

**Die Bürstenzelle stimuliert parakrin über Acetylcholin die Mucinfreisetzung aus
dem Gallenblasenepithel**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Schayan Faraj Tabrizi
aus Hannover

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Anatomie und Zellbiologie

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Gutachter: PD Dr. Martin Roderfeld

Tag der Disputation: 18.02.2026

Widmung
Meinen Eltern

Life can only be understood backwards; but it must be lived forwards. – Søren Kierkegaard

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Gallenblase	1
1.1.1 Anatomie	1
1.1.2 Histologie der Gallenblasenwand.....	2
1.1.2.1 Cholangiozyten	4
1.1.3 Gefäßversorgung.....	4
1.1.4 Lymphabfluss.....	4
1.1.5 Innervation.....	5
1.1.6 Embryogenese.....	6
1.1.6.1 Extrahepatische Gallenwege.....	6
1.1.7 Physiologie der Gallenblasenentleerung	10
1.1.8 Regulation der Gallenblasenentleerung	11
1.2 Mucus	13
1.2.1 Eigenschaften und physiologische Funktion von Mucus in der Gallenblase	14
1.2.1.1 Freisetzung von Mucinen in der Gallenblase.....	17
1.3 Das Mikrobiom der Gallenblase	17
1.4 Die Bürstenzelle	18
1.4.1 Vorkommen der Bürstenzellen	19
1.4.2 Charakteristika von Bürstenzellen	20
1.4.3 Die Funktion der Bürstenzellen	21
1.4.3.1 Die Bürstenzelle in der Gallenblase	22
1.5 Acetylcholin	24
1.6 Optogenetik	25
1.6.1 Channelrhodopsin-2.....	26
1.7 Ziel der Arbeit	26
2. Material und Methoden	28
2.1 Versuchstiere	28
2.2 Tiertötung und Gewebeaufbereitung	28
2.2.1 Tiertötung und Explantation der Gallenblasen.....	29
2.2.2 Stimulation der Gallenblasen	29
2.2.2.1 Optogenetische Stimulation	30
2.2.2.2 Chemische Stimulation	32
2.2.3 Gewebeaufbereitung für die Elektronenmikroskopie	33
2.3 Elektronenmikroskopie und Point Counting-Methode	35
2.4 Computerprogramme	38

2.5 Statistische Analyse.....	38
3. Ergebnisse.....	39
3.1 Morphologie von Cholangiozyten der Gallenblase	39
3.2 Ultrastruktur der Bürstenzelle der Gallenblase	40
3.3 Muskarin bewirkt eine Exozytose der Mucingranula	44
3.4 Eine optogenetische Aktivierung der Bürstenzelle in <i>Chat</i> -ChR2-EYFP- Mäusen senkt die Volumendichte der Mucingranula in den Cholangiozyten ..	46
3.5 Propionat induziert die Exozytose von Mucingranula über einen cholinergen Mechanismus.....	48
3.6 Der Chrm3-Rezeptor vermittelt den cholinergen Effekt der Bürstenzelle an den Cholangiozten	50
4. Diskussion.....	52
4.1 Diskussion der Methodik	52
4.2 Physiologische Bedeutung der Mucinsekretion	54
4.3 Mögliche Herkunft von Propionat.....	56
4.4 Limitationen	58
5. Zusammenfassung.....	58
6. Summary.....	59
7. Abkürzungsverzeichnis	60
8. Abbildungsverzeichnis	62
9. Tabellenverzeichnis	63
10. Formelverzeichnis.....	64
11. Literaturverzeichnis	64
12. Publikationsverzeichnis.....	85
13. Ehrenwörtliche Erklärung.....	86
14. Danksagung.....	86
15. Appendix.....	88
15.1 AAAS Author License to Publish Policy	88

1. Einleitung

1.1 Die Gallenblase

1.1.1 Anatomie

Die Gallenblase (Vesica biliaris) ist ein birnenförmiges, akzessorisches und intraperitoneal gelegenes Speicherorgan für die in der Leber produzierte Galle.

Zusammen mit dem Ductus hepaticus sinister et dexter, dem Ductus cysticus und dem Ductus choledochus zählt sie zu den extrahepatischen Gallenwegen, die Galle speichern und in das Duodenum drainieren. Die Galle stammt aus den intrahepatischen Gallenwegen, die bis zur Leberpforte gehen und die von den Hepatozyten produzierte Galle der Leber in die extrahepatischen Gallenwege drainieren. Zusammen bilden sie ein stark verzweigtes und funktionelles tubuläres Netzwerk (Han et al., 2013).

Anatomisch wird die Gallenblase in vier Regionen unterteilt: Gallenblasenboden (Fundus vesicae biliaris), Gallenblasenkörper (Corpus vesicae biliaris), Trichter (Infundibulum vesicae biliaris) und Gallenblasenhals (Collum vesicae biliaris) (Abbildung 1). In der Maus liegt die Gallenblase dorsal am zentralen Isthmus des Lobus quadratus der Leber. Dort ist sie über lockeres Bindegewebe, worin sich lymphatische sowie venöse Gefäße befinden, mit der Leber verbunden. Der nicht mit der Leber verbundene Teil der Gallenblase ist wie die Leber vom Peritoneum überzogen.

Die Gallenblase drainiert die Galle über den Ductus cysticus in den Ductus choledochus, beide haben keine peristaltische Motilität. Im Ductus cysticus befindet sich kein Sphinkter. Der Ductus choledochus und der Ductus pancreaticus, der das Pankreassekret drainiert, bilden am Kopf des Pankreas eine Vereinigung, die Ampulla hepatopancreatica. Sie penetrieren die Wand des Duodenums, so dass dort eine kleine Vorwölbung (Papilla duodeni major) entsteht. Diese Einmündungsstruktur beinhaltet auch einen Komplex verschiedener Einzelmuskeln, die durch ihre Sphinkterfunktionen die Abgabe von Gallenflüssigkeit und Pankreassekret in die Pars descendens duodeni kontrollieren (Housset et al., 2016; Oldham-Ott & Gilloteaux, 1997).

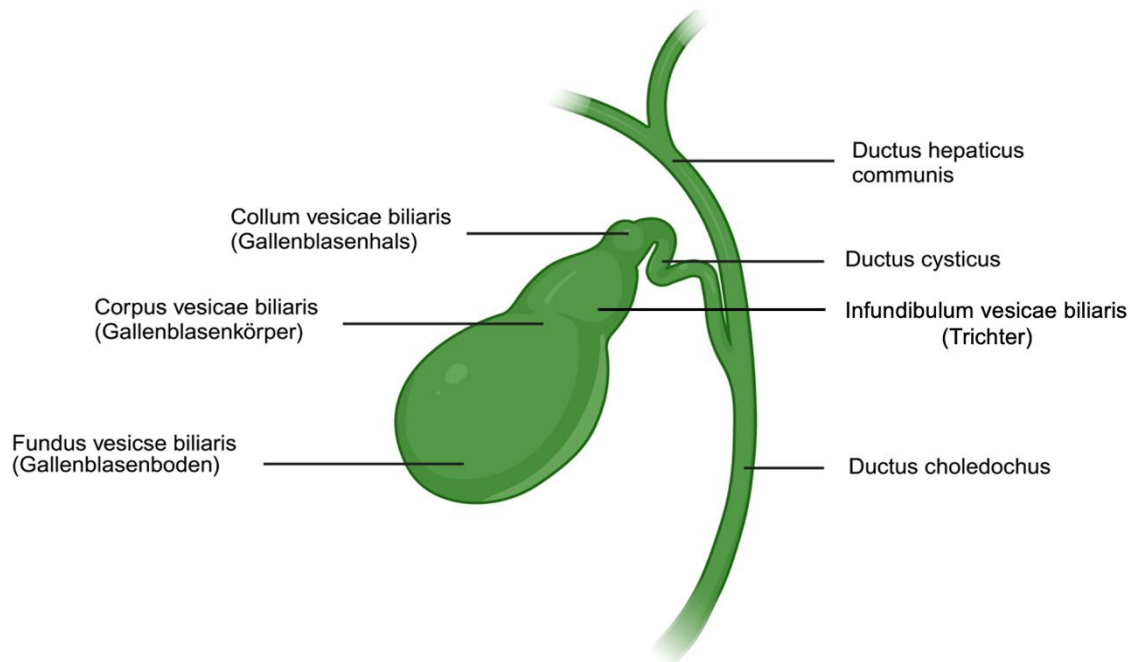


Abbildung 1: Anatomischer Aufbau der Gallenblase.
Schematische Darstellung der extrahepatischen Gallenwege der Maus.

1.1.2 Histologie der Gallenblasenwand

Die Gallenblasenwand besteht aus vier Schichten: Tunica mucosa, Tunica muscularis, Tela subserosa und Tunica serosa. Anders als andere Bereiche des Gastrointestinaltrakts besitzt die Gallenblase keine Lamina muscularis mucosae (Housset et al., 2016; Treuting & Dintzis, 2015). Die Tunica mucosa (Schleimhaut) besteht aus einer Epithelzellschicht, der Lamina epithelialis, und einer gefäßreichen Lamina propria. Die Epithelzellschicht ist einschichtig und hochprismatisch und mit kurzen Mikrovilli besetzt (Abbildung 2) (Hayward & Johnston, 1961; Oldham-Ott & Gilloteaux, 1997). Den dominierenden Anteil des transportierenden Epithels bilden Hauptzellen, sogenannte Cholangiozyten, die für den Wasserentzug der Galle sowie den Schutz der Schleimhaut durch Sekretion von Mucinen verantwortlich sind. Becherzellen fehlen. Flaschenförmige Bürstenzellen, deren Mikrovilli sich durch ihre Länge und ihre tiefe Verankerung im Zytoplasma durch Aktinfilamentbündel von denen der Cholangiozyten unterscheiden, sind auch Teil der Lamina epithelialis (Oldham-Ott & Gilloteaux, 1997; Treuting & Dintzis, 2015; Yamada, 1955). Bis auf das Vorkommen von Proteinen der Geschmackstransduktionskaskade ist die Funktion der biliären Bürstenzelle größtenteils unbekannt (Finger & Kinnamon, 2011; Luciano & Reale, 1969; Luciano & Reale, 1979, 1990; Luciano et al., 1968; Luciano & Reale, 1997).

Die Tunica mucosa zeigt außerdem eine extreme Auffaltung. Die Einbuchtungen reichen teils bis in die Tunica muscularis (Rokitansky-Aschoff-Krypten) und formen polygonale

Einsenkungen. Entsprechend des Füllungszustandes der Gallenblase ändern sich die Auffaltungen in ihrer Dichte, Form und Tiefe (Oldham-Ott & Gilloteaux, 1997; Yamada, 1955).

Die nächste Schicht der Gallenblasenwand ist die Tunica muscularis. Scherengitterartig angeordnete Bündel glatter Muskelzellen bilden spiralförmige Muskelzüge, so dass eine optimale Kontraktion und Entleerung des Organs ermöglicht wird. Zwischen den Muskelbündeln befinden sich breite Bindegewebssepten, die Kollagen und elastische Fasern enthalten (Treuting & Dintzis, 2015).

Die letzte Schicht der Gallenblase, die der Leber anliegt, wird von einer Tela subserosa und Tunica adventitia ausgebildet. Der übrige Teil bildet mit der Tunica serosa den Übergang zum Peritoneum aus (Housset et al., 2016; Treuting & Dintzis, 2015).

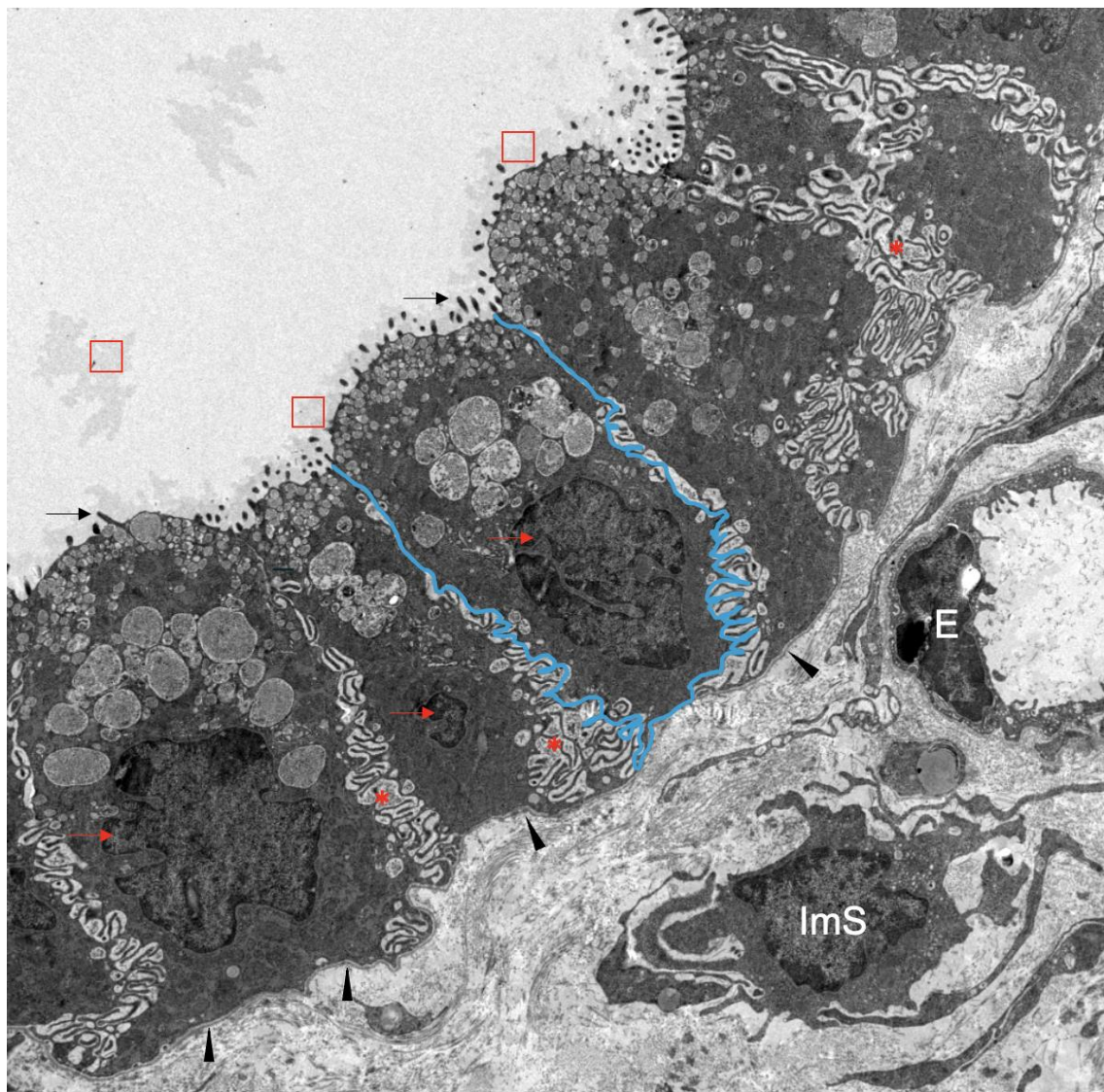


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme des Gallenblasenepithels der Maus.

In dieser elektronenmikroskopischen Übersichtsaufnahme ist der dominierende Zelltyp des Gallenblasenepithels erkennbar (blau umrandet). Die Cholangiozyten in ihrer hochprismatischen Form bilden die Lamina epithelialis der Tunica mucosa (Schleimhautschicht) der Gallenblase. Zur luminalen Oberflächenvergrößerung der Zelle tragen Mikrovilli (schwarze Pfeile) bei. Luminal außerhalb der Zelle ist ein Schleimfilm erkennbar (rote Kästen), der von Mucinen gebildet wird. Zwischen den Epithelzellen sind parazelluläre Auffaltungen sichtbar (rote Sternchen). In der apikalen Zellregion sind Mucingranula sichtbar, deren Größe zum Lumen hin abnimmt. In der basalen Zellregion erkennt man den Zellkern (rote Pfeile). Nach basal werden die Epithelzellen von der Basallamina (schwarze Pfeilspitzen) begrenzt. Des Weiteren ist eine Endothelzelle (E) der Blutversorgung sowie eine Zelle des Immunsystems (ImS) erkennbar. Dabei handelt es sich hier um einen Makrophagen.

1.1.2.1 Cholangiozyten

Cholangiozyten sind eine heterogene Zellpopulation, die die Lamina epithelialis der Gallenwege bilden. Entlang der intra- und extrahepatischen Gallenwege transportieren und modifizieren sie die von den Hepatozyten gebildete Galle über einen koordinierten Transport von Ionen, Wasser und anderen löslichen Molekülen. Ihre regulatorische Funktion auf die Eigenschaften der Galle wird maßgeblich von Peptiden, Hormonen, Neurotransmittern und Gallensäuren gesteuert (Tabibian et al., 2013).

1.1.3 Gefäßversorgung

Die Gallenblase wird arteriell über die Arteria cystica, welche dem Ramus dexter der Arteria hepatica propria entspringt, versorgt. Die Arteria hepatica propria zieht zusammen mit der Vena portae hepatis und dem Ductus choledochus im Ligamentum hepatoduodenale zur Porta hepatis (Leberpforte). Manchmal entspringt die Arteria cystica auch aus der Arteria hepatica sinistra, der Arteria hepatica communis oder der Arteria gastroduodenalis. Venöses Blut der Gallenblase wird über ein Netzwerk kleiner Gefäße sowie über die Vena cystica drainiert, welche dann in die Vena portae mündet (Halvorsen & Myking, 1971).

1.1.4 Lymphabfluss

Die Lymphflüssigkeit der Gallenblase drainiert über zwei unterschiedliche Wege. Zum einen drainiert sie in die präaortalen, um den Truncus coeliacus gelegenen Lymphknoten, den Nodi lymphatici coelici. Zum anderen drainiert sie in Lymphknoten am oberen und hinteren Rand der Bauchspeicheldrüse entlang der Arteria

pancreaticoduodenalis superior in die Nodi lymphatici pancreaticoduodenales superiores (Sato et al., 2013).

1.1.5 Innervation

Die Motilität der Gallenblase wird hormonell und neural gesteuert. In der Gallenblase kommen sympathische, parasympathische und sensorische Nervenfasern aus dem Plexus hepaticus vor.

Während Ganglien, also Anhäufungen von Nervenzellkörpern, sich nur in bestimmten Schichten der Gallenblasenwand befinden, verlaufen ihre Nervenfasern in allen drei Schichten (Balemba et al., 2004; Gilloteaux et al., 1989; Mawe et al., 1997; Talmage et al., 1996).

In der Tunica serosa befinden sich die meisten Ganglien, sie sind über nicht-mylinierte Nervenfaserbündel miteinander verbunden. In der Tunica serosa verlaufen die Nervenfasern zusammen mit den Blutgefäßen.

In der Tunica muscularis, die im Gegensatz zum Menschen bei der Maus kaum ausgeprägt ist, befindet sich ein Nervenplexus, der jedoch keine Ganglien enthält. Gleiches gilt für para- und perivaskuläre Muskelschichten.

Auch die Lamina propria der Tunica mucosa beinhaltet Nervenbündel, deren Nervenenden bis zur Lamina epithelialis reichen (Wahlin et al., 1977).

Die Neuronen der Gallenblase bestehen aus zwei homogenen Populationen. Anders als im Gastrointestinaltrakt, in dem 8 unterschiedliche Neuronentypen cholinerge und nicht-cholinerge Nervenzellen beinhalten, sind alle Neuronen innerhalb der Gallenblase cholinerg und immunreaktiv für die Cholin-Acetyltransferase (ChAT), welche die Synthese des Neurotransmitters Acetylcholin bewerkstelligt (Balemba et al., 2004; Mawe et al., 1997; Talmage et al., 1996).

Über 80% der Neuronen sind neben ChAT immunreaktiv für Substanz P, Neuropeptid Y, Somatostatin und Nociceptin/Orphanin. Alle anderen Neuronen sind immunreaktiv für Vasoaktives Intestinales Peptid, Pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide (PACAP) und Stickstoffmonoxid-Synthase (Balemba et al., 2004; Sundler et al., 1977; Talmage et al., 1996; Uemura et al., 2015).

Elektrophysiologische Studien in Meerschweinchen und Menschen zeigten, dass die Neuronen in der Gallenblase keine spontanen Aktionspotentiale aufweisen. Lediglich extrinsische Impulse, beispielsweise über den Nervus vagus, die die in der Gallenblasenwand lokalisierten Neuronen erreichen, induzieren deren Aktivierung und

die daran gekoppelte Sekretion von Neurotransmittern an die Zielzellen (Balemba et al., 2004).

Zusammenfassend ist das neuronale Netzwerk der Gallenblase für die Nozizeption (Schmerzwahrnehmung) und den Tonus der Gallenblasenwand zuständig. Außerdem beeinflusst es über Neuropeptide und Neurotransmitter Zielzellen innerhalb des Epithels (Housset et al., 2016; Mawe et al., 1997; Talmage et al., 1996).

1.1.6 Embryogenese

Das intra- und extrahepatische Gallengangssystem haben eine unterschiedliche Ontogenese, dennoch bilden sie ein gemeinsames funktionelles Netzwerk, um die Galle in das Duodenum abzuleiten. Beide Gallengangssysteme drainieren die von den Hepatozyten der Leber produzierte Galle und sind dabei von weitgehend gleichen Epithelzellen ausgekleidet, den Cholangiozyten (Han et al., 2013).

Die extrahepatischen Gallenwege beinhalten den Ductus hepaticus dexter und sinister, die Gallenblase, den Ductus cysticus sowie den Ductus choledochus (Cardinale et al., 2012; Roskams & Desmet, 2008; Zong & Stanger, 2011) und bilden sich vor den intrahepatischen Gallenwegen aus (Clotman et al., 2002). Die intrahepatischen Gallenwege entwickeln sich zusammen mit der Leber aus Hepatoblasten-ähnlichen Zellen zu Cholangiozyten (Antoniou et al., 2009; Raynaud et al., 2011).

Die Ausbildung extra- sowie intrahepatischer Gallenwege erfordert Zell-Zell-Interaktionen, die zu einer Regulation von Zelldifferenzierung und Morphogenese beitragen (Raynaud & Carpentier, et al., 2011). Die Entstehung der Anastomose beider Systeme ist bisher nicht verstanden (Tan & Moscoso, 1994b). Für die Entwicklung beider Systeme sind sowohl das HHEX-Gen (*Hex homeobox gene*) (Hunter et al., 2007) sowie die HNF6/HNF1 β (*Hepatocyte Nuclear Factor 6/Hepatocyte Nuclear Factor 1 beta*) Transkriptionskaskade unerlässlich (Clotman et al., 2002; Coffinier et al., 2002).

1.1.6.1 Extrahepatische Gallenwege

Die Anatomie des extrahepatischen Gallengangsystems, welches die Gallenblase, den Ductus hepaticus dexter et sinister sowie den Ductus choledochus zusammenfasst, ist beim Menschen und der Maus gleich, jedoch ist ihre Embryologie unterschiedlich (Higashiyama et al., 2016).

Die Vorläuferzellen der extrahepatischen Gallenwege entstammen bei der Maus, anders als im Menschen, nicht von den Hepatozyten. Auch besteht während der Entwicklung,

im Gegensatz zum Menschen (Tan & Moscoso, 1994a, 1994b), kein kontinuierlicher Kontakt zur Leber (Lemaigre, 2010). Eine eigenständige endodermale Formation am ventralen Darmrohr entwickelt sich zum ventralen Pankreas, dem extrahepatischen Ausflusstrakt sowie zur Gallenblase. Die Expression der Transkriptionsfaktoren SOX17 (*SRY-box transcription factor 17*) und PDX1 (*pancreatic and duodenal homeobox 1*) ist dabei von besonderer Bedeutung (Spence et al., 2009).

Am 8.-9. Tag nach Implantation des Embryos (E8.5) wächst das Mesenchym des Septum transversum, eine Formation zwischen Herz- und Bauchhöhle, nach posterior, kaudal der Leberanlage. Dort wird die Entwicklung von Vorläuferzellen der extrahepatischen Gallenwege zusammen mit der des ventralen Pankreas induziert, indem das Protein BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*) die Differenzierung zu Vorläuferzellen initiiert, in denen SOX17 und PDX1 induziert werden (Saito et al., 2013; Spence et al., 2009; Uemura et al., 2015).

Am 10.-11. Tag nach Implantation des Embryos (E10.5) liegt die Anlage der extrahepatischen Gallenwege an einer Elongation des Darmrohrs zwischen der Leberknospe und dem ventralen Pankreas in einer endodermalen Formation.

Die Gallenblase und der Ductus cysticus erheben sich initial als ein tubuläres Netzwerk (Pars cystica), das durch eine Elongation des kaudalen Teils der Leberanlage (Leberdivertikel) gebildet wird (Abbildung 3a).

Ein Teil des Pankreas liegt dorsal, der andere ventral des Darmrohrs. Das dorsale und ventrale Pankreas fusionieren, nachdem der ventrale Part im Uhrzeigersinn um den kaudalen Teil des Darmrohrs rotiert (Abbildung 3b). Während der Rotation gelangen der Ductus choledochus und der Ductus pancreaticus in ihre endgültige Position dorsal des Duodenums. Zunächst drainiert das Pankreas durch den ventralen Teil und verschmilzt mit dem Ductus choledochus auf Höhe der Papilla duodeni major des Duodenums (Tomita & Hara, 2022). Durch Verschmelzung des ventralen und dorsalen Teil des Pankreas entsteht der Ductus pancreaticus (Adkins et al., 2000; Tomita & Hara, 2022).

Die Dilatation der Gallenblase und der gemeinsame funktionelle Abfluss des Pankreas und der Leber erfolgen in etwa zeitgleich (Roskams & Desmet, 2008). Die äußere Schicht der Gallenblase und der Ductus cysticus entwickeln sich aus der Kondensation der Mesenchymzellen um die ursprüngliche epitheliale (endodermale) Masse.

Ein Pool von Vorläuferzellen des extrahepatischen Gallengangssystems sowie des Pankreas co-exprimiert initial die Transkriptionsfaktoren PDX1 und SOX17. PDX1-negative/SOX17-positive Zellen bilden Vorläuferzellen der Gallenblase, PDX1-positive/SOX17-negative Zellen Vorläuferzellen des ventralen Pankreas (Abbildung 3c). Eine Deletion von SOX17 führt also zu einem unmittelbarem Verlust biliärer Strukturen mit einem Ersatz durch Gewebe des Pankreas (Spence et al., 2009). Vorläuferzellen

von Hepatozyten und des intrahepatischen Gallengangssystems sind hingegen PDX1-negative Zellen. Außerdem erfordert die Entwicklung der Gallenblase über den Sonic-Hedgehog-Signalweg den Transkriptionsfaktor Foxf1 (*Forkhead box f1*). Die Expression von Foxf1 beschränkt sich auf das ventrale Mesoderm, das zur Bildung des Darmrohrs beiträgt, wozu die Gallenblase, die Leber, das Pankreas und der Darm gehören. Eine Haploinsuffizienz von Foxf1 resultiert in Mäusen in einer gestörten Organogenese der Gallenblase mit Malformation der glatten Muskelschicht innerhalb der Tunica muscularis, reduzierter mesenchymaler Zellzahl sowie fehlender biliärer Epithelzellschicht (Kalinichenko et al., 2002). Sumazaki beschreibt außerdem den Transkriptionsfaktor HES-1 (*Hairy and Enhancer of Splithomolog-1*) als wesentlich für die Entwicklung der extrahepatischen Gallenwege (Sumazaki et al., 2004).

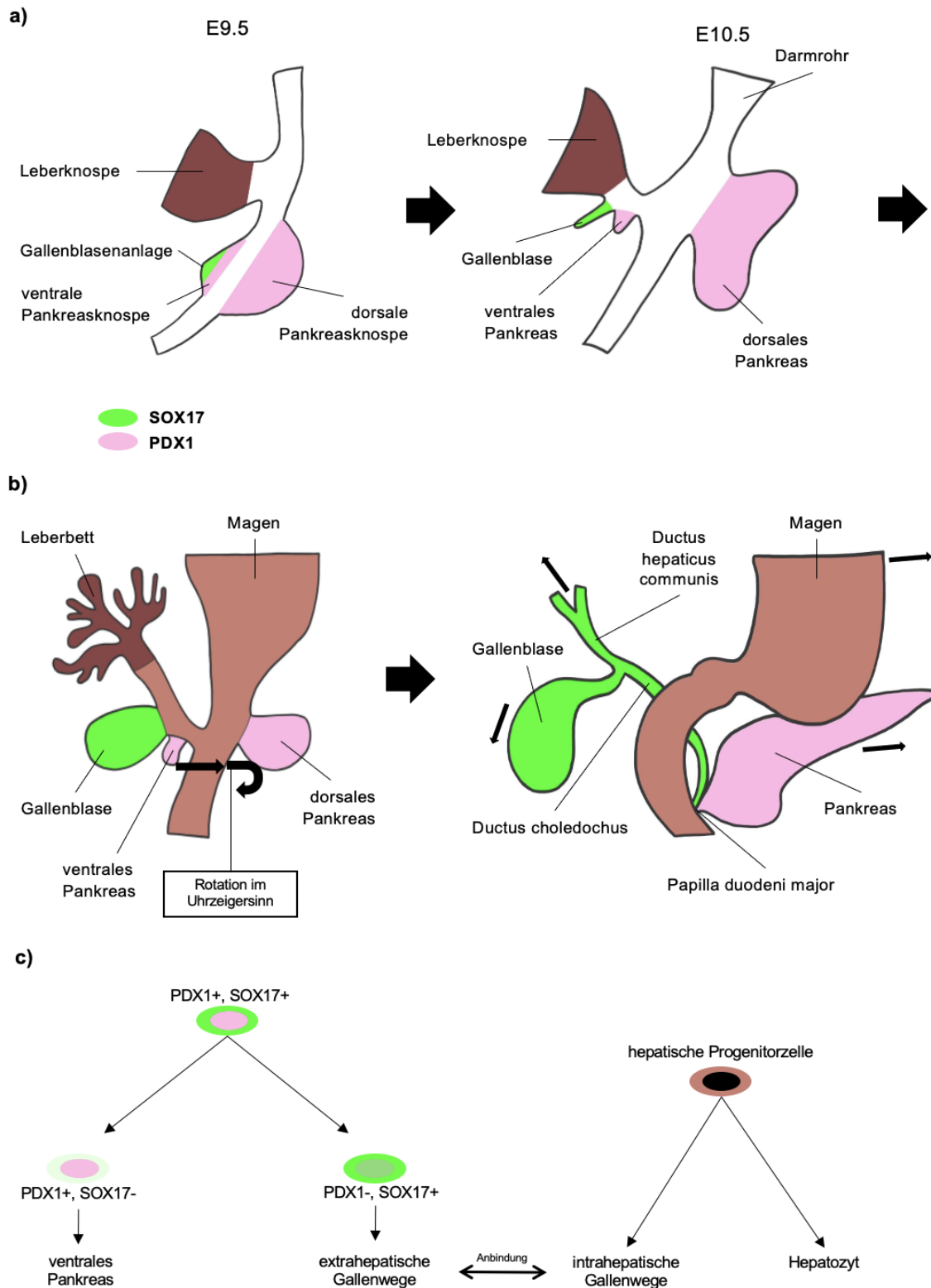


Abbildung 3: Die Entwicklung der extrahepatischen Gallenwege in der Maus.

a) Entwicklung der extrahepatischen Gallenwege. In der Maus liegt die Gallenblasenanlage an einer Elongation des Darmrohrs zwischen der Leberknospe und dem ventralen Pankreas.

b) Entwicklung von Leber, Pankreas und Gallengangssystem. Links: Die Gallenblase und der Ductus cysticus entstehen zunächst als gemeinsame tubuläre Struktur. Diese liegt zwischen der Elongation des kaudalen Teils der Leberanlage und dem ventralen Pankreas. Durch eine Rotation im Uhrzeigersinn am kaudalen Darmrohr fusionieren das

ventrale und dorsale Pankreas. Rechts: Während der Fusion vereinigen sich der Ductus choledochus und der Ductus pancreaticus in ihrer endgültigen Position in der Papilla duodeni major.

c) Molekulare Regulation der extra- und intrahepatischen Gallenwege. PDX1 und SOX17 regulieren die Entwicklung der extrahepatischen Gallenwege.
EX = X. Tag nach Implantation des Embryos.

1.1.7 Physiologie der Gallenblasenentleerung

Unter physiologischen Bedingungen speichert die Gallenblase den Großteil (etwa 80%) der von der Leber produzierten Galle zwischen. Anschließend reguliert sie die Abgabe der Galle in das Duodenum (Lanzini et al., 1987). Entscheidend dafür, ob die von der Leber produzierte Galle zwischengespeichert wird oder direkt in den Gastrointestinaltrakt fließt, ist der kontraktile Zustand der Gallenblase und des Musculus sphincter Oddi (Torsoli et al., 1990). In der interdigestiven Phase fließt die Galle durch den Druck bevorzugt zu 90% in die Gallenblase statt direkt in den Ductus choledochus. Dort wird sie gespeichert und konzentriert (Krishnamurthy & Krishnamurthy, 2002). Etwa 10% der Galle fließt durch frequente Kontraktionen des Musculus sphincter Oddi und dem zwischenzeitlichen Zuwachs des Drucks in der Gallenblase kontinuierlich als Leck in das Duodenum (Toouli et al., 1986). Vermutlich wird dadurch der enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren in der interdigestiven Phase aufrecht erhalten (Housset et al., 2016). Da sich die Gallenblase dem Volumen anpasst, führen auch erhebliche Volumenänderungen nur zu kleinen Änderungen des intraluminalen Drucks. Im Rahmen der Nahrungsaufnahme bewirkt die aktive Kontraktion der Gallenblase eine Erhöhung des intraluminalen Drucks gefolgt von einem intraluminalen Druckanstieg im Ductus choledochus. Die Relaxation des Musculus sphincter Oddi erlaubt dann den Abfluss der Galle zur Verdauung und Absorption von Nahrungsfetten im Duodenum.

Die Entleerung der Gallenblase bei Nahrungsaufnahme wird grundsätzlich in drei Phasen unterteilt. In der postprandialen Phase wird die Galle schnell ausgetrieben, gefolgt von einer Auffüllungsphase, in der die Gallenblase 30 min postprandial das größte Volumen hat. In der dritten Phase entleert sich die Gallenblase langsam aber kontinuierlich über 2 Stunden (Howard et al., 1991). Die Gallenblase entleert ca. 80% ihres Volumens. Überlagert von den drei Phasen wird die Entleerung der Gallenblase von wiederholten kurzen Perioden der Füllung und Entleerung unterbrochen (Abiru et al., 1994; Itoh & Takahashi, 1981; Lanzini et al., 1987; Traynor et al., 1984).

Eine Überfüllung der Gallenblase durch den kontinuierlichen Zufluss frischer Galle aus der Leber wird durch einen kontinuierlichen Abfluss der Galle in das Duodenum verhindert.

Trotz kontinuierlicher Zu- und Abflüsse wird besonders im distalen Teil der Gallenblase, also am Gallenblasenboden, die Galle ständig konzentriert (Howard et al., 1991; Kaufman, 1959).

1.1.8 Regulation der Gallenblasenentleerung

Die Entleerung der Gallenblase wird durch Nahrungsaufnahme und -verdauung reguliert; dies wird über neurohormonelle Signale vermittelt. Zum einen beeinflussen Phasen der Nahrungsaufnahme die Regulation der Gallenblasenentleerung, zum anderen neurogene Einflüsse.

Bereits in der cephalischen Phase, also vor der Nahrungsaufnahme, entleert sich die Gallenblase bis auf etwa die Hälfte des Volumens (Fisher et al., 1986; Howard et al., 1991). Die Menge der Entleerung entspricht der gleichen wie bei einer direkten cholinergen Stimulation, die mit dem muskarinergen Acetylcholinrezeptorblocker Atropin aufgehoben werden kann (Fisher et al., 1986). Ebenfalls bewirkt eine elektrische Stimulation des vorderen Hypothalamus eine Kontraktion der Gallenblase mit simultaner Relaxation des Musculus sphincter Oddi. Dabei steigt die Plasmakonzentration des Peptidhormons Cholezystokinin, welches postprandial der Hauptauslöser der Gallenblasenkontraktion ist, nicht an. Die neuronale Stimulation kann mit einer cervicalen Vagotomie aufgehoben werden (Furukawa & Okada, 1991). Zusammenfassend kann die Gallenblase also bereits vor Nahrungsaufnahme und unabhängig von Cholezystokinin in der cephalischen Phase kontrahieren und Galle austreiben. Hier haben neuronale Mechanismen, in denen der Nervus vagus sowie cholinerge Signalwege eine Rolle spielen, einen größeren Effekt als hormonelle Trigger (Fisher et al., 1986; Housset et al., 2016).

In der postprandialen Phase, also nach der Nahrungsaufnahme, ist der Hauptstimulus der Entleerung das gastrointestinale Peptidhormon Cholezystokinin (Setchell et al., 1982). Cholezystokinin wird von enteroendokrinen Zellen des proximalen Dünndarms sezerniert. Dies geschieht, wenn Nahrungsbrei das Duodenum passiert. Cholezystokinin kontrolliert neben der Entleerung der Gallenblase auch die Entleerung des Pankreassekrets aus dem Ductus pancreaticus (zusammengefasst von Housset et al., 2016). Cholezystokinin besteht aus 8-58 Aminosäuren und agiert über die G-Protein gekoppelten Cholezystokininrezeptoren CCK1-R und CCK2-R. Insbesondere CCK1-R ist auf den glatten Muskelzellen in der Gallenblase präsent und hat eine 1000-fach höhere Affinität zu Cholezystokinin als zu Gastrin (Konno et al., 2015; Schjoldager et al., 1989). Die physiologische Relevanz von Cholezystokinin wird dennoch hinterfragt, da

die EC50 (*Half maximal effective concentration*) einer durch Cholezystokinin induzierten Gallenblasenkontraktion *in vitro* viel höher liegt als die *in vivo* postprandial gemessene Serumkonzentration (Tokunaga et al., 1993). In elektrophysiologischen Studien konnte außerdem der Einfluss von Cholezystokinin auf präsynaptische vagale Neuronen gezeigt werden (Abbildung 4) (Mawe et al., 1997). Cholezystokinin stimuliert auch die Sekretion von Endothelin-1 (Housset et al., 1993), welches von den Cholangiozyten produziert wird (Fouassier et al., 1998; Housset et al., 1993) und insbesondere bei einer akuten Cholezystitis für einen erhöhten Muskeltonus sorgt (Al-Jiffry et al., 2004; Al-Jiffry et al., 2002). Neben dem Einfluss auf den Muskeltonus der Gallenblase reduziert Cholezystokinin den Tonus des Musculus sphincter Oddi, was ebenfalls zur Entleerung der Galle beiträgt. Sobald Gallensäuren im Duodenum vorhanden sind, wird die postprandiale Sekretion von Cholezystokinin gehemmt (Gomez et al., 1988; Malagelada et al., 1973). Das gastrointestinale Hormon Motilin stimuliert auch die muskuläre Gallenblasenwand (Itoh et al., 1982).

Eine weitere Säule der Regulation der Gallenblasenentleerung stellt die neurogene Regulation dar. Eine Stimulation durch den Nervus vagus vermittelt einen cholinergen präganglionären Stimulus an die Neuronen der Gallenblase. Dies geschieht über nikotinerge Acetylcholinrezeptoren (nAChR). Die postganglionären Neuronen setzen wiederum den Neurotransmitter Acetylcholin an ihren Axonenden frei, welches den muskarinischen Acetylcholinrezeptor Chrm3 (*Cholinergic Receptor Muscarinic 3*) auf den glatten Muskelzellen aktiviert, so dass die Gallenblase kontrahiert (Balemba et al., 2004; Eltze et al., 1997; Stengel & Cohen, 2002). Tachykinine, eine Neuropeptidfamilie, die Substanz P enthält, sind ebenfalls Neurotransmitter. Sie wurden in einem Großteil von Neuronen in Gallenblasen gefunden, die auch für eine Gallenblasenkontraktion verantwortlich sind. Über den Neurokininrezeptor-2 (NK2R) bewirken sie eine Gallenblasenkontraktion (Guo et al., 1989; Yau, 1990).

Norepinephrin hingegen reduziert präsynaptisch über den α_2 -Adrenozeptor die Acetylcholinsekretion und hindert damit die Kontraktion. Das Vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) oder Stickstoffmonoxid (NO) werden von inhibitorischen Neurotransmittern in der Gallenblasenwand sezerniert und hindern ebenfalls die Kontraktion (Housset et al., 2016).

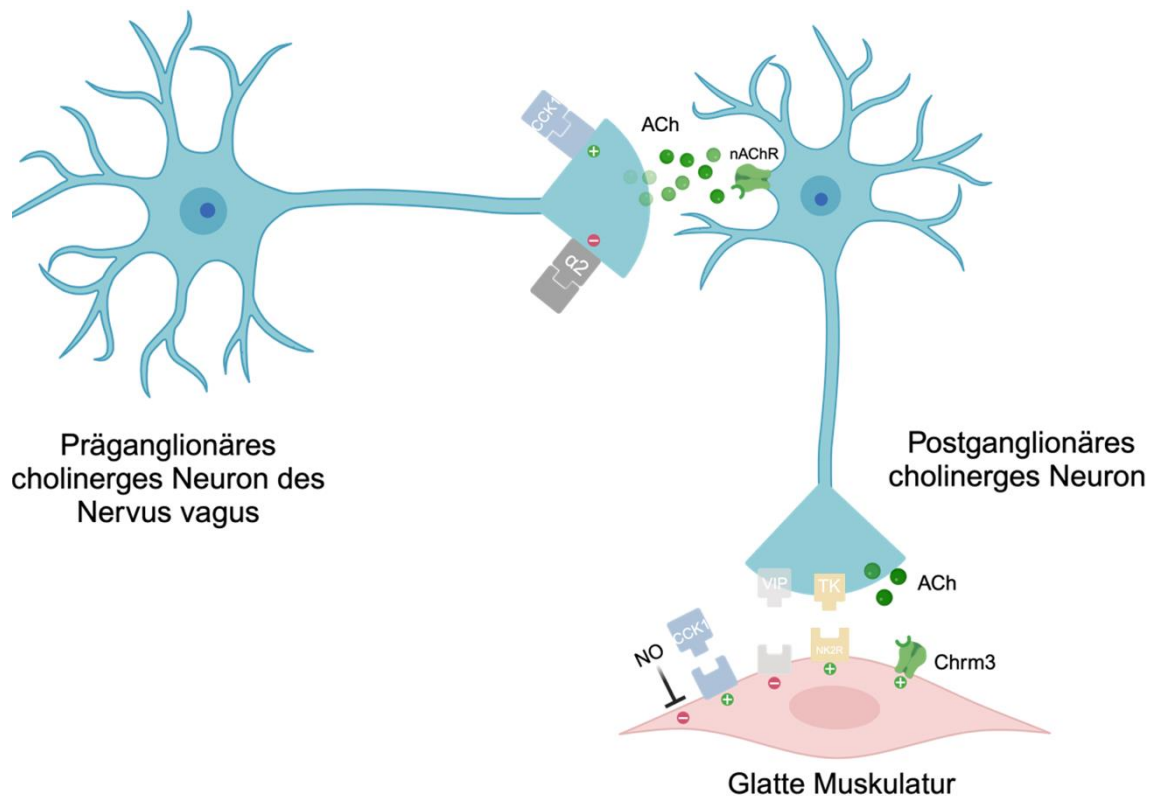


Abbildung 4: Neuronale Regulation der Gallenblase.

Präganglionäre Axonenden des Nervus vagus vermitteln eine cholinerge Signalübertragung auf postganglionäre Neuronen der Gallenblase, die hauptsächlich in der Tunica serosa lokalisiert sind. Dies wird über den nAChR vermittelt. Stimulierte Neuronen der Gallenblase sezernieren Acetylcholin und Tachykinine, die über den Chrm3 bzw. den NK2R eine Kontraktion glatter Muskelzellen bewirken. Cholezystokinin induziert über das präsynaptische Neuron eine erhöhte Acetylcholinsekretion und über den hoch affinen CCK1-R eine direkte Kontraktion glatter Muskelzellen. Norepinephrin reduziert über einen α_2 -Adrenorezeptor die postsynaptische Acetylcholinsekretion und hindert damit die Kontraktion. Eine Untergruppe von Neuronen in der Gallenblasenwand sezerniert inhibitorische Neurotransmitter. Dazu zählen das VIP oder NO.

1.2 Mucus

Mucus ist ein Sekret, das von Schleimhäuten produziert wird. Er besteht aus Glykoproteinen, anorganischen Salzen und Wasser. Mucus haftet an vielen epithelialen Oberflächen und ist Teil von Diffusionsbarrieren. Als chemische Barriere schützt er gegen für den Organismus schädliche Substanzen, auch dient er in einigen Organen als Schmiermittel (Allen et al., 1993; Chuang et al., 2011). Mucine sind die Hauptbestandteile des Mucus und sorgen für gelartige Eigenschaften (Moniaux et al., 2001). Mucinproteine sind Glycoproteine mit einem großen Molekulargewicht. Verzweigte Seitenketten aus Oligosacchariden bilden mit sich wiederholenden Aminosäuresequenzen aus Threonin, Serin und Prolin eine „Flaschenbürsten-artige“

Form der Mucine (Abbildung 5) (Yurewicz et al., 1982). Charakteristika von epithelialen Mucinen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Grundsätzlich sind Mucine in zwei strukturelle und funktionelle Einheiten organisiert: Membrangebundene Mucine (MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC17 und MUPCDH (*Mucin-like Protocadherin*)) sind an der Zelloberfläche lokalisiert. MUC2, MUC5AC, MUC5B und MUC6 werden von Epithelzellen sezerniert und bieten einen gelartigen Schutz für die darunter liegende Tunica mucosa (Sasaki et al., 2007).

Mucingene codieren für Mucinmonomere, die einen stabförmigen Apomucinkern ausbilden. Bis zum aktuellen Zeitpunkt sind 20 Mucingene auf unterschiedlichen Chromosomen identifiziert (Keicho & Hijikata, 2011). Neun Mucingene werden aktuell mit der Gallenblase und den assoziierten Erkrankungen in Verbindung gebracht. Dabei handelt es sich um MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUCPCDH, deren Charakteristika in Tabelle 2 zusammengefasst werden.

Die meisten Mucingene befinden sich an zwei Orten auf den Chromosomen 7q22 und 11p15.5 (Paris & Williams, 2000; Pigny et al., 1996).

Molekulares Gewicht	120x10 ⁶ Dalton
Konfiguration	Flaschenbürstenform
Anteil Kohlenhydrate	65-80%
Anteil Proteine	20-30%
Charakteristische funktionelle Gruppen	Negativ geladene Sulfat- und Carboxylgruppen

Tabelle 1: Charakteristika von epithelialen Mucinen.

1.2.1 Eigenschaften und physiologische Funktion von Mucus in der Gallenblase

Das Mucinprotein in der Gallenblase wird synthetisiert und sezerniert durch Cholangiozyten. Die Identifizierung dieser mucinproduzierenden Zellen erfolgte durch Sheen et al., die über eine PAS-Färbung (*Periodic acid-Schiff Reaction*) die stark glykosylierten Mucine in den Sekretionsgranula innerhalb der Gallenblasenepithels sichtbar machten (Sheen et al., 1998).

MUC2, MUC5AC, MUC5B und MUC6 werden von den Epithelzellen der Gallenblase gebildet und formen Polymere, die für die viskösen, elastischen und schützenden Eigenschaften des Mucus verantwortlich sind.

Die membrangebundenen Proteine MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4 und MUPCDH besitzen eine hydrophobe Domäne, die in der Zellmembran verankert ist. Sie bilden keinen gelartigen Mucus (Vilkin et al., 2007).

Der Proteinkern der Mucine in der Gallenblase lässt sich in zwei Domänen aufteilen. Eine Domäne ist glykosyliert und besteht zu großen Teilen aus Serin, Theonin und

Prolin. Sie ist durch kovalente Bindungen mit einer hohen Dichte an Kohlenhydraten glykolisiert. Über eine O-Glykolysierung sind die Mucine mit GalNac (N-Acetylgalactosamin) verknüpft, welches wiederum GalNacs oder Gals (Galaktose) bindet. Die andere Domäne ist nicht glykosyliert und besteht aus den Aminosäuren Serin, Glutamat, Glutamin und Glycin (Abbildung 5). Sie bindet hydrophobe Liganden wie Bilirubin und 8-Anilinonaphtalin-1-Sulfonsäure (Afdhal et al., 1990). Chuang et al. beschreiben, dass insbesondere eine Störung der hydrophoben Domäne zur Bildung von Cholesterolsteinen im Rahmen einer Cholelithiasis beitragen kann.

Die in Tabelle 2 aufgeführten Mucine kommen nicht in gleicher Häufigkeit vor. Die primären Mucine des Gallenblasenepithels im Menschen sind MUC3, MUC5B und MUC6 (Lee & Liu, 2001), wobei MUC5B dominiert (Van Klinken et al., 1998).

Ho et al. stellten die Hypothese auf, dass Mucine der schleimproduzierenden Zellen in Schichten organisiert sind. MUC1 und MUC3 schützen als membrangebundene Mucine die apikale Zellmembran, MUC5AC und MUC5B bilden die nächste weiter luminale Schicht, während MUC5B und MUC6 die letzte Schicht bilden und auch die dominierende Mucusschicht in Falten und Krypten sind (Ho et al., 2000).

Die Präsenz und Zusammensetzung verschiedener Mucine in der Gallenblase sind wichtig für den Schutz gegen die detergentischen Eigenschaften von Gallensäuren (Ho et al., 2000; Vilkin et al., 2007). Inflammatorische Zytokine, bakterielle Metabolite, Proliferationsfaktoren, Chemikalien, Schadstoffe und das Immunsystem selbst können zu einer Überexpression von Mucinen führen (Maurer et al., 2009; Rege & Prystowsky, 1998; Singh et al., 2019; Thai et al., 2008; Zen et al., 2002). Die Menge, Größe, Konzentration und chemischen Eigenschaften der Mucine können aufgrund oben genannter Umstände die Natur des Mucingels entscheidend verändern (Thornton & Sheehan, 2004). Beispielsweise zeigten Finzi et al., dass über den inflammatorischen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) eine Überproduktion des gelbildenden MUC5AC stimuliert wird. TNF- α (Tumornekrosefaktor- α), Interleukin-1 β , p38 und MSK1 (*Mitogen- and stress-activated protein kinase-1*), die durch COX-2 (Cyclooxygenase-2), Prostaglandin-E2-Rezeptor und Proteinkinase-A reguliert werden, werden auch mit einer Überproduktion von MUC5AC in Verbindung gebracht (Finzi et al., 2006).

Mucin	Chromosomaler Locus	Anzahl an Aminosäuren	Funktion
MUC1	1q21	273	Membrangebundenes Mucin
MUC2	11p15.5	5179	Gelformendes Mucin
MUC3A	7q22	1486	Membrangebundenes Mucin
MUC3B	7q22	310	Membrangebundenes Mucin
MUC4	3q29	5412	Membrangebundenes Mucin
MUC5AC	11p15.5	1962	Gelformendes Mucin
MUC5B	11p15.5	5762	Gelformendes Mucin
MUC6	11p15.5	2439	Gelformendes Mucin
MUPCDH	11p15.5	839	Membrangebundenes Mucin

Tabelle 2: Gallenblasenassoziierte Mucine.

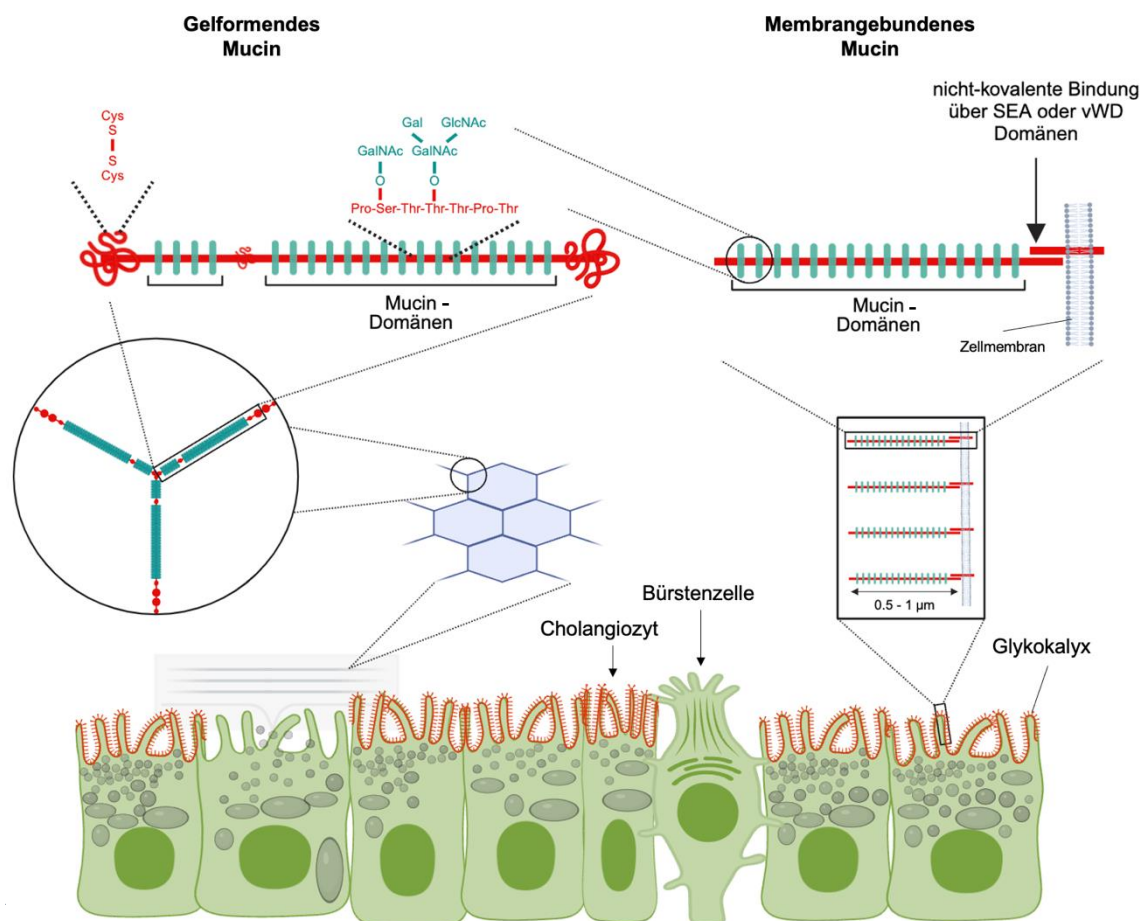


Abbildung 5: Strukturelle Konfiguration von gelformenden Mucinen am Beispiel von MUC2. Vereinfachtes Modell von gelformenden Mucinen durch muköse Epithelzellen, also Cholangiozyten. Transmembranöse Mucine haften an der apikalen Zellmembran der Cholangiozyten.

Links: Das MUC2-Polymer ist innerhalb von Cholangiozyten in Granula verpackt (grau). Während der Sekretion ändern die Granula ihre Form zu kleinen runden Strukturen, die

dicht beieinander anliegen. Die Vergrößerung zeigt die oligometrische Struktur der MUC2-Polymere. Weiter oben erkennt man ein MUC2-Monomer mit den zentralen Domänen und den beispielhaft dargestellten O-Glykanen. Zahlreiche Disulfidbrücken halten die N- und C-Termini von MUC2 zusammen.

Rechts: Mikrovilli der Cholangiozyten sind bedeckt von einer Glykokalyx aus Mucinen, welche in der Zellmembran verankert sind. Die langen verlängerten Mucindomänen bilden die Glykokalyx. Die gespaltenen und damit assoziierten SEA- (*sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin*) und vWD-Domänen (*von Willebrand domain*) sind ebenfalls in den Mucindomänen integriert.

1.2.1.1 Freisetzung von Mucinen in der Gallenblase

Über die physiologische und pharmakologische Stimulation der Mucussekretion in der Gallenblase ist wenig bekannt. Der Mucus wird über Exozytose in den Cholangiozyten in das Lumen der Gallenblase sezerniert. Mucus ist dabei im apikalen Zellareal der Cholangiozyten in Vesikeln verpackt (Wahlin et al., 1974). Im basalen Zellareal befinden sich nur wenige Mucingranula. Das Peptidhormon Cholezystokinin hat einen fördernden Einfluss auf die Sekretion der Mucingranula (Admirand & Small, 1968).

Frühere Studien sind sich uneinig, ob die aus Arachidonsäure synthetisierten Mediatoren Prostaglandine und Leukotriene einen fördernden Einfluss auf die Mucinsekretion haben (Wahlin et al., 1976) oder nur Stimulatoren der Kontraktion der Gallenblase sind. Die Kontraktion der Gallenblase und die Mucinsekretion stehen nicht in funktionellem Zusammenhang (Yusko et al., 1983).

LaMont et al. konnten einen fördernden Einfluss dieser Mediatoren auf die Mucinsekretion *in vitro* nicht bestätigen. Steroidhormone inhibieren über Phospholipase A₂ und damit Arachidonsäure für die Prostaglandinsynthese die Mucinsekretion *in vivo* (Lamont et al., 1984).

Das Acetylcholin synthetisierende Enzym ChAT wird von den Bürstenzellen der Gallenblase exprimiert (Schütz et al., 2015). Die Rolle von Acetylcholin in der Gallenblase ist nicht eindeutig geklärt. Fisher et al. zeigten, dass ein cholinerges Agonist einen Stimulator für die Kontraktion der Gallenblase darstellt (Fisher et al., 1986). Axelsson et al. zeigten, dass der cholinerges Agonist Pilocarpin einen fördernden Einfluss auf die Mucinsekretion der Cholangiozyten in der Gallenblase der Maus hat (Axelsson et al., 1985).

1.3 Das Mikrobiom der Gallenblase

Anders als lange aufgrund ihrer antibakteriellen Eigenschaften angenommen, ist die Gallenblase im physiologischen Zustand permanent Bakterien (z.B. *Escherichia coli*,

Clostridium spp., *Peptostreptococcus spp.*, *Bacteriodes spp.*, *Helicobacter pylori*) ausgesetzt und damit nicht steril (Ye et al., 2016). Das Mikrobiom der Gallenblase ist wie das Mikrobiom anderer Darmabschnitte abhängig von verschiedenen Faktoren, unter anderem von dem Gesundheitszustand, dem Alter, der Ernährung und dem Geschlecht des Organismus (Molinero et al., 2019).

Potenziell pathogene Keime gelangen über verschiedene Wege in das biliäre System und verändern das Mikrobiom der Gallenblase: Bakterien von oral und aboral des Duodenums können über den Ductus choledochus in die Gallenblase aufsteigen und diese kolonisieren. Hämatogen in die Leber eingeschwemmte Bakterien können über die biliäre Ausscheidung die Gallenblase erreichen und dort das Mikrobiom beeinflussen (Helaly et al., 2014; Neri et al., 2005). Somit führt die permanente Exposition der Gallenblase gegenüber dem komplexen Mikrobiom des Verdauungs- und Blutsystems zu regulatorischen Stoffwechselveränderungen. Dabei hat das Mikrobiom Einfluss auf den Cholesteroll- und Lipidstoffwechsel sowie auf die Zusammensetzung der Gallensäuren und damit auf den gesamten enterohepatischen Kreislauf.

Einige Studien zeigen bereits speziell den Einfluss des gastrointestinalen Mikrobioms auf die Entstehung von Pathologien wie die Bildung von Gallensteinen oder auf die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen innerhalb der Gallenblase (Grigor'eva & Romanova, 2020; Kaufman et al., 1989; Ye et al., 2016).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich das Mikrobiom der Gallenblase pathologisch verändern kann, damit auch die Zusammensetzung der Galle beeinflusst und sogar die Entstehung von Gallensteinen triggern kann (Portincasa et al., 2006). Allerdings gibt es limitierte Daten darüber, wie die Gallenblasenwand auf zellulärer Ebene auf ein verändertes Mikrobiom reagiert.

1.4 Die Bürstenzelle

Bürstenzellen sind solitäre chemosensorische Zellen im Epithel der meisten Hohlorgane, die dem Endoderm entstammen. Sie weisen an ihren verschiedenen Lokalisationen unterschiedliche Charakteristika auf.

Der apikale Saum aus Mikrovilli, dessen Aktinfilamente bis zum supranukleären Zytoplasma reichen, unterscheidet sich durch seine strikte Ausrichtung und Länge morphologisch von denen anderer Zelltypen im Epithel. Dieses gemeinsame charakteristische Merkmal aller Bürstenzellen bildet die Herkunft des Namens der Bürstenzelle (O'Leary et al., 2019; Rhodin, 1966). Rhodin und Dalhamn beschrieben diese flaschenförmige, Mikrovilli tragende Zelle erstmalig im Trachealepithel der Ratte

mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie. Sie differenzierten zwischen dem Mikrovillisaum und den Zilien der zilientragenden Zellen (Rhodin & Dalhamn, 1956). Aktuell wird zwischen zwei Zelltypen unterschieden, die zwar beide ein Büschel aus Mikrovilli vorweisen, jedoch unterschiedlich spezifiziert sind: „Brush cells“ sowie neuroendokrine Zellen. Bürstenzellen werden in der Wissenschaft unter verschiedenen Namen geführt (Tuft cells, Brush cells, Microvillus cells), da die Identifizierung dieser Zellen in verschiedenen Organen und ihre Funktionen zu unterschiedlichen Zeiten und von unterschiedlichen Forschern erfolgten. Ein Konsens zur Definition dieser Zelle hat sich in der Expression der Gene *TRPM5* (*Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5*) und *POU2F3* (*POU Class 2 Homebox 3*) ergeben, sowie der Biosynthese von Acetylcholin und Eikosanoiden. Als solide, aber nicht spezifische Marker dieser Zellen gelten ChAT, DCLK1 (*Doublecortin like kinase 1*) und Advillin (O’Leary et al., 2019; Schütz et al., 2019). Die Nomenklatur zur Namensgebung aller Bürstenzellen einigt sich über alle Organlokalisationen hinweg auf „Tuft cell“.

1.4.1 Vorkommen der Bürstenzellen

Bürstenzellen sind in der Tunica mucosa zahlreicher Organe des respiratorischen Trakts (Finger et al., 2003; Sbarbati et al., 2004; Tizzano et al., 2010), des gastrointestinalen Trakts (Höfer et al., 1996; Schütz et al., 2015; Wu et al., 2002), des urogenitalen Trakts (Deckmann et al., 2014) und auch in Teilen weiterer Organe lokalisiert. Im oberen Respirationstrakt liegen sie in der Nasenschleimhaut, im vomeronasalen Organ von Mäusen und Ratten (Zancanaro et al., 1999) und in der Tuba auditiva der Maus (Krasteva et al., 2012). Auch Zellen in der Regio olfactoria von Ratten und Mäusen weisen eine große morphologische Ähnlichkeit zu Bürstenzellen auf (Asan & Drenckhahn, 2005). Im unteren Respirationstrakt liegen sie im Kehlkopf (Merigo et al., 2005; Sbarbati et al., 2004; Tizzano et al., 2010), in der Trachea (Rhodin et Dalhamn, 1956) sowie in den Stammbronchien von Mäusen und Ratten (Krasteva et al., 2011; Taira & Shibasaki, 1978; Tizzano et al., 2010). Bürstenzellen wurden auch als Pneumozyten Typ III in den Alveolen der Ratten identifiziert (Chang et al., 1986; Luciano et al., 1968). Auch in anderen Säugetieren wurde die Bürstenzelle bereits identifiziert: In der Trachea von Kaninchen (Leeson, 1961), im respiratorischen Trakt von Rindern (Tizzano et al., 2006) sowie in der Lunge, Nasenschleimhaut und Trachea des Menschen (Finger & Kinnamon, 2011; Hollenhorst et al., 2023; Krasteva et al., 2011; Rhodin, 1966). An zahlreichen Orten des Gastrointestinaltrakts wurden ebenfalls Bürstenzellen identifiziert, wie im Magen von Ratten (Iseki & Kondo, 1990; Isomaki,

1973), Mäusen (Nabeyama & Leblond, 1974), im Colon von Mäusen (Silva, 1966), im Dünndarm aller Nagetiere (Trier et al., 1987) und in der Gallenblase von Mäusen (Luciano & Reale, 1969; Luciano & Reale, 1979, 1990; Luciano & Reale, 1997).

In jüngster Zeit wurden Bürstenzellen auch in der Urethra von Primaten, Paarhufern, Unpaarhufern, Canivoren und Nagetieren nachgewiesen (Deckmann et al., 2014, 2015). Schematisch dargestellt ist das Vorkommen der Bürstenzelle in der Maus in Abbildung 6.

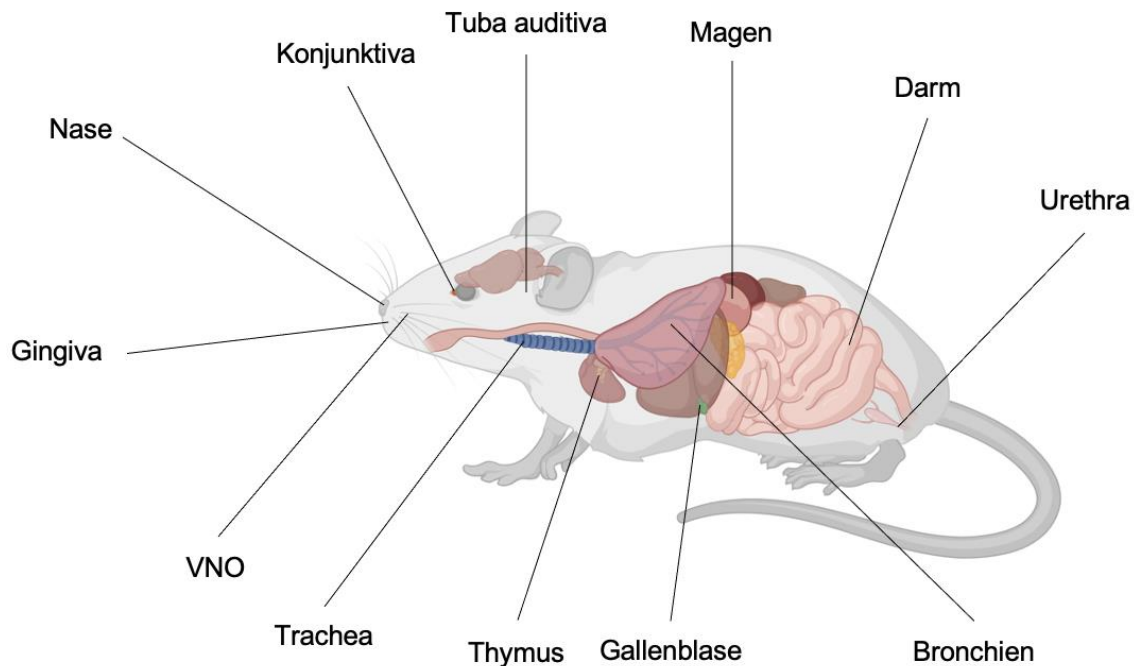


Abbildung 6: Vorkommen von Bürstenzellen in der Maus.

1.4.2 Charakteristika von Bürstenzellen

Alle Bürstenzellen weisen vier wesentliche Aspekte auf. Dazu zählen ihre charakteristische Morphologie sowie Gene, die für chemosensorische, immunologische und neurale Funktionen codieren.

Die flaschenförmige Zellmorphologie mit zahlreichen steifen apikalen Mikrovilli bis ins Lumen (außer im Thymus) ist charakteristisch für die Bürstenzelle (O’Leary et al., 2019; Reid et al., 2005).

Als erste molekulare Gemeinsamkeit weisen alle Bürstenzellen der Maus den Transkriptionsfaktor POU2F3 auf, der auch in einigen Geschmackszellen der Zunge exprimiert ist. Die Expression dieses Gens ist verantwortlich für die Differenzierung dieses Zelltyps (Gerbe et al., 2016; Huang et al., 2018; Yamashita et al., 2017).

Als zweites kennzeichnet Bürstenzellen das Vorhandensein von Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade. Alle Bürstenzellen exprimieren den Kationenkanal TRPM5 (Kaske et al., 2007; Kusumakshi et al., 2015; Tizzano et al., 2011), welchen man typischerweise auch in Typ II-Geschmackszellen findet (Matsumoto et al., 2011; Sukumaran et al., 2017). Die meisten Bürstenzellen exprimieren in diesem Zusammenhang auch weitere Proteine dieser Signaltransduktionskaskade wie α -Gustducin (*Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit α 3*) und PLC β 2 (Phospholipase C beta 2) (Bezençon et al., 2008; Kaske et al., 2007).

Weiterhin codieren alle Bürstenzellen für das Zytokin IL-25 (Interleukin-25) sowie für Proteine der Eikosanoid-Biosynthese, wie für COX1 und 2 (Bankova et al., 2018). Darüber hinaus exprimieren Bürstenzellen weitere Proteine, wie DCLK1, Advillin und ChAT, deren Verteilung variiert und die nicht immer spezifisch für Bürstenzellen sind (O'Leary et al., 2019; Schütz et al., 2015, 2019; Zheng et al., 2019).

ChAT ist das für die Acetylcholinsynthese entscheidende Enzym und wurde speziell in Bürstenzellen der Gallenblase der Maus von Schütz et al. identifiziert (Schütz et al., 2015). In anderen Organen nimmt Acetylcholin von Bürstenzellen eine zentrale Rolle in der Schleimhautimmunität ein, wie z.B. das Auslösen einer neurogenen Entzündung im respiratorischen Trakt (Hollenhorst et al., 2022; Saunders et al., 2014) oder die Partizipation an der Typ II-Immunantwort gegen Helminthen-, Protisten- und Virusinfektionen im Dünndarm (Gerbe et al., 2016; Nadsombati et al., 2018; von Moltke et al., 2016; Wilen et al., 2018). In der ChAT exprimierenden biliären Bürstenzelle ist die Funktion von Acetylcholin innerhalb des Gallenblasenepithels ungeklärt.

1.4.3 Die Funktion der Bürstenzellen

Lange wurde die Bürstenzelle lediglich morphologisch beschrieben, ohne dass ihre genaue Funktion verstanden war. Erstmals wurde ihre Funktion in den Atemwegen beschrieben. Tizzano et al. fanden heraus, dass die Detektion der Bittersubstanz Denatonium und von Quorum-Sensing-Molekülen, hoch spezifische Signalmoleküle zur Kommunikation von bakteriellen Mikroorganismen, in solchen Zellen in der Nasenschleimhaut (solitäre chemosensorische Zellen) zum intrazellulären $[Ca^{2+}]$ Anstieg führt und über sensorische Fasern im N. trigeminus einen kurzfristigen Atemarrest auslöst (Tizzano et al., 2010). Ebenso reagieren die Bürstenzellen der Trachea auf diese Substanzen und lösen über cholinerge Kommunikation mit sensorischen Vagusfasern einen Atemreflex aus (Krasteva et al., 2011; Krasteva et al., 2012). Diese Reaktionswege wurden als Schutzreflex gegen toxische Substanzen von Bakterien, die häufig Bitterstoffcharakter haben, interpretiert.

In der Trachea detektieren sie bakterielle Formyl-Peptide oder Bitterstoffe, woraufhin der Selbstreinigungsmechanismus der mukoziliären Clearance aktiviert und die Atemtiefe reduziert wird (Hollenhorst et al., 2020; Krasteva et al., 2011; Perniss et al., 2020).

Im Nasenepithel der Maus führt eine Allergenexposition durch solche Zellen über Leukotriene zur Rekrutierung von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten in der Lunge (Ualiyeva et al., 2020).

Im Dünndarm löst die Bürstenzelle bei einer Infektion mit dem Protisten *Tritrichomonas* oder Helminthen über Zytokine eine Immunantwort aus. IL-25 und Cysteinyl-Leukotriene sind hierbei die entscheidenden Mediatoren für die Auslösung einer Typ II-Immunantwort über die Aktivierung von ILC2s (*Group 2 Innate Lymphoid Cells*) in der Lamina propria (Gerbe et al., 2016; Nadjisombati et al., 2018; Schneider et al., 2019).

Ebenfalls im Dünndarm erkennt sie über den vomeronasalen Rezeptor Vmn2r26 (*Vomeronal 2, Receptor 26*) den bakteriellen Metaboliten N-Undecanoylglycin und fördert über PGD₂ (Prostaglandin D2) die Sekretion von Mucus in das Lumen (Xiong et al., 2021).

In der Harnröhre detektieren Bürstenzellen uropathogene Keime wie *Escherichia coli* und intensivieren die Kontraktion der Harnblase (Deckmann et al., 2014).

Zusammenfassend wird Bürstenzellen also eine gewebe- und kontextspezifische Funktion zugeordnet. Bürstenzellen detektieren potenziell schädliche Substanzen und kommunizieren mit ihren Nachbarzellen über neuro- und immunmodulatorische Stoffe, wodurch Immunantworten und Schutzreflexe ausgelöst werden. Sie kommen häufig in Organen vor, die eine „Pforte“ zur Außenwelt darstellen und potenziell gefährlichen Substanzen ausgesetzt sind. Die konkrete Funktion der Bürstenzellen in vielen Organen wie in der Gallenblase, Tuba auditiva, Magen oder Konjunktiva ist allerdings nicht geklärt (Billipp et al., 2021; Deckmann et al., 2015; Kummer & Deckmann, 2017; Tizzano et al., 2011).

1.4.3.1 Die Bürstenzelle in der Gallenblase

Bürstenzellen befinden sich im Epithel der extrahepatischen Gallenwegen, also auch in der Gallenblase (Luciano & Reale, 1997; O'Leary et al., 2019; Schütz et al., 2015; Von Moltke et al., 2016). Biliäre Bürstenzellen exprimieren büstenzelltypische Marker wie ChAT, TRPM5, IL-25, DCLK1, Alox5 (5-Lipoxygenase), Pou2f3 und Enzyme für die Biosynthese von Eikosanoiden, dennoch ist ihre physiologische Rolle in den extrahepatischen Gallenwegen nicht geklärt (Nadjisombati et al., 2018; O'Leary et al., 2019).

Extrahepatische Gallenwege unterliegen postnatal einer besonderen Entwicklung, die eine Anpassung an die Ernährung, an das Mikrobiom und an den enterohepatischen Kreislauf bedarf. Die Entwicklung ist streng mit der Größenentwicklung der Leber und damit auch mit der Stoffwechselsituation des Organismus synchronisiert (Cui et al., 2012; van Best et al., 2020; Wahlström et al., 2016).

Biliäre Bürstenzellen sind Teil des Immunsystems und beeinflussen dies durch ihre An- bzw. Abwesenheit maßgeblich. Zwar besitzen sie die büstenzellspezifischen Marker, sie kennzeichnet aber auch ein von O'Leary et al. identifiziertes gallenblasenspezifisches Expressionsmuster. Im Vergleich zum Dünndarm reagieren sie auf Gallensäuren und sind nicht abhängig von ILC 2 Zellen (Group 2 Innate Lymphoid Cells) des angeborenen Immunsystems (O'Leary et al., 2022).

Eine Reduktion bzw. ein kompletter Verlust biliärer Bürstenzellen aktiviert besonders in Anwesenheit von Gallensäuren, z.B. im Rahmen einer Cholestase, zahlreiche neutrophile Granulozyten und führt zu einem erhöhten Expressionsmuster inflammatorischer Marker. Gallensäuren allein bewirken keine Infiltration von neutrophilen Granulozyten (O'Leary et al., 2022). Das Transkriptom der infiltrierenden neutrophilen Granulozyten ist ähnlich zu denjenigen, die in anderen Geweben Entzündungen induzieren (Fachi et al., 2020; Pfirschke et al., 2020).

O'Leary et al. demonstrieren den gallenblasenspezifischen Zusammenhang zwischen neutrophilen Granulozyten und biliären Bürstenzellen: Sie zeigen auf, dass der Verlust von Bürstenzellen das Mikrobiom beeinflusst. Das Mikrobiom und die Gallensäuren beeinflussen sich wiederum gegenseitig.

Das Expressionsmuster von entzündeten extrahepatischen Gallenwegen, das bei Abwesenheit von Bürstenzellen vorliegt und von einer Infiltration neutrophiler Granulozyten gekennzeichnet ist, weist Ähnlichkeiten zur Reaktion des Darms auf pathogene Bakterien auf. Es ist bereits bekannt, dass die Gallenblase nicht steril ist (Ye et al., 2016), daher könnten biliäre Bürstenzellen auf aufsteigende Keime oder Metaboliten aus dem Dünndarm gesondert reagieren, ähnlich wie die Bürstenzellen des Darms (O'Leary et al., 2022).

Zusammenfassend hat die biliäre Bürstenzelle zum Teil gleiche Marker wie in anderen Geweben, jedoch eine eigene gallenblasenspezifische Rolle im Epithel. Ein vermehrtes Vorkommen von Gallensäuren führt zur Reduktion der Bürstenzellenanzahl, gleichzeitig bewirkt eine Reduktion der Anzahl an Bürstenzellen eine Infiltration neutrophiler Granulozyten und eine Veränderung des Gallenblasenmikrobioms. Auch eine Änderung des Gallenblasenmikrobioms, das in Wechselwirkung zu Gallensäuren steht, nimmt Einfluss auf die Bürstenzellen. Dabei bestehen Ähnlichkeiten zur Reaktion des Darms auf pathogene Keime, dort kommen Bürstenzellen ebenfalls vor.

1.5 Acetylcholin

Acetylcholin ist eine organische Verbindung, die als Neurotransmitter zahlreiche Rollen im Gehirn sowie im Körper vieler Tierarten einnimmt. Der Name leitet sich von seiner chemischen Struktur ab, die ein Ester aus Essigsäure und Cholin darstellt. Funktionelle Einheiten, die Acetylcholin verwenden, werden als „cholinerg“ bezeichnet. Als Neurotransmitter wird Acetylcholin von erregten Motoneuronen freigesetzt, damit Muskeln aktiviert werden und kontrahieren können. Damit nimmt Acetylcholin eine wesentliche Rolle im peripheren Nervensystem ein.

Auch im autonomen Nervensystem fungiert Acetylcholin sowohl als interner Transmitter in den autonomen Ganglien als auch an peripheren Endigungen, insbesondere im Parasympathikus, in bestimmten Zielorganen auch im Sympathikus (Sam & Bordoni, 2021; Tiwari et al., 2013).

Im Gehirn ist Acetylcholin ein Neuromodulator mit einer Vielzahl unterschiedlicher Funktionen. Beispielsweise spielt es eine wichtige Rolle bei Erregung, Motivation und Aufmerksamkeit (Kapalka, 2010).

Acetylcholin wurde auch in Zellen nicht-neuronalen Ursprungs sowie in Mikroben identifiziert. Enzyme, die mit der Synthese, dem Abbau und der zellulären Aufnahme von Acetylcholin zusammenhängen, sind bis zu den frühen Ursprüngen einzelliger Eukaryonten zurückverfolgt (Singh et al., 2019).

Die Synthese von Acetylcholin im Nervensystem findet in den terminalen Enden von Axonen statt. ChAT ist das entscheidende Enzym, das die Reaktion von Cholin mit Acetyl-CoA (Acetyl-Coenzym A) katalysiert, so dass Acetylcholin synthetisiert wird. Dabei wird ChAT im Nervenzellkörper produziert, bevor es anschließend ans terminale Ende des Axons transportiert wird. Dennoch befindet sich ChAT in der gesamten Zelle (Massoulié et al., 1993).

Auch außerhalb des Nervensystems wurde eine Reihe solitärer Zellen identifiziert, die ChAT exprimieren (Wessler et al., 1998). Dazu gehören unter anderem Bürstenzellen der Atemwege (Krasteva et al., 2011), der Urethra (Deckmann et al., 2014) und der Gallenblase (Schütz et al., 2015).

Der Effekt von Acetylcholin wird über zwei Rezeptorklassen vermittelt: über nikotinerge und über muskarinerge Rezeptoren (Picciotto et al., 2000; Wess, 2003). Bei den nikotinergen Rezeptoren unterscheidet man zwischen den muskulären Typen und verschiedenen neuronalen Typen, die aber auch auf nicht-neuronalen Zellen vorkommen. Die muskarinergen Rezeptoren werden in fünf Subtypen unterteilt: Chrm1,

Chrm2, Chrm3, Chrm4 und Chrm5. Alle Rezeptoren sind metabotrope Rezeptoren. Die Subtypen Chrm1, Chrm3 und Chrm5 sind hauptsächlich mit dem G_q-Protein gekoppelt, das das Enzym PLC (Phospholipase C) aktiviert und damit zu einer Reihe von intrazellulären Signaltransduktionsprozessen führt. Die Subtypen Chrm2 und Chrm4 inhibieren über das G_i-Protein die Adenylatcyclase. Alle fünf Rezeptoren sind im zentralen Nervensystem und auch in multiplen anderen Organen exprimiert. Chrm2 und Chrm3 sind auf glatten Muskelzellen exprimiert, wobei Chrm3 insbesondere in den glatten Muskelzellen der Bronchiolen, Iris, Harn- und Gallenblase sowie im Dünndarm vorkommt (Birdsall et al., 1988; Lebois et al., 2018).

1.6 Optogenetik

Die Optogenetik, ein Begriff, der von Deisseroth et al. stammt, beschreibt eine künstliche Technik der Photostimulation, welche Optik und Genetik miteinander vernetzt, um spezifische Zellen durch Licht zu stimulieren (Deisseroth et al., 2006). Das fundamentale Prinzip der Optogenetik basiert auf der Expression von lichtsensitiven Ionenkanalproteinen, den Opsinen, die natürlicher Weise in Bakterien, Algen, Archaeobakterien und Pilzen vorkommen (Nagel et al., 2003). Dort dienen diese Proteine der Phototaxis, eine durch Licht beeinflusste Fortbewegung von Organismen, um beispielsweise effizienter Photosynthese zu betreiben (Foster et al., 1984). Aufgrund der Möglichkeit mit Hilfe der Optogenetik nur einen Zelltypen mit präziser Kontrolle von Zeit, Dauer und Intensität zu stimulieren, konnte diese Methode insbesondere in der Neurophysiologie für das *brain mapping* (Kartierung des Gehirns) etabliert werden, um Funktionen und Kreisläufe zwischen Zellen zu identifizieren (Zhang et al., 2006). Die Optogenetik kann bidirektional eingesetzt werden, indem sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Effekte hervorgerufen werden. Dies geschieht durch die gezielte Aktivierung spezifischer Ionenkanäle: Channelrhodopsin, das eine Depolarisation und somit Erregung durch Kationenkanäle induziert, sowie Halorhodopsin, das Hyperpolarisation und somit eine Hemmung durch die Aktivierung von Chloridkanälen bewirkt. Das jeweilige Opsin wird mittels retroviraler oder transgener Technik in die Zielzellen eingeführt. Die Expression des Gens führt zur Produktion des Proteins in der Zellmembran, welches dann dem Protein erlaubt, auf Licht zu reagieren. Wird die Expression unter die Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors gestellt, wird eine zelltypspezifische Stimulation möglich. Die Lichtquelle beleuchtet das entsprechende Areal mit der opsinspezifischen Wellenlänge, wobei Channelrhodopsine mit blauem Licht und Halorhodopsine mit gelbem oder grünem Licht aktiviert werden (Chow et al., 2012; Lalumiere, 2011; Zhang et al., 2006).

Da ein aktivierender Stimulus für die Bürstenzelle bisher nicht bekannt ist, bietet das optogenetische Modell der Bürstenzelle die Möglichkeit, die Funktion der Zelle zu identifizieren, ohne ihren natürlichen Stimulus zu kennen.

1.6.1 Channelrhodopsin-2

Zur präzisen optischen Stimulation von Säugetierzellen und deren Analyse wird häufig ein Gen der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* verwendet, das für einen lichtsensitiven Kationenkanal codiert: Channelrhodopsin-2 (ChR2) (Hegemann et al., 2005; Nagel et al., 2003). Eine Expression von ChR2 in Säugetierzellen resultiert in eine durch Photonen getriggerte Depolarisation, die durch blaues Licht im Millisekundenbereich ausgelöst wird (Nagel et al., 2003; Zhang et al., 2006). Das *high speed* Einsetzen des exzitatorischen Potentials zusammen mit der hohen Empfindlichkeit des Proteins gegenüber blauem Licht hat zu einer Reihe von Experimenten und Anwendungen geführt (Boyden et al., 2005). Dazu gehören unter anderem Stimulationen von neuronalen Netzwerken und die Identifizierung ihrer Interaktionen (Bi et al., 2006; Boyden et al., 2005; Wang et al., 2007; Zhang et al., 2007) oder die Auslösung von visuell evoziertem Verhalten bei Nagetieren durch ChR2-Expression in retinalen Ganglienzellen (Bi et al., 2006).

Zellspezifische Ereignisse durch ChR2 werden durch selektive Expression des Opsins in bestimmten Zelltypen und durch gezielte optische Stimulation ausgelöst. Wenn ChR2 in spezifischen Zielzellen exprimiert wird und diese Zellen dann mit blauem Licht beleuchtet werden, öffnet sich der Kanal und erlaubt den Einstrom von Kationen. Dies führt zu einer Depolarisation der Zellmembran, die in der Regel ein Aktionspotential auslöst und zur zellspezifischen Erregung führt. Bestimmte neuronale Schaltkreise oder Zellfunktionen können dadurch aktiviert werden (Boyden et al., 2005).

Das optogenetische Modell wurde von unserer Arbeitsgruppe an den Bürstenzellen der Atemwege durch Perniss et al. eingeführt. Über die Einführung von ChR2 in die Bürstenzellen konnten natürliche Funktionen der Bürstenzellen in den Atemwegen identifiziert werden, ohne initial ihren natürlichen Stimulus zu kennen (Perniss et al., 2020).

1.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle der biliären Bürstenzellen im Epithel der Gallenblase zu identifizieren. Da diese Zellen ChAT exprimieren (Schütz et al., 2015)

und bereits gezeigt wurde, dass der muskarinische Agonist Pilocarpin die Mucinsekretion in Cholangiozyten der Gallenblase stimuliert (Axelsson et al., 1979), wird die Hypothese aufgestellt, dass die Bürstenzellen über die Acetylcholinfreisetzung eine Mucinsekretion initiieren können.

Um die Mucinfreisetzung der Cholangiozyten zu messen, wird eine seit vielen Jahrzehnten etablierte Technik in der quantitativen Mikroskopie und morphometrischen Analyse angewendet (Weibel et al., 1966). Mittels der Point Counting-Methode wird die ultrastrukturelle Volumendichte von Mucingranula im apikalen Zytoplasma der Cholangiozyten gemessen. Diese dient als stereologisches Maß für die Mucinfreisetzung.

Ein natürlicher, aktivierender Stimulus der biliären Bürstenzelle ist bislang nicht bekannt. Daher wird ein optogenetisches Modell eingesetzt, das bereits in den Bürstenzellen der Atemwege validiert wurde (Perniss et al., 2020). In diesem Modell wird ein Fusionsprotein von ChR2 und dem gelb fluoreszierenden Protein YFP (yellow fluorescent protein) unter der Kontrolle des ChAT-Promotors und somit in Bürstenzellen exprimiert. Als Stimulus kann in diesem Modell LED-Beleuchtung mit blauem Licht eingesetzt werden. Zur Testung, ob der dann beobachtete Effekt auf die Mucinsekretion der Cholangiozyten muskarinerg vermittelt ist, wird Atropin, ein Antagonist muskarinergere Rezeptoren, verwendet.

Nachdem diese ersten Versuchsserien die Eingangshypothese bestätigten, wird nach einem natürlich vorkommenden Stimulus für die Bürstenzellaktivierung gesucht. Geleitet von der Hypothese, dass Bürstenzellen als Wächter fungieren, die den Lumeninhalt für aufsteigendes Material aus dem Darm in der Gallenblase überwachen, werden Metaboliten des intestinalen Mikrobioms als natürlich vorkommende Bürstenzellaktivatoren in Betracht gezogen. Eine Fermentation unverdaulicher Kohlenhydrate durch das Darmmikrobiom führt zu hohen Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren. Dazu zählen Acetat, Propionat und Butyrat (Louis & Flint, 2017). Über FFARs (*Free fatty acid receptors*), welche in den Bürstenzellen des Gastrointestinaltrakts nachgewiesen wurden, üben sie ihre Wirkung aus (Le Poul et al., 2003). In dieser Arbeit wird auf Propionat fokussiert und getestet, ob dies über Acetylcholinfreisetzung aus Bürstenzellen zu einer Mucinsekretion führt. Durch die Verwendung eines Mausstamms, dem büstenzellspezifisch das Acetylcholinsyntheseenzym fehlt (*Avil^{cre}:Chat^{fl/fl}*), wird die Rolle des aus Bürstenzellen stammenden Acetylcholins definiert. Abschließend wird mittels einer entsprechend gendefizienten Mauslinie untersucht, ob der Effekt über den muskarinergen Rezeptor Chrm3, der insbesondere in der Gallenblase prominent exprimiert wird (zusammengefasst von Wess, 2004), vermittelt wird.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Mäuse verwendet. Die Mäuse hatten ein Alter von mindestens 56 Tagen und höchstens 309 Tagen. Für jedes Experiment wurden weibliche Mäuse in verschiedenem Alter randomisiert untersucht. Sie wurden in der zentralen Versuchstierhaltung der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten. Alle Mäuse lebten unter gleichen spezifisch pathogenfreien Bedingungen mit einer Lichtzeit von 10 Stunden und einer Dunkelzeit von 14 Stunden pro Tag. Ein freier Zugang zu Nahrung und Wasser war gewährleistet. C57BL/6JRj-Mäuse wurden von Janvier Labs (Saint Berdhevin, Cedex, Frankreich) erworben. Die Mäusestämme *Chat-ChR2-EYFP* (B6.Cg-Tg(Chat-COP4*H134R/EYFP,Slc18a3)6Gfng/J (stock no. 00702) (Zhao et al. 2011), *Chat^{fllox}* (B6;129-Chatm1Jrs/J; 016920), B6;129S6-*Chat^{tm2(cre)}Lowl/J* (stock no. 006410), *Chrm3^{-/-}* (B6N.129S6(B6J)-*Chrm3^{tm1Jwe}/J*, stock no. 030163) und Wildtyp-Mäuse (C57BL/6N) wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, Vereinigte Staaten) erworben. B6;D2-Tg(Avil-cre)1Phep/Cnrm-Mäuse (*Avil-Cre*, European Mouse Mutant Archive repository, Id EM: 05542; Infrafrontier GmbH, Neuherberg, Deutschland) (Zurborg et al., 2011) und *Chat-ChR2-EYFP*-Mäuse wurden über sechs Generationen mit C57BL/6JRj-Mäusen gepaart und gezüchtet. Um B6;129-*Chat^{tm1Jrs}/J*-B6;D2-Tg(Avil-cre)1Phep/Cnrm (*Avil^{cre}:Chat^{fl/fl}*) Mäuse zu erzeugen, wurden B6;129-*Chat^{tm1Jrs}* und B6;D2-Tg(Avil^{cre})1Phep/Cnrm-Mäuse gekreuzt. Außer für die *Chrm3^{-/-}*-Mäuse, deren Kontrolltiere C57BL/6N-Mäuse waren, dienten heterozygote und homozygote Geschwistertiere als Kontrolltiere. Alle Tiere wurden entsprechend der Richtlinie der „European Community for the care and use of animals“ gehalten und für die Züchtung sowie der weiteren Verwendung für *in vitro* Experimente beim verantwortlichen Regierungspräsidium in Gießen (Registrierungsnummer: 571_M, 572_M, 573_M, 641_M, 714_M, 717_M, 720_M, Ex-14-2018, Ex-1-2020, und 43repMMTVneu) registriert.

2.2 Tiertötung und Gewebeaufbereitung

2.2.1 Tiertötung und Explantation der Gallenblasen

Alle Tiere wurden durch Inhalation einer Überdosis Isofluran (5%) (Baxter Deutschland GmbH Unterschleißheim, Deutschland, 007977-37858) in einem geschlossenen Gefäß von etwa 500 ml Volumen getötet, anschließend erfolgte eine cervicale Dislokation. Eine vollständige Atemdepression und fehlende Schmerzabwehrreaktionen galten als sichere Kriterien einer Tötung. Die Mäuse wurden anschließend gewogen und an allen vier Extremitäten fixiert. Es erfolgte ein Schnitt entlang der Linea mediana anterior, der zur Eröffnung der Cavitas abdominalis diente. Das Tier wurde durch die Durchtrennung der Vena cava inferior ausgeblutet. Die zwischen dem Lobus quadratus und dem Lobus hepatis dexter gelegene Gallenblase wurde von kaudal nach kranial unter Erhaltung des Ductus cysticus explantiert (Abbildung 7).

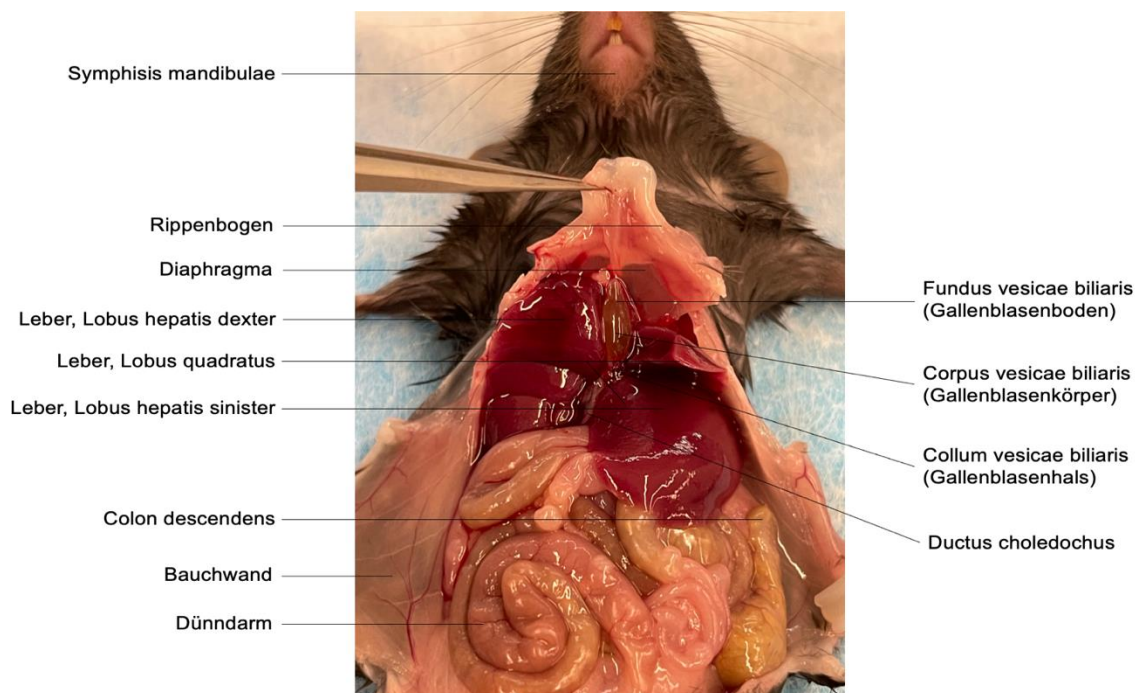


Abbildung 7: Die anatomische Lage der Gallenblase im Situs abdominis vor Explantation.

Die birnenförmige Gallenblase liegt zwischen dem Lobus hepatis dexter und den beiden Lebersegmenten des Lobus quadratus, hier aufgespannt nach Eröffnung des Abdomens und Anhebung des Rippenbogens zentral unterhalb des Diaphragmas. Die dünne Wand der Gallenblase erlaubt den Blick in das mit gelb-grüner Gallenflüssigkeit gefüllte Lumen.

2.2.2 Stimulation der Gallenblasen

Die Gallenblasen wurden unmittelbar nach der Explantation in 2 ml MEM (Minimum Essential Medium, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 51200038) und 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA P4333) bei 37°C aufbewahrt. Für die Stimulationsexperimente wurden auf Heizplatten

(37°C) vorgewärmte 6-Well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, 3920) verwendet. Für die optogenetischen Experimente wurden vorgewärmte Petrischalen, welche mit Sylgard (DOW, Midland, Michigan, USA, 1673921) ausgegossen waren, verwendet. Jede Gallenblase wurde nur mit einem Stimulus behandelt. Tötung, Explantation und Stimulation erfolgten bei allen Versuchen jeweils am selben Tag.

2.2.2.1 Optogenetische Stimulation

Die Gallenblasen der *Chat*-Chr2-EYFP-Mäuse und die der zugehörigen Kontrollmäuse (Tabelle 3) wurden longitudinal geöffnet, mit Minutien fixiert (Abbildung 8) und für 15 min in MEM und 1% Penicillin/Streptomycin oder für 5 min in MEM und 1% Penicillin/Streptomycin und 10 min in MEM mit Atropin (1 µM, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA A0257) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Gallenblasen für 2 min mit LED (blaues Licht, 456 nm, Prizmatix In-Vitro Optogenetics Toolbox, Southfield, Michigan, USA) mit einer Pulsdauer von 60 ms und einer Frequenz von 8 Hz stimuliert, dann für weitere 7 min bei 37°C in MEM inkubiert. Der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 9 dargestellt.

Mausstamm	Stimulus		
	Kein LED	LED	LED + Atropin
C57BL/6JRj	7	7	5
<i>Chat</i> -Chr2-EYFP	5	7	5

Tabelle 3: Anzahl verwendeter Gallenblasen in optogenetischen Experimenten.

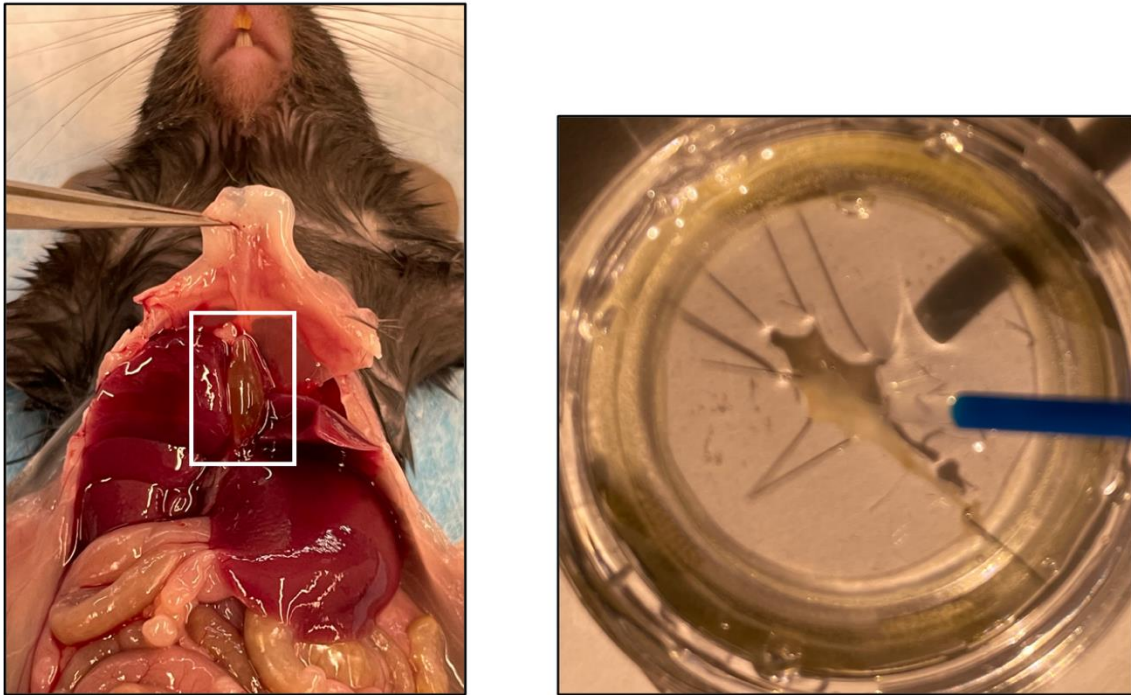


Abbildung 8: Präparation der *Chat*-ChR2-EYFP-Gallenblasen zur Durchführung der LED-Stimulation.

Linkes Bild: Präparation der Gallenblase. Der weiße Kasten markiert die Lage der Gallenblase. Sie wurde retrograd vom Gallenblasenboden präpariert und am Ductus cysticus abgesetzt. Rechtes Bild: Longitudinale Eröffnung und Fixation der Gallenblase mit Minutien. Anschließend erfolgte die optogenetische Stimulation. Hier befindet sich die Gallenblase zu Demonstrationszwecken in einer hellen Umgebung.

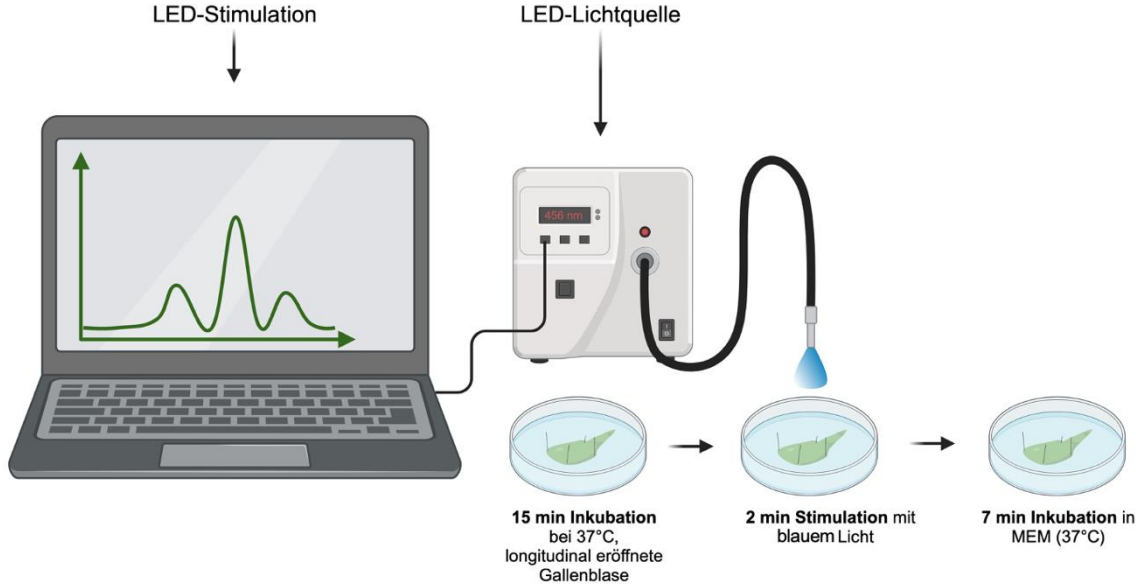


Abbildung 9: LED-Stimulation von *Chat*-ChR2-EYFP-Gallenblasen. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

2.2.2.2 Chemische Stimulation

Die chemischen Stimulationen der C57BL/6JRj-, *Avil^{cre}:Chat^{fl/fl}*- und *Chrm3^{-/-}*-Mäuse sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Gallenblasen wurden für 30 min mit Natriumpropionat (5 mM, Sigma Aldrich, P5436), Muskarinchlorid (10 µM, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA M104) oder mit dem Kontrollmedium für 30 min in 2 ml MEM bei 37°C inkubiert. Der Untersucher war über den Stimulus für die Auswertung der Gallenblasen am Transmissionselektronenmikroskop für alle in Tabelle 4 aufgeführten Mäuse verblindet, außer für die C57BL/6JRj-Mäuse. Der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 10 demonstriert.

Mausstamm	Stimulus			
	Kontrolle	Propionat	Muskarin	Muskarin + Atropin
C57BL/6JRj	5	-	5	5
<i>Avil^{cre}:Chat^{fl/+}</i>	5*	6*	5*	-
<i>Avil^{cre}:Chat^{fl/fl}</i>	5*	5*	5*	-
<i>Chrm3^{-/-}</i>	3*	3*	3*	-
C57BL/6N	3*	3*	3*	-

Tabelle 4: Anzahl explantierter Gallenblasen in Stimulationsexperimenten.

* = Der Untersucher war hinsichtlich des Stimulus der Gallenblase bei der Untersuchung am Transmissionselektronenmikroskop verblindet.

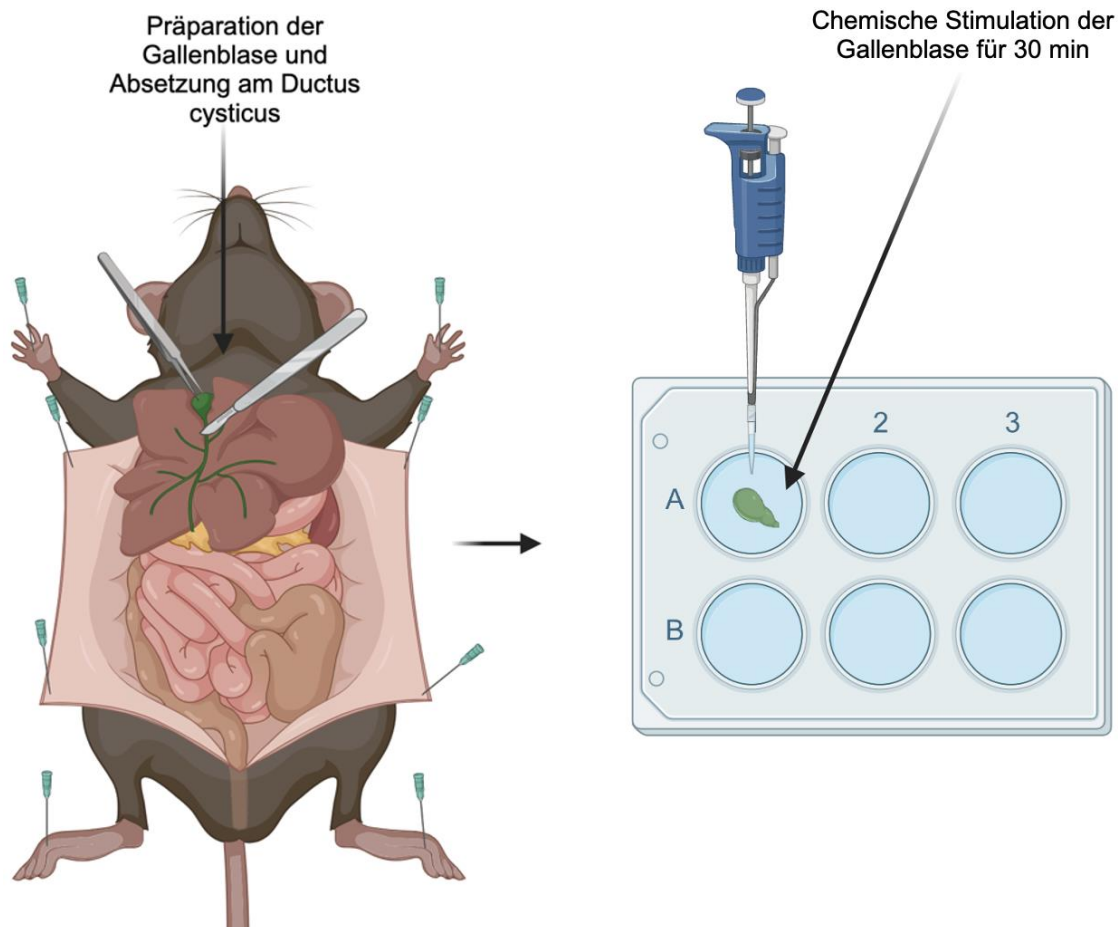


Abbildung 10: Chemische Stimulation der Gallenblase.
Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

2.2.3 Gewebeaufbereitung für die Elektronenmikroskopie

Die Proben wurden in Paraformaldehyd (PFA, 2,5%, Merck, Darmstadt, Deutschland, 1040051000) und Glutardialdehyd (GDA, 1,5%, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, G5882) in 0,1 M Phosphatpuffer (230 ml Lösung A, 770 ml Lösung B, 1 Liter, destilliertes Wasser, pH: 7,4) für 24 h fixiert. Die Rezepte der Lösungen A und B können Tabelle 5 entnommen werden.

Dann wurde das Gewebe mit gefiltertem 0,1 M Trisaminomethan-Puffer (0,1 M TRIS-HCl [TRIS, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland 4855.2; HCL, Merck, Darmstadt, Deutschland, 1101652500], 75 ml Lösung A [TRIS], 60 ml Lösung B [1 N HCl] (Tabelle 5), 1500 ml destilliertes Wasser, pH 7,6) gewaschen (5x5 min) gefolgt von einer Inkubation mit Osmiumtetroxid (OsO_4 , 1%, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 191181000) in destilliertem Wasser für 2 h bei Raumtemperatur.

Dann wurde die in destilliertem Wasser gewaschene Gallenblase (5x5 min) über Nacht und *en bloc* in 1% halbgesättigtes Uranylacetat (UAc, Merck, Darmstadt, Deutschland, CDS021290) in destilliertem Wasser kontrastiert und anschließend wieder mit

destilliertem Wasser (5x5 min) gewaschen. Mit ansteigenden Konzentrationen von Ethanol erfolgte eine Dehydratation des Gewebes (30%, 70%, 90%, 96%, 2 x 100% EtOH, Sigma Aldrich St. Louis, Missouri, USA, 1718733). 100% Ethanol wurde mit Propylenoxid (1,2-Propylenoxid, Merck, Darmstadt, Deutschland, 807027) im Verhältnis 1:1 gemischt und die Gallenblase für 5 min darin inkubiert. Danach wurde die Probe für zwei Mal 5 min in purem Propylenoxid und für 30 min in einem 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Epon (46,2 g Epoxy-Einbettungsmittel 45345; 26,5 g Härter Dodeceny succinic Anhydrid (DDSA) 45346; 25,5 Härter Methyl Nadic Anhydrid (MNA) 45347; 2,0 g Beschleuniger 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP) 30 45348; alle Reagenzien Sigma Aldrich St. Louis, Missouri, USA) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe über Nacht in purem Epon EMBED 812 epoxy resin (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA/USA, 14120) bei 60°C ausgehärtet. Überschüssiger Kunststoff an der Schnittfläche des Epon-Blocks wurde auf eine Fläche von maximal 16 mm² mit einem Trimmer (Trimmer TM 60, Reichert, Wien, Österreich, 701901) in Form einer stumpfen Pyramide zugetrimmt.

Die Anfertigung der Semi- und Ultradünnschnitte am Ultramikrotom (Reichert Ultracut E, Leica, Wetzlar, Deutschland) erfolgte durch die technische Assistentin Frau Tamara Papadakis. Zur Überprüfung der korrekten Lage des Stumpfs wurden am Ultramikrotom zunächst 0,75 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, auf einen Objektträger überführt und anschließend für 1 min mit 1 ml Toluidinblau (Roth, Karlsruhe, Deutschland, 0300.3) benetzt und am Lichtmikroskop auf relevante Stellen untersucht. Beim Vorliegen relevanter Stellen wurden 3-5 Ultradünnschnitte mit einer Dicke von etwa 80 nm am Ultramikrotom angefertigt und auf ein Elektronenmikroskopie-Grid (Graticules Standard Netzchen, Plano, Wetzlar, Deutschland, NHF33N) gezogen. Vor der Auswertung der Schnitte am Transmissionselektronenmikroskop erfolgte eine Kontrastierung mit 2 ml gelösten Uranylacetat (UAc, Merck, Darmstadt, Deutschland, CDS021290) in destilliertem Wasser (eine Messerspitze UAc in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß, aufgefüllt mit destilliertem Wasser). Darauf folgte das fünfmalige Abwaschen mit destilliertem Wasser.

Name	Zusammensetzung
Lösung A	31,2 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) in 1 Liter destilliertem Wasser.
Lösung B	35,6 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) in 1 Liter destilliertem Wasser

Tabelle 5: Rezepte der Lösungen A und B.

2.3 Elektronenmikroskopie und Point Counting-Methode

Am Transmissionselektronenmikroskop (EM902, Zeiss, Jena, Deutschland) wurden mit Hilfe einer 2K-Weitwinkel-Seitenflansch-Digitalkamera (Tröndle Restlichtverstärkersysteme Moorenweis, Deutschland) Bilder gemacht. Pro Tier wurde ein intakter Ultradünnschnitt mit dem Transmissionselektronenmikroskop analysiert. Nur Cholangiozyten, die in ihrer gesamten apikobasalen Ausbreitung erfasst wurden, über mindestens 3 μm an das Lumen angrenzten, die Basalmembran erreichten sowie intakte Zellorganellen aufwiesen (Abbildung 11), wurden untersucht.

Der Stichprobenumfang, also die Anzahl an Cholangiozyten, die erforderlich ist, um einen aussagekräftigen Messwert für eine bestimmte Probe zu erhalten, wurde mit einer Pilotmessung anhand der von Baur angegebenen Methode bestimmt (Baur, 1969). Diese Methode basiert auf einer quantitativen Schätzung der notwendigen Anzahl an Messpunkten, um verlässliche statistische Ergebnisse zu erzielen. Die Messung beginnt ab dem zweiten Messwert fortlaufend mit der Ermittlung des jeweiligen Mittelwerts. Dann wird die Variabilität (Streuung) abgeschätzt. Die Streuung der Daten wird hier durch die Standardabweichung beschrieben. Der Stichprobenumfang wird so gewählt, dass eine Veränderung von maximal 10% vom Mittelwert akzeptiert wird, wenn ein hypothetischer zusätzlicher Datenpunkt um 3 Standardabweichungen vom Mittelwert abweichen würde. Entsprechend war der kleinste zulässige Stichprobenumfang 19 Cholangiozyten pro Gallenblasenpräparat. In dieser Arbeit wurden 20 Cholangiozyten pro Präparat berücksichtigt.

Am Elektronenmikroskop wurden die ersten 20 Cholangiozyten, die im Ultradünnschnitt erschienen und die oben genannten Kriterien erfüllten, bei einer Vergrößerung von 20.000x in originaler Vergrößerung an der apikalen Zellmembran mittig fotografiert und in dem Programm Image SP (Sysprok, Minsk, Belarus) gespeichert.

Anschließend wurde die Point Counting-Methode angewendet, eine klassische, seit vielen Jahrzehnten etablierte Technik in der quantitativen Mikroskopie und morphometrischen Analyse (Weibel et al., 1966).

Dabei wurde ein Gitternetz auf ein Bild projiziert, bei dem die Abstände der Überschneidungspunkte auf dem Bild 1 cm betragen. Aufgrund des Maßstabs des Bildes entsprechen diese jedoch realen Abständen von 250 nm. Dies bedeutet, dass das Bild eine stark vergrößerte Darstellung des feinstrukturierten Gitternetzes zeigt, dessen reale Abstände im Nanometerbereich liegen. Das Gitter wurde entsprechend der hochprismatischen Form der Cholangiozyten ausgerichtet, so dass der höchste Punkt der luminalen Membran den Startpunkt der Messung bildete. Überschneidungspunkte, die im luminalen 1 μm Zytoplasmaareal auf Mucingranula fielen ($P_{\text{Mucingranula}}$), wurden ins

Verhältnis zu allen Punkten innerhalb des luminalen 1 µm Zytoplasmaareals gesetzt (P_{gesamt}) (Abbildung 12), woraus sich die Volumendichte (V_v) der Mucingranula in einer Zelle berechnet (Formel 1).

$$V_v = \frac{P_{Mucingranula}}{P_{gesamt}}$$

Formel 1: Berechnung der Volumendichte der Mucingranula.

V_v ist die Volumendichte. $P_{Mucingranula}$ die Anzahl der Punkte, die auf Mucingranula fallen, und P_{gesamt} die Gesamtzahl der gezählten Punkte innerhalb des 1 µm Zytoplasmaareals.

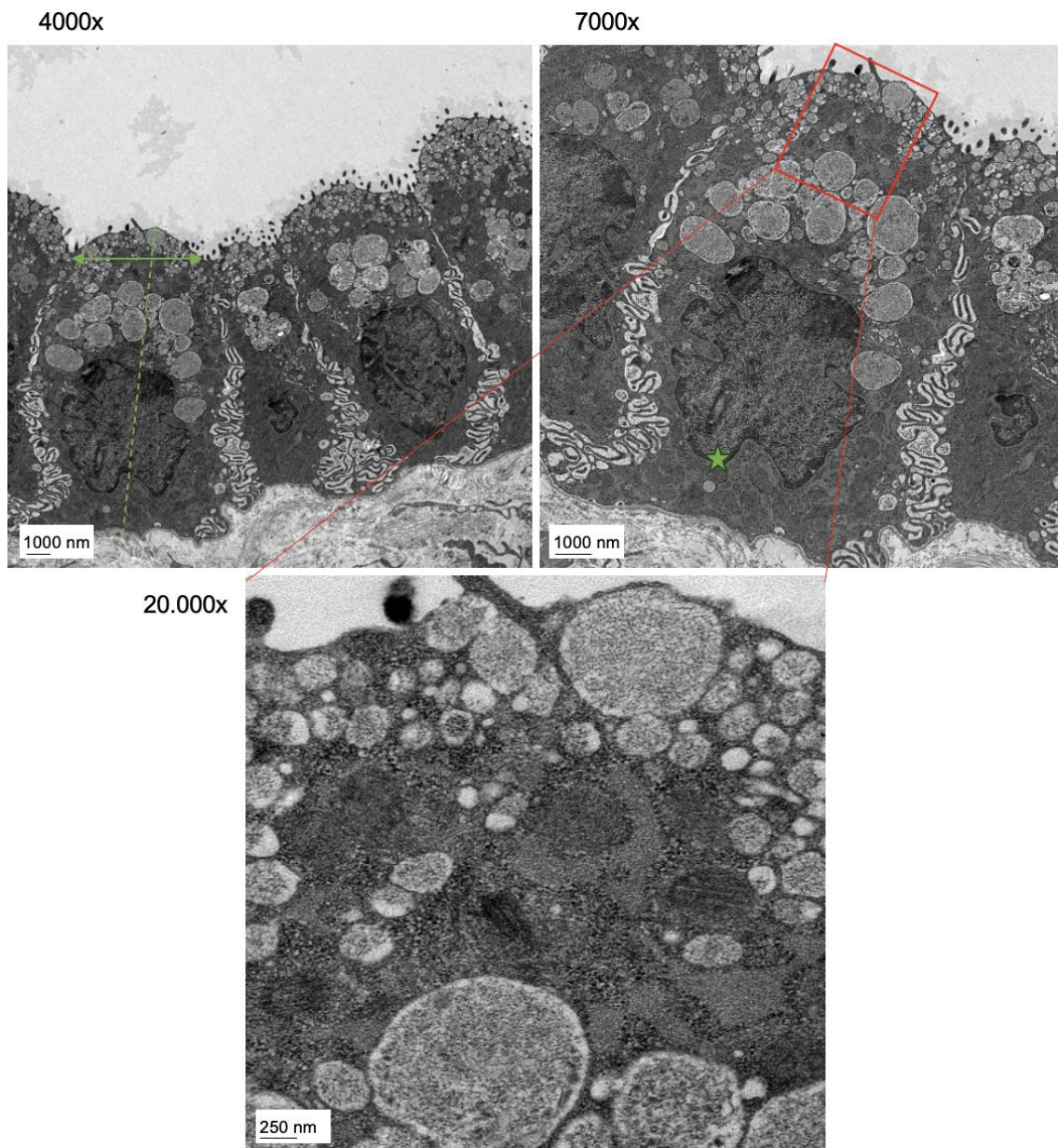


Abbildung 11: Kriterien zur Auswahl von Cholangiozyten zur Bestimmung der Volumendichte.

Diese Abbildung zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen der Cholangiozyten. Diese sind fotografiert in 4000-facher, 7000-facher und 20.000-facher Originalvergrößerung. In

4000-facher Vergrößerung wurden die Kriterien zur Aufnahme eines Cholangiozyten in die Studie überprüft. Diese waren ihr Anschnitt in eine einschichtig hochprismatische Form, sodass die Zelle von der Basalmembran bis zum Lumen reicht (grüne gestrichelte Linie) und eine apikale Angrenzung ans Lumen von mindestens 3 μm (grüner Doppelpfeil). Eine erkennbare Doppelmembran des Zellkerns bei 7000-facher Vergrößerung (grüner Stern) zeigte einen korrekten Fokus der Kamera an. Anschließend erfolgte die Nachvergrößerung in die Mitte der apikalen Zellgrenze in 20.000-facher Originalvergrößerung und die Aufnahme eines Fotos.

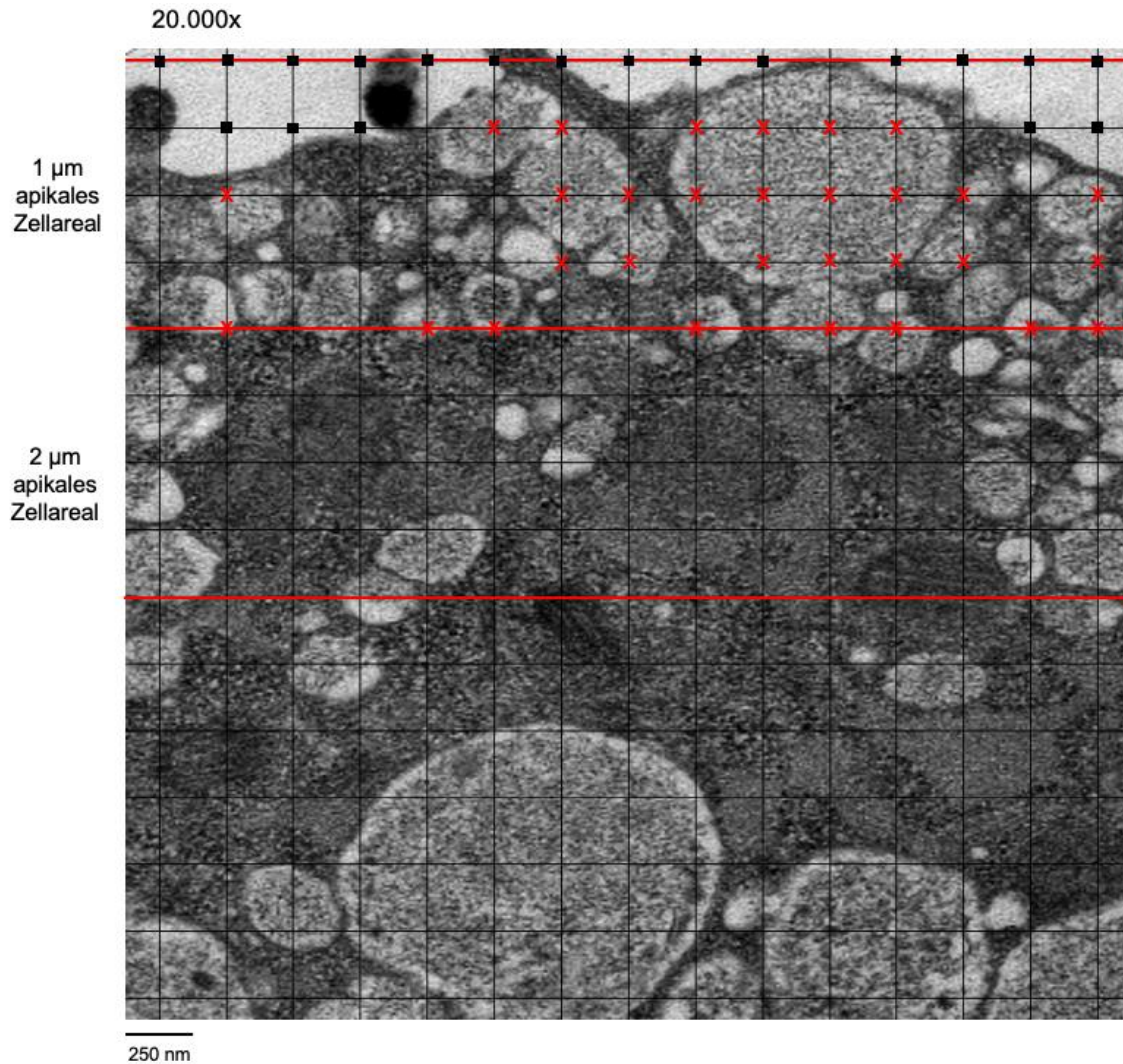


Abbildung 12: Point Counting-Methode zur Bestimmung der Volumendichte in Mucingranula.

In 20.000-facher Originalvergrößerung ist hier das mittlere apikale Zellareal eines Cholangiozyts abgebildet. Hellgrau abgrenzbar sind Mucingranula verschiedener Größen. Ein Gitternetz ist auf das Bild projiziert, bei dem die Abstände der Überschneidungspunkte auf dem Bild 1 cm betragen. Aufgrund des Maßstabs des Bildes entsprechen diese jedoch realen Abständen von 250 nm in der Zelle. Berücksichtigt wurde die Volumendichte der Mucingranula im apikalen Bereich der Zelle, die Vesikel in einem Abstand von 1 μm zur luminalen Oberfläche der Zelle umfasst. Überschneidungspunkte, welche nicht intrazellulär liegen, werden nicht berücksichtigt (schwarze Kästchen ■). Intrazelluläre Überschneidungspunkte des Gitternetzes, welche auf ein Mucingranulum fallen (30 rote Kreuze x), werden ins Verhältnis zu allen

intrazellulären Überschneidungspunkten (56) gesetzt. Hier ergibt sich eine Volumendichte der Mucingranula von: $30/56 \approx 54\%$.

2.4 Computerprogramme

In folgender Tabelle sind die Computerprogramme aufgeführt, die in dieser Arbeit Anwendung fanden.

Software	Firma	Sitz der Firma
BioRender	BioRender	Toronto, Kanada
Prism 7	GraphPad Software, Inc.	San Diego, Kalifornien, USA
Microsoft Office 2023	Microsoft	Washington, Washington, USA
ImageJ2 (Version: 2.9.0)	National Institute of Health	Bethesda, Maryland, USA
ImageSP	SYSPROG	Minsk, Belarus
IOS 16.1.1	Apple	Cupertino, Kalifornien, USA

Tabelle 6: Verwendete Computerprogramme.

2.5 Statistische Analyse

Innerhalb eines Genotyps wurden die Mäuse zufällig den experimentellen Gruppen zugeordnet. Ein Datenpunkt „n“ repräsentiert den Mittelwert der Mucingranula im apikalen 1 µm Zytoplasmaareal von 20 Cholangiozyten der Gallenblase einer Maus, also eines biologischen Replikats.

Die pharmakologische Stimulation explantierter Gallenblasen mit Muskarin, Muskarin mit Atropin und dem Kontrollmedium (destilliertes Wasser) wurden an C57BL/6-Mäusen auf 7 Versuchstage aufgeteilt. Das Alter dieser Mäuse war mindestens 67 Tage und höchstens 118 Tage. Dabei waren alle Mäuse weiblich.

Die pharmakologische Stimulation explantierter Gallenblasen mit Propionat und dem Kontrollmedium (destilliertes Wasser) wurden an C57BL/6N und *Chrm3^{-/-}*-Mäusen in 2 Versuchstage aufgeteilt. Das Alter der Mäuse war mindestens 161 Tage und höchstens 226 Tage. Alle Mäuse waren weiblich.

Die LED-Stimulation explantierter Gallenblasen der *Chat-ChR2-EYFP* und C57BL/6RJ-Mäuse fand an 4 Versuchstagen statt. Das Alter der Mäuse war mindestens 8 Wochen. Die pharmakologische Stimulation explantierter Gallenblasen mit Propionat, Muskarin und dem Kontrollmedium (destilliertes Wasser) wurde an *Avi^{cre}:Chat^{fl/fl}* und

Avil^{pre}:Chat^{fl/+}-Mäusen auf 2 Versuchstage aufgeteilt. Das Alter der Mäuse war mindestens 90 Tage und höchstens 196 Tage. Alle Mäuse waren weiblich.

An jedem Versuchstag gab es mindestens eine Kontrollmaus und mindestens eine Kontrollstimulation der explantierten Gallenblase.

Tötung, Explantation und Stimulation erfolgten bei allen Versuchen jeweils am selben Tag.

Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden Ergebnisse der Versuche als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

Es wurden keine Daten exkludiert, bis auf Präparate, die initial oder in der Gewebeaufbereitung kein intaktes Gewebe im Elektronenmikroskop erkennen ließen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Prism 7, auch die Graphen wurden dort erstellt. Das Gestalten von repräsentativen Schemata und Abbildungen erfolgte mit Hilfe von BioRender und PowerPoint. Zunächst wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests geprüft, ob die Stichprobe normalverteilt ist. Anschließend wurde der ungepaarte *t*-Test angewendet. Wenn ein Merkmal sich auf mehrere Versuchsgruppen bezog und diese verglichen werden sollten, erfolgte eine Varianzanalyse (ANOVA, Analysis of Variance) mit post hoc Tukey-Korrektur. Unterschiede wurden bei $p \leq 0.05$ als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Morphologie von Cholangiozyten der Gallenblase

Cholangiozyten variierten in der Höhe ihrer apikobasalen Ausdehnung von 10-18 μm . Ihre Form war übereinstimmend mit vorherigen Studien hochprismatisch (Hayward & Johnston, 1961; Housset et al., 2016; Oldham-Ott & Gilloteaux, 1997) (Abbildung 13). Das Kern-Plasma-Verhältnis wuchs, je kleiner der Cholangiozyt war. Cholangiozyten besaßen eine apikale (luminale) und basolaterale Plasmamembran, welche an die Basalmembran anschließt. Die basolateralen Plasmamembranen der Cholangiozyten zeigten Auffaltungen auf. Von den Cholangiozyten erstreckten sich zahlreiche Mikrovilli ins Lumen der Gallenwege, diese waren von einem Schleimfilm umgeben.

Vesikel, Lysosomen, Mucingranula und weitere Organellen befanden sich in der apikalen Domäne des Zytoplasmas.

Cholangiozyten besaßen einen prominenten Golgi-Apparat mit einer mittigen Lokalisation, ein unauffälliges raues endoplasmatisches Retikulum und zahlreiche Mitochondrien, welche die Stoffwechselaktivität der Cholangiozyten zur

Aufrechterhaltung der Funktionalität des Gallenblasenepithels unterstreichen. Der Nukleus besaß Einkerbungen und war basal lokalisiert (Abbildung 13).

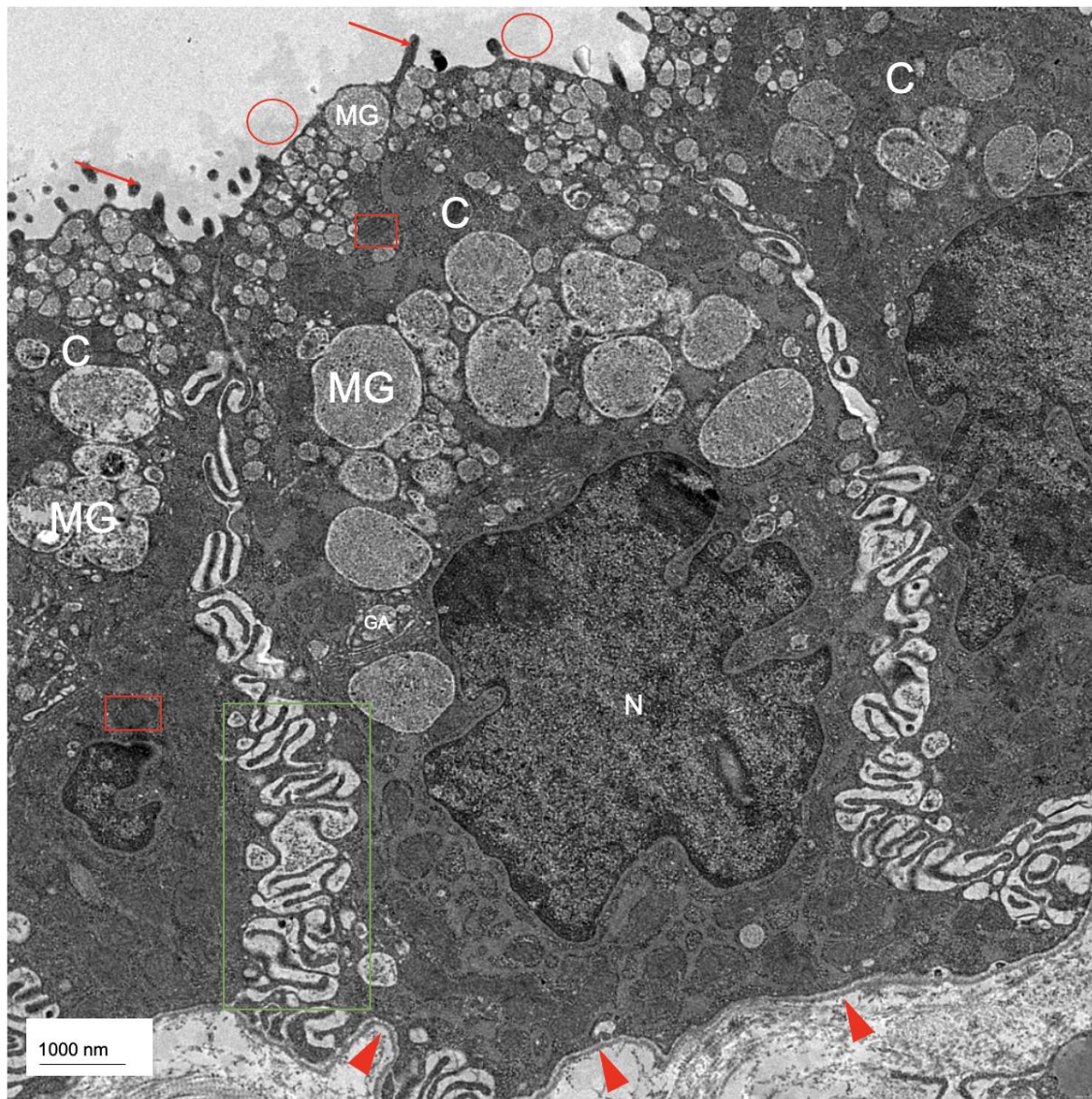


Abbildung 13: Morphologie der Cholangiozyten in der Gallenblase der Maus. Cholangiozyten (C) sind die dominierenden Zellen in der Lamina epithelialis der Tunica mucosa der Gallenblase. Sie bilden ein einschichtiges hochprismatisches Epithel. An ihrer apikalen Zellmembran zeigen sie in das Lumen reichende Mikrovilli (rote Pfeile) auf. Die apikale Zellmembran wird von einem Schleimfilm (rote Kreise) bedeckt. Die laterale Membran (grüner Kasten) zeigt Auffaltungen auf. Lysosomen, Vesikel und Mucingranula (MG) befinden sich im apikalen Zytoplasmaareal. Mitochondrien (rote Kästen) sind in der gesamten Zelle verteilt. In der Mitte der Zelle ist der Golgi-Apparat (GA) deutlich ausgeprägt. Basal in der Zelle befindet sich der runde bis ovale Nukleus (N). Die Pfeilspitzen zeigen auf die Basallamina.

3.2 Ultrastruktur der Bürstenzelle der Gallenblase

Der dominierende Zelltyp des Gallenblasenepithels war der Cholangiozyt, die Hauptzelle. Am zweithäufigsten kam die Bürstenzelle vor (Abbildung 14), übereinstimmend mit vorherigen elektronenmikroskopischen Studien (Luciano, 1972).

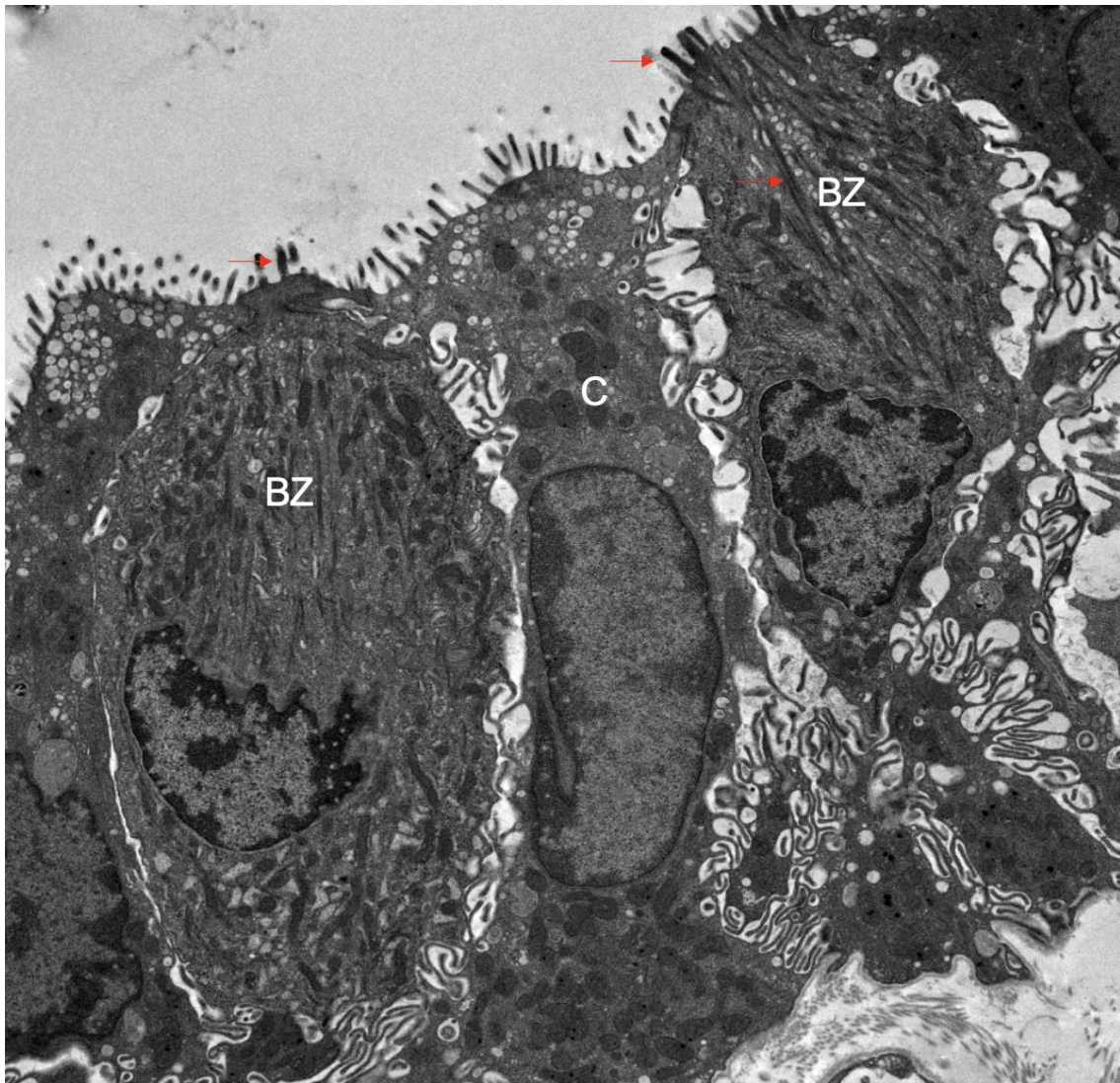
Bürstenzellen waren in der Gallenblase nicht homogen verteilt. Am häufigsten waren sie am Gallenblasenhals und –boden lokalisiert (Luciano and Reale, 1990).

Die Bürstenzelle war asymmetrisch: schmal im apikalen Teil, welcher dem Gallenblasenlumen zugewandt war, und breit im basalen Teil. Die basale Plasmamembran reichte bis zur Basalmembran des Gallenblasenepithels (Abbildung 14).

Bürstenzellen kennzeichnete ein apikaler namensgebender Bürstensaum, der aus steifen und prominenten Mikrovilli bestand (Abbildung 15). Dabei wiesen sie, übereinstimmend mit Luciano et al., einen Diameter von 0.18-0.2 μm auf (Luciano et al., 1977). Apikal waren die Bündel an der Innenseite der Zytoplasmamembran verankert, während sie basal tief bis in die Zelle reichten. Zwischen den tief im Zytoplasma verankerten apikalen Mikrovilli befand sich eine morphologische heterogene Menge an Vesikeln (Abbildung 15). Sie konnten rundlich erscheinen und einen prominenten Kern aufweisen oder eine Form ohne Inhalt annehmen. Die Zahl der Vesikel unterschied sich zwischen den Bürstenzellen. Dies wurde bereits früher in Zusammenhang mit der Zellaktivität gesetzt (Luciano & Reale, 1979).

Der exzentrische Nucleus der Bürstenzelle war oval und im basalen Teil des Zytoplasmas lokalisiert, wo die Zelle am breitesten war (Abbildung 15).

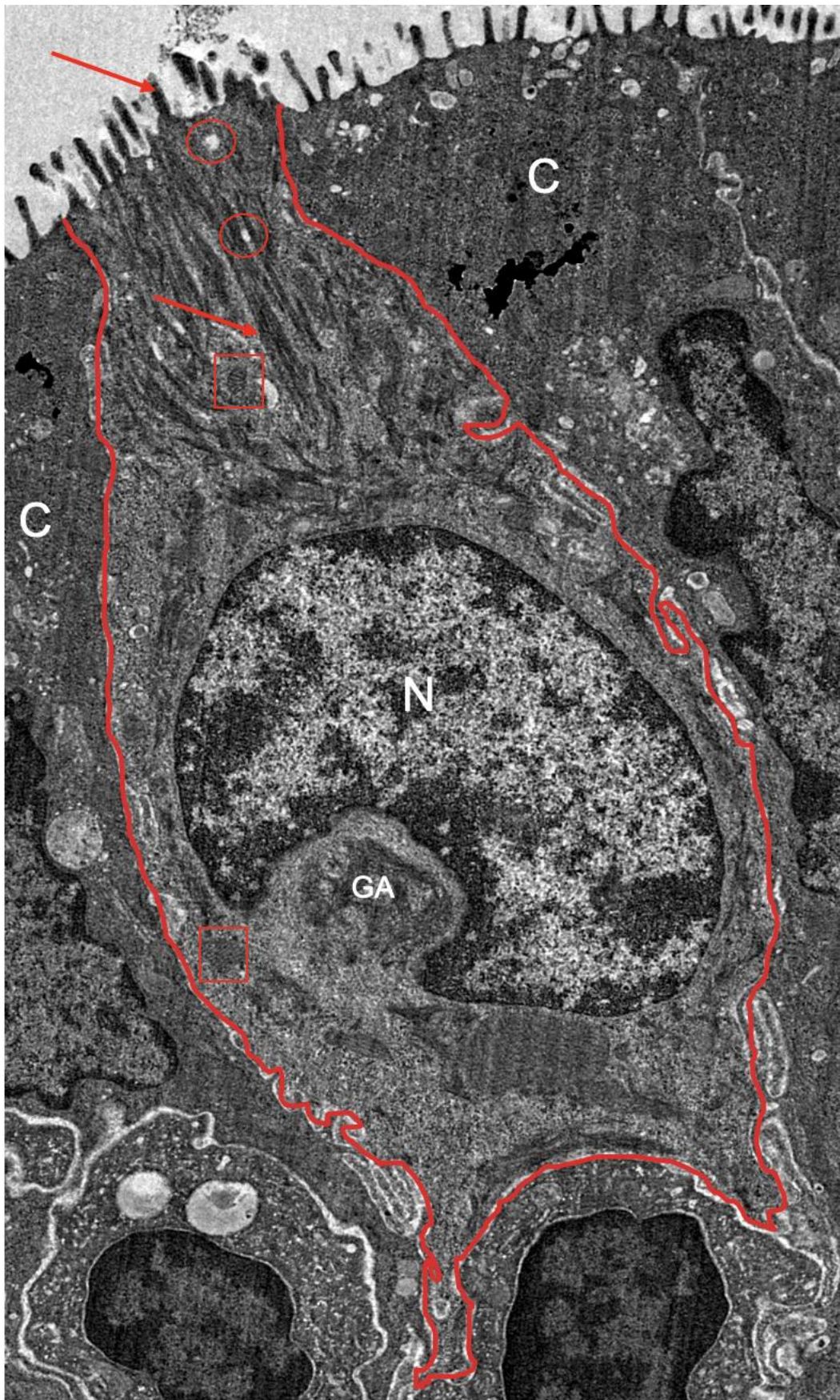
Auch Ribosomen und das raue endoplasmatische Retikulum lagen in der basalen Region. Der Golgi-Apparat war innerhalb der Bürstenzellen unterschiedlich ausgeprägt und lag meist lateral des Nucleus. Die Mitochondrien waren vom Cristae-Typ und häufig apikal lokalisiert. In wenigen Aufnahmen befanden sich basal der Bürstenzellen, aber innerhalb des Gallenblasenepithels, Zellen des Immunsystems (Abbildung 15).



1000 nm

Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme von zwei Bürstenzellen in der Gallenblase der Maus.

Ein längs angeschnittener (basal bis apikal) Cholangiozyt (C) befindet sich in der Mitte der Aufnahme. Bilateral angrenzend befinden sich Bürstenzellen (BZ). Charakteristisch für Bürstenzellen sind der eher basal liegende Zellkern, zahlreiche Mikrovilli (rote Pfeile), die in das Lumen reichen, sowie Vesikel zwischen den tief verankerten Mikrovilli.



2500 nm

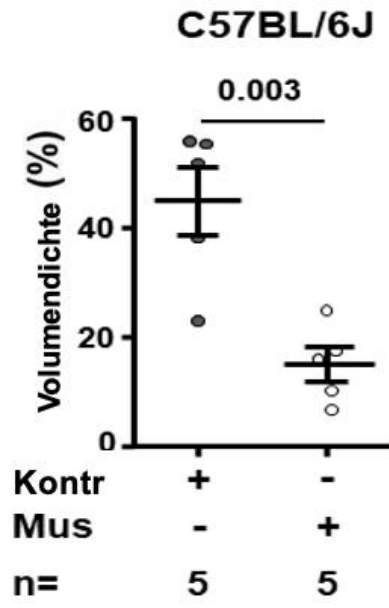
Abbildung 15: Die Morphologie der Bürstenzellen mit ihren charakteristischen tief verankerten Mikrovilli.

Die Bürstenzelle (rote Umrandung) ist im Gallenblasenepithel von Cholangiozyten (C) umgeben. Sie ragt mit ihren über Filamentbündel (rote Pfeile) tief im Zytoplasma verankerten Mikrovilli apikal in das Lumen der Gallenblase. Dabei unterscheidet sich die Dichte sowie die Verankerung ihres Bürstensaums von denen der Cholangiozyten (hier jeweils die lateralen Zellen). Zwischen den axial verankerten Mikrovilli befinden sich Vesikel (rot eingekreist). Im basalen Teil der Bürstenzelle befindet sich der ovale Nucleus (N), der sich in seiner Form ebenfalls von den Nachbarzellen unterscheidet. Die Mitochondrien (rote Kästen) sind vom Cristae-Typ und häufig apikal lokalisiert. Der Golgi-Apparat (GA) befindet sich lateral des Nucleus. Basal der Bürstenzelle befinden sich zwei Zellen des Immunsystems.

3.3 Muskarin bewirkt eine Exozytose der Mucingranula

Die Stimulation explantierter Gallenblasen von C57BL/6J-Mäusen mit dem cholinergen Agonisten Muskarin (10 μM) ergab eine signifikante ($p = 0,003$) Verringerung der Volumendichte von apikalen Mucingranula der Cholangiozyten um 29,6 % (Abbildung 16). Dieses Ergebnis validiert eine frühere Studie (Axelsson et al., 1985). Der cholinerge Agonist Pilocarpin förderte die Sekretion von Mucingranula in Cholangiozyten der Maus und führte damit zu einer geringeren intrazellulären Volumendichte der Mucingranula.

a)



b)

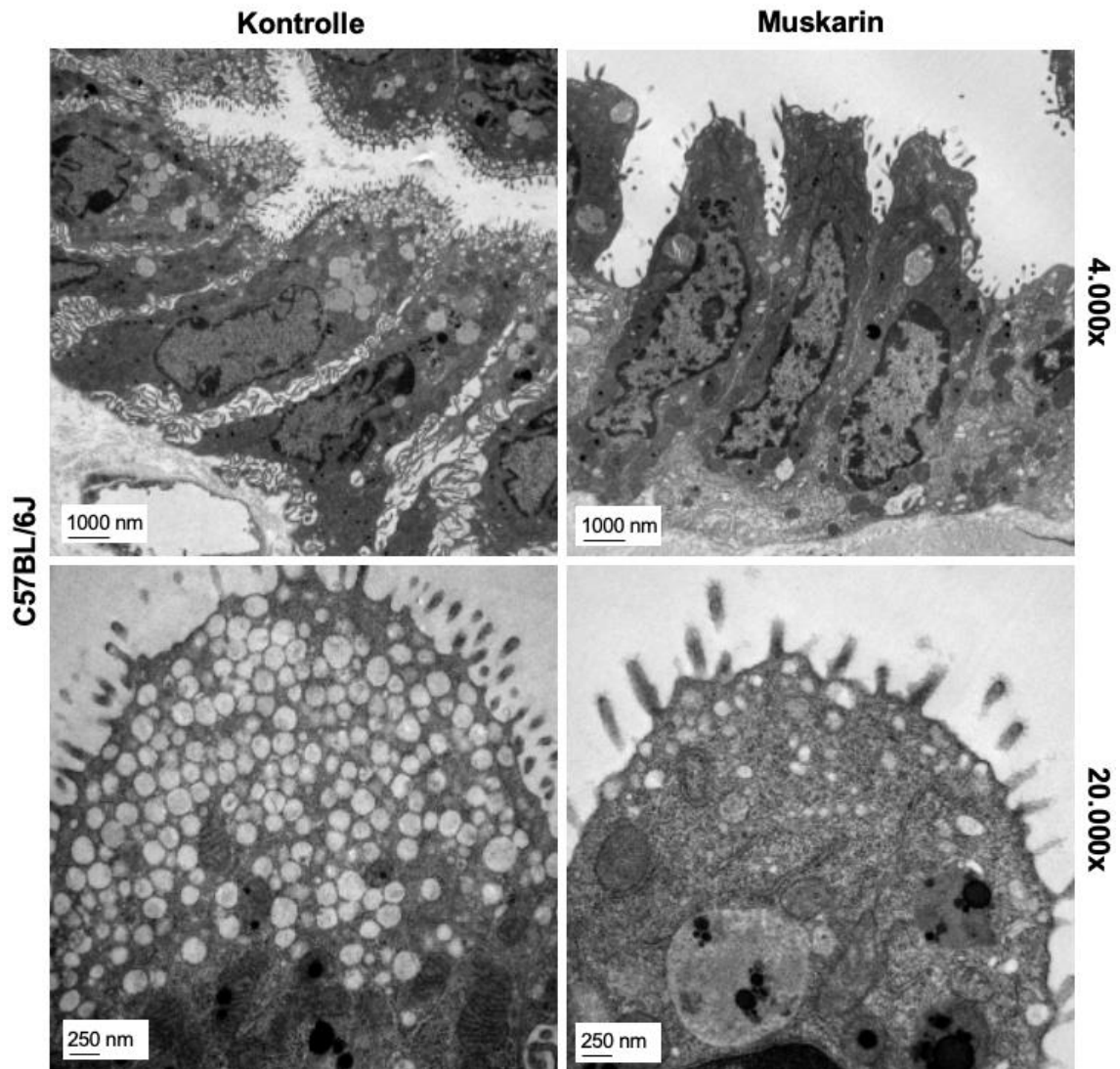


Abbildung 16: Eine cholinerge Stimulation bewirkt eine Exozytose von Mucingranula.

a) Volumendichtemessungen der apikalen Zellregion von Cholangiozyten explantierter C57BL/6J-Gallenblasen, die mit dem Kontrollmedium (Kontr+) oder mit dem cholinergen Agonisten Muskarin (10 μ M) stimuliert wurden. Kontrollmedium: Destilliertes Wasser. Ungepaarter *t*-Test, Daten von 5 unabhängigen Experimenten (*n* = 5).

b) Obere Reihe: Repräsentative elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahmen von Cholangiozyten. Untere Reihe: Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen der apikalen Zellregion von Cholangiozyten bei höherer Originalvergrößerung. Modifiziert aus Keshavarz et al. (2021).

3.4 Eine optogenetische Aktivierung der Bürstenzelle in *Chat*-ChR2-EYFP-Mäusen senkt die Volumendichte der Mucingranula in den Cholangiozyten

Eine 3-minütige LED-Stimulation (blaues Licht, 456 nm, 8 Hz, 60 ms Pulslänge) explantierter Gallenblasen von *Chat*-ChR2-EYFP-Mäusen (ChR2^{tg/+}) führte zu einer Reduktion der Volumendichte der Mucingranula im apikalen Zytoplasma der Cholangiozyten um 65% im Vergleich zu Gallenblasen von korrespondierenden Geschwistertieren (ChR2^{+/+}). Dieser Effekt war mit dem muskarinischen Blocker Atropin (1 μ M) antagonisierbar (Abbildung 17) und ist damit auf eine Aktivierung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren zurückzuführen. Da *Chat*-ChR2-EYFP in der Gallenblase nur in Bürstenzellen exprimiert wird (Keshavarz et al., 2022), ist nach einer LED-Stimulation von einer parakrinen Stimulation der Cholangiozyten und nachfolgender Reduktion der Volumendichte der Mucingranula auszugehen.

Eine LED-Stimulation explantierter Wildtypgallenblasen führte ebenfalls zu einer Verringerung der Mittelwerte der Volumendichte der Mucingranula, das war mit einem *p*-Wert von 0,152 jedoch nicht signifikant. Hier kann bereits ein geringer Effekt über natürlich vorkommende lichtsensitive Proteine vorliegen, der bei dieser Stichprobenanzahl nicht sichtbar wird.

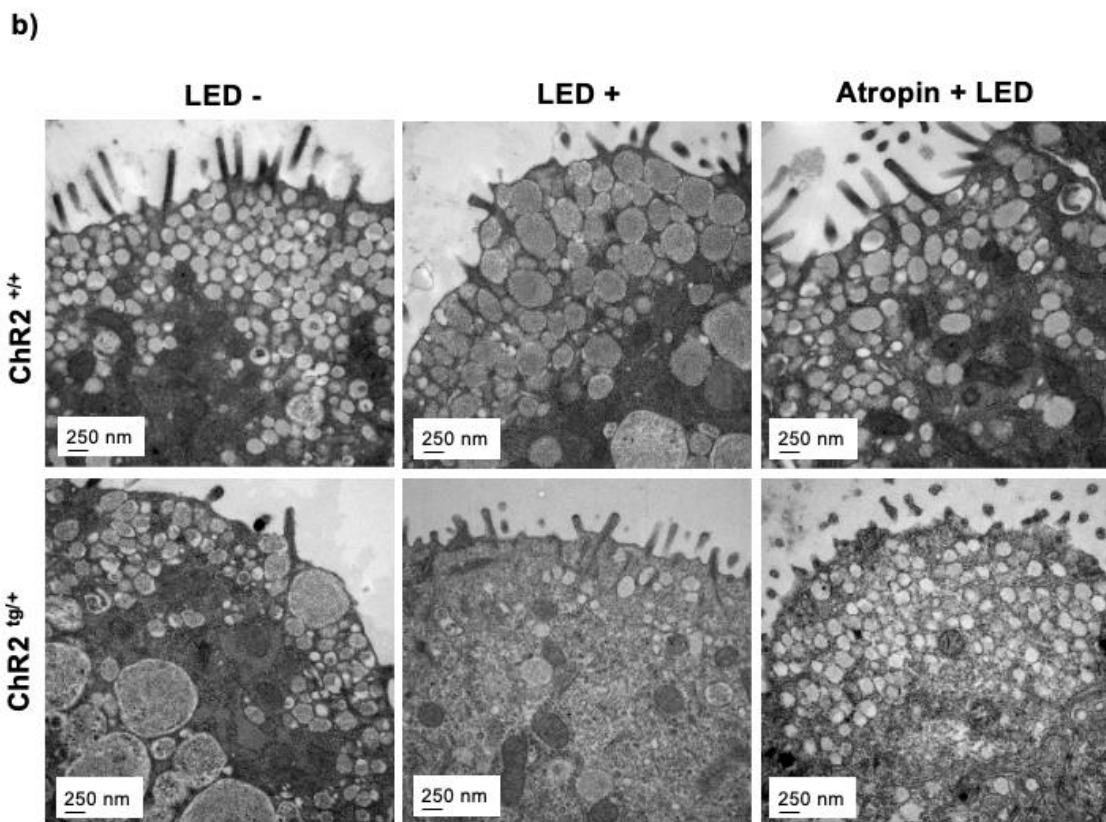
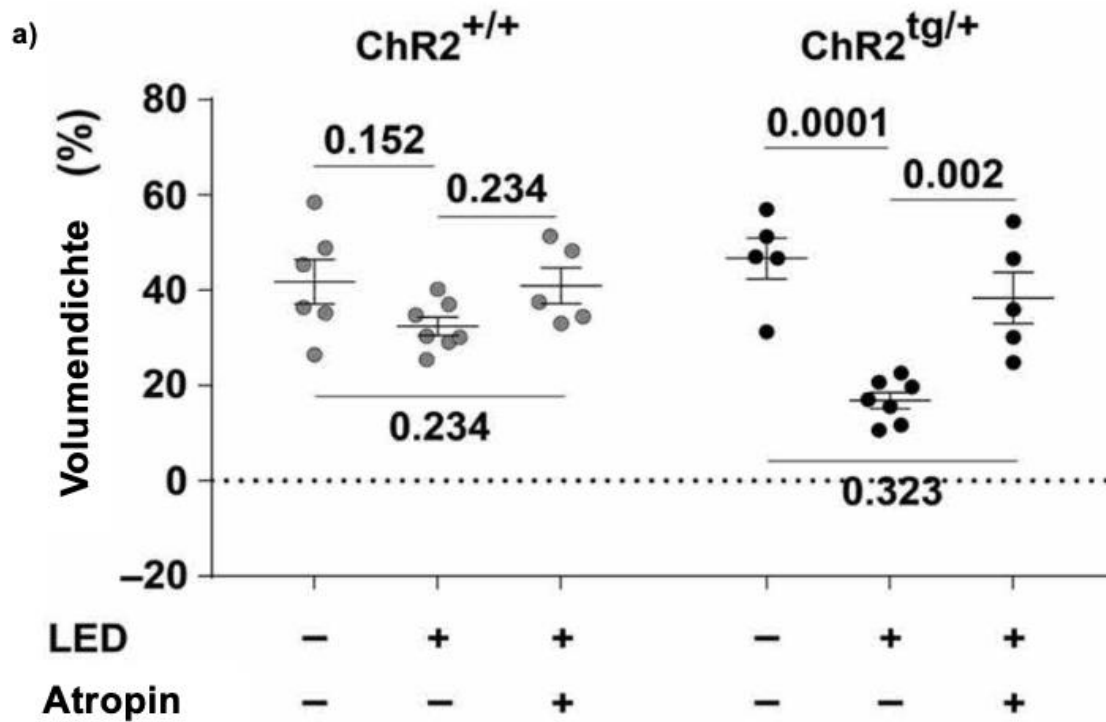


Abbildung 17: Eine optogenetische Aktivierung der Bürstenzellen in *Chat-ChR2-EYFP*-Mäusen senkt die Volumendichte der Mucingranula in den Cholangiozyten.

a) Volumendichtemessungen der apikalen Zellregion von Cholangiozyten explantierter *Chat*-ChR2-EYFP (ChR2^{tg/+})- und ChR2^{+/+}-Gallenblasen, die nicht (LED-) oder mit LED (LED+) stimuliert wurden, jeweils in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (+) des muskarinischen Blockers Atropin. ANOVA mit Tukey post hoc-Korrektur. Daten von 5-7 unabhängigen Experimenten für alle Gruppen (n = 5 bis 7).

b) Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen der apikalen Zellregion von Cholangiozyten bei 20.000-facher Originalvergrößerung. Modifiziert aus Keshavarz et al. (2021).

3.5 Propionat induziert die Exozytose von Mucingranula über einen cholinergen Mechanismus

Nadsjombati et al. wiesen FFARs in den Bürstenzellen des Gastrointestinaltrakts nach (Nadsjombati et al., 2018). Dieser Rezeptor detektiert kurzkettige Fettsäuren, welche Stoffwechselprodukte intestinaler Bakterien sind (Trompette et al., 2014). Wir betrachteten daher Propionat als möglichen Stimulus für die Bürstenzellen der Gallenblase. Aufgrund der beiden Vorbefunde, dass über einen muskarinischen Rezeptor Mucingranula freigesetzt werden können und Bürstenzellen ChAT exprimieren, lag der Verdacht nahe, dass die Stimulation der Bürstenzelle über eine Acetylcholinfreisetzung erfolgt. Daher wurde Propionat als Stimulus direkt in zwei verschiedenen Mäusestämmen getestet: Ein Mausstamm repräsentiert Mäuse, die ChAT exprimieren (*Avil^{cre/+}:Chat^{fl/+}*-Mäuse). Dem anderen Mausstamm fehlt bürstenzellspezifisch das Acetylcholinsyntheseenzym (*Avil^{cre/+}:Chat^{fl/fl}*-Mäuse).

In den *Avil^{cre/+}:Chat^{fl/+}*-Mäusen führte die Behandlung mit dem von Bakterien gebildeten Stoffwechselprodukt Propionat (5 mM) zu einer signifikanten Reduktion der Volumendichte im Vergleich zur Kontrollgruppe (p = 0,0001). Diese Reduktion zeigte einen fördernden Einfluss von Propionat auf die Mucinsekretion, der in einer Verringerung der Volumendichte der Mucingranula in den Cholangiozyten zum Ausdruck kam.

Wir stellten die Arbeitshypothese auf, dass dieser Effekt durch das von Bürstenzellen mit Hilfe von ChAT synthetisierte Acetylcholin vermittelt wird.

Diese Hypothese wurde mit Hilfe eines Maustammes (*Avil^{cre/+}:Chat^{fl/fl}*-Mäuse), welcher bürstenzellspezifisch kein Acetylcholin synthetisiert, getestet. In diesem Mausstamm hatte Propionat keinen Einfluss mehr auf die Mucinsekretion. Zwar fehlt bei *Avil^{cre/+}:Chat^{fl/fl}*-Mäusen die Quelle von Acetylcholin, dennoch führte eine Stimulation mit Muskarin zu einer erhöhten Mucinsekretion der Cholangiozyten, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass der Rezeptor der Cholangiozyten in diesem Mausstamm weiterhin funktionierte.

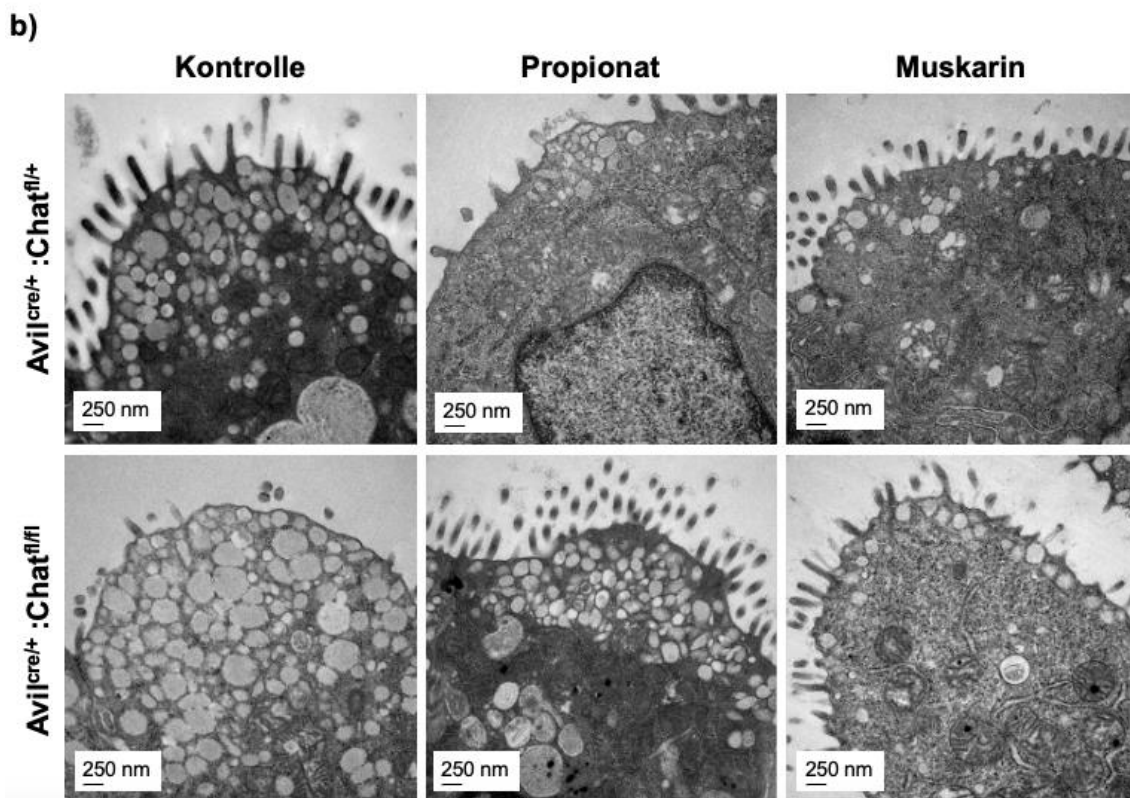
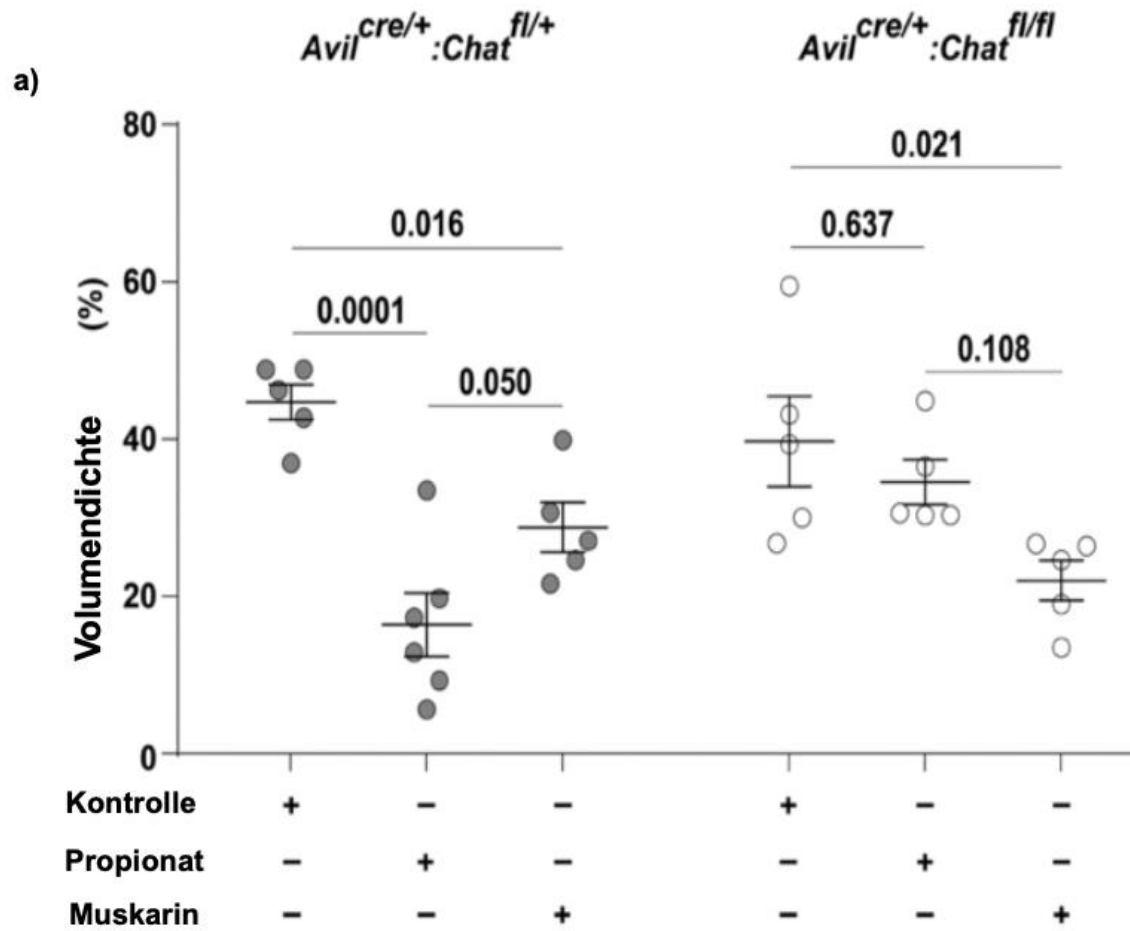


Abbildung 18: Propionat reduziert die Dichte der Mucingranula in den Cholangiozyten über ChAT der Bürstenzelle.

a) Explantierte Gallenblasen von Mäusen mit einem büstenzellspezifischen Verlust von *Chat* (*Avil^{cre/+}:Chat^{fl/fl}*) und von Wurfgeschwistern als Kontrolle (*Avil^{cre/+}:Chat^{fl/+}*) wurden mit dem Kontrollmedium (Kontrolle+), mit Propionat (Propionat+) (5 mM) oder Muskarin (Muskarin+) (10 μ M) stimuliert. Der Graph zeigt die Volumendichtemessungen dazu. Kontrollmedium: Destilliertes Wasser. Daten von 6 unabhängigen Experimenten (n = 6) für mit Propionat stimulierte *Avil^{cre/+}:Chat^{fl/+}* Gallenblasen und 5 unabhängigen Experimenten für alle anderen Gruppen. ANOVA mit Tukey post hoc-Korrektur.

b) Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen der apikalen Zellregion von Cholangiozyten.

Modifiziert aus Keshavarz et al. (2021).

3.6 Der Chrm3-Rezeptor vermittelt den cholinergen Effekt der Bürstenzelle an den Cholangiozyten

In den Gallenblasen der *Chrm3^{+/+}*-Mäuse reduzierte eine Propionatbehandlung die Volumendichte der Mucingranula in den Cholangiozyten um 13 % (p = 0,015) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 19).

Im Gegensatz dazu zeigten die *Chrm3^{-/-}*-Mäuse, denen das *Chrm3*-Gen fehlt, keine signifikante Veränderung der Volumendichte der Mucingranula nach Propionatbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe (p = 0,984) (Abbildung 19). Damit bewirkte Propionat eine Verringerung der Volumendichte der Cholangiozyten über die Vermittlung durch Chrm3. Diese Ergebnisse zeigen in Zusammenschau der vorherigen Ergebnisse, dass Chrm3 eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung des cholinergen Effekts von Bürstenzellen auf Cholangiozyten spielte: Propionat triggerte die Bürstenzelle ChAT-abhängig Acetylcholin zu sezernieren. Acetylcholin wiederum vermittelte über Chrm3 seinen cholinergen Effekt an die Cholangiozyten, deren Volumendichte der Mucingranula in Folge ihrer Sekretion abnahm.

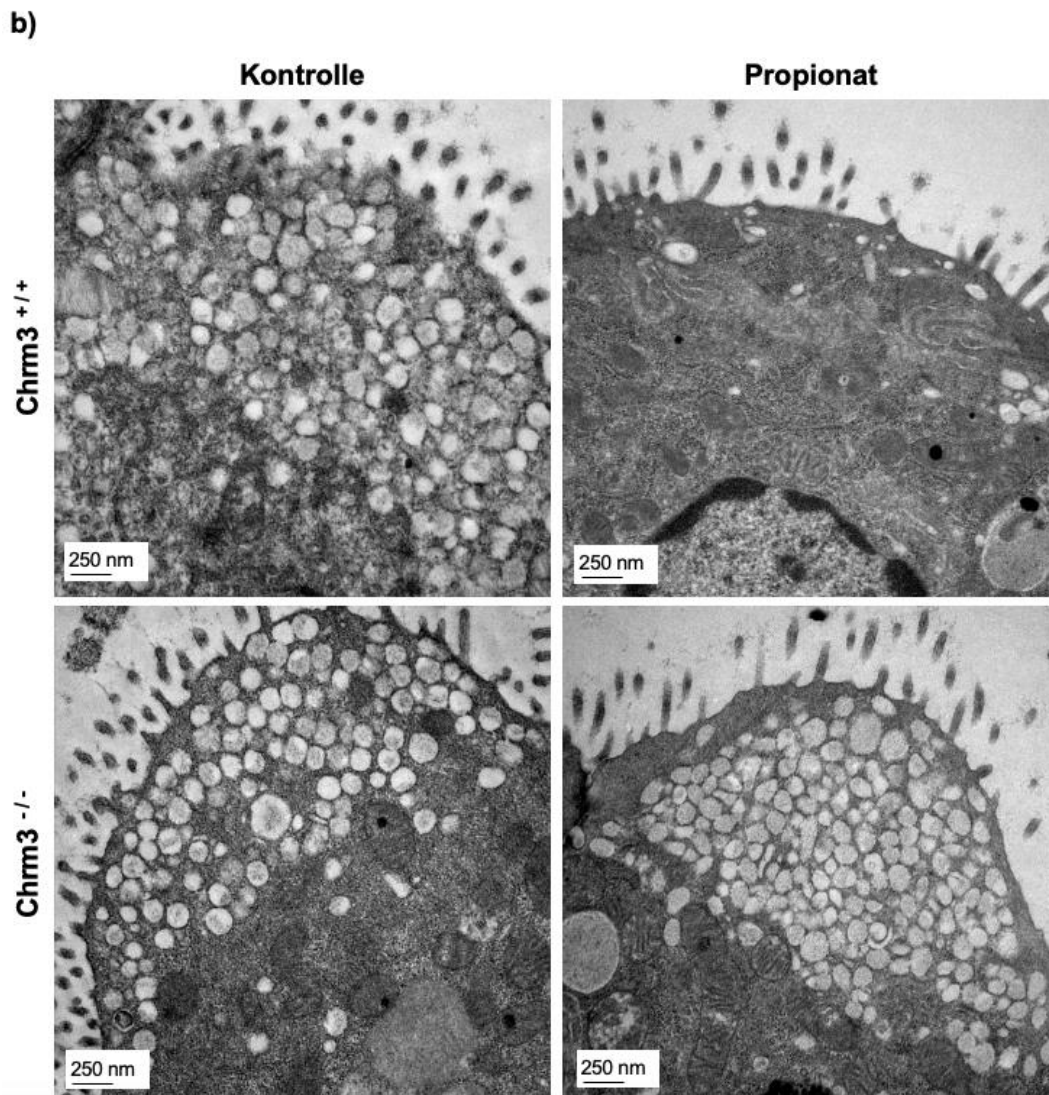
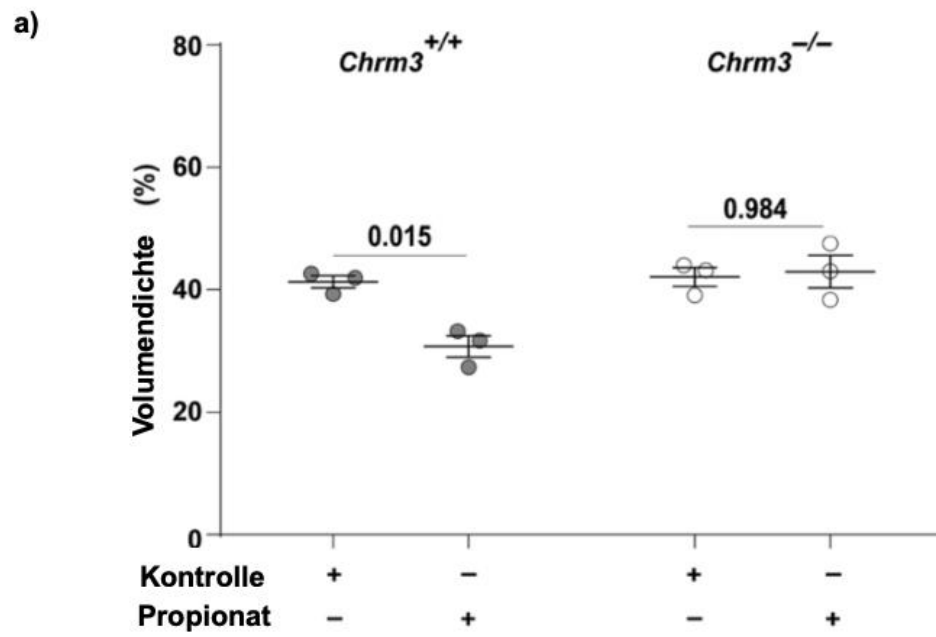


Abbildung 19: *Chrm3* vermittelt den cholinergen Effekt von Bürstenzellen auf Cholangiozyten.

- a) Volumendichte von Mucingranula von Cholangiozyten explantierter *Chrm3^{+/+}*- und *Chrm3^{-/-}*-Gallenblasen, die mit dem Kontrollmedium (Kontr+) oder mit Propionat (5 mM) stimuliert wurden. Kontrollmedium: Destilliertes Wasser. Ungepaarter *t*-Test. Daten von 3 unabhängigen Experimenten (*n* = 3).
- b) Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen der apikalen Zellregion von Cholangiozyten. Modifiziert aus Keshavarz et al. (2021).

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

Die Analyse der Volumendichte von Zellkomponenten in biologischen Proben ist entscheidend, um die Organisation und Funktion von Zellstrukturen zu verstehen. Hierbei wird die Point Counting-Methode, eine klassische, seit vielen Jahrzehnten etablierte Technik in der quantitativen Mikroskopie und morphometrischen Analyse, häufig mit der Elektronenmikroskopie kombiniert (Weibel et al., 1966). Besonders in der kardiovaskulären Forschung gewann die Elektronenmikroskopie in Kombination mit der Point Counting-Methode in den letzten Jahrzehnten an Popularität (zusammengefasst von Collins et al., 2021). Beispielsweise verglichen Rakusan et al. die Volumendichte von Mitochondrien physiologischer Kardiomyozyten mit hypertrophen Kardiomyozyten (Rakusan & Tomanek, 1986).

Die Elektronenmikroskopie erlaubt eine ultrastrukturelle Abgrenzung der Mucingranula von anderen Zellkomponenten der Cholangiozyten. Diese hochauflösenden Informationen ermöglichen eine robuste und quantitative Punktzählung, welche Schlussfolgerungen über die Sekretion von Mucingranula erlauben. Bereits im Jahr 1985 untersuchten Axelsson et al. über die elektronenmikroskopische Point Counting-Methode die Volumendichte der Mucingranula in Cholangiozyten der Maus nach Stimulation mit dem cholinergen Agonisten Pilocarpin. Zur Erfassung der Mucinsekretion von Cholangiozyten wurde zunächst die Point Counting-Methode verwendet.

Darüber hinaus wurden die Ergebnisse unabhängig mittels einer modifizierten PAS-Färbung in unserer Arbeitsgruppe validiert. Die explantierten Gallenblasen der Versuchstiere sowie der entsprechenden Kontrollgruppen der gleichen Tiermodelle wurden longitudinal eröffnet und nach dem Protokoll der elektronenmikroskopischen Versuche chemisch stimuliert. Die daraus gewonnenen Überstände wurden gesammelt und mittels Dot-Blot auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran transferiert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit einer hochsensitiven, modifizierten PAS-Reaktion. Zur quantitativen Bestimmung des Glykoproteingehalts wurde die optische Dichte der gefärbten Proteine mithilfe der Software ImageJ und GraphPad Prism analysiert. Die Glykoproteinkonzentration der Proben wurde anhand einer Standardkurve, die auf Schweinemagenschleim basierte, berechnet. Damit konnten Rückschlüsse auf die

Konzentration der Glykoproteine und die Mucinsekretion von Cholangiozyten gezogen werden, welche die zuvor ermittelten Ergebnisse aus der Point Counting-Methode bestätigten (Keshavarz et al., 2022).

Ein natürlicher aktivierender Stimulus der biliären Bürstenzelle war nicht bekannt. Um diese Zelle spezifisch zu aktivieren, wurde ein optogenetisches Modell gewählt. Ein Fusionsprotein von ChR2 und dem gelb fluoreszierenden Protein YFP wurde unter der Kontrolle des ChAT-Promotors und somit in Bürstenzellen exprimiert. Entscheidend für die Interpretation der Ergebnisse war, dass ChR2 exklusiv in Bürstenzellen exprimiert wurde, da der ChAT-Promotor auch in cholinergen Nervenzellen aktiv sein kann. Durchgeführte Immunfärbungen mit Antikörpern gegen büstenzelltypische Marker wie ChAT, PLC β 2 (die für chemosensorische Zellen charakteristische Phospholipase-C-Isoform), TRPM5 und Pou2f3 (Yamashita et al., 2017) in unserer Arbeitsgruppe zeigten dabei die exklusive Expression von ChR2 in Bürstenzellen in der Gallenblase (Keshavarz et al., 2022).

So wurde mittels Immunfärbungen gezeigt, dass die native YFP-Fluoreszenz eine Kolokalisation mit der ChAT-Immunreaktivität in einzelnen epithelialen Zellen aufwies, was bereits auf die cholinerge Natur der Bürstenzellen hinwies. Weiterführende doppelmarkierende Immunfluoreszenzanalysen zeigten eine YFP-Immunreaktivität in Pou2f3-, PLC β 2- und TRPM5-positiven Bürstenzellen der Gallenblase, was in vier biologischen Replikaten nachgewiesen wurde. Zusätzlich zeigte die Doppel-Immunfluoreszenz von Gallenblasen Whole-mounts eine weitgehende Kolokalisation von YFP- und TRPM5-Immunreaktivitäten, wobei nur selten einzelne immunreaktive Zellen gefunden wurden.

Damit konnte basierend auf der Expression von EYFP und TRPM5 gezeigt werden, dass 91,7% von 455 untersuchten Zellen EYFP⁺/TRPM5⁺ waren. Nur 0,4 % waren EYFP⁺/TRPM5⁻-Zellen, 7,7 % waren EYFP⁻/TRPM5⁺-Zellen.

Des Weiteren konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass ChAT-ChR2-EYFP nicht in Nervenfasern der Gallenblase exprimiert wird. Die immunhistochemische Färbung der Gallenblase mit Antikörpern gegen YFP und PGP9.5 (*Protein Gene Product 9.5*), einem allgemeinen neuronalen Marker, ergab keine Überlappung der Signale, was darauf hindeutet, dass cholinerge Nervenfasern in diesem Gewebe keine ChR2-vermittelte YFP-Fluoreszenz aufweisen. Dies wurde in drei biologischen Replikaten bestätigt. Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass ChAT-ChR2-EYFP selektiv in cholinergen Bürstenzellen der Gallenblase exprimiert wird, nicht jedoch in cholinergen Nervenfasern.

Eine vorherige Arbeit von Perniss et al. zeigte bereits die exklusive Expression von ChR2 in den Bürstenzellen der Trachea. In der Arbeit wurde das gleiche Mausmodell, also

Chat-ChR2-EYFP-Mäuse, eingesetzt. In den Tracheen dieser Mäuse wurde die native YFP-Fluoreszenz in der Mehrheit, aber nicht in allen Bürstenzellen beobachtet. Diese Bürstenzellen wurden durch eine simultane ChAT- und TRPM5-Immunfärbung identifiziert. Zusätzliche Immunfärbungen mit einem anti-GFP-Antikörper zur Detektion niedrigerer Expressionslevel des ChR2-YFP-Fusionsproteins konnten die Anzahl der ChR2-YFP-positiven Zellen weiter erhöhen. Zur Quantifizierung wurde die Kofärbung mit einem TRPM5-Antikörper gewählt, da diese Methode sich als effizienter erwies als die ChAT-Immunfärbung, was in einer ChAT-GFP-Reportermaus (Tallini et al., 2006) getestet wurde. Diese Analyse ergab eine YFP-Expression in 82 % der TRPM5-positiven Zellen, während keine anderen epithelialen Zelltypen eine YFP-Expression zeigten (Perniss et al., 2020).

Das optogenetische Modell erlaubte eine präzise Aktivierung der Bürstenzellen durch Licht, ohne dass zuvor ein natürlicher Stimulus identifiziert werden musste. Blaues Licht führte zur Öffnung von ChR2-Kanälen, wodurch Kationen in die Zelle einströmten. Dies bewirkte eine Depolarisation der Zellmembran und damit eine zelltypspezifische Erregung der Bürstenzellen. Die Tatsache, dass eine Depolarisation der Bürstenzellen durch ChR2 zu einer nachfolgenden ACh-Freisetzung führte, zeigt, dass dieser Prozess spannungsabhängig ist. Dies ist ein bedeutender Befund, da auch denkbar wäre, dass die ACh-Freisetzung über andere Mechanismen, wie metabotrope Signalwege oder autokrine/parakrine Prozesse, gesteuert werden könnte. Durch eine gezielte elektrische Erregung der Bürstenzellen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Freisetzung von ACh an Änderungen des Membranpotenzials gekoppelt ist.

4.2 Physiologische Bedeutung der Mucinsekretion

Das Speichern und Leeren von Galle hängt maßgeblich von der motorischen Aktivität der Gallenblase ab. Galle enthält Gallensäuren, welche potenziell zellschädigend auf das Gallenblasenepithel wirken können. Das Gallenblasenepithel sezerniert deswegen Mucine und Bikarbonat, um das Gallenblasenepithel zu schützen (Housset et al., 2016). Im Fall eindringender Pathogene sind Mucine wahrscheinlich die ersten Moleküle, mit denen sie in Kontakt kommen, bevor sie die epithelialen Zellen erreichen. Die Interaktion mit Mucinen begrenzt die Bindung der Pathogene an zellulären Oberflächenglykoproteinen und kann diese so neutralisieren (Kim & Khan, 2013). Dementsprechend ist eine erhöhte Mucinsekretion eine seit langem bekannte Abwehrreaktion der infizierten Gallenblase (Gilman et al., 1982).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bürstenzelle parakrin über Acetylcholin die Mucinfreisetzung aus den benachbarten Cholangiozyten stimuliert. Eine Kommunikation der Bürstenzellen mit den Nachbarzellen stellt grundsätzlich keine Ausnahme dar. In der Trachea wird nach Detektion bakterieller Formyl-Peptide durch Acetylcholin die mukoziliäre Clearance des benachbarten respiratorischen Epithels erhöht. Dies ist als unspezifische Abwehr ein essenzieller Schutzmechanismus der Atemwege, bei dem die Zilien in einer koordinierten Wellenbewegung den Schleim in Richtung Rachen als Reaktion auf z.B. Reizstoffe oder Infektionen transportieren (Perniss et al., 2020).

Bürstenzellen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Elektrolytsekretion im Dünndarm und in der Trachea, indem sie über Acetylcholin die Chloridsekretion benachbarter Epithelzellen stimulieren (Billipp et al., 2024; Perniss et al., 2023). Diese sezernieren Chloridionen, die aufgrund ihres osmotischen Effekts Wasser nachziehen, wodurch eine verstärkte Flüssigkeitsfreisetzung an Schleimhautbarrieren erfolgt. Dies trägt sowohl zur homöostatischen Hydratation als auch zur „Weep“-Reaktion im Darm bei – einer essentiellen Abwehrreaktion der Typ-2-Immunantwort gegen parasitäre Helminthen. Die Bürstenzellen erkennen dabei das Vorhandensein von Helminthen und setzen Zytokine und Lipidmediatoren frei, um die Typ-2-Immunzellen einzuleiten. Parallel dazu induziert das von Bürstenzellen freigesetzte Acetylcholin eine parakrine Chloridsekretion durch Epithelzellen, was zu einer verstärkten Flüssigkeitsabgabe führt und so die Abwehrmechanismen gegen Helminthen unterstützt. Perniss et al. und Billipp et al. identifizierten eine funktionelle Einheit, die Acetylcholin als Signal nutzt, um die sensorische Aktivität der Bürstenzellen mit den sekretorischen Abwehrmechanismen der benachbarten Epithelzellen zu verknüpfen (Billipp et al., 2024; Perniss et al., 2023).

Die Bürstenzelle setzt Acetylcholin frei, wobei dessen Wirkung sowohl organ- als auch kontextspezifisch ist. Ebenso variiert der auslösende Stimulus in Abhängigkeit vom jeweiligen Organ. So triggert Succinat die Bürstenzelle im Dünndarm (Nadsombati et al., 2018) und in der Trachea (Perniss et al., 2023). Hingegen lösen Propionat, Butyrat und Acetat keinen Reiz der Bürstenzellen in der Trachea aus, was mit dem Befund, dass FFARs weder in Bürstenzellen der Trachea noch in den Epithelzellen des respiratorischen Epithels exprimiert werden, konsistent ist (Perniss et al., 2023). Trotz organspezifischer Unterschiede lässt sich ein übergeordnetes Prinzip erkennen: Bürstenzellen fungieren als Sensoren für Gefahrensignale und initiieren organabhängig unspezifische Abwehrreaktionen.

4.3 Mögliche Herkunft von Propionat

Als Hauptprodukt der Fermentation von Ballaststoffen durch *Bacteroides*-Spezies beträgt die Konzentration von Propionat etwa 100 mM im Zäkum des Menschen (Cummings et al., 1987). Propionat wird in den Kreislauf aufgenommen und von peripheren Geweben metabolisiert. Die systemischen Blutkonzentrationen von Propionat, also $79 \pm 22 \mu\text{M}$ im peripheren Blut, $375 \pm 70 \mu\text{M}$ im portalvenösen Blut oder $148 \pm 42 \mu\text{M}$ im hepatischen Blut (Cummings et al., 1987), reichen jedoch nicht aus, um ausreichend bürstenzellspezifische Mechanismen zu aktivieren. Da Bürstenzellen jedoch hauptsächlich mit ihrer Oberfläche mit Gallenflüssigkeit in Kontakt treten, wurde in unserer Arbeitsgruppe auch die Propionatkonzentration der Galle mit $0,155 \pm 0,044 \text{ mM}$ bestimmt (Keshavarz et al., 2022). Auch diese reichte nicht aus, um die Bürstenzellen zu triggern. In parallel zu den Versuchen dieser Arbeit laufenden Experimenten zur Auslösung einer Gallenblasenkontraktion durch Bürstenzellen wurde gezeigt, dass bürstenzellspezifische Mechanismen erst ab einer Propionatkonzentration von ca. 5 mM aktiviert werden (Keshavarz et al., 2022). Damit ist die Bürstenzelle im physiologischen Zustand nicht kontinuierlich aktiv. Die Befunde sprechen dafür, dass Bürstenzellen entweder durch eine lokale Produktion von Propionat oder einen Rückfluss aus dem Duodenum aktiviert werden und nicht durch eine Metabolisierung aus dem Darm. Beides entspricht pathologischen Zuständen. Ein einfacher Rückfluss von Duodenalsaft allein würde nicht ausreichen, um bürstenzellspezifische Antworten einzuleiten, da die Propionatkonzentration im Duodenalsaft mit $0,094 \pm 0,016 \text{ mM}$ noch niedriger ist als die in der Gallenflüssigkeit gefundene und beide unterhalb des Aktivierungsschwellenwerts von Bürstenzellen in Mäusen unter Laborbedingungen liegen (Keshavarz et al., 2022). Die Propionatkonzentration aus dem Duodenum könnte bei Wildtieren je nach natürlich vorkommenden Nahrungsquellen wie faulendem Obst oder Getreide variieren, jedoch fehlen Daten dazu. Eine Schwäche des M. sphincter Oddi, die als zugrunde liegende Ursache des Duodenalsaft-Rückflusses gilt, wird häufig mit bakteriellen Infektionen in Verbindung gebracht, insbesondere mit *Enterobacteriaceae* (Liang et al., 2016; Zhang et al., 2020).

1,2-Propandiol ist eine weitere Quelle für Propionat. Es stammt aus der Fermentation von Fukose, die aus Schleimhaut-Glykokonjugaten gespalten wird (Delmas et al., 2019; Faber et al., 2017). Dabei führt die bakterielle Verwertung von 1,2-Propandiol zur Bildung von Propionat ohne gleichzeitige Bildung von Acetat und Butyrat (Viladomiu et al., 2021) – ein Profil, das der Empfindlichkeit von Bürstenzellen in der Gallenblase entspricht (Keshavarz et al., 2022). Verschiedene Enteropathogene, einschließlich *Salmonella*-Serovare, die Gallenwegsinfektionen verursachen, sind in der Lage alternative

Kohlenstoffquellen für die Atmung zu nutzen, was zur Produktion von Propionat führt. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die meisten Bakterien, welche Gallenwegsinfektionen verursachen, keine Fermentierer sind. Selbst wenn potenzielle Propionatproduzenten die Infektion bewirken, fehlen ihnen, wenn sie in der Gallenblase sind, die Ausgangssubstrate aus dem Darminhalt. Das führte zu der Betrachtung der Möglichkeit, dass adhärent-invasive *Escherichia coli* über alternative Substrate, wie z.B. über Aminosäuren, Propionat produzieren könnten. Hinzu kommt, dass Gallensalze diese metabolische Anpassung in adhärent-invasiven *Escherichia coli* triggern (Delmas et al., 2019). Es liegt nahe, dass der Mechanismus, der dazu führt, dass *Escherichia coli* durch Gallensalze vermehrt Propionat bildet und dieses über die Bürstenzellen zu einer protektiv vermehrten Mucussekretion führt, um eine Infiltration neutrophiler Granulozyten ergänzt wird (O'Leary et al., 2022). Dies geschieht möglicherweise parallel oder im Anschluss.

Somit könnte Propionat insgesamt ein Gefahrensignal im biliären System darstellen, das durch büstenzellspezifische Abwehrmechanismen gegen das unbeabsichtigte Aufsteigen von Darmmikrobiota überwacht wird. Grundsätzlich ist zu berücksichtigen, dass adhärent-invasive *Escherichia coli* und andere Propionatproduzenten nur einen kleinen Anteil des Spektrums pathogener Bakterien in der Gallenblase ausmachen und dass Kohlenstoffquellen für die Propionatbildung größtenteils aus dem Darminhalt stammen. Daher stellt sich die Frage, ob Bürstenzellen spezifisch nur diese Bakterien detektieren können.

Propionat ist auch ein Hauptprodukt von Parasiten. Daher wären eine denkbare Herkunft von Propionat an dieser Stelle Helminthen, insbesondere der Große Leberegel (*Fasciola hepatica*). Der Große Leberegel befällt die Gallenwege und produziert massenweise Propionat (Barrett et al., 1978; van Grinsven et al., 2009). Das Erkennen von Parasiten durch die Bürstenzelle würde auch im Kontext der Wurmbabwehr von Bürstenzellen anderer Organe stehen.

Ein ähnlicher Zusammenhang ist bereits im Darm beschrieben. Die Bürstenzelle nimmt dort eine zentrale Rolle in der mukosalen Immunabwehr gegen Parasiten ein. Das Vorhandensein von Helminthen und Protozoen im Darm löst über die Detektion des parasitären Metaboliten Succinat die Sekretion des Zytokins IL-25 durch Bürstenzellen aus, das eine Typ-2-Immunantwort, also eine Aktivierung von ILC2s, einleitet (Gerbe, 2016; Howitt et al., 2016; Lei et al., 2018; Nadjisombati et al., 2018; von Moltke et al., 2016)

Eine weitere vor kurzem veröffentlichte Arbeit von Ndjim et al. erweitert sogar die Wächterfunktion der Bürstenzelle gegen Parasiten im Darm um eine cholinerge Effektorfunktion. Mechanistisch setzen durch Interleukin-13 vermehrte Bürstenzellen

Acetylcholin ins Darmlumen frei. Acetylcholin wirkt direkt auf Helminthen, indem es deren Reproduktionsfähigkeit über muskarinische Acetylcholinrezeptoren reduziert. Damit stellen Bürstenzellen im Darm nicht nur Wächterzellen dar, sondern erfüllen im Kontext der Helmintheninfektion eine zusätzliche Effektorfunktion der Typ-2-Immunabwehr (Ndjim et al., 2024).

4.4 Limitationen

Die Ergebnisse aus den tierexperimentellen Modellen lassen sich möglicherweise nicht direkt auf den Menschen übertragen. Es gibt nur sehr limitierte Studien über das Vorkommen von Bürstenzellen im Menschen. In der Gallenblase, in den oberen Atemwegen und im Magen wurden sie lediglich ultrastrukturell nachgewiesen (Morrone et al., 2007). Studien zu büstenzellspezifischen Funktionen in menschlichen Organen liegen nicht vor. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass der parakrine Einfluss der Bürstenzellen auf das Gallenblasenepithel in einem lebenden Organismus anders ausfallen könnte, da dort komplexe Faktoren wie Blut- und Gallenabfluss und Hormonregulationen ebenfalls eine Rolle spielen.

Ob der Effekt von Acetylcholin direkt oder durch andere, noch nicht identifizierte Mediatoren vermittelt wird, ist noch unklar. Fest steht, dass die Bürstenzelle auch in anderen Organen, wie in der Trachea oder im Dünndarm, über Acetylcholin mit anderen Zellen kommuniziert (Billipp et al., 2024; Perniss et al., 2020). Die Arbeit konzentriert sich in erster Linie auf akute Effekte. Langfristige Auswirkungen oder chronische Veränderungen einer Propionatexposition oder Exposition gegenüber Helminthen und Bakterien könnten ebenfalls von Bedeutung sein, wurden aber nicht berücksichtigt.

Propionat triggert Bürstenzellen und fördert die Mucinsekretion. Dennoch bleibt zu erforschen, ob dies der einzige Stimulus für diesen epithelialen Abwehrmechanismus ist.

5. Zusammenfassung

Das Gallenblasenepithel besteht aus Cholangiozyten, die als dominierende Zellen für die Mucinsekretion verantwortlich sind, sowie aus Bürstenzellen. Abgesehen davon, dass Bürstenzellen das für die Acetylcholinsynthese verantwortliche Enzym ChAT exprimieren, ist ihre Funktion bislang unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion biliärer Bürstenzellen in der Gallenblase zu identifizieren.

Hierzu wurden explantierte Gallenblasen von Mäusen entweder pharmakologisch oder mithilfe blauen Lichts in einem optogenetischen Modell (ChAT-ChR2-EYFP) stimuliert.

Anschließend wurde elektronenmikroskopisch die Volumendichte der Mucingranula in den Cholangiozyten stereologisch analysiert. Gallenblasen von Mäusen mit globaler Defizienz des muskarinergen Rezeptors *Chrm3* sowie mit bürstenzellspezifischer Deletion des Acetylcholinsyntheseenzym ChAT dienten zur Abklärung des Signalwegs. Muskarin bewirkte eine Exozytose der Mucingranula in Cholangiozyten. Eine optogenetische Aktivierung der Bürstenzellen in ChAT-ChR2-EYFP-Mäusen, in denen der licht-sensitive Kanal ChR2 in der Gallenblase selektiv in Bürstenzellen exprimiert wird, senkte entsprechend die Volumendichte der Mucingranula. Dieser Effekt war mit dem muskarinischen Rezeptorblocker Atropin hemmbar. Als Kandidat für einen natürlich vorkommenden Stimulus von biliären Bürstenzellen wurde Propionat gewählt, da es im Darmtrakt in hohen Konzentrationen als mikrobieller Metabolit vorkommt. Auch Propionat löste über Bürstenzellen eine Exozytose von Mucinen aus, und zwar über einen cholinergen Mechanismus, da der Effekt bei bürstenzellspezifischer Deletion von *Chat* ausblieb. Dabei vermittelte der muskarinerge Rezeptor *Chrm3* den Effekt der Bürstenzelle auf die Cholangiozyten, da Propionat in Gallenblasen von *Chrm3*-gendifizienten Mäusen keine Exozytose induzierte.

Die Ergebnisse zeigen, dass Bürstenzellen der Gallenblase den dort als Gefahrensignal zu wertenden, von Bakterien oder Parasiten stammenden Metaboliten Propionat erkennen und über Acetylcholinfreisetzung eine Mucinfreisetzung aus dem Gallenblasenepithel induzieren. Die Mucinfreisetzung dient als unspezifischer Abwehrmechanismus gegen verschiedenartige Pathogene. Die Bürstenzelle ist daher als Wächter- und Effektorzelle gegenüber einer Besiedlung mit Propionat produzierenden Pathogenen anzusehen.

6. Summary

The gallbladder epithelium consists of cholangiocytes, which are the predominant cells responsible for mucin secretion, as well as brush cells. Apart from the fact that brush cells express the enzyme choline acetyltransferase (ChAT), which is essential for acetylcholine synthesis, their function remains largely unknown. The aim of this study was to identify the role of biliary brush cells in the gallbladder.

To this end, explanted gallbladders from mice were stimulated either pharmacologically or via blue light in an optogenetic model (ChAT-ChR2-EYFP). Subsequently, the volumetric density of mucin granules in cholangiocytes was analyzed stereologically using electron microscopy. Gallbladders from mice with a global deficiency of the muscarinic receptor *Chrm3*, as well as from mice with a brush cell-specific deletion of

the acetylcholine-synthesizing enzyme ChAT, were used to elucidate the signaling pathway.

Muscarine induced exocytosis of mucin granules in cholangiocytes. Optogenetic activation of brush cells in ChAT-ChR2-EYFP mice, in which the light-sensitive channel ChR2 is selectively expressed in brush cells of the gallbladder, led to a corresponding reduction in the volumetric density of mucin granules. This effect was inhibited by the muscarinic receptor blocker atropine. Propionate, a microbial metabolite present in high concentrations in the intestinal tract, was selected as a candidate for a naturally occurring stimulus of biliary brush cells. Propionate also triggered mucin exocytosis via brush cells through a cholinergic mechanism, as this effect was absent in mice with brush cell-specific deletion of *Chat*. The muscarinic receptor Chrm3 mediated the effect of brush cells on cholangiocytes, as propionate failed to induce exocytosis in gallbladders from Chrm3-deficient mice.

These results demonstrate that brush cells in the gallbladder detect the bacterial or parasitic metabolite propionate—interpreted as a danger signal—and induce mucin secretion from the gallbladder epithelium via acetylcholine release. Mucin secretion serves as a nonspecific defense mechanism against various pathogens. Thus, the brush cell functions as both a sentinel and effector cell in protecting against colonization by propionate-producing pathogens.

7. Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺]	Intrazelluläre Calciumkonzentration
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
Alox5	5-lipoxygenase
α-Gustducin	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-3
ANOVA	Analysis Of Variance
Avil	Advillin
bzw.	beziehungsweise
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
c	Zenti
ca.	Circa
CCK1-R	Cholezystokinin-1-Rezeptor
CCK2-R	Cholezystokinin-2-Rezeptor
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
ChR2	Channelrhodopsin-2
Chrm	Cholinergic Receptor Muscarinic

COX	Cyclooxygenase
DCLK1	Doublecortin like kinase 1
EC50	Half maximal effective concentration
et al.	et alii
EtOH	Ethyl Alcohol
eYFP	enhanced Yellow Fluorescent Protein
EX	X. Tag nach Implantation des Embryos
FFAR	Free fatty acid receptor
Foxf1	Forkhead box f1
Gal	Galaktose
GalNac	N-Acetylgalactosamin
GDA	Glutardialdehyde
HCL	Hydrogenchloride
HES-1	Hairy and Enhancer of Splithomolog-1
HHEX-Gen	Hex homeobox gene
HNF6	Hepatocyte Nuclear Factor 6
HNF1 β	Hepatocyte Nuclear Factor 1 beta
Hz	Hertz
IL-25	Interleukin 25
ILC2	Group 2 Innate Lymphoid Cells
l	Liter
LED	Light Emitting Diode
M	Molar
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minute
μ m	Mikrometer
μ M	mikromolar
ml	Milliliter
Muc	Mucin (Maus)
MUC	Mucin (Mensch)
MUPCDH	Mucin-like Protocadherin
Mus	Muscarin
MSK1	Mitogen- and stress-activated protein kinase-1
n	nano
nAChR	Nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NK2R	Neurokininrezeptor-2

NO	Stickstoffmonoxid
PACAP	Pituitary adenylyl activating polypeptide
PAS	Periodic acid-Schiff
PDX-1	Pancreatic and Duodenal Homebox 1
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PGD ₂	Prostaglandin D2
PGP9.5	Protein Gene Product 9.5
pH	potentia Hydrogenii
PLC	Phospholipase C
PLCβ2	Phospholipase beta 2
Pou2f3	POU Class 2 Homebox 3
p-Wert	probability value, Signifikanzwert
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SEA	sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin
SEM	Standardfehler (Standard error of the mean)
SOX17	SRY-Box Transcription Factor 17
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRPM5	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 5
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UAc	Uranylacetat
USA	United States of America
VIP	Vasoaktives intestinales Polypeptid
VNO	Vomeronasalorgan
Vmn2r26	Vomeronasal 2, Receptor 26
vWD-Domänen	von Willebrand domain
WT	Wildtyp
YFP	Yellow fluorescent protein
z.B.	Zum Beispiel

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomischer Aufbau der Gallenblase.	2
Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme des Gallenblasenepithels der Maus.	3

Abbildung 3: Die Entwicklung der extrahepatischen Gallenwege in der Maus. ...	9
Abbildung 4: Neuronale Regulation der Gallenblase.	13
Abbildung 5: Strukturelle Konfiguration von gelformenden Mucinen am Beispiel von MUC2.....	16
Abbildung 6: Vorkommen von Bürstenzellen in der Maus.	20
Abbildung 7: Die anatomische Lage der Gallenblase im Situs abdominis vor Explantation.....	29
Abbildung 8: Präparation der Chat-ChR2-EYFP-Gallenblasen zur Durchführung der LED-Stimulation.	31
Abbildung 9: LED-Stimulation von Chat-ChR2-EYFP-Gallenblasen.....	31
Abbildung 10: Chemische Stimulation der Gallenblase.	33
Abbildung 11: Kriterien zur Auswahl von Cholangiozyten zur Bestimmung der Volumendichte.....	36
Abbildung 12: Point Counting-Methode zur Bestimmung der Volumendichte in Mucingranula.	37
Abbildung 13: Morphologie der Cholangiozyten in der Gallenblase der Maus.	40
Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme von zwei Bürstenzellen in der Gallenblase der Maus.	42
Abbildung 15: Die Morphologie der Bürstenzellen mit ihren charakteristisch tief verankerten Mikrovilli.	43
Abbildung 16: Eine cholinerge Stimulation bewirkt eine Exozytose von Mucingranula.	45
Abbildung 17: Eine optogenetische Aktivierung der Bürstenzelle in Chat-ChR2-EYFP-Mäusen senkt die Volumendichte der Mucingranula in den Cholangiozyten.....	47
Abbildung 18: Propionat beeinflusst die Dichte der Mucingranula in den Cholangiozyten der Bürstenzelle.	49
Abbildung 19: Chrm3 vermittelt den cholinergen Effekt von Bürstenzellen auf Cholangiozyten.....	51

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika von epithelialen Mucinen.	14
Tabelle 2: Gallenblasenassoziierte Mucine.....	16

Tabelle 3: Anzahl verwendeter Gallenblasen in optogenetischen Experimenten.	30
Tabelle 4: Anzahl explantierter Gallenblasen in Stimulationsexperimenten.	32
Tabelle 5: Rezepte der Lösungen A und B.	34
Tabelle 6: Verwendete Computerprogramme.	38

10. Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Volumendichte der Mucingranula.	36
---------------------------------------------------------------	----

11. Literaturverzeichnis

- Abiru, H., Sarna, S. K., & Condon, R. E. (1994). Contractile mechanisms of gallbladder filling and emptying in dogs. *Gastroenterology*, *106*(6), 1652–1661. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(94\)90423-5](https://doi.org/10.1016/0016-5085(94)90423-5)
- Adkins, R. B., Chapman, W. C., & Reddy, V. S. (2000). Embryology, anatomy, and surgical applications of the extrahepatic biliary system. *Surgical Clinics of North America*, *80*(1), 363–379. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(05\)70410-2](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(05)70410-2)
- Admirand, W. H., & Small, D. M. (1968). The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *The Journal of Clinical Investigation*, *47*(5), 1043–1052. <https://doi.org/10.1172/JCI105794>
- Afdhal, N. H., Offner, G. D., Murray, F. E., Troxler, R. F., & Smith, B. F. (1990). Isolation and characterization of peptides from the protein core of bovine gallbladder mucin. *Gastroenterology*, *98*(6), 1633–1641. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(90\)91101-B](https://doi.org/10.1016/0016-5085(90)91101-B)
- Al-Jiffry, B. O., Shaffer, E. A., Woods, C. M., Menadue, M., Young, F., Oliver, J., Thomas, A. C., Toouli, J., & Saccone, G. T. P. (2004). Endogenous endothelin increases gallbladder tone and leads to acute cholecystitis in the Australian possum. *Neurogastroenterology and Motility*, *16*(1), 125–133. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2982.2003.00459.x>
- Al-Jiffry, Bilal O., Toouli, J., & Saccone, G. T. P. (2002). Endothelin-3 induces both human and opossum gallbladder contraction mediated mainly by endothelin-B receptor subtype in vitro. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, *17*(3), 324–331. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2002.02699.x>
- Allen, A., Flemström, G., Garner, A., & Kivilaakso, E. (1993). Gastroduodenal mucosal protection. *Physiological Reviews*, *73*(4), 823–857. <https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.4.823>
- Antoniou, A., Raynaud, P., Cordi, S., Zong, Y., Tronche, F., Stanger, B. Z., Jacquemin,

- P., Pierreux, C. E., Clotman, F., & Lemaigre, F. P. (2009). Intrahepatic Bile Ducts Develop According to a New Mode of Tubulogenesis Regulated by the Transcription Factor SOX9. *Gastroenterology*, 136(7), 2325–2333. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.051>
- Asan, E., & Drenckhahn, D. (2005). Immunocytochemical characterization of two types of microvillar cells in rodent olfactory epithelium. *Histochemistry and Cell Biology*, 123(2), 157–168. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0759-4>
- Axelsson, H., Danielsson, Å., Henriksson, R., & Wahlin, T. (1979). Secretory behavior and ultrastructural changes in mouse gallbladder principal cells after stimulation with cholinergic and adrenergic drugs. A morphometric study. *Gastroenterology*, 76(2), 335–340. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(79\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0016-5085(79)90342-1)
- Axelsson, H., Henriksson, R., Danielsson, Å., & Wahlin, T. (1985). Glycoprotein secretion from mouse gallbladder principal cells after chronic variation in parasympathetic activity: A morphometric study after vagotomy and cholinergic superstimulation. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 20(6), 727–733. <https://doi.org/10.3109/00365528509089203>
- Balemba, O. B., Salter, M. J., & Mawe, G. M. (2004). Innervation of the extrahepatic biliary tract. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 280(1), 836–847. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20089>
- Bankova, L. G., Dwyer, D. F., Yoshimoto, E., Ualiyeva, S., McGinty, J. W., Raff, H., von Moltke, J., Kanaoka, Y., Frank Austen, K., & Barrett, N. A. (2018). The cysteinyl leukotriene 3 receptor regulates expansion of IL-25–producing airway brush cells leading to type 2 inflammation. *Science Immunology*, 3(28). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat9453>
- Barrett, J., Coles, G. C., & Simpkin, K. G. (1978). Pathways of acetate and propionate production in adult *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology*, 8(2), 117–123. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(78\)90005-X](https://doi.org/10.1016/0020-7519(78)90005-X)
- Baur, R. (1969). Zur Schätzung des kleinsten zulässigen Stichprobenumfangs für stereologische Messungen an histologischen Schnitten. *Experientia*, 25(5), 554–555. <https://doi.org/10.1007/BF01900817>
- Bezençon, C., Fürholz, A., Raymond, F., Mansourian, R., Métairon, S., Le Coutre, J., & Damak, S. (2008). Murine intestinal cells expressing Trpm5 are mostly brush cells and express markers of neuronal and inflammatory cells. *Journal of Comparative Neurology*, 509(5), 514–525. <https://doi.org/10.1002/cne.21768>
- Bi, A., Cui, J., Ma, Y. P., Olshevskaya, E., Pu, M., Dizhoor, A. M., & Pan, Z. H. (2006). Ectopic Expression of a Microbial-Type Rhodopsin Restores Visual Responses in Mice with Photoreceptor Degeneration. *Neuron*, 50(1), 23–33.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.02.026>

- Billipp, T. E., Fung, C., Webeck, L. M., Sargent, D. B., Gologorsky, M. B., Chen, Z., McDaniel, M. M., Kasal, D. N., McGinty, J. W., Barrow, K. A., Rich, L. M., Barilli, A., Sabat, M., Debley, J. S., Wu, C., Myers, R., Howitt, M. R., & von Moltke, J. (2024). Tuft cell-derived acetylcholine promotes epithelial chloride secretion and intestinal helminth clearance. *Immunity*, *57*(6), 1243-1259.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.03.023>
- Billipp, T. E., Nadsombati, M. S., & von Moltke, J. (2021). Tuning tuft cells: new ligands and effector functions reveal tissue-specific function. *Current Opinion in Immunology*, *68*, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.09.006>
- Birdsall, N. J. M., Curtis, C. A. M., Eveleigh, P., Hulme, E. C., Pedder, E. K., Poyner, D., & Wheatley, M. (1988). Muscarinic receptor subtypes and the selectivity of agonists and antagonists. *Pharmacology*, *37*(Suppl 1), 22–31. <https://doi.org/10.1159/000138503>
- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., & Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, *8*(9), 1263–1268. <https://doi.org/10.1038/nn1525>
- Cardinale, V., Wang, Y., Carpino, G., Mendel, G., Alpini, G., Gaudio, E., Reid, L. M., & Alvaro, D. (2012). The biliary tree-a reservoir of multipotent stem cells. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *9*(4), 231–240. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.23>
- Chang, L. -Y, Mercer, R. R., & Crapo, J. D. (1986). Differential distribution of brush cells in the rat lung. *The Anatomical Record*, *216*(1), 49–54. <https://doi.org/10.1002/ar.1092160109>
- Chow, B. Y., Han, X., & Boyden, E. S. (2012). Genetically encoded molecular tools for light-driven silencing of targeted neurons. *Progress in Brain Research*, *196*, 49–61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59426-6.00003-3>
- Chuang, S. C., Hsi, E., Wang, S. N., Yu, M. L., Lee, K. T., & Juo, S. H. H. (2011). Polymorphism at the mucin-like protocadherin gene influences susceptibility to gallstone disease. *Clinica Chimica Acta*, *412*(23–24), 2089–2093. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.07.015>
- Clotman, F., Lannoy, V. J., Reber, M., Cereghini, S., Cassiman, D., Jacquemin, P., Roskams, T., Rousseau, G. G., & Lemaigre, F. P. (2002). The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. *Development*, *129*(8), 1819–1828. <https://doi.org/10.1242/dev.129.8.1819>
- Coffinier, C., Gresh, L., Fiette, L., Tronche, F., Schütz, G., Babinet, C., Pontoglio, M., Yaniv, M., & Barra, J. (2002). Bile system morphogenesis defects and liver

- dysfunction upon targeted deletion of HNF1 β . *Development*, 129(8), 1829–1838. <https://doi.org/10.1242/dev.129.8.1829>
- Collins, H. E., Kane, M. S., Litovsky, S. H., Darley-Usmar, V. M., Young, M. E., Chatham, J. C., & Zhang, J. (2021). Mitochondrial Morphology and Mitophagy in Heart Diseases: Qualitative and Quantitative Analyses Using Transmission Electron Microscopy. *Frontiers in Aging*, 6(2), 67–69. <https://doi.org/10.3389/fragi.2021.670267>
- Cui, J. Y., Aleksunes, L. M., Tanaka, Y., Fu, Z. D., Guo, Y., Guo, G. L., Lu, H., Zhong, X. bo, & Klaassen, C. D. (2012). Bile acids via FXR initiate the expression of major transporters involved in the enterohepatic circulation of bile acids in newborn mice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(9), G979-96. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00370.2011>
- Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, H. W. J., Naylor, C. P. E., & MacFarlane, G. T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10), 1221–1227. <https://doi.org/10.1136/gut.28.10.1221>
- Deckmann, K., Filipski, K., Krasteva-Christ, G., Fronius, M., Althaus, M., Rafiq, A., Papadakis, T., Renno, L., Jurastow, I., Wessels, L., Wolff, M., Schütz, B., Weihe, E., Chubanov, V., Gudermann, T., Klein, J., Bschiepfer, T., & Kummer, W. (2014). Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), 8287–8292. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402436111>
- Deckmann, K., Krasteva-Christ, G., Rafiq, A., Herden, C., Wichmann, J., Knauf, S., Nassenstein, C., Grevelding, C. G., Dorresteyn, A., Chubanov, V., Gudermann, T., Bschiepfer, T., & Kummer, W. (2015). Cholinergic urethral brush cells are widespread throughout placental mammals. *International Immunopharmacology*, 29(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.05.038>
- Deisseroth, K., Feng, G., Majewska, A. K., Miesenböck, G., Ting, A., & Schnitzer, M. J. (2006). Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *Journal of Neuroscience*, 26(41), 10380–10386. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3863-06.2006>
- Delmas, J., Gibold, L., Faïs, T., Batista, S., Lereboure, M., Sinel, C., Vazeille, E., Cattoir, V., Buisson, A., Barnich, N., Dalmaso, G., & Bonnet, R. (2019). Metabolic adaptation of adherent-invasive Escherichia coli to exposure to bile salts. *Scientific Reports*, 9(1), 2175. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38628-1>
- Eltze, M., König, H., Ullrich, B., & Grebe, T. (1997). Contraction of guinea-pig gallbladder: Muscarinic M3 or M4 receptors? *European Journal of Pharmacology*, 332(1), 77–

87. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01059-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01059-5)

- Faber, F., Thiennimitr, P., Spiga, L., Byndloss, M. X., Litvak, Y., Lawhon, S., Andrews-Polymeris, H. L., Winter, S. E., & Bäumlér, A. J. (2017). Respiration of Microbiota-Derived 1,2-propanediol Drives Salmonella Expansion during Colitis. *PLoS Pathogens*, *13*(1), 1006129. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006129>
- Fachi, J. L., Sécca, C., Rodrigues, P. B., Mato, F. C. P. de, Di Luccia, B., Felipe, J. de S., Pral, L. P., Rungue, M., Rocha, V. de M., Sato, F. T., Sampaio, U., Clerici, M. T. P. S., Rodrigues, H. G., Câmara, N. O. S., Consonni, S. R., Vieira, A. T., Oliveira, S. C., Mackay, C. R., Layden, B. T., ... Vinolo, M. A. R. (2020). Acetate coordinates neutrophil and ILC3 responses against *C. difficile* through FFAR2. *Journal of Experimental Medicine*, *217*(3), e20190489. <https://doi.org/10.1084/jem.20190489>
- Finger, T. E., Böttger, B., Hansen, A., Anderson, K. T., Alimohammadi, H., & Silver, W. L. (2003). Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(15), 8981–8986. <https://doi.org/10.1073/pnas.1531172100>
- Finger, T. E., & Kinnamon, S. C. (2011). Taste isn't just for taste buds anymore. *F1000 Biology Reports*, *3*, 20. <https://doi.org/10.3410/B3-20>
- Finzi, L., Barbu, V., Burgel, P. R., Mergey, M., Kirkwood, K. S., Wick, E. C., Scoazec, J. Y., Peschard, F., Paye, F., Nadel, J. A., & Housset, C. (2006). MUC5AC, a gel-forming mucin accumulating in gallstone disease, is overproduced via an epidermal growth factor receptor pathway in the human gallbladder. *American Journal of Pathology*, *169*(6), 2031–2041. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060146>
- Fisher, R. S., Rock, E., & Malmud, L. S. (1986). Gallbladder emptying response to sham feeding in humans. *Gastroenterology*, *90*(6), 1854–1857. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(86\)90252-0](https://doi.org/10.1016/0016-5085(86)90252-0)
- Foster, K. W., Saranak, J., Patel, N., Zarilli, G., Okabe, M., Kline, T., & Nakanishi, K. (1984). A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature*, *311*(5988), 756–759. <https://doi.org/10.1038/311756a0>
- Fouassier, L., Chinet, T., Robert, B., Carayon, A., Balladur, P., Mergey, M., Paul, A., Poupon, R., Capeau, J., Barbu, V., & Housset, C. (1998). Endothelin-1 is synthesized and inhibits cyclic adenosine monophosphate-dependent anion secretion by an autocrine/paracrine mechanism in gallbladder epithelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, *101*(12), 2881–2888. <https://doi.org/10.1172/JCI2821>
- Furukawa, N., & Okada, H. (1991). Bile evacuation induced by hypothalamic stimulation in dogs. *Gastroenterology*, *101*(2), 479–489. <https://doi.org/10.1016/0016->

5085(91)90028-J

- Gerbe, F., & Jay, P. (2016). Intestinal tuft cells: Epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. *Mucosal Immunology*, 9(6), 1353–1359. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.68>
- Gerbe, François, Sidot, E., Smyth, D. J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., Bruschi, M., Harcus, Y., Zimmermann, V. S., Taylor, N., Maizels, R. M., & Jay, P. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*, 529(7585), 226–230. <https://doi.org/10.1038/nature16527>
- Gilloteaux, J., Pomerants, B., & Kelly, T. R. (1989). Human gallbladder mucosa infrastructure: Evidence of intraepithelial nerve structures. *American Journal of Anatomy*, 184(4), 321–333. <https://doi.org/10.1002/aja.1001840407>
- Gilman, R. H., Young, C., Bulger, R., Hornick, R. B., & Greenberg, B. (1982). Anatomical and immunological responses of rabbit gallbladders to bacterial infections. *Infection and Immunity*, 36(1), 407–416. <https://doi.org/10.1128/iai.36.1.407-416.1982>
- Gomez, G., Upp, J. R., Lluís, F., Alexander, R. W., Poston, G. J., Greeley, G. H., & Thompson, J. C. (1988). Regulation of the release of cholecystokinin by bile salts in dogs and humans. *Gastroenterology*, 94(4), 1036–1046. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(88\)90564-1](https://doi.org/10.1016/0016-5085(88)90564-1)
- Grigor'eva, I. N., & Romanova, T. I. (2020). Gallstone disease and microbiome. *Microorganisms*, 8(2), 835. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060835>
- Guo, Y. S., Singh, P., Gomez, G., Rajaraman, S., & Thompson, J. C. (1989). Contractile response of canine gallbladder and sphincter of Oddi to substance P and related peptides in vitro. *Digestive Diseases and Sciences*, 34(6), 812–817. <https://doi.org/10.1007/BF01540263>
- Halvorsen, J. F., & Myking, A. O. (1971). The arterial supply and venous drainage of the gall-bladder. A study of one hundred autopsies. *Acta Chirurgica Scandinavica*, 137(7), 659–664.
- Han, Y., Glaser, S., Meng, F., Francis, H., Marzioni, M., McDaniel, K., Alvaro, D., Venter, J., Carpino, G., Onori, P., Gaudio, E. G., Alpini, G., & Franchino, A. (2013). Recent advances in the morphological and functional heterogeneity of the biliary epithelium. *Experimental Biology and Medicine*, 238(5), 549–565. <https://doi.org/10.1177/1535370213489926>
- Hayward, A. F., & Johnston, H. S. (1961). The Fine Structure of the Epithelium of the Colon in the Mouse. *Scottish Medical Journal*, 6(9), 416–425. <https://doi.org/10.1177/003693306100600905>
- Hegemann, P., Ehlenbeck, S., & Gradmann, D. (2005). Multiple photocycles of

- channelrhodopsin. *Biophysical Journal*, 89(6), 3911–3918. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.069716>
- Helaly, G. F., El-Ghazzawi, E. F., Kazem, A. H., Dowidar, N. L., Anwar, M. M., & Attia, N. M. (2014). Detection of *Helicobacter pylori* infection in Egyptian patients with chronic calculous cholecystitis. *British Journal of Biomedical Science*, 71(1), 13–18. <https://doi.org/10.1080/09674845.2014.11669957>
- Higashiyama, H., Sumitomo, H., Ozawa, A., Igarashi, H., Tsunekawa, N., Kurohmaru, M., & Kanai, Y. (2016). Anatomy of the Murine Hepatobiliary System: A Whole-Organ-Level Analysis Using a Transparency Method. *Anatomical Record*, 299(2), 161–172. <https://doi.org/10.1002/ar.23287>
- Ho, S. B., Shekels, L. L., Toribara, N. W., Gipson, I. K., Kim, Y. S., Purdum, P. P., & Cherwitz, D. L. (2000). Altered mucin core peptide expression in acute and chronic cholecystitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 45(6), 1061–1071. <https://doi.org/10.1023/A:1005573213100>
- Höfer, D., Püschel, B., & Drenckhahn, D. (1996). Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of α -gustducin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), 6631–6634. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6631>
- Hollenhorst, M. I., Husnik, T., Zylka, M., Duda, N., Flockerzi, V., Tschernig, T., Maxeiner, S., & Krasteva-Christ, G. (2023). Human airway tuft cells influence the mucociliary clearance through cholinergic signalling. *Respiratory Research*, 24(1), 267. <https://doi.org/10.1186/s12931-023-02570-8>
- Hollenhorst, M. I., Jurastow, I., Nandigama, R., Appenzeller, S., Li, L., Vogel, J., Wiederhold, S., Althaus, M., Empting, M., Altmüller, J., Hirsch, A. K. H., Flockerzi, V., Canning, B. J., Saliba, A. E., & Krasteva-Christ, G. (2020). Tracheal brush cells release acetylcholine in response to bitter tastants for paracrine and autocrine signaling. *FASEB Journal*, 34(1), 316–332. <https://doi.org/10.1096/fj.201901314RR>
- Hollenhorst, M. I., Nandigama, R., Evers, S. B., Gamayun, I., Wadood, N. A., Salah, A., Pieper, M., Wyatt, A., Stukalov, A., Gebhardt, A., Nadolni, W., Burow, W., Herr, C., Beisswenger, C., Kusumakshi, S., Ectors, F., Kichko, T. I., Hübner, L., Reeh, P., ... Krasteva-Christ, G. (2022). Bitter taste signaling in tracheal epithelial brush cells elicits innate immune responses to bacterial infection. *Journal of Clinical Investigation*, 132(13), e150951. <https://doi.org/10.1172/JCI150951>
- Housset, C., Carayon, A., Housset, B., Legendre, C., Hannoun, L., & Poupon, R. (1993). Endothelin-1 secretion by human gallbladder epithelial cells in primary culture. *Laboratory Investigation*, 69(6), 750–755.
- Housset, Chantal, Chrétien, Y., Debray, D., & Chignard, N. (2016). Functions of the

- Gallbladder. *Comprehensive Physiology*, 6(3), 1549–1577.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c150050>
- Howard, P. J., Murphy, G. M., & Dowling, R. H. (1991). Gall bladder emptying patterns in response to a normal meal in healthy subjects and patients with gall stones: Ultrasound study. *Gut*, 32(11), 1406–1411. <https://doi.org/10.1136/gut.32.11.1406>
- Howitt, M. R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A. M., Tran, S. V., Weinstock, J. V., Gallini, C. A., Redding, K., Margolskee, R. F., Osborne, L. C., Artis, D., & Garrett, W. S. (2016). Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science*, 351(6279), 1329–1333.
<https://doi.org/10.1126/science.aaf1648>
- Huang, Y. H., Klingbeil, O., He, X. Y., Wu, X. S., Arun, G., Lu, B., Somerville, T. D. D., Milazzo, J. P., Wilkinson, J. E., Demerdash, O. E., Spector, D. L., Egeblad, M., Shi, J., & Vakoc, C. R. (2018). POU2F3 is a master regulator of a tuft cell-like variant of small cell lung cancer. *Genes and Development*, 32(13–14), 915–928.
<https://doi.org/10.1101/gad.314815.118>
- Hunter, M. P., Wilson, C. M., Jiang, X., Cong, R., Vasavada, H., Kaestner, K. H., & Bogue, C. W. (2007). The homeobox gene Hhex is essential for proper hepatoblast differentiation and bile duct morphogenesis. *Developmental Biology*, 308(2), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.05.028>
- Iseki, S., & Kondo, H. (1990). An immunocytochemical study on the occurrence of liver fatty-acid-binding protein in the digestive organs of rats: Specific localization in the D cells and brush cells. *Acta Anatomica*, 138(1), 15–23.
<https://doi.org/10.1159/000146915>
- Isomaki, A. M. (1973). A new cell type (tuft cell) in the gastrointestinal mucosa of the rat. A transmission and scanning electron microscopic study. *A Transmission and Scanning Electron Microscopic Study.*, 240(1), 66.
- Itoh, Z., & Takahashi, I. (1981). Periodic contractions of the canine gallbladder during the interdigestive state. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 240(2), G183–G189. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1981.240.2.g183>
- Itoh, Zen, Takahashi, I., Nakaya, M., Suzuki, T., Arai, H., & Wakabayashi, K. (1982). Interdigestive Gallbladder Bile Concentration in Relation to Periodic Contraction of Gallbladder in the Dog. *Gastroenterology*, 83(3), 645–651.
[https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(82\)80202-3](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(82)80202-3)
- Kalinichenko, V. V., Zhou, Y., Bhattacharyya, D., Kim, W., Shin, B., Bambal, K., & Costal, R. H. (2002). Haploinsufficiency of the mouse forkhead box f1 gene causes defects in gall bladder development. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14), 12369–12374. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112162200>

- Kapalka, G. M. (2010). Substances Involved in Neurotransmission. *Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents*, 71–99. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374927-7.00004-2>
- Kaske, S., Krasteva, G., König, P., Kummer, W., Hofmann, T., Gudermann, T., & Chubanov, V. (2007). TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neuroscience*, 8, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-49>
- Kaufman, H. S., Magnuson, T. H., Lillemoe, K. D., Frasca, P., & Pitt, H. A. (1989). The role of bacteria in gallbladder and common duct stone formation. *Annals of Surgery*, 209(5), 584–592. <https://doi.org/10.1097/00000658-198905000-00011>
- Kaufman, S. A. (1959). Stratification (layering) of bile in the normal gallbladder. *The American Journal of Digestive Diseases*, 4(8), 634–637. <https://doi.org/10.1007/BF02232157>
- Keicho, N., & Hijikata, M. (2011). Genetic predisposition to diffuse panbronchiolitis. *Respirology*, 16(4), 581–588. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2011.01946.x>
- Keshavarz, M., Tabrizi, S. F., Ruppert, A. L., Pfeil, U., Schreiber, Y., Klein, J., Brandenburger, I., Lochnit, G., Bhushan, S., Perniss, A., Deckmann, K., Hartmann, P., Meiners, M., Mermer, P., Rafiq, A., Winterberg, S., Papadakis, T., Thomas, D., Angioni, C., ... Kummer, W. (2022). Cysteinyl leukotrienes and acetylcholine are biliary tuft cell cotransmitters. *Science Immunology*, 7(69), eabf6734. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abf6734>
- Kim, J. J., & Khan, W. I. (2013). Goblet cells and mucins: Role in innate defense in enteric infections. *Pathogens*, 2(1), 55–70. <https://doi.org/10.3390/pathogens2010055>
- Konno, K., Takahashi-Iwanaga, H., Uchigashima, M., Miyasaka, K., Funakoshi, A., Watanabe, M., & Iwanaga, T. (2015). Cellular and subcellular localization of cholecystokinin (CCK)-1 receptors in the pancreas, gallbladder, and stomach of mice. *Histochemistry and Cell Biology*, 143(3), 301–312. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1281-3>
- Krasteva, G., Hartmann, P., Papadakis, T., Bodenbenner, M., Wessels, L., Weihe, E., Schütz, B., Langheinrich, A. C., Chubanov, V., Gudermann, T., Ibanez-Tallon, I., & Kummer, W. (2012). Cholinergic chemosensory cells in the auditory tube. *Histochemistry and Cell Biology*, 137(4), 483–497. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-0911-x>
- Krasteva, Gabriela, Canning, B. J., Hartmann, P., Veres, T. Z., Papadakis, T., Mühlfeld, C., Schliecker, K., Tallini, Y. N., 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. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 108(23), 9478–9483.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1019418108>
- Krishnamurthy, G. T., & Krishnamurthy, S. (2002). Hepatic bile entry into and transit pattern within the gallbladder lumen: A new quantitative cholescintigraphic technique for measurement of its concentration function. *Journal of Nuclear Medicine*, 43(7), 901–908.
- Kummer, W., & Deckmann, K. (2017). Brush cells, the newly identified gatekeepers of the urinary tract. *Current Opinion in Urology*, 27(2), 85–92.
<https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000361>
- Kusumakshi, S., Voigt, A., Hübner, S., Hermans-Borgmeyer, I., Ortalli, A., Pyrski, M., Dörr, J., Zufall, F., Flockerzi, V., Meyerhof, W., Montmayeur, J. P., & Boehm, U. (2015). A binary genetic approach to characterize TRPM5 cells in mice. *Chemical Senses*, 40(6), 413–425. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjv023>
- Lalumiere, R. T. (2011). A new technique for controlling the brain: Optogenetics and its potential for use in research and the clinic. *Brain Stimulation*, 4(1), 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.brs.2010.09.009>
- Lamont, J. T., Smith, B. F., & Moore, J. R. L. (1984). Role of Gallbladder Mucin in Pathophysiology of Gallstones. *Hepatology*, 4(5), 51–56.
<https://doi.org/10.1002/hep.1840040809>
- Lanzini, A., Jazrawi, R. P., & Northfield, T. C. (1987). Simultaneous Quantitative Measurements of absolute Gallbladder Storage and Emptying During Fasting and Eating in Humans. *Gastroenterology*, 92(4), 852–861. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(87\)90957-7](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)90957-7)
- Le Poul, E., Loison, C., Struyf, S., Springael, J. Y., Lannoy, V., Decobecq, M. E., Brezillon, S., Dupriez, V., Vassart, G., Van Damme, J., Parmentier, M., & Detheux, M. (2003). Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28). <https://doi.org/10.1074/jbc.M301403200>
- Lebois, E. P., Thorn, C., Edgerton, J. R., Popiolek, M., & Xi, S. (2018). Muscarinic receptor subtype distribution in the central nervous system and relevance to aging and Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 136, 362–373.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.018>
- Lee, K. T., & Liu, T. S. (2001). Mucin gene expression in gallbladder epithelium with black pigment stone ascertained by in situ hybridization. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 17(10), 517–523.
- Leeson, T. S. (1961). The development of the trachea in the rabbit, with particular reference to its fine structure. *Anatomischer Anzeiger*, 110, 214–223.

- Lei, W., Ren, W., Ohmoto, M., Urban, J. F., Matsumoto, I., Margolskee, R. F., & Jiang, P. (2018). Activation of intestinal tuft cell-expressed *sucnr1* triggers type 2 immunity in the mouse small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(21), 5552–5557. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720758115>
- Lemaigre, F. P. (2010). Molecular mechanisms of biliary development. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 97(C), 103–126. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385233-5.00004-0>
- Liang, T., Su, W., Zhang, Q., Li, G., Gao, S., Lou, J., Zhang, Y., Ma, T., & Bai, X. (2016). Roles of sphincter of oddi laxity in bile duct microenvironment in patients with cholangiolithiasis: From the perspective of the microbiome and metabolome. *Journal of the American College of Surgeons*, 222(3), 269–280.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2015.12.009>
- Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, 19(1), 29–41. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>
- Luciano, L., Reale, E. (1969). A new cell type ('brush cell') in the gall bladder epithelium of the mouse. *Journal of Submicroscopic Cytology*, 1, 43–53.
- Luciano, L., Franke, K., Iurato, S., & Reale, E. (1977). Freeze-fracture study of the cell junctions in the utricle and saccule. *Acta Oto-Laryngologica*, 83(1–6), 79–84. <https://doi.org/10.3109/00016487709128816>
- Luciano, L., & Reale, E. (1979). A new morphological aspect of the brush cells of the mouse gallbladder epithelium. *Cell and Tissue Research*, 201(1), 37–44. <https://doi.org/10.1007/BF00238045>
- Luciano, L., & Reale, E. (1990). Brush cells of the mouse gallbladder - A correlative light- and electron-microscopical study. *Cell and Tissue Research*, 262(2), 339–349. <https://doi.org/10.1007/BF00309889>
- Luciano, Liliana, & Reale, E. (1997). Presence of brush cells in the mouse gallbladder. *Microscopy Research and Technique*, 38(6), 598–608. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19970915\)38:6<598::AID-JEMT4>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19970915)38:6<598::AID-JEMT4>3.0.CO;2-B)
- Luciano, Liliana, Reale, E., & Ruska, H. (1968). On a "chemoreceptive" sensory cell in the tachea of the rat. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 85(3), 350–375.
- Malagelada, J. R., Go, V. L. W., DiMagno, E. P., & Summerskill, W. H. J. (1973). Interactions between intraluminal bile acids and digestive products on pancreatic and gallbladder function. *Journal of Clinical Investigation*, 52(9), 2160–2165.

<https://doi.org/10.1172/JCI107400>

- Massoulié, J., Sussman, J., Bon, S., & Silman, I. (1993). Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Progress in Brain Research*, *98*, 139–146. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)62391-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)62391-2)
- Matsumoto, I., Ohmoto, M., Narukawa, M., Yoshihara, Y., & Abe, K. (2011). Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. *Nature Neuroscience*, *14*(6), 685–687. <https://doi.org/10.1038/nn.2820>
- Maurer, K. J., Carey, M. C., & Fox, J. G. (2009). Roles of Infection, Inflammation, and the Immune System in Cholesterol Gallstone Formation. *Gastroenterology*, *136*(2), 425–440. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.12.031>
- Mawe, G. M., Talmage, E. K., Cornbrooks, E. B., Gokin, A. P., Zhang, L., & Jennings, L. J. (1997). Innervation of the gallbladder: Structure, neurochemical coding, and physiological properties of guinea pig gallbladder ganglia. *Microscopy Research and Technique*, *39*(1), 1–13. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19971001\)39:1<1::AID-JEMT1>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19971001)39:1<1::AID-JEMT1>3.0.CO;2-R)
- Merigo, F., Benati, D., Tizzano, M., Osculati, F., & Sbarbati, A. (2005). α -Gustducin immunoreactivity in the airways. *Cell and Tissue Research*, *319*(2), 211–219. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1007-2>
- Moliner, N., Ruiz, L., Milani, C., Gutiérrez-Díaz, I., Sánchez, B., Mangifesta, M., Segura, J., Cambero, I., Campelo, A. B., García-Bernardo, C. M., Cabrera, A., Rodríguez, J. I., González, S., Rodríguez, J. M., Ventura, M., Delgado, S., & Margolles, A. (2019). The human gallbladder microbiome is related to the physiological state and the biliary metabolic profile. *Microbiome*, *7*(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0712-8>
- Moniaux, N., Escande, F., Porchet, N., Aubert, J. P., & Batra, S. K. (2001). Structural organization and classification of the human mucin genes. In *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* (Vol. 6). <https://doi.org/10.2741/moniaux>
- Morrone, M., Cangioti, A. M., & Cinti, S. (2007). Brush cells in the human duodenojejunal junction: An ultrastructural study. *Journal of Anatomy*, *211*(1), 125–131. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00738.x>
- Nabeyama, A., & Leblond, C. P. (1974). “Caveolated cells” characterized by deep surface invaginations and abundant filaments in mouse gastro-intestinal epithelia. *American Journal of Anatomy*, *140*(2), 147–165. <https://doi.org/10.1002/aja.1001400203>
- Nadjsombati, M. S., McGinty, J. W., Lyons-Cohen, M. R., Jaffe, J. B., DiPeso, L., Schneider, C., Miller, C. N., Pollack, J. L., Nagana Gowda, G. A., Fontana, M. F., Erle, D. J., Anderson, M. S., Locksley, R. M., Raftery, D., & von Moltke, J. (2018).

- Detection of Succinate by Intestinal Tuft Cells Triggers a Type 2 Innate Immune Circuit. *Immunity*, 49(1), 33-41.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.016>
- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., & Bamberg, E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 13940–13945. <https://doi.org/10.1073/pnas.1936192100>
- Ndjim, M., Gasmi, I., Herbert, F., Joséphine, C., Bas, J., Lamrani, A., Coutry, N., Henry, S., Zimmermann, V. S., Dardalhon, V., Campillo Poveda, M., Turtoi, E., Thirard, S., Forichon, L., Giordano, A., Ciancia, C., Homayed, Z., Pannequin, J., Britton, C., ... Jay, P. (2024). Tuft cell acetylcholine is released into the gut lumen to promote anti-helminth immunity. *Immunity*, 57(6), 1260-1273.e7. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2024.04.018>
- Neri, V., Margiotta, M., De Francesco, V., Ambrosi, A., Della Valle, N., Fersini, A., Tartaglia, N., Minenna, M. F., Ricciardelli, C., Giorgio, F., Panella, C., & Ierardi, E. (2005). DNA sequences and proteic antigens of *H. pylori* in cholecystic bile and tissue of patients with gallstones. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 22(8), 715–720. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02644.x>
- O’Leary, C. E., Sbierski-Kind, J., Kotas, M. E., Wagner, J. C., Liang, H. E., Schroeder, A. W., de Tenorio, J. C., von Moltke, J., Ricardo-Gonzalez, R. R., Eckalbar, W. L., Molofsky, A. B., Schneider, C., & Locksley, R. M. (2022). Bile acid–sensitive tuft cells regulate biliary neutrophil influx. *Science Immunology*, 7(69), eabj1080. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abj1080>
- O’Leary, C. E., Schneider, C., & Locksley, R. M. (2019). Tuft Cells-Systemically Dispersed Sensory Epithelia Integrating Immune and Neural Circuitry. *Annual Review of Immunology*, 37(10), 47–72. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041505>
- Oldham-Ott, C. K., & Gilloteaux, J. (1997). Comparative morphology of the gallbladder and biliary tract in vertebrates: Variation in structure, homology in function and gallstones. *Microscopy Research and Technique*, 38(6), 571–597. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19970915\)38:6<571::AID-JEMT3>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19970915)38:6<571::AID-JEMT3>3.0.CO;2-I)
- Paris, M. J., & Williams, B. R. G. (2000). Characterization of a 500-kb contig spanning the region between c-Ha-Ras and MUC2 on chromosome 11p15.5. *Genomics*, 69(2), 196–202. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6339>
- Perniss, A., Boonen, B., Tonack, S., Thiel, M., Poharkar, K., Alnouri, M. W., Keshavarz, M., Papadakis, T., Wiegand, S., Pfeil, U., Richter, K., Althaus, M., Oberwinkler, J.,

- Schütz, B., Boehm, U., Offermanns, S., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., & Kummer, W. (2023). A succinate/SUCNR1-brush cell defense program in the tracheal epithelium. *Science Advances*, 9(31), eadg8842. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg8842>
- Perniss, A., Liu, S., Boonen, B., Keshavarz, M., Ruppert, A. L., Timm, T., Pfeil, U., Soutanova, A., Kusumakshi, S., Delventhal, L., Aydin, Ö., Pyrski, M., Deckmann, K., Hain, T., Schmidt, N., Ewers, C., Günther, A., Lochnit, G., Chubanov, V., ... Kummer, W. (2020). Chemosensory Cell-Derived Acetylcholine Drives Tracheal Mucociliary Clearance in Response to Virulence-Associated Formyl Peptides. *Immunity*, 52(4), 683-699.e11. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.005>
- Pfirschke, C., Engblom, C., Gungabeesoon, J., Lin, Y., Rickelt, S., Zilionis, R., Messemaker, M., Siwicki, M., Gerhard, G. M., Kohl, A., Meylan, E., Weissleder, R., Klein, A. M., & Pittet, M. J. (2020). Tumor-Promoting Ly-6G+ SiglecFhigh Cells Are Mature and Long-Lived Neutrophils. *Cell Reports*, 32(12), 108164. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108164>
- Picciotto, M. R., Caldarone, B. J., King, S. L., & Zachariou, V. (2000). Nicotinic receptors in the brain: Links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacology*, 22(5), 451–465. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00146-3](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00146-3)
- Pigny, P., Guyonnet-Duperat, V., Hill, A. S., Pratt, W. S., Galiegue-Zouitina, S., D'Hooge, M. C., Laine, A., Van-Seuningen, I., Degand, P., Gum, J. R., Kim, Y. S., Swallow, D. M., Aubert, J. P., & Porchet, N. (1996). Human mucin genes assigned to 11p15.5: Identification and organization of a cluster of genes. *Genomics*, 38(3), 340–352. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0637>
- Piper M. Treuting, Suzanne M. Dintzis, K. S. M. (2015). *Comparative Anatomy And Histology: A Mouse, Rat and Human Atlas*.
- Portincasa, P., Moschetta, A., & Palasciano, G. (2006). Cholesterol gallstone disease. *Lancet*, 368(9531), 230–239. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69044-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69044-2)
- Rakusan, K., & Tomanek, R. J. (1986). Distribution of mitochondria in normal and hypertrophic myocytes from the rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 18(3), 299–305. [https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(86\)80412-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(86)80412-6)
- Raynaud, P., Carpentier, R., Antoniou, A., & Lemaigre, F. P. (2011). Biliary differentiation and bile duct morphogenesis in development and disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 43(2), 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.07.020>
- Raynaud, P., Tate, J., Callens, C., Cordi, S., Vandersmissen, P., Carpentier, R., Sempoux, C., Devuyst, O., Pierreux, C. E., Courtoy, P., Dahan, K., Delbecq, K.,

- Lepreux, S., Pontoglio, M., Guay-Woodford, L. M., & Lemaigre, F. P. (2011). A classification of ductal plate malformations based on distinct pathogenic mechanisms of biliary dysmorphogenesis. *Hepatology*, 53(6), 1959–1966. <https://doi.org/10.1002/hep.24292>
- Rege, R. V., & Prystowsky, J. B. (1998). Inflammation and a thickened mucus layer in mice with cholesterol gallstones. *Journal of Surgical Research*, 74(1), 81–85. <https://doi.org/10.1006/jsre.1997.5213>
- Reid, L., Meyrick, B., Antony, V. B., Chang, L. Y., Crapo, J. D., & Reynolds, H. Y. (2005). The mysterious pulmonary brush cell: A cell in search of a function. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172(1), 136–139. <https://doi.org/10.1164/rccm.200502-203WS>
- Rhodin, J. A. (1966). The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *American Review of Respiratory Disease*, 93(3), 1–15. <https://doi.org/10.1164/arrd.1966.93.3P2.1>
- Rhodin, J., & Dalhamn, T. (1956). Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 44(4), 345–412. <https://doi.org/10.1007/BF00345847>
- Roskams, T., & Desmet, V. (2008). Embryology of extra- and intrahepatic bile ducts, the ductal plate. *Anatomical Record*, 291(6), 628–635. <https://doi.org/10.1002/ar.20710>
- Saito, Y., Kojima, T., & Takahashi, N. (2013). The septum transversum mesenchyme induces gall bladder development. *Biology Open*, 2(8), 779–788. <https://doi.org/10.1242/bio.20135348>
- Sam, C., & Bordoni, B. (2021). Physiology, Acetylcholine. In *StatPearls*.
- Sasaki, M., Ikeda, H., & Nakanuma, Y. (2007). Expression profiles of MUC mucins and trefoil factor family (TFF) peptides in the intrahepatic biliary system: Physiological distribution and pathological significance. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 42(2), 61–110. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2007.02.001>
- Sato, T., Ito, M., & Sakamoto, H. (2013). Pictorial dissection review of the lymphatic pathways from the gallbladder to the abdominal para-aortic lymph nodes and their relationships to the surrounding structures. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 35(7), 615–621. <https://doi.org/10.1007/s00276-013-1088-2>
- Saunders, C. J., Christensen, M., Finger, T. E., & Tizzano, M. (2014). Cholinergic neurotransmission links solitary chemosensory cells to nasal inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(16), 6075–6080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402251111>
- Sbarbati, A., Merigo, F., Benati, D., Tizzano, M., Bernardi, P., Crescimanno, C., & Osculati, F. (2004). Identification and characterization of a specific sensory

- epithelium in the rat larynx. *Journal of Comparative Neurology*, 475(2), 188–201.
<https://doi.org/10.1002/cne.20172>
- Schjoldager, B., Molero, X., & Miller, L. J. (1989). Functional and biochemical characterization of the human gallbladder muscularis cholecystokinin receptor. *Gastroenterology*, 96(4), 1119–1125. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(89\)91631-4](https://doi.org/10.1016/0016-5085(89)91631-4)
- Schneider, C., O'Leary, C. E., & Locksley, R. M. (2019). Regulation of immune responses by tuft cells. *Nature Reviews Immunology*, 19(9), 584–593. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0176-x>
- Schütz, B., Jurastow, I., Bader, S., Ringer, C., von Engelhardt, J., Chubanov, 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. *Frontiers in Physiology*, 6, 87. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00087>
- Schütz, B., Ruppert, A. L., Strobel, O., Lazarus, M., Urade, Y., Büchler, M. W., & Weihe, E. (2019). Distribution pattern and molecular signature of cholinergic tuft cells in human gastro-intestinal and pancreatic-biliary tract. *Scientific Reports*, 9(1), 17466. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53997-3>
- Setchell, K. D. R., Lawson, A. M., Blackstock, E. J., & Murphy, G. M. (1982). Diurnal changes in serum unconjugated bile acids in normal man. *Gut*, 23(8), 637–642. <https://doi.org/10.1136/gut.23.8.637>
- Sheen, P. C., Lee, K. T., & Liu, Y. E. (1998). Mucin content in gallbladders with brown pigment stones or combination stones with a brown periphery. *Digestion*, 59(6), 660–664. <https://doi.org/10.1159/000007572>
- Silva, D. G. (1966). The fine structure of multivesicular cells with large microvilli in the epithelium of the mouse colon. *Journal of Ultrastructure Research*, 16(5–6), 693–705. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(66\)80015-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(66)80015-1)
- Singh, A., Singh, G., Kaur, K., Goyal, G., Saini, G., & Sharma, D. (2019). Histopathological changes in gallbladder mucosa associated with cholelithiasis: A prospective study. *Nigerian Journal of Surgery*, 25(1), 21. https://doi.org/10.4103/njs.njs_15_18
- Spence, J. R., Lange, A. W., Lin, S. C. J., Kaestner, K. H., Lowy, A. M., Kim, I., Whitsett, J. A., & Wells, J. M. (2009). Sox17 Regulates Organ Lineage Segregation of Ventral Foregut Progenitor Cells. *Developmental Cell*, 17(1), 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.05.012>
- Stengel, P. W., & Cohen, M. L. (2002). Muscarinic receptor knockout mice: Role of muscarinic acetylcholine receptors M2, M3, and M4 in carbamylcholine-induced

- gallbladder contractility. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(2), 643–650. <https://doi.org/10.1124/jpet.301.2.643>
- Sukumaran, S. K., Lewandowski, B. C., Qin, Y., Kotha, R., Bachmanov, A. A., & Margolskee, R. F. (2017). Whole transcriptome profiling of taste bud cells. *Scientific Reports*, 7(1), 7595. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07746-z>
- Sumazaki, R., Shiojiri, N., Isoyama, S., Masu, M., Keino-Masu, K., Osawa, M., Nakauchi, H., Kageyama, R., & Matsui, A. (2004). Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice. *Nature Genetics*, 36(1), 83–87. <https://doi.org/10.1038/ng1273>
- Sundler, F., Alumets, J., Håkanson, R., Ingemansson, S., Fahrenkrug, J., & Schaffalitzky de Muckadell, O. (1977). VIP Innervation of the Gallbladder. *Gastroenterology*, 72(6), 1375–1377. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(77\)80069-3](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(77)80069-3)
- Tabibian, J. H., Masyuk, A. I., Masyuk, T. V., O'Hara, S. P., & LaRusso, N. F. (2013). Physiology of cholangiocytes. *Comprehensive Physiology*, 3(1), 541–565. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120019>
- Taira, K., & Shibasaki, S. (1978). A Fine Structure Study of the Non-Ciliated Cells in the Mouse Tracheal Epithelium with Special Reference to the Relation of “Brush Cells” and “Endocrine Cells.” *Archivum Histologicum Japonicum*, 41(4), 351–366. <https://doi.org/10.1679/aohc1950.41.351>
- Tallini, Y. N., Shui, B., Greene, K. S., Deng, K. Y., Doran, R., Fisher, P. J., Zipfel, W., & Kotlikoff, M. I. (2006). BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons. *Physiological Genomics*, 27(3), 391–397. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00092.2006>
- Talmage, E. K., Pouliot, W. A., Schemann, M., & Mawe, G. M. (1996). Structure and chemical coding of human, canine and opossum gallbladder ganglia. *Cell and Tissue Research*, 284(2), 289–302. <https://doi.org/10.1007/s004410050589>
- Tan, C. E. L., & Moscoso, G. J. (1994a). The developing human biliary system at the porta hepatis level between 11 and 25 weeks of gestation: A way to understanding biliary atresia. Part 2. *Pathology International*, 44(8), 600–610. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1994.tb01720.x>
- Tan, C. E. L., & Moscoso, G. J. (1994b). The developing human biliary system at the porta hepatis level between 29 days and 8 weeks of gestation: A way to understanding biliary atresia. Part 1. *Pathology International*, 44(8), 587–599. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1994.tb01719.x>
- Thai, P., Loukoianov, A., Wachi, S., & Wu, R. (2008). Regulation of airway mucin gene expression. *Annual Review of Physiology*, 70(1), 405–429. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100441>

- Thornton, D. J., & Sheehan, J. K. (2004). From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 1(1), 54–61. <https://doi.org/10.1513/pats.2306016>
- Tiwari, P., Dwivedi, S., Singh, M. P., Mishra, R., & Chandy, A. (2013). Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(5), 413–420. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60094-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60094-8)
- Tizzano, M., Cristofolletti, M., Sbarbati, A., & Finger, T. E. (2011). Expression of taste receptors in Solitary Chemosensory Cells of rodent airways. *BMC Pulmonary Medicine*, 11(3), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-11-3>
- Tizzano, M., Gulbransen, B. D., Vandenbeuch, A., Clapp, T. R., Herman, J. P., Sibhatu, H. M., Churchill, M. E. A., Silver, W. L., Kinnamon, S. C., & Finger, T. E. (2010). Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(7), 3210–3215. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911934107>
- Tizzano, M., Merigo, F., & Sbarbati, A. (2006). Evidence of solitary chemosensory cells in a large mammal: The diffuse chemosensory system in *Bos taurus* airways. *Journal of Anatomy*, 209(3), 333–337. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2006.00617.x>
- Tokunaga, Y., Cox, K. L., Coleman, R., Concepcion, W., Nakazato, P., & Esquivel, C. O. (1993). Characterization of cholecystinin receptors on the human gallbladder. *Surgery*, 113(2), 155–162.
- Tomita, H., & Hara, A. (2022). Development of extrahepatic bile ducts and mechanisms of tumorigenesis: Lessons from mouse models. *Pathology International*, 72(12), 589–605. <https://doi.org/10.1111/pin.13287>
- Toouli, J., Buschell, M., Stevenson, G., Dent, J., Wycherley, A., & Iannos, J. (1986). Gallbladder emptying in man related to fasting duodenal migrating motor contractions. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 56(2), 147–151. <https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.1986.tb01872.x>
- Torsoli, A., Corazziari, E., Habib, F. I., & Cicala, M. (1990). Pressure relationships within the human bile tract: Normal and abnormal physiology. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 25(S175), 52–57. <https://doi.org/10.3109/00365529009093127>
- Traynor, O. J., Dozois, R. R., & DiMagno, E. P. (1984). Canine interdigestive and postprandial gallbladder motility and emptying. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 246(4), 426–432. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1984.246.4.g426>
- Trier, J. S., Allan, C. H., Marcial, M. A., & Madara, J. L. (1987). Structural features of the apical and tubulovesicular membranes of rodent small intestinal tuft cells. *The*

- Anatomical Record*, 219(1), 69–77. <https://doi.org/10.1002/ar.1092190112>
- Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Yadava, K., Sichelstiel, A. K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., Blanchard, C., Junt, T., Nicod, L. P., Harris, N. L., & Marsland, B. J. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature Medicine*, 20(2), 159–166. <https://doi.org/10.1038/nm.3444>
- Ualiyeva, S., Hallen, N., Kanaoka, Y., Ledderose, C., Matsumoto, I., Junger, W. G., Barrett, N. A., & Bankova, L. G. (2020). Airway brush cells generate cysteinyl leukotrienes through the ATP sensor P2Y2. *Science Immunology*, 5(43), aax7224. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aax7224>
- Uemura, M., Igarashi, H., Ozawa, A., Tsunekawa, N., Kurohmaru, M., Kanai-Azuma, M., & Kanai, Y. (2015). Fate mapping of gallbladder progenitors in posteroventral foregut endoderm of mouse early somite-stage embryos. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(5), 587–591. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0635>
- van Best, N., Rolle-Kampczyk, U., Schaap, F. G., Basic, M., Olde Damink, S. W. M., Bleich, A., Savelkoul, P. H. M., von Bergen, M., Penders, J., & Hornef, M. W. (2020). Bile acids drive the newborn's gut microbiota maturation. *Nature Communications*, 11(1), 3692. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17183-8>
- van Grinsven, K. W. A., van Hellemond, J. J., & Tielens, A. G. M. (2009). Acetate:succinate CoA-transferase in the anaerobic mitochondria of *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 164(1), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.11.008>
- Van Klinken, B. J. W., Dekker, J., Van Gool, S. A., Van Marle, J., Büller, H. A., & Einerhand, A. W. C. (1998). MUC5B is the prominent mucin in human gallbladder and is also expressed in a subset of colonic goblet cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 274(5), G871–G878. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.274.5.g871>
- Viladomiu, M., Metz, M. L., Lima, S. F., Jin, W. B., Chou, L., Guo, C. J., Diehl, G. E., Simpson, K. W., Scherl, E. J., & Longman, R. S. (2021). Adherent-invasive *E. coli* metabolism of propanediol in Crohn's disease regulates phagocytes to drive intestinal inflammation. *Cell Host and Microbe*, 29(4), 607-619.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.01.002>
- Vilkin, A., Nudelman, I., Morgenstern, S., Geller, A., Dayan, Y. B., Levi, Z., Rodionov, G., Hardy, B., Konikoff, F., Gobbi, D., & Niv, Y. (2007). Gallbladder inflammation is associated with increase in mucin expression and pigmented stone formation. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(7), 1613–1620. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9162-9>
- Von Moltke, J., Ji, M., Liang, H. E., & Locksley, R. M. (2016). Tuft-cell-derived IL-25

- regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature*, 529(7585), 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature16161>
- Wahlin, T., Axelsson, H., Schiebler, T. H., & Winckler, J. (1977). Light and electron microscopic observations of the autonomic innervation of the mouse gallbladder mucosa - A histochemical, cytochemical, and secretory study. *Histochemistry*, 53(2), 107–116. <https://doi.org/10.1007/BF00498486>
- Wahlin, Torkel, Bloom, G. D., & Carlsöö, B. (1974). Histochemical observations with the light and the electron microscope on the mucosubstances of the normal mouse gallbladder epithelial cells. *Histochemistry*, 42(2), 119–131. <https://doi.org/10.1007/BF00533263>
- Wahlin, Torkel, Bloom, G. D., & Danielsson, Å. (1976). Effect of cholecystinin-pancreozymin (CCK-PZ) on glycoprotein secretion from mouse gallbladder epithelium - An ultrastructural and cytochemical study. *Cell and Tissue Research*, 171(4), 425–435. <https://doi.org/10.1007/BF00220235>
- Wahlström, A., Sayin, S. I., Marschall, H. U., & Bäckhed, F. (2016). Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metabolism*, 24(1), 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.005>
- Wang, H., Peca, J., Matsuzaki, M., Matsuzaki, K., Noguchi, J., Qiu, L., Wang, D., Zhang, F., Boyden, E., Deisseroth, K., Kasai, H., Hall, W. C., Feng, G., & Augustine, G. J. (2007). High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19), 8143–8148. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700384104>
- Weibel, E. R., Kistler, G. S., & Scherle, W. F. (1966). Practical stereological methods for morphometric cytology. *The Journal of Cell Biology*, 30(1), 23–38. <https://doi.org/10.1083/jcb.30.1.23>
- Wess, J. (2003). Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(8), 414–420. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00195-0](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00195-0)
- Wess, J. (2004). Muscarinic Acetylcholine Receptor Knockout Mice: Novel Phenotypes and Clinical Implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44(1), 423–450. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121622>
- Wessler, I., Kirkpatrick, C. J., & Racké, K. (1998). Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: Expression and function in humans. *Pharmacology and Therapeutics*, 77(1), 59–79. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(97\)00085-5](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(97)00085-5)
- Wilén, C. B., Lee, S., Hsieh, L. L., Orchard, R. C., Desai, C., Hykes, B. L., McAllaster,

- M. R., Balce, D. R., Feehley, T., Brestoff, J. R., Hickey, C. A., Yokoyama, C. C., Wang, Y. T., MacDuff, D. A., Kreamalmayer, D., Howitt, M. R., Neil, J. A., Cadwell, K., Allen, P. M., ... Virgin, H. W. (2018). Tropism for tuft cells determines immune promotion of norovirus pathogenesis. *Science*, 360(6385), 204–208. <https://doi.org/10.1126/science.aar3799>
- Wu, S. V., Rozengurt, N., Yang, M., Young, S. H., Sinnott-Smith, J., & Rozengurt, E. (2002). Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 2392–2397. <https://doi.org/10.1073/pnas.042617699>
- Xiong, Z., Geng, J., Zhu, X., Xu, Y., Fan, D., Qin, X., Du, Y., Tian, Y., & Fan, Z. (2021). Intestinal Tuft-2 Cells Exert Antimicrobial Immunity Via Sensing Bacterial Metabolite N-Undecanoylglycine by Vomeronasal Receptor Vmn2r26. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3854504>
- Yamada, E. (1955). The Fine Structure of the Gall Bladder Epithelium of the Mouse. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1(5), 445–458. <https://doi.org/https://doi.org/10.1083/jcb.1.5.445>
- Yamashita, J., Ohmoto, M., Yamaguchi, T., Matsumoto, I., & Hirota, J. (2017). Skn-1a/Pou2f3 functions as a master regulator to generate Trpm5-expressing chemosensory cells in mice. *PLoS One*, 12(12), e0189340. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189340>
- Yau, W. M. (1990). Mode of stimulation of gallbladder contraction by substance K. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 259(5), G838–G841. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1990.259.5.g838>
- Ye, F., Shen, H., Li, Z., Meng, F., Li, L., Yang, J., Chen, Y., Bo, X., Zhang, X., & Ni, M. (2016). Influence of the biliary system on biliary bacteria revealed by bacterial communities of the human biliary and upper digestive tracts. *PLoS One*, 11(3), e0150519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150519>
- Yurewicz, E. C., Matsuura, F., & Moghissi, K. S. (1982). Structural characterization of neutral oligosaccharides of human midcycle cervical mucin. *Journal of Biological Chemistry*, 257(5), 2314–2322. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)34924-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)34924-x)
- Yusko, P., Hall, R. A., & Ford-Hutchinson, A. W. (1983). Contraction of guinea pig gall bladder strips by leukotrienes and other agonists. *Prostaglandins*, 25(3), 397–403. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(83\)90043-6](https://doi.org/10.1016/0090-6980(83)90043-6)
- Zancanaro, C., Caretta, C. M., Merigo, F., Cavaggioni, A., & Osculati, F. (1999). α -gustducin expression in the vomeronasal organ of the mouse. *European Journal of Neuroscience*, 11(12), 4473–4475. <https://doi.org/10.1046/j.1460->

9568.1999.00912.x

- Zen, Y., Harada, K., Sasaki, M., Tsuneyama, K., Katayanagi, K., Yamamoto, Y., & Nakanuma, Y. (2002). Lipopolysaccharide induces overexpression of MUC2 and MUC5AC in cultured biliary epithelial cells: Possible key phenomenon of hepatolithiasis. *American Journal of Pathology*, *161*(4), 1475–1484. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64423-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64423-9)
- Zhang, F., Wang, L. P., Boyden, E. S., & Deisseroth, K. (2006). Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nature Methods*, *3*(10), 785–792. <https://doi.org/10.1038/nmeth936>
- Zhang, F., Wang, L. P., Brauner, M., Liewald, J. F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P. G., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A., & Deisseroth, K. (2007). Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, *446*(7136), 633–639. <https://doi.org/10.1038/nature05744>
- Zhang, Q., Ye, M., Su, W., Chen, Y., Lou, Y., Yang, J., Ma, T., Chen, W., Gao, S., Que, R., Zhang, B., Li, H., Bai, X., & Liang, T. (2020). Sphincter of Oddi laxity alters bile duct microbiota and contributes to the recurrence of choledocholithiasis. *Annals of Translational Medicine*, *8*(21), 1383–1383. <https://doi.org/10.21037/atm-20-3295>
- Zheng, X., Tizzano, M., Redding, K., He, J., Peng, X., Jiang, P., Xu, X., Zhou, X., & Margolskee, R. F. (2019). Gingival solitary chemosensory cells are immune sentinels for periodontitis. *Nature Communications*, *10*(1), 4496. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12505-x>
- Zong, Y., & Stanger, B. Z. (2011). Molecular mechanisms of bile duct development. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *43*(2), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.06.020>

12. Publikationsverzeichnis

- Keshavarz, M., Faraj Tabrizi, S., Ruppert, A. L., Pfeil, U., Schreiber, Y., Klein, J., Brandenburger, I., Lochnit, G., Bhushan, S., Perniss, A., Deckmann, K., Hartmann, P., Meiners, M., Mermer, P., Rafiq, A., Winterberg, S., Papadakis, T., Thomas, D., Angioni, C., Oberwinkler, J., ... Kummer, W. (2022). Cysteinyl leukotrienes and acetylcholine are biliary tuft cell cotransmitters. *Science immunology*, *7*(69), eabf6734. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abf6734>
- Mei, W., Faraj Tabrizi, S., Godina, C., Lovisa, A. F., Isaksson, K., Jernström, H., & Tavazoie, S. F. (2025). A commonly inherited human PCSK9 germline variant drives breast cancer metastasis via LRP1 receptor. *Cell*, *188*(2), 371–389.e28.

13. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum Unterschrift

14. Danksagung

Zum Abschluss dieser Dissertation möchte ich mich bei allen Beteiligten aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie bedanken, ohne jene der Abschluss dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Kummer für die Überlassung des hochinteressanten Themas, die Betreuung sowie den Einsatz bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit. Weiterhin gilt ihm mein Dank für die Unterstützung meines Forschungsaufenthaltes als Research Student an der Rockefeller Universität in New York. Lieber Wolfgang, von Deinem Engagement, Wissen und deiner grenzenlosen

Leidenschaft für die Wissenschaft und Medizin profitierten bereits viele Generationen von Ärzten und Wissenschaftlern. In diesem Sinne gelten Dir meine größte Anerkennung und Dankbarkeit.

Mein Dank gilt ferner Frau Dr. Maryam Keshavarz, für die ausdauernde und fruchtbare Zusammenarbeit und Betreuung aller Experimente und dem Verfassen unserer hochrangig publizierten Forschungsarbeit. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihr professionell und intensiv begleitet.

Dankbar anerkennen will ich auch die immer freundliche, uneingeschränkte und geduldige Bereitschaft von Herrn Priv. Doz. Dr. Ulrich Gärtner, der mir die Transmissionselektronenmikroskopie ermöglicht hat.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Frau Tamara Papadakis, die mir bei der Anfertigung der Präparate für die Elektronenmikroskopie sehr geholfen hat.

Bei der Studienstiftung Des Deutschen Volkes bedanke ich mich für die finanzielle und ideale Unterstützung dieses Forschungsprojekts.

Weiterhin bedanke ich mich bei meiner Freundin Carolin Feiler, die mich bei der Gestaltung der Abbildungen und der Finalisierung der Doktorarbeit stets professionell und liebevoll unterstützt hat.

Meinem Bruder Dr. Pouriya Faraj Tabrizi, der mir in allen Lebenssituationen und Karrierefragen sowie der Korrektur dieser Dissertation mit größtem Engagement zur Seite stand, danke ich von tiefstem Herzen. Lieber Pouriya, als wundervoller Vater, Partner, Bruder, Wissenschaftler und Arzt bist Du mir ein großes Vorbild.

Zuletzt möchte ich meinen liebevollen Eltern, Taahereh Bideh und Saeid Faraj Tabrizi danken, die mir den Weg des Lebens und der bedingungslosen Liebe Tag für Tag vorleben. Euer unermüdlicher Einsatz in allen Lebensabschnitten ermöglichten mir eine einzigartige Studienzeit in Gießen und den Vereinigten Staaten von Amerika. In unendlicher Dankbarkeit und Liebe widme ich Euch diese Doktorarbeit.

15. Appendix

15.1 AAAS Author License to Publish Policy

AAAS Author License to Publish Policy

OUR PHILOSOPHY

The American Association for the Advancement of Science (AAAS), the non-profit publisher of the *Science* family of journals, recognizes the importance of openness in research as well as the increasingly global nature of the scientific enterprise. The broad public communication of peer-reviewed research, and information-sharing within the scientific community, are essential to advancing science in the service of society.

This is why AAAS makes all of its peer-reviewed research content freely available with registration via the *Science* Web site twelve months after publication. AAAS also makes any articles of urgent public-health importance freely and immediately available to the public, and it participates in various efforts to provide no-cost research content to the world's poorest countries.

As part of our mission, AAAS seeks to enhance communication among scientists, engineers, and the public, worldwide. Toward that end AAAS' license to publish agreement enables authors to use and share their manuscript in a variety of ways.

FURTHER DISSEMINATION

Authors are encouraged to further disseminate the accepted version of their manuscript, for release on the following schedule:

- Immediately following publication of the work by AAAS:
 - To the author's personal website
 - To the author's institution's archival database
- Six months following publication of the work by AAAS:
 - To the funder's* designated repository, if any

*On a trial basis, AAAS is allowing cOAlition S-funded authors to place a CC BY license (or a CC BY-ND license) on their accepted manuscript. This policy will apply to any research submitted to the *Science* family subscription journals on or after 01 January, 2021 that was funded by those cOAlition S organizations that indicated adoption of the Plan S Rights Retention Strategy. (See here: <https://www.coalition-s.org/plan-s-funders-implementation/>.)

Additionally, authors and their institutions are encouraged—without further permission from AAAS—to use the final, published version of their work for educational purposes such as presentations, class handouts, dissertations, or photocopies for colleagues, so long as that use is not commercial in nature.

Further details about the AAAS author license to publish agreement appear below.

OUR LICENSE TO PUBLISH

1. Authors grant to AAAS an exclusive license to publish, not a copyright transfer.

In consideration of publication by AAAS in one of its *Science* journals, the author grants to AAAS an exclusive license to publish and to reproduce, adapt, and distribute the work as well as related supplemental content as broadly as possible, in various languages and forms, worldwide. Ownership of the copyright will remain with the author. AAAS will be the title holder for purposes of registration.

2. Authors can immediately use final works for non-profit purposes—no permission needed.

The author retains the non-exclusive right to use the final, published version of the work, immediately after it is made public by AAAS and without further permission, for educational and other non-commercial purposes, for example, in print collections of the author's own writings; in the author's thesis or dissertation (for electronic deposits, however, only the accepted manuscript should be used); oral presentations by the author; educational courses taught by the author or offered by the author's institution; and distribution of photocopies by the author to colleagues for non-commercial purposes (not for further re-distribution). Figures from the final, published version of the work also can be used, with attribution, in future works by the author, including journal articles, book chapters, presentation slides, and posters.

3. Authors also can share the final published version through the AAAS “referrer linking service.”

Authors may take advantage of the AAAS referrer linking service in order to provide free access to their final, published work via their personal or institutional Web site. AAAS will provide authors with one free referrer link per article. Information on the service will be e-mailed to the corresponding author the week following publication by AAAS.

4. Authors can immediately post the accepted work to their personal or institutional archive.

Authors also retain the right and are encouraged to post the accepted version of their manuscript to their personal Web site or institutional repository, immediately following publication by AAAS. (The accepted version is the paper that was accepted for publication by AAAS, including changes resulting from peer review, but prior to AAAS copyediting.) In such cases, authors must include a hyperlink to the final version published on the *Science* Web site, along with an explanatory note that includes the full citation, as follows: “This is the author's version of the work. It is posted here by permission of the AAAS for personal use, not for redistribution. The definitive version was published in [*Science Journal Title*] on [Volume number and date], DOI: [insert DOI number].”

5. Authors can release the accepted work to designated repositories, as required by funders.

Authors of research articles, reports, reviews, or technical comments can release the accepted version of their work to PubMedCentral or another designated repository no sooner than six months after publication by AAAS. The accepted work can be *submitted* to the funder's repository immediately upon publication by AAAS, but authors must ensure that it is not scheduled for posting or public release for at least six months.

6. Plan S funded authors.

On a trial basis, authors of research that was funded by those cOAlition S organizations that have implemented a Plan S aligned OA policy may, upon publication by AAAS, distribute their accepted manuscript under a CC BY license (or a CC BY-ND license, if permitted by the funder). This trial is effective starting with applicable papers submitted to the Science family subscription journals on or after 01 January, 2021.

7. Authors and their institutions can use the accepted work for non-profit research purposes.

Information-sharing is a key to scientific progress. Authors and their institutions therefore can use the accepted version of manuscripts for non-commercial research purposes, including sharing results with colleagues, or for replication or adaptation of the work so long as such use is not for any commercial advantage or exploitation. No further permission is needed from AAAS. Authors and their institutions cannot license the work, except to AAAS.

8. Authors pledge that the work is original, true, and not previously published.

The author(s) warrant that the work is original, that all facts are true and accurate, that it has not been published elsewhere, and does not infringe on any copyright, proprietary, or personal right of any third party. If the work contains materials owned or controlled by a third party, the author must certify that s/he has obtained permission for its use by attaching documentation to the License to Publish form and by clearly attributing the source within the text of the manuscript.

9. University or institutional restrictions require a waiver.

If university or other institutional restrictions might limit the authors' ability to grant to AAAS any of the rights described in AAAS's license, they must obtain an approved waiver from their institution.

10. Publication by AAAS will require a signed copy of AAAS's License to Publish form.

This License to Publish must be signed and returned to AAAS before a manuscript can be accepted for publication. Each author must sign the form. If the contribution is owned by the author's employer, an authorized representative must sign the form.

11. Authors must sign AAAS's form even if the Work was created under U.S. Government Contract.

The AAAS recognizes the U.S. Government's non-exclusive rights to use the work for non-commercial, governmental purposes where such rights are established in the grant or contract.

12. Authors employed by the U.S. Government should sign in the appropriate section of AAAS's form.

The area designated for U.S. Government employees confirms that the Work was written as part of your official duties as an employee of the U.S. Government, and therefore the Work is in the public domain.