

Funktionelle Charakterisierung der Bürstenzellen des Thymus der Maus

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Chen Cen

aus Nanjing

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Anatomie und Zellbiologie

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Gutachterin: PD Dr. Jacqueline Heger

Tag der Disputation: 04.04.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Thymus.....	1
1.1.1	Lokalisation und Embryologie.....	1
1.1.2	Morphologie.....	1
1.1.3	Zellen.....	3
1.1.4	Funktion.....	4
1.1.5	Involution.....	6
1.1.6	Cholinerges System im Thymus.....	7
1.2	Bürstenzellen.....	8
1.2.1	Morphologie und Lokalisationen.....	8
1.2.2	Chemosensorik.....	10
1.2.3	Signaltransduktion.....	11
1.2.4	Funktion.....	12
1.2.5	Bürstenzellen im Thymus.....	13
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	14
2	Material und Methode	16
2.1	Material.....	16
2.1.1	Versuchstiere.....	16
2.1.2	Lösungen.....	17
2.1.3	Pharmaka/Chemikalien.....	18
2.1.4	Primäre Antikörper.....	19
2.1.5	Sekundäre Antikörper.....	20
2.1.6	Fluorochrommarkierte Antikörper.....	21
2.1.7	Primer.....	21
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Tötung der Maus und Gewebeentnahme.....	27
2.2.2	Zellisolation.....	27
2.2.3	Immunhistochemie an Gewebeschnitten.....	28

2.2.4	Immunhistochemie an isolierten Zellen	30
2.2.5	Durchflusszytometrie	31
2.2.6	RT-PCR aus Thymusgewebe	31
2.2.7	RT-PCR aus mit FACS isolierten Zellen	33
2.2.8	Zellenpicken und Deep Sequencing	34
2.2.9	Kalziummessungen an isolierten Zellen aus dem Thymus	35
2.2.10	Statistische Auswertung	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Immunhistochemische Phänotypen der Bürstenzellen im Thymus	37
3.2	Expression von Geschmacksrezeptoren im Thymus.....	39
3.3	Identifizierung und Anreicherung der Bürstenzellen aus dem Thymus.....	43
3.4	Vorkommen von <i>aire</i> , <i>h2-aa</i> (MHC-II), <i>cd45</i> und <i>tas2r104</i> in Bürstenzellen des Thymus	46
3.4.1	RT-PCR von mit FACS isolierten Zellen	46
3.4.2	Deep Sequencing von Einzelzellen	48
3.5	Denatonium löst eine Reaktion in den Bürstenzellen und den ChAT- eGFP-negativen Zellen aus	50
3.5.1	Denatonium erzeugt einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$	50
3.5.2	Der durch Denatonium induzierte Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ist unabhängig von der kanonischen Geschmackskaskade.....	52
3.5.3	Keine cholinerge auto- oder parakrine Stimulation der Bürsten- und Umgebungszellen nach Gabe von Denatonium	56
3.6	Weitere Bitterrezeptoragonisten.....	59
4	Diskussion	63
4.1	Heterogenität der thymalen Bürstenzellen	63
4.2	AIRE, MHC-II und CD45	66
4.3	Chemosensorische Funktion	68
4.4	Cholinerge Signaltransduktion	71
4.5	Schlussfolgerung und Hypothese	73

5	Zusammenfassung.....	75
6	Summary	76
7	Abkürzungsverzeichnis.....	77
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	81
9	Literaturverzeichnis.....	83
10	Erklärung zur Dissertation	101
11	Danksagung.....	102

1 Einleitung

1.1 Thymus

1.1.1 Lokalisation und Embryologie

Der Thymus, auch Bries genannt, befindet sich bei Menschen und Mäusen im oberen Mediastinum direkt hinter dem Sternum, vor dem Herzbeutel. Er ist für die Reifung der Thymozyten zu immunkompetenten T-Lymphozyten verantwortlich und gehört neben dem Knochenmark, dem Zentralorgan des B-Zell-Systems, ebenfalls zu den primären lymphatischen Organen (Miller 1961). Zusammen dienen sie dem adaptiven Teil der Immunabwehr.

Embryologisch hat der Mäusethymus seinen Ursprung im Endoderm der dritten Schlundtasche (Blackburn et al. 2002; Blackburn und Manley 2004). Eine Beteiligung des Ektoderms der dritten Schlundfurche an der Entwicklung vom Thymus war umstritten. Die Theorie, nach der die Rinde des Thymus eine ektodermale und das Thymusmark eine endodermale Herkunft besitzt (Cordier und Haumont 1980; Cordier und Heremans 1975), wurde später in Experimenten widerlegt (Abramson und Anderson 2017; Rodewald 2008). So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass ein vollständiger und funktionstüchtiger Mäusethymus sich allein aus dem isolierten Endoderm der dritten Schlundfurche, ohne Beteiligung des Ektoderms, entwickeln konnte (Gordon et al. 2004). Von der Schlundtasche aus wandert die Thymusanlage nach kaudal und verschmilzt im vorderen Mediastinum mit der Anlage der Gegenseite (Müller-Hermelink und Kreipe 2019). Die so gebildete epitheliale Anlage wird zunächst von lymphatischen Vorläuferzellen der fetalen Blutbildungsstätten und später aus dem Knochenmark besiedelt (Dieterlen-Lievre et al. 1994; Morrison et al. 1995; Tavassoli 1991).

1.1.2 Morphologie

Die Thymi des Menschen und der Maus sind anatomisch und auch histologisch ähnlich aufgebaut. Er besteht aus zwei asymmetrischen Lappen, die mittig durch eine bindegewebige Verwachsung, den Isthmus, verbunden sind. Bei Menschen erreicht der

Thymus im Kindesalter sein Höchstgewicht von circa 30 g, bei Mäusen kann er in den ersten zwei Monaten bis zu 4-8% des Körpergewichts betragen (Treuting und Dintzis 2012). Der Thymus ist in Rinde (Kortex) und Mark (Medulla) unterteilt, welche die unterschiedlichen Aufgaben bei der Reifung der Thymozyten übernehmen. Beide Anteile stammen aus bipotenten endodermalen Vorläuferzellen (Müller-Hermelink und Kreipe 2019; Rossi et al. 2006). Die Rinde ist von kleinen, dicht gepackten Thymozten besiedelt, wodurch sie ihre mikroskopisch stärkere Anfärbung erhält. Im Mark hingegen herrschen die Epithelzellen vor, weshalb es blasser erscheint. Die Epithelzellen bilden mit ihren langen Ausläufern zusammen ein dreidimensionales Netzwerk, in dem die heranreifenden Thymozyten liegen (Anastasiadis und Ratnatunga 2007; Lüllmann-Rauch 2009). Im Mark sind die sogenannten Hassall-Körperchen vorzufinden, welche von Epithelzellen gebildet werden und epidermoide Strukturen zeigen. In Mäusen sind die Hassall-Körperchen weniger ausgeprägt. Umgeben wird das Thymusparenchym, getrennt durch eine subkapsuläre Schicht von Epithelzellen mit nach außen anliegender Basallamina, von einer dünnen bindegewebigen Kapsel. Bei Menschen ziehen Bindegewebssepten von der Kapsel aus ins Innere des Parenchyms und unterteilen es in weitere Läppchen (Treuting und Dintzis 2012).

Der Thymus wird durch Blutgefäße versorgt, die innerhalb der Septen ins Innere des Thymus ziehen. An der Rinde-Mark-Grenze entspringen aus diesen Gefäßen Kapillaren, die in der Rinde von Epithelzellen umschlossen werden (Blut-Thymus-Schranke). Im Mark sind die Gefäße nicht umschieden (Raviola und Karnovsky 1972; Ribatti 2015). Arteriell versorgt die Arteria thoracica interna mit ihren Rami thymici diese Blutgefäße. Venös wird das Blut über die Venae thymicae in die Venae brachiocephalicae drainiert. Die Lymphdrainage erfolgt entlang der Blutgefäße zu den Nodi lymphatici brachiocephalici.

Die Nervenstränge des autonomen Nervensystems verlaufen zusammen mit den Gefäßstraßen sowohl ins Parenchym als auch subkapsulär. Die räumliche Nähe der Nerven zu den Blutgefäßen und den Thymozyten lässt ihre essentielle Rolle bei der Funktionstüchtigkeit des Thymus vermuten (Al-Shalan et al. 2019). Die sympathischen Nervenfasern stammen aus dem Truncus sympathicus (Bulloch und Pomerantz 1984; Nance et al. 1987). Die parasympathischen Fasern stammen aus dem Nervus vagus, dem Nervus laryngeus recurrens und dem Nervus phrenicus (Bulloch und Pomerantz 1984; Fatani et al. 1986; Mičić et al. 1992; Singh et al. 1987). Die Existenz dieser

parasympathischen Fasern ist jedoch sehr umstritten (Nance et al. 1987; Nance und Sanders 2007; Trotter et al. 2007). Während der adrenerge Einfluss des Sympathikus die Aktivität der Lymphozyten zu hemmen scheint, bewirke die cholinerge Stimulation durch den Parasympathikus das Gegenteilige (Middlebrook et al. 2002; Strom et al. 1974; Williams et al. 1981).

1.1.3 Zellen

Das Thymusstroma besteht aus drei großen Gruppen von Zellen: Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen (Bornstein et al. 2018). Wie schon vorher beschrieben, bilden die Thymusepithelzellen, auch TECs genannt (thymic epithelial cells), das epitheliale Grundgerüst des Thymus, welches durch die eingewanderten T-Zellenvorläufer (Thymozyten) besiedelt wird. So werden die TECs in der Rinde auch als Ammenzellen bezeichnet, welche die heranreifenden T-Lymphozyten umhüllen.

Die sternförmigen Epithelzellen stehen untereinander mit ihren langen Ausläufern in Verbindung und sind durch Desmosomen miteinander verankert. Zusammen mit der nach außen zeigenden Basallamina bilden sie die subkapsuläre Schicht, die so den intrathymischen Raum gegen den extrathymischen Raum abgrenzt. Diese Schicht setzt sich als Bindegewebssepten nach innen fort und umhüllt die Blutgefäße (Blut-Thymus-Schranke). In den TECs findet man Zytokeratine (CK, cytokeratin), die zur immunhistochemischen Antikörpermarkierung dieser Zellen genutzt werden können. Zytokeratinfilamente zählen zu den Intermediärfilamenten und sind in Epithelien vorzufinden. Sie bestehen als Heterodimere jeweils aus zwei verschiedenen Zytokeratintypen, einem sauren und einem basischen CK (Fuchs und Weber 1994; Moll et al. 1982). Die TECs können histologisch in vier verschiedene Gruppen unterschieden werden: 1) subkapsuläre, paraseptal und perivaskuläre TECs, 2) kortikale Thymusepithelzellen (cTECs), 3) medulläre Thymusepithelzellen (mTECs) und 4) differenzierte mTECs, welche die Hassall-Körperchen bilden (Gaudecker et al. 1997; Schuurman et al. 1997; Waal und Rademakers 1997). Die cTECs exprimieren typischerweise CK8 und CK18, die mTECs sind größtenteils positiv für CK5 und CK14 (Klug et al. 1998; Kuraguchi et al. 2006; Lee et al. 2011; Liepinsh et al. 2009). In Hassall-Körperchen sind Zellen enthalten, die gegen CK10 immunreaktiv sind (Soultanova et al. 2014). Neuere Forschungen zeigen jedoch, dass eine große

Heterogenität innerhalb der TECs existiert und verschiedene Subpopulationen vorhanden sind (Bornstein et al. 2018; Danzl et al. 2014; Klug et al. 1998).

Über die heranreifenden Thymozyten wird im Kapitel Funktion umfassend gesprochen.

Neben diesen beiden Hauptzellen, TECs und Lymphozyten, befinden sich im Thymus noch weitere Zelltypen. B-Lymphozyten, dendritische Zellen und Makrophagen gelten als antigenpräsentierende Zellen und entstammen wie die T-Lymphozyten dem Knochenmark. Die Makrophagen unterscheiden sich morphologisch je nach ihren Lokalisationen. Sie sind sowohl im Bindegewebe, im Mark als auch im Kortex vorzufinden und sind für die Phagozytose der durch Apoptose untergegangenen Thymozyten zuständig (Boyd et al. 1993; Surh und Sprent 2018). Die dendritischen Zellen befinden sich überwiegend im kortikomedullären Übergang und sind wie die TECs für die Antigenpräsentation zuständig. Daneben findet man noch die myoiden Zellen, die vorwiegend im Mark und selten auch einzeln in den Bindegewebssepten lokalisiert sind. Diese runden oder auch langgestreckten Zellen besitzen quergestreifte Myosin- und Aktinfilamente (Drenckhahn et al. 1979). Im perivaskulären Bindegewebe entlang der Septen, das noch zu dem extrathymischen Raum gehört und durch TECs nach innen abgegrenzt wird, findet man neben Fibroblasten auch Adipozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten, Plasmazellen und Mastzellen (Boyd et al., 1993).

Vor kurzem wurde im Thymus ein bisher unbekannter Zelltyp entdeckt, der als Bürstenzelle identifiziert wurde (Bornstein et al. 2018; Panneck et al. 2014).

1.1.4 Funktion

Neben den B-Zellen stellen die T-Zellen die Hauptvertreter des adaptiven Immunsystems dar. Der Thymus ist als primäres lymphatisches Organ für die Erzeugung immunkompetenter und gleichzeitig selbsttoleranter T-Zellen verantwortlich (Klein et al. 2014; Miller 1961).

Die T-Zellenvorläufer stammen wie die anderen hämatopoetischen Zellen von den Progenitorzellen des Knochenmarks ab. Dabei durchlaufen sie verschiedene Entwicklungsstadien und verlassen das Knochenmark als Präkursoren (thymic settling progenitors), um über den Körperkreislauf zum Thymus zu gelangen (Morrison et al.

1995; Zlotoff et al. 2008). Im Bereich des kortikomedullären Übergangs treten die Vorläuferzellen durch die postkapillären Venolen aus und wandern in Richtung Rinde zu der subkapsulären Zone (Lind et al. 2001). Die Reifung der T-Zellen beinhaltet zwei zentrale Schritte, welche in zwei verschiedenen Kompartimenten des Thymus ablaufen: Die positive Selektion findet in der Rinde statt und die negative Selektion im Mark. Dabei wandern die Thymozyten je nach Entwicklungsstadien von der Rinde aus in Richtung Mark. Für diese Proliferations- und Reifungsvorgänge sind spezialisierte Stromazellen zuständig, die ein bestimmtes Mikromilieu im Thymus erschaffen und dabei die Prozesse mittels Zytokinen und Hormonen steuern (Abramson und Anderson 2017; Takahama et al. 2017). In der Rinde koordinieren die cTECs die ersten Reifungsprozesse und die positive Selektion. Hier wird überprüft, ob die Thymozyten funktionierende T-Zell-Rezeptoren (TCR) besitzen, welche die körpereigenen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Moleküle erkennen müssen. Diejenigen ohne eine suffiziente Affinität zu den MHC-Molekülen werden aussortiert (Takada und Takahama 2015). Im Mark sind die mTECs für die spätere Entwicklung der Thymozyten sowie deren negative Selektion verantwortlich. Hier werden die körpereigenen Antigene von den mTECs und den dendritischen Zellen mit Hilfe von MHC-II-Komplex dargeboten. Diejenigen Thymozyten, die eine zu hohe Affinität zu den Antigenen zeigen, werden in die Apoptose geschickt, um somit eine spätere Autoreaktivität der T-Zellen zu verhindern (Boehmer und Kisielow 1990; Klein et al. 2014; Takahama et al. 2017). Um eine große Anzahl der körpereigenen Antigene präsentieren zu können, spielt der Transkriptionsfaktor AIRE (Autoimmun-Regulator) hier eine große Rolle. AIRE ist in bestimmten mTECs zu finden und für die zufällige Expression von peripheren gewebeigenen Antigenen (promiscuous gene expression) zuständig. Durch AIRE werden unspezifisch und stochastisch Gene aktiviert und folglich zufällige körpereigene Proteine auf der Zelloberfläche der mTECs exprimiert (Derbinski et al. 2001). So werden bei Mäusen ca. 20% der im Thymus präsentierten Antigene durch AIRE reguliert (Passos et al. 2018). Daher ist AIRE eine der wichtigsten Tragesäulen der zentralen Toleranz, das heißt, für die Differenzierung zwischen Selbst und Fremd verantwortlich (Laan und Peterson 2013). Trotz des großen Durchbruchs mit der Entdeckung von AIRE ist nur ein Teil der Antigenpräsentation im Thymus erklärt. So wird vermutet, dass noch andere AIRE-unabhängige Mechanismen existieren (Derbinski et al. 2005). Im Jahr 2015 entdeckten Takaba und Mitarbeiter

unter dem Namen Fezf2 (forebrain-expressed zinc finger 2) einen zweiten Mechanismus der Antigenexpression, der AIRE-unabhängig arbeitet. Der Transkriptionsfaktor Fezf2 ist wie AIRE ebenfalls nur in den mTECs vorhanden und für andere Gene als AIRE zuständig (Takaba et al. 2015). Bei dem gesamten Reifungsprozess präsentieren die Thymozyten zu verschiedenen Zeitpunkten verschiedene Oberflächenmarker, die sogenannte Cluster of differentiation (CD). Sie sind kennzeichnend für die Entwicklungsstufen der Thymozyten. Diese werden von den anfänglichen CD4⁻-CD8⁻-Zellen (doppelt negativ) zu den CD4⁺-CD8⁺-Zellen (doppelt positiv) und enden als CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen (einfach positiv). CD45 wird von allen kernhaltigen hämatopoetischen Zellen exprimiert (Hermiston et al. 2003). Einfach CD4-positive Zellen werden zu regulatorischen T-Zellen oder T-Helferzellen und sind in der Lage, mit ihrem TCR MHC-II-Moleküle zu binden (Boehmer und Kieselow 1990). Dadurch erkennen sie Antigenfragmente, die durch Makrophagen, B-Zellen oder dendritische Zellen präsentiert werden und leiten die Immunantwort durch Zytokine ein. Einfach CD8-positive Zellen werden zu zytotoxischen T-Zellen (Abramson und Anderson 2017; Boehmer und Kieselow 1990). Sie können an MHC-I-Moleküle binden, die alle kernhaltigen Zellen im Körper tragen. Ca. 5% der Thymozyten überleben diesen Vorgang und werden schließlich als reife, naive T-Zellen durch den Körperkreislauf zu den sekundären lymphatischen Organen wie Milz, peripheren Lymphknoten und Peyer Plaques exportiert (Haynes und Hale 1998).

1.1.5 Involution

Als Altersinvolution des Thymus werden die physiologische Atrophie des Organs und die Vermehrung des umliegenden Fettgewebes bezeichnet. Das Wachstum des menschlichen Thymus beschränkt sich nur auf das erste Lebensjahr, danach erreicht er seine maximale Größe und die Rückbildung beginnt (Steinmann et al. 1985; Steinmann 1986). Schon ab hier kann man die histologischen Veränderungen wie die Erweiterung des perivaskulären Raumes, die Vermehrung von Bindegewebe und die Vergrößerung von Hassall-Körperchen nachweisen. Später wird das Bindegewebe durch Fettgewebe ersetzt. Dabei bleibt das Volumen des Thymus über die Jahre konstant. Im Alter von 70 Jahren beträgt das lymphatische Gewebe nur noch 10% des Organgesamtvolumens (Steinmann 1986). Das Thymusepithel unterliegt einem kontinuierlichen

Involutionsprozess, der allerdings im Alter an Geschwindigkeit abnimmt. Funktionelle Reste des Thymus sind bis ins höchste Alter immer noch nachweisbar. Im Alter tritt eine Abnahme der Funktionsfähigkeit des peripheren T-Zellsystems in Erscheinung. Durch den Rückgang des Exports reifer naiver T-Zellen vom Thymus sinkt die Zahl der hochdifferenzierten T-Zellen in der Peripherie und die T-zellspezifische Vermittlerfunktion büßt ein (Douek et al. 1998; Fry und Mackall 2002; Steinmann und Müller-Hermelink 1985). Durch die abnehmende Immunleistung können altersassoziierte immunologische und infektiöse Erkrankungen auftreten, die eine erhöhte Morbidität und Mortalität im Alter erklären (Lynch et al. 2009; Weksler et al. 2009). Durch Stressfaktoren, Erkrankung und auch therapeutische Maßnahmen kann die physiologische Altersinvolution stärker beschleunigt werden und dessen Folgen graviert werden. Die möglichen Ursachen können eine HIV-Infektion, Mangelernährung, Tumorerkrankungen, Chemo- und Radiotherapie sein (Müller-Hermelink und Kreipe 2019). Die Thymusinvolution ist bei Mäusen milder ausgeprägt und beginnt bereits ab der sechsten Lebenswoche (Treuting und Dintzis 2012).

1.1.6 Cholinerges System im Thymus

Acetylcholin (ACh) fungiert sowohl als Neurotransmitter an neuronalen Synapsen, aber auch als Transmitter in nicht-neuronalen Zellen zur Signalweitergabe, unter anderem in Epithelzellen des Respirations- (Kummer und Krasteva-Christ 2014) und des Urogenitaltraktes (Lips et al. 2007). Als Bindungsstelle für ACh dienen die Acetylcholinrezeptoren (AChR). AChR können in muskarinische (mAChR) und nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) unterteilt werden, die jeweils durch ihre Agonisten gekennzeichnet werden: Muskarin und Nikotin. Atropin hingegen wirkt als Antagonist an mAChR und analog dazu Mecamylamin an nAChR. Im Thymus konnte in Stromazellen und Thymozyten neben mAChR und nAChR auch die Cholin-Acetyltransferase (ChAT) zur Synthese von ACh aus Acetyl-CoA und Cholin nachgewiesen werden (Engel et al. 1977; Kawashima und Fujii 2004; Kuo et al. 2002; Maśliński et al. 1987; Mihovilovic et al. 1997; Mihovilovic und Butterworth-Robinette 2001; Rinner et al. 1999; Tria et al. 1992). Obwohl um den Bestand parasymphatischer Nervenfasern im Thymus kontrovers diskutiert wird, ist das Vorkommen von ACh sowie dessen cholinergem Einfluss auf den Thymus und seine Funktion als Brutstätte

immunkompetenter T-Zellen nachgewiesen (Rinner et al. 1994). Bereits eine geringe Dosis Nikotin kann die Reifung der Thymozyten zum Stillstand bringen (Middlebrook et al. 2002). Durch den vagalen Einfluss sollen reife Lymphozyten aus dem Thymus freigesetzt und eine Stimulation der Lymphopoese und der Lymphozytenfunktion ausgelöst werden (Antonica et al. 1994; Maśliński et al. 1987; Strom et al. 1974).

1.2 Bürstenzellen

1.2.1 Morphologie und Lokalisationen

Die sogenannten Bürstenzellen, im Englischen als brush cells oder tuft cells bekannt, verdanken diese Namen ihrem Aussehen. Erstmals wurde die Zelle im Jahr 1956 in der Trachea von Ratten als non-ciliated cell (Zelle ohne Flimmer) entdeckt und aufgrund ihres bürstenartigen Fortsatzes als brush cell bezeichnet (Rhodin und Dalhamn 1956). Später konnten die Bürstenzellen in verschiedensten Organen sowie Säugetierarten identifiziert werden. Durch die chronologisch versetzte Entdeckung der Zelle sowie unterschiedliche Merkmale, die bei der Erstbeschreibung im Vordergrund standen, trägt sie weitere Namen: solitäre chemosensorische Zellen (SCCs), microvillar cells, caveolated cells, fibrillovesicular cells und multivesicular cells (Nevo et al. 2019; Sbarbati und Osculati 2005). Neben dem Entdeckungsort, der Trachea, sind sie in weiteren Bereichen des Respirationstraktes situiert: im vomeronasalen Organ (Finger et al. 2003; Zancanaro et al. 1999), der nasalen Schleimhaut (Brettschneider 1958; Finger et al. 2003), dem Larynx der Mäuse und Ratten (Sbarbati et al. 2004) und in der Tuba auditiva der Maus (Krasteva et al. 2012b). Im unteren Respirationstrakt sind die Bürstenzellen in den Bronchien der Mäuse und bei Ratten sogar in den Alveolen zu finden (Chang et al. 1986; Hijiya et al. 1977; Jeffery und Reid 1975; Meyrick und Reid 1968; Tizzano et al. 2011). Im Gastrointestinaltrakt der Nagetiere finden sich die Bürstenzellen im Magen, im Dün- und Dickdarm (Jarvi und Keyrilainen 1956; Luciano et al. 1968b; Nabeyama und Leblond 1974; Wattel und Geuze 1978) sowie in den Ausführungsgängen der anhängenden Drüsen: Gallenblase (Luciano und Reale 1979, 1990), Ductus choledochus, Ductus pancreaticus (Kugler et al. 1994; Luciano et al. 1981) und auch Ausführungsgänge der Speicheldrüsen (Sato und Miyoshi 1996). Aktuell konnten sie bei Mäusen auch in der Konjunktiva (Wiederhold et al. 2015), in

der Urethra (Deckmann et al. 2014) und überraschenderweise auch im Thymus, als einziges Organ ohne direkten Kontakt zur Außenwelt, identifiziert werden (Panneck et al. 2014). Neben Mäusen und Ratten sind die Bürstenzellen in weiteren Säugetierarten vorzufinden: So sind sie zum Beispiel in den Atemwegen oder im Verdauungstrakt von Kaninchen (Leeson 1961), Hunden (Hammond und Ladeur 1968), Rindern (Tizzano et al. 2006) und Menschen (Moran et al. 1982; Morroni et al. 2007; Rhodin 1966) vertreten. Die urethralen Bürstenzellen konnten sogar in weiteren Säugetieren nachgewiesen werden: neben den Nagetieren auch in Primaten, Carnivoren, Paarhufern und Unpaarhufern (Deckmann et al. 2015).

Je nach Lokalisation im Körper variiert die Form der Bürstenzelle. So findet man von spindelförmig über dreieckig bis zu kugelförmige Zellen. Die Bürstenzellen in der nasalen Schleimhaut sind beispielsweise langgestreckt und in Richtung des Lumens zugespitzt (Finger et al. 2003). Die trachealen Bürstenzellen zeigen sich spindel-, flaschenförmig, dreieckig oder auch konisch, mit einer an der Basalmembran angrenzenden Spitze und einem bis ins Lumen reichenden Bürstensaum (Krasteva et al. 2011; Luciano et al. 1968a; Rhodin und Dalhamn 1956). Die alveolären Bürstenzellen besitzen dagegen eine sphärische oder kubische Form (Hijiya et al. 1977; Meyrick und Reid 1968). Ein gemeinsames Merkmal ist ein langes, steifes Büschel von Mikrovilli auf der apikalen Seite der Zelle, das stark einer Bürste ähnelt und sich in das Lumen stülpt (Reid et al. 2005). Die Aktinfilamente der Mikrovilli sind mit den Strukturproteinen Villin, Fimbrin und Espin verflochten und ziehen zusammen bis in das apikale Zytoplasma der Zelle hinein (Hansen und Finger 2008; Höfer et al. 2000; Höfer und Drenckhahn 1992). Interessanterweise sind auch an der basolateralen Seite der Zelle Mikrovilli situiert, welche die gleiche Immunreaktivität gegen Villin und Fimbrin zeigten (Höfer und Drenckhahn 1992). An manchen Regionen penetrieren die lateralen Mikrovilli sogar die benachbarten Epithelzellen mit Kontakt zu deren Nucleus (Hoover et al. 2017; Luciano und Reale 1979; Morroni et al. 2007). Für die Entstehung und die Entwicklung der Bürstenzelle spielt der Transkriptionsfaktor POU domain class 2 transcription factor 3 (Pou2f3), auch Skn-1a genannt, eine Schlüsselrolle. Die POU-Familie ist eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren. Das Akronym POU leitet sich von drei aus ihnen ab: Pit-1, Oct-1 und Unc-86. In genetisch veränderten Mäusen mit fehlendem Pou2f3 sind die Bürstenzellen abwesend (Ohmoto et al. 2013; Yamashita et al. 2017). Als Marker für die Bürstenzellen etablierten sich das Strukturprotein Villin

und Doublecortin-like kinase 1 (Dclk1) (Gerbe et al. 2009; Höfer und Drenckhahn 1996; Saqui-Salces et al. 2011). Advillin (Avil), ein Protein, das mit Villin zu 61% genetisch identisch ist, wurde auch als Marker postuliert (Yamashita et al. 2017). Zur Bildung des Zytoskeletts trägt typischerweise das Intermediärfilament CK18 bei, aber auch Neurofilamente konnten nachgewiesen werden (Höfer und Drenckhahn 1996; Kasper et al. 1994; Luciano et al. 2003).

1.2.2 Chemosensorik

Potenziell schädigende Substanzen, natürliche, synthetische, aber auch durch Herstellungs- oder Alterungsprozess entstandene, erzeugen einen bitteren Geschmack und die damit verbundene Aversion (Glendinning 1994). Auch Produkte von Bakterien, zum Beispiel Lactone, können für Menschen bitter schmecken und dadurch eine Gefahr an den Körper signalisieren (Brockhoff et al. 2011; Krasteva et al. 2012a; Krasteva und Kummer 2012). Die gustatorische Wahrnehmung entsteht durch die Weitergabe von Informationen, ausgehend von Sinneszellen der Geschmacksknospen, welche die Geschmacksmoleküle über die Geschmacksrezeptoren an ihrer Mikrovilli binden, über sensorische Nerven an das Gehirn (Small 2006). Je nach Geschmacksqualität sind verschiedene Sinneszellen mit dafür spezifischen Rezeptoren ausgestattet (Chandrashekar et al. 2006). Für den bitteren Geschmack sind die Bitterrezeptoren der Tas2r (taste receptor type 2)-Familie zuständig, welche in Geschmackszellen oder auch in Bürstenzellen zu finden sind (Adler et al. 2000; Chandrashekar et al. 2000; Deckmann et al. 2014; Finger und Kinnamon 2011; Kinnamon 2012). Sie können durch verschiedene Bitterstoffe aktiviert werden: Denatonium, Amarogentin und Diphenidol können an Tas2r105 oder Tas2r108 binden. Cycloheximid ist ein Ligand für Tas2r105 (Chandrashekar et al. 2000; Lossow et al. 2016). Im Gegensatz zu der Tas2r-Familie, die aus vielen verschiedenen Bitterrezeptoren besteht, hat die Tas1r (taste receptor type 1)-Familie drei Mitglieder: Tas1r1, Tas1r2 und Tas1r3. Während die Tas2r-Familie die Wahrnehmung von Bitterstoffen regelt, ist das Heterodimer aus Tas1r2 und Tas1r3 für die Detektion von Süßmolekülen und der Zusammenschluss von Tas1r1 und Tas1r3 für die Geschmacksqualität umami zuständig (Li et al. 2002; Nelson et al. 2001). In den Bürstenzellen der Urethra, des Gastrointestinal- und des Respirationstraktes konnten neben den Bitterrezeptoren auch Rezeptoren für andere Geschmacksqualitäten

nachgewiesen werden (Deckmann et al. 2014; Iwatsuki et al. 2012; Kinnamon 2012). Die urethralen Bürstenzellen exprimieren beispielsweise neben dem Bitterrezeptor Tas2r108 auch Tas1r1, Tas1r3 für die Geschmacksqualität umami, ENaC (epithelial sodium channel) für salzige Moleküle und können durch die jeweiligen Liganden aktiviert werden (Deckmann et al. 2014; Kandel et al. 2018). Aktuelle Forschungen zeigen, dass die Bürstenzellen neben den Geschmacksrezeptoren auch andere Rezeptoren wie FFAR3 (free fatty acid receptor 3), SUCNR1 (succinate receptor 1) oder CysLT3R (cysteinyl leukotriene 3 receptor) besitzen und dadurch in der Lage sind, Moleküle wie zum Beispiel Succinat, Leukotrien E4, Propionat oder Butyrat zu detektieren und Reaktionen einzuleiten (Bankova et al. 2018; Lei et al. 2018; Nadjombati et al. 2018; Schneider et al. 2018).

1.2.3 Signaltransduktion

Die Bürstenzellen weisen eine starke Ähnlichkeit zu den Sinneszellen der Geschmacksknospe auf der Zunge auf. So konnten in ihnen die Komponenten der kanonischen Geschmackskaskade nachgewiesen werden, die der Signalübermittlung der Geschmackswahrnehmung dienen. Dazu gehören neben den Geschmacksrezeptoren die G-Proteinuntereinheit α -Gustducin, auch guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-3 (GNAT3) genannt, die Phospholipase C β 2 (PLC β 2) und der monovalent selektive Kationkanal transient receptor potential cation channel subfamily M member 5 (TRPM5) (Behrens und Meyerhof 2011; Höfer et al. 1996; Kaske et al. 2007; Rössler et al. 1998).

Die Bitterrezeptoren der Tas2r-Familie gehören wie die der Tas1r-Familie zu den G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR), die sieben Transmembrandomänen besitzen (Hoon et al. 1999). Die extrazellulären Rezeptoranteile dienen der Detektion der Geschmacksmoleküle; die intrazellulären Rezeptoranteile sind mit einem G-Protein verbunden und initiieren hierdurch die Geschmackskaskade. Das G-Protein ist ein Heterotrimer und liegt mit dem Rezeptor verbunden der Zellmembran auf der Innenseite an. Es besteht aus drei Untereinheiten: α -Gustducin, β 3- und γ 13-Untereinheit (Huang et al. 1999; Rössler et al. 2000). Bei Aktivierung des Geschmacksrezeptors durch Liganden interagiert er mit dem G-Protein, woraufhin das G-Protein in seine Untereinheiten dissoziiert (Hoon et al. 1999). Die β - und γ -Untereinheiten aktivieren die

PLC β 2, welche wiederum Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) spaltet (Hwang et al. 1990; Rössler et al. 1998; Spielman et al. 1994). IP3 vermittelt über den IP3-Rezeptor-Typ-3 (type-III IP3-receptor) ein Ausströmen von Kalziumionen (Ca²⁺) aus dem endoplasmatischen Retikulum (Clapp et al. 2001). Durch den intrazellulären Kalziumanstieg werden die monovalenten TRPM5-Kationkanäle geöffnet (Hofmann et al. 2003), welche über den Einstrom der Natriumionen eine Depolarisation der Zelle verursachen und eine Transmitterfreisetzung in Gang setzen (Behrens und Meyerhof 2011). Triphenylphosphinoxid (TPPO) gilt als spezifischer Inhibitor des TRPM5-Kanals, dennoch konnte gezeigt werden, dass durch TPPO auch der intrazelluläre Kalziumanstieg signifikant reduziert werden kann (Deckmann et al. 2014; Liu et al. 2011; Palmer et al. 2010). Bürstenzellen verschiedener Regionen exprimieren ChAT, die ACh synthetisiert, und nutzen dies als Transmitter (Deckmann et al. 2014; Krasteva et al. 2011; Ogura et al. 2011; Saunders et al. 2014; Schütz et al. 2015). In Organen wie Trachea, Nase und Urethra bestehen direkte Verbindungen zwischen Bürstenzellen und Nervenfasern, wodurch das Signal direkt weitergeleitet werden kann (Finger et al. 2003; Krasteva et al. 2011; Luciano et al. 1968a).

1.2.4 Funktion

Obwohl die Bürstenzelle schon vor über 60 Jahren entdeckt wurde, blieb ihre Funktion bis vor Jahren noch unerschlossen. Schon Rhodin und Dalhamn vermuteten aufgrund der Morphologie eine sensorische Funktion der Zelle, hielten sie aber für unwahrscheinlich, da sie in der Trachea keinerlei Kontakt zwischen der Zelle und Nervenfasern entdecken konnten (Rhodin und Dalhamn 1956). Aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten zu den Sinneszellen der Geschmacksknospe sowie der nicht zufälligen räumlichen Verteilung innerhalb der Organe verfestigte sich die Vermutung, dass die Bürstenzellen eine chemosensorische „Wächterfunktion“ ausüben, weshalb sie auch als solitäre chemosensorische Zellen bezeichnet werden (Höfer und Drenckhahn 1998; Luciano und Reale 1990). In der nasalen Schleimhaut sind die SCCs in der Lage, die einströmende Luft zu analysieren und sezernieren ACh bei Detektion von Bitterstoffen, das wiederum sensorische Trigeminasfasern aktiviert und eine Reihe von Abwehrmechanismen einleitet: Die Atmung wird gedrosselt, Reflexe wie Husten oder

Niesen werden ausgelöst, eine lokale neurogene Entzündungsreaktion wird eingeleitet (Finger et al. 2003; Saunders et al. 2014; Tizzano et al. 2010). So kann das Vordringen potenziell gefährlicher Substanzen unterbunden werden. In der Trachea zeigen Krasteva und Mitarbeiter eine ähnliche Regulation der Atmung durch die trachealen Bürstenzellen. Quorum-Sensing-Moleküle sind Signalmoleküle, die von Einzellern wie Bakterien produziert werden und deren Anpassung auf die eigenen Populationsdichte dienen. Bei Registrierung von bitteren Quorum-Sensing-Molekülen der Bakterien werden sensorische Vagusfasern acetylcholinabhängig aktiviert und die Atemfrequenz vermindert (Krasteva et al. 2011; Krasteva et al. 2012a). Zudem sind die trachealen Bürstenzellen in der Lage, über Produktion von Interleukin (IL)-25 eine Typ-2-Immunantwort zu induzieren (Bankova et al. 2018). In der Urethra aktiviert die Bürstenzelle die kanonische Geschmackskaskade bei Kontakt zu Bitterstoffen, was in einem intrazellulären Kalziumanstieg und einer anschließenden ACh-Freisetzung resultiert. Der Botenstoff stimuliert angrenzende Zellen und sensorische Nervenendigungen, die über einen Reflexbogen eine Anspannung des Detrusormuskels und damit eine Blasenentleerung einleiten (Deckmann et al. 2014). Auf die gleiche Weise wie in den vorher genannten Beispielen sind die SCCs auch in der Tuba auditiva zur Beschützung des Mittelohrs und in der Konjunktiva zu finden (Krasteva et al. 2012b; Wiederhold et al. 2015). Neue Studien weisen der Bürstenzelle auch eine Rolle bei Infektionen mit Parasiten im Verdauungstrakt zu. Die intestinalen Bürstenzellen sind in der Lage, bei Detektion von Succinat, einem Metabolit der Parasiten, über die Produktion von IL-25 innate lymphoide Zellen der Gruppe 2 (group 2 innate lymphoid cells, ILC2) zu aktivieren und über weitere Zytokine eine Parasitenabwehr einzuleiten (Gerbe et al. 2016; Howitt et al. 2016; Moltke et al. 2016; Nadjisombati et al. 2018). Auf diese Art sind die Bürstenzellen als „Wächter“ an verschiedenen Eintrittspforten des Körpers stationiert und tragen ihren Teil zur Immunabwehr bei (Billipp et al. 2021).

1.2.5 Bürstenzellen im Thymus

Unlängst wurden im murinen Thymus cholinerge Zellen entdeckt, die ChAT exprimieren und stark den Bürstenzellen des Atem- und Verdauungstraktes ähneln (Panneck et al. 2014). Sie sind überwiegend im Thymusmark an der Rinde-Mark-Grenze situiert und repräsentieren circa 4-10% der mTECs (Bornstein et al. 2018;

Kadouri et al. 2020; Miller et al. 2018). Die Zellform variiert von rund, birnenförmig über dreieckig bis zu länglich mit einem, manchmal zwei langen Zellfortsätzen. Neben dem Bürstenzellmarker Villin konnte auch Immunreaktivität gegen Zytokeratine CK8, CK18 und Komponenten der Geschmackskaskade, sprich α -Gustducin, PLC β 2 und TRPM5, nachgewiesen werden. Eine hundertprozentige Übereinstimmung der Immunreaktivität für die Komponenten der Geschmackskaskade mit den ChAT-positiven Zellen ergab sich jedoch nicht. Ein Kontakt zwischen Nervenfasern und diesen Zellen konnte immunhistochemisch nicht beobachtet werden. Andererseits konnten aber in unmittelbarer Nähe von ihnen mTECs nachgewiesen werden, welche die nAChR-Untereinheit α 3 exprimieren, was auf eine eventuelle cholinerge Signalkaskade hindeutet (Panneck et al. 2014). In weiteren Forschungsarbeiten konnten durch RNA (Ribonukleinsäure)-Analyse von Einzelzellen weitere büstenzellspezifische Gene wie Avil, IL-25, TRPM5 sowie verschiedene Bitterrezeptoren, zum Beispiel Tas2r105, Tas2r108 etc., nachgewiesen werden. Eine Abwesenheit dieser Zellen bei Pou2f3-Knockout-Mäusen wurde bestätigt (Bornstein et al. 2018; Miller et al. 2018). All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich hierbei um thymale Bürstenzellen handelt.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In vorherigen Arbeiten konnte das Vorkommen der sogenannten Bürstenzellen auch im Thymus gezeigt werden. Sie weisen deutliche morphologische Ähnlichkeiten zu denen in der Peripherie auf, inklusive der Expression von Bitterrezeptoren, Komponenten der kanonischen Geschmackskaskade und ChAT (Miller et al. 2018; Panneck et al. 2014). In den Schleimhäuten, beispielsweise in der Trachea oder in der Urethra, dienen die Bürstenzellen als Wächter an den Eintrittspforten zum Körperinneren und verhindern ein Vordringen von eventuell schädlichen Substanzen. Ihre chemosensorische Ausstattung sowie die Fähigkeit, ACh als Transmitter einzusetzen, erlauben es ihnen, diese Substanzen zu detektieren und Schutzreflexe auszulösen (Deckmann et al. 2014; Krasteva et al. 2011).

Die thymalen Bürstenzellen kommen im Thymusmark vor allem an der Rinde-Mark-Grenze vor. Hier entspringen Kapillaren aus den septalen Gefäßen, welche im Mark, im Gegensatz zur Rinde, nicht umhüllt sind und keine Blut-Thymus-Schranke besitzen

(Raviola und Karnovsky 1972). Hierdurch besteht die Gefahr, dass schädliche Substanzen oder Bakterien durch diese Kapillare in den Thymus gelangen könnten und ihre Antigene als körpereigene präsentieren – eine irrtümliche Toleranz der T-Zellen entsteht. An dieser Stelle könnten die Bürstenzellen einschreiten und die Bildung einer falschen Toleranz unterbinden. Der fehlende Kontakt mit Nervenfasern und die Existenz vieler Epithelzellen mit nAChR α 3 in der unmittelbaren Nähe weisen auf eine parakrine cholinerge Signalweitergabe dieser Zellen hin.

Die Lokalisation im Thymus zusammen mit der zellulären und molekularen Morphologie der thymalen Bürstenzellen legen die Vermutung nahe, dass sie auch hier eine Wächterfunktion ausüben, um ein Vordringen potenziell bedrohlicher Substanzen inklusive ihrer Antigene in den Thymus zu verwehren. Um die Entstehung einer falschen Toleranz des Immunsystems zu verhindern, könnten die Bürstenzellen in der Lage sein, bei Detektion von Bitterstoffen, die auf eine bakterielle Infektion hindeuten, ACh auszuschütten, um so die Reifung der Thymozyten zu blockieren. Dadurch soll die Funktionstüchtigkeit des Immunsystems garantiert werden.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die thymalen Bürstenzellen bezüglich ihrer Stimulation und Signaltransduktion weiter analysiert. Mittels Immunhistochemie und RNA-Analyse wurden die Zellen auf der molekularen Ebene weiter charakterisiert. Zudem wurden die Bürstenzellen aus dem Thymus isoliert, identifiziert und angereichert. Die so gewonnenen Bürstenzellen wurden mittels Kalziummessung auf ihre Stimulierbarkeit und Reaktion auf verschiedene Bittersubstanzen untersucht. Mit dem Inhibitor des TRPM5-Kanals, TPPO, wurde getestet, ob die stattgefundenere Reaktion durch die kanonische Geschmackskaskade abläuft. Um eine cholinerge parakrine Signalweiterleitung zu überprüfen, wurde bei der Stimulation der Bürstenzellen durch Bitterstoffe die intrazelluläre Kalziumveränderung der Nicht-Bürstenzellen aus dem Thymus mitregistriert. Zudem wurden mit diesen Zellen ein Inhibitorversuch mit Acetylcholinrezeptorantagonisten sowie ein direkter Stimulationsversuch mit ACh durchgeführt.

2 Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche und männliche Mäuse vom Typ C57BL/6N, des transgenen ChAT^{BAC}-eGFP (enhanced green fluorescent protein)-Stammes und des transgenen TRPM5-eGFP-Stammes verwendet. Die Versuchstiere waren zwischen 6 und 36 Wochen alt und wogen zwischen 19 g und 40 g.

Bei den ChAT^{BAC}-eGFP-Mäusen wurde das Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP) mittels der „bacterial artificial chromosome“ (BAC)-Technologie an den Promotor des Enzyms ChAT gekoppelt. In der Fluoreszenzmikroskopie lassen sich somit die ChAT-produzierenden Zellen anhand der grünen Farbe identifizieren. (Tallini et al. 2006).

Die TRPM5-eGFP-Mäuse wurden, ähnlich den ChAT-eGFP-Mäusen, durch die Kopplung des eGFP-Gens an den Promotor des Enzyms TRPM5 genetisch modifiziert. Dadurch leuchten unter der Fluoreszenzmikroskopie die Zellen grün, welche TRPM5 exprimieren (Clapp et al. 2006).

Die C57BL/6N- und ChAT-eGFP-Mäuse wurden von The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA bezogen. Die TRPM5-eGFP-Mäuse wurden von Prof. Robert Margolskee (Monell Chemical Senses Center, Philadelphia, PA, USA) zur Verfügung gestellt. Alle Versuchstiere wurden unter Standardbedingungen bei 22 °C ± 2 °C Raumtemperatur, 55% ± 1% Luftfeuchtigkeit, sowie einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden im zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität gehalten. Die Aufzucht, Haltung und Tiertötungen wurden bei den lokalen Behörden angezeigt und registriert (Regierungspräsidium Gießen, Deutschland; #A60/2012, #572_M, #A61/2012, #571_M, #624_M).

2.1.2 Lösungen

Gepuffertes Glycerol

Karbonatpuffer (1,5 M Na_2CO_3 mit 1,5 M NaHCO_3 , pH 8,6) und Glycerol (100%) im Verhältnis 1:2

Histoblocklösung

10% normales Pferdeserum (NHS; PAA Laboratories, Pasching, Österreich), 0,5% Tween 20, 0,1% Rinderserumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in phosphatgepuffertes Salzlösung (PBS), pH 7,4

Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)-Puffer

2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; Serva, Heidelberg, Deutschland) in PBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0,5% BSA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), pH 7,2

Phosphatgepufferte 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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmstadt, Deutschland), 22,4 g NaCl (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), ad 5 l Aqua destillata, pH 7,4

Phosphatgepufferte Salzlösung + NaCl (PBS+S)

PBS, 22,4 g NaCl (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), pH 7,4

RPMI-1640

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Phosphatpuffer 0,1 M

115 ml Stammlösung A, 385 ml Stammlösung B (Merck, Darmstadt, Deutschland), 500 ml Aqua destillata, pH 7,4

4% phosphatgepuffertes Paraformaldehyd (PFA)

4% PFA (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4

TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer

4,84 g TRIS (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1,142 ml Eisessig (Merck, Darmstadt, Deutschland), 2 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), ad 1 l Aqua destillata

Tyrode II

140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1 mM CaCl₂, 10 mM Glukose (Merck, Darmstadt, Deutschland), 10 mM HEPES, 1 mM Brenztraubensäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), pH 7,4

Zamboni-Fixationslösung

2% PFA (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 15% gesättigte Pikrinsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4

2.1.3 Pharmaka/Chemikalien

Pharmakon	Funktion	Ziel	Gelöst in	Quelle
Acetylcholinchlorid	Agonist	Acetylcholinrezeptor	H ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Amarogentin	Agonist	Bitterrezeptor, unter anderem (u.a.) Tas2r105, Tas2r108	Ethanol, H ₂ O 1:1	ChromaDex, Irvine, CA, USA
Atropin	Antagonist	Muskarinischer Acetylcholinrezeptor	H ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cycloheximid	Agonist	Bitterrezeptor Tas2r105	H ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Denatoniumbenzoat	Agonist	Bitterrezeptor, u.a. Tas2r105, Tas2r108	PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Diphenidol- hydrochlorid	Agonist	Bitterrezeptor, u.a. Tas2r105, Tas2r108	Ethanol	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Mecamylamin	Antagonist	Nikotinischer Acetylcholinrezeptor	H ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TPPO	Inhibitor	TRPM5-Kanal	PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tabelle 2.1 Liste der verwendeten Pharmaka

2.1.4 Primäre Antikörper

Antigen	Wirt	Klon/Code	Verdünnung	Quelle
ChAT	Ziege, p	AB144P	1:250-800	Merck Milipore, Darmstadt, Deutschland
GFP	Huhn, p	NB 100-1614	1:4000	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA

GNAT3	Ziege, p	pab73402	1:800-3000	Covalab, Villeurbanne, Frankreich
PLCβ2	Kaninchen, p	sc-206	1:800	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
TRPM5	Kaninchen, p	AB-321	1:8000	(Kaske et al. 2007)

Tabelle 2.2 Liste der verwendeten Primärantikörper

p=polyklonal.

2.1.5 Sekundäre Antikörper

Antigen	Wirt	Konjugat	Verdünnung	Quelle
Huhn-IgY	Esel	FITC	1:800	Dianova, Hamburg, Deutschland
Kaninchen-IgG	Esel	Cy3	1:2000	Chemicon, Temecula, CA, USA
Ziegen-IgG	Esel	Cy3	1:400-1600	Chemicon, Temecula, CA, USA

Tabelle 2.3 Liste der verwendeten Sekundärantikörper

FITC=Fluoresceinisothiocyanat, Cy=Cyanin

2.1.6 Fluorochrommarkierte Antikörper

Antigen	Wirt	Klon/Code	Konjugat	Verdünnung	Quelle
EpCAM	Ratte, m	caa7-9G8	PE	1:50	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MHC-II	Ratte, m	M5/114.15.2	PE	1:10	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Tabelle 2.4 Liste der verwendeten fluorochrommarkierten Antikörper

epcam=epithelial cell adhesion molecule, *m*=monoclonal, *PE*= Phycoerythrin

2.1.7 Primer

Für die qualitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurden folgende Oligonukleotidpaare (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) benutzt.

Gen	Sequenz (5'→3')	Basenpaarlänge	Gendatenbanknummer
<i>actb</i> (β-Aktin)	fw: gtgggaatgggtcagaagg re: ggcatacagggacagcaca	300	NM_007393
<i>aire</i>	fw: agagaccccggaaccaatctc re: agggctcgtgactagcagagt	149	NM_001271557

<i>cd3</i>	fw: cacttctgtgtggggttca re: atgttctcggcatcgtcctg	195	XM_006509966
<i>chat</i>	fw: cctgccagtcaactctagcc re: atacagagaggctgcctga	183	NM_009891
<i>ck14</i>	fw: gacgccacctttcatcttc re: ggggctcttccagcagtac	237	NM_016958
<i>ck18</i>	fw: agggtcagatctttgcgaat re: ggcatccacttccacagtca	309	NM_010664
<i>ck5</i>	fw: ccaacctccagaacgccatt re: ctctccgtagccagaagaga	291	NM_027011
<i>ck8</i>	fw: atgcagaacatgagcattcatacg re: atcttcttcacaaccacagcct	185	NM_031170
<i>egfp</i>	fw: acgtaaacggccacaagttc re: aagtcgtgctgcttcatgtg	187	EU056363
<i>epcam</i> (<i>cd326</i>)	fw: aagaaccgacaaggacacgg re: ggactcccccttcacatctttt	298	NM_008532
<i>gnat3</i>	fw: tcatacataagaatggttacagc re: cccacagtcgtttaatgatttc	231	NM_001081143
<i>h2-aa</i> (MHC-II)	fw: tgaagacgacattgaggccg re: ttgaggagcctcattggtage	277	NM_010378
<i>plcb2</i>	fw: tcaaaatcagagccagaaactcc re: agcattgactgtcatcgggt	205	NM_001290790

<i>ptprc</i> (<i>cd45</i>)	fw: gtgccagcctcacaactctt re: agttgtagctggagcacatga	290	NM_001111316
<i>tas1r1</i>	fw: aggccacctagagatgcaga re: ccgcaactatgacttccacct	232	NM_031867
<i>tas1r3</i>	fw: atggctgtggaggagatcaa re: gtcacttagccgatccatgc	297	NM_031872
<i>tas2r102</i>	fw: acaggcgacgctgttatatgc re: gctttgtttaatgaccagctcc	158	NM_199153
<i>tas2r103</i>	fw: agcacagtggcccacataaa re: tggcctgtgggaaaagctac	167	NM_053211
<i>tas2r104</i>	fw: ctgagcgtttggttagcacc re: ttcacagctagcggaaagga	167	NM_207011
<i>tas2r105</i>	fw: gactggcttccttctcatcg re: gcaaacaccccaagagaaaa	284	NM_020501
<i>tas2r106</i>	fw: agcctcaacctcttctatctcc re: tcaactgtttgtgggaaagcaa	145	NM_207016
<i>tas2r107</i>	fw: tgctcggagtttaggggaca re: ccagaggtaagcatgtgtggaa	184	NM_199154
<i>tas2r108</i>	fw: gtcgcagaattgcctctc re: ccagagactgtttgcatccaga	176	NM_020502
<i>tas2r109</i>	fw: tactggtgtctctggtcctct re: cagggacaaaacaacgggga	188	NM_207017

<i>tas2r110</i>	fw: agcatttcacagcggatcag re: gcatgtggcaagccaaacg	189	NM_199155
<i>tas2r113</i>	fw: tggcaattagcagaatcgctc re: gatgctcaagttgcagtaagc	164	NM_207018
<i>tas2r114</i>	fw: cttcctgatagggtgcttgct re: ttgattccatctgcctgcga	242	NM_207019
<i>tas2r115</i>	fw: agactgtggtgccttcctc re: gtttctcacgcttgacca	229	NM_207020
<i>tas2r116</i>	fw: ctttgctgtgctactggca re: tctgatgtgggccttagtgct	119	NM_053212
<i>tas2r117</i>	fw: ggcccacttcaaagccctac re: gctgcgataatacagagaggca	228	NM_207021
<i>tas2r118</i>	fw: tccagcctgaaagctcagttc re: agggttgctcatcatcagtgca	195	NM_207022
<i>tas2r119</i>	fw: cgatgctctccattctgtca re: tgatgagtagcaggcactgg	289	NM_020503
<i>tas2r120</i>	fw: atggcaaaggatgtcaagatcag re: atgacctgctgggtagaagga	182	NM_207023
<i>tas2r121</i>	fw: gaacgagaccccagcactaa re: gtcacacccaaagactggct	236	NM_207024
<i>tas2r122</i>	fw: tgtggcaagctccattcttga re: acctccacaatgacacaccag	163	NM_001039128

<i>tas2r123</i>	fw: tgcaggatcaatgccaacaac re: tggcttgtctcagcttactgt	243	NM_207025
<i>tas2r124</i>	fw: ctagtgtctacggccccacaga re: acatcccagctgcctcatta	239	NM_207026
<i>tas2r125</i>	fw: ggtagtggcctttctcctgtt re: agggaaccaacatccgtaca	233	NM_207027
<i>tas2r126</i>	fw: tcttggggctctatcttgggt re: gcgaatgccttctgagagaac	240	NM_207028
<i>tas2r129</i>	fw: tggtttcagggactttgctca re: gcaggagaaaagtgactggg	219	NM_207029
<i>tas2r130</i>	fw: tccagacacctacaacagagg re: caggagataatcacacatgcc	211	NM_199156
<i>tas2r131</i>	fw: gcagtattataactggaatgctgg re: aggcgctagtcttctgtatggt	177	NM_207030
<i>tas2r134</i>	fw: atggcggcctgtgaaaacta re: gtgagcctgggtgctgtaat	207	NM_199158
<i>tas2r135</i>	fw: cagcctctcgattctgtctcc re: aggcaacctgtactttagcca	227	NM_199159
<i>tas2r136</i>	fw: gtgcttcaaccacattaaggt re: aaatcaggtggattggttctc	132	NM_181276
<i>tas2r137</i>	fw: acatcagactgaagcgacagg re: ggctcagcactctgatctc	176	NM_001025385

<i>tas2r138</i>	fw: acgtggtgcattctgtgct re: tctatggcctcctcagctt	160	NM_001001451
<i>tas2r139</i>	fw: ttcgtcgcaacagctactct re: tgttggatgtggacagaagca	184	NM_181275
<i>tas2r140</i>	fw: ccagcaccacagcccatatt re: ttaggacacaagagtggccc	183	NM_021562
<i>tas2r143</i>	fw: aagcgaaccttattggcatcc re: agcctgggaactaactgggaa	157	NM_001001452
<i>tas2r144</i>	fw: gtgggtgccatcaaatcgac re: atgaacatggtgctgaaaccg	219	NM_001001453
<i>trpm5</i>	fw: tgaggaacgaccttggcta re: acacggatcttggatgt	183	NM_020277
<i>villin</i>	fw: tggaaaccgagaccttgaga re: tccacttcgggctcataac	195	NM_009509

Tabelle 2.5 Liste der verwendeten Primer

fw=forward: Sequenzabfolge des Vorwärtsstranges, re=reverse: Sequenzabfolge des Rückwärtsstranges

2.2 Methoden

2.2.1 Tötung der Maus und Gewebeentnahme

Die Tötung der Maus erfolgte durch Inhalationsnarkose mit einer Überdosis von 5% Isofluran (Baxter Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland) in einer abgeschlossenen Glasglocke mit anschließender zervikaler Dislokation unter Betäubung. Ein Schnitt wurde ventral entlang der Linea mediana gesetzt und die Brust- und Bauchhöhle damit eröffnet. Eine Durchtrennung der Vena cava inferior und der Aorta führte dann zur Ausblutung des Tieres. Im Anschluss wurde der Thymus entnommen.

2.2.2 Zellisolation

Die Vorgehensweise der Zellisolation aus dem murinen Thymus orientiert sich am Protokoll von Gray und Mitarbeitern (Gray et al. 2008).

Nach der Tötung der Maus wurde der Thymus vorsichtig entnommen und vom umliegenden Fettgewebe befreit. Beide Lobi wurden voneinander getrennt und in 10 ml RPMI-1640-Medium für circa 15 Minuten (min) bei 37 °C auf dem Rotator (Dyna Sample Mixer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) belassen, um möglichst viele Lymphozyten zu entfernen. Der Überstand, der vorwiegend aus Lymphozyten bestand, wurde je nach Experiment separat auf Eis aufbewahrt oder verworfen. Anschließend erfolgte der erste Verdauungsvorgang: Die Lobi wurden bei sanfter, regelmäßiger Durchmischung durch den Rotator mit 2 ml 0,125% Collagenase D und 500 µl 0,1% DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in RPMI-1640-Medium bei 37 °C im Inkubator (Heraeus, Hanau, Deutschland) zur Verdauung belassen. Nach 10 min wurde der Überstand mit Zellen entnommen und auf Eis aufbewahrt. Dieser Verdauungsvorgang wurde zweimal wiederholt und der Thymusrest wurde für circa 15 min bis zur Auflösung in 3 ml 0,125% Collagenase/Dispase (Roche Diagnostics) mit 300 µl 0,1% DNase I in RPMI-1640-Medium überführt. Diese Mischung wurde mit dem Überstand aus den vorherigen Verdauungsvorgängen zusammengeführt und bei 300 xg für 5 min zentrifugiert (Heraeus). Daraufhin wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet bei 4 °C im kalten MACS-Puffer

resuspendiert und für 10 min inkubiert, um Zellaggregate aufzulösen. Die Zellsuspension wurde dann durch ein Sieb (100 µm; Thermo Fisher Scientific) filtriert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Zur Anreicherung der zu untersuchenden Bürstenzellen wurden Lymphozyten durch ihre CD45-Moleküle aussortiert. Nach erneuter Zentrifugation (300 xg, 5 min; Heraeus) wurden pro 1×10^7 Zellen 95 µl MACS-Puffer und 5 µl Anti-CD45-Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 6 °C für 15 min inkubiert und für die Kalziummessung zusätzlich mit einem fluorochrommarkierten Antikörper Anti-CD45-Vioblue (Miltenyi Biotec) nach Anleitung des Herstellers beladen. Die Zellen wurden mit 2 ml MACS-Puffer je 10^7 Zellen gewaschen und bei gleicher Einstellung erneut zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Die Lymphozyten wurden mit Hilfe von LD Column und QuadroMACS™ Separator (Miltenyi Biotec) nach Herstellerprotokoll entfernt. Hierbei wurden die mit Microbeads beladenen CD45-positiven Lymphozyten durch magnetische Kräfte des Separators angezogen und beim Passieren des LD Columns festgehalten, während die unbeladenen Zellen durch den Column fließen konnten.

2.2.3 Immunhistochemie an Gewebeschnitten

Der entnommene Thymus wurde einer Immersionsfixation unterzogen. Dabei wurde das Gewebe nach der Entnahme sofort in ein Glasgefäß mit 4% phosphatgepuffertem PFA oder Zamboni-Fixationslösung überführt und über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Nach dem Fixieren wurde das Gewebe wiederholt mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Der Phosphatpuffer wurde stündlich gewechselt bis das Fixierungsmittel ausgewaschen war. Die Probe wurde dann über Nacht in 0,1 M Phosphatpuffer mit 18% Saccharose (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei 4 °C eingelegt. Am nächsten Tag wurde die Probe in Tissue-Tek-O.C.T.™-Compound (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet, mit Filterpapier bedeckt und in schmelzendem Isopentan (Carl Roth) auf flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung im Gefrierfach bei -80 °C gelagert.

Von der gefrorenen Probe wurden mit Hilfe des Kryostats (Microm HM 560, MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland) 5-10 µm dicke Schnitte angefertigt und

auf speziell mit Adhäsionslösung beschichteten Objektträgern (SuperFrost®-Objektträger, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen. Die Schnitte wurden sofort verwendet oder bei -20 °C eingelagert.

Für die indirekte Immunhistochemie wurden die Kryoschnitte zuerst in einer dunklen Kammer bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Nach der Trocknung wurden die Schnitte mit einem Fettstift (PAP Pen Liquid Blocker, Science Services, Japan) umrahmt und mit Histoblocklösung für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert, um unspezifischen Proteinbindungsstellen zu verdecken. Zusätzlich zu ihrem jeweiligen Primärantikörper enthielt die Inkubationslösung bei einem Teil der Schnitte den Anti-eGFP-Antikörper zur Verstärkung der eGFP-Fluoreszenz der TRPM5-eGFP-Mäuse, der später an den mit FITC-konjugierten Sekundärantikörper gekoppelt wurde. Die primären Antikörper (Tabelle 2.2) wurden nach dem Absaugen der Histoblocklösung in der entsprechenden Verdünnung mit PBS+S auf die Objektträger aufgetragen. Die Schnitte wurden anschließend in einer feuchten Kammer, welche mit Parafilm (Bemis, Neenah, WI, USA) luftdicht verschlossen wurde, bei Raumtemperatur für eine Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde der primäre Antikörper abgesaugt und die Schnitte zweimal 10 min lang in einer Küvette mit PBS gewaschen. Für die primären Antikörper gegen die Antigene ChAT und GNAT3 kam der Cy3-konjugierte Anti-Ziegen-IgG-Sekundärantikörper zum Einsatz, für die Antikörper gegen die Antigene PLCβ2 und TRPM5 der Cy3-konjugierte Anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper. Die sekundären Antikörper (Tabelle 2.3) wurden in entsprechender Verdünnung mit PBS+S auf die Objektgläser aufgetragen und die Schnitte wurden nochmals für eine Stunde in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für je 10 min wurden die Objektträger für 10 min in 4% PFA eingetaucht, um die Verbindung zwischen den primären und den sekundären Antikörpern zu stabilisieren. Nach nochmaligem zehninütigem Waschvorgang wurde DAPI (4',6-Diaminidin-2-phenylindol; 1 mg/ml; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) zur Kernmarkierung aufgetragen. Die Objektträger wurden mit karbonatgepuffertem Glycerol eingedeckelt (Deckgläser, R. Langenbrinck) und bis zur Ansicht bei -4 °C gelagert. Die angefertigten Schnitte wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (AxioPlan 2 Imaging, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland) und den passenden Filtern ausgewertet. Die immunhistochemisch markierten Zellen wurden unter Sicht am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Mit Hilfe von dem Imaging-Programm AxioVision (AxioVs40V 4.8.2.0,

Carl Zeiss Microscopy) wurden Beispielbilder aufgenommen und dokumentiert. Die Negativkontrolle zur Überprüfung der Spezifität der Sekundärreagenzien erfolgte durch die Benutzung von PBS+S anstelle der Primärantikörper. Als Positivkontrolle für den Anti-GNAT3-Antikörper dienten Anschnitte von Wallpapillen einer C57BL/6N-Maus. Für die restlichen Primärantikörper erfolgte die Positivkontrolle bereits in früheren Arbeiten (Deckmann et al. 2014; Panneck et al. 2014).

2.2.4 Immunhistochemie an isolierten Zellen

Nach der Zellisolation mit Microbeads (Kapitel 2.2.2) und der Anfärbung mit Anti-CD45-Vioblue wurden die erhaltenen Zellen mit weiteren fluorochrommarkierten Antikörpern (Tabelle 2.4), Anti-EpCAM-PE (Phycoerythrin) oder Anti-MHC-II-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland), nach dem Protokoll des Herstellers beladen und auf einem Deckgläschen in einer mit Tyrode II-Puffer gefüllten Messkammer unter dem CLSM (Leica-TCS SP2 AOBS, Leica, Mannheim, Deutschland) mit passenden Filtern betrachtet.

Für die Markierung mit dem TRPM5-Antikörper wurden die isolierten Zellen zuerst permeabilisiert und fixiert. Dazu wurde die Suspension für 10 min in 4% PFA (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert und anschließend zweimalig mit PBS gewaschen. Dabei wurde jeweils bei 400x g (Centrifuge 5424, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) 5 min lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde die Histoblocklösung für 10 min hinzugegeben und bei gleichbleibender Einstellung erneut zweimalig gewaschen. Der Primärantikörper gegen TRPM5 wurde in der angegebenen Verdünnung (Tabelle 2.2) der Zellsuspension hinzugefügt und die Zellen wurden über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag folgten zwei weitere Waschvorgänge und eine einstündige Inkubation der Zellen mit dem Cy3-markierten Anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 2.3). Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Zellen unter dem CLSM mit entsprechender Einstellung betrachtet. Aufgenommen und dokumentiert wurde mit der Software Zen 11 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland).

2.2.5 Durchflusszytometrie

Zellen wurden aus dem Thymus einer ChAT-eGFP-Maus mit dem beschriebenen Verdauungsvorgang (Kapitel 2.2.2) isoliert. Ein Teil der isolierten Zellen wurden vor dem Anreicherungsverfahren entnommen und im MACS-Puffer auf Eis bewahrt. Die restlichen Zellen wurden dem Anreicherungsverfahren mit Anti-CD45-Microbeads unterzogen. Beide Zellfraktionen wurden mit dem fluorochrommarkierten Antikörper Anti-CD45-APC-Vio770 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) nach dem Herstellerprotokoll beladen und anschließend durch den Durchflusszytometer MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec) mit entsprechender Filter- und Lasereinstellung analysiert. Die Daten wurden mit der Software FlowJo (Version 10.6.1; BD, Franklin Lakes, NJ, USA) bearbeitet und in Form von Punktdiagrammen veranschaulicht.

2.2.6 RT-PCR aus Thymusgewebe

Der sauber präparierte Thymus einer C57BL/6N-Maus wurde zerkleinert und sofort in ein Gefäß mit Lysepuffer (RLT-Puffer, Qiagen, Hilden, Deutschland) und 1% β -Mercaptoethanol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) überführt. Das Gewebe wurde in einer Kugelmühle (MM 300, Retsch, Haan, Deutschland) für 3 min bei 30 Hertz (Hz) weiter zerkleinert und homogenisiert. Für die Extraktion der RNA wurde mit RNeasy Mini Kits (Qiagen) strikt nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Die isolierte RNA wurde auf Eis aufbewahrt und fotometrisch (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) auf ihre Konzentration geprüft. Um die genomische DNA zu eliminieren, wurde der DNase-Verdau durchgeführt. Hierbei wurde für 1 μ g RNA jeweils 1 μ l DNase-Puffer, 1 μ l DNase-I (Invitrogen) und 8 μ l H₂O (Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) hinzugegeben. Die Probe wurde für 15 min im Thermocycler (Mastercycler Personal, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 μ l EDTA (25 mM, pH 8,0; Thermo Fisher Scientific) hinzu gegeben und für 15 min bei 65 °C inkubiert, um die DNase zu inaktivieren. Zur cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)-Synthese aus der RNA wurden weitere Chemikalien benötigt: 4 μ l 5x First Strand Buffer (Qiagen), 2 μ l Dithiothreitol (DTT; 0,1 M; Invitrogen), 1 μ l

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs; 10 mM; Qiagen), 1 µl Oligo-dTs (0,5 µg/µl; Eurofins Genomics) und 1 µl reverse Transkriptase (SuperScript II, Qiagen). Das Gemisch wurde für 50 min bei 42 °C inkubiert und zur Inaktivierung der reversen Transkriptase für 15 min auf 72 °C erhitzt. Für die Kontrolle ohne reverse Transkriptase wurde stattdessen 1 µl H₂O (Ampuwa) benutzt. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Für die PCR der cDNA zum Nachweis der gesuchten Genprodukte wurde das folgende Gemisch hergestellt: 17,75 µl H₂O (Ampuwa), 2,5 µl 10x PCR Buffer II, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 0,75 µl dNTPs (10 mM), 0,25 µl AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5 U/µl; Thermo Fisher Scientific), 0,75 µl Primerpaar aus dem Vorwärts- und dem Rückwärtsstrang (20 pmol/µl; Tabelle 2.5) und 1 µl cDNA. In der Wasserkontrolle wurde statt cDNA 1 µl H₂O verwendet. Die Proben wurden in 200 µl Reaktionsgefäßen im Thermocycler zur Amplifikation gebracht. Zuerst wurde durch eine Erhitzung auf 95 °C für 12 min die Polymerase aktiviert. Dabei wurden sowohl die DNA-Stränge als auch die Primer durch Denaturierung voneinander getrennt. Dann erfolgten 40 Zyklen der Amplifikation aus folgenden Schritten: Zuerst fand die Denaturierung bei 95 °C für 20 s zur Trennung der DNA-Doppelstränge statt. Anschließend wurde 20 s lang bei 60 °C die Anlagerung der Primer an den DNA-Strang ermöglicht. Zuletzt erfolgte am Ende des angelagerten Primers die Elongation des fehlenden Strangs bei 72 °C für 20 s. Nach dem Ablauf der 40 Zyklen wurde die Temperatur für 7 min auf 72° C gehalten, um die Synthese von fehlenden DNA-Strängen zu vollenden.

Die entstandenen PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese dargestellt. Das 2% Agarose-Gel setzte sich zusammen aus 20 g/l Agarose (Biozym, Oldendorf, Deutschland) und TAE-Puffer. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle geschmolzen, mit 10 µl/l Ethidiumbromid (1%; Carl Roth) vermischt und in eine Kammer gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde in eine Elektrophoresekammer (Modell 40-1410, Peqlab, Erlangen, Deutschland) gelegt und mit TAE-Puffer umspült. Zu 25 µl der PCR-Produkte wurden jeweils 5 µl vom Ladepuffer aus 0,5 g Orange G (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 25 ml Glycerol (Sigma-Aldrich) und 25 ml TAE-Puffer hinzugefügt. Die Proben mit Ladepuffer wurden gut durchmischt und zusammen mit einem Basenpaarmarker (Invitrogen) auf das liegende Agarose-Gel übertragen. Die Elektrophorese wurde bei 150 V für circa 30 min durchgeführt. Dabei wanderten die negativ geladenen PCR-Produkte aufgrund des elektrischen Feldes durch die

Gelmaschen in Richtung Pluspol. Unter UV-Licht (Renner, Darmstadt, Deutschland) wurde das Ergebnis betrachtet und dokumentiert.

Als Positivkontrolle wurde die RT-PCR mit den gleichen Primern für Tas2-Rezeptoren an Proben aus Zungen von C57BL/6N-Mäusen durchgeführt.

2.2.7 RT-PCR aus mit FACS isolierten Zellen

Es wurden Zellen wie oben beschrieben (Kapitel 2.2.2) aus dem Thymus einer weiblichen, 10 Wochen alten ChAT-eGFP-Maus isoliert. Die Zellen wurden mit dem fluorochrommarkierten Antikörper Anti-CD45-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) nach dem Herstellerprotokoll beladen und bis zum FACS (fluorescence-activated cell sorting) im MACS-Puffer auf Eis gehalten. Die Sortierung der Zellen wurde an einem BD FACSAria™ III (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) von der Arbeitsgruppe Hackstein des Institutes für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen vollzogen. Die Zellen wurden in folgende drei Gruppen eingeteilt: ChAT-eGFP⁺/CD45⁻, ChAT-eGFP⁻/CD45⁺ und ChAT-eGFP⁺/CD45⁺.

Für die RNA-Extraktion wurden die Zellsuspensionen bei 500 xg für 15 min zentrifugiert (Centrifuge 5424, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland). Der Überstand wurde so weit verworfen, dass circa 4 µl in jedem Gefäß zurückblieben. Zu jeder Zellsuspension wurde 1 µl RNaseOUT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) hinzugegeben, um den RNA-Verdau zu verhindern. Die Zellen wurden für 10 min bei 75 °C inkubiert und dann auf 4 °C abgekühlt. Anschließend folgte der DNase-Verdau mit 2,5 µl DNase I (1 U/µl), 0,8 µl DNase I Buffer und 0,6 µl EDTA (25 mM; Invitrogen) bei 70 °C für 5 min. Die cDNA-Synthese erfolgte mit SeqPlex RNA Amplification Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) nach dem Herstellerprotokoll. Die erhaltenen DNA-Mengen der Umschreibung wurden fotometrisch durch Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kontrolliert.

Die Schritte der PCR zum Nachweis von Genprodukten sowie dessen Darstellung durch die Gelelektrophorese wurden bereits im Kapitel 2.2.6 beschrieben.

Als Positivkontrolle wurden verschiedene Gewebeproben mit bekannter Expression der gesuchten mRNAs (Boten-Ribonukleinsäuren) verwendet. Die Primer für die Komponenten der kanonischen Geschmackskaskade (*gnat3*, *plcb2*, *trpm5*) und die Bürstenzellmarker (*chat*, *villin*) wurden an Proben sowohl aus der Zunge von C57BL/6N-Mäusen, als auch aus der Zunge und der Gallenblase von ChAT-eGFP-Mäusen überprüft. Die Primer für *egfp* wurden an Proben der Zunge einer ChAT-eGFP-Maus kontrolliert. Die Positivkontrolle der Primer für *tas2r104* erfolgte bereits im Vorfeld für die RT-PCR aus Thymusgewebe.

2.2.8 Zellenpicken und Deep Sequencing

Zellen wurden wie im Kapitel 2.2.2 beschrieben aus den Thymi zweier männlicher, 7 Wochen alten ChAT-eGFP-Mäuse isoliert. Anschließend wurden die Zellen mit dem fluorochrommarkierten Antikörper Anti-CD45-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) nach dem Herstellerprotokoll beladen und in Tyrode II auf runde Deckgläschen (Durchmesser 18 mm; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei 37 °C für 30 min zur Adhäsion belassen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop Mikroskop; Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland) konnten die Bürstenzellen als ChAT-eGFP-positive Zellen mit fehlender CD45-Markierung identifiziert werden. Die Zellsuspension wurde auf dem Objektisch des Mikroskops befestigt. Eine Pumpe (Minipuls 2; Gilson, Middleton, WI, USA) sorgte für eine kontinuierliche Zufuhr frischer Tyrode II-Lösung und damit für das Abspülen frei schwimmender Zellen. Mit dem Flaming/Brown Micropipette Puller (Model P-97; Sutter Instrument, Novato, CA, USA) wurden Glaskapillaren (GB150F-10; Sutter Instrument) in die richtige Form für das Zellenpicken gebracht. Mittels eines Mikromanipulators konnte die Glaskapillare zu der ausgesuchten Zelle hingesteuert werden. Durch den Zug an einer 100 µl gasdichten Glasspritze (Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz), die durch einen Schlauch mit der Glaskapillare verbunden war, wurde ein Unterdruck in der selbigen erzeugt und dadurch die anvisierte Zelle in die Glaskapillare hineingesaugt. Die Spitze der Kapillare samt Zelle wurde in einem mit 1 µl RNaseOUT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) befüllten Reaktionsgefäß abgebrochen und bis zur Umschreibung bei -20 °C aufbewahrt.

Die cDNA-Synthese inklusiv DNase-Verdau erfolgte mit SeqPlex RNA Amplification Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) nach dem Herstellerprotokoll. Nach fotometrischer Überprüfung durch Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurde die cDNA bei -20 °C zum Labor des Institutes für medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen gebracht. Die Arbeitsgruppe von Torsten Hain führte die Sequenzierung mittels Deep Sequencing durch.

2.2.9 Kalziummessungen an isolierten Zellen aus dem Thymus

Zur Untersuchung der chemosensorischen Funktion der Bürstenzellen und ihrer Effekte auf die Umgebung wurde die isolierte Zellsuspension verschiedenen Pharmaka ausgesetzt.

Hierfür wurden runde Deckgläschen (Durchmesser 3 cm; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) als Adhäsionsgrundlage benutzt. Je 2 Deckgläschen wurden mit einem Gemisch aus 3 µl Cell Tek (Discovery Labware Inc, Bedford, MA, USA), 12 µl 2 M Natriumkarbonat und 0,45 µl 2-Propanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) beschichtet und zum Trocknen in einen Wärmeschrank mit 37 °C gestellt. Anschließend wurden sie zweimalig mit Aqua destillata (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) gereinigt und getrocknet.

Die Zellsuspension wurde zusammen mit dem Kalziumindikator GFP-CERTIFIED® FLUOFORTE® (Enzo Life Sciences, Lausen, Schweiz) oder Calcium Orange™ (AM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) auf Deckgläschen in eine 6-Well-Platte überführt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Calcium Orange™ wurde in Experimenten mit Acetylcholinrezeptorblockern, mit direkter Stimulation durch Acetylcholin und teilweise beim Einsatz von Cycloheximid benutzt. In allen anderen Experimenten wurde FLUOFORTE® benutzt. Beide Indikatoren unterscheiden sich in den Exzitations-/Emissionsspektren, welche von Calcium Orange™ bei 549/576 nm und von FLUOFORTE® bei 530/570 nm liegen. Das Deckgläschen wurde dann in einer mit Tyrode II-Puffer gefüllten Messkammer auf dem Objektisch des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (CLSM, Leica-TCS SP2 AOBS; Leica, Mannheim, Deutschland) befestigt. Der Objektisch wurde konstant auf 37 °C gehalten, während eine Pumpe die Messkammer mit frischem warmem Puffer versorgte und den alten Puffer absaugte. Die

mit Kalziumindikator beladenen Zellen ändern ihre Leuchtintensität bei Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Mit Hilfe der Software Zen 11 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland) wurden Kalziumkonzentrationsveränderungen innerhalb der Zellen als Korrelat der Reaktion auf verschiedene Stimuli gemessen. Um osmotische Effekte der hinzugegebenen Substanzen zu eliminieren, wurde das eGFP-Signal mitregistriert und in Relation zur Helligkeit des Kalziumindikators gebracht.

2.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines unabhängigen zweiseitigen t-Tests beziehungsweise des Chi-Quadrat-Tests beim Vergleich der Häufigkeiten. Sowohl die statistischen Berechnungen als auch die graphische Darstellung wurden mit Hilfe der Software Microsoft Excel 2010 ausgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Phänotypen der Bürstenzellen im Thymus

In der Immunhistochemie konnten Zellen mit TRPM5-eGFP-Fluoreszenz in verschiedenen Formen beobachtet werden. Manche von ihnen verfügten über ein spindelförmiges Soma mit einem Zellausläufer, andere zeigten sich rund. Einige formierten sich in Cluster aus mehreren Einzelzellen. Die TRPM5-eGFP-positiven Zellen befanden sich vor allem im äußeren Mark des Thymus. Des Weiteren zeigte sich, dass fast alle ChAT-immunreaktiven Zellen TRPM5-eGFP-positiv waren (94%; n=395; Abbildung 3.1 a); dies gilt auch größtenteils für GNAT3 (86%; n=291; Abbildung 3.1 b) und PLC β 2 (81%; n=927; Abbildung 3.1 c). Allerdings waren viele TRPM5-eGFP-positiv Zellen nicht immunreaktiv für GNAT3 (64%; n=706; Abbildung 3.1 b Inset) oder ChAT (31%; n=543; Abbildung 3.1 a), für PLC β 2 betrug der nicht-immunreaktive Anteil 17% (n=897). Mit Antikörpern gegen TRPM5 ergab sich eine Deckung der Immunreaktivität mit dem TRPM5-eGFP-Signal von 84% (n=879; Abbildung 3.1 d). Benutzt wurden fünf TRPM5-eGFP-Mäuse, zwischen 29 und 36 Wochen alt. N entspricht der Anzahl der gezählten Zellen.

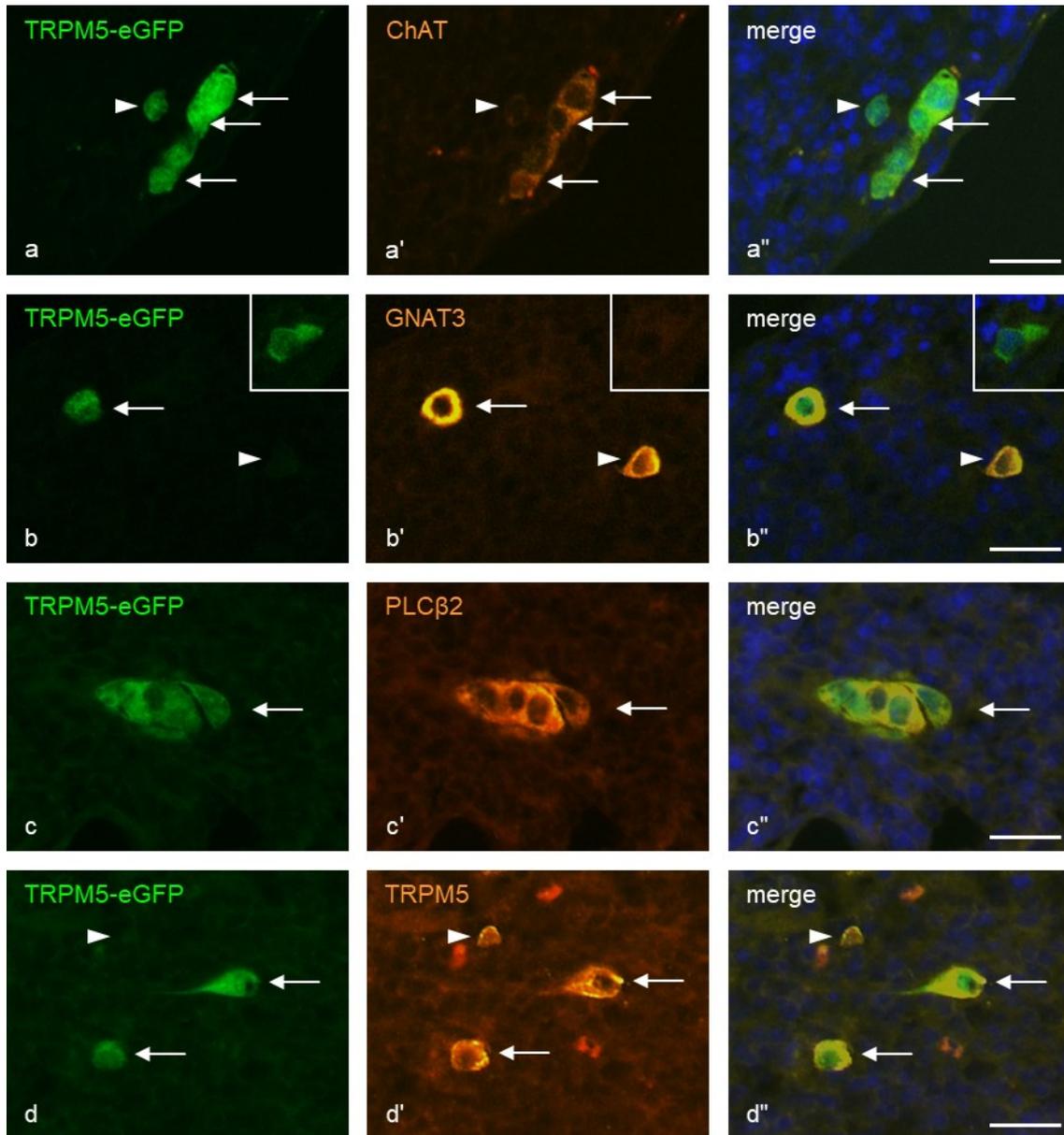
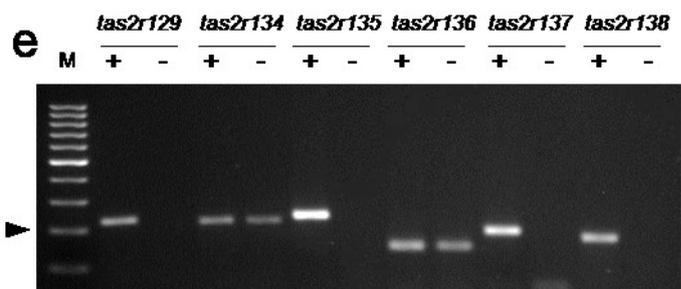
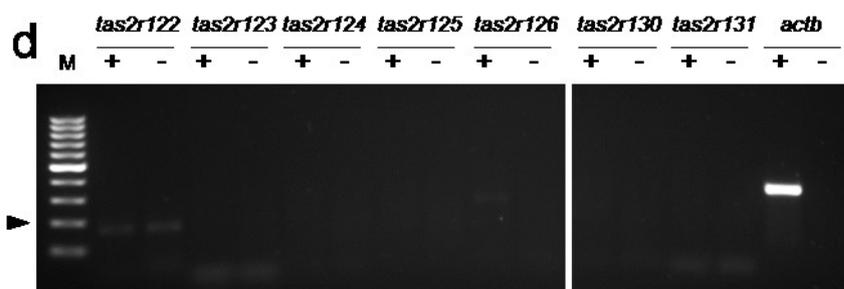
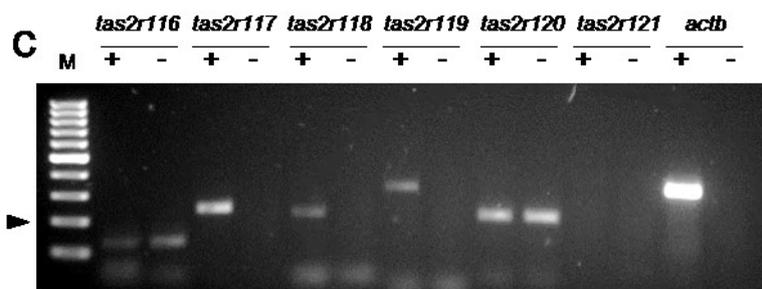
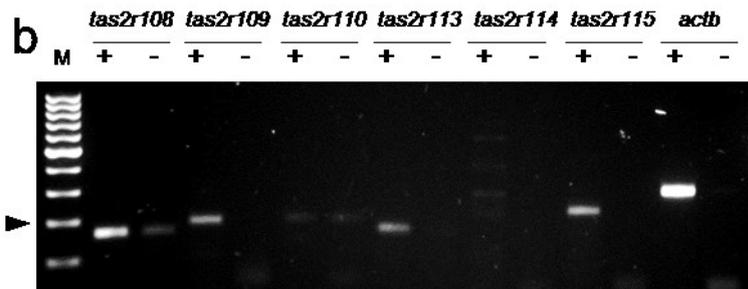
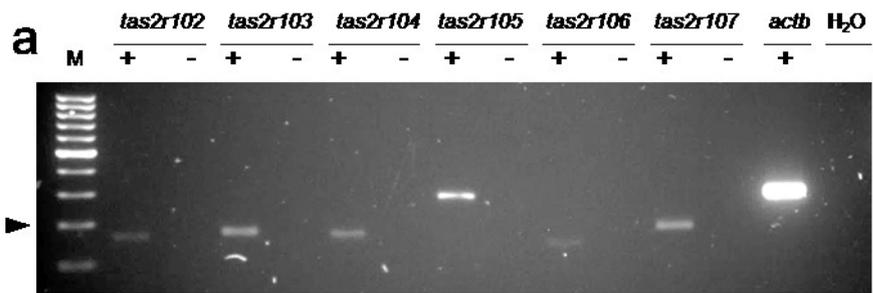


Abbildung 3.1 Immunhistochemie an Gewebeschnitten vom Thymus, TRPM5-eGFP-Maus

a Es finden sich neben doppelpositiven Zellen für ChAT und TRPM5 (Pfeil) auch einfach TRPM5-positive Zellen (Pfeilkopf). **b** Eine GNAT3-TRPM5-doppelpositive Zelle (Pfeil) neben einer einfach GNAT3-positiven Zelle (Pfeilkopf). **Inset b** Einfach TRPM5-positive Zelle. **c** Eine Gruppe eng beieinander liegender TRPM5-PLC β 2-doppelpositiver Zellen (Pfeil). **d** Es gibt auch TRPM5-eGFP-negative Zellen mit Immunreaktivität für TRPM5-Antikörper (Pfeilkopf). **a-d** Der Balken entspricht 20 μ m, Merge ist mit Kernmakierung durch DAPI dargestellt.

3.2 Expression von Geschmacksrezeptoren im Thymus

Die RT-PCR zeigte, dass im Thymus mRNA-Expressionen von verschiedenen Bitterrezeptoren (*tas2r102-109*, *tas2r113*, *tas2r115*, *tas2r117-119*, *tas2r129*, *tas2r135*, *tas2r137-139*, *tas2r143*, *tas2r144*; Abbildung 3.2 a-c, e und f) sowie von *tas1r1* und *tas1r3* (Abbildung 3.2 g) vorhanden sind. Die mRNA-Expression von *tas2r139* und *tas2r144* (Abbildung 3.3 c und e) fehlte allerdings in der Positivkontrolle aus der Zunge. Bei *tas2r110*, *tas2r114*, *tas2r121-126*, *tas2r130-131* (Abbildung 3.2 b-d) konnte im Thymus keine mRNA-Expression nachgewiesen werden, bei *tas2r114* und *tas2r121* (Abbildung 3.2 b und c) auch nicht in der Positivkontrolle. Bei *tas2r116*, *tas2r120*, *tas2r134*, *tas2r136* und *tas2r140* (Abbildung 3.2 c, e und f) zeigten sich PCR-Produkte sowohl in den Proben mit als auch ohne reverse Transkriptase. Hier muss von einer Transkription der nukleären DNA ausgegangen werden und das Ergebnis kann somit nicht gewertet werden. Zum mRNA-Nachweis wurde der Thymus einer C57BL/6N-Maus und als Positivkontrolle die Zunge einer C57BL/6N-Maus benutzt.



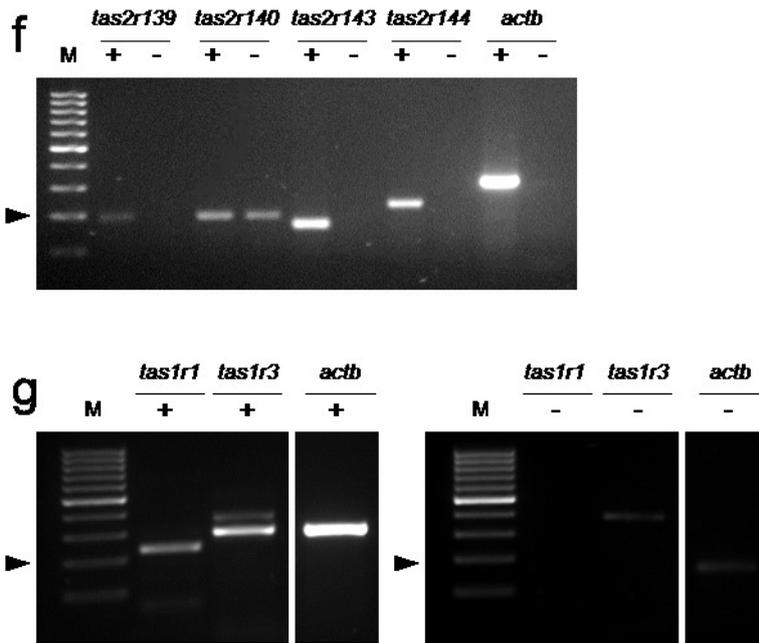


Abbildung 3.2 RT-PCR von Zellen aus dem Thymus, elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel, C57BL/6N-Maus

*Bilder mit engem Abstand zueinander stammen vom selben Agarosegel und wurden höhengetreu zugeschnitten. Der Pfeilkopf zeigt auf den 200 Basenpaar(bp)-Marker (M). Die Marker sind von 100-1000 Basenpaaren mit jeweils einem Abstand von 100 Basenpaaren zueinander aufgereiht. Die PCR wurde an Proben mit (+) und ohne (-) Reverse Transkriptase und mit Wasserkontrolle (H₂O) durchgeführt. β -Aktin (*actb*) dient als Haushaltsgen. Die Reihen e und f stammen aus derselben PCR und haben somit eine gemeinsame β -Aktin-Kontrolle.*

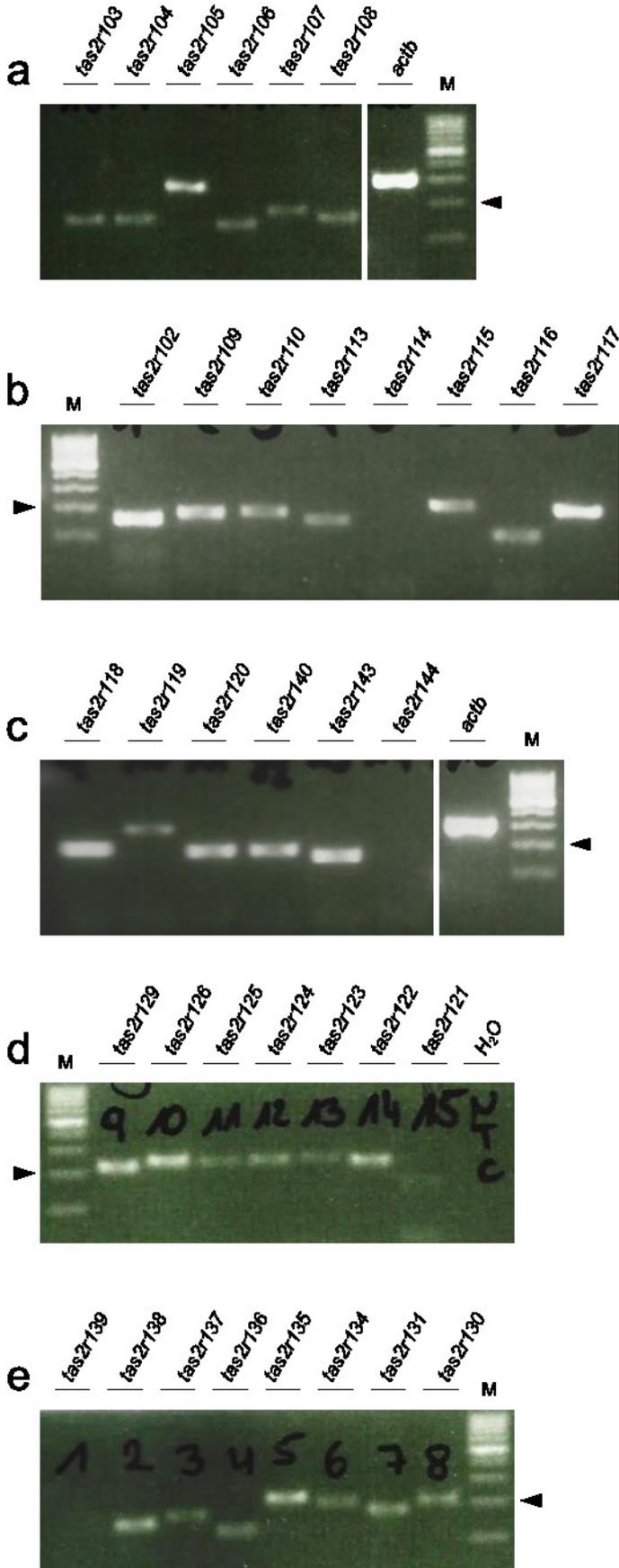


Abbildung 3.3 Positivkontrolle: RT-PCR von Zellen aus der Zunge, elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel, C57BL/6N-Maus

Bilder mit engem Abstand zueinander stammen vom selben Agarosegel und wurden höhengetreu zugeschnitten. Der Pfeilkopf zeigt auf den 200 Basenpaar(bp)-Marker (M). Die Marker sind von 100-1000 Basenpaaren mit jeweils einem Abstand von 100 Basenpaaren zueinander aufgereiht. H₂O: PCR mit Wasserkontrolle. β -Aktin (actb) dient als Haushaltsgen. Die Reihen b und c und die Reihen a, d und e stammen jeweils aus derselben PCR und haben somit eine gemeinsame β -Aktin-Kontrolle.

3.3 Identifizierung und Anreicherung der Bürstenzellen aus dem Thymus

Zellen wurden aus Thymi von zwei ChAT-eGFP-Mäusen wie bereits beschrieben (Kapitel 2.2.2) extrahiert, mit fluorochrommarkierten Antikörpern gegen EpCAM, MHC-II oder mit dem Primärantikörper gegen TRPM5 plus dem Cy3-markierten Anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper beladen und auf einem Deckgläschen in einer mit Tyrode II-Puffer gefüllten Messkammer unter dem CLSM betrachtet.

Es zeigte sich hierbei ein großer Teil von ChAT-eGFP-positiven Zellen mit CD45-Markierung und ein kleiner Teil ohne CD45-Markierung. Die ChAT-eGFP-positiven Zellen mit fehlender CD45-Markierung zeigten eine deutliche Immunreaktivität für das büstenzellcharakteristische Markerprotein TRPM5 und gelten als die gesuchten Bürstenzellen (Abbildung 3.4 a). Es waren ChAT-eGFP-positiven Zellen mit TRPM5-Markierung zu sehen, die gleichzeitig eine CD45-Immunfluoreszenz aufwiesen (Abbildung 3.4 b). Daneben fand sich auch eine Gruppe TRPM5-positiver Zellen, jedoch ohne ChAT-eGFP-Signal (Abbildung 3.4 a). Zusätzlich konnten ChAT-eGFP-positive und CD45-negative Zellen gefunden werden, die gegen EpCAM oder MHC-II immunreaktiv waren (Abbildung 3.4 c und d).

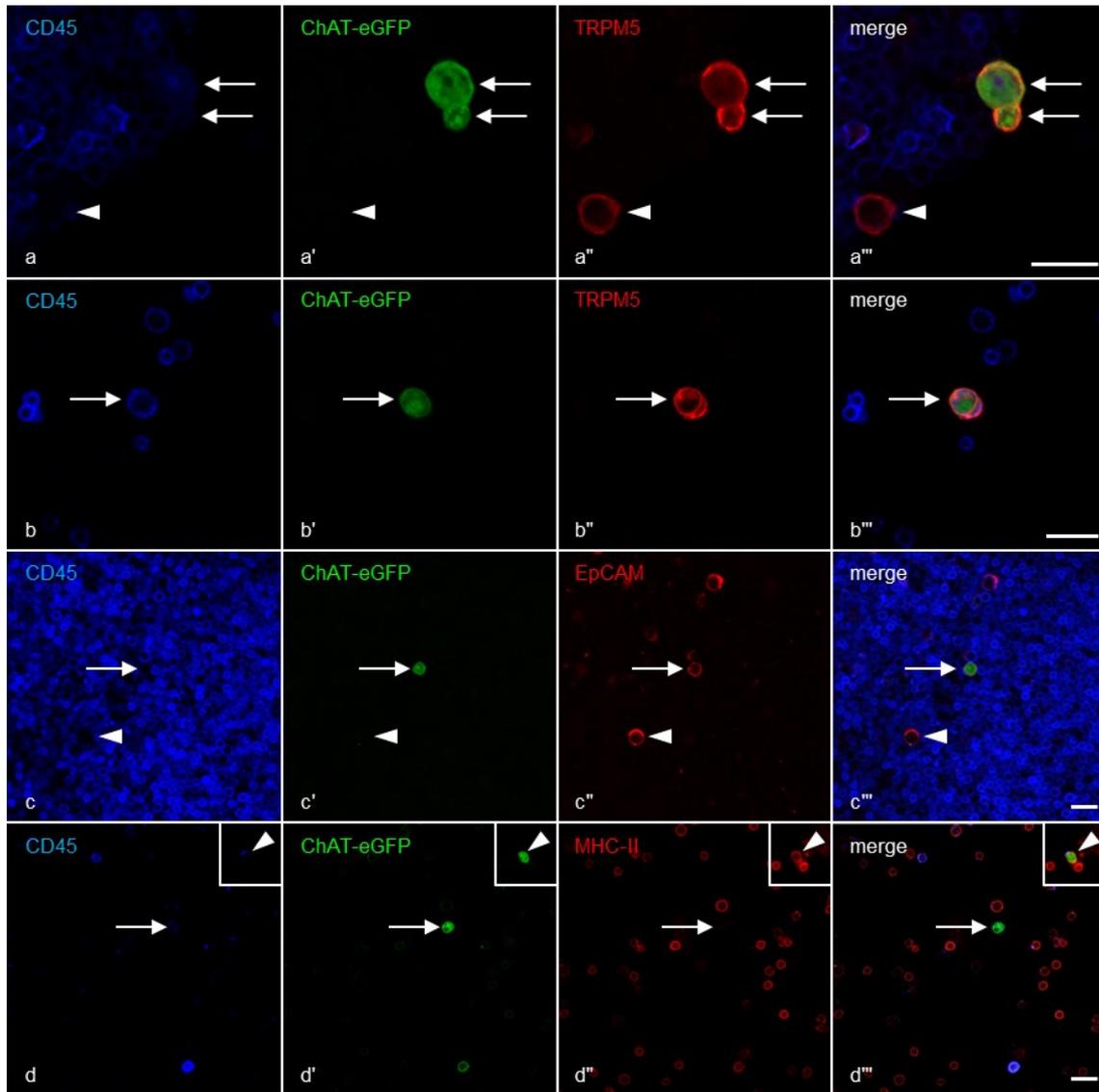


Abbildung 3.4 Immunhistochemie an isolierten Zellen vom Thymus, ChAT-eGFP-Maus

a Die TRPM5-immunreaktiven Zellen sind CD45-negativ und sowohl ChAT-eGFP-positiv (Pfeil) als auch -negativ (Pfeilkopf). *b* Es sind auch dreifach positive ($CD45^+/ChAT-eGFP^+/TRPM5^+$) Zellen zu finden (Pfeil). *c* Die ChAT-eGFP-positiven und CD45-negativen Zellen sind auch immunreaktiv gegen EpCAM (Pfeil). Daneben befindet sich eine einfach EpCAM-positive Zelle (Pfeilkopf). **Inset d** Die ChAT-eGFP-positiven und CD45-negativen Zellen sind teilweise immunreaktiv gegen MHC-II (Pfeilkopf). *d* Pfeil zeigt auf eine MHC-II-negative, CD45-negative und ChAT-eGFP-positive Zelle. **a-d** Der Balken entspricht 20 μ m.

Die aus dem Thymus einer ChAT-eGFP-Maus gewonnenen Zellen wurden zusätzlich mit Anti-CD45-Microbeads gereinigt (Kapitel 2.2.2). Vor und nach dem Anreicherungsverfahren mit Microbeads wurde jeweils ein Teil der Zellen entnommen, mit dem Antikörper Anti-CD45-APC-Vio770 angefärbt und mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf seine Bestandteile analysiert.

In der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die gesuchten Bürstenzellen (ChAT-eGFP⁺/CD45⁻) von der Gesamtheit der aus dem Thymus gewonnenen Zellen durch das Anreicherungsverfahren mit Microbeads deutlich konzentriert werden konnten, von 0,09% (Q1 in Abbildung 3.5 b) auf 0,62% (Q1 in Abbildung 3.5 c).

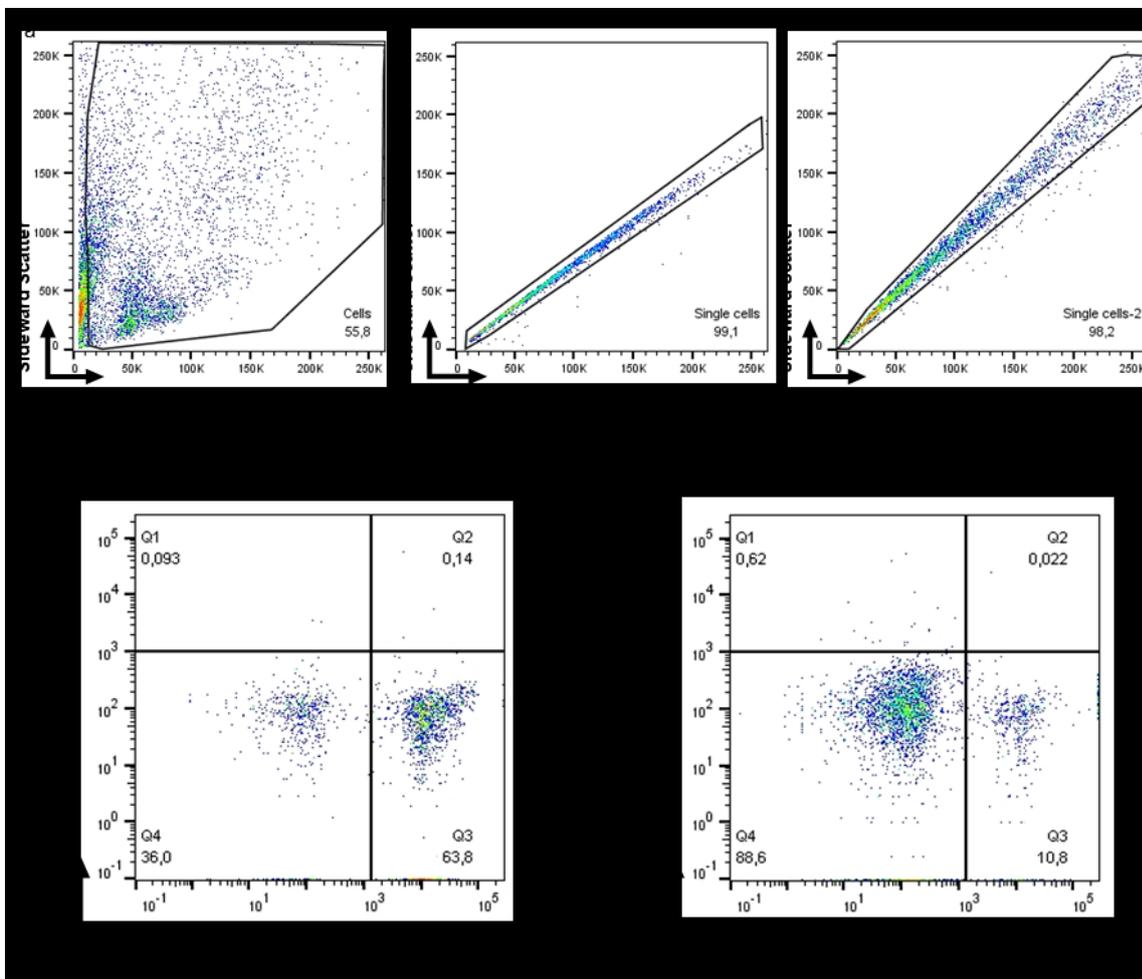


Abbildung 3.5 Durchflusszytometrie mit Zellen vor und nach dem Anreicherungsverfahren mit Anti-CD45-Microbeads, ChAT-eGFP-Maus

a Gatingstrategie der Durchflusszytometrie. *b* Vor dem Anreicherungsverfahren, insgesamt 2151 Zellen. *c* Nach dem Anreicherungsverfahren, insgesamt 4525 Zellen.

c Q1 entspricht dem Anteil der Bürstenzellen (ChAT-eGFP⁻/CD45⁺), Q2 dem Anteil der ChAT-eGFP⁻ und CD45-positiven Zellen, Q3 dem Anteil der ChAT-eGFP-negativen und CD45-positiven Zellen, Q4 dem Anteil der ChAT-eGFP⁻ und CD45-negativen Zellen.

3.4 Vorkommen von *aire*, *h2-aa* (MHC-II), *cd45* und *tas2r104* in Bürstenzellen des Thymus

3.4.1 RT-PCR von mit FACS isolierten Zellen

Es wurden Zellen aus dem Thymus einer ChAT-eGFP-Maus isoliert und mithilfe von FACS in folgende drei Gruppen sortiert: ChAT-eGFP⁺/CD45⁻ (Bürstenzellen), ChAT-eGFP⁻/CD45⁺ und ChAT-eGFP⁺/CD45⁺. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese aus der extrahierten mRNA dieser Zellen. Der mRNA-Nachweis von *chat* und *egfp* zeigte den Erfolg der Sortierung mit FACS.

In den Bürstenzellen konnte die mRNA-Expression von Komponenten der kanonischen Geschmackskaskade (*gnat3*, *plcb2*, *trpm5*), von Bürstenzellmarkern (*epcam*, *villin*, *ck8*, *ck18*) sowie vom Bitterrezeptor *tas2r104* nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte die RT-PCR der Bürstenzellen auch mRNA-Expression von *aire* und *ck14*. PCR-Produkte von *h2-aa* und *cd45* fanden sich in allen drei Gruppen. In der ChAT-eGFP⁻/CD45⁺-Fraktion ließ sich mRNA von *cd3* (T-Zellmarker) nachweisen.

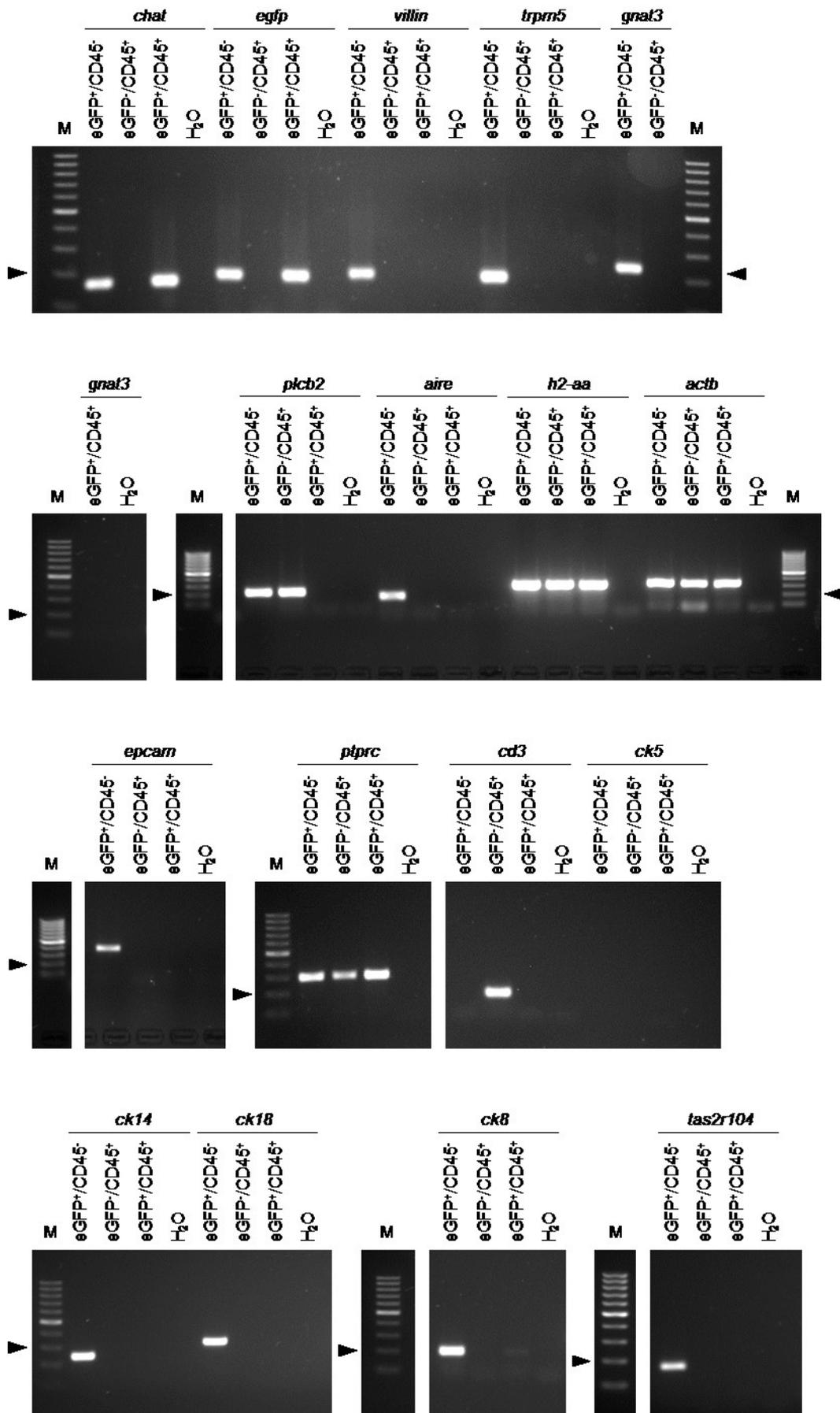


Abbildung 3.6 RT-PCR von mit FACS isolierten Zellen vom Thymus, elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel, ChAT-eGFP-Maus

*Bilder mit engem Abstand zueinander stammen vom selben Agarosegel und wurden höhengetreu zugeschnitten. Alle Gele stammen von derselben PCR. Der Pfeilkopf zeigt auf den 200 Basenpaar(bp)-Marker (M). Die Marker sind von 100-1000 Basenpaaren mit jeweils einem Abstand von 100 Basenpaaren zueinander aufgereiht. H₂O: PCR mit Wasserkontrolle. β -Aktin (*actb*) dient als Haushaltsgen.*

3.4.2 Deep Sequencing von Einzelzellen

Zellen aus dem Thymus zweier ChAT-eGFP-Maus wurden isoliert und mit dem Anti-CD45-PE-Antikörper beladen. Unter fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle wurden fünf einzelne Zellen herausgepickt. Zellen Nummer (Nr.) 1 bis Nr. 3 zeigten hierbei ein GFP-Signal bei fehlender CD45-Markierung. Die restlichen zwei Zellen zeigten weder eine grüne Fluoreszenz noch eine Antikörpermarkierung. Nach der mRNA-Extraktion mit cDNA-Synthese erfolgte die Analyse dieser Zellen mit Deep Sequencing. Der Nachweis von *chat* in Nr. 1 bis 3 zeigte den Erfolg der Entnahme und der Umschreibung.

In den Bürstenzellen (ChAT-eGFP⁺/CD45⁻) konnte die mRNA-Expression von den Komponenten der kanonischen Geschmackskaskaden (*gnat3*, *plcb2*, *trpm5*) sowie anderen büstenzellcharakteristische Genen (*avil*, *dclk1*) nachgewiesen werden, wobei *gnat3* nur einmal nachweisbar war. Die Expression von *epcam*, einem Epithelzellmarker, war allerdings nur in zwei der drei Bürstenzellen nachzuweisen. Außerdem konnte die Genexpression von MHC-II (*h2-ab1*, *h2-aa*, *cd74*) in einer Bürstenzelle und den ChAT-eGFP- und CD45-negativen Zellen gezeigt werden. Auch eine geringe *cd45*-Expression (*ptprc*) auf der mRNA-Ebene war in einer Bürstenzelle zu finden. Die mRNA-Expression von einigen Geschmacksrezeptoren war nachweisbar, wenn auch nur in geringem Maß. Dazu gehören *tas1r2*, *tas1r3*, *tas2r104*, *tas2r118*, *tas2r121*, *tas2r135* und *tas2r138*.

	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5
	ChAT-eGFP ⁺ /CD45 ⁻				
<i>chat</i>	7	15	20	0	0
<i>gnat3</i>	5	0	0	0	0
<i>plcb2</i>	11	12	14	1	0
<i>trpm5</i>	16	34	100	0	0
<i>avil</i>	8	5	61	1	0
<i>dclk1</i>	12	22	29	7	6
<i>epcam</i>	0	4	27	5	0
<i>krt8</i>	3	1	0	2	2
<i>krt18</i>	1	7	9	9	9
<i>krt5</i>	0	0	0	10	11
<i>krt14</i>	0	0	8	0	1
<i>aire</i>	1	1	0	0	0
<i>h2-ab1</i>	18	0	0	15	2
<i>h2-aa</i>	0	0	1	0	2
<i>cd74</i>	12	2	0	10	7
<i>ptprc</i>	0	0	5	2	0
<i>tas1r1</i>	0	0	0	0	0
<i>tas1r2</i>	1	0	0	0	0
<i>tas1r3</i>	3	4	0	0	5
<i>tas2r102</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r103</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r104</i>	1	0	0	0	0
<i>tas2r105</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r106</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r107</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r108</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r109</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r110</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r113</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r114</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r115</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r116</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r117</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r118</i>	0	1	0	0	0
<i>tas2r119</i>	0	0	0	2	0
<i>tas2r120</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r121</i>	2	0	0	0	0
<i>tas2r122</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r123</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r124</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r125</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r126</i>	0	0	0	0	0

<i>tas2r129</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r130</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r131</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r134</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r135</i>	0	0	1	0	0
<i>tas2r136</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r137</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r138</i>	4	0	0	0	0
<i>tas2r139</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r140</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r141</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r142</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r143</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r144</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r145</i>	0	0	0	0	0
<i>tas2r146</i>	0	0	0	0	0

Tabelle 3.1 Genexpression der untersuchten Einzelzellen vom Thymus, Deep Sequencing, ChAT-eGFP-Maus

Die Genexpressionen sind in unique exon reads angegeben. Farbliche Markierungen kennzeichnen unterschiedliches Expressionslevel: Null in Rot, 1-4 in Gelb, 5-19 in Hellgrün, ab 20 in Dunkelgrün. Krt=Keratin, entspricht ck.

3.5 Denatonium löst eine Reaktion in den Bürstenzellen und den ChAT-eGFP-negativen Zellen aus

Nach Isolations- und Anreicherungsverfahren mit Thymi von ChAT-eGFP-Mäusen wurden die Zellen unter dem CLSM zur Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) genutzt. Als Bürstenzellen wurden solche Zellen betrachtet, die ein ChAT-eGFP-Signal hatten und keine CD45-Antikörpermarkierung zeigten.

3.5.1 Denatonium erzeugt einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$

In 16 von 34 Bürstenzellen (47%) und 8 von 23 ChAT-eGFP-negativen Zellen (35%) konnte man nach Gabe von Denatonium zwischen 0,1 mM bis 25 mM einen Anstieg der

$[Ca^{2+}]_i$ beobachten. Dabei reagierten eine Bürstenzelle bereits bei einer Konzentration von 1 mM, 3 bei 5 mM, 10 bei 10 mM und 2 bei 25 mM. Von den ChAT-eGFP-negativen Zellen reagierten 5 bei einer Konzentration von 5 mM und 3 bei 10 mM. Benutzt wurden 11 ChAT-eGFP-Mäuse.

Davon erfolgte die Gabe von Denatonium bei 21 Bürstenzellen und 6 ChAT-eGFP-negativen Zellen in konsekutiv aufsteigender Konzentration von 1 mM, 5 mM und 10 mM. Dabei konnte ein langsamer Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in 9 von 21 Bürstenzellen (43%) registriert werden (Abbildung 3.7). Eine Zelle reagierte bereits bei 5 mM, die restlichen 8 bei 10 mM. Bei den ChAT-negativen Zellen konnte in 3 von 6 Zellen (50%) ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ bei 10 mM Denatonium registriert werden (Abbildung 3.8).

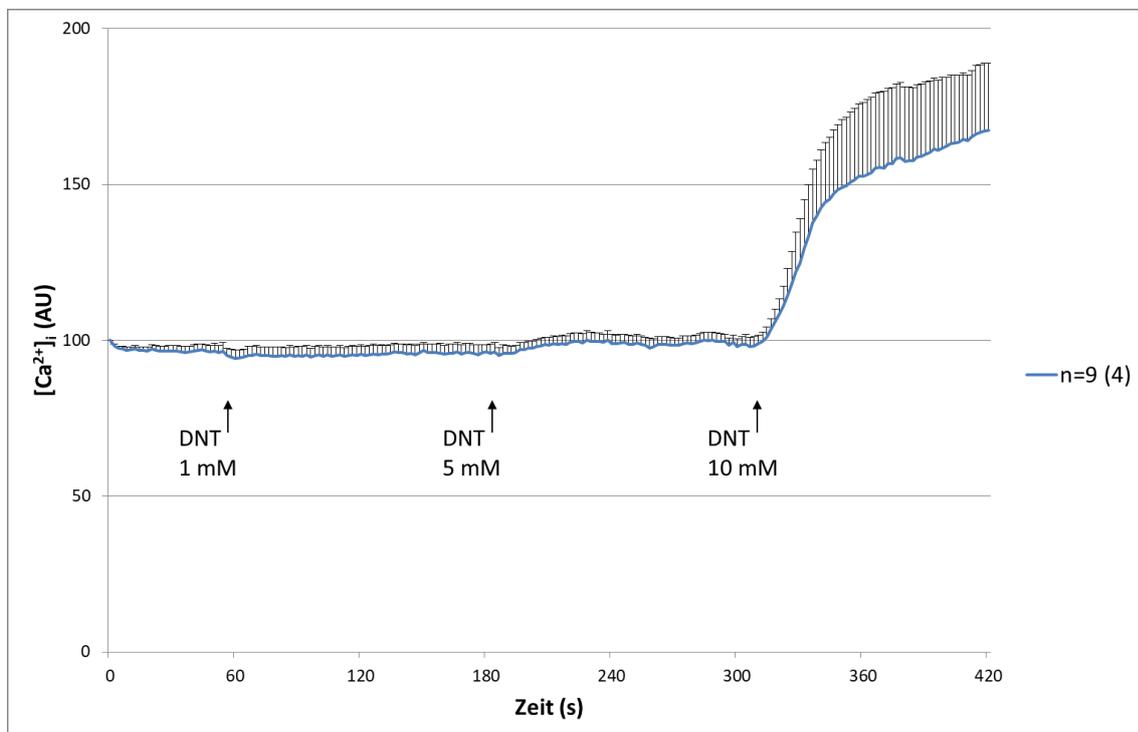


Abbildung 3.7 Kalziummessungen an isolierten Bürstenzellen bei Gabe von Denatonium (DNT) in aufsteigender Konzentration

Dargestellt ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration der reagierenden Zellen in arbitrary units (AU). Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler. Stichprobenanzahl (n): Anzahl der reagierenden Zellen mit (Anzahl der verwendeten Mäuse).

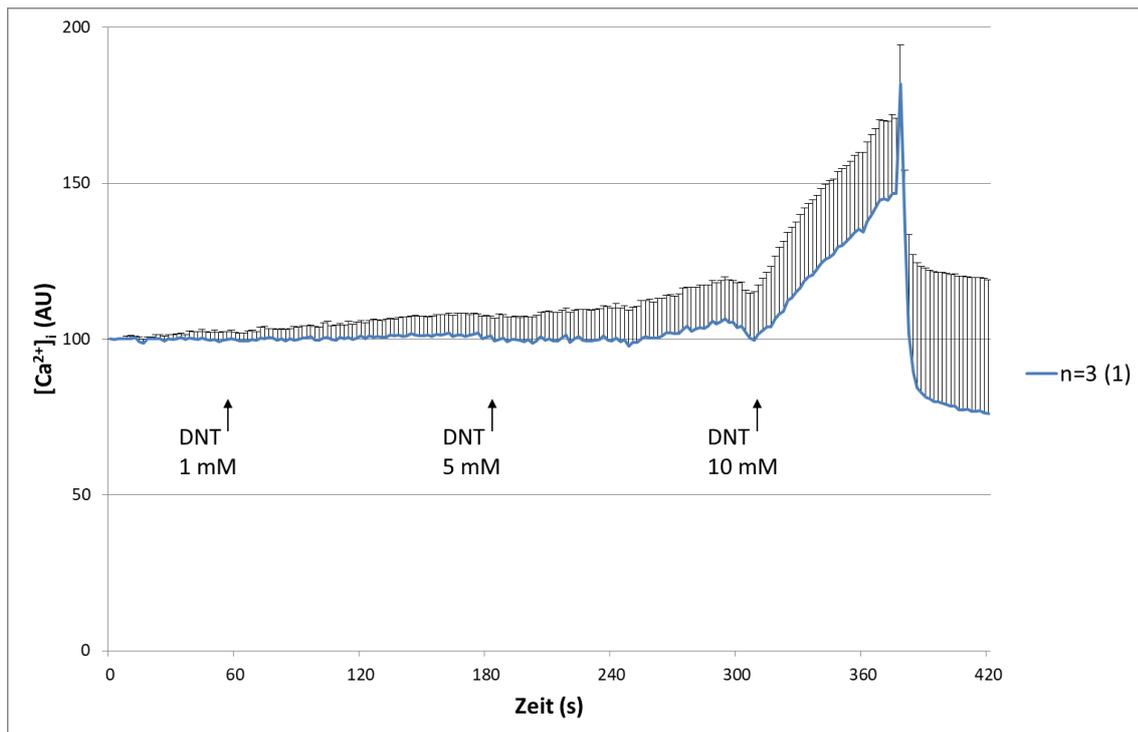


Abbildung 3.8 Kalziummessungen an isolierten ChAT-negativen Zellen bei Gabe von Denatonium (DNT) in aufsteigender Konzentration

Dargestellt ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration der reagierenden Zellen in arbitrary units (AU). Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler. Stichprobenanzahl (n): Anzahl der reagierenden Zellen mit (Anzahl der verwendeten Mäuse).

3.5.2 Der durch Denatonium induzierte Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ist unabhängig von der kanonischen Geschmackskaskade

In der Experimentalgruppe wurden die isolierten Zellen mit 25 μ M oder 250 μ M TPPO, einem TRPM5-Kanalblocker, eine Minute lang inkubiert. Anschließend wurde unter Zufuhr frischer Pufferlösung die Kalziummessung gestartet. Hierbei wurde zum Zeitpunkt Null Denatonium (10 mM) zusammen mit TPPO in der jeweiligen anfänglichen Dosis (25 μ M oder 250 μ M) appliziert. In der Kontrollgruppe wurde nur Denatonium (10 mM) zum Zeitpunkt Null hinzugegeben.

Sowohl in der Experimentalgruppe als auch in der Kontrollgruppe konnte ein Effekt von Denatonium in den Bürstenzellen (ChAT-eGFP⁺/CD45⁻) beobachtet werden

(Abbildung 3.9). Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der reagierenden Zellen: In der Experimentalgruppe mit 25 μM TPPO reagierten 4 von 6 Zellen, mit 250 μM TPPO 6 von 6 Zellen. In der Kontrollgruppe reagierten 5 von 7 Zellen. Der p-Wert beträgt zwischen der Experimentalgruppe mit 25 μM TPPO und der Kontrollgruppe 0,12, zwischen der Experimentalgruppe mit 250 μM TPPO und der Kontrollgruppe 0,15 (Chi-Quadrat-Test). Auch in der Stärke der Reaktion, abgeleitet vom maximalen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der reagierenden Zellen innerhalb einer Minute nach Gabe von Denatonium, war durch TPPO kein signifikanter Unterschied zu beobachten (Abbildung 3.10): Der p-Wert beträgt zwischen der Experimentalgruppe mit 25 μM TPPO und der Kontrollgruppe 0,22, zwischen der Experimentalgruppe mit 250 μM TPPO und der Kontrollgruppe 0,58 (unabhängiger t-Test).

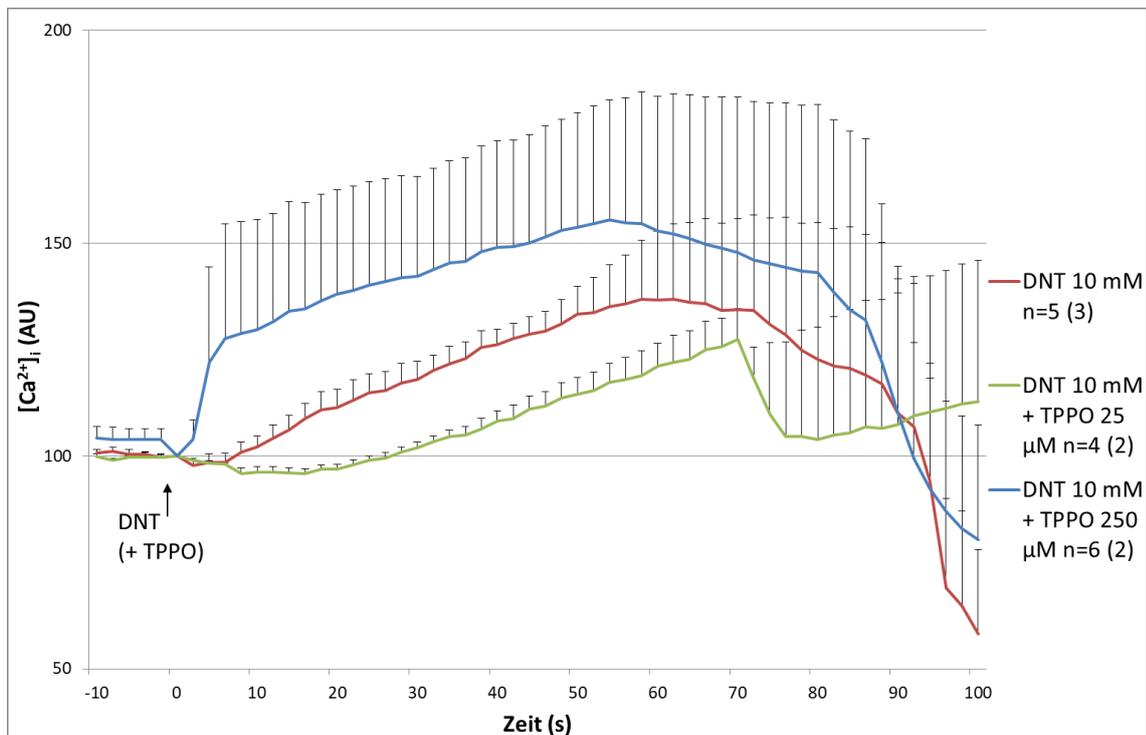


Abbildung 3.9 Kalziummessung an isolierten Bürstenzellen bei Gabe von 10 mM Denatonium (DNT) mit oder ohne TPPO (25 μM oder 250 μM) im Vergleich

Dargestellt ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration der reagierenden Zellen in arbitrary units (AU). Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler. Stichprobenanzahl (n): Anzahl der reagierenden Zellen mit (Anzahl der verwendeten Mäuse).

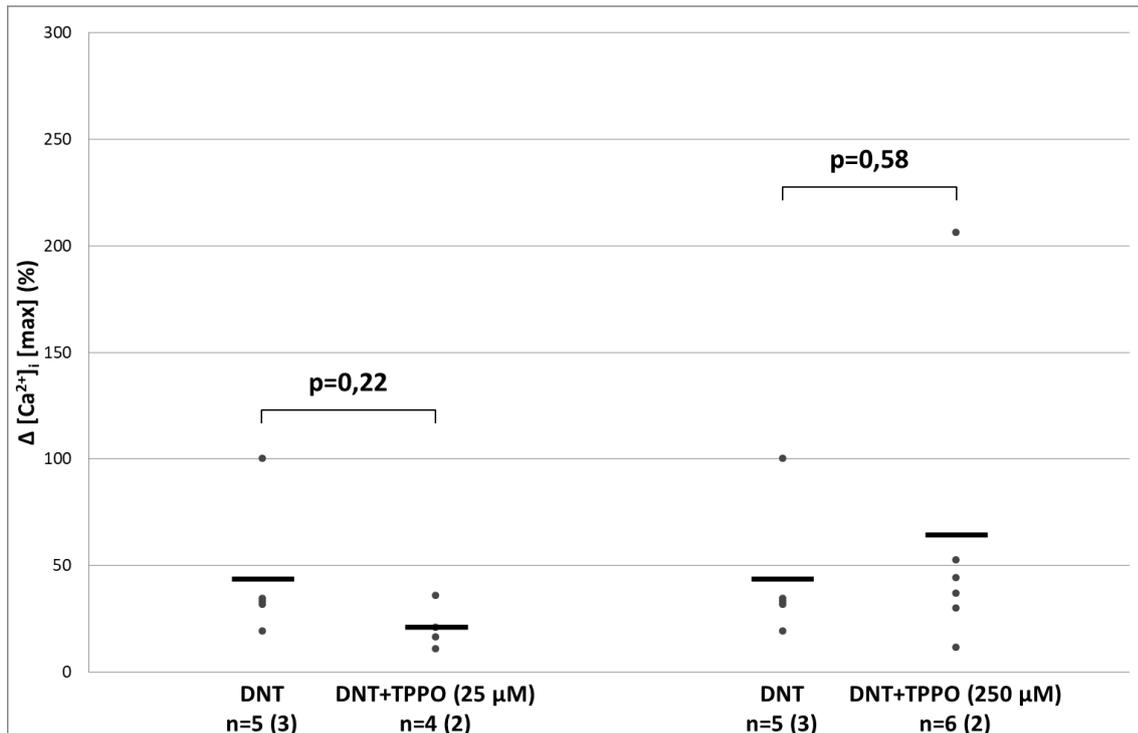


Abbildung 3.10 Maximaler Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in reagierenden Bürstenzellen innerhalb einer Minute nach Gabe von 10 mM Denatonium (DNT) mit oder ohne TPPO (25 μ M oder 250 μ M) im Vergleich

Der Strich kennzeichnet den jeweiligen Mittelwert. P entspricht dem p-Wert des unabhängigen t-Tests zwischen den jeweiligen Gruppen. Stichprobenanzahl (n): Anzahl der reagierenden Zellen mit (Anzahl der verwendeten Mäuse).

Alle ChAT-negativen Zellen reagierten sowohl bei alleiniger Gabe von Denatonium als auch bei Gabe von Denatonium mit TPPO (Abbildung 3.11). Wie bei den Bürstenzellen war ebenfalls in der Stärke der Reaktion, abgeleitet vom maximalen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ der reagierenden Zellen innerhalb einer Minute nach Gabe von Denatonium, durch TPPO kein signifikanter Unterschied zu beobachten (Abbildung 3.12): Der p-Wert beträgt zwischen der Experimentalgruppe mit 25 μ M TPPO und der Kontrollgruppe 0,27, zwischen der Experimentalgruppe mit 250 μ M TPPO und der Kontrollgruppe 0,12 (unabhängiger t-Test).

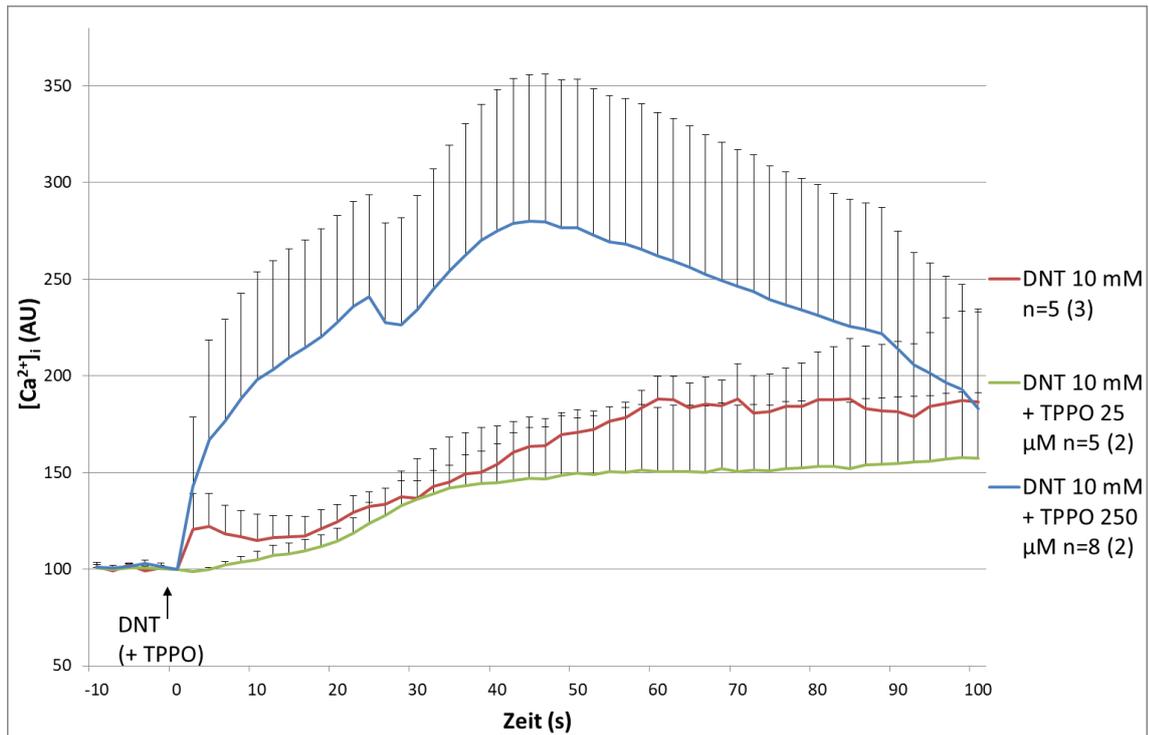


Abbildung 3.11 Kalziummessung an ChAT-negativen Zellen bei Gabe von 10 mM Denatonium (DNT) mit oder ohne TPPO (25 µM oder 250 µM) im Vergleich

Dargestellt ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration der reagierenden Zellen in arbitrary units (AU). Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler. Stichprobenanzahl (n): Anzahl der reagierenden Zellen mit (Anzahl der verwendeten Mäuse).

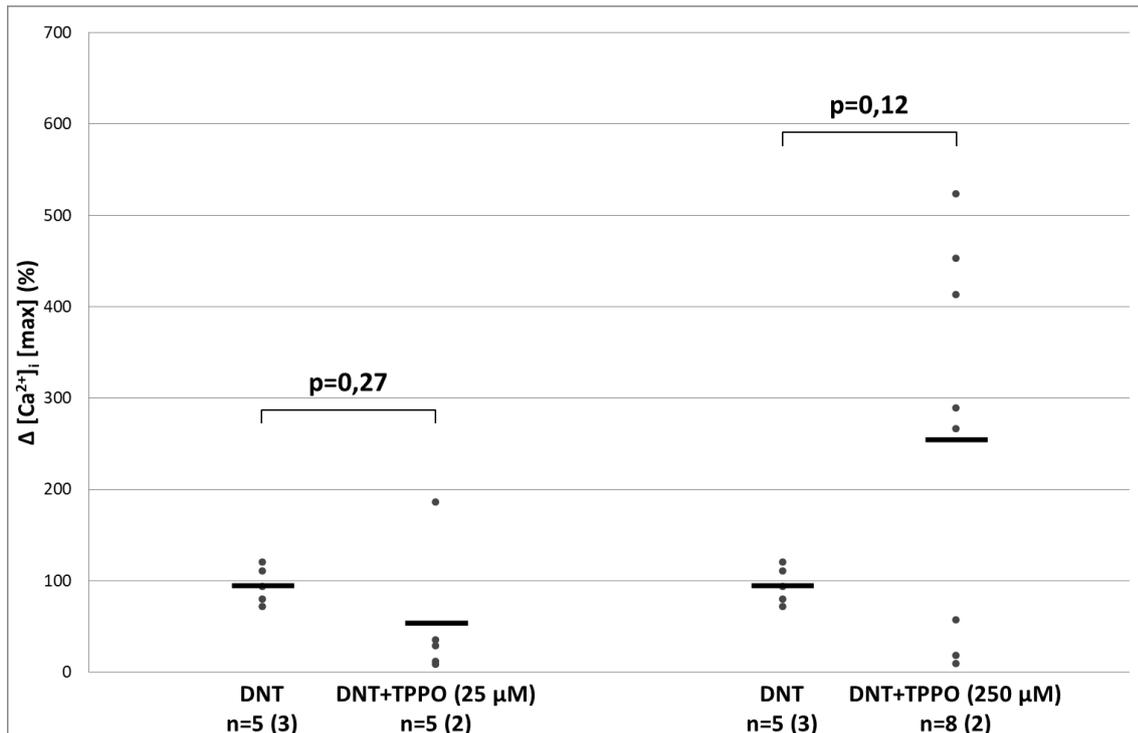


Abbildung 3.12 Maximaler Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in reagierenden ChAT-negativen Zellen innerhalb einer Minute nach Gabe von 10 mM Denatonium (DNT) mit oder ohne TPPO (25 μ M oder 250 μ M) im Vergleich

Der Strich kennzeichnet den jeweiligen Mittelwert. *P* entspricht dem *p*-Wert des unabhängigen *t*-Tests zwischen den jeweiligen Gruppen. Stichprobenanzahl (*n*): Anzahl der reagierenden Zellen mit (Anzahl der verwendeten Mäuse).

3.5.3 Keine cholinerge auto- oder parakrine Stimulation der Bürsten- und Umgebungszellen nach Gabe von Denatonium

In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Bürstenzellen nach Aktivierung ACh freisetzen und so benachbarte Zellen stimulieren können. Dieser parakrine Effekt kann durch cholinerge Rezeptorantagonisten blockiert werden (Deckmann et al. 2014; Perniss et al. 2020). Zur Überprüfung einer solchen cholinergen Signalübertragung wurde die Zellsuspension mit 10 μ M Mecamylamin und 10-50 μ M Atropin, Antagonisten nikotinischer und muskarinischer Acetylcholinrezeptoren, für 20 Sekunden inkubiert. Anschließend wurde unter Zufuhr frischer Pufferlösung Denatonium (5 mM) zusammen mit Mecamylamin und Atropin in der jeweiligen

anfänglichen Dosis appliziert. In der Kontrollgruppe wurde nur Denatonium (5 mM) hinzugegeben. Der maximale Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ innerhalb einer Minute im Vergleich zum Anfangspunkt (Injektionszeitpunkt von Denatonium) wurde in ein Punktdiagramm eingetragen (Abbildung 3.13).

In der Experimentalgruppe mit Denatonium und Acetylcholinrezeptorblockern reagierten 11 von 16 (69%) Bürstenzellen und 8 von 26 (31%) ChAT-eGFP-negativen Zellen. In der Kontrollgruppe mit alleiniger Gabe von Denatonium reagierten 24 von 54 (44%) Bürstenzellen und 24 von 82 (29%) ChAT-eGFP-negativen Zellen. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der reagierenden Zellen: Der p-Wert beträgt bei Bürstenzellen zwischen der Experimentalgruppe und der Kontrollgruppe 0,09, bei ChAT-eGFP-negativen Zellen zwischen der Experimentalgruppe und der Kontrollgruppe 0,88 (Chi-Quadrat-Test). Auch im maximalen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden zwischen der Experimentalgruppe und der Kontrollgruppe (Abbildung 3.13): Der p-Wert für Bürstenzellen beträgt 0,52, für ChAT-negative Zellen 0,86 (unabhängiger t-Test).

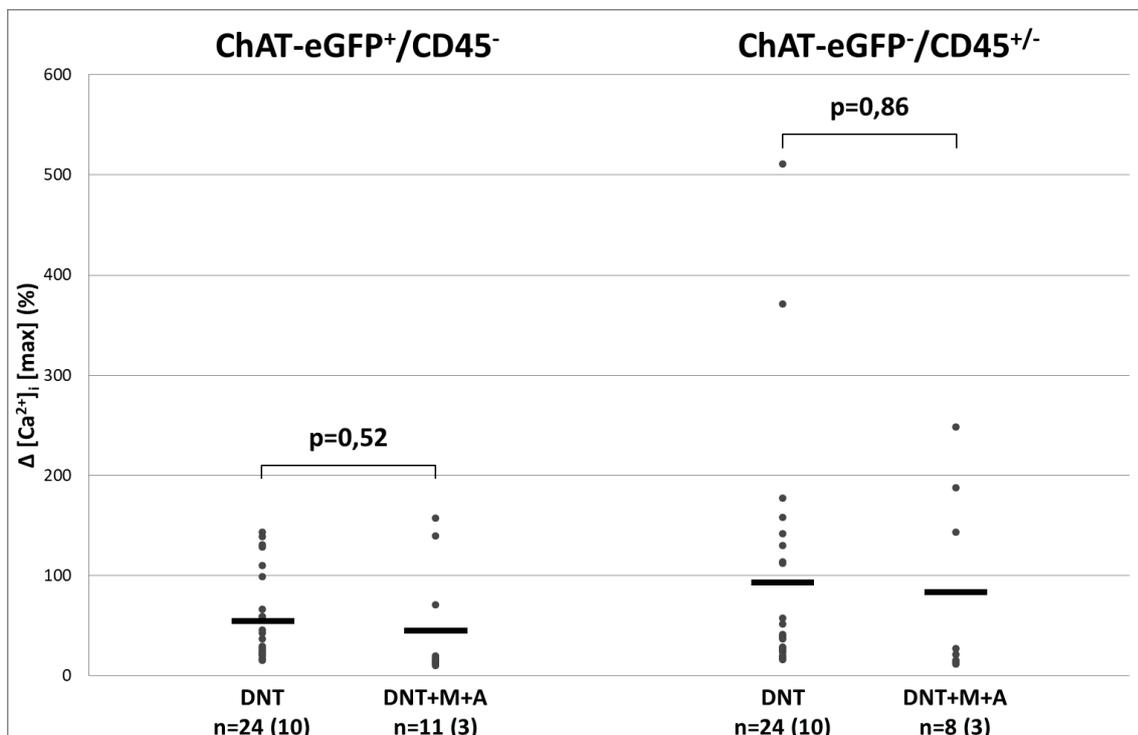


Abbildung 3.13 Maximaler Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in Bürstenzellen (ChAT-eGFP⁺/CD45⁻) und ChAT-eGFP-negativen Zellen (ChAT-eGFP⁻) innerhalb einer

Minute nach Gabe von 5 mM Denatonium (DNT) mit oder ohne 10 μ M Mecamylamin und 10-50 μ M Atropin (M+A)

Der Strich kennzeichnet den jeweiligen Mittelwert. *P* entspricht dem *p*-Wert des unabhängigen *t*-Tests. Stichprobenanzahl (*n*): Anzahl der reagierenden Zellen mit (Anzahl der verwendeten Mäuse).

Bei direkter Stimulation der Zellsuspension mit ACh (50-500 μ M) reagierten weder Bürstenzellen (0 von 5 Zellen) noch ChAT-eGFP-negative Zellen (0 von 10 Zellen; Maus *n*=2). Abbildung 3.14 zeigt einen Teil dieser Zellen bei Gabe von ACh in aufsteigender Konzentration.

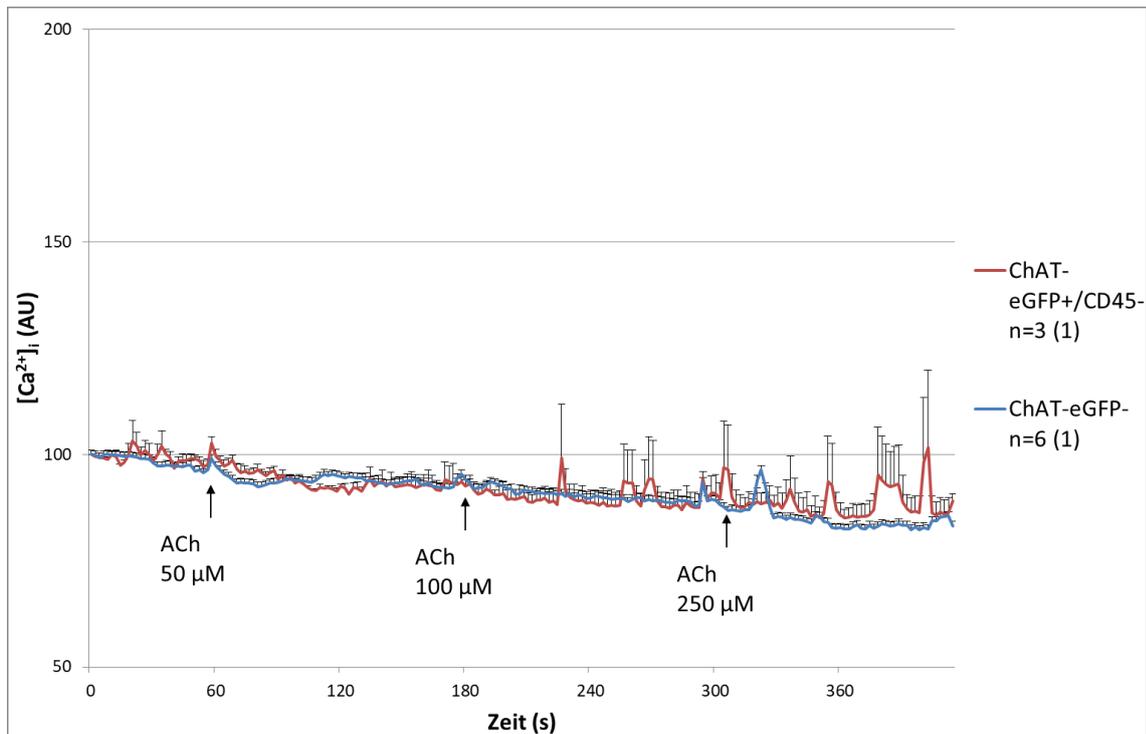


Abbildung 3.14 Kalziummessung an Bürstenzellen (ChAT-eGFP⁺/CD45⁻) und ChAT-eGFP-negativen Zellen (ChAT-eGFP⁻) bei Gabe von Acetylcholin (ACh) in aufsteigender Konzentration

Dargestellt ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration der Beispielizehen in arbitrary units (AU). Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler. Stichprobenanzahl (*n*): Anzahl der Zellen mit (Anzahl der verwendeten Mäuse).

3.6 Weitere Bitterrezeptoragonisten

Es wurden weitere Bitterrezeptoragonisten auf ihren Effekt auf die Bürstenzellen des murinen Thymus und ihre Umgebung untersucht. Es zeigte sich bei keinem der Bitterstoffe eine Reaktion (Tabelle 3.2 und Abbildungen 3.15-3.17).

Bitterrezeptor-agonist	Zielrezeptor	Konzentration	Reagierende Zellen/alle Zellen	Mausanzahl
Cycloheximid	Tas2r105	0,05-0,5 mM	ChAT-eGFP ⁺ /CD45 ⁻ : 0/15 ChAT-eGFP ⁻ : 0/23	n=5
Diphenidolhydrochlorid	u.a. Tas2r105, Tas2r108	0,1-1 mM	ChAT-eGFP ⁺ /CD45 ⁻ : 0/6 ChAT-eGFP ⁻ : 0/6	n=2
Amarogentin	u.a. Tas2r105, Tas2r108	1-5 mM	ChAT-eGFP ⁺ /CD45 ⁻ : 0/6 ChAT-eGFP ⁻ : 0/6	n=2

Tabelle 3.2 Reaktion der Bürstenzellen auf weitere Bitterrezeptoragonisten

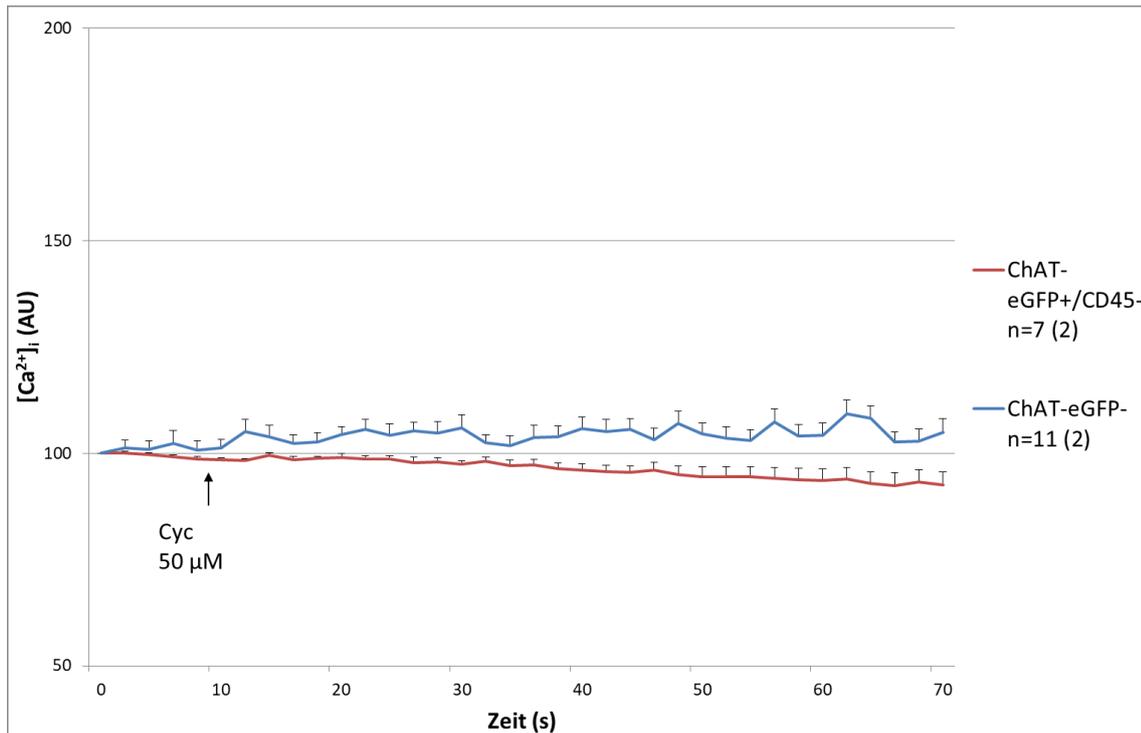


Abbildung 3.15 Kalziummessung an Bürstenzellen (ChAT-eGFP⁺/CD45⁻) und ChAT-eGFP-negativen Zellen (ChAT-eGFP⁻) bei Gabe von 50 μ M Cycloheximid (Cyc)

Dargestellt ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration der Beispielzellen in arbitrary units (AU). Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler. Stichprobenanzahl (n): Anzahl der Zellen mit (Anzahl der verwendeten Mäuse).

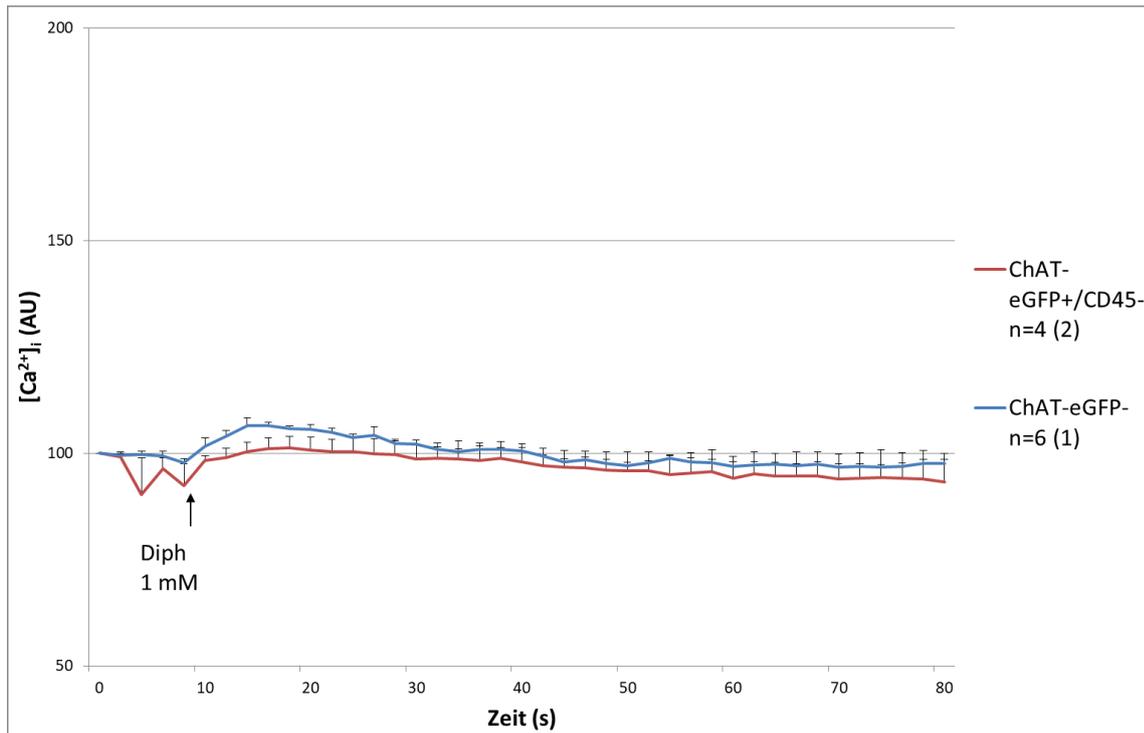


Abbildung 3.16 Kalziummessung an Bürstenzellen (ChAT-eGFP⁺/CD45⁻) und ChAT-eGFP-negativen Zellen (ChAT-eGFP⁻) bei Gabe von 1 mM Diphenidolhydrochlorid (Diph)

Dargestellt ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration der Beispielzellen in arbitrary units (AU). Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler. Stichprobenanzahl (n): Anzahl der Zellen mit (Anzahl der verwendeten Mäuse).

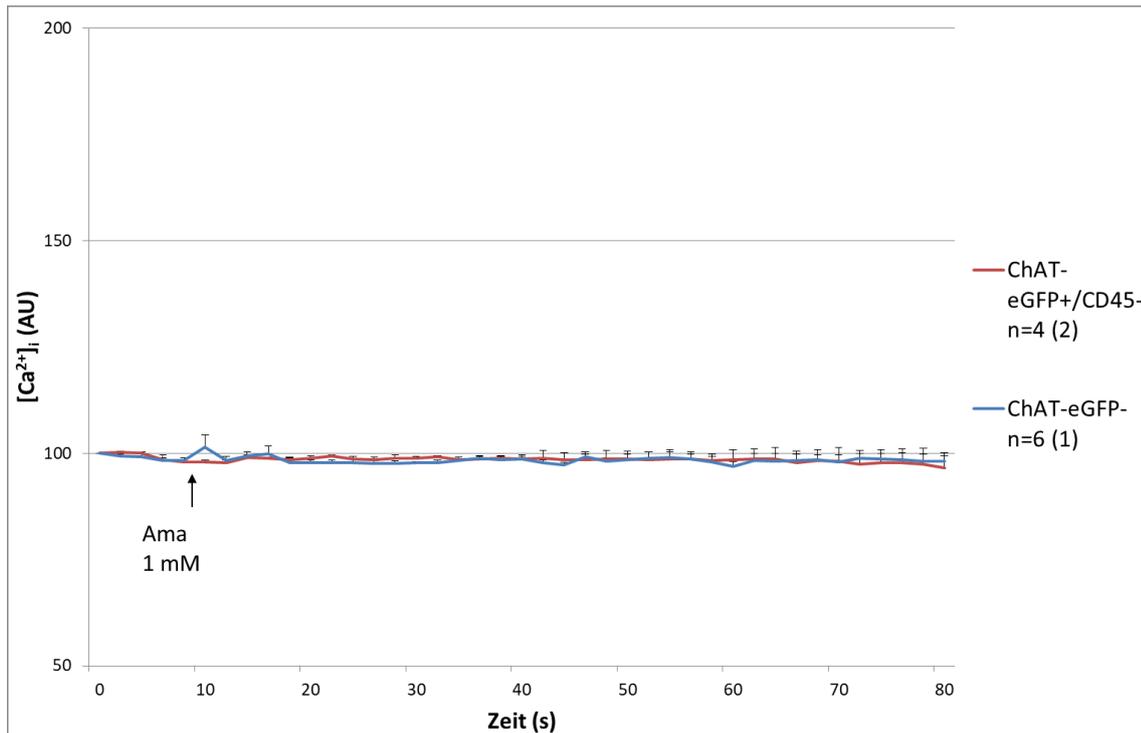


Abbildung 3.17 Kalziummessung an Bürstenzellen (ChAT-eGFP⁺/CD45⁻) und ChAT-eGFP-negativen Zellen (ChAT-eGFP⁻) bei Gabe von 1 mM Amarogentin (Ama)

Dargestellt ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration der Beispielzellen in arbitrary units (AU). Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler. Stichprobenanzahl (n): Anzahl der Zellen mit (Anzahl der verwendeten Mäuse).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Bürstenzellen des Thymus der Maus durch immunhistochemische und molekularbiologische Methoden weiter charakterisiert. Sie konnten aus dem murinen Thymus isoliert, identifiziert und angereichert werden. An den so gewonnenen Einzelzellen wurden diverse Bittersubstanzen zur Stimulation getestet, um die Funktion der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade und ihre Wirkung auf andere Zellen des Thymus zu untersuchen. Darüber hinaus wurde die auto-/parakrine cholinerge Signaltransduktion durch die thymalen Bürstenzellen überprüft.

4.1 Heterogenität der thymalen Bürstenzellen

Um von einer Heterogenität einer Zellpopulation sprechen zu können, ist es im Voraus unabdinglich, die Gemeinsamkeiten, welche diesem Zelltypus die Identität verleiht, zu unterstreichen. Neben der variierenden Form des Somas gilt das lange, steife Büschel von Mikrovilli auf der apikalen Seite der Zelle als ein gemeinsames Merkmal der Bürstenzellen, welches, wie der Name es schon verrät, stark an eine Bürste erinnert (Reid et al. 2005). Doch auch dieses Merkmal scheint sich zumindest nicht in allen Bürstenzellen durchzusetzen. So zeigen die Vertreter in der Tuba auditiva kein typisches Mikrovillibüschel (Krasteva et al. 2012b). In der nasalen Schleimhaut sind die Mikrovilli der Bürstenzelle dicht gepackt und weniger ausgeprägt, ohne das ins Zytoplasma reichende Geflecht aus Filamenten, weshalb manche Autoren sie als eine eigene Population, die SCC, postulierten (Finger et al. 2003; Monteiro-Riviere und Popp 1984; Sbarbati und Osculati 2005). Im Laufe der Jahre wurden viele molekulare Marker für die Bürstenzelle beansprucht, unter anderem CK18, Dclk1, Villin und die Komponenten der kanonischen Geschmackskaskade, sprich TRPM5, GNAT3, PLC β 2 (Gerbe et al. 2009; Höfer und Drenckhahn 1996; Kasper et al. 1994; Saqui-Salces et al. 2011). Schon früh wiesen allerdings Sequenzierungsstudien an Bürstenzellen des Darms auf eine Expression des verwandten Strukturproteins Advillin hin, verbunden mit dem Hinweis auf mögliche Kreuzreaktionen der bisher verwendeten Villin-Antikörper mit Advillin (Bezençon et al. 2008). In der Tat konnten nach Abschluss der Experimente zur vorliegenden Arbeit zwei weiterführende Untersuchungen zeigen, dass Advillin büstenzellspezifisch exprimiert wird, wohingegen Villin eher ubiquitär im Epithel des

Magen-Darm-Traktes und der Gallengänge auftritt (Esmaeilniakooshkghazi et al. 2020; Ruppert et al. 2020). Auch wenn in der weiteren Arbeit weiter der Begriff der Villin-Immunreaktivität beziehungsweise –Expression verwendet wird, ist es daher möglich, dass das Hauptstrukturprotein auch in diesem Fall Advillin statt Villin ist. Gewisse Marker, die von den Bürstenzellen einer Region exprimiert werden, sind in den Zellen anderer Regionen nicht vorhanden. Andere Marker wiederum werden auch von anderen Zelltypen exprimiert. Die Grenze scheint hier zu verschwimmen. Wichtig scheint es, eine Kombination aus verschiedenen Markern plus die morphologischen Merkmale in Betracht zu ziehen, um die Bürstenzelle auch als solche zu identifizieren (Gerbe et al. 2012). In einer vorausgegangen Arbeit (Panneck et al. 2014) wurde der Verdacht geäußert, dass es sich bei den grün fluoreszierenden Zellen des ChAT-eGFP-Mausstammes um thymale Bürstenzellen handeln könnte. Dies konnte durch neuere Untersuchungen (Bornstein et al. 2018; Miller et al. 2018) und auch in dieser Arbeit bestätigt werden.

Nichtsdestotrotz unterscheiden sich die thymalen Bürstenzellen besonders stark von den Bürstenzellen der anderen Körperregionen. Zum einen gilt der Thymus als der erste Fundort von Bürstenzellen, der kein durch Mukosa bedecktes Hohlorgan ist, welches Kontakt zu der Außenwelt pflegt. Hier, im Inneren des primären lymphatischen Organs spielt die Reifung von immunkompetenten T-Zellen die zentrale Rolle. Im Gegensatz zu den mit Mukosa bedeckten Hohlorganen kann im Thymus keine luminale Seite von der basalen Seite unterschieden werden, wodurch der klassische Bürstensaum nicht ausgebildet werden kann. Stattdessen sind Villin-immunreaktive laterale Zellausläufer vorhanden (Panneck et al. 2014). Zum anderen zeigten die mRNA-Sequenzierung und die Hauptkomponentenanalyse der thymalen Bürstenzellen, dass ihre Genexpressionen sich am weitesten von den der anderen Organe distinguieren (Najdsombati et al. 2018). All dies weist auf eine besondere Rolle dieser Zellen hin.

Doch abgesehen von der phänotypischen und genotypischen Vielfalt der Bürstenzellen, die zwischen den unterschiedlichen Lokalisationen im Körper vorzufinden ist, konnte in den bisherigen Untersuchungen eine Variabilität der Bürstenzellen auch innerhalb eines Organs nachgewiesen werden. In der murinen Trachea konnte eine kleine Gruppe von Zellen (17%) beobachtet werden, die eine Antikörperimmunreaktivität für den Bürstenzellmarker Villin besitzt, jedoch keine Expression von ChAT zeigt (Krasteva et al. 2011). Neuere Einzelzell-RNA-Sequenzierung der murinen Trachea zeigt differente

Bürstenzellpopulationen, die in Typ 1 (tuft-1) und Typ 2 (tuft-2) aufgeteilt werden können (Montoro et al. 2018). Eine ähnliche Aufteilung konnte auch im murinen Intestinum vorgenommen werden (Haber et al. 2017). Im murinen Urogenitaltrakt scheinen die Bürstenzellen unterschiedliche Geschmacksrezeptoren zu besitzen und reagieren nur auf passende Stimuli (Kandel et al. 2018). Der murine Thymus scheint in diesem Punkt keine Ausnahme zu sein. Eine morphologische Zuordnung der thymalen Bürstenzellen gestaltet sich schwierig durch die fehlende apikobasale Polarisierung. Die Form der Zellen variiert von dreieckig über birnenförmig bis hin zu spindelförmig. Villin-immunreaktive Bürstenzellen mit fehlendem ChAT-eGFP-Signal sind, wie in der Trachea, auch im Thymus der Maus zu finden (Panneck et al. 2014). Neben den Bürstenzellen, die einzeln im Thymusmark situiert sind, formen die anderen, welche eine hohe Expression an *Dclk1* zeigen, multizelluläre Cluster, die bei Menschen regelmäßig an die Hassall-Körperchen angrenzen (Miller et al. 2018). Diese clusterbildenden Zellen schienen in den ChAT-eGFP-Mäusen ein schwächeres ChAT-eGFP-Signal zu besitzen, trotz der verstärkenden eGFP-Immunmarkierung (Panneck et al. 2014). Sie wurden bei der Charakterisierung der thymalen Bürstenzellen durch Panneck und Mitarbeiter nicht mitberücksichtigt. Auf der molekularbiologischen Ebene variiert das Muster der mRNA-Expression der thymalen Bürstenzellen auch untereinander. So exprimiert diejenige Gruppe von Bürstenzellen vermehrt Bitterrezeptoren der *Tas2r*-Familie, die auch eine Expression des Proteins der kanonischen Geschmackskaskade, GNAT3, vorweist (Miller et al. 2018).

In dieser Arbeit konnte einerseits die ChAT-positiven und CD45-negativen Zellen aus dem murinen Thymus durch immunchemische und molekularbiologische Verfahren als die gesuchten thymalen Bürstenzellen verifiziert werden, aber andererseits auch die Heterogenität dieser Zellen bestätigt werden, wodurch eventuell nicht alle von ihnen in die funktionelle Charakterisierung miteingeschlossen wurden.

Anhand der immunhistochemischen Gewebeschnitte vom Thymus des TRPM5-eGFP-Mausstammes konnte die Diversität der thymalen Bürstenzellen bestätigt werden. In fast allen der ChAT-immunmarkierten Zellen konnte ein TRPM5-eGFP-Signal beobachtet werden (94%). Doch viele TRPM5-eGFP-positiven Zellen exprimieren keine ChAT (31%), was sich auch in der Immunhistochemie der isolierten Zellen widerspiegelte. Diese Zellen ($\text{ChAT}^-/\text{TRPM5}^+$) wurden auch von Panneck und Mitarbeitern beobachtet (Panneck et al. 2014). Auch andere Komponenten der

kanonischen Geschmackskaskade, GNAT3 und PLC β 2, sind nur inkonstant bei den TRPM5-positiven Zellen vorzufinden. Allerdings ist hierbei auch von einer unvollständigen Expression von eGFP in den TRPM5-exprimierenden Zellen auszugehen, da sich keine hundertprozentige Übereinstimmung zwischen dem TRPM5-eGFP-Signal und der Immunmarkierung vom TRPM5-Antikörper zeigte.

In der mRNA-Analyse der durch FACS isolierten ChAT-positiven und CD45-negativen Zellen konnte ihre Identität als thymale Bürstenzellen nochmals untermauert werden. Neben den typischen Markern der Bürstenzelle (ChAT, Villin, TRPM5, GNAT3, PLC β 2, EpCAM, CK8, CK18) und dem Bitterrezeptor Tas2r104 konnten aber auch RT-PCR-Produkte von MHC-II und AIRE detektiert werden.

4.2 AIRE, MHC-II und CD45

Das Vorkommen von MHC-II und AIRE in den thymalen Bürstenzellen konnte durch Forscher an der Universität von Kalifornien mithilfe eines neuen „lineage tracing“-Mausmodells mit iALT (inducible Aire Lineage Trace) bestätigt werden. Bei einem Mausstamm wurden die AIRE-exprimierenden Zellen irreversibel durch einen Fluoreszenzreporter markiert (Metzger et al. 2013; Miller et al. 2018). Abhängig von der MHC-II-Expression und der Stärke des roten fluoreszierenden Proteines (RFP) konnten die mTECs mittels Durchflusszytometrie in vier Populationen eingeteilt werden: pre-AIRE (MHC-II^{lo}/RFP^{lo}), early-AIRE (MHC-II^{hi}/RFP^{lo}), late-AIRE (MHC-II^{hi}/RFP^{hi}) und post-AIRE (MHC-II^{lo}/RFP^{hi}). Durch mRNA-Analyse konnten die Zellen der verschiedenen Populationen weiter identifiziert werden. So konnten die thymalen Bürstenzellen, neben den CK10-positiven terminal differenzierten mTECs, welche die Hassall-Körperchen bilden, als ein Teil der post-AIRE-Population mit einer niedrigen Expression an MHC-II und RFP zugeordnet werden. Aber auch in der pre-AIRE-Population sind die Bürstenzellen vertreten. Dieses Erscheinen in beiden Populationen unterstützt der Befund, dass auch in AIRE-Knockout-Mäusen thymale Bürstenzellen zu finden sind. Sie scheinen einen AIRE-unabhängigen Entwicklungspfad zu besitzen. Neben Pou2f3 scheint die HIPK2 (Homeodomain-interacting protein kinase 2) auch für die Differenzierung der thymalen Bürstenzellen von Bedeutung zu sein. In mTEC-spezifisch HIPK2-abladierten Mausthymi konnte eine verringerte Expression von bürstenzellassozierten Genen festgestellt werden. (Miller et al. 2018). Im Gegensatz

dazu wiesen Soultanova und Mitarbeiter darauf hin, dass die thymalen Bürstenzellen und die AIRE-positiven Zellen aufgrund der fehlenden Doppelmarkierung in der Immunfluoreszenz zwei distinkte Populationen darstellen (Soultanova et al. 2015). Dies könnte allerdings durch die pre-AIRE-Population und die niedrige AIRE-Expression der Bürstenzellen bedingt sein. In der Immunhistochemie von isolierten Zellen einer Suspension konnte das Vorkommen von MHC-II in thymalen Bürstenzellen nochmals bestätigt werden. Ein weiterer überraschender Befund ist das cDNA-Produkt von CD45 nach der RT-PCR der durch FACS erhaltenen ChAT-positiven und CD45-negativen Bürstenzellfraktion. Dies ist unter anderem dadurch zu erklären, dass diese Zellen eine relativ geringe Expression von CD45 an ihrer Zelloberfläche hatten, welche durch die Gatingstrategie des FACS noch als „negativ“ betrachtet wurde, dessen mRNA-Gehalt intrazellulär jedoch für die RT-PCR genügend war, um ein cDNA-Produkt zu erzeugen. Die cDNA-Produkte der Bürstenzellmarker, wie oben bereits genannt, verifizieren die Identität dieser Zellfraktion. Zudem wies das Fehlen von CD3-PCR-Produkt eine Abwesenheit von T-Zellen nach und das EpCAM-PCR-Produkt belegte die epitheliale Herkunft der Zelle. Auch in der Immunhistochemie der isolierten Einzelzellen vom Thymus konnten dreifache positive Bürstenzellen mit ChAT, TRMP5 und CD45 beobachtet werden. CD45, welches lange als Marker der hämatopoetischen Zellen galt, konnte sowohl in den Bürstenzellen des Intestinums, als auch in der Trachea beobachtet werden (Haber et al. 2017; Montoro et al. 2018). CD45 wird ausschließlich vom Typ 2 der beiden intestinalen Bürstenzellen exprimiert, der im Gegensatz zum Typ 1 überwiegend Expression von immunassoziierten Genen zeigt. Bei einer Wurminfektion mit *Heligmosomoides polygyrus* zeigten die Typ 2-Bürstenzellen eine signifikant gesteigerte Proliferation und waren in der Lage, durch die Produktion des Zytokins TSLP (thymic stromal lymphopoietin) und IL-25 innate lymphoide Zellen der Gruppe 2 (ILC2) zu aktivieren und somit die Parasitenabwehr einzuleiten (Gerbe et al. 2016; Haber et al. 2017; Howitt et al. 2016; Moltke et al. 2016). TSLP wird im Thymus beispielsweise von den differenzierten mTECs der Hassall-Körperchen produziert und nimmt darüber Einfluss auf die medullären dendritischen Zellen und die regulatorischen T-Zellen (Laan und Peterson 2013; Watanabe et al. 2005). In der Trachea ist CD45 auch den Typ 2-Bürstenzellen zuzuordnen, die durch ihre Leukotriensynthese bei der Atemwegsentzündung und dem asthmatischen Krankheitsbild eine Rolle spielen. Die

Typ 1-Bürstenzelle der Trachea scheint dem „klassischen“ Typus der Bürstenzellen mit Komponenten der Geschmackstransduktion zu entsprechen (Montoro et al. 2018).

Im Deep Sequencing konnte man in den ChAT-positiven und CD45-negativen Bürstenzellen alle typischen Marker wiederfinden, abgesehen von GNAT3, welches sich nur bei einer Zelle zeigte. Auch hier konnte, wenn auch in geringem Maße, in manchen Zellen die Expression von AIRE, MHC-II und CD74, das bei der Antigenpräsentation mit beteiligt ist, nachgewiesen werden. Die Expression von ptpcr (CD45) konnte in der Zelle Nr. 3 beobachtet werden, die gleichzeitig auch EpCAM exprimierte, was einen weiteren Hinweis auf die Expression von CD45 durch die epithelialen Bürstenzellen darstellt. In derselben Zelle konnte eine Expression von CK14 statt CK18 beobachtet werden, was auch in der RT-PCR der durch FACS isolierten Zellen festgestellt werden konnte. Bisher wurden die thymalen Bürstenzellen als CK8-/CK18-positiv und CK5-/CK14-negativ beschrieben (Panneck et al. 2014). Es bleibt also abzuwarten, was für neue Erkenntnisse zukünftige Forschungen mit sich bringen werden. Bei der geringen Zellanzahl der mRNA-Analyse durch das Deep Sequencing können natürlich keine validen allgemeingültigen Aussagen getroffen werden.

4.3 Chemosensorische Funktion

Die Bürstenzelle, eine schon vor geraumer Zeit entdeckte, jedoch funktionell lange nicht charakterisierte Zelle, bildete in den letzten Jahren nicht ohne Grund einen neuen Schwerpunkt der Zellforschung. Fast ein halbes Jahrhundert hat es gedauert, bis man nach der Entdeckung der Zelle auch deren Funktion auf die Schliche kam (Rhodin und Dalhamn 1956). Die Vermutung, dass es sich bei der Bürstenzelle um eine chemosensorische Zelle handeln könnte, sowie die Entdeckung der G-Proteinuntereinheit der Geschmackskaskade, α -Gustducin (GNAT3), führte letztendlich zum Durchbruch bei der Erschließung ihrer funktionellen Bedeutung (Höfer und Drenckhahn 1998; Luciano und Reale 1990). Die Bürstenzelle, die ihre Namensgebung dem Büschel von Mikrovilli an ihrer apikalen Seite verdankt, scheint, wie der Zufall es so manchmal will, bei ihrem Zweck auch die Bürste nachzuahmen, nämlich zur Reinhaltung. Was für die Bürste die Schuhe oder Kleidungen sind, sind für die Bürstenzelle die mit Schleimhaut bedeckten Hohlgane. Vielerorts, in der nasalen

Schleimhaut, im Larynx, in der Trachea, in der Tuba auditiva, im Magen, im Darm, in der Gallenblase und den Gallengängen, in den Speicheldrüsenengängen, in den Harnwegen und sogar auf der Konjunktiva, sind diese Zellen vorzufinden, ausgestattet mit verschiedensten Rezeptoren, um das Vordringen potenziell schädlicher Substanzen zu verhindern. Verschiedene Abwehrmechanismen konnten nachgewiesen werden, welche durch sie ausgelöst werden: Niesen, Husten, Drosselung der Atmung, Entleerung der Harnblase, Aktivierung anderer Immunzellen und Einleitung von Entzündungsreaktionen (Deckmann et al. 2014; Finger et al. 2003; Gerbe et al. 2016; Howitt et al. 2016; Krasteva et al. 2011; Krasteva et al. 2012a; Moltke et al. 2016; Nadjombati et al. 2018; Saunders et al. 2014; Tizzano et al. 2010). All diese Maßnahmen dienen dazu, die detektierten Bakterien oder auch Parasiten zu bekämpfen. Aber auch an Krankheitsbildern wie Atemwegsentzündungen oder Asthma wird eine Beteiligung vermutet (Montoro et al. 2018).

Durch einen Zufallsbefund wurden grün leuchtende Zellen im Thymus des ChAT-eGFP-Mausstammes entdeckt. Seither erfolgte eine Periode intensiver Forschung an diesen neu entdeckt und jedoch bekannt erscheinenden Zellen. Schließlich stellte sich heraus, dass es sich hierbei um die Bürstenzelle handelt, die seit 1956 unter verschiedensten Bezeichnungen firmiert (Bornstein et al. 2018; Nevo et al. 2019; Panneck et al. 2014; Rhodin und Dalhamn 1956; Sbarbati und Osculati 2005). Die ersten Forschungsergebnisse zeigten, dass die thymalen Bürstenzellen, wie ihresgleichen in der Körperperipherie, auch die Komponenten der kanonischen Geschmackskaskaden besitzen (Panneck et al. 2014). Später konnte eine Vielfalt an Bitterrezeptoren in ihnen nachgewiesen werden (Miller et al. 2018; Nadjombati et al. 2018; Soultanova et al. 2015). Wie schon vorher beschrieben, besitzen die Bürstenzellen, welche GNAT3 exprimieren, zudem vermehrt Bitterrezeptoren der Tas2r-Familie. Im Weiteren zeigte sich auch, dass hierbei bestimmte Kombinationen von Tas2-Bitterrezeptoren vermehrt auftreten, was auf eine chemosensorische Befähigung der Bürstenzellen hindeutet (Miller et al. 2018).

Sowohl in der RT-PCR vom gesamten murinen Thymus, von der durch FACS isolierten Bürstenzellfraktion (ChAT-eGFP⁺/CD45⁻) als auch im Deep Sequencing der einzelnen Bürstenzellen vom Thymus konnte eine Reihe unterschiedlicher Bitterrezeptoren nachgewiesen werden, darunter auch Tas2r105 und Tas2r108. Cycloheximid, Diphenidolhydrochlorid, Amarogentin und Denatonium, das als etabliertes Stimulans

der Bürstenzellen gilt, sind Liganden dieser Bitterrezeptoren und wurden als Stimulanzen für die Bürstenzellen benutzt (Chandrashekar et al. 2000; Lossow et al. 2016; Saunders et al. 2014). Die aus dem murinen Thymus isolierten Zellen konnten durch Anti-CD45-Microbeads weiter selektiert werden. So konnten die thymalen Bürstenzellen (ChAT-eGFP⁺/CD45⁻) angereichert werden. Durch Immunfluoreszenzmarkierung der isolierten Zellen konnten sie auch als solche eindeutig identifiziert werden. Sie waren TRPM5- und EpCAM-positiv. Die isolierten Bürstenzellen zusammen mit anderen Zellen aus dem Thymus wurden unter dem CLSM den Bittersubstanzen ausgesetzt. Nach Gabe von Denatonium konnte ein intrazellulärer Kalziumanstieg als Korrelat der Zellantwort beobachtet werden. Bei einer Aktivierung der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade durch die Interaktion der Liganden mit ihren Bitterrezeptoren strömen Kalziumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma ein und aktivieren die TRPM5-Kationkanäle, die wiederum über den Einstrom der Natriumionen eine Depolarisation der Zelle verursachen und dadurch eine Transmitterfreisetzung in Gang setzen (Behrens und Meyerhof 2011; Clapp et al. 2001; Hofmann et al. 2003; Rössler et al. 2000). In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass durch TPPO, einem TRPM5-Kanalblocker, der intrazelluläre Kalziumanstieg signifikant reduziert werden kann (Deckmann et al. 2014; Liu et al. 2011; Palmer et al. 2010). Die Reaktion der thymalen Bürstenzellen auf Denatonium ließ sich jedoch mit TPPO nicht abschwächen. Zudem zeigten die ChAT-negativen Zellen in der Umgebung sowohl bei einer alleinigen Stimulation mit Denatonium als auch bei Gabe von Denatonium mit TPPO Reaktionen ohne einen signifikanten Unterschied. Dies legt die Vermutung nahe, dass der intrazelluläre Kalziumanstieg der Bürstenzellen nicht durch die kanonische Geschmackskaskade hervorgerufen wurde und es sich hierbei um einen unspezifischen Effekt handelt. Bei Untersuchungen mit den restlichen Bittersubstanzen zeigten weder die thymalen Bürstenzellen, noch die ChAT-negativen Zellen aus der Umgebung eine Reaktion. Somit konnte in dieser Arbeit eine chemosensorische Funktion der Bürstenzellen, bezogen auf die Detektion von Bitterstoffen im Thymus, nicht nachgewiesen werden.

Wie schon im Kapitel davor beschrieben, sind neben den ChAT-positiven, CD45-negativen Bürstenzellen noch andere Bürstenzellen im Thymus vorhanden, welche CD45 exprimieren oder keine ChAT besitzen. Sie wurden hier allerdings nicht mitberücksichtigt.

4.4 Cholinerge Signaltransduktion

Seit langem ist es bekannt, dass die trachealen Bürstenzellen in direkter Verbindung mit Nervenfasern stehen (Luciano et al. 1968a). Durch den transgenen *Chrna3* (cholinergic receptor nicotinic alpha 3 subunit)-eGFP-Mausstamm und retrograde neuronale Markierungsexperimente konnten diese Nervenfasern als cholinorezeptive sensorische Nervenfasern, die von den sensorischen Ganglien des Nervus vagus stammen, identifiziert werden (Krasteva et al. 2011). Mit dem gleichen Mausstamm konnte im Urogenitaltrakt ein subepitheliales Nervengeflecht cholinergen Ursprungs nachweisen werden, welches direkte Verbindungen zu den urethralen Bürstenzellen aufweist (Deckmann et al. 2014). Auch in der Konjunktiva konnten diese sensorischen Nervenfasern nachgewiesen werden (Wiederhold et al. 2015). Auf die gleiche Art und Weise fungiert ACh auch als Transmitter zwischen den nasalen Bürstenzellen und sensorischen Fasern des Nervus trigeminus (Saunders et al. 2014; Tizzano et al. 2010). Neben den direkten neuralen Verbindungen, worüber die reflektiven Abwehrmechanismen ausgelöst werden, geht man von einer weiteren parakrinen Stimulation der Umgebungszellen aus. Im olfaktorischen Epithel der Maus scheinen die Bürstenzellen auf dem parakrinen Weg die Stützzellen durch ACh zu modulieren (Ogura et al. 2011). Im Gegensatz zum olfaktorischen Epithel verfügt die Mehrheit der Bürstenzellen im unteren Respirationstrakt über keinen direkten Kontakt zu sensorischen Nervenfasern. Auch das präsynaptisches Protein SNAP-25 konnte in den Bürstenzellen nicht detektiert werden (Krasteva et al. 2011). Es wird vermutet, dass ACh als Botenstoff hier beispielsweise durch den dem Epithel aufliegenden Flüssigkeitsfilm transportiert wird, um dadurch eine autokrine und parakrine Signalweiterleitung zu bewirken (Perniss et al. 2020). Hier auf der Oberfläche der Atemwege befinden sich die Zellen des Immunsystems, beispielsweise die alveolären Makrophagen, ausgestattet mit cholinergen Rezeptoren, welche dadurch reguliert und moduliert werden können (Kummer und Krasteva-Christ 2014; Racké und Matthiesen 2004). Im murinen Urogenitaltrakt konnte an isolierten Zellen eine cholinerge Signalweiterleitung durch die urethralen Bürstenzellen in Form von parakriner Transduktion nachgewiesen werden. In der Anwesenheit der ChAT-eGFP-positiven Bürstenzellen konnte eine Reaktion der ChAT-eGFP-negativen Zellen aus der Umgebung nach Gabe von Denatonium registriert werden. Bei Abwesenheit der ChAT-

eGFP-positiven Zellen oder bei Zugabe von cholinergen Antagonisten ist die Reaktion der ChAT-eGFP-negativen Zellen erloschen (Deckmann et al. 2014).

Im Thymus verlaufen die Nervenfasern subkapsulär, in den interlobulären Septen und entlang der Blutgefäße. Sie formen perivaskuläre Plexus und ziehen weiter in den Cortex und in die Medulla. Im Thymusmark ist ein Netzwerk von Nervenfasern zu finden, das eng mit CD4-positiven Thymozyten und dendritischen Zellen vergesellschaftet ist. Auch Verbindungen dieser Nervenfasern mit Makrophagen und B-Zellen wurden beobachtet (Al-Shalan et al. 2019; Bulloch und Pomerantz 1984). Ein Kontakt zwischen den thymalen Bürstenzellen und Nervenfasern konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Panneck et al. 2014). Wie schon in der Einleitung erwähnt wurde, ist eine Einflussnahme des cholinergen Systems auf die zentrale Aufgabe des Thymus, nämlich die Bildung immunkompetenter und gleichzeitig selbsttoleranten T-Zellen, seit langem bekannt (Antonica et al. 1994; Maśliński et al. 1987; Middlebrook et al. 2002; Strom et al. 1974). Während die parasymphatische Innervation des Thymus umstritten bleibt, ist das Vorkommen von ACh und AChR im Thymus nachgewiesen (Engel et al. 1977; Kawashima und Fujii 2004; Kuo et al. 2002; Maśliński et al. 1987; Mihovilovic und Butterworth-Robinette 2001; Nance et al. 1987; Nance und Sanders 2007; Rinner et al. 1994; Tria et al. 1992; Trotter et al. 2007). Im murinen Thymus konnte die nAChR-Untereinheit $\alpha 3$ in den differenzierten mTECs, aus denen die Hassall-Körperchen bestehen, nachgewiesen werden. Diese grenzen regelrecht an den Cluster aus Bürstenzellen an (Soultanova et al. 2014). All diese Beobachtungen, zusammen mit der Feststellung, dass fast alle TRPM5-positiven Bürstenzellen ChAT exprimieren, suggerieren, dass die thymalen Bürstenzellen möglicherweise über eine parakrine Signaltransduktion durch ACh verfügen. Wie im vorherigen Kapitel erwähnt wurde, war ein intrazellulärer Kalziumanstieg als Äquivalenz der Zellantwort weder in ChAT-positiven noch in ChAT-negativen Zellen der Umgebung bei Stimulationen durch Cycloheximid, Diphenidolhydrochlorid und Amarogentin registrierbar. Nach der Gabe von Denatonium zeigten die ChAT-negativen Zellen der Umgebung zusammen mit den ChAT-positiven Bürstenzellen einen Kalziumanstieg, der sich allerdings in beiden Zelltypen nicht durch TPPO abschwächen ließ. Um der Frage nachzugehen, ob die Zellen der Umgebung durch eine cholinerge Signaltransduktion aktiviert wurden, wurde Denatonium zusammen mit cholinergen Antagonisten, Atropin und Mecamylamin, hinzugegeben. Es konnte hierbei weder ein signifikanter Unterschied in

der Anzahl der reagierenden Zellen der Umgebung, noch in der Stärke der Reaktion zwischen alleiniger Gabe von Denatonium und Gabe von Denatonium zusammen mit Atropin und Mecamylamin festgestellt werden. Eine cholinerge autokrine Stimulation der Bürstenzellen durch sich selbst konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Auch hier gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die isolierten Zellen zeigten bei einer direkten Stimulation mit ACh auch keine Reaktion. Eine cholinerge parakrine oder autokrine Signaltransduktion, wie sie bei der Bürstenzelle im Urogenitaltrakt bekannt ist (Deckmann et al. 2014; Deckmann et al. 2018) und auch in anderen Organen wie in der Trachea vermutet wird (Hollenhorst et al. 2020; Krasteva et al. 2011), konnte hier an den isolierten Zellen aus dem Thymus nicht bestätigt werden.

4.5 Schlussfolgerung und Hypothese

Überraschenderweise wurden zuletzt auch im Thymus, der im Gegensatz zu Hohlorganen keinerlei direkten Kontakt zur Außenwelt pflegt, cholinerge epitheliale Zellen, die mit Komponenten der Chemosensorik ausgestattet sind, entdeckt (Panneck et al. 2014). Durch neuere Untersuchungen und auch im Rahmen dieser Arbeit konnten diese anhand von verschiedenen Markern als thymale Bürstenzellen identifiziert werden (Bornstein et al. 2018; Miller et al. 2018; Nadjombati et al. 2018). Neben den morphologischen und molekularen Ähnlichkeiten zu den bereits erforschten Bürstenzellen der anderen Lokalisationen lässt die Lage dieser Zellen, nämlich an der Rinde-Mark-Grenze neben den Kapillaren mit fehlender Blut-Thymus-Schranke, den Verdacht schöpfen, dass es sich hierbei auch um chemosensorische Sinneszellen handelt, welche das Eindringen von Fremdstoffen in den Thymus verhindern sollen. Dadurch könnte eine Präsentation von Fremdantigenen im Thymusmark unterbunden werden, um eine Toleranzentstehung gegenüber diesen Antigenen zu verhindern.

In den aus dem murinen Thymus isolierten ChAT-positiven Bürstenzellen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine über die kanonische Geschmackstransduktionskaskade ablaufende Reaktion nach Stimulation mit verschiedenen Bitterrezeptoragonisten nicht beobachtet werden. Eine cholinerge Signalweitergabe konnte ebenso wenig nachgewiesen werden. Eine chemosensorische Funktion dieser Zellen gegenüber Bitterstoffen scheint somit unwahrscheinlich. Im Weiteren konnte die mRNA-Expression von MHC-II und AIRE von thymalen Bürstenzellen gezeigt werden. Auch

in der Immunhistochemie der isolierten Bürstenzellen zeigte sich eine MHC-II-Antikörpermarkierung. Zwei andere Arbeitsgruppen konnten unabhängig voneinander zeigen, dass zumindest ein Teil der thymalen Bürstenzellen von reifen mTECs stammen könnte und das AIRE-exprimierende Stadium durchlaufen hat (Bornstein et al. 2018; Miller et al. 2018). Die Expression dieser Gene mit antigenpräsentierender Funktion zusammen mit dem Fakt, dass die genetische Signatur der thymalen Bürstenzellen sich am weitesten von den anderen Bürstenzellen unterscheidet, suggerieren eine besondere Rolle dieser Zellen. (Najdsombati et al. 2018). Es ist daher möglich, dass sie, anstatt eine chemosensorische Funktion ausüben, bei der Entwicklung der zentralen Toleranz mitbeteiligt sind. Die Präsentation von den Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade könnte dazu dienen, autoreaktive T-Zellen gegenüber diesen Antigenen zu identifizieren und sie zur Apoptose zu führen.

Weitere Experimente unterstützen diese These. Wie im Intestinum sind die Bürstenzellen im Thymus in der Lage, IL-25 zu produzieren. Wie im Gastrointestinaltrakt können die thymalen Bürstenzellen eine Typ-2-Immunantwort hervorrufen. Eine Depletion von Bürstenzellen resultierte in einer verminderten Anzahl von NKT2 (type 2 natural killer T), welche die Hauptquelle von IL-4 darstellen, und IL-4-abhängigen einfach CD8-positiven Thymozyten (Lee et al. 2013; Lee et al. 2015; Miller et al. 2018). Die Frage bleibt offen, ob die thymalen Bürstenzellen neben IL-25 auch ACh zur Immunmodulation produzieren. Neben dem Nachweis einer Einflussnahme der Bürstenzellen auf die Bildung von T-Zellen konnte schlussendlich auch ihre Mitbeteiligung an der Bildung der zentralen Toleranz gezeigt werden. Athymische Mäuse mit einer Immunisierung mit IL-25-Protein bekamen ein Thymustransplantat entweder von Wildtyp-Mäusen oder von einer Maus mit Depletion der thymalen Bürstenzellen. Nur die Empfänger vom Bürstenzellen-depletierten Thymus entwickelten IL-25-Antikörper, was die Unerlässlichkeit der thymalen Bürstenzellen bei der Verhütung der toxischen Autoreaktivität von T-Zellen zeigt (Miller et al. 2018).

5 Zusammenfassung

Bürstenzellen sind chemosensorische Zellen, die sich an den Eintrittspforten zum Körperinneren befinden. Sie sind mit zahlreichen Rezeptoren ausgestattet und in der Lage, verschiedene Moleküle, wie zum Beispiel Bitterstoffe als Bakterienprodukt, zu detektieren und daraufhin Abwehrmechanismen einzuleiten. Dadurch kann der Eintritt von potenziell schädigenden Substanzen verhindert werden. Auch im Thymus, dem primären lymphatischen Organ, wurden diese Sinneszellen entdeckt, die neben dem büstenzellspezifischen Protein Villin auch die Komponenten der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade besitzen. In dieser Arbeit konnte unter den thymalen Bürstenzellen eine große Heterogenität nachgewiesen werden. Die Expression einiger Bürstenzellmarker, darunter ChAT und Komponente der Geschmackskaskade wie TRPM5, GNAT3 und PLC β 2, variiert unter diesen Zellen. Neben der Expression typischer Marker konnte gezeigt werden, dass auch AIRE und MHC-II, zwei Marker für antigenpräsentierende Zellen, sowie überraschenderweise CD45 von den Bürstenzellen exprimiert werden. Daneben konnten verschiedene Bitterrezeptoren im murinen Thymus und in den Bürstenzellen nachgewiesen werden. Diese Zellen konnten erfolgreich aus dem Thymus von ChAT-eGFP-Mäusen isoliert und angereichert werden. Bei der Stimulation der gewonnenen Bürstenzellen sowie ihrer Umgebungszellen durch die bittere Substanz Denatonium konnte eine Reaktion in Form von einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration beobachtet werden. Allerdings scheint diese Reaktion unabhängig von der kanonischen Geschmackstransduktionskaskade abzulaufen. Auch eine cholinerge Signalübertragung von Bürstenzellen zu Nachbarzellen nach Stimulation mit Denatonium konnte nicht nachgewiesen werden. Andere Bitterstoffe lösten hingegen in den Bürsten- und Umgebungszellen keine Reaktion aus.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Bürstenzellen des Thymus der Maus wider Erwartung keine chemosensorische Wächterfunktion besitzen, sondern an der Autoantigenpräsentation beteiligt sind.

6 Summary

Brush cells are chemosensory cells located at the entry points of the body. With numerous receptors, they are able to detect various molecules, such as bitter compounds of bacterial metabolites, and they initiate defence mechanisms preventing the entrance of hazardous substances. Recently, brush cells, expressing brush-cell-specific protein villin and members of the canonical taste transduction cascade, have also been found in the thymus, the primary lymphatic organ. In this work, I could demonstrate a high heterogeneity among thymic brush cells. The expression of some brush cell markers, including ChAT and components of the taste transduction machinery such as TRPM5, GNAT3 and PLC β 2, varies among these cells. Furthermore, the expression of AIRE and MHC-II, two markers for antigen-presenting cells, was shown. Surprisingly, CD45 was also expressed by them. In addition, various bitter receptors were detected in the murine thymus and in the thymic brush cells. These cells were successfully isolated and enriched from the thymus of ChAT-eGFP mice. Brush cells and their surrounding cells increase the intracellular calcium concentration in response to denatonium while other bitter substances did not trigger a reaction. However, this increasing calcium concentration seems to occur independently from the canonical taste transduction cascade. A cholinergic signalling from brush cells to neighbouring cells after stimulation with denatonium could not be detected either.

The results suggest that, contrary to expectations, brush cells of the mouse thymus do not have a chemosensory sentinel function, but may be involved in autoantigen presentation.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholinrezeptor
AIRE	Autoimmun-Regulator
Ama	Amarogentin
AU	arbitrary units
Avil	Advillin
BAC	bacterial artificial chromosome
BSA	Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Kalziumion
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
chrna3	cholinergic receptor nicotinic alpha 3 subunit
CK	Zytokeratin
CLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskops
cTECs	kortikale (cortical) Thymusepithelzellen
Cy	Cyanin
Cyc	Cycloheximid
CysLT3R	cysteinyl leukotriene 3 receptor
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diaminidin-2-phenylindol
Dclk1	doublecortin-like kinase 1
Diph	Diphenidolhydrochlorid

dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DNT	Denatonium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ENaC	epithelial sodium channel
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
Fezf2	forebrain-expressed zinc finger 2
FFAR3	free fatty acid receptor 3
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GNAT3	guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-3
GPCR	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor
HBSS	Hank`s Balances Salt Solution
Hipk2	homeodomain-interacting protein kinase 2
iALT	inducible Aire Lineage Trace
IL	Interleukin
ILC2	innate lymphoide Zellen der Gruppe 2
IP3	Inositoltrisphosphat
Krt	Keratin
m	monoclonal
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten

mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mTECs	medulläre Thymusepithelzellen
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NHS	normales Pferdeserum
NKT2	type 2 natural killer T
Nr.	Nummer
p	polyklonal
PE	Phycoerythrin
PFA	phosphatgepuffertes Paraformaldehyd
PLC β 2	Phospholipase C β 2
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS+S	phosphatgepufferte Salzlösung + NaCl
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Pou2f3	POU domain class 2 transcription factor 3
RFP	rotes fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SNAP-25	synaptosomal nerve-associated protein 25
SUCNR1	succinate receptor 1
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
Tas1r	taste receptor type 1
Tas2r	taste receptor type 2
TCR	T-Zell-Rezeptoren
TEC	Thymusepithelzellen

TPPO	Triphenylphosphanoxid
TRPM5	transient receptor potential channel subfamily M member 5
TSLP	thymic stromal lymphopoietin
u.a.	unter anderem
x g	x-fache Erdbeschleunigung

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Liste der verwendeten Pharmaka	19
Tabelle 2.2 Liste der verwendeten Primärantikörper	20
Tabelle 2.3 Liste der verwendeten Sekundärantikörper	20
Tabelle 2.4 Liste der verwendeten fluorochrommarkierten Antikörper	21
Tabelle 2.5 Liste der verwendeten Primer	26
Tabelle 3.1 Genexpression der untersuchten Einzelzellen vom Thymus, Deep Sequencing, ChAT-eGFP-Maus.....	50
Tabelle 3.2 Reaktion der Bürstenzellen auf weitere Bitterrezeptoragonisten	59
Abbildung 3.1 Immunhistochemie an Gewebeschnitten vom Thymus, TRPM5-eGFP-Maus	38
Abbildung 3.2 RT-PCR von Zellen aus dem Thymus, elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel, C57BL/6N-Maus	41
Abbildung 3.3 Positivkontrolle: RT-PCR von Zellen aus der Zunge, elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel, C57BL/6N-Maus.....	43
Abbildung 3.4 Immunhistochemie an isolierten Zellen vom Thymus, ChAT-eGFP-Maus	44
Abbildung 3.5 Durchflusszytometrie mit Zellen vor und nach dem Anreicherungsverfahren mit Anti-CD45-Microbeads, ChAT-eGFP-Maus.....	45
Abbildung 3.6 RT-PCR von mit FACS isolierten Zellen vom Thymus, elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel, ChAT-eGFP-Maus	48
Abbildung 3.7 Kalziummessungen an isolierten Bürstenzellen bei Gabe von Denatonium (DNT) in aufsteigender Konzentration.....	51
Abbildung 3.8 Kalziummessungen an isolierten ChAT-negativen Zellen bei Gabe von Denatonium (DNT) in aufsteigender Konzentration.....	52

Abbildung 3.9 Kalziummessung an isolierten Bürstenzellen bei Gabe von 10 mM Denatonium (DNT) mit oder ohne TPPO (25 μ M oder 250 μ M) im Vergleich.....	53
Abbildung 3.10 Maximaler Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in reagierenden Bürstenzellen innerhalb einer Minute nach Gabe von 10 mM Denatonium (DNT) mit oder ohne TPPO (25 μ M oder 250 μ M) im Vergleich.....	54
Abbildung 3.11 Kalziummessung an ChAT-negativen Zellen bei Gabe von 10 mM Denatonium (DNT) mit oder ohne TPPO (25 μ M oder 250 μ M) im Vergleich.....	55
Abbildung 3.12 Maximaler Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in reagierenden ChAT-negativen Zellen innerhalb einer Minute nach Gabe von 10 mM Denatonium (DNT) mit oder ohne TPPO (25 μ M oder 250 μ M) im Vergleich	56
Abbildung 3.13 Maximaler Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in Bürstenzellen (ChAT-eGFP ⁺ /CD45 ⁻) und ChAT-eGFP-negativen Zellen (ChAT-eGFP ⁻) innerhalb einer Minute nach Gabe von 5 mM Denatonium (DNT) mit oder ohne 10 μ M Mecamylamin und 10-50 μ M Atropin (M+A).....	57
Abbildung 3.14 Kalziummessung an Bürstenzellen (ChAT-eGFP ⁺ /CD45 ⁻) und ChAT-eGFP-negativen Zellen (ChAT-eGFP ⁻) bei Gabe von Acetylcholin (ACh) in aufsteigender Konzentration	58
Abbildung 3.15 Kalziummessung an Bürstenzellen (ChAT-eGFP ⁺ /CD45 ⁻) und ChAT-eGFP-negativen Zellen (ChAT-eGFP ⁻) bei Gabe von 50 μ M Cycloheximid (Cyc).....	60
Abbildung 3.16 Kalziummessung an Bürstenzellen (ChAT-eGFP ⁺ /CD45 ⁻) und ChAT-eGFP-negativen Zellen (ChAT-eGFP ⁻) bei Gabe von 1 mM Diphenidol-hydrochlorid (Diph).....	61
Abbildung 3.17 Kalziummessung an Bürstenzellen (ChAT-eGFP ⁺ /CD45 ⁻) und ChAT-eGFP-negativen Zellen (ChAT-eGFP ⁻) bei Gabe von 1 mM Amarogentin (Ama).....	62

9 Literaturverzeichnis

Abramson, J., Anderson, G. 2017. Thymic Epithelial Cells. *Annu Rev Immunol* 35: 85–118.

Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J., Zuker, C. S. 2000. A Novel Family of Mammalian Taste Receptors. *Cell* 100 (6): 693–702.

Al-Shalan, H. A. M., Hu, D., Nicholls, P. K., Greene, W. K., Ma, B. 2019. Immunofluorescent characterization of innervation and nerve-immune cell neighborhood in mouse thymus. *Cell Tissue Res* 378 (2): 239–254.

Anastasiadis, K., Ratnatunga, C. 2007. The thymus gland: Diagnosis and surgical management. Berlin: Springer.

Antonica, A., Magni, F., Mearini, L., Paolucci, N. 1994. Vagal control of lymphocyte release from rat thymus. *J Auton Nerv Syst* 48 (3): 187–197.

Bankova, L. G., Dwyer, D. F., Yoshimoto, E., Ualiyeva, S., McGinty, J. W., Raff, H., Moltke, J. von, Kanaoka, Y., Austen, K. F., Barrett, N. A. 2018. The cysteinyl leukotriene 3 receptor regulates expansion of IL-25–producing airway brush cells leading to type 2 inflammation. *Sci Immunol* 3 (28).

Behrens, M., Meyerhof, W. 2011. Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. *Physiology & Behavior* 105 (1): 4–13.

Bezençon, C., Fürholz, A., Raymond, F., Mansourian, R., Métairon, S., Le Coutre, J., Damak, S. 2008. Murine intestinal cells expressing Trpm5 are mostly brush cells and express markers of neuronal and inflammatory cells. *J Comp Neurol* 509 (5): 514–525.

Billipp, T. E., Nadjisombati, M. S., Moltke, J. von 2021. Tuning tuft cells: new ligands and effector functions reveal tissue-specific function. *Curr Opin Immunol* 68: 98–106.

Blackburn, C. C., Manley, N. R. 2004. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev Immunol* 4 (4): 278–289.

Blackburn, C. C., Manley, N. R., Palmer, D. B., Boyd, R. L., Anderson, G., Ritter, M. A. 2002. One for all and all for one: thymic epithelial stem cells and regeneration. *Trends Immunol* 23 (8): 391–395.

- Boehmer, H. von, Kisielow, P. 1990. Self-nonsel self discrimination by T cells. *Science* 248 (4961): 1369–1373.
- Bornstein, C., Nevo, S., Giladi, A., Kadouri, N., Pouzolles, M., Gerbe, F., David, E., Machado, A., Chuprin, A., Tóth, B., Goldberg, O., Itzkovitz, S., Taylor, N., Jay, P., Zimmermann, V. S., Abramson, J., Amit, I. 2018. Single-cell mapping of the thymic stroma identifies IL-25-producing tuft epithelial cells. *Nature* 559 (7715): 622–626.
- Boyd, R. L., Tucek, C. L., Godfrey, D. I., Izon, D. J., Wilson, T. J., Davidson, N. J., Bean, A. G., Ladyman, H. M., Ritter, M. A., Hugo, P. 1993. The thymic microenvironment. *Immunol Today* 14 (9): 445–459.
- Brettschneider, H. 1958. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Nasenschleimhaut. *Anat Anz* 105 (10-16): 194–204.
- Brockhoff, A., Behrens, M., Roudnitzky, N., Appendino, G., Avonto, C., Meyerhof, W. 2011. Receptor Agonism and Antagonism of Dietary Bitter Compounds. *Journal of Neuroscience* 31 (41): 14775–14782.
- Bulloch, K., Pomerantz, W. 1984. Autonomic nervous system innervation of thymic-related lymphoid tissue in wildtype and nude mice. *J Comp Neurol* 228 (1): 57–68.
- Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J. P., Zuker, C. S. 2006. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444 (7117): 288–294.
- Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C. S., Ryba, N. J. 2000. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100 (6): 703–711.
- Chang, L. Y., Mercer, R. R., Crapo, J. D. 1986. Differential distribution of brush cells in the rat lung. *Anat Rec* 216 (1): 49–54.
- Clapp, T. R., Medler, K. F., Damak, S., Margolskee, R. F., Kinnamon, S. C. 2006. Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage-gated calcium channels and SNAP-25. *BMC Biol* 4: 7.
- Clapp, T. R., Stone, L. M., Margolskee, R. F., Kinnamon, S. C. 2001. Immunocytochemical evidence for co-expression of Type III IP3 receptor with signaling components of bitter taste transduction. *BMC Neurosci* 2: 6.
- Cordier, A. C., Haumont, S. M. 1980. Development of thymus, parathyroids, and ultimo-branchial bodies in NMRI and nude mice. *Am J Anat* 157 (3): 227–263.

- Cordier, A. C., Heremans, J. F. 1975. Nude mouse embryo: ectodermal nature of the primordial thymic defect. *Scand J Immunol* 4 (2): 193–196.
- Danzl, N. M., Jeong, S., Choi, Y., Alexandropoulos, K. 2014. Identification of novel thymic epithelial cell subsets whose differentiation is regulated by RANKL and Traf6. *PLoS ONE* 9 (1)e86129.
- Deckmann, K., Filipski, K., Krasteva-Christ, G., Fronius, M., Althaus, M., Rafiq, A., Papadakis, T., Renno, L., Jurastow, I., Wessels, L., Wolff, M., Schütz, B., Weihe, E., Chubanov, V., Gudermann, T., Klein, J., Bschleipfer, T., Kummer, W. 2014. Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (22): 8287–8292.
- Deckmann, K., Krasteva-Christ, G., Rafiq, A., Herden, C., Wichmann, J., Knauf, S., Nassenstein, C., Grevelding, C. G., Dorresteyn, A., Chubanov, V., Gudermann, T., Bschleipfer, T., Kummer, W. 2015. Cholinergic urethral brush cells are widespread throughout placental mammals. *International Immunopharmacology* 29 (1): 51–56.
- Deckmann, K., Rafiq, A., Erdmann, C., Illig, C., Durschnabel, M., Wess, J., Weidner, W., Bschleipfer, T., Kummer, W. 2018. Muscarinic receptors 2 and 5 regulate bitter response of urethral brush cells via negative feedback. *FASEB J* 32 (6): 2903–2910.
- Derbinski, J., Gäbler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenahn, M., Peltonen, L., Walter, J., Kyewski, B. 2005. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med* 202 (1): 33–45.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., Klein, L. 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2 (11): 1032–1039.
- Dieterlen-Lievre, F., Godin, I. E., Garcia-Porrero, J. A., Marcos, M. A. 1994. Initiation of hemopoiesis in the mouse embryo. *Ann N Y Acad Sci* 718: 140–146.
- Douek, D. C., McFarland, R. D., Keiser, P. H., Gage, E. A., Massey, J. M., Haynes, B. F., Polis, M. A., Haase, A. T., Feinberg, M. B., Sullivan, J. L., Jamieson, B. D., Zack, J. A., Picker, L. J., Koup, R. A. 1998. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396 (6712): 690–695.
- Drenckhahn, D., Gaudecker, B. von, Müller-Hermelink, H. K., Unsicker, K., Gröschel-Stewart, U. 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* 32 (1): 33–45.

Engel, E. K., Trotter, J. L., McFarlin, D. E., McIntosh, C. L. 1977. Thymic epithelial cell contains acetylcholine receptor. *Lancet* 1 (8025): 1310–1311.

Esmailniakooshkghazi, A., George, S. P., Biswas, R., Khurana, S. 2020. Mouse intestinal tuft cells express advillin but not villin. *Sci Rep* 10 (1): 8877.

Fatani, J. A., Qayyum, M. A., Mehta, L., Singh, U. 1986. Parasympathetic innervation of the thymus: a histochemical and immunocytochemical study. *J Anat* 147: 115–119.

Finger, T. E., Böttger, B., Hansen, A., Anderson, K. T., Alimohammadi, H., Silver, W. L. 2003. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (15): 8981–8986.

Finger, T. E., Kinnamon, S. C. 2011. Taste isn't just for taste buds anymore. *F1000 Biol Rep* 3: 20.

Fry, T. J., Mackall, C. L. 2002. Current concepts of thymic aging. *Springer Seminars in Immunopathology* 24 (1): 7–22.

Fuchs, E., Weber, K. 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 63: 345–382.

Gaudecker, B. von, Kendall, M. D., Ritter, M. A. 1997. Immuno-electron microscopy of the thymic epithelial microenvironment. *Microsc Res Tech* 38 (3): 237–249.

Gerbe, F., Brulin, B., Makrini, L., Legraverend, C., Jay, P. 2009. DCAMKL-1 Expression Identifies Tuft Cells Rather Than Stem Cells in the Adult Mouse Intestinal Epithelium. *Gastroenterology* 137 (6): 2179–2180.

Gerbe, F., Legraverend, C., Jay, P. 2012. The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cell Mol Life Sci* 69 (17): 2907–2917.

Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D. J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., Bruschi, M., Harcus, Y., Zimmermann, V. S., Taylor, N., Maizels, R. M., Jay, P. 2016. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 529 (7585): 226–230.

Glendinning, J. I. 1994. Is the bitter rejection response always adaptive? *Physiology & Behavior* 56 (6): 1217–1227.

- Gordon, J., Wilson, V. A., Blair, N. F., Sheridan, J., Farley, A., Wilson, L., Manley, N. R., Blackburn, C. C. 2004. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat Immunol* 5 (5): 546–553.
- Gray, D. H. D., Fletcher, A. L., Hammett, M., Seach, N., Ueno, T., Young, L. F., Barbuto, J., Boyd, R. L., Chidgey, A. P. 2008. Unbiased analysis, enrichment and purification of thymic stromal cells. *J Immunol Methods* 329 (1-2): 56–66.
- Haber, A. L., Biton, M., Rogel, N., Herbst, R. H., Shekhar, K., Smillie, C., Burgin, G., Delorey, T. M., Howitt, M. R., Katz, Y., Tirosh, I., Beyaz, S., Dionne, D., Zhang, M., Raychowdhury, R., Garrett, W. S., Rozenblatt-Rosen, O., Shi, H. N., Yilmaz, O., Xavier, R. J., Regev, A. 2017. A single-cell survey of the small intestinal epithelium. *Nature* 551 (7680): 333–339.
- Hammond, J. B., Ladeur, L. 1968. Fibrillovesicular cells in the Fundic glands of the canine stomach: Evidence for a new cell type. *Anat Rec* 161 (4): 393–411.
- Hansen, A., Finger, T. E. 2008. Is TrpM5 a reliable marker for chemosensory cells? Multiple types of microvillous cells in the main olfactory epithelium of mice. *BMC Neurosci* 9: 115.
- Haynes, B. F., Hale, L. P. 1998. The human thymus. A chimeric organ comprised of central and peripheral lymphoid components. *Immunol Res* 18 (2): 61–78.
- Hermiston, M. L., Xu, Z., Weiss, A. 2003. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 21: 107–137.
- Hijiya, K., Okada, Y., Tankawa, H. 1977. Ultrastructural study of the alveolar brush cell. *J Electron Microsc (Tokyo)* 26 (4): 321–329.
- Höfer, D., Drenckhahn, D. 1992. Identification of brush cells in the alimentary and respiratory system by antibodies to villin and fimbrin. *Histochemistry* 98 (4): 237–242.
- Höfer, D., Drenckhahn, D. 1996. Cytoskeletal markers allowing discrimination between brush cells and other epithelial cells of the gut including enteroendocrine cells. *Histochem Cell Biol* 105 (5): 405–412.
- Höfer, D., Drenckhahn, D. 1998. Identification of the taste cell G-protein, alpha-gustducin, in brush cells of the rat pancreatic duct system. *Histochem Cell Biol* 110 (3): 303–309.

- Höfer, D., Püschel, B., Drenckhahn, D. 1996. Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (13): 6631–6634.
- Höfer, D., Shin, D.-W., Drenckhahn, D. 2000. Identification of cytoskeletal markers for the different microvilli and cell types of the rat vomeronasal sensory epithelium. *Journal of Neurocytology* 29 (3): 147–156.
- Hofmann, T., Chubanov, V., Gudermann, T., Montell, C. 2003. TRPM5 Is a Voltage-Modulated and Ca²⁺-Activated Monovalent Selective Cation Channel. *Current Biology* 13 (13): 1153–1158.
- Hollenhorst, M. I., Jurastow, I., Nandigama, R., Appenzeller, S., Li, L., Vogel, J., Wiederhold, S., Althaus, M., Empting, M., Altmüller, J., Hirsch, A. K. H., Flockerzi, V., Canning, B. J., Saliba, A.-E., Krasteva-Christ, G. 2020. Tracheal brush cells release acetylcholine in response to bitter tastants for paracrine and autocrine signaling. *FASEB J* 34 (1): 316–332.
- Hoon, M. A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J. F., Ryba, N. J., Zuker, C. S. 1999. Putative Mammalian Taste Receptors. *Cell* 96 (4): 541–551.
- Hoover, B., Baena, V., Kaelberer, M. M., Getaneh, F., Chinchilla, S., Bohórquez, D. V. 2017. The intestinal tuft cell nanostructure in 3D. *Sci Rep* 7 (1): 72.
- Howitt, M. R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A. M., Tran, S. V., Weinstock, J. V., Gallini, C. A., Redding, K., Margolskee, R. F., Osborne, L. C., Artis, D., Garrett, W. S. 2016. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science* 351 (6279): 1329–1333.
- Huang, L., Shanker, Y. G., Dubauskaite, J., Zheng, J. Z., Yan, W., Rosenzweig, S., Spielman, A. I., Max, M., Margolskee, R. F. 1999. Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nat Neurosci* 2 (12): 1055–1062.
- Hwang, P. M., Verma, A., Brecht, D. S., Snyder, S. H. 1990. Localization of phosphatidylinositol signaling components in rat taste cells: role in bitter taste transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (19): 7395–7399.

- Iwatsuki, K., Ichikawa, R., Uematsu, A., Kitamura, A., Uneyama, H., Torii, K. 2012. Detecting sweet and umami tastes in the gastrointestinal tract. *Acta Physiol (Oxf)* 204 (2): 169–177.
- Jarvi, O., Keyrilainen, O. 1956. On the cellular structures of the epithelial invasions in the glandular stomach of mice caused by intramural application of 20-methylcholantren. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 39 (Suppl 111): 72–73.
- Jeffery, P. K., Reid, L. 1975. New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron microscopic study. *J Anat* 120 (Pt 2): 295–320.
- Kadouri, N., Nevo, S., Goldfarb, Y., Abramson, J. 2020. Thymic epithelial cell heterogeneity: TEC by TEC. *Nat Rev Immunol* 20 (4): 239–253.
- Kandel, C., Schmidt, P., Perniss, A., Keshavarz, M., Scholz, P., Osterloh, S., Althaus, M., Kummer, W., Deckmann, K. 2018. ENaC in Cholinergic Brush Cells. *Front Cell Dev Biol* 6: 89.
- Kaske, S., Krasteva, G., König, P., Kummer, W., Hofmann, T., Gudermann, T., Chubanov, V. 2007. TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neurosci* 8: 49.
- Kasper, M., Rudolf, T., Müller, M., Höfer, D., Drenckhahn, D., Woodcock-Mitchell, J., Migheli, A., Attanasio, A. 1994. Colocalization of cytokeratin 18 and villin in type III alveolar cells (brush cells) of the rat lung. *Histochemistry* 101 (1): 57–62.
- Kawashima, K., Fujii, T. 2004. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front Biosci* 9: 2063–2085.
- Kinnamon, S. C. 2012. Taste receptor signalling - from tongues to lungs. *Acta Physiol (Oxf)* 204 (2): 158–168.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., Hogquist, K. A. 2014. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* 14 (6): 377–391.
- Klug, D. B., Carter, C., Crouch, E., Roop, D., Conti, C. J., Richie, E. R. 1998. Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (20): 11822–11827.

- Krasteva, G., Canning, B. J., Hartmann, P., Veres, T. Z., Papadakis, T., Mühlfeld, C., Schliecker, K., Tallini, Y. N., Braun, A., Hackstein, H., Baal, N., Weihe, E., Schütz, B., Kotlikoff, M., Ibanez-Tallon, I., Kummer, W. 2011. Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (23): 9478–9483.
- Krasteva, G., Canning, B. J., Papadakis, T., Kummer, W. 2012a. Cholinergic brush cells in the trachea mediate respiratory responses to quorum sensing molecules. *Life Sci* 91 (21-22): 992–996.
- Krasteva, G., Hartmann, P., Papadakis, T., Bodenbenner, M., Wessels, L., Weihe, E., Schütz, B., Langheinrich, A. C., Chubanov, V., Gudermann, T., Ibanez-Tallon, I., Kummer, W. 2012b. Cholinergic chemosensory cells in the auditory tube. *Histochem Cell Biol* 137 (4): 483–497.
- Krasteva, G., Kummer, W. 2012. "Tasting" the airway lining fluid. *Histochem Cell Biol* 138 (3): 365–383.
- Kugler, P., Höfer, D., Mayer, B., Drenckhahn, D. 1994. Nitric oxide synthase and NADP-linked glucose-6-phosphate dehydrogenase are co-localized in brush cells of rat stomach and pancreas. *J Histochem Cytochem* 42 (10): 1317–1321.
- Kummer, W., Krasteva-Christ, G. 2014. Non-neuronal cholinergic airway epithelium biology. *Curr Opin Pharmacol* 16: 43–49.
- Kuo, Y., Lucero, L., Michaels, J., DeLuca, D., Lukas, R. J. 2002. Differential expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in fetal and neonatal mouse thymus. *J Neuroimmunol* 130 (1-2): 140–154.
- Kuraguchi, M., Wang, X.-P., Bronson, R. T., Rothenberg, R., Ohene-Baah, N. Y., Lund, J. J., Kucherlapati, M., Maas, R. L., Kucherlapati, R. 2006. Adenomatous polyposis coli (APC) is required for normal development of skin and thymus. *PLoS Genet* 2 (9): e146.
- Laan, M., Peterson, P. 2013. The many faces of aire in central tolerance. *Front Immunol* 4: 326.
- Lee, E. N., Park, J. K., Lee, J.-R., Oh, S.-O., Baek, S.-Y., Kim, B.-S., Yoon, S. 2011. Characterization of the expression of cytokeratins 5, 8, and 14 in mouse thymic epithelial cells during thymus regeneration following acute thymic involution. *Anat Cell Biol* 44 (1): 14–24.

- Lee, Y. J., Holzapfel, K. L., Zhu, J., Jameson, S. C., Hogquist, K. A. 2013. Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nat Immunol* 14 (11): 1146–1154.
- Lee, Y. J., Wang, H., Starrett, G. J., Phuong, V., Jameson, S. C., Hogquist, K. A. 2015. Tissue-Specific Distribution of iNKT Cells Impacts Their Cytokine Response. *Immunity* 43 (3): 566–578.
- Leeson, T. S. 1961. The development of the trachea in the rabbit, with particular reference to its fine structure. *Anat Anz* 110: 214–223.
- Lei, W., Ren, W., Ohmoto, M., Urban, J. F., Matsumoto, I., Margolskee, R. F., Jiang, P. 2018. Activation of intestinal tuft cell-expressed *Sucnr1* triggers type 2 immunity in the mouse small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115 (21): 5552–5557.
- Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., Adler, E. 2002. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (7): 4692–4696.
- Liepinsh, D. J., Kruglov, A. A., Galimov, A. R., Shakhov, A. N., Shebzukhov, Y. V., Kuchmiy, A. A., Grivennikov, S. I., Tumanov, A. V., Drutskaya, M. S., Feigenbaum, L., Kuprash, D. V., Nedospasov, S. A. 2009. Accelerated thymic atrophy as a result of elevated homeostatic expression of the genes encoded by the TNF/lymphotoxin cytokine locus. *Eur J Immunol* 39 (10): 2906–2915.
- Lind, E. F., Prockop, S. E., Porritt, H. E., Petrie, H. T. 2001. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 194 (2): 127–134.
- Lips, K. S., Wunsch, J., Zarghooni, S., Bschleipfer, T., Schukowski, K., Weidner, W., Wessler, I., Schwantes, U., Koepsell, H., Kummer, W. 2007. Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur Urol* 51 (4): 1042–1053.
- Liu, P., Shah, B. P., Croasdell, S., Gilbertson, T. A. 2011. Transient receptor potential channel type M5 is essential for fat taste. *J Neurosci* 31 (23): 8634–8642.
- Lossow, K., Hübner, S., Roudnitzky, N., Slack, J. P., Pollastro, F., Behrens, M., Meyerhof, W. 2016. Comprehensive Analysis of Mouse Bitter Taste Receptors Reveals Different Molecular Receptive Ranges for Orthologous Receptors in Mice and Humans. *J Biol Chem* 291 (29): 15358–15377.

- Luciano, L., Castellucci, M., Reale, E. 1981. The brush cells of the common bile duct of the rat. This section, freeze-fracture and scanning electron microscopy. *Cell Tissue Res* 218 (2): 403–420.
- Luciano, L., Groos, S., Reale, E. 2003. Brush cells of rodent gallbladder and stomach epithelia express neurofilaments. *J Histochem Cytochem* 51 (2): 187–198.
- Luciano, L., Reale, E. 1979. A new morphological aspect of the brush cells of the mouse gallbladder epithelium. *Cell Tissue Res* 201 (1): 37–44.
- Luciano, L., Reale, E. 1990. Brush cells of the mouse gallbladder. A correlative light- and electron-microscopical study. *Cell Tissue Res* 262 (2): 339–349.
- Luciano, L., Reale, E., Ruska, H. 1968a. Über eine "chemorezeptive" Sinneszelle in der Trachea der Ratte. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 85 (3): 350–375.
- Luciano, L., Reale, E., Ruska, H. 1968b. Über eine glykogenhaltige Bürstenzelle im Rectum der Ratte. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 91 (1): 153–158.
- Lüllmann-Rauch, R. 2009. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. Stuttgart: Thieme.
- Lynch, H. E., Goldberg, G. L., Chidgey, A., van den Brink, M. R. M., Boyd, R., Sempowski, G. D. 2009. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol* 30 (7): 366–373.
- Maśliński, W., Grabczewska, E., Laskowska-Bozek, H., Ryzewski, J. 1987. Expression of muscarinic cholinergic receptors during T cell maturation in the thymus. *Eur J Immunol* 17 (7): 1059–1063.
- Metzger, T. C., Khan, I. S., Gardner, J. M., Mouchess, M. L., Johannes, K. P., Krawisz, A. K., Skrzypczynska, K. M., Anderson, M. S. 2013. Lineage tracing and cell ablation identify a post-Aire-expressing thymic epithelial cell population. *Cell Rep* 5 (1): 166–179.
- Meyrick, B., Reid, L. 1968. The alveolar brush cell in rat lung—a third pneumonocyte. *Journal of Ultrastructure Research* 23 (1): 71–80.
- Mićić, M., Leposavić, G., Ugresić, N., Bogojević, M., Isaković, K. 1992. Parasympathetic innervation of the rat thymus during first life period: histochemical and biochemical study. *Thymus* 19 (3): 173–182.

- Middlebrook, A. J., Martina, C., Chang, Y., Lukas, R. J., DeLuca, D. 2002. Effects of nicotine exposure on T cell development in fetal thymus organ culture: arrest of T cell maturation. *J Immunol* 169 (6): 2915–2924.
- Mihovilovic, M., Butterworth-Robinette, J. 2001. Thymic epithelial cell line expresses transcripts encoding α -3, α -5 and β -4 subunits of acetylcholine receptors, responds to cholinergic agents and expresses choline acetyl transferase. An in vitro system to investigate thymic cholinergic mechanisms. *J Neuroimmunol* 117 (1-2): 58–67.
- Mihovilovic, M., Denning, S., Mai, Y., Whichard, L. P., Patel, D. D., Roses, A. D. 1997. Thymocytes and cultured thymic epithelial cells express transcripts encoding α -3, α -5 and β -4 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: preferential transcription of the α -3 and β -4 genes by immature CD4+8+ thymocytes. *J Neuroimmunol* 79 (2): 176–184.
- Miller, C. N., Proekt, I., Moltke, J. von, Wells, K. L., Rajpurkar, A. R., Wang, H., Rattay, K., Khan, I. S., Metzger, T. C., Pollack, J. L., Fries, A. C., Lwin, W. W., Wigton, E. J., Parent, A. V., Kyewski, B., Erle, D. J., Hogquist, K. A., Steinmetz, L. M., Locksley, R. M., Anderson, M. S. 2018. Thymic tuft cells promote an IL-4-enriched medulla and shape thymocyte development. *Nature* 559 (7715): 627–631.
- Miller, J. 1961. IMMUNOLOGICAL FUNCTION OF THE THYMUS. *The Lancet* 278 (7205): 748–749.
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., Krepler, R. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31 (1): 11–24.
- Moltke, J. von, Ji, M., Liang, H.-E., Locksley, R. M. 2016. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. *Nature* 529 (7585): 221–225.
- Monteiro-Riviere, N. A., Popp, J. A. 1984. Ultrastructural characterization of the nasal respiratory epithelium in the rat. *Am J Anat* 169 (1): 31–43.
- Montoro, D. T., Haber, A. L., Biton, M., Vinarsky, V., Lin, B., Birket, S. E., Yuan, F., Chen, S., Leung, H. M., Villoria, J., Rogel, N., Burgin, G., Tsankov, A. M., Waghray, A., Slyper, M., Waldman, J., Nguyen, L., Dionne, D., Rozenblatt-Rosen, O., Tata, P. R., Mou, H., Shivaraju, M., Bihler, H., Mense, M., Tearney, G. J., Rowe, S. M., Engelhardt,

- J. F., Regev, A., Rajagopal, J. 2018. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature* 560 (7718): 319–324.
- Moran, D. T., Carter Rowley, J., Jafek, B. W. 1982. Electron microscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: The microvillar cell. *Brain Research* 253 (1-2): 39–46.
- Morrison, S. J., Uchida, N., Weissman, I. L. 1995. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 35–71.
- Morrone, M., Cangioti, A. M., Cinti, S. 2007. Brush cells in the human duodenojejunal junction: an ultrastructural study. *J Anatomy* 211 (1): 125–131.
- Müller-Hermelink, H. K., Kreipe, H. H. 2019. Pathologie: Knochenmark, Lymphatisches System, Milz, Thymus. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Nabeyama, A., Leblond, C. P. 1974. "Caveolated cells" characterized by deep surface invaginations and abundant filaments in mouse gastro-intestinal epithelia. *Am J Anat* 140 (2): 147–165.
- Nadsombati, M. S., McGinty, J. W., Lyons-Cohen, M. R., Jaffe, J. B., DiPeso, L., Schneider, C., Miller, C. N., Pollack, J. L., Nagana Gowda, G. A., Fontana, M. F., Erle, D. J., Anderson, M. S., Locksley, R. M., Raftery, D., Moltke, J. von 2018. Detection of Succinate by Intestinal Tuft Cells Triggers a Type 2 Innate Immune Circuit. *Immunity* 49 (1)33-41.e7.
- Nance, D. M., Hopkins, D. A., Bieger, D. 1987. Re-investigation of the innervation of the thymus gland in mice and rats. *Brain Behav Immun* 1 (2): 134–147.
- Nance, D. M., Sanders, V. M. 2007. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun* 21 (6): 736–745.
- Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., Zuker, C. S. 2001. Mammalian Sweet Taste Receptors. *Cell* 106 (3): 381–390.
- Nevo, S., Kadouri, N., Abramson, J. 2019. Tuft cells: From the mucosa to the thymus. *Immunol Lett* 210: 1–9.
- Ogura, T., Szebenyi, S. A., Krosnowski, K., Sathyanesan, A., Jackson, J., Lin, W. 2011. Cholinergic microvillous cells in the mouse main olfactory epithelium and effect of

acetylcholine on olfactory sensory neurons and supporting cells. *J Neurophysiol* 106 (3): 1274–1287.

Ohmoto, M., Yamaguchi, T., Yamashita, J., Bachmanov, A. A., Hirota, J., Matsumoto, I. 2013. Pou2f3/Skn-1a is necessary for the generation or differentiation of solitary chemosensory cells in the anterior nasal cavity. *Biosci Biotechnol Biochem* 77 (10): 2154–2156.

Palmer, R. K., Atwal, K., Bakaj, I., Carlucci-Derbyshire, S., Buber, M. T., Cerne, R., Cortés, R. Y., Devantier, H. R., Jorgensen, V., Pawlyk, A., Lee, S. P., Sprous, D. G., Zhang, Z., Bryant, R. 2010. Triphenylphosphine oxide is a potent and selective inhibitor of the transient receptor potential melastatin-5 ion channel. *Assay Drug Dev Technol* 8 (6): 703–713.

Panneck, A. R., Rafiq, A., Schütz, B., Soultanova, A., Deckmann, K., Chubarov, V., Gudermann, T., Weihe, E., Krasteva-Christ, G., Grau, V., del Rey, A., Kummer, W. 2014. Cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in murine thymic medulla. *Cell Tissue Res* 358 (3): 737–748.

Passos, G. A., Speck-Hernandez, C. A., Assis, A. F., Mendes-da-Cruz, D. A. 2018. Update on Aire and thymic negative selection. *Immunology* 153 (1): 10–20.

Perniss, A., Liu, S., Boonen, B., Keshavarz, M., Ruppert, A.-L., Timm, T., Pfeil, U., Soultanova, A., Kusumakshi, S., Delventhal, L., Aydin, Ö., Pyrski, M., Deckmann, K., Hain, T., Schmidt, N., Ewers, C., Günther, A., Lochnit, G., Chubarov, V., Gudermann, T., Oberwinkler, J., Klein, J., Mikoshiba, K., Leinders-Zufall, T., Offermanns, S., Schütz, B., Boehm, U., Zufall, F., Bufe, B., Kummer, W. 2020. Chemosensory Cell-Derived Acetylcholine Drives Tracheal Mucociliary Clearance in Response to Virulence-Associated Formyl Peptides. *Immunity* 52 (4)683-699.e11.

Racké, K., Matthiesen, S. 2004. The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulm Pharmacol Ther* 17 (4): 181–198.

Raviola, E., Karnovsky, M. J. 1972. Evidence for a blood-thymus barrier using electron-opaque tracers. *J Exp Med* 136 (3): 466–498.

Reid, L., Meyrick, B., Antony, V. B., Chang, L.-Y., Crapo, J. D., Reynolds, H. Y. 2005. The mysterious pulmonary brush cell: a cell in search of a function. *Am J Respir Crit Care Med* 172 (1): 136–139.

- Rhodin, J., Dalhamn, T. 1956. Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 44 (4): 345–412.
- Rhodin, J. A. 1966. The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *Am Rev Respir Dis* 93 (3)Suppl:1-15.
- Ribatti, D. 2015. The discovery of the blood-thymus barrier. *Immunol Lett* 168 (2): 325–328.
- Rinner, I., Globerson, A., Kawashima, K., Korsatko, W., Schauenstein, K. 1999. A possible role for acetylcholine in the dialogue between thymocytes and thymic stroma. *Neuroimmunomodulation* 6 (1-2): 51–55.
- Rinner, I., Kukulansky, T., Felsner, P., Skreiner, E., Globerson, A., Kasai, M., Hirokawa, K., Korsatko, W., Schauenstein, K. 1994. Cholinergic stimulation modulates apoptosis and differentiation of murine thymocytes via a nicotinic effect on thymic epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 203 (2): 1057–1062.
- Rodewald, H.-R. 2008. Thymus organogenesis. *Annu Rev Immunol* 26: 355–388.
- Rossi, S. W., Jenkinson, W. E., Anderson, G., Jenkinson, E. J. 2006. Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature* 441 (7096): 988–991.
- Rössler, P., Boekhoff, I., Tareilus, E., Beck, S., Breer, H., Freitag, J. 2000. G protein betagamma complexes in circumvallate taste cells involved in bitter transduction. *Chem Senses* 25 (4): 413–421.
- Rössler, P., Kroner, C., Freitag, J., Noè, J., Breer, H. 1998. Identification of a phospholipase C beta subtype in rat taste cells. *Eur J Cell Biol* 77 (3): 253–261.
- Ruppert, A.-L., Keshavarz, M., Winterberg, S., Oberwinkler, J., Kummer, W., Schütz, B. 2020. Advillin is a tuft cell marker in the mouse alimentary tract. *Journal of molecular histology* 51 (4): 421–435.
- Saqui-Salces, M., Keeley, T. M., Grosse, A. S., Qiao, X. T., El-Zaatari, M., Gumucio, D. L., Samuelson, L. C., Merchant, J. L. 2011. Gastric tuft cells express DCLK1 and are expanded in hyperplasia. *Histochem Cell Biol* 136 (2): 191–204.
- Sato, A., Miyoshi, S. 1996. Tuft cells in the main excretory duct epithelia of the three major rat salivary glands. *Eur J Morphol* 34 (3): 225–228.

Saunders, C. J., Christensen, M., Finger, T. E., Tizzano, M. 2014. Cholinergic neurotransmission links solitary chemosensory cells to nasal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (16): 6075–6080.

Sbarbati, A., Merigo, F., Benati, D., Tizzano, M., Bernardi, P., Osculati, F. 2004. Laryngeal chemosensory clusters. *Chem Senses* 29 (8): 683–692.

Sbarbati, A., Osculati, F. 2005. A new fate for old cells: brush cells and related elements. *J Anat* 206 (4): 349–358.

Schneider, C., O'Leary, C. E., Moltke, J. von, Liang, H.-E., Ang, Q. Y., Turnbaugh, P. J., Radhakrishnan, S., Pellizzon, M., Ma, A., Locksley, R. M. 2018. A Metabolite-Triggered Tuft Cell-ILC2 Circuit Drives Small Intestinal Remodeling. *Cell* 174 (2)271-284.e14.

Schütz, B., Jurastow, I., Bader, S., Ringer, C., Engelhardt, J. von, Chubanov, V., Gudermann, T., Diener, M., Kummer, W., Krasteva-Christ, G., Weihe, E. 2015. Chemical coding and chemosensory properties of cholinergic brush cells in the mouse gastrointestinal and biliary tract. *Front Physiol* 6: 87.

Schuurman, H. J., Kuper, C. F., Kendall, M. D. 1997. Thymic microenvironment at the light microscopic level. *Microsc Res Tech* 38 (3): 216–226.

Singh, U., Fatani, J. A., Mohajir, A. M. 1987. Ontogeny of cholinergic innervation of thymus in mouse. *Dev Comp Immunol* 11 (3): 627–635.

Small, D. M. 2006. Central gustatory processing in humans. *Adv Otorhinolaryngol* 63: 191–220.

Soultanova, A., Panneck, A. R., Rafiq, A., Kummer, W. 2014. Terminally differentiated epithelial cells of the thymic medulla and skin express nicotinic acetylcholine receptor subunit α 3. *Biomed Res Int* 2014: 757502.

Soultanova, A., Voigt, A., Chubanov, V., Gudermann, T., Meyerhof, W., Boehm, U., Kummer, W. 2015. Cholinergic chemosensory cells of the thymic medulla express the bitter receptor Tas2r131. *International Immunopharmacology* 29 (1): 143–147.

Spielman, A. I., Huque, T., Nagai, H., Whitney, G., Brand, J. G. 1994. Generation of inositol phosphates in bitter taste transduction. *Physiology & Behavior* 56 (6): 1149–1155.

- Steinmann, G. G. 1986. Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol* 75: 43–88.
- Steinmann, G. G., Klaus, B., Müller-Hermelink, H. K. 1985. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J Immunol* 22 (5): 563–575.
- Steinmann, G. G., Müller-Hermelink, H. K. 1985. Altersveränderungen des thymusabhängigen Immunsystems. *Dtsch Med Wochenschr* 110 (34): 1300–1307.
- Strom, T. B., Sytkowski, A. J., Carpenter, C. B., Merrill, J. P. 1974. Cholinergic augmentation of lymphocyte-mediated cytotoxicity. A study of the cholinergic receptor of cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71 (4): 1330–1333.
- Surh, C. D., Sprent, J. 2018. Pillars Article: T-Cell Apoptosis Detected In Situ during Positive and Negative Selection in the Thymus. *Nature*. 1994. 372: 100-103. *J Immunol* 201 (1): 7–10.
- Takaba, H., Morishita, Y., Tomofuji, Y., Danks, L., Nitta, T., Komatsu, N., Kodama, T., Takayanagi, H. 2015. Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell* 163 (4): 975–987.
- Takada, K., Takahama, Y. 2015. Positive-selection-inducing self-peptides displayed by cortical thymic epithelial cells. *Adv Immunol* 125: 87–110.
- Takahama, Y., Ohigashi, I., Baik, S., Anderson, G. 2017. Generation of diversity in thymic epithelial cells. *Nat Rev Immunol* 17 (5): 295–305.
- Tallini, Y. N., Shui, B., Greene, K. S., Deng, K.-Y., Doran, R., Fisher, P. J., Zipfel, W., Kotlikoff, M. I. 2006. BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons. *Physiol Genomics* 27 (3): 391–397.
- Tavassoli, M. 1991. Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. *Blood Cells* 17 (2)269-81; discussion 282-6.
- Tizzano, M., Cristofolletti, M., Sbarbati, A., Finger, T. E. 2011. Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways. *BMC Pulm Med* 11: 3.
- Tizzano, M., Gulbransen, B. D., Vandenbeuch, A., Clapp, T. R., Herman, J. P., Sibhatu, H. M., Churchill, M. E. A., Silver, W. L., Kinnamon, S. C., Finger, T. E. 2010. Nasal

- chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (7): 3210–3215.
- Tizzano, M., Merigo, F., Sbarbati, A. 2006. Evidence of solitary chemosensory cells in a large mammal: the diffuse chemosensory system in *Bos taurus* airways. *J Anat* 209 (3): 333–337.
- Treuting, P. M., Dintzis, S. 2012. Comparative anatomy and histology: A mouse and human atlas. Amsterdam: Elsevier Acad. Press.
- Tria, M. A., Vantini, G., Fiori, M. G., Rossi, A. 1992. Choline acetyltransferase activity in murine thymus. *J Neurosci Res* 31 (2): 380–386.
- Trotter, R. N., Stornetta, R. L., Guyenet, P. G., Roberts, M. R. 2007. Transneuronal mapping of the CNS network controlling sympathetic outflow to the rat thymus. *Auton Neurosci* 131 (1-2): 9–20.
- Waal, E. J. de, Rademakers, L. H. 1997. Heterogeneity of epithelial cells in the rat thymus. *Microsc Res Tech* 38 (3): 227–236.
- Watanabe, N., Wang, Y.-H., Lee, H. K., Ito, T., Wang, Y.-H., Cao, W., Liu, Y.-J. 2005. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436 (7054): 1181–1185.
- Wattel, W., Geuze, J. J. 1978. The cells of the rat gastric groove and cardia. *Cell Tissue Res* 186 (3): 375–391.
- Weksler, M. E., Pawelec, G., Franceschi, C. 2009. Immune therapy for age-related diseases. *Trends Immunol* 30 (7): 344–350.
- Wiederhold, S., Papadakis, T., Chubanov, V., Gudermann, T., Krasteva-Christ, G., Kummer, W. 2015. A novel cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in the murine conjunctiva. *International Immunopharmacology* 29 (1): 45–50.
- Williams, J. M., Peterson, R. G., Shea, P. A., Schmedtje, J. F., Bauer, D. C., Felten, D. L. 1981. Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: Evidence for a functional link between the nervous and immune systems. *Brain Research Bulletin* 6 (1): 83–94.

Yamashita, J., Ohmoto, M., Yamaguchi, T., Matsumoto, I., Hirota, J. 2017. Skn-1a/Pou2f3 functions as a master regulator to generate Trpm5-expressing chemosensory cells in mice. *PLoS ONE* 12 (12):e0189340.

Zancanaro, C., Caretta, C. M., Merigo, F., Cavaggioni, A., Osculati, F. 1999. alpha-Gustducin expression in the vomeronasal organ of the mouse. *Eur J Neurosci* 11 (12): 4473–4475.

Zlotoff, D. A., Schwarz, B. A., Bhandoola, A. 2008. The long road to the thymus: the generation, mobilization, and circulation of T-cell progenitors in mouse and man. *Semin Immunopathol* 30 (4): 371–382.

10 Erklärung zur Dissertation

„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

11 Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlichst bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Fertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Allen voran gilt mein Dankeschön meinem Doktorvater, Professor Dr. Wolfgang Kummer, und meiner Betreuerin, Dr. Aichurek Soultanova. Danke für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung, die vielen kostbaren Ideen und dafür, dass sie bei Problemen und Rückfragen immer für mich da waren.

Einen besonderen Dank spreche ich allen Kollegen vom Labor des Institutes für Anatomie und Zellbiologie aus, die mich an die Laborarbeit herangeführt haben und mich sowohl persönlich als auch fachlich unterstützt haben: Dr. Amir Rafiq, Dr. Klaus Deckmann, Dr. Uwe Pfeil, Dr. Christina Nassenstein, Martin Bodenbenner, Tamara Papadakis, Katharina Fleck, Silke Wiegand, Patricia Berger, Karola Michael, Chrissy Kandel, Lucas Delventhal und allen anderen, die mich durch die Jahre begleitet haben.

Ich danke meinen Eltern, die mich über das ganze Studium unterstützt und somit all dies überhaupt erst möglich gemacht haben. Ich danke auch meinen Freunden, die das Leben wertvoller machen.

Zum Abschluss möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner wundervollen Freundin Svenja Hemmer bedanken. Danke für die Motivation, die moralische Unterstützung und die Geduld beim Erklären der fehlenden Logik in der deutschen Grammatik.