

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg

Charakterisierung von Bürstenzellen in verschiedenen Abschnitten der menschlichen Atemwege

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von:

Nele Karoline Duda

geb. am: 17.11.1996 in Bochum

Tag der Promotion: 12. Oktober 2021

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ

Prof. Dr. Dr. Robert Bals

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 Deutsche Version.....	1
1.2 Englische Version.....	2
2 EINLEITUNG	3
2.1 Entdeckung der Bürstenzellen	3
2.2 Lage und Anatomie von Bürstenzellen.....	3
2.3 Immunhistochemische Charakteristika von Bürstenzellen.....	4
2.4 Funktion von Bürstenzellen.....	5
2.5 Aufbau der unteren Atemwege ab der Trachea	6
2.6 Histologischer Aufbau der Bronchien	7
2.7 Zielsetzung der Arbeit	7
3 MATERIAL UND METHODEN	9
3.1 Material.....	9
3.2 Humane Proben	11
3.3 Gewebegewinnung	12
3.3.1 Präparation	12
3.3.2 Fixierung, Aufbereitung und Einbettung	14
3.3.3 Schnittherstellung	15
3.3.4 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung	15
3.4 Immunfluoreszenz	15
3.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz	17
3.4.2 Doppelfärbung	18
3.5 Auswertung.....	19

4	ERGEBNISSE	21
4.1	Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung	21
4.2	Etablierung der Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	22
4.3	Ausschluss des <i>G-Protein-subunit-alpha-transducin</i> (GNAT3) Antikörpers	24
4.4	<i>Calcitonin-gene-related-peptide</i> -(cGRP)-Expression in der murinen und humanen Trachea	26
4.5	Immunfluoreszenz-Analysen mit Zungengewebe (Positivkontrolle).....	28
4.5.1	Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1).....	28
4.5.2	Protein-gene-product 9.5 (PGP9.5).....	28
4.5.3	POU-class-2-homeobox-3 (POU2F3).....	29
4.5.4	Cholinacetyltransferase (ChAT)	30
4.6	Immunfluoreszenz-Analysen mit Gewebe des Bronchialsystems.....	32
4.6.1	Protein-gene-Product 9.5 (PGP9.5)	32
4.6.2	<i>Calcitonin-gene-related-peptide</i> (cGRP)	38
4.6.3	Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1).....	42
4.6.4	POU-class-2-homeobox-3 (POU2F3).....	47
4.6.5	Cholinacetyltransferase (ChAT)	53
4.7	Doppelfärbungen des tracheobronchialen Gewebes.....	58
4.7.1	Cholinacetyltransferase (ChAT)/protein-gene-product 9.5 (PGP9.5) Innervation	58
4.7.2	Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1)/ <i>Calcitonin-gene-related-peptide</i> (cGRP).....	61
4.7.3	Cholinacetyltransferase (ChAT)/Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1).....	70
4.7.4	Cholinacetyltransferase (ChAT)/protein-gene-product 9.5 (PGP9.5)	76
4.7.5	POU-class-2-homeobox-3 (POU2F3)/Doublecortin-like-Kinase 1 (DCAMKL1).....	84

5	DISKUSSION	95
5.1	Zusammenfassung	95
5.2	Abgrenzung bronchialer Bürstenzellen von neuroendokrinen Zellen	96
5.2.1	Morphologische und immunhistochemische Unterschiede	96
5.2.2	Mögliche Kooperationspartner der Bürstenzellen	97
5.3	Signalweiterleitung der respiratorischen Bürstenzellen	99
5.3.1	Aktivierung von protein-gene-product 9.5 (PGP9.5) bzw. Calcitonin-gene-related-peptide (cGRP) positiven Nervenfasern	99
5.3.2	Kopplung der Bürstenzellen mit neuroendokrinen Zellen – Vergleich mit der Reizweiterleitungskaskade in der Geschmacksknospe der Zunge	100
5.4	Funktion der cholinergen Bürstenzellen der Atemwege.....	102
5.4.1	Systemische Wächterfunktion	102
5.4.2	Lokale Abwehrfunktion – neurogene Inflammation.....	104
5.5	Mögliche weitere Funktionen der Bürstenzellen	107
5.5.1	Mechanorezeption.....	107
5.5.2	Thermorezeption	108
5.6	Bürstenzellen und Asthma	108
5.7	Schlussfolgerung und Ausblick	109
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	110
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	114
8	LITERATURVERZEICHNIS	115
9	DANKSAGUNG	129
10	LEBENS LAUF	130
11	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	131

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Version

Die primär sterilen Atemwege sind der Invasion durch Pathogene und Stube ausgesetzt. Bürstenzellen (BC) wurden in Tiermodellen als Bestandteil der Immunabwehr der Atemwege klassifiziert. BC fungieren als Wachterzellen des respiratorischen Epithels, sie vermitteln direkte Abwehrmechanismen, wie die Steigerung der mukoziliären *Clearance* und die Senkung der Atemfrequenz, lösen aber auch eine zelluläre Immunantwort aus. Daran beteiligt sind parakrine Mechanismen und die Stimulation nahe gelegener Nervenfasern. BC exprimieren Geschmacksrezeptoren. Die bei der bakteriellen Besiedelung gebildeten *Quorum sensing* Moleküle lösen in den BC eine Geschmackssignalkaskade aus. Vereinzelt Studien beim Menschen belegen ein Vorkommen dieser Zellen in den oberen Atemwegen, jedoch ohne ihre Funktion zu klassifizieren.

In der vorliegenden Studie wurde das Vorkommen von BC und ihre Lagebeziehung zu Neuroendokrinen Zellen (NEC) bzw. Nervenfasern in den unteren Atemwegen in Gewebe von fünf Körperspendern untersucht, um funktionelle BC-Subtypen zu identifizieren. Für die indirekten (Doppel)-Immunfluoreszenz-Analysen wurden der BC-Strukturmarker *Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1), der für chemosensorische Zellen spezifische Transkriptionsfaktor *POU-class-2-homeobox-3* (POU2F3), das in die Acetylcholin-Synthese involvierte Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) und die beiden für NEC/neuronale Zellen spezifischen Marker *Calcitonin-gene-related-peptide* (CGRP) und *protein-gene-product 9.5* (PGP9.5) verwendet.

Die BC-spezifischen Marker DCAMKL1 und POU2F3 zeigten keinen überlappenden Markierungen mit PGP9.5 positiven Zellen. Bei dem Vergleich der Expression von POU2F3 und DCAMKL1 traten neben doppeltmarkierten Zellen zahlreiche ausschließlich POU2F3-positive Zellen im oberen trachealen Bereich auf. Auch die DCAMKL1- und ChAT-Expression zeigte Überschneidungen, jedoch kamen zusätzlich ausschließlich ChAT-positive Zellen in der Trachea und in den Hauptbronchien vor. Mittels Doppelmarkierung von ChAT und PGP9.5 ließ sich nachweisen, dass es sich bei diesen ChAT-positiven Zellen nicht um NEC handelte. cGRP-positive Nervenfasern kontaktierten DCAMKL1-positive Zellen, teilweise wurden auch doppeltpositive Zellen detektiert.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchung belegen die Existenz unterschiedlicher BC-Subpopulationen in den einzelnen Abschnitten der Atemwege. Diese BC stehen teilweise

in engem Kontakt zu Nervenfasern und NEC. Die möglichen unterschiedlichen Funktionen dieser BC-Subpopulationen sollten in Folgestudien analysiert werden.

1.2 Englische Version

Distribution and characterization of brush cells in different parts of the human respiratory tract

The primarily sterile airways are daily exposed to pathogens and dust. In animal models, brush cells (BC) have been classified as part of the immune defense mechanism of the respiratory tract. BC function as sentinels of the respiratory epithelium, they trigger direct defense mechanisms such as, for instance, the increase of mucociliary clearance as well as the decrease of the respiratory rate. Furthermore, they are able to initiate cellular immunresponses. This happens via paracrine mechanisms and via stimulation of nearby nerve fibers. BC express taste receptors. Quorum-sensing molecules that occur during bacterial colonization trigger the taste signalling cascade in BC. Previous examinations demonstrated the presence of BC in the upper airway without description of functional parameters.

The localization of BC and their connection to neuroendocrine cells (NEC) or nerve fibers in the lower respiratory tract was determined in five body donors by indirect (double)-immunofluorescence, in order to identify functional BC subtypes. The presence of BC was assessed using the following markers: *Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1), the chemosensory-cell-specific transcription factor *POU-class-2-homeobox-3* (POU2F3), choline acetyltransferase (ChAT) involved in acetylcholine production and two NEC-specific markers *Calcitonin-gene-related-peptide* (CGRP) and *protein-gene-product 9.5* (PGP9.5).

The BC-specific markers DCAMKL1 and POU2F3 showed no overlap with PGP9.5-positive cells. Comparing the POU2F3 and DCAMKL1 expression pattern, despite some double-stained cells, exclusively POU2F3-positive cells occurred in the upper tracheal region. Furthermore, DCAMKL1 and ChAT double-stained cells were found exclusively in the trachea and in the main bronchi. The double-staining of ChAT and PGP9.5 proved, that ChAT-positive cells could not be classified as NEC. CGRP-positive nerve fibers contacted DCAMKL1-positive cells, additionally, an overlap of CGRP- and DCAMKL1-positive cells could be found.

The results of these immunological analyses demonstrated the presence of different BC subpopulations in distinct regions of the respiratory tract. To some extent, BC showed close contact to nerve fibers or NEC. Whether distinct BC subpopulations in various parts of the airways have different functional roles need to be addressed in future studies.

2 Einleitung

2.1 Entdeckung der Bürstenzellen

Vor über 50 Jahren entdeckten Rhodin & Dalham [124] mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen die Bürstenzellen (engl. *brush cells*, BC) in der Trachea der Ratte. Später wurden diese Zellen in verschiedenen Spezies und Organen beschrieben. Zu Letzteren zählen die Lunge [60,91,123], die Nasenhöhlen [107] und der Magen-Darm-Trakt [92,94]. In Tiermodellen wurden BC in den Atemwegen von der Nasenhöhle [107] bis zu den Alveolen [61] nachgewiesen. Im humanen System existieren solche Befunde nur im Kontext eines Infektes oder anderer pulmonaler Erkrankungen [35,55]. Die Situation im gesunden Zustand ist bislang wenig erforscht [123]. Die zunächst rein strukturelle Beschreibung der BC weitete sich später auf funktionelle Komponenten aus, wonach die Zellen ein Teil des peripheren Immunsystems darstellen [51,75,146,150]. Im englischen Sprachraum existieren verschieden Synonyme für BC; dazu zählen *tuft*, *caveolated*, *multivesicular* oder *fibrillovesicular cells* [123].

2.2 Lage und Anatomie von Bürstenzellen

Die Schleimhäute der Atemwege sind ständig Umwelteinflüssen ausgesetzt. Daher sind sie mit einem Flimmerepithel ausgekleidet, um kleine Schmutzpartikel abzutransportieren. Das Epithel der Atemwege enthält verschiedene Zelltypen, wie Basalzellen, zilienträgende und sekretorische Zellen sowie cholinerge chemozeptive BC [130]. Letztere sind in der Lage, Toxine und andere Stoffgruppen zu erkennen und so die mukoziliäre *Clearance* einzuleiten [75].

Morphologisch zeichnen sich BC durch eine flaschen- bis birnenförmige Zellform aus. Sie liegen langgestreckt der Basalmembran auf und sind von Epithelzellen umgeben. Der Zellkern liegt mittig im Zytoplasma. An der apikalen Seite besitzen BC Mikrovilli [123], denen sie ihren Namen verdanken [90]. Bis in das Zytoplasma reichende Filamente verankern die Mikrovilli am Zytoskelett. Zwischen den aus Mikrotubuli bestehenden Filamenten liegen im apikalen Bereich der Zelle, knapp unter der freien Oberfläche, Vesikel.

Die BC kommen einzeln oder in kleineren Gruppen vor. Lateral der BC reichen Nervenfasern an die benachbarten Zellen heran [91]. Luciano & Reale [90] konnten durch die doppelte Gewebsbehandlung mit Aldehyd und Osmium(VIII)-oxid erstmals nervale Strukturen mit direktem Kontakt zu den BC darstellen. Sie schlussfolgerten, dass BC anders als die übrigen Zellen

der Atemwege innerviert werden, da letztere bereits bei einer einfachen Fixierung nachweisbar sind [90]. Sie postulierten Gemeinsamkeiten zwischen den BC und sensorischen Zellen, wie eine Oberflächenanbindung zum Lumen mit differenzierten Mikrovilli und synaptische Vesikel [23]. Weiter stellten Luciano & Reale eine strukturelle Ähnlichkeit der BC mit den Geschmacksknospen der Zunge fest. Laut ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen handelt es sich bei zahlreichen Zellbeschreibungen aus dem vorangegangenen Jahrhundert um BC [90]. Lichtmikroskopisch stellten Hofer & Drenckhahn [63] erstmals 1992 BC durch eine Antikörper-Färbung von Fibrin und Villin dar [128].

Generell stellte sich die Frage nach dem Vorkommen von BC vor allem in den unteren Atemwegen des Menschen. Elektronenmikroskopische Nachweise von BC gelangen Watson & Brinkman im tracheobronchialen Baum [150], Rhodin in der Trachea [125] und Basset et al. im Epithel der Bronchioli [9]. Immunfluoreszenz-basierte Analysen fehlen bisher völlig.

2.3 Immunhistochemische Charakteristika von Bürstenzellen

Bislang wurden immunhistochemische Untersuchungen von BC lediglich an Tiermodellen durchgeführt.

Laut Krasteva et al. [75] handelt es sich bei den BC der Atemwege um rein chemosensorische und nicht um neuroendokrine Zellen (engl. *neuroendocrine cells*, NEC), da die Zellen zwar Acetylcholin (ACh), aber keine NEC-spezifischen Marker exprimieren. Die Autoren schlussfolgerten, dass BC die chemische Zusammensetzung des Atemwegsfluid erfassen und über eine cholinerge Innervation an sensorische Nervenendigungen weitergeben. Zur Analyse der Transmission und Innervation verwendeten die Wissenschaftler Antikörper gegen Cholinacetyltransferase (ChAT), *Calcitonin-gene-related-peptide* (CGRP) und *protein-gene-product 9.5* (PGP9.5) (siehe Tabelle 1).

Zu den BC-spezifischen Markern zählen auch die Mikrotubulin-assoziierte *Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1, DCKL1) [51] und der Transkriptionsfaktor *POU-class-2-homeobox-3* (POU2F3) [52] (siehe Tabelle 1). Die Serin/Threonin-Proteinkinase DCAMKL1 ist ein Strukturmarker der BC [51], charakterisiert aber auch funktionelle Komponenten der BC (Innervation und Signalweitergabe über den Neurotransmitter ACh). POU2F3 wurde erstmals in geschmackswahnehmenden Zellen gefunden [102] und später als spezifischer Marker identifiziert. Dies geschah auf Grundlage von POU2F3 *knock-out* Modellen, in denen BC völlig fehlten, sodass davon auszugehen ist, dass es sich um einen unabdingbaren Transkriptionsfaktor

für die BC handelt [52]. Laut Gerber & Jay ist intestinal die Expression von POU2F3 auf DCAMKL1-positive BC beschränkt [53].

Laut Befunden in Mäusen exprimieren nicht nur BC Villin [75]. Auch Advillin zeigt keinen Vorteil gegenüber DCAMKL1 und POU2F3 hinsichtlich der BC-Spezifität [51]. Mit Doppelimmunmarkierungen können reine NEC von BC unterschieden werden.

Neuere Forschungen zur Charakterisierung der BC in Tiermodellen lieferten Hinweise auf die Funktion dieser Zellen. Verschiedene Subtypen scheinen unterschiedliche Aufgaben zu erfüllen [7,111]. POU2F3 wurde als Marker der BC-Typ-1-Zellen identifiziert [108]. ChAT wird vermutlich von verschiedenen BC-Subtypen exprimiert [64,111].

Tabelle 1: Spezifische Antikörper für Bürstenzellen (BC) und neuroendokrine Zellen (NEC)

Antikörper	Antigen	Spezifität
PGP9.5	<i>protein-gene-product 9.5</i>	Marker für NEC und zentrale/periphere Innervation
CGRP	<i>Calcitonin-gene-related-peptide</i>	Nervenendigungen peripherer Nerven
DCAMKL1 (DCLK1)	<i>Doublecortin-like-kinase 1</i>	spezifischer BC-Marker
POU2F3 (Skn-1a)	<i>POU-class-2-homeobox-3</i>	Transkriptionsfaktor/spezifischer BC-Marker
ChAT	Cholinacetyltransferase	Enzym für die Bildung des Neurotransmitters ACh

2.4 Funktion von Bürstenzellen

BC exprimieren Proteine der Bittergeschmackskaskade und sind daher in der Lage, Bitterstoffe zu erkennen [7,64,108,111,144]. Dies ist von Interesse, da bestimmte Bakterienmetabolite wie *Quorum sensing molecules* (QSM) und Cycloheximid diese Kaskade aktivieren. Diese Aktivierung initiiert respiratorische Abwehrmechanismen [75,76] über die Ausschüttung von ACh [64]. Zu diesen Abwehrmechanismen zählen der Hustenreflex, die Erhöhung der mukoziliären Clearance mit Zunahme des Zilienschlags, die Sekretion antibakterieller Proteine und die Erniedrigung der Atemfrequenz [20,64,75,76,144]. Weiter aktiviert ACh Immunzellen und kann zu einer Typ-2-Immunreaktion führen [53,64,65].

Auch das vasodilatatorisch wirkende CGRP stärkt durch die Förderung der Durchblutung die Immunabwehr [13], indem Immunzellen den Ort des Geschehens besser erreichen. Im Mausmodell wurde der direkte Kontakt zwischen BC und CGRP-positiven Nervenfasern nachgewiesen [75].

Laut neueren Befunden existieren verschiedene BC-Typen im respiratorischen Epithel. Typ-1-Zellen sind für die Geschmackswahrnehmung zuständig und exprimieren das Asthma-Risiko-Gen *Regulator of G-Protein signaling 13 (Rgs13)*. Typ-2-Zellen synthetisieren Leukotriene [108]. Beide Zelltypen können Interleukin (IL) 25 und *Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)* bilden [108].

BC sind an der Wahrnehmung von bakteriellen, viralen, parasitären und mykotischen Pathogenen und bei der Initiierung einer ersten humoralen/zellulären Immunantwort, noch bevor sich eine Infektion klinisch manifestiert, beteiligt. Damit könnten BC bei der Therapie vieler Lungenerkrankungen (z. B. Mukoviszidose, Pneumonien) und im Rahmen der Prävention eine große Rolle spielen. BC scheinen bei allergischem Asthma sensibel auf harmlose Allergene zu reagieren. Die daraus folgende überschießende Immunantwort kann Gewebeschäden auslösen. Die involvierte Freisetzung von IL-25 [7] bietet Optionen für ein therapeutisches Eingreifen.

2.5 Aufbau der unteren Atemwege ab der Trachea

Die Trachea erstreckt sich 10–13 cm distal bis zur *Bifurcatio tracheae*. Sie wird strukturell in einen *Pars cervicalis* und *Pars thoracica* eingeteilt. An der Bifurkation teilt sich die Trachea in einen kürzeren steileren rechten sowie einen längeren linken Hauptbronchus (*Bronchi principales*) (siehe Abb. 1). Die Bronchien wiederum verzweigen sich rechts in drei und links in zwei Lappenbronchien (*Bronchi lobares*). Aus den Lappenbronchien gehen rechts zehn und links neun Segmentbronchien (*Bronchi segmentales*) hervor [133]. Im weiteren Verlauf teilen sich die Bronchien sechs- bis zwölfmal, bevor sie in die Bronchioli übergehen. Nach drei bis vier Teilungen spalten sich die Bronchioli in die *Bronchioli terminales* auf, die jeweils einen Lungenazinus (*Acinus pulmonalis*) versorgen.

Ein Lungenazinus besteht aus zehn *Bronchioli respiratorii*, sowie dem *Ductus* und den *Sacculi alveolares* [96,131,133]. Ab den *Bronchioli respiratorii* besitzen die Strukturen eine respiratorische (gasaustauschende) Funktion. Die Funktion der vorgeschalteten Abschnitte ist rein konduktiv (luftleitend) [131]. Insgesamt teilt sich der Bronchialbaum ca. 20-mal dichotom. Links fehlt aufgrund der Herzbucht der siebte Segmentbronchus.

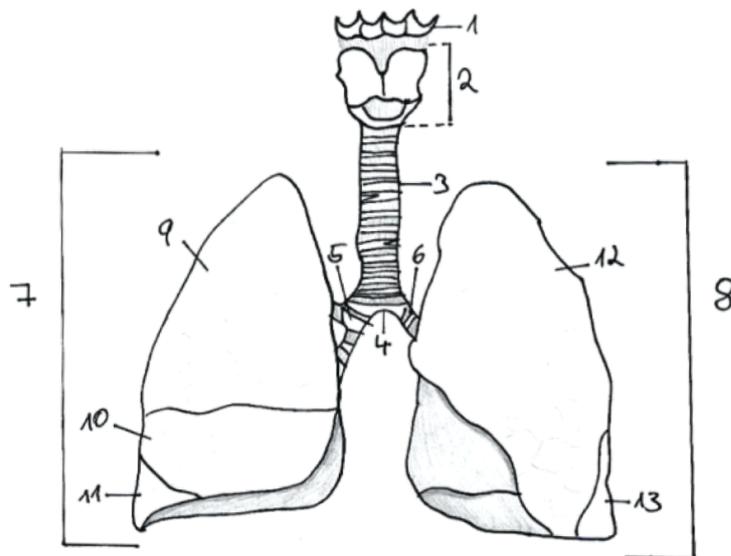


Abbildung 1: Makroanatomie Atemwege und Lunge

1: *Os hyoideum*, 2: Larynx, 3: Trachea, 4: *Bifurcatio tracheae*, 5: *Bronchus principales dexter*, 6: *Bronchus principales sinister*, 7: rechter Lungenflügel, 8: linker Lungenflügel, 9: oberer rechter Lungenlappen, 10: mittlerer rechter Lungenlappen, 11: unterer rechter Lungenlappen, 12: oberer linker Lungenlappen, 13: unterer linker Lungenlappen

2.6 Histologischer Aufbau der Bronchien

Die Wandstruktur der Bronchien besteht aus verschiedenen Schichten. Die äußere *Tunica adventitia* enthält Nerven, Blutgefäßen und Bindegewebe. Sie dient der vegetativen Regulation und Versorgung. Ihr folgt die *Tunica fibromusculocartilaginea*, die sich nochmals in eine äußere, aus hyalinen Knorpelplatten bestehende *Tunica cartilaginea* und eine innere, aus glatter Muskulatur bestehende *Tunica fibromuscularis*, aufteilt. Die *Tunica cartilaginea* sorgt für den Erhalt des Bronchiallumens bei negativem thorakalen Druck und die *Tunica fibromuscularis* reguliert den Bronchialdurchmesser [96,97]. Die innere Wandschicht der Bronchien, die *Tunica mucosa*, besteht aus der, der *Lamina propria* aufliegenden *Tunica fibromuscularis*. Sie enthält Fibroblasten, Immunsystemzellen (Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten), elastische Fasern, ein Kapillarnetz sowie seromuköse Drüsen (*Glandulae tracheales* bzw. *bronchiales*). Ihre Aufgaben sind die Anwärmung der Atemluft, die Anpassung des Thoraxvolumens sowie die Vermittlung der Immunantwort. Zuletzt folgt die *Lamina epithelialis* mit dem respiratorischen Flimmerepithel, Becherzellen und NEC, zu denen auch die BC zählen, [96,97]. Ihre Aufgabe ist die mukoziliäre *Clearance*.

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Studie ist die Analyse des Vorkommens von BC und ihrer Lagebeziehung zu NEC/neuronalen Fasern in den unteren Atemwegen beim Menschen. Dazu sollen

immunhistochemische Analysen mit spezifischen Markern für BC und NEC/nervale Fasern an humanen Präparaten des tracheobronchialen Baumes durchgeführt werden.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- Sind die in Tiermodellen detektierten BC auch in humanen Präparaten nachweisbar?
- Bestehen in den einzelnen Abschnitten des humanen Trachealbaumes Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens der BC?
- Lassen sich BC von reinen NEC abgrenzen?
- Exprimieren die nachgewiesenen BC cholinerge Marker?
- Stehen die nachgewiesenen BC in Kontakt mit Nervenfasern?

Aus der Identifizierung von BC-Subpopulationen mit unterschiedlichen immunhistochemischen Eigenschaften in den Abschnitten des Trachealbaumes sollen mögliche funktionelle Unterschiede abgeleitet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 2 listet die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Labormaterialien.

Tabelle 2: Labormaterialien

Fabrikat	Hersteller
Cryomold Standard (25 × 20 × 5 mm), Intermediate (15 × 15 × 5 mm), Biopsy (10 × 10 × 5 mm)	Sakura Finetek USA, Inc.; Torrance, USA
Deckgläser 20 × 60 mm, Dicke 0,13-0,16 mm	R. Langenbrinck; Emmendingen, Germany
Tissue Tek O.C.T Compound	Sakura Finetek USA, Inc.; Torrance, USA
Filterpapier	Macherey-Nagel; Düren, Germany
Liquidblocker-Stift PAP-Pen Mini	Science Service; München, Germany
Pipetten 0,2-1000 µl	Brand; Wertheim, Germany
Pipettenspitzen 10 µl, 1-200 µl, 101-1000 µl	Sarstedt; Nümbrecht, Germany
Objektträger Super Frost Plus 25 × 75 × 1,0 mm	R. Langenbrinck; Emmendingen, Germany
Zahnarztwachs	Gebedi GmbH; Engen, Germany
Biopsiestanze	Kai Industries Co. Ltd.
Parafilm	Brand; Wertheim, Germany
DePeX	Serva; Heidelberg

Tabelle 3 listet die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte.

Tabelle 3: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Kryostat Leica CM 1950 Seriennummer 0666/03.2009	Leica, Bensheim, Germany
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axio	Zeiss, Oberkochen, Germany

Tabelle 4 listet die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien.

Tabelle 4: Laborchemikalien

Substanz	Strukturformel	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol	$C_{16}H_{15}N_5$	Carl Roth; Karlsruhe
Dinatriumcarbonat	Na_2CO_3	Grüssing; Filsum
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	Grüssing; Filsum
Eosin	$C_{20}H_6Br_2N_2Na_2O_9$	Merck; Darmstadt
Essigsäure	CH_3COOH	VWR; Radnor, USA
Flüssigstickstoff	N_2	Westfalen; Berlin
Formaldehyd	CH_2O	Zentrales Chemikalienlager Saarbrücken
Hämatoxylin	$C_{16}H_{14}O_6 \times H_2O$	Carl Roth; Karlsruhe
2-Methylbutan	C_5H_{12}	Carl Roth; Karlsruhe
Natriumchlorid	$NaCl$	Grüssing; Filsum
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	$NaH_2PO_4 \times 2 H_2O$	Grüssing; Filsum
Natronlauge	$NaOH$	Sigma-Aldrich; St.-Luis, USA
Paraformaldehyd	$OH(CH_2O)_nH_{(n=8-100)}$	Merck; Darmstadt
Pikrinsäure (Trinitrophenol)	$C_6H_3N_3O_7$	AppliChem; Darmstadt
2-Propanol	C_3H_8O	Fisher Chemical; Zürich, Schweiz
Saccharose D (+)	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Sigma-Aldrich; St- Luis, USA
Salzsäure	HCl	VWR; Radnor, USA
Tri-Na-Citrat-Dihydrat	$C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$	Carl Roth; Karlsruhe
Xylol	C_8H_{10}	VWR; Radnor, USA

Lösungen und Puffer

Lösung A (0,2 M): 31,2 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat in 1 l destilliertem Wasser; Lagerung bei 4 °C

Lösung B (0,2 M): 35,6 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat in 1 l destilliertem Wasser; Lagerung bei Raumtemperatur

PBS (*phosphate-buffered saline*; 0,005 M): 28,75 ml Lösung A, 96,2 ml Lösung B und 22,4 g Natriumchlorid; auffüllen auf 5 l mit destilliertem Wasser, Einstellung auf pH 7,4

PBS + S: PBS mit 44,8 g statt 22,4 g Natriumchlorid

Histoblock: 10 % *horse serum*, 0,5 % Tween, 0,1 % *bovine serum albumin* (BSA), 89,4 % PBS; pH=7,4

Phosphatpuffer (0,1 M): 115 ml Lösung A mit 385 ml Lösung B; auffüllen auf 1 l mit destilliertem Wasser; Einstellung auf pH 7,4

Zamboni-Fixans: 50 ml 37 %-ige Formaldehydlösung, 0,2 M Phosphatpuffer (200 ml Lösung A mit 300 ml Lösung B), 150 ml Pikrinsäure; auffüllen auf 1 l mit destilliertem Wasser

Zitronensäure (Citrat-Puffer): 2,94 g Tri-Na-Citrat-Dihydrat (10 mM) ad 1 l aqua dest.; pH = 6,0 einstellen

Mowiol: 6 g Glycerol, 2,4 g Mowiol, 6 ml destilliertes Wasser, 12 ml 0,2 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) Puffer pH 8. Zugabe von 0,1 % 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO). Die Suspension wurde 4 h gerührt. Nach einer Ruhephase von 2 h erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 50 °C im Wasserbad und anschließend eine Zentrifugation bei 5000 g für 15 min. Der Überstand wurde dekantiert und bei -20 °C eingefroren.

3.2 Humane Proben

Das in der vorliegenden Dissertation untersuchte Gewebe stammte von fünf Körperspendern (3 Männer, 2 Frauen) der anatomischen Fakultät der Universität des Saarlandes Campus Homburg. Die medizinische Vorgeschichte der Spender war weitgehend unbekannt. Als Ausschlusskriterien wurden Malignome im Bronchialbereich, Raucherlungen und Infektionen (z. B. Pneumonie, chronische Bronchitis) definiert. Spender, bei denen Informationen zu diesen Erkrankungen vorlagen, wurden nicht seziiert. Zusätzlich erfolgte bei Entnahme des Organs eine visuelle und haptische Beurteilung auf Auffälligkeiten. Dennoch waren eventuell bestehende Erkrankungen nicht mit absoluter Sicherheit auszuschließen.

Bei allen Spendern handelte es sich um ältere Personen (65-78 Jahre). Da Vergleichsdaten von jüngeren Probanden fehlen, kann keine Aussage zum potenziell unterschiedlichen Vorkommen von BC in verschiedenen Altersstufen getroffen werden. Hinzu kommt die genetische Diversität (z. B. heterozygote Mukoviszidose-Veranlagung) humaner Proben, die bei der Interpretation der Befunde berücksichtigt werden muss. Das Gleiche gilt für Umwelteinflüsse, denen die Probanden durch ihre Lebensweise ausgesetzt waren, die anamnestisch nicht vollständig erfasst wurden. Dazu zählten Zigarettenrauchexposition durch Passivrauchen, Exposition gegenüber anderen Gefahrenstoffen im Rahmen der Berufstätigkeit, Lage des Lebensmittelpunkts (Stadt versus Land), Erkrankungen (z. B. Allergien, Asthma, Autoimmunerkrankungen) und Infekte (z. B. chronische Bronchitiden) sowie die Einnahme von Medikamenten. Somit wichen die Grundvoraussetzungen in dieser Versuchsreihe deutlich von denen bei nativen Mausmodellen ab.

Der Entnahmezeitpunkt lag bei der vorliegenden Studie innerhalb eines Zeitraumes von 24–72 h *post mortem*. Die Gewebe zeigten unabhängig vom Entnahmezeitpunkt vergleichbar gute Ergebnisse. Das respiratorische Epithel ist ständig der Luft ausgesetzt und bei fehlender Atmung keinen Scherkräften. Da die Perfusion auch bei intaktem Kreislauf vergleichbar gering ist, schien eine fehlende Versorgung die Gewebequalität nicht signifikant zu verschlechtern. Bei ausreichender Kühlung bei 0 °C trat der Verwesungsprozess somit nicht sofort ein.

3.3 Gewebegewinnung

3.3.1 Präparation

Zur Entnahme des Gewebes erfolgte ein erster Schnitt vom Kinn medial über den Hals bis kurz vor dem Sternum, ohne die darunterliegenden Strukturen zu verletzen (siehe Abb. 2). Mit einem zweiten Hautschnitt entlang des Mandibularrandes wurde die Cutis und Subcutis des Halses von den darunterliegenden Strukturen gelöst. Zur Eröffnung des Thorax mit Durchtrennung der Haut und der Muskulatur führten die Schnitte jeweils lateral über den Rippen bis über die Clavicula. Die Rippen wurden mit einer Rippenschere an der Knorpel-Knochen-Grenze von der unteren Thoraxapparatur nach oben eröffnet. Anschließend wurde die Clavicula mit einer Japansäge durchtrennt. Um den Brustkorb zu eröffnen und umzuklappen, wurde die restliche Muskulatur inklusive des *Musculus sternocleidomastoideus* und eventuelle Verwachsungen durchtrennt. Es folgte ggf. die Ablösung der Lunge von Verwachsungen mit dem Zwerchfell und dem äußeren Blatt der Pleura. Zur Entnahme des Hals-Thorax-Pakets wurde die Mundbodenmuskulatur mit einem halbmondförmigen Schnitt unterhalb des Mandibularrandes durchtrennt und die Zunge nach kaudal verlagert. Durch Zug der Zunge nach ventral wurde der dorsal von der Trachea gelegene Ösophagus von dem zu entnehmenden Paket abgelöst und so die

oberen Atemwege mobilisiert. Abschließend wurden die Gefäße zwischen Lunge und Herz abgetrennt, so dass das Herz im Thorax verblieb. Nach Entnahme wurden das Paket zur Konservierung in eine Wanne mit Zamboni-Fixans eingelegt und die Lunge mit Fixans gefüllt.

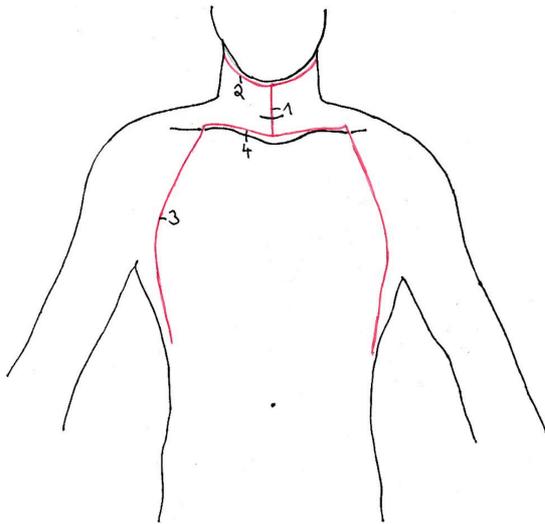


Abbildung 2: Schnittführung an der Leiche
1: medialer Halsschnitt; 2: submandibulärer Randschnitt; 3: lateraler Schnitt an Thoraxgrenzen; 4: medialer Clavicularschnitt

Es folgte die Freipräparation des Bronchialbaums von kranial nach kaudal entlang der Trachea, den Hauptbronchien, den Lappenbronchien, den Segmentbronchien und den nachfolgenden verzweigten Bronchialabschnitten (siehe Abb. 3 + 4). Aus der Trachea und den Hauptbronchien wurden sowohl Stanzproben entnommen, als auch Schleimhaut abpräpariert und mit Nadeln auf Dentalwachs aufgespannt. Tieferliegende Abschnitte konnten aufgrund der geringeren Größe mit intaktem Lumen entnommen werden. Zur Durchführung der Positivenkontrollen erfolgte zusätzlich die Entnahme von Zungengewebe auf Höhe der *Papillae vallate*.

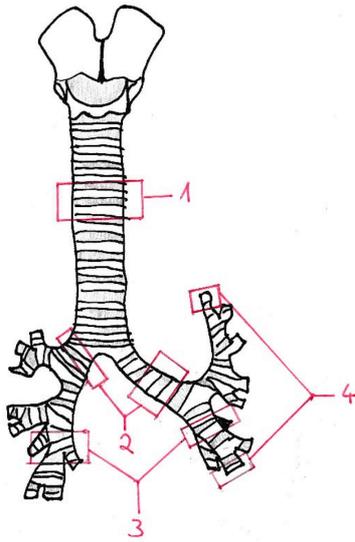


Abbildung 3: Entnahmestellen am Bronchienpaket
1: Trachea; 2: Hauptbronchien; 3: Lappenbronchien; 4: Segmentbronchien

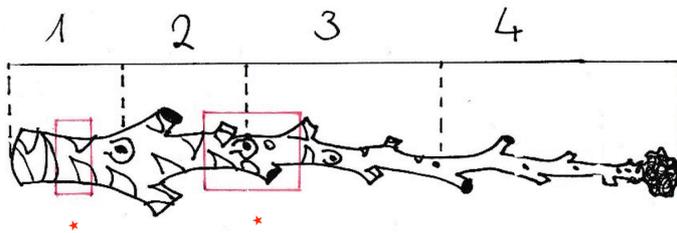


Abbildung 4: Entnahmestellen im Segmentbronchus
1: Segmentbronchus; 2: großer Subsegmentbronchus, 3: kleiner Subsegmentbronchus; 4: Bronchiolus; Stern: Entnahmestellen

3.3.2 Fixierung, Aufbereitung und Einbettung

Die Gewebeproben wurden drei Tage einzeln in je 50 ml Zamboni-Fixans eingelegt. Bei Bedarf (z. B. Verfärbungen) wurde das Fixans ausgetauscht. Da kein festes Protokoll zur Fixierung der menschlichen Proben vorlag, galt es, zunächst die Methode zu etablieren.

Bei dem ersten Körperspender erfolgte eine Immersionsfixierung für fünf Tage. Auf den nach der Einbettung erstellten Schnitten waren jedoch in keinem Atemwegsabschnitt Epithelzellen darstellbar. Die wahrscheinlichste Ursache war eine Überfixierung und somit eine komplette Ablösung der Epithelzellen von der Basalmembran. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Spender aufgrund von Malignitäten oder einem Infekt der Atemwege mit einem damit einhergehenden Husten bereits vor der Entnahme kein Epithelgewebe aufwies. In den nachfolgenden Präparationen trat die Problematik einer kompletten Epithelzellablösung nicht mehr auf. Lediglich einzelne Defekte im Epithelrasen der Trachea und der Hauptbronchien oder etwas größere Läsionen in tieferen Abschnitten (z. B. Segmentbronchien) waren erkennbar.

Nach der Fixation wurden die Proben mehrere Tage in Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen, um alle Reste des Zambonis-Fixans und weitere Verunreinigungen zu entfernen. In der Regel dauerte dieser Schritt 3–5 Tage, bis der Puffer klar blieb. Ein häufiges Wechseln des Puffers beschleunigte den Vorgang. Anschließend wurden die Proben in 18 %-iger Sucrose in 0,1 M Phosphatpuffer über Nacht inkubiert, um das Gewebe vor Gefrierschäden zu schützen.

Am nächsten Tag erfolgte die Einbettung der Gewebe in größenangepasste Cryomold-Förmchen mit *Tissue Tek*. Hierzu wurden die präparierten Förmchen in Flüssigstickstoff eingebettetem 2-Methylbutan schnell eingefroren. Zum Schutz wurden die Präparate in Parafilm eingewickelt. Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

3.3.3 Schnittherstellung

Mit Hilfe eines Leica-Kryostaten wurden aus den präparierten Gewebeschnitten bei -26 °C bis -18 °C 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurde auf doppelgefrostete Objektträger übertragen und bei Raumtemperatur für 60 min getrocknet. Je nach Gewebe betrug die Schnittzahl pro Objektträger 3–5 Schnitte. Anschließend wurden die Objektträger entweder sofort weiterbehandelt oder zur Zwischenlagerung bei -20 °C eingefroren.

3.3.4 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Die Standard HE-Färbung beginnt mit der Inkubation der Schnitte in filtriertem Hämalaun für zehn Minuten. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser, erfolgt das Spülen des Präparates unter fließendem Leitungswasser ebenfalls für zehn Minuten. Als nächstes erfolgt die Inkubation in 0,1%igem Eosin für 30-60 Sekunden mit anschließendem Spülen in destilliertem Wasser.

Es folgt die Fixierung der Färbung durch 90%iges 2-Propanol für zwei Minuten gefolgt von der absteigenden Alkoholreihe 2-Propanol III/II/I für jeweils drei Minuten und der abschließenden aufsteigenden Xylolreihe Xylol I/II/III ebenfalls für jeweils drei Minuten. Die Eindeckelung erfolgt zuletzt mit einem Kunstharz (DePeX).

3.4 Immunfluoreszenz

Das Grundprinzip der Immunfluoreszenz beruht auf der spezifischen Bindung eines Antikörpers an sein Antigen und einer Visualisierung dieses Komplexes durch ein Fluorochrom im Auflichtmikroskop. Dazu wird das Fluorochrom entweder an den Antigen-spezifischen Primärantikörper (direkte Immunfluoreszenz) gekoppelt oder an einen Sekundärantikörper, der den Antigen-spezifischen Primärantikörper erkennt (indirekte Immunfluoreszenz). Der Sekundärantikörper stammt dabei aus einer anderen Spezies als der Primärantikörper und bindet an

den Fc-Bereich des Primärantikörpers. Dabei sind auch unspezifische, direkte Bindungen an das Gewebe und nicht nur an den Primärkörper möglich. In den vorliegenden Einzelfärbungen wurde das Prinzip der indirekten Fluoreszenzmarkierung genutzt. Das Gleiche galt für die Doppelfärbungen mit Ausnahme des Nachweises von DCAMKL1 in Kombination mit POU2F3. Für diese Färbung wurde aufgrund der identischen Herkunft der Primärantikörper ein *Labeling-Kit* genutzt. Tabelle 5 listet die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie das *Labeling-Kit*.

Tabelle 5: Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper				
Antigen	Wirtsspezies	Verdünnung	Quelle	
cGRP (Calcitonin-gene-related-peptide)	<i>rabbit</i> , polyklonal Lot: 170 10909	1:6400	Abbotec; Escondido, USA	
cGRP (Calcitonin-gene-related-peptide)	<i>goat</i> , polyklonal Lot: 0515	1:6400	Acres GmbH; Germany	
ChAT (Cholinacetyltransferase)	<i>goat</i> , polyklonal Lot: 2603400	1:800	Merck Millipore; Temecula, California	
DCAMKL1 (Doublecortin-like-kinase 1)	<i>rabbit</i> , polyklonal Lot: GR320497-1	1:3200; 1:1600	Abcam; Cambridge, UK	
GNAT3 (G-Protein-subunit-alpha-transducin 3)	<i>goat</i> , polyklonal pab73402	1:800	Covalab; Bron, France	
PGP9.5 (protein-gene-product 9.5)	<i>rabbit</i> , polyklonal Lot: GR256354-1	1:1600	Abcam; Cambridge, UK	
POU2F3 (POU-class-2-homeobox-3)	<i>rabbit</i> , Lot: QC1994	1:1600	Sigma-Aldrich; St.-Louis, USA	
Zenon Alexa Fluor 647 rabbit IgG Labeling Kit	<i>Goat</i> Z-25308	1:500	Molecular Probes; Eugene, USA	
Sekundärantikörper				
Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-IgG	donkey Lot:122922	Cy5*	1:500	Jackson Immune Research Laboratories; Suffolk, UK
Kaninchen-IgG	donkey Lot:2548999	Cy3*	1:1000	Merck Millipore; Temecula, USA

Ziegen-IgG	donkey Lot:2707848	Cy3*	1:500	Merck Millipore; Temecula, USA
Ziegen-IgG	donkey Lot: 134600	SP Biotin	1:400	Dianova GmbH; Hamburg, Germany
Biotin	Streptavidin Lot:136321	Cy3*	1:160000	Jackson Immune Research Laboratories; Suffolk, UK
Biotin	Streptavidin Lot:1354947	Cy5*	1:8000	Jackson Immune Research Laboratories; Suffolk, UK

*Cyanin

3.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Grundprotokoll

Nach der Trocknung (1 h frische Schnitte, 0,5 h eingefrorene Schnitte) wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet, um das Auslaufen der Detergenzien und das Austrocknen zu verhindern. Danach wurden die Schnitte 1 h in einer, mit nassen Papiertüchern ausgelegten Kammer, mit Histoblock inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und eine spezifische Bindung des Primärantikörpers zu gewährleisten. Danach wurde die Flüssigkeit mit Hilfe einer Vakuumpumpe von den Schnitten abgesaugt. Dabei war darauf zu achten, dass das Gewebe niemals komplett trocken lag. Nach dieser Vorbehandlung wurden die in PBS-S verdünnten Primärantikörper zugefügt (siehe Tab. 5). Für die Negativkontrolle wurde ausschließlich PBS-S verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal 10 min in PBS gewaschen, um alle Reste des Primärantikörpers zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte mit dem in PBS-S verdünnten Sekundärantikörper in einer feuchten Kammer für 60 min inkubiert (siehe Tab. 5). Danach wurde der Sekundärantikörper vom Gewebe abgesaugt. Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Schnitte mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 10 min inkubiert. DAPI bindet an doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA). Es folgten weitere Waschschritte in PBS (3 x 10 min). Zur Fixation der Antikörper auf dem Gewebe wurden die Schnitte 10 min in 4 %-igem Paraformaldehyd (PFA) inkubiert und anschließend dreimal 10 min in PBS gewaschen. Zuletzt erfolgte die Eindeckung der Schnitte mit Mowiol. Dazu wurden 2–3 Tropfen mit einer Einmalpipette auf die Gewebe getropft, um diese vor dem Austrocknen zu schützen. Dann wurde mit Hilfe einer geknickten breiten Pinzette ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt. Das überschüssige Medium wurde mit einem Papiertuch vorsichtig abgesogen. Die Mappe mit den gefärbten Schnitten wurde im Dunkeln im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Vorbehandlungen

Zur Optimierung des Grundprotokolls wurden Vorbehandlungsschritte eingeführt.

Schritt 1: Schritt 1 diente der thermischen Permeabilisierung des Gewebes. Die Objektträger wurden nach 60 min Trocknungszeit in einer Küvette gefüllt mit 10 mM Zitronensäure (pH 6) in einer Schale mit Leitungswasser in der Mikrowelle bei maximaler Leistung erhitzt. Die Objektträger wurden so 5 min in der Zitronensäure gekocht. Falls der Spiegel der Zitronensäure unter die Schnitthöhe fiel, wurde die Küvette mit heißem Wasser aufgefüllt und für weitere 5 min gekocht. Danach wurden die Schnitte in der Zitronensäure für 15 min bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend 10 min in PBS gewaschen.

Schritt 2: Der zweite Schritt diente der chemischen Permeabilisierung. Die Schnitte wurden entweder im Anschluss an das Kochen oder nach der Trocknungsphase mit einem Fettstift umrandet, für 30 min mit 0,3 %-igem Triton x100 inkubiert und danach einmal 10 min mit PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit Histoblock inkubiert und nach dem Grundprotokoll weiterbehandelt.

Schritt 3: Der dritte Schritt diente dem chemischen Entzug von Lipiden durch Aceton. Er wurde nur singulär und nicht in Kombination mit den ersten beiden Schnitten durchgeführt. Hierzu wurden die getrockneten Schnitte für 10 min in -20 °C kaltes Aceton in einer im Kryostaten platzierten Küvette inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS und der Umrandung mit dem Fettstift wurde zur Eliminierung unspezifischer Bindungsstellen 10 %-iges *horse serum* anstatt Histoblock für 60 min zugefügt. Danach wurde entsprechend dem Grundprotokoll weiter verfahren.

3.4.2 Doppelfärbung

Zur Differenzierung spezifisch positiver Zellen können bereits gefärbte Schnitte mit einem weiteren primären Antikörper inkubiert werden, um eine überlappende Expression der beiden Antigene zu detektieren. Hierzu wurden die Objektträger zur Ablösung der Deckgläser in PBS auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zur Entfernung der Mowiol-Reste in PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörper erfolgte wie bei der Erstmarkierung. Es galt zu beachten, primäre Antikörper aus verschiedenen Wirtstieren und unterschiedliche Fluoreszenzmarker zu verwenden. Bei der Doppelfärbung DCAMKL1/PGP9.5, DCAMKL1/cGRP, ChAT/DCAMKL1 und ChAT/PGP9.5 erfolgte nach Bindung des Primärantikörpers an das Antigen eine einstündige Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der sich gegen die wirtsspezifischen Fc-Anteile des Primärantikörpers richtete

und an ein Biotin-Molekül gekoppelt war. In einem dritten Schritt wurden die Schnitte mit an Fluorochrom gekoppeltes Streptavidin inkubiert.

Bei der Doppelfärbung von POU2F3 und DCAMKL1, deren Antikörper beide im selben Wirt produziert wurden, wurde der DCAMKL1-Antikörper mit Hilfe eines Kits vor der Inkubation mit den Schnitten direkt mit dem Farbstoff gekoppelt (direkte Immunfluoreszenz). Zur direkten Kopplung des Farbstoffes wurde der Primärantikörper auf ein Volumen von 15 μ l mit PBS aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 5 min mit der Komponente A (an Fluorochrom gekoppelt Fab-Fragmente gegen den Fc-Bereich des spezifischen primären IgG-Antikörpers) wurde die Komponente B (unspezifische IgG-Antikörper, die an überschüssige Fab-Fragmente binden, um eine unspezifische Bindung zu verhindern) zugegeben. Die Ansätze wurden erneut 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgte die Endverdünnung des nun gekoppelten Antikörpers mit PBS-S.

Da eine Anfärbung der Zellkerne mittels DAPI bereits in der primären Färbung erfolgte, entfiel dieser Schritt. Es folgte die dreimal zehnmütige Waschung der Schnitte in PBS und anschließend die Eindeckung in Mowiol, wie im Grundprotokoll beschrieben.

3.5 Auswertung

Die Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Auflichtfluoreszenzmikroskops der Marke Zeiss. Hierbei generiert eine Quecksilber-Hochdrucklampe einen Lichtstrahl, der einen Anregungsfilter passiert, der die zur Anregung benötigte Wellenlänge herausfiltert. Der gefilterte Lichtstrahl trifft auf einen dichroischen Spiegel mit der kritischen Wellenlänge λ_K , der das Licht mit kürzeren Wellenlängen als λ_K reflektiert und durch das Objektiv gebündelt auf das Gewebe leitet. Das Licht trifft auf das an den sekundären Antikörper gekoppelte Fluorochrom. Durch die energetische Anregung emittiert der Farbstoff Licht einer längeren Wellenlänge, das durch das Objektiv wieder auf den dichroischen Spiegel trifft. Da die Wellenlänge des reflektierten Lichts größer als λ_K ist, wird das Licht nicht reflektiert, sondern gelangt durch den Spiegel. Eventuell noch vorhandenes Anregungslicht wird vom Spiegel zurück in die Quelle reflektiert oder vom nachgeschalteten Emissionsfilter gefiltert, sodass nur das reine Emissionslicht zur Kamera gelangt. Die Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorochrome betragen 570 nm für Cy3 (orange-rot), 670 nm für Cy5 (rot) und 461 nm für DAPI (blau).

Die Schnitte wurden nach Einstellung des Lichts mit der für das Fluorochrom entsprechenden Anregungswellenlänge und der Filter beurteilt. Analysiert wurden Schleimhaut- bzw Lumenoberflächen sowie eventuell im um- und unterliegenden Gewebe angeschnittene Bronchien/Bronchioli. Die positiv markierten Zellen wurden mit Hilfe der 6-Kanal-Farb-Kamera aufgenommen.

Bei Markierung mit Cy5 in Doppelfärbungen erfolgten die Aufnahmen mit einer Monokamera in Schwarz/Weiß, die Farben wurden nachträglich am Computer mittels der Fiji-Software hinzugefügt. Die Aufnahmen wurden im czi- und tif-Format abgespeichert. Die nachträgliche Bildbearbeitung beschränkte sich auf der Zuweisung der Farben bei Aufnahmen mit der Monokamera, sowie auf die Regulationen der Helligkeit und des Kontrastes mit der Software „Fiji“.

Die Positivkontrolle diente der Überprüfung der Methodik und stellte sicher, dass die verwendeten Antikörper auf Gewebe, die das zu markierende Protein mit Sicherheit enthalten, ein positives Ergebnis lieferten. Zur Überprüfung aller Antikörper wurden die Geschmacksknospen der Zunge genutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung

Zur Darstellung der Gewebeverhältnisse wurden kryofixierte Schnitte der Trachea und des Hauptbronchus mit HE gefärbt (siehe Abb. 5). Diese Schnitte stellten repräsentativ die Beschaffenheit der Präparate nach Entnahme, Präparation, Fixation, Einbettung sowie Schnittanfertigung dar.

In den Präparaten war die *Tunica mucosa* vollständig und die *Tunica fibromusculocartilaginea* zum Teil mit Anschnitten des Knorpels erkennbar. Das dichte, lückenlose Epithel auf der Basalmembran zeigte keine Defekte. Die basophilen Zellkerne verteilten sich auf der gesamten Zellhöhe in mehreren Ebenen und zeigten eine runde bis ovale Form. Die Zellkerne waren von eosinophilem Zytoplasma umgeben. Das Bild entsprach einem mehrreihigen, zylindrischen Epithel, wie es in den Atemwegen vorkommt. Apikal der Zellen war eine lineare rötliche Verdichtung erkennbar, die der Verankerung der Kinozilien bzw. Mikrovilli am Zellskelett diente. Sie entsprach den Basalkörperchen. Zwischen den ziliotragenden Zellen ließen sich vereinzelte Becherzellen erahnen. Sie grenzten sich von der Umgebung heller, bzw. blasser ab.

Unter der Basalmembran waren die bindegewebige *Lamina propria* mit dichten Bündeln kollagener Fasern, sowie zahlreiche Lymphozyten und Plasmazellen erkennbar. Die Repräsentanten der Immunabwehr, waren anhand des Zellkerns im Bindegewebe zu identifizieren. Weiter enthielt die *Lamina propria* multiple, seromuköse Drüsenendendstücke in ihrer typischen runden Form, in der mehreren Drüsenepithelzellen ein gemeinsames Lumen bilden. Auch vereinzelte Blutgefäße mit intravasal liegenden Erythrozyten waren zu erkennen. Da Erythrozyten keine Zellkerne enthalten, stellten sie sich als rein eosinophile Zellen dar. Unter der bindegewebigen *Lamina propria* schlossen sich hyaline Knorpelspangen an. Diese waren durch eine glasartige Extrazellulärmatrix und zwei aneinander liegende Chondrozyten charakterisiert. Die Zellen besaßen einen schwachen Zytoplasmasaum und einen umgebenden Knorpelhof.^[1]Die Knorpelspangen waren von einer verdichteten, faserigen Zellschicht umgeben, die dem Perichondrium entsprach.

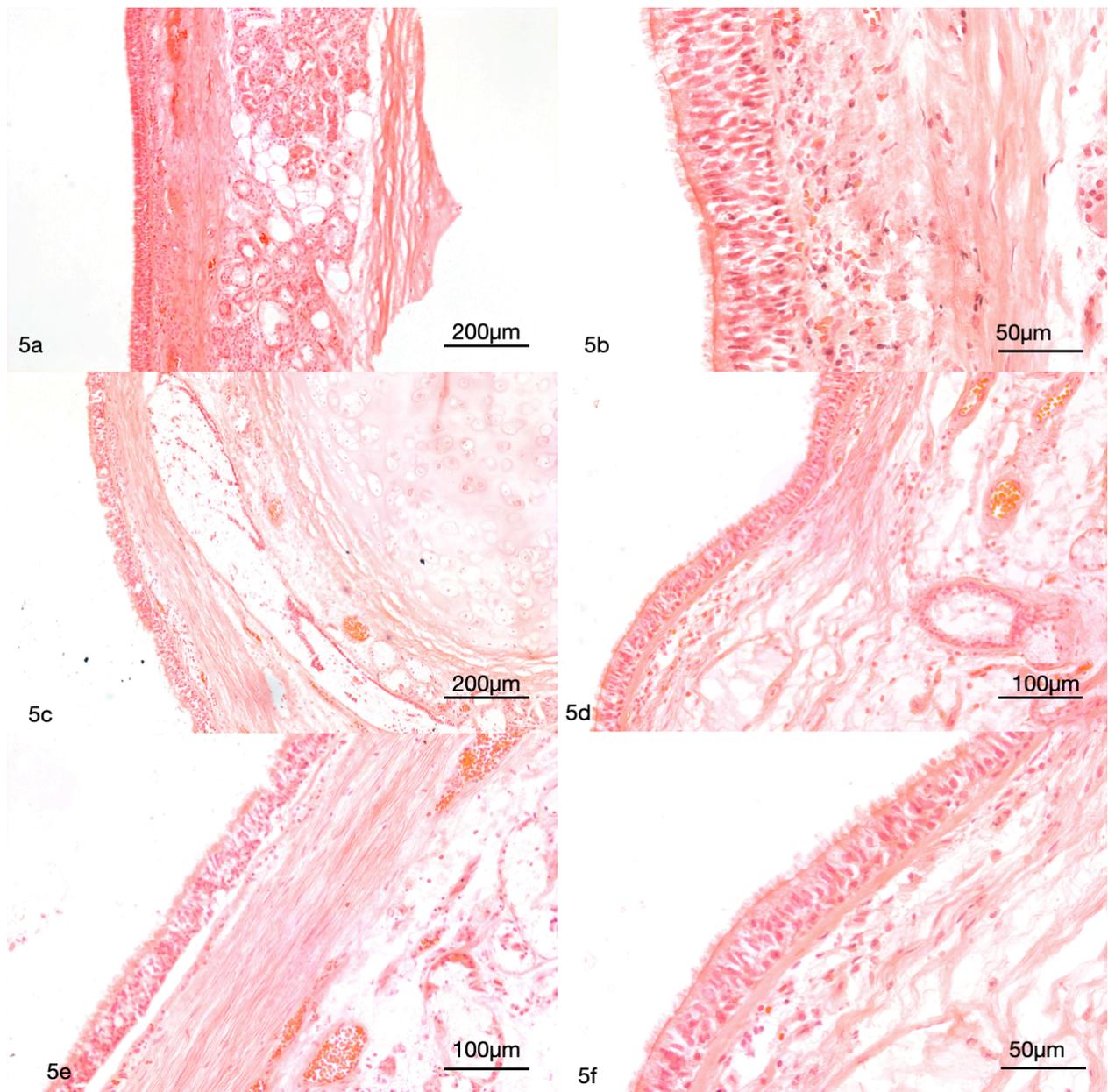


Abbildung 5: Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung der Trachea und des Hauptbronchus
(a) Trachealgewebe mit Anschnitt von Epithel und tieferliegenden Schichten (10-fache Vergrößerung); **(b)** identisches Trachealgewebe (40-fache Vergrößerung); **(c)** Gewebe des Hauptbronchus mit Anschnitt eines großen Knorpelstücks (10-fache Vergrößerung); **(d + e)** Gewebe des Hauptbronchus mit Anschnitten der *Lamina propria* inklusive Drüsen und Gefäße (20-fache Vergrößerung); **(f)** Gewebe des Hauptbronchus mit Epithelansicht (40-fache Vergrößerung).

4.2 Etablierung der Antikörper für die Immunfluoreszenz

Da für die Antikörper zunächst ein Protokoll für die Verwendung mit humanem Gewebe ausgearbeitet werden musste, wurden verschiedene Antikörper-Verdünnungen mit humanem Zungen- und Trachealgewebe getestet (siehe Tab. 6). Die Verdünnungen mit dem besten Ergebnis (Fettdruck in der Tabelle) wurden für die nachfolgenden Experimente verwendet.

Aus Übersichtlichkeitsgründen wird auf die bildliche Darstellung der unzureichenden Färberversuche verzichtet. Zu den Kriterien der Beurteilung der bestmöglichen Verdünnung zählten die Intensität der Zell- sowie Faseranfärbung, die Abgrenzbarkeit zum umgebenden Gewebe, sowie das Gesamtbild im Vergleich.

Tabelle 6: Verdünnungen der Primärantikörper

Antikörper	Verdünnungen
cGRP-gt (Calcitonin-gene-related-peptide, goat)	1:6400 , 1:12800, 1:25000
CGRP-rb (Calcitonin-gene-related-peptide; rabbit)	1:1600, 1:3200, 1:6400 , 1:10000, 1:12800
ChAT (Cholinacetyltransferase)	1:400, 1:800 , 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800
DCAMKL1 (Doublecortin-like-kinase 1)	1:1600, 1:3200 , 1:6400
GNAT3 (G-Protein-subunit-alpha-transducin 3)	1:400 , 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400
PGP9.5 (protein-gene-product 9.5)	1:800, 1:1600 , 1:3200
POU2F3 (POU-class-2-homeobox-3)	1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 , 1:3200

Die besten Verdünnungen sind fettgedruckt.

Für den DCAMKL1-Antikörper zeigte die Verdünnung 1:3200 auf der Trachea und auf dem Hauptbronchus das beste Ergebnis, bei den tieferen bronchialen Abschnitten dagegen die Verdünnung 1:1600. Bei der Färbung mit dem cGRP-Antikörper aus dem Kaninchen (cGRP-rb), bzw. aus der Ziege (cGRP-gt) erwiesen sich jeweils Verdünnungen von 1:6400 als günstig. Bei Experimenten mit dem ChAT-Antikörper erfolgte eine Permeabilisierung nach dem Mikrowellenprotokoll (siehe Kap. 3.4.1), da bereits aus Experimenten mit Mausgewebe die Schwierigkeiten bei nativen Färbungen bekannt waren. Hier ergab eine Verdünnung von 1:800 mit unterschiedlichen Permeabilisierungen (Mikrowellenprotokoll+Triton) die besten Ergebnisse. Bei den Versuchen mit dem GNAT3-Antikörper waren ohne Vorbehandlung kaum Fluoreszenzsignale erkennbar. Lediglich bei der Verdünnung 1:400 konnten einzelne Zellen im Epithel differenziert werden. Dagegen waren bei der Verwendung des POU2F3-Antikörpers auch bei höheren Verdünnungen POU2F3-positive Zellen nachweisbar. Zur Minimierung des Hintergrundsignals wurde eine Endverdünnung von 1:1600 gewählt. Der PGP 9.5-Antikörper zeigte ohne Vorverhandlung keine eindeutigen positiven Ergebnisse.

Zur Verbesserung der Ergebnisse wurden die Antikörper mit verschiedenen Maßnahmen vorbehandelt (siehe Kap. 3.4.1). Tabelle 7 listet die Vorbehandlungen, die das jeweils beste Endergebnis erzielten.

Tabelle 7: Vorbehandlungen

Antikörper	Kochen in Säure	Triton-Inkubation
PGP9.5 (protein-gene-product 9.5)	X	
DCAMKL1 (Doublecortin-like-kinase 1)		X
POU2F3 (POU-class-2-homeobox-3)		X
ChAT (Cholinacetyltransferase)	X	X
cGRP (Calcitonin-gene-related-peptide)	X	X

4.3 Ausschluss des *G-Protein-subunit-alpha-transducin* (GNAT3) Antikörpers

Als Positivkontrolle zur Detektion der GNAT3-Expression mit dem Antikörper dienten die Geschmacksknospen der Zunge (siehe Abb. 6). In den Aufnahmen waren die Schleimhautfalten des humanen Zungengewebes mit Geschmacksknospen erkennbar. Aufgrund der geringen Anfärbung des Gewebes wurden zusätzlich die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Zur Darstellung der Eigenfluoreszenz wurde das Gewebe zusätzlich mit *enhanced green fluorescence protein* (EGFP) Licht beleuchtet.

Ohne permeabilisierende Vorbehandlung trat unerwartet keine Anfärbung im Bereich der Knospe auf (siehe Abb. 6a).

Nach einer chemischen Vorbehandlung mit Triton (0,3 % in PBS für 30 min) zeigte sich apikal an der Knospe eine minimale Anfärbung, die sich aber kaum vom umgebenden Gewebe abgrenzte (siehe Abb. 6b). Es waren keine einzelnen Zellen differenzierbar. Weiter traten vereinzelt positive Zellen basal der Schleimhauttasche ohne Bezug zu den Knospen auf. Diese Befunde könnten auf eine eventuelle unspezifische Markierung hinweisen. Die runden Zellen waren stärker angefärbt als die Knospe. Aufgrund fehlender erkennbarer Zellbegrenzung, wirkte das Färbemuster diffus.

Auch nach thermischer Vorbehandlung (Kochen in Zitronensäure) und chemischer Behandlung (Triton) war nur eine leichte apikale Anfärbung der Knospe erkennbar, die nach basal zog,

jedoch kaum vom Hintergrund abgegrenzt werden konnte (siehe Abb. 6c). Auch in diesen Ansätzen waren basal unspezifische runde diffus angefärbte Zellen mit deutlicheren Signalen, als in der Knospe nachweisbar.

Auch eine Vorinkubation in Aceton ergab nur eine geringe Anfärbung der Knospe mit deutlich erhöhtem Hintergrundsignal (siehe Abb. 6d). Die außerhalb der Knospe liegenden, stark positiven Zellen, waren besonders gut zu erkennen. Weiter traten positive Zellen mit einem ähnlichen unspezifischen Färbemuster weiter basal außerhalb des Schleimhautepithels auf.

Aufgrund der fehlenden, bzw. schwachen Anfärbung der Geschmacksknospen der Zunge und der unspezifisch angefärbten Zellen, wurde der GNAT3-Antikörper nicht weiter zur Charakterisierung und Differenzierung der BC in Abschnitten des Respirationstraktes verwendet [69].

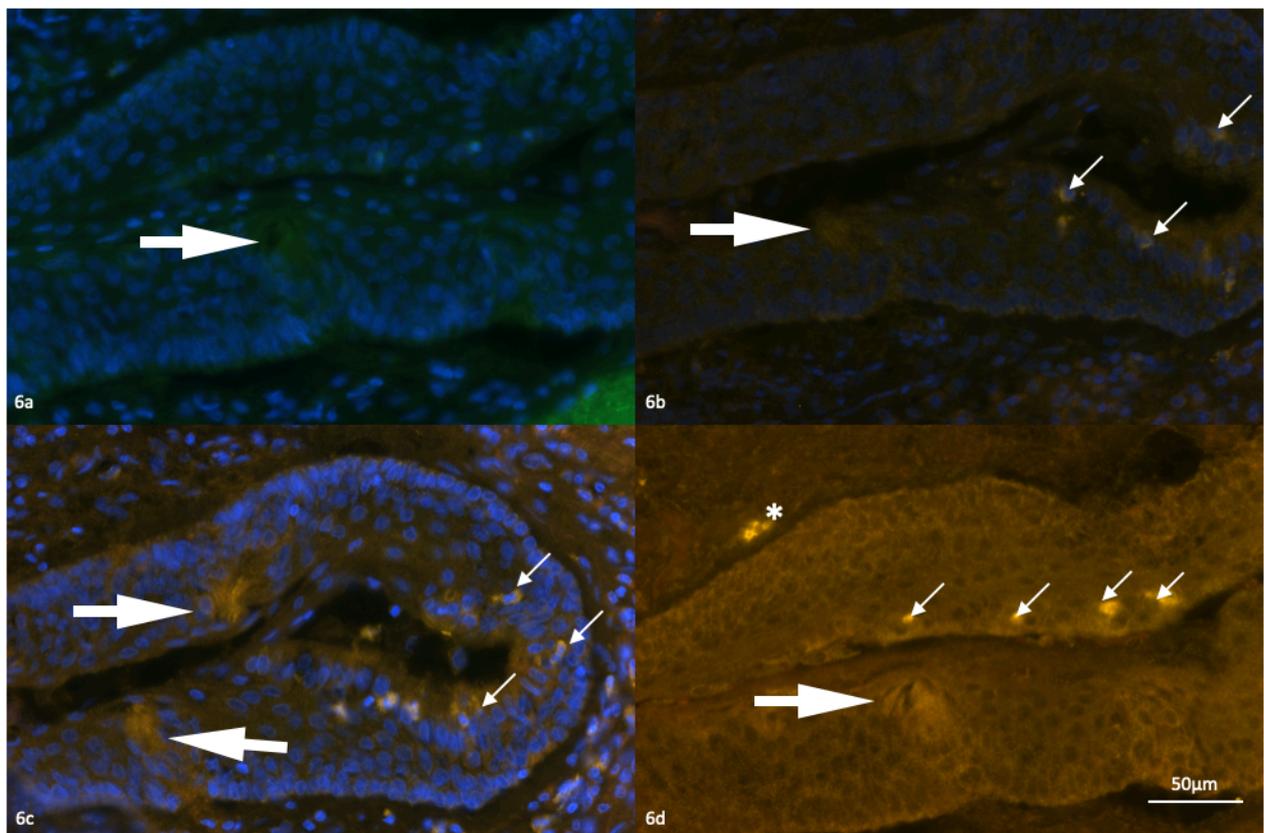


Abbildung 6: Nachweis von G-Protein-subunit-alpha-transducin 3 (GNAT3) in der Epithelfalte der Zunge – Vergleich unterschiedlicher Vorbehandlungen

(a) ohne Vorbehandlung: grüne Fluoreszenz durch *enhanced green fluorescence protein* (EGFP) Licht + 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), fehlende Anfärbung der Geschmacksknospe (Blockpfeil); **(b) vorbehandelt mit Triton:** minimal angefärbte Geschmacksknospe (Blockpfeil), diffus angefärbte Zellen (Pfeile) außerhalb von Knospen; **(c) Gewebe nach thermischer Behandlung in Zitronensäure und Permeabilisierung mit Triton:** gering gefärbte Knospen (Blockpfeil), diffus im Epithel verteilte positive Zellen (Pfeile); **(d) Vorbehandlung mit Inkubation in Aceton:** kaum gefärbte Knospe (Blockpfeil), vereinzelt positive Zellen (Pfeile) innerhalb des Epithels, positive Zellen subepithelial der *Lamina propria* (*).

4.4 *Calcitonin-gene-related-peptide*-(cGRP)-Expression in der murinen und humanen Trachea

Die cGRP-Expression in der humanen und murinen Trachea (Wildmaustyp aus einem anderen Projekt der Arbeitsgruppe) wurde mit einem cGRP-Antikörper aus der Ziege unter identischer Vorbehandlung (Kochen in Zitronensäure, Inkubation mit Triton) und denselben Färbebedingungen analysiert. Das Anfärbemuster war in humanen und murinen Proben vergleichbar. Die Innervation im Epithel wurde durch granuläre Signale auf der ganzen Zellhöhe abgebildet (siehe Abb. 7a+c). Die positiven Zellen zeigten eine starke Fluoreszenz des gesamten Zellkörpers mit Aussparung des Zellkernes (siehe Abb. 7b+d). Positive Ergebnisse hoben sich gut von dem umliegenden Hintergrund ab.

Bei der Gesamtbetrachtung fiel auf, dass das humane Material im Vergleich zum murinen Material eine bessere Fluoreszenz ergab. Somit war der verwendete cGRP-Antikörper aus der Ziege zum Nachweis von cGRP in menschlichen Proben gut geeignet. Aufgrund der deutlicheren Anfärbung von humanem Gewebe mit dem cGRP-Antikörper aus der Ziege wurden alle nachfolgenden Experimente mit diesem Antikörper durchgeführt. Der cGRP-Antikörper aus Kaninchen wurde nicht weiter genutzt.

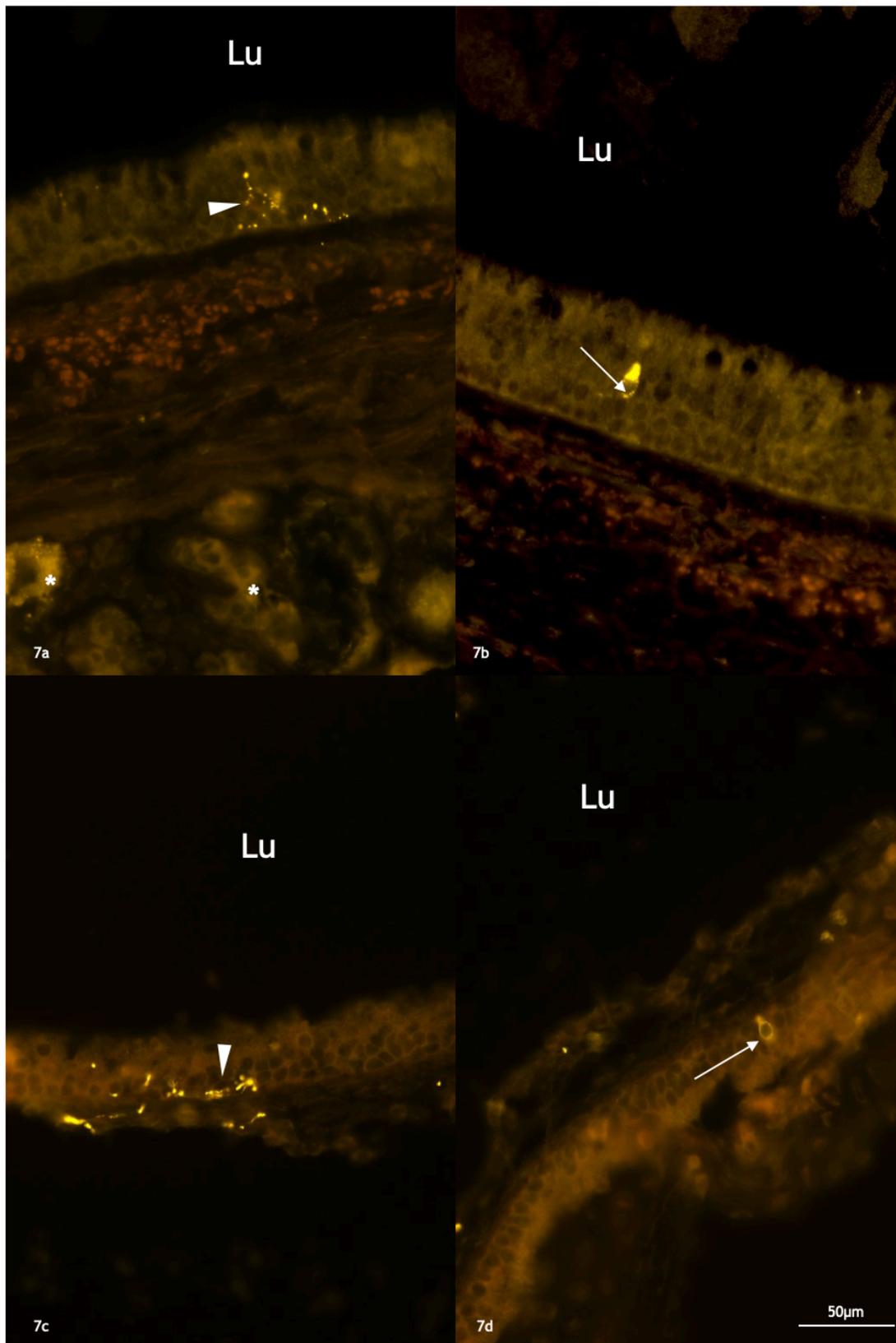


Abbildung 7: *Calcitonin-gene-related-peptide*-(cGRP)-Expression in humaner und muriner Trachea – Nachweis mit Ziegen-Antikörper (cGRP-gt)

(a) humane Trachea: Anfärbung der intraepithelialen Innervation (Pfeilspitze und diffus angefärbten Drüsen (*) in der *Lamina propria*; **(b) humane Trachea:** deutlich positive Zelle (Pfeil) mit granulärem Färbemuster; **(c) murine Trachea:** mit vergleichbarem Innervationsmuster (Pfeilspitze) wie in a; **(d) murine Trachea:** positive Zelle (Pfeil), die der Form und dem Färbemuster von (b) entspricht.

4.5 Immunfluoreszenz-Analysen mit Zungengewebe (Positivkontrolle)

Vor der Analyse der DCAMKL1-, PGP9.5-, POU2F3- und ChAT-Expression in den Atemwegsabschnitten erfolgte eine Testung der Antikörper auf humanem Zungengewebe in Höhe der Geschmacksknospen als Positivkontrolle. Die Entnahme des Gewebes erfolgte bei den Körperspendern an den *Papillae vallatae* der Zunge mit Hilfe einer Biopsiestanze. Der Fixations- und Einbettungsablauf entsprach dem der anderen Gewebe, ebenso die antikörperspezifische Vorbehandlung und Verdünnung.

Analysiert wurde primär die Schleimhaut, in der sich die Knospen befinden. Generell wurden nur Zellen und Strukturen als positiv gewertet, die ganz als positiv zu erkennen waren und die sich gut vom Hintergrund abgrenzen ließen. Die häufig vorkommenden, schwächer gefärbten oder nicht eindeutig positiven Zellen bzw. Strukturen flossen nicht in die Wertung ein. Weiter wurden nur gelb-orange markierte Strukturen als positiv gewertet. Rot-orange Signale resultierten aus der Eigenfluoreszenz der Gewebe und der Einlagerung von Lipofuszin.

4.5.1 Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1)

Die Immunfluoreszenz-Analysen mit dem Antikörper gegen den BC-spezifischen Strukturmarker DCAMKL1 zeigten die erwartete intensive Anfärbung der Knospe (siehe Abb. 8a+b). Vor allem apikal die Knospenspitze war das Fluoreszenz-Signal intensiv. Von der Spitze zogen sternschweifartige Ausläufer zu der Knospenbasis; das einheitliche Muster erinnerte an eine Qualle. Die nach basal ziehenden Ausläufersignale verloren in ihrem Verlauf an Intensität; interne punktförmige Granula fehlten. Spezifisch angefärbte einzelne Zellen wurden nicht identifiziert. Intraepithelial beschränkte sich die Antikörper-Markierung auf die Knospen. Subepithelial zeigte sich zudem eine Markierung von elastischen Fasern in der *Lamina propria*. Auf zusätzlich auftretende Anfärbemuster wird noch bei den Ergebnissen der Experimente zum Tracheobronchialbaum eingegangen werden.

4.5.2 Protein-gene-product 9.5 (PGP9.5)

Nach Inkubation der Schnitte mit dem Antikörper gegen den NEC- und Innervationsmarker PGP9.5 waren unterhalb des Epithels bis an die Basalmembran großflächige, diffus gefärbte Wolken mit punktuell intensiveren Anteilen zu beobachten (siehe Abb. 8c). Ihre Struktur entsprach der vieler kleiner Ganglia, da keine positiv markierten Zellen, sondern lediglich Nervenfasern und deren gebündelte Querschnitte zu beobachten waren. Die Basalmembran stellte sich

generell aufgeheilt dar. Intraepithelial zogen markierte Nervenfasern blitzartig vertikal zwischen den Zellen nach apikal zum Lumen. An unterschiedlichen Stellen innerhalb des Epithels zeigten die Fasern eine perlenschnurartige bzw. granuläre Form. Innerhalb der Knospen war eine fächerförmige Anfärbung der Nervenfasern erkennbar, welche der zwiebelschalenartigen Struktur der Knospe folgte. Diese Fasern waren fadenförmig und zeigten nur kleine Granula. An der apikalen Knospenspitze wurden kaum oder gar keine Fasern markiert.

4.5.3 POU-class-2-homeobox-3 (POU2F3)

Die mit dem Antikörper gegen den BC-spezifischen Marker POU2F3 gefärbten Gewebe der Zunge zeigten zwei Markierungsmuster.

Einerseits wurden innerhalb der Geschmacksknospen längliche Zellen mit ovalem, großem Zellkern, die sich dem Zwiebelmuster der Knospe anpassten, beobachtet (siehe Abb. 8d+e). Diese Zellen besaßen einen kurzen, nach basal zur Knospenbasis spitz zulaufenden Ausläufer. Vereinzelt waren auch längere spitze Ausläufer nach apikal zur Knospenspitze und zum Lumen hin erkennbar. Die Intensität der Anfärbung erlaubte eine gute Differenzierung der positiven Zellen, war jedoch nicht mit der des DCAMKL1-Antikörpers vergleichbar (siehe Kap. 4.5.1). Das gleichmäßige Färbemuster mit einer leichten sandigen Granulierung innerhalb der Zellen verlor an den basalen Ausläufern an Intensität. Die großen, dunkel imponierenden Zellkerne lagen im Zentrum der Zellkörper. Generell stellt sich ein granuläres Anfärbemuster des Zytoplasmas mit dunklerem Zellkern dar. Je nach Gewebeanschnitt waren teilweise auch nur die Ausläufer der markierten Zellen ohne Anfärbung des Zellkörpers zu erkennen.

Außerhalb der Geschmacksknospe zeigten sich diffus aus der *Lamina propria* in das Epithel infiltrierende rundlich bis ovale Zellen (siehe Abb. 8f). Sie verteilten sich über die gesamte Epithelhöhe. In Form und Größe unterschieden sich diese Zellen deutlich von denen innerhalb der Knospe. Die diffusen Zellgrenzen mit einer generellen Umschattung der Zellen erschwerte die Festlegung der Zellgrenzen und die Abschätzung der definitiven Größe und Form. Die intrazelluläre Markierung dieser Zellen war eher diskontinuierlich. Die runden Zellkerne stellten sich etwas dunkler als das Zytoplasma dar und waren bei vielen dieser Zellen erst mit einer Kernfärbung zu erkennen. Das verschwommene Färbemuster entsprach nicht der erwarteten Markierung. Möglicherweise handelte es sich bei diesen Zellen um Immunzellen, was auch das infiltrierende Muster erklären würde.

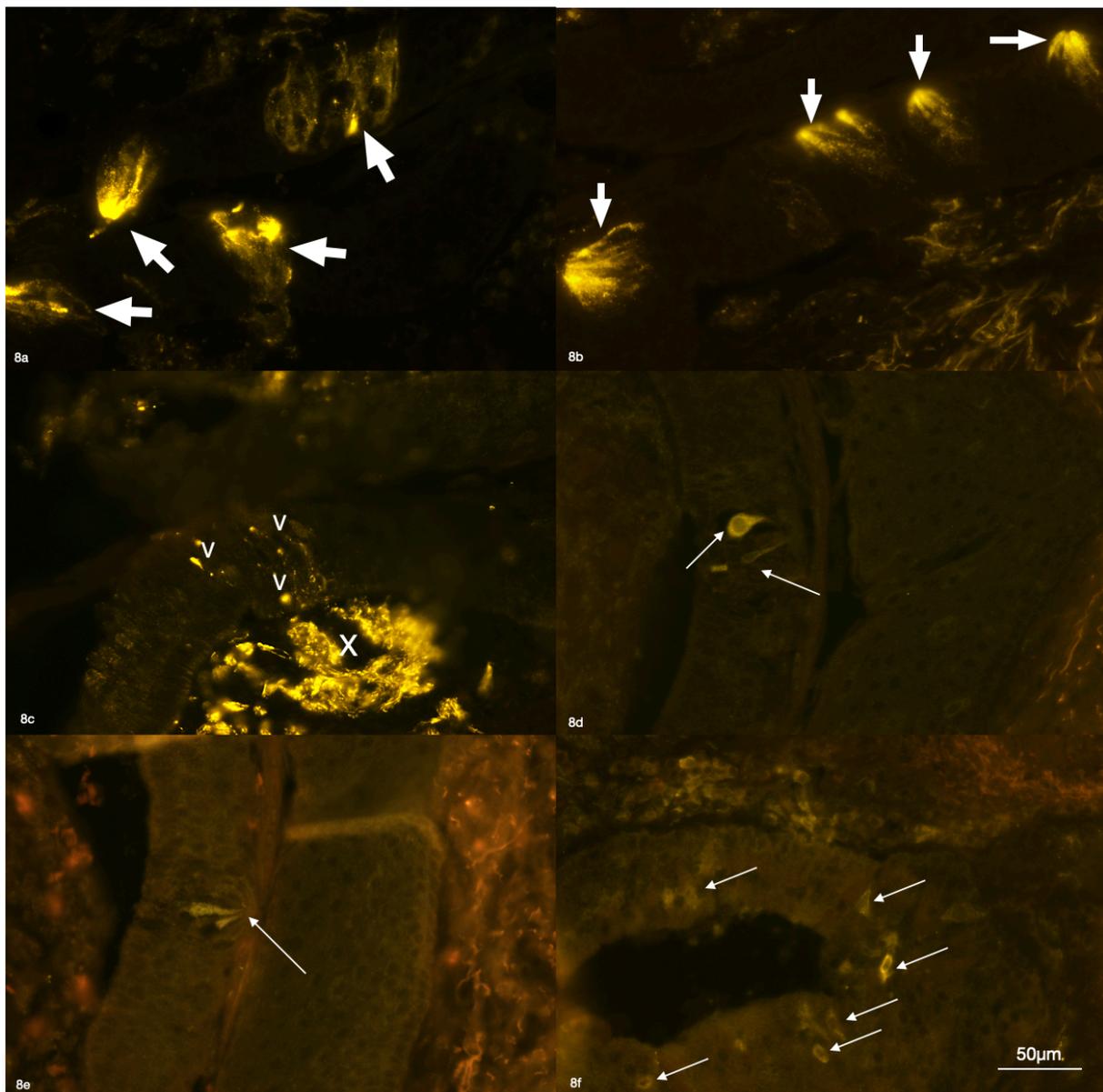


Abbildung 8: Nachweis der *Doublecortin-like-kinase-1*-(DCAMKL1)-, *Protein-gene-product-9.5*-(PGP9.5)- und *POU-class-2-homeobox-3*-(POU2F3)-Expression im Zungengewebe
(a + b) DCAMKL1: multiple Geschmacksknospen (Blockpfeil) in direkter Nähe zueinander; intensive Anfarbung der Geschmacksknospen mit maximaler Anfarbung apikal zum Lumen gerichtet; **(c) PGP9.5:** intraepitheliale Innervation (V) und subepithelial gelegenes Nervengeflecht (X); **(d – f) POU2F3:** POU2F3-positive Zellen innerhalb der Geschmacksknospen (d+e) sowie multiple diffus angefarbte Zellen intraepithelial außerhalb der (f).

4.5.4 Cholinacetyltransferase (ChAT)

Nach Inkubation der Schnitte mit dem Antikörper gegen ein Enzym (ChAT) des Synthesewegs des Neurotransmitters ACh traten innerhalb der Knospen stark positive Zellen auf, die sich der Form des Knospenmusters anpassten (siehe Abb. 9 e+f). Die breitere ovale Zellbasis zeigte nach basal zur Knospenbasis und ein spitz nach apikal ziehender Zellausläufer zu den Knospenspitzen. Daraus ergab sich eine birnenförmige bis zwiebelartige Zellform. Aufgrund der

starken Intensität der Markierung waren die Zellkerne kaum erkennbar. Zusätzlich traten innerhalb der Knospe positiv markierte Strukturen ausgehend von der Knospenspitze und lateral verlaufend auf, die den durch den PGP9.5-Antikörper angefärbten Nervenfasern ähnelten (siehe Abb. 9 d). Auch diese Strukturen wiesen ein granuläres fadenförmiges Färbemuster auf. Abweichend von den mit dem ChAT-Antikörper markierten nervalen Strukturen waren die mit dem PGP9.5-Antikörper markierten Strukturen sowohl an der Knospensbasis, als auch apikal an der Spitze zu erkennen. Dieser Befund kann als Hinweis auf eine cholinerge Innervation der Geschmacksknospen gedeutet werden. Die beschriebenen Anfärbungen traten auch an Stellen auf, an denen positive Einzelzellen fehlten.

Subepithelial wurden verschiedene weitere Strukturen markiert. Dazu zählten faserartige Strukturen zwischen den Drüsen in der *Lamina propria*, die auch hier auf eine cholinerge Innervation hindeuteten (siehe Abb. 9 c). Weiter wurden große rundliche Strukturen markiert, die der Form eines quer angeschnittenen Ganglions entsprachen (siehe Abb. 9 a).

Die erwartete Färbung der Muskulatur der Zunge präsentierte sich in den Querschnitten der Muskelbündel als schleierartiger deckender Belag (siehe Abb. 9 b).

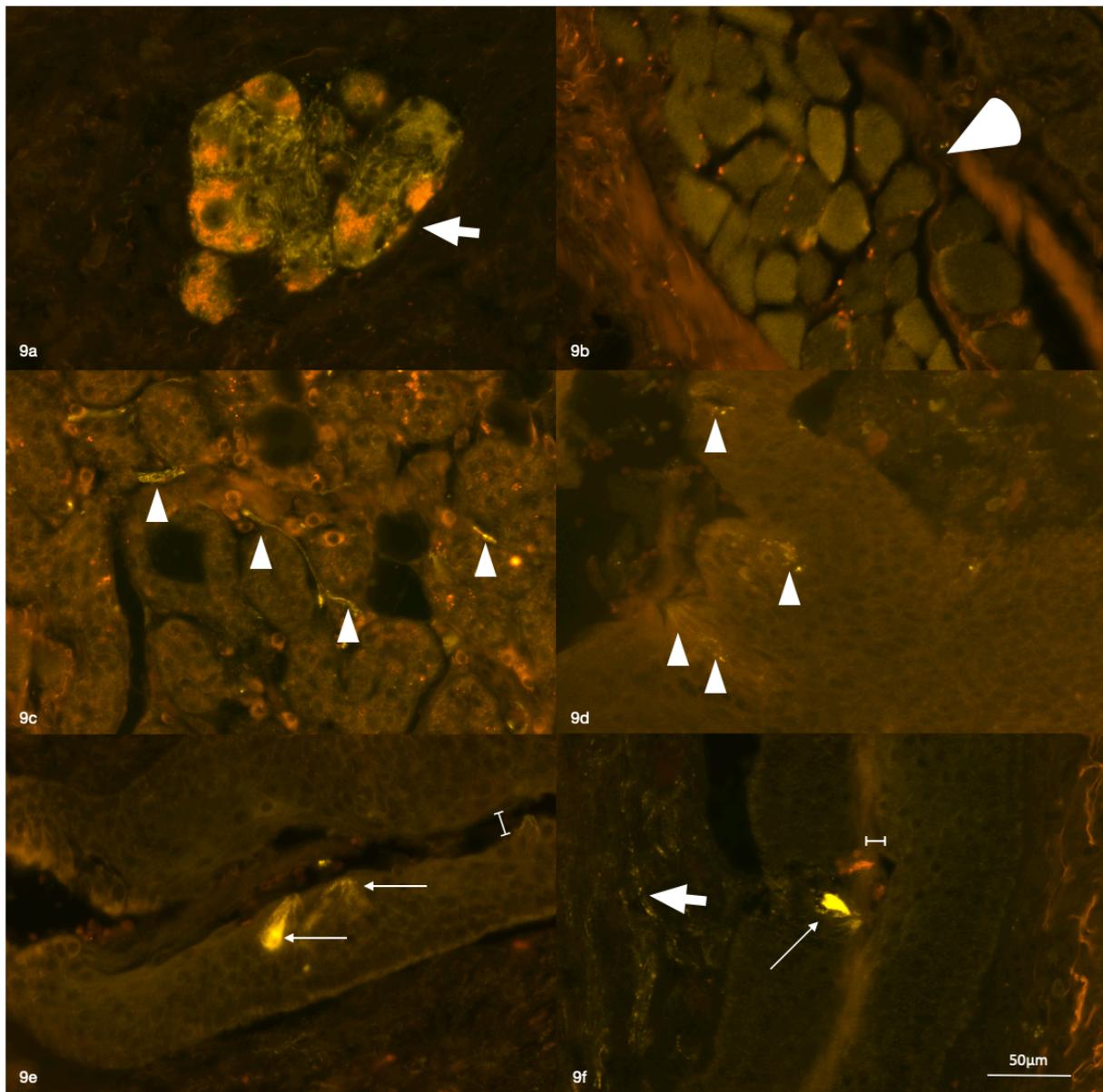


Abbildung 9: Nachweis der Cholinacetyltransferase-(ChAT)-Expressionen im Zungengewebe
(a) Intramurales Nervenganglion (Blockpfeil) im Zungengewebe. Nervenfaserbündel sind meist im Querschnitt sichtbar; **(b)** Querschnitt eines Skelettmuskelbündels (Kegel) mit diskontinuierlicher diffuser Anfärbung, Positivkontrolle; **(c)** Anschnitt subepithelialer Spüldrüsen durchzogen von ChAT-positiven Nervenfasern (Pfeilspitze); **(d)** Geschmacksknospe im Epithel (apikal zulaufende Fluoreszenz), granulär angefärbte Nervenfasern (Pfeilspitzen); **(e)+(f)** Geschmacksknospen mit ChAT-positiven Zellen (Pfeil) im Zentrum zum artifiziel endstandenen Epithelspalt (Strecke) gerichtet und subepithelialer Innervation (Blockpfeil).

4.6 Immunfluoreszenz-Analysen mit Gewebe des Bronchialsystems

4.6.1 Protein-gene-Product 9.5 (PGP9.5)

Zur Darstellung der Innervation des respiratorischen Epithels und der sich innerhalb des Epithels befindenden NEC wurde der Antikörper PGP9.5 genutzt. Positive Signale (Zellen, Innervation) traten bis in die untersten Abschnitte des Bronchialsystems auf.

Die Innervation durchzog als granuläres, perlenschnurartiges Färbemuster die gesamte Höhe des Epithels von der Basalmembran bis apikal zum Lumen (siehe Abb. 11c+12 c+ 3 a). Neben vertikal zwischen den Zellen verlaufenden Nervenfasern traten stark positive Granula knapp über der Basalmembran, in der Mitte der Epithelhöhe oder an der Begrenzung zum Lumen auf. Daneben waren auch horizontal an den basalen bzw. apikalen Zellgrenzen verlaufende Innervationsmuster erkennbar. Neben der Epithelinnervation wurden auch Nervenfasern subepithelial in der *Lamina propria* beobachtet (siehe Abb. 11 a–b+14 a–d). Die diffus verteilten, bis zur Epithelgrenze reichenden Zellen wiesen ebenfalls ein granuläres Färbemuster auf. Auch die an der Epithelgrenze liegenden submukösen Drüsen waren stark angefärbt. Die Drüsen waren zirkulär von unterschiedlich großen Granula umgeben und gelegentlich durch faden- oder perlenschnurartige Fasern innerviert (siehe Abb. 14 a). Weiter war in den Wänden des angeschnittenen Gefäßes eine vergleichbare Innervation erkennbar (siehe Abb. 14 b). Auch tieferliegende Ganglia in unterschiedlichen Größen (Durchmesser 10– 50 µm) wurden markiert. Erkennbar waren punktuell intensivere Strukturen und auch Bündelungen von Fasern (siehe Abb. 14 c+d). Einzeln positive Zellen wurden in der *Lamina propria* nicht detektiert. In der angrenzenden glatten Muskulatur präsentierten sich die Nervenfasern als linear-knotige Färbungen.

Der verwendete PGP9.5-Antikörper markierte somit die Innervation in erwarteter Form und mit vergleichbarer Färbeintensität in allen Abschnitten des Bronchialbaums bis in den Bereich der Subsegmentbronchien. Dabei war eine Abnahme der Dichte der Innervation in Richtung der tieferen Segmente erkennbar. In allen Bereichen wurden jedoch Fasern und positiv markierte Zellen im Epithel detektiert.

Die Form der positiven Zellen variierte erheblich. In der Trachea traten gehäuft längliche, von der Basalmembran bis apikal zum Lumen reichende Zellen mit schmalen Zytoplasma und zentralem Zellkern auf. Einige von diesen Zellen zeigten eine blitzartige Form (siehe Abb. 10 a+b). Daneben saßen flaschen- und tropfenförmige Zellen mit ihren rundlichen bis ovalen Zellleibern der Basalmembran auf. Ihre immer schmäler werdenden Fortsätze reichten bis zum Lumen (siehe Abb. 11 a+12 a-b). Der zentrale Zellkern war ebenfalls leicht markiert. Die Fluoreszenz-Intensität war im basalen Teil der Zellen etwas stärker als in den Ausläufern. Dieser Zelltyp trat hauptsächlich im Haupt- sowie Lappenbronchus auf. Weiter fielen eher runde bis ovale oder teilweise auch dreieckige Zellen mit zentralem Zellkern auf. Sie lagen eher basal bis zentral im Epithel und besaßen Ausläufer in alle Richtungen, die häufig nach lateral zogen (siehe Abb. 10 d-f).

Neben den häufig auftretenden Mustern zeigten einige Zellen individuelle Muster und Ausläuferkonstellationen über die gesamte Epithelhöhe (siehe Abb. 13 c-e). Die Zellen hatten Kontakt zum Lumen, zu den von der Balsamembran kommenden Fasern und zu benachbarten Zellen. Solche Zellen kamen vor allem im Segment- sowie Subsegmentbronchus vor. Diese Bereiche wurden durch solche Zellen flächendeckend versorgt.

In den Bronchialabschnitten zeigte die Trachea und der Hauptbronchus die höchste Dichte markierter Zellen. In diesen Abschnitten lagen die markierten Zellen teilweise nah beieinander (10–15 Zellen pro 200 µm). Solche Häufungen traten nur in gewissen Abschnitten auf; dazwischen lagen auch Epithelabschnitte, die nur vereinzelte oder keine positiven Zellen enthielten. Im Lappenbronchus traten bei einer insgesamt geringeren Dichte positive Zellen einzeln oder in Paaren auf. Die in diesem Abschnitt vorkommenden orangerötlichen Zellen resultierten aus Lipofuszin-Einlagerungen bei den älteren Körperspendern. Im Subsegmentbronchus kamen positive Zellen mit individueller Zellform beinahe ausschließlich einzeln vor.

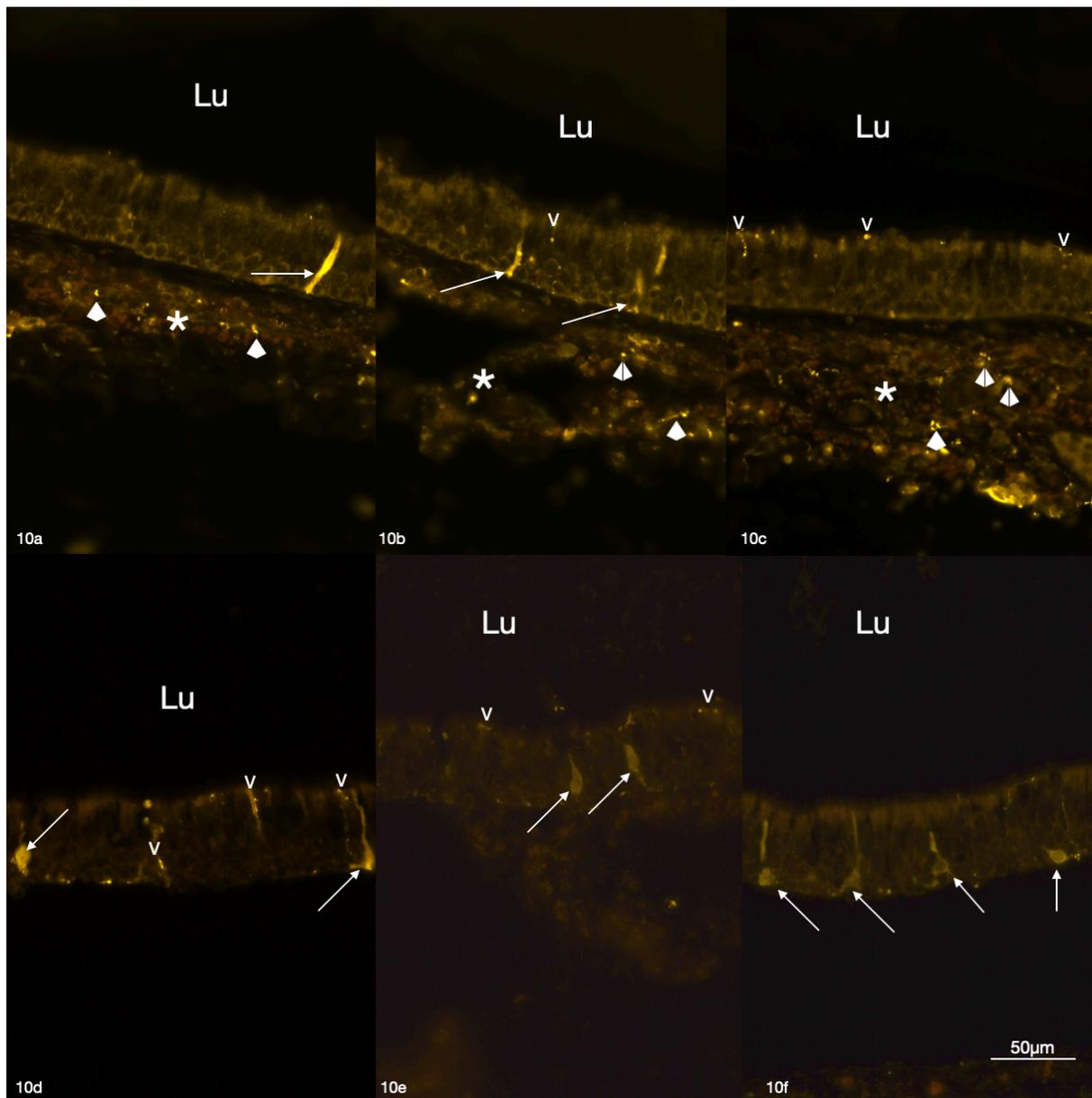


Abbildung 10: Nachweis der *protein-gene-product-9.5*-(PGP9.5) - Expression in trachealem Gewebe
Lu: Lumen, **Pfeil:** positive Zelle, **V:** intraepitheliale Nervenfasern, **Dreieck:** subepitheliale Nervenfasern, *****: Drüsen; **(a)** stark positive zylindrische Zelle (Pfeil) über die gesamte Epithelhöhe und subepitheliale Nervenfasern (Dreieck); **(b)** Mischbild mit intraepithelialen Nervenfasern (V) und positiven Zellen; **(c)** intraepitheliale Innervation apikal am Lumen, ausgeprägte Innervation in der *Lamina propria* (Dreieck); **(d)** Mischbild mit intraepithelialen Nervenfasern und positiven Zellen; **(e)** birnenförmige Zellen, apikal zum Lumen gelegene Nervenfasern; **(f)** vier positive Zellen innerhalb von 150 µm mit weitreichenden Zellausläufern.

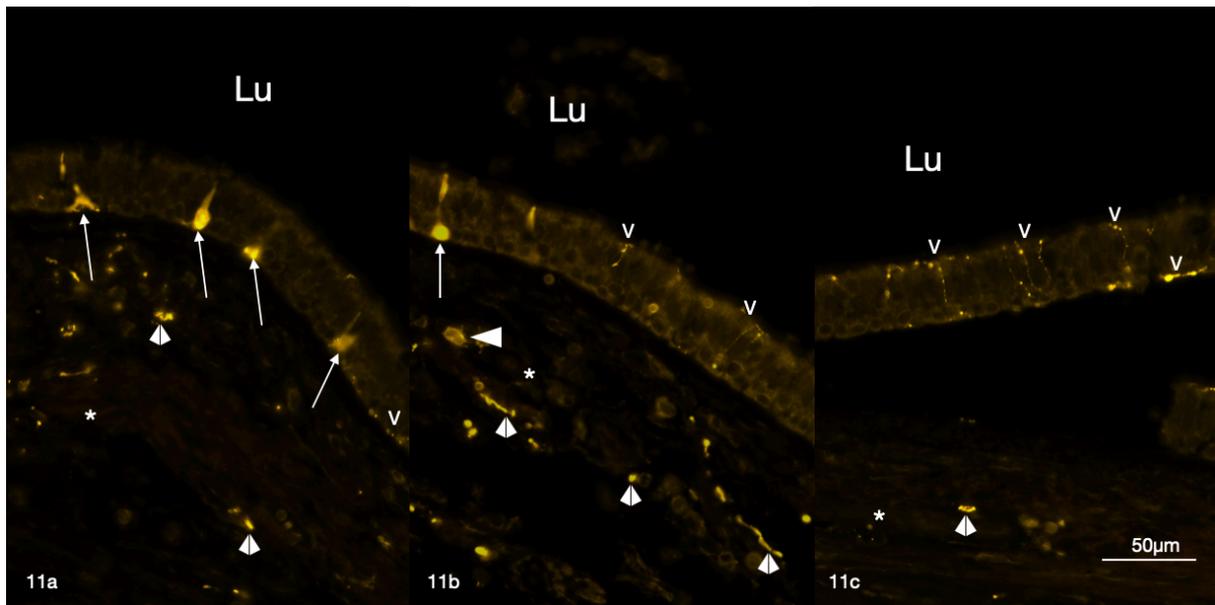


Abbildung 11: Nachweis der *protein-gene-product-9.5*-(PGP9.5)-Expression im Hauptbronchus
Lu: Lumen, **Pfeil:** positive Zelle, **V:** intraepitheliale Nervenfasern, **Dreieck:** supepitheliale Nervenfasern, **Pfeilspitze:** subepitheliale positive Zelle, *****: Drüsen; **(a+b)** Mischbild aus angefärbten Zellen sowie Innervation; **(c)** ausgeprägte vertikale sowie horizontale Epithelinnervation über die gesamte Höhe.

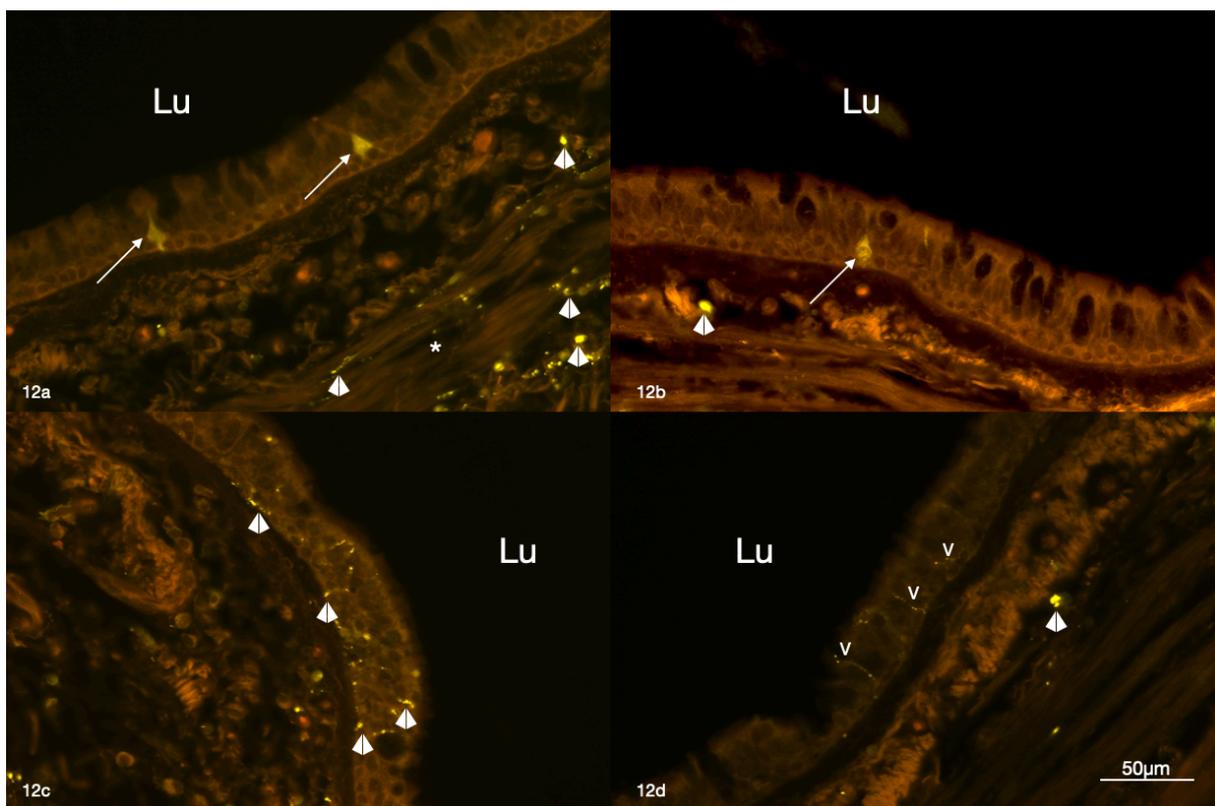


Abbildung 12: Nachweis der *protein-gene-product-9.5*-(PGP9.5)-Expression im Lappenbronchus
Lu: Lumen, **Pfeil:** positive Epithelzelle, **V:** intraepitheliale Nervenfasern, **Dreieck:** supepitheliale Nervenfasern, *****: Lumina von Drüsen; **(a+b)** Mischbild mit angefärbten Zellen und gewebsübergreifender Innervation; **(c+d)** Innervation über die gesamte Epithelhöhe überwiegend senkrecht zwischen den Epithelzellen und subepithelial.

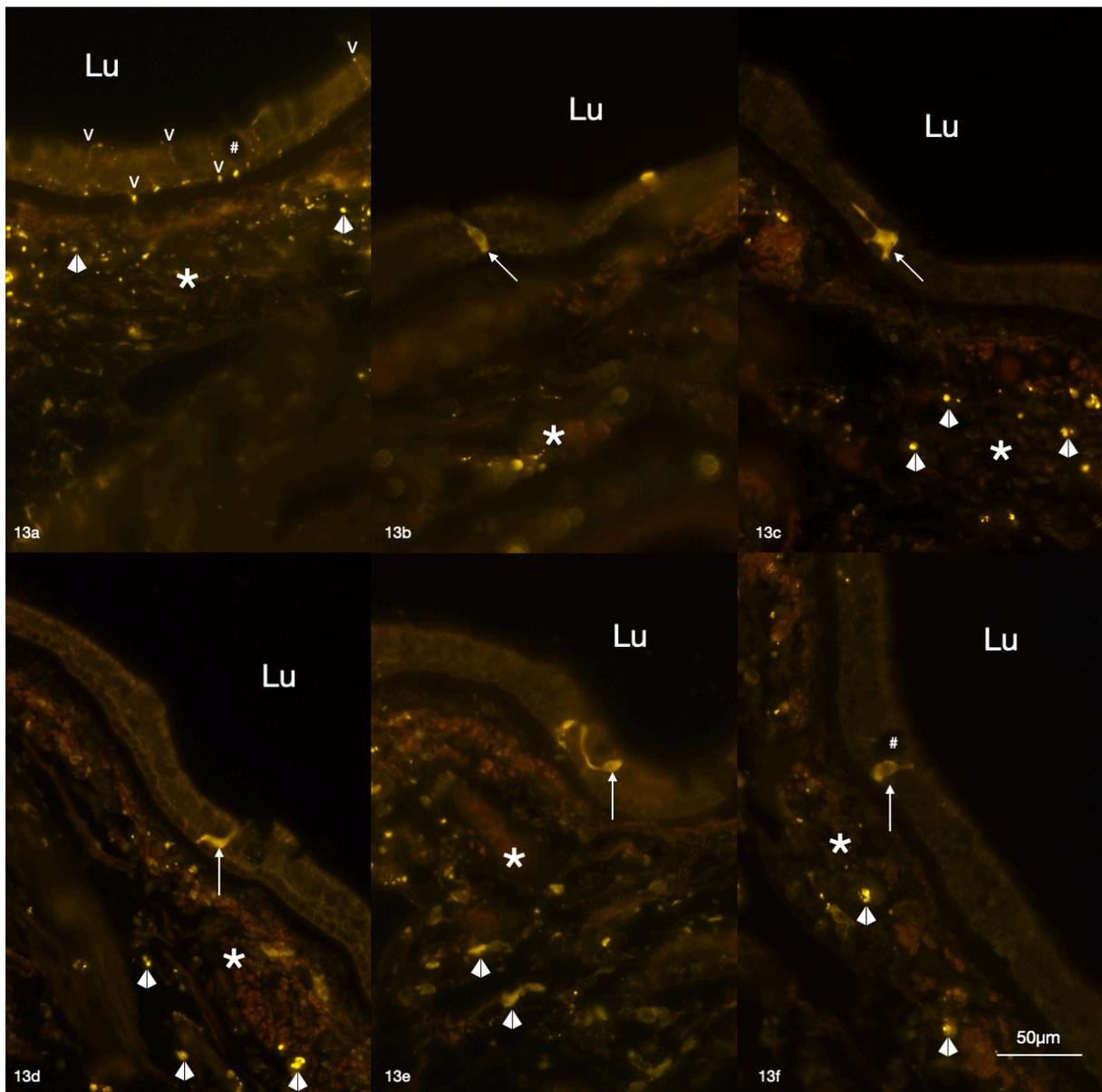


Abbildung 13: Nachweis der *protein-gene-product-9.5*-(PGP9.5)-Expression im Subsegmentbronchus
Lu: Lumen, **Pfeil:** positive Zellen, **V:** intraepitheliale Nervenfasern, **Dreieck:** supraepitheliale Nervenfasern, *****: Drüsen, **#:** Becherzellen; **(a)** ausgeprägte intraepitheliale Innervation (V); **(b–f)** Mischbild mit stark variierenden Zellformen.

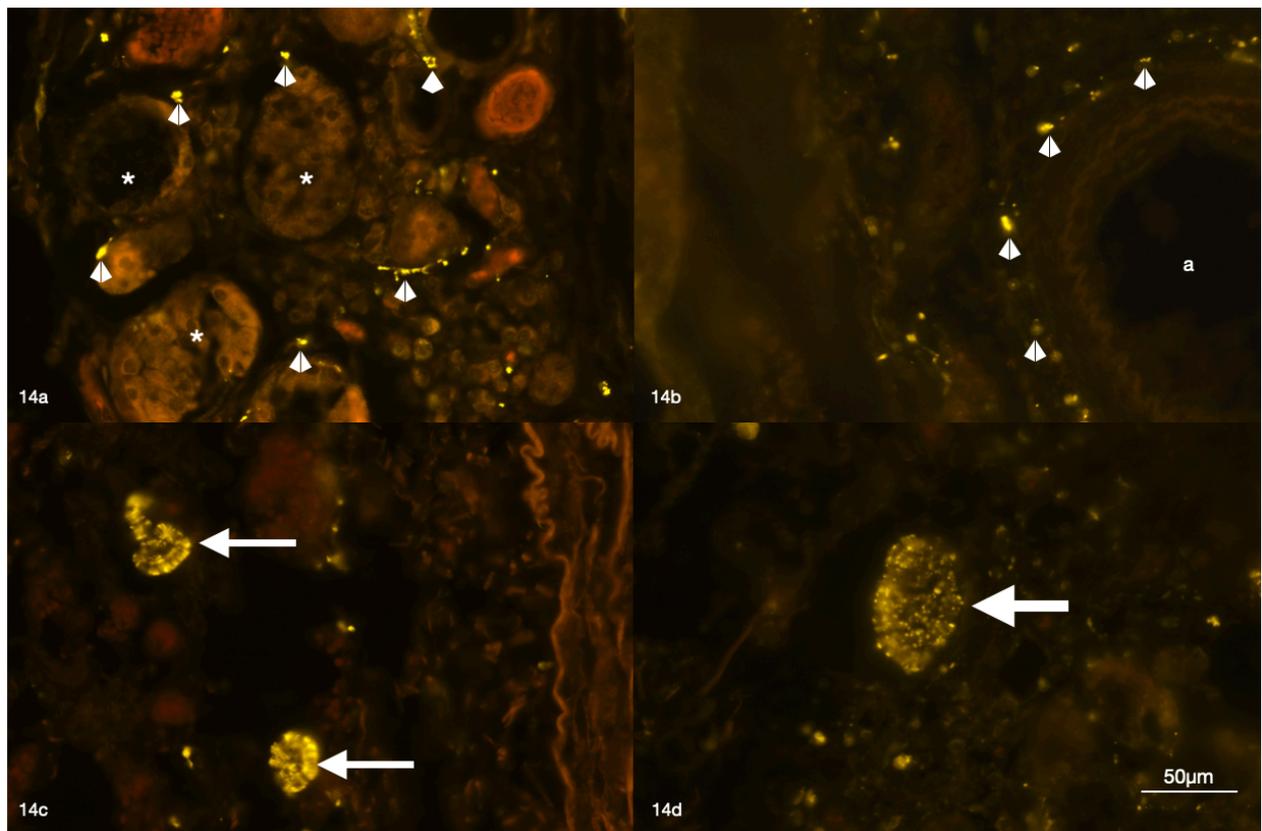


Abbildung 14: Nachweis der *protein-gene-product-9.5*-(PGP9.5)-Expression im supepithelialen Gewebe
Lu: Lumen, **Dreieck:** supepitheliale Nervenfasern, **Blockpfeil:** Nervenganglion, **a:** Gefäßlumen,
*****: Drüsen; **(a)** Drüsenquerschnitte mit umgebenden Nervenfasern; **(b)** Anschnitt eines Gefäßes mit
 Lumen (a) mit randständiger Innervation (V); **(c+d)** Anschnitte von Nervenganglia.

4.6.2 Calcitonin-gene-related-peptide (cGRP)

Auch das cGRP wird von Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert. Sezerniertes cGRP erweitert arterielle Gefäße und steigert die Durchblutung. Wie auch bei der PGP9.5-Markierung, ließen sich bei der cGRP-Markierung in allen untersuchten Abschnitten bis in die Subsegmentbronchusebene positive intraepitheliale Nervenfasern und Zellen nachweisen. Die Innervation verlief sowohl senkrecht als auch horizontal zwischen den Zellen (siehe Abb. 15+16 c). Generell war sie sowohl in den basalen als auch in den apikalen Bereichen vertreten. In den tieferen subsegmentalen Anschnitten war die Innervation häufiger direkt an der Basalmembran erkennbar und dehnte sich kaum in andere Ebenen aus (siehe Abb. 17 c). Die Färbung zeigte wieder eine granuläre faden- bzw. perlenschnurartige Form. Markierte Zellen und Nervenfasern traten meist räumlich getrennt voneinander auf. Positive Fasern mit direktem Kontakt zu positiven Zellen fehlten.

Markierte Zellen in der Trachea und in den Hauptbronchien zeichneten sich durch einen runden bis ovalen Zelleib, der der Basalmembran aufsaß (siehe Abb. 15+16) und einen direkt vertikal nach apikal ziehenden langen schmalen Zellausläufer bis zum Lumen aus. Vereinzelt lag der

Zelleib der positiven Zellen in der Mitte des Epithels und je einen Ausläufer erreichte die Basalmembran und apikal das Lumen (siehe Abb. 15 d). Auf der Subsegmentbronchusebene dominierten runde, ovale oder dreieckige Zellen. Die Zellen saßen ausnahmslos der Basalmembran auf und zeigten meist laterale Ausläufer; apikal ziehende Ausläufer waren nur vereinzelt erkennbar (siehe Abb. 17). Die intrazelluläre Färbung war in allen Abschnitten deckend granulär und betraf die gesamte Zelle mit gleicher Intensität. Die Zellkerne waren vereinzelt gut zu erkennen; in vielen Fällen waren sie jedoch ebenfalls markiert, was eine Abgrenzung erschwerte.

Auch subepithelial traten vereinzelt Nervenfasern auf. Weiter konnten die in der *Lamina propria* gelegenen Drüsen mit dem cGRP-Antikörper markiert werden (siehe Abb. 15 a+b). Bei einer zellübergreifenden schleierhaft deckenden Anfärbung waren die Zellkerne nicht immer genau zu identifizieren. Generell zeigte die Färbung mit dem cGRP-Antikörper ein ähnliches Muster, wie die Markierung mit dem PGP9.5-Antikörper. Quantitativ wurden mit dem cGRP-Antikörper weniger Strukturen angefärbt. Eine Markierung Ganglien wie beim PGP 9.5 Strukturen wurde bei der Verwendung des cGRP-Antikörpers nicht beobachtet.

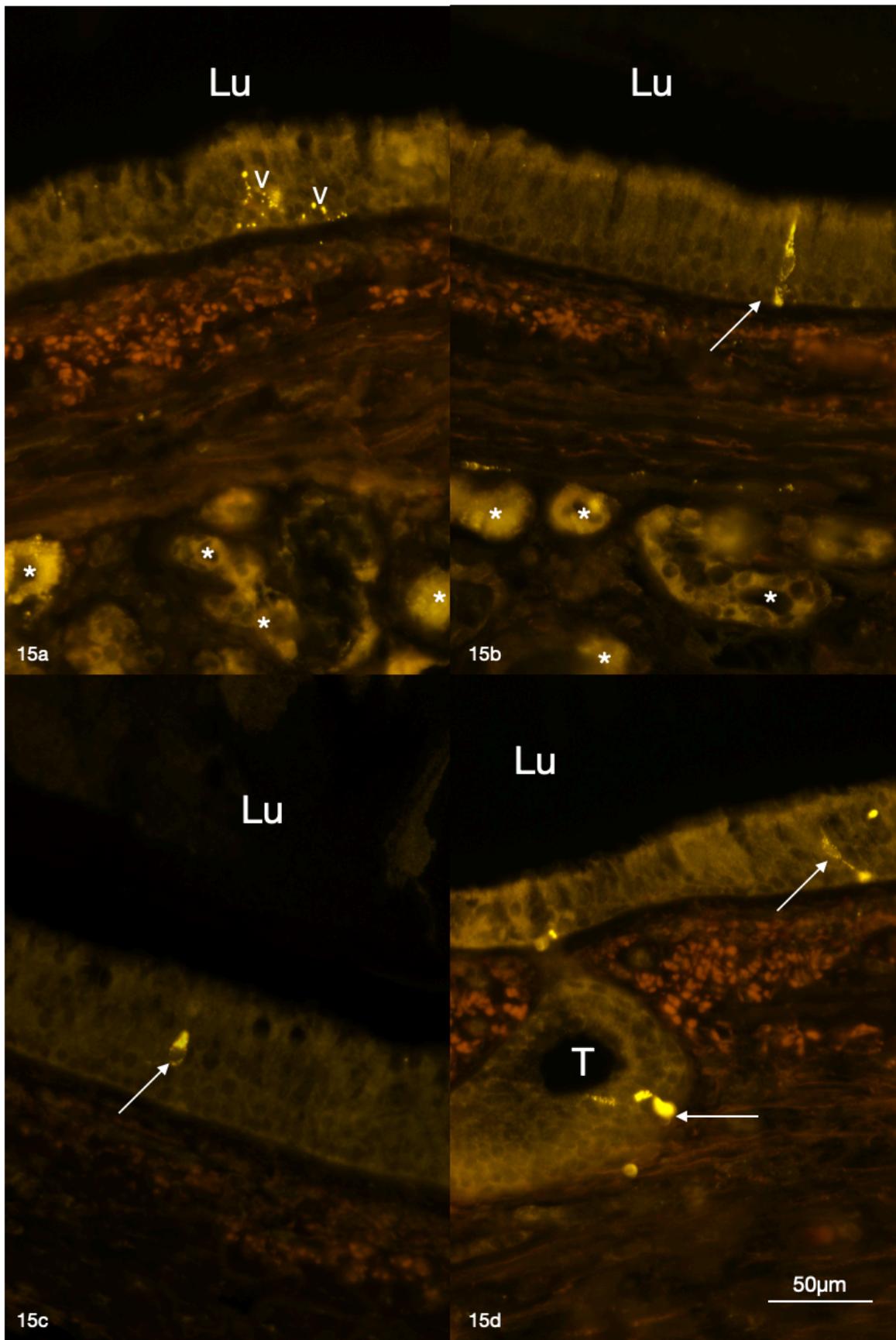


Abbildung 15: *Calcitonin-gene-related-peptide* (cGRP) im Tracheaepithel
Lu: Lumen, *****: Drüsen, **Pfeil:** positive Zellen, **V:** Nervenfasern, **T:** Lumen der Epitheltasche; **(a)** intraepitheliale granuläre Nervenfasern vertikal sowie horizontal zwischen den Zellen; **(b+d)** positive Zellen mit zentral liegendem Zellkern.

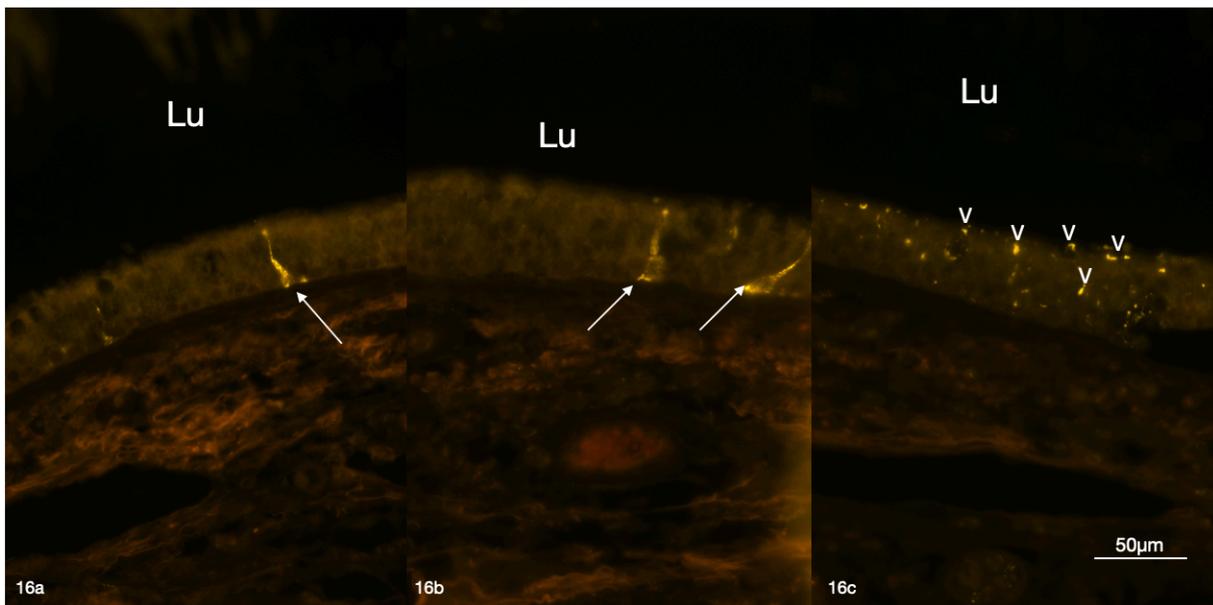


Abbildung 16: *Calcitonin-gene-related-peptide* (cGRP) im Hauptbronchus

Lu: Lumen, **Pfeil:** positive Zelle, **V:** Nervenfasern; **(a+b)** basal aufliegende positive Zellen mit schmalen Fortsätzen, die apikal zum Lumen hin enden; **(c)** intraepitheliale Innervation durch granulär angefärbte, vertikal zwischen den Zellen verlaufende Nervenfasern.

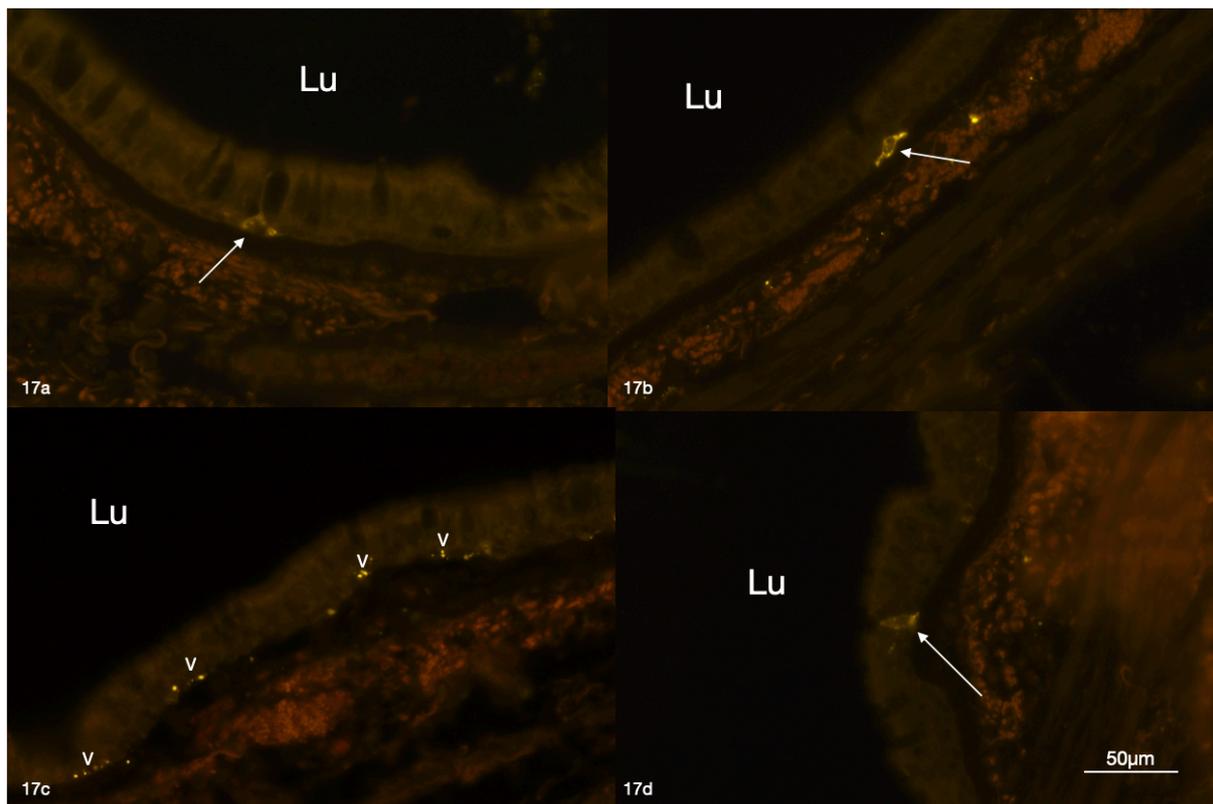


Abbildung 17: *Calcitonin-gene-related-peptide* (cGRP) im Subsegmentbronchus

Lu: Lumen, **Pfeil:** positive Zellen, **V:** Nervenfaser; **(a)** breitbasig aufsitzende dreieckige positive Zelle mit langem dünnem Ausläufer zum Lumen hin; **(b)** ovale Zelle mit horizontalen Ausläufern in beide Richtungen; **(c)** knapp über der Basalmembran liegende intraepitheliale Nervenfasern; **(d)** positive Zelle.

4.6.3 Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1)

Der im Tiermodell etablierte DCAMKL1-Antikörper ist für den Nachweis von BC geeignet. Die vorliegende Immunfluoreszenz-Analyse ergab DCAMKL1-positive Zellen, angefärbte Nervenfaserbündel zwischen den Drüsen (siehe Abb. 22) und Bindegewebsfasern in der *Lamina propria* und Gefäßwänden (siehe Abb. 18+22 c). Die angefärbten Nervenfaserbündel verliefen mit verschiedenen Durchmessern langgestreckt parallel zum Epithel im subepithelialen Bindegewebe und reichten bis an die Basalmembran des Epithels. Auch eine ganglionähnliche Struktur im subepithelialen Gewebe, die von kleinen querangeschnittenen Gefäßen umgeben war, wurde beobachtet (siehe Abb. 22 c).

Generell zeigte sich bei den Analysen mit dem DCAMKL1-Antikörper nur eine geringe Hintergrundfärbung. Teilweise trat eine rot-orange Eigenfluoreszenz der kollagenen Fasern in der *Lamina propria* auf. Zwischen den Körperspendern bestanden kaum qualitative, aber quantitative Unterschiede. Insgesamt kam im trachealen Gewebe circa alle 200–400 µm eine positive Zelle vor. DCAMKL1-positive Zellen waren somit seltener als PGP9.5-positive NEC. Häufiger traten zwei oder mehrere DCAMKL1-positive Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft auf (siehe Abb. 18 c+19 d+20 d). Auch in den tieferen Abschnitten wie den Segment- und Subsegmentbronchien lagen positive Zellen in einigen Fällen nahe beieinander (Abstand: 25–50 µm). Dazwischen gab es aber auch längere Strecken ohne positive Zellen. Im Vergleich zur Trachea und zu den Hauptbronchien waren diese positiven Zellgruppen in den tieferen Abschnitten des Bronchialbaums seltener. Die DCAMKL1-positiven Zellen zeigten meist einen schmalen, von der Basalmembran bis zum Lumen reichenden Zellkorpus und einen zentralen Zellkern (siehe Abb. 18). Zusätzlich traten auch kleinere, flaschenförmige Zellen auf (siehe Abb. 19 c), die häufig mit einem schmalen Füßchen auf der Basalmembran auflagen (siehe Abb. 18). Im Gewebe des Lappenbronchus wurden häufig Zellen mit einem basal im Epithel positionierten Zellkörper und einem schmalen Zellausläufer nach oben detektiert. Seltener kamen rundlichere Zellkörper vor, die basal bis zentral im Epithel lagen.

Intrazellulär war die Anfärbung nicht immer gleichmäßig und teils sandig granuliert. Oft traten fleckige Markierungen innerhalb einer Zelle sowie eine stärkere apikale oder basale Anfärbung auf. Bei variablen Fluoreszenz-Intensitäten und teilweise auftretenden Randschatten waren die Zellgrenzen nicht immer erkennbar. Die basal bis zentral im Zellkörper liegenden, schwach bis gar nicht angefärbte Zellkerne waren unabhängig von der äußeren Zellform rund bis oval.

Die in allen Abschnitten leicht unterschiedlichen Zellformen entsprachen den bekannten BC-Formen. Das Farbsignal endete an den Epithelkörperchen der Zellen, die Mikrovilli waren nicht

markiert. Im Subsegmentbronchus zeigten die Zellen eine geringere Größe und einen breiteren Zellkorpus. Die leicht variierenden Farbmuster und Zellformen unterstützen die Theorie der Existenz verschiedener BC-Subtypen. Entlang der Bronchialabschnitte nahm die Fluoreszenz-Intensität der positiven Zellen bei gleicher Antikörperverdünnung und Vorbehandlung immer weiter ab. Die Fluoreszenz-Intensität der zusätzlich extraepithelial angefärbten Strukturen blieb unverändert.

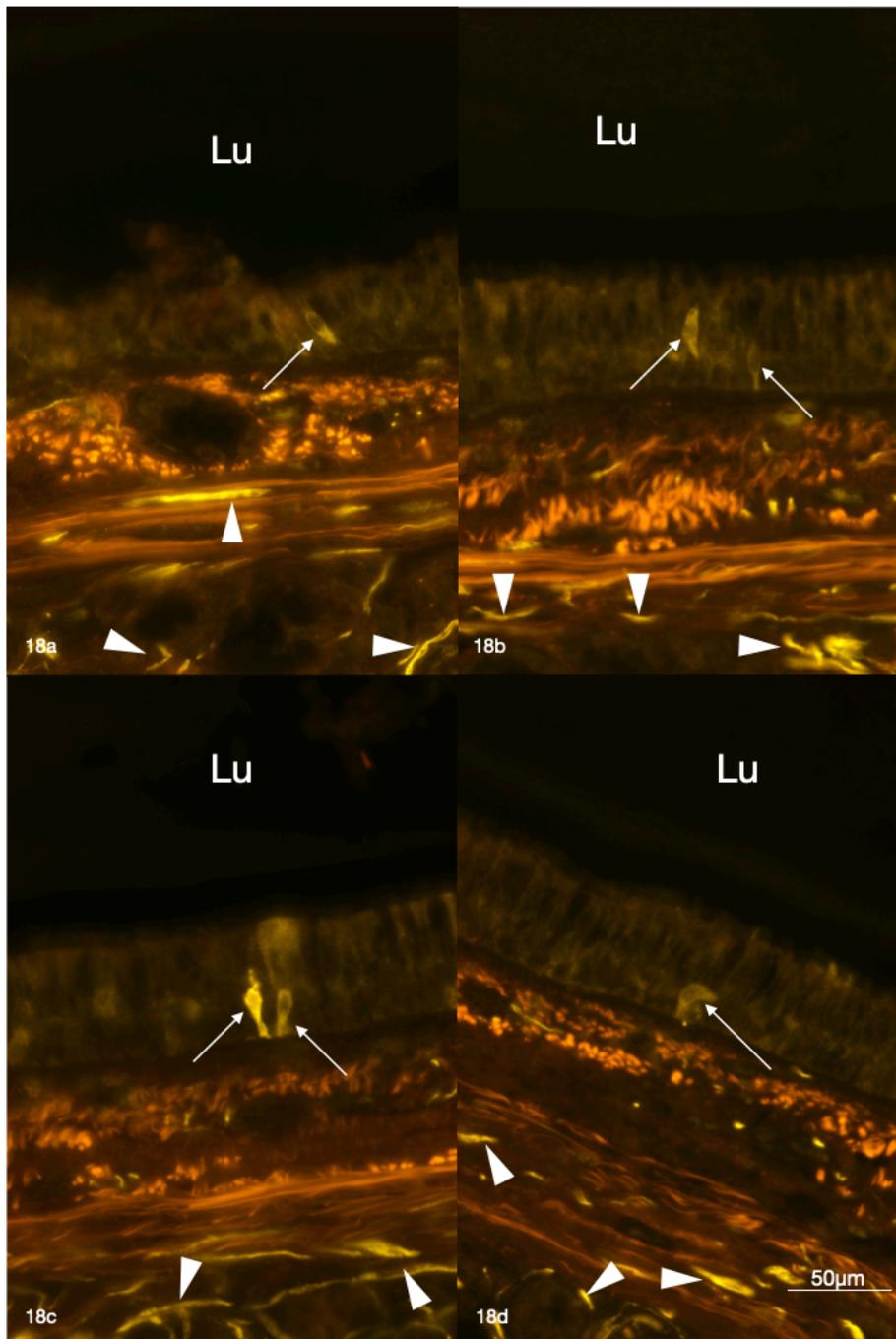


Abbildung 18: *Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) im Tracheagewebe (1:3200)

Lu: Lumen, **Pfeil:** positive Zelle, **Pfeilspitze:** subepitheliale Fasern; **(a)** länglich ovale Zelle mit stärkerer Anfärbung im unteren Teil der Zelle; **(b–d)** positive Zellen mit Verankerung auf der Basalmembran.

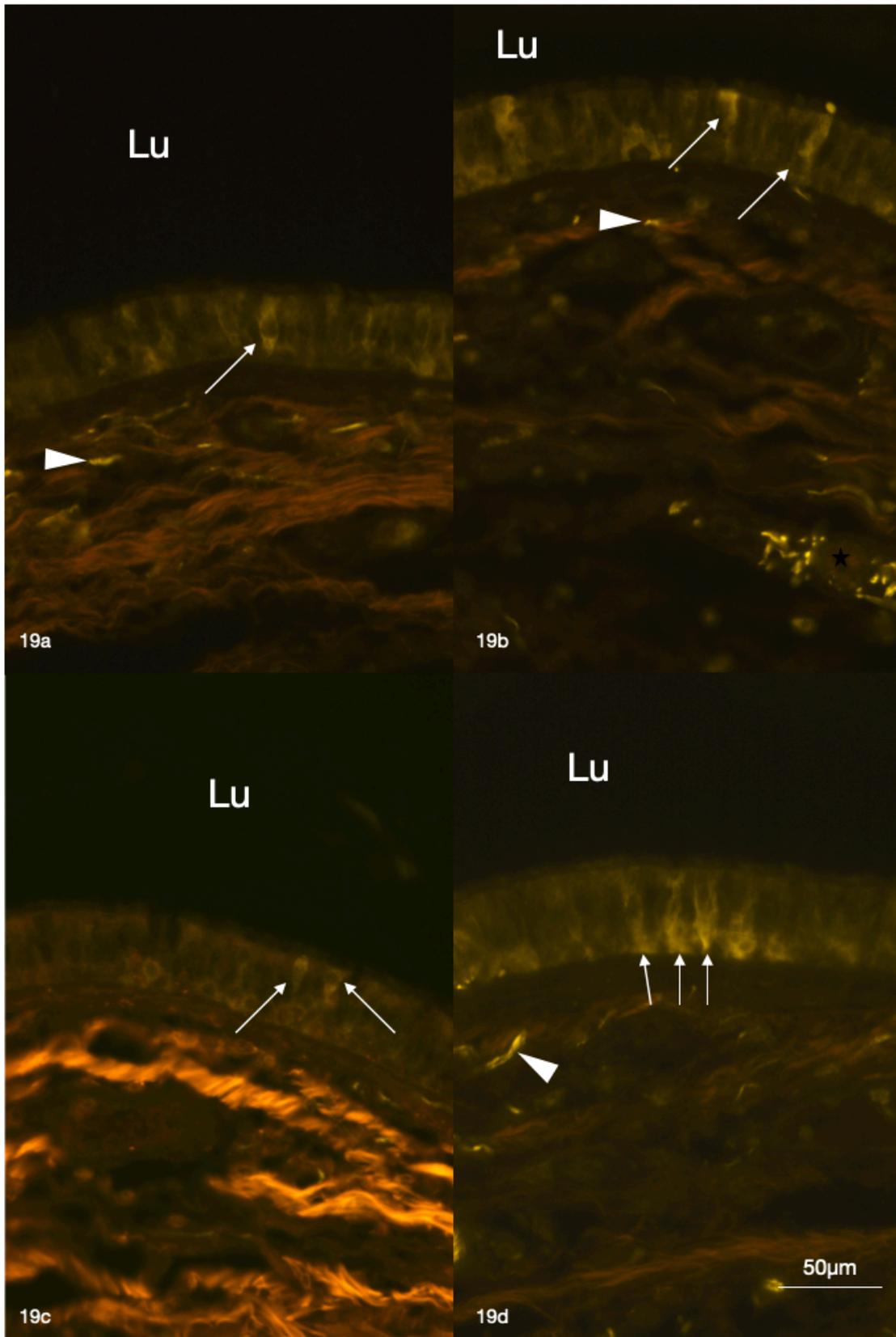


Abbildung 19: *Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) im Hauptbronchus (1:3200)

Lu: Lumen, **Pfeil:** positive Zellen, **Pfeilspitze:** subepitheliale Fasern, **Stern:** subepitheliale Nervenfasern; **(a)** längliche positive Zelle über die gesamte Epithelhöhe (Basalmembran–Lumen); **(b)** zwei positive längliche Zellen mit Kontakt zur Basalmembran und zum Lumen; **(c)** zwei positive ovale Zellen in naher Verbindung und Kontakt zum Lumen; **(d)** drei benachbarte positive Zellen mit gleicher Form, die sich über die gesamte Epithelhöhe erstrecken.

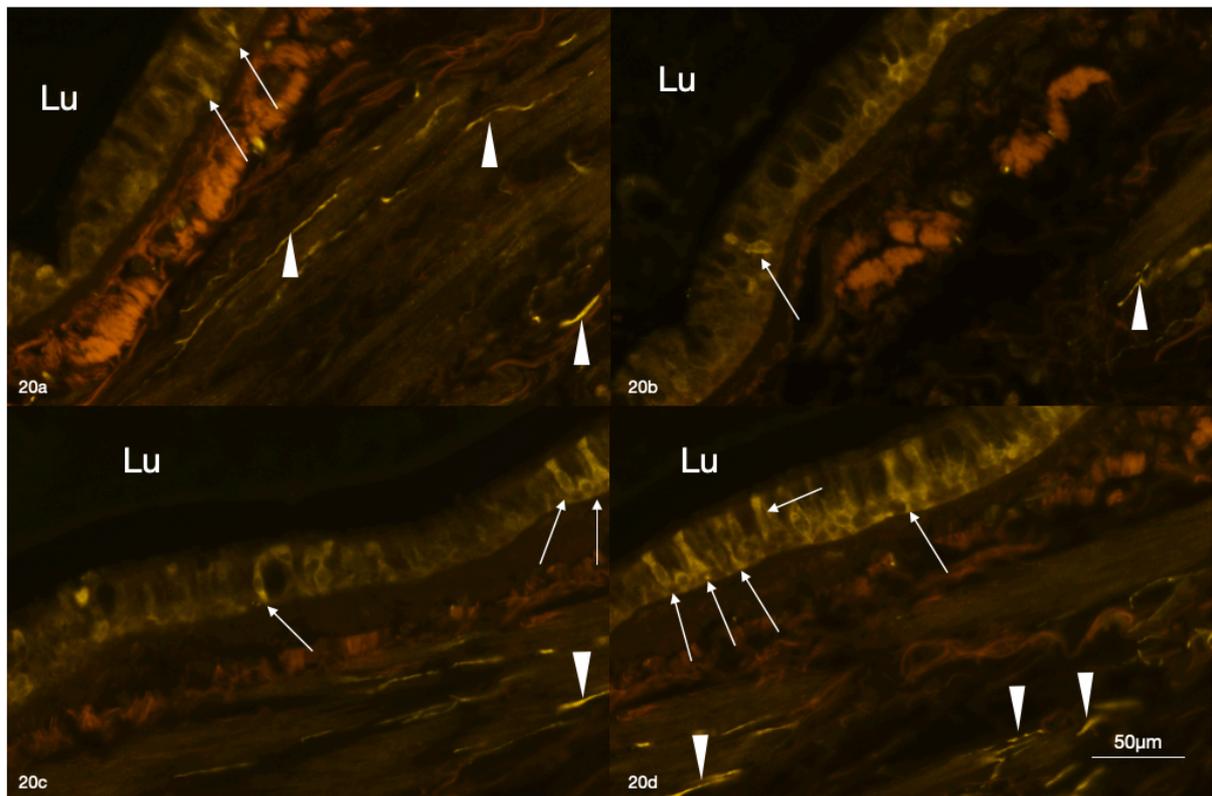


Abbildung 20: *Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) in Lappenbronchus (1:1600)

Lu: Lumen, **Pfeil:** positive Zellen, **Pfeilspitze:** subepitheliale Fasern; **(a)** zwei nahe beieinander liegende positive längliche Zellen mit spitzem Fuß auf der Basalmembran; **(b)** positive, leicht gebogene Zelle über die gesamte Epithelhöhe; **(c+d)** mehrere positive Zellen mit Sitz auf der Basalmembran und Kontakt zum Lumen.

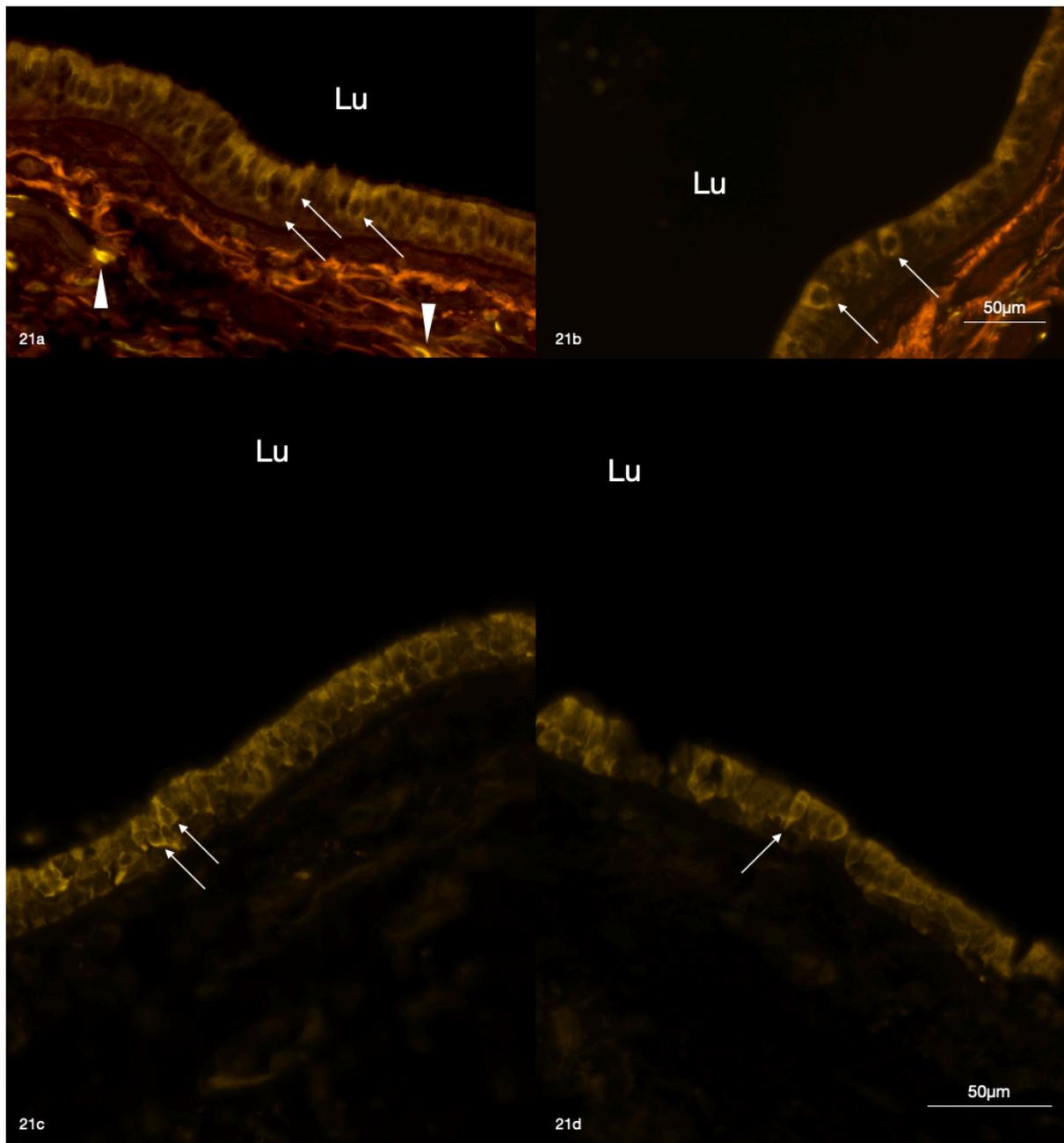


Abbildung 21: *Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) in Subsegmentbronchus (1:1600)

Lu: Lumen, **Pfeil:** positive Zellen, **Pfeilspitze:** subepitheliale Fasern; **(a)** mehrere positive länglich geformte Zellen mit Fortsatz zum Lumen gerichtet und auf der Basis aufsitzend; **(b)** zwei deutlich positive Zellen über die gesamte Epithelhöhe; **(c)** direkt nebeneinanderliegende längliche positive Zellen; **(d)** schmale positive Zelle mit Lumenkontakt und spitzem Fuß auf der Basalmembran.

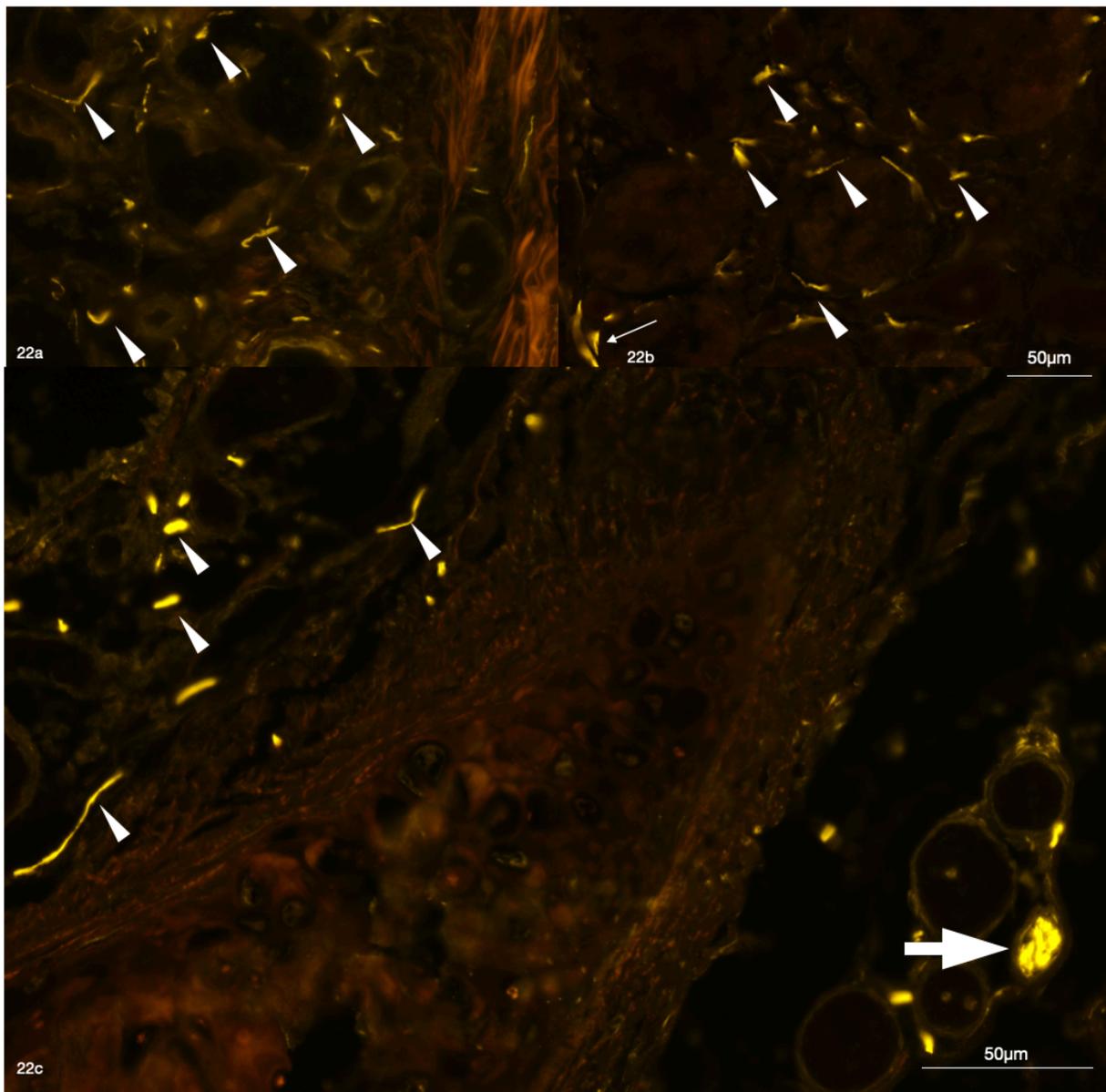


Abbildung 22: *Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) im subepithelialen Gewebe (1:1600)
Anfärbung von Nervenfasern/elastiche Fasern (Pfeilspitzen) um Drüsen herum; (c) Nervenganglion (Blockpfeil).

4.6.4 POU-class-2-homeobox-3 (POU2F3)

Wie an Tiermodellen gezeigt, handelt es sich bei POU2F3 um einen BC-spezifisches Antigen. Im Vergleich zur DCAMKL1-Immunfluoreszenz zeigte sich jedoch ein abweichendes Färbemuster. Die intraepithelialen POU2F3-positiven Zellen zeigten eine variable Form und Größe. Dazu zählten längliche flaschen- bis birnenförmige, rechteckige und reiskornförmige Zellen, die sich wie die DCAMKL1-positiven Zellen über die gesamte Höhe des Epithels von der Basalmembran bis zum Lumen erstreckten (siehe Abb. 24). Sie waren häufig mit einem fußartigen Ausläufer an der Basalmembran befestigt. Der Mikrovillisaum blieb von der Färbung ausgespart. Der kaum oder gar nicht angefärbte Zellkern befand sich im Zentrum oder im oberen

Bereich der Zelle. Intrazellulär zeigte sich eine ungleichmäßige, fleckige Markierung. Die Zellgrenzen waren nicht immer klar abgrenzbar. Neben dem großen Zellkern verliefen lateral schmale positive Zytoplasma-Ränder. Häufig zeigte die Zellbasis die höchste Färbeintensität, die weiter apikal abnahm. Die wenigen Zellen mit einem von apikal nach basal abnehmenden Intensitätsverlauf traten häufig zu zweit oder in Gruppen auf. Vor allem in der Trachea und den Hauptbronchien gab es häufiger positive Zellgruppen; in den tieferen Segmentabschnitten war die Frequenz deutlich geringer. In allen Abschnitten traten jedoch isoliert liegende markierte Zellen auf. Die Anzahl der markierten Zellen nahm von den oberen Abschnitten zu den Subsegmentbronchen kontinuierlich ab.

Seltener traten kleinere, runde bis ovale Zellen mit einer intensiveren Färbung auf (siehe Abb. 25). Ihr schwach gefärbter Zellkern füllte beinahe die gesamte Zelle aus. Häufig saßen die in allen Abschnitten singulär vorkommenden Zellen der Basalmembran auf und erstreckten sich nicht über die gesamte Epithelhöhe.

Neben positiv markierten Epithelzellen wurden auch subepithelial infiltrierende Einzelzellen markiert (siehe Abb. 23 e-f). Die kleineren, runden bis ovale Zellen verteilten sich auf verschiedenen Ebenen bis unter die Basalmembran. Meist fehlten klare Zellgrenzen. Der Zellkern war etwas dunkler als das Zytoplasma, jedoch nicht immer abgrenzbar.

Der POU2F3-Antikörper markierte auch das Gefäßendothel (siehe Abb. 24 a). Teilweise ließen sich vereinzelte Endothelzellen abgrenzen, meist jedoch waren die Zellgrenzen verschwommen. Bei Anschnitten der subepithelialen Drüsen waren gefärbte fadenförmige bzw. kordelartige Strukturen, die die Drüsen umgaben, erkennbar (siehe Abb. 27). Vereinzelt zeigten auch einzelne Zellen der Drüsenendstücke eine geringe Fluoreszenz.

Bei dem Anschnitt eines großen, vermutlich arteriellen Gefäßes zeigten sich im Gefäßlumen neben den nicht markierten Erythrozyten einzelne markierte Zellen (siehe Abb. 27 b), die eine ähnliche Form besaßen, wie die Zellen, die die *Lamina propria* in den oberen Atemwegsabschnitten infiltrierten. In diesen kleinen, runden Zellen mit verschwommenen Zellgrenzen war der Zellkern nicht zu differenzieren.

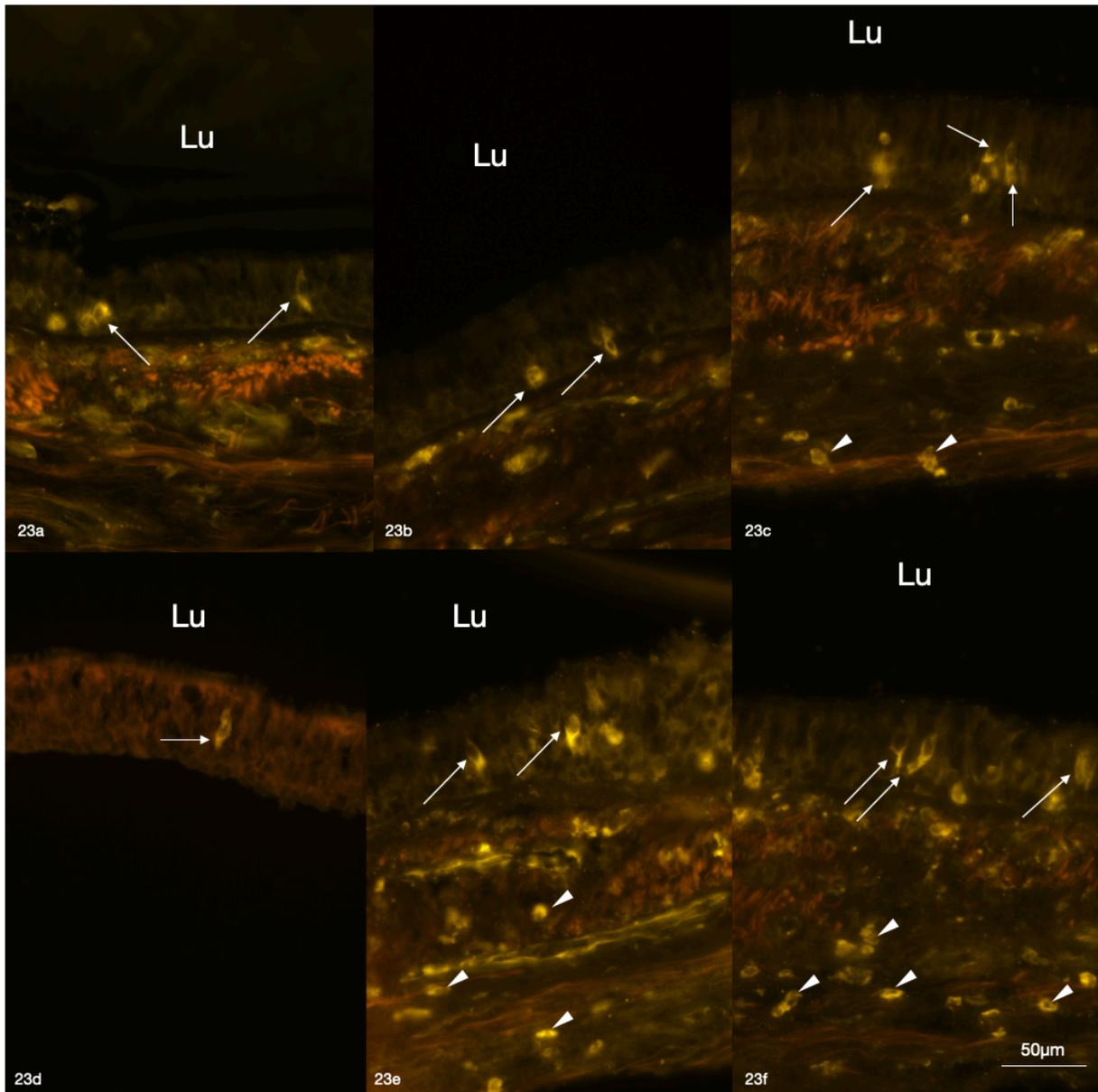


Abbildung 23: *POU-class-2-homeobox-3* (POU2F3) in Trachealgewebe

Lu: Lumen, **Pfeil:** positive Zelle, **Pfeilspitze:** subepithelial infiltrierende Zellen; **(a)** diffus angefärbte, basal im Epithel liegende, rundliche Zelle und längliche flaschenförmige Zelle in der Mitte des Epithels; **(b)** unscharfe rundliche Zelle und länglich basal und apikal spitz zulaufende Zelle; **(c)** unscharfe runde Zelle sowie zwei benachbarte längliche Zellen nach oben und unten, spitz zulaufend; **(d)** einzelnen flaschenförmigen Zelle in der Mitte des Epithels; **(e)** zwei positive Zellen in typischer Form, basal stärkere Anfärbung; **(f)** mehrere positive Zellen in direkter Nähe mit jeweils spitzem Fuß und basal stärkerer Färbung.

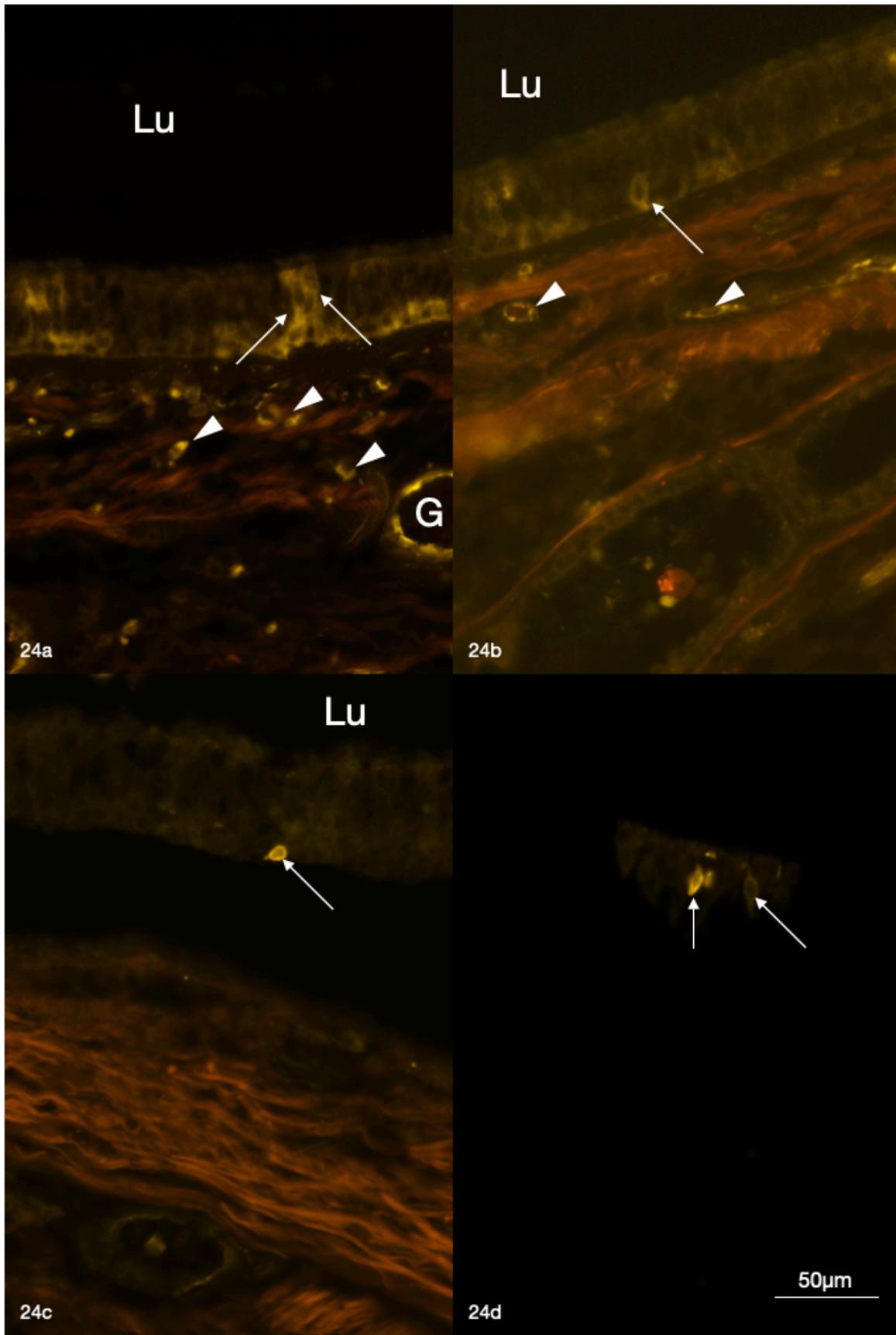


Abbildung 24: *POU-class-2-homeobox-3* (POU2F3) im Hauptbronchus

Lu: Lumen, **Pfeil:** positive Zelle, **Pfeilspitze:** subepithelial infiltrierende Zellen, **G:** Gefäßlumen;
(a) gefärbte Zellen im Epithel sowie Anschnitt eines Gefäßes mit fluoreszierendem Endothel; **(b–d)** POU2F3-positive Zellen im Epithel.

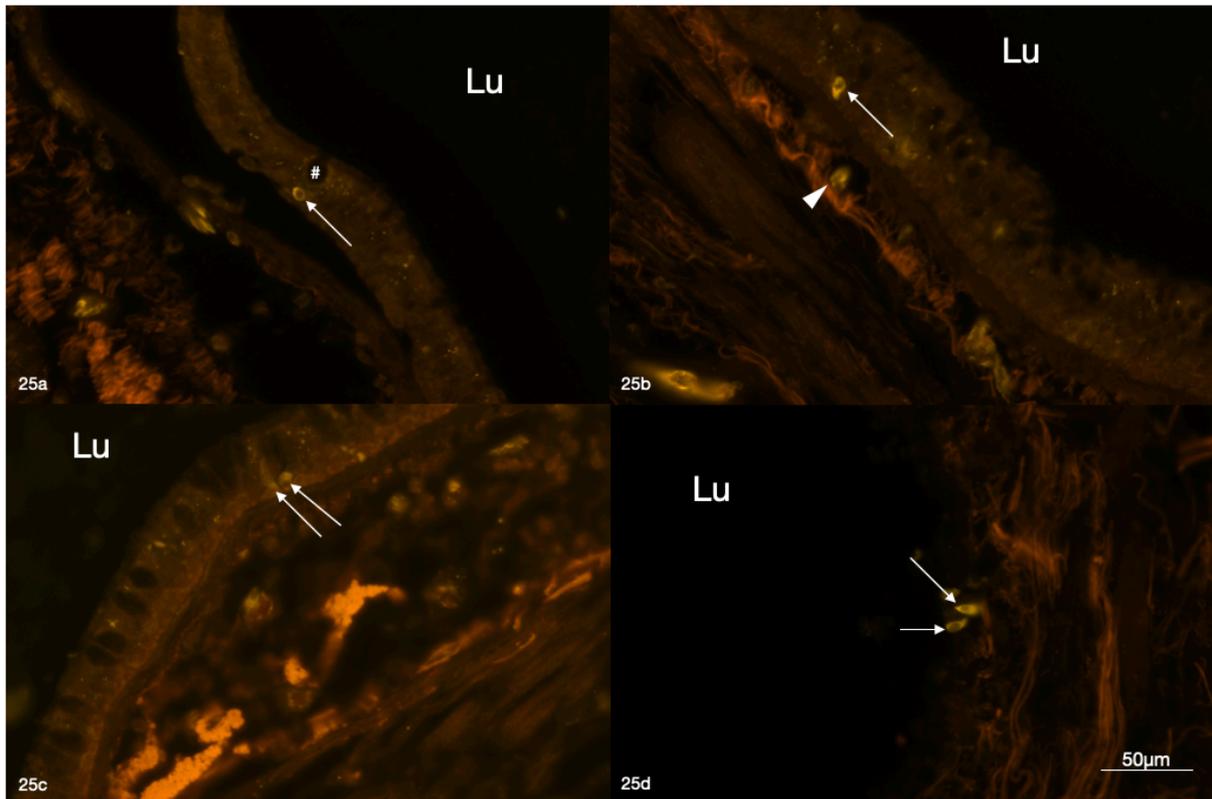


Abbildung 25: *POU-class-2-homeobox-3* (POU2F3) in Lappenbronchus

Lu: Lumen, **Pfeil:** positive Zelle, **Pfeilspitze:** subepithelial infiltrierende Zellen, **#:** Becherzelle
(a-b) Einzelne der Basalmembran aufsitzenden Zellen, die keinen Kontakt zum Lumen haben.
(c-d) Paarweise vorkommende rundliche Zellen ohne Lumenkontakt.

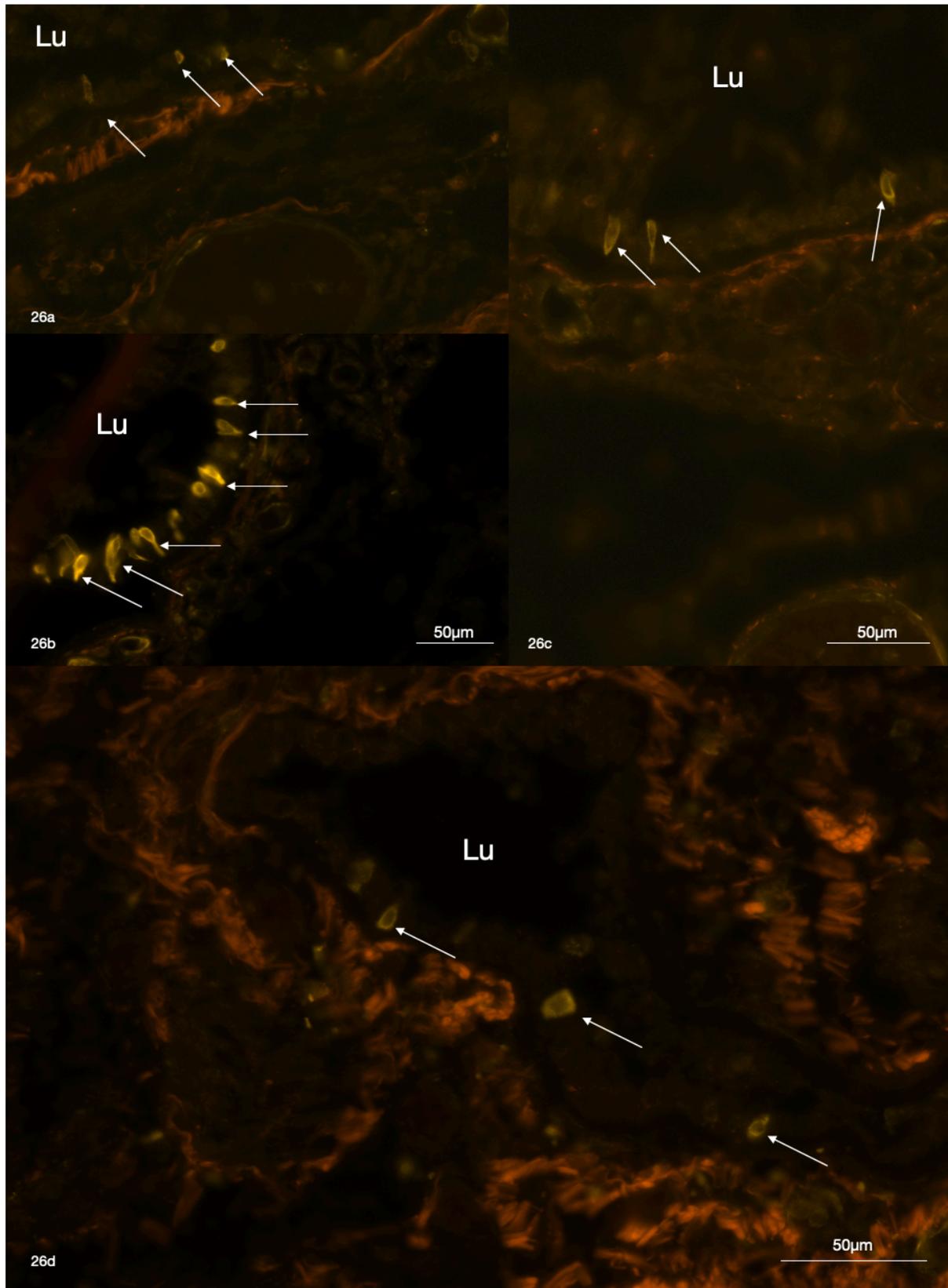


Abbildung 26: *POU-class-2-homeobox-3* (POU2F3) in Segment- und Subsegmentbronchus

Lu: Lumen, **Pfeil:** positive Zelle; **(a+b)** benachbarte tropfenförmige positive Zellen im Gewebe des Segmentbronchus, Fuß der Zellen auf der Basalmembran; **(c)** mehrere längliche, basal spitz zulaufende Zellen mit Kontakt zu Lumen und Basalmembran; **(d)** Lumenanschnitt eines kleinen Subsegmentbronchus (Querschnitt ca. 100 µm); vereinzelte positive, runde bis oval-eckige Zellen mit großen Zellkernen.

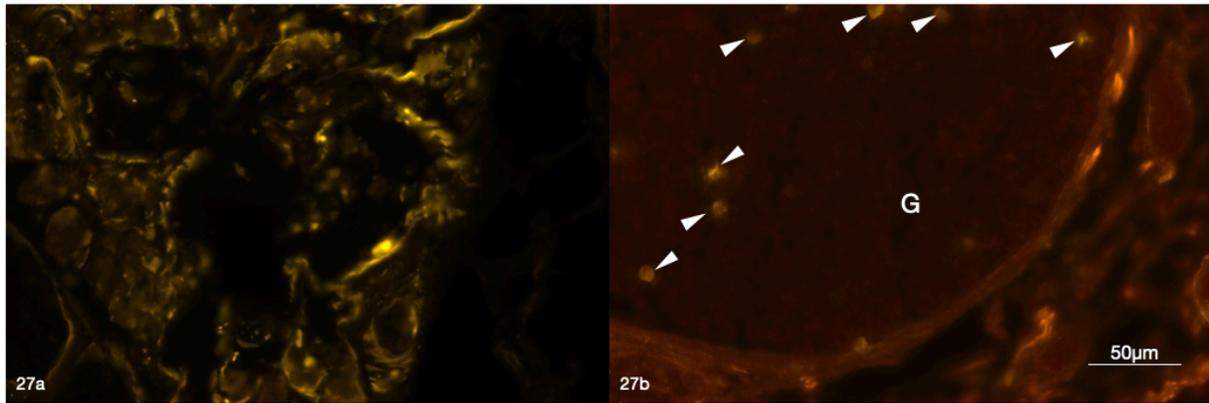


Abbildung 27: *POU-class-2-homeobox-3*-(POU2F3) - Expression außerhalb des Epithels
(a) Anschnitte von subepithelialen Drüsen mit randständigen Färbungen durch den POU2F3 Antikörper; **(b)** Anschnitt eines größeren arteriellen Gefäßes; das Gefäßlumen (G) enthält eine Vielzahl an Zellen, darunter POU2F3-positive Zellen (Pfeilspitze).

4.6.5 Cholinacetyltransferase (ChAT)

Da ACh eine wichtige Rolle bei der auto- und parakrin ausgelösten Signalweiterleitung der BC spielt, wurde mit ChAT die Expression eines Schlüsselenzyms der ACh-Produktion analysiert. Intraepithelial trat aufgrund der notwendigen doppelten Permeabilisierung (siehe Kap. 3.4.1) eine erhöhte Hintergrundfluoreszenz auf. Die eindeutig positiv markierten Zellen ließen sich dennoch gut vom restlichen Gewebe abgrenzen.

Die in den oberen Abschnitten der Trachea und dem Hauptbronchus häufigen positiven Zellen (ca. alle 100–200 µm) wurden in den Lappen- und Segmentbronchien seltener (ca. alle 400–600 µm eine positive Zelle) und kamen in den Subsegmentbronchien nur noch vereinzelt vor. In der Trachea und den Hauptbronchien und deutlich seltener auf der Ebene des Subsegmentbronchus, traten die Zellen auch in Gruppen auf (siehe Abb. 28+29). Die abnehmende Häufigkeit markierter Zellen in den tieferen Atemwegsabschnitten entspricht dem Bild bei der Immunfluoreszenz-Analyse mit den anderen BC-Antikörpern. Die von der Basalmembran bis apikal zum Lumen reichenden Zellen zeigten fast einheitlich eine längliche und flaschenförmige Gestalt (siehe Abb. 28+29). In den höheren Bronchialabschnitten der Trachea und den Hauptbronchien waren teilweise Ausläufer zur Basalmembran erkennbar (siehe Abb. 28 e+31 a). Innerhalb der Subsegmentbronchien wurden zusätzlich wenige eher runde bis dreieckige Zellen beobachtet, die häufig mit einem dünnen Ausläufer die Basalmembran kontaktierten (siehe Abb. 4.31). Die Zellen besaßen einen relativ großen runden bis ovalen Zellkern in der Mitte des Zellkörpers, der diffus bzw. fleckig angefärbt war. Das diffuse, durchgängige Färbemuster im Zytoplasma war nicht gleichmäßig intensiv. Häufig traten stärkere Signale apikal zum Lumen hin oder basal an der Membran auf (siehe Abb. 31 c+e). Auch negative Zellen vor

allem in den Subsegmentbronchien zeigten apikale Anfärbungen, die den Bürstensaum charakterisierten.

Bei Verwendung des ChAT-Antikörpers zeigten die subepithelialen Kollagenfasern in der *Lamina propria* ebenfalls eine rot-orange Eigenfluoreszenz, die es abzugrenzen galt. Teilweise waren intraepithelial apikal am Lumen und auf der Basalmembran positive Signale erkennbar, die vermutlich Nervenfasern darstellten. Sie ähnelten optisch den mit dem PGP9.5-Antikörper gefärbten Strukturen und zogen granulär perlenschnurartig zwischen den Zellen durch (siehe Abb. 31). Zur Analyse einer möglichen Doppelsexpression von PGP9.5 und ChAT in den Zellen wurden Doppelfärbungen durchgeführt (siehe Kap. 4.7.1).

Da ACh nicht nur in BC exprimiert wird wurden auch andere Gewebe markiert. Dazu zählten die außerhalb des Epithels liegenden seromukösen Spüldrüsen in der *Lamina propria* (siehe Abb. 32). Die Drüsenabschnitte zeigten eine zellübergreifende, wolkenartige, granulär deckende Markierung, sodass einzelne Zelle meist nicht erkennbar waren (siehe Abb. 32 a). In Abb. 32 b zeigten sich einmalig zwei differenzierbare cholinerge Bürstenzellen.

Auch subepithelial gelegene cholinerge Nervenfasern, welche die Spüldrüsen umgaben, konnten dargestellt werden (siehe Abb. 28). Das intensiv granuläre Färbemuster ähnelte dem der Versuche mit dem PGP9.5-Antikörper.

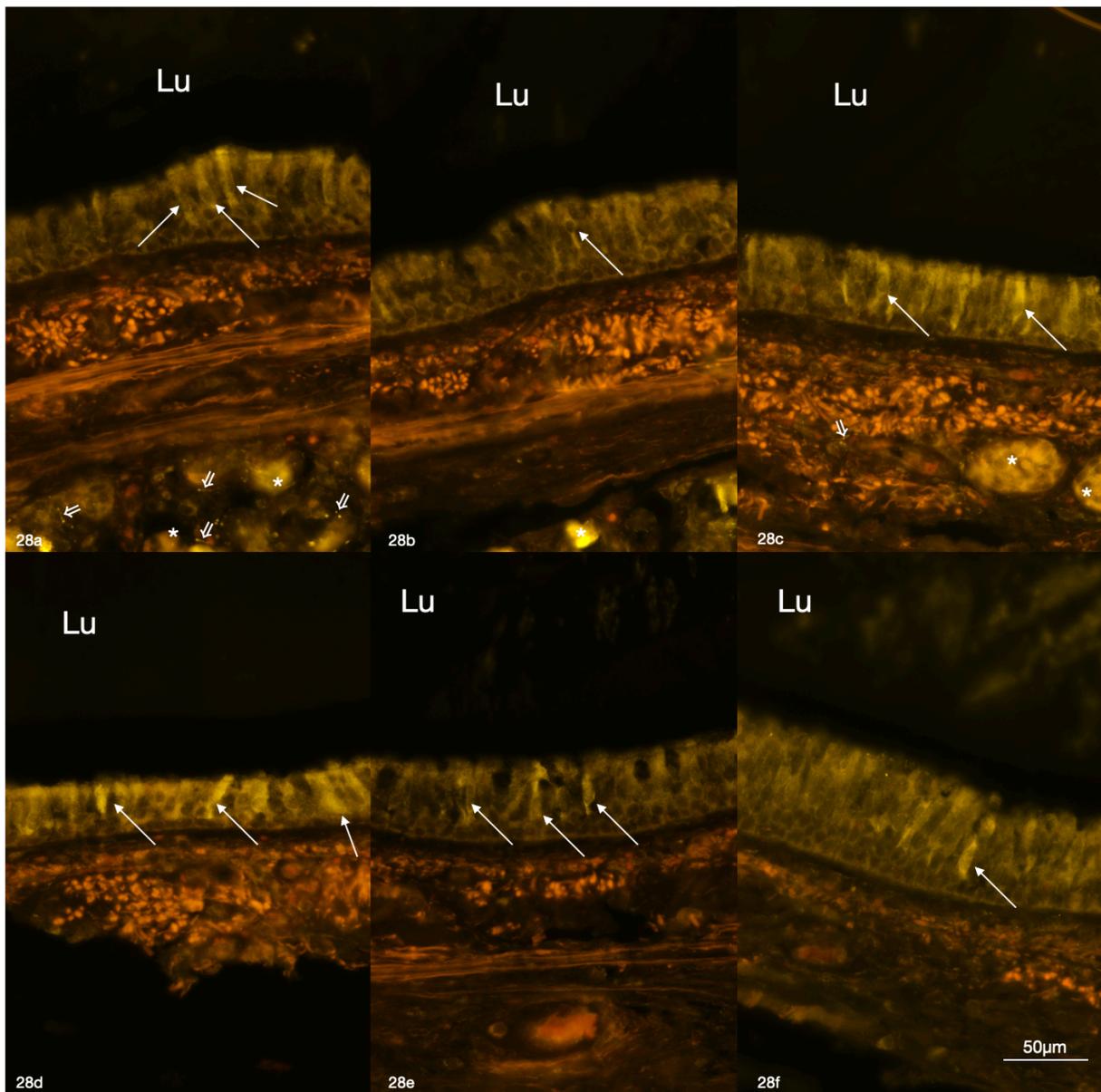


Abbildung 28: Cholinacetyltransferase (ChAT) in Tracheagewebe

Lu: Lumen; **Pfeil:** positive Zelle; *****: Drüsen; **Doppelpfeil:** cholinerge Nervenfasern; mehrere benachbarte ChAT-positive Zellen mit länglich schmaler Zellform mit Kontakt zur Basalmembran und bis an das Lumen heranreichende Ausläufer; mittig, auf der Hälfte der Zellhöhe liegender Zellkern.

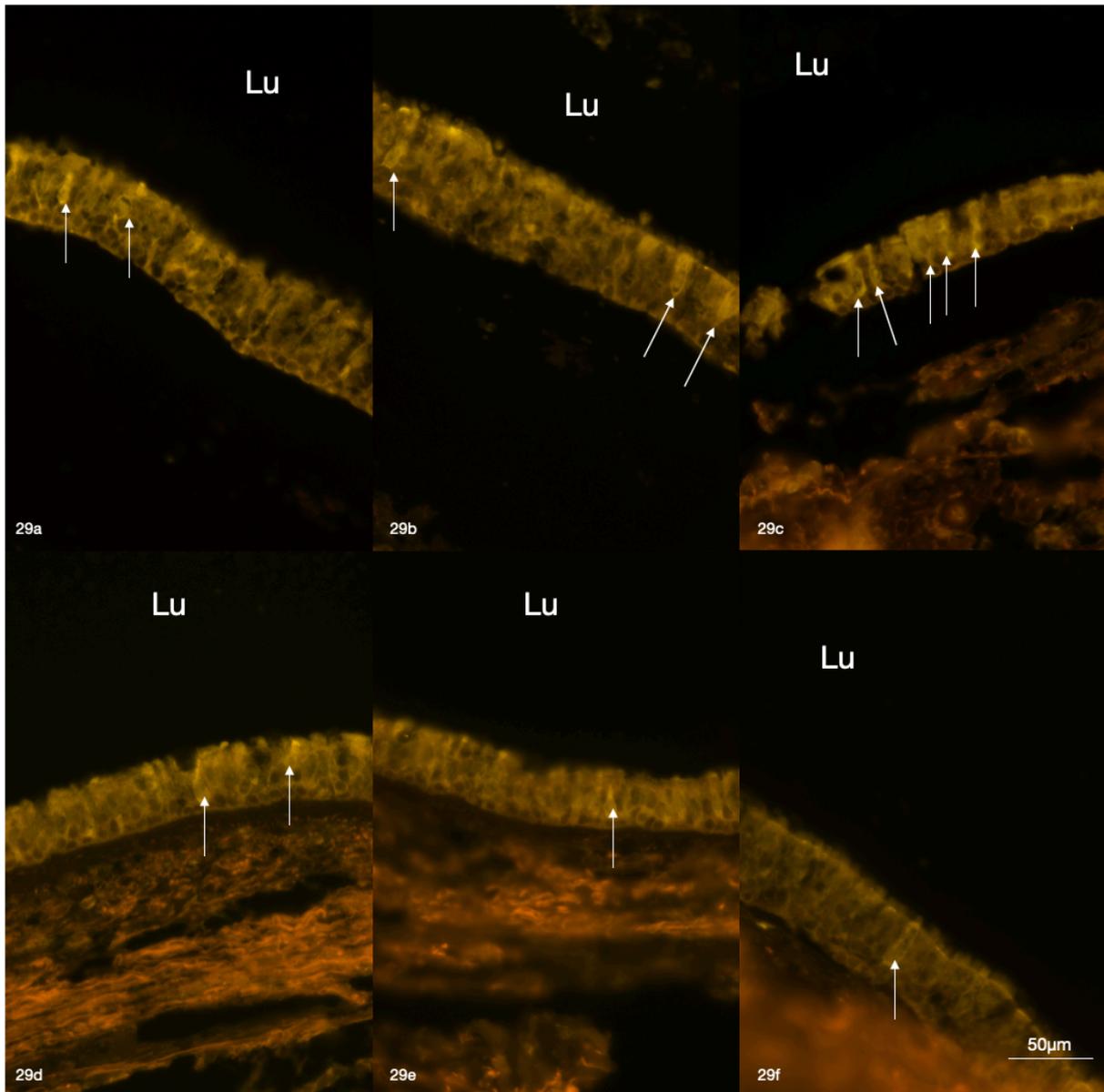


Abbildung 29: Cholinacetyltransferase (ChAT) im Hauptbronchus

Lu: Lumen; **Pfeil:** positive Zelle; **(a-f)** ChAT-positive Zellen von langgestreckter Zellform mit Kontakt zu Basalmembran und Lumen, häufig direkte Nachbarschaft zu weiteren positiven Zellen.

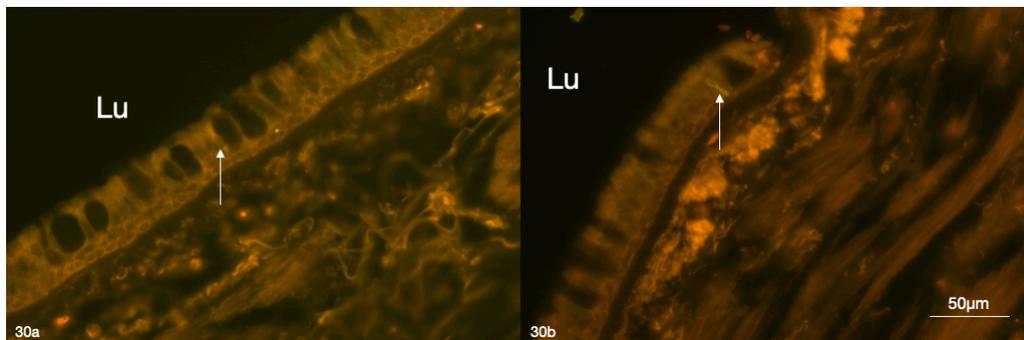


Abbildung 30: Cholinacetyltransferase (ChAT) in Lappenbronchus

Lu: Lumen; **Pfeil:** positive Zelle; **(a+b)** längliche positive Zellen (Pfeil) direkt neben Becherzellen.

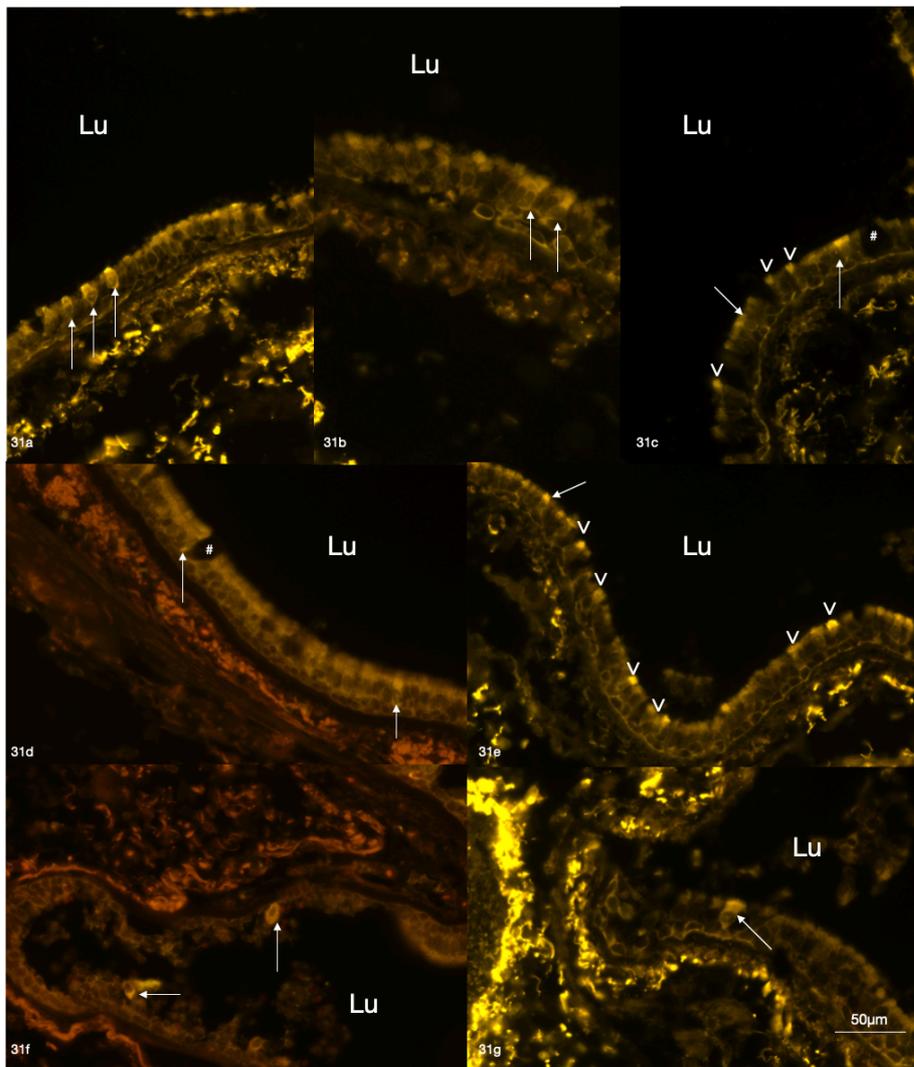


Abbildung 31: Cholinacetyltransferase (ChAT) in Subsegmentbronchus

Lu: Lumenseite, **Pfeil:** ChAT-positive Zellen, **V:** verstärkte apikale Anfärbung am Epithel auf Höhe des Bürstensaums, **#:** Becherzellen; positive Zellen mit stärkerer Anfärbung im oberen Zell-drittel, mit Kontakt zur Basalmembran und zum Lumen, mittig im Zellkörper liegender Zellkern.

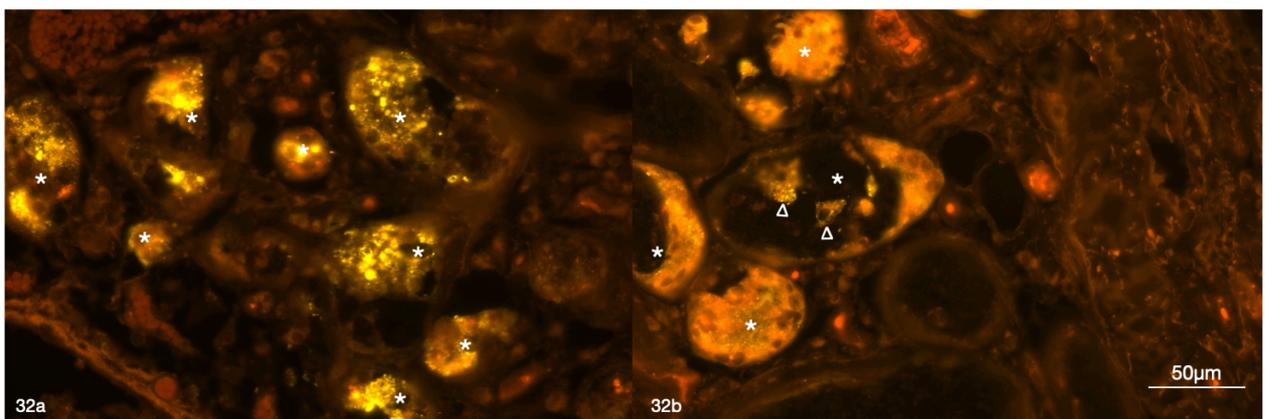


Abbildung 32: Cholinacetyltransferase (ChAT) in Drüsengewebe

*****: Lumen der Drüsenendstücke; **Dreieck:** cholinerge Drüsenzellen; zellunabhängige granuläre Anfärbung diffus über das Gewebe verteilt, starke auf Abschnitte begrenzte Fluoreszenz.

4.7 Doppelfärbungen des tracheobronchialen Gewebes

4.7.1 Cholinacetyltransferase (ChAT)/protein-gene-product 9.5 (PGP9.5) Innervation

Weiter wurden bereits mit dem ChAT-Antikörper (Fluorochrom Cy3) gefärbte Schnitte der Zunge und der Trachea aufgrund der detektierten nervenfaserähnlichen Strukturen zusätzlich mit dem PGP9.5-Antikörper (Fluorochrom Cy5) angefärbt. Im Zungengewebe wurden ChAT-positive Strukturen primär an der Knospenspitze detektiert (siehe Kap. 4.5.4).

Laut Doppelfärbung war die Expression von ChAT (Enzym des Synthesewegs des Neurotransmitters ACh) und PGP9.5 (Marker für NEC/Innervation) nicht vollständig identisch, jedoch traten vor allem im zentralen und teilweise im apikalen Bereich der Knospe Überlappungen auf (siehe Abb. 33). PGP9.5-positive Fasern zogen basal von der Knospenbasis nach oben und trafen dort auf die von der Knospenspitze apikal kommenden Ausläufer der ChAT-positiven Fasern. Bei basal liegenden PGP9.5-positiven Fasern war häufig keine ChAT-Markierung erkennbar.

In der Trachea traten ChAT-Fasern mit fadenförmigem Muster, eher apikal zum Lumen hin auf (siehe Abb. 34), deutlich seltener der Basalmembran aufliegend. ChAT-positive Zellen konnten in diesen speziellen Färbungen nicht detektiert werden. Mit dem PGP9.5-Antikörper konnten dagegen Zellen markiert werden (siehe Abb. 34); die positiven Fasern durchzogen die gesamte Höhe des Epithels.

Überlappende Färbungen waren selten und lagen auf verschiedenen Ebenen (Einstellung im Mikroskop musste verändert werden). Ein eindeutiges cholinerges Innervationsmuster wurde nicht identifiziert bzw. nicht kontinuierlich entlang aller Abschnitte beobachtet. Die Untersuchungsbefunde ließen lediglich für das Zungengewebe Interpretationen zu.

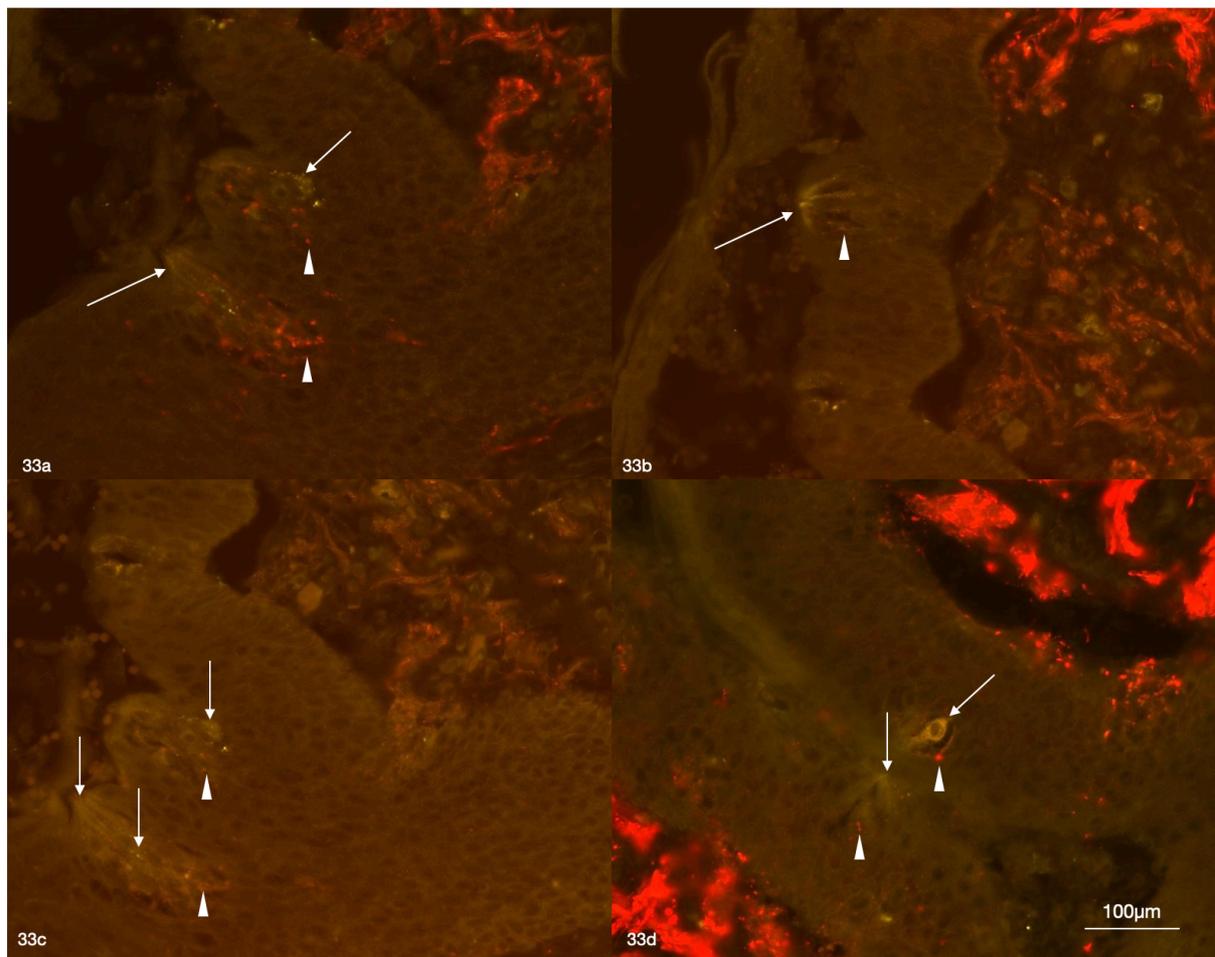


Abbildung 33: *Protein-gene-product 9.5* (PGP9.5)/Cholinacetyltransferase (ChAT) –Doppelfärbung im Zungengewebe
 Pfeil: ChAT-positive Signale (gelb-orange); Pfeilspitze: PGP 9.5-positive Signale (rot); **(a–c)** zwei Geschmacksknospen mit apikaler ChAT-Anfärbung (Pfeil) und von basal an die Knospe reichende PGP9.5-positive Nervenfasern (Pfeilspitze); **(d)** ChAT-positive Zelle im Zentrum einer Geschmacksknospe (Pfeil) mit PGP9.5-positiver Innervation (Pfeilspitze).

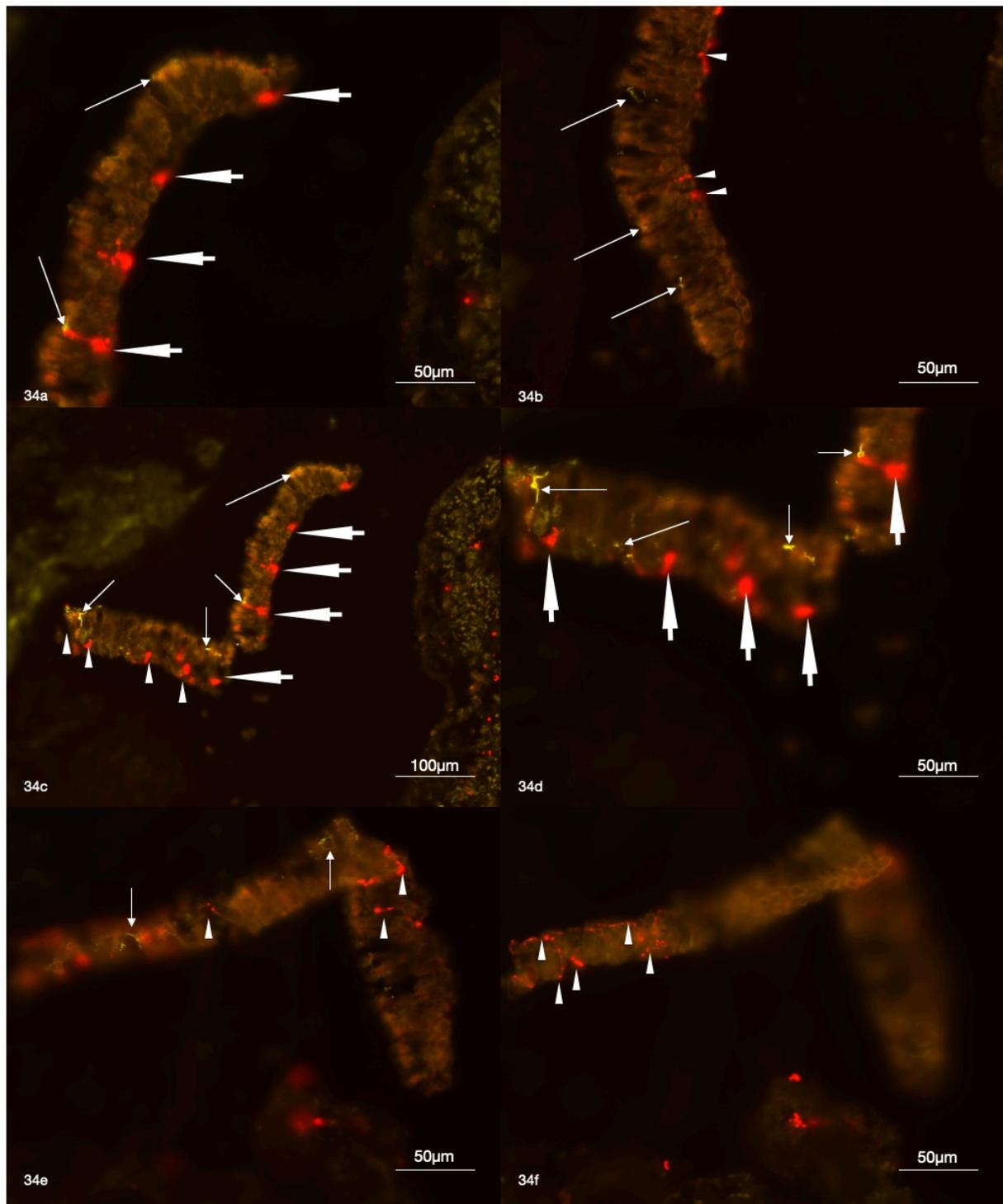


Abbildung 34: *Protein-gene-product 9.5* (PGP9.5)/Cholinacetyltransferase (ChAT) –Doppelfärbung in Tracheagewebe

Pfeil: ChAT-positive Nervenfasern (gelb-orange); Pfeilspitze: PGP9.5-positive Nervenfasern (rot), Blockpfeil: PGP9.5-positive Zellen (rot); granulär im apikalen Bereich des Epithels direkt am Lumen ChAT-positive Strukturen (Nervenfasern?); basal beginnende und vertikal zwischen den Zellen hochziehende PGP9.5-positive Strukturen (Nervenfasern (Pfeilspitzen), Zellen (Blockpfeile)); fehlende Überlappung der Anfärbung, aber Kontakte von ChAT-positiven und PGP9.5-positiven Fasern.

4.7.2 Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1)/Calcitonin-gene-related-peptide (cGRP)

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Kontakte zwischen BC und cGRP-positiven Nervenfasern wurden Doppelfärbungen mit DCAMKL1- (BC-Strukturmarker) und cGRP-Antikörpern durchgeführt. In den oberen Abschnitten der Trachea und in den Hauptbronchien zeigte sich apikal über den DCAMKL1-positiven Zellen im Bürstensaum eine deutliche cGRP-Markierung (siehe Abb. 35+ 36+ 37). Diese war nicht einzelnen Zellen zuzuordnen, sondern betraf diffus die Zilien bzw. Mikrovilli.

Generell waren in allen Abschnitten DCAMKL1- sowie cGRP-positive Zellen zu beobachten. Die Zellmuster entsprachen denen der Einzelfärbungen. Die Markierungen traten auch in direkter Nähe auf. CGRP-positive Zellen lagen basal unter DCAMKL1-positiven Zellen (siehe Abb. 36) und cGRP-positive Nervenfasern in der Nähe von DCAMKL1-positiven Zellen (siehe Abb. 37+ 40). Auch ein direkter Kontakt (siehe Abb. 37) zwischen cGRP-positiven Nervenfasern mit DCAMKL1-Zellen war nachweisbar. Bei überlappenden Signalen (siehe Abb. 37+38) zeigten DCAMKL1-positive Zellen meist ein etwas schwächeres cGRP-Signal, als ausschließlich cGRP-positive Zellen. Doppelt positive Zellen kamen vermehrt in den Abschnitten der Subsegmentbronchien vor. Bei der Analyse der subepithelialen Gefäßes fiel auf, dass der cGRP-Antikörper auch das Endothel markierte (siehe Abb. 40 g-i) und der DCAMKL1-Antikörper Nervenfasern in der äußeren Gefäßwand (siehe Abb. 40).

Im Drüsengewebe zeigte die Färbung mit dem cGRP-Antikörper ein feines granuläres umrandendes Fasermuster, während der DCAMKL1-Antikörper gröberes eher strangartiges Färbungsmuster der innere und äußere angeschnittene Drüsenendstücke zeigte (siehe Abb. 40 g-i).

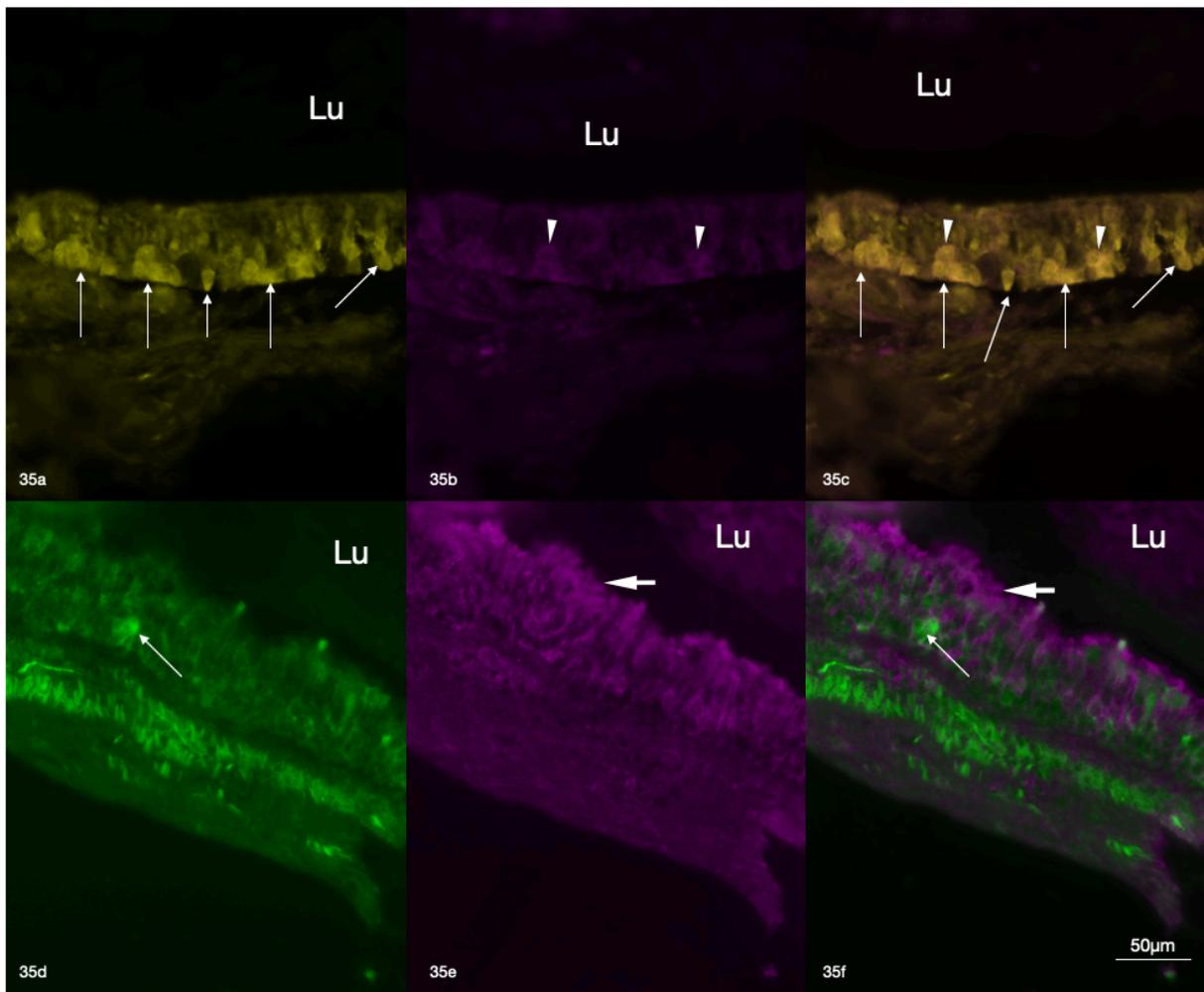


Abbildung 35: *Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1)/*Calcitonin-gene-related-peptide* (cGRP) Doppelfärbung in Tracheagewebe
Lu: Lumen; **(a+d)** DCAMKL1 (grün); **(b+e)** cGRP (lila) **(c+f)** Mischbild; **obere Reihe:** teilweise Überlappungen zwischen DCAMKL1-positiven (Pfeil in a+c) und cGRP-positiven Zellen (Pfeilspitzen in b+c); **untere Reihe:** basal liegende DCAMKL1-positive Zelle (Pfeil in d+f) und apikale cGRP-Anfärbung des Ziliensaums des Epithels (Blockpfeil).

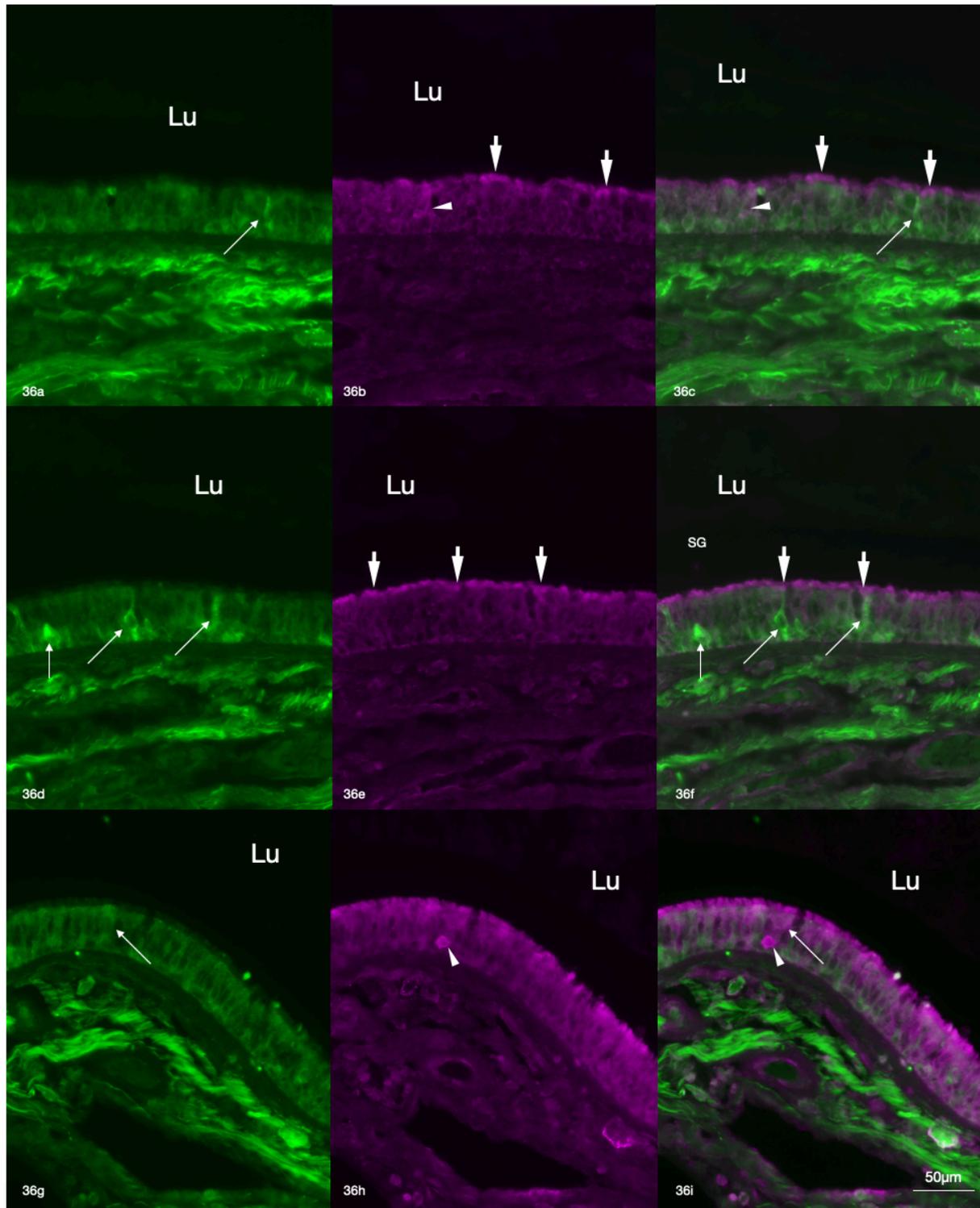


Abbildung 36: *Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1)/*Calcitonin-gene-related-peptide* (cGRP) Doppelfärbung im Hauptbronchus

Lu: Lumen; **(a+d+g)** DCAMKL1 (grün); **(b+e+h)** cGRP (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** DCAMKL1-positive Zelle (Pfeil in a+c), cGRP-positive Zelle (Pfeilspitzen in b+c), cGRP-Anfärbung des apikalen Epithelziliensaums (Blockpfeil in b+c); **mittlere Reihe:** basal liegende DCAMKL1-positive Zellen (Pfeil in d+f), apikale cGRP-Anfärbung des Ziliensaums des Epithels (Blockpfeil in e+f); **untere Reihe:** DCAMKL1-positive Zelle (Pfeil in g+i) mit basal auf der Basalmembran liegender, benachbarter cGRP-positiver Zelle (Pfeilspitze in g+h).

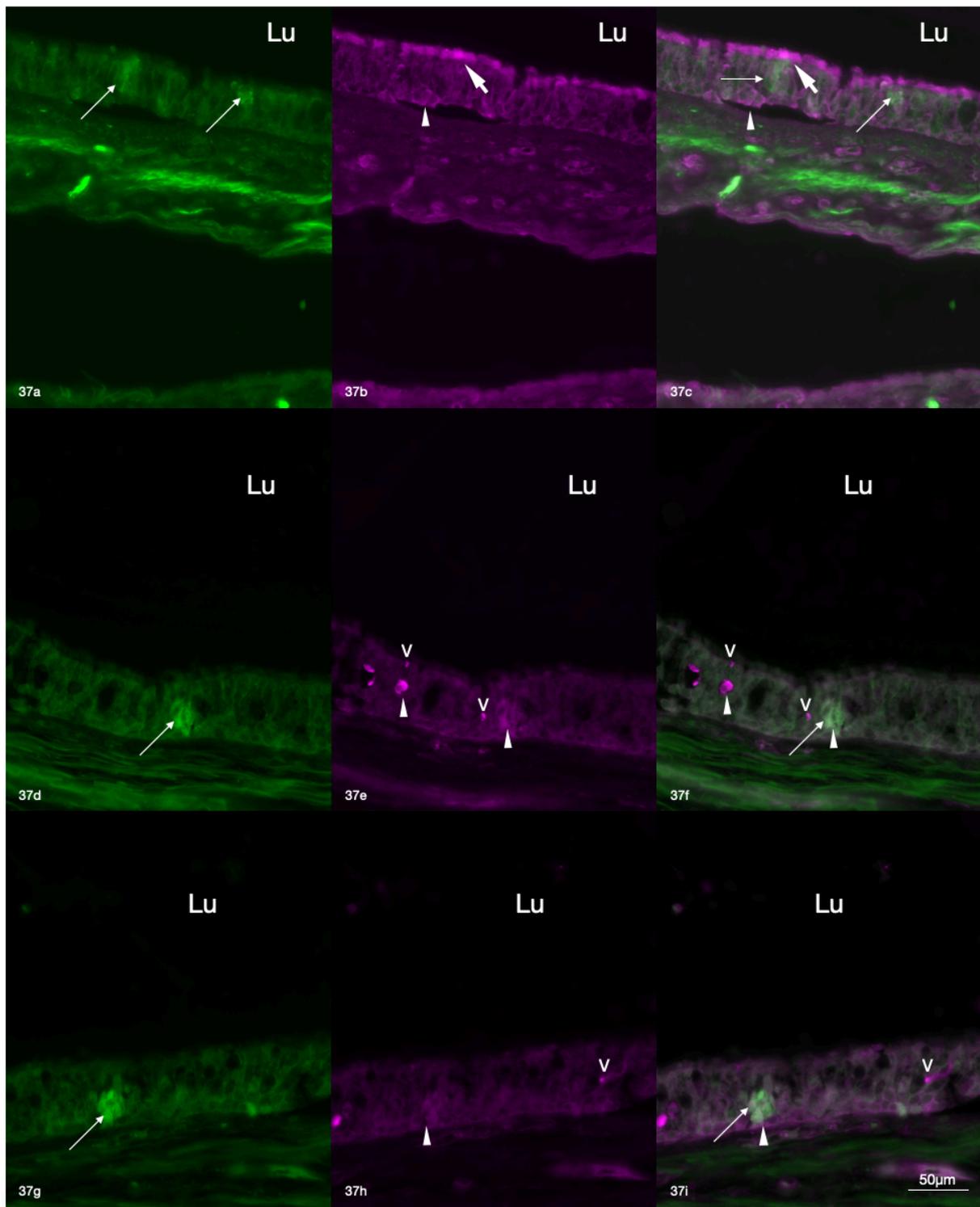


Abbildung 37: *Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1)/*Calcitonin-gene-related-peptide* (cGRP) Doppelfärbung im Hauptbronchusgewebe
Lu: Lumen; **(a+d+g)** DCAMKL1 (grün); **(b+e+h)** cGRP (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** DCAMKL1-positive Zellen (Pfeile in a+c) in Überlappung mit einer cGRP-positiven Zelle (Pfeilspitze in b+c), cGRP-positiver Ziliensaum (Blockpfeil in b+c); **mittlere Reihe:** Überlappung einer DCAMKL1-positiven (Pfeil in d+f) und einer cGRP-positiven Zelle (Pfeilspitze in e+f), benachbarte cGRP-positive Nervenfasern (V in e+f); **untere Reihe:** Überlappung einer DCAMKL1-positiven (Pfeil in g+i) und einer cGRP-positiven Zelle (Pfeilspitze in h+i), benachbarte cGRP-positive Nervenfasern (V in h+i).

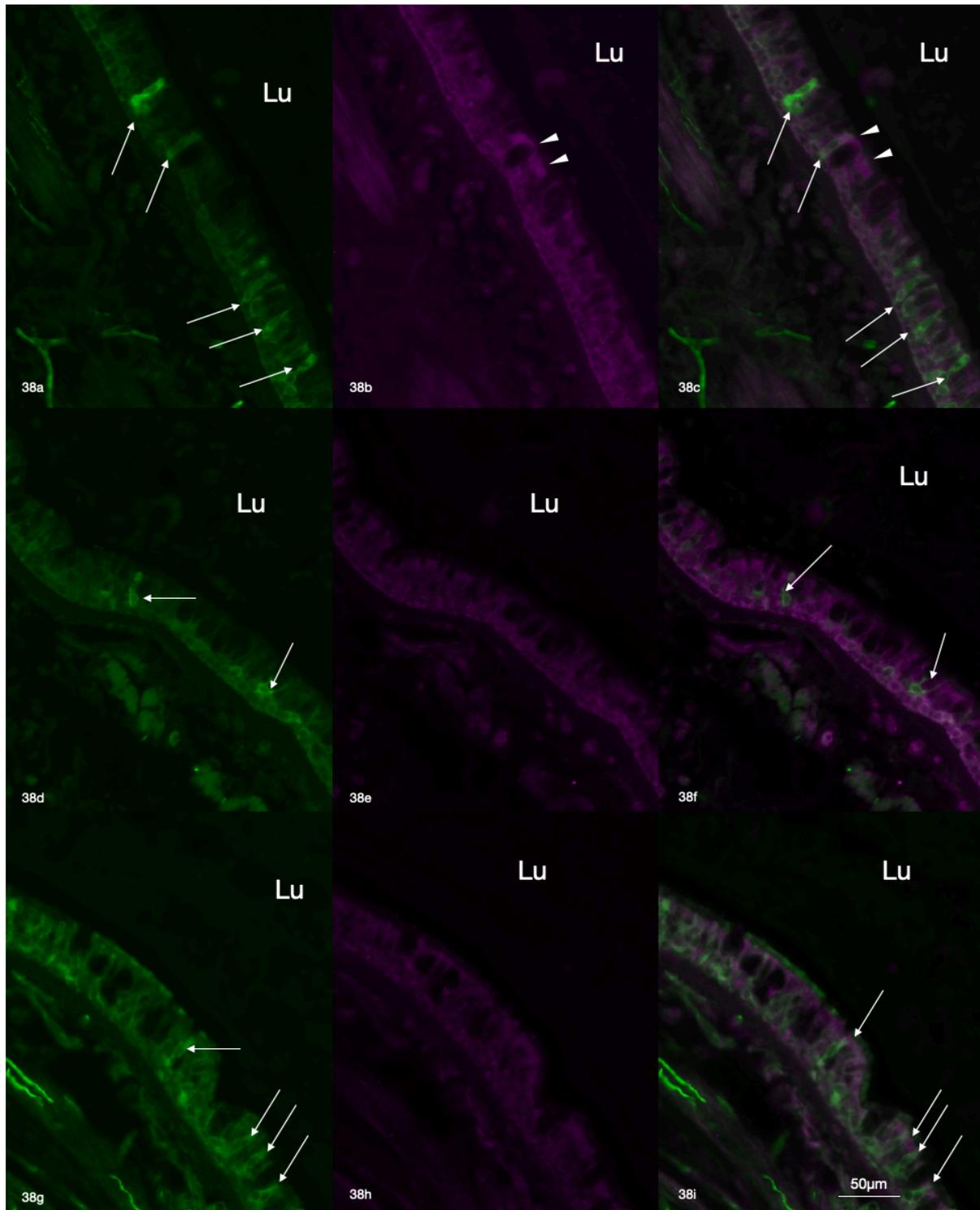


Abbildung 38: *Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1)/*Calcitonin-gene-related-peptide* (cGRP) Doppelfärbung im Lappenbronchus
Lu: Lumen; **(a+d+g)** DCAMKL1 (grün); **(b+e+h)** cGRP (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** DCAMKL1-positive (Pfeile in a+c) und cGRP-positive Zellen (Pfeilspitze in b+c) mit einer Überlappung; **mittlere Reihe:** DCAMKL1-positive Zellen (Pfeile in d+f) und fehlende cGRP-Signale; **untere Reihe:** DCAMKL1-positive Zellen (Pfeile in g+i) und fehlende cGRP-Signale.

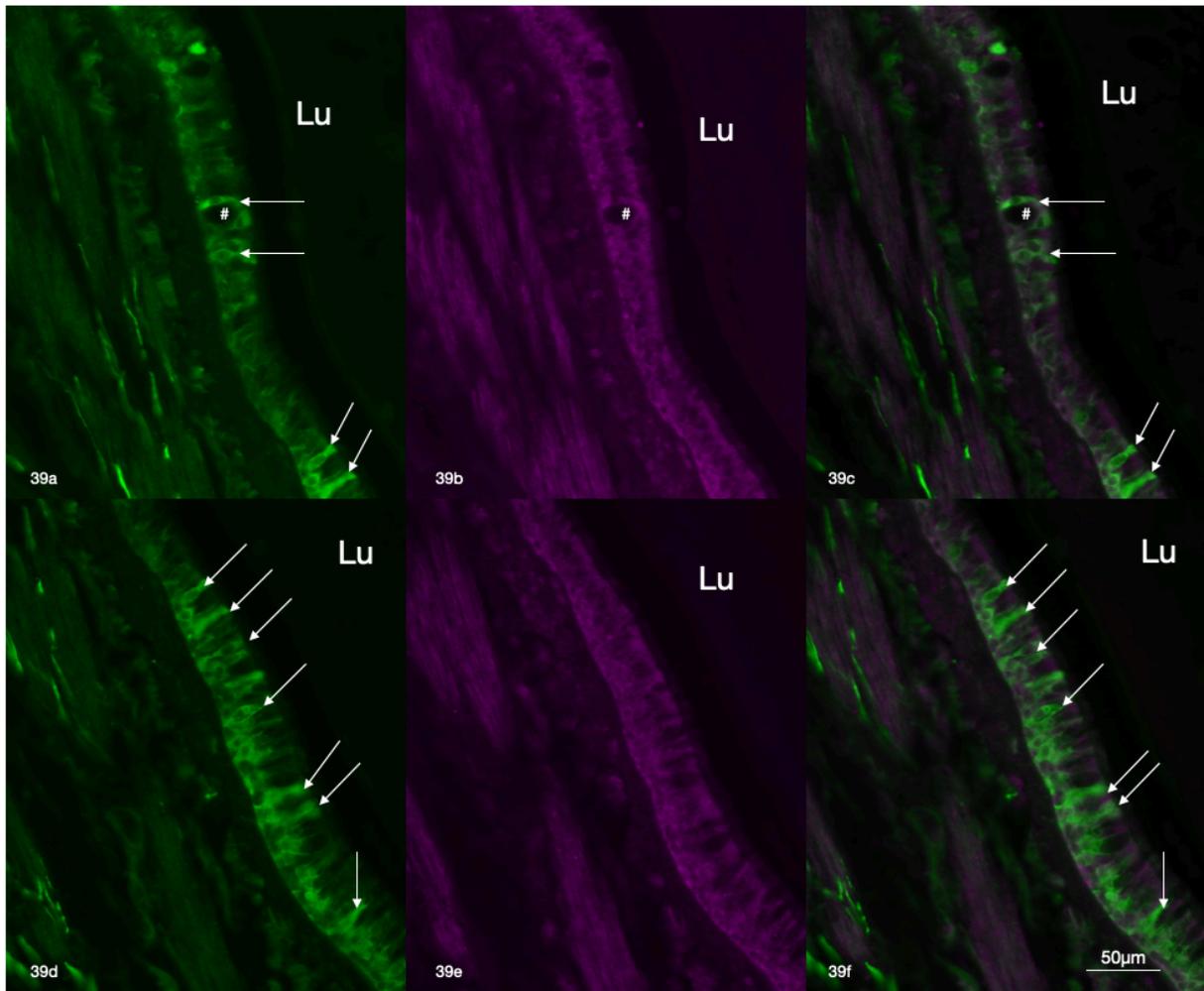


Abbildung 39: Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1)/Calcitonin-gene-related-peptide (cGRP) Doppelfärbung im Lappenbronchus

Lu: Lumen; **(a+d)** DCAMKL1 (grün); **(b+e)** cGRP (lila); **(c+f)** Mischbild; **obere Reihe:** DCAMKL1-positive Zellen (Pfeile in a+c) eine Becherzelle (#) umgeben von DCAMKL1-Signal und fehlendes cGRP-Signal; **untere Reihe:** DCAMKL1-positive Zelle (Pfeile in a+c) und fehlendes cGRP-Signal.

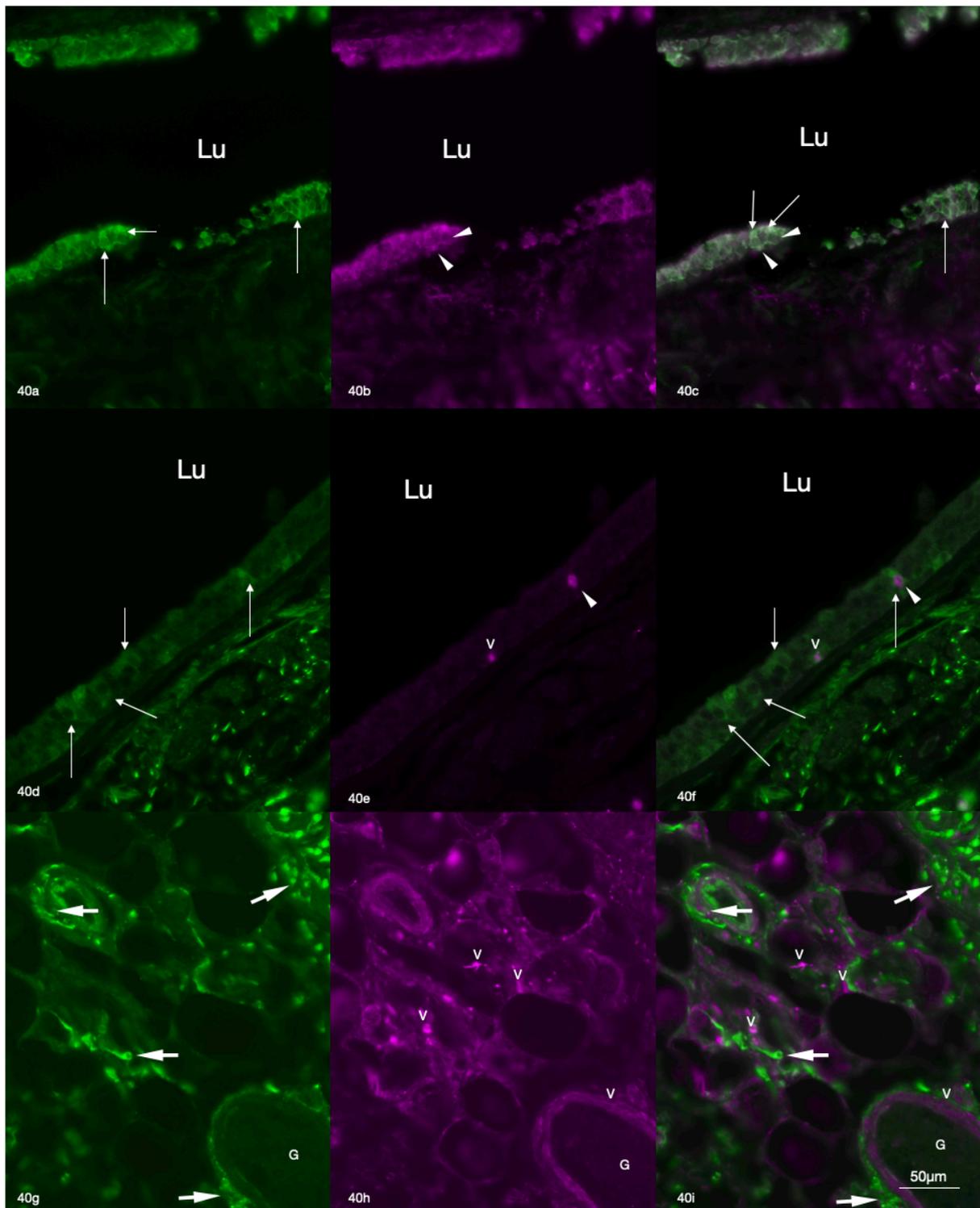


Abbildung 40: *Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1)/*Calcitonin-gene-related-peptide* (cGRP) Doppelfärbung im Subsegmentbronchus

Lu: Lumen; **(a+d+g)** DCAMKL1 (grün); **(b+e+h)** cGRP (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** DCAMKL1-positive (Pfeile in a+c) und cGRP-positive Zellen (Pfeilspitze in b+c) mit zwei Überlappungen; **mittlere Reihe:** DCAMKL1-positive (Pfeile in d+f) und cGRP-positive Zelle (Pfeilspitze in e+f) mit einer Überlappung und cGRP-positiver Nervenfasern (V in e+f); **untere Reihe:** DCAMKL1-Anfärbung um subepitheliales Drüsengewebe (Blockpfeil in g+i) und um ein Gefäß (G), cGRP-positiv innerviert (V in h+i) um die Drüsen und Anfärbung des Gefäßendothels (G).

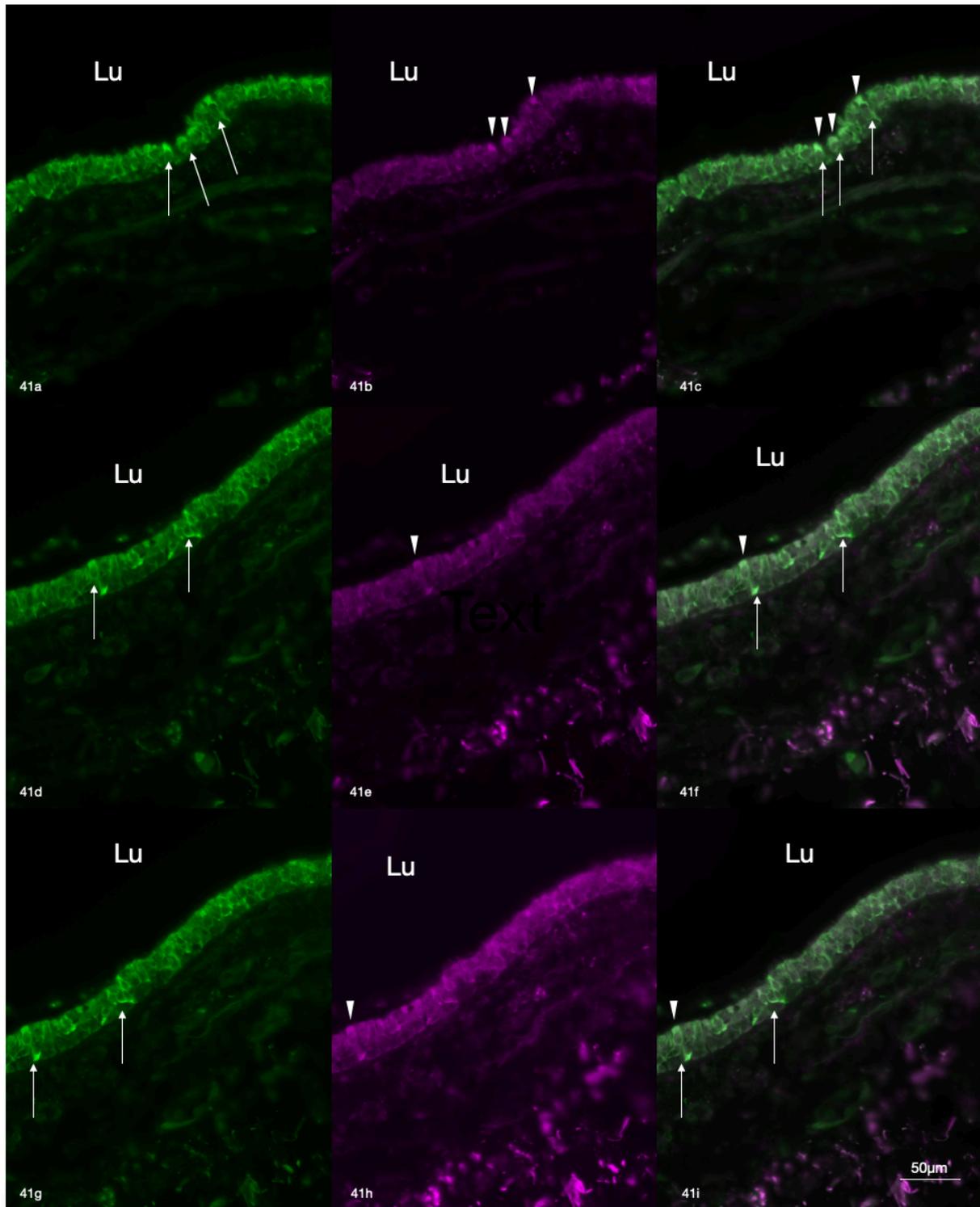


Abbildung 41: *Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1)/*Calcitonin-gene-related-peptide* (cGRP) Doppelfärbung auf Subsegmentbronchus

Lu: Lumen; **(a+d+g)** DCAMKL1 (grün); **(b+e+h)** cGRP (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** sich überlappende DCAMKL1-positive (Pfeile in a+c) und cGRP-positive Zellen (Pfeilspitzen in b+c); **mittlere Reihe:** DCAMKL1-positive Zellen (Pfeile in d+f) und cGRP-positive Zelle (Pfeilspitze in e+f) mit einer Überlappung; **untere Reihe:** DCAMKL1-positive Zellen (Pfeile in g+i) und cGRP-positive Zelle (Pfeilspitze in h+i) mit einer Überlappung.

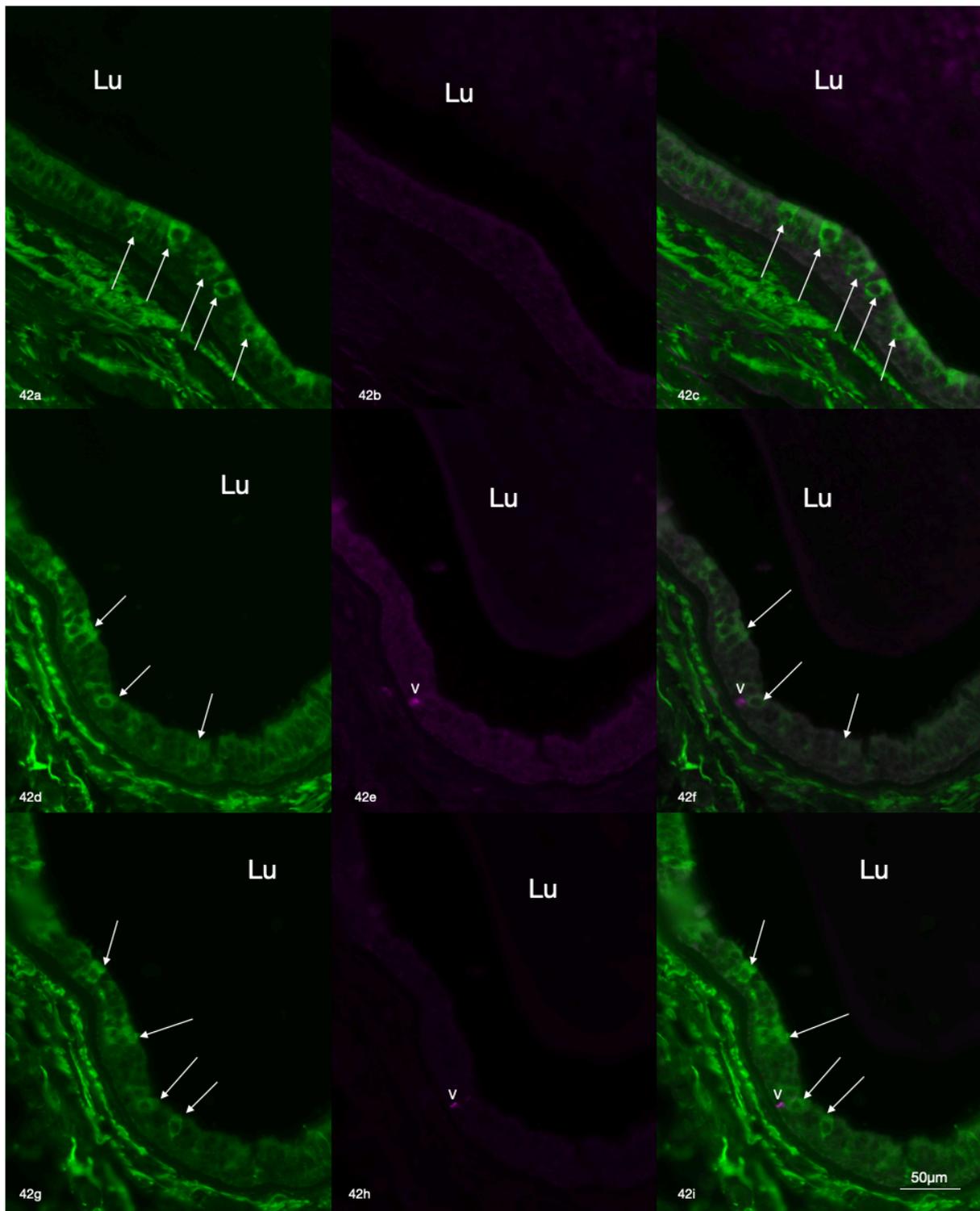


Abbildung 42: *Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1)/*Calcitonin-gene-related-peptide* (cGRP) Doppelfärbung im Subsegmentbronchus

Lu: Lumen; **(a+d+g)** DCAMKL1 (grün); **(b+e+h)** cGRP (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** DCAMKL1-positive Zelle (Pfeile in a+c) und fehlendes cGRP-Signal; **mittlere Reihe:** DCAMKL1-positive Zelle (Pfeile in d+f) und cGRP-positive Innervation (V in e+f) in der Nähe einer DCAMKL1-positiven Zelle; **untere Reihe:** DCAMKL1-positive Zelle (Pfeile in g+i) und cGRP-positive Innervation (V in h+i) in der Nähe einer DCAMKL1-positiven Zelle.

4.7.3 Cholinacetyltransferase (ChAT)/Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1)

Zum Nachweis funktioneller ACh-ausschüttender Strukturen wurden die mit dem BC-spezifischen DCAMKL1-Antikörper gefärbten Schnitte mit dem ChAT-Antikörper nachgefärbt.

In der Trachea und den Hauptbronchien wurden lediglich die bereits beschriebenen länglichen rechteckigen, rein ChAT-positiven Zellen nachgewiesen (siehe Abb. 43–44). DCAMKL1-positive Zellen fehlten auf diesen Ebenen. Ab der Höhe des Lappenbronchus bis zu den Subsegmentbronchien zeigten sich überlappende Zellmarkierungen (siehe Abb. 46) sowie ausschließlich DCAMKL1-positive Zellen (siehe Abb. 45). Damit kamen in diesen Abschnitten ChAT-positive-, DCAMKL1-positive und doppelt positive Zellen vor.

Das Drüsengewebe der Schnitte zeigte nach Markierung mit dem ChAT-Antikörper das typische diffuse diskontinuierliche Markierungsmuster im Inneren der Querschnitte. Nach Markierung mit dem DCAMKL1-Antikörper wiesen die Querschnitte eine nervenfaserähnliche Umrandung, ähnlich wie in den Schnitten nach PGP9.5-Markierung auf (siehe Abb. 48).

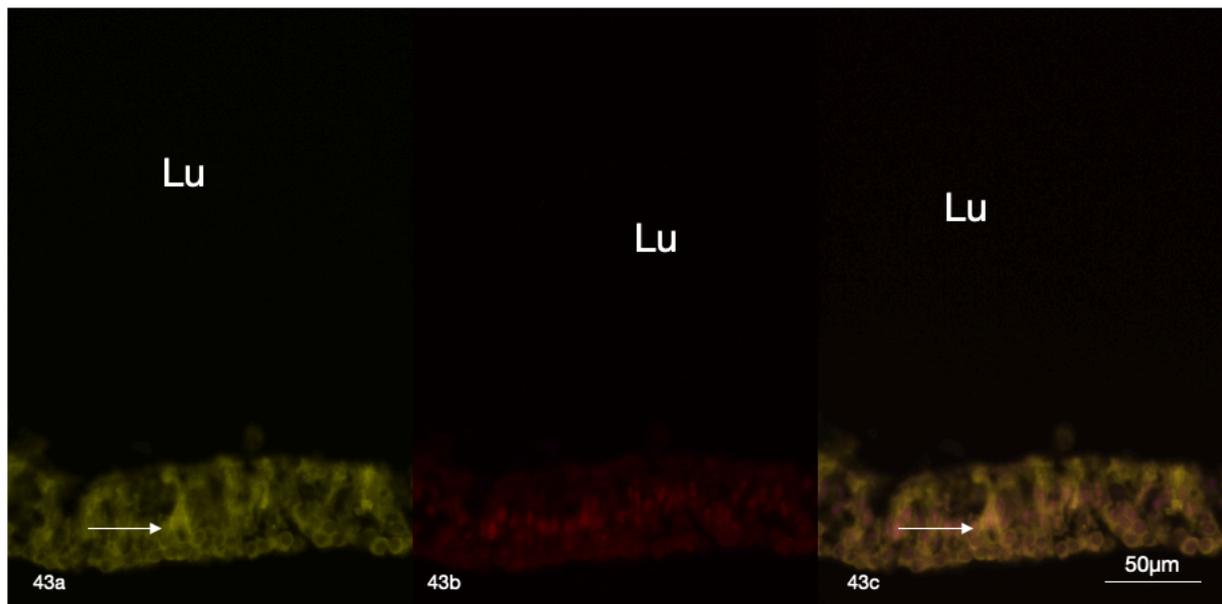


Abbildung 43: Cholinacetyltransferase (ChAT)/*Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) Doppelfärbung im Tracheagewebe
Lu: Lumen; **(a)** ChAT (gelb); **(b)** DCAMKL1 (rot); **(c)** Mischbild; ChAT-positive Zelle (Pfeil in a+c) und fehlendes DCAMKL1-Signal.

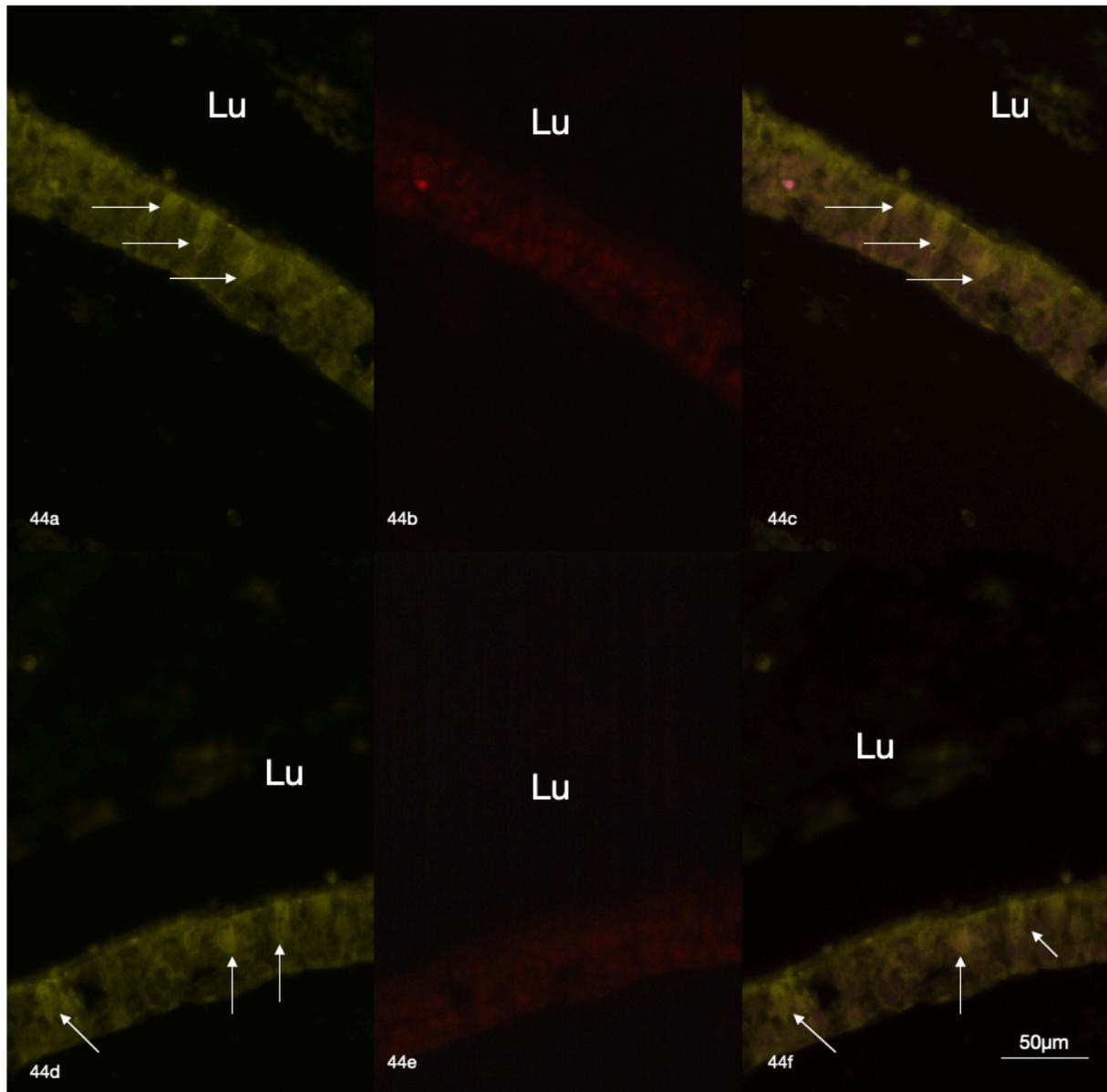


Abbildung 44: Cholinacetyltransferase (ChAT)/*Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) Doppelfärbung im Hauptbronchus

Lu: Lumen; **(a+d)** ChAT (gelb); **(b+e)** DCAMKL1 (lila); **(c+f)** Mischbild; **obere Reihe:** ChAT-positive Zelle (Pfeil in a+c) und fehlendes DCAMKL1-Signal; **untere Reihe:** ChAT-positive Zelle (Pfeil in d+f) und fehlendes DCAMKL1-Signal.

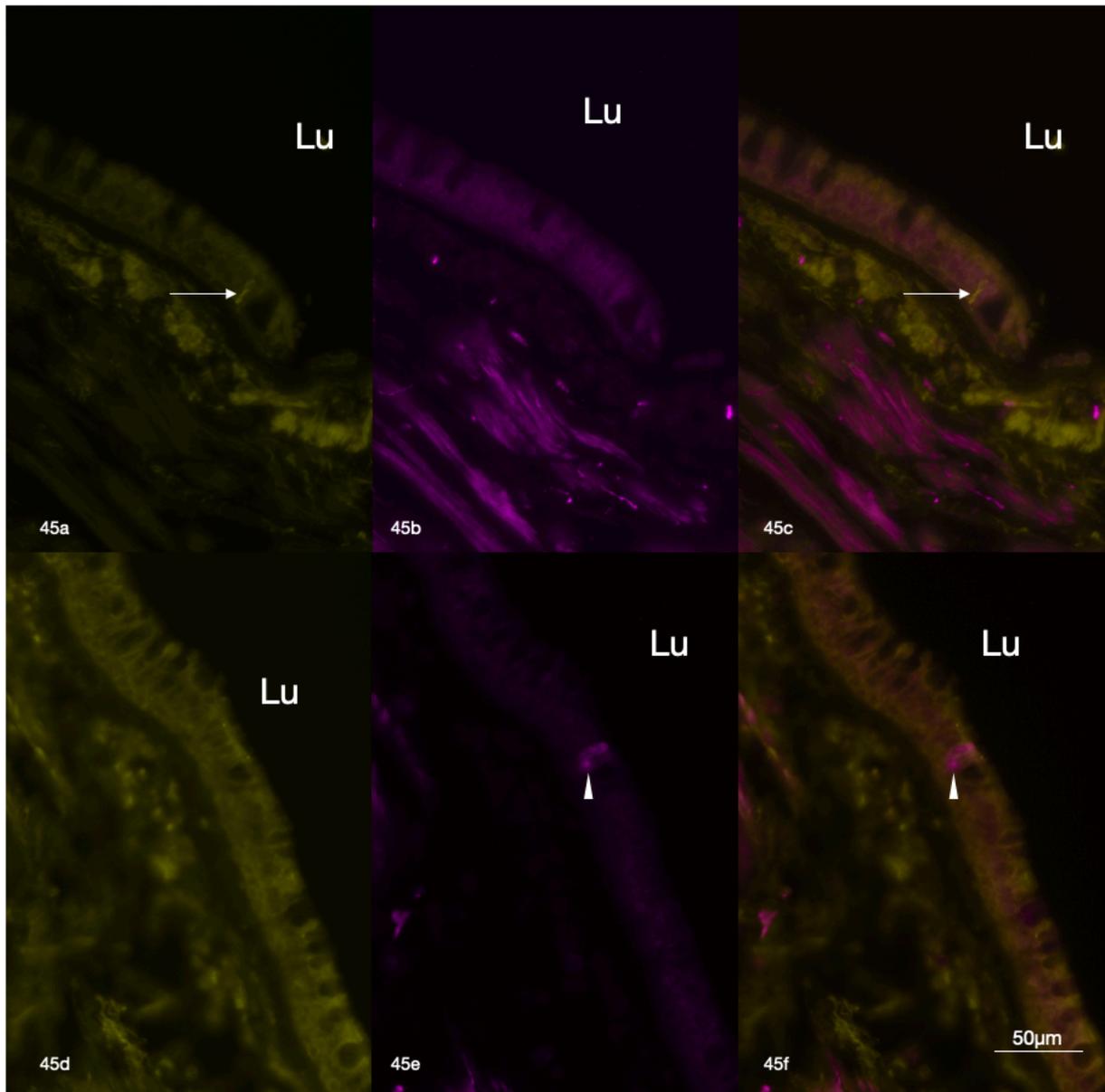


Abbildung 45: Cholinacetyltransferase (ChAT)/*Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) Doppelfärbung im Lappenbronchus
Lu: Lumen; **(a+d)** ChAT (gelb); **(b+e)** DCAMKL1 (lila); **(c+f)** Mischbild; **obere Reihe:** ChAT-positive Zelle (Pfeil in a+c) und fehlendes DCAMKL1-Signal; **untere Reihe:** DCAMKL1-positive Zelle (Pfeilspitze in d+f) und fehlendes ChAT-Signal.

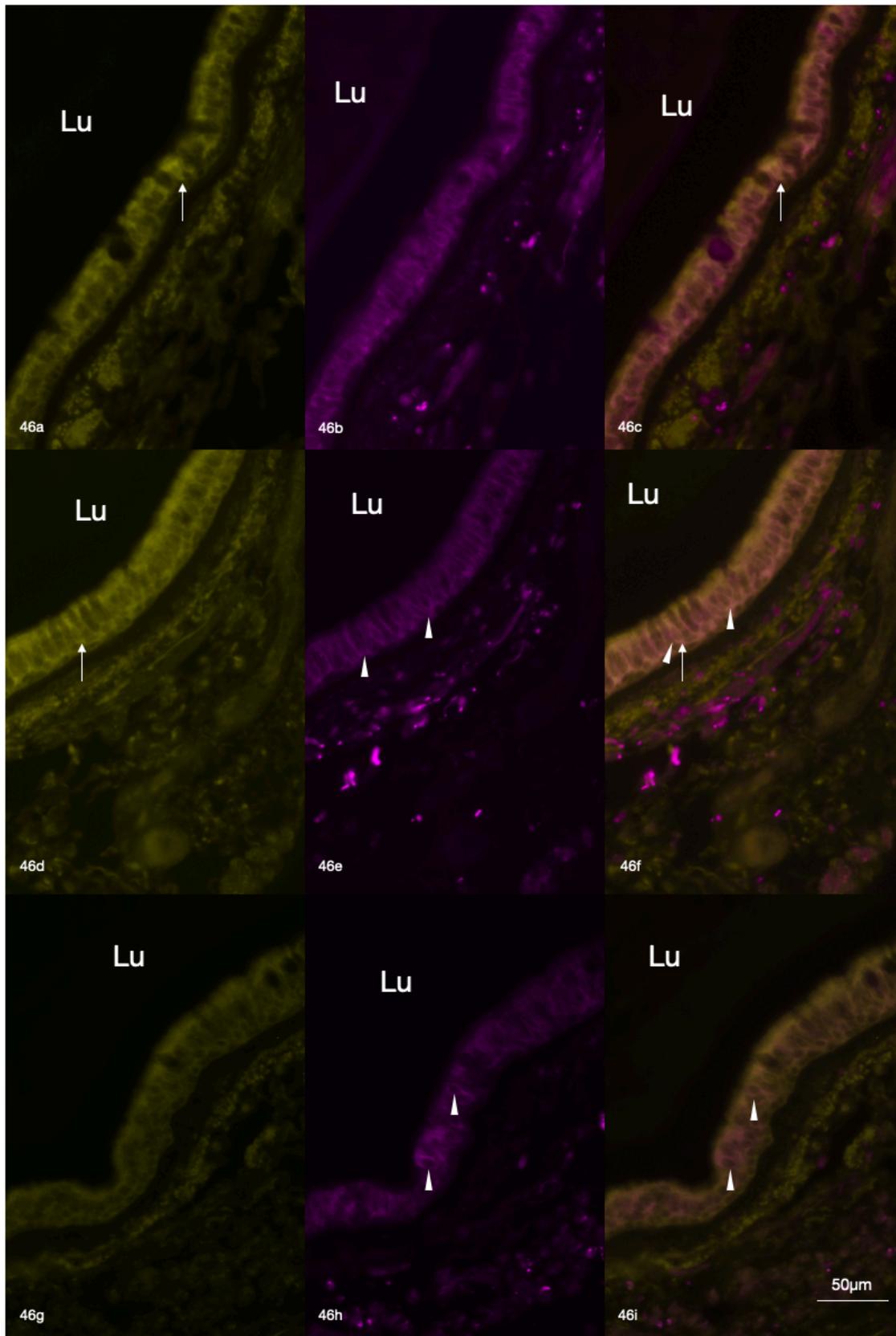


Abbildung 46: Cholinacetyltransferase (ChAT)/*Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) Doppelfärbung im Subsegmentbronchus

Lu: Lumen; **(a+d+g)** ChAT (gelb); **(b+e+h)** DCAMKL1 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** ChAT-positive Zelle (Pfeil in a+c) und fehlendes DCAMKL1-Signal; **mittlere Reihe:** ChAT-positive Zelle (Pfeil in d+f) und DCAMKL1-positive Zellen (Pfeilspitzen in e+f) mit einer Überlappung; **untere Reihe:** DCAMKL1-positive Zellen (Pfeilspitze in h+i) und fehlendes ChAT-Signal.

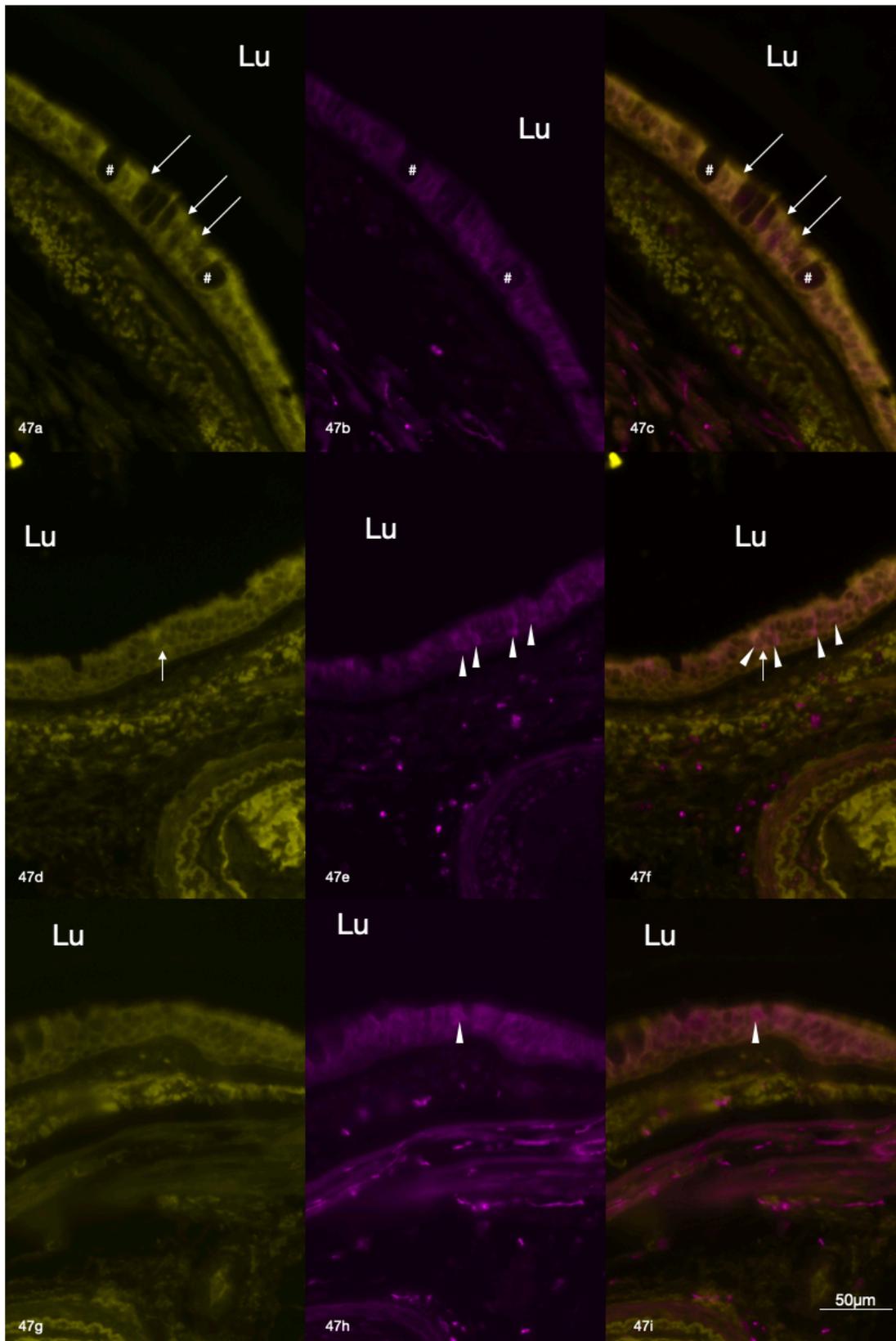


Abbildung 47: Cholinacetyltransferase (ChAT)/*Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) Doppelfärbung im Subsegmentbronchus

Lu: Lumen; **(a+d+g)** ChAT (gelb); **(b+e+h)** DCAMKL1 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** ChAT-positive Zellen (Pfeil in a+c) in der Nähe von zwei Becherzellen (#) und fehlendes DCAMKL1-Signal; **mittlere Reihe:** ChAT-positive Zelle (Pfeil in d+f) und DCAMKL1-positive Zellen (Pfeilspitzen in e+f) mit einer Überlappung; **untere Reihe:** DCAMKL1-positive Zellen (Pfeilspitze in h+i) und fehlendes ChAT-Signal.

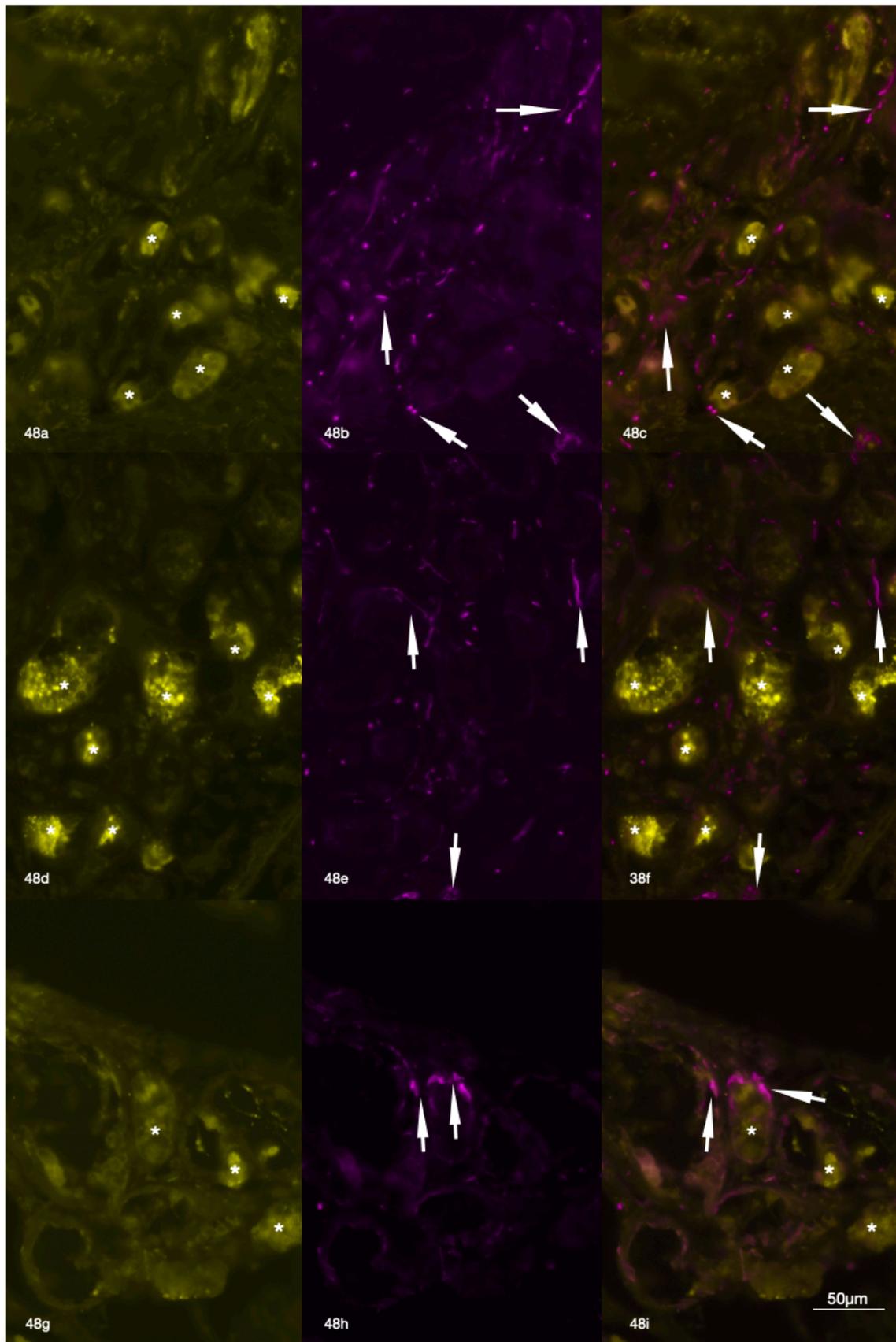


Abbildung 48: Cholinacetyltransferase (ChAT)/*Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) Doppelfärbung in Drüsengewebe

Lu: Lumen; **(a+d+g)** ChAT (gelb); **(b+e+h)** DCAMKL1 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; diffuse ChAT-positive Anfärbung der Drüsenanschnitte (* in a+d+g und c+f+i), DCAMKL1-positive, Drüsen umgebende Anfärbung von Nervenfasern (Blockpfeil in b+c).

4.7.4 Cholinacetyltransferase (ChAT)/protein-gene-product 9.5 (PGP9.5)

Aufgrund des Färbemusters in der ChAT/DCAMKL1-Doppelfärbung, bei der neben doppelmarkierten Zellen auch ChAT-positive Zellen auftraten, die nicht den spezifischen BC-Marker DCAMKL1 exprimierten, sollte mit einer ChAT/PGP9.5-Doppelfärbung untersucht werden, ob es sich bei den ausschließlich ChAT-positiven Zellen um NEC handelt.

Dabei wurden in keinem Abschnitt des tracheobronchialen Baumes ChAT/PGP9.5-doppelmarkierte Zellen detektiert. Erneut traten längliche, rechteckige bis flaschenartige ChAT-positive Zellen über die gesamte Epithelhöhe (Basalmembran–Lumen) auf. Ihr runder bis ovaler Zellkern lag in der Mitte des Zellkörpers. Sie kamen häufig zu zweit oder in Gruppen in einem Abstand von circa 50 µm vor und grenzten teilweise direkt an schleimproduzierende Becherzellen (siehe Abb. 49+ 51).

Die variablen PGP9.5-markierten Zellen zeigten länglich rechteckige, runde oder dreieckige Formen mit unterschiedlichen Zellausläufern. Auch die Größe war nicht konstant und korrelierte nicht mit der Form (siehe Abb. 53). Sie lagen auch auf unterschiedlichen Ebenen innerhalb des Epithels und hatten nur selten direkten Kontakt zum Lumen.

Neben Zellen markierte der PGP9.5-Antikörper auch Nervenfasern, die von der Basalmembran vertikal zwischen den Zellen bis apikal zum Lumen verliefen (siehe Abb. 51+ 52). PGP9.5-positive Fasern reichten an die ChAT-positiven Zellen heran und umgaben diese (siehe Abb. 49+ 51+ 52).

Laut den vorliegenden Befunden handelte es sich bei den ChAT-markierten Zellen somit nicht um NEC. Die Zellen wurden aber von intraepithelialen Nervenfasern erreicht und versorgt. Eine direkte Nähe von PGP9.5-positiven NEC und den ChAT-positiven Zellen bestand nicht. Möglicherweise entsprachen die ChAT-positiven Zellen einem BC-Subtyp, der nicht den Marker DCAMKL1 exprimiert.

Anschnitte subepithelialer Drüsen zeigten nach Markierung mit dem ChAT-Antikörper das typisch diffuse Färbemuster über die Zellen verteilt. Die Drüsen waren wiederum von ausgeprägten PGP-positiven Nervenfasern umgeben (siehe Abb. 55).

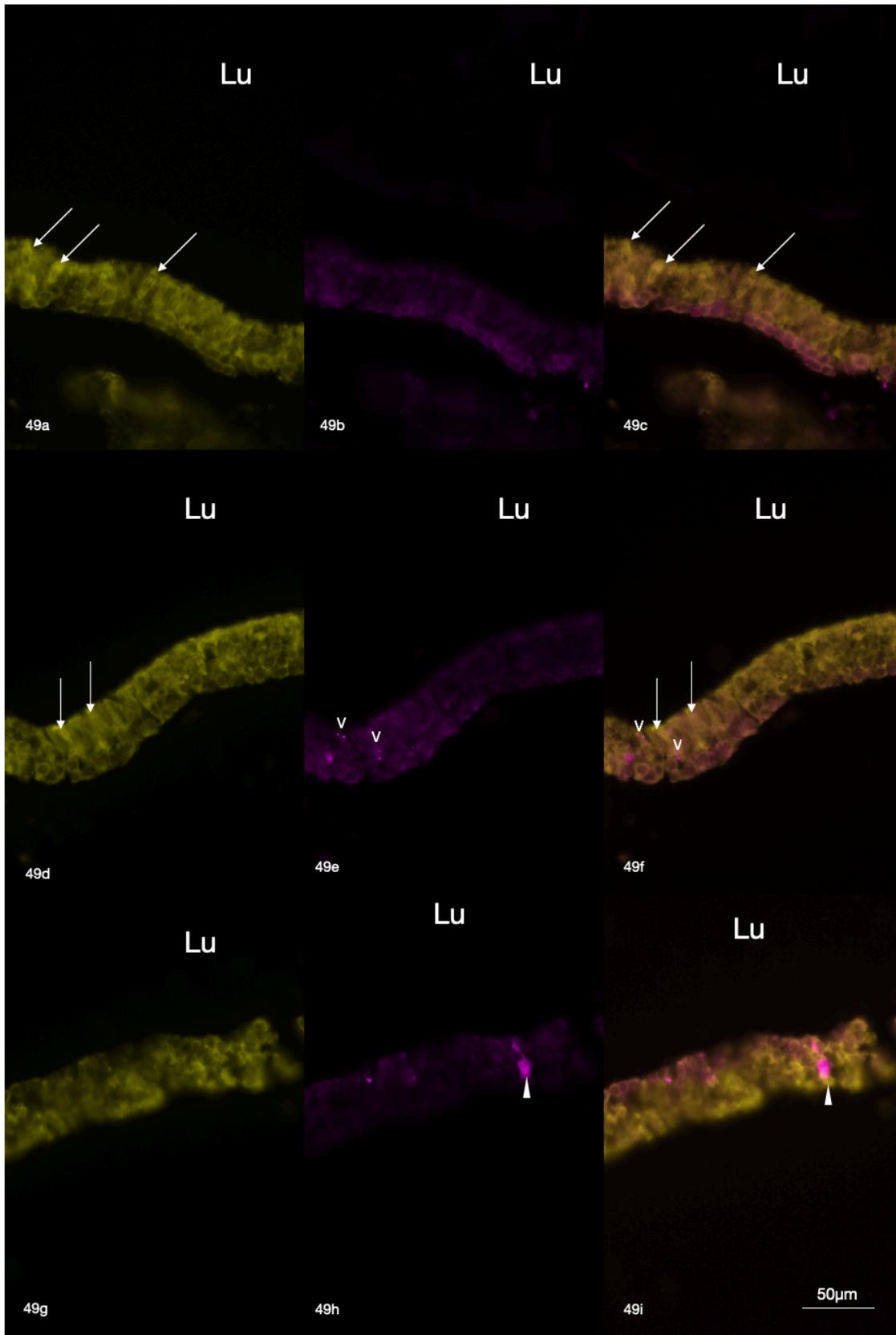


Abbildung 49: Cholinacetyltransferase (ChAT)/*protein-gene-product* 9.5 (PGP9.5) – Doppelfärbung in Tracheagewebe

Lu: Lumen; **(a+d+g)** ChAT (gelb); **(b+e+h)** PGP9.5 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** ChAT-positive Zellen (Pfeil in a+c) und fehlendes PGP9.5-Signal; **mittlere Reihe:** ChAT-positive Zellen (Pfeil in d+f) und umgebende PGP9.5-positive Innervation (V in e+f); **untere Reihe:** PGP9.5-positive Zelle (Pfeilspitze in h+i) und fehlendes ChAT-Signal.

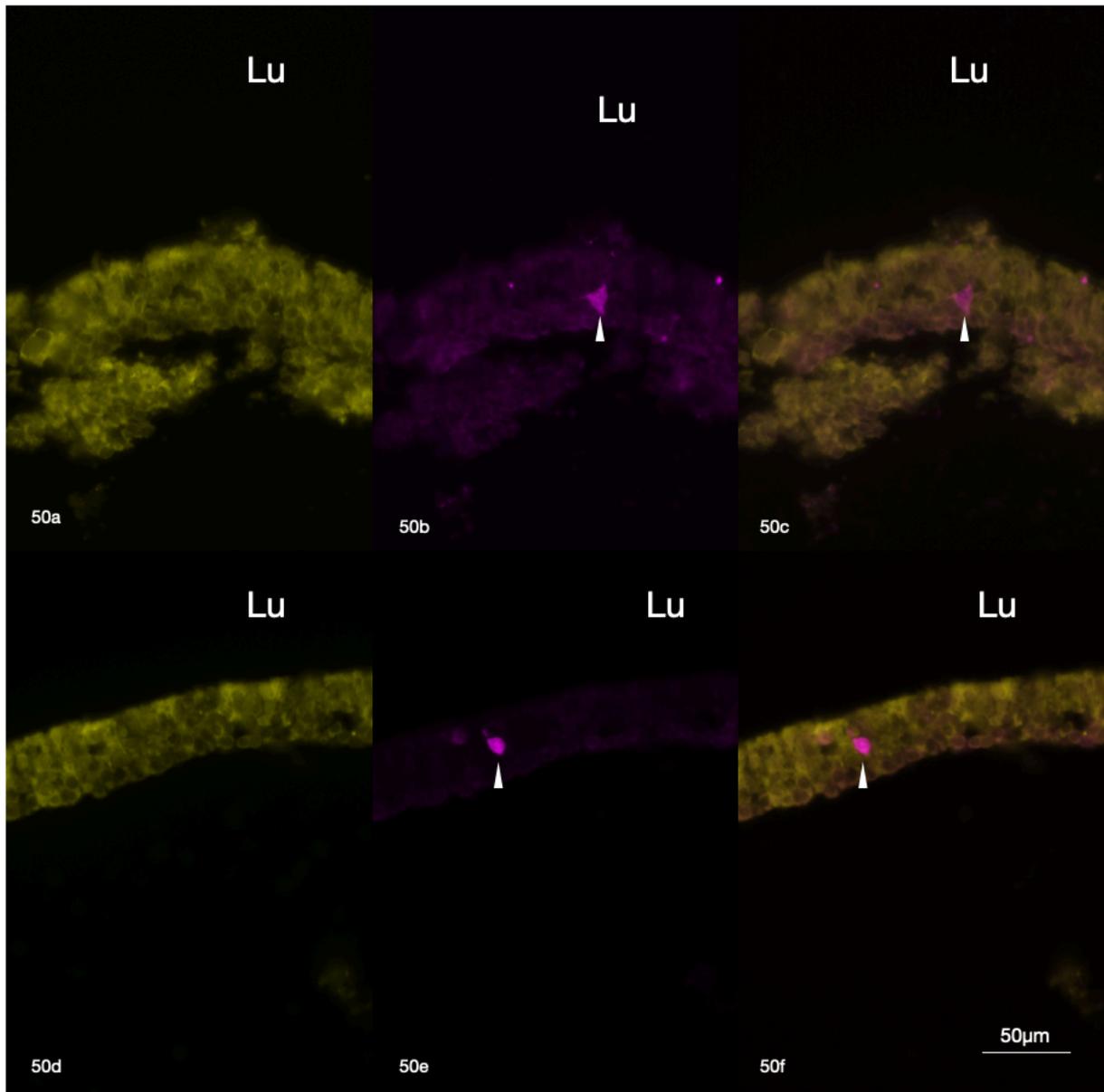


Abbildung 50: Cholinacetyltransferase (ChAT)/*protein-gene-product 9.5* (PGP9.5) – Doppelfärbung in Tracheagewebe

Lu: Lumen; **(a)** ChAT (gelb); **(b)** PGP9.5 (lila); **(c)** Mischbild; PGP9.5-positive Zelle (Pfeilspitze in b+c) und fehlendes ChAT-Signal.

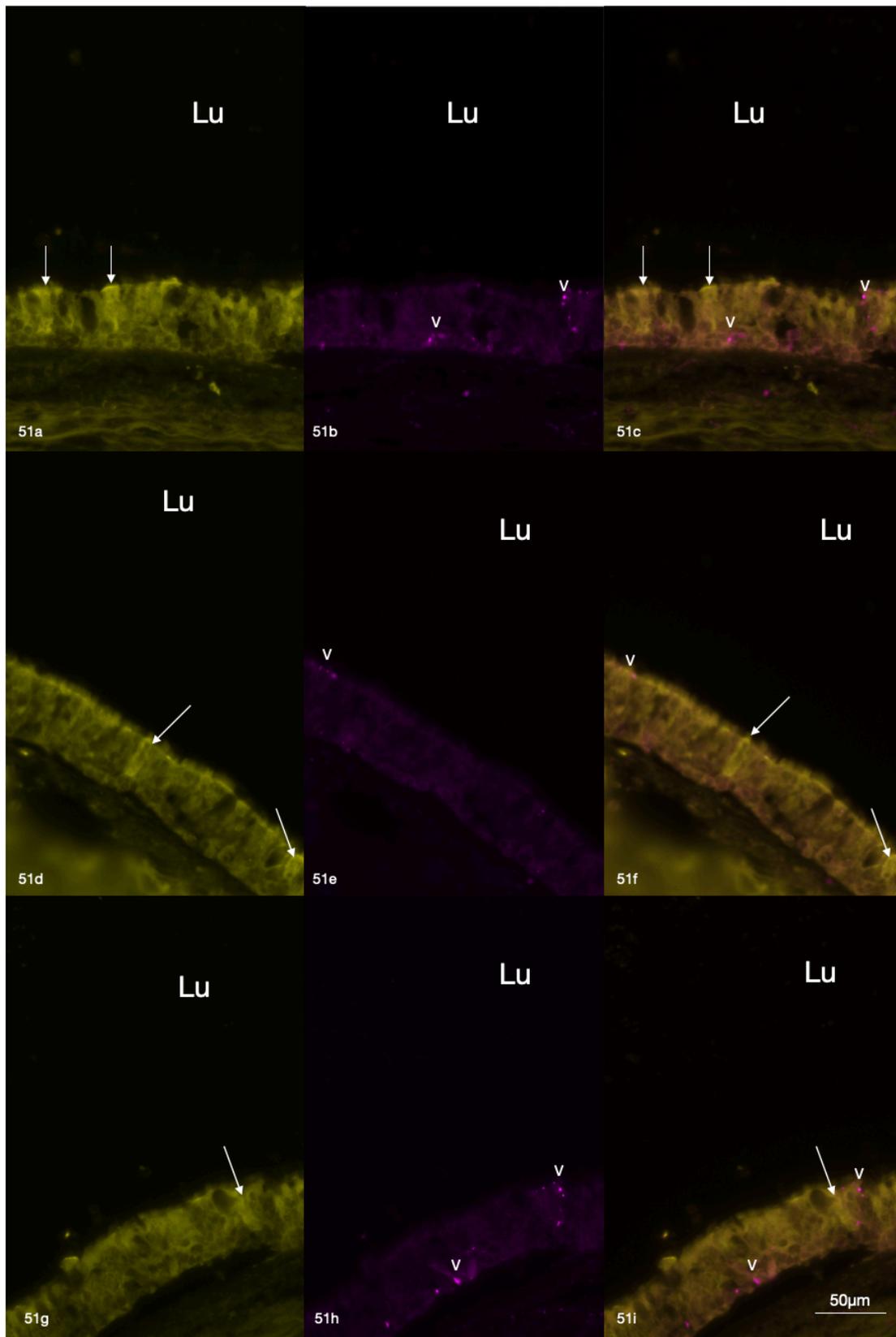


Abbildung 51: Cholinacetyltransferase (ChAT)/*protein-gene-product 9.5* (PGP9.5) – Doppelfärbung im Hauptbronchus

Lu: Lumen; **(a+d+g)** ChAT (gelb); **(b+e+h)** PGP9.5 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** ChAT-positive Zellen (Pfeil in a+c) und PGP9.5-positive Innervation (V in b+c) über die gesamte Epithelhöhe; **mittlere Reihe:** ChAT-positive Zellen (Pfeil in d+f) und PGP9.5-positive Innervation (V in e+f) apikal am Ziliensaum; **untere Reihe:** ChAT-positive Zellen (Pfeil in g+i) und PGP9.5-positive Innervation (V in h+i).

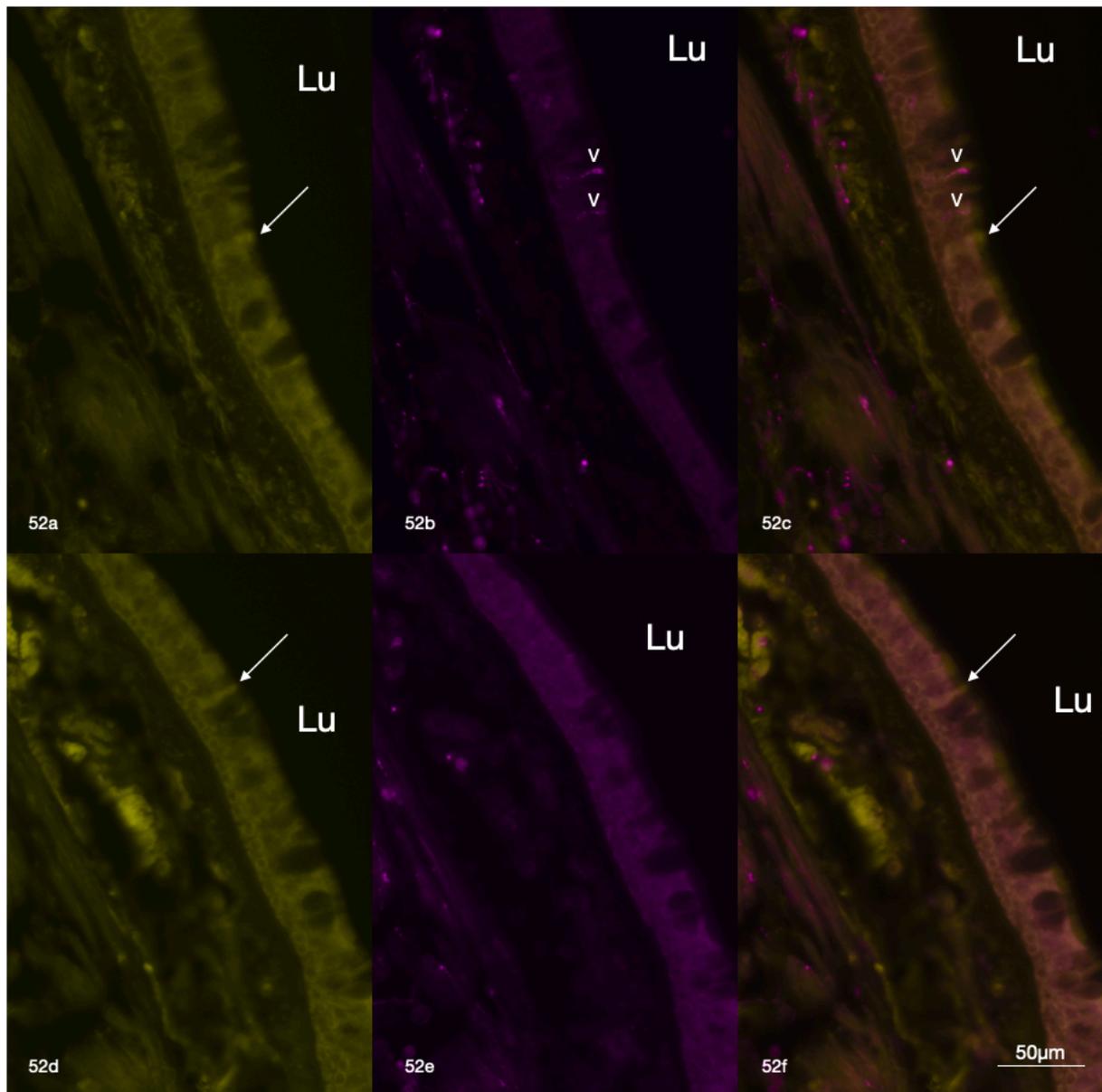


Abbildung 52: Cholinacetyltransferase (ChAT)/*protein-gene-product 9.5* (PGP9.5) – Doppelfärbung im Lappenbronchus

Lu: Lumen; **(a+d)** ChAT (gelb); **(b+e)** PGP9.5 (lila); **(c+f)** Mischbild; **obere Reihe:** ChAT-positive Zellen (Pfeil in a+c) und PGP9.5-positive Innervation (V in b+c); **untere Reihe:** ChAT-positive Zellen (Pfeil in d+f) und fehlendes PGP9.5-Signal.

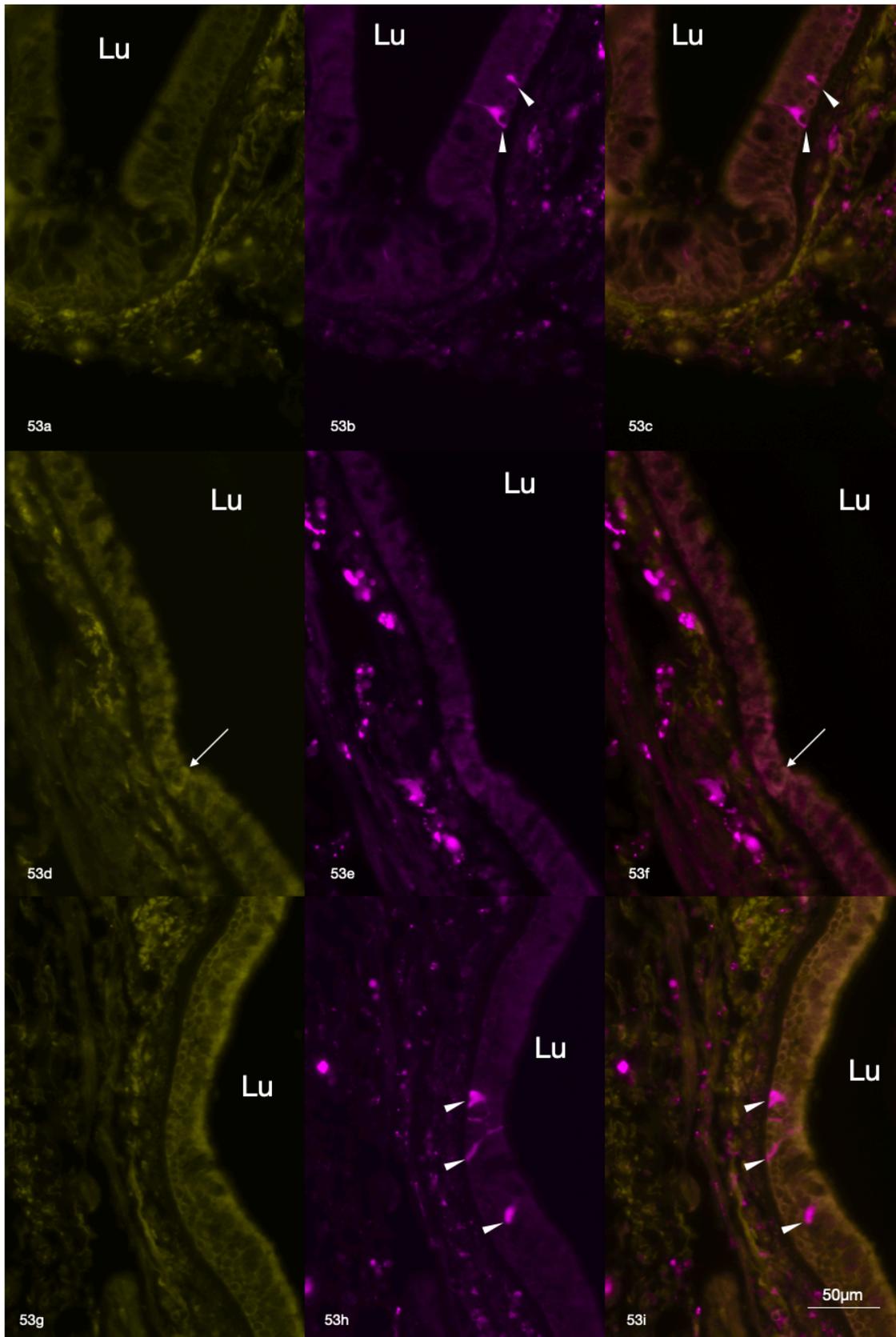


Abbildung 53: Cholinacetyltransferase (ChAT)/*protein-gene-product 9.5* (PGP9.5) – Doppelfärbung im Subsegmentbronchus

Lu: Lumen; **(a+d+g)** ChAT (gelb); **(b+e+h)** PGP9.5 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **untere Reihe:** PGP9.5-positive Zellen (Pfeilspitze in b+c) und fehlendes ChAT-Signal; **mittlere Reihe:** ChAT-positive Zelle (Pfeil in d+f) und fehlendes PGP9.5-Signal; **untere Reihe:** PGP9.5-positive Zellen (Pfeilspitze in h+i) und fehlendes ChAT-Signal.

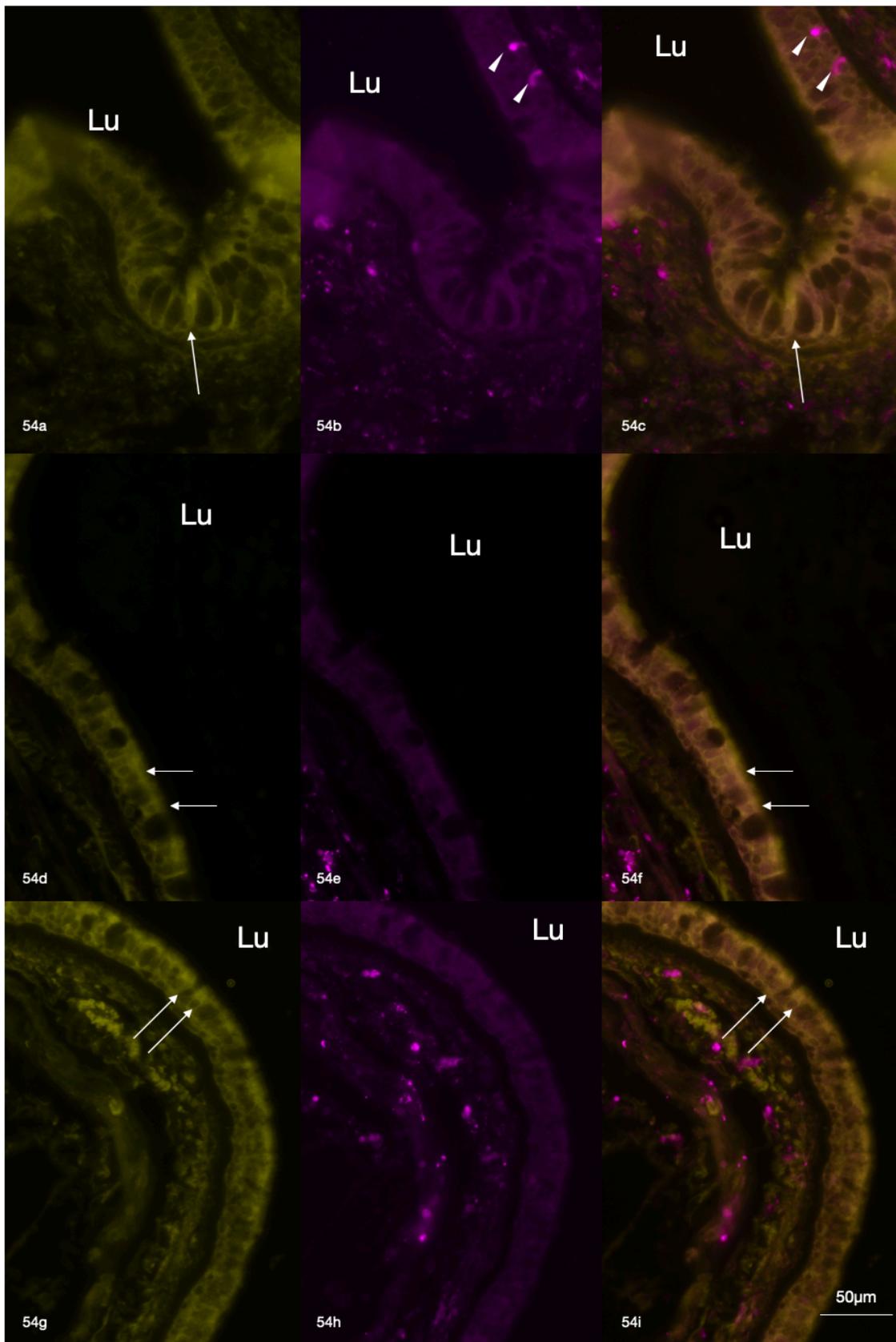


Abbildung 54: Cholinacetyltransferase (ChAT)/*protein-gene-product 9.5* (PGP9.5) – Doppelfärbung im Subsegmentbronchus

Lu: Lumen; **(a+d+g)** ChAT (gelb); **(b+e+h)** PGP9.5 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** ChAT-positive Zellen (Pfeil in a+c) und PGP9.5-positive Zellen (Pfeilspitze in b+c) ohne Überlappungen; **mittlere Reihe:** ChAT-positive Zellen (Pfeil in d+f) und fehlendes PGP9.5-Signal; **untere Reihe:** ChAT-positive Zellen (Pfeil in g+i) und fehlendes PGP9.5-Signal.

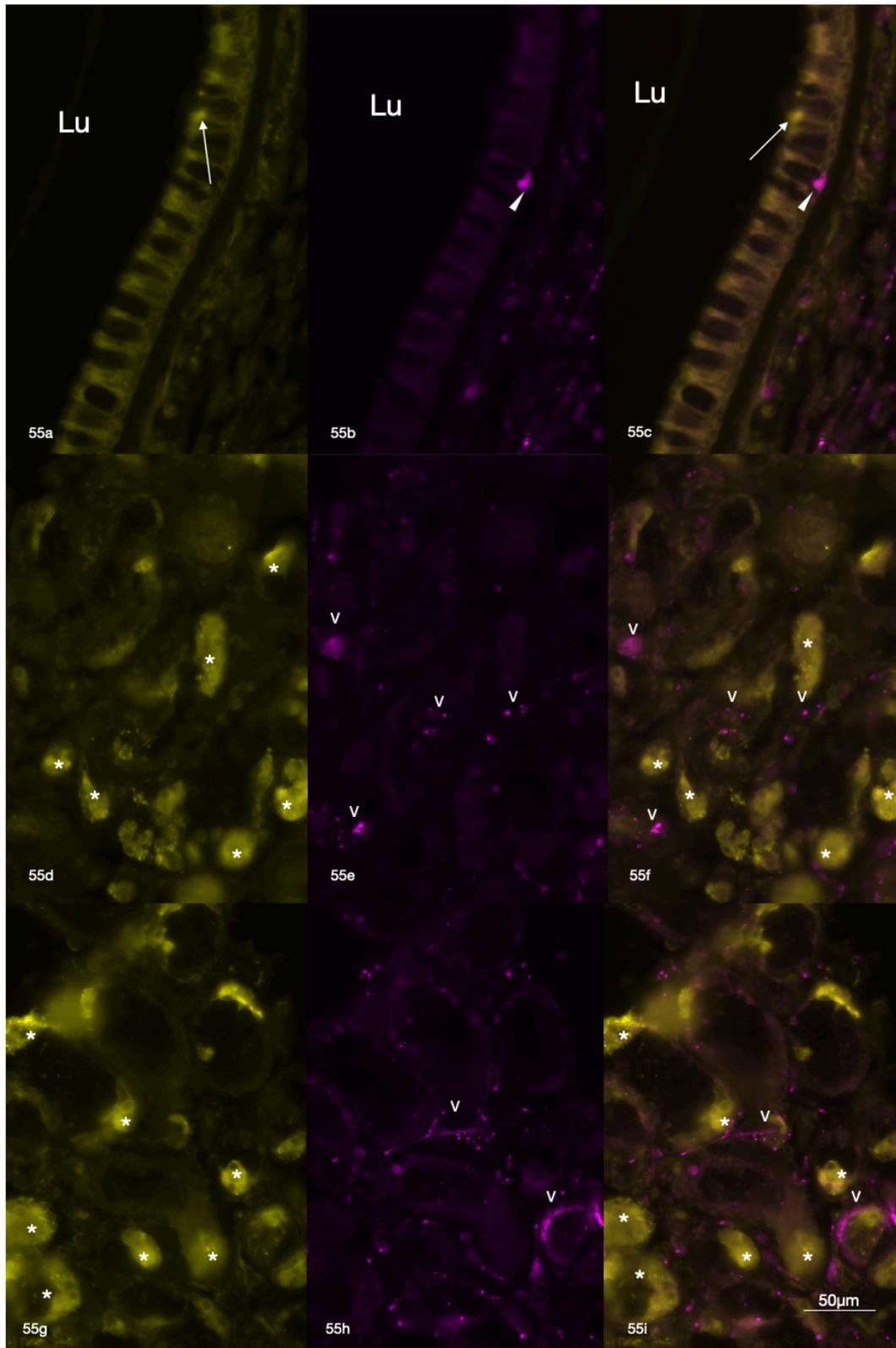


Abbildung 55: Cholinacetyltransferase (ChAT)/*protein-gene-product 9.5* (PGP9.5) – Doppelfärbung im Subsegmentbronchus und im Drüsengewebe

Lu: Lumen; **(a+d+g)** ChAT (gelb); **(b+e+h)** PGP9.5 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** ChAT-positive Zellen (Pfeil in a+c) und PGP9.5-positive Zelle (Pfeilspitze in b+c) in direkter Nähe aber ohne Überlappungen; **mittlere Reihe:** diffuse ChAT-positive Anfärbung der Drüsenanschnitte (* in d+f) und PGP9.5-positive Anfärbung von die Drüsen umgebenden Nervenfasern (V in e+f); **untere Reihe:** diffuse ChAT-positive Anfärbung der Drüsenanschnitte (* in g+i) und PGP9.5-positive Anfärbung von die Drüsen umgebenden Nervenfasern (V in h+i).

4.7.5 POU-class-2-homeobox-3 (POU2F3)/Doublecortin-like-Kinase 1 (DCAMKL1)

Die Ergebnisse der bisherigen Doppelfärbungen deuten auf verschiedene BC-Subtypen beim Menschen hin. Zur Untermauerung dieser Hypothese wurden Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen die BC-spezifischen Marker POU2F3- und DCAMKL1 durchgeführt.

In allen Abschnittsebenen wurden zahlreiche Zellen durch die beiden Antikörper markiert. Doppelt markierte BC traten in allen Abschnittshöhen auf (siehe Abb. 58+ 59+ 60). Öfter wurden jedoch auch rein POU2F3-positive Zelle markiert (siehe Abb. 56+ 57). Im Gewebe des Lappenbronchus waren rein DCAMKL1-positive Zellen (siehe Abb. 62) deutlich seltener als doppelt positive und rein POU2F3-positive Zellen.

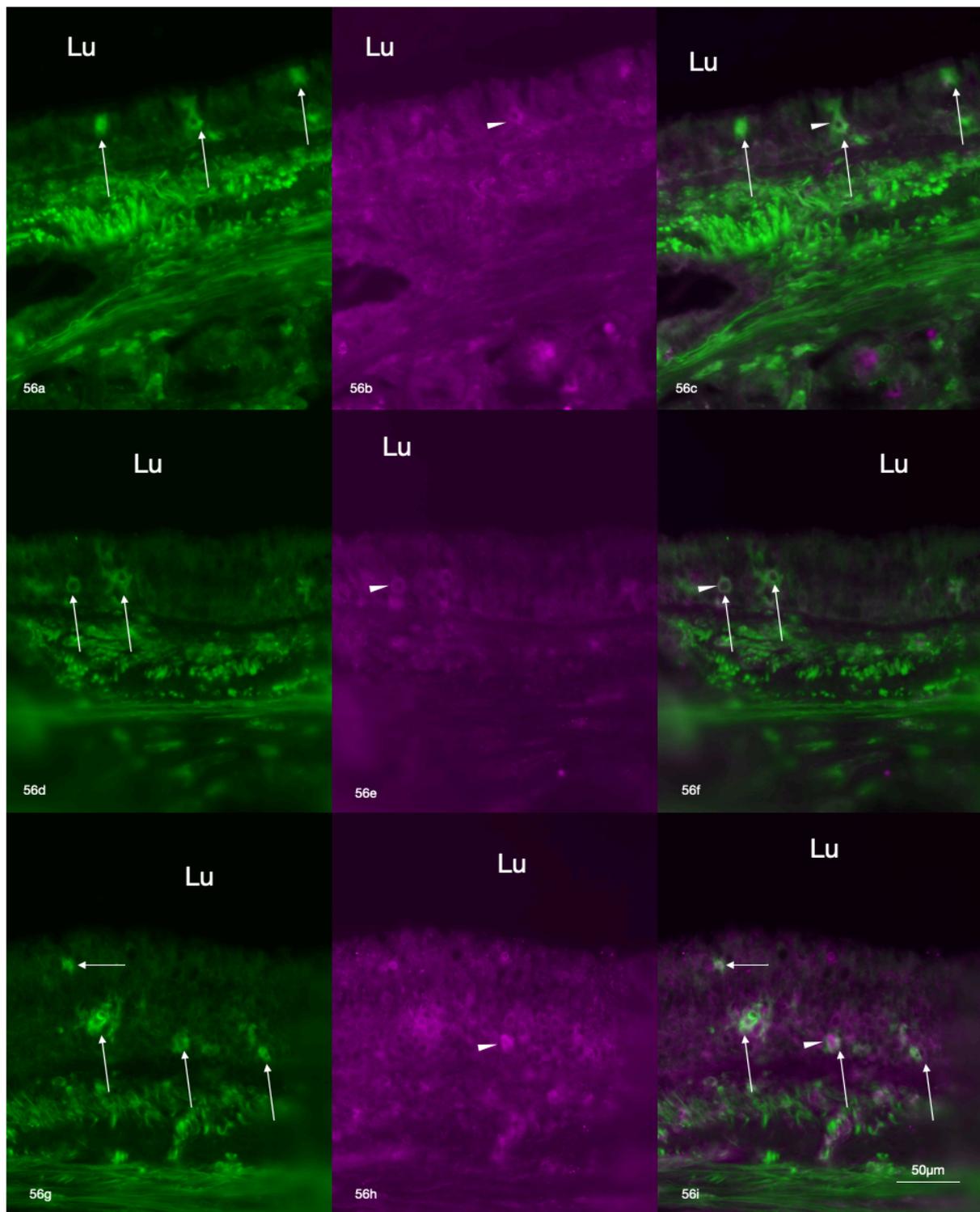


Abbildung 56: *POU-class-2-homeobox-3* (POU2F3)/*Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) Doppelfärbung in Tracheagewebe

Lu: Lumen; **(a+d+g)** POU2F3 (grün); **(b+e+h)** DCAMKL1 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; mehrere POU2F3-positive Zellen (Pfeile in a+d+g und c+f+i) sowie eine DCAMKL1-positive Zelle (Pfeilspitze in Pfeile in b+e+h und c+f+i) mit Überlappung.

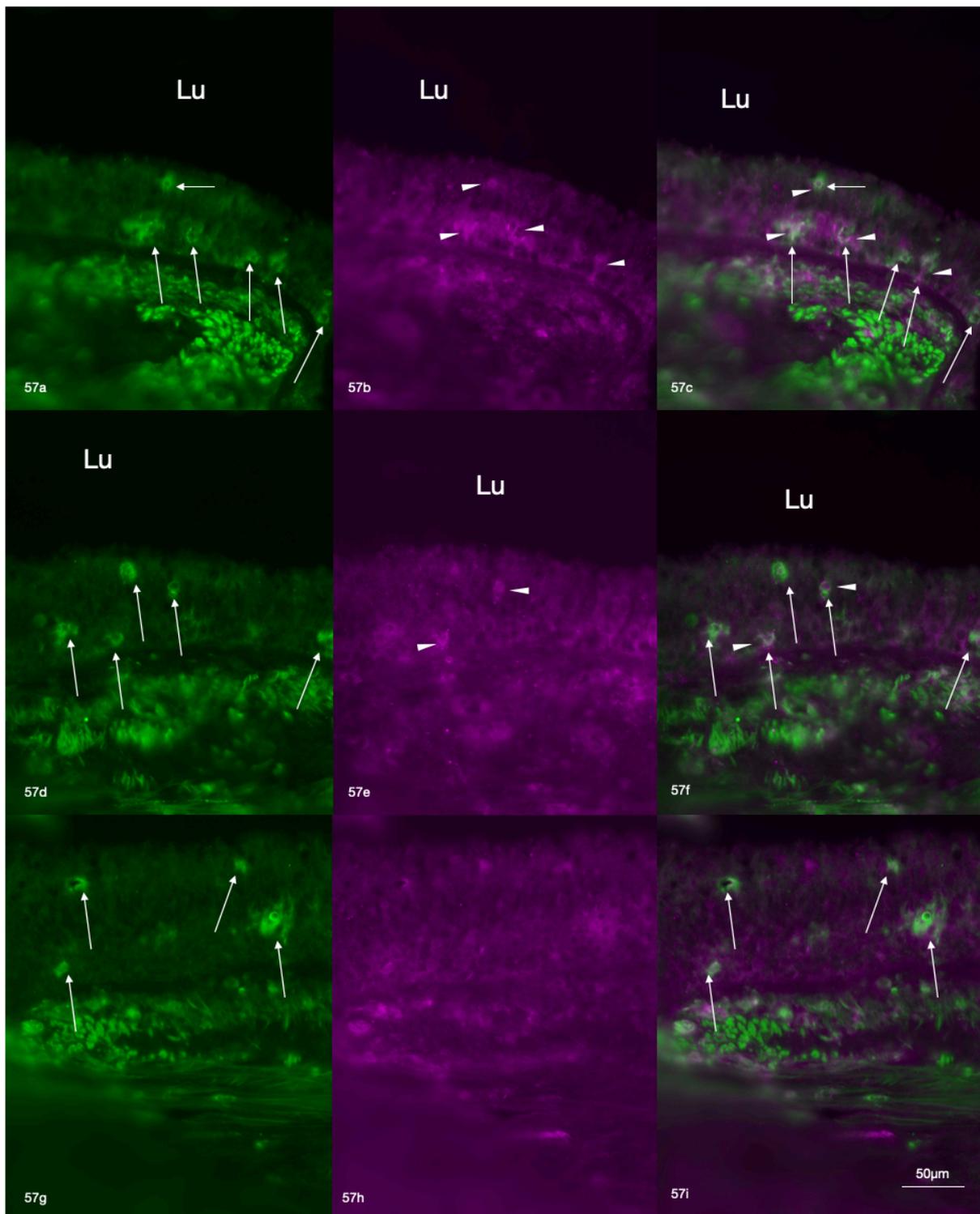


Abbildung 57: *POU-class-2-homeobox-3* (POU2F3)/*Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) Doppelfärbung in Tracheagewebe

Lu: Lumen; **(a+d+g)** POU2F3 (grün); **(b+e+h)** DCAMKL1 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** mehrere POU2F3-positive Zellen (Pfeile in a+c) sowie DCAMKL1-positive Zellen (Pfeilspitze in b+c) mit zahlreichen Überlappungen; **mittlere Reihe:** mehrere POU2F3-positive Zellen (Pfeile in d+f) sowie zwei DCAMKL1-positive Zellen (Pfeilspitze in e+f) mit Überlappung; **untere Reihe:** IHF mehrere POU2F3-positive Zellen (Pfeile in g+i) sowie fehlendes DCAMKL1-Signal.

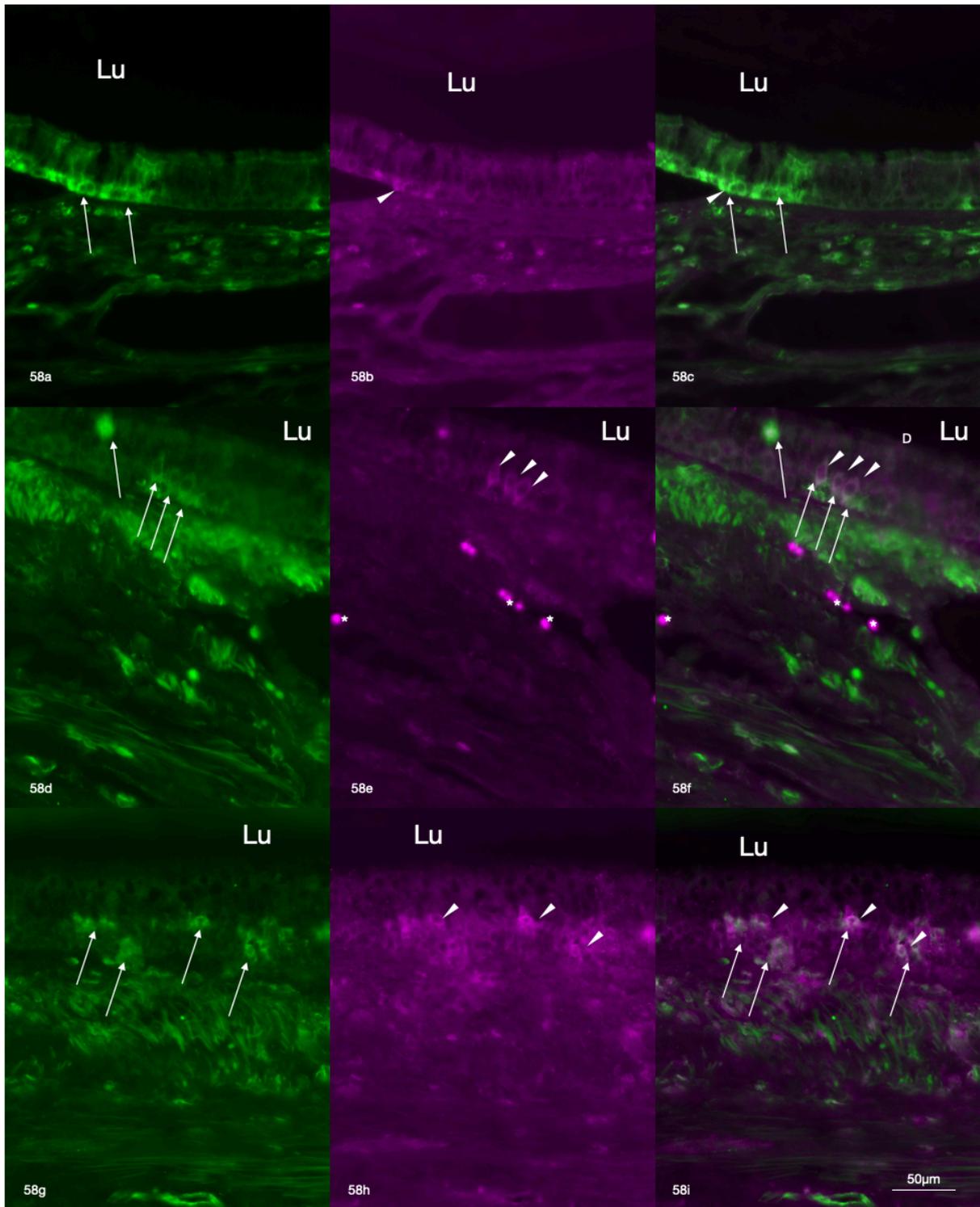


Abbildung 58: *POU-class-2-homeobox-3* (POU2F3)/*Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) Doppelfärbung in Tracheagewebe

Lu: Lumen; **(a+d+g)** POU2F3 (grün); **(b+e+h)** DCAMKL1 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; mehrere POU2F3-positive Zellen (Pfeile in a+d+g und c+f+i) sowie DCAMKL1-positive Zellen (Pfeilspitze in b+e+h und c+f+i) mit Überlappungen.

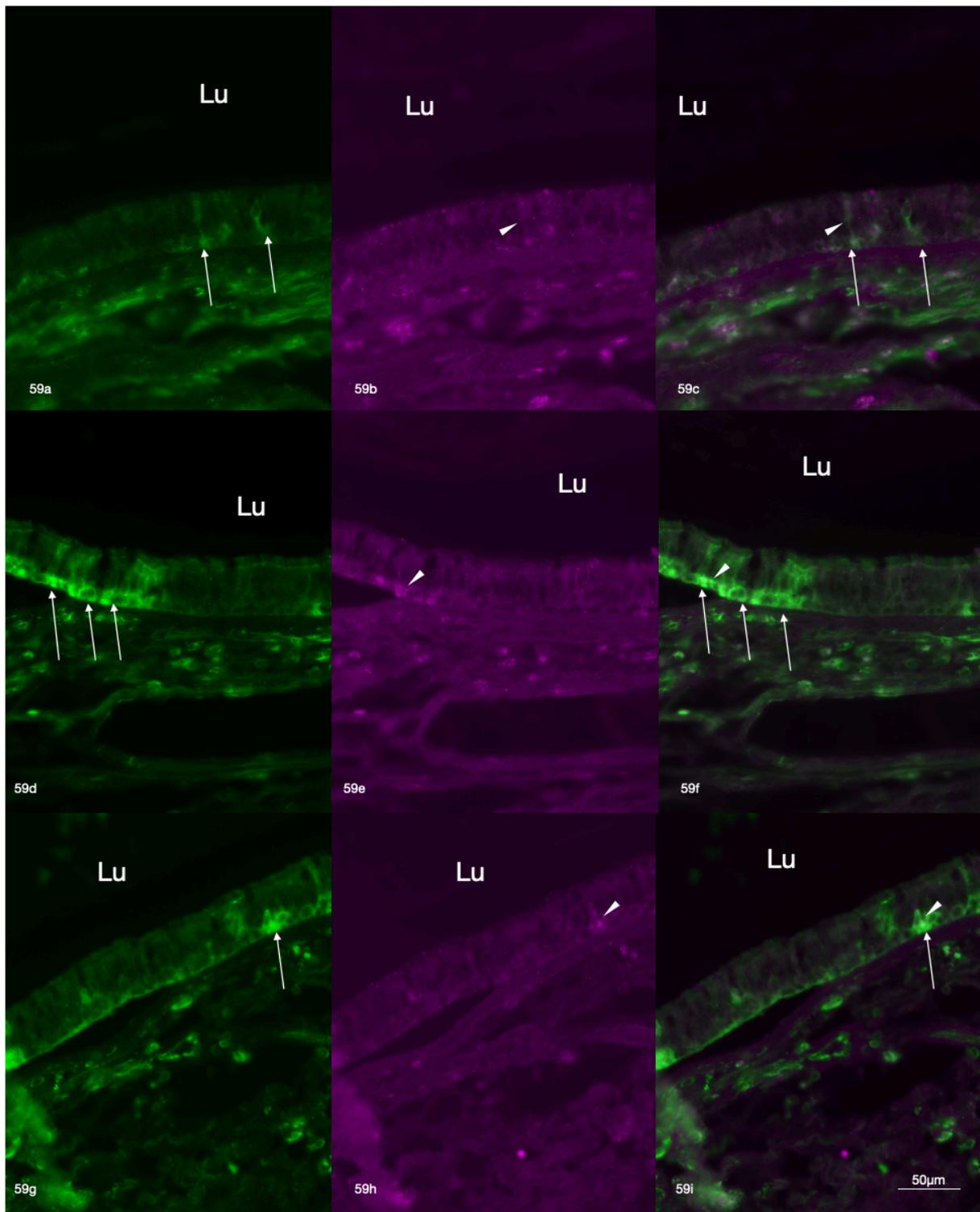


Abbildung 59: *POU-class-2-homeobox-3* (POU2F3)/*Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) Doppelfärbung im Hauptbronchus

Lu: Lumen; **(a+d+g)** POU2F3 (grün); **(b+e+h)** DCAMKL1 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** zwei POU2F3-positive Zellen (Pfeile in a+c) in direkter Nähe und eine DCAMKL1-positive Zelle (Pfeilspitze in b+c) mit Überlappungen; **mittlere Reihe:** mehrere POU2F3-positive Zellen (Pfeile in d+f) in direkter Nähe sowie eine DCAMKL1-positive Zelle (Pfeilspitze in e+f) mit Überlappungen; **untere Reihe:** Überlappung einer POU2F3-positiven (Pfeile in g+i) und DCAMKL1-positiven Zelle (Pfeilspitze in g+i).

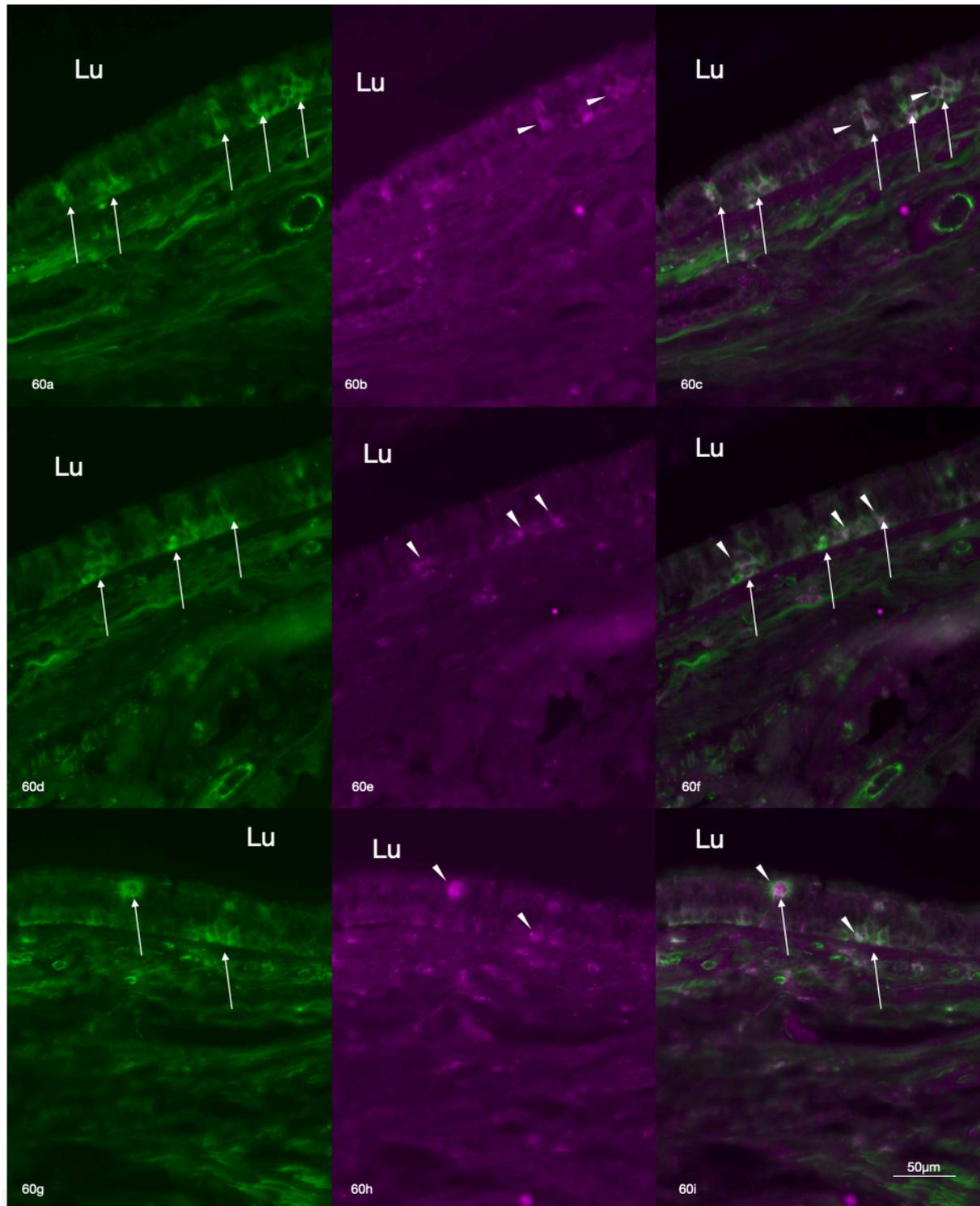


Abbildung 60: POU-class-2-homeobox-3 (POU2F3)/Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1) Doppelfärbung im Hauptbronchus

Lu: Lumen; **(a+d+g)** POU2F3 (grün); **(b+e+h)** DCAMKL1 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; mehrere POU2F3-positive (Pfeile in a+d+g und c+f+i) sowie DCAMKL1-positive Zellen (Pfeilspitze in b+e+h und c+f+i) mit Überlappungen.

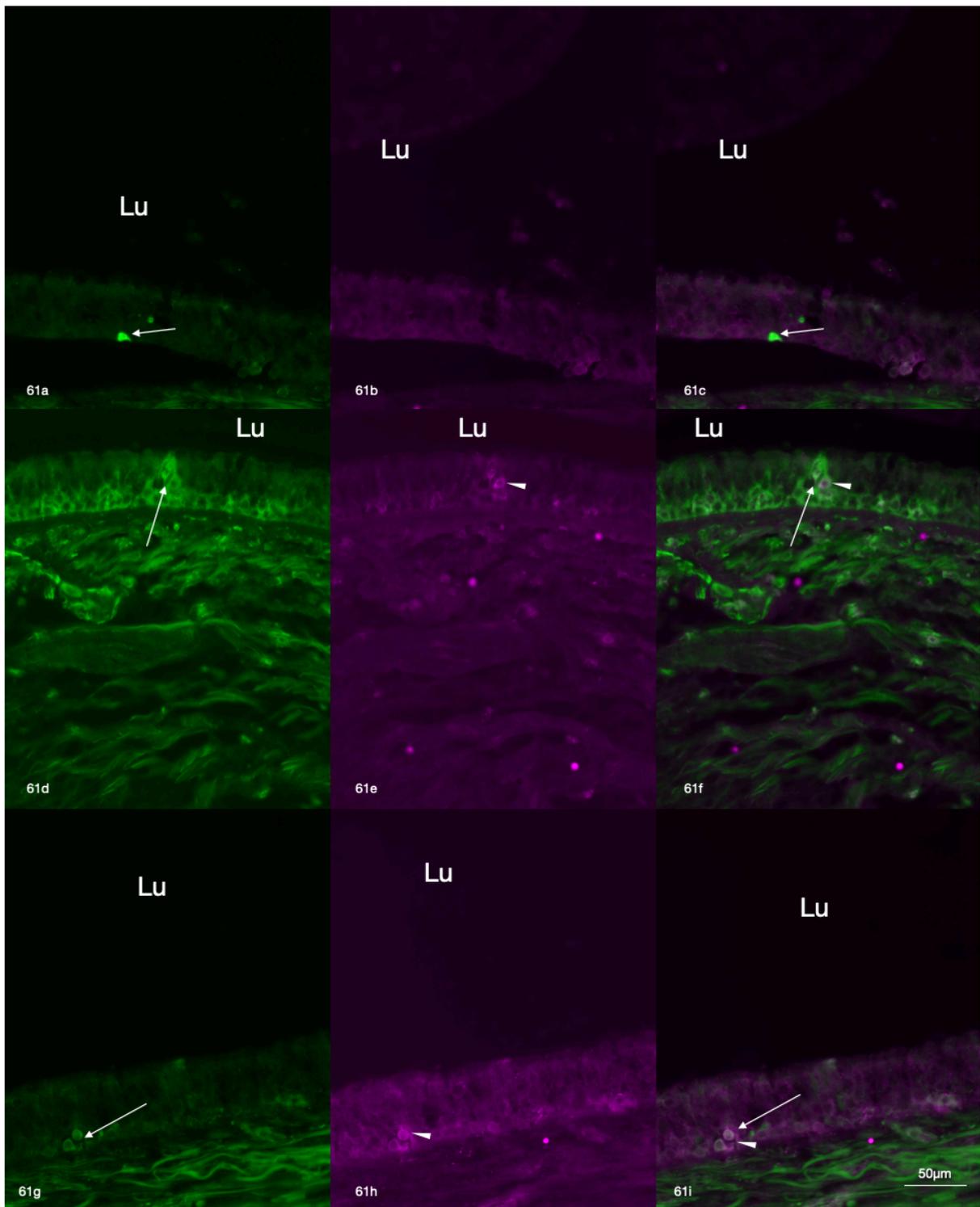


Abbildung 61: POU-class-2-homeobox-3 (POU2F3)/Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1) Doppelfärbung im Hauptbronchus

Lu: Lumen; **(a+d+g)** POU2F3 (grün); **(b+e+h)** DCAMKL1 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** zwei POU2F3-positive Zellen (Pfeile in a+c) in direkter Nähe mit fehlenden DCAMKL1-Signalen; **mittlere Reihe:** Überlappung einer POU2F3-positiven (Pfeil in d+f) und DCAMKL1-positiven (Pfeilspitze in e+f) Zelle; **untere Reihe:** Überlappung einer POU2F3-positiven (Pfeil in g+i) und DCAMKL1-positiven (Pfeilspitze in h+i) Zelle.

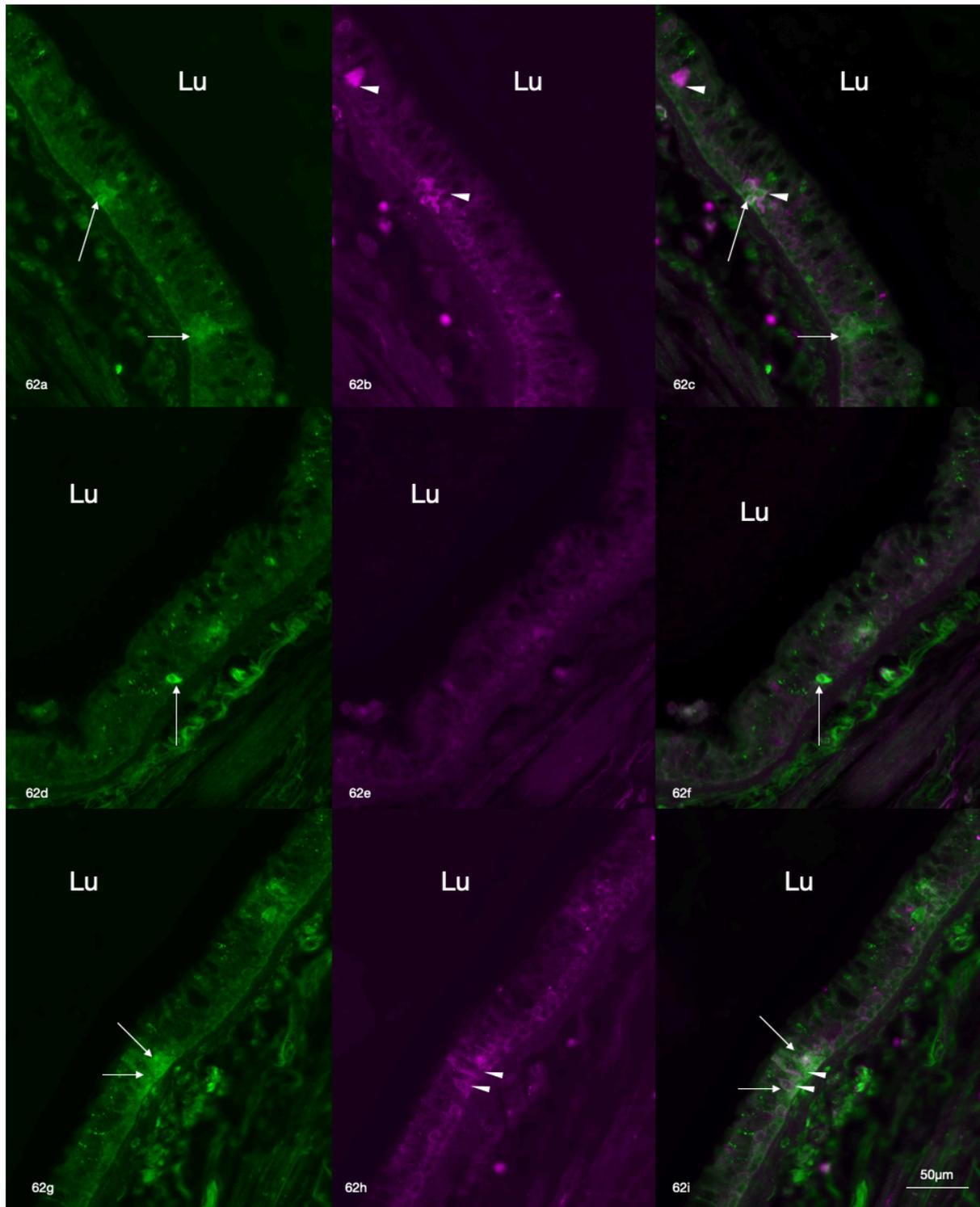


Abbildung 62: *POU-class-2-homeobox-3* (POU2F3)/*Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) Doppelfärbung im Lappenbronchus

Lu: Lumen; **(a+d+g)** POU2F3 (grün); **(b+e+h)** DCAMKL1 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** zwei POU2F3-positive Zellen (Pfeile in a+c) und zwei DCAMKL1-positive Zellen (Pfeilspitze in b+c) mit einer Überlappung; **mittlere Reihe:** eine POU2F3-positive Zellen (Pfeile in d+f) mit fehlendem DCAMKL1-Signal; **untere Reihe:** zwei POU2F3-positive (Pfeile in g+i) sowie zwei DCAMKL1-positive Zellen (Pfeilspitze in h+i) mit Überlappungen.

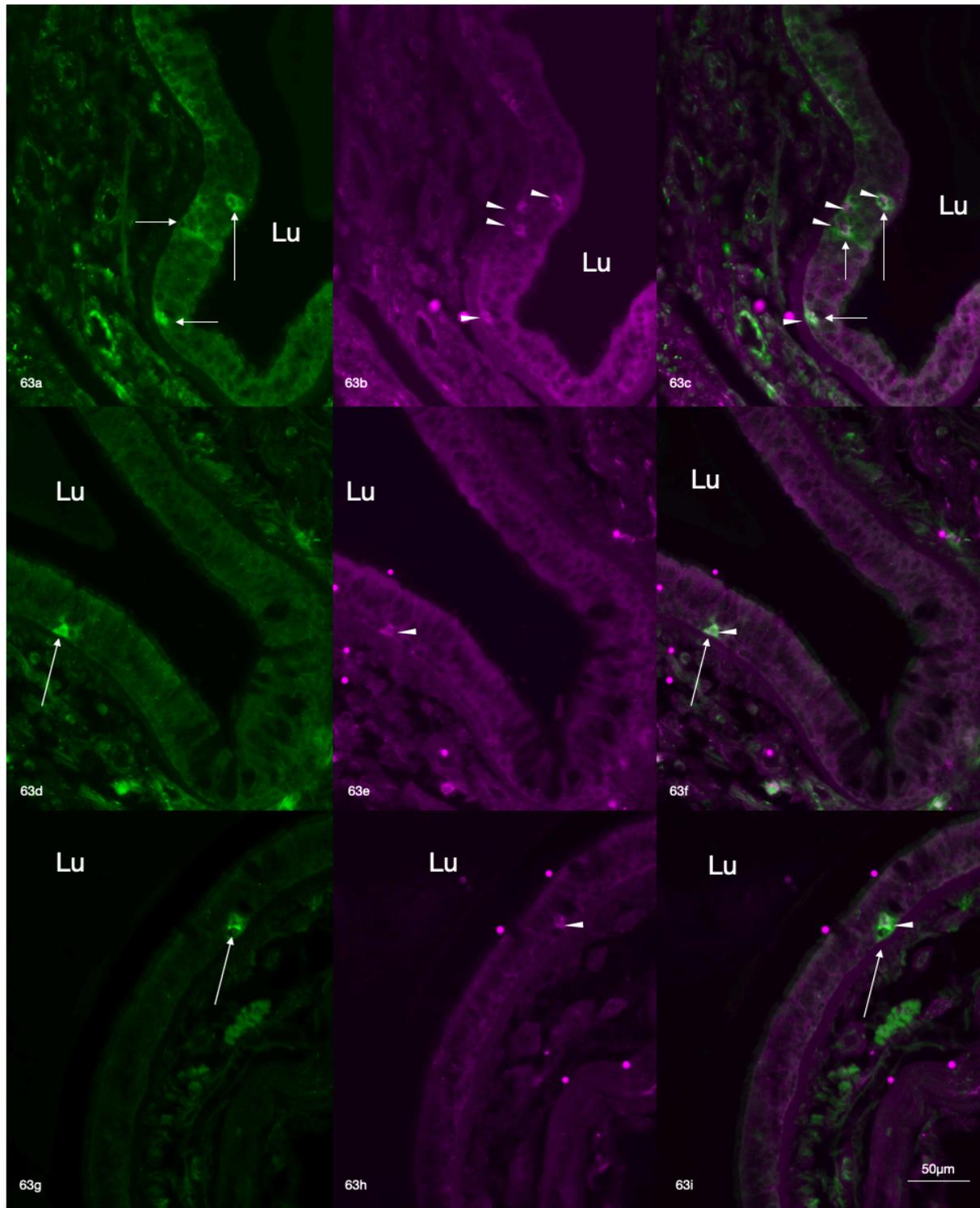


Abbildung 63: *POU-class-2-homeobox-3* (POU2F3)/*Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) Doppelfärbung im Subsegmentbronchus

Lu: Lumen; **(a+d+g)** POU2F3 (grün); **(b+e+h)** DCAMKL1 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** mehrere POU2F3-positive Zellen (Pfeile in a+c) sowie DCAMKL1-positive Zellen (Pfeilspitze in b+c) mit Überlappungen; **mittlere Reihe:** Überlappung einer POU2F3-positiven (Pfeil in d+f) und DCAMKL1-positiven Zelle (Pfeilspitze in e+f); **untere Reihe:** Überlappung einer POU2F3-positiven (Pfeil in g+i) und DCAMKL1-positiven Zelle (Pfeilspitze in h+i).

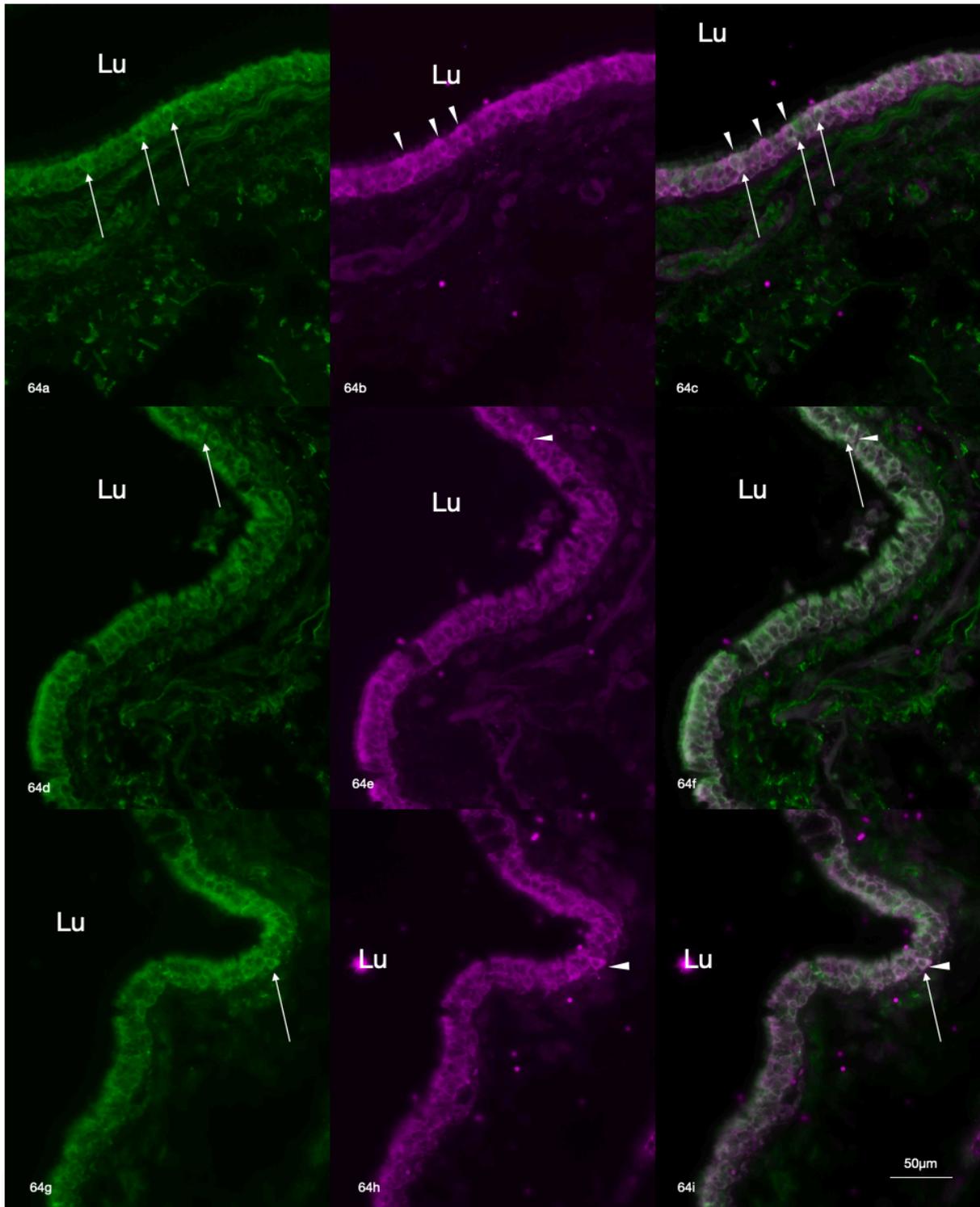


Abbildung 64: *POU-class-2-homeobox-3* (POU2F3)/*Doublecortin-like-kinase 1* (DCAMKL1) Doppelfärbung im Subsegmentbronchus

Lu: Lumen; **(a+d+g)** POU2F3 (grün); **(b+e+h)** DCAMKL1 (lila); **(c+f+i)** Mischbild; **obere Reihe:** mehrere POU2F3-positive (Pfeile in a+c) sowie DCAMKL1-positive (Pfeilspitze in b+c) Zellen mit Überlappungen; **mittlere Reihe:** Überlappung einer POU2F3-positiven (Pfeil in d+f) und DCAMKL1-positiven Zelle (Pfeilspitze in e+f); **untere Reihe:** Überlappung einer POU2F3-positiven (Pfeil in g+i) und DCAMKL1-positiven (Pfeilspitze in h+i) Zelle.

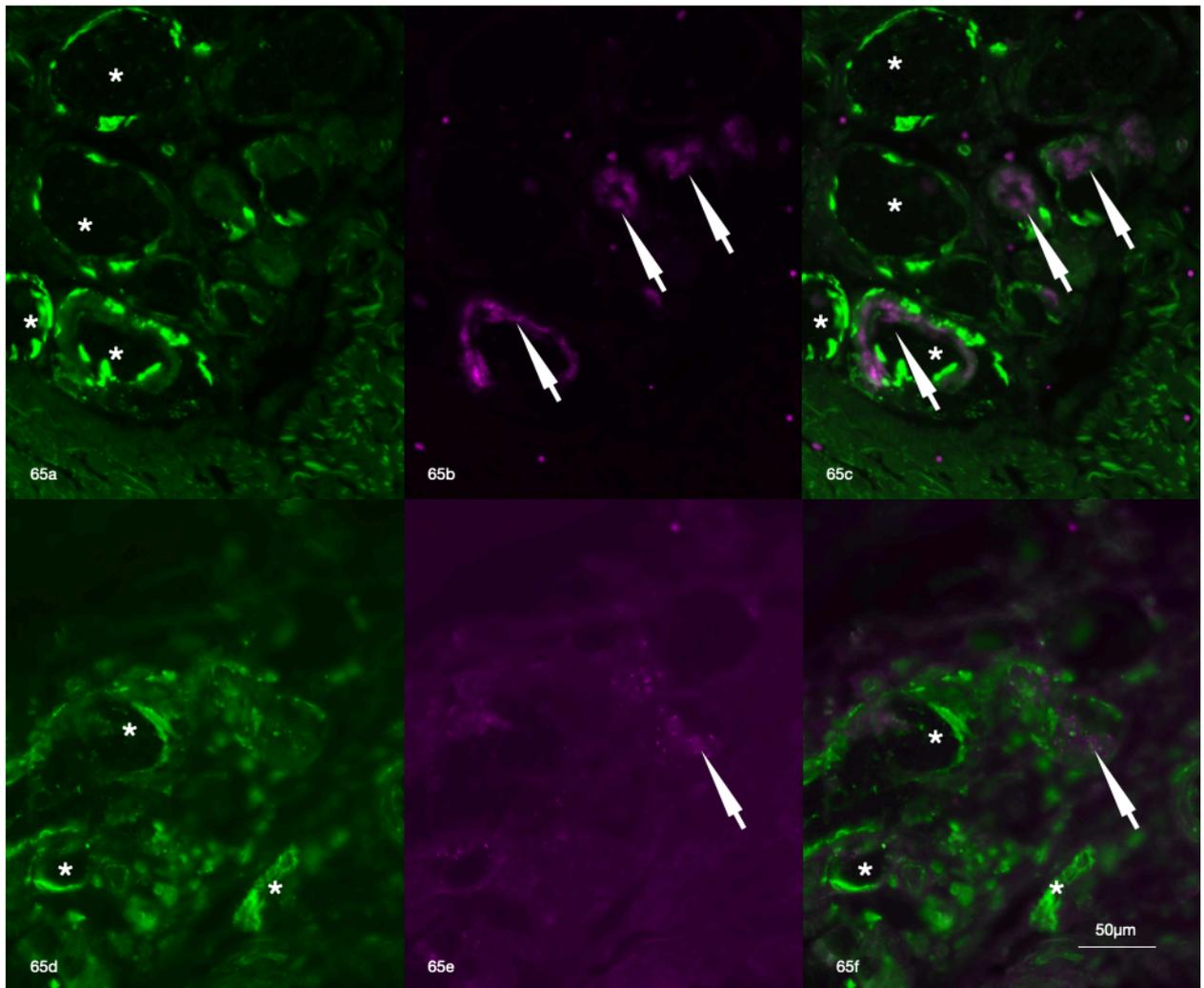


Abbildung 65: POU-class-2-homeobox-3 (POU2F3)/Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1) Doppelfärbung in Drüsengewebe

Lu: Lumen; **(a+d)** POU2F3 (grün); **(b+e)** DCAMKL1 (lila); **(c+f)** Mischbild IHF; POU2F3-positive randständige Regionen der Drüsen (* in a+d und c+f) sowie diffuse DCAMKL1-positive Färbung in der Mitte der Drüsenanschnitte (Blockpfeil in b+e und c+f).

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung

Folgende Fragestellungen konnten mit der vorgelegten Arbeit erfolgreich beantwortet werden:

Sind die in Tiermodellen detektierten BC auch in humanen Präparaten nachweisbar?

Als Ergebnis der Untersuchung ist zusammenfassend festzuhalten, dass die in Tiermodellen detektierten BC nun auch in humanen Präparaten nachgewiesen wurden. Verschiedenen Färbungsmuster lassen auch darauf schließen, dass möglicherweise verschiedene Subtypen bestehen.

Bestehen in den einzelnen Abschnitten des humanen Trachealbaumes Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens der BC?

BC konnten in allen Abschnitten des Bronchialbaums bis auf die Ebene der Subsegmentbronchien beobachtet werden. Das höchste Vorkommen war in den Abschnitten der Trache zu beobachten. Ihr Vorkommen nahm proportional zur Bronchialtiefe ab, sodass sie nur noch vereinzelt in den Subsegmentbronchien beobachtet werden konnten.

Lassen sich BC von reinen NEC abgrenzen?

Es kam zu keiner Überlappung von BC-Markern und dem PGP 9.5. Jedoch zeigten sich einzelne Überschneidungen von DCAMKL1 und cGRP-positiven Zellen. Es besteht die Möglichkeit, dass dies etwas über die Funktion der BC in humanem Bronchialgewebe aussagt.

Sind die nachgewiesenen BC in der Lage ACh zu produzieren?

Vereinzelt konnten Überlappungen zwischen DCAMKL1 und ChAT-positiven Zellen beobachtet werden, was die Schlussfolgerung zulässt, dass einige BC in der Lage sind ACh zu produzieren. Jedoch kann diese Aussage nicht pauschal zu jeder BC getroffen werden. Dies stützt wiederum die These der unterschiedlichen BC-Subtypen.

Stehen die nachgewiesenen BC in Kontakt mit Nervenfasern?

Es konnten mehrfach Berührungspunkte zwischen PGP9.5-positiven und cGRP-positiven Nervenfasern identifiziert werden.

Die einzelnen Punkte werden im Weiteren ausführlicher diskutiert.

5.2 Abgrenzung bronchialer Bürstenzellen von neuroendokrinen Zellen

5.2.1 Morphologische und immunhistochemische Unterschiede

Bei den BC der Atemwege handelt es sich laut elektronenmikroskopischer Untersuchungen um konische [90], spindelförmige [124], kubisch bis hochprismatische [91] Zellen. Sie sitzen der Basalmembran des Epithels auf und reichen mit ihren Ausläufern bis in das Lumen. Apikal besitzen sie zahlreiche Mikrovilli, mit denen sie verschiedene Reize detektieren können [60,61,90,91,124,125]. Diese Charakteristika decken sich mit den Befunden der vorliegenden Untersuchung (siehe Abb. 18, 20, 23, 24, 26).

Die NEC des Bronchialsystems haben eher eine runde bis dreieckige Form [152]. Ihr Zellkern liegt in den meisten Fällen eher mittig im Epithel und besitzen horizontal verlaufende Ausläufer. Der Kontakt zur Basalmembran besteht häufig nur durch dünne Zellfortsätze. Anders als BC sind NEC nicht immer mit dem Lumen der Atemwege verbunden [1,25,146,152]. Häufig verlaufen in ihrer Nähe intraepitheliale granuläre Nervenfasern, die vermutlich die Anbindung an das bronchiale Nervensystem widerspiegeln.

Damit bestehen schon rein morphologisch deutliche Unterschiede zwischen BC und NEB. Daneben exprimieren die beiden Zelltypen auch unterschiedliche Proteine, die immunhistologisch nachweisbar und in diesen Untersuchungen verwandt worden sind.

PGP9.5 ist ein etablierter Marker für NEC und Nervenfasern, der von zentralen und peripheren Neuronen exprimiert wird. Nach dem Nachweis im Hirngewebe wurde PGP9.5 auch in der Lunge und im Bronchialsystem detektiert [12,18,82,83,118,143,152]. Dies gilt sowohl für tierisches, als auch für menschliches Gewebe [12,83]. Die PGP9.5-Immunfluoreszenzfärbung des Tracheaepithels ergab in der vorliegenden Studie eine basal verstärkte Fluoreszenz und ein granuliertes Färbemuster (s. Abb. 10). Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen überein. Zusätzlich waren intraepithelial vertikale sowie subepithelial horizontal verlaufende Nervenfasern darstellbar (s. Abb. 11- 13). Auch innerhalb der basal im angeschnittenen Gewebe liegenden Drüsenazini wurden PGP9.5-positive Zellen beobachtet (s. Abb. 13, 14)

Neben PGP9.5 ist auch cGRP ein neuronaler, wenn auch unspezifischerer Marker zur Identifikation von NEB und der intra- sowie subepithelialen Innervation [72,103,136,138,145]. Keith et al. detektierten cGRP in singulären sowie geclusterten NEC im gesamten Bronchialbaum bis

zu den Alveolen [72]. cGRP wird von Zellen als Reaktion auf hypoxische Zustände abgegeben und führt zu einer lokal begrenzten Vasodilatation der umliegenden Arteriolen [103]. Das Protein ist ab der 27. Schwangerschaftswoche in der Lunge von Feten nachweisbar und spielt dort in der frühen Lungenentwicklung eine Rolle [145].

Studien zum Vorkommen von cGRP und PGP9.5 in den Atemwegen legen die Existenz verschiedener NEC-Subtypen nahe, da neben PGP9.5/cGRP doppelt positiven Zellen auch ausschließlich cGRP-positive und PGP9.5-positive Zellen existieren [58,118,137].

In der vorgelegten Arbeit konnte bei der Doppelfärbung des Gewebes die gelegentliche Coexpression von cGRP und dem spezifischen BC-Marker DCAMKL1 (s. Abb. 35, 37, 38, 40, 41) vor allem auf Höhe der Subsegmentbronchien beobachtet werden. Dies erlaubt die These, dass auch BC bei Aktivierung in der Lage sein könnten cGRP sezernieren, um die lokale Durchblutung zu erhöhen, was möglicherweise auch die Einwanderung von Immunzellen beschleunigt.

Unterstützt wird dies durch die Erkenntnis von Plassaert et al., dass NEC und BC des humanen Bronchialsystems im Zellsequencing nicht von einander differenziert werden konnten [119].

5.2.2 Mögliche Kooperationspartner der Bürstenzellen

Verschiedene Forschergruppen bezeichneten NEC mit unterschiedlichen Namen. Feyrter beschrieb beispielsweise ‚Helle Zellen‘ im Pankreas, in peripheren Drüsen [40], im Urogenitaltrakt [41] und im Bronchialbaum [42]. Im Rahmen seiner Untersuchung des Urogenitaltraktes postulierte er erstmals auch eine chemosensorische Funktion der chromaffinen Zellen.

NEC weisen funktionelle Ähnlichkeiten mit den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes auf [48]. Bronchiale NEC reagieren auf eine Vielzahl chemischer Reize, dazu zählen der Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxid-Partialdruck, der pH-Wert und Nicotin [26,27,87]. Nach ihrer Aktivierung sekretieren NEC Vesikel mit cGRP oder andere Neurotransmitter und beeinflussen dadurch parakrin Zellen, Nerven und Gefäße. In diesem Kontext spielt cGRP bei der Differenzierung und Reifung von Gewebe und bei der Proliferation eine Rolle [154].

Da NEC in ein nervales Netzwerk aus umgebenden Zellen und vagalen Fasern eingebunden sind, können sie vegetative Abwehrmechanismen wie Husten auslösen [121]. In diesem nervalen Netz sind NEC auch mit BC verbunden, wobei die beiden Zelltypen häufig keinen direkten Zellkontakt zeigen, aber in unmittelbarer Nähe liegen (s. Abb. 37, 40). In der vorliegenden Studie ließen sich in den Immunfluoreszenz-Analysen keine Zellen gleichzeitig mit Antikörpern gegen BC-Marker und PGP9.5 anfärben. Die Existenz von langen Zellfortsätzen zwischen den beiden Zellpopulationen ist möglich, aber bislang nicht belegt.

Nach dem Konzept der Paraneuronen-Kaskade könnten die NEC die Verbindung zwischen BC und dem Nervensystem darstellen [48,68,140]. Dafür spricht auch der vorliegende Befund (s. Abb. 12,13), dass nicht alle NEC eine Anbindung an das Lumen der Bronchien aufwiesen, sondern durch umgebende Epithelzellen und deren Zilien bedeckt waren [54]. Möglicherweise leiten chemosensorische BC nach ihrer Aktivierung durch einen Reizstoff über ihre apikal ins Lumen reichenden Mikrovilli anschließend das Signal an benachbarte NEC weiter. Diese schütten reaktiv in Vesikel gespeicherte Amine, Peptide oder Purine [27] aus, was potenziell den BC-Reiz verstärkt. Weiter könnten NEC das Reizspektrum erweitern, da sie anders als BC auch auf hypoxische Reize wie einen erniedrigten Sauerstoff- oder einen erhöhten Kohlenstoffdioxid-Partialdruck reagieren [26,46,47]. Die in Gruppen vorkommenden NEC der Lunge setzen reaktiv auf den Abfall des Sauerstoff-Partialdrucks vermehrt Serotonin (5-HT) frei. Auslöser ist eine reduzierte Aktivität der Nikotinsäureamid-Adenindinukleotidphosphat-(NADPH)-Oxidase. Die daraus resultierende Reduktion des zellulären Redoxpotenzials hat die Schließung von Sauerstoff-sensitiven Kalium-Kanälen zur Folge. Die folgende Zelldepolarisierung führt über L-Typ-Kalzium-Kanäle zu einem Kalzium-Einstrom in die Zelle, der eine Vesikel-Exozytose und Neurotransmitter-Ausschüttung auslöst [27,46,47]. Neben der Reaktion auf die Veränderung der Sauerstoff-Konzentration lassen sich NEC auch durch eine Erhöhung der Kohlenstoffdioxid-Konzentration und einen Abfall des pH-Wertes aktivieren. Wie Livermore et al. an isolierten NEB aus Hamsterlungen zeigten, verstärkt sich der Anstieg der Serotonin-Sekretion bei dem gemeinsamen Auftreten einer Azidose, Hyperkapnie und Hypoxie [89]. Zusätzlich ist eine *Feedback*-Schleife zwischen BC und NEC mit einer gegenseitigen Aktivierung denkbar.

Neben der Kommunikation zwischen BC und NEC ist auch eine Kooperation zwischen BC und sezernierenden Zellen des Epithels vorstellbar. Zu Letzteren zählen Schleim-produzierende Becherzellen und an der Abwehr beteiligte Keulenzellen. Diese Vermutung äußerten erstmals Mergio et al. bei der Untersuchung der Atemwege der Ratte [105,106]. Die von den Autoren als solitäre chemosensorische Zellen (*solitary chemosensory cells*, SCC) bezeichnete Population stimmt morphologisch und funktionell mit der BC-Population überein. Beide Zelltypen kommen solitär im respiratorischen Epithel vor, exprimieren ihre Mikrovilli apikal und besitzen die für die Verarbeitung von gustatorischen Reizen notwendigen Enzyme [77]. So kam es auch in der vorgelegten Studie mehrfach zu der Beobachtung der direkten Nachbarschaft von BC und Becherzellen (s. Abb. 20,25,38,39)

5.3 Signalweiterleitung der respiratorischen Bürstenzellen

5.3.1 Aktivierung von protein-gene-product 9.5 (PGP9.5) bzw. Calcitonin-gene-related-peptide (cGRP) positiven Nervenfasern

In der vorliegenden Studie konnten entlang des gesamten Tracheobronchialbaumes zahlreiche PGP9.5-positive Nervenfasern im respiratorischen Epithel nachgewiesen werden (s. Abb. 10-13). Neben der Epithelinnervation war eine ausgeprägte nervale Versorgung von Zellen im subepithelialen Gewebe mit PGP9.5-positiven Nervenfasern darstellbar (siehe Abb 10-14). Es konnte beobachtet werden, dass es sich bei der subepithelialen Innervation öfters um cholinerge Nervenfasern oder um Fasern handelte, die in der Nähe von cholinergen Zellen und Nervenfasern lagen (s. Abb. 28+34). Vorangegangene Studien belegen die Existenz verschiedener Nervenfasern-Untergruppen im respiratorischen Epithel. Beschrieben wurden PGP9.5-, cGRP-, Substanz P- und Neurokinin-A-positive Nervenfasern [6,58,80,83,151].

Im Tracheagewebe wurde ein enger Kontakt von cholinergen Zellen mit cGRP- und/oder PGP9.5-positiven Nervenfasern beobachtet (s. Abb. 49, 51, 52). Krasteva et al. wiesen über Whole-Mount-Präparate mit Doppelfärbungen nach, dass 6 % der BC Kontakt zu cGRP-positiven Nervenfasern haben und 22 % zu rein PGP-positiven Fasern [75]. Zusätzlich gelang an genetisch veränderten *enhanced green fluorescence protein*-(EGFP)-Mäusen der Nachweis von nikotineren Rezeptoren an einer Subpopulation cGRP-positiver, sensorisch-vagaler Nervenfasern. Diese Rezeptoren lösten nach der Reizung mit Nikotin eine Kalziumionen-Erhöhung im Zytosol aus [75]. Die den Tracheobronchialbaum versorgenden sensorischen Neuronen besitzen Perikarya im *Ganglion jugulare* und im rostralen Abschnitt des *Ganglion nodosum* [75,104]. Die Freisetzung von cGRP aus Nervenfasern erfolgt nach Stimulation mit ACh oder mit anderen Agonisten nikotinerger ACh-Rezeptoren (Cytisin, Nikotin). Das Ausmaß der cGRP-Freisetzung hängt von der Dosis des auslösenden Cystins und Nikotins ab [70]. Antagonisten des nikotineren ACh-Rezeptors (Hexamethonium) und die Blockade von muskarinen Rezeptoren durch Atropin hemmen die cGRP-Ausschüttung [70]. Aufgrund dieser Signalkette ist anzunehmen, dass chemosensorische cholinerge BC in der Lage sind, die cGRP-Sekretion in cGRP-positiven sensorischen Nervenfasern zu stimulieren. Hollenhorst et al. zeigten, dass das von BC sezernierte ACh eine para- und autokrine Wirkung entfaltet [64]. Bei cGRP handelt es sich um ein multifunktionelles Peptid, das auf verschiedene Organe wirkt. Schon in geringen Konzentrationen wirkt cGRP stark gefäßerweiternd. Testpersonen zeigten nach subkutaner Injektion eine bis zu 12 h anhaltende ausgeprägte Rötung. Der vasodilatatorische Effekt ist mit dem von Prostaglandin 2 zu vergleichen und scheint vor allem an arteriellen Gefäßen eine Rolle

zu spielen [13]. Somit könnte dieser Effekt beim An- und Abtransport von Immunzellen und entzündungsvermittelnden Substanzen eine zentrale Rolle spielen.

Die hier gezeigte Coexpression von cGRP und DCAMKL1 in Zellen des humanen Bronchialsystems stellt eine neue Erkenntnis dar und könnte somit Hinweis auf die Beteiligung der Bürstenzellen an der Aktivierung der neurogenen Inflammation sein.

5.3.2 Kopplung der Bürstenzellen mit neuroendokrinen Zellen – Vergleich mit der Reizweiterleitungskaskade in der Geschmacksknospe der Zunge

Trotz der mittels PGP- und cGRP-Antikörper detektierten ausgeprägten Innervation des gesamten respiratorischen Epithels, konnte nur wenige direkte Kontakte mit den als BC identifizierten Zellen festgestellt werden (s. Abb. 37, 42). Auch in anderen Untersuchungen wurden kaum Kontakte zwischen Nervenfasern und BC beobachtet [75].

Daher stellt sich die Frage, wie BC ohne direkten Kontakt zu angrenzenden Nervenfasern Signale weiterleiten. Wie beschrieben (s. Kap. 5.1.1 und 5.1.2) könnten NEC als Paraneuronen als Vermittler zwischen chemosensorischen BC und dem Nervensystem fungieren. Früh wurde erkannt, dass BC den von Codier et al. beschriebenen sekundären Sinneszellen bzw. den Typ-II-Zellen entsprechen [23,90], da sie über ihren Kontakt zum Organlumen Reizstoffe detektieren können und ihre zytoplasmatischen Vesikel denen von Nerven ähneln [90]. Aus diesen funktionellen Entsprechungen und den sichtbaren Mikrovilli der BC zogen Luciano et al. [56] den Schluss, dass BC den sensorischen Typ-II-Zellen der Zunge im Bereich der *Papillae circumvallatae* und *foliatae* entsprechen könnten [90].

Auf der Zunge geben sensorische Typ-II-Zellen nach Stimulation durch Geschmacksmoleküle Signale an neuronale Typ-III-Zellen weiter. An der Geschmackswahrnehmung und anschließenden Signalkaskade sind Geschmacksrezeptoren (TasR), der *Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5* (TRPM5) beteiligt [132]. Typ-II-Zellen weisen jedoch keinen direkten Kontakt mit Nervenfasern auf. Außerdem fehlen ihnen bestimmte, zur direkten Signalweitergabe notwendige Proteine, wie das *Synaptosomal-associated protein* (SNAP25), der spannungsabhängige Kalzium-Kanal $\alpha 1C$ und das für die Vesikeladhäsion notwendige *Neural cell adhesion molecule* (NCAM). Diese Proteine sind aber in den neuronalen Typ-III-Zellen vorhanden [22,30], mit denen Typ-II-Zellen über Synapsen verbunden sind. Diese Verbindung wird an dem um 100 ms verzögerten Potenzialanstieg in Typ-III-Zellen nach der Stimulation von Typ-II-Zelle deutlich. Umgekehrt kommt es bei rezidivierender Stimulation von Typ-III-

Zellen nach einer Minute in Typ-II-Zellen zur Hyperpolarisation der Membran, einer Resistenzerhöhung und einer generell erhöhten Antwortamplitude auf den Stimulus [38]. Dieser positive Feedbackmechanismus spricht für eine „bidirektionale synaptische Transmission“ [38].

Das Konzept der Signalweiterleitung an der Zunge stellt sich wie folgt dar: Geschmacks-moleküle führen über eine Bindung an Geschmacksrezeptoren (TasR) auf Typ-II-Zellen zu einem intrazellulären Kalzium-Anstieg und zu einer Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) [44,66,127]. Da den Zellen die für die Vesikelexozytose notwendigen Moleküle fehlen, erfolgt die ATP-Freisetzung über Poren (*Calcium homeostasis modulator* (CALHM1-Kanäle), Pannexin-Kanäle, Connexin-Hemikanäle) in der Zellmembran [66,127,142]. Das freigesetzte ATP bindet an purinerge Rezeptoren (P2X2/P2X3) sensorischer Nervenfasern, die die Geschmacksknospe umgeben bzw. versorgen [11,19,36,44,85]. Neben einer synaptischen Reizweiterleitung erfolgt über eine parakrine Wirkung des ATP die Aktivierung von Typ-III-Zellen, die reaktiv den Neurotransmitter Serotonin freisetzen [38,66,67,71,73]. Die exklusive Ausschüttung von Serotonin durch Typ-III-Paraneurone belegen Untersuchungen, bei denen es nach einer Blockade der synaptischen Membranporen und des ATP-gesteuerten Signalwegs mittels ATPasen und Purinrezeptor-Antagonisten in diesen Zellen zu keiner Serotonin-Sekretion mehr kam [66].

Untersuchungen an mammären Tiermodellen oder Amphibien wiesen Serotonin in den Geschmacksknospen nach. Auf der Basis des Modells der „bidirektionalen synaptischen Transmission“ (siehe oben) wurde die Vermutung geäußert, dass Serotonin die Erregbarkeit der gustatorischen Typ-II-Zelle über die Hemmung Serotonin-sensitiver Natrium-Kanäle beeinflusst [38,67,73]. Diese Inhibition führt zu einer Vermeidung von rückwärtsgerichteten Signalen und optimiert die Leistung der Typ-II-Zellen [71].

Die Projektion dieses Modells auf das Bronchialsystem lässt vermuten, dass es sich bei den gefundenen cholinergen BC um Typ II Zellen und bei den NEC um Typ III Zellen handelt. Aufgrund von Problemem mit der Spezifität von ATP-Antikörpern auf humanem Gewebe, konnte diese Komponente in der hiesigen Untersuchung nicht dargestellt werden. Jedoch beschrieben Dando et al., dass Typ II Zelle bei Wahrnehmung eines Geschmacksreizes ACh sekretieren, was durch einen intrazellulären Calciumanstieg zur ATP Sekretion führt [28]. Durch die Färbung des ChAT-Antikörpers konnte hier somit indirekt der oben beschriebene Signalweg nachgewiesen werden. So scheint eine Weitergabe zwischen BC und NEC über Zellsynapsen und/oder über einen parakrinen Weg, sowie eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Zelltypen möglich. BC sezernieren also sowohl ATP, als auch parakrin und autokrin wirkendes ACh.

Die parakrine ACh-Wirkung betrifft nicht nur NEC, sondern auch andere Zelltypen wie Epithel- und Becherzellen [64].

Im tracheobronchialen System ist ACh an der Auslösung von entzündlichen Prozessen und der Aktivierung von Abwehrmechanismen (z. B. gesteigerte Sekretion, Modulation des Tonus der glatten Muskulatur) beteiligt [64,79,120]. Auch Serotonin spielt bei der Entstehung von Entzündungen eine Rolle [156].

5.4 Funktion der cholinergen Bürstenzellen der Atemwege

Auch im Zeitalter der Breitbandantibiotika gehören akute Infektionen der Lunge und Atemwege zu den medizinischen Herausforderungen. Weltweit und insbesondere in Nordamerika und Europa gehören Pneumonien zu den Infektionskrankheiten mit der höchsten Letalität [43,153]. Betroffen sind vor allem Menschen mit Vorerkrankungen. Zu den Risikofaktoren zählen Lungenerkrankungen (z. B. *Chronic obstructive pulmonary disease* (COPD)), kardiovaskuläre Vorerkrankungen, Diabetes mellitus und ein erhöhtes Alter [17,153]. Aufgrund des demografischen Wandels und der Zunahme des Metabolischen Syndroms in der westlichen Welt wird sich die Problematik in Zukunft noch verschärfen. Zusätzlich spielen bakterielle Erreger im Rahmen von Superinfektionen der Atemwege bei saisonalen viralen Infekten eine Rolle [21,100]. Bei einer bakteriellen Superinfektion von Coronaviren ausgelösten Lungenentzündungen zeigten die Patienten ein deutlich schlechteres Outcome und ein signifikant schwerer geschädigtes Lungengewebe [4,15].

Problematisch ist in diesem Kontext auch die zunehmende Resistenzentwicklung gegen Antibiotika [49] und die bei einer Impfung gegen Pneumokokken fehlende Erfassung von Stämmen, die teilweise mit einem dramatischen Krankheitsverlauf einhergehen [50].

Unterschieden wird die meist durch gram-positive Pneumokokken ausgelöste *Community acquired pneumonia* (CAP) und die *Ventilation acquired pneumonia* (VAP) mit negativem Erregerspektrum, die eher vorerkrankte Patienten betrifft [2,59,122,148,155]. Die aktuelle *Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2* (SARS-CoV-2) Pandemie unterstreicht die Bedeutung der Entwicklung von neue Behandlungs- und Präventionsmaßnahmen. Eine therapeutische Option bieten Wächterzellen.

5.4.1 Systemische Wächterfunktion

Durch ihre direkte Verbindung mit dem Lumen der Hohlorgane und der Ausbildung von Mikrovilli können BC aufgrund ihrer Ausstattung mit Proteinen der gustatorischen Signalkaskade

Pathogene beim Eintreten in die Atemwege detektieren. Bei der Entwicklung von Lungenerkrankungen spielen vor allem Pneumokokken, Enterobakterien, *Haemophilus influenzae* und Pseudomonaden eine Rolle [2,122,148,155]. Einige diese Bakterien sind in der Lage über chemische Botenstoffe miteinander zu kommunizieren, um zelldichteabhängig [29,84,115–117] die Aktivierung bestimmter Gene oder die Freisetzung von Pathogenitätsfaktoren zu koordinieren [147]. Zu den beim sogenannten *Quorum sensing* freigesetzten Signalmolekülen gehört N-Acyl-Homoserin-Lacton (AHL) [39]. AHL wird speziell von gram-negativen Erregern gebildet [39] und spielt für die Virulenz eines Bakterienstammes [141] und für die Bildung von Biofilmen [29] eine bedeutende Rolle. Mutierte Bakterienstämme, denen AHL fehlt, zeigen ein deutlich reduziertes Wachstum und bilden dünnere Biofilme. Bei Zugabe des fehlenden AHL normalisiert sich die Biofilmdicke und die Populationskoordination [29]. Bakterien nutzen *Quorum sensing*, um sich an äußere Gegebenheiten anzupassen und die bakterielle Invasion voranzutreiben. Chemosensorische Zellen sind in der Lage AHL wahrzunehmen [64,77,144]. Auch die von Pseudomonaden sezernierten Quinolone aktivieren Rezeptoren für Bitterstoffe [45]. Chemosensorische Zellen sind in der Lage AHL wahrzunehmen [144]. Sensorische Zellen in den Nasennebenhöhlen der Maus reagierten auf AHL mit einem Anstieg der zytoplasmatischen Kalzium-Konzentration [144]. Respiratorische BC exprimieren eine Vielzahl von Rezeptoren der *Taste receptor family 2 (T2R)*-Gruppe [64] und anderer Bitterrezeptoren [14,76]. Der an der Wahrnehmung von Bitterstoffen beteiligte G-Protein-gekoppelte-Rezeptor *Taste receptor family 2 isoform 38 protein (T2R38)* wurde beim Menschen in Zellen der oberen Atemwege gefunden. Die Bindung von Bitterstoffen oder AHL an diesen Rezeptor erhöhen die intrazelluläre Kalziumkonzentration [84] und in Folge die Freisetzung von bakteriostatisch wirkendem Stickstoffmonoxid (NO) [98]. Unter anderem Lee et al. zeigten, dass NO bei sinonasalen Zellen des Menschen als Transmitter für die Clearance dient [84,98]. Die Rolle von ACh wurde dabei nicht untersucht.

Krasteva et al. zeigten an mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Mäusen, dass eine Aktivierung der BC der unteren Atemwege durch AHL zu einer Senkung der Atemfrequenz und zu einer Beschleunigung des Partikeltransportes durch die Zilien der Epithelzellen führt [76]. Entsprechende Befunde veröffentlichten Tizziano et al. für die oberen Atemwege, wo die *solitary chemosensory cells (SCC)* der Nasennebenhöhlen eine trigeminale Reizantwort auslösten [144].

Da BC in der Lage sind, sensorische vagale Nervenfasern über den Transmitter ACh zu stimulieren [75] und so respiratorische Abwehrreflexe auszulösen, scheinen diese Zellen bei der De-

tektion und Abwehr von Bakterien eine zentrale Rolle einzunehmen [75]. Auch die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten Zellen mit einer gelegentlichen Überlappung des spezifischen BC-Markers DCAMKL1 und des ChAT.

An der Steigerung des Partikeltransportes ist der parakrine ACh-Signalweg aber vermutlich nicht beteiligt; diese Aufgabe übernehmen muskarine Rezeptoren der zilienträgenden Zellen [74]. Dagegen wird die Mucus-Produktion durch die Freisetzung von ACh gesteigert [78,79].

Korrespondierend dazu zeigten sich in der akuten Untersuchung die meisten ChAT exprimierenden Zellen in Abschnitten der oberen Atemwege, wie Trachea und Hauptbronchus (siehe Abb. 28+29).

Bestimmte *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in Genen immunologisch aktiver Proteine wie IL-6 können einer Pneumokokken-Pneumonie abmildern [101]. Humane Bronchialzellen werden durch ACh über den *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB) Signalweg zur Sezernierung von IL-8 angeregt [120]. Dieser Signalweg ist auch an der Steigerung der IL-6-Sekretion von Stammzellen im Knochenmark beteiligt [112]. Möglicherweise führt die ACh-Freisetzung durch BC zu einer IL-6-Synthese, wodurch der Krankheitsverlauf bei einer Lungenentzündung positiv beeinflusst und die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines *Acute respiratory distress syndrome* senken kann [101].

Im Urogenitaltrakt sind BC häufig in den Ausführungsgängen paraurethraler und akzessorischer Drüsen zu finden. Vermutlich regen sie parakrin lokal vorkommende Plasmazellen zur IgA-Produktion an und erschweren so die Adhäsion der Bakterien an der Organwand [114]. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für die Atemwege denkbar. Hier könnte das IgA im Bronchialsekret eine Rolle bei chronischer Bronchitis und Asthma spielen [139].

5.4.2 Lokale Abwehrfunktion – neurogene Inflammation

Durch ihre Wächterfunktion spielen BC eine entscheidende Rolle bei der Wahrnehmung von Pathogenen und der Vermittlung der Abwehrfunktion. Zusätzlich können sie aber auch lokal die Sekretion von Antimikrobiellen Peptiden (AMP) auslösen [45,135]. Diese präventiven Bestandteile des *Airway Surface Liquid* (ASL) werden vermehrt bei erhöhter Bakterienlast sezerniert [16]. Sie stehen am Anfang der Kette der lokalen Abwehrmechanismen und zerstören Bakterien ohne zelluläre Entzündungsreaktion [5]. Zu den vom humanen respiratorischen Epithel gebildeten AMP gehören [134] β-Defensin-3 (hBD3), Cathelicidin LL-37/hCAP-18 und Lysozym [5]. Diamond et al. beschrieben ein antimikrobiell wirksames *Airway Surface*

Liquid Peptid der hochprismatischen Epithelzellen, das von der Nase bis zu den Bronchien vorkommt. Dieses *Tracheal antimicrobial peptide* (TAB) [32] gehört zur Gruppe der β -Defensine [5,33].

Defensine und Cathelicidin wirken gegen eine Vielzahl von gram-positiven und gram-negativen Bakterien, darunter auch *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylokokkus aureus* [3]. Aufgrund ihres kationischen Charakters binden sie an die anionische Mikrobenmembran und zerstören durch Porenbildung den elektrochemischen Gradienten der Bakterienzelle [5,16]. Verschiedene AMP wirken synergistisch [3]. Weiter können AMP die Wirkung von Antibiotika wie Amoxicillin, das häufig bei akuten Atemwegsinfektionen eingesetzt wird, und Metronidazol verstärken [99,135]. Außerdem wirken sie gegen Antibiotika-resistente Erreger, wie *Multi-resistente Staphylococcus aureus* (MRSA) und gegen Erreger aufwändig zu behandelnder Infektionen, wie Tuberkulose [81]. Zudem spielen AMP eine Rolle bei der Bekämpfung von Virus- und Pilzinfektionen, sowie bei den chemotaktischen Vorgängen der zellulären Antwort des angeborenen und erworbenen Immunsystems [31,81].

Auch bei Erkrankungen der Atmungsorgane wie Sarkoidose, Pneumonie und Zystischer Fibrose (CF) wurden erhöhte AMP-Werte detektiert [62,129]. Bei einer erhöhten Bakterienlast durch die Verschiebung des pH-Wertes ins saure Milieu ist die Potenz der AMP eingeschränkt, da ihr auf ionische Wechselwirkungen beruhendes Anheften an die Pathogene erschwert ist [3,31]. Bei der Zystischen Fibrose erreicht die gesteigerte Sekretion an Defensinen ein zelltoxisches Maß [5].

Lee et al. zeigte die Sekretion von Defensine durch die SCC in der Nase nach Simulation mit AHL und Denatonum [84]. Die hier vorgelegte Arbeit gibt Hinweis darauf, dass BC möglicherweise eine Quelle dieser Defensine sein könnten, denn auch BC können über verschiedene Mechanismen eine vermehrte AMP-Ausschüttung auszulösen. Sezerniertes, parakrin auf benachbarte Epithelzellen wirkendes, ACh aktiviert zusätzlich Nervenfasern, wodurch sich der „alarmierte“ Bereich vergrößert. Weiter lösen BC über die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs eine Freisetzung von IL-8 aus bronchialen Epithelzellen aus [120]. IL-8 beeinflusst neben IL-6 die Aktivität des *Epidermal-growth-factor*-(EGF)-Rezeptors, der für die Expression des humanen β -Defensin-3 eine Rolle spielt; dabei handelt sich um eine indirekte Stimulation [135]. Der NF- κ B-Signalweg ist von besonderer Bedeutung, da er an der Induktion der Immun- und Entzündungsantwort beteiligt ist [34], andererseits aber auch die β -Defensin-Sekretion hemmt [81].

Nach diesen ersten direkten Abwehrmechanismen, folgt die Abwehr durch Inflammation und Zellmigration [5]. In der *Lamina propria* der Atemwege kommen residente Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten vor, die bei Bedarf direkt am Ort des Geschehens sind. Weitere Zellen können über den Blutweg die Atemwege erreichen, wenn aktivierte BC die Durchblutung durch das vasodilatativ wirksame cGRP steigern. Die durch BC getriggerte Chemotaxis und Aktivierung von Immunzellen beruht auf unterschiedlichen Mechanismen. Laut neuerer Befunde schütten respiratorische BC nach ihrer Aktivierung das Chemokin IL-25 aus, was zu einer IL-13 Synthese in *Group 2 innate lymphoid cells* (ILC) führt. IL-13 wiederum fördert die Proliferation von BC und Becherzellen [98]. Weiter setzen BC bei Kontakt mit Allergenen und Mikroorganismen *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) frei [57,88,108], das ebenfalls ILC und Makrophagen aktiviert. Daraufhin sezernieren diese Zellen weitere Chemokine, die eosinophile/neutrophile Makrophagen sowie Mastzellen anlocken [57,88].

Untersuchungen im Intestinaltrakt belegen die Schlüsselrolle der Freisetzung von IL-25 durch BC, bei der Auslösung einer Typ-2-Inflammation bei parasitärem Befall [51–53,65]. Definiert ist eine Typ-2-Inflammation durch die Aktivierung von T-Helferzellen-Typ 2 und ILC-2 durch IL-25, IL-33 und *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) [109]. Die durch IL-25 aktivierten ILC-2 [110] sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und weisen morphologische Ähnlichkeiten mit Lymphozyten auf. Sie setzen Zytokine wie IL-5, IL-6 und IL-13 frei [110], die zu einem Gewebsumbau mit einem massiven Anstieg der Anzahl schleimproduzierender Becherzellen und BC und zu einer Rekrutierung von Granulozyten führen, die für die Abwehr von Parasiten notwendigen sind [52,53,65,110]. IL-13 stimuliert die Vorläufer der Becherzellen und BC (Basalzellen) [108], zur Ausdifferenzierung [149]. Maina et al. wiesen diesen Rückkopplungsmechanismus auch für die Schleimhäute der oberen Atemwege nach [98].

Die Bedeutung der BC in diesem Geschehen belegen Versuche mit *POU2F3 knock out* Mäusen. Der Transkriptionsfaktor POU2F3 ist für die Expression des *Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5* (*Trpm5*) notwendig [102], der die Geschmackssignalkaskade in BC einleitet. Aufgrund dieses funktionellen Defizits zeigten *POU2F3 knock out* Mäuse einen deutlich verlängerten Infektzeitraum [65], eine lediglich mäßige Hyperplasie der Becherzellen und keine Zunahme der Anzahl an BC [53]. Durch das Fehlen von POU2F3 scheinen Becherzellen nicht mehr in der Lage zu sein, die Immunantwort zu induzieren.

ILC-2 sind nach der Einleitung einer eosinophilen Entzündung auch an der Reparatur des Gewebes beteiligt [110]. Auch das durch die BC ausgeschüttete humane β -Defensin-3 spielt in der regenerativen Phase eine Rolle [31].

Diese Befunde sind ein weiterer Beleg für die Bedeutung der BC im Epithel der Atemwege und anderer Organe. Sie aktivieren die humorale und zelluläre Immunantwort über verschiedene Mechanismen und beeinflussen so die Infektionsverläufe. Daraus leiten sich eine Vielzahl von möglichen Behandlungsansätzen und Präventionsmaßnahmen ab. Beispielsweise führt eine Infektion mit dem Respiratorischen Synzytial Virus (RS-Virus) bei Säuglingen aufgrund der kleinen Luminaldurchmesser und dem massiven Anschwellen der Atemwege häufig zu einem schweren Infektverlauf, der durch eine präventive Stimulation der BC durch eine inhalative Gabe eines entsprechenden Medikamentes verhindert werden könnte.

5.5 Mögliche weitere Funktionen der Bürstenzellen

Laut neuerer Studien scheint es verschiedene BC-Subtypen zu geben [64]. Auch in der vorliegenden Untersuchung exprimierten Zellen die BC-Marker DCAMKL1 oder POU2F3; nicht alle Zellen zeigten aber eine Doppelfluoreszenz (s. Abb. 61,62).

Denkbar wäre, dass ChAT-positive/DCAMKL1-negative Zellen POU2F3-positiv wären. Für diese Hypothese spricht, dass in der Trachea und den Hauptbronchien vermehrt reine POU2F3-Zellen auftraten. Das Gleiche galt für die rein ChAT-positive Zellen.

Darüber hinaus scheinen in verschiedenen Abschnitten unterschiedliche Subtypen zu dominieren. In Tracheahöhe ist es sinnvoll die mukoziliäre *Clearance* mit Schleimproduktion zu erhöhen, auf Ebene der Subsegmentbronchien dagegen die Steigerung der Durchblutung. Denkbar wären auch Unterschiede zwischen humanem und Tiergewebe.

Neben chemosensorischen Eigenschaften besitzen einige BC-Subpopulationen möglicherweise weitere sensorische Fähigkeiten. Die in einer Studie beschriebenen *solitary chemosensory cells* (SCC), die den BC entsprechen, exprimierten alle POU2F3. Dieser Transkriptionsfaktor ist für die Expression von Geschmacksrezeptoren notwendig (Tas1r3, Tas2rs) [113]. Bei diesen Zellen gilt die Fähigkeit der aktiven Geschmackswahrnehmung als gesichert. In der vorliegenden Studie wurden neben DCAMKL1/POU2F3 doppelt positiven Zellen auch Zellen detektiert, die ausschließlich DCAMKL1 exprimierten (s. Abb. 62). Möglicherweise werden diese BC nicht durch chemosensorische, sondern durch andere Reize stimuliert.

5.5.1 Mechanorezeption

Laut Luciano & Reale fungieren BC in der Gallenblase der Maus vermutlich als Mechanosensoren, da die lateralen Mikrovilli der BC Ähnlichkeiten mit den zytoplasmatischen Ausläu-

fern der drucksensiblen Merkelzellen und den Vibrationen-detektierenden axonalen Ausläufern der Vater-Pacini-Körperchen aufweisen [93,95]. Wenn die lichtmikroskopisch sichtbaren Mikrovilli der BC im respiratorischen Trakt auch auf mechanischen Reiz reagieren, könnten BC auch beim Einatmen von staubhaltiger Luft aktiviert werden und nachfolgend durch parakrine Sekretion von ACh NEB bzw. efferente Nervenfasern aktivieren.

5.5.2 Thermorezeption

Laut Cruz et al. kommt es beim Herunterkühlen der menschlichen Zunge im Bereich der *Papillae circumvallatae* von 35 °C auf 15 °C bzw. 5 °C zu einem signifikanten Anstieg der Bitterstoffwahrnehmung [24]. Daher scheint die Auslösung der Signalkaskade der Bitterstoffwahrnehmung nicht zwangsläufig über einen Chemorezeptor zu erfolgen.

In der Zusammenschau der bisherigen Ergebnisse wäre es möglich, dass BC schädliche Temperatureinflüsse registrieren und zusätzlich zur Kälte-bedingten Bronchokonstriktion [10] die bereits beschriebenen Abwehrmechanismen [20,75,79] zum Schutz der Atemwege auslösen.

Diese Mechanismen könnten bei der Prävention der Entwicklung einer Pneumonie eine Rolle spielen, indem sie bei der Einstellung der Temperatur der zugeführten Luft bei der maschinellen Beatmung von Patienten berücksichtigt würden.

5.6 Bürstenzellen und Asthma

Neben ihrer positiven Funktion als Wächter und Vermittlerzellen werden BC auch pathologische Funktionen, beispielsweise beim Asthma, zugeschrieben. Sie exprimieren den Marker *Regulator of G-Protein signaling 13 (Rgs13)*, der als Risikogen für Asthma identifiziert wurde [86]. Dieser Marker wird auch mit der IgE-vermittelten Mastzeldegranulation in Verbindung gebracht [8].

Weiter spielen ILC-2 beim Asthma eine Rolle, indem sie zur Verschlechterung der Symptome und zur Aktivierung einer eosinophilen Entzündungsantwort beitragen [110]. Durch Inhalation des Allergens steigt die Zahl der BC und ILC-2, wodurch eine Typ-2-Inflamationsreaktion ausgelöst wird [7]. Folgen der BC-Aktivierung sind eine Hyperplasie der Becherzellen und eine gesteigerte Schleimproduktion [52]. Ein übermäßiges Schleimaufkommen kann bei der bronchokonstriktiven Erkrankung, die Symptomatik ebenfalls verschlimmern [37,126].

Der Pathomechanismus des Asthmas ist noch nicht vollständig geklärt. Es gilt jedoch als gesichert, dass BC an der Entwicklung bzw. Exazerbation der Erkrankung beteiligt sind. Daher stellen diese Zellen auch einen potenziellen Behandlungsansatz dar. Die Bedeutung solcher

Therapieoptionen, wird daran deutlich, dass chronisches Asthma häufig in eine *Chronic obstructive pulmonary disease* (COPD) mündet [8].

5.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Zellart der BC eine heterogene Gruppe an Zellen darstellt. Was ihre Aktivierung und Funktion angeht, sind noch viele Fragen offen. Die vorliegende Untersuchung konnte feststellen, dass es BC auch in unterschiedlichen Abschnitten des humanen Bronchialbaumes bis auf die Ebene der Subsegmentbronchien und auch verschiedene Subtypen beschrieben werden können. So gab es Überlappungen des BC-Markers DCAMKL1 mit dem ChAT-Antikörper, was auf die Produktion von ACh in diesen Zellen hinweist. Als auch Überlappungen von DCAMKL1 mit dem cGRP-Antikörper, was die Sezernierung eines weiteren Neurotransmitters beweisen könnte.

Die spezifischen BC-Marker DCAMKL1 sowie POU2f3 zeigten zwar viele Überlappungen, jedoch keine vollständige Deckung. Dies ist ein Hinweis auf zwei grundlegend andere BC-Subtypen, bei denen nur die POU2f3 exprimierenden Zellen zu einer Wahrnehmung von Geschmacksreizen in der Lage sind. Die einzig DCAMKL1 exprimierenden BC konnten unter anderem im Lappenbronchus, jedoch nicht in höheren Bronchialabschnitten wie der Trachea oder den Hauptbronchien beobachtet werden. Dies könnte Hinweise auf eine andere Aktivierungsform einiger der BC in tieferen Abschnitten der Atemwege sein.

All dies könnte die Basis für die Erforschung einiger, vor allem pulmonaler, Erkrankungen und deren Ursachen darstellen. Sowie auch neue Ansätze einer innovativen Therapie dieser möglich machen könnte.

Bis dahin ist aber noch eine ausführliche Erforschung des komplexen Zellsystems der BC aber auch der generellen humanen Atemwege notwendig.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Makroanatomie Atemwege und Lunge.....	7
Abbildung 2:	Schnittführung an der Leiche.....	13
Abbildung 3:	Entnahmestellen am Bronchienpaket.....	14
Abbildung 4:	Entnahmestellen im Segmentbronchus	14
Abbildung 5:	Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung der Trachea und des Hauptbronchus ...	22
Abbildung 6:	Nachweis von G-Protein-subunit-alpha-transducin 3 (GNAT3) in der Epithelfalte der Zunge – Vergleich unterschiedlicher Vorbehandlungen....	25
Abbildung 7:	<i>Calcitonin-gene-related-peptide</i> -(cGRP)-Expression in humaner und muriner Trachea – Nachweis mit Ziegen-Antikörper (cGRP-gt)	27
Abbildung 8:	Nachweis der <i>Doublecortin-like-kinase-1</i> -(DCAMKL1)-, <i>Protein-gene-product-9.5</i> -(PGP9.5)- und <i>POU-class-2-homeobox-3</i> -(POU2F3)-Expression im Zungengewebe	30
Abbildung 9:	Nachweis der Cholinacetyltransferase-(ChAT)-Expressionen im Zungengewebe	32
Abbildung 10:	Nachweis der <i>protein-gene-product-9.5</i> -(PGP9.5) - Expression in trachealem Gewebe	35
Abbildung 11:	Nachweis der <i>protein-gene-product-9.5</i> -(PGP9.5)-Expression im Hauptbronchus	36
Abbildung 12:	Nachweis der <i>protein-gene-product-9.5</i> -(PGP9.5)-Expression im Lappenbronchus	36
Abbildung 13:	Nachweis der <i>protein-gene-product-9.5</i> -(PGP9.5)-Expression im Subsegmentbronchus	37
Abbildung 14:	Nachweis der <i>protein-gene-product-9.5</i> -(PGP9.5)-Expression im supepithelialen Gewebe	38
Abbildung 15:	<i>Calcitonin-gene-related-peptide</i> (cGRP) im Tracheaepithel.....	40
Abbildung 16:	<i>Calcitonin-gene-related-peptide</i> (cGRP) im Hauptbronchus	41

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 17:	<i>Calcitonin-gene-related-peptide</i> (cGRP) im Subsegmentbronchus	41
Abbildung 18:	<i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1) im Tracheagewebe (1:3200)	43
Abbildung 19:	<i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1) im Hauptbronchus (1:3200)	44
Abbildung 20:	<i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1) in Lappenbronchus (1:1600).....	45
Abbildung 21:	<i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1) in Subsegmentbronchus (1:1600).....	46
Abbildung 22:	<i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1) im subepithelialen Gewebe (1:1600).....	47
Abbildung 23:	<i>POU-class-2-homeobox-3</i> (POU2F3) in Trachealgewebe	49
Abbildung 24:	<i>POU-class-2-homeobox-3</i> (POU2F3) im Hauptbronchus	50
Abbildung 25:	<i>POU-class-2-homeobox-3</i> (POU2F3) in Lappenbronchus	51
Abbildung 26:	<i>POU-class-2-homeobox-3</i> (POU2F3) in Segment- und Subsegmentbronchus	52
Abbildung 27:	<i>POU-class-2-homeobox-3</i> -(POU2F3) - Expression außerhalb des Epithels	53
Abbildung 28:	Cholinacetyltransferase (ChAT) in Tracheagewebe	55
Abbildung 29:	Cholinacetyltransferase (ChAT) im Hauptbronchus	56
Abbildung 30:	Cholinacetyltransferase (ChAT) in Lappenbronchus	56
Abbildung 31:	Cholinacetyltransferase (ChAT) in Subsegmentbronchus.....	57
Abbildung 32:	Cholinacetyltransferase (ChAT) in Drüsengewebe	57
Abbildung 33:	<i>Protein-gene-product 9.5</i> (PGP9.5)/Cholinacetyltransferase (ChAT) – Doppelfärbung im Zungengewebe.....	59
Abbildung 34:	<i>Protein-gene-product 9.5</i> (PGP9.5)/Cholinacetyltransferase (ChAT) – Doppelfärbung in Tracheagewebe	60
Abbildung 35:	<i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1)/ <i>Calcitonin-gene-related-</i> <i>peptide</i> (cGRP) Doppelfärbung in Tracheagewebe	62
Abbildung 36:	<i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1)/ <i>Calcitonin-gene-related-</i> <i>peptide</i> (cGRP) Doppelfärbung im Hauptbronchus.....	63

Abbildung 37:	<i>Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1)/Calcitonin-gene-related-peptide (cGRP) Doppelfärbung im Hauptbronchusgewebe</i>	64
Abbildung 38:	<i>Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1)/Calcitonin-gene-related-peptide (cGRP) Doppelfärbung im Lappenbronchus</i>	65
Abbildung 39:	<i>Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1)/Calcitonin-gene-related-peptide (cGRP) Doppelfärbung im Lappenbronchus</i>	66
Abbildung 40:	<i>Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1)/Calcitonin-gene-related-peptide (cGRP) Doppelfärbung im Subsegmentbronchus</i>	67
Abbildung 41:	<i>Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1)/Calcitonin-gene-related-peptide (cGRP) Doppelfärbung auf Subsegmentbronchus</i>	68
Abbildung 42:	<i>Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1)/Calcitonin-gene-related-peptide (cGRP) Doppelfärbung im Subsegmentbronchus</i>	69
Abbildung 43:	<i>Cholinacetyltransferase (ChAT)/Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1) Doppelfärbung im Tracheagewebe</i>	70
Abbildung 44:	<i>Cholinacetyltransferase (ChAT)/Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1) Doppelfärbung im Hauptbronchus</i>	71
Abbildung 45:	<i>Cholinacetyltransferase (ChAT)/Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1) Doppelfärbung im Lappenbronchus</i>	72
Abbildung 46:	<i>Cholinacetyltransferase (ChAT)/Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1) Doppelfärbung im Subsegmentbronchus</i>	73
Abbildung 47:	<i>Cholinacetyltransferase (ChAT)/Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1) Doppelfärbung im Subsegmentbronchus</i>	74
Abbildung 48:	<i>Cholinacetyltransferase (ChAT)/Doublecortin-like-kinase 1 (DCAMKL1) Doppelfärbung in Drüsengewebe</i>	75
Abbildung 49:	<i>Cholinacetyltransferase (ChAT)/protein-gene-product 9.5 (PGP9.5) – Doppelfärbung in Tracheagewebe</i>	77
Abbildung 50:	<i>Cholinacetyltransferase (ChAT)/protein-gene-product 9.5 (PGP9.5) – Doppelfärbung in Tracheagewebe</i>	78
Abbildung 51:	<i>Cholinacetyltransferase (ChAT)/protein-gene-product 9.5 (PGP9.5) – Doppelfärbung im Hauptbronchus</i>	79

Abbildung 52:	Cholinacetyltransferase (ChAT)/ <i>protein-gene-product 9.5</i> (PGP9.5) – Doppelfärbung im Lappenbronchus	80
Abbildung 53:	Cholinacetyltransferase (ChAT)/ <i>protein-gene-product 9.5</i> (PGP9.5) – Doppelfärbung im Subsegmentbronchus.....	81
Abbildung 54:	Cholinacetyltransferase (ChAT)/ <i>protein-gene-product 9.5</i> (PGP9.5) – Doppelfärbung im Subsegmentbronchus.....	82
Abbildung 55:	Cholinacetyltransferase (ChAT)/ <i>protein-gene-product 9.5</i> (PGP9.5) – Doppelfärbung im Subsegmentbronchus und im Drüsengewebe.....	83
Abbildung 56:	<i>POU-class-2-homeobox-3</i> (POU2F3)/ <i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1) Doppelfärbung in Tracheagewebe	85
Abbildung 57:	<i>POU-class-2-homeobox-3</i> (POU2F3)/ <i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1) Doppelfärbung in Tracheagewebe	86
Abbildung 58:	<i>POU-class-2-homeobox-3</i> (POU2F3)/ <i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1) Doppelfärbung in Tracheagewebe	87
Abbildung 59:	<i>POU-class-2-homeobox-3</i> (POU2F3)/ <i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1) Doppelfärbung im Hauptbronchus.....	88
Abbildung 60:	<i>POU-class-2-homeobox-3</i> (POU2F3)/ <i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1) Doppelfärbung im Hauptbronchus.....	89
Abbildung 61:	<i>POU-class-2-homeobox-3</i> (POU2F3)/ <i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1) Doppelfärbung im Hauptbronchus.....	90
Abbildung 62:	<i>POU-class-2-homeobox-3</i> (POU2F3)/ <i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1) Doppelfärbung im Lappenbronchus	91
Abbildung 63:	<i>POU-class-2-homeobox-3</i> (POU2F3)/ <i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1) Doppelfärbung im Subsegmentbronchus.....	92
Abbildung 64:	<i>POU-class-2-homeobox-3</i> (POU2F3)/ <i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1) Doppelfärbung im Subsegmentbronchus.....	93
Abbildung 65:	<i>POU-class-2-homeobox-3</i> (POU2F3)/ <i>Doublecortin-like-kinase 1</i> (DCAMKL1) Doppelfärbung in Drüsengewebe	94

7 Abkürzungsverzeichnis

AcH	Acetylcholin
AHL	N-Acyl-Homoserin-Lacton
AMP	Antimikrobielle Peptide
ATP	Adenosintriphosphat
BC	Bürstenzelle, engl. <i>brushcell</i>
cGRP	<i>Calcitonin-gene-related-peptide</i>
ChAT	Cholinacetyltransferase
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCAMKL1	<i>Doublecortin-like-kinase 1</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL	Interleukin
ILC	<i>innate lymphoid cell</i>
NEB	<i>neuroepithelial bodies</i>
NEC	neuroendokrine Zelle; engl. <i>neuroendocrine cell</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
PBS	phosphate-buffered saline
PGP9.5	<i>protein-gene-product 9.5</i>
POU2F3	<i>POU-class-2-homeobox-3 (POU2F3)</i>
T2R	<i>Taste receptor family 2</i>

8 Literaturverzeichnis

1. Adriaensen D, Scheuermann DW (1993) Neuroendocrine cells and nerves of the lung. *Anat Rec* 236:70–86
2. Ahl J, Tham J, Walder M, Melander E, Odenholt I (2010) Bacterial aetiology in ventilator-associated pneumonia at a Swedish university hospital. *Scand J Infect Dis* 42:469–474
3. Alaiwa MHA, Reznikov LR, Gansemer ND, Sheets KA, Horswill AR, Stoltz DA, Zabner J, Welsh MJ (2014) pH modulates the activity and synergism of the airway surface liquid antimicrobials β -defensin-3 and LL-37. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:18703–18708
4. Ami Y, Nagata N, Shirato K, Watanabe R, Iwata N, Nakagaki K, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S, Taguchi F (2008) Co-infection of respiratory bacterium with severe acute respiratory syndrome coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Microbiol Immunol* 52:118–127
5. Bals R (2000) Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 1:5
6. Baluk P, Nadel JA, McDonald DM (1992) Substance P-immunoreactive sensory axons in the rat respiratory tract: A quantitative study of their distribution and role in neurogenic inflammation. *J Comp Neurol* 319:586–598
7. Bankova LG, Dwyer DF, Yoshimoto E, Barrett NA (2018) The cysteinyl leukotriene 3 receptor regulates expansion of IL-25–producing airway brush cells leading to type 2 inflammation. *Sci Immunol* 3:
8. Bansal G, Xie Z, Rao S, Nocka KH, Druey KM (2008) Suppression of immunoglobulin E-mediated allergic responses by regulator of G protein signaling 13. *Nat Immunol* 9:73–80
9. Basset F, Poirier J, Le Crom M, Turiaf J (1971) Ultrastructural study of the human bronchiolar epithelium. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 116:425–42
10. Berk JL, Lenner KA, McFadden ER (1987) Cold-induced bronchoconstriction: Role of cutaneous reflexes vs. direct airway effects. *J Appl Physiol* 63:659–664

11. Bo X, Alavi A, Xiang Z, Oglesby I, Ford A, Burnstock G (1999) Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. *Neuroreport* 10:1107–1111
12. Bradbury JM, Thompson RJ (1985) Immunoassay of the Neuronal and Neuroendocrine Marker PGP 9.5 in Human Tissues. *J Neurochem* 44:651–653
13. Brain S. D., Williams T. J., Tippins J. R., Morris H. R. MI (1985) Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 313:54–56
14. Brockhoff A, Behrens M, Roudnitzky N, Appendino G, Avonto C, Meyerhof W (2011) Receptor agonism and antagonism of dietary bitter compounds. *J Neurosci* 31:14775–14872
15. Brockmeier SL, Loving CL, Nicholson TL, Palmer M V. (2008) Coinfection of pigs with porcine respiratory coronavirus and *Bordetella bronchiseptica*. *Vet Microbiol* 128:36–47
16. Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3:238–250
17. Brown JS (2012) Community-acquired pneumonia. *Clin Med J R Coll Physicians London* 12:538–543
18. Chanez P, Springall D, Vignola AM, Moradoghi-Hattvani A, Polak JM, Godard P, Bousquet J (1998) Bronchial mucosal immunoreactivity of sensory neuropeptides in severe airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 158:985–990
19. Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377:428–431
20. Chilvers MA, O’Callaghan C (2000) Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatr Respir Rev* 1:27–34
21. Cillóniz C, Ewig S, Menéndez R, Ferrer M, Polverino E, Torres A (2012) Bacterial coinfection with H1N1 infection in patients admitted with community acquired pneumonia. *J Infect* 65:223–230
22. Clapp TR, Medler KF, Damak S, Margolskee RF, Kinnamon SC (2006) Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage-gated calcium channels and SNAP-25. *BMC Biol* 4:7
23. Cordier R (1964) *The cell - Chapter 5 - Sensory Cells*. Elsevier

24. Cruz A, Green BG (2000) Thermal stimulation of taste. *Nature* 403:889–892
25. Cutz E (1982) Neuroendocrine cells of the lung an overview of morphologic characteristics and development. *Exp Lung Res* 3:185–208
26. Cutz E, Jackson A (1999) Neuroepithelial bodies as airway oxygen sensors. Elsevier
27. Cutz E, Pan J, Yeger H, Domnik NJ, Fisher JT (2013) Recent advances and contraversies on the role of pulmonary neuroepithelial bodies as airway sensors. *Semin Cell Dev Biol* 24:40–50
28. Dando R, Roper SD (2012) Acetylcholine is released from taste cells, enhancing taste signalling. *J Physiol* 590:3009–3017
29. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* (80-) 280:295–298
30. DeFazio RA, Dvoryanchikov G, Maruyama Y, Kim JW, Pereira E, Roper SD, Chaudhari N (2006) Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *J Neurosci* 26:3971–3980
31. Dhople V, Krukemeyer A, Ramamoorthy A (2006) The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1758:1499–1512
32. Diamond G, Jones DE, Bevins CL (1993) Airway epithelial cells are the site of expression of a mammalian antimicrobial peptide gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4596–4600
33. Diamond G, Russell JP, Bevins CL (1996) Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5156–5160
34. Diamond G, Legarda D, Ryan LK (2000) The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev* 173:27–38
35. Dimaio MF, Dische R, Gordon RE, Kattan M (1988) Alveolar brush cells in an infant with desquamative interstitial pneumonitis. *Pediatr Pulmonol* 4:185–191
36. Eddy MC, Eschle BK, Barrows J, Hallock RM, Finger TE, Delay ER (2009) Double P2X2/P2X3 purinergic receptor knockout mice do not taste NaCl or the artificial sweetener SC45647. *Chem Senses* 34:789–797

37. Evans CM, Kim K, Tuvim MJ, Dickey BF (2009) Mucus hypersecretion in asthma: Causes and effects. *Curr Opin Pulm Med* 15:4–11
38. Ewald DA, Roper SD (1994) Bidirectional synaptic transmission in *Necturus* taste buds. *J Neurosci* 14:3791–3804
39. Feldman C, Anderson R (2012) Antibiotic resistance of pathogens causing community-acquired pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* 33:232–243
40. Feyrter F (1946) Über die These von den peripheren endokrinen Drüsen. *Wien Z Inn Med Grenzgeb* 10:9–36
41. Feyrter F (1951) Zur Pathologie des urogenitalen Helle-Zellen-Systems. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 320:564–576
42. Feyrter F (1958) Zur Frage der Endokrinie des argyrophilen Helle-Zellen-Organs im menschlichen Bronchialbaum. *Dtsch Medizinische Wochenschrift* 83:958–963
43. File TM, Marrie TJ (2010) Burden of community-acquired pneumonia in North American adults. *Postgrad Med* 122:130–141
44. Finger TE, Danilova V, Barrows J, Bartel DL, Vigers AJ, Stone L, Hellekant G, Kinnamon SC (2005) Neuroscience: ATP signalling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* (80-) 310:1495–1499
45. Freund JR, Mansfield CJ, Doghramji LJ, Adappa ND, Lee RJ (2018) Activation of airway epithelial bitter taste receptors by *Pseudomonas aeruginosa* quinolones modulates calcium, cyclic-amp, and nitric oxide signaling. *J Biol Chem* 293:9824–9840
46. Fu XW, Wang D, Nurse CA, Dinauer MC, Cutz E (2000) NADPH oxidase is an O₂ sensor in airway chemoreceptors: Evidence from K⁺ current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4374–4379
47. Fu XW, Nurse CA, Wong V, Cutz E (2002) Hypoxia-induced secretion of serotonin from intact pulmonary neuroepithelial bodies in neonatal rabbit. *J Physiol* 539:503–510
48. Fujita T, Kanno T, Kobayashi S, Fujita T, Kanno T, Kobayashi S (1988) What are Paraneurons? Springer Japan
49. Fuller JD, McGeer A, Low DE (2005) Drug-resistant pneumococcal pneumonia: Clinical relevance and approach to management. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24:780–788

50. Garcia-Vidal C, Ardanuy C, Tubau F, Carratalà J (2010) Pneumococcal pneumonia presenting with septic shock: Host- and pathogen-related factors and outcomes. *Thorax* 65:77–81
51. Gerbe F, Legraverend C, Jay P (2012) The intestinal epithelium tuft cells: Specification and function. *Cell Mol Life Sci* 69:2907–2917
52. Gerbe F, Jay P (2016) Intestinal tuft cells: Epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal Immunol* 9:1353–1359
53. Gerbe F, Sidot E, Smyth DJ, Ohmoto M, Matsumoto I, Jay P (2016) Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 529:226–230
54. Goniakowska-Witalińska L (1997) Neuroepithelial bodies and solitary neuroendocrine cells in the lungs of amphibia. *Microsc Res Tech* 37:13–30
55. Gordon REY, Kattan M (1984) Absence of cilia and basal bodies with predominance of brush cells in the respiratory mucosa from a patient with immotile cilia syndrome. *Ultrastruct Pathol* 6:45–49
56. Gray EG, Watkins KC (1965) Electron microscopy of taste buds of the rat. *Zeitschrift für Zellforsch und Mikroskopische Anat* 66:583–595
57. Harada M, Hirota T, Jodo AI, Doi S, Kameda M, Fujita K, Tamari M (2009) Functional analysis of the thymic stromal lymphopoietin variants in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40:368–374
58. Hauser-Kronberger C, Hacker GW, Franz P, Albegger K, Dietze O (1997) CGRP and substance P in intraepithelial neuronal structures of the human upper respiratory system. *Regul Pept* 72:79–85
59. Herrero FS, Olivas JB (2012) Microbiology and risk factors for community-acquired pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* 33:220–231
60. Hijiya K, Okada Y, Tankawa H (1977) Ultrastructural Study of the Alveolar Brush Cell. *J Electron Microsc (Tokyo)* 26:321–329
61. Hijiyah K (1978) Electron Microscope Study of the Alveolar Brush Cell. *J Electron Microsc (Tokyo)* 27:223–227
62. Hiratsuka T, Nakazato M, Date Y, Ashitani JI, Minematsu T, Chino N, Matsukura S (1998) Identification of human β -defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem Biophys Res Commun* 249:943–947

63. Höfer D, Drenckhahn D (1992) Identification of brush cells in the alimentary and respiratory system by antibodies to villin and fimbrin. *Histochemistry* 98:237–242
64. Hollenhorst MI, Jurastow I, Nandigama R, Appenzeller S, Li L, Vogel J, Wiederhold S, Althaus M, Empting M, Altmüller J, Hirsch AKH, Flockerzi V, Canning BJ, Saliba AE, Krasteva-Christ G (2020) Tracheal brush cells release acetylcholine in response to bitter tastants for paracrine and autocrine signaling. *FASEB J* 34:316–332
65. Howitt MR, Lavoie S, Michaud M, Blum AM, Tran S V., Weinstock J V., Gallini CA, Redding K, Margolskee RF, Osborne LC, Artis D, Garrett WS (2016) Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science* (80-) 351:1329–1333
66. Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Tränkner D, Ryba NJP, Zuker CS (2006) The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442:934–938
67. Huang YJ, Maruyama Y, Lu KS, Pereira E, Plonsky I, Baur JE, Wu D, Roper SD (2005) Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter. *J Neurosci* 25:843–847
68. Iwanaga T, Yui R, Kuramoto H, Fujita T (1987) *The Paraneuron Concept and its Implications in Neurobiology*. Springer Berlin Heidelberg
69. Jingguo Chen^{1, 2, §}, Eric D. Larson^{2, 3 §}, Catherine B. Anderson^{2, 3}, Pratima Agarwal³, Daniel N. Frank⁴, Sue C. Kinnamon^{2, 3} VRR (2018) Expression of bitter taste receptors and solitary chemosensory cell markers in the human sinonasal cavity. *J Gerontol A Biol sci Med Sci* 2008–2010
70. Jinno S, Hua XY, Yaksh TL (1994) Nicotine and acetylcholine induce release of calcitonin gene-related peptide from rat trachea. *J Appl Physiol* 76:1651–1656
71. Kaya N, Shen T, Lu S, Zhao F, Herness S (2004) A paracrine signaling role for serotonin in rat taste buds: expression and localization of serotonin receptor subtypes. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 286:R649–R658
72. Keith IM, Pelto-Huikko M, Schalling M, Hökfelt T (1991) Calcitonin gene-related peptide and its mRNA in pulmonary neuroendocrine cells and ganglia. *Histochemistry* 96:311–315
73. Kim D-J, Roper SD (1995) Localization of serotonin in taste buds: A comparative study in four vertebrates. *J Comp Neurol* 353:364–370

74. Klein MK, Haberberger R V., Hartmann P, Faulhammer P, Lips KS, Krain B, Wess J, Kummer W, König P (2009) Muscarinic receptor subtypes in cilia-driven transport and airway epithelial development. *Eur Respir J* 33:1113–1121
75. Krasteva G, Canning BJ, Hartmann P, Veres TZ, Papadakis T, Mühlfeld C, Schliecker K, Tallini YN, Braun A, Hackstein H, Baal N, Weihe E, Schütz B, Kotlikoff M, Ibanez-Tallon I, Kummer W (2011) Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9478–83
76. Krasteva G, Canning BJ, Papadakis T, Kummer W (2012) Cholinergic brush cells in the trachea mediate respiratory responses to quorum sensing molecules. *Pergamon*
77. Krasteva G, Kummer W (2012) Tasting the airway lining fluid. *Histochem Cell Biol* 138:365–383
78. Kummer W, Lips KS (2006) Non-neuronal acetylcholine release and its contribution to COPD pathology. *Drug Discov Today Dis Mech* 3:47–52
79. Kummer W, Lips KS, Pfeil U (2008) The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol* 130:219–234
80. Lamb JP, Sparrow MP (2002) Three-dimensional mapping of sensory innervation with substance P in porcine bronchial mucosa: Comparison with human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 166:1269–1281
81. Laube DM, Yim S, Ryan LK, Kisich KO, Diamond G (2006) Antimicrobial peptides in the airway. *Curr Top Microbiol Immunol* 306:153–182
82. Lauweryns JM, Van Lommel AT, Dom RJ (1985) Innervation of rabbit intrapulmonary neuroepithelial bodies. Quantitative and qualitative ultrastructural study after vagotomy. *J Neurol Sci* 67:81–92
83. Lauweryns JM, Van Ranst L (1988) Protein gene product 9.5 expression in the lungs of humans and other mammals. Immunocytochemical detection in neuroepithelial bodies, neuroendocrine cells and nerves. *Neurosci Lett* 85:311–316
84. Lee RJ, Xiong G, Kofonow JM, Chen B, Lysenko A, Jiang P, Abraham V, Doghramji L, Adappa ND, Palmer JN, Kennedy DW, Beauchamp GK, Doulias PT, Ischiropoulos H, Kreindler JL, Reed DR, Cohen NA (2012) T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *J Clin Invest* 122:4145–4159

85. Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A (1995) Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377:432–435
86. Li MJ, Liu Z, Wang P, Wong MP, Nelson MR, Kocher JPA, Yeager M, Sham PC, Chanock SJ, Xia Z, Wang J (2016) GWASdb v2: An update database for human genetic variants identified by genome-wide association studies. *Nucleic Acids Res* 44:D869–D876
87. Linnoila RI (2006) Functional facets of the pulmonary neuroendocrine system. *Lab Investig* 86:425–444
88. Liu Y-J, Soumelis V, Watanabe N, Ito T, Wang Y-H, de Waal Malefyt R, Omori M, Zhou B, Ziegler SF (2007) TSLP: An Epithelial Cell Cytokine that Regulates T Cell Differentiation by Conditioning Dendritic Cell Maturation. *Annu Rev Immunol* 25:193–219
89. Livermore S, Zhou Y, Pan J, Yeager H, Nurse CA, Cutz E (2015) Pulmonary neuroepithelial bodies are polymodal airway sensors: Evidence for CO₂/H⁺ sensing. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 308:L807–L815
90. Luciano L, Reale E, Ruska H (1968) Über eine chemorezeptive Sinneszelle in der Trachea der Ratte. *Zeitschrift für Zellforsch und Mikroskopische Anat* 85:350–375
91. Luciano L, Reale E, Ruska H (1969) Bürstenzellen im Alveolarepithel der Rattenlunge. *Zeitschrift für Zellforsch und Mikroskopische Anat* 95:198–201
92. Luciano L, Reale E, Engelhardt W v. (1980) The fine structure of the stomach mucosa of the llama (*Llama guanacoe*). *Cell Tissue Res* 208:207–228
93. Luciano L, Reale E (1990) Brush cells of the mouse gallbladder - A correlative light- and electron-microscopical study. *Cell Tissue Res* 262:339–349
94. Luciano L, Reale E (1992) The “Limiting Ridge” of the Rat Stomach. *Arch Histol Cytol* 55:131–138
95. Luciano L, Reale E (1997) Presence of brush cells in the mouse gallbladder. *Microsc Res Tech* 38:598–608
96. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Lunge. Georg Thieme Verlag URL: https://eref.thieme.de/ebooks/2444813#/ebook_2444813_SL91313436 BT - Taschenlehrbuch Histologie [Zugriff am 21.01.2021]

97. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Atemwege. Georg Thieme Verlag URL: https://eref.thieme.de/ebooks/2444813#/ebook_2444813_SL91313308 BT - Taschenlehrbuch Histologie [Zugriff am 21.01.2021]
98. Maina IW, Workman AD, Cohen NA (2018) The role of bitter and sweet taste receptors in upper airway innate immunity: Recent advances and future directions. *World J Otorhinolaryngol - Head Neck Surg* 4:200–208
99. Maisetta G, Batoni G, Esin S, Luperini F, Pardini M, Bottai D, Florio W, Giuca MR, Gabriele M, Campa M (2003) Activity of human β -defensin 3 alone or combined with other antimicrobial agents against oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3349–3351
100. Martín-Loeches I, Sanchez-Corral A, Diaz E, Granada RM, Zaragoza R, García MÁ (2011) Community-acquired respiratory coinfection in critically III patients with pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus. *Chest* 139:555–562
101. Martín-Loeches I, Solé-Violán J, Rodríguez De Castro F, García-Laorden MI, Borderías L, Blanquer J, Rajas O, Briones ML, Aspa J, Herrera-Ramos E, Marcos-Ramos JA, Sologuren I, González-Quevedo N, Ferrer-Agüero JM, Noda J, Rodríguez-Gallego C (2012) Variants at the promoter of the interleukin-6 gene are associated with severity and outcome of pneumococcal community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med* 38:256–262
102. Matsumoto I, Ohmoto M, Narukawa M, Yoshihara Y, Abe K (2011) Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. *Nat Neurosci* 14:685–687
103. McBride JT, Springall DR, Winter RJD, Polak JM (2012) Quantitative Immunocytochemistry Shows Calcitonin Gene-related Peptide-like Immunoreactivity in Lung Neuroendocrine Cells Is Increased by Chronic Hypoxia in the Rat. <http://dx.doi.org/101165/ajrcmb/36587> [Zugriff am 21.01.2021]
104. McDonald DM, Mitchell RA, Gabella G, Haskell A (1988) Neurogenic inflammation in the rat trachea. II. Identity and distribution of nerves mediating the increase in vascular permeability. *J Neurocytol* 17:605–628
105. Merigo F, Benati D, Tizzano M, Osculati F, Sbarbati A (2005) α -Gustducin immunoreactivity in the airways. *Cell Tissue Res* 319:211–219
106. Merigo F, Benati D, Di Chio M, Osculati F, Sbarbati A (2007) Secretory cells of the airway express molecules of the chemoreceptive cascade. *Cell Tissue Res* 327:231–247

107. Monteiro-Riviere NA, Popp JA (1984) Ultrastructural characterization of the nasal respiratory epithelium in the rat. *Am J Anat* 169:31–43
108. Montoro DT, Haber AL, Biton M, Vinarsky V, Rajagopal J (2018) A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* 560:319–324
109. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa JI, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S (2010) Innate production of TH 2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit⁺ Sca-1⁺ lymphoid cells. *Nature* 463:540–544
110. Moro K, Koyasu S (2015) Innate lymphoid cells, possible interaction with microbiota. *Semin Immunopathol* 37:27–37
111. Nadjombati MS, McGinty JW, Lyons-Cohen MR, Jaffe JB, DiPeso L, Schneider C, Miller CN, Pollack JL, Nagana Gowda GA, Fontana MF, Erle DJ, Anderson MS, Locksley RM, Raftery D, von Moltke J (2018) Detection of Succinate by Intestinal Tuft Cells Triggers a Type 2 Innate Immune Circuit. *Immunity* 49:33-41.e7
112. Novotny NM, Markel TA, Crisostomo PR, Meldrum DR (2008) Differential IL-6 and VEGF secretion in adult and neonatal mesenchymal stem cells: Role of NFκB. *Cytokine* 43:215–219
113. Ohmoto M, Yamaguchi T, Yamashita J, Bachmanov AA, Hirota J, Matsumoto I (2013) Pou2f3/Skn-1a is necessary for the generation or differentiation of solitary chemosensory cells in the anterior nasal cavity. *Biosci Biotechnol Biochem* 77:2154–2156
114. Parr MB, Parr EL (1989) Immunohistochemical localization of secretory component and immunoglobulin A in the urogenital tract of the male rodent. *J Reprod Fertil* 85:115–124
115. Parsek MR, Greenberg EP (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8789–8793
116. Pearson JP, Passador L, Iglewski BH, Greenberg EP (1995) A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1490–1494

117. Pearson JP, Feldman M, Iglewski BH, Prince A (2000) *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect Immun* 68:4331–4334
118. Pilmane M, Luts A, Sundler F (1995) Changes in neuroendocrine elements in bronchial mucosa in chronic lung disease in adults. *Thorax* 50:551–554
119. Plasschaert L, Žilionis R, Choo-wing R, Savova V, Knehr J, Roma G, Klein AM, Jaffe AB (2018) A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature*
120. Profita M, Bonanno A, Siena L, Ferraro M, Montalbano AM, Pompeo F, Riccobono L, Pieper MP, Gjomarkaj M (2008) Acetylcholine mediates the release of IL-8 in human bronchial epithelial cells by a NFκB/ERK-dependent mechanism. *Eur J Pharmacol* 582:145–153
121. Qaqish R, Yeger H, Cutz E (2009) Myelination of NEB associated vagal afferents in the newborn rat lung.
122. Ramírez-Estrada S, Borgatta B, Rello J (2016) *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management. *Infect Drug Resist* 9:7–18
123. Reid L, Meyrick B, Antony VB, Chang L-Y, Crapo JD, Reynolds HY (2005) The Mysterious Pulmonary Brush Cell. *Am J Respir Crit Care Med* 172:136–139
124. Rhodin J, Dalhamn T (1956) Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Zeitschrift für Zellforsch und Mikroskopische Anat* 44:345–412
125. Rhodin JA (1966) The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *Am Rev Respir Dis* 93:
126. Rogers DF (2004) Airway mucus hypersecretion in asthma: An undervalued Pathology? *Curr Opin Pharmacol* 4:241–250
127. Romanov RA, Rogachevskaja OA, Bystrova MF, Jiang P, Margolskee RF, Kolesnikov SS (2007) Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO J* 26:657–667
128. Sbarbati A, Osculati F (2005) A new fate for old cells: brush cells and related elements. *J Anat* 206:349

129. Schaller-Bals S, Schulze A, Bals R (2002) Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *Am J Respir Crit Care Med* 165:992–995
130. Schätz B, Jurastow I, Bader S, Ringer C, von Engelhardt J, Chubakov V, Gudermann T, Diener M, Kummer W, Krasteva-Christ G, Weihe E (2015) Chemical coding and chemosensory properties of cholinergic brush cells in the mouse gastrointestinal and biliary tract. *Front Physiol* 6:87
131. Schiebler TH, Korf H-W (2007) *Thorax*. Steinkopff, Heidelberg. URL: http://link.springer.com/10.1007/978-3-7985-1771-4_10 [Zugriff am 21.01.2021]
132. Schling P (2019) *Geschmack aus Sicht der Biologie*. Springer Spektrum, Wiesbaden
133. Schmitz F (2020) *Atmungsorgane und Pleura*. Georg Thieme Verlag URL: https://eref.thieme.de/ebooks/cs_11350838#/ebook_cs_11350838_cs8264 BT - Duale Reihe Anatomie [Zugriff am 21.01.2021]
134. Schutte BC, McCray PB (2002) β -Defensins in Lung Host Defense. *Annu Rev Physiol* 64:709–748
135. Sechet E, Telford E, Bonamy C, Sansonetti PJ, Sperandio B (2018) Natural molecules induce and synergize to boost expression of the human antimicrobial peptide β -defensin-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E9869–E9878
136. Song H, Yao E, Lin C, Gacayan R, Chen MH, Chuang PT (2012) Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:17531–17536
137. Springall DR, Edginton JA, Price PN, Swanston DW, Noel C, Bloom SR, Polak JM (1990) Acrolein depletes the neuropeptides CGRP and substance P in sensory nerves in rat respiratory tract. *Environ Health Perspect* 85:151–157
138. Stahlman MT, Gray ME (1993) Colocalization of peptide hormones in neuroendocrine cells of human fetal and newborn lungs: An electron microscopic study. *Anat Rec* 236:206–212
139. Stockley RA, Burnett D (1980) Local IgA production in patients with chronic bronchitis: Effect of acute respiratory infection. *Thorax* 35:202–206

140. Tamaki M, Iwanaga T, Takeda M, Adachi I, Sato S, Fujita T (1992) Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)-Immunoreactive Nerve Terminals in the Whole Mount Preparations of the Dog Urethra. *Arch Histol Cytol* 55:1–11
141. Tang HB, Dimango E, Bryan R, Gambello M, Iglewski BH, Goldberg JB, Prince A (1996) Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun* 64:37–43
142. Taruno A, Vingtdoux V, Ohmoto M, Ma Z, Dvoryanchikov G, Li A, Adrien L, Zhao H, Leung S, Abernethy M, Koppel J, Davies P, Civan MM, Chaudhari N, Matsumoto I, Hellekant G, Tordoff MG, Marambaud P, Foskett JK (2013) CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature* 495:223–226
143. Thompson RJ, Doran JF, Jackson P, Dhillon AP, Rode J (1983) PGP 9.5-a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res* 278:224–228
144. Tizzano M, Gulbransen BD, Vandenbeuch A, Clapp TR, Herman JP, Sibhatu HM, Churchill MEA, Silver WL, Kinnamon SC, Finger TE (2010) Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3210–3215
145. Tsutsumi Y (1989) Immunohistochemical analysis of calcitonin and calcitonin gene-related peptide in human lung. *Hum Pathol* 20:896–902
146. Van Lommel A, Bolle T, Fannes W, Lauweryns JM (1999) The Pulmonary Neuroendocrine System: The Past Decade. *Arch Histol Cytol* 62:1–16
147. Venturi V, Subramoni S (2009) Future research trends in the major chemical language of bacteria. *HFSP J* 3:105–116
148. Von Baum H, Welte T, Marre R, Suttorp N, Ewig S (2010) Community-acquired pneumonia through Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*: Diagnosis, incidence and predictors. *Eur Respir J* 35:598–605
149. Von Moltke J, Ji M, Liang HE, Locksley RM (2016) Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature* 529:221–225
150. Watson JH, Brinkman GL (1964) Electron microscopy of the epithelial cells of normal and bronchitic human bronchus. *Am Rev Respir Dis* 90:851–866

151. Weichselbaum M, Everett AW, Sparrow MP (1996) Mapping the Innervation of the Bronchial Tree in Fetal and Postnatal Pig Lung Using Antibodies to PGP 9.5 and SV2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:703–710
152. Weichselbaum M, Sparrow MP, Hamilton EJ, Thompson PJ, Knight DA (2005) A confocal microscopic study of solitary pulmonary neuroendocrine cells in human airway epithelium. *Respir Res* 6:1–11
153. Welte T, Torres A, Nathwani D (2012) Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax* 67:71–79
154. White SR, Hershenson MB, Sigrist KS, Zimmermann A, Solway J (2012) Proliferation of Guinea Pig Tracheal Epithelial Cells Induced by Calcitonin Gene-related Peptide. <http://dx.doi.org/10.1165/ajrcmb/86592>
155. Woodhead M (2002) Community-acquired pneumonia in Europe: Causative pathogens and resistance patterns. European Respiratory Society
156. Zeitz KP, Guy N, Malmberg AB, Dirajlal S, Martin WJ, Sun L, Bonhaus DW, Stucky CL, Julius D, Basbaum AI (2002) The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci* 22:1010–1019

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mir auf dem Weg zu dieser Arbeit jederzeit zur Seite gestanden und mich unterstützt haben.

Mein erster Dank gebührt Frau Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ, die diese Untersuchung auf vielen Ebenen erst möglich gemacht hat und die Überlassung des Themas. Danke für die ausgezeichnete Expertise, die interessanten Diskussionen, die Geduld und das Vertrauen in mein Arbeiten. Diese Zusammenarbeit hat mir die Türen zur medizinischen Forschung geöffnet und wird mich nachhaltig prägen.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Tschernig bedanken, der als Leiter der Prosektur der Medizinischen Fakultät in Homburg die Probenentnahme an Körperspendern ermöglichte und so die Voraussetzungen für die Experimente geschaffen hat.

Dank gebührt auch den Mitarbeitern der AG Krasteva-Christ für die mentale Unterstützung und Betreuung. Hier allen voran Dr. Stephan Marxeiner, der mir stets eine besondere Stütze und Hilfe auf dem nicht immer einfachen Weg zu einer experimentellen Promotion war.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die immer hinter mir stehen. Danke für all die Unterstützung, Motivation und Glauben an die Sache, auch in schwierigen Zeiten. Danke für unzählige aufbauende und stärkende Gespräche und, dass ihr immer für mich da seid. Mehr geht nicht.

10 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen, in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberaterinnen/Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

Ort, Datum

Unterschrift der/des Promovierenden