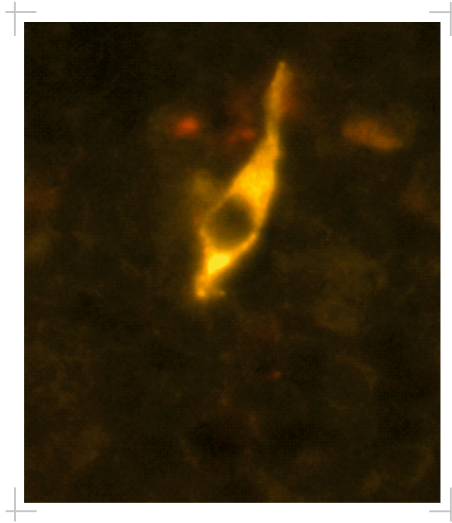


Eine cholinerge, epitheliale Zelle mit
Bürstenzellcharakteristika im Thymusmark

Alexandra Regina Panneck



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



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Eine cholinerge, epitheliale Zelle mit
Bürstenzellcharakteristika im Thymusmark**

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Alexandra Regina Panneck

aus Hannover

Gießen 2016

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Arbeitsgruppe Kardiopulmonale Neurobiologie
Leiter: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Gutachter: Prof. Dr. Kummer

Gutachter: Prof. Dr. Meyle

Tag der Disputation: 23.05.2017

Widmung

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Der Thymus, ein lymphoepitheliales Organ	1
1.1.1	Embryologie und Morphologie	1
1.1.2	Zellpopulationen des Thymus	2
1.1.3	Innervation und Gefäßversorgung des Thymus	4
1.1.4	Thymusinvolution	5
1.1.5	Funktion - Entwicklung der zentralen Toleranz	6
1.2	Das cholinerge System des Thymus	8
1.2.1	Non-neuronales Acetylcholin	8
1.2.2	Acetylcholinrezeptoren	8
1.2.3	Synthese und Metabolismus von ACh und seine Wirkung auf den Thymus	10
1.3	Solitäre chemosensorische Zellen (SCC)	11
1.3.1	Lokalisation und Morphologie der Bürstenzelle	11
1.3.2	Die Funktion der Bürstenzellen	13
1.3.3	Chemosensorik gustatorischer Reize	14
1.3.4	Signaltransduktion	15
1.3.5	Innervation der Bürstenzelle	16
1.4	Ziel der Arbeit	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Tiertötung und Gewebeaufbereitung	18
2.1.1	Mäuse	18
2.1.2	Tiertötung	19
2.1.3	Besonderheiten der Gewebeaufbereitung bei Perfusionsfixation	19
2.1.4	Besonderheiten der Gewebeaufbereitung bei Immersionsfixation	19
2.1.5	Weiterverarbeitung der Proben	20
2.2	Indirekte Immunfluoreszenz	20
2.2.1	Versuchsdurchführung	20
2.2.2	Fluorochrome	24
2.2.3	Kontrollen	25
2.3	Preembedding-staining und Immunelektronenmikroskopie	26
2.3.1	Versuchsdurchführung	26

3	ERGEBNISSE	29
3.1	Detektion einer bisher unbekanntes ChAT-positiven Zelle im Thymus.....	29
3.2	Cholinerge, medulläre Zellen im Thymus sind Epithelzellen	30
3.3	Detektion einer engen räumlichen Assoziation von ChAT-positiven Thymusepithelzellen und CGA-positiven Zellen	32
3.4	Cholinerge Thymusepithelzellen exprimieren bürstenzellcharakteristische Markerproteine	33
3.4.1	Immunhistochemischer Nachweis der Villin-Immunreaktivität	33
3.4.2	Elektronenmikroskopie: Villin	35
3.4.3	Expression von Komponenten der kanonischen Geschmackskaskade im Thymusmark.....	37
3.4.4	Elektronenmikroskopie: PLC _{β2} und TRPM5.....	39
3.5	Lagebeziehung cholinerges Zellen zu Nervenfasern	40
3.6	Cholinozeptive Zellen im Thymusmark	41
4	DISKUSSION	45
4.1	Ein neuer cholinerges Zelltyp im Thymusmark	45
4.2	Ein neuer spezialisierter Epithelzelltyp im Thymusmark	47
4.3	Neuroendokrine Zellen und ihre Gemeinsamkeiten mit Bürstenzellen.....	48
4.4	Chemosensorik im Thymus.....	50
4.4.1	Villin-Immunreaktivität	50
4.4.2	Geschmackskaskade	51
4.5	Lagebeziehung cholinerges Thymusepithelzellen zu Nervenfasern	53
4.6	Cholinozeption.....	54
4.7	Schlussfolgerungen und Hypothesen.....	55
4.7.1	Interpretation der Ergebnisse im Hinblick auf eine mögliche Sensorfunktion chemosensorischer Thymusepithelzellen	55
4.7.2	Cholinerge Effekte im Thymus	57
5	ZUSAMMENFASSUNG	59
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	61
7	LITERATURVERZEICHNIS	64
8	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	78

9	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	79
10	DANKSAGUNG.....	80
11	TABELLARISCHER LEBENSLAUF.....	82

1 Einleitung

1.1 Der Thymus, ein lymphoepitheliales Organ

1.1.1 Embryologie und Morphologie

Der Thymus, Bries, gehört neben dem Knochenmark zu den primär lymphatischen Organen. Im Thymus findet die Entwicklung und Ausbildung heranreifender Thymozyten, die aus dem Knochenmark emigriert sind, zu reifen und selektionierten T-Lymphozyten statt.

Embryologisch entwickelt sich der Mäusethymus aus dem primitiven Pharynx. Es gibt seit jeher zwei verschiedene Theorien zur genaueren embryologischen Herkunft des Organs: Zum einen wird von einem zweifachen Ursprung aus der ektodermalen Schlundfurche und der entodermalen Schlundtasche ausgegangen (Cordier and Haumont, 1980; Cordier and Heremans, 1975; Parham, 2005), zum anderen von einer ausschließlich entodermalen Herkunft aus der dritten Schlundtasche (Blackburn and Manley, 2004; Blackburn et al., 2002). Obwohl für beide Theorien zahlreiche Studien existieren, gehe ich im weiteren Verlauf der Arbeit auf die zweite Theorie ein, die mittlerweile auch in immunologischen Lehrbüchern vertreten ist (Murphy, 2012). Darüber hinaus sind Fragestellungen, die die Embryonalentwicklung des Thymus betreffen, für den Inhalt meiner Arbeit nicht von großer Bedeutung, sodass ich exemplarisch nur auf den Inhalt der zweiten Theorie rekurriere. Bereits eine Studie aus dem Jahr 1975 über die Embryogenese des Thymus in Wachtelkükchen deutet darauf hin, dass sich kortikale und medulläre Epithelzellen aus Endoderm entwickeln (Le Douarin and Jotereau, 1975). Gordon und Mitarbeiter isolierten aus Mäuseembryonen das Endoderm der dritten Schlundtasche von ektodermalen und mesenchymalen Zellen. Dies geschah zeitlich noch bevor es im Rahmen der Embryogenese zum direkten Kontakt zwischen Ektoderm und Endoderm kommen konnte. Sie konnten in Ihrer Studie zeigen, dass sich aus dem isolierten Endoderm der dritten Schlundtasche ein morphologisch normal ausgebildeter Thymus mit einer regelrechten Funktion entwickeln kann (Gordon et al., 2004). Das beweist, dass für die Entwicklung der vollen Funktionsfähigkeit des Thymus nicht das Ektoderm der dritten Schlundfurche erforderlich ist und man von einem einfachen Ursprung aus Endoderm ausgehen kann (Gordon et al., 2004; Lanza, 2004).

Das Organ liegt bei Mäusen und Menschen im oberen Mediastinum an der Rückseite des Manubrium sterni, ventral über dem Herzen. Der Mäusethymus nimmt bei maximaler Größe etwa 4-8% des Körpergewichts ein (Treuting and Dintzis, 2011). Er besteht aus zwei asymmetrischen Lappen, die von einer bindegewebigen Kapsel umschlossen sind, von der Septen und Trabekel mesodermalen Ursprungs ins Organinnere ziehen und den Thymus in Läppchen unterteilen. Histologisch unterscheidet man die außen liegende Rinde, in der die heranreifenden Thymozyten dicht gepackt nebeneinander liegen, und das innen liegende Mark, in dem Thymusepithelzellen über lange, schlanke Fortsätze miteinander verknüpft sind, um ein labyrinthartiges Retikulum zu bilden. In dem zellulären Netzwerk liegen überwiegend Lymphozyten (Anastasiadis and Ratnatunga, 2006; Suster and Rosai, 1990; Treuting and Dintzis, 2011).

1.1.2 Zellpopulationen des Thymus

Das Thymusstroma setzt sich aus Epithelzellen sowie Fibroblasten, Endothelzellen und myoiden Zellen zusammen (Boyd et al., 1993). Die beiden Hauptzelltypen sind Epithelzellen und heranreifende Lymphozyten, die im Thymus auch als Thymozyten bezeichnet werden und von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks abstammen (Morrison et al., 1995). Der Anteil der verschiedenen Zelltypen ist zum einen abhängig von der Region im Thymus und wird zum anderen durch die altersbedingte Atrophie (Lynch et al., 2009) stark beeinflusst und verändert. Auf die Thymusinvolution wird in einem eigenen Kapitel weiter unten genauer eingegangen.

Ektodermale Thymusepithelzellen und Cytokeratine

Thymusepithelzellen bilden durch Zell-Zell-Kontakte eine in Richtung Bindegewebskapsel geschlossene subkapsuläre Schicht, die durch die nach außen zeigende Basallamina der Epithelzellen gebildet wird. In der Rinde ummanteln die Epithelzellen heranreifende Lymphozyten mit ihrem Zytoplasma und werden daher als Ammenzellen bezeichnet. Thymusepithelzellen bilden einen Großteil der nicht-lymphoiden Zellen und werden in vier Gruppen unterteilt: 1) periphere Epithelzellen, zu denen subkapsuläre, paraseptale und perivaskuläre Zellen gehören, 2) kortikale und 3) medulläre Epithelzellen sowie 4) Hassall-Körperchen, die bei der Maus auch Hassall-like-bodies genannt werden (De Waal and Rademakers, 1997; Haynes, 1984; Rouse et al., 1988;

Schuurman et al., 1997). Die Epithelzellen sind durch Desmosomen verknüpft. Sie enthalten Cytokeratine (CK), die zu den Intermediärfilamenten zählen und durch immunhistochemische Antikörpermarkierung zur Detektion von Epithelzellen genutzt werden können. Die CK werden in zwei Gruppen eingeteilt: saure, Typ-I-CK mit einem geringen Molekulargewicht, und basische, Typ-II-CK mit einem größeren Molekulargewicht (Fuchs and Weber, 1994; Moll et al., 1982). CK sind Heterodimere aus jeweils einem basischen und einem sauren CK. Zu der CK-Familie zählen circa 20 verschiedene Mitglieder, die abhängig von ihrer Lokalisation in einschichtigen (CK8, CK18, CK19) oder mehrschichtigen Epithelien (CK13, CK14, CK17) weiter unterteilt werden. Sternförmige Thymusepithelzellen exprimieren vier verschiedene CK: CK8, CK18, CK5 und CK14, die Aufschluss über ihre Lokalisation in Rinde oder Mark geben. CK8 und CK18 finden sich charakteristischer Weise bei kortikalen Thymusepithelzellen, der Großteil medullärer Thymusepithelzellen exprimiert CK5 und CK14 (Klug et al., 1998; Lee et al., 2011; Liepinsh et al., 2009; Shezen et al., 1995). Im Thymusmark gibt es weiterhin eine Untergruppe terminal differenzierter Epithelzellen, welche die $\alpha 3$ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR, Gennamen: cholinergic receptor nicotinic alpha 3 subunit [Chrna3]) exprimieren und zum Teil immunreaktiv gegen CK10 sind. Die Zellen liegen vereinzelt oder in kleinen Grüppchen, in denen sie sich zu konzentrisch angeordneten Hassall-Körperchen zusammenlagern (Soultanova et al., 2014).

Andere Zelltypen

Neben den T-Lymphozyten kommen B-Lymphozyten als Zellen der spezifischen Immunabwehr im Thymus vor. B-Lymphozyten zählen zusammen mit dendritischen Zellen und Makrophagen zu den Antigen-präsentierenden Zellen.

Makrophagen und dendritische Zellen entstammen dem Knochenmark und gelangen über den Körperkreislauf in den Thymus. Makrophagen sind in Rinde, Mark und im Bindegewebe lokalisiert, sie helfen als Zellen des mononukleär-phagozytären Systems bei der Beseitigung apoptotischer Thymozyten (Surh and Sprent, 1994). Interdigitierende dendritische Zellen sind überwiegend im Thymusmark und der Rinden-Mark-Grenze lokalisiert und aktivieren über die Freisetzung von Zytokinen naive Lymphozyten und regen sie zur Proliferation an. Zusätzlich treten Bindegewebszellen aus der Neuralleiste, reife Abwehrzellen aus der hämatopoetischen Reihe und myoide Zellen unklarer Herkunft im Thymusstroma auf (Boyd et al., 1993; Suster and Rosai, 1990; Treuting and Dintzis, 2011). Runde oder lang gestreckte myoide Zellen enthalten typi-

sche Bestandteile quergestreifter Muskelzellen wie Aktin- und Myosinfilamente im Zytoplasma und liegen mehrheitlich im Thymusmark und im Bereich der Rinden-Mark-Grenze, vereinzelt auch in Thymussepten (Drenckhahn et al., 1979). Die Zellen besitzen nAChR, die das Schlangengift α -Bungarotoxin irreversibel binden (Kao and Drachman, 1977; Wekerle et al., 1978). α -Bungarotoxin ist ein Neurotoxin, das hochaffin bestimmte Subtypen des nAChR antagonisiert und das man verwenden kann, um diese zu markieren (Changeux et al., 1970; Shelukhina et al., 2009; Tsetlin and Hucho, 2004). In den Thymussepten und Trabekeln liegen eosinophile und neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Adipozyten, Plasmazellen und Mastzellen (Boyd et al., 1993).

1.1.3 Innervation und Gefäßversorgung des Thymus

Die den Thymus versorgenden arteriellen Gefäße entstammen überwiegend dem Stromgebiet der Arteria thoracica interna aus der Arteria subclavia und verlaufen innerhalb der Septen in das Organinnere bis zur Rinden-Mark-Grenze, von der aus sich kleine Äste verzweigen und in das Parenchym eintreten. Der venöse Abfluss erfolgt über die Venae brachiocephalicae in die Vena cava superior.

Innerhalb der Thymussepten sowie perivaskulär verlaufen efferente Fasern des autonomen Nervensystems: sympathische Fasern aus dem Truncus sympathicus (Williams and Felten, 1981) und parasympathische Nervenfasern aus dem Nervus vagus, dem Nervus laryngeus recurrens und dem Nervus phrenicus (Bulloch and Pomerantz, 1984; Fatani et al., 1986; Singh et al., 1987). Der Sympathikus wirkt im Thymus über den postganglionären Neurotransmitter Noradrenalin eher inhibitorisch auf die Lymphozytenentwicklung und -aktivität (Besedovsky et al., 1979; Williams and Felten, 1981). Parasympathische, cholinerge Nervenfasern sind erst im Verlauf der Embryonalentwicklung – ab dem 17./18. Schwangerschaftstag – im Mäusethymus nachweisbar (Singh et al., 1987). Der Parasympathikus bewirkt über Acetylcholin (ACh) eine vermehrte Lymphopoese, muskarinische ACh-Rezeptoragonisten ändern die Lymphozytenaktivität, wobei es zu einer Zytotoxizität kommt (Strom et al., 1974). Eine direkte Stimulation des Nervus vagus im Tierversuch löste eine vorübergehende Erhöhung der Lymphozytenfreisetzung in den Körperkreislauf aus (Middlebrook et al., 2002).

1.1.4 Thymusinvolution

Der Thymus sticht bei Mäusen und Menschen im Vergleich zu anderen Organen aufgrund seiner altersbedingten Entwicklung besonders hervor, denn schon in der Kindheit beginnend schrumpft das Organ (Steinmann, 1986; Steinmann et al., 1985). Dieses als Thymusinvolution bezeichnete Phänomen wird bei Mäusen bereits nach einer initialen Größenzunahme in den ersten drei bis sechs Wochen beobachtet (Fredrickson and Basch, 1994; Penit and Vasseur, 1989). Der Mäusethymus erfährt im weiteren Verlauf der Entwicklung eine Atrophie. Dabei wird ein Großteil des Gewebes, insbesondere epithelzellreiche Areale, durch Fettgewebe und andere nicht-lymphoide Zellen ersetzt. Der Thymus behält als retrosternaler Fettkörper nur noch einen Rest seiner ursprünglichen Funktion bei. Eine Thymusinvolution wird neben Mäusen auch bei anderen Säugetieren wie Schafen (Cunningham et al., 2001) oder Menschen (Tosi et al., 1982) beobachtet. Bei Menschen nimmt der Thymus nach dem ersten Lebensjahr nicht mehr an Größe zu (Steinmann, 1986; Steinmann et al., 1985). Lange wurde von einer Größenzunahme des Thymus bis zur Pubertät ausgegangen (Kendall et al., 1980), die allerdings nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Bis in das junge Erwachsenenalter nehmen der perivaskuläre Raum und das Bindegewebe zu, danach werden ebendiese zunehmend durch Fettgewebe ersetzt. Dadurch kommt es mit zunehmender Organalterung im Thymus zwar nicht zu einer Reduktion der Organgröße, jedoch vermindert sich durch die Umbauvorgänge das Organgewicht (Steinmann et al., 1985). Die Altersinvolution ist bei Menschen stärker ausgeprägt als bei Mäusen (Treuting and Dintzis, 2011) und führt zu einem Rückgang der Thymusleistung und zu einer Abnahme reifer, naiver T-Lymphozyten im peripheren Blut (Douek et al., 1998; Fry and Mackall, 2002). Es ist bekannt, dass die Morbidität und Mortalität mit zunehmenden Lebensalter steigen, was unter anderem durch eine verminderte Immunkompetenz und einer damit einhergehenden erhöhten Anfälligkeit für Infektionskrankheiten und altersassoziierten Erkrankungen bedingt sein kann (Chen et al., 2009; Lynch et al., 2009; Weksler et al., 2009). Normalerweise würde die Altersinvolution des Thymus bei immunkompetenten Individuen zu keinen schwerwiegenden Einbußen der Abwehrlage führen, allerdings können extrem gesundheitsbelastende Situationen – HIV-Infektionen, Chemo- oder Strahlentherapie und auch Knochenmarkstransplantationen – zu einer massiven Abnahme der T-Zell-Population führen, wobei die Fähigkeit zur schnellen Regeneration der T-Zell-Immunität durch die Organalterung gemindert ist und sich das Immunsystem nur langsam wieder erholt (Haynes et al., 2000).

Infektionen, Alterung, Schwangerschaft und Stress können ebenfalls eine Atrophie auslösen und zu einer Rückbildung lymphatischen Gewebes führen; der evolutionäre Grund dafür konnte bislang nicht einwandfrei geklärt werden (de Meis et al., 2012; Dooley and Liston, 2012; Dowling and Hodgkin, 2009).

1.1.5 Funktion - Entwicklung der zentralen Toleranz

In der Thymusrinde gibt es eine Blut-Thymus-Schranke, die vom kontinuierlichen Kapillarendothel gebildet wird (Raviola and Karnovsky, 1972). Die Blut-Thymus-Schranke verhindert den Kontakt noch unreifer Lymphozyten mit im Blut zirkulierenden Fremdstoffen. Noch unreife Thymozyten-Vorläufer aus dem Knochenmark gelangen über den Blutkreislauf zum Thymus, in den sie über postkapilläre Venolen im Bereich der Rinden-Mark-Grenze in das Organ eintreten und in Richtung Rinde bis zur subkapsulären Zone wandern (Haynes and Hale, 1998; Lind et al., 2001). Die T-Zell-Reifung beginnt in der Rinde, in der die Thymozyten in einem Netzwerk verzweigter Epithelzellen liegen und in Richtung Mark wandern. Auf diesem Weg durchlaufen sie einen Reifungsprozess, während dessen sie unterschiedliche Proteine an der Zelloberfläche exprimieren. Diese Oberflächenmarker werden in der Cluster of differentiation (CD)-Nomenklatur durchnummeriert und zur Immunphänotypisierung herangezogen. Der Wandel der Oberflächenmerkmale, von $CD4^-CD8^-$ -negativen-Zellen, die weder CD4, noch CD8 an ihrer Plasmamembran exprimieren, zu $CD4^+CD8^+$ -positiven Zellen und schließlich zu $CD4^+$ - oder $CD8^+$ -positiven T-Zellen, ist bezeichnend für Entwicklungsstufen, die die Thymozyten auf dem Weg von der Rinde in das Mark durchmachen. Einfach $CD4^+$ -Zellen erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) Selbst-Haupthistokompatibilitätskomplex-II-Antigene (MHC), sie werden funktionell T-Helferzellen oder regulatorische T-Zellen (von Boehmer and Kisielow, 1990). Über MHC-II-Moleküle auf Makrophagen oder dendritischen Zellen werden $CD4^+$ -Lymphozyten Peptide exogener Antigene präsentiert, die zuvor über Endozytose in die Zellen aufgenommen und intrazellulär prozessiert wurden. $CD8^+$ -positive Zellen sind in der Lage, an MHC-I-Moleküle zu binden; sie differenzieren sich zu zytotoxischen Zellen (Abbas and Lichtman, 2009; von Boehmer and Kisielow, 1990). MHC-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren intrazelluläre Antigene, das heißt körpereigen synthetisierte Proteine oder virale Proteine. Man unterscheidet bei diesem Reifungsprozess die positive von der negativen Selektion. Die positive Selektion durch kortikale Thymusepithelzellen ist notwendig für eine spezifische Immun-

antwort. Dabei werden alle Lymphozyten, die keine körpereigenen MHC-Moleküle erkennen können, in die Apoptose geschickt. Bei der negativen Selektion im Mark werden Lymphozyten körpereigene Antigene durch Epithelzellen, dendritische Zellen oder Makrophagen präsentiert und die Lymphozyten ausgesondert, die sich gegen körpereigene Antigene richten (Abbas and Lichtman, 2009; von Boehmer and Kisielow, 1990; Klein et al., 2014; Ladi et al., 2006). Eine Untergruppe medullärer Thymusepithelzellen mit MHC-II-Antigenen auf ihrer Zelloberfläche exprimiert den Autoimmune Regulator (AIRE). Dieser ist ein Transkriptionsfaktor, der in medullären Thymusepithelzellen die Expression einer Vielzahl von Genen regulieren kann (Derbinski et al., 2001). Er treibt die Promiscuous Gene Expression, eine zufällige Expression körpereigener Antigene aus dem AIRE-regulierten Pool, die an MHC-I gebunden auf der Zelloberfläche medullärer Thymusepithelzellen präsentiert werden. AIRE ist somit für die Ausbildung der zentralen Toleranz, das heißt, die Differenzierung zwischen Selbst und Nicht-Selbst mitverantwortlich (Laan and Peterson, 2013). Binden die heranreifenden Thymozyten an die gewebsspezifischen Antigene, werden sie im Zuge der negativen Selektion im Thymusmark in die Apoptose geschickt. AIRE ist somit wesentlich an der Expression gewebsspezifischer Antigene und der negativen Selektion im Thymusmark beteiligt, ein Defekt des Transkriptionsfaktors kann zu polyendokrinen Autoimmunerkrankungen führen (Anderson et al., 2002; Laan and Peterson, 2013; Liston et al., 2003; Mathis and Benoist, 2009). Lange wurde angenommen, dass AIRE der einzige Transkriptionsfaktor ist, der Einfluss auf diesen Prozess hat, bis Takaba und Mitarbeiter kürzlich FEZ Family Zinc Finger 2 (Fezf2) als weiteren Transkriptionsfaktor entdeckten, der AIRE-unabhängig die Expression gewebsspezifischer Antigene beeinflusst und ebenfalls von medullären Thymusepithelzellen exprimiert wird (Takaba et al., 2015). Thymusepithelzellen können diesen Prozess beeinflussen, indem sie über die Sekretion von Hormonen – Thymosin, Thymulin oder Thymopoietin – oder Zytokinen die Proliferation und Selektion der Thymozyten regulieren. Im Mark existiert keine Blut-Thymus-Schranke und die naiven, ausdifferenzierten Thymozyten wandern von hier in den Blutkreislauf aus, von wo aus sie bei Bedarf sekundär lymphatische Organe wie Lymphknoten, Milz und Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe besiedeln (Anastasiadis and Ratnatunga, 2006; Haynes and Hale, 1998). Durch den strengen Selektionierungsprozess wird sichergestellt, dass der Körper eine effektive zelluläre Immunität erwirbt, die zwischen körpereigenen und -fremden Strukturen differenzieren kann.

1.2 Das cholinerge System des Thymus

1.2.1 Non-neuronales Acetylcholin

ACh ist der älteste bekannte Transmitter, der 1923 erstmals von Otto Loewi als „Vagusstoff“ am Herzen beschrieben und später von Henry H. Dale als ACh identifiziert wurde. Für ihre „Entdeckung der chemischen Übertragung von Nervenimpulsen“ bekamen die beiden Forscher 1936 einen Nobelpreis. Seit über drei Milliarden Jahren existiert ACh in pro- und eukaryontischen nicht-neuronalen Zellen, wohingegen Neurone, in denen ACh als Neurotransmitter wirkt, erst vor einer halben Milliarde Jahren entstanden sind (Grando et al., 2003; Wessler et al., 1999). ACh taucht im Körper in vielen verschiedenen Formen und Funktionen auf: Neuronales ACh wirkt als Transmitter an der neuromuskulären Endplatte und kommt in hohen Konzentrationen im Striatum und in autonomen Ganglien des vegetativen Nervensystems vor. Non-neuronales ACh wurde in Epithelzellen des respiratorischen Trakts (Kummer and Krasteva-Christ, 2014; Wessler and Kirkpatrick, 2001), des Gastrointestinal- sowie des Urogenitaltrakts (Lips et al., 2007) und der Haut (Grando et al., 1993; Kurzen et al., 2007) entdeckt. Weiterhin tauchen non-neuronales ACh oder die Cholinacetyltransferase (ChAT) auch in Endothelzellen (Parnavelas et al., 1985), mesothelialen Zellen oder Immunzellen (Wessler et al., 1998) – Granulozyten, Zellen des mononukleären-phagozytären Systems und Lymphozyten – auf. T-Lymphozyten der adaptiven Immunabwehr können ACh synthetisieren und in den Blutkreislauf sezernieren (Fujii and Kawashima, 2001; Fujii et al., 1996; Fujii et al., 1998), wo es immunmodulatorische Effekte hat: Anregung der Zytokinfreisetzung, Einwirkung auf die Lymphozytenmembran und Beeinflussung der Lymphozytenaktivität (Masturzo et al., 1985; Strom et al., 1974). Neben der Immunfunktion hat nicht-neuronales ACh auch Einfluss auf Zell-Zell-Kontakte, den Zellzyklus – insbesondere die Mitose und die Zelldifferenzierung – Sekretion und Resorption und verschiedenste weitere Zellfunktionen (Wessler et al., 1998).

1.2.2 Acetylcholinrezeptoren

Thymusepithelzellen, myoide Zellen und Thymozyten exprimieren muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) und nAChR (Engel et al., 1977; Kuo et al., 2002;

Maslinski et al., 1987; Mihovilovic et al., 1997; Poëa-Guyon et al., 2005; Wakkach et al., 1996). mAChR sind transmembranäre Glykoproteine, die an ein Guaninnucleotid-bindendes Protein (G-Protein) gekoppelt sind. Man unterscheidet fünf verschiedene Typen von mAChR: Die Subtypen M1, M3 und M5 aktivieren über ein G_q-Protein die Phospholipase C (PLC)-Signalkaskade, die M2- und die M4-Untereinheit inhibieren über ein G_i-Protein die Adenylatcyclase (Caulfield, 1993). ACh und Muskarin stellen Rezeptoragonisten dar; Atropin, das Gift der schwarzen Tollkirsche (*Atropa belladonna*), wirkt als kompetitiver Hemmstoff. nAChR sind integrale Membranproteine und liegen als ligandengesteuerte Ionenkanäle in der Plasmamembran von Zellen, die sich nach Aktivierung durch den Neurotransmitter ACh oder das Alkaloid Nikotin öffnen. Der Rezeptor ist ein zylindrisches Heteropentamer, das aus α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Untereinheiten aufgebaut sein kann (Cooper et al., 1991). Die Zusammensetzung des funktionellen Rezeptors variiert durch das Vorkommen von 17 verschiedenen homologen Untereinheiten (α 1- α 10, β 1-4, γ , δ , ϵ) (Kalamida et al., 2007). Die unterschiedliche Zusammensetzung der Untereinheiten führt zu einer großen Vielfalt an nAChR-Isoformen. Die Rezeptoren werden in einen „muskulären“ und einen „neuronalen“ Rezeptortypen unterteilt. Der „muskuläre“ Rezeptortyp befindet sich an der motorischen Endplatte und ist aus zwei α 1-, einer β 1-, einer ϵ - und einer δ -Untereinheit aufgebaut. Im Thymus exprimieren myoide Zellen (Schluep et al., 1987; Wakkach et al., 1999) und Thymusepithelzellen des Marks diesen Rezeptortyp (Bruno et al., 2004; Engel et al., 1977; Wakkach et al., 1996; Wheatley et al., 1992). Pathologische Veränderungen im Thymus, Infektionen oder ein Thymom, können zur Ausbildung von Autoantikörpern gegen nAChR führen (Lindstrom et al., 1976; Vincent, 1980; Vincent, 2002). Die Höhe der Antikörper-Konzentration ist bei der Thymushyperplasie am größten, gefolgt vom Thymom. Der normale und auch der atrophische Thymus zeigen den niedrigsten Antikörper-Titer (Huang and Lo, 2013). Die Patienten zeigen klinisch eine belastungsabhängige Muskelschwäche, die auf die Störung der synaptischen Übertragung an der motorischen Endplatte zurückzuführen ist (Fambrough et al., 1973). Das Krankheitsbild heißt Myasthenia gravis (MG) und wird abhängig von der klinischen Ausprägung durch Acetylcholinesterase-Hemmer oder eine Thymektomie symptomatisch therapiert. Der „neuronale“ Typ nAChR, der auch in nicht-neuronalen Zellen des Thymus – Bindegewebszellen, lymphoiden Zellen und Thymusepithelzellen – zu finden ist, umfasst Rezeptoren mit unterschiedlicher Ionenpermeabilität und den Untereinheiten: α 2-7, β 2-4; α 7, α 9; α 9, α 10 (Kuo et al., 2002; Mihovilovic et al., 1997).

1.2.3 Synthese und Metabolismus von ACh und seine Wirkung auf den Thymus

ACh wird im Thymus endogen von Thymusepithelzellen und Lymphozyten gebildet (Kawashima and Fujii, 2004; Rinner et al., 1999; Tria et al., 1992; Wakkach et al., 1996), wobei eine definitive in situ-Identifikation ACh-produzierender Zellen bisher nicht einwandfrei erfolgte. In Neuronen wird der Transmitter durch die ChAT aus Acetyl-CoA und Cholin synthetisiert (Fujimoto et al., 2001; Nachmansohn and Machado, 1943; Rinner et al., 1999), durch einen vesikulären ACh-Transporter in Vesikeln angereichert (Erickson et al., 1994) und bei Reizeintritt durch die intrazelluläre Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration exozytotisch in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Im Gegensatz dazu wird ACh in nicht-neuronalen Zellen frei im Zytoplasma gespeichert und über spezielle Membrantransporter, polyspezifische organische Kationentransporter (OCT1-3, Mitglieder der Solute-Carrier-Familie 22 [SLC22]), freigesetzt (Wessler et al., 2001). OCTs transportieren ACh in Abhängigkeit vom Membranpotential der Zelle und dem Konzentrationsgradienten verschiedener Ionen sowohl in die Zelle hinein, als auch heraus (Koepsell et al., 2003). Lips und Mitarbeiter untersuchten die Expression organischer Kationentransporter im Atemwegssepithel und beobachteten neben der Expression von OCT1, OCT2 und OCT3 in der Membran der Epithelzellen, dass nach Transfektion von Oozyten des Krallenfrosches mit OCTs lediglich OCT1 und OCT2 an der ACh-Freisetzung beteiligt waren (Lips et al., 2005). OCT1/2-Doppelknock-out-Mäuse zeigten eine deutliche Zunahme der ACh-Konzentration in Epithelzellen des Respirationstrakts (Kummer et al., 2006). Im Thymus der Ratte wird überwiegend der polyspezifische OCT3 exprimiert, wobei auch OCT2 mRNA nachweisbar war (Slitt et al., 2002). Ein weiteres Mitglied der SLC22-Familie ist der pH-abhängige OCT, novel type 1 (OCTN1), der in der apikalen Hälfte respiratorischer Epithelzellen exprimiert wird (Horvath et al., 2007; Mukherjee et al., 2013; Nakanishi et al., 2013; Salomon et al., 2012). Pochini und Mitarbeiter zeigten, dass humaner OCTN1 in Liposomen den Transport von ACh vermittelt, der durch intraliposomales Adenosintriphosphat (ATP) angetrieben wird (Pochini et al., 2012).

Die ChAT wird während der ersten zwei Lebensmonate im Mäusethymus streng hochreguliert (Tria et al., 1992). ACh wird durch eine Esterase enzymatisch in Acetyl-CoA und Cholin hydrolysiert und inaktiviert. Ein Teil des neuronalen Cholins wird durch den hochaffinen Cholintransporter-1 (CHT1) wieder in die präsynaptische Endigung aufgenommen und kann zur Resynthese von ACh wiederverwendet werden (Haga and Noda, 1973; Okuda and Haga, 2000; Okuda et al., 2000).

Im Thymus können Mechanismen der cholinergen Signaltransduktion die T-Zell-Reifung beeinflussen (Nordman et al., 2014). Fasern des Nervus vagus lösen im Thymus die Freisetzung reifer Lymphozyten in das venöse Blut aus (Antonica et al., 1994; Maslinski et al., 1987) und führen zu einer Stimulation der Lymphopoese und einer Aktivierung der Lymphozytenfunktion (Strom et al., 1974). Cholinerge Agonisten, wie das pflanzliche Alkaloid Nikotin, bewirken eine verminderte Zelladhärenz und ein vermindertes Zellwachstum kultivierter Thymusepithelzellen (Mihovilovic and Butterworth-Robinette, 2001). Interessanterweise zeigten Middlebrook und Mitarbeiter an fetalen Thymusorgankulturen von Mäusen, dass schon geringste Dosen Nikotin die Thymozytenreifung beeinflussen und die Entwicklung heranreifender Thymozyten im doppelt positiven Stadium ($CD4^+CD8^+$) zum Stillstand bringen können (Middlebrook et al., 2002).

1.3 Solitäre chemosensorische Zellen (SCC)

SCC oder Bürstenzellen sind ein spezialisierter Zelltyp, der erstmals in den fünfziger Jahren von Rhodin und Dalhamn im Respirationstrakt der Ratte beschrieben wurde (Rhodin and Dalhamn, 1956). Morphologisch charakteristisch für diese Zellen ist ein apikaler Mikrovillibüschel, der an eine Bürste erinnert (Reid et al., 2005). Die Zelle ist aufgrund der Expression mehrerer nachgeschalteter Moleküle der Bitter-, Süß- und Umami-Geschmackswahrnehmungskaskade (Finger et al., 2003; Krasteva and Kummer, 2012; Merigo et al., 2005) auch als chemosensorische Zelle in die Literatur eingegangen. Da es noch keine festgelegte Bezeichnung für diesen Zelltyp in der Literatur gibt und häufig der Name Bürstenzelle oder SCC (Sbarbati and Osculati, 2005) verwendet wird, werden die beiden Begriffe in dieser Arbeit zum Teil synonym verwendet.

1.3.1 Lokalisation und Morphologie der Bürstenzelle

SCC existieren in der Mukosa des gesamten respiratorischen und gastrointestinalen Trakts (Eberle et al., 2013; Finger and Kinnamon, 2011; Krasteva et al., 2011; Krasteva et al., 2012b; Ogura et al., 2010; Tizzano et al., 2010). Im oberen Respirationstrakt liegen sie in der Nasenschleimhaut von Mäusen und Ratten (Finger et al., 2003), im

vomeronasalen Organ (Finger et al., 2003; Zancanaro et al., 1999) und in der Tuba auditiva der Maus (Krasteva et al., 2012b), sowie im Larynx von Mäusen und Ratten (Merigo et al., 2005; Sbarbati et al., 2004; Tizzano et al., 2011). In der olfaktorischen Mukosa von Ratten und Mäusen wurden Zellen mit einer großen morphologischen Ähnlichkeit zu SCC gefunden (Asan and Drenckhahn, 2005), denen allerdings keine chemosensorische Funktion nachgewiesen werden konnte (Hansen and Finger, 2008). Deshalb stellen sie als mikrovillöse Zelle eine eigene Entität dar. Im respiratorischen Epithel der unteren Atemwege sind Bürstenzellen in Trachea und Bronchien (Krasteva et al., 2011; Rhodin and Dalhamn, 1956; Taira and Shibasaki, 1978; Tizzano et al., 2011) und speziesspezifisch auch in den Alveolen – Pneumozyt Typ III – und den terminalen Bronchien der Ratte weit verbreitet (Chang et al., 1986; Hijiya et al., 1977; Jeffery and Reid, 1975; Luciano et al., 1968a; Meyrick and Reid, 1968). Neben Mäusen und Ratten wurde das Vorkommen der Zellen auch in anderen Säugetieren untersucht. SCC sind in der Trachea von Kaninchen (Leeson, 1961), in den Atemwegen von Rindern (Tizzano et al., 2006) und in der Nasenschleimhaut und Trachea des Menschen präsent (Braun et al., 2011; DiMaio et al., 1990; Rhodin, 1966). Im gastrointestinalen Trakt sind chemosensorische Zellen im Magen (Iseki and Kondo, 1990; Isomaki, 1973; Nabeyama and Leblond, 1974; Wattel and Geuze, 1978), im Ductus pancreaticus major (Kugler et al., 1994; Weyrauch and Schnorr, 1976) sowie im Ductus choledochus (Iseki and Kondo, 1990; Luciano et al., 1981) verbreitet. Bei der Maus konnten SCC im Dünn- und Dickdarm (Gebhard and Gebert, 1999; Luciano et al., 1968b; Nabeyama and Leblond, 1974; Silva, 1966; Trier et al., 1987) und in der Gallenblase (Luciano and Reale, 1990; Luciano, 1979) nachgewiesen werden. Unlängst wurden solche Zellen in der Urethra (Deckmann et al., 2014) und in der Konjunktiva (Wiederhold et al., 2015) entdeckt. Deckmann und Mitarbeiter entdeckten die urethrale Bürstenzelle nicht nur in der Maus und der Ratte, sondern konnten ihre Existenz in weiteren Säugetierarten nachweisen. Dazu gehörten Primaten, Carnivore, Paarhufer, Unpaarhufer und Nagetiere (Deckmann et al., 2015).

Die Bezeichnung „Bürstenzelle“ geht auf den besonderen Phänotyp der Zelle zurück. Morphologisch sind Bürstenzellen durch einen apikalen, steifen Mikrovillibüschel charakterisiert, der die Strukturproteine Villin, Fimbrin und Espin enthält und mit einzelnen Aktinfilamenten bis in das apikale Zytoplasma der Zelle hineinstrahlt (Hansen and Finger, 2008; Höfer and Drenckhahn, 1992; Höfer et al., 2000; Luciano et al., 1968a; Reid et al., 2005; Sekerkova et al., 2004; Taira and Shibasaki, 1978). Typisch sind auch Bündel von CK18-positiven Intermediärfilamenten im Zytoplasma der Bürstenzellen in der Kardia-Region des Magens, im Ductus pancreaticus oder in Typ III-

Pneumozyten der Ratte (Höfer and Drenckhahn, 1996; Höfer et al., 2000; Kasper et al., 1994). Bürstenzellen werden durch charakteristische Markerproteine gegenüber anderen Zelltypen abgegrenzt. Die Zellen unterscheiden sich aber trotzdem in der ultrastrukturellen Ausprägung dieser Gemeinsamkeiten. Mikrovilli nasaler Bürstenzellen besitzen, anders als tracheale Bürstenzellen, kein Filamentnetz im apikalen Zytoplasma (Finger et al., 2003). SCC der Tuba auditiva besitzen keinen klassischen Bürstensaum aus steifen, kurzen, parallel angeordneten Mikrovilli, zeigen aber dennoch eine positive Villinimmunreaktivität (Krasteva et al., 2012b). Villin gilt daher als charakteristisches Markerprotein für diesen Zelltyp (Höfer and Drenckhahn, 1992). Bürstenzellen an unterschiedlichen Orten des Körpers unterscheiden sich morphologisch voneinander. In der Nase haben die Zellen eine Birnenform, der Zellkörper ist langgestreckt und verschmälert sich lumenwärts (Finger et al., 2003; Monteiro-Riviere and Popp, 1984). In der Trachea ist der Zellkörper oft eher spindel- oder flaschenförmig, teils auch zylindrisch oder dreieckig, und ein langer, hauchfeiner Ausläufer am apikalen Zellpol erstreckt sich in Richtung Lumen (Krasteva et al., 2011). In der Alveolarregion von Ratten besitzen Bürstenzellen eine Kugelform (Hijiya et al., 1977).

1.3.2 Die Funktion der Bürstenzellen

Physiologisch zeigen Bürstenzellen ähnliche Eigenschaften wie die Sinneszellen der Geschmacksknospen der Zunge, die mit ihrem apikalen Mikrovillibüschel in Kontakt zu Geschmacksstoffen stehen.

Bürstenzellen liegen überwiegend in Organen, die eine Pforte zur „Außenwelt“ darstellen. In der Trachea von Mäusen strecken die Zellen ihren apikalen Bürstensaum in Richtung Lumen, um die chemische Zusammensetzung des Mukosaschleims zu analysieren und auf potenziell gefährliche Substanzen zu reagieren (Krasteva et al., 2011). Toxische Substanzen haben oft einen stark bitteren Geschmack und lösen aversive Reaktionen aus. Eine schnelle Reizwahrnehmung ist dabei ein wichtiger Schutzmechanismus des Körpers bei versehentlicher Aufnahme toxischer Substanzen. Finger und Kinnamon haben gezeigt, dass chemosensorische Zellen der Nasenschleimhaut durch bitter schmeckende Substanzen und freie Aminosäuren (umami) im Mukosashleim aktiviert werden (Finger and Kinnamon, 2011; Kinnamon, 2012). Die Zellen sind imstande, bitter schmeckende Quorum-Sensing-Moleküle, die zur Kommunikation zwischen Mikroorganismen dienen, zu detektieren (Krasteva et al., 2012a; Tizzano et al., 2010). Mittels cholinergischer Signalweiterleitung geben sie diese Informationen zu

sensorischen Neuronen weiter und lösen lokale Abwehrmechanismen oder Schutzreflexe aus (Krasteva et al., 2011; Ogura et al., 2010; Saunders et al., 2014). Bei Inhalation potenziell schädlicher Bitterstoffe drosseln tracheale Bürstenzellen die Atemfrequenz auf diese Weise (Krasteva et al., 2011; Tizzano et al., 2010). Sie fungieren somit als Wächterzellen an Eintrittspforten in das Organsystem (Fatani et al., 1986). Mit dieser Erkenntnis ließ sich die Existenz der Bürstenzelle an verschiedenen Orten vorher-sagen: in der Urethra als Eintrittspforte in den Urogenitaltrakt (Deckmann et al., 2014), in der Tuba auditiva als Eintrittspforte zum Mittelohr (Krasteva et al., 2012b) und in der Konjunktiva als Eintrittspforte zu den ableitenden Tränenwegen (Wiederhold et al., 2015).

1.3.3 Chemosensorik gustatorischer Reize

Man unterscheidet grundlegend fünf verschiedene Geschmacksqualitäten: süß, salzig, umami (japanisch für *wohlschmeckend*), sauer und bitter, wobei seit einiger Zeit auch über die rezeptorvermittelte Wahrnehmung von Fett (Liu et al., 2011; Mattes, 2009) und Karbonat (Chandrashekar et al., 2009) berichtet wurde. Geschmacksknospen bestehen aus sekundären Sinneszellen der Zunge. Mehrere Sinneszellen bilden eine Knospe (Chandrashekar et al., 2006) und laufen in einem Geschmacksporus mit ihrem apikalen Mikrovillibusatz zusammen. Über Geschmacksrezeptoren im Mikrovillibusatz binden bei Nahrungszufuhr Geschmacksliganden (Lindemann, 2001). Jede Geschmacksqualität wird über einen eigenen Zelltyp mit spezifischen Rezeptoren vermittelt (Chandrashekar et al., 2006; Finger, 2005). Die sensorischen Informationen werden anschließend über Synapsen mit basal verankerten Nervenfasern umgeschaltet und über den Tractus solitarius – gebildet aus Fasern des Nervus facialis (N.VII), des Nervus glossopharyngeus (N.IX) und des Nervus vagus (N.X) – zum Nucleus tractus solitarii im Hirnstamm geleitet. Dort werden die gustatorischen Informationen auf das zweite Neuron verschaltet und zum Thalamus geleitet, von wo die sensorischen Fasern nach Umschaltung auf das dritte Neuron zum Großhirn gelangen (Small, 2006).

In den verschiedensten Geweben im Körper – Respirations-, Gastrointestinaltrakt oder auch in der Urethra – existieren chemosensorische Zellen, die eine große Ähnlichkeit mit Geschmacksknospen der Zunge besitzen. Sie nutzen Elemente der Geschmackskaskade und die gleichen Rezeptoren, die in Geschmackszellen existieren, als Pathogenitätsrezeptoren, mithilfe derer sie bitter, süß und umami schmecken (Deckmann et al., 2014; Finger and Kinnamon, 2011; Höfer et al., 1996; Iwatsuki et al., 2012;

Kinnamon, 2012; Krasteva and Kummer, 2012). Die intrazelluläre Signalkaskade erfolgt entsprechend der in Geschmackszellen. Anhand spezieller Antikörpermarkierungen gegen Komponenten der Geschmackskaskade, die in Geschmacksknospen der Zunge vorkommen, können Bürstenzellen in Immunfluoreszenzversuchen identifiziert werden. Zu den molekularen Komponenten zählen das G-Protein α -Gustducin, die $PLC_{\beta 2}$ und der monovalent selektive Kationenkanal Transient receptor potential channel subfamily M member 5 (TRPM5) (Eberle et al., 2013; Finger et al., 2003; Kaske et al., 2007; Krasteva and Kummer, 2012). Im weiteren Verlauf der Arbeit wird der Begriff des Schmeckens für die chemosensorische Weiterverarbeitung gustatorischer Reize verwendet und nicht zur Beschreibung der Sinneswahrnehmung, die von sekundären Sinneszellen der Zunge wahrgenommen wird.

1.3.4 Signaltransduktion

Bürstenzellen besitzen zwei verschiedene Rezeptorklassen, an die Geschmacksmoleküle binden können: taste receptors type 1 (Tas1R) und taste receptors type 2 (Tas2R). Diese Rezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR), die sieben Transmembrandomänen besitzen. Die extrazellulären Rezeptoranteile dienen der Ligandenbindung, wobei an die Tas1R-Untereinheit Süß- und Umamimoleküle und an die Tas2R-Untereinheit Bittermoleküle binden. Die Tas1R-Familie besteht aus drei Mitgliedern. Die beiden Rezeptoren T1R-2 und T1R-3 sind zusammen als Heterodimer an der Perzeption von Süßmolekülen beteiligt, eine Koexpression von Tas1R-1 und Tas1R-3 ist nötig für die Umami-Wahrnehmung (Li et al., 2002; Nelson et al., 2001). Die intrazellulären Rezeptoranteile initiieren eine Signalkaskade, die mit der Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins beginnt. Das G-Protein ist an den Transmembranrezeptor gekoppelt und liegt der Innenseite der Plasmamembran an. Es besteht aus einer α -Gustducin-, einer $\beta 3$ - und einer $\gamma 13$ -Untereinheit (Huang et al., 1999). Lange Zeit wusste man lediglich von dem regulatorischen Einfluss der α -Untereinheit auf intrazelluläre Effektormoleküle, wohingegen die Funktion der β - und γ -Untereinheit unbekannt war. Inzwischen ist bekannt, dass auch die β - und γ -Untereinheit einen Einfluss auf die nachgeschaltete Signalkaskade haben (Clapham and Neer, 1997). Hoon und Mitarbeiter bestätigten in ihrer Studien die Existenz von GPCR in Geschmacksknospen und ihre Aktivierung durch Geschmacksmoleküle (Hoon et al., 1999). Die α -Gustducin-Untereinheit hat im inaktiven Zustand Guanosindiphosphat (GDP) gebunden, das nach Ligandenbindung durch Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht wird.

Das aktivierte G-Protein zerfällt und die α -Gustducin-Untereinheit hydrolysiert GTP wieder zu GDP. Die β - γ -Untereinheit wirkt auf das Enzym PLC β_2 , das das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) in Inositoltriphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerin (DAG) spaltet (Huang et al., 1999; Rossler et al., 2000; Rössler et al., 1998). IP $_3$ leert intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Speicher (Behrens et al., 2011), wodurch die cytoplasmatische Calciumkonzentration steigt und sich TRPM5-Kanäle öffnen (Hofmann et al., 2003). Natrium strömt durch den Kationenkanal in die Zelle ein, die Plasmamembran depolarisiert, was zur Öffnung spannungsabhängiger Ca $^{2+}$ -Kanäle führt. Durch einen weiteren Anstieg der intrazellulären Ca $^{2+}$ -Konzentration wird ACh freigesetzt und umliegende Nervenfasern werden exzitatorisch erregt.

1.3.5 Innervation der Bürstenzelle

In der Nasenschleimhaut, der Trachea und der Urethra werden Bürstenzellen direkt von Nervenfasern berührt, an die sie die Erregung weiterleiten können (Deckmann et al., 2014; Krasteva et al., 2011; Luciano et al., 1968a). Peptiderge sensorische Nervenfasern können mithilfe von Antikörpermarkierungen gegen das Calcitonin-Genverwandte Peptid (CGRP) dargestellt werden, das in den Varikositäten der Nervenfasern enthalten ist (Finger et al., 2003; Tizzano et al., 2011). CGRP ist mit dem Peptidhormon Calcitonin aus den C-Zellen der Schilddrüse verwandt. Beide werden vom gleichen Gen codiert, wobei durch alternatives Spleißen derselben mRNA gewebsspezifische Peptide synthetisiert werden: Calcitonin in der Schilddrüse und CGRP in sensorischen Neuronen und weiteren Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems (Amara et al., 1982; Rosenfeld et al., 1984; Rosenfeld et al., 1983).

An trachealen Bürstenzellen kommen neben peptidergen auch nicht-peptiderge Nervenfasern vor, beide können mithilfe eines Antikörpers gegen Protein-Gen-Produkt 9.5 (PGP9.5) dargestellt werden (Krasteva et al., 2011). Nicht alle Bürstenzellen werden direkt von Nervenfasern kontaktiert. Das Innervationsschema von Bürstenzellen ist regional unterschiedlich und sogar innerhalb der Organe des Respirationstrakts uneinheitlich. Bürstenzellen der olfaktorischen Mukosa werden beispielsweise nicht direkt innerviert, ebenso wie Zellen in den distalen Abschnitten des unteren Respirationstrakts, zu denen die alveolären Bürstenzellen bei Ratten gehören (Hijiya et al., 1977; Luciano et al., 1969).

1.4 Ziel der Arbeit

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen an dem Reportermausstamm ChAT^{BAC}-eGFP wurden verschiedene Körperregionen der Maus auf das Vorkommen von Zellen des nicht-neuronalen cholinergen Systems analysiert, die das verstärkt grün-fluoreszierende Protein (eGFP) exprimieren. Dabei wurde durch einen Zufallsbefund in einem Schnitt aus dem oberen Mediastinum eine bisher unbekannte, cholinerge Zelle im Thymus entdeckt (Panneck et al., 2014). Morphologisch ähnelt diese Zelle Bürstenzellen aus anderen Organen, wie dem Respirationstrakt oder dem Magen (Eberle et al., 2013; Krasteva et al., 2011; Krasteva et al., 2012b; Ogura et al., 2010). Wie oben beschrieben, sind ein apikaler Mikrovillibüschel und die Expression von Proteinen der kanonischen Geschmackskaskade charakteristisch für Bürstenzellen. Sie haben eine chemosensorische Funktion und können bei unphysiologischen Veränderungen des Umgebungsmilieus protektive Reflexe einleiten.

Aufgrund der großen morphologischen Ähnlichkeit der cholinergen Zelle im Thymus und Bürstenzellen ergaben sich folgende Fragen:

1. Wo im Thymus ist diese neuartige Zelle lokalisiert?
2. Um welchen Zelltyp handelt es sich genau?
3. Werden büstenzellcharakteristische Markerproteine von diesen Zellen exprimiert?
4. Werden die Zellen von sensorischen Nervenfasern kontaktiert?

Anhand von zwei verschiedenen Mausstämmen, ChAT^{BAC}- und Chrna3^{BAC}-eGFP-Mäusen (Frahm et al., 2011; Tallini et al., 2006), wurden die oben beschriebenen Fragestellungen adressiert und grundlegende Eigenschaften cholinergischer Zellen untersucht. Die Reportermausstämme wurden zum einen nativ und mittels immunhistochemischer Verstärkung der eGFP-Fluoreszenz im Epifluoreszenzmikroskop untersucht. Des Weiteren sollten Doppelmarkierungen mit zelltypspezifischen Markern Aufschluss über die zelluläre Identifikation der neuentdeckten Zelle geben. Zudem wurden die Zellen ultrastrukturell analysiert und eine eventuelle Innervation der Zelle untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Tiertötung und Gewebeaufbereitung

2.1.1 Mäuse

Für die Immunfluoreszenzversuche wurden zwei Wildtypmäuse (C57BL/6N), eine männliche und eine weibliche Maus im Alter von neun Wochen, 14 männliche und weibliche ChAT^{BAC}-eGFP-transgene Mäuse (Tallini et al., 2006) im Alter von viereinhalb bis elf Monaten und fünf Jungmäuse – eine null Tage alte Maus sowie zwei sechs und neun Tage alte Mäuse – als Versuchstiere verwendet. Bei ChAT^{BAC}-eGFP-transgenen Mäusen wurde mithilfe eines Vektors, bacterial artificial chromosome (BAC), die Expression des Gens des eGFP durch die Promotersequenz der ChAT getrieben. In diesen Mäusen können ChAT-exprimierende Zellen im Fluoreszenzmikroskop durch ihre grüne Eigenfluoreszenz erkannt sowie zentrale und periphere cholinerge Neurone und einige epitheliale Zellen identifiziert werden (Tallini et al., 2006).

Das Vorkommen der $\alpha 3$ -Untereinheit des nAChR wurde an Chrna3^{BAC}-eGFP-Mäusen (n=5, Alter 8 bis 14 Wochen, beide Geschlechter) untersucht, bei denen mithilfe der schon oben beschriebenen BAC-Technik die Expression des eGFP an den Chrna3-Promoter (Frahm et al., 2011) gekoppelt wurde. Zellen, die die nikotinische $\alpha 3$ -Rezeptoruntereinheit exprimieren, können so im Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden. Das inserierte Transgen besteht neben der modifizierten $\alpha 3$ -Sequenz aus der kodierenden Sequenz für die $\beta 4$ -Untereinheit, die in dem Mausstamm überexprimiert wird, und der unvollständigen kodierenden Sequenz für die $\alpha 5$ -Untereinheit (Frahm et al., 2011).

Positivkontrollen wurden an ChAT^{BAC}-eGFP-, Chrna3^{BAC}-eGFP-Mäusen und Wildtypmäusen (C57BL/6N) durchgeführt und dienen der Überprüfung der Sensitivität, das heißt, der Richtig-positiv-Rate des verwendeten Antikörpers.

Für die Elektronenmikroskopie (n=4) dienten ChAT^{BAC}-eGFP-transgene Mäuse (n=3) sowie eine Maus vom Wildtyp (C57BL/6N, n=1, Zentrales Tierlabor, Justus-Liebig-Universität Gießen). Die Tierhaltung, Zucht und Verwendung der Mäuse wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (RP Gießen, Referenznummern A9/2011, A11/2011, A38/2011, A60/2012, A61/2012).

2.1.2 Tiertötung

Die Mäuse wurden zunächst durch eine Inhalationsnarkose mit einer Überdosis Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) getötet. Ventral wurde ein Schnitt entlang der Linea mediana anterior gesetzt, der nach kaudal erweitert wurde, um die Cavitas abdominalis zu eröffnen und die Aorta und die Vena cava inferior zu durchtrennen, damit das Tier ausblutet.

2.1.3 Besonderheiten der Gewebeaufbereitung bei Perfusionsfixation

Zur Perfusionsfixation wurde nach der Thoraxöffnung das Herz freigelegt und 0,1 ml Heparin (Heparin-Natrium-25 000-ratiopharm®, Ulm, Deutschland) ins Herz injiziert. Mit einer Federschere wurde die Auricula dextra angeschnitten, um eine Abflussmöglichkeit für das Blut zu schaffen. In dem Ventriculus sinister wurde eine Kanüle fixiert und pro Maus der Körperkreislauf mit circa 50 ml Vorspüllösung (9 g/l NaCl [Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA], 25 g/l Polyvinylpyrrolidon MG 40.000 [PVP, Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland], 5 g/l Procainhydrochlorid in Wasser [Merck, Darmstadt, Deutschland], pH 7,4, (Forssmann et al., 1977)), versetzt mit Heparin in Wasser (5000 I. E. /ml), durchspült. Anschließend wurde das Tier durch etwa 50 ml der Zamboni-Fixationslösung (2% Formaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer [PP] mit 15% gesättigter Pikrinsäure, pH 7,4, alle Reagenzien von Merck, Darmstadt, Deutschland; n=7) oder phosphatgepuffertem Paraformaldehyd (4% PFA [Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland] in 0,1 M PP, n=1 für ChAT^{BAC}-eGFP Mäuse und n=5 für Chrna3^{BAC}-eGFP Mäuse) perfundiert.

Der Thymus und Organe, die später als Kontrollen dienen (Nebenniere, Darm, Rückenmark, Zunge und Trachea), wurden entnommen und für fünf bis sechs Stunden in der gleichen Fixierlösung belassen, mit der die Mäuse zuvor perfundiert waren.

2.1.4 Besonderheiten der Gewebeaufbereitung bei Immersionsfixation

Anders verfahren wurde bei der Immersionsfixation von Gewebe. Nach der Tiertötung durch Ausbluten wurden der Schnitt entlang der Linea mediana anterior kranial erwei-

tert und der Thymus und Organe, die für spätere Positivkontrollen dienen sollten, frei-präpariert. Entnommenes, unfixiertes Gewebe wurde über Nacht in ein Gefäß mit Zambonifixans (n=3) oder 4% PFA (n=3) gegeben und auf einem Schüttler geschwenkt.

2.1.5 Weiterverarbeitung der Proben

Die Gewebeproben wurden wiederholt in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, 28,75 ml Stammlösung A [0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$], 96,20 ml Stammlösung B [0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$], Reagenzien für beide Stammlösungen von Merck, Darmstadt, Deutschland, 22,4 g NaCl ad 5000 ml Aqua destillata [aq.dest.]) gewaschen und über Nacht in 0,1 M PP mit 18% Saccharose (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), pH 7,4, bei 4°C eingelegt.

Am nächsten Tag wurde das Gewebe in Tissue-Tek-O.C.T.TM-Compound (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) auf Filterpapier eingebettet und in schmelzendem Isopentan (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), welches zuvor durch Flüssigstickstoff gekühlt worden war, eingefroren. Durch das schnelle Einfrieren wird die Eiskristallbildung im Gewebe vermindert, die zur einer Schädigung des Zellverbandes führen könnte. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2 Indirekte Immunfluoreszenz

2.2.1 Versuchsdurchführung

Von ChAT^{BAC}-eGFP- und BAC- α 3-nAChR-transgenen Mäusen wurden bei -23°C 10 μm dicke Kryostatschnitte (Microm HM 560, MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland) angefertigt, auf Objektträger mit einer positiven Ladung (SuperFrost Plus-Objektträger, R.Langensbrinck, Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) gezogen und in einer dunklen Kammer für eine Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Schnitte wurden teils sofort zur Immunhistochemie verwendet, teils im -80°C-Gefrierschrank gelagert.

Bei Versuchsbeginn wurden die Schnitte mit einem Fettstift (PAP Pen Liquid Blocker, Science Services, Japan) umrandet und für eine Stunde mit einer Blocklösung (10% normales Pferdeserum [NHS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich], 0,5% Tween 20 und 0,1% Rinderserumalbumin [BSA], beide Reagenzien von Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA in PBS, pH=7,4) inkubiert, um die Zellmembranen für Antikörper durchlässig zu machen, freie Proteinbindungsstellen zu sättigen und damit unspezifische Markierungen zu reduzieren.

Der Primärantikörper wurde verdünnt mit 0,005 M PP mit 0,01% Natriumazid (NaN_3 , Merck, Darmstadt, Deutschland), welches das Wachstum von Mikroorganismen hemmt, und mit 0,9% Kochsalz. Die Schnitte wurden mit dem Primärantikörper inkubiert (Tabelle 2-1) und über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer gelagert, die mit Parafilm (Bemis, Neenah, USA) luftdicht verschlossen wurde.

Antigen	Wirtspezies	Klon/Code	Verdünnung	Quelle
CGRP	Ziege, p	BT17-2090-07	1:4000	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
CGA (Chromogranin A)	Kaninchen, p	1782-1	1:400	Epitomics, Burlingame, CA, USA
CK5	Kaninchen, m	SP27/M3270	1:200	Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA
CK8	Kaninchen, m	SP102/M4020	1:100	Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA
CK14	Kaninchen, m	SP53/M3530	1:400	Spring Bioscience, Pleasanton,

				CA, USA
CK18	Kaninchen, m	SP69/M3690	1:200	Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA
eGFP	Huhn, p	NB 100-1614	1:16,000	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
Gα-gustducin	Kaninchen, p	sc-395	1:3,000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
PGP 9.5	Kaninchen, p	BT78-6305-04	1:8,000	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
PLC _{β2}	Kaninchen, p	sc-206	1:800	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
TRPM5	Kaninchen, p	∅	1:4,000	Kaske et al. (2007)
Villin vom Menschen	Kaninchen, p	V2121-95	1:50	US Biological, Salem, MA, USA
Villin vom Huhn	Kaninchen, p	∅	1:6400	Drenckhahn et al. (1983)

Tabelle 2-I: Verwendete Primärantikörper für die Immunfluoreszenzmarkierung.
m=monoclonal, p=polyclonal

Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper von den Objektträgern abgesaugt und das Gewebe in einer Küvette mit PBS zweimal 10 Minuten gewaschen, um nicht gebundene Antikörper aus dem Gewebe zu entfernen.

Die Schnitte wurden mit einem Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper (Tabelle 2-II), der zuvor mit 0,005 M PP mit 0,01% NaN_3 und 0,9% NaCl verdünnt worden war, für eine Stunde im Dunklen inkubiert, damit es nicht zu einer vorzeitigen Anregung und Abschwächung des Fluorochroms kommt. Auf einige Objektträger wurde zusätzlich für eine Stunde das Fluorochrom DAPI (4',6 Diaminidin-2-phenylindol, $1\mu\text{g/ml}$, verdünnt in PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) zur DNA-Markierung zugesetzt, mithilfe dessen man in Gewebeschnitten bei Anregung mit ultraviolettem Licht Zellkerne blau fluoreszieren sieht.

Antigen	Wirtspezies	Konjugat	Ig-Größe	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-IgG	Esel	Cy3	gesamtes Molekül	1:2,000	Chemicon, Temecula, CA, USA
Ziegen-IgG	Esel	Cy3	F(ab)_2	1:800	Chemicon, Temecula, CA, USA
Huhn-IgY	Esel	FITC	gesamtes Molekül	1:800	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2-II: Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzmarkierung.

Die Objektträger wurden zweimal 10 Minuten gewaschen und für 10 Minuten in 4% PFA nachfixiert, um die Bindung zwischen Primär- und Sekundärantikörper zu stabilisieren. Die gewaschenen Objektträger wurden mit Einschlussmittel – karbonatgepuffertes Glycerol (Carbonatpuffer [$1,5\text{ M NaHCO}_3$] mit $1,5\text{ M Na}_2\text{CO}_3$ [pH 8,6] und Glycerol im Verhältnis 1:1, alle Reagenzien von Merck, Darmstadt, Deutschland) oder Mowiol (6 g Glycerol, 2,4 g Mowiol 4-88 [Merck, Darmstadt, Deutschland], 6 ml aq. dest., 12 ml $0,2\text{ M Tris (hydroxymethyl)-aminomethan [TRIS, Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland]}$ Puffer pH 8, pH 8,6) – eingedeckelt (Deckgläser, R.Langensack, Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland). Die Objektträger wurden im Kühlschrank bei

-4°C für eine Nacht gelagert und später mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 Imaging, Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet.

Die immunhistochemischen Markierungen wurden mit dem Imaging-Programm AxioVision (AxioVs40V 4.8.2.0, Zeiss, Jena, Deutschland) dokumentiert. Die Bildverarbeitung (Power Point 2010, Microsoft Office) wurde auf die gleichmäßige Anpassung aller Bildanteile bezüglich Helligkeit und Kontrast beschränkt.

2.2.2 Fluorochrome

Zur Verstärkung der eGFP-Fluoreszenz in Schnitten von ChAT^{BAC}-eGFP-transgenen Mäusen wurden Immunfluoreszenzmarkierungen mit dem Primärantikörper Anti-eGFP vom Huhn und einem Anti-Huhn-IgY-Sekundärantikörper, gekoppelt an Fluoresceinisothiocyanat (FITC), durchgeführt.

Die jeweiligen Antigene, die im Thymus dargestellt werden sollten, wurden durch an Sekundärantikörper gekoppelte synthetische Cyanin-Farbstoffe (Anregungs- und Emissionsmaxima von Cy5 = 649/670 nm und Cy3 = 550/570 nm) markiert.

Die Auswertung am Epifluoreszenzmikroskop erfolgte mit folgenden Filtern (Tabelle 2-III).

Fluorochrome	Erregerfilter	Sperrfilter	Dichroischer Spiegel
DAPI	360-370	420-460 nm	400 nm
FITC	460-490 nm	515-550 nm	505 nm
Cy3	525-560 nm	570-650 nm	555 nm
Cy5	590-650 nm	665-740 nm	655 nm

Tabelle 2-III: Verwendete Filter für die Fluoreszenzmikroskopie.

2.2.3 Kontrollen

Zur Antikörpervalidierung wurden bei jeder neuen Antikörperaustestung Positivkontrollen zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse durchgeführt. Bei Positivkontrollen wurde Gewebe, welches das Antigen sicher enthält, mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Die Zunge, mit Anschnitten von Geschmacksknospen, diente als Kontrollgewebe für Immunfluoreszenzmarkierungen gegen $G\alpha$ -Gustducin, $PLC_{\beta 2}$ und TRPM5. Chemosensorische Zellen in der Trachea sind immunreaktiv für die oben genannten Proteine (Krasteva et al., 2011), weswegen ebenfalls die Trachea als Kontrollgewebe genutzt wurde. Als Kontrollgewebe für das Neuropeptid CGRP und für PGP 9.5, das in Neuronen und Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems gefunden wird, fungierten das Rückenmark und der Darm. Der Darm diente auch zum Nachweis für Villin, ebenso wie die chemosensorischen Zellen der Trachea. Für CGA wurde die Nebenniere als Positivkontrolle genutzt. Bei der initialen Testung eines Antikörpers wurden auch Negativkontrollen mitgeführt, bei denen der Primärantikörper mit dem korrespondierenden Peptid (Tabelle 2-IV) präabsorbiert wurde. Bei jedem Immunfluoreszenzversuch wurden ein bis zwei Objektträger mitgeführt, bei denen die Schnitte anstelle des Primärantikörpers mit PBS inkubiert wurden, um die Spezifität des Sekundärantikörpers zu testen.

Bei der Präabsorption wurde der Antikörper vor der Inkubation mit seinem Antigen zusammengebracht, wobei das Antigen an alle freien Bindungsstellen des Antikörpers binden soll. Hierfür wurde der Antikörper mit 20 μ g/100 ml des Peptids gemischt und für sechs Stunden abgedunkelt bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gelagert. Die darauf folgenden Schritte waren identisch mit denen der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung. Die Schnitte wurden für eine Stunde mit Blocklösung (s.o.) geblockt, über Nacht mit dem Gemisch aus Antikörper und Peptid inkubiert und am darauffolgenden Tag mit dem Sekundärantikörper weiter inkubiert, wobei keine Immunreaktion im Gewebe mehr stattfinden sollte. Dies diente der Erfassung unspezifischer Bindungen des Antikörpers.

Antikörper	Verwendetes Peptid, Chargennummer	Quelle
Anti-G α -Gustducin (I-20) P	sc-395 P, # C1708	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Anti- PLC β ₂ (Q-15) P	sc-206 P, # 10704	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 2-IV: Für die Präabsorptionen verwendete Peptide.

2.3 Preembedding-staining und Immunelektronenmikroskopie

2.3.1 Versuchsdurchführung

Für das Preembedding-staining wurden ausschließlich Thymi von C57Bl/6N-Mäusen verwendet, die zuvor perfusionsfixiert worden waren.

Es wurden 40 μ m dicke Kryostatschnitte vom Thymus angefertigt und das Gewebe freischwimmend für eine Stunde in einer dunklen Kammer mit 10% NHS in PBS+S (PBS mit doppelter Menge NaCl) geblockt. Die Schnitte wurden über Nacht mit folgenden Primärantikörpern (Tabelle 2-V) in Napf-Platten inkubiert.

Antigen	Wirtspezies	Klon/Code	Verdünnung	Quelle
PLC β ₂	Kaninchen, p	sc-206	1:800	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
TRPM5	Kaninchen, p	∅	1:4000	Kaske et al. (2007)
Villin vom Menschen	Kaninchen, p	V2121-95	1:50	US Biological, Salem, MA, USA

Tabelle 2-V: Verwendete Primärantikörper für das Preembedding-staining.

Am zweiten Tag wurden die Schnitte dreimal 5 Minuten in gefiltertem PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 2-VI), gelöst in PBS+S, für eine Stunde im Dunkeln inkubiert.

Antigen	Wirtspezies	Konjugat	Ig-Größe	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-IgG	Schwein	Peroxidase (POX)	gesamtes Molekül	1:100	Dako, Glostrup, Dänemark

Tabelle 2-VI: Verwendete Sekundärantikörper für das Preembedding-staining.

Die Schnitte wurden einmal 5 Minuten mit PBS und zweimal 5 Minuten in 0,05 M Trisaminomethan-Puffer (0,05 M TRIS-HCl [HCL von Merck, Darmstadt, Deutschland], 75 ml Lösung A [TRIS], 60 ml Lösung B [1N HCl], 1500 ml aq. dest., pH 7,6) gewaschen. Eine Nickelverstärkung des Diaminobenzidinprodukts wurde erreicht, indem die Schnitte mit einer Lösung aus 0,3 g gelöstem Nickelammoniumsulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in 20 ml TRIS-HCl und 250 µl Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) reagierten. Nach zehnmütiger Vorinkubation wurde für weitere 45 Minuten 1,2 µl H₂O₂ (30%, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) dazugegeben. Die Schnitte wurden dreimal 5 Minuten mit gefiltertem TRIS-HCl und einmal 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Kontrastierung wurden die Schnitte in 1% Osmiumtetroxid (OsO₄, Riedel-de Haën AG, Seelze, Deutschland) in aq. dest. für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmal 5 Minuten Wässern in aq. dest. wurden die Schnitte mit halbesättigtem Uranylacetat (UAc, Merck, Darmstadt, Deutschland) in aq. dest. über Nacht kontrastiert. Die Schnitte wurden gewaschen und für jeweils 5 Minuten in einer Alkoholreihe mit aufsteigender Konzentration (30% Ethanol [EtOH], 50% EtOH, 70% EtOH, 90% EtOH, 96% EtOH und zweimal 5 Minuten in 100% EtOH, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) entwässert. 100% Ethanol wurde mit Propylenoxid (1,2-Propylenoxid, Merck, Darmstadt, Deutschland) im Verhältnis 1:1 gemischt und für 5 Minuten zu dem Gewebe gegeben, danach wurden die Schnitte für zweimal 5 Minuten in purem Propylenoxid und für 30 Minuten in einem Gemisch aus Propylenoxid und Epon (46,2 g Epoxy-Einbettungsmittel, 26,5 g Epoxy-Einbettungsmittel, Härter Dodeceny succinic Anhydrid [DDSA], 25,1 g Epoxy-Einbettungsmittel, Härter Methyl Nadic Anhydrid [MNA], 2,0 g Epon Beschleuniger 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol [DMP] 30, alle Reagenzien von Fluka® Analytical, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,

USA) im Verhältnis 1:1 gelagert. Über Nacht wurden die Schnitte in purem Epon belassen.

Am nächsten Tag wurde das Gewebe mit ein wenig Epon auf Folien platziert, die mit Gewichten beschwert wurden, um eine flache Einbettung der Schnitte zu gewährleisten, und über Nacht bei +60°C ausgehärtet. Im Lichtmikroskop wurden die ausgehärteten Schnitte auf positive Immunreaktionen durchsucht, interessante Stellen markiert, die unter der Stereolupe (Carl Zeiss, Deutschland) ausgeschnitten und mit Epon auf ein Kunststoffblöckchen fixiert über Nacht bei +60°C ausgehärtet wurden.

Um überflüssigen Kunststoff zu entfernen und die Schnittfläche zu verringern, wurden die Gewebestücke im Epon-Block auf eine Fläche von maximal 16 mm² in Form einer stumpfen Pyramide zugetrimmt (Trimmer TM 60, C. Reichert, Wien, Österreich). Am Ultramikrotom (Reichert Ultracut E, Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden Semidünnschnitte (0,75 µm) zur Orientierung im Gewebe angefertigt, mit Toluidinblau angefärbt und im Lichtmikroskop untersucht. Beim Auffinden relevanter Stellen wurden Ultradünnschnitte (70 nm) angefertigt, auf Trägernetzchen gezogen und auf einem Objektträger-Strecktisch bei +60°C getrocknet. Die Schnitte wurden vor der Auswertung mit 2 ml gelösten UAc in aq. dest. kontrastiert (eine Messerspitze UAc, aufgefüllt mit aq. dest., in 2 ml Eppendorf-Hüttchen) und drei- bis viermal mit aq. dest. abgewaschen.

Am Transmissionselektronenmikroskop (EM 902, Zeiss, Jena, Deutschland) wurden die Schnitte ausgewertet und mit einer 2K-Weitwinkel-Seitenflansch-Digitalkamera (TRS, Tröndle, Moorenweis, Deutschland) und Image SP (Version 1.0.29.22) fotografiert. Helligkeit und Kontrast wurden im Adobe Photoshop einheitlich im gesamten Bild angepasst.

3 Ergebnisse

3.1 Detektion einer bisher unbekanntes ChAT-positiven Zelle im Thymus

In ChAT^{BAC}-eGFP-transgenen Mäusen konnten Thymusmarkzellen mit einer grünen Eigenfluoreszenz nachgewiesen werden, die durch immunhistochemische eGFP-Verstärkung noch deutlicher sichtbar wurde. Darunter gab es Zellen mit starker Fluoreszenzintensität und Zellen mit einer schwächeren Markierung. Im weiteren Verlauf der Arbeit bezieht sich die Charakterisierung der ChAT-positiven Thymusmarkzellen nur auf die Gruppe der Zellen mit starker Markierungsintensität und nicht auf die schwächer angefärbten Zellen.

In einigen Thymusanschnitten konnte beobachtet werden, dass ChAT^{BAC}-eGFP-immunreaktive Zellen Netzwerke bilden. Die Zellen lagen einzeln verstreut oder in Grüppchen angeordnet. Diese waren besonders in der äußeren Markzone lokalisiert (Abbildungen 3-I a und b). Es gab dreieckige, rundliche, gestreckte und birnenförmige Zellen (Abbildungen 3-I c-e), die zum Teil seitliche Ausläufer besaßen.

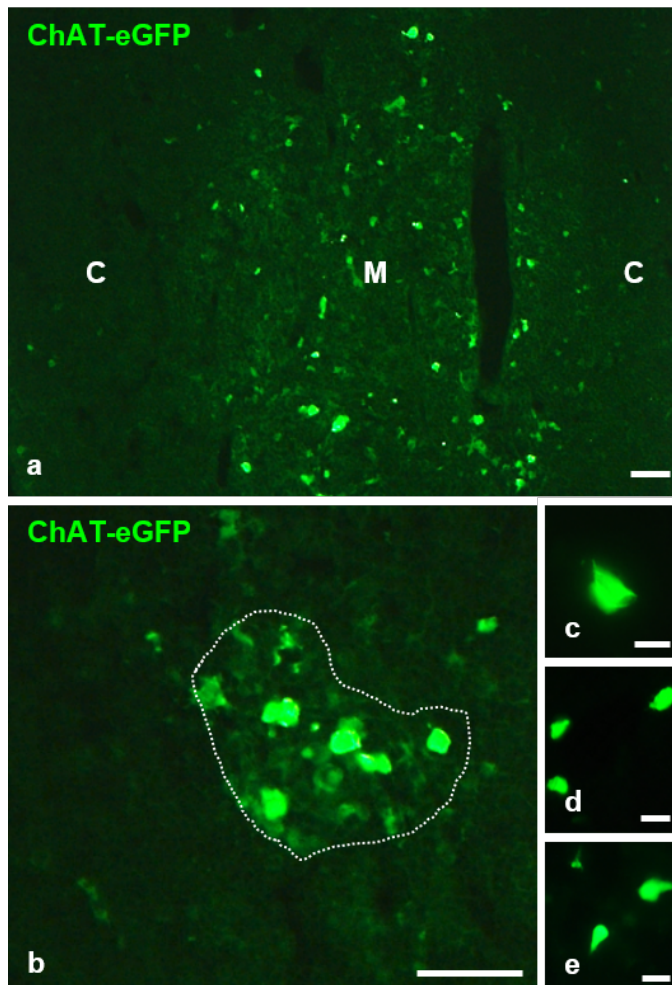


Abbildung 3-I. a, b Markierung cholinergischer Zellen im Thymusepithel mit unterschiedlich starker Immunreaktivität (C: Cortex, M: Medulla). **b** Einige Zellen bilden lose Verbände (gepunktete Linie). **c-e** Dreieckige, runde bis spindelförmig-geformte Zellen mit kurzen, zellulären Ausläufern. **a, b** Männliche Mäuse, 25 Wochen alt. **c** Weibliche Maus, 25 Wochen alt. **d** Männliche Maus, 31 Wochen alt. **e** Männliche Maus, 22 Wochen alt. Maßstab **a, b**: 50 μm , Maßstab **c**: 10 μm , Maßstab **d, e**: 20 μm . Bilder aus Panneck et al., 2014, mit freundlicher Genehmigung von Cell and Tissue Research.

3.2 Cholinerge, medulläre Zellen im Thymus sind Epithelzellen

Das kortikale Epithelnetzwerk war immunreaktiv für CK8 und CK18, an das CK8/CK18-positive, cholinerge Zellen grenzten. Diese Zellen lagen in unmittelbarer Nähe zur Rinden-Mark-Grenze und im Thymusmark. Im äußeren Rindenbereich waren keine immunreaktiven Zellen zu finden (Abbildungen 3-II a und b). Medulläre Thymusepithelzellen und ihr retikuläres Netzwerk wurden durch CK5- und CK14-Antikörper angefärbt. Dazwischen lagen vereinzelt cholinerge Zellen, bei denen keine CK5/CK14-Immunreaktivität gefunden wurde (Abbildungen 3-II c und d).

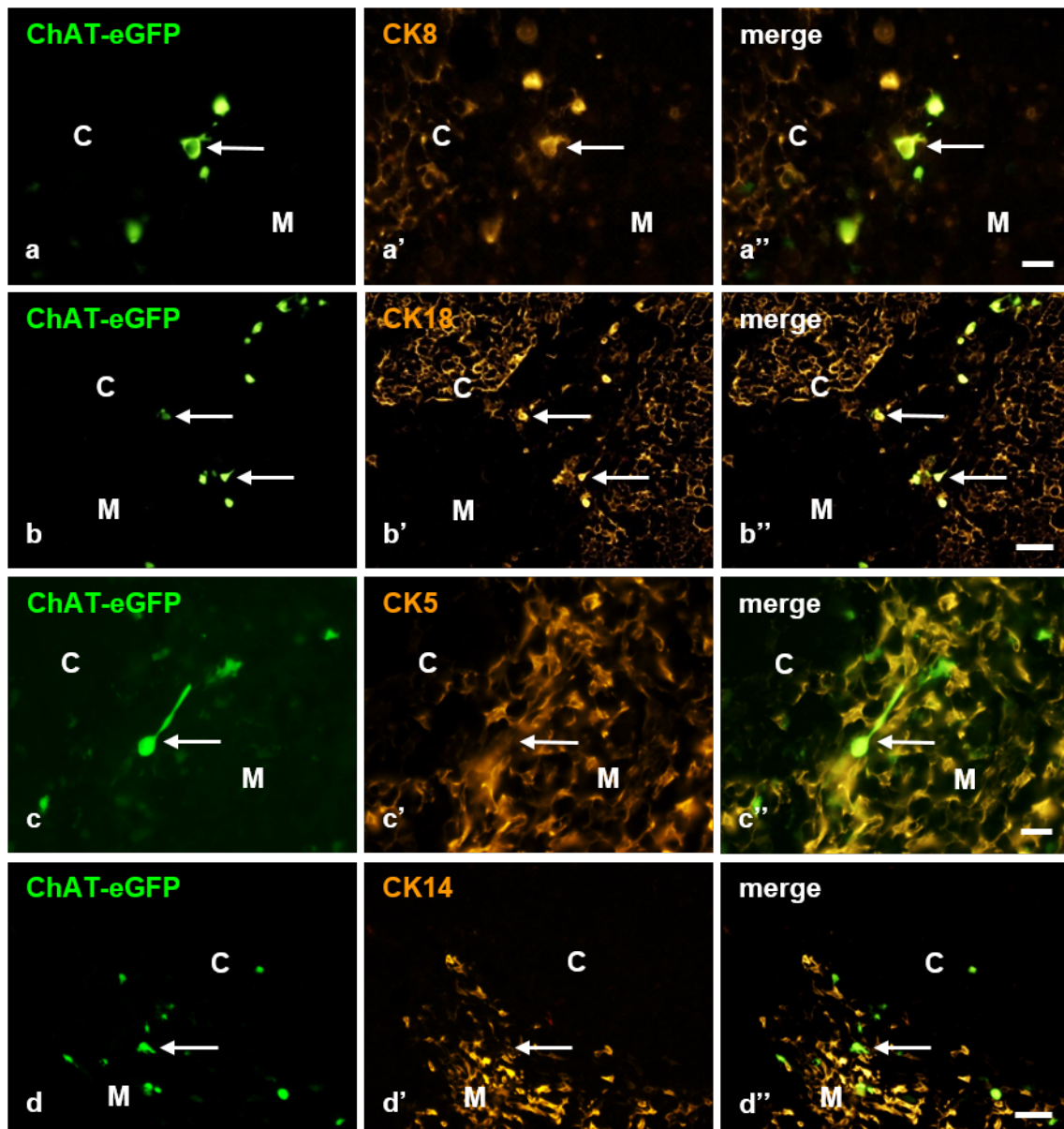


Abbildung 3-II. **a, b** CK8- und CK18-Markierung des kortikalen Netzwerks (C: Cortex, M: Medulla). Cholinerge Zellen (Pfeil) sind ChAT⁺/CK8⁺/CK18⁺-immunreaktiv. **c, d** Markierung des medullären Epithelnetzwerks durch CK5- und CK14-Antikörper. Keine Immunreaktion in ChAT-positiven Zellen nachweisbar. **a-d** Weibliche Maus, 25 Wochen alt. Maßstab **a, c**: 20 μm , Maßstab **b, d**: 50 μm . Bilder aus Panneck et al., 2014, mit freundlicher Genehmigung von Cell and Tissue Research.

3.3 Detektion einer engen räumlichen Assoziation von ChAT-positiven Thymusepithelzellen und CGA-positiven Zellen

Die Doppelimmunfluoreszenzmarkierung gegen CGA und ChAT-eGFP zeigte, dass die Immunmarkierung der beiden Proteine im Thymus nicht kolokalisiert war. Einfach CGA-positive, rundliche Zellen lagen vereinzelt in unmittelbarer Nähe zu Gruppchen medullärer, cholinergere Thymusepithelzellen (Abbildung 3-III a). Bekanntlich können im Thymus CGA-positive Zellen in Hassall-Körperchen vorkommen (Soultanova et al., 2014). Als Positivkontrolle wurden hier Gewebeschnitte der Nebenniere verwendet. Durch CGA-Antikörper markierte Zellen im Nebennierenmark zeigten eine stärkere Intensität der Cy3-Fluoreszenz als CGA-positive Zellen im Thymus. Präganglionäre cholinerge sympathische Nervenfasern durchzogen das gesamte Nebennierenmark und bildeten ein ChAT-positives Nervengeflecht. CGA-Antikörper und Anti-eGFP-Antikörper riefen keine Markierung in der Nebennierenrinde hervor (Abbildung 3-III b).

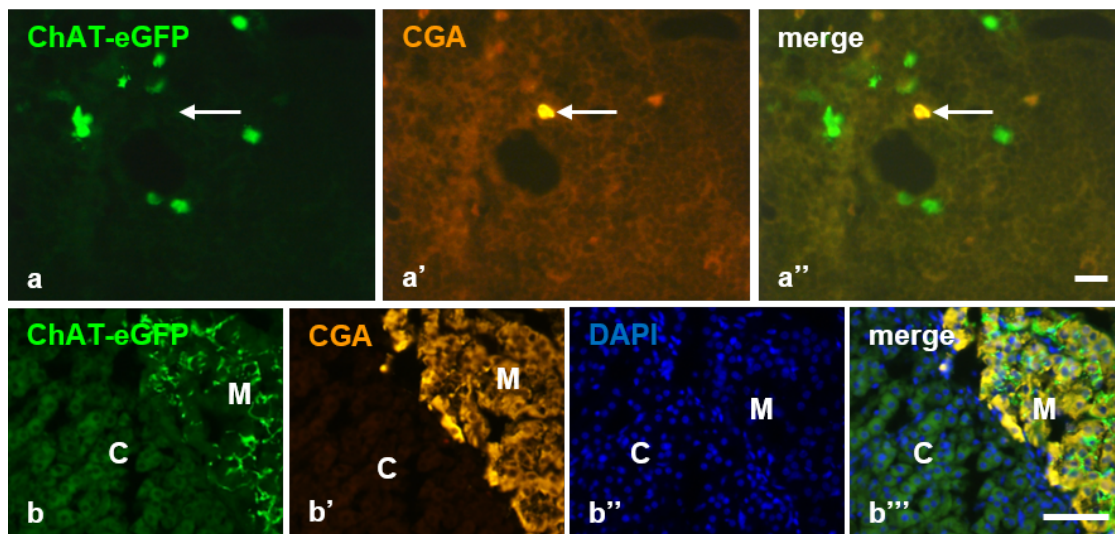


Abbildung 3-III. **a** Thymus. Markiert ist eine einzelne einfach CGA-positive Zelle (Pfeil), daneben liegen mehrere, rundliche, cholinerge Zellen. **b** Die Nebenniere dient als Positivkontrolle (C: Cortex, M: Medulla). Immunhistochemischer Nachweis von ChAT-eGFP-Expression in präganglionären, cholinergen Nervenfasern im Nebennierenmark. Kernmarkierung durch DAPI. **a** Männliche Maus, 25 Wochen alt. **b** Männliche Maus, 22 Wochen alt. Maßstab **a**: 20 μm , Maßstab **b**: 50 μm . **a**: Aus Panneck et al., 2014, mit freundlicher Genehmigung von Cell and Tissue Research.

3.4 Cholinerge Thymusepithelzellen exprimieren bürstenzellcharakteristische Markerproteine

3.4.1 Immunhistochemischer Nachweis der Villin-Immunreaktivität

Cholinerge Thymusepithelzellen waren immunreaktiv für Villin. Die rundlichen bis spindelförmigen Zellen wiesen eine Koexpression von ChAT und Villin auf. Selten fand man einfach Villin-positive Zellen im Thymus, wohingegen einfach ChAT-eGFP-positive Zellen häufiger auftraten (Abbildung 3-IV a). Lichtmikroskopisch fielen viele sehr kleine und kurze Zellausläufer auf, die man an den seitlichen Zellgrenzen sehen konnte (Abbildungen 3-IV b und c). Als Positivkontrolle diente die Trachea, in der solitäre chemosensorische Zellen durch Villin-Antikörper markiert wurden (Abbildung 3-IV d). Die Markierungsintensität hatte im Vergleich zu Immunfluoreszenzversuchen mit anderen Antikörpern im Thymus per se eine schwächere Intensität. Zudem tauchten einige sehr schwach angefärbte Zellen auf, die in der Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt wurden.

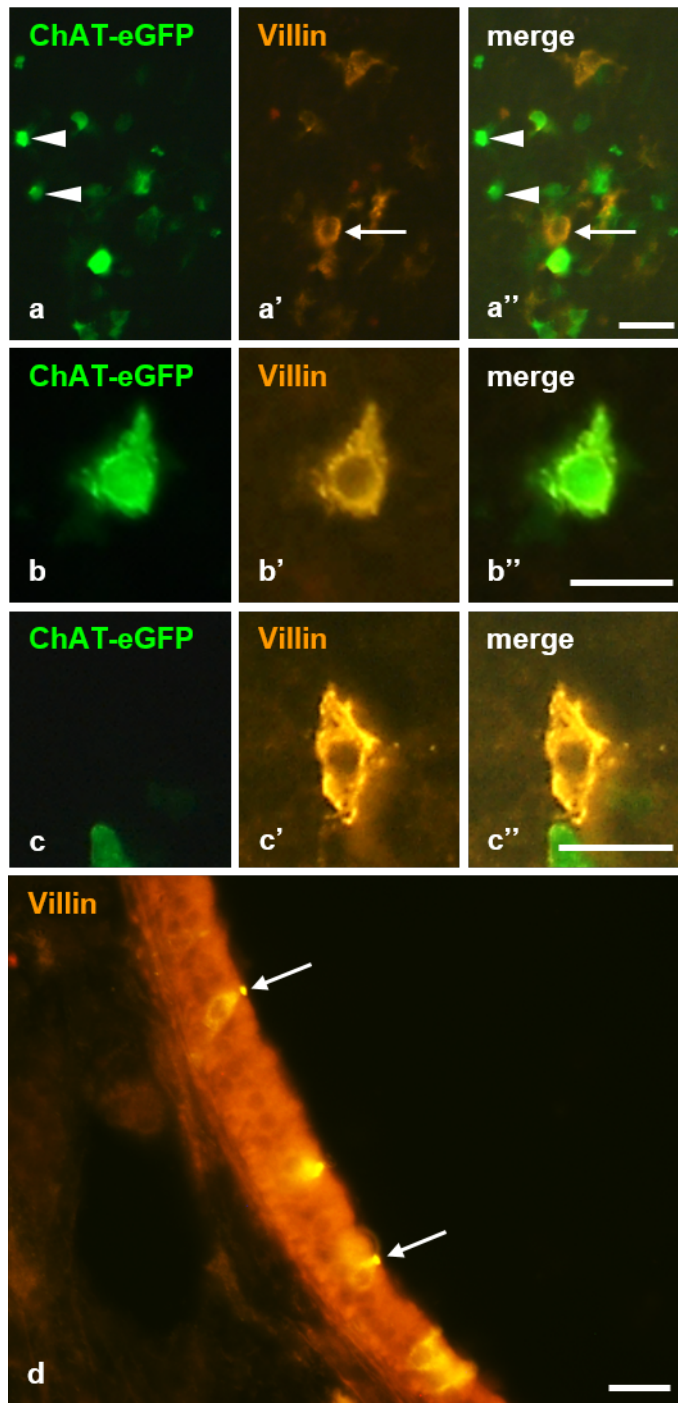


Abbildung 3-IV. **a** Einfach ChAT⁺-Zellen (Pfeilkopf) kommen regelmäßig im Thymus vor. Im Gegensatz dazu stellen einfach Villin-positive Zellen (Pfeil) eine Seltenheit dar. **b** Kolokalisation von ChAT-eGFP und Villin-Immunreaktivität in einer dreieckigen Thymusepithelzelle. **c** Markiert ist eine einfach Villin-positive Zelle im Thymusmark. **d** Villin-immunreaktive Zellen sind in der Positivkontrolle Trachea markiert. Tracheale Bürstenzellen exprimieren verstärkt Villin am apikalen Zellpol (Pfeil), dies entspricht dem lumenwärts gerichteten Mikrovillibüschel. **a, c** Weibliche Maus, 25 Wochen alt. **b, d** Männliche Maus, 31 Wochen alt. Maßstab **a-d**: 20 μ m. **b, c**: Aus Panneck et al., 2014, mit freundlicher Genehmigung von Cell and Tissue Research.

3.4.2 Elektronenmikroskopie: Villin

Durch eine Preembedding-Immunhistochemie gegen Villin markierte Zellen waren bereits lichtmikroskopisch im Thymusmark sichtbar. Das braune DAB-Reaktionsprodukt zeigt die positive Villin-Immunreaktion. Viele kleine, rundliche, tief schwarz markierte Zellen waren über das gesamte Gewebe markiert, wobei es sich um eosinophile Granulozyten handelte, die endogene Peroxidase enthalten (Abbildung 3-V a). Diese waren an den charakteristischen Granula mit kristallinen Einschlüssen identifizierbar (Abbildung 3-V b). Daneben lagen einige schwächer reaktive Zellen mit bräunlicher Färbung, einem birnenförmigen bis dreieckigen Zellkörper und feinen, länglichen Ausläufern (Abbildung 3-V a). Im Einklang mit den lichtmikroskopischen Ergebnissen wurden bei der elektronenmikroskopischen Auswertung der Immunhistochemie laterale Zellausläufer zwischen benachbarten epithelialen Zellen sichtbar. Die Zellen selber wiesen keine synaptischen Vesikel oder Dense-Core-Vesikel auf, allerdings besaßen benachbarte Zellen Dense-Core-Vesikel (Abbildungen 3-VI b und c).

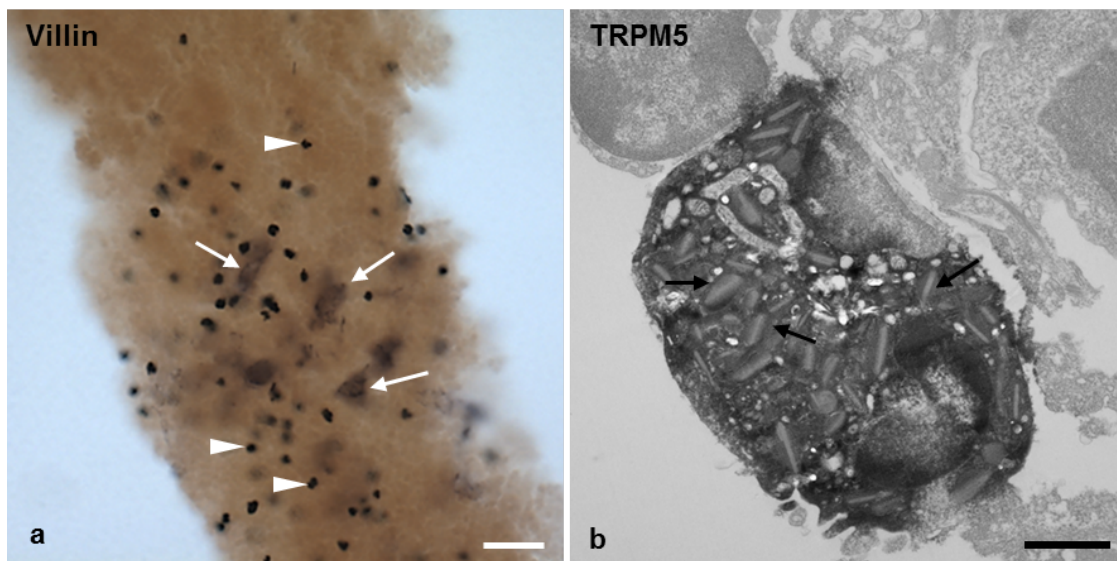


Abbildung 3-V. Preembedding-Immunhistochemie mit Peroxidase-DAB. **a** Villin-Immunreaktivität (Pfeil) in Thymusepithelzellen. Kleine, kugelförmige, tief schwarze eosinophile Granulozyten (Pfeilkopf) liegen im gesamten Schnitt verteilt. **b** Endogene Peroxidaseaktivität eines eosinophilen Granulozyten in einem TRPM5-Preembedding. Granula mit kristallinen Einschlüssen (Pfeil). **a** Weibliche Maus, 25 Wochen. **b** Weibliche Maus. Maßstab **a**: 50 µm, Maßstab **b**: 1 µm

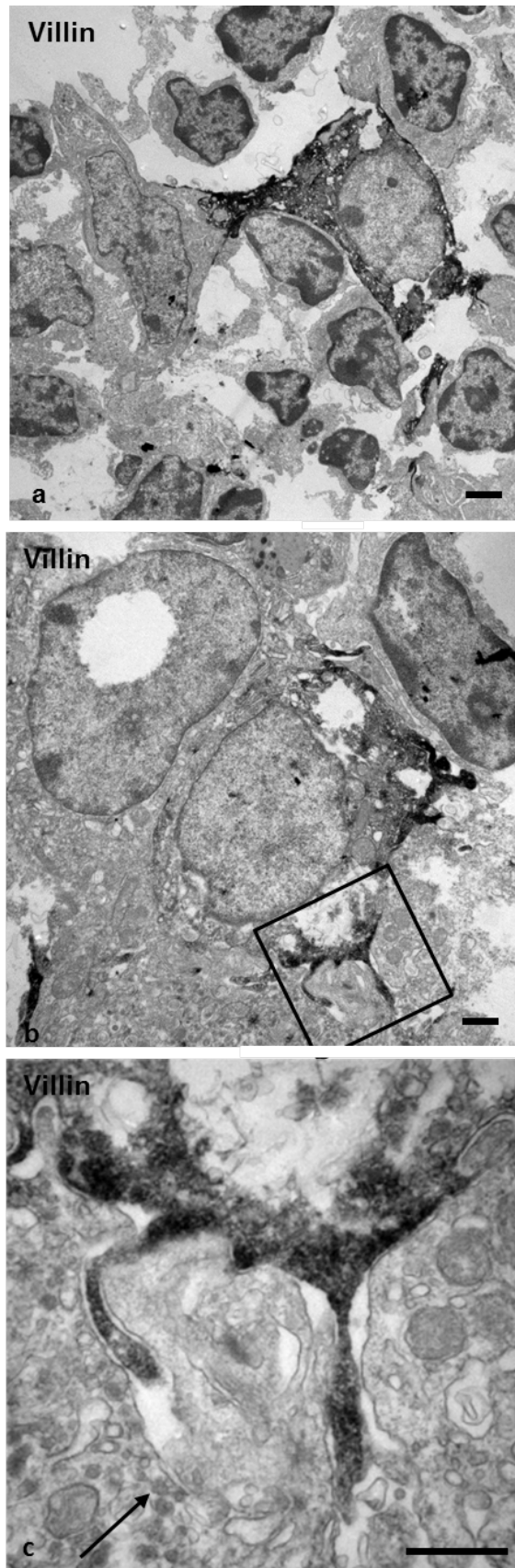


Abbildung 3-VI. Preembedding Villin-Immunreaktivität. **a-c** Im Ultradünnschnitt markierte Villin-positive Zelle besitzt laterale Mikrovilliausläufer. **c** Vergrößerung aus **b**. Dense-Core-Vesikel benachbarter Zellen sichtbar (Pfeil). **a-c** Weibliche Maus, 9 Wo-

chen alt. Maßstab **a, b**: 1 μm , Maßstab **c**: 0,5 μm . **b, c**: Aus Panneck et al., 2014, mit freundlicher Genehmigung von Cell and Tissue Research.

3.4.3 Expression von Komponenten der kanonischen Geschmackskaskade im Thymusmark

$\text{G}\alpha$ -Gustducin-Immunreaktivität fand sich in Thymusepithelzellen immer mit ChAT-eGFP-Immunreaktivität kolokalisiert. In direkter Nachbarschaft zu Gruppchen doppelt positiver Zellen lagen häufig einzelne einfach ChAT-positive Epithelzellen. Einfach $\text{G}\alpha$ -Gustducin-positive Zellen waren im Gegenzug dazu praktisch nicht zu finden (Abbildung 3-VII a). $\text{PLC}_{\beta 2}$ - und TRPM5-Immunreaktivität wurden in medullären, cholinergen Zellen detektiert. Die Zahl der Thymusepithelzellen, bei denen ChAT und $\text{PLC}_{\beta 2}$ /TRPM5-Immunreaktivität kolokalisiert vorlagen, war höher als die Zahl einfach $\text{PLC}_{\beta 2}$ /TRPM5-positiver Zellen (Abbildungen 3-VII b und c). $\text{G}\alpha$ -Gustducin/ $\text{PLC}_{\beta 2}$ -Immunmarkierung war nach Präabsorption des Antikörpers mit seinem korrespondierenden Antigen nicht mehr vorhanden (Abbildungen 3-VII Inset in a und b). Als Positivkontrolle diente für alle drei Antikörper die Zunge mit Anschnitten von Geschmacksknospen (Abbildung 3-VII d-f).

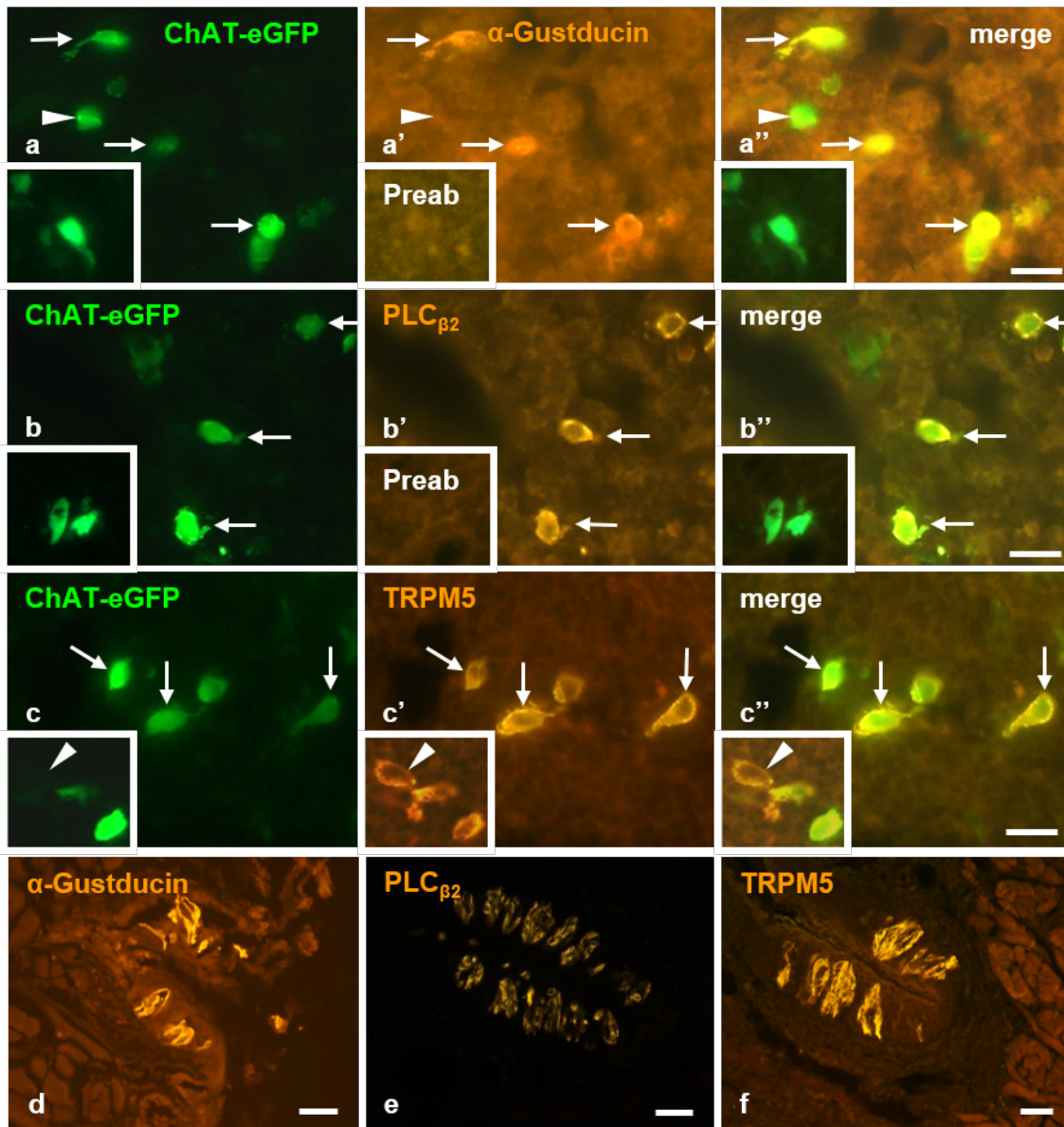


Abbildung 3-VII. Medulläre ChAT-positive Thymusepithelzellen sind immunreaktiv für Komponenten der Geschmackskaskade: **a** Kolokalisation von α -Gustducin und ChAT (Pfeil), daneben eine einfach ChAT-positive Zelle (Pfeilkopf). **b, c** Zellen sind durch PLC _{β 2}/TRPM5 und CHAT-eGFP-Antikörper doppelt positiv markiert. **c** Einfach TRPM5-positive Zelle (Pfeilkopf im Inset). **Inset a, b** Keine Immunreaktion in Präabsorptionskontrollen sichtbar. **d-f** Positivkontrolle Zunge, Geschmacksknospen. **a, b** Männliche Maus, 25 Wochen alt. **Inset in a, b** Männliche Maus, 16 Wochen alt. **c** Männliche Maus, 31 Wochen alt. **Inset c** Weibliche Maus, 25 Wochen alt. **d** Weibliche Maus, 50 Wochen alt. **e, f** Männliche Maus, 31 Wochen alt. Maßstab **a, b, c, f**: 20 μ m, Maßstab **d, e**: 50 μ m. **a, b, c**: Aus Panneck et al., 2014, mit freundlicher Genehmigung von Cell and Tissue Research.

3.4.4 Elektronenmikroskopie: PLC β_2 und TRPM5

Die lichtmikroskopische Auswertung der Preembedding-Immunhistochemie gegen PLC β_2 und TRPM5 zeigte längliche, immunreaktive Zellen mit Zellausläufern an beiden Enden (Abbildungen 3-VIII a und b). Ultrastrukturell wiesen diese Zellen eine intensive Markierung auf. Je nach Schnittebene konnte man Zellen mit enorm in die Länge gestreckten Zellkörpern oder auch kleineren, birnenförmigen Zellkörpern sehen (Abbildungen 3-VIII a und b).

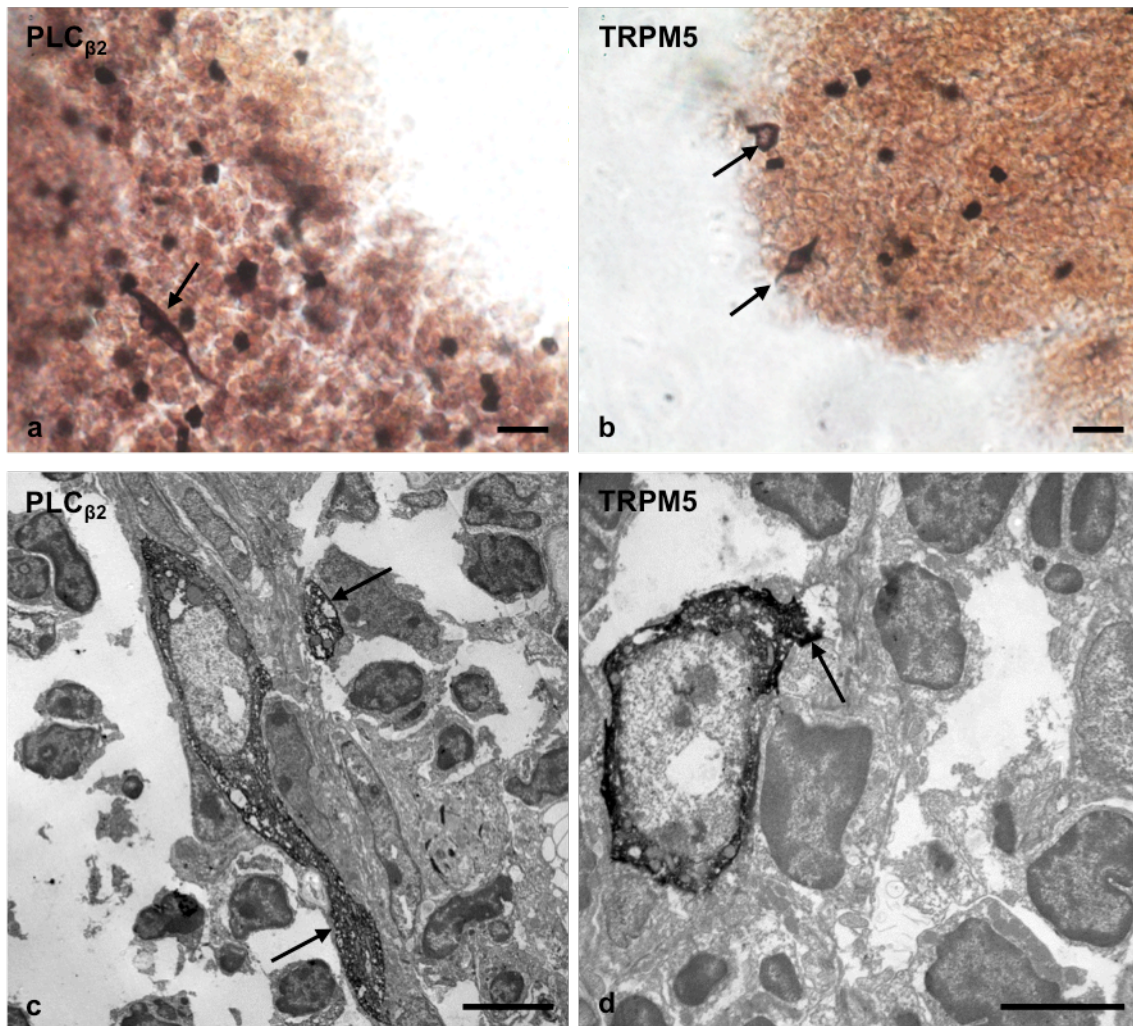


Abbildung 3-VIII. a, b PLC β_2 /TRPM5-Immunhistochemie, Peroxidase-Reaktion, flach eingebetteter 40 μm -Kryostatschnitt vom fixierten Thymus. Immunreaktive Epithelzellen mit Pfeil markiert. c, d Ultrastrukturelle Darstellung positiv markierter Zellen gegen PLC β_2 und TRPM5. Zellausläufer (Pfeil). a-d Weibliche Maus. 31 Wochen alt. Maßstab a, b: 20 μm , Maßstab c, d: 5 μm . c, d: Aus Panneck et al., 2014, mit freundlicher Genehmigung von Cell and Tissue Research.

3.5 Lagebeziehung cholinergischer Zellen zu Nervenfasern

Doppelimmunfluoreszenzmarkierung von CGRP und ChAT-eGFP zeigten, dass cholinerge Thymusepithelzellen nicht direkt von CGRP-immunreaktiven, sensorischen Nervenfasern innerviert werden. Der CGRP-Antikörper markierte Nervenfasern, die um Blutgefäße lokalisiert waren oder Thymussepten durchzogen, ebenso wie schwach CGRP-immunreaktive Zellen in Rinde und Mark. Eine Assoziation von CGRP-immunreaktiven Nervenfasern und ChAT-eGFP-positiven Zellen war nicht erkennbar. Als Positivkontrolle diente das Rückenmark (Abbildungen 3-IX a und c). Im Thymus wurde mit dem PGP9.5-Antikörper eine subkapsuläre und perivaskuläre Innervation festgestellt. Im Darm wurden mit dem Antikörper Nervenfasern des enterischen Nervensystems markiert (Abbildungen 3-IX b und d).

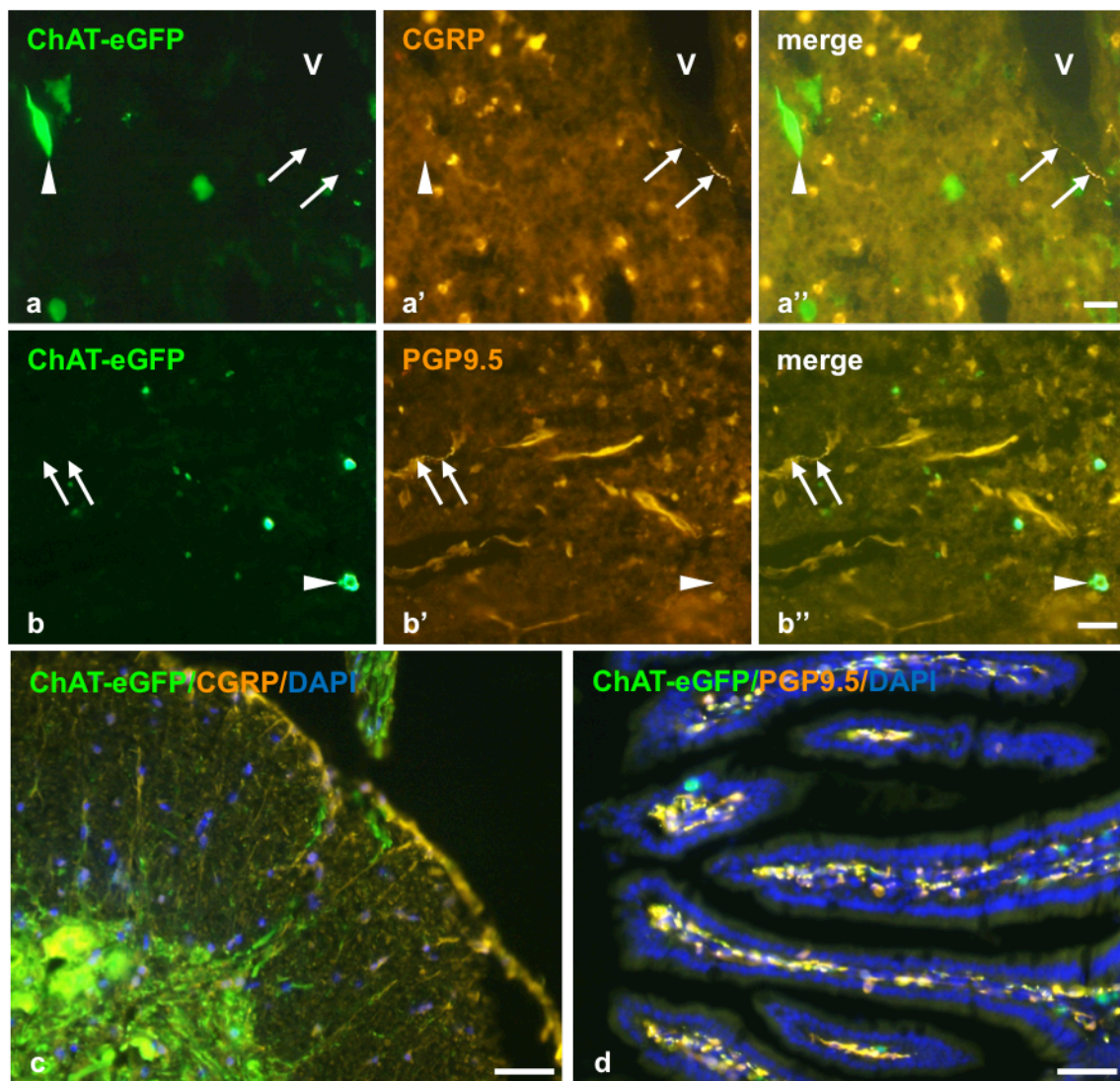


Abbildung 3-IX. a Im Thymus liegen CGRP-positive Nervenfasern (Pfeil) in direkter Beziehung zu Blutgefäßen (V). Cholinerge Zellen (Pfeilkopf) haben keinen direkten Kontakt zu Nervenfasern. **b** Der PGP9.5-Antikörper markiert Nervengeflechte in Thymussepten und um Blutgefäße. ChAT-positive Zellen (Pfeilkopf) liegen weit entfernt von PGP9.5-positiven Nervenfasern (Pfeil). **c** Positivkontrolle Rückenmark mit ChAT-positiven Neuronen in der grauen Substanz des Vorderhorns und CGRP-immunreaktive Axonen in der weißen Substanz. Die DNA in den Nuklei wurde durch DAPI blau markiert. **d** Positivkontrolle Dünndarm. PGP9.5-Immunreaktive Nervenfasern des enterischen Nervensystems. Kernmarkierung durch DAPI. **a** Weibliche Maus, 25 Wochen alt. **b** Weibliche Maus, 17 Wochen. **c, d**: Männliche Maus, 31 Wochen alt. Maßstab **a**: 20 µm, Maßstab **b, c, d**: 50 µm. **a, b**: Aus Panneck et al., 2014, mit freundlicher Genehmigung von Cell and Tissue Research.

3.6 Cholinozeptive Zellen im Thymusmark

Chrna3^{BAC}-eGFP-Mäuse besaßen grün fluoreszierende Zellen im Thymusmark und an der Rinden-Mark-Grenze, die durch eine immunhistochemische Verstärkung von eGFP noch deutlicher hervortraten. Die Zellen lagen meist in kleinen Grüppchen zusammen, kamen aber auch vereinzelt vor. Im Bereich der Thymusrinde gab es keine Zellen, die die $\alpha 3$ -Untereinheit des nAChRs exprimierten. Der Verlauf von Nervenfasern, die innerhalb der Septen von der Kapsel in das Thymusinnere zogen oder um Gefäße lokalisiert waren, wurde bei den Chrna3^{BAC}-eGFP-Mäusen sichtbar. Neben den perivaskulären Axonen lagen im Thymusmark keine weiteren $\alpha 3$ -positiven Nervenfasern vor (Abbildungen 3-X a bis d).

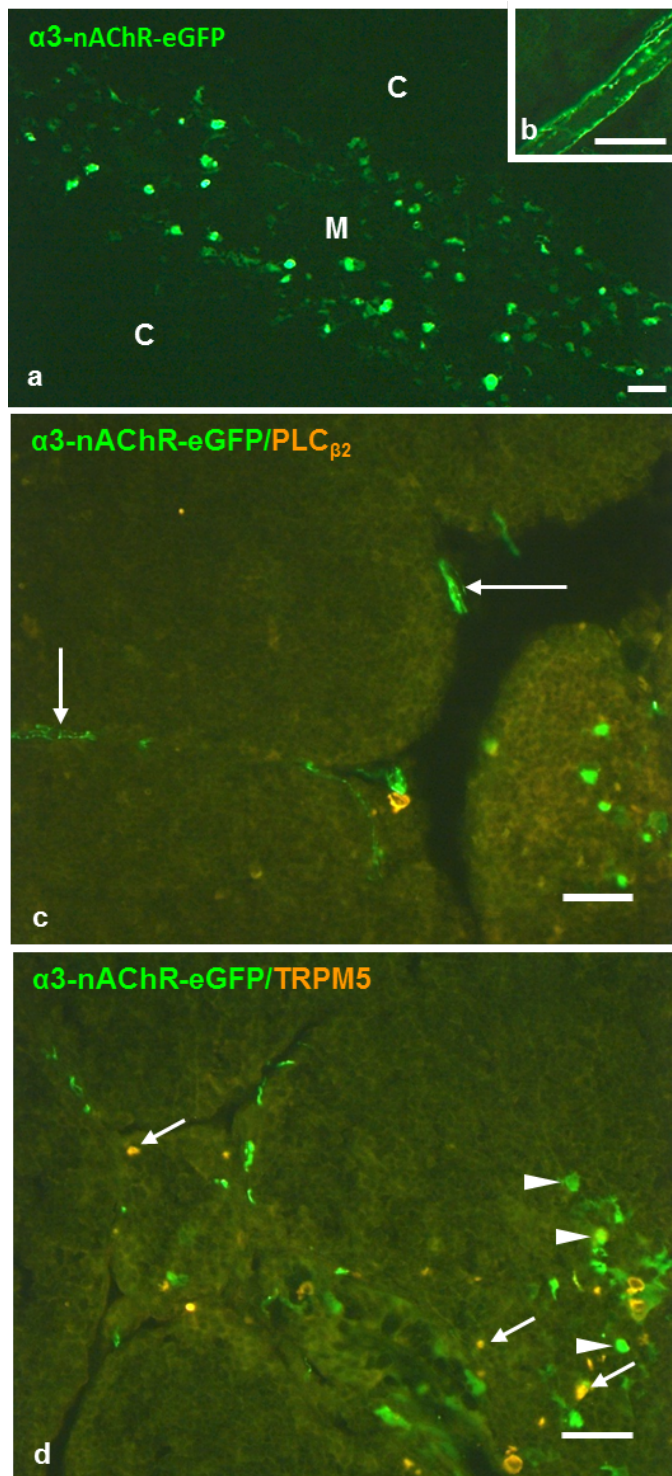


Abbildung 3-X. **a** nAChR α 3-positive Zellen im Thymusmark (C: Cortex, M: Medulla). **b** Positive perivaskuläre Nervenfasern umwickeln eine kleine Septenarterie. **c** Markiert sind Nervenfasern in den Thymussepten und der -kapsel (Pfeil). **d** Chemosensitive Bürstenzellen durch TRPM5 markiert (Pfeil), und α 3-nAChR-eGFP-immunreaktive Zellen (Pfeilköpfe) stellen zwei verschiedene Zellentitäten dar. **a, b, c, d** Männliche Maus, 6 Wochen alt. Maßstab **a-d**: 50 μ m. **a, b**: Aus Panneck et al., 2014, mit freundlicher Genehmigung von Cell and Tissue Research.

Um die zuvor beschriebene cholinerge, medulläre Thymusepithelzelle im $\text{Chrna3}^{\text{BAC}}$ -eGFP-Mausstamm zu identifizieren, wurden immunhistochemische Marker für Bürstenzellen – Antikörper gegen Villin und Komponenten der Geschmackskaskade – verwendet. Dadurch wurde eine Assoziation chemosensorischer Zellen und nAChR α 3-positiver Epithelzellen im Thymus sichtbar. Doppelimmunfluoreszenzmarkierungen gegen Villin und eGFP zeigten, dass nAChR- α 3-positive Zellen unmittelbar neben Villin-immunreaktiven Zellen lagen. Eine Koexpression bestand dabei nicht (Abbildung 3-XI a). Ein ähnlicher Befund tauchte bei Antikörpermarkierungen gegen eGFP und Elemente der gustatorischen Signalkaskade auf, bei denen einfach G α -Gustducin/PLC β 2- oder TRPM5-positive Zellen markiert waren, die entweder in direktem Kontakt (Abbildungen 3-XI b und d), oder in Nachbarschaft (Abbildung 3-XI c) zu cholinozeptiven Zellen lagen. Die oben beschriebenen Doppelimmunfluoreszenzmarkierungen zeigen, dass die chemosensorischen Thymusepithelzellen mit den nAChR α 3-positiven Zellen kleine Grüppchen bildeten, die zwar in unmittelbarem Kontakt zueinander standen, aber trotzdem jeweils eigene Zellpopulationen darstellten. Ein Kontakt nAChR α 3-positiver Nervenfasern und cholinergen Zellen wurde nicht gefunden (Abbildungen 3-XI a bis d). Als Positivkontrolle wurden Schnitte des Darms, der Zunge und der Trachea mitgeführt (Abbildungen 3-XI e bis g). Im Darm fluoreszierte der Bürstensaum aus dicht gepackten Mikrovilli markiert durch den Cy3-konjugierten Anti-Villin-Antikörper. Die Zellkerne der Enterozyten wurden durch DAPI markiert (Abbildung 3-XI e). Die zwiebel-förmigen Geschmacksknospen der Zunge zeigten eine Immunreaktivität gegen G α -Gustducin, markiert mit einem Anti-eGFP-Antikörper wurden umliegende Nervenfasern sichtbar (Abbildung 3-XI f). Bürstenzellen der Trachea, die regulatorisch die Atmung beeinflussen können, dienen als Positivkontrolle zum Nachweis des Enzyms PLC β 2 (Abbildung 3-XI g).

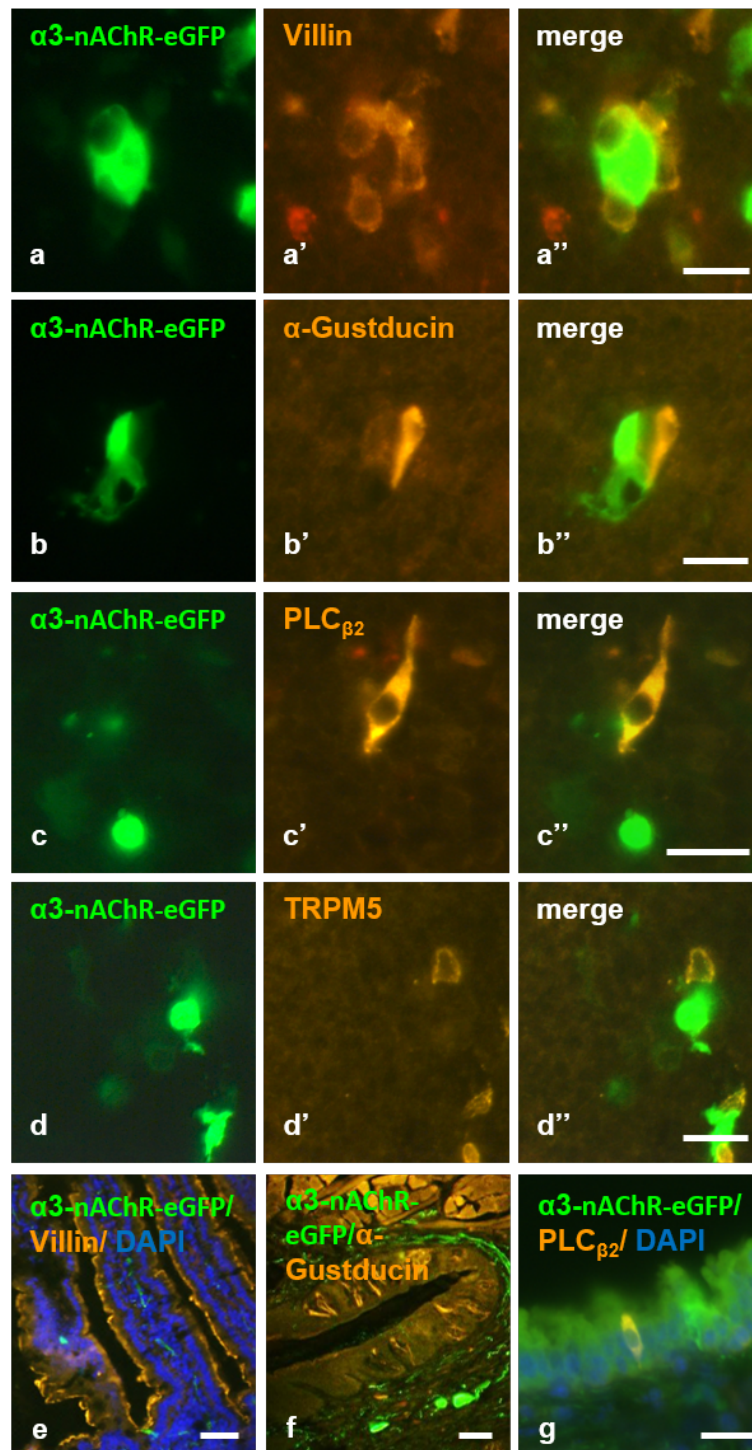


Abbildung 3-XI. **a-d** nAChR α 3-eGFP-positive Zellen liegen neben Villin/ α -Gustducin/PLC β ₂/TRPM5-positiven Zellen. **e, f, g** Darm, Zunge und Trachea als Positivkontrolle mitgeführt. **e** Villin-positive Mikrovilli bilden den Bürstensaum. Kernmarkierung durch DAPI. **f** Geschmacksknospen der Zunge sind immunreaktiv für α -Gustducin. **g** Tracheale Bürstenzelle durch PLC β ₂-Antikörper markiert. Die Nuklei der Zellen des respiratorischen Epithels wurden durch DAPI angefärbt. **a, b** Männliche Maus, 14 Wochen alt. **c, d** Weibliche Maus, 8 Wochen alt. **e-g** Männliche Maus, 11-14 Wochen alt. Maßstab **a-d, g**: 20 μ m, Maßstab **e, f**: 50 μ m. **a, b, c, d**: Aus Panneck et al., 2014, mit freundlicher Genehmigung von Cell and Tissue Research.

4 Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit ist eine bislang unbekannte cholinerge Zelle, die im Thymusmark von ChAT^{BAC}-eGFP-transgenen Mäuse detektiert wurde (Panneck et al., 2014). Sie besitzt phänotypische Gemeinsamkeiten mit Bürstenzellen aus dem Gastrointestinal- und Respirationstrakt. Im Verlauf der Experimente wurde die neuartige Zelle durch die Bestimmung der Lokalisation, des Zelltyps und potenzieller morphologischer Gemeinsamkeiten mit Bürstenzellen, wie etwa dem typischen Mikrovillisaum, genauer untersucht. Da Bürstenzellen über charakteristische Mechanismen der chemosensorischen Wahrnehmung gustatorische Stimuli erkennen, wurde die Immunreaktivität der cholinergen Thymuszellen für Elemente der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade – G α -gustducin, PLC β ₂, und TRPM5 – überprüft, um Aussagen über die mögliche Funktion der Zelle zu treffen.

4.1 Ein neuer cholinerges Zelltyp im Thymusmark

In immunhistochemischen Untersuchungen an ChAT^{BAC}-eGFP Knock-in Mäusen wurden cholinerge Zellen im Thymus nachgewiesen. Durch radioaktive in-situ-Hybridisierung an Wildtyp-Mäusen für ChAT-mRNA (Abbildung 4-I a) bestätigte Burkhard Schütz, Marburg, die ChAT-Expression in diesen Zellen (Panneck et al., 2014). Bei dem in dieser Studie verwendeten Mausstamm wurde die Expression von ChAT-eGFP bereits in SCC anderer Organe nachgewiesen (Deckmann et al., 2014; Krasteva et al., 2011; Krasteva et al., 2012b; Ogura et al., 2010; Saunders et al., 2014; Wiederhold et al., 2015). Im oberen Respirationstrakt und der Trachea ist ACh einer der wichtigsten Transmitter, der von SCC freigesetzt wird. ACh wird neben ATP und verschiedenen anderen Transmittern von sensorischen Zellen synthetisiert und sezerniert, wodurch eine Signalweitergabe nach Stimulation durch Geschmacksstoffe eingeleitet wird (Roper, 2013).

Das Vorkommen cholinerges Zellen im Thymus war auf das Thymusmark – besonders die äußere Markzone und die Rinden-Mark-Grenze – beschränkt. Es gab Unterschiede in der Intensität der Immunfluoreszenz und im Verteilungsmuster der ChAT-positiven Zellen, da sie nicht nur einzeln verstreut, sondern auch in Grüppchen verteilt lagen. Die Zellform variierte stark von rundlichen bis hin zu dreieckigen, gestreckten oder birnen-

förmigen Zellkörpern, die zum Teil seitliche Zellausläufer bildeten. Tracheale Bürstenzellen sind birnenförmig oder besitzen eine lang gestreckte, zylindrische Form (Krasteva et al., 2011). In der Tuba auditiva besitzen die Zellen ebenfalls die typische Birnenform (Krasteva et al., 2012b), urethrale Zellen variieren von flaschenförmigen Zellkörpern zu lang gestreckten, schlanken Zellen mit feinen, lumenwärts gerichteten Ausläufern (Deckmann et al., 2014). Zellen der Konjunktiva sind spindel-, oder birnenförmig mit einem apikalen oder basalen Zellausläufer (Wiederhold et al., 2015), wohingegen Bürstenzellen in der Alveolarregion der Ratte einen eher kugeligen Körper aufweisen (Hijjiya et al., 1977). Aufgrund einer großen morphologischen Ähnlichkeit der Zellkörper ChAT-positiver Thymuszellen zu chemosensorischen Zellen anderer Organe wurde im Verlauf der Untersuchungen der Fokus auf weitere Gemeinsamkeiten der beiden Zellen gelegt.

In ergänzenden Untersuchungen von Burkhard Schütz mit Immunmarkierung gegen den CD3-Rezeptor, der zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor den TRC-CD3-Komplex bildet und auf der Zelloberfläche von Thymozyten und reifen T-Lymphozyten exprimiert wird, konnten die cholinergen Zellen als nicht-lymphatische Zellentität identifiziert werden, da ChAT-eGFP und CD3 nicht kolokalisiert vorlagen (Panneck et al., 2014) (Abbildung 4-I b).

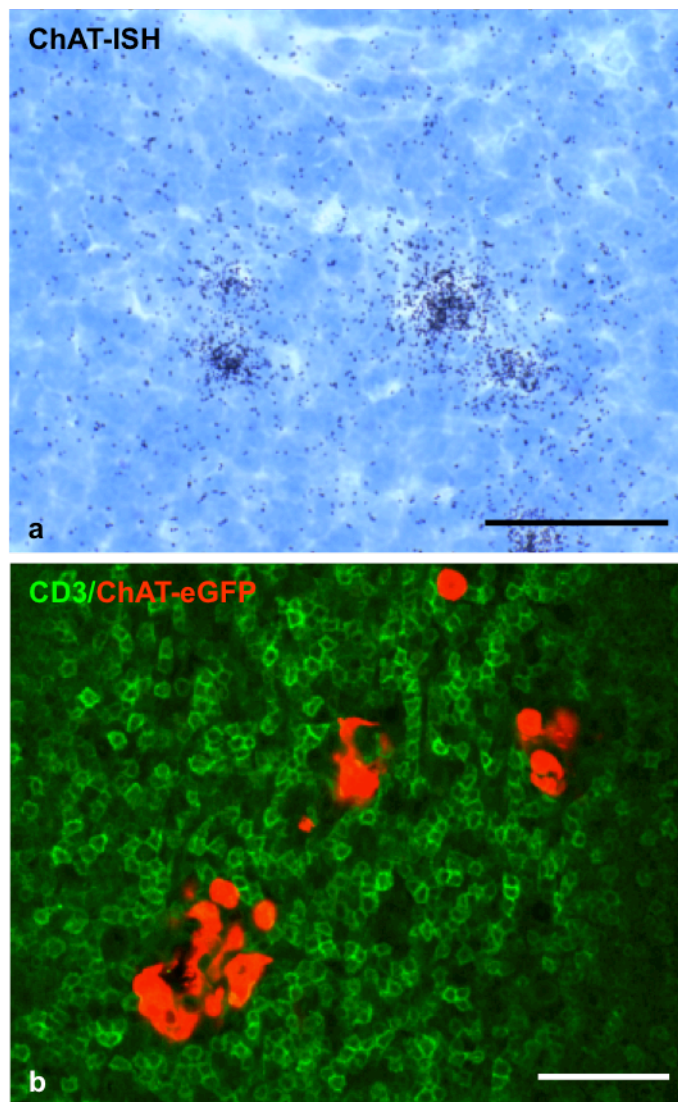


Abbildung 4-I. **a** Radioaktive in-situ-Hybridisierung (ISH) für ChATmRNA. Im Thymusmark einer Wildtyp-Maus liegen positiv markierte Zellen. **b** Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. ChAT-eGFP-Fluoreszenz durch eGFP-Markierung verstärkt in Rot dargestellt, CD3 markiert Thymozyten. ChAT-eGFP und CD3 liegen nicht kolokalisiert vor. **a** Männliche Maus, 17 Wochen alt. **b** Männliche Maus, 19 Wochen. Maßstab **a, b**: 50 µm. Bilder von Prof. Dr. Burkhard Schütz, Marburg, aus Panneck et al., 2014, mit freundlicher Genehmigung von Cell and Tissue Research.

4.2 Ein neuer spezialisierter Epithelzelltyp im Thymusmark

Der CK-Gehalt ChAT-positiver Zellen des Thymusmarks und die typische Ultrastruktur kennzeichnen die Zelle als Teil des Thymusepithels. Die verschiedenen Epithelzelltypen exprimieren Intermediärfilamente mit einer unterschiedlichen CK-Zusammensetzung, abhängig von der Lage der Zellen im Thymus. Obwohl die cholinerge Thymusepithelzelle im Mark liegt, enthält sie nicht die für medulläre Epithelzellen

charakteristischen CK. Medulläre, sternförmige Thymusepithelzellen und ihr retikuläres Netzwerk sind immunreaktiv für CK5 und CK14 (Lee et al., 2011). Interessanterweise exprimiert die im Thymusmark liegende ChAT-positive Zelle CK8 und CK18, die eigentlich kortikalen Epithelzellen eigen sind und nur bei einer kleinen Minderheit medullärer Zellen gefunden werden können (Klug et al., 1998; Lee et al., 2011; Liepinsh et al., 2009; Savino and Dardenne, 1988; Shezen et al., 1995). Die Mehrzahl der medullären, cholinergen Thymusepithelzellen liegt entlang der Rinden-Mark-Grenze. Eine im Thymusmark liegende Subpopulation epithelialer Zellen ist CK5- und CK14-negativ, zeigt aber eine positive Immunreaktion für CK8 und CK18. Sie werden als globuläre Zellen von den sternförmigen medullären Thymusepithelzellen unterschieden (Klug et al., 1998; Lee et al., 2011). Bestimmte CK können nicht nur zur Identifikation von Epithelzellen herangezogen werden, sondern werden in bestimmten Epithelverbänden exklusiv von Bürstenzellen exprimiert. Dies macht man sich zunutze, um anhand bestimmter CK-Isoformen chemosensorische Zellen von umliegenden Epithelzellen abzugrenzen. CK18 dient als Markermolekül beim Nachweis oropharyngealer Geschmackszellen und als Marker verschiedener chemosensorischer Oberflächenepithelien, da es Bündel von Intermediärfilamenten im Zytoplasma der Bürstenzellen markiert (Akimori et al., 2011; Asan and Drenckhahn, 2005; Höfer et al., 2000; Kasper et al., 1993; Knapp et al., 1995). Das in cholinergen Thymusepithelzellen lokalisierte CK8 wird auch von SCC der Konjunktiva exprimiert (Wiederhold et al., 2015). Andererseits besitzen andere Epithelzellen ebenso CK8, sodass diese Isoform nicht als spezifischer Bürstenzellmarker genutzt werden kann. Während der Embryogenese von Mäusen werden CK8 und CK18 als erste Intermediärfilamente in einfachen Epithelien exprimiert (Baribault et al., 1993).

4.3 Neuroendokrine Zellen und ihre Gemeinsamkeiten mit Bürstenzellen

SCC sind neuroendokrinen Zellen strukturell und funktionell sehr ähnlich. SCC und neuroendokrine Zellen wirken beide chemosensorisch (Breer et al., 2012). Das diffuse neuroendokrine System bezeichnet die Gesamtheit der in den verschiedensten Organen des Körpers lokalisierten neuroendokrinen Zellen. Die Zellen ähneln Neuronen und produzieren und sezernieren Monoamine, Peptide und Proteine. Sie besitzen, wie Bürstenzellen, einen dichten Mikrovillisaum. Die Mikrovilli neuroendokriner Zellen des Respirationstrakts sind, anders als bei Bürstenzellen, weniger parallel ausgerichtet und in ihrer Länge und Anzahl variabel (Ericson et al., 1972; Pavelka et al., 1976; Taira and

Shibasaki, 1978). Neuroendokrine Zellen haben oft einen breiten Apex und kürzere Mikrovilli ohne terminales Netz (Finger et al., 2003). Bei neuroendokrinen Zellen des Magens unterscheidet man zwei verschiedene Bautypen: einen offenen Typ, dessen Mikrovilli Verbindung zum Magenlumen haben, und einen geschlossenen Typ ohne Verbindung. Histologisches Differenzierungsmerkmal von anderen Zellarten sind Dense-Core-Vesikel, elektronendichte Granula im basalen Teil der Zellen (Ericson et al., 1972; Taira and Shibasaki, 1978). Entarten neuroendokrine Zellen, können sich Tumore aus ihnen entwickeln, die auch im Thymus liegen können (Herbst et al., 1987). Mithilfe eines histopathologischen Nachweises typischer Markermoleküle des Ursprungsgewebes können neuroendokrine Tumoren diagnostiziert werden. Als immunhistochemische Marker für Neurone und neuroendokrine Zellen werden in der Diagnostik häufig CGA oder PGP9.5 verwendet, wobei CGA ebenfalls als Marker zur Identifikation neuroendokriner Tumore genutzt werden kann (Taupenot et al., 2003; Weiler et al., 1988). CGA wurde erstmals in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks identifiziert und ist auch ein sekretorisches Protein endokriner Zellen, zum Beispiel in der Nebenschilddrüse. Es gehört zu den neuroendokrinen Proteinen und kommt in sekretorischen Vesikeln von Neuronen und neuroendokrinen Zellen vor. Außer von endokrinen Zellen wird das saure Protein von Keratinozyten des Stratum granulosum der Epidermis exprimiert (Radek et al., 2008), die eine große Ähnlichkeit zu Hassall-Körperchen des Thymus besitzen. Daher markiert CGA im Thymus gleichermaßen eine Subpopulation terminal differenzierter medullärer Epithelzellen, die Hassall-Körperchen bilden (Soultanova et al., 2014). Catestatin entsteht bei der proteolytischen Spaltung von CGA. Es wirkt als nikotinisch-cholinerg Antagonist auf die Katecholaminsekretion (Mahata et al., 1997; Mahata et al., 1999), als antimikrobielles Peptid in der Epidermis (Radek et al., 2008) und es verhindert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Makrophagen (Rabbi et al., 2014). In dieser Studie durchgeführte Doppelimmunfluoreszenzversuche gegen CGA und ChAT-eGFP zeigten, dass cholinerge, medulläre Thymusepithelzellen keine neuroendokrinen Zellen sind. Es handelt sich bei den CGA- oder ChAT-positiven Zellen um einen jeweils verschiedenen Zelltyp. Vereinzelt lagen CGA-immunreaktive Zellen in direkter Nähe zu ChAT-positiven Thymusepithelzellen oder assoziiert mit Hassall-Körperchen (Ginda et al., 1996; Raica et al., 2006). PGP9.5 dient als Marker für Neurone (Doran et al., 1983), Zellen des neuroendokrinen Systems (Lauweryns and Van Rans, 1988; Thompson et al., 1983) und neuroendokrine Tumore (Rode et al., 1985). Das zytoplasmatische PGP9.5 ist ein deubiquitinierendes Enzym, das über die Ubiquitin carboxy-terminal Hydrolase L1 Ubiquitin von Proteinen oder Molekülen abspaltet. Im Thymus reagiert eine Untergruppe kortikaler Thymusepithelzellen immunreaktiv auf PGP9.5 (Brelinska et al., 2000). In dieser Arbeit wurde durch Immun-

fluoreszenzmarkierung gegen PGP9.5 die subkapsuläre und perivaskuläre Innervation des Thymus dargestellt.

4.4 Chemosensorik im Thymus

4.4.1 Villin-Immunreaktivität

Sowohl das Auftreten lateraler Zellausläufer als auch die Immunreaktivität für Villin erhärten die Vermutung, dass die cholinergen Epithelzellen im Thymusmark zur Gattung der Bürstenzellen gehören. Ein Nachweis von Villin-Immunreaktivität ist ein Indikator für Bürstenzellen (Höfer and Drenckhahn, 1992). Villin vernetzt Aktinfilamente durch Querbrückenbildung zu Bündeln, die als Binnengerüst von Mikrovilli fungieren. Die vernetzten Aktinfilamente strahlen über die Zellausläufer hinaus in das Zytoplasma der Zellen ein, wo sie im terminalen Netz verankert werden. Immunfluoreszenzversuche im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass cholinerge Thymusepithelzellen gehäuft Villin und ChAT koexprimieren. Eine seltene Ausnahme stellten dagegen einfach Villin-positive Zellen dar. Bislang wurden Bürstenzellen anhand ihres apikalen Villin-positiven Bürstensaums charakterisiert, jedoch zeigen Bürstenzellen verschiedener Herkunft sehr unterschiedliche Ausprägungen dieser Ausläufer. Bürstenzellen der Tuba auditiva sind zwar Villin-positiv, besitzen aber keinen typischen Mikrovillibüschel (Krasteva et al., 2012b), nasale Bürstenzellen haben nur wenige, dicht gepackte, unverzweigte Mikrovilli (Monteiro-Riviere and Popp, 1984). Cholinerge, chemosensorische Thymusepithelzellen besitzen, wie oben erwähnt, keinen „klassischen“ Bürstensaum. Ein solcher ist eine apikale Differenzierung polarisierter Epithelzellen. Thymusepithelzellen weisen keine apikobasale Polarisierung auf, weshalb gebündelte Mikrovilli nicht zur Ausbildung kommen können. Sie weisen allerdings sowohl lichtmikroskopisch, als auch ultrastrukturell laterale Villin-positive Zellausläufer auf. Laterale Mikrovilliausläufer sind auch von Bürstenzellen des Dünndarms bekannt (Höfer and Drenckhahn, 1992). Benzençon und Mitarbeiter beobachteten in ihrer Studie aus dem Jahr 2008, dass eGFP-positive Bürstenzellen des Gastrointestinaltrakts Advillin exprimieren. Advillin gehört zur Gelsolin/Villin-Familie und zählt zu den Aktin-bindenden Proteinen. Es weist eine 60-75%-genetische Übereinstimmung mit Villin auf (Benzençon et al., 2008; Marks et al., 1998; Ravenall et al., 2002). Advillin scheint eine wichtige Rolle in der Ziliogenese zu spielen und an der Regulation zytoskelettaler Organisationsvorgänge beteiligt zu

sein (Silacci et al., 2004). Möglicherweise handelt es sich bei der Immunreaktivität von Bürstenzellen mit Villin eigentlich um eine Kreuzreaktion mit dem Protein Advillin. Advillin stellt somit vielleicht ein spezifischeres Bürstenzellmarkerprotein als Villin dar, das zur Identifikation von allen Formen von Zellausläufern genutzt werden kann (Bezencon et al., 2008).

4.4.2 Geschmackskaskade

Neuere Erkenntnisse indizieren, dass Geschmacksrezeptoren nicht nur in der gustatorischen Wahrnehmung von Speisen oder Getränken durch Geschmacksknospen involviert sind, sondern auch von extragustatorischen, spezialisierten chemosensorischen Epithelzellen exprimiert werden. Diese chemosensorischen Epithelzellen besitzen molekulare Komponenten der kanonischen Geschmackskaskade und können Reflexe auf schädliche Substanzen auslösen (Finger et al., 2003; Krasteva et al., 2011; Krasteva et al., 2012b; Tizzano et al., 2011). Nicht-gustatorisches Gewebe wurde unlängst auf die Expression von Geschmacksrezeptoren untersucht. Dabei wurden in einem Mausreporterstamm für die Expression des Tas2R131, eines Mitglieds der Rezeptorfamilie für Bitterstoffe, einfach positive Zellen im Thymusmark von Mäusen identifiziert (Voigt et al., 2012). Im Jahr 2015 zeigten Soultanova und Mitarbeiter, dass die in dieser Arbeit charakterisierten cholinergen Thymusepithelzellen neben den beschriebenen Elementen der Geschmackstransduktionskaskade auch den Bitterrezeptor Tas2R131 exprimieren (Soultanova et al., 2015). Mitglieder der Tas2R-Familie werden allerdings auch von nicht-chemosensorischen Zellen exprimiert. Bei diesen sind sie Elemente von Signaltransduktionskaskaden, die sich von denen der Geschmackszellen unterscheiden (Grassin-Delyle et al., 2013; Lee et al., 2014). Erstaunlicherweise wird Tas2R131 auch von anderen Zelltypen wie beispielsweise Spermien (Voigt et al., 2012) exprimiert. In einer von Prandi und Mitarbeitern durchgeführten Studie wurde Tas2R131 in einem geringen Teil der Becherzellen im Kolon der Maus nachgewiesen, wobei es sich bei den Tas2R131-positiven Zellen nicht um SCC des Gastrointestinaltrakts handelte (Prandi et al., 2013).

Nachdem ein Geschmacksmolekül an GPCR der Tas1R- und Tas2-R-Familie gebunden hat, wird über die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch PLC $_{\beta 2}$ der Kationenkanal TRPM5 aktiviert (Hofmann et al., 2003). Im Respirations- und Gastrointestinaltrakt von Ratten und Mäusen wurde in Bürstenzellen TRPM5, der üblicherweise aus der Geschmackswahrnehmungskaskade für Aminosäuren und Süß- und

Bitterstoffe in Geschmacksknospen bekannt ist, identifiziert (Kaske et al., 2007). Doppelimmunfluoreszenzversuche im Mäusethymus zeigten, dass ChAT-eGFP-positive Epithelzellen häufig auch PLC β_2 oder TRPM5 enthalten. Dennoch konnte keine hundertprozentige Kongruenz der Immunfluoreszenzmarkierung gegen ChAT-eGFP/PLC β_2 oder ChAT-eGFP/TRPM5 gefunden werden, da einfach positive Immunreaktivität gegen PLC β_2 - oder TRPM5-Antikörper auch in wenigen ChAT-eGFP-negativen Zellen gefunden wurde. Dies ähnelt der Situation in der Trachea, in der circa 15% der Villin-immunreaktiven Zellen kein ChAT-eGFP exprimieren (Krasteva et al., 2011). Im Gegensatz dazu kam in allen G α -Gustducin-positiven Zellen im Thymusmark auch ChAT-eGFP-Immunreaktivität vor. In Geschmacksknospen der Zunge wird das geschmacksspezifische Protein G α -Gustducin mit den Mitgliedern der Tas1R-Familie koexprimiert (Kim et al., 2003). Eine solitäre Expression des geschmacksspezifischen Proteins G α -Gustducin (McLaughlin et al., 1992) war im Thymus so gut wie nicht zu finden, wohingegen ChAT-eGFP⁺/G α -Gustducin⁻-Zellen regelmäßig vorkamen. Eine nicht vollständige Übereinstimmung der Immunmarkierungen kann Folge einer inkompletten Expression des BAC-Transgens in cholinergen Zellen sein, da Fehlpaarungen zwischen der Expression des Transgen und ChAT-Immunmarkierung auch im Gehirn dieser Tiere vorkommen können (von Engelhardt et al., 2007; Tallini et al., 2006). Weiterhin kann es Folge einer nicht gleichzeitigen Expression der Marker zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten sein. Ebenso kann es sich um eine Subpopulation chemosensorischer Thymuszellen handeln, die noch weiterführend untersucht werden müssten. Aichurek Soultanova und Amir Rafiq bestätigten die mRNA-Expression für G α -Gustducin, PLC β_2 und TRPM5 im Thymus und auch in isolierten Zellen (Panneck et al., 2014) (Abbildung 4-II, a und b).

Nachdem nun durch den PLC β_2 -induzierten Ca²⁺-Anstieg der Kationenkanal TRPM5 geöffnet wurde und Na⁺-Ionen in die Zellen strömen, werden durch die Depolarisation der Zellmembran vermehrt potenzialgesteuerte Ionenkanäle geöffnet, die über einen weiteren Ca²⁺-Influx letztendlich zur Transmitterfreisetzung und zur Erregung benachbarter sensorischer Nervenfasern führen (Hofmann et al., 2003; Krasteva et al., 2011; Romanov et al., 2007; Roper, 2006).

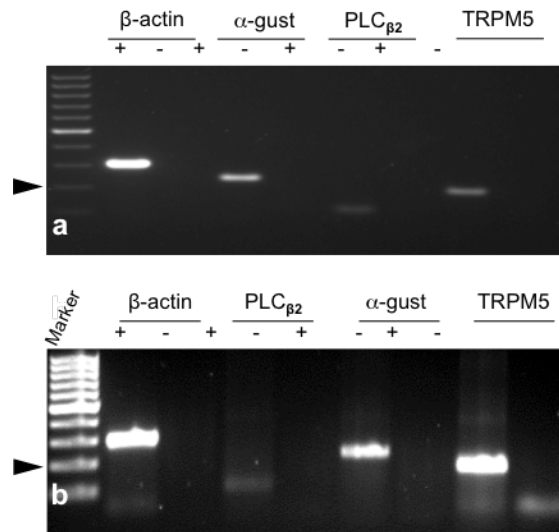


Abbildung 4-II. a Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion. Agarosegel durch Ethidiumbromid angefärbt. α -Gustducin- (α -gust), $PLC_{\beta 2}$ - und TRPM5-spezifische Moleküle wurden aus dem gesamten Thymus und **b** aus einzelnen Thymuszellen, die mithilfe des TRPM5-Antikörpers und der Magnetic Bead Technologie isoliert wurden, amplifiziert. Der Pfeilkopf zeigt den 200 bp-Marker an. Die PCR wurde mit (+) und ohne (-, Negativkontrolle) reverser Transkription der RNA durchgeführt. β -Aktin diente als Haushaltsgen. **a**: PCR von Dr. Aichurek Soultanova. **b**: PCR von Dr. Amir Rafiq. Aus Panneck et al., 2014, mit freundlicher Genehmigung von Cell and Tissue Research.

4.5 Lagebeziehung cholinergischer Thymusepithelzellen zu Nervenfasern

SCC der Atemwege stehen in direktem Kontakt zu sensorischen Nervenfasern und lösen bei Stimulation reflektorisch lokale und generelle Antworten aus (Finger et al., 2003; Krasteva et al., 2011; Tizzano et al., 2010). Wiederhold und Mitarbeiter entdeckten in der Konjunktiva ebenfalls einen Kontakt zwischen peptidergen, sensorischen Nervenfasern und chemosensorischen Zellen (Wiederhold et al., 2015). Oft besitzen die Nervenfasern Verdickungen oder Varikositäten, in denen die beiden Neuropeptide CGRP und Substanz P liegen, die zur immunhistochemischen Darstellung SCC und kontaktierender Nervenfasern dienen (Finger et al., 2003; Krasteva et al., 2012b). Die Auswertung der mit dem CGRP-Antikörper behandelten Gewebeschnitte im Thymus wies keine direkte Innervation chemosensorischer, medullärer Thymusepithelzellen durch sensorische Nervenfasern nach. In dieser Arbeit konnten peptiderge Nervenfasern lediglich in der Nähe der Thymuskapsel, in Thymussepten sowie perivaskulär

identifiziert werden. Etwas schwächer CGRP-positive Zellen tauchten in Rinde und Mark auf. Eine weitere Immunfluoreszenzmarkierung gegen den neuronalen Marker PGP9.5 stellte Nervenfasern um Blutgefäße und im subkapsulären Epithel dar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Signalweitergabe der SCC im Thymus möglicherweise parakrin erfolgt. Eine ähnliche Signalweiterleitung ist auch von cholinergen, mikrovillösen TRPM5-positiven Zellen im olfaktorischen Epithel von Mäusen bekannt. Bei diesen Zellen findet die Weiterleitung sensorischer Informationen weder über axonale Signalweitergabe zum Bulbus olfactorius noch über einen direkten Kontakt zu trigeminalen Nervenfasern statt, sondern über eine parakrine Sekretion auf Zellen der direkten Umgebung (Hansen and Finger, 2008; Ogura et al., 2011). Es ist nicht ungewöhnlich, dass ACh sowohl in neuronalem als auch in nicht-neuronalem Gewebe die Funktionsweise benachbarter Zellen parakrin beeinflusst (Wessler and Kirkpatrick, 2008).

4.6 Cholinozeption

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, exprimieren Thymozyten, Thymusepithelzellen und myoide Zellen muskarinische und nikotinische Rezeptoren (Engel et al., 1977; Kuo et al., 2002; Maslinski et al., 1987; Mihovilovic et al., 1997; Poea-Guyon et al., 2005; Wakkach et al., 1996). Die $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ - und $\beta 4$ -Untereinheiten des nAChR zeigen die stärkste Expression im postnatalen Mäusethymus (Kuo et al., 2002).

In dieser Arbeit wurden durch immunhistochemische Untersuchungen an Chrna3^{BAC}-eGFP-Mäusen Epithelzellen im Thymusmark und an der Rinden-Mark-Grenze nachgewiesen, die die $\alpha 3$ -Untereinheit des nAChR exprimieren. Diese cholinozeptiven Zellen kamen in Grüppchen oder seltener als solitäre Zellen vor und lagen in unmittelbarer räumlicher Nähe zu den SCC des Thymus, was für eine parakrine Signalweitergabe spricht. Die Lokalisation von Nervenfasern konnte bei den Chrna3^{BAC}-eGFP-Mäusen immunhistochemisch dargestellt werden; $\alpha 3$ -positive Nervenfasern liefen von der Kapsel in das Organinnere und entlang der Thymussepten. Im Mark waren $\alpha 3$ -immunreaktive Nervenfasern lediglich entlang der Gefäße vorhanden. Kürzlich wurden die cholinozeptiven Zellen als CK10-immunreaktive terminal differenzierte Epithelzellen identifiziert. Sie liegen in kleinen Grüppchen und besitzen eine starke Ähnlichkeit mit Hassall-Körperchen (Soulтанova et al., 2014). Soulтанova und Mitarbeiter legten in ihrer Studie von 2014 nah, dass die Produktion und/oder Freisetzung von Catestatin im Thymus eventuell unter cholinenger Kontrolle steht, wobei insbesondere die $\alpha 3$ -Einheit

des nAChR relevant ist (Soultanova et al., 2014). Allerdings besitzt Catestatin, wie zuvor erwähnt, speziell auf die $\alpha 3/\beta 4$ -Untereinheit des nAChR (Sahu et al., 2012) eine anticholinerge Wirkung, sodass es auf terminal differenzierte medulläre Epithelzellen im Thymus autoinhibitorisch wirken könnte. Die genaue Funktion der Zelle ist zwar bislang nicht bekannt, die räumliche Nähe zu den SCC im Thymusmark spricht aber dafür, dass sie möglicherweise unter der Kontrolle eben dieser durch parakrine Signalweitergabe stehen.

4.7 Schlussfolgerungen und Hypothesen

4.7.1 Interpretation der Ergebnisse im Hinblick auf eine mögliche Sensorfunktion chemosensorischer Thymusepithelzellen

SCC in schleimhauttragenden Organen wie der Trachea oder der Nase nutzen Geschmacksrezeptoren, um toxische Substanzen und potenziell gefährliche Stoffwechselprodukte von Bakterien zu schmecken und protektive Reflexe einzuleiten. Aufgrund dieser Erkenntnis konnte die Existenz der Zelle an verschiedenen Stellen des Körpers vorhergesagt werden: in der Urethra (Deckmann et al., 2014), in der Konjunktiva (Wiederhold et al., 2015) und in der Tuba auditiva (Krasteva et al., 2012b). Bakterien produzieren Quorum-Sensing-Moleküle, die dem Informationsaustausch zwischen Bakterienzellen dienen; diese Signalmoleküle können Bitterrezeptoren aktivieren (Lee et al., 2012; Tizzano et al., 2010). Krasteva und Mitarbeiter demonstrierten 2011, dass eine intratracheale Gabe von Denatonium – ein Derivat des Lokalanästhetikums Lidocain und die für den Menschen bitterste bekannte Substanz – zu einem raschen Abfall der Atemfrequenz führen kann (Krasteva et al., 2011). SCC der Nase sind in der Lage, Entzündungsreaktionen, vaskuläre Plasmalecks und Mastzelldegranulation als Reaktion auf Bitterstimuli auszulösen (Saunders et al., 2014). Auch in der Urethra scheinen Bürstenzellen das chemische Milieu zu kontrollieren und nach Bitterwahrnehmung Transmitter zu sezernieren, um vor eventuell schädlichen Substanzen zu warnen (Deckmann et al., 2014). Diese Zellen dienen somit als Wächter, indem sie eine weitere Invasion von Bakterien oder schädlichen Substanzen verhindern (Krasteva et al., 2011; Krasteva et al., 2012b; Krasteva and Kummer, 2012; Lee et al., 2014; Ogura et al., 2010; Tizzano et al., 2010).

Das Thymusmark ist im Gegensatz zu den anderen Organen, in denen die SCC bislang untersucht wurde, nicht einer ständigen Exposition inhalierter oder durch die Nah-

rung aufgenommener Substanzen oder Bakterien über die Schleimhaut ausgesetzt. Dennoch wird das Thymusmark bei systemischen Infektionen mit Viren, Bakterien und bakteriellen Stoffwechselprodukten konfrontiert. Es nimmt Infektionen wahr und kann eine Thymusinvolution induzieren (Dooley and Liston, 2012). Bei einer unlängst durchgeführten Studie wurden detaillierte Mechanismen aufgezeigt, die eine Thymusinvolution als Reaktion auf polyinosinic polycytidylic acid (poly I:C) initiierten. Poly I:C ist ein Immunstimulator, der strukturelle Ähnlichkeit mit viraler Doppelstrang RNA besitzt und in der Immunforschung zur Simulation viraler Infektionen genutzt wird. Die genauen Grundlagen bakterieller Infekterkennung im Thymus sind hingegen noch unklar (Anz et al., 2009; Dooley and Liston, 2012; Papadopoulou et al., 2012; Ross et al., 2012). Kürzlich sind zudem erste Erkenntnisse über eine Interaktion zwischen intestinalen Bürstenzellen und lymphoiden Zellen des angeborenen Immunsystems, sogenannten „innate lymphoid cells type 2“ (ILC-2), bekannt geworden. Bürstenzellen im Dünndarm der Maus setzen Interleukin-25 als Reaktion auf einen parasitären Befall mit Helminthen frei. Dies führt zur Aktivierung der ILC-2, die über Interleukin-13 auf das intestinale Stammzellkompartiment wirken, um dort die Hyperplasie intestinaler Becherzellen und Bürstenzellen zu initiieren. Weiterhin wird die Schleimproduktion angeregt, um den Parasiten leichter auszuscheiden (Gerbe et al., 2016; Harris, 2016; Howitt et al., 2016; von Moltke et al., 2016). Versuche mit TRPM5 Knock-out Mäusen zeigten, dass diese Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einen höheren Wurmbefall aufwiesen (Howitt et al., 2016). Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass chemosensorische Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenerkennung besitzen und immunregulatorisch wirken. Es ist verlockend zu vermuten, dass SCC des Thymus ebenso wie SCC aus anderen Organen Wächtermechanismen besitzen, mithilfe derer sie direkt oder über den Blutfluss bakterielle Quorum-Sensing-Moleküle oder andere bakterielle Produkte erkennen, um umliegende cholinozeptive Epithelzellen über parakrine ACh-Sekretion zu warnen und lokale Reflexe auslösen, um Thymozyten vor einer Exposition mit Fremdanigenen zu schützen. Die vom Thymus ausgebildeten reifen T-Lymphozyten wandern über den Blutkreislauf in sekundär lymphatische Organe. Der Thymus ist aufgrund dessen unabdingbar für die Erneuerung des peripheren T-Zell-Pools.

4.7.2 Cholinerge Effekte im Thymus

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, besitzen Thymusepithelzellen und Thymozyten mAChR und nAChR (Engel et al., 1977; Kuo et al., 2002; Maslinski et al., 1987; Mihovilovic et al., 1997; Wakkach et al., 1996). Cholinerge Agonisten können vielfältige Auswirkungen auf den Thymus haben. Insbesondere die Arbeiten von Middlebrook und Mihovilovic sind hochinteressant bezüglich der Funktion der zuvor unbekannt, cholinergen Thymusepithelzelle. Im Jahr 2002 untersuchten Middlebrook und Mitarbeiter den Einfluss von Nikotin auf die T-Zell-Entwicklung im fetalen Mäusethymus, der schon bei geringsten Nikotinmengen zum Stillstand der Thymozytenreifung und somit zu einer Zunahme an unreifen T-Zellen führt (Middlebrook et al., 2002). Interessanterweise führt die Gabe cholinergischer Agonisten im Thymus zu einer verminderten Zelladhärenz und einem geringeren Wachstumsverhalten von Thymusepithelzellen in Kultur (Mihovilovic and Butterworth-Robinette, 2001).

In der Thymusrinde existiert subkapsulär sowie um die Blutgefäße herum eine Blut-Thymus-Schranke, die im Mark nicht vorhanden ist. Der Thymus stellt dort eine Eintrittspforte dar, über die Thymuszellen mit Blut und potenziell schädlichen, körperfremden Substanzen in Kontakt kommen könnten. Folglich kann sich die Fähigkeit zur Wahrnehmung potenziell schädlicher Stoffe im Blut als überaus nützlich erweisen, da der Kontakt heranreifender Thymozyten mit Pathogenen die Gefahr der Toleranzentwicklung birgt. Die cholinergen, epithelialen Thymuszellen mit Bürstenzellcharakteristika liegen vorwiegend im Mark und an der Rinden-Mark-Grenze, an der doppelt positive T-Zellen nach der positiven Selektion weiter in das Thymusmark wandern. Sie besitzen damit eine ideale Lage, um Thymozyten vor einer Exposition mit bakteriellen Antigenen zu schützen und eine Toleranz gegenüber Bakterien während Infektionen zu verhindern. Während die Thymozyten heranreifen, entstehen ihre Antigenrezeptoren durch zufällige somatische Rekombination, wodurch Milliarden von T-Zellen mit unterschiedlicher Antigenspezifität entstehen, die eine zentrale Funktion bei der Erkennung und Vernichtung von Pathogenen einnehmen (Anderson and Takahama, 2012; Hogquist et al., 2005; Klein et al., 2014). Mittels positiver und negativer Selektion werden die T-Lymphozyten selektiert, die die Fähigkeit zur zentralen Toleranz haben. Ein Teilmechanismus der zentralen Toleranz ist die Anergie, aufgrund derer die Immunantwort der T-Lymphozyten gegen körpereigene Antigene abgeschaltet wird. Im Rahmen von Infektionen durch Viren oder Bakterien besteht die Gefahr, dass Pathogene die immunologische Reaktion auf sich abschwächen und damit Anergie erzeugen. Die Grundlagen der Entstehung von Autoimmunerkrankungen sind sehr komplex und können hier

nur oberflächlich angerissen werden. Es bedarf noch weiterer Forschungsarbeit, um die genaue Wirkweise und Funktion der cholinergen, medullären Thymusepithelzellen zu identifizieren und eventuell vorhandene protektive Mechanismen auch im Zusammenhang mit zentraler und peripherer Toleranz zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Der Thymus ist ein primär lymphatisches Organ, in dem die Reifung und Ausbildung von Thymozyten zu selektionierten T-Lymphozyten stattfindet, die letztendlich in sekundär lymphatische Organe auswandern und den peripheren T-Zell-Pool bilden. In dieser Arbeit habe ich einen bislang unbekanntem, cholinergen Zelltyp im Thymus identifiziert. Zur genauen Charakterisierung dieses Zelltyps wurden Untersuchungen an zwei verschiedenen Reportermausstämmen, ChAT^{BAC}-eGFP- und Chrna3^{BAC}-eGFP-transgenen Mäusen, durchgeführt. ChAT^{BAC}-eGFP-transgene Mäuse besitzen eine Subpopulation cholinergere Zellen in der äußeren Thymusmarkzone und entlang der Rinden-Mark-Grenze, die eine große morphologische Ähnlichkeit zu einem spezialisierten Epithelzelltyp besitzen, der in der Lamina epithelialis mucosae verschiedener Säuger vorkommt. Ein Strukturmerkmal dieses Epithelzelltyps ist ein apikaler Besatz aus Mikrovilli („Bürstenzelle“), mithilfe dessen die Zellen den luminalen Inhalt auf der Schleimhautoberfläche wahrnehmen. Sie exprimieren Elemente der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade, um bakterielle Bitterstoffe zu schmecken und daraufhin protektive Reflexe einzuleiten. Die chemosensorischen Zellen liegen gehäuft an potenziellen Eintrittspforten bakterieller Erreger in den Körper: Tuba auditiva, vomeronasales Organ, Trachea, Urethra, Konjunktiva. In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass cholinerge Zellen im Thymusmark das Bürstenzell-spezifische Strukturprotein Villin exprimieren, das ultrastrukturell zur immunhistochemischen Darstellung lateraler Mikrovilliausläufer genutzt wurde. Anhand von Markierungen gegen Epithelzellmarker (CK8, CK18) konnten die Zellen als Epithelzellen identifiziert und als eigenständige Zellentität von Thymozyten oder neuroendokrinen Zellen (CGA, PGP9.5) abgegrenzt werden. Die Zellen sind immunreaktiv für Moleküle der Geschmackstransduktionskaskade, G α -Gustducin, TRPM5 und PLC β 2. Sie haben keinen direkten Kontakt zu sensorischen Nervenfasern (PGP9.5, CGRP), lagen allerdings in direkter Nachbarschaft zu terminal differenzierten Epithelzellen des Thymusmarks (Hassall-like-bodies in der Maus), die den nAChR α 3 exprimieren.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass SCC eine Wächterfunktion besitzen, mithilfe derer sie körperfremde Substanzen erkennen, cholinozeptive Epithelzellen über parakrine ACh-Sekretion warnen und lokale Reflexe einleiten können. Dies könnte dazu dienen, Thymozyten vor einer Exposition mit Fremdanitigenen zu schützen und so eine Toleranz gegenüber Bakterien während Infektionen zu verhindern.

Summary

The thymus is a primary lymphoid organ, in which the maturation and formation of thymocytes to selected T cells, that colonize secondary lymphoid organs and generate the peripheral T cell pool, take place. In this study, I discovered a previously unknown cholinergic cell type in the thymus. To characterize this cell type, we used two different reporter mouse strains, ChAT^{BAC}-eGFP- and Chrna3^{BAC}-eGFP-transgene mice. ChAT^{BAC}-eGFP-transgene mice showed a subset of cholinergic cells in the outer medulla and along the cortico-medullary border, which have a great morphological resemblance to specialized epithelial cells in the lamina epithelialis mucosae of various mammals. A structural characteristic of this cell type is a tuft of apical microvilli (“brush cells”) to sense the mucosa’s luminal content. They express elements of the canonical taste transduction cascade to detect “bitter” substances and to initiate protective reflexes in response to detection of potentially harmful substances. Chemosensory cells are often located at potential entry points of bacterial agents in the body: tuba auditiva, vomeronasal organ, trachea, urethra, conjunctiva. In this study, I demonstrated that cholinergic cells in the thymic medulla express villin, a brush cell marker protein, which was ultrastructurally used to exhibit lateral microvilli. On the basis of immunohistochemical markers for epithelial cell marker (CK8, CK18), the cells were identified as epithelial cells and differentiated from thymocytes or neuroendocrine cells as an independent cell entity (CGA, PGP9.5). The cells are immunoreactive for molecules of the canonical taste transduction cascade such as Gα-gustducin, TRPM5, and PLC_{β2}. They are not directly approached by sensory nerve fibers (identified by PGP9.5 and CGRP antibodies). However, they were often in direct contact with terminally differentiated epithelial cells in the thymic medulla, expressing the nAChRα3 (Hassall’s corpuscle-like structures in mice). This data implies that SCC have a sentinel function, which helps to detect foreign substances to warn cholinergic cells by paracrine secretion and to initiate local reflexes. This could help to protect thymocytes from having contact with foreign antigens during the process of negative selection and thus prevent tolerance against bacteria during infection.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AIRE	Autoimmune Regulator
aq.dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial artificial chromosome
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cortex
CD	Cluster of differentiation
CGA	Chromogranin A
CGRP	Calcitonin-Gen-verwandtes Peptid
ChAT	Cholinacetyltransferase
Chrna3	cholinergic receptor nicotinic alpha 3 subunit
CHT1	Cholinetransporter-1
CK	Cytokeratin
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
DAB	Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6 Diaminidin-2-phenylindol
DDSA	Dodeceny succinic Anhydrid
DMP	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol
eGFP	verstärkt grün-fluoreszierendes Protein
EtOH	Ethanol
Fezf2	FEZ Family Zinc Finger 2

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren
GTP	Guanosintriphosphat
ILC	innate lymphoid cells
IP ₃	Inositoltriphosphat
ISH	in-situ-Hybridisierung
m	Monoklonal
M	Medulla
mAChR	muskarinische Acetylcholinrezeptoren
MG	Myasthenia gravis
MHC	major histocompatibility complex Haupthistokompatibilitätskomplex
MNA	Methyl Nadic Anhydrid
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NaN ₃	Natriumazid
NHS	normales Pferdeserum
OCT	organische Kationentransporter
OCTN1	OCT, novel type 1
OsO ₄	Osmiumtetroxid
p	polyklonal
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS+S	PBS mit doppelter Menge NaCl
PFA	Paraformaldehyd
PGP 9.5	Protein Gen Produkt 9.5
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PP	Phosphatpuffer
poly I:C	polyinosinic polycytidylic acid
POX	Peroxidase

PVP	Polyvinylpyrrolidon
SCC	solitäre chemosensorische Zellen
SLC22	Solute-Carrier-Familie 22
Tas1R	Taste receptors type 1
Tas2R	Taste receptors type 2
TCR	T-Zell-Rezeptor
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TRPM5	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5
UAc	Uranylacetat

7 Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., and A.H. Lichtman. 2009. Basic immunology : functions and disorders of the immune system. Saunders, Philadelphia, Pa.
- Akimori, T., K. Hanazaki, T. Okabayashi, K. Okamoto, M. Kobayashi, and T. Ogata. 2011. Quantitative distribution of brush cells in the rat gastrointestinal tract: brush cell population coincides with NaHCO₃ secretion. *Medical molecular morphology*. 44:7-14.
- Amara, S.G., V. Jonas, M.G. Rosenfeld, E.S. Ong, and R.M. Evans. 1982. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*. 298:240-244.
- Anastasiadis, K., and C. Ratnatunga. 2006. The Thymus Gland : Diagnosis and Surgical Management. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Anderson, G., and Y. Takahama. 2012. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol*. 33:256-263.
- Anderson, M.S., E.S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S.P. Berzins, S.J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis. 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*. 298:1395-1401.
- Antonica, A., F. Magni, L. Mearini, and N. Paolocci. 1994. Vagal Control of Lymphocyte Release from Rat Thymus. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 48:187-197.
- Anz, D., R. Thaler, N. Stephan, Z. Waibler, M.J. Trauscheid, C. Scholz, U. Kalinke, W. Barchet, S. Endres, and C. Bourquin. 2009. Activation of melanoma differentiation-associated gene 5 causes rapid involution of the thymus. *Journal of immunology*. 182:6044-6050.
- Asan, E., and D. Drenckhahn. 2005. Immunocytochemical characterization of two types of microvillar cells in rodent olfactory epithelium. *Histochemistry and cell biology*. 123:157-168.
- Baribault, H., J. Price, K. Miyai, and R.G. Oshima. 1993. Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8. *Genes Dev*. 7:1191-1202.
- Behrens, M., W. Meyerhof, C. Hellfritsch, and T. Hofmann. 2011. Sweet and umami taste: natural products, their chemosensory targets, and beyond. *Angew Chem Int Ed Engl*. 50:2220-2242.
- Besedovsky, H.O., A. del Rey, E. Sorkin, M. Da Prada, and H.H. Keller. 1979. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Cell Immunol*. 48:346-355.
- Bezencon, C., A. Furholz, F. Raymond, R. Mansourian, S. Metairon, J. Le Coutre, and S. Damak. 2008. Murine intestinal cells expressing Trpm5 are mostly brush cells and express markers of neuronal and inflammatory cells. *J Comp Neurol*. 509:514-525.
- Blackburn, C.C., and N.R. Manley. 2004. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev Immunol*. 4:278-289.
- Blackburn, C.C., N.R. Manley, D.B. Palmer, R.L. Boyd, G. Anderson, and M.A. Ritter. 2002. One for all and all for one: thymic epithelial stem cells and regeneration. *Trends Immunol*. 23:391-395.
- von Boehmer, H., and P. Kisielow. 1990. Self-nonsel discrimination by T cells. *Science*.
- Boyd, R.L., C.L. Tucek, D.I. Godfrey, D.J. Izon, T.J. Wilson, N.J. Davidson, A.G. Bean, H.M. Ladyman, M.A. Ritter, and P. Hugo. 1993. The thymic microenvironment. *Immunology today*. 14:445-459.

- Braun, T., B. Mack, and M.F. Kramer. 2011. Solitary chemosensory cells in the respiratory and vomeronasal epithelium of the human nose: a pilot study. *Rhinology*. 49:507-512.
- Breer, H., J. Eberle, C. Frick, D. Haid, and P. Widmayer. 2012. Gastrointestinal chemosensation: chemosensory cells in the alimentary tract. *Histochemistry and cell biology*. 138:13-24.
- Brelinska, R., D. Ostalska, and M. Zabel. 2000. Subtypes of thymic epithelial cells defined by neuroendocrine markers. *Histochemistry and cell biology*. 114:239-244.
- Bruno, R., L. Sabater, E. Tolosa, M. Sospedra, X. Ferrer-Francesch, J. Coll, M. Foz, A. Melms, and R. Pujol-Borrell. 2004. Different patterns of nicotinic acetylcholine receptor subunit transcription in human thymus. *Journal of neuroimmunology*. 149:147-159.
- Bulloch, K., and W. Pomerantz. 1984. Autonomic nervous system innervation of thymic-related lymphoid tissue in wildtype and nude mice. *J Comp Neurol*. 228:57-68.
- Caulfield, M.P. 1993. Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacology & therapeutics*. 58:319-379.
- Chandrashekar, J., M.A. Hoon, N.J. Ryba, and C.S. Zuker. 2006. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*. 444:288-294.
- Chandrashekar, J., D. Yarmolinsky, L. von Buchholtz, Y. Oka, W. Sly, N.J. Ryba, and C.S. Zuker. 2009. The taste of carbonation. *Science*. 326:443-445.
- Chang, L.Y., R.R. Mercer, and J.D. Crapo. 1986. Differential distribution of brush cells in the rat lung. *The Anatomical record*. 216:49-54.
- Changeux, J.P., M. Kasai, and C.Y. Lee. 1970. Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 67:1241-1247.
- Chen, W.H., B.F. Kozlovsky, R.B. Effros, B. Grubeck-Loebenstien, R. Edelman, and M.B. Szein. 2009. Vaccination in the elderly: an immunological perspective. *Trends Immunol*. 30:351-359.
- Clapham, D.E., and E.J. Neer. 1997. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 37:167-203.
- Cooper, E., S. Couturier, and M. Ballivet. 1991. Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature*. 350:235-238.
- Cordier, A.C., and S.M. Haumont. 1980. Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *The American journal of anatomy*. 157:227-263.
- Cordier, A.C., and J.F. Heremans. 1975. Nude mouse embryo: ectodermal nature of the primordial thymic defect. *Scand J Immunol*. 4:193-196.
- Cunningham, C.P., W.G. Kimpton, J.E. Holder, and R.N. Cahill. 2001. Thymic export in aged sheep: a continuous role for the thymus throughout pre- and postnatal life. *European journal of immunology*. 31:802-811.
- de Meis, J., D. Aurelio Farias-de-Oliveira, P.H. Nunes Panzenhagen, N. Maran, D.M. Villa-Verde, A. Morrot, and W. Savino. 2012. Thymus atrophy and double-positive escape are common features in infectious diseases. *J Parasitol Res*. 2012:574020.
- De Waal, E.J., and L.H. Rademakers. 1997. Heterogeneity of epithelial cells in the rat thymus. *Microscopy research and technique*. 38:227-236.
- Deckmann, K., K. Filipowski, G. Krasteva-Christ, M. Fronius, M. Althaus, A. Rafiq, T. Papadakis, L. Renno, I. Jurastow, L. Wessels, M. Wolff, B. Schutz, E. Weihe, V. Chubanov, T. Gudermann, J. Klein, T. Bschleipfer, and W. Kummer. 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*. 111:8287-8292.

- Deckmann, K., G. Krasteva-Christ, A. Rafiq, C. Herden, J. Wichmann, S. Knauf, C. Nassenstein, C.G. Grevelding, A. Dorresteijn, V. Chubanov, T. Gudermann, T. Bschiepfer, and W. Kummer. 2015. Cholinergic urethral brush cells are widespread throughout placental mammals. *Int Immunopharmacol.* 29:51-56.
- Derbinski, J., A. Schulte, B. Kyewski, and L. Klein. 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature immunology.* 2:1032-1039.
- DiMaio, M.F., M. Kattan, D. Ciurea, J. Gil, and R. Dische. 1990. Brush cells in the human fetal trachea. *Pediatr Pulmonol.* 8:40-44.
- Dooley, J., and A. Liston. 2012. Molecular control over thymic involution: from cytokines and microRNA to aging and adipose tissue. *European journal of immunology.* 42:1073-1079.
- Doran, J.F., P. Jackson, P.A. Kynoch, and R.J. Thompson. 1983. Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *J Neurochem.* 40:1542-1547.
- Douek, D.C., R.D. McFarland, P.H. Keiser, E.A. Gage, J.M. Massey, B.F. Haynes, M.A. Polis, A.T. Haase, M.B. Feinberg, J.L. Sullivan, B.D. Jamieson, J.A. Zack, L.J. Picker, and R.A. Koup. 1998. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature.* 396:690-695.
- Dowling, M.R., and P.D. Hodgkin. 2009. Why does the thymus involute? A selection-based hypothesis. *Trends Immunol.* 30:295-300.
- Drenckhahn, D., B. von Gaudecker, H.K. Muller-Hermelink, K. Unsicker, and U. Groschel-Stewart. 1979. Myosin and actin containing cells in the human postnatal thymus. Ultrastructural and immunohistochemical findings in normal thymus and in myasthenia gravis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 32:33-45.
- Eberle, J.A., P. Richter, P. Widmayer, V. Chubanov, T. Gudermann, and H. Breer. 2013. Band-like arrangement of taste-like sensory cells at the gastric groove: evidence for paracrine communication. *Frontiers in physiology.* 4:58.
- Engel, E.K., J.L. Trotter, D.E. McFarlin, and C.L. McIntosh. 1977. Thymic epithelial cell contains acetylcholine receptor. *Lancet.* 1:1310-1311.
- von Engelhardt, J., M. Eliava, A.H. Meyer, A. Rozov, and H. Monyer. 2007. Functional characterization of intrinsic cholinergic interneurons in the cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 27:5633-5642.
- Erickson, J.D., H. Varoqui, M.K. Schafer, W. Modi, M.F. Diebler, E. Weihe, J. Rand, L.E. Eiden, T.I. Bonner, and T.B. Usdin. 1994. Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *The Journal of biological chemistry.* 269:21929-21932.
- Ericson, L.E., R. Hakanson, B. Larson, C. Owman, and F. Sundler. 1972. Fluorescence and electron microscopy of amine-storing enterochromaffin-like cells in tracheal epithelium of mouse. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 124:532-545.
- Fambrough, D.M., D.B. Drachman, and S. Satyamurti. 1973. Neuromuscular junction in myasthenia gravis: decreased acetylcholine receptors. *Science.* 182:293-295.
- Fatani, J.A., M.A. Qayyum, L. Mehta, and U. Singh. 1986. Parasympathetic innervation of the thymus: a histochemical and immunocytochemical study. *Journal of anatomy.* 147:115-119.
- Finger, T.E. 2005. Cell types and lineages in taste buds. *Chemical senses.* 30 Suppl 1:i54-55.
- Finger, T.E., B. Bottger, A. Hansen, K.T. Anderson, H. Alimohammadi, and W.L. Silver. 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.* 100:8981-8986.
- Finger, T.E., and S.C. Kinnamon. 2011. Taste isn't just for taste buds anymore. *F1000 biology reports.* 3:20.

- Forssmann, W.G., S. Ito, E. Weihe, A. Aoki, M. Dym, and D.W. Fawcett. 1977. An improved perfusion fixation method for the testis. *The Anatomical record*. 188:307-314.
- Frahm, S., M.A. Slimak, L. Ferrarese, J. Santos-Torres, B. Antolin-Fontes, S. Auer, S. Filkin, S. Pons, J.F. Fontaine, V. Tsetlin, U. Maskos, and I. Ibanez-Tallon. 2011. Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of beta4 and alpha5 nicotinic receptor subunits in the medial habenula. *Neuron*. 70:522-535.
- Fredrickson, G.G., and R.S. Basch. 1994. Early thymic regeneration after irradiation. *Developmental and comparative immunology*. 18:251-263.
- Fry, T.J., and C.L. Mackall. 2002. Current concepts of thymic aging. *Springer Semin Immunopathol*. 24:7-22.
- Fuchs, E., and K. Weber. 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annual review of biochemistry*. 63:345-382.
- Fujii, T., and K. Kawashima. 2001. An independent non-neuronal cholinergic system in lymphocytes. *Jpn J Pharmacol*. 85:11-15.
- Fujii, T., T. Tsuchiya, S. Yamada, K. Fujimoto, T. Suzuki, T. Kasahara, and K. Kawashima. 1996. Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. *Journal of neuroscience research*. 44:66-72.
- Fujii, T., S. Yamada, Y. Watanabe, H. Misawa, S. Tajima, K. Fujimoto, T. Kasahara, and K. Kawashima. 1998. Induction of choline acetyltransferase mRNA in human mononuclear leukocytes stimulated by phytohemagglutinin, a T-cell activator. *Journal of neuroimmunology*. 82:101-107.
- Fujimoto, K., M. Matsui, T. Fujii, and K. Kawashima. 2001. Decreased acetylcholine content and choline acetyltransferase mRNA expression in circulating mononuclear leukocytes and lymphoid organs of the spontaneously hypertensive rat. *Life sciences*. 69:1629-1638.
- Gebhard, A., and A. Gebert. 1999. Brush cells of the mouse intestine possess a specialized glycocalyx as revealed by quantitative lectin histochemistry. Further evidence for a sensory function. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 47:799-808.
- Gerbe, F., E. Sidot, D.J. Smyth, M. Ohmoto, I. Matsumoto, V. Dardalhon, P. Cesses, L. Garnier, M. Pouzolles, B. Brulin, M. Bruschi, Y. Harcus, V.S. Zimmermann, N. Taylor, R.M. Maizels, and P. Jay. 2016. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*. 529:226-230.
- Ginda, W.J., M. Gratzl, A. Mayerhofer, and J.B. Warchol. 1996. Chromogranin A immunoreactivity in epithelial cells of the thymus. *Folia Histochem Cytobiol*. 34:91-93.
- Gordon, J., V.A. Wilson, N.F. Blair, J. Sheridan, A. Farley, L. Wilson, N.R. Manley, and C.C. Blackburn. 2004. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nature immunology*. 5:546-553.
- Grando, S.A., K. Kawashima, and I. Wessler. 2003. Introduction: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Life sciences*. 72:2009-2012.
- Grando, S.A., D.A. Kist, M. Qi, and M.V. Dahl. 1993. Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J Invest Dermatol*. 101:32-36.
- Grassin-Delyle, S., C. Abrial, S. Fayad-Kobeissi, M. Brollo, C. Faisy, J.C. Alvarez, E. Naline, and P. Devillier. 2013. The expression and relaxant effect of bitter taste receptors in human bronchi. *Respiratory research*. 14:134.
- Haga, T., and H. Noda. 1973. Choline uptake systems of rat brain synaptosomes. *Biochim Biophys Acta*. 291:564-575.
- Hansen, A., and T.E. Finger. 2008. Is TrpM5 a reliable marker for chemosensory cells? Multiple types of microvillous cells in the main olfactory epithelium of mice. *BMC neuroscience*. 9:115.
- Harris, N. 2016. IMMUNOLOGY. The enigmatic tuft cell in immunity. *Science*. 351:1264-1265.

- Haynes, B.F. 1984. The human thymic microenvironment. *Advances in immunology*. 36:87-142.
- Haynes, B.F., and L.P. Hale. 1998. The human thymus. A chimeric organ comprised of central and peripheral lymphoid components. *Immunol Res*. 18:175-192.
- Haynes, B.F., M.L. Markert, G.D. Sempowski, D.D. Patel, and L.P. Hale. 2000. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol*. 18:529-560.
- Herbst, W.M., W. Kummer, W. Hofmann, H. Otto, and C. Heym. 1987. Carcinoid tumors of the thymus. An immunohistochemical study. *Cancer*. 60:2465-2470.
- Hijiya, K., Y. Okada, and H. Tankawa. 1977. Ultrastructural study of the alveolar brush cell. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 26:321-329.
- Höfer, D., and D. Drenckhahn. 1992. Identification of brush cells in the alimentary and respiratory system by antibodies to villin and fimbrin. *Histochemistry*. 98:237-242.
- Höfer, D., and D. Drenckhahn. 1996. Cytoskeletal markers allowing discrimination between brush cells and other epithelial cells of the gut including enteroendocrine cells. *Histochemistry and cell biology*. 105:405-412.
- Höfer, D., B. Puschel, and D. Drenckhahn. 1996. Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:6631-6634.
- Höfer, D., D.W. Shin, and D. Drenckhahn. 2000. Identification of cytoskeletal markers for the different microvilli and cell types of the rat vomeronasal sensory epithelium. *Journal of neurocytology*. 29:147-156.
- Hofmann, T., V. Chubanov, T. Gudermann, and C. Montell. 2003. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Current biology : CB*. 13:1153-1158.
- Hogquist, K.A., T.A. Baldwin, and S.C. Jameson. 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol*. 5:772-782.
- Hoon, M.A., E. Adler, J. Lindemeier, J.F. Battey, N.J. Ryba, and C.S. Zuker. 1999. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*. 96:541-551.
- Horvath, G., N. Schmid, M.A. Fragoso, A. Schmid, G.E. Conner, M. Salathe, and A. Wanner. 2007. Epithelial organic cation transporters ensure pH-dependent drug absorption in the airway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 36:53-60.
- Howitt, M.R., S. Lavoie, M. Michaud, A.M. Blum, S.V. Tran, J.V. Weinstock, C.A. Gallini, K. Redding, R.F. Margolskee, L.C. Osborne, D. Artis, and W.S. Garrett. 2016. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science*. 351:1329-1333.
- Huang, G.Z., and Y.L. Lo. 2013. Correlation between acetylcholine receptor antibody levels and thymic pathology in myasthenia gravis: a review. *J Clin Neuromuscul Dis*. 14:209-217.
- Huang, L., Y.G. Shanker, J. Dubauskaite, J.Z. Zheng, W. Yan, S. Rosenzweig, A.I. Spielman, M. Max, and R.F. Margolskee. 1999. Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nature neuroscience*. 2:1055-1062.
- Iseki, S., and H. Kondo. 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 Anat (Basel)*. 138:15-23.
- Isomaki, A.M. 1973. A new cell type (tuft cell) in the gastrointestinal mucosa of the rat. A transmission and scanning electron microscopic study. *Acta Pathol Microbiol Scand A:Suppl* 240:241-235.
- Iwatsuki, K., R. Ichikawa, A. Uematsu, A. Kitamura, H. Uneyama, and K. Torii. 2012. Detecting sweet and umami tastes in the gastrointestinal tract. *Acta Physiol (Oxf)*. 204:169-177.

- Jeffery, P.K., and L. Reid. 1975. New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron microscopic study. *Journal of anatomy*. 120:295-320.
- Kalamida, D., K. Poulas, V. Avramopoulou, E. Fostieri, G. Lagoumintzis, K. Lazaridis, A. Sideri, M. Zouridakis, and S.J. Tzartos. 2007. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *The FEBS journal*. 274:3799-3845.
- Kao, I., and D.B. Drachman. 1977. Thymic muscle cells bear acetylcholine receptors: possible relation to myasthenia gravis. *Science*. 195:74-75.
- Kaske, S., G. Krasteva, P. Konig, W. Kummer, T. Hofmann, T. Gudermann, and V. Chubanov. 2007. TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC neuroscience*. 8:49.
- Kasper, M., D. Hofer, J. Woodcock-Mitchell, A. Migheli, A. Attanasio, T. Rudolf, M. Muller, and D. Drenckhahn. 1994. Colocalization of cytokeratin 18 and villin in type III alveolar cells (brush cells) of the rat lung. *Histochemistry*. 101:57-62.
- Kasper, M., T. Rudolf, A.A. Verhofstad, D. Schuh, and M. Muller. 1993. Heterogeneity in the immunolocalization of cytokeratin-specific monoclonal antibodies in the rat lung: evaluation of three different alveolar epithelial cell types. *Histochemistry*. 100:65-71.
- Kawashima, K., and T. Fujii. 2004. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 9:2063-2085.
- Kendall, M.D., H.R. Johnson, and J. Singh. 1980. The weight of the human thymus gland at necropsy. *Journal of anatomy*. 131:483-497.
- Kim, M.R., Y. Kusakabe, H. Miura, Y. Shindo, Y. Ninomiya, and A. Hino. 2003. Regional expression patterns of taste receptors and gustducin in the mouse tongue. *Biochem Biophys Res Commun*. 312:500-506.
- Kinnamon, S.C. 2012. Taste receptor signalling - from tongues to lungs. *Acta Physiol (Oxf)*. 204:158-168.
- Klein, L., B. Kyewski, P.M. Allen, and K.A. Hogquist. 2014. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol*. 14:377-391.
- Klug, D.B., C. Carter, E. Crouch, D. Roop, C.J. Conti, and E.R. Richie. 1998. Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:11822-11827.
- Knapp, L., A. Lawton, B. Oakley, L. Wong, and C.X. Zhang. 1995. Keratins as Markers of Differentiated Taste Cells of the Rat. *Differentiation; research in biological diversity*. 58:341-349.
- Koepsell, H., B.M. Schmitt, and V. Gorboulev. 2003. iso. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 150:36-90.
- Krasteva, G., B.J. Canning, P. Hartmann, T.Z. Veres, T. Papadakis, C. Muhlfeld, K. Schliecker, Y.N. Tallini, A. Braun, H. Hackstein, N. Baal, E. Weihe, B. Schutz, M. Kotlikoff, I. Ibanez-Tallon, and W. Kummer. 2011. Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:9478-9483.
- Krasteva, G., B.J. Canning, T. Papadakis, and W. Kummer. 2012a. Cholinergic brush cells in the trachea mediate respiratory responses to quorum sensing molecules. *Life sciences*. 91:992-996.
- Krasteva, G., P. Hartmann, T. Papadakis, M. Bodenbenner, L. Wessels, E. Weihe, B. Schutz, A.C. Langheinrich, V. Chubanov, T. Gudermann, I. Ibanez-Tallon, and W. Kummer. 2012b. Cholinergic chemosensory cells in the auditory tube. *Histochemistry and cell biology*. 137:483-497.
- Krasteva, G., and W. Kummer. 2012. "Tasting" the airway lining fluid. *Histochemistry and cell biology*. 138:365-383.

- Kugler, P., D. Hofer, B. Mayer, and D. Drenckhahn. 1994. Nitric oxide synthase and NADP-linked glucose-6-phosphate dehydrogenase are co-localized in brush cells of rat stomach and pancreas. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 42:1317-1321.
- Kummer, W., and G. Krasteva-Christ. 2014. Non-neuronal cholinergic airway epithelium biology. *Curr Opin Pharmacol*. 16:43-49.
- Kummer, W., S. Wiegand, S. Akinci, A.H. Schinkel, J. Wess, H. Koepsell, R.V. Haberberger, and K.S. Lips. 2006. Role of acetylcholine and muscarinic receptors in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 30:67-68.
- Kuo, Y., L. Lucero, J. Michaels, D. DeLuca, and R.J. Lukas. 2002. Differential expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in fetal and neonatal mouse thymus. *Journal of neuroimmunology*. 130:140-154.
- Kurzen, H., I. Wessler, C.J. Kirkpatrick, K. Kawashima, and S.A. Grando. 2007. The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res*. 39:125-135.
- Laan, M., and P. Peterson. 2013. The many faces of aire in central tolerance. *Front Immunol*. 4:326.
- Ladi, E., X. Yin, T. Chtanova, and E.A. Robey. 2006. Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nature immunology*. 7:338-343.
- Lanza, R.P. 2004. Handbook of stem cells. Elsevier Academic, Boston, MA.
- Lauweryns, J.M., and L. Van Ranst. 1988. Protein gene product 9.5 expression in the lungs of humans and other mammals. Immunocytochemical detection in neuroepithelial bodies, neuroendocrine cells and nerves. *Neurosci Lett*. 85:311-316.
- Le Douarin, N.M., and F.V. Jotereau. 1975. Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J Exp Med*. 142:17-40.
- Lee, E.N., J.K. Park, J.R. Lee, S.O. Oh, S.Y. Baek, B.S. Kim, and S. Yoon. 2011. Characterization of the expression of cytokeratins 5, 8, and 14 in mouse thymic epithelial cells during thymus regeneration following acute thymic involution. *Anatomy & cell biology*. 44:14-24.
- Lee, R.J., J.M. Kofonow, P.L. Rosen, A.P. Siebert, B. Chen, L. Doghramji, G. Xiong, N.D. Adappa, J.N. Palmer, D.W. Kennedy, J.L. Kreindler, R.F. Margolskee, and N.A. Cohen. 2014. Bitter and sweet taste receptors regulate human upper respiratory innate immunity. *The Journal of clinical investigation*. 124:1393-1405.
- Lee, R.J., G. Xiong, J.M. Kofonow, B. Chen, A. Lysenko, P. Jiang, V. Abraham, L. Doghramji, N.D. Adappa, J.N. Palmer, D.W. Kennedy, G.K. Beauchamp, P.T. Doulias, H. Ischiropoulos, J.L. Kreindler, D.R. Reed, and N.A. Cohen. 2012. T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *The Journal of clinical investigation*. 122:4145-4159.
- Leeson, T.S. 1961. The development of the trachea in the rabbit, with particular reference to its fine structure. *Anat Anz*. 110:214-223.
- Li, X., L. Staszewski, H. Xu, K. Durick, M. Zoller, and E. Adler. 2002. Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:4692-4696.
- Liepinsh, D.J., A.A. Kruglov, A.R. Galimov, A.N. Shakhov, Y.V. Shebzukhov, A.A. Kuchmiy, S.I. Grivennikov, A.V. Tumanov, M.S. Drutskaya, L. Feigenbaum, D.V. Kuprash, and S.A. Nedospasov. 2009. Accelerated thymic atrophy as a result of elevated homeostatic expression of the genes encoded by the TNF/lymphotoxin cytokine locus. *European journal of immunology*. 39:2906-2915.
- Lind, E.F., S.E. Prockop, H.E. Porritt, and H.T. Petrie. 2001. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med*. 194:127-134.

- Lindemann, B. 2001. Receptors and transduction in taste. *Nature*. 413:219-225.
- Lindstrom, J.M., M.E. Seybold, V.A. Lennon, S. Whittingham, and D.D. Duane. 1976. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology*. 26:1054-1059.
- Lips, K.S., C. Volk, B.M. Schmitt, U. Pfeil, P. Arndt, D. Miska, L. Ermert, W. Kummer, and H. Koepsell. 2005. Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 33:79-88.
- Lips, K.S., J. Wunsch, S. Zarghooni, T. Bschiepfer, K. Schukowski, W. Weidner, I. Wessler, U. Schwantes, H. Koepsell, and W. Kummer. 2007. Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur Urol*. 51:1042-1053.
- Liston, A., S. Lesage, J. Wilson, L. Peltonen, and C.C. Goodnow. 2003. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nature immunology*. 4:350-354.
- Liu, P., B.P. Shah, S. Croasdell, and T.A. Gilbertson. 2011. Transient receptor potential channel type M5 is essential for fat taste. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 31:8634-8642.
- Luciano, L., M. Castellucci, and E. Reale. 1981. The brush cells of the common bile duct of the rat. This section, freeze-fracture and scanning electron microscopy. *Cell and tissue research*. 218:403-420.
- Luciano, L., and E. Reale. 1990. Brush cells of the mouse gallbladder. A correlative light- and electron-microscopical study. *Cell and tissue research*. 262:339-349.
- Luciano, L., E. Reale, and H. Ruska. 1968a. [On a "chemoreceptive" sensory cell in the tachea of the rat]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 85:350-375.
- Luciano, L., E. Reale, and H. Ruska. 1968b. [On a glycogen containing brush cell in the rectum of the rat]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 91:153-158.
- Luciano, L., E. Reale, and H. Ruska. 1969. [Brush cells in the alveolar epithelium of the rat lung]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 95:198-201.
- Luciano, L.R.E. 1979. A new morphological aspect of the brush cells of the mouse gallbladder epithelium. *Cell and tissue research*.
- Lynch, H.E., G.L. Goldberg, A. Chidgey, M.R. Van den Brink, R. Boyd, and G.D. Sempowski. 2009. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol*. 30:366-373.
- Mahata, S.K., M. Mahata, R.J. Parmer, and D.T. O'Connor. 1999. Desensitization of catecholamine release. The novel catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin a344-364) acts at the receptor to prevent nicotinic cholinergic tolerance. *The Journal of biological chemistry*. 274:2920-2928.
- Mahata, S.K., D.T. O'Connor, M. Mahata, S.H. Yoo, L. Taupenot, H. Wu, B.M. Gill, and R.J. Parmer. 1997. Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *The Journal of clinical investigation*. 100:1623-1633.
- Marks, P.W., M. Arai, J.L. Bandura, and D.J. Kwiatkowski. 1998. Advillin (p92): a new member of the gelsolin/villin family of actin regulatory proteins. *J Cell Sci*. 111 (Pt 15):2129-2136.
- Maslinski, W., E. Grabczewska, H. Laskowska-Bozek, and J. Ryzewski. 1987. Expression of muscarinic cholinergic receptors during T cell maturation in the thymus. *European journal of immunology*. 17:1059-1063.
- Masturzo, P., M. Salmons, O. Nordstrom, S. Consolo, and H. Ladinsky. 1985. Intact human lymphocyte membranes respond to muscarinic receptor stimulation by oxotremorine with marked changes in microviscosity and an increase in cyclic GMP. *FEBS Lett*. 192:194-198.
- Mathis, D., and C. Benoist. 2009. Aire. *Annu Rev Immunol*. 27:287-312.
- Mattes, R.D. 2009. Oral detection of short-, medium-, and long-chain free fatty acids in humans. *Chemical senses*. 34:145-150.
- McLaughlin, S.K., P.J. McKinnon, and R.F. Margolskee. 1992. Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature*. 357:563-569.

- Merigo, F., D. Benati, M. Tizzano, F. Osculati, and A. Sbarbati. 2005. alpha-Gustducin immunoreactivity in the airways. *Cell and tissue research*. 319:211-219.
- Meyrick, B., and L. Reid. 1968. The alveolar brush cell in rat lung--a third pneumonocyte. *J Ultrastruct Res*. 23:71-80.
- Middlebrook, A.J., C. Martina, Y. Chang, R.J. Lukas, and D. DeLuca. 2002. Effects of nicotine exposure on T cell development in fetal thymus organ culture: arrest of T cell maturation. *Journal of immunology*. 169:2915-2924.
- Mihovilovic, M., and J. Butterworth-Robinette. 2001. Thymic epithelial cell line expresses transcripts encoding alpha-3, alpha-5 and beta-4 subunits of acetylcholine receptors, responds to cholinergic agents and expresses choline acetyl transferase. An in vitro system to investigate thymic cholinergic mechanisms. *Journal of neuroimmunology*. 117:58-67.
- Mihovilovic, M., S. Denning, Y. Mai, L.P. Whichard, D.D. Patel, and A.D. Roses. 1997. Thymocytes and cultured thymic epithelial cells express transcripts encoding alpha-3, alpha-5 and beta-4 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: preferential transcription of the alpha-3 and beta-4 genes by immature CD4 + 8 + thymocytes. *Journal of neuroimmunology*. 79:176-184.
- Moll, R., W.W. Franke, D.L. Schiller, B. Geiger, and R. Krepler. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 31:11-24.
- von Moltke, J., M. Ji, H.E. Liang, and R.M. Locksley. 2016. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature*. 529:221-225.
- Monteiro-Riviere, N.A., and J.A. Popp. 1984. Ultrastructural characterization of the nasal respiratory epithelium in the rat. *The American journal of anatomy*. 169:31-43.
- Morrison, S.J., N. Uchida, and I.L. Weissman. 1995. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 11:35-71.
- Mukherjee, M., M.L. Latif, D.I. Pritchard, and C. Bosquillon. 2013. In-cell Western detection of organic cation transporters in bronchial epithelial cell layers cultured at an air-liquid interface on Transwell((R)) inserts. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 68:184-189.
- Murphy, K. 2012. Janeway's immunobiology. Garland Science, London u.a.
- Nabeyama, A., and C.P. Leblond. 1974. "Caveolated cells" characterized by deep surface invaginations and abundant filaments in mouse gastro-intestinal epithelia. *The American journal of anatomy*. 140:147-165.
- Nachmansohn, D., and A.L. Machado. 1943. The formation of acetylcholine. A new enzyme: "Choline acetylse".
- Nakanishi, T., Y. Hasegawa, T. Haruta, T. Wakayama, and I. Tamai. 2013. In vivo evidence of organic cation transporter-mediated tracheal accumulation of the anticholinergic agent ipratropium in mice. *J Pharm Sci*. 102:3373-3381.
- Nelson, G., M.A. Hoon, J. Chandrashekar, Y. Zhang, N.J. Ryba, and C.S. Zuker. 2001. Mammalian sweet taste receptors. *Cell*. 106:381-390.
- Nordman, J.C., P. Muldoon, S. Clark, M.I. Damaj, and N. Kabbani. 2014. The alpha4 nicotinic receptor promotes CD4+ T-cell proliferation and a helper T-cell immune response. *Molecular pharmacology*. 85:50-61.
- Ogura, T., K. Krosnowski, L. Zhang, M. Bekkerman, and W. Lin. 2010. Chemoreception regulates chemical access to mouse vomeronasal organ: role of solitary chemosensory cells. *PloS one*. 5:e11924.
- Ogura, T., S.A. Szebenyi, K. Krosnowski, A. Sathyanesan, J. Jackson, and W. Lin. 2011. Cholinergic microvillous cells in the mouse main olfactory epithelium and effect of acetylcholine on olfactory sensory neurons and supporting cells. *J Neurophysiol*. 106:1274-1287.
- Okuda, T., and T. Haga. 2000. Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett*. 484:92-97.

- Okuda, T., T. Haga, Y. Kanai, H. Endou, T. Ishihara, and I. Katsura. 2000. Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nature neuroscience*. 3:120-125.
- Panneck, A.R., A. Rafiq, B. Schutz, A. Soultanova, K. Deckmann, V. Chubanov, T. Gudermann, E. Weihe, G. Krasteva-Christ, V. Grau, A. del Rey, and W. Kummer. 2014. Cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in murine thymic medulla. *Cell and tissue research*. 358:737-748.
- Papadopoulou, A.S., J. Dooley, M.A. Linterman, W. Pierson, O. Ucar, B. Kyewski, S. Zuklys, G.A. Hollander, P. Matthys, D.H. Gray, B. De Strooper, and A. Liston. 2012. The thymic epithelial microRNA network elevates the threshold for infection-associated thymic involution via miR-29a mediated suppression of the IFN-alpha receptor. *Nature immunology*. 13:181-187.
- Parham, P. 2005. The immune system. Garland Science u.a., New York, NY u.a.
- Parnavelas, J.G., W. Kelly, and G. Burnstock. 1985. Ultrastructural localization of choline acetyltransferase in vascular endothelial cells in rat brain. *Nature*. 316:724-725.
- Pavelka, M., H.R. Ronge, and G. Stockinger. 1976. [Comparative study of tracheal epithelium of different mammals]. *Acta Anat (Basel)*. 94:262-282.
- Penit, C., and F. Vasseur. 1989. Cell proliferation and differentiation in the fetal and early postnatal mouse thymus. *Journal of immunology*. 142:3369-3377.
- Pochini, L., M. Scalise, M. Galluccio, G. Pani, K.A. Siminovitch, and C. Indiveri. 2012. The human OCTN1 (SLC22A4) reconstituted in liposomes catalyzes acetylcholine transport which is defective in the mutant L503F associated to the Crohn's disease. *Biochim Biophys Acta*. 1818:559-565.
- Poea-Guyon, S., P. Christadoss, R. Le Panse, T. Guyon, M. De Baets, A. Wakkach, J. Bidault, S. Tzartos, and S. Berrih-Aknin. 2005. Effects of cytokines on acetylcholine receptor expression: implications for myasthenia gravis. *Journal of immunology*. 174:5941-5949.
- Prandi, S., M. Bromke, S. Hubner, A. Voigt, U. Boehm, W. Meyerhof, and M. Behrens. 2013. A subset of mouse colonic goblet cells expresses the bitter taste receptor Tas2r131. *PloS one*. 8:e82820.
- Rabbi, M.F., B. Labis, M.H. Metz-Boutigue, C.N. Bernstein, and J.E. Ghia. 2014. Catestatin decreases macrophage function in two mouse models of experimental colitis. *Biochem Pharmacol*. 89:386-398.
- Radek, K.A., B. Lopez-Garcia, M. Hupe, I.R. Niesman, P.M. Elias, L. Taupenot, S.K. Mahata, D.T. O'Connor, and R.L. Gallo. 2008. The neuroendocrine peptide catestatin is a cutaneous antimicrobial and induced in the skin after injury. *J Invest Dermatol*. 128:1525-1534.
- Raica, M., S. Encica, A. Motoc, A.M. Cimpean, T. Scridon, and M. Barsan. 2006. Structural heterogeneity and immunohistochemical profile of Hassall corpuscles in normal human thymus. *Ann Anat*. 188:345-352.
- Ravenall, S.J., I. Gavazzi, J.N. Wood, and A.N. Akopian. 2002. A peripheral nervous system actin-binding protein regulates neurite outgrowth. *Eur J Neurosci*. 15:281-290.
- Raviola, E., and M.J. Karnovsky. 1972. Evidence for a blood-thymus barrier using electron-opaque tracers. *J Exp Med*. 136:466-498.
- Reid, L., B. Meyrick, V.B. Antony, L.Y. Chang, J.D. Crapo, and H.Y. Reynolds. 2005. The mysterious pulmonary brush cell: a cell in search of a function. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 172:136-139.
- Rhodin, J., and T. Dalhamn. 1956. Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 44:345-412.
- Rhodin, J.A. 1966. The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *Am Rev Respir Dis*. 93:Suppl:1-15.

- Rinner, I., A. Globerson, K. Kawashima, W. Korsatko, and K. Schauenstein. 1999. A possible role for acetylcholine in the dialogue between thymocytes and thymic stroma. *Neuroimmunomodulation*. 6:51-55.
- Rode, J., A.P. Dhillon, J.F. Doran, P. Jackson, and R.J. Thompson. 1985. PGP 9.5, a new marker for human neuroendocrine tumours. *Histopathology*. 9:147-158.
- Romanov, R.A., O.A. Rogachevskaja, M.F. Bystrova, P. Jiang, R.F. Margolskee, and S.S. Kolesnikov. 2007. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *The EMBO journal*. 26:657-667.
- Roper, S.D. 2006. Cell communication in taste buds. *Cell Mol Life Sci*. 63:1494-1500.
- Roper, S.D. 2013. Taste buds as peripheral chemosensory processors. *Seminars in cell & developmental biology*. 24:71-79.
- Rosenfeld, M.G., S.G. Amara, and R.M. Evans. 1984. Alternative RNA processing: determining neuronal phenotype. *Science*. 225:1315-1320.
- Rosenfeld, M.G., J.J. Mermod, S.G. Amara, L.W. Swanson, P.E. Sawchenko, J. Rivier, W.W. Vale, and R.M. Evans. 1983. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*. 304:129-135.
- Ross, E.A., R.E. Coughlan, A. Flores-Langarica, S. Lax, J. Nicholson, G.E. Desanti, J.L. Marshall, S. Bobat, J. Hitchcock, A. White, W.E. Jenkinson, M. Khan, I.R. Henderson, G.G. Lavery, C.D. Buckley, G. Anderson, and A.F. Cunningham. 2012. Thymic function is maintained during Salmonella-induced atrophy and recovery. *Journal of immunology*. 189:4266-4274.
- Rössler, P., I. Boekhoff, E. Tareilus, S. Beck, H. Breer, and J. Freitag. 2000. G protein betagamma complexes in circumvallate taste cells involved in bitter transduction. *Chemical senses*. 25:413-421.
- Rössler, P., C. Kroner, J. Freitag, J. Noè, and H. Breer. 1998. Identification of a phospholipase C β subtype in rat taste cells. *European Journal of Cell Biology*. 77:253-261.
- Rouse, R.V., L.M. Bolin, J.R. Bender, and B.A. Kyewski. 1988. Monoclonal antibodies reactive with subsets of mouse and human thymic epithelial cells. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 36:1511-1517.
- Sahu, B.S., J. Mohan, G. Sahu, P.K. Singh, P.J. Sonawane, B.K. Sasi, P.K. Allu, S.K. Maji, A.K. Bera, S. Senapati, and N.R. Mahapatra. 2012. Molecular interactions of the physiological anti-hypertensive peptide catestatin with the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *J Cell Sci*. 125:2323-2337.
- Salomon, J.J., S. Endter, G. Tachon, F. Falson, S.T. Buckley, and C. Ehrhardt. 2012. Transport of the fluorescent organic cation 4-(4-(dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium iodide (ASP+) in human respiratory epithelial cells. *Eur J Pharm Biopharm*. 81:351-359.
- Saunders, C.J., M. Christensen, T.E. Finger, and M. Tizzano. 2014. Cholinergic neurotransmission links solitary chemosensory cells to nasal inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111:6075-6080.
- Savino, W., and M. Dardenne. 1988. Immunohistochemical studies on a human thymic epithelial cell subset defined by the anti-cytokeratin 18 monoclonal antibody. *Cell and tissue research*. 254:225-231.
- Sbarbati, A., F. Merigo, D. Benati, M. Tizzano, P. Bernardi, and F. Osculati. 2004. Laryngeal chemosensory clusters. *Chemical senses*. 29:683-692.
- Sbarbati, A., and F. Osculati. 2005. A new fate for old cells: brush cells and related elements. *Journal of anatomy*. 206:349-358.
- Schluep, M., N. Willcox, A. Vincent, G.K. Dhoot, and J. Newsom-Davis. 1987. Acetylcholine receptors in human thymic myoid cells in situ: an immunohistological study. *Ann Neurol*. 22:212-222.
- Schuurman, H.J., C.F. Kuper, and M.D. Kendall. 1997. Thymic microenvironment at the light microscopic level. *Microscopy research and technique*. 38:216-226.

- Sekerikova, G., L. Zheng, P.A. Loomis, B. Changyaleket, D.S. Whitlon, E. Mugnaini, and J.R. Bartles. 2004. Espins are multifunctional actin cytoskeletal regulatory proteins in the microvilli of chemosensory and mechanosensory cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 24:5445-5456.
- Shelukhina, I.V., E.V. Kryukova, K.S. Lips, V.I. Tsetlin, and W. Kummer. 2009. Presence of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on dorsal root ganglion neurons proved using knockout mice and selective alpha-neurotoxins in histochemistry. *J Neurochem*. 109:1087-1095.
- Shezen, E., E. Okon, H. Ben-Hur, and O. Abramsky. 1995. Cytokeratin expression in human thymus: immunohistochemical mapping. *Cell and tissue research*. 279:221-231.
- Silacci, P., L. Mazzolai, C. Gauci, N. Stergiopoulos, H.L. Yin, and D. Hayoz. 2004. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci*. 61:2614-2623.
- Silva, D.G. 1966. The fine structure of multivesicular cells with large microvilli in the epithelium of the mouse colon. *J Ultrastruct Res*. 16:693-705.
- Singh, U., J.A. Fatani, and A.M. Mohajir. 1987. Ontogeny of cholinergic innervation of thymus in mouse. *Developmental and comparative immunology*. 11:627-635.
- Slitt, A.L., N.J. Cherrington, D.P. Hartley, T.M. Leazer, and C.D. Klaassen. 2002. Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels. *Drug Metab Dispos*. 30:212-219.
- Small, D.M. 2006. Central gustatory processing in humans. *Adv Otorhinolaryngol*. 63:191-220.
- Soultanova, A., A.R. Panneck, A. Rafiq, and W. Kummer. 2014. Terminally differentiated epithelial cells of the thymic medulla and skin express nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 3. *BioMed research international*. 2014:757502.
- Soultanova, A., A. Voigt, V. Chubanov, T. Gudermann, W. Meyerhof, U. Boehm, and W. Kummer. 2015. Cholinergic chemosensory cells of the thymic medulla express the bitter receptor Tas2r131. *Int Immunopharmacol*. 29:143-147.
- Steinmann, G.G. 1986. Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol*. 75:43-88.
- Steinmann, G.G., B. Klaus, and H.K. Muller-Hermelink. 1985. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J Immunol*. 22:563-575.
- Strom, T.B., A.J. Sytkowski, C.B. Carpenter, and J.P. Merrill. 1974. Cholinergic augmentation of lymphocyte-mediated cytotoxicity. A study of the cholinergic receptor of cytotoxic T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 71:1330-1333.
- Surh, C.D., and J. Sprent. 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*. 372:100-103.
- Suster, S., and J. Rosai. 1990. Histology of the normal thymus. *Am J Surg Pathol*. 14:284-303.
- Taira, K., and S. Shibasaki. 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". *Arch Histol Jpn*. 41:351-366.
- Takaba, H., Y. Morishita, Y. Tomofuji, L. Danks, T. Nitta, N. Komatsu, T. Kodama, and H. Takayanagi. 2015. Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell*. 163:975-987.
- Tallini, Y.N., B. Shui, K.S. Greene, K.Y. Deng, R. Doran, P.J. Fisher, W. Zipfel, and M.I. Kotlikoff. 2006. BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons. *Physiological genomics*. 27:391-397.

- Taupenot, L., K.L. Harper, and D.T. O'Connor. 2003. The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med.* 348:1134-1149.
- Thompson, R.J., J.F. Doran, P. Jackson, A.P. Dhillon, and J. Rode. 1983. PGP 9.5--a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res.* 278:224-228.
- Tizzano, M., M. Cristofolletti, A. Sbarbati, and T.E. Finger. 2011. Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways. *BMC Pulm Med.* 11:3.
- Tizzano, M., B.D. Gulbransen, A. Vandenbeuch, T.R. Clapp, J.P. Herman, H.M. Sibhatu, M.E. Churchill, W.L. Silver, S.C. Kinnamon, and T.E. Finger. 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.* 107:3210-3215.
- Tizzano, M., F. Merigo, and A. Sbarbati. 2006. Evidence of solitary chemosensory cells in a large mammal: the diffuse chemosensory system in *Bos taurus* airways. *Journal of anatomy.* 209:333-337.
- Tosi, P., R. Kraft, P. Luzi, M. Cintorino, G. Fankhauser, M.W. Hess, and H. Cottier. 1982. Involution patterns of the human thymus. I Size of the cortical area as a function of age. *Clin Exp Immunol.* 47:497-504.
- Treuting, P.M., and S.M. Dintzis. 2011. Comparative anatomy and histology : a mouse and human atlas. Academic, Oxford.
- Tria, M.A., G. Vantini, M.G. Fiori, and A. Rossi. 1992. Choline acetyltransferase activity in murine thymus. *Journal of neuroscience research.* 31:380-386.
- Trier, J.S., C.H. Allan, M.A. Marcial, and J.L. Madara. 1987. Structural features of the apical and tubulovesicular membranes of rodent small intestinal tuft cells. *The Anatomical record.* 219:69-77.
- Tsetlin, V.I., and F. Hucho. 2004. Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Lett.* 557:9-13.
- Vincent, A. 1980. Immunology of acetylcholine receptors in relation to myasthenia gravis. *Physiological reviews.* 60:756-824.
- Vincent, A. 2002. Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nat Rev Immunol.* 2:797-804.
- Voigt, A., S. Hubner, K. Lossow, I. Hermans-Borgmeyer, U. Boehm, and W. Meyerhof. 2012. Genetic labeling of Tas1r1 and Tas2r131 taste receptor cells in mice. *Chemical senses.* 37:897-911.
- Wakkach, A., T. Guyon, C. Bruand, S. Tzartos, S. Cohen-Kaminsky, and S. Berrih-Aknin. 1996. Expression of acetylcholine receptor genes in human thymic epithelial cells: implications for myasthenia gravis. *Journal of immunology.* 157:3752-3760.
- Wakkach, A., S. Poeta, E. Chastre, C. Gespach, F. Lecerf, S. De La Porte, S. Tzartos, A. Coulombe, and S. Berrih-Aknin. 1999. Establishment of a human thymic myoid cell line. Phenotypic and functional characteristics. *Am J Pathol.* 155:1229-1240.
- Wattel, W., and J.J. Geuze. 1978. The cells of the rat gastric groove and cardia. An ultrastructural and carbohydrate histochemical study, with special reference to the fibrillovesicular cells. *Cell and tissue research.* 186:375-391.
- Weiler, R., R. Fischer-Colbrie, K.W. Schmid, H. Feichtinger, G. Bussolati, L. Grimelius, K. Krisch, H. Kerl, D. O'Connor, and H. Winkler. 1988. Immunological studies on the occurrence and properties of chromogranin A and B and secretogranin II in endocrine tumors. *Am J Surg Pathol.* 12:877-884.
- Wekerle, H., U.P. Ketelsen, A.D. Zurn, and B.W. Fulpius. 1978. Intrathymic pathogenesis of myasthenia gravis: transient expression of acetylcholine receptors on thymus-derived myogenic cells. *European journal of immunology.* 8:579-582.

- Weksler, M.E., G. Pawelec, and C. Franceschi. 2009. Immune therapy for age-related diseases. *Trends Immunol.* 30:344-350.
- Wessler, I., and C.J. Kirkpatrick. 2008. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British journal of pharmacology.* 154:1558-1571.
- Wessler, I., C.J. Kirkpatrick, and K. Racke. 1998. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacology & therapeutics.* 77:59-79.
- Wessler, I., C.J. Kirkpatrick, and K. Racke. 1999. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 26:198-205.
- Wessler, I., E. Roth, C. Deutsch, P. Brockerhoff, F. Bittinger, C.J. Kirkpatrick, and H. Kilbinger. 2001. Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *British journal of pharmacology.* 134:951-956.
- Wessler, I.K., and C.J. Kirkpatrick. 2001. The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther.* 14:423-434.
- Weyrauch, K.D., and B. Schnorr. 1976. [Ultrastructure of the epithelium of the major pancreatic duct in sheep]. *Acta Anat (Basel).* 96:232-247.
- Wheatley, L.M., D. Urso, K. Tumas, J. Maltzman, E. Loh, and A.I. Levinson. 1992. Molecular evidence for the expression of nicotinic acetylcholine receptor alpha-chain in mouse thymus. *Journal of immunology.* 148:3105-3109.
- Wiederhold, S., T. Papadakis, V. Chubanov, T. Gudermann, G. Krasteva-Christ, and W. Kummer. 2015. A novel cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in the murine conjunctiva. *Int Immunopharmacol.*
- Williams, J.M., and D.L. Felten. 1981. Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: a comparative histofluorescence study. *The Anatomical record.* 199:531-542.
- Zancanaro, C., C.M. Caretta, F. Merigo, A. Cavaggioni, and F. Osculati. 1999. alpha-Gustducin expression in the vomeronasal organ of the mouse. *Eur J Neurosci.* 11:4473-4475.

8 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

1. Panneck, A.R., A. Rafiq, B. Schutz, A. Soultanova, K. Deckmann, V. Chubanov, T. Gudermann, E. Weihe, G. Krasteva-Christ, V. Grau, A. del Rey, and W. Kummer. 2014. Cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in murine thymic medulla. *Cell and tissue research*. 358:737-748
2. Soultanova, A., A.R. Panneck, A. Rafiq, and W. Kummer. 2014. Terminally differentiated epithelial cells of the thymic medulla and skin express nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 3. *BioMed research international*. 2014:757502.

Abstracts

1. Panneck A., Rafiq A., Papadakis T., Deckmann K., Kripp G., Magdowski G., Schütz B., Weihe E., Grau V., Krasteva G., Kummer W. (2013) A cholinergic cell with brush cell characteristics in the thymic medulla. doi:10.1016/j.autneu.2013.05.136; Joint meeting ISAN-EFAS 2013, Gießen
2. Panneck A., Rafiq A., Papadakis T., Kripp G., Schütz B., Weihe E., Grau V., Krasteva-Christ G., Kummer W. (2013) A cholinergic cell with brush cell characteristics in the thymic medulla. 30. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg.
3. Panneck A., Rafiq A., Schütz B., Soultanova A., Deckmann K., Chubanov V., Gudermann T., Weihe E., Krasteva-Christ G., Grau V., del Rey A., Kummer W. (2014) A cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in the murine thymic medulla. 4th International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine, Gießen.

9 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

10 Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich sehr herzlich bei allen Menschen bedanken, die mir bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit geholfen und mich stets unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich Herrn Professor Dr. Wolfgang Kummer ein ganz besonders herzliches Dankeschön widmen. Er hat mich vom ersten Tag meiner Forschungsarbeit kollegial in seine Arbeitsgruppe aufgenommen. Ich möchte mich bei Ihm für die Überlassung des Themas, für die unermüdliche, hilfreiche und freundliche persönliche Betreuung sowie die fachliche Inspiration und Motivation bedanken.

Als Stipendiatin der LOEWE-Stiftung des Landes Hessen wusste ich insbesondere die Seminare des LOEWE-Schwerpunktes „Non-neuronal cholinergic systems“ zu schätzen, bei denen ich mich weiter fortbilden konnte.

Für hilfreiche Diskussionen und Ideen bedanke ich mich bei Frau Professor Dr. Gabriela Krasteva-Christ, bei Herrn Dr. Amir Rafiq und bei Herrn Dr. Klaus Deckmann.

Ich möchte mich besonders bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kardiopulmonale Neurobiologie für die Einarbeitung in das Labor, die vielen nützlichen Ratschläge, die netten und unterhaltsamen Gespräche im Sozialraum und das freundschaftliche Arbeitsverhältnis bedanken. Mein besonderer Dank geht hierbei an Frau Tamara Papadakis für die Betreuung und Unterstützung bei der Immunhistochemie und der Anfertigung von elektronenmikroskopischen Präparaten. Bei Herrn Martin Bodenbenner möchte ich mich zum einen für die Hilfe bei der Tiertötung und der Perfusionsfixation der Mäuse bedanken, zum anderen dafür, dass er jederzeit ein offenes Ohr für meine unzähligen Fragen hatte. Mein besonderer Dank geht auch an Frau Karola Michael, die mir bei der Gestaltung der Abbildungen und bei computertechnischen Fragen zur Seite stand und mit der ich nette Gespräche in unserem Arbeitszimmer führte. Frau Patricia Berger danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Literaturrecherche, die administrative Hilfe und die freundlichen Gespräche zwischendurch.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Gerhard Kripp und Herrn Gerd Magdowski aus der Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie und allen Mitarbeitern der Anatomie bedanken, die mir bei den Experimenten zur Seite standen.

Herrn Holger Ries danke ich für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit.

Meinen Eltern und meiner Schwester Patricia danke ich für die seelische Unterstützung und den liebevollen Rückhalt. Besonders meinem Vater danke ich für den Zuspruch,

das Vertrauen in mich und die kontinuierliche Motivation, meine Ziele und Pläne schnellstmöglich – auch wenn dies manchmal länger dauerte als geplant – in die Tat umzusetzen.

Bei meinem Freund Felix bedanke ich mich für sprachliche Ratschläge, sein unerschütterliches Durchhaltevermögen beim Zuhören, seine moralische Unterstützung und dafür, dass er immer an mich geglaubt hat.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6592-8



9 17 8 3 8 3 5 19 6 5 9 2 8

Foto Buchumschlag: © Aus Panneck et al., 2014, mit freundlicher Genehmigung von Cell and Tissue Research.