

**Non-neuronale cholinerge chemosensorische Zellen im  
Nebenhodenepithel**

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

vorgelegt von Dorscht, Ludmilla  
aus Almaty

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität  
Gießen

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie,

Gutachter: Prof. Dr. med. Ralf Middendorff

Gutachterin: Prof. Dr. med. Eva Peters

Tag der Disputation: 15.07.2021

**Inhalt**

1	Einleitung.....	1
1.1	Aufbau des Nebenhodens.....	1
1.1.1	Allgemeiner Aufbau des Nebenhodenepithels.....	3
1.1.2	Spezifische Zelltypen des Nebenhodenepithels.....	5
1.1.3	Muskelschicht und Kontraktion des Ductus epididymidis.....	7
1.2	Non-neuronales cholinerges System.....	8
1.2.1	„Acetylcholin als non-neuronales Signalmolekül“.....	8
1.2.2	Die Acetylcholin-Synthese.....	9
1.2.3	Acetylcholin-Speicherung und Freisetzung.....	10
1.2.4	Acetylcholin-Abbau und Recycling.....	11
1.2.5	Acetylcholinrezeptoren.....	12
1.2.6	Der nikotinerge Acetylcholinrezeptor.....	12
1.2.7	Der muskarinergere Acetylcholinrezeptor.....	14
1.3	Bitterstoffe und ihr Signalweg.....	16
1.3.1	Bitterstoffe und Geschmack.....	16
1.3.2	Bitterstoffrezeptoren und Signalwege.....	16
2	Zielsetzung.....	18
3	Material und Methoden.....	19
3.1	Materialien.....	19
3.1.1	Untersuchungsmaterial.....	19
3.1.2	Antikörper.....	20
3.1.3	Primer für die Polymerase Kettenreaktion.....	22
3.1.4	Lösungen.....	23
3.1.5	Kits.....	25
3.1.6	Programme.....	25
3.1.7	Geräte.....	25
3.1.8	Verbrauchsmaterialien.....	26
3.2	Methoden.....	27
3.2.1	Immunfluoreszenz.....	27
3.2.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	28
3.2.3	Life Imaging Kontraktionsversuche.....	30
4	Ergebnisse.....	31
4.1	Nachweis von ChAT-positiven Zellen im Nebenhoden der Maus.....	31
4.2	Nachweis von ChAT auf der mRNA Ebene.....	33
4.3	Zelltypisierung der ChAT positiven Zellen.....	34
4.4	Die Nachbarschaft zu V-ATPase-haltigen „Clear-Zellen“.....	37

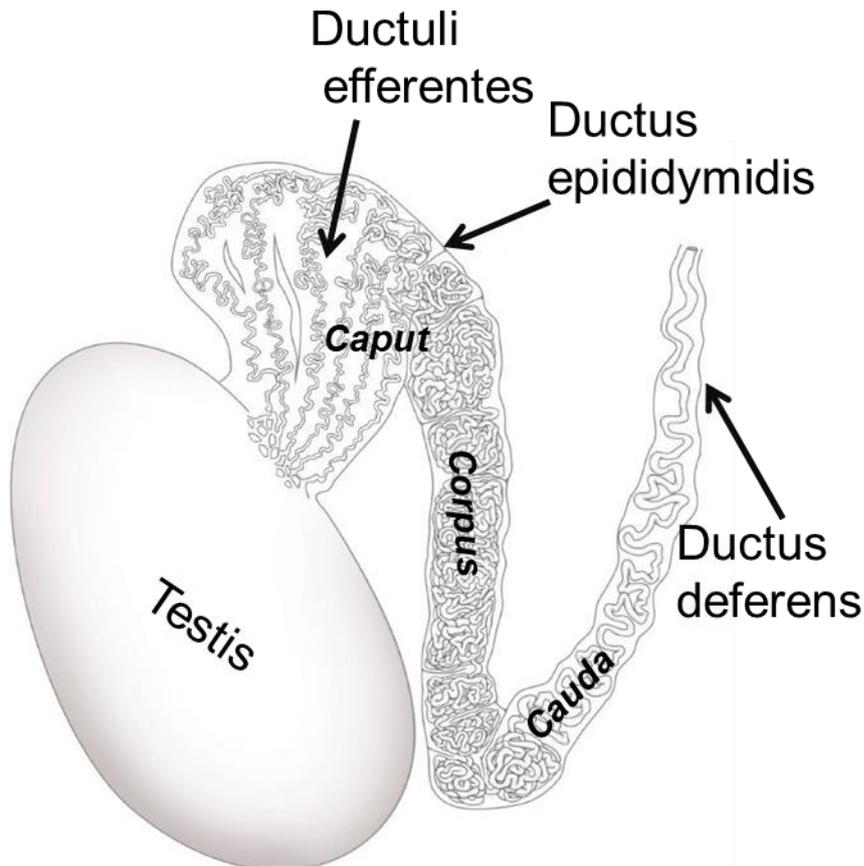
4.5	Komponenten der Geschmackskaskade im Nebenhoden .....	38
4.6	ChAT positive Zellen und $\alpha$ 3-nAChR-haltige Nervfasern .....	40
4.7	Kontraktionsstudien mit Bitterstoffen am Nebenhodengang .....	41
5	Diskussion .....	44
5.1	Gibt es non-neuronale cholinerge Zellen im Nebenhodenepithel? .....	44
5.2	Mögliche Funktion einer ChAT exprimierenden Zelle im Nebenhoden .....	45
5.3	Welchem Zelltyp ähneln die cholinergen Zellen? .....	46
5.4	Weitere Charakteristika der non-neuronalen cholinergen Basalzellen des Nebenhodenepithels .....	48
5.5	Bitterstoff-Detektion im Nebenhoden .....	49
5.6	Funktionelle interzelluläre Verbindung zu V-ATPase-exprimierenden Zellen	51
5.7	Nervale Stimulation durch ChAT-positive-Zellen als eine mögliche Funktion	52
5.8	Der direkte Muskeffekt als funktioneller Aspekt .....	52
5.9	Die non-neuronale cholinerge chemosensorische Zelle in anderen Organen im Wandel der Forschung .....	54
6	Zusammenfassung .....	55
7	Summary .....	56
8	Abkürzungsverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge .....	57
9	Abbildungsverzeichnis .....	58
10	Tabellenverzeichnis .....	59
11	Literaturverzeichnis .....	60
12	Erklärung zur Dissertation .....	69
13	Danksagung .....	70

## 1 Einleitung

### 1.1 Aufbau des Nebenhodens

Durch die Passage des Nebenhodens erlangen Spermien die Fähigkeit zur Fertilisation. Damit ist der Nebenhoden unabdingbar für die Reifung befruchtungsfähiger Spermien und ihrer Speicherung bis zur Ejakulation. Durch diese bedeutenden Aufgaben wird der Nebenhoden zu einem absolut notwendigen Fortpflanzungsorgan. Er ist an der Hilusseite des Hodens lokalisiert und erstreckt sich von dessen cranialen Pol bis hin zum caudalen Pol. Zu seinen weiteren Funktionen zählen außerdem noch die Resorption von Flüssigkeiten und Proteinen, welche vom Hoden zum Nebenhoden gelangen, und die Aufrechterhaltung des für die Spermien so notwendigen Mikromilieus (Sobotta & Welsch, 2009).

Das Organ wird gebildet durch die stark aufgewundenen Ductuli efferentes, welche in ihrer Anzahl abhängig von der Spezies variieren (beim Menschen 8-12 Kanälchen mit einer Länge von 10-12cm) und dem Nebenhodengang (Ductus epididymidis), einem 6m langen röhrenartigen Schlauch. Dieser ist durch Schleifenbildung stark geknäult und hat dadurch beim Menschen eine Größe von nur 4-5cm (Turner et al., 1978). Er mündet in den 35-40cm langen Samenleiter, dem Ductus deferens. Der Nebenhoden ist in eine dünne Bindegewebshülle, der Tunica albuginea, gehüllt und umgeben von Bindegewebe, welches durchzogen wird von Nerven, Gefäßen und Lymphbahnen. Makroskopisch lässt sich der Nebenhoden in drei Abschnitte einteilen, welche durch strukturelle und funktionelle Merkmale unterscheidbar sind: einen kranial gelegenen Nebenhodenkopf (Caput), einem schmalen Nebenhodenkörper (Corpus) und dem distal gelegenen Nebenhodenschwanz (Cauda) (Abbildung 1). Im Bereich des Caput befindet sich neben den Ductuli efferentes auch der Beginn des Ductus epididymidis, dieser setzt sich in den Corpus fort. Diese beiden Abschnitte dienen vor allem der Spermienreifung und dem Erhalt des notwendigen Mikromilieus. Anschließend gelangen die Spermien in die Cauda und werden hier bis zur Ejakulation gespeichert. Das gesamte Gangsystem ist umgeben von einer Muskelschicht, welche von Caput nach Cauda an Dicke zunimmt und durch seine peristaltische Aktivität den Spermatozoen-Transport gewährleistet (Robaire & Hinton, 2015).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ductus epididymidis.**

Der Hoden setzt sich über das Rete testis in die Ductuli efferentes des Nebenhodens fort. Diese machen einen Großteil des Caput epididymidis aus, welcher in das Corpus epididymidis übergeht. Die Cauda epididymidis bildet den Abschluss des Nebenhodenganges, welcher in den Ductus deferens mündet.

Im Lumen des Ductus epididymidis befinden sich neben den zahlreichen Spermatozoen auch unreife, verfrüht entlassene Keimzellen, abgeschilferte Epithelzellen, Spermatophagen (Makrophagen) und Flüssigkeit, welche aus Hoden und dem Rete testis stammt. So wie oben bereits beschrieben nimmt die Muskelschicht Cauda-wärts zu, dasselbe gilt für den Durchmesser des Lumens. Gegenätzlich verhält sich nur die Höhe des Epithels, welche von proximal nach distal stetig abnimmt (Baumgarten et al., 1971).

Verschiedene Hormone (beispielsweise: Androgene, Östrogene, Progesterone, Melatonin, usw.), sowie Proteine (z.B. Wachstumsfaktoren) dienen im Nebenhoden der Aufrechterhaltung von funktionellen und morphologischen Eigenschaften (Robaire & Hamzeh, 2011). Aber auch eine optimale Temperatur und die autonome Innervation (Ricker, 1998) sind relevante Faktoren zum Funktionserhalt.

Durchschnittlich verweilen Spermien 8 bis 16 Tage im Ductus epididymidis (Amann et al., 1976) und können abhängig von Spezies etwa drei Wochen nach Isolation aus dem Nebenhoden in der Lage sein, eine Eizelle zu befruchten. Die Mobilität kann sogar bis zu sechs Wochen lang erhalten bleiben (Lubicz-Nawrocki et al., 1973; Paufler & Foote, 1968).

### **1.1.1 Allgemeiner Aufbau des Nebenhodenepithels**

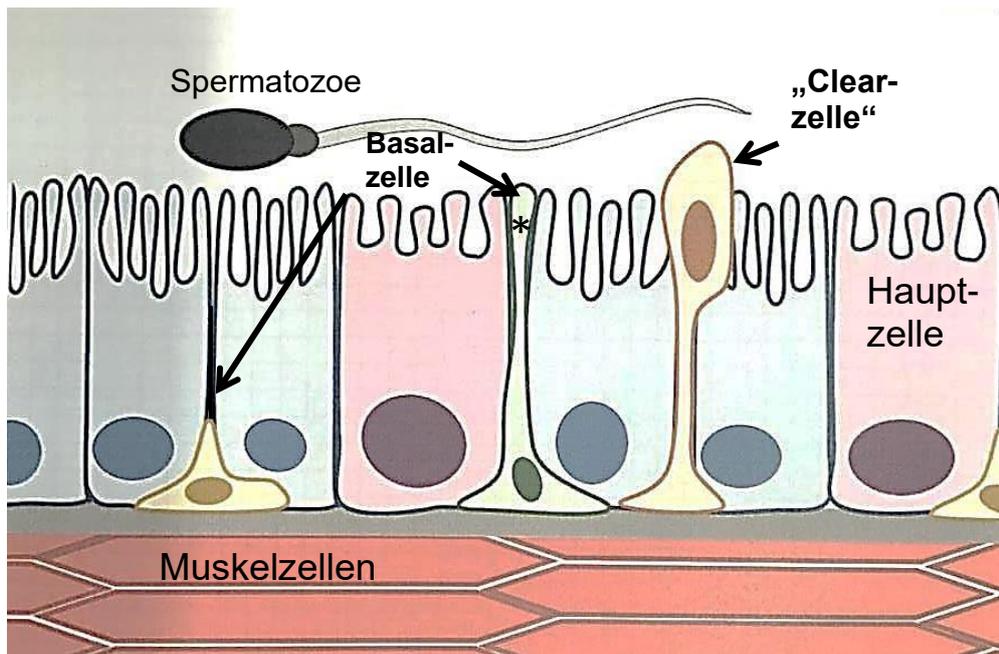
Das Nebenhodenepithel besteht aus einem ein- bis mehrreihigen Epithel, welches Zellen unterschiedlicher Höhe beherbergt. Diese Höhenunterschiede reichen von 30 bis hin zu 80µm (Robaire & Hinton, 2015).

Die Ductuli efferentes besitzen ein abwechselnd kubisches, einschichtiges oder mehrreihiges, prismatisches Epithel, hierdurch erscheint die Querschnittsansicht des Epithels wellenförmig. Die tiefer gelegenen Epithelzellen tragen Mikrovilli und sind sowohl sekretorisch als auch resorptiv aktiv. Hingegen tragen die höheren Epithelzellen Kinozilien und tragen durch Bewegungen zu einem stetigen Flüssigkeitsstrom und damit zum Spermatozoen-Transport bei (Holstein, 2008).

Der Ductus epididymidis setzt sich aus einem zweireihigen, gleichmäßig hohem Epithel zusammen und besitzt verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen und morphologischen Eigenschaften (Abbildung 2). Den größten Anteil der Zellen stellen die Epithelzellen dar, gefolgt von den Basalzellen und vielen weiteren kleineren Zellpopulationen (Holstein, 2008).

Die entstehenden Zell-Zell-Kontakte zwischen den verschieden und gleichartigen Zellen tragen entscheidend zur Bildung der notwendigen Blut-Nebenhoden-Schranke bei (Cyr et al., 2007).

Die hormonell gesteuerten Sekretionsvorgänge der verschiedenen Zelltypen scheinen unter anderem Einfluss zu haben auf die Spermienreifung und die Aufrechterhaltung der notwendigen morphologischen und funktionellen Aspekte des Ductus epididymidis (Cosentino et al., 1986; Leung et al., 1998; Shum et al., 2008). So z.B. der Testosteron abhängige Angiotensin Rezeptor Typ (I und) II, welcher durch Tierversuche in Basalzellen nachgewiesen wurde. Dieser wird durch im Lumen befindliches Angiotensin aktiviert und führt zur Bildung von Stickstoffmonoxid (NO). Das NO wiederum diffundiert zur benachbarten „Clear-Zelle“ und bewirkt hier eine Akkumulation von V-ATPase in den Mikrovilli. Durch die Katalyse dieses Enzyms kommt es zur Protonenfreisetzung und dadurch zum Erhalt des physiologischen pH (Shum et al., 2008).



**Abbildung 2: Schema des Nebenhodenepithels.**

Im Nebenhodenepithel berühren alle Zellen die Basalmembran, aber nicht alle Zellen erreichen das Lumen (einschichtiges, zweireihiges Epithel). Hier gezeigt sind die Hauptzellen, „Clear-Zellen“ sowie Basalzellen mit (\*) und ohne Lumen-erreichendem Ausläufer. Außen befindet sich eine Muskelschicht aus glatten Muskelzellen (Abbildung von Clara Morawski).

### 1.1.2 Spezifische Zelltypen des Nebenhodenepithels

#### **Hauptzellen**

Die Stereozilien tragenden Hauptzellen besitzen einen hohen Säulenartigen Charakter und bilden 65-80% der gesamten Zellpopulation aller Zelltypen. Sie unterscheiden sich in strukturellen Eigenschaften innerhalb der verschiedenen Abschnitte. Klassisch für diesen Zelltyp ist das ausgeprägte Endoplasmatisches Retikulum und der reiche Golgi Apparat, welche zu den wichtigen Sekretions- und Resorptionsvorgängen beitragen. Aber auch die Synthese von zahlreichen Proteinen, die teilweise luminal sezerniert werden oder intrazellulär verbleiben, ist typisch für diesen Zelltyp. Die Stereozilien besitzen Aktinfilamentbündel, welche durch Fimbrin quervernetzt sind und im basalen Bereich  $\alpha$ -Aktin tragen. Diese dienen der Oberflächenvergrößerung zur Sicherung der Ausbildung der verschiedenen Kanäle und Proteine (Robaire, Hinton und Orgebin-Christ, 2006).

#### **Basalzellen**

Die basolateral gelegenen Stereozilien-freien Basalzellen liegen mit einer breiten Basis der Basalmembran auf. Lange Zeit glaubte man, dass dieser Zelltyp keinen direkten Kontakt zum luminalen Milieu hat, doch wurden mittlerweile immer wieder einzelne Basalzellen beschrieben, die einen dünnen zytoplasmatischen Zellausläufer bis hin zum Lumen bilden (Shum et al., 2008). Basalzellen besitzen ebenso wenig wie Hauptzellen die Eigenschaft zur Zellteilung. Im basalen Abschnitt dieser Zellen finden sich so genannte coated pits und wie die Epithelzellen haben auch die Basalzellen einen ausgeprägten Golgi-apparat, was sie zu Endozytose befähigt. Des Weiteren wird den Basalzellen eine immunogene Rolle zugesprochen, was mit der Reaktion auf die Anwesenheit von Spermatozoen Auto-Antigen zusammenhängt (Robaire, Hinton und Orgebin-Christ, 2006).

#### **„Clear-Zellen“**

Die „Clear-Zellen“ stellen eine Zellpopulation mit hohem endozytischem Charakter dar. Typisch für diese Zellen ist das Vorhandensein von coated pits, Lysosomen, Vesikel, Endosomen, usw. im apikalen Zellbereich. Sie dienen der Abschnitts-spezifischen Freisetzung von diversen Proteinen und deren Resorption. Funktionell spielen sie eine Rolle bei der luminalen Sekretion von Protonen und exprimieren typischerweise V-ATPasen, wodurch sie zu dem leicht sauren pH (pH 6,5) beitragen, unter welchem die Spermatozoen in einer so genannten Säurestarre unbeweglich bleiben (Robaire, Hinton und Orgebin-Christ, 2006).

**„Narrow-Zellen“**

Dieser Zelltyp ist ausschließlich im Initialenabschnitt und der Intermediär Zone lokalisiert. Der größte Teil des Zellkörpers befindet sich im apikalen Bereich des Epithels, jedoch erstreckt sich ein dünner zytoplasmatischer Ausläufer Richtung Basalmembran (Cornwall, 2009; Kujala et al., 2007; Pietrement et al., 2006; Robaire, Hinton und Orgebin-Christ, 2006).

**Halo-Zellen**

Halo-Zellen finden sich im gesamten Epithel des Ductus epididymidis, wobei sie eher im basalen Bereich des Epithels lokalisiert sind. Sie beinhalten eine unterschiedliche Anzahl von dense-core Vesikeln und werden entweder als Lymphozyten oder Monozyten beschrieben. Sie scheinen gemeinsam mit den Basalzellen eine Immunabwehr zu bedingen (Cornwall, 2009; Robaire, Hinton und Orgebin-Christ, 2006).

**Apikal-Zellen**

Dieser Zelltyp ist ausschließlich im apikalen Bereich des Epithels lokalisiert und hat keinerlei Verbindung zur Basalmembran. Apikal-Zellen finden sich wie auch die „Narrow-Zellen“ im Initial Segment und der Intermediär Zone. Sie werden klassischerweise durch ihre spezielle und für sie typische Proteinexpression von Epithel- und „Narrow-Zellen“ unterschieden (Robaire, Hinton und Orgebin-Christ, 2006).

### 1.1.3 Muskelschicht und Kontraktion des Ductus epididymidis

Die morphologische Grundlage der peristaltischen Bewegung des Nebenhodenganges ist die glatte Muskelzelle. Die, wie bereits erwähnt, von proximal nach distal an Dicke zunimmt (Holstein et al., 1996) und sich in den jeweiligen Abschnitten in ihrer Erregbarkeit unterscheidet (Mewe et al., 2006).

Im Caput werden die Nebenhodenkanälchen der Ductuli efferentes und der Nebenhodengang selbst durch einen nur wenige Schichten dicken Muskelmantel zirkulär umgeben. Hier neigen die glatten Muskelzellen zur Spontankontraktion und werden allgemein als weniger differenziert angesehen. Diese Autokontraktion lässt sich durch Oxytocingabe verstärken (Veeramachaneni et al., 1990). Dies führt gemeinsam mit der aktiven Bewegung der ins Lumen ragenden Kinozilien der Epithelzellen der Ductuli efferentes zum Transport der Spermatozoen in Richtung des Nebenhodenganges (Heiniger et al., 1996). Weitere Tierversuche konnten einen Spermatozoentransport unabhängig von den Ductuli efferentes zeigen, so wie eine rhythmische Kontraktion mit einer höheren Frequenz des Caput im Vergleich zum Cauda der Ratte (MacMillan & Auckland, 1960).

Im Corpus verstärkt sich dieser Muskelmantel, ohne dabei eine Veränderung der Anordnung der Muskelzellen zu bewirken. Das Kontraktionsprofil zeigt charakteristisch eine reduzierte Spontankontraktion je distaler der Bereich, hingegen nimmt die Amplitude der Kontraktionen Cauda-wärts zu (Mewe et al., 2006a; Mewe et al., 2006b). Studien am Bullen-Nebenhoden konnten eine Kontraktionszunahme im Caput nach Oxytocingabe zeigen, während im Corpus und Cauda eher eine Relaxation zu verzeichnen war (Mewe et al., 2007).

Neben den hormonellen und parakrinen Regulationsmechanismen der Kontraktion sind vor allem im Bereich der Cauda eine hohe Anzahl adrenerger und cholinergere Nervenfasern zu finden. Caput und Corpus scheinen hingegen spärlich innerviert (Kaleczyc et al., 1993; Koslov et al., 2013). Auch zeigte sich im Bereich der Cauda ein stärkerer Effekt von Adrenalin und Noradrenalin als in den anderen Abschnitten des Nebenhodens (Eliasson et al., 1968; Mewe et al., 2007).

Viele weitere neuere Erkenntnisse am Tiermodell verbesserten das Verständnis über die Kontraktion des Nebenhodenganges und dessen Regulationsmechanismen (Mewe et al., 2006a; Mewe et al., 2006b; Mietens et al., 2012; Mietens et al., 2014).

## 1.2 Non-neuronales cholinerges System

Zunächst zum besseren Verständnis eine kurze Erläuterung zum neuronalen cholinergen System: das neuronale System beschreibt die Synthese und Freisetzung von Acetylcholin (ACh) in cholinergen Neuronen, wodurch es zur Bindung von Acetylcholin an nikotinergen oder muskarinergen Rezeptoren (Rez.) einer Effektorzelle und zur Aktivierung dieser kommt (Abbildung 3). Im Vergleich dazu stellt das non-neuronale cholinerge System denselben Mechanismus dar, jedoch in nicht neuronalem Gewebe (Grando et al., 2003). Noch ist die Studienlage zum non-neuronalen cholinergen System nicht sonderlich groß, doch ist mittlerweile bekannt, dass es sich um ein evolutionsgeschichtlich sehr altes System handelt, das ubiquitär verbreitet ist. So wird Acetylcholin als Botenstoff nicht nur von Säugetieren genutzt, sondern auch von Pilzen, Bakterien, Algen und vielen anderen Lebewesen verwendet (Wessler et al., 1999; Horiuchi et al., 2003; Kawashima et al., 2007). Immer mehr Gewebe bzw. Zellen werden entdeckt, welche Proteine zur Synthese, Freisetzung oder zum Abbau von Acetylcholin besitzen. In nicht neuronalen Zellen wirkt Acetylcholin als Botenstoff auf lokaler Ebene. Über parakrine oder autokrine Mechanismen kann es so verschiedene Zellfunktionen steuern (Abbildung 4), dazu zählen unter anderem die Proliferation bis hin zu Apoptose, aber auch Zell-Zell-Kontakte und Immunaktivität (Grando et al., 2003). Für den Nebenhoden lagen dies bezüglich noch keine Erkenntnisse vor.

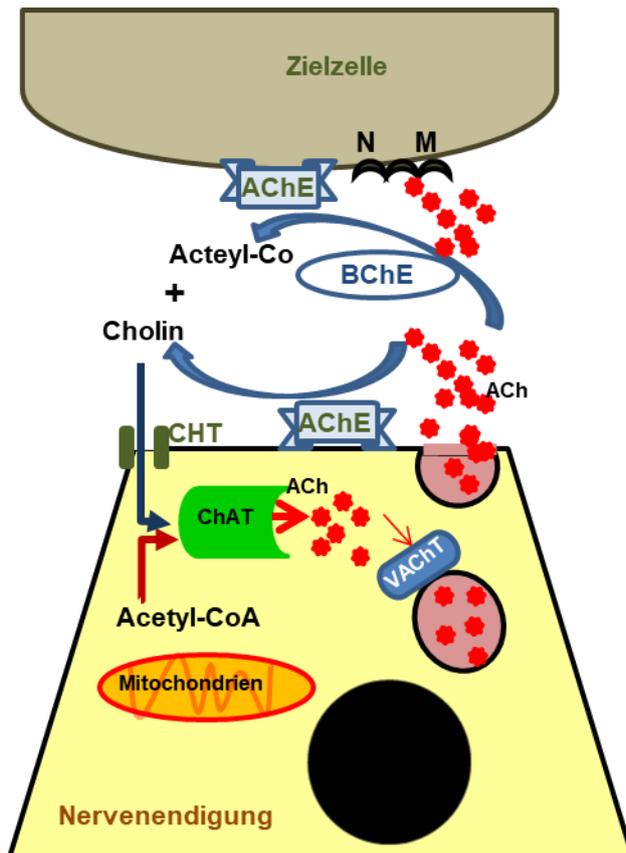
### 1.2.1 „Acetylcholin als non-neuronales Signalmolekül“

1921 entdeckte Otto Loewi den ersten klassischen Neurotransmitter, das Acetylcholin. In seinen Experimenten stellte er die Freisetzung dieses bis dahin unbekanntes Botenstoffes aus den Nervenendigungen des N. vagus fest (Loewi, 1921). Dieser als Vagusstoff bezeichnete Transmitter wurde im Laufe der Jahre auch im Mutterkorn nachgewiesen (Ewins, 1914) und im Laufe der Zeit als Acetylcholin identifiziert (Tansey, 2006). Die Forschung konzentrierte sich zunächst jedoch auf den rein neuronalen Effekt von Acetylcholin. Es wird bekanntermaßen in Bereichen der motorischen Endplatte und der Synapsenendigungen gebraucht. Es bindet an muskarinergen oder nikotinergen Acetylcholinrezeptoren und setzt darüber eine direkte Aktivierung von Kationenkanälen in Gang oder führt über eine G-Protein-gekoppelte Kaskade zur Zellreaktion. Immer mehr Hinweise zum Vorhandensein von Acetylcholin oder anderen Bestandteilen des cholinergen Systems in nicht neuronalen Organen wurden im Laufe der Zeit entdeckt, sodass sich die Forschung vom neuronalen cholinergen System in Richtung des non-neuronalen weiter fortbewegt hat (Comline, 1946; Sastry & Sadavongvivad 1978; Wessler et al., 1998).

### 1.2.2 Die Acetylcholin-Synthese

Das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) katalysiert die Synthese des Acetylcholins aus Acetyl-Coenzym A (CoA) und Cholin (Abbildung 3) im Zytoplasma (Nachmansohn & Machado, 1943). Auch das ubiquitär vorkommende Enzym Carnitinacetyltransferase ist in der Lage Acetylcholin zu bilden (Tucek, 1982; White & Wu, 1973). Es ist hauptsächlich in der Mitochondrienmembran in z.B. Herz- und Skelettmuskelzellen lokalisiert. Das benötigte Cholin wird einerseits über Transportsysteme aus dem Extrazellularraum oder aber durch den intrazellulären Abbau cholinhaltiger Phospholipide bereitgestellt. Bei dem Acetyl-CoA handelt es sich um ein Abbauprodukt des mitochondrialen Fettsäurezyklus, welches in das Zytosol abgegeben wird (Adamic 1972). Die zytosolische Cholinaufnahme ist abhängig von den unterschiedlichen Affinitäten der Transportsysteme und stellt hier den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Acetylcholin-Synthese dar (Okuda et al., 2000A). ChAT besitzt eine hohe Affinität zu Cholin, toleriert aber diverse Acylgruppen (Rossier, 1977), was daraufhin deutet, dass ChAT auch an der Synthese von Butyrylcholin und Propionylcholin beteiligt ist (Rossier, 1977; Wessler et al., 1998).

Beim Menschen wurde das ChAT-Gen auf Chromosom 10, Region 10q11, lokalisiert und durch alternatives Splicing sind vier (bei der Maus 7) verschiedene Isoformen bekannt (Kengaku et al., 1993; Wu et al., 1994; Misawa et al., 1997). Das menschliche Protein wird mit 69kDa und 82kDa translatiert, wohingegen das Mausprotein bei 68kDa liegt (Klapproth et al., 1997). Man kann weiterhin unterschiedliche ChAT-Isoformen im zentralen und peripheren Nervensystem unterscheiden. Eine im Rückenmark und Gehirn lokalisierte cChAT und eine im peripheren Gewebe gelegene pChAT (Tooyama & Kimura, 2000).

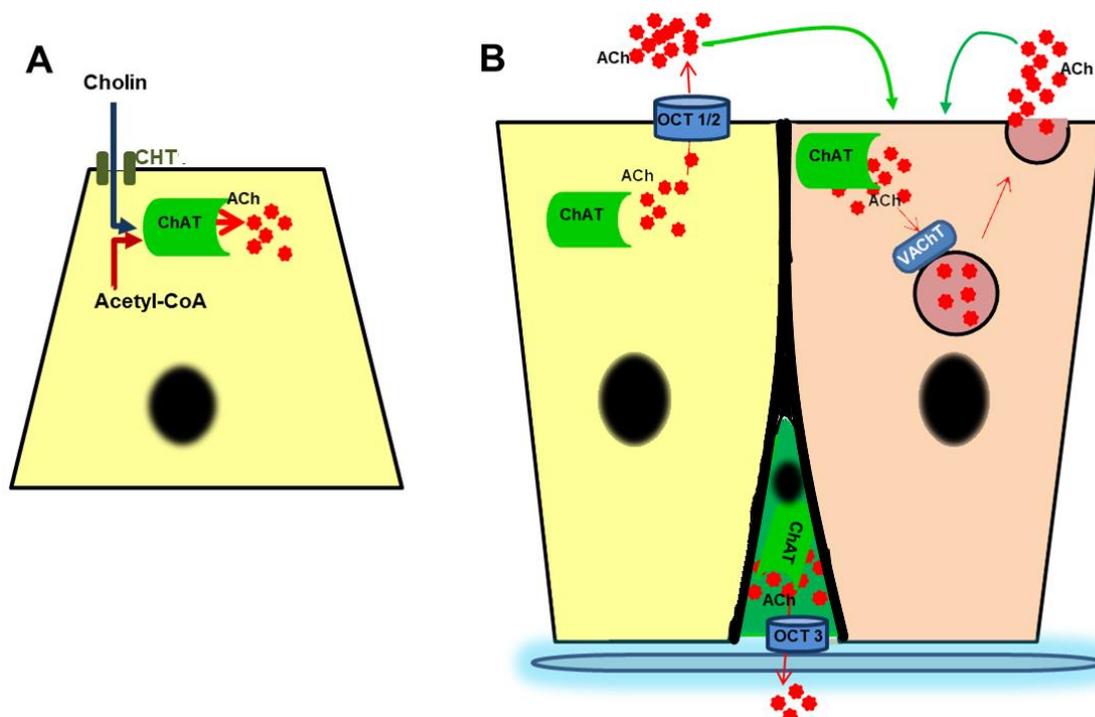


**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Acetylcholinzyklus**

Acetylcholin (ACh) wird durch die ChAT aus Acetyl-CoA und Cholin synthetisiert. Das Cholin wird dabei überwiegend aus dem Extrazellularraum über spezielle Transporter (CHT) zur Zelle zurückgeschleust, während das Acetyl-CoA aus der  $\beta$ -Oxidation der Mitochondrien stammt. Über den vesikulären Acetylcholin-Transporter (VACHT) wird das ACh in Vesikel verpackt und gespeichert bis zu seiner Freisetzung. Nach einer ACh-Freisetzung bindet dieses an nikotinerge (N) bzw. muskarinerge (M) Rezeptoren der Zielzelle. Ein schneller Acetylcholin-Abbau wird durch die Acetylcholinesterase (AChE) und die weniger sensitive Butyrylcholinesterase (BChE) gewährleistet. Cholin gelangt anschließend über Transporter (CHT) zurück in die Nervenendigung.

### 1.2.3 Acetylcholin-Speicherung und Freisetzung

Das synthetisierte Acetylcholin wird in neuronalen Zellen über einen vesikulären Transporter, dem vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT), in Vesikel transportiert und bis zur Freisetzung gespeichert. Die Freisetzung erfolgt über ein Signal, welches in diesem Fall das Aktionspotential ist und zur Exocytose führt (Arvidsson et al., 1997). In non-neuronalen Zellen wird dieser VACHT gelegentlich auch exprimiert (Pfeil et al., 2004; Proskocil, 2004), jedoch ist aufgrund des nicht ubiquitären Vorkommens in diesem System von einer eher direkten zytoplasmatischen Freisetzung auszugehen. Bei Acetylcholin handelt es sich um ein organisches Kation und seine Freisetzung kann daher auch über organische Kationentransporter (OCT) erfolgen (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Schema eines möglichen non-neuronalen Acetylcholin-Zyklus**

A) Aus den Syntheseprodukten Cholin und Acetyl-CoA synthetisiert die Cholinacetyltransferase wie beim neuronalen cholinergen System auch ACh. B) Dieses kann nun über Organischer Kationentransporter (OCT 1,2 oder 3) oder über einen vesikulären Transporter freigesetzt werden und parakrin aber auch autokrin wirken. (Modifizierte Abbildung nach Kummer et al., 2008)

#### 1.2.4 Acetylcholin-Abbau und Recycling

Nachdem Acetylcholin mit den spezifischen Rezeptoren der Zielzelle interagiert hat und seine potentielle Wirkung vermittelt wurde, wird es durch die Acetylcholinesterase (AChE) bzw. durch die Butyrylcholinesterase (BChE) in seine Ausgangsstoffe (Cholin und Acetyl-CoA) zerlegt und inaktiviert (Abbildung 3). Die AChE zeigt eine hohe Spezifität und wird daher auch bei sehr niedrigen Acetylcholin Konzentrationen aktiviert. Die BChE hingegen ist eher unspezifisch und benötigt daher eine entsprechend hohe Konzentration. Beide Esterasen kommen ubiquitär in neuronalen aber auch in nicht neuronalen Zellen vor (Übersicht siehe: Wessler et al., 1998). Um eine lokal Wirkung an der Region seiner Freisetzung zu gewährleisten, kommt es zu einer schnellen Inaktivierung von Acetylcholin. Das freigesetzte Cholin wird wie bereits erwähnt über Transportsysteme in die Zelle zurückgeschleust und steht der erneuten Synthese zur Verfügung (Silverthorn, 2007).

### 1.2.5 Acetylcholinrezeptoren

Bei den Acetylcholin-Rezeptoren unterscheidet man grundsätzlich zwei verschiedene Klassen: den inotropen nikotinergen und den metabotropen muskarinergen Acetylcholinrezeptor. Beide liegen zwar membrangebunden vor, unterscheiden sich aber in ihrem Aufbau, ihrer Funktion und der nachgestellten Signalkaskade erheblich voneinander (Starke, 2001).

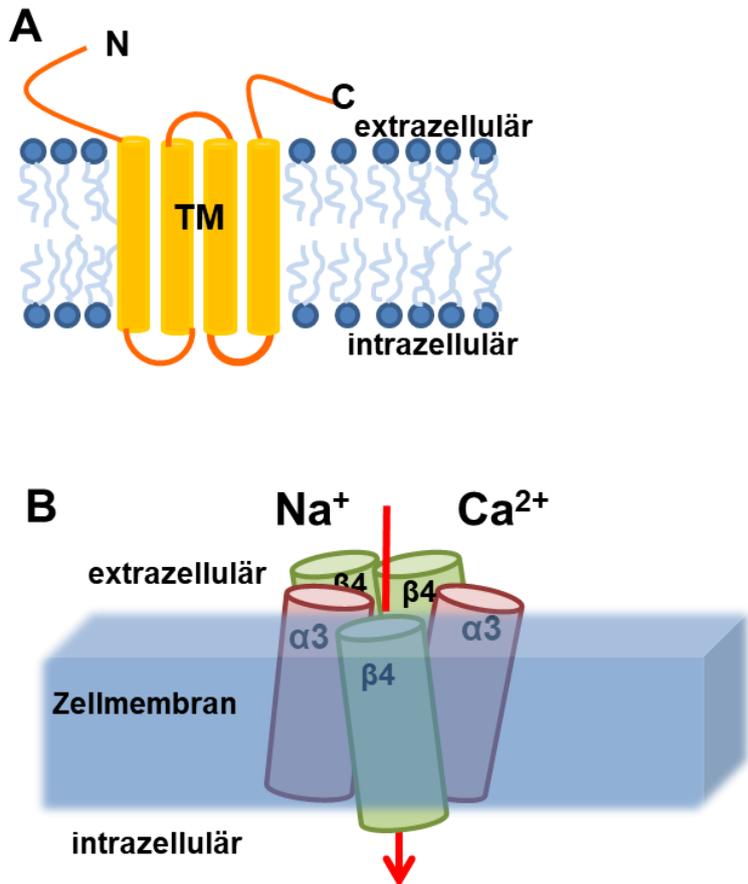
### 1.2.6 Der nikotinerge Acetylcholinrezeptor

Der Nikotinrezeptor ist ein ligandenabhängiger Ionenkanal, der aus fünf Untereinheiten besteht, welche sich um eine zentral gelegene Pore positionieren (Abbildung 5 B). Es sind bisher 10 verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten, vier verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten und je eine  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Untereinheit bekannt (Kalamida et al., 2007). Weiterhin besitzt jede Untereinheit eine extra-, eine intrazelluläre Domäne und vier Transmembrandomänen (TM1-4). Die extrazelluläre Domäne der Untereinheiten stellt die Bindungsstelle für Agonisten und kompetitive Antagonisten dar (Kalamida et al., 2007). Sie liegt am N-terminalen Ende und besteht aus etwa 200 Aminosäuren. Die Transmembrandomänen TM1 und TM2, sowie TM2 und TM3 sind über kurze kleine Schleifen miteinander verbunden, während die letzte Transmembrandomäne TM4 mit der TM3 über die intrazelluläre Domäne verbunden ist. Diese intrazelluläre Schleife hat eine variable Größe und Aminosäuresequenz. Über die TM4 ragt das kurze C-terminale Ende in den extrazellulären Raum und stellt damit das Ende einer Untereinheit dar (Abbildung 5 A) (Albuquerque et al., 2009).

Man unterscheidet weiterhin bei dem nikotinergen Acetylcholinrezeptor einen muskulären und einen neuronalen Typ, wobei der neuronale Typ auch in nicht neuronalen Geweben vorkommt. Diese beiden unterscheiden sich in der Kombination der einzelnen Untereinheiten, wobei der muskuläre sich noch mal differenzieren lässt in fetalem und adultem Gewebe (Schuller, 2009; Raftery et al., 1980; Kalamida et al., 2007; Mishina et al., 1986; Witzemann et al., 1987).

Für die Acetylcholinbindung benötigt es mindestens zwei  $\alpha$ -Untereinheiten. Die  $\beta$ -Untereinheiten dienen der Regulierung der Bindung und Dissoziation sowohl der Agonisten als auch der Antagonisten (Gotti & Clementi, 2004). Abhängig von den Untereinheiten wird so der pharmakologische Charakter und die Funktion des jeweiligen Rezeptors bestimmt (Linzy et al., 2013).

Die nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren lassen sich in homomere, bestehend aus fünf identischen  $\alpha$ -Untereinheiten (z.B. Alpha 7 oder Alpha 9) oder in heteromere, bestehend aus  $\alpha$ ,  $\beta$  oder/und  $\gamma$ -Untereinheiten, einteilen (Hendrickson et al., 2013).



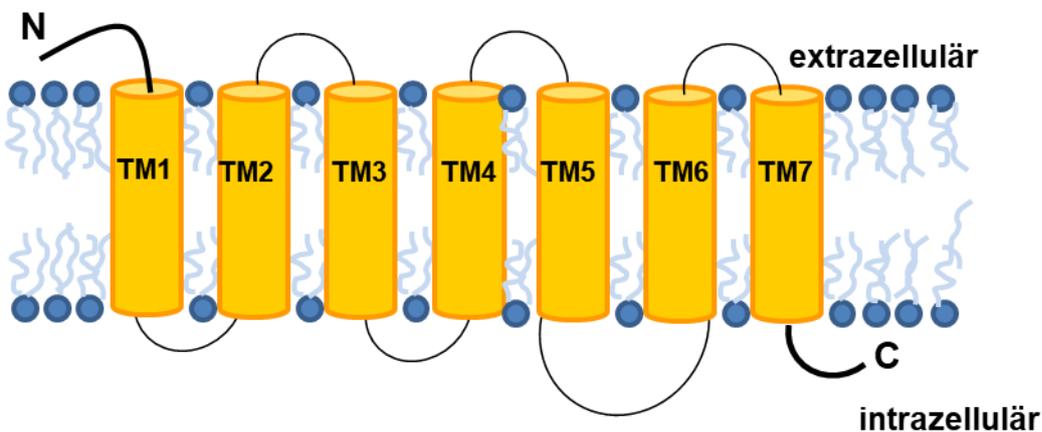
**Abbildung 5: Schematische Darstellung nikotinerger Acetylcholinrezeptoren**

A zeigt die schematische Darstellung des nikotinergeren Acetylcholinrezeptors mit der extra- und intrazellulären, sowie den vier transmembranären Domänen einer einzelnen Untereinheit. In B ist beispielhaft ein heteromerer Rezeptor ( $\alpha 3\beta 4$ ) dargestellt, der aus fünf Untereinheiten besteht.

Abhängig von seinem Aktivitätszustand kann der nikotinerge Acetylcholinrezeptor in drei Konformationen vorliegen: aktivierbar-geschlossen, aktiv-geöffnet und desensitisiert-geschlossen. Durch die Bindung eines Agonisten z.B. ACh wird der Rezeptor von der aktivierbar-geschlossenen in die aktiv-geöffnete Konformation überführt, hierdurch wird er durchlässig für Kationen. Anschließend ändert sich die Konformation erneut diesmal in die desensitisierte-geschlossene Form, quasi die Ruheform, in der ein Agonist keine Konformationsänderung herbeiführen kann. Danach geht es wieder über in die aktivierbar-geschlossene Form, in der es erneut durch Ligandenbindung zur Aktivierung und Konformationsänderung kommen kann (Dani, 2001). Der Einstrom von Kationen führt innerhalb der Zelle zu einer Änderung des Membranpotentials und dadurch zur Aktivierung von Signalkaskaden. Diese beeinflussen wiederum die Zellfunktionen, sei es über die Genexpression, über eine Transmitterfreisetzung oder ähnliches.

### 1.2.7 Der muskarinergere Acetylcholinrezeptor

Der Muskarinrezeptor besteht aus einem zusammenhängenden Glykoprotein, welches sieben Transmembrandomänen aufweist. Diese sind hydrophob und durch drei intra- und drei extrazelluläre hydrophile Schlaufen verbunden. Die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle wird durch das N-terminale Ende gebildet, während das C-terminale Ende intrazellulär lokalisiert ist (Abbildung 6). Fünf Subtypen (M1-M5) sind bisher bekannt und unterscheiden sich in ihrer Lokalisation (Felder, 1995). So kommen im Nebenhoden der Ratte die Subtypen M1 bis M3 vor, M4 und M5 jedoch nicht (Siu et al., 2006). Außerdem zeigen unterschiedliche mRNA-Level der Rezeptor-Subtypen, dass M1 v.a. in den Ductuli efferentes, der M2 in den Ductuli efferentes wie auch im Caput, aber mehr in der Cauda und der M3 v.a. in der Cauda vorliegt (Siu et al., 2006).

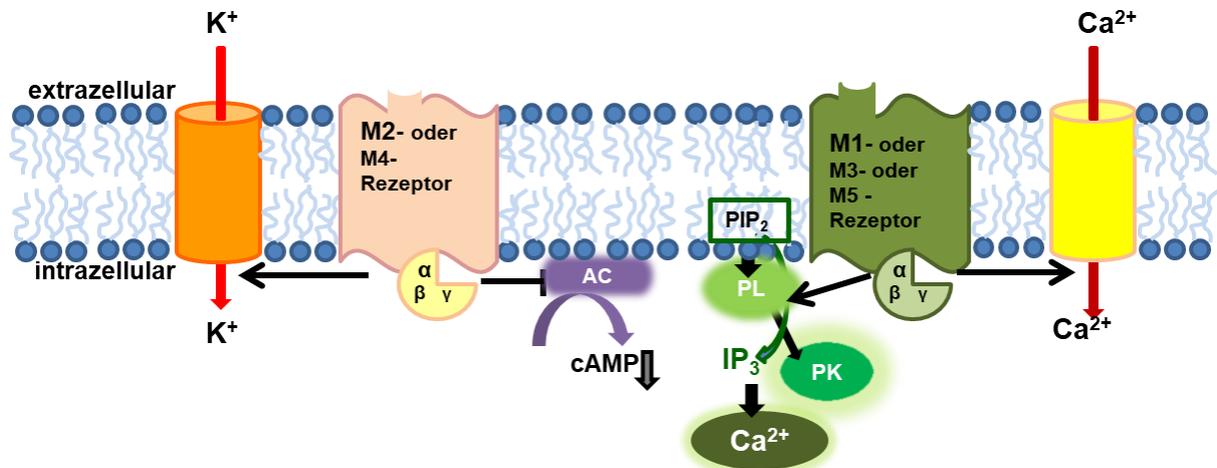


**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Muskarinrezeptors**

Der muskarinergere Acetylcholinrezeptor besteht aus einer N-terminalen extrazellulären Bindungsdomäne mit sieben hydrophoben Transmembrandomänen und einem C-terminalen intrazellulärem Ende. Die sieben Transmembrandomänen sind über kurzen Schleifen miteinander verbunden.

Der metabotrope Muskarinrezeptor ist bekanntermaßen G-Protein gekoppelt. Das bedeutet, bei einer Bindung eines Agonisten, wie z.B. Acetylcholin, kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors und dadurch zur Interaktion mit einem intrazellulär an der Zellmembran gelegenen G-Protein. Dieses ist ein Heterotrimer, welches aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit besteht. Unterschiedliche  $\alpha$ -Untereinheiten bedingen das Vorhandensein von verschiedenen G-Proteinen. Eine Aktivierung von den Subtypen M1, M3 und M5, führen über eine membranständige Phospholipase C (PLC) zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ), einem Bestandteil der Zellmembran, zu Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG). Das entstandene  $\text{IP}_3$  bedingt über Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum die Freisetzung von Calcium ins Zytosol. Das DAG wiederum führt über eine Proteinkinase C zur Phosphorylierung verschiedener Proteine. Die Subtypen M2 und

M4 bewirken zum einen über ihr G-Protein die Hemmung der Adenylatcyclase, wodurch es zu einem intrazellulären Abfall von cAMP kommt, und zum anderen über einen Kaliumkanal den verlängerten Kaliumeinstrom (Abbildung 7) (Eglen, 2006).



**Abbildung 7: Schema der Signalkaskade der muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren**

Die Subtypen M2 und M4 führen über die Hemmung einer Adenyltacyclase (AC) zum Abfall des cAMP und über einen Kaliumkanal zum Kaliumeinstrom. Die Subtypen M1, M3 und M5 hingegen bewirken über die Phospholipase (PL) eine Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und dadurch die Calcium Freisetzung und eine Proteinphosphorylierung über die Proteinkinase (PK).

### 1.3 Bitterstoffe und ihr Signalweg

#### 1.3.1 Bitterstoffe und Geschmack

Ein Bitterstoff ist, wie der Name schon sagt, eine chemische Verbindung, die zu einer gustatorisch bitteren Wahrnehmung führt. Sie deuten in der Regel auf eine gefährliche bzw. für den Organismus schädliche Substanz hin. In anderen Fällen dienen bittere Komponenten dem speziellen Geschmackserlebnis, wie z.B. das Alkaloid Coffein im Kaffee. Andere Bitterstoffe werden künstlich zugesetzt, um das Verspeisen giftiger Substanzen zu verhindern; so wird Denatoniumbenzoat dem Rattengift beigemischt wird, um Hunde am Verzehr des Giftes zu hindern (Holvoet, 2015).

Viele verschiedene Bitterstoffe sind derzeit bekannt, dazu zählt das bereits erwähnte Denatoniumbenzoat. Es ist die bisher bekannt bitterste Substanz und wurde 1958 vom schottischen Chemiker J. R. Smith entdeckt. Aber auch Cycloheximid, ein toxisch wirkendes Antibiotikum, gilt als bekannter Bitterstoff (Hettinger et al., 2007).

Anders als man früher glaubte, finden sich Geschmacksrezeptoren nicht nur im Mundraum und den gustatorischen Organen, sondern sind in einer Vielzahl weiterer Gewebe entdeckt und beschrieben worden. Hier sind nur einzelne Beispiele dafür genannt: Trachea (Krasteva et al., 2011), Lunge (Sanderson and Madison, 2010), Herz (Foster et al., 2014), Urethra (Deckmann et al., 2014) und Testis (Xu, et al., 2013).

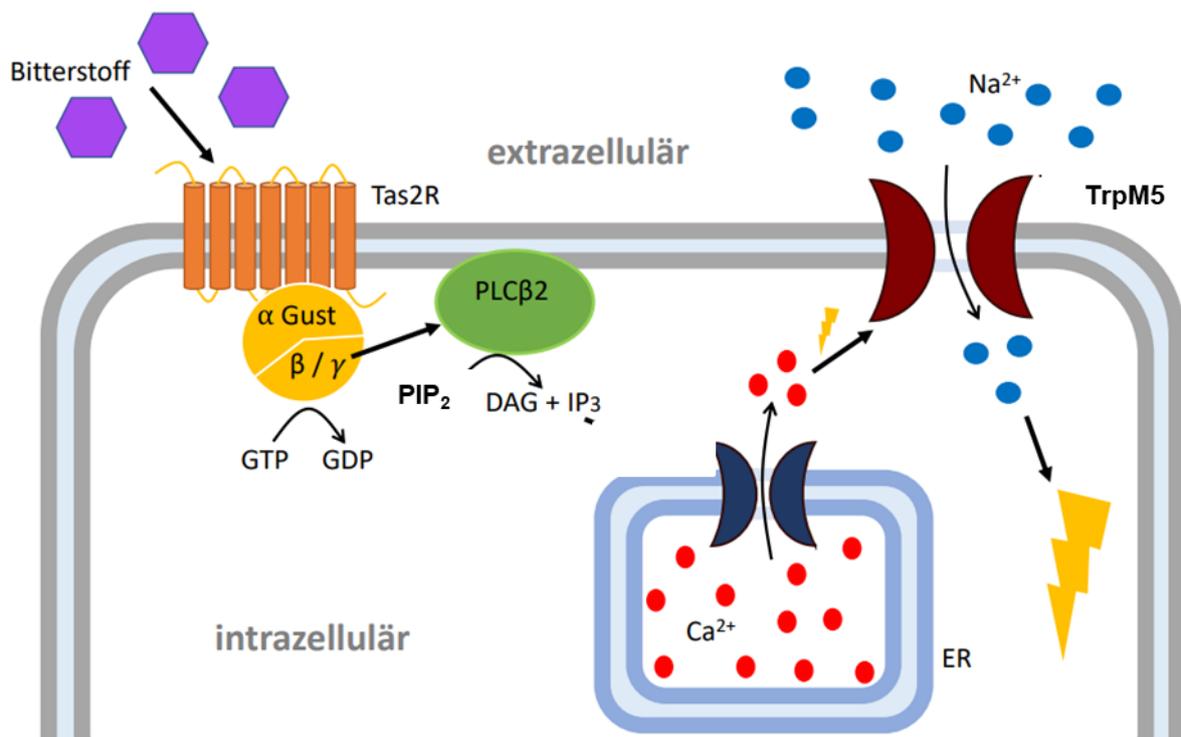
#### 1.3.2 Bitterstoffrezeptoren und Signalwege

Man unterscheidet zwei Familien von Geschmacksrezeptoren, die jeweils an G-Proteinen gekoppelt zur Reaktion der Zelle führen: Tas1- und Tas2-Rezeptoren (Tas1 bzw. 2R) (Bachmanov & Beauchamp, 2007), wobei die Tas2R über Bitterstoffe aktiviert werden. Es gibt Spezies abhängige Unterschiede in der Anzahl der verschiedenen Tas2R, beim Menschen z.B. sind derzeit 36 bekannt (Shi et al., 2003; Behrens & Meyerhof, 2006).

Nach der Bindung eines Liganden am Tas2R kommt es zur Aktivierung eines gekoppelten heterotrimeren G-Proteins, z.B. dem Gustducin, dessen  $\alpha$ -Untereinheit bewirkt dann die Umsetzung von Guanosindiphosphat (GDP) in Guanosintriphosphat (GTP) (Ruiz-Avila et al., 1995). Zusätzlich kommt es zur Abspaltung der  $\alpha$ -Untereinheit von den beiden anderen und zur Aktivierung einer Phosphodiesterase (PDE [4]), ebenfalls durch die  $\alpha$ -Untereinheit induziert, was zu einem Abfall der cAMP-/ cGMP-Spiegel führt. Die anderen beiden Untereinheiten  $\beta$  und  $\gamma$  aktivieren als Dimer die geschmacksspezifische PLC $\beta$ 2 und bewirken über IP $_3$  einen Calciumanstieg im Zytosol (Yan et al., 2001; Margolskee, 2002). Dieser Calciumanstieg wiederum hat einen depolarisierenden Effekt, was zur Aktivierung des nicht selektiven Kationenkanals, dem

transient receptor potential melastatin (TrpM5), führt (Abbildung 8) (Flockerzi & Wissenbach, 2005).

Der TrpM5 Kanal wird durch einen bereits niedrigen Calciumanstieg aktiviert und durch einen sehr hohen Anstieg inaktiviert. Als nicht-selektiv wird der Kanal bezeichnet, da er durchgängig ist für alle positiv geladenen Moleküle (beispielsweise Natrium und Kalium), jedoch nicht für zweifach positiv geladenen Kationen, wie Calcium. Des Weiteren ist der Kanal temperatur-sensibel, was zu einem verstärkten Einstrom von Kationen bei höheren Temperaturen führt (Okumus et al., 2013).



**Abbildung 8: Schema der Bitterstoff-Signaltransduktion**

Über die Bindung eines Liganden an den Tas2-Rezeptor kommt es zur Aktivierung des G-Proteins und darüber zur Calcium-Freisetzung, welche wiederum den TrpM5 Kanal aktiviert. Gleichzeitig bewirkt die  $\beta\gamma$ -Untereinheit die Umwandlung von GTP zu GDP (Abbildung von Clara Morawski).

## **2 Zielsetzung**

Hauptziel der Arbeit ist die Suche nach non-neuronaler cholinergem Zellen im Epithel des Nebenhodens. Diese sollen anschließend genauer charakterisiert werden im Hinblick auf ihre morphologischen Eigenschaften und ihre möglichen Funktionen für das Organ.

Mithilfe eines transgenen Mausmodells sollten auf Proteinebene zunächst die Cholinacetyltransferase (ChAT) exprimierende Zellen in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Anschließend sollte die ChAT-Expression auch auf der mRNA-Ebene verifiziert werden.

Über Zelltypmarker sollte mithilfe der Immunfluoreszenz der Zelltyp genauer definiert und mögliche chemosensorischen Eigenschaften auf Protein- (Immunfluoreszenz) und mRNA-Ebene (RT-PCR) gesichert werden.

Im Hinblick auf einen möglichen Einfluss dieser Zellen auf die Nebenhodengangkontraktion sollte in Kontraktionsstudien mittels Live Imaging das Kontraktionsmuster unter Zugabe von Bitterstoffen zwischen Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit einem inaktiviertem Bestandteil der gustatorischen Kaskade (TrpM5 k.o. Mäuse) verglichen werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Untersuchungsmaterial

Für die Versuche wurde das Gewebe von adulten Mäusen (C57BL/6) und adulten ChAT-eGFP-Mäusen,  $\alpha$ 3-nAChR-eGFP-Mäusen sowie TrpM5-knock out (k.o.)-Mäusen verwendet. Diese Gewebeentnahmen liefen unter folgenden Tierversuchsnummern:

Alpha3-eGFP-Mäuse: A9/2011 & A60/2012

ChAT-eGFP-Mäuse: A11/2011 & 516\_M & 555\_M

Wildtyp Mäuse zu den knock out Mäusen: A38/2011 und A61/2012

Wildtyp C57Bl/6J: 571\_M & 572\_M

TrpM5 Mäuse: 573\_M

Die Versuchstiere sind sogenannte bacterial artificial chromosome (BAC) transgene Mäuse. Die enhanced green fluorescent protein (eGFP)-Expression unterliegt bei den Alpha3-eGFP-Mäusen der Promotorregion der Alpha3-Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors ( $\alpha$ 3-nAChR). Bei den ChAT-eGFP-Mäusen wurde das eGFP mit einer Poly-A-Sequenz an das Initialcodon des dritten ChAT-Exons inseriert. Bei den TrpM5-k.o.-Mäusen handelte es sich um Tiere, bei denen eine Deletion von 174nt im Bereich des Exon 14 des TrpM5-Gens durchgeführt und eine Neo-LacZ-Kassette am Deletionsende eingefügt wurde (Riera C. E. et al 2009). Das nun entstehende Protein, sprich der TrpM5-Kanal, hat einen nachweislichen Funktionsverlust.

Ein Teil der Versuchstiere wurde post mortem mit Zamboni perfundiert und anschließend wurden die Organe (Nebenhoden, Zunge und Trachea) entnommen und in Zamboni für eine Nacht bei 4°C nachfixiert. Bei einem anderen Teil der Tiere wurden die entnommenen Organe lediglich mit 4% PFA oder Zamboni über Nacht bei 4°C immersionsfixiert. Die Gewebe wurden nach der Fixierung mit 0,1M Phosphatpuffer (PP) über Nacht bei 4°C ausgewaschen und je 24h in 10%iger, 20%iger und 40%iger Saccharose-Lösung bei 4°C inkubiert. Weitere Organe wurden mit Bouin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Für die PCR-Untersuchung wurde RNA aus unfixierten Gewebeproben der oben genannten Tiere gewonnen, wobei die

Nebenhoden jeweils das zu untersuchende Material darstellten und die anderen Organe als Kontrolle dienten.

### 3.1.2 Antikörper

**Tabelle 1** Primärantikörper in der Immunfluoreszenz

<b>Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Poly-/ mono-clonal</b>	<b>Aus</b>	<b>Ver- dünnung</b>
ChAT	Abcam (Cambridge, Großbritannien)	polyclonal	Kaninchen	1:200
Claudin 1	Life technologies- Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)	polyclonal	Kaninchen	1:100
COX-1	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)	polyclonal	Kaninchen	1:100
GFP	Novus Biologicals (Cambridge, Großbritannien)	polyclonal	Huhn	1:1000
Keratin 5	Spring Bioscience (Pleasanton, CA, USA)	monoclonal	Kaninchen	1:200
TrpM5	Standard immunization program, Eurogentec, Seraing, Belgium	polyclonal	Kaninchen	1:4000
V-ATPase-b1-Untereinheit	Geschenk von Prof. Sylvie Breton, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.	polyclonal	Kaninchen	1:250
Occludin	Thermo Fischer scientific, ehemals Invitrogen (Waltham, MA USA)	polyclonal	Kaninchen	1:100
ZO1	Thermo Fischer scientific, ehemals Invitrogen (Waltham, MA USA)	polyclonal	Kaninchen	1:500

**Tabelle 2** Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenz

<b>Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung in PBS</b>
Alexa, 488 Ziege-anti-Kaninchen-IgG	Life technologies- Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)	1:500
Cy3, 550 Ziege-anti-Kaninchen-IgG	Jackson Immuno Research (über Dianova, Hamburg, Deutschland)	1:500
Cy3 II, 550 Esel-anti-Kaninchen-IgG	Merck Millipore (Schwalbach, Deutschland)	1:2000
FITC-Esel-anti-Huhn-IgG	Jackson Immuno Research (über Dianova, Hamburg, Deutschland)	1:800
Texas red Esel-anti-Ziege-IgG	Jackson Immuno Research (über Dianova, Hamburg, Deutschland)	1:400

### 3.1.3 Primer für die Polymerase Kettenreaktion

Die Primersequenzen wurden mit dem Webprogramm Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) generiert und bei der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) bestellt. Aus den Primerlösungen wurden Stammlösungen von 200pMol/μl hergestellt. Die Primer sollten nach Möglichkeit Intronspannend, nicht-komplementär und ca. 20 Basen lang sein, bei einem GC-Gehalt von ca. 50%. Mit dem Programm BLAST (Basic-Local-Alignment-Search-Tool) wurde die Spezifität der Primer durch den Vergleich mit vorhandenen Sequenzen der Datenbank geprüft.

Tabelle 3 Mausspezifische Sequenzen der Oligonukleotide

<b>Name</b>	<b>Größe</b>	<b>Basenabfolge</b> <b>Forward (FW) 5'→3'</b> <b>Reverse (RV) 5'→3'</b>	<b>Accession number (NM_)</b>
α-Gustducin	231bp	FW: TCATCCATAAGAATGGTTACAGC RV: CCCACAGTCGTTTAATGATTTTC	001081143
β-Aktin	249bp	FW: CCATCATGAAGTGTGACGTTGA RV: CATCGTACTCCTGCTTGCTGAT	007393.3
ChAT	284bp	FW: GGCTGGTGGAGAGAATAAACC RV: AGGTCGGGTGGACAACATC	009891.2
ChAT	183bp	FW: CCTGCCAGTCAACTCTAGCC RV: ATACAGAGAGGCTGCCCTGA	009891.2
PLCβ2	101bp	FW: TTCCAGATGTTTCCTGCTGA RV: GGAAGTCCTCTGGGTTGAT	177568
Tas2R105	284bp	FW: GACTGGCTTCCTTCTCATCG RV: GCAAACACCCAAGAGAAAA	020501
Tas2R108	158bp	FW: TGGATGCAAACAGTCTCTGG RV: GGTGAGGGCTGAAATCAGAA	020502
TrpM5	235bp	FW: TATGGCTTGTGGCCTATGGT RV: ACCAGCAGGAGAATGACCAG	020277.2

### 3.1.4 Lösungen

I-Chloro-2,2,2Trifluoroethyl-Difluoromethylether (Isofluran)	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
4'6-diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Agarose	PeqLab, Erlangen, Deutschland
AmpliTaq-DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMEM/F-12 (1:1)	Gibco®, Invitrogen, Grand Island, USA
Denatoniumbenzoat	Molecula GmbH, München, Deutschland
DNaseI	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Thermo Scintific, Waltham, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehydlösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
GeneRuler™ 100bp DNA-Marker	Thermo Scintific, Waltham, USA
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hepes	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kalium-Chlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Fluka, Buchs, Schweiz
MinimumEssential Medium (MEM)	Gibco® by life technologies™, Grand, USA

## Material und Methoden

Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natrium-Chlorid ( $\text{NaCl}$ )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Noradrenalin (Norepinephrin)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Normales Pferdeserum	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Normales Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Orange-G	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pikrinsäure	Fluka, Buchs, Schweiz
Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek O.C.T.	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 3.1.5 Kits

RNeasy 96 Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio Rad, München, Deutschland
GeneAmp® RNA PCR Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

### 3.1.6 Programme

Image J 1.50e/ Fiji	<a href="http://imagej.net/">http://imagej.net/</a>
Motic Images Plus 2.0	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland
GraphPad Prism 4.03	GraphPad, La Jolla CA, USA
Axiov. Rel 4.8	Zeiss, München, Deutschland

### 3.1.7 Geräte

Agarose-Gel-Elektrophorese-Kammer	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop, Axioskop 2plus	Zeiss, München, Deutschland
Gel-Dokumentationssystem	Phase, Lübeck, Deutschland
iCycler IQ™ Realtime PCR System	BioRad, München, Deutschland
Kugelmühle	Retsch, Haan, Deutschland
Kryostat, CM1900	Leica, Wetzlar, Deutschland
Leica Mikroskop MS5	Leica, Wetzlar, Deutschland
MasterCycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nanodrop 2000 Spektrophometer	Thermo Scientific, Frankfurt, Deutschland

MoticCam 3.0 MP

Motic Deutschland GmbH, Wetzlar,  
Deutschland

Lichtmikroskop SMZ-171

Motic Deutschland GmbH, Wetzlar,  
Deutschland

### 3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser

Langenbrick, Emmendingen,  
Deutschland

Eppendorf-Gefäße (0,5ml/1,5ml/2ml)

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen (2,5/10/20/100/1000µl)

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

PCR-Gefäße (0,2ml)

Applied Biosystem, Darmstadt,  
Deutschland

Superfrost® Plus-Objektträger

R. Langenbrinck, Emmendingen,  
Deutschland

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Immunfluoreszenz

In PFA oder Zambonie fixierte Gewebe wurden nach dem Durchlaufen der Saccharose-Reihe (10%, 20% und 40%) über Methyl-2Butan in TissueTec eingebettet, in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Aus diesen Geweben wurden mit dem Kryostat (CM1900, Leica, Wetzlar, Deutschland) ca. 10µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger gezogen. Anschließend wurden sie eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Bei tierischen Geweben von eGFP Mäusen wurde die Lichtexposition möglichst gering gehalten, um einen Verlust der Fluoreszenz zu vermeiden.

Von Paraffin eingebettete Gewebe wurden von dem RM Leica 225 in 5µm dicke Schnitte angefertigt und über Xylol und Ethanol (100%, 96% und 70%) entparaffiniert. Nun folgt eine schematische Darstellung des Ablaufs, wobei alle Inkubationen in einer „feuchten Kammer“ durchgeführt wurden:

- Waschen in PBS 3x für 10 Minuten
- Blockieren mit 2% Normalserum und je nach Notwendigkeit Hinzunahme von 0,1% Tween in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur
- Inkubation mit Primärantikörper (3.1.2.1.) in Verdünnungspuffer über Nacht bei 4°C
- Waschen in PBS 2x für 10 Minuten
- Zugabe des in PBS verdünnten Sekundärantikörpers (3.1.2.2.) und Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur
- Erneutes Waschen in PBS für 2x 10 Minuten
- 10 minütiges Nachfixieren mit 4% PFA
- Waschen in PBS für 2x 10 Minuten
- Eindecken der Schnitte mit gepuffertem Glycerol und Lagerung bei 4°C

Für die Bilder wurde das Zeiss-Axioskop 2 plus-Mikroskop verwendet. Zur Kontrolle der Antikörper wurden bei jedem Versuch ebenfalls Schnitte angefertigt, die nicht mit einem Primärantikörper versetzt wurden, sondern lediglich mit dem verwendeten Verdünnungspuffer inkubiert wurden.

### 3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

#### ***Isolierung der RNA aus Geweben***

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Geweben wurde das oben genannte RNeasy Kit von Qiagen (3.1.5) verwendet. Das mit Lysis-Puffer und  $\beta$ -Mercaptoethanol anbehandelte Gewebe wurde zur Homogenisierung in einer Kugelmühle (Retsch, Haan) für 5 Minuten bei 30.000Hz weiterbehandelt. Um die Zellüberreste zu entfernen, wurde das Lysat für 3 Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein neues 1.5ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Es folgte das Ausfällen der RNA mithilfe von 70% Ethanol und der weiteren Isolierung der RNA nach den Angaben des Herstellers. Die Synthese der cDNA erfolgt erst in einem weiteren Schritt (siehe 3.2.2.3). Zur Lösung der RNA aus der Säule wurde RNase freies Wasser dazugegeben und das Ganze ein weiteres Mal zentrifugiert. Die Stabilität der RNA wurde gewährleistet durch eine Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder der unverzüglichen Weiterverarbeitung zur cDNA.

#### ***Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren***

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte mit dem Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Zur Bestimmung reichte bereits eine kleine Menge von  $1\mu\text{l}$  Lösung aus, während das RNase-freie Wasser als Leerwert diente.

#### ***cDNA-Synthese-Schritt (Reverse Transkriptase)***

Die Synthese der cDNA geschah aus der isolierten RNA der ganzen Gewebe mithilfe des iScript™ cDNA Synthese-Kit von BioRad. Dem Protokoll folgend wurde  $1\mu\text{g}$  der RNA in cDNA umgeschrieben. Dies begann im Thermocycler, in dem die genomische DNA mit DNase I (Thermo Scientific) bei  $25^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten verdaut wurde. Der Ablauf wurde durch die Zugabe von 25mM EDTA bei  $65^{\circ}\text{C}$  innerhalb von 10 Minuten unterbrochen und bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 2 Minuten inkubiert. Nun folgte die Zugabe der modifizierten Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV) reversen Transkriptase und dem 5x iScript-Mix zum Reaktionsmix. Die Hexamer-Primer waren bereits im 5x iScript-Mix enthalten und mussten nicht separat zugeführt werden. Unter Beachtung der Herstellerangaben zur optimalen Synthese der DNA wurden die Zeiten und Temperaturen (5 Minuten bei  $25^{\circ}\text{C}$ , 30 Minuten bei  $42^{\circ}\text{C}$  und weitere 5 Minuten bei  $85^{\circ}\text{C}$ ) eingehalten. Anstelle der reversen Transkriptase wurde steriles Wasser für die Negativkontrolle eingesetzt. Die entstandene cDNA konnte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert oder als Template für die Polymerase-Kettenreaktion (siehe 3.2.2.4) verwendet werden.

**Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Mithilfe der PCR wird eine DNA-Sequenz vervielfältigt, die durch zwei spezifische, an einem Strang komplementär bindende Primer festgelegt wird. Die aus ganzen Geweben gewonnene cDNA dient hierbei als Template.

Es wurde die AmpliTaq® Gold-DNA-Polymerase von Applied Biosystem (USA) benutzt. 0,2µl Template cDNA wurde in PCR-Gefäßen mit dem Reaktionsmix versetzt, welches nach folgendem Schema pipettiert wurde:

Tabelle 4 Pipettierschema zur cDNA-Synthese der isolierten RNA aus Geweben

Reaktionsmix	Volumen in µl
10x PCR Puffer	2,5
2mM MgCl <sub>2</sub>	2
10mM dNTPs	0,5
0,4pMol/µl Forward Primer	0,5
0,4pMol/µl Reverse Primer	0,5
AT Gold Polymerase	0,1
Steriles Wasser	17,9
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25</b>

Anschließend wurde unter folgenden Bedingungen die Amplifikation vorgenommen:

95°C	12 Minuten	
95°C	30 Sekunden	} 35 Zyklen
60°C	20 Sekunden	
73°C	30 Sekunden	
73°C	12 Minuten	
4°C	∞	

**Auftrennung der DNA-Fragmente mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente können mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt werden (Sambrook et al., 1989), dabei verursacht die negative Ladung der DNA-Fragmente die Wanderung eben dieser durch das angelegte elektrische Feld. Aus Agarose und 1xTri-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer wird ein 2%iges Gel hergestellt und mit 0,5mg/ml Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid dient der Darstellung der

Banden, in dem es durch seine Struktur mit den Doppelsträngen der DNA interkaliert. Mithilfe von UV-Licht (245nm) können die Banden dann sichtbar gemacht werden. Der 100bp-Marker (GeneRuler™ 100bp DNA-ladder, ThermoScientific, USA) dient dabei als Längenstandard. Die Elektrophorese lief bei einer Spannung von ca. 150V und 250mA für ca. 30min. Das PCR-Produkt wurde mit einem Gel-Dokumentationssystem (Phase, Lübeck) ausgewertet.

### **3.2.3 Life Imaging Kontraktionsversuche**

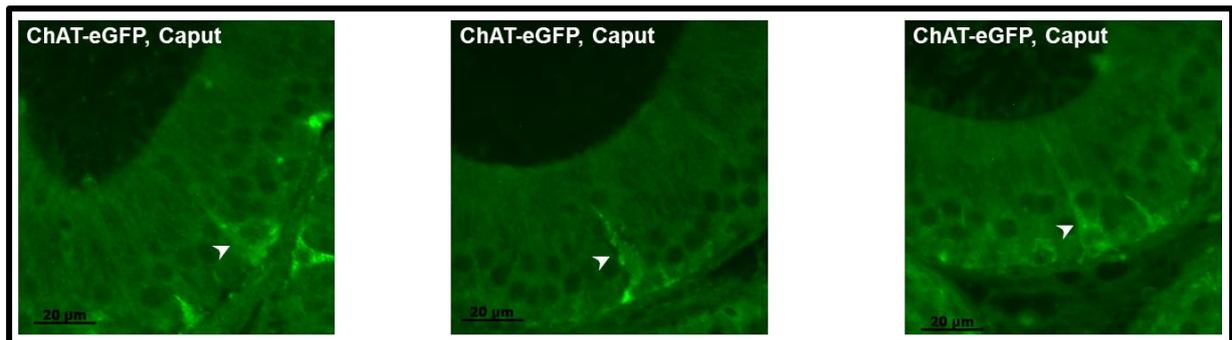
Zunächst wurden Tubuli aus Caput und Cauda des Nebenhodens von nicht perfundierten Tieren präpariert. Aus Rattenschwänzen, Essigsäure, DMEM, Hepes und NaOH auf Eis hergestelltes Kollagen dient einer stabilen Immobilisierung. Von dem Kollagen wurden 300µl auf Delta-T-Dishes gegeben und in dieses der präparierte Nebenhodengangabschnitt positioniert. Dieses in Kollagen eingebettete Gewebe wurde anschließend für 20min im Wärmeschrank bei 37°C (5% CO<sub>2</sub>) inkubiert und mit 1ml temperiertem Medium versetzt. Vor Beginn des Versuchs wurde dieses Medium gewechselt, danach erfolgte die Fixierung auf der Wärmeplatte. Das Motic-Mikroskop wurde auf einen bestimmten Abschnitt fokussiert und das Motic-Programm so eingestellt, dass es jede Sekunde eine Aufnahme des fokussierten Gangabschnittes speicherte. Zu Beginn wurde Medium zugegeben und über einen Zeitraum von 8 min untersucht, dieses wurde als Spontankontraktion festgesetzt. Es folgte eine Zugabe von 10µM, dann 100µM Denatoniumbenzoat für denselben Zeitraum und zu denselben Bedingungen. Anschließend wurde 1000µM Denatoniumbenzoat für etwa 3min, gefolgt von 10µM Noradrenalin für ebenfalls 3min zugegeben, um sicherzugehen, dass das Gewebe noch zur Kontraktion fähig und damit vital ist. Alle diese Aufnahmen wurden in dem Programm Image J zu einem Film zusammengesetzt. In einem bestimmten Bereich des Tubulis wurde ein Reslice gelegt, welches durch den kompletten Film diesen Bereich als Querschnitt darstellt. Zuckungen des Organs äußerten sich in sichtbaren Zacken, welche über einen bestimmten Zeitraum ausgezählt wurden. Diese Anzahl der Zuckungen wurde in Kontraktionen pro Sekunde umgerechnet. Verglichen wurden hierbei die Nebenhoden von Wildtyp-Mäusen mit TrpM5-k.o.-Mäusen. Daneben gab es einen Vergleich zwischen Wildtyp- und ChAT-eGFP-Mäusen im Bereich des Caput.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Nachweis von ChAT-positiven Zellen im Nebenhoden der Maus

Um das Vorhandensein von ChAT positiven (+) Zellen im Nebenhoden zu analysieren, wurde eine ChAT-eGFP-Mauslinie untersucht. Diese Maus exprimiert immer zusätzlich zu der ChAT ein grünleuchtendes Protein (eGFP), wodurch ChAT-eGFP exprimierende Zellen in der Immunfluoreszenz grün leuchten. Im Nebenhoden wurde dieses grüne Signal durch Antikörper gegen das eGFP verstärkt.

In dieser Immunfluoreszenz-Analyse wurden ChAT exprimierende Zellen im Nebenhodenepithel detektiert (Abbildung 9). Bei der Untersuchung des gesamten Nebenhodengangepithels wurden diese Zellen v.a. in den basalen Abschnitten der Epithelschicht lokalisiert. Manche dieser Zellen zeigen zytoplasmatische Ausläufer in Richtung Lumen. In Richtung Basalmembran haben diese Zellen einen breiten Zellkörper, der sich nach apikal verjüngt (Abbildung 9).



**Abbildung 9: ChAT exprimierende Zellen im Nebenhodenepithel**

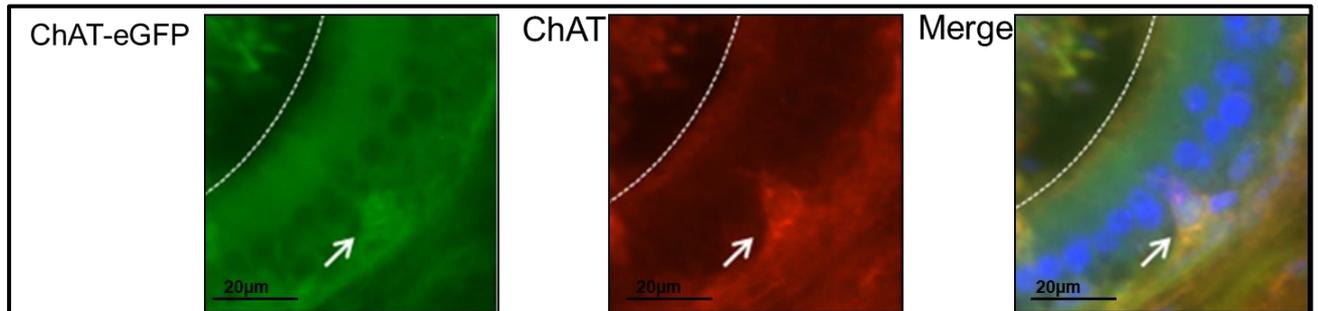
In der Immunfluoreszenz-Färbung wurde das eGFP-Signal der ChAT-eGFP-Maus mithilfe von Antikörpern verstärkt. Die Pfeilköpfe markieren ChAT positive Zellen im Caput-Abschnitt des Nebenhodenganges einer ChAT-eGFP Maus.

Die in Abbildung 9 gezeigten ChAT-eGFP-Zellen stammen aus dem Caput-Bereich, in dem sich deutlich mehr dieser Zellen befinden als im Corpus- oder Cauda-Abschnitt

Auch ist die Anzahl ChAT produzierender Zellen abhängig vom Alter des Tieres. Daneben konnten auch individuelle Unterschiede innerhalb der gleichaltrigen Tiere beobachtet werden. Diese Aspekte wurden in dieser Doktorarbeit nicht weiter analysiert und ausgewertet. Lediglich die Nebenhoden der adulten Mäuse wurden analysiert und die ChAT positiven Zellen dieser Tiere untersucht.

Zur Verifizierung der ChAT-Expression wurden bei der ChAT-eGFP-Maus auch Antikörper gegen die ChAT selbst verwendet und mittels Immunfluoreszenz-Untersuchung an Gefrierschnitten nachgewiesen.

In dieser Doppelfärbung zeigte sich die eGFP-Expression einhergehend mit der ChAT-Expression (Abbildung 10) dargestellt.



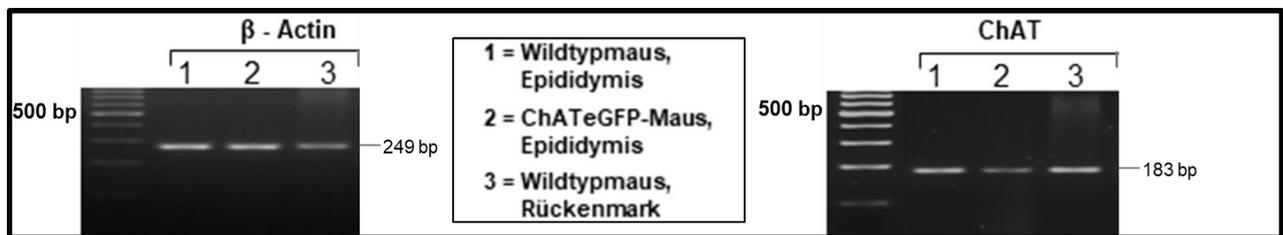
### **Abbildung 10: Nachweis von ChAT auf Proteinebene.**

Mithilfe der Immunfluoreszenz wurde die ChAT selbst auf Protein-Ebene im Nebenhodenepithel des Caput detektiert. Hierzu wurden Antikörper gegen eGFP (grün) und ChAT (rot) am Nebenhoden der ChAT eGFP-Maus verwendet. Es zeigte sich eine Kolokalisation des eGFP- und ChAT-Proteins (Pfeil). Die gestrichelte Linie dient der Visualisierung des Übergangs von Epithel zu Lumen.

#### 4.2 Nachweis von ChAT auf der mRNA Ebene

Neben dem Nachweis von ChAT auf Proteinebene erfolgte eine Analyse auf dem mRNA-Level. Hierfür wurde eine RT-PCR-Untersuchung am Nebenhoden durchgeführt. Dabei wurde eine Gesamtpräparation des Organs genutzt. Als Positiv-Kontrolle der verwendeten Primer wurde ein Organ benutzt, welches einen hohen ChAT-Gehalt aufweist: das Rückenmark. Alle Organe stammten von der Maus ab und wurden zusammen mit einem Housekeeping-Gen analysiert. Als Housekeeping-Gen diente in diesem Fall das  $\beta$ -Aktin (249bp).

Die Abbildung 11 der durchgeführten RT-PCR-Analyse zeigte das Vorhandensein von ChAT (183bp) im Nebenhoden auch auf mRNA-Ebene. Die ChAT-Expression konnte im Nebenhoden wie auch im Kontrollorgan nachgewiesen werden.



**Abbildung 11: Nachweis von ChAT auf mRNA-Ebene.**

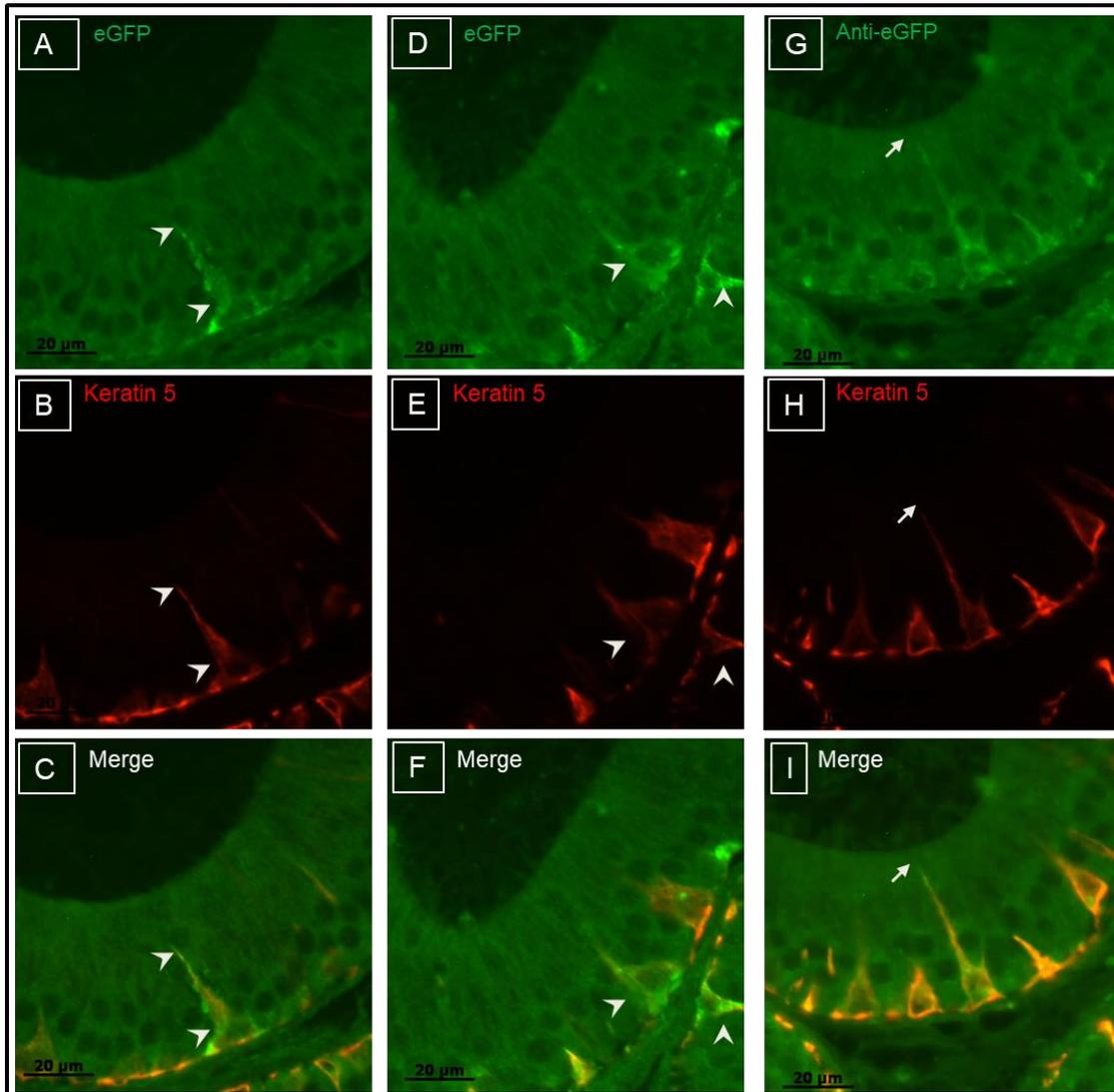
Es wurde eine RT-PCR mit einem Primer-Paar gegen die ChAT durchgeführt. Der Nebenhoden als Gesamtpräparation war das zu untersuchende Organ, während das Rückenmark, ein Organ mit hoher ChAT-Expression, als Kontroll-Organ diente. In beiden Organen konnte die ChAT-Expression nachgewiesen werden. Das  $\beta$ -Aktin (249bp) diente in diesem Fall als house-keeping-Gen und wurde ebenfalls in den untersuchten Mausorganen gefunden.

### **4.3 Zelltypisierung der ChAT positiven Zellen**

Nach der erfolgreichen Detektion von ChAT exprimierenden Zellen im Nebenhoden erfolgte die genauere Analyse dieser Zellen. Zur Charakterisierung der Zelle wurde zunächst die zelltypische Zellmorphologie genutzt.

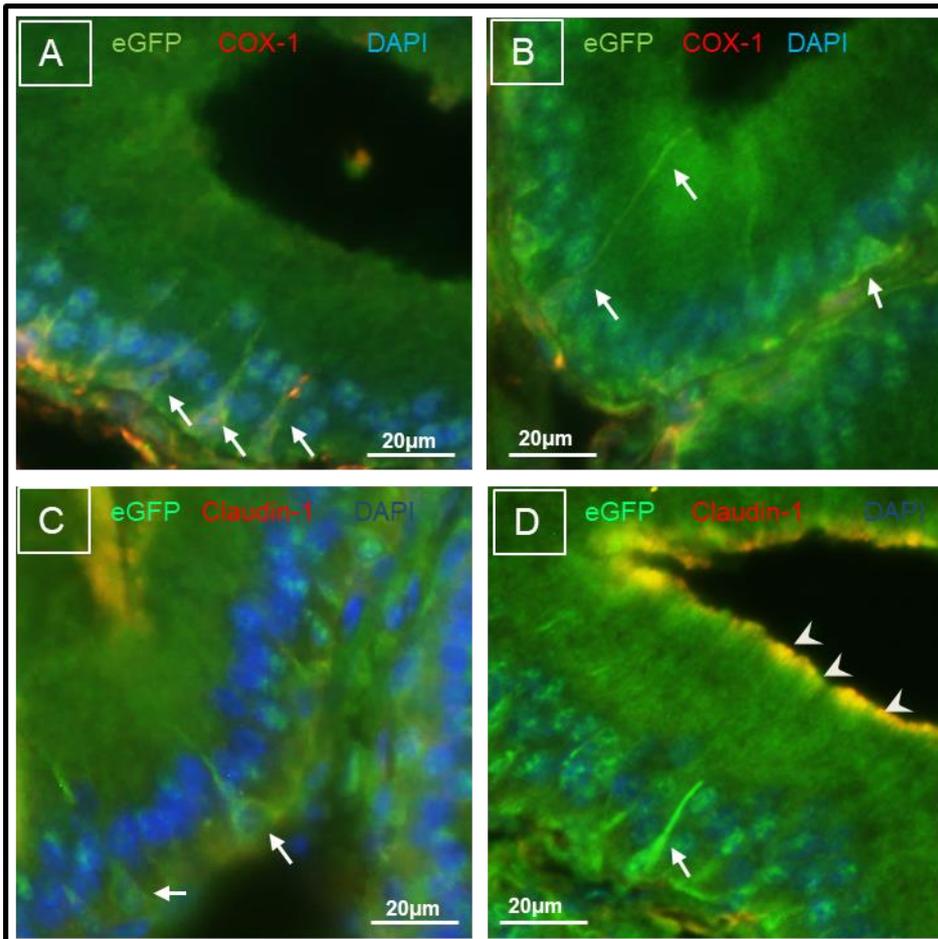
Die ChAT positiven Zellen liegen mit einer breiten Basis der Basalmembran auf (Abbildung 12 A, D, G). Lokalisation und Aussehen ließen an Basalzellen denken. Deshalb wurde zunächst die Vermutung untersucht, ob es sich tatsächlich um Basalzellen handelt.

Dazu wurden Immunfluoreszenz-Färbungen mit Antikörpern gegen klassische Basalzellenmarker angefertigt. Hierzu zählen Keratin 5 (Abbildung 12 A-I), Claudin-1 (Abbildung 13 C, D) und COX-1 (Abbildung 13 A, B).



**Abbildung 12: ChAT<sup>+</sup> Zellen exprimieren Keratin 5, einen Basalzellmarker** **A, D und G:** Durch die Verstärkung des eGFP-Signals mit Antikörpern gegen eGFP wurden ChAT exprimierende Zellen im Nebenhodenepithel der ChAT-eGFP-Maus im Bereich des Caput dargestellt (grün) und durch Pfeilköpfe markiert. **B, E und H:** Durch den Basalzellmarker Keratin 5 wurden in der Immunfluoreszenz-Färbung die Basalzellen in demselben Schnitt detektiert (rot) und auch hier mit Pfeilköpfen markiert. **C, F und I:** Durch die Merge-Bilder konnte gezeigt werden, dass ein Teil der Basalzellen (rot) auch ChAT (grün) exprimieren (Pfeilköpfe) und es sich somit um eine Untergruppe handelt.

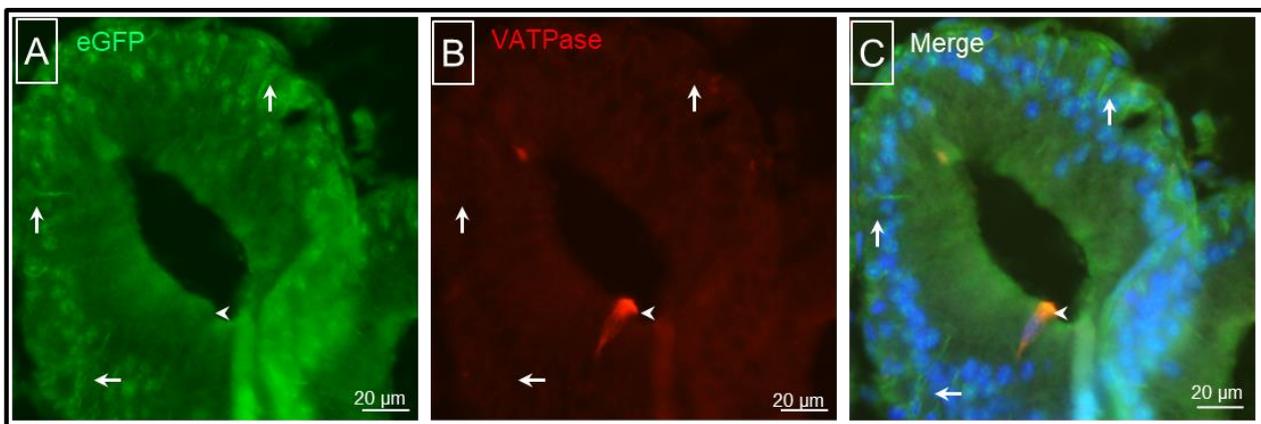
Alle drei Antikörper zeigten eine Immunreaktivität mit den ChAT positiven Zellen, wobei hier nicht alle Basalzellen, die positiv für die Basalzellmarker waren, auch ChAT exprimiert haben. Somit entsprechen die Chat-GFP markierten Zellen einer Subpopulation der Basalzellen (Abbildung 12 C, F und I). Die Basalzellen, die einen Zellfortsatz bis zum Lumen aufweisen, zählen jedoch nahezu immer zu den ChAT positiven Zellen (Abbildung 12 B).



**Abbildung 13: Weitere Basalzellmarker lassen sich in ChAT exprimierenden Zellen nachweisen: A-B:** Durch die Verwendung von Antikörpern gegen eGFP (grün) und COX-1 (rot) wurde die Expression von ChAT in einigen Basalzellen des Nebenhodenepithels der ChAT-eGFP-Maus sichtbar (Pfeile). **C-D:** In der Doppelfärbung mit Antikörpern gegen Claudin-1 (rot) und eGFP (grün) zeigte sich im Epithel des Epididymidis der ChAT-eGFP-Maus ebenfalls, dass einige der Basalzellen ChAT<sup>+</sup> sind (Pfeile). Umgekehrt handelt es sich bei ChAT<sup>+</sup> Zellen immer um Basalzellen. Claudin-1 markiert neben den Basalzellen auch die apikal gelegenen Tight-Junction-Komplexe (orange, Pfeilkopf).

#### 4.4 Die Nachbarschaft zu V-ATPase-haltigen „Clear-Zellen“

Für Basalzellen mit Ausläufern wurde in der Vergangenheit eine enge Nachbarschaft mit „Clear-Zellen“ beschrieben. Zum Überprüfen, ob die im Nebenhodenepithel befindlichen non-neuronalen cholinergen Zellen ebenfalls einen räumlichen Bezug zu V-ATPase exprimierenden „Clear-Zellen“ besitzen, wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit Antikörpern gegen eGFP und V-ATPase am Nebenhoden der ChAT-eGFP-Maus durchgeführt. Diese Doppelfärbung konnte eindeutig zeigen, dass ChAT-eGFP nicht Co-Lokalisiert sind, d.h. dass ChAT nicht auch in „Clear-Zellen“ vorkommt (Abbildung 14 A-C). V-ATPase<sup>+</sup> „Clear-Zellen“ fanden sich regelmäßig in einiger Entfernung von den ChAT<sup>+</sup>-Zellen. In keinem Fall ließ sich eine direkte Nachbarschaft nachweisen (Abbildung 14 A-C).



**Abbildung 14: ChAT<sup>+</sup>-Zellen und V-ATPase<sup>+</sup> „Clear-Zellen“.** Im Caput des Nebenhodens sind ChAT-eGFP<sup>+</sup>-Zellen (A, grün) und V-ATPase<sup>+</sup> „Clear-Zellen“ (B, rot) nicht Co-Lokalisiert (C, merge). Eine unmittelbare Nachbarschaft beider Zelltypen existiert nicht.

#### 4.5 Komponenten der Geschmackskaskade im Nebenhoden

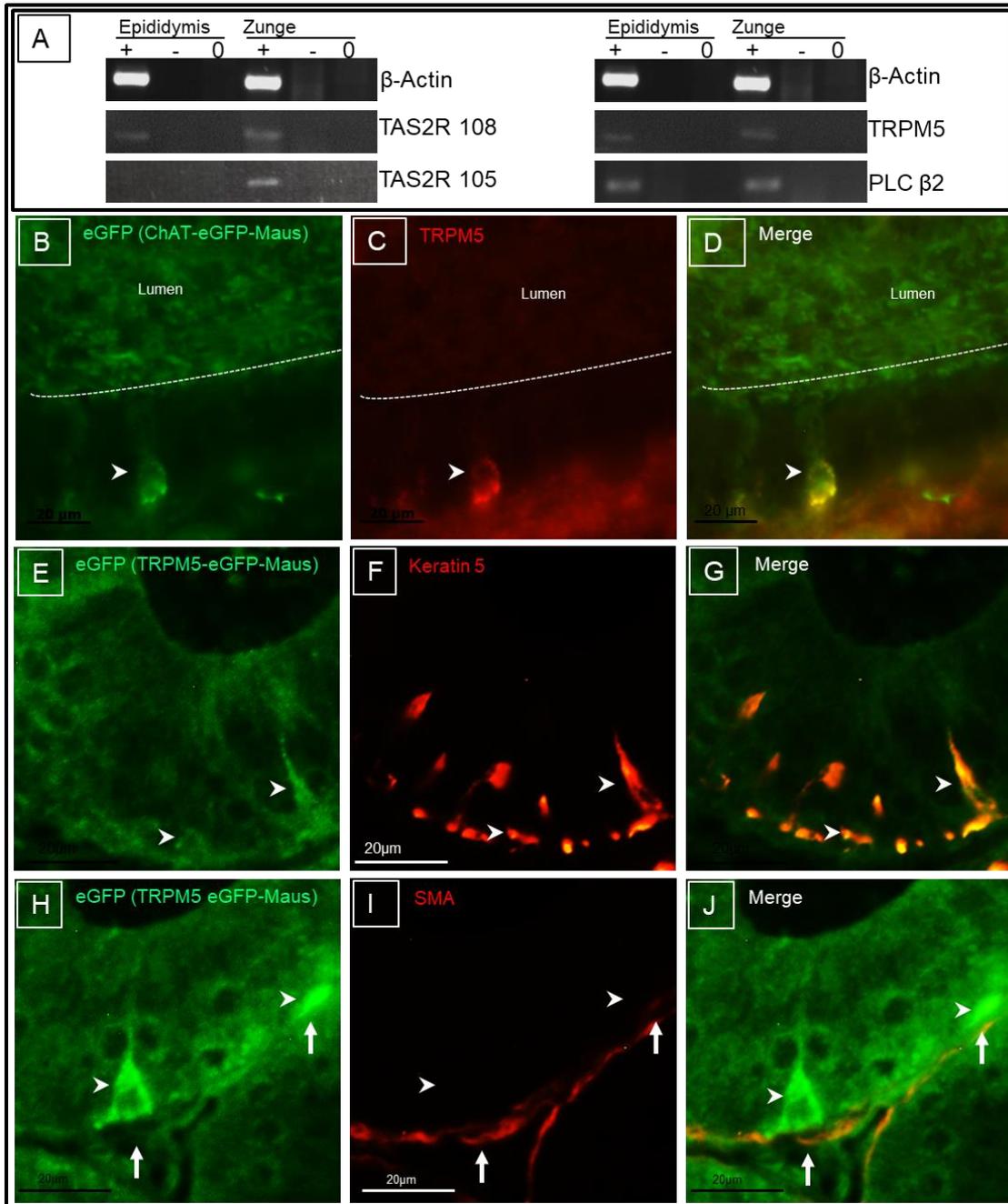
Non-neuronale cholinerge Zellen wurden häufiger als chemosensorisch beschrieben. Sie scheinen vermehrt Komponenten einer Geschmackskaskade zu exprimieren, die lange Zeit ausschließlich im Bereich der Zunge bekannt waren. Um den chemosensorischen Charakter der ChAT exprimierenden Zellen nachzuweisen, wurden Nebenhoden mittels der RT-PCR-Analyse mithilfe von Primern gegen diverse mRNA-Produkte dieser Kaskade untersucht.

Diese RT-PCR-Analysen zeigten auf dem mRNA-Level, dass der Bitterstoffrezeptor Tas2R 108 im Nebenhoden nachweislich vorhanden ist, jedoch nicht Tas2R 105. Auch konnten die Phospholipase- $\beta$ -2 sowie der TrpM5-Kanal durch diese Methode auf mRNA-Ebene detektiert werden (Abbildung 15 A).

Mittels Immunfluoreszenz-Analysen wurde der TrpM5-Kanal zusätzlich noch genauer lokalisiert. Es zeigte sich eine Co-Expression mit ChAT in der Basalzell-Subpopulation, sichtbar in Abbildung 15 B-D.

Mithilfe der TrpM5-eGFP-Maus konnte im Nebenhodenepithel die TrpM5-Expression noch spezifischer gesichert werden. Hier wurde erneut ein grünleuchtendes Protein an ein anderes Protein gekoppelt, in diesem Fall an das TrpM5.

In der Immunfluoreszenz ergaben Doppelfärbungen mit Antikörper gegen Keratin 5 und eGFP sowie Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen Smooth-muscle-actin (SMA) und eGFP eine Immunoreaktivität für das TrpM5-eGFP-Signal in Co-Lokalisation mit Keratin 5, dem Basalzellmarker (Abbildung 15 E-G). TrpM5-eGFP findet sich nicht in den SMA<sup>+</sup> glatten Muskelzellen (Abbildung 15 H-J).

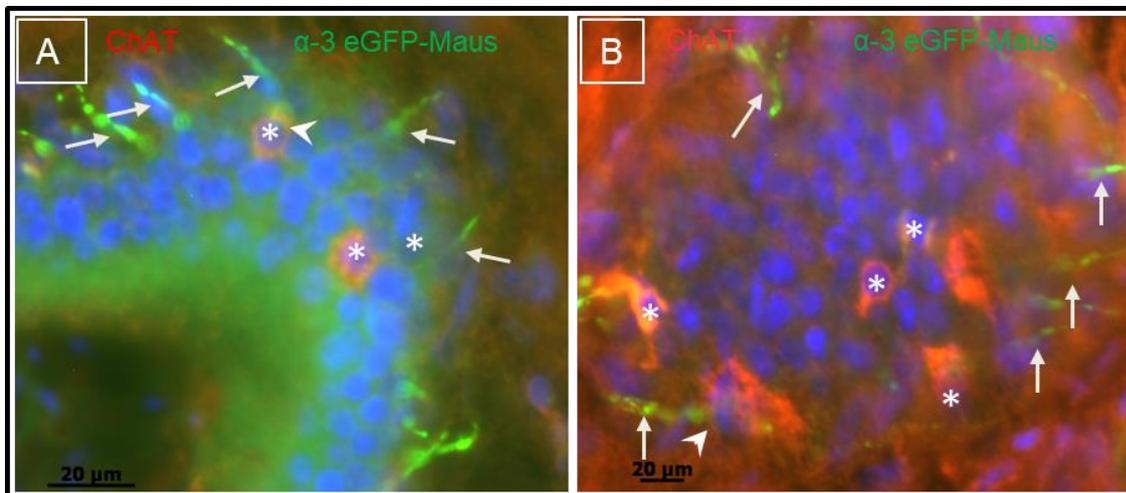


**Abbildung 15: Komponenten der Geschmackskaskade im Nebenhoden A:** In der RT-PCR konnten im Nebenhoden (Gesamtpräparation) verschiedene Komponenten einer Signalkaskade nachgewiesen werden, welche lange Zeit lediglich in der Zunge bekannt waren. Primer gegen Tas2R 105 (284bp) und 108 (158bp), PLC β2 (101 bp) und TrpM5 (253 bp) wurden hierfür verwendet und waren bis auf den Tas2R 105 im Nebenhoden ebenso präsent wie im Kontrollorgan-Zunge (Gesamtpräparation). **B-D:** Immunfluoreszenzfärbungen des Nebenhodens einer ChAT-eGFP-Maus mit Antikörper gegen eGFP (B, grün) und TrpM5 (C, rot) zeigen eine Co-Lokalisation der Proteine in derselben Zelle (D, merge. Pfeilköpfe). **E-G:** Weitere Untersuchungen von Nebenhoden einer TrpM5-eGFP-Maus mit Antikörper gegen Keratin 5 (F, rot) und eGFP (E, grün) bestätigten die Expression von TrpM5 im Epithel des Nebenhodens und dort in den Basalzellen (G, merge. Pfeilköpfe). **H-J:** Die Gegenkontrolle mit Antikörper gegen eGFP (H, grün) und SMA (I, rot) zeigten keine Immunreaktivität von SMA<sup>+</sup>-glatte Muskelzellen für TrpM5 (J, merge. Pfeile), während die Epithelzellen deutlich positiv sind (J, merge. Pfeilköpfe).

#### 4.6 ChAT positive Zellen und $\alpha 3$ -nAChR-haltige Nervenfasern

Der Nebenhoden wird auch von zahlreichen Nervenfasern erreicht und scheint gut innerviert zu sein. Studien am Nebenhoden der  $\alpha 3$ -nAChR-eGF-Maus zeigten eine grüne Immunfluoreszenz im Bereich von Nervenfasern, welche die  $\alpha 3$ -Untereinheit des nikotinergen Acetylcholinrezeptors exprimieren.

Solche Fasern wurden im gesamten Nebenhoden detektiert und zeigten eine räumliche Nähe zu ChAT-positiven-Zellen (Abbildung 16 A-B). Dies lässt die Annahme zu, dass das produzierte Acetylcholin auch einen nervalen Effekt provozieren kann. Manche dieser Faserendigungen scheinen eine nahezu direkte Verbindung bzw. Berührungsstelle mit den non-neuronalen cholinergen Zellen des Nebenhodens zu besitzen (Abbildung 16 A).



**Abbildung 16: Nikotinische Nervenfasern besitzen eine enge räumliche Nähe zu ChAT+-Zellen.**

Immunfluoreszenzfärbungen des Nebenhodens einer  $\alpha 3$ -eGFP-Maus (grün) mit Antikörper gegen ChAT (A und B, rot) zeigten ChAT-positive-Zellen im Epithel des Nebenhodens (Sternchen) in unmittelbarer räumlicher Nähe (Pfeilkopf) mit den nikotinischen Nervenfasern (A und B, grün, Pfeile). Es handelt sich bei A und B um Tangentialschnitte des Nebenhodenganges im Caput.

#### **4.7 Kontraktionsstudien mit Bitterstoffen am Nebenhodengang**

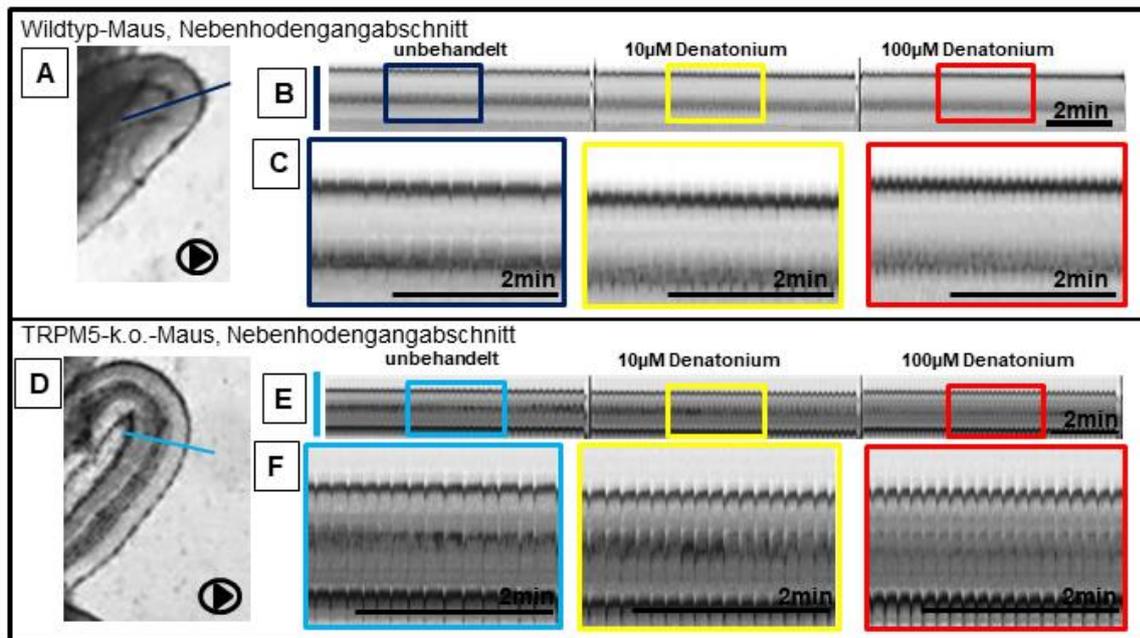
Zur Analyse der möglichen Funktion der Geschmackskaskade im Nebenhoden wurden Kontraktionsstudien mit Bitterstoffen wie Denatoniumbenzoat und Cycloheximid durchgeführt. Die verwendeten Nebenhodengangabschnitte wurden, wie im Material und Methoden-Teil beschrieben, präpariert und mithilfe des Time Lapse Imaging untersucht.

Zunächst wurde mittels einer Konzentrationsreihe die Dosis von Denatoniumbenzoat ermittelt, bei der es zu einer ersten messbaren Zunahme der Spontankontraktion des Nebenhodenganges kommt. Es wurden Versuche mit 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M und 1000 $\mu$ M durchgeführt.

Mit diesen Arbeitskonzentrationen wurden anschließend die Studien an spontan kontraktilem Nebenhodengangabschnitten im Bereich von Caput und Cauda durchgeführt. Die Verwendung der 1 $\mu$ M Denatoniumbenzoat-Lösung zeigte keine bzw. höchstens eine minimale Veränderung in der Kontraktionsfrequenz. Daher wurde diese Konzentration nicht weiter verwendet. Die 10 $\mu$ M Lösung führte zur ersten sichtbaren Zunahme der Spontankontraktionen, welche durch die 100 $\mu$ M Lösung noch gesteigert werden konnte. Bei einer Zugabe von 1000 $\mu$ M Denatoniumbenzoat ließen sich Einzelkontraktionen bei unserem Methodenansatz nicht mehr eindeutig differenzieren (nicht gezeigt). Die deutlichste messbare Veränderung der Kontraktion des Ganges gelang somit bei 100 $\mu$ M Denatoniumbenzoat (Abbildung 17 A-C).

Neben Untersuchungen an Wildtyp-Mäusen wurden unter Verwendung gleicher Nebenhodengangabschnitte auch Studien an TrpM5-k.o.-Mäusen durchgeführt. Sowohl bei 10 $\mu$ M als auch bei 100 $\mu$ M Denatoniumbenzoat waren die Effekte deutlich geringer (Abbildung 17 D-F) als beim Wildtyp (Abbildung 17 A-C).

Diese ersten Ergebnisse werden von uns aktuell (nach Beendigung der vorliegenden Arbeit) genauer überprüft und nach Erhöhen der Fallzahl statistisch ausgewertet.

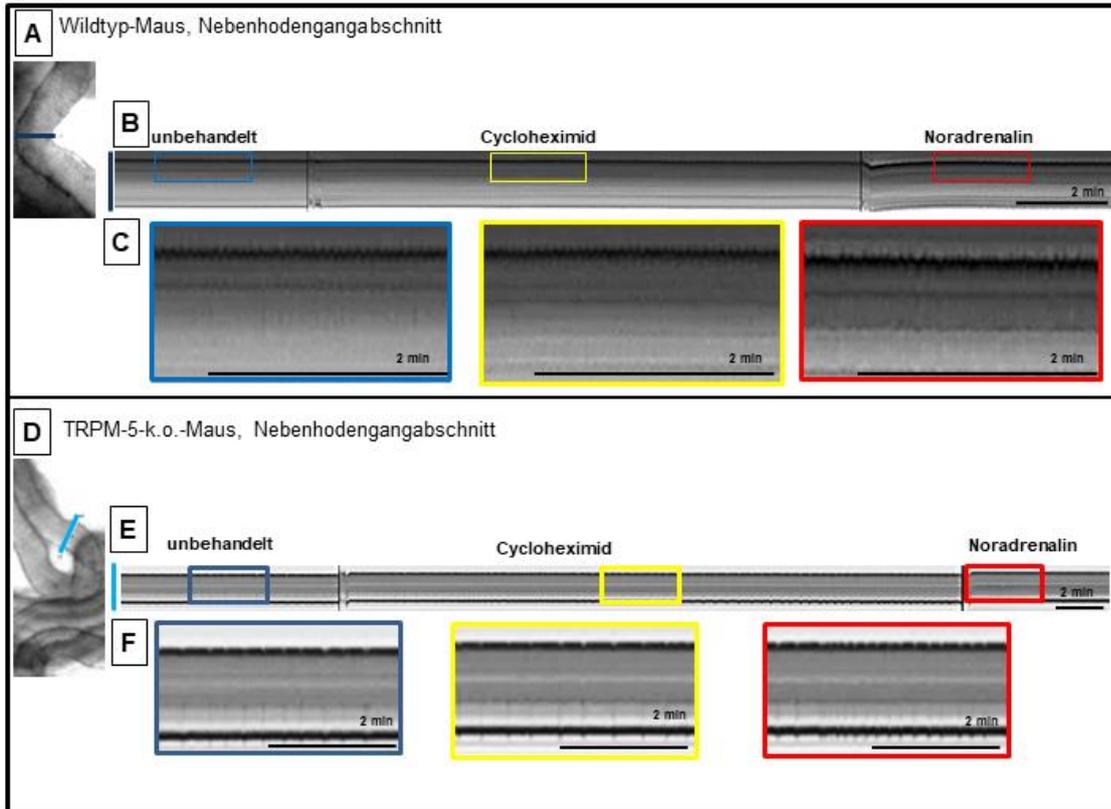


**Abbildung 17: Kontraktions-Analysen unter Zugabe von Denatoniumbenzoat am Nebenhodengang**

Mithilfe des Time-lapse-imaging wurden sekundlich Aufnahmen eines präparierten Nebenhodengangabschnittes gemacht. A, D: Der Screenshot zeigt einen Nebenhodengangabschnitt aus dem Caput. Die dunkelblaue und hellblaue Linie zeigen die Positionen eines virtuellen Schnittes durch den Bilderstapel. Hieraus resultiert ein Time stack, welcher in B und E dargestellt ist. Zunächst erfolgte eine Analyse der spontanen Kontraktionen der Gewebestückchen (8 min). Dies wird durch Zacken im Time stack sichtbar. Anschließend wird 10µM Denatoniumbenzoat (8 min), gefolgt von 100µM Denatoniumbenzoat (8 min) hinzugegeben. A - C zeigen die Analyse des Wildtyp-Maus-Nebenhodens im Bereich des Caputs. D-F entsprechen diesem Bereich in einem TrpM5-k.o.-Maus-Nebenhoden. C und F zeigen vergrößerte Abschnitte. Es zeigt sich deutlich eine Zunahme der Kontraktion des Nebenhodenganges bei der Wildtyp-Maus. Die TrpM5-k.o.-Maus hingegen reagiert kaum auf eine Zugabe des Bitterstoffes.

Eine zusätzliche Versuchsreihe wurde mit dem Bitterstoff Cycloheximid (100µM) durchgeführt. Das Hinzufügen dieser Substanz führte ebenfalls zu einem Anstieg der Kontraktionsfrequenz von Nebenhodengangabschnitten einer Wildtyp-Maus (Abbildung 18A-C). Demgegenüber bewirkte Cycloheximid bei den Gangabschnitten von TrpM5 k.o.-Mäusen nur eine diskrete Änderung der Zuckungen (Abbildung 18 D-F).

In jeder Versuchsreihe (Denatoniumbenzoat [nicht gezeigt] und Cycloheximid [Abbildung 18]) und jeder Tiergruppe (Wildtyp- und TrpM5-k.o.-Maus) erfolgte nach der Testsubstanz eine abschließende Vitalitätsprüfung des Organs durch Zugabe von 10µM Noradrenalin, was in allen Fällen zur Veränderung des Kontraktionsmusters führte.



**Abbildung 18: Kontraktions-Analysen unter Zugabe von Cycloheximid am Nebenhodengang** Erneut zeigen A und D den Screenshot eines Nebenhodengangsabschnitts aus dem Caput, A bei einer ChAT-GFP-Maus und D an einer TrpM5-k.o.-Maus. Die blauen Linien zeigen die Positionen eines virtuellen Schnittes durch den Bilderstapel. Hieraus resultiert ein Time stack, welcher in B und E dargestellt ist. Die in C und F vergrößerten Ausschnitte machen die Zuckungen deutlich und zählbar. Zunächst wird immer der Zustand ohne Zugabe von Cycloheximid gezeigt, danach erfolgt eine Zugabe der 100 $\mu$ M Lösung und anschließend zur Testung der Vitalität des Gewebes eine Zugabe von Noradrenalin. Es zeigt sich in C eine deutliche Zunahme der Kontraktion, wohingegen in F kaum Veränderungen feststellbar sind.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde nach non-neuronalen cholinergen Zellen im Nebenhodenepithel der Maus gesucht. Es konnte eine Untergruppe von Basalzellen mit Lumen erreichendem Ausläufer detektiert werden, welche das Enzym ChAT exprimieren. Diese Zellen wurden innerhalb der Forschungsarbeit genauer charakterisiert und ihre mögliche Funktion innerhalb des Nebenhodenganges untersucht.

### 5.1 Gibt es non-neuronale cholinerge Zellen im Nebenhodenepithel?

Der Nachweis der ChAT positiven Zellen erfolgte mithilfe von zwei Methoden. Zum einen wurde das transgene ChAT-eGFP-Mausmodell verwendet. Der Vorteil eines solchen Modells besteht in der Expression eines fluoreszierenden Proteins innerhalb der gesuchten Zellen, sodass theoretisch gesehen keine Antikörper-Färbung notwendig ist. Eine Schwäche dieses Verfahrens ist jedoch das relativ schwache Signal in bestimmten Organen bzw. ein schwaches Signal bei wenig Proteinmenge. Da die ChAT in non-neuronalen Geweben nur in geringen Mengen vorkommt, ist es für den Nebenhoden notwendig gewesen, das Signal mithilfe eines Antikörpers gegen GFP zu verstärken. Dies ist nicht unüblich und wird in diversen anderen Arbeiten ebenfalls beschrieben (Deckmann et al., 2014). Als eine weitere unabhängige Methode wurde ein ChAT-Antikörper verwendet. Beide Ergebnisse markieren dieselben Zellen im Nebenhodenepithel, was mithilfe der Anwendung von ChAT-Antikörpern am Nebenhoden der ChAT-eGFP-Maus gezeigt werden konnte.

Zur Sicherung der o.g. Ergebnisse erfolgte die Untersuchung der ChAT Expression auch auf mRNA-Ebene. Die durchgeführten PCR-Analysen des Nebenhodens in toto konnte die ChAT-Expression bestätigen. Zur Sicherung erfolgten Analysen auch an Kontrollorganen, wie dem Rückenmark und dem Gehirn (Sorbi et al., 1980; Aquilonius et al., 1981; Oda, 1999). In allen drei Organen, Nebenhoden, Rückenmark und Gehirn, konnte die ChAT-mRNA nachgewiesen werden. Negativ-Kontrollen mit Wasser und fehlender RNA dienten zum Ausschluss von falsch positiven Ergebnissen. Somit wurde die Existenz der non-neuronalen cholinergen Zellen im Nebenhodengang sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene gesichert.

Solche non-neuronalen cholinergen Zellen zählen zum non-neuronalen cholinergen System und wurden bereits im männlichen Urogenitaltrakt beschrieben. Im Hoden wurden ChAT exprimierende Zellen detektiert, die im Hodenparenchym lokalisiert sind

und eine Rolle bei der Spermiendifferenzierung spielen könnten (Schirmer et al., 2011). Ebenso konnte in der Urethra eine Zellpopulation nachgewiesen werden, welche zu dem NNCS zählt. Diese cholinergen Zellen scheinen in der Urethra eine sensorische und eventuell auch präventive Schutzfunktion im Rahmen einer aufsteigenden Infektion zu besitzen (Deckmann & Kummer, 2016).

In dieser Arbeit war es nun erstmalig möglich, die Existenz einer solchen non-neuronalen cholinergen Zelle im Nebenhodengang nachzuweisen.

### **5.2 Mögliche Funktion einer ChAT exprimierenden Zelle im Nebenhoden**

Das Enzym ChAT wurde zunächst im neuronalen System identifiziert (Oda, 1999). Innerhalb der Synapsen gibt es membrangebundene und zytosolische Enzyme, welche die Katalyse von Cholin und Acetyl CoA zu dem bekannten Neurotransmitter Acetylcholin bewirken (Nachmansohn & Machado, 1943). Acetylcholin, ein Botenstoff, führt an der motorischen Endplatte über eine rezeptorgebundene Signalkaskade zu einem Effekt am Skelettmuskel (Bernareggi et al., 2019) und im Rahmen der interneuronalen Informationsübertragung zu einer Depolarisation und damit einer Weiterleitung von Aktionspotentialen (Huh & Fuhrer, 2002). Je nach Wirkungsort kann es zu einer Depolarisation und Stimulation kommen und in der glatten Muskulatur auch zu einer Kontraktion oder auch zur Modulation der Kontraktionsfrequenz (Sergeant et al., 2019) Im Nebenhodengang könnte letzteres ebenso denkbar sein. Da der Nebenhodengang größtenteils über eine Spontankontraktion verfügt, könnte die Freisetzung von ACh zu einer Veränderung des Kontraktionsmusters führen. Eine solche Anpassung der Muskelaktivität könnte im Zusammenhang mit der Vermeidung von aufsteigenden Infektionen gesehen werden. So könnte eine Zunahme der Kontraktilität zum gerichteten Abtransport und damit der Ausscheidung von möglichen Pathogenen führen.

Weitere Hypothesen bzgl. der Wirkungsweise des gebildeten ACh könnten natürlich auch neuronale Pathomechanismen oder interzelluläre Modulation sein. Alle drei Hypothesen werden in der vorliegenden Arbeit überprüft und im Verlauf genauer erläutert und diskutiert.

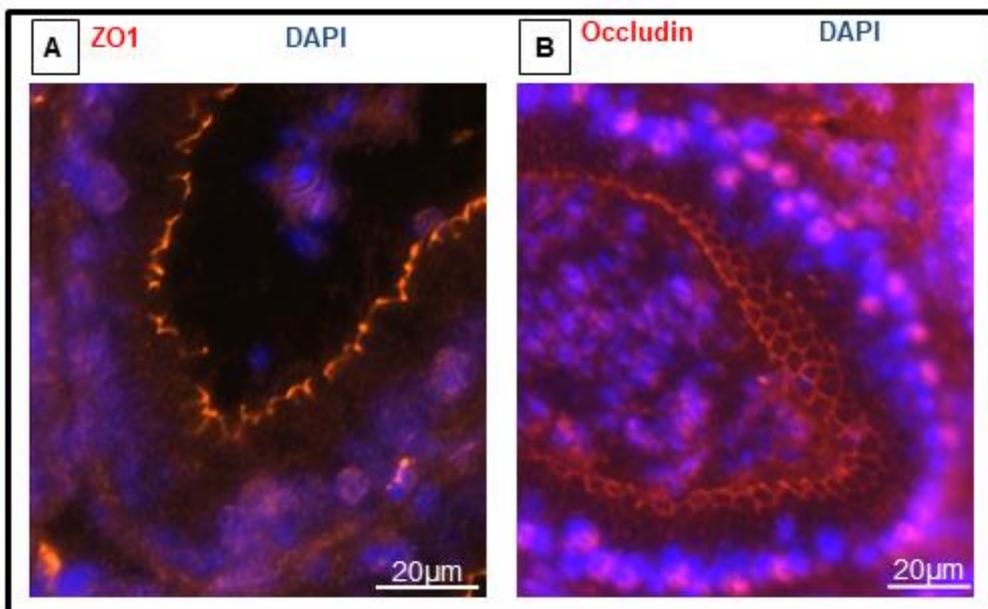
### 5.3 Welchem Zelltyp ähneln die cholinergen Zellen?

Morphologisch zeigen die ChAT exprimierenden Nebenhoden-Zellen eine typische Basalzell-Form. Weitere Basalzellcharakteristika sollten durch eine genauere morphologische Analyse der Zellen mithilfe von Immunfluoreszenz bestätigt werden. Es erfolgten daher Untersuchungen mit diversen Antikörpern für Proteine der Basalzellen, wie Keratin 5 (Kim et al., 2015), COX-1 (Robaire & Hinton, 2015) und Claudin 1 (Shum et al., 2009). Diese Proteine konnten in den ChAT exprimierenden Zellen des Nebenhodens nachgewiesen werden. Jedoch zeigten umgekehrt nicht alle Keratin 5, COX-1 und Claudin 1-exprimierenden Basalzellen einen cholinergen Charakter. Die neu entdeckten cholinergen Zellen des Nebenhodenepithels können somit zur Gruppe der Basalzellen gezählt werden. Auffällig war, dass die ChAT-positiven Basalzellen einen längeren apikalen Fortsatz besitzen, für den bei günstigem Anschnitt der Zelle auch gezeigt werden konnte, dass er das Lumen des Nebenhodenganges erreicht. Damit gehören sie zu den Basalzellen mit Lumen erreichendem apikalem Ausläufer (Shum et al., 2008). Dies führt zu der Annahme, dass Basalzellen insgesamt keine homogene Zellpopulation darstellen, sondern dass diese sich in Untergruppen unterteilen lassen. Präzise ausgedrückt, zeigten die Immunfluoreszenz-Untersuchungen, dass ein Teil der Basalzellen mit apikalem Ausläufer positiv für die ChAT-Expression ist und damit eine Untergruppe der Untergruppe zu sein scheint.

Erneut muss die Frage nach der Funktion gestellt und im Zusammenhang mit dem Basalzell-Charakter betrachtet werden. Neben den bekannten klassischen Basalzellfunktionen, wie der Beteiligung an der Endozytose, möglichen immunologischen Effekten (Robaire & Hinton, 2015) und einer Stammzellfunktion für das Nebenhodenepithel (Mandon et al., 2015), wurde ihnen in den letzten Jahren eine luminale Sensor-Funktion zugeschrieben (Shum et al., 2008). In jener Arbeit wurde beschrieben, dass die Basalzellen mit lumenalem Ausläufer einen Angiotensin II-Rezeptor besitzen und dass es bei Aktivierung durch das Angiotensin II zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus der Basalzelle kommt. Dieses wirkt an benachbarten „Clear-Zellen“, in dem es zur Akkumulation von V-ATPasen in den Mikrovilli kommt und in der Folge den luminalen pH-Wert verändert. Welche physiologische Relevanz diese beschriebene Aufgabe im Bereich des Nebenhodens hat, scheint noch unklar, da sich z.B. die Verteilung der Basalzellen mit apikalem Fortsatz über die Länge des Nebenhodenganges zwischen Ratte und Maus wesentlich unterscheidet. Im Maus-Nebenhodenepithel zeigt sich eine Häufung dieser Zellen vor allem im Bereich des Caput, wohingegen im Nebenhoden der Ratte vor allem in der

Cauda solche Fortsatz-Zellen beschrieben sind (Breton et al., 2016). Es scheint sehr unwahrscheinlich, dass die Azidifizierung der luminalen Flüssigkeit hauptsächlich durch diese Zellen hervorgerufen wird. Denn für diesen wichtigen Vorgang ist nicht vorstellbar, dass er bei zwei Spezies in komplett anderen Bereichen des sehr langen Nebenhodenganges stattfindet. Dies spricht dagegen, dass eine luminale Sensor-Funktion zur pH-Regulation eine Hauptaufgabe aller Basalzellen mit luminalem Ausläufer ist und stützt unsere Hypothese, dass sich die Basalzellen mit Lumen erreichendem Ausläufer weiter unterteilen lassen.

Im Rahmen der morphologischen Analysen untersuchten wir auch tight junctions (Furuse, 2010) im Bereich der ChAT-positiven Basalzellen mit Ausläufern. Die Abbildung zeigt eine klare Darstellung des ZO1- und Occludin-Proteins vor allem in tangentialen Schnitten (Abbildung 19 A und B). Der Nachweis dieser Proteine war vor allem durch die Anwendung von Aceton als Fixierungsmittel möglich. Es fehlt jedoch bislang der definitive Nachweis, dass auch die ChAT-positiven Basalzellen mit Fortsatz die tight junction durchbrechen. Eine Arbeit aus der Breton-Arbeitsgruppe lässt aber vermuten, dass es sich hierbei um ein allgemein in der Fortsatz-Untergruppe der Basalzellen vorkommendes Merkmal handelt (Kim et al., 2015).



**Abbildung 19: Zell-Zell-Kontakte im Epithel des Nebenhodens der Maus** A markiert die tight junctions im Lumen-nahen Bereich praktisch durch Nachweis des Proteins ZO1. In B sind die Epithelzellen im apikalen Bereich teilweise tangential getroffen, so dass die tight junction nach Occludin-Färbung als Schlussleistennetz imponieren.

#### **5.4 Weitere Charakteristika der non-neuronalen cholinergen Basalzellen des Nebenhodenepithels**

Non-neuronale cholinerge Zellen wurden mittlerweile wie o.g. in diversen Organen beschrieben und scheinen dort die unterschiedlichsten Funktionen auszuüben. Mehrfach wurde innerhalb solch cholinergere Zellen eine chemosensorische Komponente beschrieben, ähnlich der Geschmackskaskade (Deckmann et al., 2014; Krasteva et al., 2011). Es sind überwiegend Proteine, die innerhalb der Zunge zur Weiterleitung von Bitterstoff vermittelten Signalen führen. Diese Signalwege sind nicht nur im Bereich der Geschmacksweiterleitung relevant, sondern auch als Schutzmechanismus. Da Gift in den meisten Fällen bitter ist, reagiert der gustatorische Apparat sehr sensibel auf diese Liganden (Ruiz-Avila et al., 2001). Grob beschrieben führen Bitterstoffe über einen G-Protein gekoppelten Tas2-Rezeptor zur Öffnung des TrpM5-Kanals und damit zum Einstrom von Kationen (Abbildung 8). Durch die Verschiebung von positiv geladenen Teilchen kommt es zur Depolarisation und Weiterleitung der Information (Lindemann, 2001).

Diese Proteine sind teilweise in ChAT-positiven Zellen in Organen unabhängig vom Geschmacksapparat nachgewiesen worden und eines dieser Organe ist z.B. die Trachea. Hier scheinen die non-neuronalen cholinergen Zellen chemosensorisch aktiv zu sein. So wurden Proteine wie der Tas2-Rezeptor oder auch der TrpM5-Kanal in der cholinergen Zelle detektiert (Krasteva et al., 2011; Hollenhorst et al., 2020; Ualiyeva, 2019). Im Gegensatz zur Zunge, bei der Bitterstoffe die Geschmacksrichtung „bitter“ weiterleiten, scheinen diese Liganden in anderen Organen eine andere Funktion zu besitzen. Über ihre Aktivierung kommt es z.B. in der Trachea zur Veränderung der Atmung. Der Bitterstoff bindet an Tas2R und aktiviert den TrpM5-Kanal. Durch die Depolarisation synthetisiert die ChAT den Transmitter ACh und dieses scheint einen Einfluss auf die Atmung zu haben. Daher ist hier von einer möglichen Schutzfunktion innerhalb der Trachea auszugehen (Krasteva et al., 2011). Im Bereich der Harnröhre führen Bitterstoffe zur Stimulation der Blasenentleerung, was als eine Art Säuberung der Harnröhre zur Verhinderung einer aufsteigenden Infektion gesehen werden kann (Deckmann et al., 2014).

Teile dieser Kaskade konnten nun auch erstmalig im Nebenhodenepithel nachgewiesen werden. Im Rahmen der morphologischen Untersuchungen der ChAT-positiven Basalzellen des Nebenhodens wurde nach diversen Proteinen, u.a. solchen aus dem gustatorischen Apparat, gesucht. Auf mRNA-Ebene konnte im untersuchten Maus-Nebenhoden in toto zunächst der bekannte TrpM5-Kanal detektiert werden. Dieser Kanal sorgt für den schnellen Kationen-Einstrom von extra- nach intrazellulär

und spielt damit eine entscheidende Rolle bei der Depolarisierung. Er ist bisher bekannt als Bestandteil der Signalkaskade zur Geschmacksweiterleitung und wird ebenfalls in pankreatischen  $\beta$ -Zellen im Rahmen der Insulin-Sekretion beschrieben (Brixel et al., 2010). Im Laufe der vergangenen Jahre wurde in zahlreichen weiteren Organen bei chemosensorischen Zellen das Vorhandensein des Kanals nachgewiesen. Der PCR-Nachweis von TrpM5 mRNA am Nebenhoden in toto zeigte jedoch noch keine genaue Lokalisation im Organ. Daher erfolgten Immunfluoreszenz-Versuche mit Antikörpern gegen das TrpM5-Protein an ChAT-eGFP-Maus-Nebenhoden. Es zeigte sich ein Proteinnachweis im Bereich des Epithels und hier in den ChAT-positiven Basalzellen. Eine weitere Sicherung dieser Ergebnisse erfolgte mithilfe von TrpM5-eGFP-Maus-Nebenhoden, welcher mit Antikörpern gegen Keratin 5, dem bereits beschriebenen Basalzell-Marker, untersucht wurde. Hier zeigte sich ebenfalls eine Kolo-kalisation von beiden Proteinen innerhalb einer Zelle. Das lässt den Schluss zu, dass die non-neuronalen cholinergen Zellen des Nebenhodenepithels ein Protein der Geschmackskaskade exprimieren. Für weitere, v.a. funktionelle, Experimente ist es entscheidend nachzuweisen, dass TrpM5 zwar im Epithel des Nebenhodens aber nicht in der umgebenden glatten Muskulatur lokalisiert ist, da sonst mit Bitterstoff inkubierte Nebenhoden auch über den direkten Muskeleffekt kontrahieren würden. Daher wurde der Nebenhoden der TrpM5-eGFP-Maus zusätzlich noch in einem weiteren Versuch mit Antikörpern gegen SMA behandelt. Hier zeigte sich deutlich eine unterschiedliche Expression von SMA und TrpM5. Erneut wurde nachgewiesen, dass TrpM5 sich nur im Epithel befindet und kein TrpM5 in der glatten Muskulatur (Bereich mit positiver SMA-Antikörper-Färbung) vorhanden ist.

Durch diese Versuchsreihe konnte sichergestellt werden, dass das TrpM5 Protein nur im Epithel des Nebenhodens existiert und mit Sicherheit eine Expression in der glatten Muskulatur ausgeschlossen werden kann.

### **5.5 Bitterstoff-Detektion im Nebenhoden**

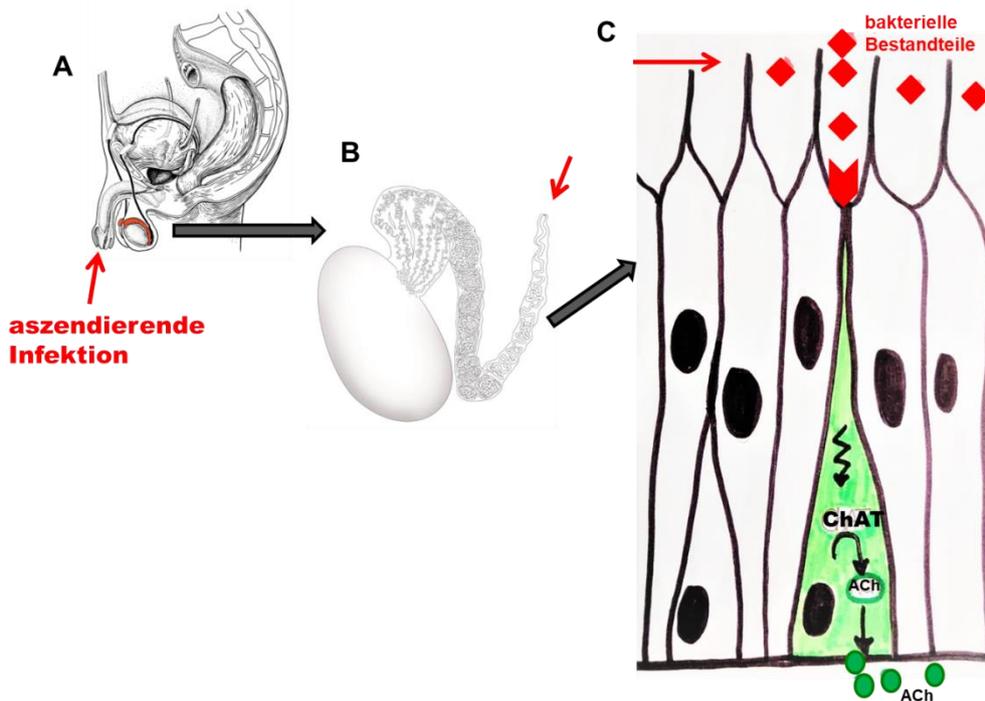
Die Geschmackskaskade beginnt, wie bereits erwähnt, mit einem Rezeptor, der einen Liganden bindet. Im Falle der Geschmacksrichtung „bitter“ ist es einer der Tas2-Rezeptoren. Bei der Maus bekannt und in diversen Organen beschrieben sind Tas2R 105 und 108 (Lossow et al., 2016). Tas2-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche durch Aktivierung zur Konformationsänderung des G-Proteins führen. Hierdurch kommt es zu Abspaltungen der Untereinheiten des G-Proteins und der Aktivierung von PLC $\beta$ 2. Dies bewirkt indirekt über eine Calciumfreisetzung die Öffnung des TrpM5-Kanals. Die Kaskade selbst wird durch Bitterstoffe oder auch Bitterstoff-ähnliche Bakterienbestandteile aktiviert (Lee et al., 2014). Zu bekannten

Bitterstoffen zählen Denatonium und Cycloheximid (Crosson & Sandmann, 2013; Hettinger et al., 2007), welche bereits in geringen Mengen wahrgenommen werden.

In der Zunge bekannt geworden, wurde in zahlreichen anderen Organen diese Rezeptor-Familie Tas2R nun nachgewiesen, z.B. im Hoden, den Spermien, der Trachea und der glatten Muskulatur im Bereich der Aorta (Liu et al., 2020; Governini et al., 2020; Hollenhorst et al., 2020).

Auch im Nebenhoden konnte im Rahmen dieser Forschungsarbeit der Tas2R 108 sowie das nachgeschaltete PLC $\beta$ 2 detektiert werden. In PCR-Analysen wurden beide auf mRNA-Ebene am Maus-Nebenhoden in toto nachgewiesen und belegen hierdurch das Vorhandensein der Geschmackskaskade im Maus-Nebenhoden. Unsere Daten legen eine Kolo-kalisation des Tas2-Rezeptors mit dem TrpM5 Kanal in derselben Zelle nahe.

Funktionell gesehen muss man von einer Schutzfunktion im Rahmen von aufsteigenden, urogenitalen Infektionen ausgehen. Bakterien steigen über die Harnröhre in Richtung Nebenhoden auf und dürften von dem im Epithel befindlichen Tas2-Rezeptor gebunden werden. Dies führt über das gekoppelte G-Protein indirekt zur Aktivierung von TrpM5 und damit zur Depolarisation innerhalb der non-neuronalen cholinergen Basalzelle, was wiederum zur Stimulierung der ChAT und Bildung von ACh führt (Abbildung 20). Die Funktion des gebildeten ACh könnte vielfältig sein. Im Rahmen dieser Dissertation wurden drei mögliche funktionelle Ansätze berücksichtigt.



**Abbildung 20: Mögliche Auswirkung aufsteigender Infektionen auf das Nebenhodenepithel**

A zeigt das Eintreten einer Infektion über die Harnröhre. In B wird das Aszendieren der Infektion über den Ductus deferens in Richtung des Nebenhodens dargestellt. C ist eine schematische Darstellung des Nebenhodenepithels. Die bakteriellen Bestandteile führen zur Aktivierung der grün eingefärbten ChAT positiven Zelle und damit zur Freisetzung von ACh.

**5.6 Funktionelle interzelluläre Verbindung zu V-ATPase-exprimierenden Zellen**

Im Nebenhoden der Maus wurde eine Untergruppe der Basalzellen entdeckt, welche ChAT-positiv ist und nachweislich wichtige Proteine der gustatorischen Kaskade zur Weiterleitung der Geschmacksrichtung „bitter“ exprimiert. Es erfolgte im Rahmen dieser Doktorarbeit das Untersuchen möglicher funktioneller Eigenschaften dieser neuen Zellgruppe. Zunächst wurde nach einer möglichen funktionellen Verbindung zu den V-ATPase-bildenden Zellen, „Clear-Zellen“, gesucht. Diese Untersuchung erfolgte mithilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen an ChAT-eGFP-Maus-Nebenhoden unter Verwendung eines Antikörpers gegen die b1-Untereinheit der V-ATPase. Es konnte in keinem Schnitt der unterschiedlichen Bereiche des Nebenhodens eine räumliche Nähe zwischen den ChAT-positiven Basalzellen und den V-ATPase exprimierenden „Clear-Zellen“ gefunden werden. Die bereits oben erläuterte Kaskade zur luminalen pH-Regulation bedarf einer engen Nachbarschaft der „Clear-Zellen“ mit den Lumen-erreichenden Basalzellen. Durch diese Nähe kann das Stickstoffmonoxid von der Basalzelle zur „Clear-Zelle“ diffundieren und kann somit die Anzahl der V-ATPasen und

damit die pH-Änderung beeinflussen (Shum et al., 2008). Durch die fehlende räumliche Nähe ist ein solcher Mechanismus im Zusammenhang mit den ChAT-positiven Basalzellen auszuschließen. Dies bestätigt unsere Hypothese von unterschiedlichen Untergruppen der Basalzellen und zeigt weiterhin, dass sich die Untergruppe der Basalzellen mit vorhandener ChAT-Expression in ihrer Aufgabe von den Basalzellen mit apikalem Ausläufer ohne ChAT-Expression unterscheiden lassen.

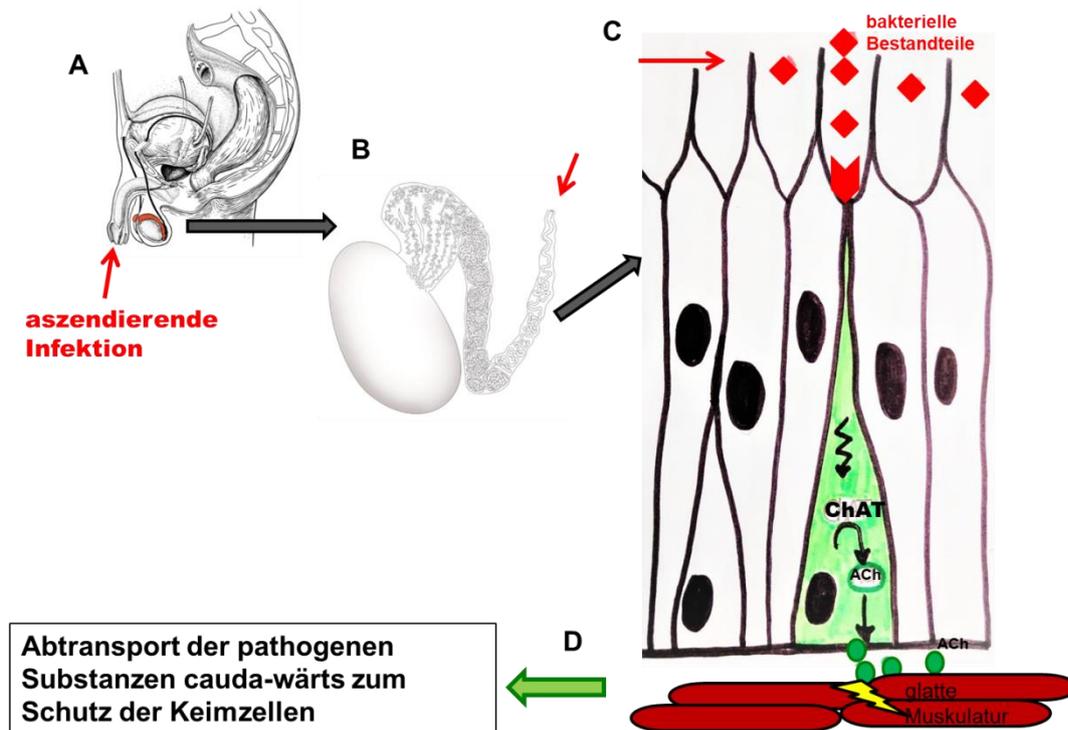
### **5.7 Nervalen Stimulation durch ChAT-positive-Zellen als eine mögliche Funktion**

Auf Grund des cholinergen Charakters der ChAT-positiven Zellen wurde außerdem nach einer nervalen Verbindung gesucht. Mithilfe von  $\alpha 3$ -nAChR-eGFP-Mäusen wurde eine räumliche Nähe zwischen diesem Zelltyp und  $\alpha 3$ -nAChR-Nervenfasern geprüft. Hier konnte eine enge räumliche Beziehung von Nervenenden zu ChAT-positiven Basalzellen des  $\alpha 3$ -nAChR-eGFP-Maus-Nebenhodens festgestellt werden. Vor allem im tangentialen Schnitt konnte in der Immunfluoreszenz-Färbung von  $\alpha 3$ -nAChR-eGFP-Maus-Nebenhoden mit ChAT-Antikörpern dieser räumliche Bezug sichtbar gemacht werden. Es ist denkbar, dass das synthetisierte ACh einen direkten Einfluss auf diese Nervenfasern besitzt. Die Aktivierung der ACh-bildenden Basalzellen des Nebenhodens durch bakterielle Bestandteile, würde demnach zu einem nervalen Impuls führen. Inwieweit die Weiterleitung über solche Neurone vonstattengeht und welche Endpunkte diese Informationskette besitzen könnte, ist noch unklar und wurde in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Denkbar sind sowohl efferente als auch afferente Qualitäten (Dai et al., 2019) der Nervenfasern. Es könnte daher sein, dass das gebildete ACh von afferenten Fasern weitergeleitet und nach Zwischenschritten über efferente Fasern zu einer Muskelaktivität oder deren Modulation führt. Die durch uns registrierten Bitterstoff-abhängigen Kontraktionsänderung können jedoch nicht durch einen derartigen nervalen Weg ausgelöst sein, da wir isolierte Gang-Anteile untersucht haben, was aber nicht die Existenz eines solchen Weges ausschließt. Aber auch die sensorische Wahrnehmung einer Entzündung könnte ein funktioneller Aspekt von Nervenfasern in unmittelbarer Nachbarschaft von ChAT exprimierenden Zellen sein.

### **5.8 Der direkte Muskeffekt als funktioneller Aspekt**

Eine weitere Hypothese zur Funktion der ChAT-positiven Zellen ist ein direkter Muskeffekt, hervorgerufen durch das synthetisierte ACh. So könnte eine Infektion im Bereich des Nebenhodens zur Bindung von bakteriellen Bestandteilen am Tas2R 108 führen. Die Aktivierung des G-Proteins und Abspaltung seiner Untergruppen wiederum

bedeutet eine Depolarisierung v.a. nach Stimulierung des TrpM5-Kanals. Die zunehmende Depolarisierung aktiviert die ChAT (Liman, 2007). Das dadurch gebildete ACh könnte vesikulär oder auch direkt über Kanäle freigesetzt werden. An der glatten Muskulatur könnte das ACh einen direkten Einfluss auf die Spontankontraktion des Nebenhodenganges besitzen (Abbildung 21). Daher erfolgten Untersuchungen mit Teilen des Nebenhodenganges, welche in Kollagen gebettet wurden. Es wurden nur die Abschnitte mit Spontankontraktion untersucht. Die beiden Bitterstoffe Cycloheximid und Denatonium wurden in unterschiedlichen Versuchen und in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben. Die Anzahl der Zuckungen wurde anschließend vor und nach Zugabe der Substanzen ausgezählt. In den meisten Fällen konnte eine Zunahme der Zuckungen nach Denatonium- bzw. Cycloheximid-Zugabe registriert werden. Um sicher zu sein, dass die Bitterstoff-Effekte über die ChAT positiven Basalzellen vermittelt sind, wurde diese Versuchsreihe in gleicherweise an TrpM5-k.o.-Maus-Nebenhoden durchgeführt, da TrpM5 bei uns ausschließlich in den ChAT positiven Basalzellen nachgewiesen wurde. Hier zeigte sich umgekehrt in den meisten Fällen das Ausbleiben der Kontraktionszunahme. Das spricht für die Richtigkeit der oben erwähnten Hypothese und könnte damit eine mögliche Funktion der neu entdeckten ChAT-positiven Zellen des Nebenhodenepithels beschreiben. Diese Hypothese wird von uns nach Fertigstellung dieser Doktorarbeit noch genauer überprüft und statistisch abgesichert.



**Abbildung 21: Funktioneller Zusammenhang der aszendierenden Infektion und der ACh-Freisetzung**

A-C stellen wie zuvor beschrieben die aszendierende Infektion über die Harnröhre zum Nebenhoden dar sowie die ACh-Freisetzung über die grün markierte Zelle des Nebenhodenepithels. In D ist eine mögliche ACh-Wirkung auf die darunter liegenden glatten Muskelzellen gezeigt. Der Anstieg der Kontraktionsfrequenz könnte dem Abtransport der pathogenen Substanzen dienen.

### 5.9 Die non-neuronale cholinerge chemosensorische Zelle in anderen Organen im Wandel der Forschung

Die Forschungsergebnisse zu den non-neuronalen cholinergen chemosensorischen Zellen werden immer differenzierter. Somit unterliegt sowohl die Benennung als auch die Definition der entsprechenden Zelltypen einem ständigen Wandel. In aktuellen Veröffentlichungen wurden die Zellen weiter unterteilt in drei verschiedene Gruppen. Es wird differenziert in eine neuroendokrine-serotonerge Zelle, eine Bürstenzelle mit Villin aber ohne ChAT-Expression und eine Bürstenzell-ähnliche Zelle mit cholinergem Charakter aber ohne Villin (Deckmann & Kummer, 2016). Inwieweit diese Zelltypen in den Organen vorhanden sind und welche Rolle welcher Zelltyp genau besitzt, ist noch wenig sicher. Auch im Nebenhodenepithel zeigten die allseits bekannten Basalzellen eine vorher unbekannte Differenzierungsmöglichkeit. Sie unterscheiden sich nicht nur im morphologischen Aspekt (Basalzellen mit und ohne Lumen erreichendem Ausläufer), sondern auch in der Proteinsynthese (vorhandene oder nicht vorhandene ChAT- und TrpM5-Expression) und in ihrer Funktion (Stammzellfunktion/ pH-Änderung der Samenflüssigkeit/ Abwehrfunktion/ Sensorfunktion).

## 6 Zusammenfassung

Die Cholinacetyltransferase (ChAT) spielt in neuronalem Gewebe eine wichtige Rolle und dient der Synthese des bekannten Neurotransmitters Acetylcholin. In den vergangenen Jahren zeigten auch diverse nicht-neuronale Organe Zellen mit ChAT-Expression. Diese Zellen werden als non-neuronale cholinerge Zellen bezeichnet und scheinen eine Rolle im Rahmen einer Schutzfunktion der Organe zu spielen. Das Vorhandensein dieses Enzyms im Nebenhoden wurde bisher noch nicht überprüft.

Immunfluoreszenz-Färbungen am Epididymidis der Maus zeigten eine Expression der ChAT in einem Teil von Zellen genau eines Zelltypes, den Basalzellen des Epithels. Einige Basalzellen bilden teilweise apikale das Lumen erreichende Ausläufer aus, was mit einer Überprüfung der luminalen Flüssigkeit in Verbindung gebracht wird. Eine Subpopulation der Basalzellen mit luminalem Fortsatz exprimieren gewissermaßen als Untergruppe einer Untergruppe die ChAT. Weitere Untersuchungen zeigten auf mRNA- und Protein-Ebene die Expression von Komponenten chemosensorischer Zellen wie dem Geschmacksrezeptor Tas2R 108, dem Ionenkanal TrpM5 und der Phospholipase C- $\beta$ 2 im Nebenhoden, welche im gustatorischen Bereich eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung der Geschmacksqualität „bitter“ spielen. Diese Bestandteile chemosensorischer Kaskaden wurden in der cholinergen Basalzelle des Nebenhodens in dieser Forschungsarbeit erstmalig nachgewiesen. Morphologische und funktionelle Experimente zur möglichen Rolle von Bitterstoff-detektierenden Zellen innerhalb des Nebenhodenepithels zeigten eine räumliche Nähe der non-neuronalen cholinergen Zellen zu Nervenendigungen des Nebenhodens. Des Weiteren führten bei Time-Lapse-Studien mit isolierten Abschnitten des Nebenhodenganges Bitterstoffe wie Cycloheximid und Denatonium zu einer Zunahme der Spontankontraktion im Unterschied zum Nebenhoden der TrpM5-knock-out-Maus.

Damit sprechen unsere Daten für eine bisher unbekannt Subpopulation der Basalzellen des Epithels, nämlich einer chemosensorischen, cholinergen Zellgruppe, über die die Kontraktion des Nebenhodenganges beeinflusst werden kann. Die Signalkaskade kann hierbei von Bitterstoffen bzw. bitterstoffähnlichen Bakterienbestandteilen gramnegativer Bakterien, wie z.B. E-Coli oder evtl. auch *Pseudomonas aeruginosa*, aktiviert werden. Dies legt einen Bakteriensensor-Mechanismus im Nebenhodengang nahe, um aufsteigende Infektionen frühzeitig zu erkennen und um in der Folge die bakterielle Ausscheidung durch Kontraktionssteigerung zu fördern.

## 7 Summary

The choline acetyltransferase (ChAT) plays an important role in the nervous tissue and is responsible for the synthesis of the neurotransmitter acetylcholine. In the last years a number of non-neuronal cells were also shown to express ChAT. These non-neuronal cholinergic cells were suggested to play a protective role within the different organs. In the epididymis, expression of this enzyme has not yet been investigated.

Immunofluorescence of the mouse epididymis revealed the expression of ChAT in a subpopulation of the basal cells of the epithelium. Some basal cells were described to send cytoplasmic projections towards the lumen in order to monitor the luminal environment. A subpopulation of such basal cells with luminal extension was now shown to express ChAT.

At the mRNA and the protein level the expression of further components of chemosensory cells such as the taste receptor Tas2R 108, the ionic channel TRPM5 and the phospholipase C beta-2 were also found in the epididymis. These are elements of the bitter taste signalling pathway. In the epididymis these components were now localized to the cholinergic basal cells.

Additional experiments showed a close proximity of non-neuronal cholinergic cells of the epididymis to nerve terminals. Time lapse investigations found that bitter substances like cycloheximide and denatonium lead to an increase of spontaneous contractions of the epididymal duct in wild-type mice in contrast to TRPM5-knock-out mice.

Our data suggest an up to now unknown subpopulation of basal cells of the epithelium. This is a chemosensory and cholinergic cell group, by which contractions of the epididymis can be affected. Bitter substances or bitter substance similar bacteria components of gram-negative bacteria like *E. Coli* or *Pseudomonas aeruginosa* can activate the signalling cascade. This leads to a bacteria sensor mechanism inside the epididymis to detect ascending infections at an early stage and subsequently to enhance bacterial elimination through increasing contractions.

**8 Abkürzungsverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge**

ACh	Acetylcholin
AGTR2	Angiotensin-Rezeptor 2
BChE	Butrylcholin-Esterase
cGMP/cAMP	zyklisches Guanosin/Adenosin-Monophosphat
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
ChT	Cholin-Transporter
COX	Cyclooxygenase
DAG	Diaglycerol
eGFP	enhanced Green-fluoreszenz-Protein
GDP	Guanosindiphosphat
IP3	Inositoltriphosphat
k.o.	knock out
nAChR	nikotinischer Acetylcholin Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
OCT	organische Kationentransporter
PBS	Phosphate buffered saline
PDE	Phosphodiesterase
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PLC beta-2	Phospholipase C beta 2
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion-
sGC	lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylate cyclase)
SMA	Smooth muscle actin
Tas	Taste receptor
TM	Transmembran
TrpM5	Transient receptor potential cation channel subfamily M mem. 5
VACHT	Vesiculärer Acetylcholintransporter
V-ATPase	Vacuolar-type H <sup>+</sup> -Adenosintriphosphatase

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ductus epididymidis.....	2
Abbildung 2: Schema des Nebenhodenepithels. ....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Acetylcholinzyklus.....	10
Abbildung 4: Schema eines möglichen non-neuronalen Acetylcholin-Zyklus	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung nikotinerger Acetylcholinrezeptoren ...	13
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Muskarinrezeptors .....	14
Abbildung 7: Schema der Signalkaskade der muskarinergen Acetylcholin- Rezeptoren .....	15
Abbildung 8: Schema der Bitterstoff-Signaltransduktion.....	17
Abbildung 9: ChAT exprimierende Zellen im Nebenhodenepithel.....	31
Abbildung 10: Nachweis von ChAT auf Proteinebene. ....	32
Abbildung 11: Nachweis von ChAT auf mRNA-Ebene. ....	33
Abbildung 12: ChAT+ Zellen exprimieren Keratin 5, einen Basalzellmarker. ....	35
Abbildung 13: Weitere Basalzellmarker lassen sich in ChAT exprimierenden Zellen nachweisen.....	36
Abbildung 14: ChAT+-Zellen und V-ATPase+ „Clear-Zellen“. ....	37
Abbildung 15: Komponenten der Geschmackskaskade im Nebenhoden. ....	39
Abbildung 16: Nikotinische Nervenfasern besitzen eine enge räumliche Nähe zu ChAT+-Zellen. ....	40
Abbildung 17: Kontraktions-Analysen unter Zugabe von Denatoniumbenzoat am Nebenhodengang .....	42
Abbildung 18: Kontraktions-Analysen unter Zugabe von Cycloheximid am Nebenhodengang.....	43
Abbildung 19: Zell-Zell-Kontakte im Epithel des Nebenhodens der Maus.....	47
Abbildung 20: Mögliche Auswirkung aufsteigender Infektionen auf das Nebenhodenepithel .....	51
Abbildung 21: Funktioneller Zusammenhang der aszendierenden Infektion und der ACh-Freisetzung .....	54

**10 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	Primärantikörper in der Immunfluoreszenz .....	20
Tabelle 2	Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenz .....	21
Tabelle 3	Mausspezifische Sequenzen der Oligonukleotide .....	22
Tabelle 4	Pipettierschema zur cDNA-Synthese der isolierten RNA aus Gewebe .....	29

## 11 Literaturverzeichnis

**Adamic S.** (1972) Effects of quaternary ammonium compounds on choline entry into the rat diaphragm muscle fibre. *Biochem Pharmacol.* 1;21(21):2925-9.

**Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW.** (2009) Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* 89: 73–120.

**Amann RP, Johnson L, Thompson DL Jr, Pickett BW.** (1976) Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. *Biol Reprod* 15(5):586-92.

**Aquilonius SM, Eckernäs SA, Gillberg PG.** (1981) Topographical localization of choline acetyltransferase within the human spinal cord and a comparison with some other species. *Brain Res.* 211(2):329-40.

**Arnheim N & Calabrese P.** (2009) Understanding what determines the frequency and pattern of human germline mutations. *Nature reviews. Genetics* 10(7):478-488.

**Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B.** (1997) Vesicular acetylcholine transporter (VAChT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol* 378: 454–467.

**Bachmanov AA, Beauchamp GK.** (2007) Taste receptor genes. *Annu Rev Nutr* 27:389-414. Review.

**Baumgarten HG, Holstein AF, Rosengren E.** (1971) Arrangement, ultrastructure, and adrenergic innervation of smooth musculature of the ductuli efferentes, ductus epididymis and ductus deferens of man. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 120:37-79.

**Behrens M, Meyerhof W.** (2006) Bitter taste receptors and human bitter taste perception. *Cell Mol Life Sci* 63(13):1501-9.

**Bernareggi A, Sciancalepore M, Lorenzon P.** (2019) Interplay Between Cholinergic and Adenosinergic Systems in Skeletal Muscle. Copyright ©Published by Elsevier B.V.

**Breton S, Ruan YC, Park YJ, Kim B.** (2016) Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis. *Asian Journal of Andrology* 18, 3–9.

**Comline RS.** (1946) Synthesis of acetylcholine by non-nervous tissue. *J Physiol* 105: 6-7.

**Cornwall GA.** (2009) New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 15(2): 213-227.

**Cosentino MJ, Cockett AT.** (1986) Structure and function of the epididymis. *Urol Res* 14(5): 229-240.

- Crosson GS, Sandmann E.** (2013) Kinetic Study of Denatonium Sorption to Smectite Clay Minerals Environ Eng Sci. 30(6): 311–316.
- Cyr DG, Gregory M, Dube E, Dufresne J, Chan PT, Hermo L.** (2007) Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. Asian journal of andrology 9(4):463-75.
- Dai Y, Ren K, Kurosawa K, Terayama H, Miwa Y, Sato I, Yi SQ.** (2019) The distribution of nerves supplying the testis, epididymis and accessory sex glands of *Suncus murinus*. Anat Sci Int. 94(1):128-135.
- Dani JA.** (2001) Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. Biol Psychiatry 49: 166-174.
- Deckmann K, Filipski K, Krasteva-Christ G, Fronius M, Althaus M, Rafiq A, Papadakis T, Renno L, Jurastow I, Wessels L, Wolff M, Schütz B, Weihe E, Chubanov V, Gudermann T, Klein J, Bschiepfer T, Kummer W.** (2014) Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes Proc Natl Acad Sci U S A. 3; 111(22): 8287–8292.
- Deckmann K, Filipski K, Krasteva-Christ G, Fronius M, Althaus M, Rafiq A, Papadakis T, Renno L, Jurastow I, Wessels L, Wolff M, Schütz B, Weihe E, Chubanov V, Gudermann T, Klein J, Bschiepfer T, Kummer W.** (2014) Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes. Proc Natl Acad Sci 111(22):8287-92.
- Deckmann K, Kummer W.** (2016) Chemosensory epithelial cells in the urethra: sentinels of the urinary tract. Histochem Cell Biol. 146(6):673-683.
- Eglen RM.** (2006) Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. Auton Autacoid Pharmacol 26: 219–233.
- Eliasson R, Risley PL.** (1968) Adrenergic innervation of the male reproductive ducts of some mammals. 3. Distributions of noradrenaline and adrenaline. Acta Physiol Scand 73(3): 311-319.
- Ewins AJ.** (1914) Acetylcholine, a New Active Principle of Ergot. Biochem J. 8(1):44-9.
- Felder CC.** (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. FASEB J 9: 619–625.
- Flockerzi V und Wissenbach U.** (2005) Überblick TRP-Kationenkanäle als Marker für das Prostatakarzinom und als mögliche Zielmoleküle für Medikamente. BIO spektrum 11. Jahrgang Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie Medizinische Fakultät, Universität des Saarlandes, Homburg.
- Foster SR, Blank K, See Hoe LE, Behrens M, Meyerhof W, Peart JN, Thomas WG.** (2014) Bitter taste receptor agonists elicit G-protein-dependent negative inotropy in the murine heart. FASEB J 28(10):4497-508.

- Furuse M.** (2010) Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. 2(1): a002907 Cold Spring Harb Perspect Biol.
- Gotti C, Clementi F.** (2004) Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. Prog Neurobiol 74: 363–396.
- Governini L, Semplici B, Pavone V, Crifasi L, Marrocco C, De Leo V, Arlt E, Gudermann T, Boekhoff I, Luddi A, Piomboni P.** (2020) Expression of Taste Receptor 2 Subtypes in Human Testis and Sperm. J Clin Med. 18;9(1). pii: E264.
- Grando SA, Kawashima K, Wessler I** (2003) Introduction: The non-neuronal cholinergic system in humans. Life Sci 72: 2009–2012.
- Heiniger BM, Stoffel MH, Friess AE.** (1996) Ultrastructural validation of an improved culture system for boar efferent duct epithelium. J Reprod Fertil 106(2):251-8.
- Hendrickson LM1, Guildford MJ, Tapper AR.** (2013) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: common molecular substrates of nicotine and alcohol dependence. Front Psychiatry 4:29.
- Hettinger TP, Formaker BK, Frank ME.** (2007) Cycloheximide: no ordinary bitter stimulus. Behav Brain Res 180(1):4-17.
- Hollenhorst MI, Jurastow I, Nandigama R, Appenzeller S, Li L, Vogel J, Wiederhold S, Althaus M, Empting M, Altmüller J, Hirsch AKH, Flockerzi V, Canning BJ, Saliba AE, Krasteva-Christ G.** (2020) Tracheal brush cells release acetylcholine in response to bitter tastants for paracrine and autocrine signaling FASEB J.;34(1):316-332.
- Holstein A. Benninghoff.** Anatomie, 17. Auflage 2008.
- Holstein AF, Maekawa M, Nagano T, Davidoff MS.** (1996) Myofibroblasts in the lamina propria of human semi-iferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. Arch Histol Cytol 59(2): 109-125.
- Holvoet, J-P.** "Denatonium". Sentinalco. Retrieved 2 October 2015.
- Horiuchi Y, Kimura R, Kato N, Fujii T, Seki M, Endo T, Kato T, Kawashima K.** (2003) Evolutional study on acetylcholine expression. Life Sci 72: 1745–1756.
- Huh KH, Fuhrer C.** (2002) Clustering of nicotinic acetylcholine receptors: from the neuromuscular junction to interneuronal synapses. Mol Neurobiol. 25(1):79-112.
- Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, Fostieri E, Lagoumintzis G, Lazaridis K, Sideri A, Zouridakis M, Tzartos SJ.** (2007) Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. FEBS J 274(15): 3799–3845.
- Kaleczyc J, Majewski M, Calka J, Lakomy M.** (1993) Adrenergic innervation of the epididymis, vas deferens, accessory genital glands and urethra in the boar. Folia Histochem Cytobiol 31(3): 117-123.

- Kawashima K, Misawa H, Moriwaki Y, Fujii YX, Fujii T, Horiuchi Y, Yamada T, Imanaka T, Kamekura M.** (2007) Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous systems. *Life Sci* 80: 2206– 2209.
- Kengaku M, Misawa H, Deguchi T.** (1993) Multiple mRNA species of choline acetyltransferase from rat spinal cord. *Brain Res Mol Brain Res* 18:(1-2):71-6.
- Kim B, Roy J, Shum WWC, Da Silva N, Breton S.** (2015) Role of Testicular Luminal Factors on Basal Cell Elongation and Proliferation in the Mouse Epididymis *Biol Reprod.* 2015 Jan; 92(1): 9.
- Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Munch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Hohle KD, Schemann M, Racke K, Wessler I.** (1997) Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355: 515-523.
- Koslov DS, Andersson KE.** (2013) Physiological and pharmacological aspects of the vas deferens-an update. *Front Pharmacol* 4: 101.
- Krasteva G, Canning BJ, Hartmann P, Veres TZ, Papadakis T, Mühlfeld C, Schliecker K, Tallini YN, Braun A, Hackstein H, Baal N, Weihe E, Schütz B, Kotlikoff M, Ibanez-Tallon I, Kummer W.** (2011) Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(23): 9478–9483.
- Krasteva G, Canning BJ, Hartmann P, Veres TZ, Papadakis T, Mühlfeld C, Schliecker K, Tallini YN, Braun A, Hackstein H, Baal N, Weihe E, Schütz B, Kotlikoff M, Ibanez-Tallon I, Kummer W.** (2011) Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proc Natl Acad Sci* 108(23):9478-83.
- Kujala M, Hihnala S, Tienari J, Kaunisto K, Hastbacka J, Holmberg C.** (2007) Expression of ion transport-associated proteins in human efferent and epididymal ducts. *Reproduction* 133(4): 775-784.
- Kummer W, Lips KS, Pfeil U.** (2008) The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol* 130: 219–234.
- Lee RJ, Chen B, Redding KM, Margolskee RF, Cohen NA.** (2014) Mouse nasal epithelial innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecules require taste signaling components. *Innate Immun* 20(6): 606–617.
- Leung PS, Chan HC, Chung YW, Wong TP, Wong PY.** (1998) The role of local angiotensins and prostaglandins in the control of anion secretion by the rat epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 53: 15-22.
- Brixel LR, Monteilh-Zoller MK, Ingenbrandt CS, Fleig A, Penner R, Enklaar T, Zabel BU, Prawitt D.** (2010) TRPM5 regulates glucose-stimulated insulin secretion *Pflugers Arch.* 460(1): 69–76.
- Liman ER.** (2007) TRPM5 and taste transduction. *Handb Exp Pharmacol.* 2007;(179):287-98.

- Lindemann B.** (2001) Receptors and transduction in taste. NATURE vol 413 insight review articles.
- Hendrickson LM, Guildford MJ, Tapper AR.** (2013) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: common molecular substrates of nicotine and alcohol dependence. Front. Psychiatry 10.3389/fpsyt.2013.00029.
- Liu M, Qian W, Subramaniyam S, Liu S, Xin W.** (2020) Denatonium enhanced the tone of denuded rat aorta via bitter taste receptor and phosphodiesterase activation. Eur J Pharmacol. 7;872:172951.
- Loewi O.** (1921) Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. Pflügers Arch 189(1): 239–242.
- Lossow K, Hübner S, Roudnitzky N, Slack JP, 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.
- Lubicz-Nawrocki CM, Lau NI, Chang MC.** (1973) The fertilizing life of spermatozoa in the cauda epididymidis of mice and hamsters. J Reprod Fertil 35(1):165-8.
- Macmillan EW und Auckland J.** (1960) The transport of radio-opaque medium through the initial segment of the rat epididymis. J. Reprod. Fert. 1, 139-145.
- Mandon M, Hermo L, Cyr DG.** (2015) Isolated Rat Epididymal Basal Cells Share Common Properties with Adult Stem Cells. Biol Reprod. 93(5): 115.
- Margolskee RF.** (2002) Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. J Biol Chem 277(1):1-4.
- Mewe M, Bauer CK, Muller D, Middendorff R.** (2006a) Regulation of spontaneous contractile activity in the bovine epididymal duct by cyclic guanosine 5'monophosphate-dependent pathways. Endocrinology 147(4): 2051-2062.
- Mewe M, Bauer CK, Schwarz JR, Middendorff R.** (2006b) Mechanisms regulating spontaneous contractions in the bovine epididymal duct. Biol Reprod 75(4): 651-659.
- Mewe M, Wulfsen I, Middendorff R, Bauer CK.** (2007) Differential modulation of bovine epididymal activity by oxytocin and noradrenaline. Reproduction 134(3): 493-501.
- Mietens A, Tasch S, Feuerstacke C, Eichner G, Volkmann J, Schermuly RT.** (2012) Phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibition, ANP and NO rapidly reduce epididymal duct contractions, but long-term PDE5 inhibition in vivo does not. Mol Cell Endocrinol 349(2): 145-153.
- Mietens A, Tasch S, Stammler A, Konrad L, Feuerstacke C, Middendorff R.** (2014). Time-lapse imaging as a tool to investigate contractility of the epididymal duct-effects of cgmp signaling. PLoS One 9(3): e92603.

- Misawa H, Matsuura J, Oda Y, Takahashi R, Deguchi T.** (1995) Human choline acetyltransferase mRNAs with different 5'-region produce a 69-kDa major translation product. *Brain Res Mol Brain Res* 44(2):323-33.
- Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, Numa S.** (1986) Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptors. *Nature* 22: 406–411.
- Nachmansohn D, Machado AL.** (1943) The formation of acetylcholine. A new enzyme: "Choline acetylase". *J Neurophysiol* 6: 397–403.
- Ockenga W, Kühne S, Bocksberger S, Banning A und Tikkanen R.** (2013) Non-Neuronal Functions of the M2 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Genes* 4(2), 171-197.
- Oda Y.** (1999) Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int.* 49(11):921-37.
- Okuda T, Haga T.** (2000) Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett* 484: 92–97.
- Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, Katsura I.** (2000) Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci* 3: 120– 125.
- Okumus S, Demiryürek S, Gürler B, Coskun E, Bozgeyik I, Oztuzcu S, Kaydu E, Celik O, Erbagcı I and Demiryürek AT.** (2013) Association transient receptor potential melastatin channel gene polymorphism with primary open angle glaucoma. *Mol Vis*; 19: 1852–1858.
- Paüfler SK, Foote RH.** (1968) Morphology, motility and fertility of spermatozoa recovered from different areas of ligated rabbit epididymides *J Reprod Fertil.* 17(1):125-37.
- Pfeil U, Vollerthun R, Kummer W, Lips KS.** (2004) Expression of the cholinergic gene locus in the rat placenta. *Histochem. Cell Biol* 122: 121-130.
- Pietrement C, Sun-Wada GH, Silva ND, McKee M, Marshansky V, Brown D.** (2006). Distinct expression patterns of different subunit isoforms of the V-ATPase in the rat epididymis. *Biol Reprod* 74(1): 185-194.
- Proskocil BJ.** (2004) Acetylcholine Is an Autocrine or Paracrine Hormone Synthesized and Secreted by Airway Bronchial Epithelial Cells. *Endocrinology* 145: 2498–2506.
- Raftery MA, Hunkapiller MW, Strader CD, Hood LE.** (1980) Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science* 208(4451): 1454–1456.
- Ricker DD.** (1998) The autonomic innervation of the epididymis: its effects on epididymal function and fertility. *J Androl* 19(1): 1-4.
- Riera CE, Vogel H, Simon SA, Damak S, le Coutre J.** (2009) Sensory attributes of complex tasting divalent salts are mediated by TRPM5 and TRPV1 channels. *J Neurosci.* 25;29(8):2654-62.

- Robaire B, Hamzeh M.** (2011) Androgen action in the epididymis. *J Androl* 32(6): 592599.
- Robaire B, Hinton BT.** (2015) Kapitel 17 The Epididymis. In: Plant TM, Zeleznik AJ (Hg): *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Academic Press 4. Auflage 691-771.
- Robaire B, Hinton BT; Orgebin-Crist MC.** (2006) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, CHAPTER 22 The Epididymis. Third Edition edited by Jimmy D. Neill, Elsevier ©
- Rossier J.** (1977) Acetyl-coenzyme A and coenzyme A analogues. Their effects on rat brain choline acetyltransferase. *Biochem J* 165: 321–326.
- Ruiz-Avila L, McLaughlin SK, Wildman D, McKinno PJ, Robichon A, Spickofsky N und Margolskee RF.** (1995) Coupling of bitter receptor to phosphodiesterase through transducin in taste receptor cells. *Nature* 376, 80–85.
- Ruiz-Avila L, Wong GT, Damak S, Margolskee RF.** (2001) Dominant loss of responsiveness to sweet and bitter compounds caused by a single mutation in  $\alpha$ -gustducin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(15): 8868–8873.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York
- Sanderson MJ, Madison JM.** (2010) Bitter treats for better breathing. *Nat Med* 16(11):1190-1.
- Sastry BV, Sadavongvivad C.** (1978) Cholinergic systems in non-nervous tissues. *Pharmacol Rev* 30: 65–132.
- Schirmer SU, Eckhardt I, Lau H, Klein J, DeGraaf YC, Lips KS, Pineau C, Gibbins IL, Kummer W, Meinhardt A, Haberberger RV.** (2011) The cholinergic system in rat testis is of non-neuronal origin. *Reproduction* 142(1):157-66.
- Schuller HM.** (2009) Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nat Rev Cancer* 9: 195–205.
- Schünke, Schulte, Schumacher** (2014) *Prometheus, Innere Organe*. Thieme; Grafiker: Markus Voll.
- Sergeant GP, Hollywood MA, Thornbury KD.** (2019) Spontaneous Activity in Urethral Smooth Muscle.. *Adv Exp Med Biol*. 1124:149-167.
- Shi P, Zhang J, Yang H, Zhang YP.** (2003) Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in Mammalian evolution. *Mol Biol Evol* 20:805–814.
- Shum WW, Da Silva N, Brown D, Breton S.** (2009). Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *J Exp Biol* 212(Pt 11):1753-61.

- Shum WW, Da Silva N, McKee M, Smith PJ, Brown D, Breton S.** (2008) Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell* 135(6): 1108-1117.
- Silverthorn DU.** (2007) *Physiologie*. Vierte Auflage Pearson Studium (Kapitel 8, Seite 408).
- Siu ER, Yasuhara F, Maróstica, Avellar ACW, Porto CS.** (2006) Expression and localization of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in rat efferent ductules and epididymis. *Cell Tissue Res* 323: 157-166.
- Sobotta J, Welsch U.** (2009) *Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie*. München: Elsevier Urban & Fischer 2. Auflage 406-424.
- Sorbi S, Amaducci L, Albanese A, Gainotti G.** (1980) Biochemical differences between the left and right hemispheres. Preliminary observations on choline acetyltransferase (CAT) activity. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 56(21):2266-70.
- Starke K.** (2001) *Pharmakologie cholinergischer Systeme*. In: W Forth, D Henschler, W Rummel, U Förstermann, K Starke. (Eds.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 3. Aufl., Urban & Fischer, München, Jena: 147-174.
- Tansey EM.** (2006) Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *C R Biol* 329: 419–425.
- Tizzano M und Finger TE.** (2013) Chemosensors in the Nose: Guardians of the Airways. *PHYSIOLOGY* 28: 51–60.
- Tooyama I, Kimura H.** (2000) A protein encoded by an alternative splice variant of choline acetyltransferase mRNA is localized preferentially in peripheral nerve cells and fibers. *J Chem Neuroanat.* 17(4):217-26.
- Tucek S.** (1982) The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol* 322: 53–69.
- Turner TT, Howards SS.** (1978) Factors involved in the initiation of sperm motility. *Biol Reprod* 18(4): 571-578.
- Ualiyeva S, Yoshimoto E, Barrett NA, Bankova LG.** (2019) Isolation and Quantitative Evaluation of Brush Cells from Mouse Tracheas. *J Vis Exp.* 12;(148).
- Veeramachaneni DN, Amann RP.** (1990) Oxytocin in the ovine ductuli efferentes and caput epididymidis: immunolocalization and endocytosis from the luminal fluid. *Endocrinology* 126(2): 1156-1164.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K.** (1998) Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther* 77: 59–79.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K.** (1999) The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 198–205.

**White HL, Wu JC.** (1973) Choline and carnitine acetyltransferases of heart. *Biochemistry* 12: 841–846.

**Witzemann V, Barg B, Nishikawa Y, Sakmann B, Numa S.** (1987) Differential regulation of muscle acetylcholine receptor  $\gamma$ - and  $\epsilon$ -subunit mRNAs. *FEBS Lett* 223: 104–112.

**Wu D, Hersh LB.** (1994) Choline Acetyltransferase: Celebrating Its Fiftieth Year. *J Neurochem.* 62: 1653–1663.

**Xu J, Cao J, Iguchi N, Riethmacher D, Huang L.** (2013) Functional characterization of bitter-taste receptors expressed in mammalian testis. *Mol Hum Reprod* 19(1):17-28.

**Yan W, Sunavala G, Rosenzweig S, Dasso M, Brand JG, Spielman AI.** (2001) Bitter taste transduced by PLC-beta(2)-dependent rise in IP(3) and alpha-gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides. *Am J Physiol Cell Physiol.*

## 12 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 JustusLiebig-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.“

Wetzlar, 18.06.2020

Ludmilla Dorscht

### 13 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Professor Ralf Middendorff bedanken für die warmherzige, freundliche und vor allem geduldige Betreuung meiner Doktorarbeit auch in den chaotischen Abschnitten meines Lebens.

Natürlich danke ich an dieser Stelle der gesamten lustigen und einzigartigen Arbeitsgruppe Signaltransduktion. Ganz besonders muss ich hier Sabine Tasch nennen, nicht nur für ihre fast tägliche Labor-Unterstützung, sondern auch für die viele emotionale und freundschaftliche Begleitung durch diese interessante Zeit. Aber auch Caro und Ingrid möchte ich für ihre Hilfe bei den Versuchen und die freundlichen Diskussionen danken.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer und seiner Arbeitsgruppe, darunter Dr. Klaus Deckmann, Alexander Perniß, Tamara Papadakis, Martin Bodenbenner-Türich und Dr. Uwe Pfeil für das freundlicherweise bereit gestellte Gewebe und Material sowie die hilfreichen Gespräche.

Ich möchte mich auch von Herzen bei meiner unglaublichen Familie bedanken, die immer an mich geglaubt und mich unterstützt hat, vor allem ein riesen Dankeschön an meinen einzigartigen Ehemann Jürgen und meine bezaubernden Kinder - Ich liebe euch.

Danken will ich auch meinen Eltern Olga und Reinhold Wittlif: Ihr seid der Grund, warum ich da bin, wo ich jetzt bin. Ihr habt mir den Rücken gestärkt und mir zusammen mit der besten Oma der Welt, Valentina, durch unzählige Babysitten Zeit für all das hier freigeräumt. Ebenso dankbar bin ich meinem großen Bruder Eugen Wittlif, der immer für mich da war und mir Mut gemacht hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meiner Schwester Ines Werner. Ich hab in dir nicht nur eine Schwester, eine beste Freundin, eine Vertraute sondern auch eine liebevolle Psychotherapeutin, die mir schon so oft die Augen geöffnet und mich geerdet hat. Ich danke dir für deine Hilfe während des Studiums und der Doktorarbeit, für all deine emotionale und fachliche Unterstützung und dafür, dass du mir immer sagst, was gesagt werden muss (auch wenn ich es manchmal nicht gerne höre).