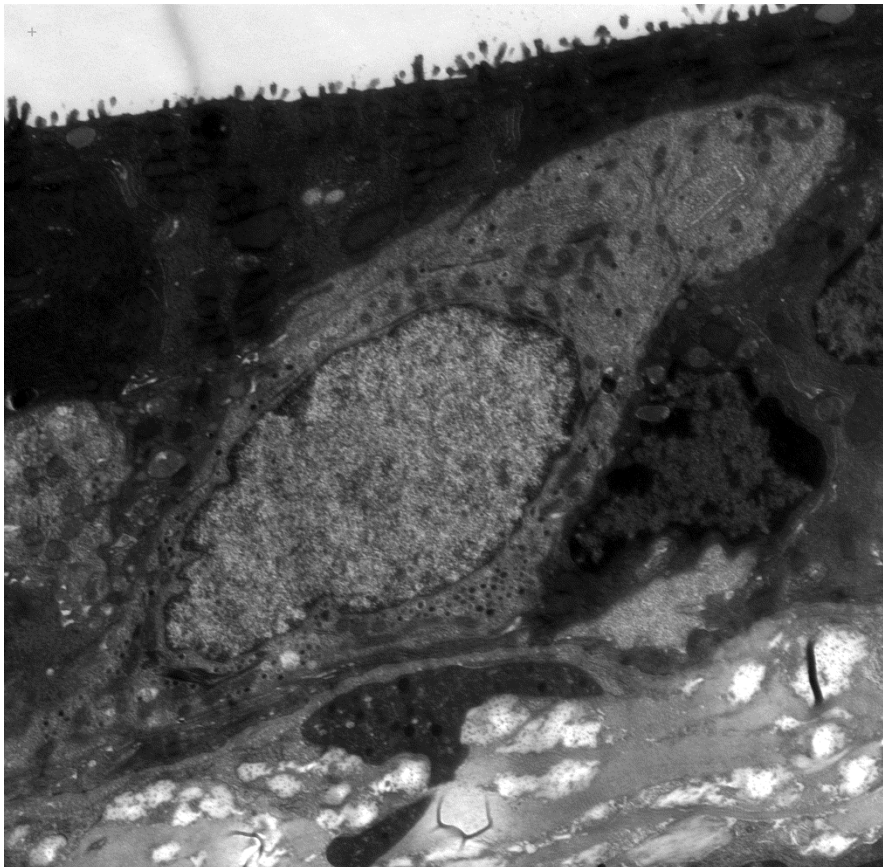


„Bedeutung von neuroendokrinen Zellen für die Signalübertragung an sensorischen Nervenfasern in den Atemwegen“

Lisa-Christina Hübner



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin des Fachbereichs Anatomie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Süleyman Ergün

**Bedeutung von neuroendokrinen Zellen für die Signalübertragung an
sensorischen Nervenfasern in den Atemwegen**

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. dent.
im Fachbereich für Anatomie und Zellbiologie
der Julius- Maximilians-Universität Würzburg

Eingereicht von
Lisa-Christina Hübner
Zahnärztin aus Leverkusen
Würzburg 2019

Referent bzw. Referentin: Prof. Dr. Krasteva-Christ

Korreferent bzw. Korreferentin: Prof. Dr. Carmen Villmann

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2020

Die Promovendin ist Zahnärztin

***In Liebe
meinen Eltern***

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	4
2.1 Die Trachea	4
2.1.1 Zellen im Trachealepithel der Maus	5
2.1.2 Die Bürstenzelle	6
2.1.3 Die neuroendokrine Zelle	8
2.1.4 Innervation der Trachea	10
2.1.5 Die neurogene Entzündung	12
2.2 Transmissionselektronenmikroskopie	13
3. Material und Methoden	15
3.1 Immunhistochemie	15
3.1.1 Versuchstiere	15
3.1.2 Organentnahme und Anfertigung von Kryoschnitten	15
3.2 Indirekte Immunfluoreszenz an der Trachea	21
3.2.1 Immunhistochemie an Gewebeschnitten der Trachea	21
3.2.2 Immunhistochemie der Whole-Mount-Präparate der Trachea	22
3.2.3 Statistische Auswertung	23
3.3 Elektronenmikroskopie	23
3.3.1 Eponeinbettung	23
3.3.2 Tomographische Rekonstruktion	24

4. Ergebnisse	26
4.1 Immunhistochemische Auswertungen	26
4.1.1 Auswirkung der Stimulation mit Denatonium auf die Anzahl der CGRP-positiven Zellen	26
4.1.2 Auswirkung der Stimulation mit Denatonium auf die CGRP-positiven Nervenfasern	27
4.1.3 Nachweis von neuroendokrinen Zellen bei GAD-67-Mäusen	30
4.1.4 Quantifizierung der neuroendokrinen Zellen in <i>TRPM5^{+/+}</i> - und <i>TRPM5^{-/-}</i> -Mäusen	32
4.1.5 Auswirkungen der Stimulation mit Denatonium auf die Anzahl der neuroendokrinen Zellen in <i>TRPM5^{+/+}</i> - und <i>TRPM5^{-/-}</i> -Mäusen	32
4.1.6 Auswirkungen der Stimulation mit Denatonium auf die Anzahl der CGRP-positiven Nervenfasern in <i>TRPM5^{+/+}</i> - und <i>TRPM5^{-/-}</i> -Mäusen	34
4.2 Elektronenmikroskopische Auswertungen	35
4.2.1 Elektronenmikroskopische Auswertungen der Kontakte zwischen neuroendokrinen Zellen und Nervenfasern	35
4.2.2 Tomographische Rekonstruktion von Nervenfaserkontakten zu neuroendokrinen Zellen	39
5. Diskussion	42
5.1 Ergebnisdiskussion	42
5.1.1 Effekt von Denatonium auf die CGRP-positiven Zellen	42
5.1.2 Veränderte Morphologie der CGRP-positiven Nervenfasern nach Stimulation mit Denatonium	44
5.1.3 Auswirkungen der Stimulation mit Denatonium auf die CGRP-positiven Zellen bei <i>TRPM5^{+/+}</i> - und <i>TRPM5^{-/-}</i> -Mäusen	46

5.1.4 Auswirkungen der Stimulation mit Denatonium auf die CGRP-positiven Nervenfasern bei *TRPM5*^{+/+}- und *TRPM5*^{-/-}- Mäusen 47

5.2 Methodenkritik 47

5.2.1 Grenzen der dreidimensionalen Darstellung von neuroendokrinen Zellen anhand von Serienschnitten 47

5.2.2 Methode der tomographischen Rekonstruktion 48

6. Zusammenfassung 50

7. Summary 51

8. Literaturverzeichnis 52

9. Erklärung

Liste der verwendeten Materialien

Danksagung

Lebenslauf

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Organentnahme

Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Elektronenmikroskops

Abb. 3: Einfluss von verschiedenen Denatoniumkonzentrationen auf die Anzahl der CGRP-positiven Zellen in den drei Abschnitten der Trachea bei C57BL/6J-Mäusen

Abb. 4: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Trachealringen

Abb. 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von CGRP-positiven Nervenfasern

Abb. 6: Neuroendokrine Zellen in der Trachea bei GAD-67-eGFP-Mäusen

Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung eines Whole-Mount-Präparates der Trachea

Abb. 8: Vergleich der Anzahl der neuroendokrinen Zellen bei *TRPM5^{+/+}*- und *TRPM5^{-/-}*- Mäusen

Abb. 9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von extraepithelialen Nervenfasern.

Abb. 10: Bürstenzelle umschließt neuroendokrine Zelle

Abb. 11: Nervenfaser kontaktiert neuroendokrine Zelle

Abb. 12: Neuroendokrine Zelle und Nervenfaserbündel

Abb. 13: Ausschnitt aus einer Tilt-Serie der 3-D-Tomographie

Abb. 14: Tomographische Rekonstruktion einer Nervenfaser

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	bakterielles künstliches Chromosom (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
BM	Basalmembran
BZ	Bürstenzelle
CGRP	Calcitonin-Gen-verwandtes Peptid (<i>Calcitonin gene-related peptide</i>)
ChAT	Cholinacetyltransferase
eGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
KO	Knock out
Lu	Lumen
MVCs	mikrovillöse Zellen (<i>mikrovillous cells</i>)
n.s.	nicht signifikant
NeZ	Neuroendokrine Zelle
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PP	Phosphatpuffer
SCCs	vereinzelte chemosensorische Zellen (<i>solitary chemosensory cells</i>)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TRPM5	TRP-Kanal der Melastatin-Unterfamilie (<i>transient receptor potential channel</i>)

1. Einleitung

Neuroendokrine Zellen entstammen der Neuralleiste und sind Bestandteil des diffusen neuroendokrinen Systems (DNES). Sie zählen zu den hormonbildenden Zellen und kommen gehäuft im Respirationstrakt, im Urogenitaltrakt, sowie im Gastrointestinaltrakt vor. Sie können alleine, oder in Form von neuroepithelialen Körpern vorliegen. Hauptmerkmal der neuroendokrinen Zellen sind die zahlreichen Vesikel mit dichtem Kernbereich (dense-core-Vesikel), die sich vornehmlich im basalen Teil der Zelle befinden. Hierbei handelt es sich um verschiedene peptidhaltige Granula. Diese enthalten Serotonin, Calcitonin, Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), Somatostatin und Adenosintriphosphat (ATP) (Adriaensen et al. 2006), sowie Cholezystokinin und Gamma-Aminobuttersäure (GABA). CGRP ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Neuropeptid, welches überwiegend in C- und A δ -Nervenfaser vorkommt (Russell et al. 2014). Es stellt eine der stärksten vasodilatatorischen Substanzen dar. Des Weiteren sezernieren die neuroendokrinen Zellen Hormone und Neurotransmitter, wie zum Beispiel Substanz P. Die verschiedenen Zelltypen im Trachealepithel sind in der Lage, über Schlussleistenkomplexe oder Adhäsionskontakte miteinander zu kommunizieren. Dies ermöglicht es ihnen, das Eindringen von Schadstoffen zu verhindern (Mitic, Van Itallie et al., 2000). Um herausfinden zu können, ob nach Stimulation mit Bittersubstanzen das CGRP aus Neuronen oder neuroendokrinen Zellen freigesetzt wird, wurde in der vorliegenden Arbeit eine spezielle immunhistochemische Färbung durchgeführt. Dafür wurde GAD-67, ein spezieller Marker für GABAerge neuroendokrine Zellen, verwendet. Die GAD67-eGFP-Maus zeigt einen Subtyp von neuroendokrinen Zellen. Es sollte geprüft werden, ob diese Zellen CGRP enthalten. Glutamat-Decarboxylase (GAD) ist ein Enzym, welches entscheidend für die Decarboxylierung von Glutamat zu γ -Aminobuttersäure (GABA) und CO₂ ist, also für die Biosynthese von GABA, dem wichtigsten hemmenden Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Die beiden Isoformen GAD-67 und GAD-65 kommen ausschließlich bei Säugetieren vor. In einer weiteren Versuchsreihe erfolgte die

Stimulation der neuroendokrinen Zellen mit einem Bitterstoff, um zu untersuchen, ob das CGRP von den neuroendokrinen Zellen freigesetzt wird. Verwendet wurde in diesem Fall Denatoniumbenzoat, die bitterste bekannte Substanz (Davis et al. 1987), welche aus einer vierfachen Ammoniumverbindung besteht. Als Derivat von Lidocain, einem Lokalanästhetikum, wurde Denatoniumbenzoat 1958 entdeckt und heute als Bitterstoff in Rattengift oder zur Vergällung von Alkohol angewendet. Anhand der Stimulation mit einem Bitterstoff sollte geprüft werden, ob die CGRP-positiven neuroendokrinen Zellen nach Stimulation weiterhin vorhanden sind, oder sich ihre Anzahl verändert. Zudem wurde ein spezieller *TRPM5^{+/+}*- (Wildtyp) und *TRPM5^{-/-}*- (KO-Typ) Mausstamm verwendet. TRPM5 ist ein Calcium-aktivierter Kationenkanal, der sowohl von chemosensorischen Zellen (SCCs) der Nasenschleimhaut, als auch von mikrovillösen Zellen (MVCs) des olfaktorischen Epithels exprimiert wird (Genovese et al. 2018). Darüber hinaus ist bekannt, dass cholinerge Bürstenzellen, die zum Beispiel im Thymus von Mäusen vorkommen, TRPM5 exprimieren (Panneck et al. 2014). Zudem konnten Bürstenzellen in der Trachea von Mäusen nachgewiesen werden, welche immunreaktiv für TRPM5 waren und höchstwahrscheinlich Acetylcholin für die parakrine Kommunikation nutzen (Krasteva-Christ et al. (2015). Bei dem *TRPM5^{-/-}* Mausstamm handelt es sich um Mäuse, denen spezielle Exons (15-19) der TRPM5-Sequenz fehlen. *TRPM5^{-/-}* Mäuse zeigen eine reduzierte Antwort auf die Stimulation mit Bitterstoffen, süßen oder Umami-Substanzen (Damak et al. 2006). Zunächst wurde untersucht, ob das Vorkommen einer defekten Geschmackstransduktions-Kaskade (*TRPM5*-Defizienz) zu Veränderungen in der Anzahl von neuroendokrinen Zellen im Trachealepithel dieser Mäuse führt. Darüber hinaus wurde nach Stimulation mit Denatonium erneut die Anzahl der neuroendokrinen Zellen quantifiziert. Dies ist besonders im Hinblick auf die Fragestellung, ob CGRP bei Stimulation mit Bitterstoffen von den neuroendokrinen Zellen oder von den Nervenfasern ausgeschüttet wird, interessant.

Zielsetzung der Arbeit

Folgende Fragestellungen wurden in diesem Zusammenhang untersucht:

1. Welche Kontakte gibt es zwischen neuroendokrinen Zellen und Nervenfasern?
2. Welche Bedeutung kommt den neuroendokrinen Zellen bei der Entstehung einer neurogenen Entzündung zu?
3. Hat die Stimulation mit Bittersubstanzen einen Einfluss auf die Anzahl der CGRP-positiven Nervenfasern?

2. Literaturübersicht

2.1 Die Trachea

Die Trachea (Luftröhre) ist ein spindelförmiges Hohlorgan. Sie ist beim Menschen ca. 10-12 cm lang und besteht aus 15-20 hufeisenförmigen Knorpelspangen (*cartilago trachealis*), die durch Bänder (*Ligamenta anularia*) miteinander verbunden sind. Am unteren Ende teilt die Trachea sich in den rechten und linken Hauptbronchus. Diese teilen sich weiter auf in kleine Lappen- und Segmentbronchien sowie Bronchioli. Nach dorsal sind die Knorpelspangen geöffnet und werden durch den *Musculus trachealis* überbrückt. Die lumenale Fläche der Trachea wird durch das sogenannte respiratorische Epithel, auch als Flimmerepithel bezeichnet, ausgekleidet. Dieses besteht aus verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen, wobei die einzelnen Zellen über hochdifferenzierte Zellkontakte miteinander verbunden sind. Eine wichtige Aufgabe dieser untereinander ausgebildeten Zellkontakte in Form von Schlussleistenkomplexen oder Adhäsionskontakten besteht darin, das Eindringen von Mikroorganismen oder Schadstoffen zu unterbinden (Mitic et al. 2000). Die Morphologie der Schlussleistenkomplexe variiert dabei zwischen den jeweiligen Zelltypen, die sie begrenzen (Schneeberger 1980). Sogenannte Gap-Junctions stellen eine weitere Gruppe von Zellkontakten dar, die in Form von kanalbildenden Proteinen dafür sorgen, dass ein Ionen- und Molekülaustausch zwischen den Zellen stattfinden kann. Des Weiteren sind Trachealepithelzellen in der Lage, durch die Freisetzung von Transmittern mit den umliegenden Strukturen und Zellen direkt zu kommunizieren (Robbins RA 1997). Eine bedeutende Aufgabe der luftleitenden Atemwege und der Trachea besteht in der Erwärmung und Befeuchtung der eingeatmeten Luft. Zudem kommt es durch die mit Flimmerhärchen ausgekleidete Epithelschicht bereits zu einer groben Reinigung der Atemluft. Schmutzpartikel und Noxen werden durch das Flimmerepithel gefiltert und vom Eindringen in das gasaustauschende System abgehalten. Ein weiterer wichtiger Schutzmechanismus der Lunge besteht in der mukoziliären Clearance. Dieser Prozess beschreibt die Ausbildung einer zweiphasigen Schleimschicht, die das

Flimmerepithel überzieht. Die wässrige Phase liegt dem Epithel direkt auf und ist von einer mukösen Phase überzogen (Rubin 2002). Getrennt werden die beiden Phasen durch eine dünne Schicht Surfactant (Robbins RA 1997). Die muköse Phase bindet eindringende Partikel (Voynow et al. 2009), die dann durch den Zilienschlag in Richtung der Mundhöhle transportiert werden (Knowles & Boucher, 2002). Der Zilienschlag besteht aus einem effektiven Vorwärtsschlag und einer Rückholbewegung (Wanner et al. 1996). Der Zilienschlag findet aktiv in Richtung des Kehlkopfes statt, um zu gewährleisten, dass Partikel und Mukus oralwärts abtransportiert werden (Wanner et al. 1996). Es konnte bereits gezeigt werden, dass zilienträgende Zellen sowohl im thorakalen, als auch im zervikalen Bereich der Trachea vorkommen, wobei deren Anzahl im Epithel über dem Muskelteil signifikant höher ist, als im Epithel über dem Knorpelteil (Klein et al., 2008). Der Zilienschlag wird über verschiedene Mechanismen reguliert. So nimmt die Freisetzung von ACh aus spezialisierten Zellen des Trachealepithels zum Einen über muskarinische Rezeptoren und zum Anderen über nikotinsche Acetylcholinrezeptoren, Einfluss auf den zilienschlagvermittelten Partikeltransport (Kummer et al. 2008). Es gelang mit Hilfe einer speziell entwickelten Messmethode, die Partikeltransportgeschwindigkeit, unabhängig von der Mukusproduktion, zu bestimmen (Klein et al., 2008). Dies ermöglicht es, direkt auf den Einfluss der verschiedenen muskarinischen Rezeptoren (MR) auf die Transportleistung der zilienträgenden Zellen zu schließen (Klein et al., 2008). Es zeigte sich, dass die Rezeptorsubtypen M1, M2 und M3 maßgeblich an der Regulation des Partikeltransportes beteiligt sind (Klein et al., 2008). Diese Erkenntnisse sind zur Behandlung von chronischen Atemwegserkrankungen von besonderer Bedeutung.

2.1.1 Zellen im Trachealepithel der Maus

Im hochprismatischen, mehrreihigen Flimmerepithel in der Mastrachea werden mehr als zwölf verschiedene Zellarten unterschieden (Robbins RA 1997). Die

wichtigsten Zelltypen stellen die zilientragende Zelle, die Bürstenzelle, die neuroendokrine Zelle, die Basalzelle, die Becherzelle und die sekretorische Zelle dar. Den am häufigsten vorkommenden Zelltyp (mit 36-55% aller Zellen) im Trachealepithel der Maus stellen die sekretorischen Zellen gemeinsam mit den zilientragenden Zellen dar (Weitz 2012). Die zilientragenden Zellen sitzen der Basalmembran breit auf. Sie tragen zahlreiche ca. 6 µm lange Zilien an ihrer apikalen Seite (Pavelka et al. 1976). Mit einem Anteil von 50-60% (Pack et al. 1980) aller Zellen im Trachealepithel, ist die sekretorische Zelle ebenfalls sehr häufig zu finden. Sie tritt in Gruppen auf und trägt kurze Mikrovilli an ihrer apikalen Membran (Pack et al. 1980). Die Basalzelle, welche der Basalmembran direkt aufsitzt und das Lumen nicht erreicht, stellt mit 5-10% aller im Trachealepithel vorkommenden Zellen den dritthäufigsten Zelltyp dar (Pack et al. 1980). Ein weiterer Zelltyp im Trachealepithel der Maus ist die Becherzelle, mit einem Vorkommen von 0,5% (Pavelka et al. 1976). Ihre Hauptaufgabe besteht in der Schleimproduktion.

2.1.2 Die Bürstenzelle

Die Bürstenzelle ist morphologisch durch die zahlreichen Mikrovilli auf ihrer apikalen Seite gekennzeichnet. Diese Zellart kommt sowohl im respiratorischen als auch im digestiven Trakt vor (Sbarbati et al. 2005). Im respiratorischen Epithel von Ratten kommen sie gehäuft im Ductus alveolaris superior vor (Chang et al. 1986). Man findet sie im Larynx (Yamamoto et al. 2018), in der Nasenschleimhaut von Mäusen und Ratten (Finger et al., 2003), sowie in der Tuba auditiva der Maus (Krasteva et al. 2012). Ebenso konnten Bürstenzellen im Trachealepithel (Krasteva-Christ et al. 2015) und im Thymusmark von Mäusen nachgewiesen werden (Panneck et al. 2014). Sie kann als chemosensorische Zelle fungieren und ist in der Lage, Bitterstoffe bakteriellen Ursprungs, wie Acyl Homoserin Lactone, wahrzunehmen und in Folge dessen die Atemfrequenz zu senken (Krasteva et al. 2011). Dies stellt einen Schutzmechanismus dar und verhindert, dass eingedrungene Schadstoffe in tiefere Abschnitte des Atmungssystems gelangen. Bürstenzellen in der Trachea

von Mäusen exprimieren die Geschmacksrezeptoren Tas2R105 (taste receptor, type 2, member 105) und Tas2R108 (taste receptor, type 2, member 108), sowie die Signaltransduktionsmoleküle α -Gustducin, (ein G-Protein) und Phospholipase C β 2, die für die Bitter-, Süß- und Umami-Geschmackswahrnehmung in der Geschmacksknospe der Zunge verantwortlich sind (Krasteva et al. 2011). Neueste Untersuchungen beschäftigten sich mit der Herkunft von Interleukin 25 (IL-25) und dessen Bedeutung bei allergischem Asthma und chronischer Rhinosinusitis. Es konnte gezeigt werden, dass das IL-25, welches als Botenstoff für allergisches Asthma und chronische Rhinosinusitis verbunden mit nasalen Polypen gilt, hauptsächlich von solitären chemosensorischen Zellen (SCCs) im Trachealepithel exprimiert wird (Kohanski et al. 2018). Ebenso konnte man nachweisen, dass bei Patienten mit diesem Krankheitsbild die Zahl der SCCs deutlich erhöht war (Kohanski et al. 2018). Weitere aktuelle Studien, die sich mit der Untersuchung des Sputums von Asthmapatienten beschäftigen, zeigen, dass IL-25 besonders mit schweren Formen von Asthma assoziiert ist (Paplińska-Goryca et al. 2018). Die Ergebnisse zeigen, dass bei Patienten mit einer schweren Form von Asthma, die IL-25-Konzentration gegenüber derjenigen der Kontrollgruppe, deutlich erhöht war (Paplińska-Goryca et al. 2018).

Bei Untersuchungen an embryonaler Nasenschleimhaut von Fröschen konnte neben Becher- und zilienträgenden Zellen ein weiterer Zelltyp gefunden werden, der als „kleine sekretorische Zelle“ (SSC = small secretory cell) bezeichnet wird (Walentek et al. 2014). Morphologisch ähneln diese Zellen den Bürstenzellen, da sie ebenfalls über zahlreiche apikale Mikrovilli verfügen, wobei diese nicht so starr ausgerichtet sind, wie die der Bürstenzellen (Finger et al. 2003). Diese Zellen sind in der Lage, Serotonin zu synthetisieren und zu sezernieren (Walentek et al. 2014). Des Weiteren zeichnen sich diese Zellen durch große apikale sekretorische Vesikel aus (Dubaiissi et al. 2014). Sie weisen zahlreiche Mitochondrien auf und haben Kontakt zu Nervenfasern, weshalb sie den neuroendokrinen Zellen in der Lunge ähneln (Finger et al. 2003).

2.1.3 Die neuroendokrine Zelle

Die neuroendokrinen Zellen sind Teil des diffusen neuroendokrinen Nervensystems (DNES) und entstammen der Neuralleiste. Sie können alleine oder in Form von neuroepithelialen Körperchen vorliegen. Mikroskopisch zeichnen sie sich durch zahlreiche Vesikel im basalen Teil der Zelle aus, welche verschiedene Neuropeptide wie CGRP, Substanz P, Somatostatin und darüber hinaus auch ATP und Serotonin enthalten (Adriaensen et al. 2006). Lange wurde angenommen, dass neuroendokrine Zellen Chemosensoren sind, die mit Nervenfasern interagieren und sauerstoffsensitiv sind (Van Lommel et al. 1999). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass neuroendokrine Zellen sowohl als Chemorezeptoren (Kemp et al. 2002), als auch als Mechanorezeptoren fungieren (Lembrechts et al. 2012), wobei die genaue Funktion noch nicht vollständig geklärt werden konnte. In Bezug auf die Entstehung von kleinzelligem Lungenkrebs (SCLC) bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass bereits die frühen Läsionen aus neuroendokrinen Zellen zusammengesetzt sind und daher die Erkrankung sehr wahrscheinlich direkt aus den neuroendokrinen Zellen entsteht (Park et al. 2011). In neueren Untersuchungen an menschlichen Trachealepithelzellen konnte hingegen gezeigt werden, dass SCLC möglicherweise aus Bürstenzellen entstehen kann. Hierzu wurde ein spezieller Transkriptionsfaktor (POU2F3) untersucht, welcher sowohl in Bürstenzellen als auch in SCLC-Tumoren exprimiert wird (Huang et al. 2018). Es zeigte sich bei einer Variante des SCLC-Tumors, dass keine neuroendokrinen Zellen nachgewiesen werden konnten, während jedoch chemosensorische Bürstenzellen gefunden wurden (Huang et al. 2018). Diese Ergebnisse zeigen, dass SCLC -Tumore nicht ausschließlich aus neuroendokrinen Zellen entstehen. Eine Erkrankung, welche von den neuroendokrinen Zellen in den Atemwegen beim Menschen ausgeht, stellt die diffuse idiopathische neuroendokrine Zellhyperplasie (DIPNECH) dar. Hierbei handelt es sich um ein seltenes Krankheitsbild, welches sich durch die diffuse Hyperplasie von bronchialen neuroendokrinen Zellen auszeichnet (Koliakos et al. 2017). Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch Dyspnoe, Atemwegsobstruktion und chronischen Husten und wird daher fälschlicherweise

häufig als Asthma oder COPD diagnostiziert (Carr et al. 2015). Schon vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass sowohl nicht-myelinisierte als auch myelinisierte terminale Nervenstrukturen am basalen Pol der neuroendokrinen Zellen enden (Mazzone et al. 2016). In Bezug auf die Entstehung von gastrointestinalen Tumoren (GI) konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass deren Entstehung und Wachstum maßgeblich sowohl vom neuroendokrinen- als auch vom zentralen Nervensystem (ZNS) beeinflusst wird. In neueren Untersuchungen wurde der Einfluss der Darm-Gehirn-Achse (gut-brain-Achse), also der biochemische Signalweg zwischen Darm und ZNS, in Bezug auf die Entstehung und Proliferation von GI-Tumoren untersucht. Hier zeigte sich, dass das Gehirn das Wachstum von GI-Tumoren sowohl über das anatomische Nervensystem als auch über den neuroendokrinen Signalweg moduliert (Di et al. 2019). Die Ergebnisse zeigten, dass die Stimulation oder Inaktivierung des ZNS, des sympathischen und parasympathischen Nervensystems, den immunmodulatorischen Einfluss auf das vagale Nervensystem ändert und somit inflammatorische Prozesse fördert (Di et al. 2019). Dies erhöht die Inzidenz von GI-Tumoren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Modulation von Neurotransmittern und die Stimulation der Signalübertragung zwischen Nerven und Tumorzellen das Wachstum von GI-Tumoren ebenfalls beschleunigen oder hemmen kann (Di et al. 2019). Neueste Untersuchungen bezüglich der Entstehung von GI-Tumoren beschäftigten sich mit der Rolle des Notch-Rezeptors, Delta-like 3 (DLL3), im Gastrointestinaltrakt. Es konnte anhand von immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden, dass DLL3 sowohl im Gastrointestinaltrakt als auch von neuroendokrinen Karzinomen des GI-Traktes exprimiert wird (Matsuo et al. 2019). Dabei wird DLL3 direkt von neuroendokrinen Zellen exprimiert (Matsuo et al. 2019).

2.1.4 Innervation der Trachea

Die Innervation der unteren Atemwege wird über ein System reguliert, welches sich aus mehreren Anteilen zusammensetzt. Es besteht aus einem sensorischen afferenten Teil und einem autonomen efferenten Teil. Der autonome Teil gliedert sich weiterhin in einen parasympathischen und einen sympathischen Anteil. Der klassische Neurotransmitter des Sympathikus ist Noradrenalin, während Acetylcholin der typische Überträgerstoff des Parasympathikus ist. Die parasympathischen Anteile verlaufen im Nervus vagus und ziehen im zervikalen Bereich über die Nervi laryngei recurrentes zur Trachea. Diese strahlen dann als Rami tracheales in den Plexus pulmonalis ein. Über den Truncus sympathicus, welcher die sympathischen präganglionären Axone enthält, wird die Trachea sympathisch innerviert. Mittels des Plexus pulmonalis werden der Tonus der glatten Atemwegsmuskulatur, die Permeabilität des Atemwegsepithels, die Sekretion der Drüsen und der Blutfluss in den Blutgefäßen reguliert. Weitere wichtige Überträgerstoffe sind das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) (Ward et al., 1993) und das Stickstoffmonoxid (Bredt et al. 1990). Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten zeigen, dass VIP in Nervenfasern der glatten Atemwegsmuskulatur enthalten ist (Laitinen et al. 1985). Diese Nerven werden daher als VIP-erge oder peptiderge Nerven bezeichnet (Said et al. 1974). Aufgrund seiner stark relaxierenden Wirkung auf die glatte Muskulatur, ist VIP wahrscheinlich hauptverantwortlich für die Relaxation der Atemwegsmuskulatur (Kummer et al. 2008). NO (Stickstoffmonoxid) wird durch das Enzym NO-Synthase bei der Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin produziert (Moncada et al. 1989). Man findet NO in Trachealepithelzellen bei Menschen, Ratten und Mäusen, sowie in Entzündungs- und Immunzellen (Robbins et al. 1994). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NO von den Endothelzellen der Atemwege synthetisiert wird und an der Regulation der Atmung beim Menschen beteiligt ist (Kobzik et al. 1993). Die Wirkung, die diese Neuropeptide hervorrufen, wird dem nicht-adrenergen nicht-cholinergen (NANC) System zugeordnet (Widdicombe 1998). Der Nachweis von Rezeptoren in der humanen Trachea, die sensibel für Substanz P und VIP sind, erfolgte schon vor vielen

Jahren (Fischer et al. 1992). Das autonome Nervensystem, welches die Sekretion der Drüsen und die Permeabilität im Bronchialsystem moduliert, ist sowohl für die Innervation der Lunge als auch für die Ausschüttung von verschiedenen Mediatoren aus Entzündungszellen verantwortlich (Kummer et al. 2008). Unterschieden werden zum einen das non-adrenerge, non-cholinerge, inhibitorische Nervensystem und zum anderen das non-adrenerge, non-cholinerge, exzitatorische Nervensystem. Die non-adrenergen, non-cholinergen, exzitatorischen Nerven enthalten Tachykinine, wie zum Beispiel Substanz P, welche nach Stimulation mit Reizstoffen (Staub, chemische Substanzen) freigesetzt werden (Kummer et al. 2008). Substanz P ist ein Neuropeptid, welches von den peripheren sensorischen Neuronen exprimiert wird und von den sensorischen C-Fasern in den Atemwegen freigesetzt wird (Joos et al. 1994). Die Zahl der Substanz P sensitiven Nervenfasern, sowie die Anzahl der Substanz P enthaltenden jugulären Ganglien im Trachealepithel von Ratten, nimmt nach Inhalation von Diacetyl (Diketon) deutlich zu (Goravanahally et al. 2014). Dies begünstigt die Entstehung von Atemwegsentzündungen (Goravanahally et al. 2014). Das Auftreten typischer Entzündungszeichen konnte schon vor vielen Jahren in Zusammenhang mit der Freisetzung von Substanz P gebracht werden. Die Ausschüttung bewirkt im Gewebe eine Vasodilatation und eine Steigerung der Gefäßpermeabilität (Barnes 1986). Ebenfalls wird durch die Freisetzung von Substanz P die Schleimsekretion und die Kontraktion der glatten Muskulatur gesteigert (Barnes 1986). Diese Symptome werden insgesamt als „neurogene Entzündung“ zusammengefasst (Kummer et al. 2008). Das non-adrenerge, non-cholinerge, inhibitorische Nervensystem, welches ebenfalls im Vagus verläuft, konnte bereits vor vielen Jahren im Gastrointestinal-, im Urogenitaltrakt und im respiratorischen sowie im kardiovaskulären System von Wirbeltieren und Menschen nachgewiesen werden (Burnstock 1986). Dies ist anhand der Embryogenese zu erklären, da die Trachea während der vierten Embryonalwoche aus dem Epithel des Vorderdarms entsteht (Brand-Saberi et al. 2014). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in den Nervenfasern der

Atemwege VIP enthalten ist, welches als Neurotransmitter für die Muskelrelaxation der Atemwege verantwortlich ist (Kummer et al. 2008).

2.1.5 Die neurogene Entzündung

Die sensorische Stimulation von Nervenfasern bewirkt eine Freisetzung von bestimmten Neuropeptiden, wie CGRP oder Substanz P (Herbert et al. 2002). Durch die Ausschüttung dieser Mediatoren wird eine Reaktion im Gewebe hervorgerufen. Es kommt in Folge dessen zur Aktivierung von Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen (Berczi et al. 1996). Dass es nach Reizung der Nerven zu einer Reaktion kommt, konnte bereits 1927 von Lewis gezeigt werden. Er beschrieb, wie die mechanische Reizung der Haut zu einer Rötung, einem Erythem und einem Ödem führt („triple response“) (Lewis et al. 1927). Die Ödembildung wird durch die erhöhte Gefäßpermeabilität und Hyperämie verursacht (Herbert et al. 2002). Diesen Prozess bezeichnet man insgesamt als „neurogene Entzündung“ (Jancso et al. 1967). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass eine neurogene Entzündung in den Atemwegen durch verschiedene Inhalationsanästhetika verursacht wird. Es stellte sich heraus, dass Desfluran und Isofluran eine irritative Wirkung auf die sensorischen Nerven in den Atemwegen haben und die Ausschüttung von Neuropeptiden bewirken (Kichko et al. 2015). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass der Nervus vagus ebenfalls bei der Entstehung einer neurogenen Entzündung beteiligt ist. Es ist davon auszugehen, dass afferente Nerven in der Medulla oblongata bei dem Entzündungsprozess mitwirken (Chen et al. 2017). So führt die Durchtrennung bestimmter Äste des Nervus vagus zu einer verringerten neuronalen Aktivität in der Medulla oblongata und einer weniger stark ausgeprägten Entzündung in den Atemwegen (Chen et al. 2017). In Bezug auf die chemosensorischen Zellen (SCCs) im Epithel der Nasenschleimhaut konnte gezeigt werden, dass die Stimulation dieser Zellen mit Denatonium zu einer signifikanten inflammatorischen Reaktion führt (Saunders et al. 2014). SCCs sind, wie die Bürstenzellen in der Trachea, in der Lage ACh zu exprimieren und dadurch peptiderge Nervenfasern im Epithel zu aktivieren (Saunders et al.

2014). In der Folge kommt es zu frühen Zeichen einer Entzündungsreaktion, welche sich in Form von Plasmaextravasation und Mastzelldegranulation manifestiert (Saunders et al. 2014). In neuesten Studien konnte gezeigt werden, dass der dorsale vagale Komplex den Inflammationsprozess maßgeblich moduliert. Demnach sind Neurone aus diesem Komplex bei Patienten mit chronischer Entzündung in den Atemwegen, bedingt durch gastroösophagealen Reflux, an der Entstehung dieser Entzündung beteiligt (Chen et al. 2018).

2.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie wird, im Gegensatz zur Lichtmikroskopie, die zu untersuchende Probe von einem Elektronenstrahl durchleuchtet. Die Wellenlänge von Elektronen ist im Vergleich zur Wellenlänge von Licht im sichtbaren Bereich deutlich kürzer und hat somit eine höhere Auflösung (Moeller, 2010). Es ist möglich, Strukturen bis zu einer minimalen Größe von 0,1 Nanometern zu betrachten (Mißfeldt, 2014). Als Elektronenquelle dient bei der Transmissionselektronenmikroskopie eine thermische Kathode, welche Elektronen emittiert (Moeller, 2010). Die Elektronen werden durch die Kathode, welche an eine Hochspannung angelegt ist, in Richtung der Anode beschleunigt. Die Hochspannung variiert zwischen einigen Kilovolt bis zu mehreren Megavolt. Durch diverse Elektronenlinsen, welche ein elektrisches Feld erzeugen, werden die Elektronen gebündelt und abgelenkt. Nach Passieren der Kondensorenlinse werden die Elektronenstrahlen mittels der Objektivlinse fokussiert. Es entsteht ein erstes vergrößertes Zwischenbild, welches mit Hilfe der Zwischenlinse ein zweites vergrößertes Zwischenbild abbilden lässt (Moeller, 2010). Die Projektivlinse dient der weiteren Vergrößerung und lässt das Endbild entstehen. Das entstandene Bild kann über einen fluoreszierenden Schirm direkt betrachtet oder mittels einer CCD-Kamera (charge-coupled device) aufgezeichnet werden. Die Probe wird zu Beginn der Untersuchung in das Innere des Mikroskops eingeschleust. Dazu wird die zu untersuchende Probe zunächst in den dafür vorgesehenen Probenhalter gelegt, der dann in das Mikroskop eingeführt wird. Im Inneren des

Mikroskops herrscht ein Vakuum. Das erzeugte Vakuum ist von immenser Wichtigkeit, damit die Elektronen nicht durch andere Moleküle abgelenkt werden, wodurch das Ergebnis verfälscht werden würde. Damit der Elektronenstrahl in das zu untersuchende Gewebe eindringen kann, müssen zunächst Ultradünnschnitte (50-200 nm) des Gewebes angefertigt werden (McDonald et al. 2006). Dazu wird das Gewebe zunächst mittels verschiedener Chemikalien fixiert, eingebettet und hitzopolymerisiert (McDonald et al. 2006). Anschließend können dann mit Hilfe eines Ultramikrotoms die Ultradünnschnitte angefertigt werden. Die Auswertung am Elektronenmikroskop ist nach erfolgreicher Kontrastierung der Schnitte möglich. Die konventionelle Elektronenmikroskopie ermöglicht es, eine zweidimensionale Darstellung der zu untersuchenden Proben zu erzeugen. Dieser Methode steht das Verfahren der dreidimensionalen Tomographie gegenüber. Während bei der konventionellen Elektronenmikroskopie lediglich zwei Dimensionen (x- und y-Achse) berücksichtigt werden, wird bei der 3D-Tomographie eine dritte Dimension (z-Achse) hinzugezogen (Kaltdorf et al. 2017). Bei der Tomographie werden die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der zu untersuchenden Probe aus vielen verschiedenen Winkeln aufgenommen. Dies ermöglicht es, die Informationen der einzelnen Bilder in eine sogenannte „Tilt-Serie“ zusammenzuführen, um somit eine virtuelle Darstellung eines bestimmten Abschnittes zu erzeugen (Kaltdorf et al. 2017). Mit Hilfe verschiedener Software-Programme ist es möglich, diese Tilt-Serien zu bearbeiten und ein dreidimensionales Tomogramm zu erstellen.

3. Material und Methoden

3.1 Immunhistochemie

3.1.1 Versuchstiere

Für die durchgeführten Versuche wurden *TRPM5*^{+/+}- und *TRPM5*^{-/-}- Mäuse (Uli Boehm, Universität des Saarlandes), ChAT-eGFP- (Tierzucht der Universität Würzburg), sowie GAD67-eGFP- (Tierzucht der Universität Würzburg) Mäuse beider Geschlechter verwendet, welche ca. 12-16 Wochen alt waren. Bei den GAD67-eGFP-Mäusen handelte es sich um transgene Tiere, bei denen durch Einbringen eines speziellen eGFP (enhanced green-fluorescent-protein) rekombinanten Vektors, das Enzym GAD-67 mit einem grün-fluoreszierenden Protein gekoppelt wurde. Die Mäuse exprimieren dann GFP. Glutamat-Decarboxylase (GAD) ist ein Enzym, welches bei Säugetieren in den Isoformen GAD-67 und GAD-65 vorliegt. Dieses Enzym katalysiert die Abspaltung des Kohlenstoffdioxidmoleküls am Glutamat, also die Decarboxylierung zu γ -Aminobuttersäure (GABA). Die ChAT-eGFP-Mäuse exprimieren ebenfalls eGFP. Hierzu wird mit Hilfe der Bacterial-Artificial-Chromosome (BAC)-Technologie das BAC in das Genom eingebracht und an den Promotor des Enzyms zur Synthese von ChAT gekoppelt. Durch die Fluoreszenz des Proteins ist es möglich, die Zellen, in denen das Protein exprimiert wird, lichtmikroskopisch zu betrachten. Für die Durchführung der Versuche wurde jeweils der dazugehörige Wildtyp-Mausstamm verwendet. Die Tiere wurden in einer spezifiziert pathogen-freien Tierhaltung (Uni Würzburg) bei einem normalen Nacht-Tag-Rhythmus gehalten. Ernährt wurden die Tiere mittels Standarddiät. Die verwendeten Versuchstiere wurden durch zervikale Dislokation getötet.

3.1.2 Organentnahme und Anfertigung von Kryoschnitten

Die Tiere wurden zunächst durch subcutane Injektion von 25-prozentigem Urethan (Sigma-Aldrich GmbH; Steinheim), im Bereich des Hinterlaufes

anästhesiert. Dazu wurden 0,2 ml/30 g Körpergewicht verabreicht. Die Lagerung der Mäuse auf einer Wärmedecke (36°C) für 30 Minuten, erfolgte ab dem Zeitpunkt der Urethan-Injektion. Nach Ablauf der 30 Minuten wurden die Tiere zunächst dorsal fixiert, um das Kanülieren der Trachea mittels eines Plastikschauchs zu ermöglichen. Der Außendurchmesser dieses Schlauchs betrug 1,2 mm und im Inneren 0,7 mm. Im Vorfeld erfolgte zunächst ein Medianschnitt der Haut im Bereich des Kehlkopfes, um die Trachea freizulegen. Das Einbringen des Plastikschauchs erfolgte nach Präparation und anschließender Durchtrennung des Ligamentums cricothyroideum. Der Schlauch wurde ca. zwei-drei mm in die Trachea eingebracht, sodass die Atmung der Mäuse gewährleistet war. Ein Teil der Versuchstiere atmete über diesen Schlauch 20 µl Denatonium in verschiedenen Konzentrationen (1 mM, 10 mM, 20 mM) über einen Zeitraum von 30 Minuten ein. Während die Kontrollgruppe keine Stimulation mit Denatonium erhielt. Im Anschluss fand eine Perfusion mit Zamboni oder 4-prozentigem Phosphatpuffer (PFA) statt. Nach Ablauf der Zeit wurde das Abdomen eröffnet, die Aorta durchtrennt sowie Herz und Lunge freipräpariert. Zur Vermeidung von Thrombenbildung erfolgte die Injektion von Heparin (Heparin-Natrium 25.000 Ratiopharm, Ulm) in den linken Ventrikel. Danach wurde die Perfusionskanüle in den linken Ventrikel geschoben und mit Hilfe einer Gefäßklemme an der Herzspitze fixiert. Im Anschluss wurde der rechte Herzvorhof eröffnet. Die Tiere wurden für 10-15 Minuten mit Polyvinylpyrrolidon (PVP), NaCl und Procain Hydrochlorid perfundiert, bis nach ca. 15 Minuten die aus dem rechten Ventrikel austretende Spüllösung klar war. Anschließend folgte für weitere 10-15 Minuten die Perfusion mit dem Fixans (siehe Tab.1). Anschließend wurde die Trachea entnommen und caudal des Kehlkopfes und der Bifurkation durchtrennt und in drei Abschnitte unterteilt. Der erste Abschnitt reichte bis zum fünften Trachealknorpel. Der zweite Abschnitt reichte vom sechsten bis zum elften Trachealknorpel und der letzte Abschnitt umfasste die zwölfte Knorpelspange und die Hauptbronchien. Die Präparate wurden über Nacht bei 4°C in 18-prozentiger Saccharose in 0,1 PP-Puffer eingelegt. Zum Einbetten der entnommenen Tracheen wurden diese einzeln in Blöckchen mit Hilfe von

Tissue-Tek (O.C.T. Compound, Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande) konserviert. Dazu wurden die Präparate in Petrischalen gelegt und in einem Kupferzylinder, welcher durch Stickstoff gekühltes Isopentan (-20°C) enthielt, eingefroren. Aus den gefrorenen Blöckchen wurden mit Hilfe eines Kryostaten (Leica CM 3050S; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar), 10µm dicke Serienschnitte angefertigt und auf SuperFrost Plus®-Objektträger (25x75x1,0mm; R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen) aufgezogen. Es folgte eine Trocknung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Auswertung der Gewebeproben erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss Axioskop2 mot plus Mikroskop, AxioCam MRc, Axiovision 4-Software; Carl Zeiss GmbH, Jena). Für den Vergleich der extraepithelialen Fasern nach Stimulation mit Denatonium wurden die Trachealringe am Fluoreszenzmikroskop abschnittsweise fotografiert und mit Hilfe von PowerPoint (Microsoft, 2010) wieder zu Ringen zusammengesetzt. Dies ermöglichte es, eine Gesamtübersicht über die Morphologie der Fasern zu erhalten.

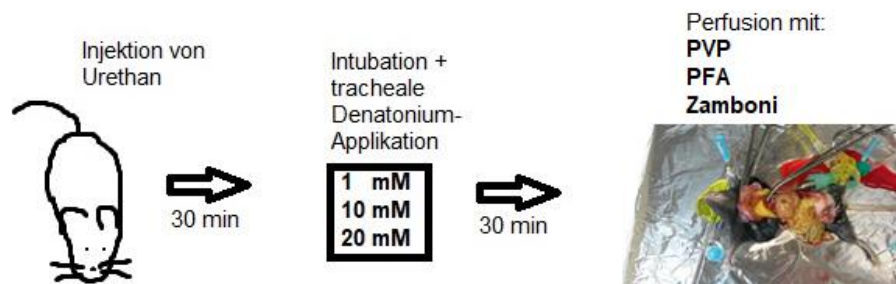


Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Organentnahme

0,2 M Lösung A	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (31,2 g/l)
0,2 M Lösung B	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35,6 g/l)
0,1 M Phosphatpuffer (PP)	115 ml Lösung A + 385 ml Lösung B Auf 1000 ml Aqua dest. auffüllen pH 7,4 einstellen.
0,005 M Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	28,75 ml Lösung A 96,2 ml Lösung B 22,4 g NaCl Auf 5000 ml Aqua dest. auffüllen. pH 7,4 einstellen.
Fixans: 4%iges Paraformaldehyd in 0,1 PP (4%PFA)	8% Paraformaldehyd in dest. H_2O geben und auf 70°C erhitzen. 2 M NaOH tropfenweise zugeben, bis die Lösung klar wird. Die gleiche Menge 0,2 M Phosphatpuffer zugeben und filtrieren. pH 7,4 einstellen.
PBS+S	28,75 ml Lösung A 96,20 ml Lösung B 44,8 g NaCl Auf 5000 ml Aqua dest. auffüllen. pH 7,4 einstellen.
Zamboni (2% Formaldehyd mit 15% Pikrinsäurelösung in 0,1 M PP)	200 ml Lösung A+ 300 ml Lösung B+ 50 ml Formaldehydlösung (37%)+ 150 ml Pikrinsäurelösung (2x gefiltert) 300 ml H_2O

Spüllösung: PVP	2,5% Polyvinylpyrrolidon 0,9% NaCl 0,5% Procainhydrochlorid pH 7,4 einstellen.
Blocklösung A	10% NHS (normal horse serum) 0,1% BSA (bovine serum albumin) 0,5% Tween 20 in PBS
Blocklösung B	4% NHS 1% BSA in PBS
Mowiol	6 g Glycerol + 24 g Mowiol abwiegen, 6 ml H ₂ O + 12 ml 0,2 M Tris-Puffer (pH 8,6) hinzufügen, 4 h rühren und 2 h ruhen lassen, 10 min in Wasserbad bei 50°C inkubieren, 15 min mit einer Kraft von 5.000 g verrühren, bei -20°C lagern Die Aushärtung der eingedeckten Schnitte erfolgt über Nacht.

Tab. 1 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.

Material

Bleicitrat

BSA

Deckgläschen

Denatonium

Diamantmesser

Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

Glycerol

Mikroreaktionsgefäße

Formvar

Mowiol

Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)

Nickel-Netzchen

NHS

Paraformaldehyd 4%

Pikrinsäurelösung

Saccharose 20%

SuperFrost Plus® Objektträger

Uranylacetat

Hersteller

agar scientific, Stansted essex

Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

A.Hartenstein GmbH, Würzburg

Sigma-Aldrich

Diatome; Labtec Science Service

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

A.Hartenstein GmbH

Merck, Darmstadt

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Plano, Wetzlar

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

AppliChem GmbH, Darmstadt

AppliChem

25x75x1,0mm; R.Langenbrinck
GmbH, Emmendingen

Serva, Heidelberg

3.2 Indirekte Immunfluoreszenz an der Trachea

3.2.1 Immunhistochemie an Gewebeschnitten der Trachea

Auf die Schnitte wurden 100 µl Blocklösung gegeben und es erfolgte die Inkubation für eine Stunde in einer feuchten Kammer mit zehnpromzentigem normalem Pferdeserum (NHS, Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland) mit 0,5% Tween 20 in PBS behandelt, um die unspezifischen Proteinbindungsstellen abzusättigen. Flüssigkeitsrückstände wurden vorsichtig abgesaugt, bevor die Schnitte mit den Primärantikörpern beschickt wurden. Das Ansetzen der Primärantikörper erfolgte in PBS mit einem Zusatz von 22,4 Gramm NaCl (PBS+S), in folgender Verdünnung: CGRP 1:8.000, Ly6G-FITC 1:200. Nach dem Pipettieren des Primärantikörpers wurden die Schnitte über Nacht in einer dunklen, feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS für 3x10 Minuten gewaschen, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen.

Antigen	Wirt	Verdünnung	Quelle
CGRP	Ziege	1:8000	Acris, Rockville, USA
Ly6G FITC Konjugat	Ratte	1:200	Thermo Fisher, Rockford, USA

Tab. 2 Liste der verwendeten Primärantikörper

Der verwendete Sekundärantikörper wurde ebenfalls in der entsprechenden Verdünnung in PBS+S angesetzt und für eine Stunde in der dunklen Feuchtkammer inkubiert. Verwendet wurde der Antikörper dk- α -gt-Cy3 (Dianova), in einer Verdünnung von 1:400. Danach wurden die Proben wieder

für 3x10 Minuten in PBS gewaschen und Flüssigkeitsrückstände abgesaugt. Zum Eindeckeln wurden die Schnitte mit Mowiol (Rezept s.Tab.1) beschickt und mit Deckgläschen (A. Hartenstein GmbH; Würzburg) versehen. Zum Auswerten wurden die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop2 mot plus Mikroskop, AxioCam MRc; Carl Zeiss) mikroskopiert. Bei der verwendeten Software handelte es sich um das Programm Axiovision 4-Software (Carl Zeiss GmbH, Jena).

3.2.2 Immunhistochemie der Whole-Mount-Präparate der Trachea

Für eine weitere Versuchsreihe erfolgte die Immunhistochemie an Whole-Mount-Präparaten. Dabei handelt es sich um vollständige Organpräparate, die nach der Entnahme im Ganzen fixiert und mit Hilfe von Tissue-Tek in Blöckchen eingebettet wurden (s. o.). Für die Immunhistochemie ergeben sich, aufgrund der Dicke der Präparate, einige Unterschiede im Vergleich zu den Ultradünnschnitten. Die Präparate wurden zunächst für 15 Minuten mit PBS gewaschen. Es folgte die Permeabilisierung mit ca. 1 ml 0,3-prozentigem Triton in PBS behandelt, welche zwei Stunden dauerte. Im Anschluss wurden die Präparate für weitere zwei Stunden mit ca. 300 µl Blocklösung beschickt. Diese bestand aus 4-prozentigem normalem Pferdeserum mit einem Prozent BSA in PBS behandelt. Nach der Entfernung der Flüssigkeitsrückstände erfolgte die Applikation des ersten Primärantikörpers (CGRP 1:8000, Tab. 2) und die Inkubation über Nacht in einer dunklen feuchten Kammer. Danach wurden die Präparate 5x30 Minuten in PBS gewaschen, bevor die erneute Applikation der Blocklösung für weitere zwei Stunden erfolgte. Anschließend wurden die Präparate mit dem ersten Sekundärantikörper dk- α -gt-Cy3 (dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:400 für eine Stunde inkubiert. Es folgte das Waschen in PBS für 5x30 Minuten und das erneute Blocken für zwei Stunden. Dann wurden die Präparate mit dem zweiten Primärantikörper inkubiert. Hier wurde ein FITC-konjugierter Ly6G-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1.000 verwendet. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurden die

Präparate erneut für 5x30 Minuten gewaschen und anschließend mit Mowiol eingedeckt.

3.2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der SPSS Software Version 20 (IBM SPSS Inc. Headquarters Chicago Illinois, USA). Hierbei wurde zunächst die Normalverteilung getestet und im Anschluss der ANOVA-Test durchgeführt. Bei einem signifikanten Ergebnis wurde der Student-T-Test gemacht. Zur Varianzanalyse unabhängiger Stichproben innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen diente der Kruskal-Wallis-Test. Bei Ergebnissen von $p \leq 0,5$ wurde für den direkten Gruppenvergleich zusätzlich der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

3.3 Elektronenmikroskopie

3.3.1 Eponeinbettung

Bei den verwendeten Gewebeproben handelte es sich ebenfalls um Biopsien von Mäusetracheen, welche für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung mit Eponeinbettung zunächst in 1,5-prozentiger Glutaraldehydlösung fixiert wurden und nach dem Osmieren mit Osmiumtetroxyd (EMS) mit halbgesättigtem Uranylacetat (Serva; Heidelberg) kontrastiert wurden. Mit Hilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe von 30, 50, 70, 90 und 96 Prozent (je 15 Minuten) und 100 Prozent (2x15 Minuten) wurden diese in reines Propylenoxid überführt. Dieses wurde ausgetauscht und in einem Epon-Gemisch nach LUFT (1961) wurden die Proben in reines Epoxidharz (Epon) überführt. Nach der vollständigen Polymerisation des Epoxidharzes über 24 Stunden bei 60°C wurden die Blöckchen auf die Größe des zu untersuchenden Gewebes zugetrimmt. Mit Hilfe eines Mikrotoms (Ultracut-Schneidegerät E; Reichert-Jung, Nußloch), unter Verwendung von Diamantmessern (Diatome; Labtec Science Service), erfolgte die Anfertigung

von ca. 80 nm dicken Ultradünnschnitten in Serie, welche auf Formvarbeschichtete (Merck; Darmstadt) Nickel-Netzchen (Plano; Wetzlar) aufgezogen und schließlich mit Uranylacetat (Serva; Heidelberg) und Bleicitrat (agar scientific, Stansted Essex) kontrastiert wurden. Die Auswertung erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop (LEO912 AB; Zeiss, Oberkochen) bei einer Vergrößerung von 8000 bis 20000 und ca. 3-7 μ A. Dazu wurden die Präparate zunächst stabilisiert, indem sie bei geöffneter Objektivblende und einer Vergrößerung von 200 bei einer Emission von ca. 24-28 μ A und maximaler Helligkeit für mindestens fünf, jedoch maximal 30 Minuten dem Lichtstrahl exponiert wurden. Die Fotodokumentation erfolgte mit Hilfe einer 2K-Digitalkamera (TRS, Tröndle, München), welche direkt mit dem TEM verbunden war.

3.3.2 Tomographische Rekonstruktion

Zur Klärung der Fragestellung, ob und inwiefern neuroendokrine Zellen in der Trachea Kontakt zu sensorischen Nervenfasern ausbilden, wurden ausgesuchte Gewebeproben am Transmissionselektronenmikroskop (JEOL JEM-2100) betrachtet, welches mit einer maximalen Kathodenspannung von 200kV betrieben wird. Dazu war es notwendig, zunächst am TEM (LEO 912 AB) geeignete Stellen im Gewebe zu finden, welche sich über mindestens fünf Schnitte kontinuierlich verfolgen ließen. Diese Stellen wurden dann am TEM (JEOL JEM-2100) aufgesucht, um sogenannte „Tilt-Serien“ davon zu erzeugen. Die Methode der tomographischen Rekonstruktion ermöglicht es, im Anschluss an die Aufnahme einer Serie von spezifischen Stellen im Gewebe, mit Hilfe von entsprechender Software, eine dreidimensionale Bildgebung dieser Stelle zu erhalten. Für die dreidimensionale Rekonstruktion einer Bilderserie am TEM bedarf es einer speziellen Aufnahmetechnik. Hierbei werden zweidimensionale Projektionen in einem maximalen Winkelbereich von -90° bis $+90^\circ$ in Abständen von $1-2^\circ$ aufgenommen, während die Probe entlang einer Drehachse gekippt wird. Die entstehende Kippserie wird zeitgleich von einer CCD-Kamera (charge-coupled device) aufgezeichnet. Anhand der zahlreichen Aufnahmen

aus möglichst vielen Projektionsrichtungen können später, durch Rückprojektion, 3D-Objekte rekonstruiert werden (He & He, 2014). Für die Rekonstruktion wird ein automatischer Algorithmus verwendet, welcher die einzelnen Positionen jeder Projektion abgleicht und die Korrelation berechnet. Anschließend wurden mit Hilfe einer speziellen Software (IMOD/ Etomo; Colorado, USA) zur Erstellung von tomographischen Rekonstruktionen einer elektronenmikroskopischen Bilderserie, die angefertigten Serien in eine 3D-Rekonstruktion überführt.

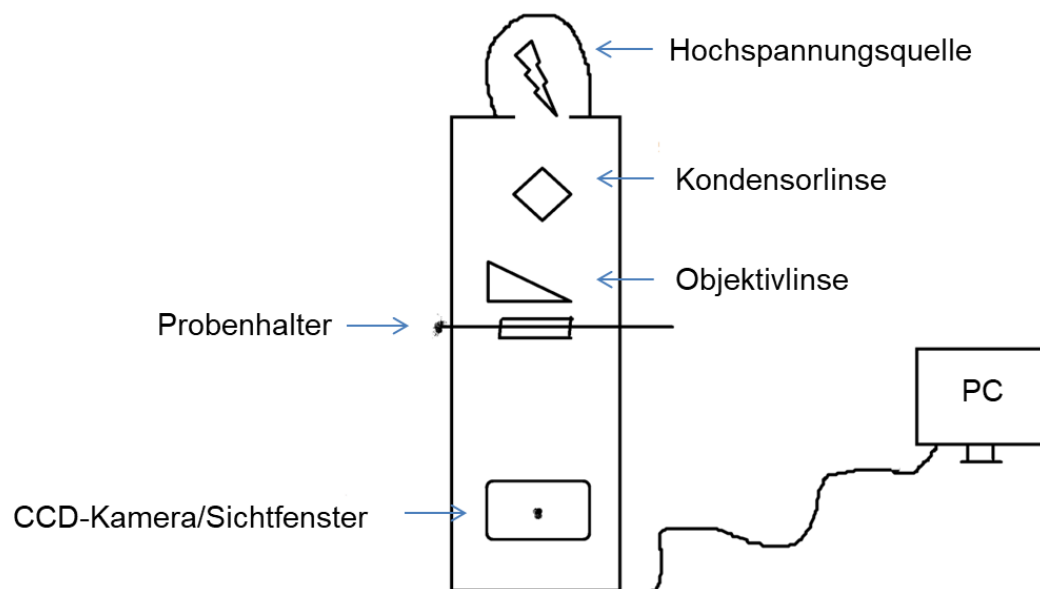


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Elektronenmikroskops

4. Ergebnisse

4.1 Immunhistochemische Auswertungen

4.1.1 Auswirkung der Stimulation mit Denatonium auf die Anzahl der CGRP-positiven Zellen

Die Auswertung der durchgeführten Versuche bezieht sich auf den Vergleich der einzelnen Abschnitte der Trachea. Die Unterteilung der Abschnitte erfolgte in zwei tracheale und einen bronchialen Abschnitt. Bei dem ersten Abschnitt handelt es sich um den kehlkopfnahen Bereich (T1-5), welcher die Knorpelspangen 1-5 umfasst. Der zweite Abschnitt, welcher die Knorpelspangen 6-11 umfasst, repräsentiert den trachealen Abschnitt (T6-11), während der bronchiale Abschnitt (T12-Bif.) die Knorpelspangen 12- Bifurkation enthält. Da es sich bei dem Abschnitt T1-5 um den Bereich handelt, in dem die Beatmungskanüle appliziert wurde und nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Applikation der Kanüle eine Schädigung des Epithels verursacht, wurde dieser Abschnitt bei der Auswertung nicht repräsentativ für die Trachea gewertet. Beim Vergleich der einzelnen Abschnitte der Trachea zeigte sich, dass in allen drei untersuchten Abschnitten CGRP-positive Zellen gefunden werden konnten. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Anzahl der CGRP-positiven Zellen im trachealen Abschnitt am höchsten war. Es konnten pro 10µm Dicke und Querschnitt der Trachea zwei CGRP-positive Zellen gezählt werden. Im bronchialen Abschnitt hingegen wurde die Anzahl geringer. Hier wurde eine CGRP-positive Zelle pro 10µm Dicke und Querschnitt der Trachea gefunden. Bei der Quantifizierung der CGRP-positiven Zellen nach Stimulation mit Denatonium zeigte sich, dass CGRP-positive Zellen in allen drei Abschnitten der Trachea vorhanden waren. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass sich die Anzahl der CGRP-positiven Zellen nach Stimulation mit einer Denatoniumkonzentration von 1, 10 und 20 mM in den verschiedenen Abschnitten nicht signifikant verändert hat ($p = 0,210$) (s. Abb. 3).

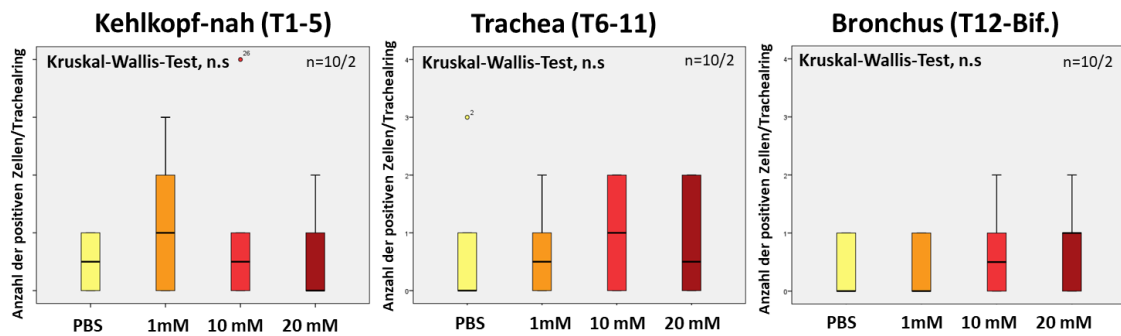


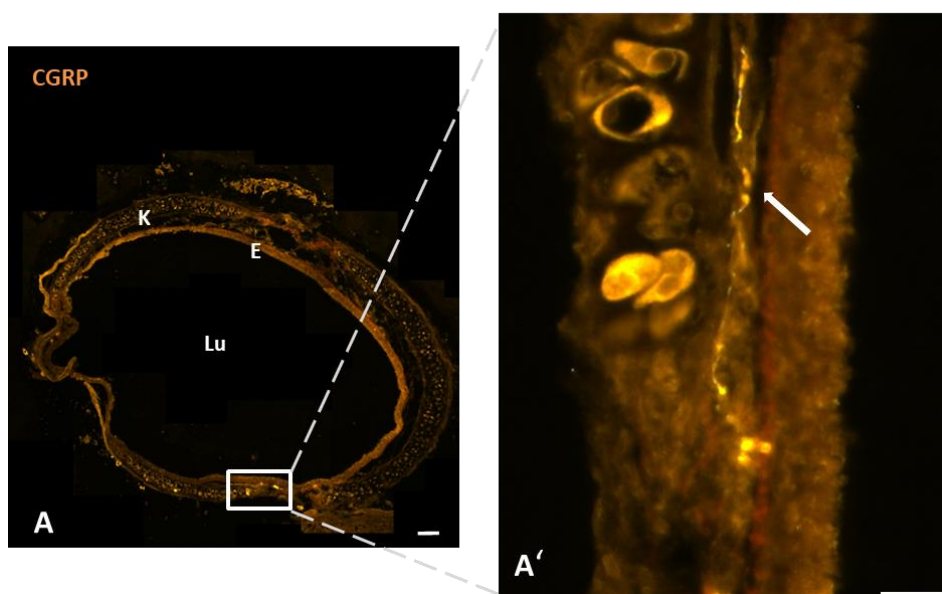
Abb. 3: Einfluss von verschiedenen Denatoniumkonzentrationen auf die Anzahl der CGRP-positiven Zellen in den drei Abschnitten der Trachea bei C57BL/6J-Mäusen.

Die Anzahl der CGRP-positiven Zellen ist im Abschnitt T6-11 am höchsten. Die Stimulation mit Denatonium hat keinen Einfluss auf die Anzahl der CGRP-positiven Zellen in den drei Abschnitten der Trachea. Boxplots: Whisker (vertikale Linien nach oben und unten) kennzeichnen das Minimum (untere Linie), das Maximum (obere Linie), sowie den Medianwert (Linie innerhalb der Box). ° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung. 25% Quantil (unteres Ende der Box) und 75% Quantil (oberes Ende der Box). Mann-Whitney-U-Test: nicht signifikant (n.s.): $p > 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$.

4.1.2 Auswirkung der Stimulation mit Denatonium auf die CGRP-positiven Nervenfasern

Nachdem gezeigt werden konnte, dass CGRP-positive Zellen nach Stimulation mit Denatonium in allen Abschnitten der Trachea zu finden sind, wurde in weiteren Versuchen die Auswirkung des verwendeten Bitterstoffes auf die Anzahl und das morphologische Erscheinungsbild der CGRP-positiven Nervenfasern untersucht. Der Vergleich wurde sowohl zwischen den unterschiedlichen Denatoniumkonzentrationen als auch zwischen extra- und intraepithelialen Fasern gezogen. In Bezug auf die extraepithelialen Fasern konnte nachgewiesen werden, dass bei den drei verwendeten Konzentrationen immer CGRP-positive extraepitheliale Fasern gefunden werden konnten. Dabei zeigte sich, dass die Stimulation mit den verschiedenen Konzentrationen des

verwendeten Bitterstoffes keine Auswirkung auf die Morphologie der extraepithelialen Fasern hatte. Bei allen verwendeten Konzentrationen waren die Fasern deutlich gefärbt und klar zu erkennen (s. Abb. 4A-C). Bei Betrachtung der Auswirkung der Stimulation mit den drei verschiedenen Denatoniumkonzentrationen auf die intraepithelialen CGRP-positiven Nervenfasern zeigten sich deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Anzahl sowie die Morphologie der Fasern. Es konnte gezeigt werden, dass der Querschnitt der Fasern mit zunehmender Konzentration deutlich abgenommen hat. Zudem nahm die Quantität der Fasern mit steigender Denatoniumkonzentration ab. So konnten bei einer Denatoniumkonzentration von 1 mM sowie bei 10 mM jeweils zwei intraepitheliale Fasern, je 10 μm Dicke und Querschnitt der Trachea gezählt werden (s. Abb. 4 A+B). Bei einer Konzentration von 20 mM Denatonium konnte hingegen keine Faser aufgefunden werden (s. Abb. 4 C). Im Hinblick auf die Frage, ob CGRP bei der Entstehung einer neurogenen Entzündung in den Atemwegen von den intra- oder extraepithelialen Nervenfasern freigesetzt wird, lässt die von Denatonium veränderte Morphologie und geringere Quantität der intraepithelialen Fasern darauf schließen, dass diese nach Stimulation mit Bitterstoffen CGRP freisetzen (s. Abb. 5 B).



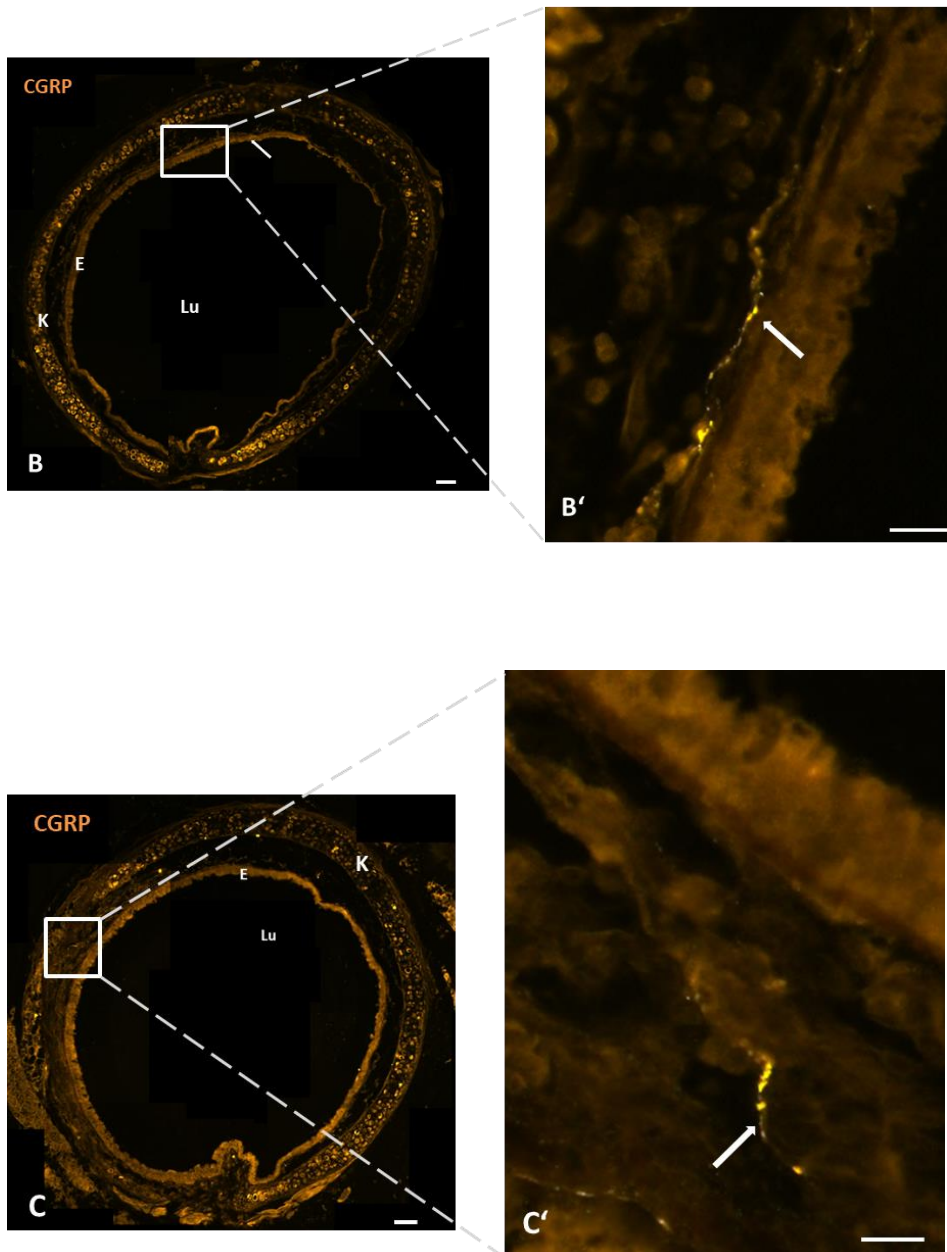


Abb. 4: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Trachealringen

A-C: Morphologie der extraepithelialen CGRP-positiven Fasern nach Stimulation mit 1 mM (A), 10 mM (B), 20 mM Denatonium (C). A'-C' zeigen einen vergrößerten Ausschnitt von extraepithelialen CGRP-positiven Fasern. Die Aufnahme der Fluoreszenz fand bei einer Belichtungszeit von 80ms statt. E=Epithel (Lamina epithelialis), K=Knorpel (Cartilago trachealis), Lu=Lumen. A'-C': Pfeile deuten auf

extraepitheliale Fasern, B: Pfeil deutet auf eine intraepitheliale Faser. Maßstab in A-C: 100 μm , Maßstab in A'-C': 50 μm

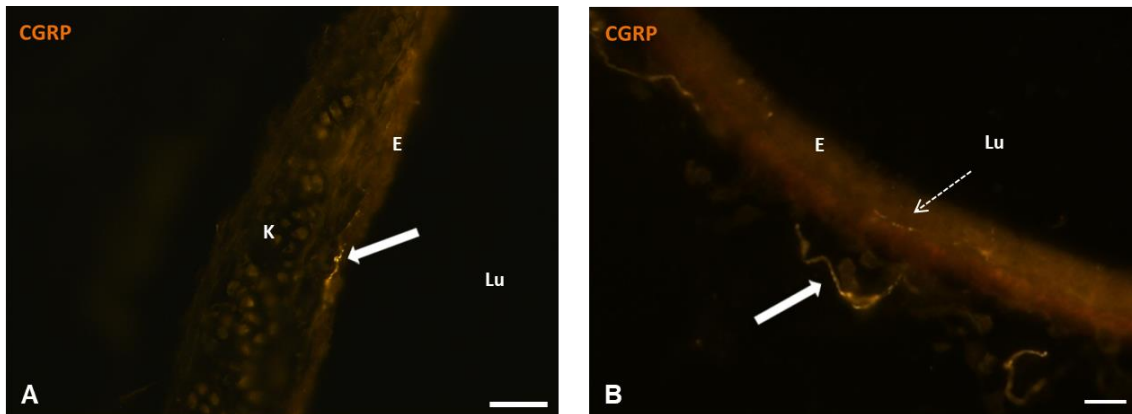


Abb. 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von CGRP-positiven Nervenfasern

A: Pfeil deutet auf eine intraepitheliale Nervenfaser nach Stimulation mit 1 mM Denatonium. B: Pfeil deutet auf eine extraepitheliale Nervenfaser. Gestrichelter Pfeil deutet auf eine deutlich schwächer gefärbte CGRP-positive intraepitheliale Nervenfaser nach Stimulation mit 10 mM Denatonium. E=Epithel (Lamina epithelialis), K=Knorpel (Cartilago trachealis), Lu=Lumen

Maßstab in A+B: 25 μm

4.1.3 Nachweis von neuroendokrinen Zellen bei GAD-67-Mäusen

Neuroendokrine Zellen in der Trachea enthalten GAD-67. Um die Anzahl von neuroendokrinen Zellen, die CGRP enthalten, zu untersuchen, haben wir in der vorliegenden Versuchsreihe GAD-67-eGFP-Mäuse verwendet. Es zeigte sich bei einer Gesamtzahl von 40 Zellen, dass 36 Zellen GAD-67-eGFP-positiv und vier Zellen CGRP-positiv waren. Drei Zellen wiesen nach erfolgter Inkubation mit CGRP eine doppelt positive Markierung auf. Es konnte somit gezeigt werden, dass es sich bei den CGRP-positiven- Zellen nur um eine kleine Subpopulation von neuroendokrinen (GABA+) Zellen handelt (s. Abb. 6+7).

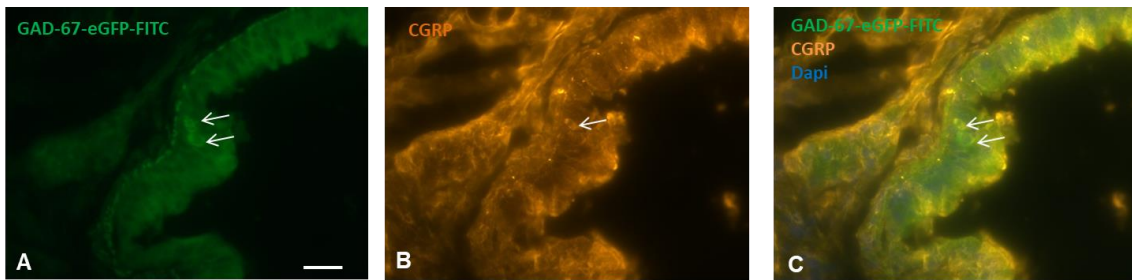


Abb. 6: Neuroendokrine Zellen in der Trachea bei GAD-67-eGFP-Mäusen. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von neuroendokrinen Zellen nach erfolgter Färbung mittels Antikörper gegen eGFP und CGRP. A-C: Pfeile zeigen auf neuroendokrine Zellen. Maßstab in A-C: 25 μ m

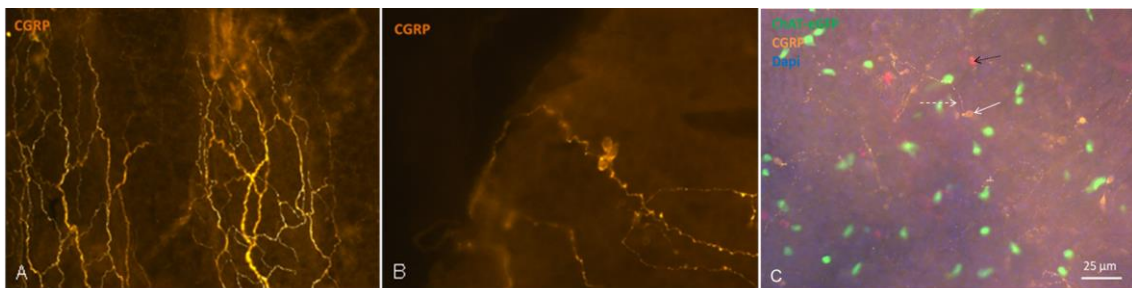


Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung eines Whole-Mount-Präparates der Trachea. A: CGRP-positive (orange) Nervenfasern. B: CGRP-positive Zellen (orange) stehen im engen Kontakt zu CGRP-positiven Nervenfasern. C: Merge-Bild: Chat-eGFP- (grün), CGRP-positive (orange) und PGP-positive (rot) Zellen sind entlang einer CGRP-positiven Nervenfaser sichtbar. Der weiße Pfeil zeigt auf eine CGRP-positive neuroendokrine Zelle. Der gestrichelte weiße Pfeil deutet auf eine CGRP-positive Nervenfaser. Der schwarze Pfeil deutet auf eine PGP-positive Zelle (Subtyp). Maßstab in A-C: 25 μ m.

4.1.4 Quantifizierung der neuroendokrinen Zellen in *TRPM5*^{+/+}- und *TRPM5*^{-/-}- Mäusen

Die Quantifizierung der neuroendokrinen Zellen bei *TRPM5*^{+/+}- und *TRPM5*^{-/-}- Mäusen zeigte, dass neuroendokrine Zellen sowohl bei der Wildtyp-Gruppe als auch in der Gruppe der *TRPM5*-defizienten Tiere gefunden werden konnten. Bei allen verwendeten Versuchstieren wurde eine Trachealkanüle appliziert. Beim Vergleich zwischen der *TRPM5*^{+/+}- und der *TRPM5*^{-/-}- Gruppe zeigte sich, dass sich die Anzahl der neuroendokrinen Zellen in den Abschnitten T6-11 und T12-Bifurkation nicht veränderte ($p \geq 0,05$) (s. Abb. 8). Hier konnte jeweils eine Zelle pro Trachealquerschnitt detektiert werden.

4.1.5 Auswirkungen der Stimulation mit Denatonium auf die Anzahl der neuroendokrinen Zellen in *TRPM5*^{+/+}- und *TRPM5*^{-/-}- Mäusen

Der Vergleich zwischen der *TRPM5*^{+/+}-Gruppe (WT) und der *TRPM5*^{-/-}-Gruppe (KO) innerhalb der mit PBS behandelten Tiere zeigte, dass es in den Abschnitten T6-11 zu keiner Änderung der Anzahl der neuroendokrinen Zellen gekommen ist. Innerhalb der Gruppe der mit 1 mM Denatonium behandelten Tiere blieb die Anzahl der neuroendokrinen Zellen beim Vergleich zwischen der *TRPM5*^{-/-}- und der *TRPM5*^{+/+}- Gruppe ebenfalls gleich (s. Abb. 8). Die Auswertung zeigte, dass es innerhalb der *TRPM5*^{+/+}-Gruppe, der mit PBS behandelten Tiere, im Abschnitt T6-11 im Vergleich zum Abschnitt T12-Bif zu keiner Veränderung der Anzahl der neuroendokrinen Zellen gekommen ist ($p=0,34$). Bei den Tieren der *TRPM5*^{-/-}-Gruppe zeigte sich beim Vergleich zwischen den Tieren, welche mit 1 mM Denatonium behandelt wurden und der PBS Gruppe, bezogen auf den Abschnitt T6-11, ein höchst signifikantes Ergebnis ($p=0,001$). Dieses Ergebnis zeigte sich auch bezogen auf den Abschnitt T12-Bif ($p=0,001$). Ebenfalls zeigte die Auswertung, dass die Anzahl der neuroendokrinen Zellen sowohl innerhalb der *TRPM5*^{+/+}- als auch in der *TRPM5*^{-/-}-Gruppe im Abschnitt T6-11 deutlich höher als im Abschnitt T12-Bif ist. Der Vergleich innerhalb der *TRPM5*^{-/-}-Gruppe zeigte, dass es bei den mit 1 mM

Denatonium behandelten Tieren im Abschnitt T6-11 im Vergleich zum Abschnitt T12-Bif zu einem Abfall der Anzahl der neuroendokrinen Zellen gekommen ist. Es zeigte sich hier ein signifikantes Ergebnis ($p=0,026$). Innerhalb der mit PBS behandelten Gruppe zeigte sich, bezogen auf den Vergleich zwischen den Abschnitten T6-11 und T12-Bif, keine Veränderung der Anzahl der neuroendokrinen Zellen ($p=0,69$).

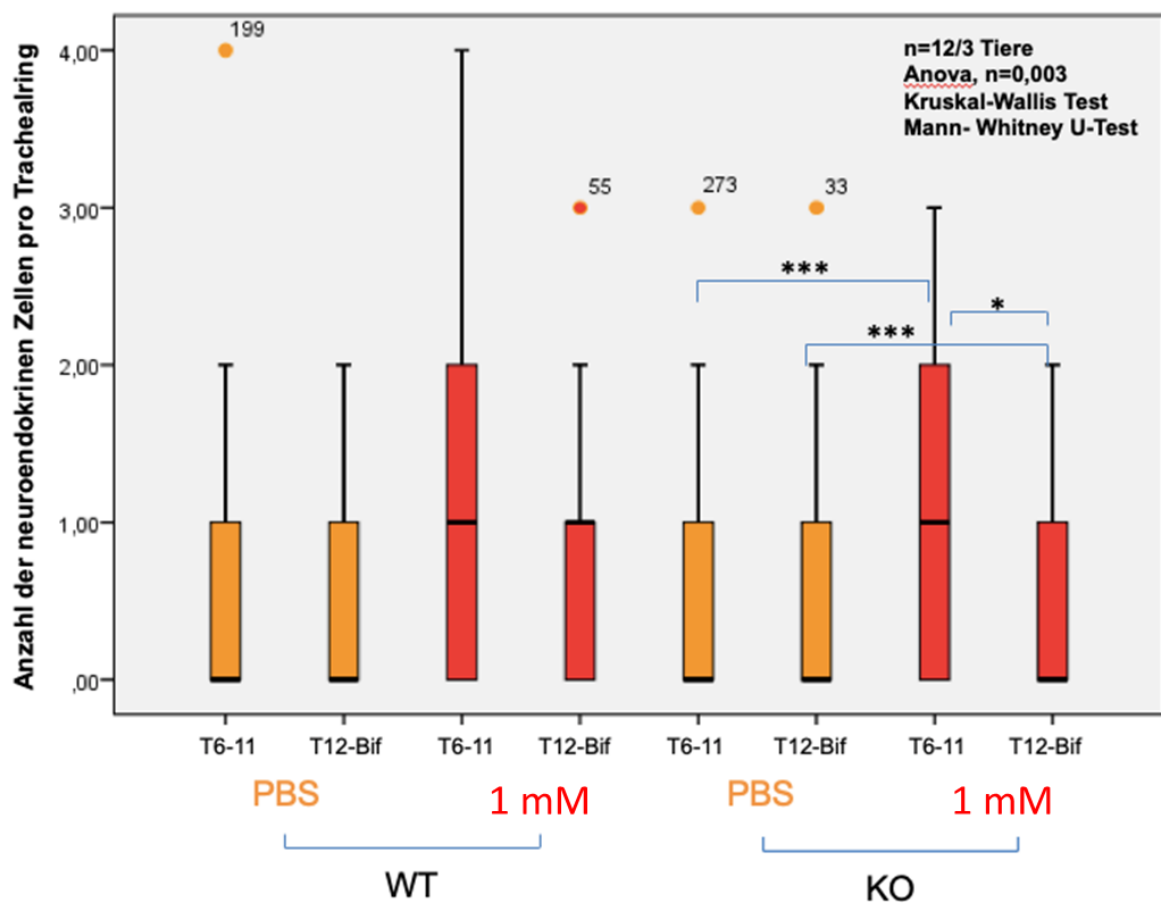


Abb. 8: Vergleich der Anzahl der neuroendokrinen Zellen pro Trachealquerschnitt bezogen auf die unterschiedlichen Abschnitte in der Trachea zwischen TRPM5^{+/+}-(WT) und TRPM5^{-/-}-Mäusen (KO) bei einer Gabe von 1 mM Denatonium oder PBS. Boxplots: Whisker (vertikale Linien nach oben und unten) kennzeichnen das Minimum (untere Linie), das Maximum (obere Linie) sowie den Medianwert (Linie innerhalb der Box). ° = Datenpunkt außerhalb der dreifachen Standardabweichung. 25%-Quantil (unteres Ende der Box) und 75%-Quantil (oberes Ende der Box). Mann-Whitney-U-Test: nicht signifikant (n.s.) = $p > 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

4.1.6 Auswirkungen der Stimulation mit Denatonium auf die Anzahl der CGRP-positiven Nervenfasern in *TRPM5*^{+/+}- und *TRPM5*^{-/-}- Mäusen

Im Hinblick auf die CGRP-positiven Nervenfasern bei *TRPM5*^{+/+}- und *TRPM5*^{-/-}- Mäusen zeigte sich, dass in den beiden Gruppen ausschließlich extraepitheliale Nervenfasern gefunden werden konnten. Die extraepithelialen Nervenfasern erschienen kräftig und konnten auch nach Stimulation mit Denatonium weiterhin aufgefunden werden. Die Morphologie der Nervenfasern wies keinerlei erkennbare Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Gruppe auf. Ebenso ließ sich kein Unterschied bezogen auf die Anzahl der extraepithelialen Nervenfasern feststellen (s. Abb. 9).

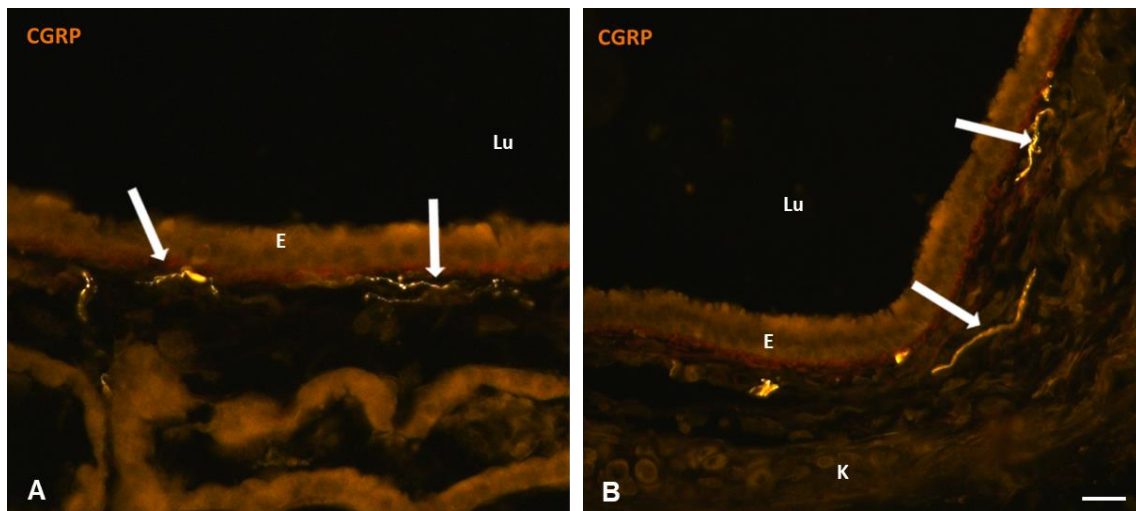


Abb. 9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von extraepithelialen Nervenfasern. A-B: Weiße Pfeile deuten auf extraepitheliale CGRP-positiv Nervenfasern. Lu=Lumen, E=Epithel (Lamina epithelialis), K=Knorpel (Cartilago trachealis)
A: *TRPM5*^{-/-}-Maus nach Stimulation mit PBS.
B: *TRPM5*^{-/-}-Maus nach Stimulation mit 1 mM Denatonium.
Maßstab in A-B: 25 µm.

4.2 Elektronenmikroskopische Auswertungen

4.2.1 Elektronenmikroskopische Auswertungen der Kontakte zwischen neuroendokrinen Zellen und Nervenfasern

Die Auswertung der Gewebe von Lunge, Bronchus und Trachea am Elektronenmikroskop zeigte, dass in jeder ausgewerteten Serie neuroendokrine Zellen gefunden werden konnten. Diese waren bereits anhand ihrer typischen Charakteristika bei einer 6.300-fachen Vergrößerung gut zu identifizieren. Das Mikroskopieren bei Vergrößerungen von 16.000-fach oder 32.000-fach ermöglichte dann die exakte Betrachtung der Zellgrenzen sowie deren Bezug zu anderen Epithelzelltypen oder Nervenfasern. So konnte an ausgewählten Stellen beispielsweise die direkte Nachbarschaft zu Bürstenzellen nachgewiesen werden (s. Abb. 10). An dieser ausgewählten Stelle konnte eine neuroendokrine Zelle gefunden werden, welche von einer Bürstenzelle umschlossen ist. Diese Stelle veranschaulicht die Fragestellung, ob es vermittelt durch die Bürstenzellen zur Aktivierung von CGRP-haltigen Zellen kommt, welche dann CGRP freisetzen. Des Weiteren konnte an mehreren Stellen ein enger Bezug zwischen den neuroendokrinen Zellen und den umliegenden sensorischen intraepithelialen Nervenfasern nachgewiesen werden (s. Abb. 11 A+B, 12). Bei der Auswertung der Serienschnitte gelang es uns, ausgewählte neuroendokrine Zellen, in direkter Lokalisation zu einer Nervenfaser, über eine Länge von bis zu fünf Schnitten zu verfolgen. Dadurch war es möglich, die Stelle bis ca. 400 nm in die Tiefe zu untersuchen. Dennoch reicht die Lichtmikroskopie nicht aus, um einen direkten Kontakt zwischen einer neuroendokrinen Zelle und der Nervenfaser nachzuweisen, da trotz enger Assoziation zwischen den Strukturen eine Distanz bestehen kann. Daher haben wir in weiteren Versuchen mit Hilfe der 3D-Tomographie eine Kontaktstelle zwischen einer Nervenfaser und einer neuroendokrinen Zelle rekonstruiert (s. Abb. 13+14).

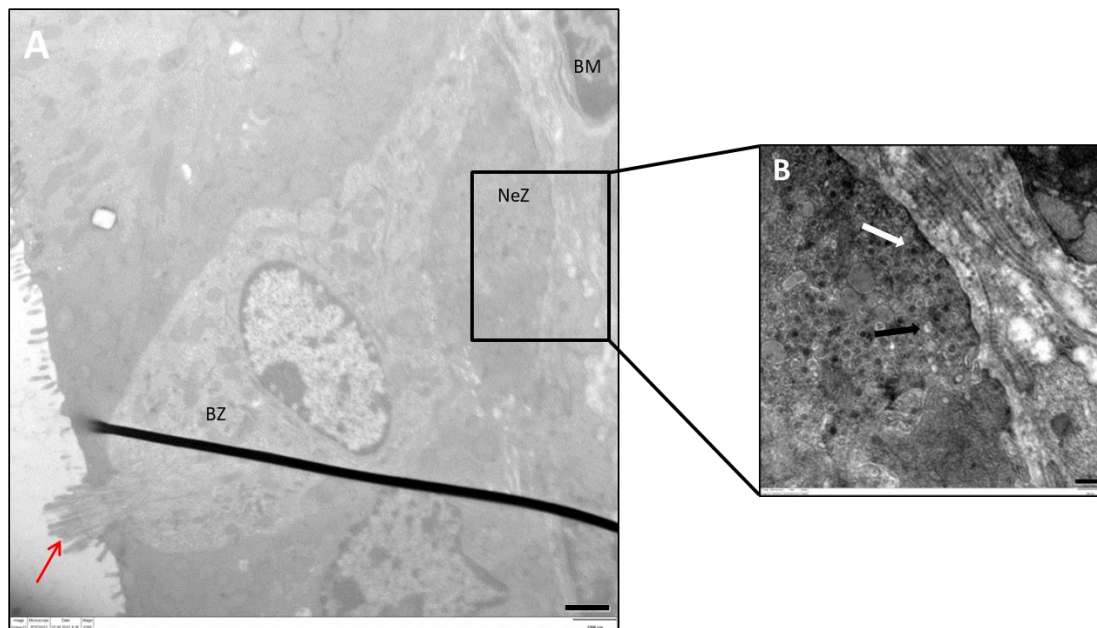


Abb. 10: Bürstenzelle umschließt neuroendokrine Zelle

A: Neuroendokrine Zelle (NeZ) wird von einer Bürstenzelle (BZ) umschlossen. Roter Pfeil kennzeichnet die apikalen Büschel von Mikrovilli an der Bürstenzelle, welche bis ins Lumen ragen. Die Bürstenzelle erstreckt sich von der Basalmembran (BM) bis zum Lumen. Maßstab: 1.000 nm.

B: Vergrößerter Ausschnitt der neuroendokrinen Zelle, gezeigt im Inset in A. Der weiße Pfeil kennzeichnet ein elektronendichtes Vesikel (*dense core vesikel*). Der schwarze Pfeil deutet auf ein nicht-elektronendichtes Vesikel. Beide sind charakteristisch für neuroendokrine Zellen. Maßstab: 250 nm.

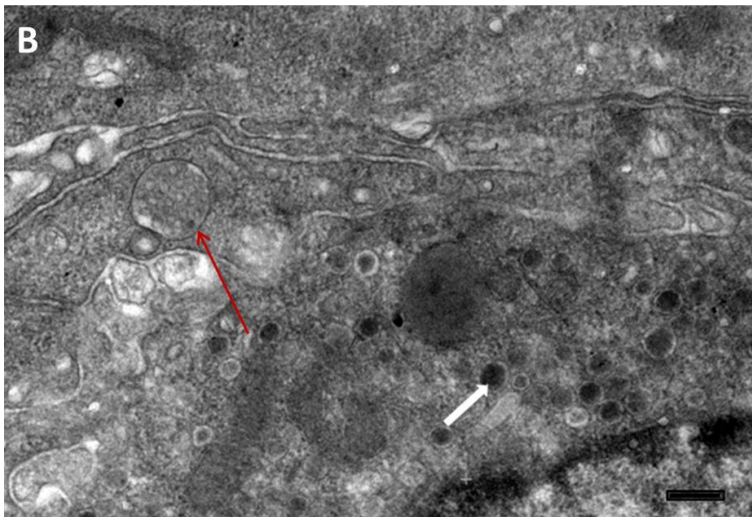
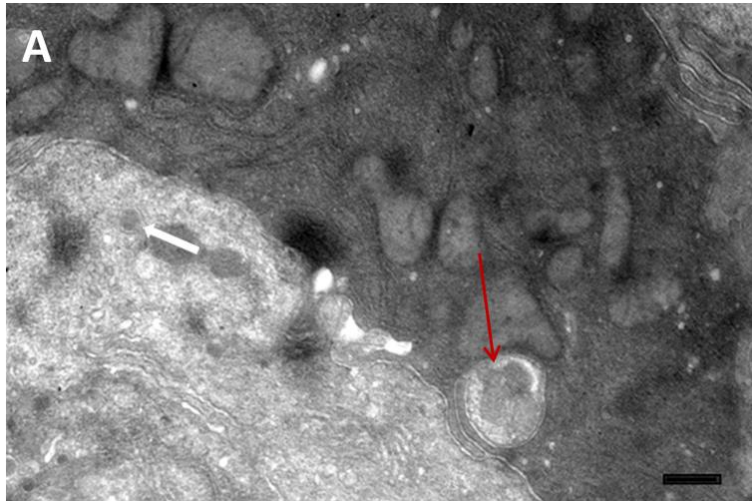


Abb. 11: Nervenfaser kontaktiert neuroendokrine Zelle

A-B: Nervenfaserbündel in direkter Lokalisation zu neuroendokrinen Zellen - aufgenommen bei einer 16.000-fachen Vergrößerung (rote Pfeile). Die weißen Pfeile zeigen auf die elektronen-dichten Vesikel, welche charakteristisch für neuroendokrine Zellen sind.

A: Die Nervenendigung mit typischer Morphologie einer sensorischen Nervenfasers .

B: Nervenfasersendigung mit vielen kleinen hellen Vesikeln. Diese Fasern erscheinen von ihrer Morphologie wie cholinerge Fasern.

Maßstab in A+B: 1 µm.

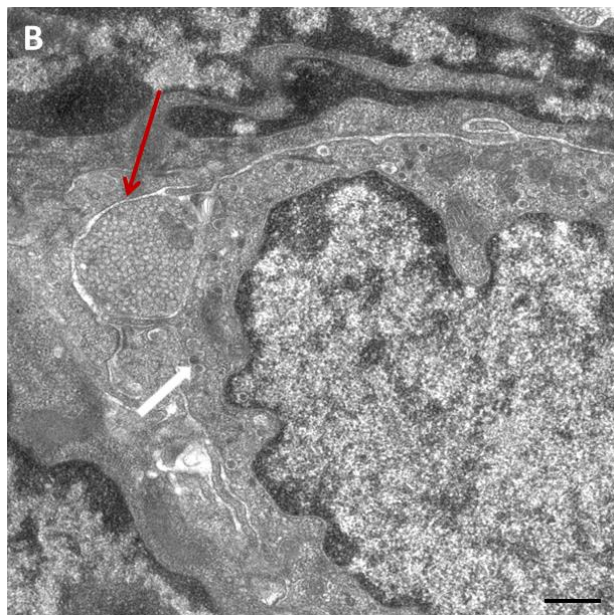
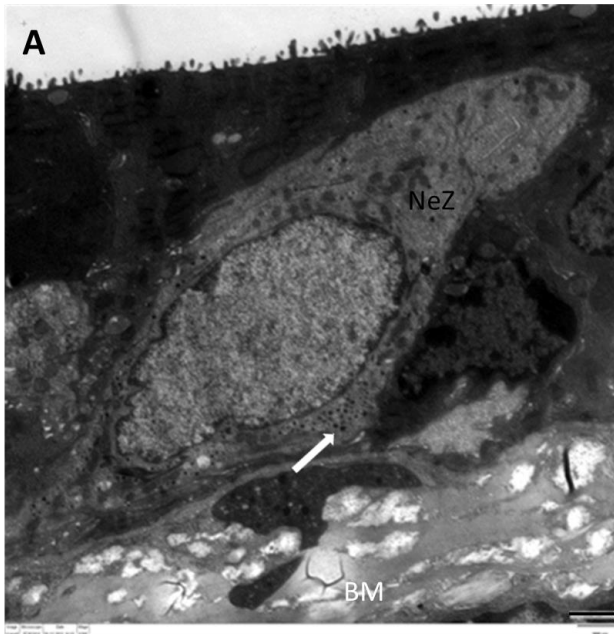


Abb. 12: Neuroendokrine Zelle und Nervenfaserbündel

A: NeZ = Neuroendokrine Zelle bei 6.300-facher Vergrößerung. BM = Basalmembran.

A-B: Weißer Pfeil deutet auf Dense-core-Vesikel.

B: Nervenfasern und neuroendokrine Zelle bei 12.500-facher Vergrößerung. Roter Pfeil deutet auf Nervenfaserbündel.

Maßstab in A+B: 1 µm.

4.2.2 Tomographische Rekonstruktion von Nervenfaserkontakten zu neuroendokrinen Zellen

Die tomographische Rekonstruktion erfolgte an zuvor ausgesuchten Regionen aus den Serien. Hierbei gelang es, eine bestimmte Zelle über einen Bereich von ca. fünf Schnitten zu verfolgen. Dies entspricht einer Länge von ungefähr 1250 nm, da die Schnittdicke für die tomographische Rekonstruktion 250 nm pro Schnitt betrug. Bei der Rekonstruktion einer ausgesuchten Stelle zeigte sich, dass die in direkter Lokalisation zur neuroendokrinen Zelle verlaufende Nervenfaser direkt mit dieser in Kontakt trat (s. Abb. 13+14). Durch Kippung der Probe entlang einer Drehachse entsteht eine Bilderserie, welche im Anschluss an die Elektronenmikroskopie mit Hilfe einer speziellen Computersoftware (IMOD/Etomo; Colorado, USA) zu 3D-Rekonstruktionen umgewandelt wurde (s. Abb. 14). Es war aufgrund der tomographischen Rekonstruktion zwar möglich, eine dreidimensionale Darstellung der Zelle und ihrer direkten Umgebung zu erhalten, wobei es trotz der dickeren Schnitte nicht gelang, die gesamte Stelle zu rekonstruieren.

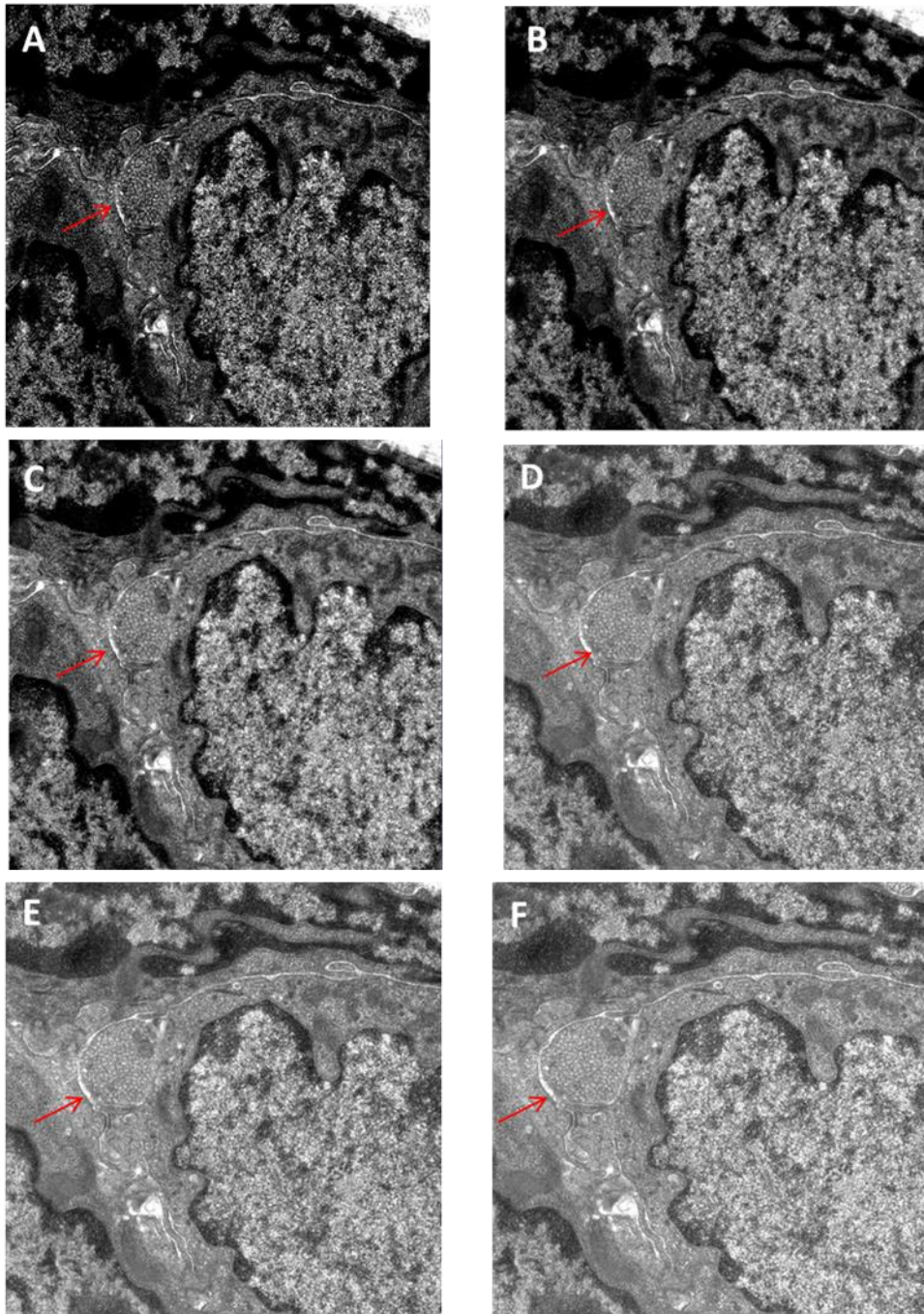


Abb. 13: Ausschnitt aus einer Tilt-Serie der 3-D-Tomographie

Zwischen den Bildern A-F liegen 35 weitere Bilder. Roter Pfeil deutet auf das Nervenfaserbündel. Durch Kippung entlang der Drehachse erscheint das Faserbündel in immer flacher werdender Position.

Maßstab in A-F: 1 μ m.

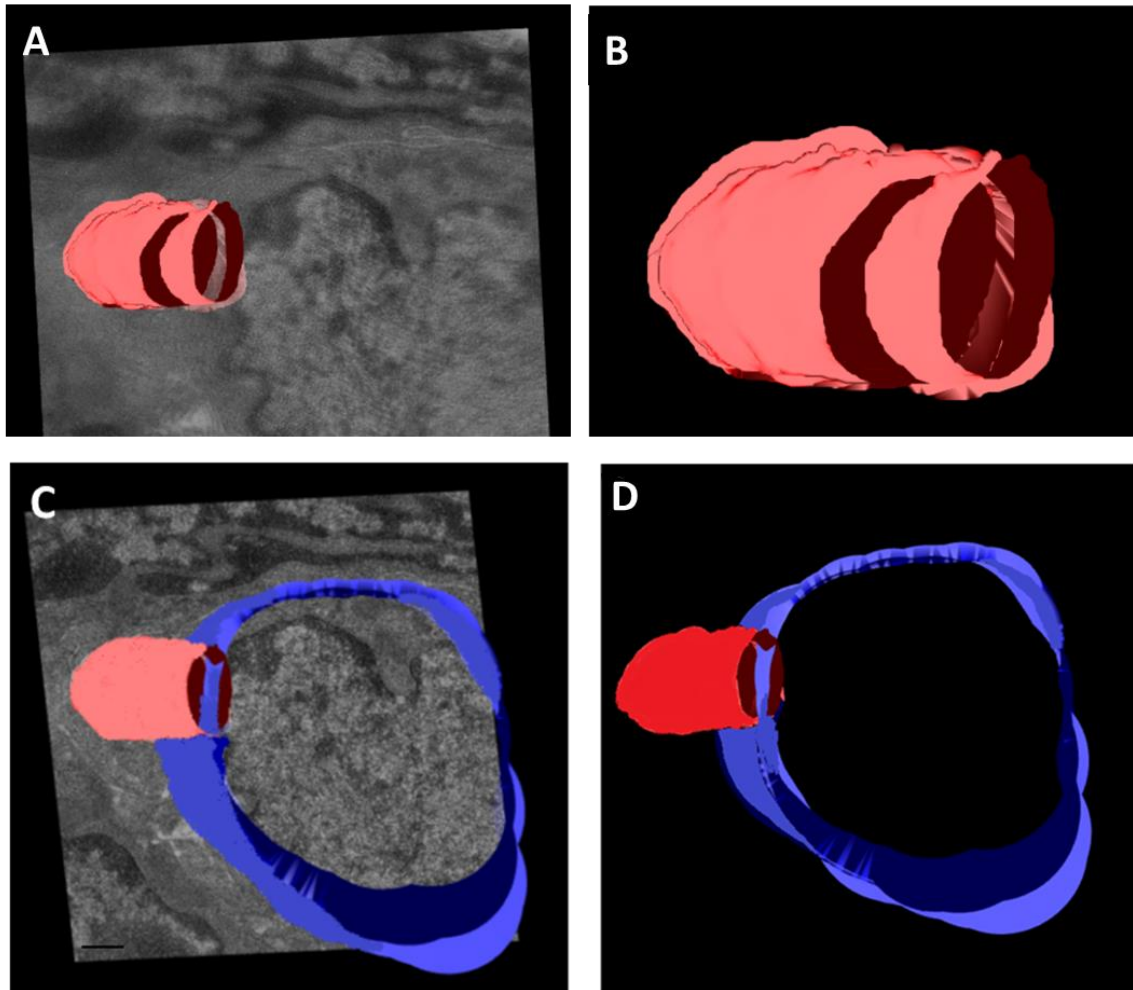


Abb. 14: Tomographische Rekonstruktion einer Nervenfasern

A-D: Tomographische Rekonstruktion eines Nervenfaserbündels (in Abb.12 mit rotem Pfeil markiert). Im Hintergrund die elektronenmikroskopische Aufnahme einer neuroendokrinen Zelle.

B: 3D-Rekonstruktion des Nervenfaserbündels (rot).

C: Nervenfaserbündel (rot) und 3D-Rekonstruktion der neuroendokrinen Zelle (blau). Im Hintergrund die elektronenmikroskopische Aufnahme dieser Stelle. Der Kontakt zwischen der Zelle und dem Nervenfaserbündel ist deutlich zu erkennen.

D: 3D-Rekonstruktion des Nervenfaserbündels und der neuroendokrinen Zelle in direktem Kontakt.

Maßstab in A+C: 1 μ m.

5. Diskussion

5.1 Ergebnisdiskussion

5.1.1 Effekt von Denatonium auf die CGRP-positiven Zellen

Die Ausschüttung von CGRP nach Stimulation mit Denatonium wurde in vorangegangenen Versuchen von Prof. Dr. Peter Reeh und Dr. Tatjana Kichko gemessen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob das nach Stimulation mit Denatonium ausgeschüttete CGRP von den Bürstenzellen, den neuroendokrinen Zellen oder von den Nervenfasern freigesetzt wurde. Es sollte untersucht werden, ob die Stimulation mit Bitterstoffen zu einer Aktivierung von Bürstenzellen führt, welche dann Acetylcholin freisetzen und in Folge dessen die Nervenfasern oder die neuroendokrinen Zellen aktivieren. Es wird angenommen, dass die Ausschüttung von CGRP und Substanz P nach sensorischer Stimulation im Gewebe zur sogenannten neurogenen Entzündung führt (Kummer et al. 2008). Dabei kommt es zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität, der Schleimsekretion und zur Bronchokonstriktion (Barnes 1986). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass es nach Inhalation von Diacetyl, einem Diketon, zu einer Reaktion der Atemwege mittels sensorischer Nervenfasern kam (Goravanahally et al. 2014). So führte die Inhalation zu einer gesteigerten sensorischen Innervation und einer erhöhten Produktion von Substanz P, welche in den sensorischen Nervenfasern der Trachea enthalten ist (Goravanahally et al. 2014). Dieser Vorgang führt wiederum zur Inflammation (Goravanahally et al. 2014). Dass die Ausschüttung von CGRP im kardiovaskulären System überwiegend aus sensorischen Nervenfasern erfolgt, konnte ebenfalls bereits festgestellt werden (Russell et al. 2014). CGRP hat eine hohe vasodilatatorische Wirkung und bedingt wichtige protektive Mechanismen sowohl im kardiovaskulären System als auch im Wundheilungsprozess (Russell et al. 2014). Man weiß, dass dem CGRP eine wichtige Rolle bei immunologischen Funktionen zukommt und es wichtige antiinflammatorische Effekte bedingt. So ist schon lange bekannt, dass CGRP in der Lage ist, die H₂O₂-Produktion von Makrophagen zu inhibieren (Nong et

al. 1989) und diese an der T-Zell-Aktivierung zu hindern (Springer et al. 2003). Bei Untersuchungen zur Rolle des CGRPs bei chronischer und akuter Colitis konnte nachgewiesen werden, dass während der Entzündungsreaktion sowohl CGRP als auch Substanz P von sensorischen Nervenfasern freigesetzt wird (Reinshagen et al. 1998). Man konnte darüber hinaus zeigen, dass CGRP protektiv auf die Mukosa wirkt (Reinshagen et al. 1998). Ebenso ist die protektive Wirkung von CGRP auf Alveolarepithelzellen bereits beschrieben worden (Fu et al. 2017). Man geht davon aus, dass CGRP sowohl den apoptotischen Zelltod als auch DNA-Schäden verhindern kann (Fu et al. 2017). So könnte bei der Behandlung von Hyperoxie-bedingten Lungenerkrankungen die Hochregulierung des CGRPs ein neuer Therapieansatz sein, da dieses die Epithelzellen in der Lunge vor hyperoxischen Schäden schützt (Fu et al. 2017). Des Weiteren konnte in neuesten Untersuchungen die protektive Wirkung von CGRP in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen verdeutlicht werden. So geht man davon aus, dass CGRP in der Lage ist, die Nachlast zu senken und die positive Inotropie zu verstärken (Kee et al. 2018). Ebenso hat man einen protektiven Effekt des CGRPs gegenüber Hypertonie nachweisen können, indem es aktiv gegen das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) wirkt (Kee et al. 2018). CGRP kann den Reperfusionsschaden nach Minderdurchblutung, die Apoptoserate sowie die Entzündungsreaktion vermindern (Kee et al. 2018). Diese protektive Wirkung des CGRPs ist insbesondere in Bezug auf die antiinflammatorische Wirkung auch für die Atemwege denkbar. In der vorliegenden Arbeit sollte die Fragestellung, woher das ausgeschüttete CGRP in den Atemwegen stammt, geklärt werden. Dazu konnte anhand von Versuchen, bei denen zur Stimulation verschiedene Konzentrationen von Denatonium verwendet wurden, gezeigt werden, dass die Stimulation keine Auswirkungen auf die Anzahl der CGRP-positiven Zellen hatte. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Morphologie der Zellen unverändert blieb. Die gleichbleibende Anzahl sowie die unveränderte Morphologie von CGRP-positiven Zellen zeigten, dass es in Folge der Stimulation mit Bitterstoffen sehr wahrscheinlich nicht zur Ausschüttung von CGRP durch die Zellen gekommen war. Deshalb wurde im weiteren Verlauf die

Auswirkung des Bitterstoffs sowohl auf die extraepithelialen als auch auf die intraepithelialen Nervenfasern untersucht.

5.1.2 Veränderte Morphologie der CGRP-positiven Nervenfasern nach Stimulation mit Denatonium

CGRP hat als starker Vasodilatator eine wichtige Funktion bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Abläufen. Daher ist es besonders in Bezug auf die Entstehung und Behandlung von respiratorischen Erkrankungen interessant zu klären, woher das ausgeschüttete CGRP stammt. Anhand von Untersuchungen am Nasenepithel von Mäusen bezüglich der Entstehung von Entzündungsprozessen in der Nasenschleimhaut wurde die Bedeutung von SCCs in diesem Zusammenhang untersucht. Man fand heraus, dass die Aktivierung von SCCs zu einer schnellen lokalen proinflammatorischen Antwort führt, welche einen Abwehrmechanismus darstellt (Saunders et al. 2014). Nach der Stimulation mittels Denatonium setzen SCCs Acetylcholin frei, welches peptiderge trigeminale Nozizeptoren aktiviert, die die Freisetzung von Substanz P veranlassen (Saunders et al. 2014). Dadurch werden Neurokinin-1-Rezeptoren (NK₁) aktiviert, welche schließlich die typischen inflammatorischen Prozesse, wie z.B. Mastzelldegranulation und die Ödembildung bedingen (Saunders et al. 2014). Zusätzlich gelang es zu zeigen, dass peptiderge Nervenfasern nach der Stimulation mit Capsaicin die gleichen lokalen inflammatorischen Prozesse hervorrufen (Saunders et al. 2014).

Die bereits angesprochene ambivalente Bedeutung von CGRP für verschiedene physiologische sowie pathologische Vorgänge im Organismus, konnte bereits in vorangegangenen Publikationen herausgestellt werden. So konnte gezeigt werden, dass der CGRP-Anteil im Plasma bei Ratten mit pulmonaler Hypertonie deutlich geringer war als bei der gesunden Kontrollgruppe (Russell et al. 2014). Ebenso ist bekannt, dass das Fehlen von CGRP bei gendefizienten Mäusen mit einer Hemmung der Hyperreagibilität des respiratorischen Systems assoziiert ist (Aoki-Nagase et al. 2002). Auf der anderen Seite konnte jedoch anhand verschiedener Tiermodelle gezeigt

werden, dass die Blockade von CGRP zur Verschlechterung von kardiovaskulären Erkrankungen führt (Russell et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei der Betrachtung der CGRP-positiven Nervenfasern nach der Stimulation mit Denatonium, dass diese keinen Einfluss auf die Anzahl oder Morphologie der extraepithelialen Fasern hatte. Die Fasern erschienen sowohl bei den PBS Kontrollen als auch bei den mit Denatonium stimulierten Proben identisch stark gefärbt. Im Hinblick auf die intraepithelialen Fasern zeigte sich, dass die Stimulation mit Denatonium sowohl Auswirkungen auf die Quantität als auch auf die Morphologie der Fasern hatte. Der Querschnitt der intraepithelialen Fasern sowie die Anzahl haben in Folge der Stimulation deutlich abgenommen. Dieser Effekt wurde mit steigender Denatoniumkonzentration zusätzlich verstärkt. Die Ergebnisse bestärken die Annahme, dass es aufgrund der Stimulation mit dem Bitterstoff zur Ausschüttung von CGRP aus den intraepithelialen Fasern gekommen ist. Die Fasern erscheinen daher dünner und deutlich schwächer gefärbt. Möglicherweise laufen in den Atemwegen ähnliche Prozesse wie im kardiovaskulären System ab, wo das ausgeschüttete CGRP überwiegend aus den sensorischen Fasern stammt. Zur Entwicklung neuer Therapieansätze bei der Behandlung von Erkrankungen des respiratorischen Systems könnten diese Erkenntnisse hilfreich sein. Die sowohl wichtige Rolle von CGRP bei physiologischen als auch bei pathophysiologischen Vorgängen gilt es weiter zu erforschen, um sich diese vielseitige Aminosäure bei der Therapie von Erkrankungen zu Nutze machen zu können. Interessant wäre es weiterhin, den Effekt der gesteuerten Regulierung von CGRP im respiratorischen System auf die neuroendokrinen Zellen zu untersuchen. Diese sind als Ursprung für die Entstehung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC) verantwortlich (Park et al. 2011).

5.1.3 Auswirkungen der Stimulation mit Denatonium auf die CGRP-positiven Zellen bei *TRPM5^{+/+}*- und *TRPM5^{-/-}*- Mäusen

Dass es bei *TRPM5^{-/-}*-Mäusen zu keiner oder allenfalls einer stark abgeschwächten geschmacksvermittelten Reaktion auf Reize mit Bitterstoffen kommt, wurde bereits bewiesen (Damak et al. 2006). Ebenso zeigen diese Mäuse eine deutlich schwächere nervale Antwort (Damak et al. 2006). Neueste Untersuchungen zeigen hingegen, dass Nikotin über zwei rezeptorabhängige Mechanismen einen bitteren Geschmack hervorruft (Qian et al. 2018). Dabei findet die Signalübertragung zum einen über einen TRPM5-abhängigen und zum anderen über einen TRPM5-unabhängigen, aber nAChR-abhängigen Signalweg statt (Qian et al. 2018). Es konnte nachgewiesen werden, dass Nikotin sowohl bei den *TRPM5^{+/+}*- als auch bei den TRPM5-gendefizienten Mäusen eine nervale und eine aversive Verhaltensantwort hervorrief (Qian et al. 2018). Dies ist im Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche mit dem Bitterstoff Denatonium äußerst interessant. Zunächst konnte gezeigt werden, dass sowohl bei der Gruppe der *TRPM5^{+/+}*- als auch bei der Gruppe der *TRPM5^{-/-}*-Mäusen CGRP-positive Zellen nachgewiesen werden konnten. Die Zellen waren sowohl im trachealen als auch im bronchialen Abschnitt zu finden. Die Annahme, dass es durch die Platzierung einer Beatmungskanüle zu einer Schädigung des Epithels im Abschnitt T1-5 kommen könnte, wurde durch das signifikante Ergebnis unterstützt. Dennoch kann nicht eindeutig gesagt werden, ob es durch den mechanischen Reiz der Beatmungskanüle oder durch den chemischen Reiz des Bitterstoffes zur Ausschüttung von CGRP gekommen ist. Im Hinblick auf die Fragestellung, ob es nach Stimulation mit Bitterstoffen zur Ausschüttung von CGRP kommt, wurden die bereits beschriebenen Versuche im Folgenden mit dem gendefizienten Mausstamm durchgeführt. Hier zeigte sich, dass es beim *TRPM5^{-/-}*-Mausstamm, verglichen mit den *TRPM5^{+/+}*-Mäusen, nach Stimulation mit 1 mM Denatonium zu keinem signifikanten Unterschied in Bezug auf die Anzahl der CGRP-positiven Zellen kam. Dies lässt darauf schließen, dass es in Folge der Stimulation zu keiner Ausschüttung von CGRP durch die Zellen gekommen ist. Dieses Ergebnis deckt sich weitestgehend mit den Ergebnissen

aus den vorangegangenen Versuchen. Dort zeigte sich ebenfalls, dass das CGRP nicht von den Zellen ausgeschüttet wurde, sondern höchstwahrscheinlich von den intraepithelialen Fasern freigesetzt wurde. Es gilt somit noch weiterhin herauszufinden, ob neuroendokrine Zellen direkt oder über Bürstenzellen aktiviert werden. Diese Fragestellung konnte anhand der durchgeführten Versuche und der Ergebnisse nicht abschließend beantwortet werden, da zurzeit noch kein epithelspezifischer CGRP-gendefizienter Mausstamm zur Verfügung steht.

5.1.4 Auswirkungen der Stimulation mit Denatonium auf die CGRP-positiven Nervenfasern bei *TRPM5*^{+/+}- und *TRPM5*^{-/-}- Mäusen

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl vor der Stimulation mit Denatonium als auch danach ausschließlich extraepitheliale CGRP-positive Nervenfasern gefunden werden konnten. Darüber hinaus konnte kein Unterschied im Hinblick auf die beiden verwendeten Mausstämme festgestellt werden. So konnten kräftig gefärbte extraepitheliale Nervenfasern sowohl bei den *TRPM5*^{+/+}-, als auch bei den *TRPM5*^{-/-}-Mäusen gefunden werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Nervenfasern zusätzlich zu dem Aktivierungsweg über die Bürstenzellen auch direkt über bittere Substanzen aktiviert werden können.

5.2 Methodenkritik

5.2.1 Grenzen der dreidimensionalen Darstellung von neuroendokrinen Zellen anhand von Serienschnitten

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Loch-Grids verwendet. Zunächst wurden die einzelnen Präparate bei einer 7.500-fachen Vergrößerung auf das Vorhandensein von neuroendokrinen Zellen untersucht. Bei Auffinden einer geeigneten Stelle wurde diese zumeist bei einer 16000- oder 32000-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die davor und danach

liegenden Mesh-Schnitte wurden daraufhin auf das Vorkommen dieser spezifischen Zelle hin untersucht, um diese vollständig analysieren zu können. Die Problematik bei dieser Methode besteht darin, dass es bereits beim Anfertigen der Serienschnitte zu Gewebeverlust beim Schneiden der Präparate kommen kann. Dies ist besonders bei Präparaten, welche von Strukturen mit verschiedener Dichte durchzogen sind, der Fall. So auch bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mäusetracheen, da diese aufgrund der Knorpelspangen besonders gefährdet sind, zu reißen. Des Weiteren ergibt sich eine Schwierigkeit beim Auswerten der Schnitte unter dem Elektronenmikroskop, da es innerhalb einer Serie erneut zum Verlust von Schnitten durch Einreißen der Präparate während des Mikroskopierens kommen kann. Zur Stabilisierung der angefertigten Präparate wurden die Schnitte zunächst bei offener Objektivblende und einer 200-fachen Vergrößerung bei einem Stromfluss von 24-28 μA für die Dauer von 15 Minuten bestrahlt. Dies führte zu einem guten Kontrast innerhalb des untersuchten Gewebes. Falls das Präparat nicht ausreichend stabilisiert war, wurde dieser Vorgang für weitere 5 Minuten fortgeführt. Dabei kam es allerdings ebenfalls gelegentlich zum Einreißen der Präparate, was das Auswerten des betroffenen Präparates unmöglich machte. Dies erschwerte es, eine geeignete Stelle zu finden, welche sich lückenlos über eine ausreichende Länge verfolgen ließ.

5.2.2 Methode der tomographischen Rekonstruktion

Bei der tomographischen Rekonstruktion von Nervenfasern in Nachbarschaft zu neuroendokrinen Zellen konnte der ausgebildete Kontakt zwischen der Zelle und der Faser gezeigt werden. Bei der Verbindung handelt es sich wahrscheinlich um eine afferente Verbindung, wie sie bereits im Darm nachgewiesen werden konnte. Dort konnte gezeigt werden, dass enteroendokrine Zellen eine direkte Verbindung mit sensorischen Neuronen eingehen und über einen zytoplasmatischen Prozess kommunizieren (Bohorquez et al. 2015). In Bezug auf die vorliegende Arbeit deutet dies darauf hin, dass in der Trachea ähnliche Prozesse ablaufen. Höchstwahrscheinlich

finden über die ausgebildete Verbindung zwischen neuroendokrinen Zellen und Nervenfasern Kommunikationsprozesse statt, in Folge derer es zu einer Veränderung in der Atemfunktion kommt.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, neuroendokrine Zellen in den Atemwegen bei Mäusen zu untersuchen, welche Kontakt zu sensorischen Nervenfasern ausbilden. In vorangegangenen Versuchen konnte bereits die Menge des ausgeschütteten CGRPs nach Stimulation mit Bitterstoffen bestimmt werden. Die Methode zur Messung der Freisetzung von CGRP aus verschiedenen Organen wurde von Prof. Reeh und seiner Arbeitsgruppe etabliert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, woher das ausgeschüttete CGRP kommt und ob die Stimulation von Bürstenzellen mit Bitterstoffen zur Ausschüttung von CGRP aus den neuroendokrinen Zellen führt. Anhand der elektronenmikroskopischen Auswertung und der dreidimensionalen Rekonstruktion konnte gezeigt werden, dass es Kontakt zwischen den neuroendokrinen Zellen im Epithel der Trachea und sensorischen Nervenfasern gibt. Die immunhistochemischen Versuche zeigten, dass es nach Stimulation mit Denatonium höchstwahrscheinlich zur Ausschüttung von CGRP durch die intraepithelialen Fasern gekommen ist. Diese Annahme spiegelt sich in der veränderten Morphologie sowie der geringeren Quantität der intraepithelialen Fasern nach Stimulation mit Denatonium deutlich wider. Dass es weder bei der Anzahl der neuroendokrinen Zellen, noch bei der Erscheinung und Anzahl der extraepithelialen Fasern nach Denatoniumstimulation zu einer Veränderung gekommen ist, unterstützt diese Annahme ebenfalls. Im Hinblick auf die durchgeführten Versuche mit den TRPM5-gendefizienten Mäusen zeigte sich, dass die Stimulation mit Denatonium keine Auswirkungen auf die Anzahl der neuroendokrinen Zellen hatte. Dieses Ergebnis unterstützt die Erkenntnisse der vorangegangenen Untersuchungen, welche gezeigt haben, dass das CGRP nicht von den neuroendokrinen Zellen ausgeschüttet wurde. Des Weiteren lässt das Ergebnis darauf schließen, dass die Ausschüttung von CGRP nicht abhängig von der Anwesenheit von Bürstenzellen ist. Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass es nach Stimulation mit Bittersubstanzen zu einer CGRP-Ausschüttung durch die intraepithelialen Fasern gekommen ist. Interessant wäre es weiterhin zu klären, welche Effekte diese Ausschüttung

bewirkt und welche Bedeutung der Freisetzung von Substanz P in diesem Zusammenhang zukommt.

7. Summary

This thesis focused on the objective to investigate the neuroendocrine cells in the respiratory tracts of mice which connect to sensory nervous fibers. In the preceding trials it was possible to determine the amount of the released CGRP after the stimulation with bitter substances. The method of measuring the release of CGRP from a variety of organs was established by Prof. Reeh and his working group. The aim of this work was to investigate where the released CGRP originates from and if the stimulation of brush cells with bitter substances leads to the release of CGRP in the neuroendocrine cells. Based on the electron-microscopic analysis and the three dimensional reconstruction, a correlation between the neuroendocrine cells in the epithelium of mice trachea and the sensory nervous fibers was observed. The immunohistochemical examinations displayed that the stimulation with Denatonium most probably leads to the release of CGRP through intraepithelial fibers. This presumption is reflected in the changed morphology as well as the lower quantity of intraepithelial fibers after the stimulation with Denatonium. Furthermore, the presumption is supported by the fact that neither the number of neuroendocrine cells, nor the appearance and number of extraepithelial fibers led to a change after denatonium stimulation. With regards to the executed trials with TRPM5 gene-deficient mice it was observed that the stimulation with Denatonium does not impact the number of neuroendocrine cells. This again supports the finding of the previous trials which showed that CGRP was not released by neuroendocrine cells. Moreover, it can be concluded from this result that the release of CGRP is independent from the existence of brush cells. Overall the trials showed that the release of CGRP through intraepithelial fibers was triggered by the stimulation with bitter substances. Based on these results it would be interesting to investigate the effects of the release and to understand the role of substance P in this correlation.

8 Literaturverzeichnis

- Adriaensen, D., Brouns, I., Pintelon, I., De Proost, I., & Timmermans, J. P. (2006). Evidence for a role of neuroepithelial bodies as complex airway sensors: comparison with smooth muscle-associated airway receptors. *J Appl Physiol* (1985), 101(3), 960-970. doi:10.1152/jappphysiol.00267.2006
- Aoki-Nagase, T., Nagase, T., Oh-Hashi, Y., Shindo, T., Kurihara, Y., Yamaguchi, Y., . . . Ouchi, Y. (2002). Attenuation of antigen-induced airway hyperresponsiveness in CGRP-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283(5), L963-970. doi:10.1152/ajplung.00130.2002
- Barnes, P. J. (1986). Asthma as an axon reflex. *Lancet*, 1(8475), 242-245.
- Berczi, I., Chalmers, I. M., Nagy, E., & Warrington, R. J. (1996). The immune effects of neuropeptides. *Baillieres Clin Rheumatol*, 10(2), 227-257.
- Bohorquez, D. V., Shahid, R. A., Erdmann, A., Kreger, A. M., Wang, Y., Calakos, N., . . . Liddle, R. A. (2015). Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells. *J Clin Invest*, 125(2), 782-786. doi:10.1172/JCI78361
- Brand-Saberi, B. E. M., & Schafer, T. (2014). Trachea: anatomy and physiology. *Thorac Surg Clin*, 24(1), 1-5. doi:10.1016/j.thorsurg.2013.09.004
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., & Snyder, S. H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347(6295), 768-770. doi:10.1038/347768a0
- Burnstock, G. (1986). The non-adrenergic non-cholinergic nervous system. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 280(2 Suppl), 1-15.
- Carr, L. L., Chung, J. H., Duarte Achcar, R., Lesic, Z., Rho, J. Y., Yagihashi, K., . . . Kern, J. A. (2015). The clinical course of diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia. *Chest*, 147(2), 415-422. doi:10.1378/chest.14-0711
- Chang, L. Y., Mercer, R. R., & Crapo, J. D. (1986). Differential distribution of brush cells in the rat lung. *Anat Rec*, 216(1), 49-54. doi:10.1002/ar.1092160109
- Chen, Z., Chen, H., Chen, F., Gu, D., Sun, L., Zhang, W., . . . Lai, K. (2017). Vagotomy decreases the neuronal activities of medulla oblongata and alleviates neurogenic inflammation of airways induced by repeated intra-esophageal instillation of HCl in guinea pigs. *Physiol Res*, 66(6), 1021-1028.
- Chen, Z., Sun, L., Chen, H., Gu, D., Zhang, W., Yang, Z., . . . Lai, K. (2018). Dorsal Vagal Complex Modulates Neurogenic Airway Inflammation in a Guinea Pig Model With Esophageal Perfusion of HCl. *Front Physiol*, 9, 536. doi:10.3389/fphys.2018.00536

- Damak, S., Rong, M., Yasumatsu, K., Kokrashvili, Z., Perez, C. A., Shigemura, N., . . . Margolskee, R. F. (2006). Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds. *Chem Senses*, *31*(3), 253-264. doi:10.1093/chemse/bjj027
- Davis, S. F., Grover, C. A., Erickson, C. A., Miller, L. A., & Bowman, J. A. (1987). Analyzing aversiveness of denatonium saccharide and quinine in rats. *Percept Mot Skills*, *64*(3 Pt 2), 1215-1222. doi:10.2466/pms.1987.64.3c.1215
- Di, Y. Z., Han, B. S., Di, J. M., Liu, W. Y., & Tang, Q. (2019). Role of the brain-gut axis in gastrointestinal cancer. *World J Clin Cases*, *7*(13), 1554-1570. doi:10.12998/wjcc.v7.i13.1554
- Dubaissi, E., Rousseau, K., Lea, R., Soto, X., Nardeosingh, S., Schweickert, A., . . . Papalopulu, N. (2014). A secretory cell type develops alongside multiciliated cells, ionocytes and goblet cells, and provides a protective, anti-infective function in the frog embryonic mucociliary epidermis. *Development*, *141*(7), 1514-1525. doi:10.1242/dev.102426
- Finger, T. E., Bottger, B., Hansen, A., Anderson, K. T., Alimohammadi, H., & Silver, W. L. (2003). Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(15), 8981-8986. doi:10.1073/pnas.1531172100
- Fu, H., Zhang, T., Huang, R., Yang, Z., Liu, C., Li, M., . . . Xu, F. (2017). Calcitonin gene-related peptide protects type II alveolar epithelial cells from hyperoxia-induced DNA damage and cell death. *Exp Ther Med*, *13*(4), 1279-1284. doi:10.3892/etm.2017.4132
- Genovese, F., & Tizzano, M. (2018). Microvillous cells in the olfactory epithelium express elements of the solitary chemosensory cell transduction signaling cascade. *PLoS One*, *13*(9), e0202754. doi:10.1371/journal.pone.0202754
- Goravanahally, M. P., Hubbs, A. F., Fedan, J. S., Kashon, M. L., Battelli, L. A., Mercer, R. R., . . . Dey, R. D. (2014). Diacetyl increases sensory innervation and substance P production in rat trachea. *Toxicol Pathol*, *42*(3), 582-590. doi:10.1177/0192623313493689
- Herbert, M. K., & Holzer, P. (2002). [Neurogenic inflammation. I. Basic mechanisms, physiology and pharmacology]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, *37*(6), 314-325. doi:10.1055/s-2002-32233
- Huang, Y. H., Klingbeil, O., He, X. Y., Wu, X. S., Arun, G., Lu, B., . . . Vakoc, C. R. (2018). POU2F3 is a master regulator of a tuft cell-like variant of small cell lung cancer. *Genes Dev*, *32*(13-14), 915-928. doi:10.1101/gad.314815.118
- Jancso, N., Jancso-Gabor, A., & Szolcsanyi, J. (1967). Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother*, *31*(1), 138-151.
- Joos, G. F., Germonpre, P. R., Kips, J. C., Peleman, R. A., & Pauwels, R. A. (1994). Sensory neuropeptides and the human lower airways: present state and future directions. *Eur Respir J*, *7*(6), 1161-1171.

- Kaltdorf, K. V., Schulze, K., Helmprobst, F., Kollmannsberger, P., Dandekar, T., & Stigloher, C. (2017). FIJI Macro 3D ART VeSElecT: 3D Automated Reconstruction Tool for Vesicle Structures of Electron Tomograms. *PLoS Comput Biol*, *13*(1), e1005317. doi:10.1371/journal.pcbi.1005317
- Kee, Z., Kodji, X., & Brain, S. D. (2018). The Role of Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) in Neurogenic Vasodilation and Its Cardioprotective Effects. *Front Physiol*, *9*, 1249. doi:10.3389/fphys.2018.01249
- Kemp, P. J., Lewis, A., Hartness, M. E., Searle, G. J., Miller, P., O'Kelly, I., & Peers, C. (2002). Airway chemotransduction: from oxygen sensor to cellular effector. *Am J Respir Crit Care Med*, *166*(12 Pt 2), S17-24. doi:10.1164/rccm.2206009
- Kichko, T. I., Niedermirtl, F., Leffler, A., & Reeh, P. W. (2015). Irritant volatile anesthetics induce neurogenic inflammation through TRPA1 and TRPV1 channels in the isolated mouse trachea. *Anesth Analg*, *120*(2), 467-471. doi:10.1213/ANE.0000000000000568
- Kobzik, L., Brecht, D. S., Lowenstein, C. J., Drazen, J., Gaston, B., Sugarbaker, D., & Stamler, J. S. (1993). Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *9*(4), 371-377. doi:10.1165/ajrcmb/9.4.371
- Kohanski, M. A., Workman, A. D., Patel, N. N., Hung, L. Y., Shtraks, J. P., Chen, B., . . . Cohen, N. A. (2018). Solitary chemosensory cells are a primary epithelial source of IL-25 in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*, *142*(2), 460-469 e467. doi:10.1016/j.jaci.2018.03.019
- Koliakos, E., Thomopoulos, T., Abbassi, Z., Duc, C., & Christodoulou, M. (2017). Diffuse Idiopathic Pulmonary Neuroendocrine Cell Hyperplasia: A Case Report and Review of the Literature. *Am J Case Rep*, *18*, 975-979.
- Krasteva-Christ, G., Soultanova, A., Schutz, B., Papadakis, T., Weiss, C., Deckmann, K., . . . Kummer, W. (2015). Identification of cholinergic chemosensory cells in mouse tracheal and laryngeal glandular ducts. *Int Immunopharmacol*, *29*(1), 158-165. doi:10.1016/j.intimp.2015.05.028
- Krasteva, G., Canning, B. J., Hartmann, P., Veres, T. Z., Papadakis, T., Muhlfeld, C., . . . Kummer, W. (2011). Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(23), 9478-9483. doi:10.1073/pnas.1019418108
- Krasteva, G., Hartmann, P., Papadakis, T., Bodenbenner, M., Wessels, L., Weihe, E., . . . Kummer, W. (2012). Cholinergic chemosensory cells in the auditory tube. *Histochem Cell Biol*, *137*(4), 483-497. doi:10.1007/s00418-012-0911-x
- Kummer, W., Lips, K. S., & Pfeil, U. (2008). The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol*, *130*(2), 219-234. doi:10.1007/s00418-008-0455-2

- Laitinen, A., Partanen, M., Hervonen, A., Pelto-Huikko, M., & Laitinen, L. A. (1985). VIP like immunoreactive nerves in human respiratory tract. Light and electron microscopic study. *Histochemistry*, *82*(4), 313-319.
- Lembrechts, R., Brouns, I., Schnorbusch, K., Pintelon, I., Timmermans, J. P., & Adriaensen, D. (2012). Neuroepithelial bodies as mechanotransducers in the intrapulmonary airway epithelium: involvement of TRPC5. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *47*(3), 315-323. doi:10.1165/rcmb.2012-0068OC
- Lewis, T., & Zotterman, Y. (1927). Vascular reactions of the skin to injury: Part VIII. The resistance of the human skin to constant currents, in relation to injury and vascular response. *J Physiol*, *62*(3), 280-288.
- Matsuo, K., Taniguchi, K., Hamamoto, H., Ito, Y., Futaki, S., Inomata, Y., . . . Uchiyama, K. (2019). Delta-like 3 localizes to neuroendocrine cells and plays a pivotal role in gastrointestinal neuroendocrine malignancy. *Cancer Sci*. doi:10.1111/cas.14157
- Mazzone, S. B., & Udem, B. J. (2016). Vagal Afferent Innervation of the Airways in Health and Disease. *Physiol Rev*, *96*(3), 975-1024. doi:10.1152/physrev.00039.2015
- McDonald, K. L., & Auer, M. (2006). High-pressure freezing, cellular tomography, and structural cell biology. *Biotechniques*, *41*(2), 137, 139, 141 passim.
- Mitic, L. L., Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *279*(2), G250-254.
- Moncada, S., Palmer, R. M., & Higgs, E. A. (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol*, *38*(11), 1709-1715. doi:10.1016/0006-2952(89)90403-6
- Nong, Y. H., Titus, R. G., Ribeiro, J. M., & Remold, H. G. (1989). Peptides encoded by the calcitonin gene inhibit macrophage function. *J Immunol*, *143*(1), 45-49.
- Pack, R. J., Al-Ugaily, L. H., Morris, G., & Widdicombe, J. G. (1980). The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell Tissue Res*, *208*(1), 65-84.
- Panneck, A. R., Rafiq, A., Schutz, B., Soultanova, A., Deckmann, K., Chubanov, V., . . . Kummer, W. (2014). Cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in murine thymic medulla. *Cell Tissue Res*, *358*(3), 737-748. doi:10.1007/s00441-014-2002-x
- Paplinska-Goryca, M., Grabczak, E. M., Dabrowska, M., Hermanowicz-Salamon, J., Proboszcz, M., Nejman-Gryz, P., . . . Krenke, R. (2018). Sputum interleukin-25 correlates with asthma severity: a preliminary study. *Postepy Dermatol Alergol*, *35*(5), 462-469. doi:10.5114/ada.2017.71428

- Park, K. S., Liang, M. C., Raiser, D. M., Zamponi, R., Roach, R. R., Curtis, S. J., . . . Kim, C. F. (2011). Characterization of the cell of origin for small cell lung cancer. *Cell Cycle*, *10*(16), 2806-2815. doi:10.4161/cc.10.16.17012
- Pavelka, M., Ronge, H. R., & Stockinger, G. (1976). [Comparative study of tracheal epithelium of different mammals]. *Acta Anat (Basel)*, *94*(2), 262-282.
- Qian, J., Mummalaneni, S., Grider, J. R., Damaj, M. I., & Lyall, V. (2018). Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are expressed in Trpm5 positive taste receptor cells (TRCs). *PLoS One*, *13*(1), e0190465. doi:10.1371/journal.pone.0190465
- Reinshagen, M., Flamig, G., Ernst, S., Geerling, I., Wong, H., Walsh, J. H., . . . Adler, G. (1998). Calcitonin gene-related peptide mediates the protective effect of sensory nerves in a model of colonic injury. *J Pharmacol Exp Ther*, *286*(2), 657-661.
- Robbins, R. A., Barnes, P. J., Springall, D. R., Warren, J. B., Kwon, O. J., Buttery, L. D., . . . Polak, J. M. (1994). Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *203*(1), 209-218. doi:10.1006/bbrc.1994.2169
- Robbins RA, R. S. (1997). Biology of airway epithelial cells. *Crystal RG, West JB, Weibel ER (Hrsg.). The Lung: Scientific Foundations vol 1. LippincottRaven, Philadelphia*, 445-457.
- Rubin, B. K. (2002). Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care*, *47*(7), 761-768.
- Russell, F. A., King, R., Smillie, S. J., Kodji, X., & Brain, S. D. (2014). Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, *94*(4), 1099-1142. doi:10.1152/physrev.00034.2013
- Said, S. I., Kitamura, S., Yoshida, T., Preskitt, J., & Holden, L. D. (1974). Humoral control of airways. *Ann N Y Acad Sci*, *221*, 103-114. doi:10.1111/j.1749-6632.1974.tb28205.x
- Saunders, C. J., Christensen, M., Finger, T. E., & Tizzano, M. (2014). Cholinergic neurotransmission links solitary chemosensory cells to nasal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(16), 6075-6080. doi:10.1073/pnas.1402251111
- Sbarbati, A., & Osculati, F. (2005). A new fate for old cells: brush cells and related elements. *J Anat*, *206*(4), 349-358. doi:10.1111/j.1469-7580.2005.00403.x
- Schneeberger, E. E. (1980). Heterogeneity of tight junction morphology in extrapulmonary and intrapulmonary airways of the rat. *Anat Rec*, *198*(2), 193-208. doi:10.1002/ar.1091980207
- Springer, J., Geppetti, P., Fischer, A., & Groneberg, D. A. (2003). Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator. *Pulm Pharmacol Ther*, *16*(3), 121-130. doi:10.1016/S1094-5539(03)00049-X
- Voynow, J. A., & Rubin, B. K. (2009). Mucins, mucus, and sputum. *Chest*, *135*(2), 505-512. doi:10.1378/chest.08-0412

- Walentek, P., Bogusch, S., Thumberger, T., Vick, P., Dubaissi, E., Beyer, T., . . . Schweickert, A. (2014). A novel serotonin-secreting cell type regulates ciliary motility in the mucociliary epidermis of *Xenopus* tadpoles. *Development*, *141*(7), 1526-1533. doi:10.1242/dev.102343
- Wanner, A., Salathe, M., & O'Riordan, T. G. (1996). Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med*, *154*(6 Pt 1), 1868-1902. doi:10.1164/ajrccm.154.6.8970383
- Widdicombe, J. G. (1998). Autonomic regulation. i-NANC/e-NANC. *Am J Respir Crit Care Med*, *158*(5 Pt 3), S171-175. doi:10.1164/ajrccm.158.supplement_2.13tac140
- Yamamoto, Y., Ozawa, Y., Yokoyama, T., & Nakamuta, N. (2018). Immunohistochemical characterization of brush cells in the rat larynx. *J Mol Histol*, *49*(1), 63-73. doi:10.1007/s10735-017-9747-y

Gerät

Fluoreszenzmikroskop

Kryostat

Mikrotom

Transmissionselektronenmikroskop

Transmissionselektronenmikroskop

Hersteller

Zeiss Axioskop2 mot plus
Mikroskop, AxioCam MRc,
Axiovision 4-Software; Carl Zeiss
GmbH, Jena

Leica CM 3050S; Leica
Mikrosysteme Vertrieb GmbH,
Wetzlar

Ultracut-Schneidegerät E;
Reichert-Jung, Nußloch

LEO912 AB; Zeiss, Oberkochen

JEOL JEM-2100; JEOL GmbH
Freising

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und nur unter zu Hilfenahme der angegebenen Mittel und Quellen, verfasst habe. Material, welches aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommen wurde, oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Textstellen, welche wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sowie alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind ebenfalls als solche kenntlich gemacht. Ich versichere, dass ich bei den von mir durchgeführten Versuchen, die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in den „Richtlinien der Julius Maximilians Universität Würzburg zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Frau Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ und Herrn Prof. Dr. Süleyman Ergün für die freundliche Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Mittel und die Betreuung dieser Arbeit. Bei Frau Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ möchte ich mich herzlich für ihr Engagement und ihre unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Frau Prof. Dr. Carmen Villmann danke ich herzlich für die Bereitschaft zur Betreuung dieser Arbeit.

Frau PD Dr. Nicole Wagner danke ich sehr für die Einarbeitung und unentwegte Bereitschaft zur Hilfestellung am Elektronenmikroskop.

Herrn Prof. Dr. Christian Stigloher gilt mein besonderer Dank für die Bereitschaft zur Unterstützung am Elektronenmikroskop, sowie Katharina Lichter für die vielen Ratschläge und Hilfestellungen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Ursula Roth für ihre Unterstützung und Geduld bei der Arbeit im Labor bedanken.

Bei Erna Kleinschroth, Karin Reinfurt-Gehm, Sieglinde Schenk und Lisa Berberich möchte ich mich für die gute Einarbeitung und herzliche Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Michael Christof danke ich sehr für seine Hilfe bei allen technischen Fragen.

Meinen „Mit-Doktorandinnen“ Wienke Helm und Wera Burow danke ich von Herzen dafür, dass sie diese Zeit mit mir gemeinsam verbracht haben und unzählige Stunden während der Semesterferien mit mir im Institut verbracht haben.

Daniel, Dir danke ich für deine Geduld und Unterstützung bei dieser Arbeit.

Meiner Schwester Anna danke ich sehr dafür, dass sie jedes Wort penibel gelesen hat.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen dafür, dass ich mich auf deren bedingungslose Unterstützung immer verlassen konnte und ohne die ich es niemals bis hier her geschafft hätte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lisa-Christina Hübner

Ausbildung

06/2015-06/2020 Dissertation zur Erlangung des Grades „Dr.med. dent“
(Institut für Anatomie und Zellbiologie, Würzburg)

03/2012- 06/2017 Studium der Zahnmedizin

10/2010- 10/2011 Ausbildung zur Rettungssanitäterin

08/2001- 06/2010 Allgemeine Hochschulreife