

Katharina Johanna Filipski

Die cholinerge chemosensitive Bürstenzelle
im Urogenitaltrakt

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



edition wissenschaft
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

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

1. Auflage 2017

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

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Die cholinerge chemosensitive Bürstenzelle im Urogenitaltrakt

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

vorgelegt von

Katharina Johanna Filipski

aus Ozimek/Polen

Gießen 2016

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

Betreuer: Prof. Dr. med. Wolfgang Kummer

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. phil. Thomas Bschiepfer

Tag der Disputation: 24. Oktober 2017

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Anatomie und Histologie der Urethra und der akzessorischen Geschlechtsdrüsen .	1
1.1.1	Männchen.....	1
1.1.2	Weibchen.....	4
1.2	Die neuroendokrine Zelle im Urogenitaltrakt.....	5
1.2.1	Von den Anfängen ihrer Beschreibung in der Urethra als „Helle Zelle“ nach Feyrter bis zur Bezeichnung als „neuroendokrine Zelle“ durch Pearse.....	5
1.2.2	Sekretionsprodukte der neuroendokrinen Zelle und ihre Funktion im urogenitalen Organsystem	6
1.2.3	Lokalisationen bevorzugten Vorkommens neuroendokriner Zellen im Urogenitaltrakt von Tier und Mensch.....	8
1.3	Gustatorische Signaltransduktionsmechanismen in der murinen Geschmacksknospe.....	9
1.3.1	Funktionsweise des heterotrimeren G-Proteins „Gustducin“ und seine Kopplung an Geschmacksrezeptoren	9
1.3.2	Identifizierung und Charakterisierung der GPCRs der Familien Tas1r und Tas2r	10
1.3.3	Bedeutung der Signalproteine Adenylatzyklase und Phospholipase C β 2 sowie ihrer second messenger cAMP bzw. IP ₃ und des Ionenkanals „TRPM5“ für die Erregung süß- und bitter-detektierender geschmacksrezeptiver Zellen.....	10
1.4	Die cholinerge Bürstenzelle der Atemwege und ihr chemosensitives Potential	12
1.4.1	Entdeckung der Bürstenzelle im trachealen Epithel und strukturelle Ana- lyse ihres Mikrovillisaums	12
1.4.2	Expression von Komponenten der geschmackszellspezifischen Signaltrans- duktionskaskade durch die tracheale Bürstenzelle und ihre „Wächterfunk- tion“	13
1.5	Fragestellung.....	14
2.	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Chemikalien und Reagenzien	16
2.2	Lösungen und Puffer	16
2.3	Antikörper	18
2.3.1	Primäre Antikörper.....	18

2.3.2	Sekundäre Antikörper	19
2.4	Laborbedarf und Geräte	20
2.4.1	Laborbedarf	20
2.4.2	Geräte	21
2.5	Tiere	21
2.6	Gewebebegewinnung und -aufbereitung	21
2.6.1	Perfusionsfixation.....	21
2.6.2	Gewebepräparation	22
2.6.3	Darstellung des Harntrakts durch transurethrale retrograde Farbstoffinjektion	22
2.6.4	Aufbereitung des Gewebes für die Kryokonservierung.....	23
2.7	Herstellung von Gefrierschnitten	23
2.8	Indirekte Immunhistochemie	23
2.8.1	Einfache indirekte Immunhistochemie.....	23
2.8.2	Doppelimmunfluoreszenz	24
2.9	Auswertung am Fluoreszenzmikroskop.....	25
2.9.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	25
2.9.2	Auswertung der inkubierten Schnittpräparate	26
2.10	Spezifitätskontrollen der immunhistochemischen Markierungen	27
2.10.1	Positivkontrolle	27
2.10.2	Negativkontrolle.....	27
2.10.3	Präabsorptionskontrolle.....	28
2.11	Auszählung der Zellen und statistische Auswertung.....	28
3.	ERGEBNISSE	29
3.1	Abschnittsgliederung der Urethra	29
3.1.1	Männchen.....	29
3.1.2	Weibchen.....	30
3.2	Vorkommen solitärer cholinerges Epithelzellen im Urogenitaltrakt.....	34
3.2.1	Nierenbecken, Ureteren und Harnblase.....	34
3.2.2	Urethra und akzessorische Drüsen des Männchens.....	34
3.2.3	Urethra und akzessorische Drüsen des Weibchens.....	37

3.3	Abgrenzung neuroendokriner Zellen von solitären cholinergen Epithelzellen.....	39
3.3.1	Form neuroendokriner Zellen in den Urethrae und periurethralen Drüsen von männlicher und weiblicher Maus	39
3.3.2	Verteilung PGP-, 5-HT- und CgA-positiver neuroendokriner Zellen	42
3.3.2.1	Urethra der männlichen Maus.....	42
3.3.2.2	Periurethrale Drüsen und akzessorische Drüsen der männlichen Maus	42
3.3.2.3	Urethra der weiblichen Maus.....	43
3.3.2.4	Periurethrale Drüsen der weiblichen Maus.....	43
3.3.3	Intra- und subepitheliale Nervenfasern in der Urethra.....	43
3.4	Cholinerge und nicht-cholinerge Bürstenzellen in der Urethra.....	44
3.4.1	Villin-Immunreaktivität cholinerg und nicht-cholinerg Epithelzellen .	44
3.4.1.1	Urethra der männlichen Maus	44
3.4.1.2	Periurethrale Drüsen und akzessorische Drüsen der männlichen Maus	46
3.4.1.3	Urethra der weiblichen Maus.....	46
3.4.1.4	Periurethrale Drüsen der weiblichen distalen Urethra	46
3.4.2	Gestalt und Lage der cholinergen Bürstenzelle und ihrer Fortsätze	46
3.4.3	Gestalt und Lage der nicht-cholinergen Bürstenzelle und ihrer Fortsätze .	48
3.5	Komponenten der gustatorischen Signaltransduktion in cholinergen Bürstenzellen.....	51
3.5.1	Gustducin.....	51
3.5.1.1	Urethra der männlichen Maus	51
3.5.1.2	Periurethrale Drüsen und akzessorische Drüsen der männlichen Maus	51
3.5.1.3	Urethra der weiblichen Maus.....	51
3.5.1.4	Periurethrale Drüsen der weiblichen Maus.....	51
3.5.2	PLC β 2	53
3.5.2.1	Urethra der männlichen Maus	53
3.5.2.2	Periurethrale Drüsen und akzessorische Drüsen der männlichen Maus	53
3.5.2.3	Urethra der weiblichen Maus.....	54
3.5.2.4	Periurethrale Drüsen der weiblichen Maus.....	54
3.5.3	TRPM5.....	54
3.5.3.1	Urethra der männlichen Maus	54
3.5.3.2	Periurethrale Drüsen und akzessorische Drüsen der männlichen Maus	56

3.5.3.3	Urethra der weiblichen Maus.....	56
3.5.3.4	Periurethrale Drüsen der weiblichen Maus.....	56
3.5.4	Inkubation der Urethra mit Tas1r3-Immunsereen.....	57
3.6	Nachweis von Bürstenzellen und Komponenten der gustatorischen Signaltransduktion im Epithel der Urethrae von Wildtypmäusen	60
4.	DISKUSSION	64
4.1	Die cholinerge urethrale Zelle ist eine Bürstenzelle und kontaktiert das urethrale Lumen	64
4.2	Abgrenzung neuroendokriner Zellen von cholinergen Bürstenzellen in der Urethra.....	66
4.2.1	Histomorphologie der urethralen neuroendokrinen Zelle im Vergleich zu Vorarbeiten.....	66
4.2.2	Neuroendokrine und chemosensorische Zellen bilden distinkte Zellpopulationen in der Urethra: Unterschiede in Ultrastruktur, Immunhistochemie und Vorkommen	67
4.2.3	Funktion der einzelnen und im Zellverband organisierten neuroendokrinen Zelle	71
4.3	Die cholinerge Bürstenzelle detektiert Substanzen im Lumen der Urethra über die kanonische gustatorische Signaltransduktionskaskade.....	73
4.3.1	Gustducin- und PLC β 2-vermittelte Signaltransduktion	73
4.3.2	Alternative G α -Untereinheiten in der gustatorischen Signaltransduktionskaskade	76
4.3.3	Alternative PLC-Isoformen in der gustatorischen Signaltransduktionskaskade	78
4.3.4	Bedeutung von TRPM5 in der gustatorischen Signaltransduktionskade....	79
4.4	Mechanismen der Signalübermittlung aktivierter urethraler chemosensitiver Bürstenzellen	80
4.4.1	Erregung peptiderger CGRP/PGP-positiver und PGP-positiver Nervenfasern und die Wirkung des CGRP im Harntrakt	80
4.4.2	Funktionelle Kopplung mit neuroendokrinen Zellen in Analogie zu Typ-II- und -III-Zellen in der Geschmacksknospe.....	83
4.5	Funktionen der cholinergen chemosensitiven Bürstenzelle im Urogenitaltrakt	85

4.5.1	Systemische Wächterfunktion: Detektion schädigender Mikroorganismen im urethralen Lumen und potentielle Einleitung des urethrovesikalen Reflexes als Schutzmechanismus gegen die bakterielle Besiedlung des Harntrakts	86
4.5.2	Lokale Abwehrmechanismen und Ausblick auf die Interaktion mit dem Immunsystem am Beispiel der gastrointestinalen chemosensitiven Bürstenzelle	89
4.6	Mögliche Funktionen der non-cholinergen urethralen Bürstenzelle	91
4.6.1	Mechanozeption	91
4.6.2	PH-sensing	93
4.6.3	Thermosensation	95
5.	SCHLUSSFOLGERUNGEN	96
6.	ZUSAMMENFASSUNG	99
7.	SUMMARY	100
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	101
9.	LITERATURVERZEICHNIS	103
10.	ANHANGSTABELLEN	115
11.	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS UND AUFLISTUNG DER KONGRESSBEITRÄGE	139
12.	ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	140
13.	DANKSAGUNG	141

1. EINLEITUNG

1.1 Anatomie und Histologie der Urethra und der akzessorischen Geschlechtsdrüsen

1.1.1 Männchen

Die männliche Urethra erstreckt sich vom *Ostium urethrae externum* am Penis über den Blasen Hals bis zum *Ostium urethrae internum*, wo sie in die Harnblase übergeht [93].

Als gemeinsame Endstrecke des Harn- und Genitalsystems durchfließen sowohl Harn als auch Ejakulat die Urethra, wobei letzteres u.a. eine Zusammensetzung aus Sekreten der männlichen akzessorischen Geschlechtsdrüsen darstellt, die auf unterschiedlicher Höhe in die Urethra münden. Aus anatomischer Sicht lässt sich die Harnröhre in einen penilen und einen pelvinen Abschnitt unterteilen (vgl. Abb. 1.1); der Übergang vom Penis zum Becken wird dabei durch das urethrale Divertikel geschaffen [69, 79, 167].

Die äußere Öffnung der Urethra befindet sich im Bereich der *Fossa urethrae* [201] an der Penis Spitze unter der Vorhaut, welche den Penisschaft umsäumt, um distal schlitzförmig auszulaufen [159]. Hier münden zudem die Vorhautdrüsen, die als modifizierte Talgdrüsen beidseits lateral der Peniswurzel gelegen sind [79, 93]. Mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, das die inwendige Fläche der Vorhaut und die *Glans penis* bedeckt, kleidet auch die *Fossa urethrae* bzw. das *Ostium urethrae externum* aus [23, 93, 159, 201].

Außerhalb der *Fossa urethrae* verliert die urethrale Mukosa ihre Verhornung und besteht bis zur Peniswurzel aus mehrschichtigem hochprismatisches Epithel, dem sich nach außen eine *Lamina propria* und elastisches Bindegewebe anschließen [156, 159]. Da die Urethra innerhalb des *Corpus spongiosum* verläuft, ist sie in aus weiten Sinusoiden bestehendem erektilen Gewebe eingebettet [6, 44, 65, 93]. Nagetiere verfügen darüber hinaus über eine penile knöcherne Struktur, das *Os penis*, das von Penis Spitze bis Penisbasis mittig liegt. Entsprechend befindet sich die Harnröhre im Bereich der Peniswurzel ventral des *Os penis* [93, 159, 201].

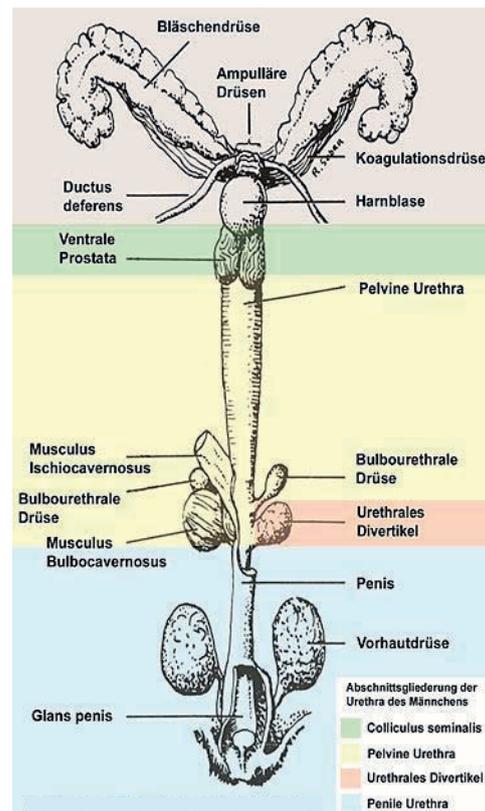


Abb. 1.1 Schematische Übersicht über die Abschnitte der Urethra der männlichen Maus, modifiziert nach [79], Abdruck mit Genehmigung von Dover Publications, Inc.

Nach proximal setzt sich das *Corpus spongiosum* in den *Bulbus penis* fort, der eine zwiebelartige Auftreibung in Nachbarschaft der Symphyse darstellt [159, 167]. Das innerhalb des *Bulbus* verlaufende Harnröhrenstück weitet sich auf und bildet den *Sinus urethralis* (Tullberg, 1899 zitiert in [65]), ein sackartiges Divertikel. Je nach Füllungszustand des Lumens variiert diese lokale Aussackung in ihrer Ausdehnung und lässt Gabelungen erkennen [65, 79, 146]. Die Mukosa der Urethra geht kontinuierlich in die des Divertikels über, wobei dessen Epithelauskleidung aus wenigeren Zellschichten bestehen kann [65]. Das Divertikel wird von dicht geballtem Drüsengewebe umgeben, welches vorwiegend beidseits lateral zwischen die Sinusoide des kavernösen Gewebes des *Bulbus* interponiert ist und durch Trabekel der sich von außen anschließenden glatten Muskulatur septiert wird [65, 79]. Die sich in der Wand des Divertikels befindenden periurethralen Drüsen (PUD) drainieren ihr Sekret in die urethrale Ausbuchtung über Ausführungsgänge (periurethrale Drüsenausführungsgänge, PUDAG) mit niedrigem, kubischem Epithel. Im Schwellkörpergewebe und in der im Penis distal des *Bulbus* verlaufenden Urethra fehlen PUD [23, 65, 146]. Im Divertikel münden zudem die Ausführungsgänge der bulbourethralen Drüsen [23, 65, 144, 156]. Dieses paarige Organ wird bei der Maus analog zur Benennung beim Menschen als *Cowpersche Drüse* bezeichnet [65, 93, 144] und ist auf Höhe des urethralen Divertikels angesiedelt [93]. Auf ihrem Weg vom Drüsenkörper zum Divertikel penetrieren die Drüsenausführungsgänge (AG) der bulbourethralen Drüsen das spongiöse Gewebe des *Bulbus penis*, wobei sie zwischen den zahlreichen Sinusoiden und paraurethralen Drüsenpaketen an ihrer Auskleidung mit kubischem Epithel zu erkennen sind [23, 65, 93]. Beim Blick in die eröffnete Bauchhöhle der männlichen Maus ist das Divertikel zunächst nicht erkennbar, da es gänzlich vom *Musculus bulbocavernosus* umhüllt wird [65, 79, 146].

Ausgekleidet durch ein hochprismatisch mehrschichtiges Epithel mit stellenweise mehrreihiger Differenzierung [156, 167] verläuft der aus dem urethralen Sinus hervorgehende pelvine Teil der Harnröhre nach kranial [146] und vereinigt sich auf Höhe des *Colliculus seminalis* mit den Ausführungsgängen der Koagulationsdrüsen, ventraler, dorsaler und lateraler Prostata sowie den gemeinsamen exkretorischen Gängen der Bläschendrüsen und der *Ductus deferentes* einschließlich deren glandulären ampullären Strukturen [93]. Die pelvine Urethra wird von dichten paraurethralen Drüsenansammlungen innerhalb der *Lamina propria* umsäumt, deren Sekret über multiple Ausführungsgänge in den benachbarten Harnröhrenabschnitt drainiert wird [23, 65, 146, 201]. In Bezug auf ihr histologisches Erscheinungsbild und ihre immunologisch bedeutsame Sekretion von IgA besteht zwischen dem paraurethralen Drüsengewebe von Becken- und Bulbusurethra kein Unterschied [23, 146]. Mukosa und Drüseneinheiten werden von einer ausgeprägten

Schicht quergestreiften Muskelgewebes und Bindegewebes umschlossen [6, 23, 156, 201].

Bevor die pelvine Urethra in den Blasenhalss übergeht, wird ihr Lumen durch den sich von dorsal vorwölbenden *Colliculus seminalis* eingeengt [79]. An ihren proximalen, urethranahen Enden besitzen die *Ductus deferentes* Erweiterungen, die *Ampullae*. Verzweigt-tubuläre Drüsenpakete drainieren ihr Sekret unmittelbar in die *Ampullae*. Die Ausführungsgänge der Bläschendrüsen münden ebenfalls am *Colliculus seminalis* in die Urethra, indes bildet sich gelegentlich ein gemeinsamer exkretorischer Gang mit der *Ampulla ductus deferenti* der jeweiligen Seite aus, im Gegensatz zur anatomischen Situation bei der Ratte, die regelrecht über einen fusionierten Ausführungsgang verfügt [6, 79]. Unabhängig von den *Ampullae* und Bläschendrüsen öffnen sich im anterioren Bereich kranial des *Colliculus seminalis* die paarigen Ausführungsgänge der Koagulationsdrüsen, einem der unteren Kurvature der Bläschendrüsen anliegenden Organ, das als anteriorer Anteil der Prostata gilt [79, 93, 156, 184]. Weiterhin besteht die Prostata der Maus aus einem doppelt angelegten dorsalen Lappen, lokalisiert im Winkel zwischen Bläschendrüse und dorsalem urethralen Wandgefüge. Über ca. 25 Ausführungsgänge vereinigt sich die dorsale Prostata mit der Urethra dorsal in der Umgebung des *Colliculus seminalis*. Zudem lassen sich hier weitere 20 ausführende Gänge unterscheiden, die der lateralen Prostata angehören. Trotz gemeinsamer ortsbezogener Einmündung umläuft die laterale Prostata ebenfalls als paarig ausgebildetes Organ die Urethra in ventrolateraler Richtung, um die Kapsel der ventralen Prostata zu penetrieren und sich zusammen mit den ventralen Drüsenanteilen zu verzweigen [184]. Die beiden ventralen Prostatalappen befinden sich mittig vor dem Blasenhalss, wo sie über einen bis drei Hauptausführungsgänge Anschluss an die ventrale Wand der pelvinen Urethra gewinnen [79, 156, 184].

Während das Lumen der durch den *Colliculus seminalis* eingeengten Urethra distal vorerst noch mit einem mehrschichtigen, hochprismatischen Epithel ausgekleidet ist, wandelt sich der Epitheltyp mit zunehmender Höhe in Richtung Harnblase, so dass schon im Blasenhalss transitorisches Epithel vorliegt [6, 167, 186]. Romih et al. beschrieben den Übergang zwischen transitorischem und mehrschichtigem Epithel, den sie anhand elektronenmikroskopischen und immunhistochemischen Vorgehensweisen an der Maus untersuchten und am distalen Punkt des Blasenhalss ansiedelten, als abrupt [167]. Das Urothel der Harnblase und ihres Halses verfügt über einen charakteristischen Aufbau aus basalen, intermediären und oberflächlichen Deckzellen, wobei letztere die urothelspezifischen Differenzierungsmarker Uroplakin Ib und Cytokeratin (CK) 20 exprimieren. Diese Differenzierung fehlt der mehrschichtigen Mukosa der proximalen Urethra [156, 167].

1.1.2 Weibchen

Beim Weibchen hingegen ist die Harnröhre wesentlich kürzer und aus funktioneller Sicht nicht an das Genitalsystem angebunden (vgl. Abb. 1.2) [79, 154, 167]. Die Klitoris als eine von Haaren bedeckte Erhebung befindet sich an der anterioren Wand der Vagina [79, 162]. In der *Fossa clitoridis* innerhalb der Klitoris liegt die urethrale Öffnung [79, 162]. Das *Ostium urethrae externum* ist analog zum *Ostium externum* der männlichen murinen Harnröhre ebenfalls von mehrschichtigem, verhorntem Plattenepithel ausgekleidet [154]. Die Urethra durchläuft das Schwellkörpergewebe der Klitoris zusammen mit einer ihr ventral angelagerten, dem *Os penis* des Männchens ähnelnden Struktur [79, 154, 162]. Zu beiden Seiten dieser knöchernen Struktur erstrecken sich die Ausführungsgänge der Klitorisdrüsen, deren talghaltiges Sekret in die *Fossa clitoridis* abgegeben wird [79, 162]. Mit ihrer dorsalen Wand grenzt die Urethra im weiteren Verlauf nach proximal an die Vagina, so dass in diesem Bereich eine gemeinsame Adventitia ausgebildet ist [79, 162]. Die urethrale Mukosa besteht bis zum Blasenhals aus kubischem, mehrreihigem Epithel, das bis zu acht Schichten aufweisen kann [154]. Nach außen schließen sich eine kollagen- und fibroblastenreiche *Lamina propria* mit zahlreichen Nervenfasern

sowie glatte und quergestreifte Muskulatur an. Diese Muskelzüge sind vornehmlich zirkulär ausgerichtet, verlaufen lateral jedoch zusätzlich longitudinal [154]. Des Weiteren fällt innerhalb der *Lamina propria* ein kavernoöses Gewebemuster auf, das den Sinusoiden der Schwellkörper beim Männchen ähnelt [154]. Auch beim Weibchen ist die Submukosa durchsetzt von PUD, deren Vorkommen jedoch auf die distale Hälfte der Harnröhre beschränkt ist [79, 154, 175]. Neben der submukösen Lokalisation beschrieb Shehata in Gruppen auftretende, PUD auch intermuskulär. Die AG bestehen aus kubischem Epithel bis zur Einmündung in die urethrale Mukosa [154, 175]. Der Übergang von proximaler Urethra zu Blasenhals zeigt sich parallel zur histologischen Gegebenheit beim Männchen durch einen klaren Epithelwechsel [154, 167]. Mehrreihiges Epithel der

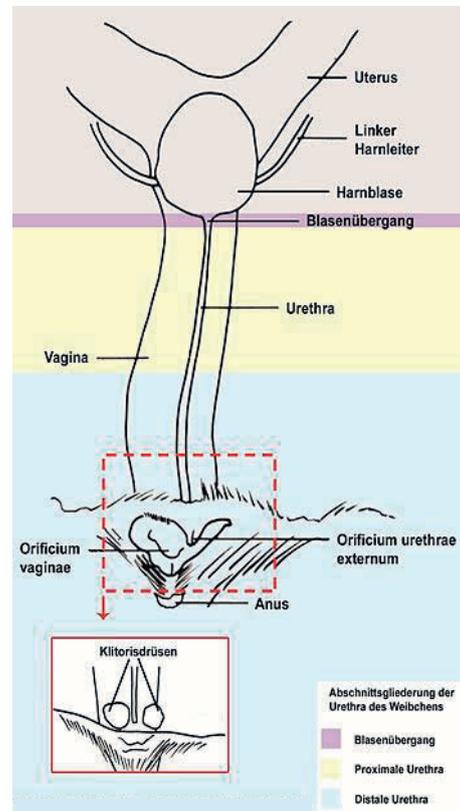


Abb. 1.2 Schematische Übersicht über die Abschnitte der Urethra der weiblichen Maus, modifiziert nach [29], Abdruck mit Genehmigung von Elsevier

Harnröhre weicht zu Gunsten des Urothels, das die innere Organgrenze zwischen Blasen Hals und Harnblase festsetzt [154, 167].

1.2 Die neuroendokrine Zelle im Urogenitaltrakt

1.2.1 Von den Anfängen ihrer Beschreibung in der Urethra als „Helle Zelle“ nach Feyrter bis zur Bezeichnung als „neuroendokrine Zelle“ durch Pearse

Das urethrale Epithel enthält sog. neuroendokrine Zellen. Dieser Zelltyp wurde erstmals 1951 von Feyrter in der Urethra und den paraurethralen Drüsen des Mannes sowie der Frau entdeckt und aufgrund seiner „Chromophobie“ „(B)ei gewöhnlicher Plasmafärbung“ als „Helle Zelle“ inmitten des regulären Epithels beschrieben [46].

Nach Formaldehydbehandlung (Falck 1965, zitiert in [142]) fluoreszierten diese Zellen in der Urethra der weiblichen Katze gelb, was Owman et al. 1971 auf das Vorkommen von Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) zurückführten und das biogene Amin quantitativ nachwies [142]. Den fluoreszierenden, aminenthaltenden Zellen wurde eine Ähnlichkeit mit enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltrakts zugeschrieben. In Anlehnung an die zuletzt genannte Arbeit von Owman et al. charakterisierten Dixon et al. 1973 die „urethrale chromaffine Zelle“ anhand von Proben aus männlichen und weiblichen Meerschweinchen, Ratten und Kaninchen. Elektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass die in diesen Spezies nach Formaldehydfixierung gelb fluoreszierenden Zellen der Urethra membranbegrenzte, 5-HT-haltige Granula von 40 bis 160 nm Durchmesser besitzen und darüber hinaus über einen apikalen Mikrovillusbesatz verfügen, welcher ins Lumen hineinragt [39]. Während Dixon et al. die mögliche Speicherung von 5-HT innerhalb der Granula diskutierten, gelang Hakanson et al. eine Differenzierung der endokrinen Zellen in der Urethra und Prostata des Meerschweinchens in zwei Typen, je nachdem ob sie 5-HT enthielten oder nicht [64]. Bei Vorkommen des Amins innerhalb der Granula der Zellen wirkte dies als Reduktionsmittel, führte zu einer argentaffinen Reaktion mit Silberpräzipitation und reagierte mit Formaldehyd zu einem gelb leuchtenden Fluorophor. Der zweite Zelltyp ohne Silberpräzipitation und folglich ohne 5-HT unterschied sich bezüglich Morphologie und Verteilung im urethralen Epithel nicht von dem gelb leuchtenden, wenngleich er seltener anzutreffen war. Diese Zellen fluoreszierten grün, nachdem man L-DOPA in das Peritoneum der Versuchstiere injiziert hatte, was in der Annahme resultierte, dass sie dopaminerg seien und Aminvorstufen aufnehmen, dekarboxylieren und speichern können. Somit wurden die urethralen chromaffinen, formaldehyd-induziert leuchtenden Zellen dem APUD-System zugerechnet (**A**mine **P**recursor **U**ptake and **D**ecarboxylation) [64, 148]. Weitere Forschungsarbeiten auf dem Feld der

enteroendokrinen Zellen durch Pearse und Fujita führten zur Definition der Begriffe „Paraneuron“ und „neuroendokrine Zelle“. Hiernach versteht man unter einem Paraneuron eine Zelle, die zur Produktion von Neurotransmittern oder Neurohormonen befähigt ist, über Granula in Form von neurosekretorischen und/oder synaptischen Vesikeln verfügt, sowie über Rezeptoren für Reize empfänglich ist, auf welche sie mit Sekretion reagiert [56]. In Übereinstimmung mit früheren Publikationen [39, 66], in denen hinsichtlich der zahlreichen zytoplasmatischen, basal orientierten Granula auf die ultrastrukturelle Ähnlichkeit der urethralen endokrinen Zelle mit endokrinen Zellen des trachealen und bronchialen Epithels verwiesen wurde, postulierten Fujita et al. die Zugehörigkeit der „basalgranulierten“ Zellen in Gastrointestinaltrakt, Atemwegen und Urethra zur Familie der Paraneurone [56].

1977 prägte Pearse den Begriff der „neuroendokrinen“ Zelle. Er umschrieb hiermit die APUD-Zellpopulation, die trotz ihrer weiten Verbreitung in vielen Organen das Merkmal teilt, über ein gemeinsames „neuroendokrines Programm“ zu verfügen, dass sie dazu befähigt, anhand synthetisierter und sezernierter Hormone oder Neurotransmitter Einfluss auf das somatische und vegetative Nervensystem nehmen zu können, dabei den Neuronen des Nervensystems jedoch als Effektor niederer Ordnung unterliegt [148].

1983 gelang Thompson et al. die Isolierung eines „neuen Markers“, dem „Neuronenspezifischen Proteins PGP 9.5“ (Protein Gene Product 9.5, PGP), einem spezifisch in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie zudem in neuroendokrinen Zellen nachweisbaren Proteins [195].

1.2.2 Sekretionsprodukte der neuroendokrinen Zelle und ihre Funktion im urogenitalen Organsystem

Ein Charakteristikum der neuroendokrinen Zelle bzw. Paraneurone, das neurosekretorische Granulum, verhalf Lloyd und Wilson einen Antikörper zu entwickeln, der als spezifischer immunhistochemischer Marker endokrinen Gewebes Bedeutung gewann [110]. Der Antikörper richtete sich gegen ein 68000-Dalton schweres Polypeptid, das in neurosekretorischen Granula endokriner Organe (Nebennierenmark, Paraganglien, endokriner Pankreas, Endokrinium des Gastrointestinaltrakts, Nebenschilddrüsen, Adenohypophyse, C-Zellen der Schilddrüse) sowie deren Tumoren vorkommt und als Chromogranin A (CgA) identifiziert wurde [137]. Dies bestätigte sich in nachfolgenden immunhistochemischen Arbeiten, u.a. an der Urethra des Hundes, deren 5-HT-haltige neuroendokrine Zellen alle immunreaktiv gegen CgA waren. Der Umkehrschluss traf jedoch nicht zu, denn es fanden sich CgA-positive Zellen, die kein 5-HT enthielten, worauf vermutet wurde, dass dieses eine Prozent an CgA-immunreaktiven Zellen andere Substanzen

speichern könnte [66]. Dahingegen zeigte man an der Urethra des Schafes, dass 25% der gefundenen Paraneurone allein positiv mit Antikörpern gegen 5-HT reagierten, ohne Kolo-kalisation mit CgA, welche zu 25 bis 30% auftrat. Ausgehend von den restlichen 50% ausschließlich CgA-enthaltenden neuroendokrinen Zellen und des Nachweises von Somatostatin-speichernden Paraneuronen, schlossen Vittoria et al. vorerst auf die Existenz von mindestens vier Typen dieser Zellart: 1. 5-HT-positive, 2. CgA-positive, 3. 5-HT- und CgA-positive und 4. Somatostatin-positive urethrale neuroendokrine Zellen [207]. Kurz darauf konnte die Auflistung durch dieselbe Arbeitsgruppe um zwei weitere Positionen erweitert werden, da immunzytochemische Untersuchungen an den Harnröhren von Pferd, Rind, Schaf und Schwein neuroendokrine Zellen zeigten, welche Cholezystokinin sowie Cholezystokinin zusammen mit 5-HT enthielten [206]. Auf elektronenmikroskopischer Ebene bestätigte sich das Vorhandensein mehrerer Sekretionsprodukte innerhalb einer Zelle durch die Darstellung von Granula unterschiedlicher Form und Größe in der menschlichen Prostata und prostatistischen Urethra [38]. Neben Zellen mit „kleinen“, „intermediären“ und „großen“ Granula konnten auch solche dargestellt werden, die Granula vielfältigen Durchmessers enthielten. In dieser Hinsicht erinnert die Speicherung und Sekretion mehrerer Substanzen durch eine neuroendokrine Zelle der Urethra an die Verwandtschaft mit den enteroendokrinen Zellen, da diese gastrointestinale Hormone aus intermediären unter sphärisch und asphärisch geformten Granula freisetzen, welche anhand von Färbungen mit Silber-Methenamin, Eisenhämatoxylin und Uranylacetat-Blei differenzierbar sind [136].

Die Tatsache, dass die Granula der neuroendokrinen Zelle am dichtesten um den Zellkern, im basalen Zellkompartiment und der basalen Hälfte apikaler Fortsätze konzentriert sind [6, 38, 64, 66, 84, 161, 207], stützt zusammen mit dem Konzept „offener“ Paraneurone die Hypothese einer „rezepto-sensorisch-sekretorischen“ Funktion der neuroendokrinen Zellen [32, 38, 56, 66, 84, 206, 207]. Hiernach gebraucht die neuroendokrine Zelle ihren Zellapex, der einen Fortsatz mit oder ohne Mikrovilli besitzt, um Stimuli innerhalb der Urethra zu detektieren, und reagiert daraufhin mit der Ausschüttung ihrer gespeicherten Amine bzw. Peptidhormone an der Basalmembran.

1.2.3 Lokalisationen bevorzugten Vorkommens neuroendokriner Zellen im Urogenitaltrakt von Tier und Mensch

5-HT-positive neuroendokrine Zellen finden sich beim Rüden ab dem vesiko-urethralen Übergang bis ca. zwei Millimeter proximal der äußeren Harnröhrenöffnung gleichmäßig im Epithel verteilt. Proximale Urethra und *Colliculus seminalis* stellen dabei die Organsegmente mit der höchsten Dichte an 5-HT-haltigen Zellen dar; distal des *Diaphragma pelvis* nehmen sie ab. Während die Harnblase, Ureteren und Ejakulationsgänge des Hundes keine neuroendokrinen Zellen aufweisen, erscheinen sie in den Ausführungsgängen und periurethralen Azini der Prostata [66]. Neuroendokrine Zellen mit 5-HT-immunreaktiven Granula kommen in der gesamten Urethra der Hündin vor, wobei sie insbesondere in den mittigen bis distalen Organabschnitten anzutreffen sind. Ebenfalls in ihrer Anzahl zum *Ostium urethrae externum* hin abnehmend finden sie sich im Gegensatz zum Männchen beim Weibchen auch hier vereinzelt. Zudem werden Paraneurone im vestibulären Epithel beschrieben [66].

Czaja et al., die mit immunhistochemischen Methoden nach CgA-positiven sowie nach argyrophilen Zellen im Urogenitaltrakt der Sau suchten, fanden diese hauptsächlich in Vestibulardrüsen, in geringerer Anzahl in der Urethra und vereinzelt auch in der Blase, wo sie sich ausschließlich im Sphinkterbereich befinden. Innerhalb des exokrinen Drüsengewebes verzeichnete man sich zu Clustern formierende neuroendokrine Zellen in den Urethrae der Sau, Stute, Kuh und des Schafs [32, 206]. Analog zur Verteilung der neuroendokrinen Zellen beim Rüden enthält auch der Bereich um den *Colliculus seminalis* des Schafbocks, d.h. das proximale Drittel, die meisten Paraneurone; in den distalen zwei Dritteln der Harnröhre verringerte sich ihre Menge. Auch in dieser Tierspezies verfügen die urethranahen, pericolliculären Azini und Ausführungsgänge der Prostata über den neuroendokrinen Zelltyp [17, 207].

Durch eine differenziertere Untersuchung der männlichen akzessorischen Geschlechtsdrüsen und der Urethra der Ratte kamen Aumüller et al. zum Schluss, dass der Anteil neuroendokriner Zellen, die insbesondere in den ventralen und lateralen Prostatalappen und dem *Ductus excretorius* der Bläschendrüse aufzufinden sind, mit zunehmender Nähe der AG zur Einmündung in die Urethra wächst. Das urethrale Epithel selbst war im Bereich und kaudal des „Ejakulationssinus“ [6], welcher die gemeinsame Öffnung des Endstücks von *Ductus deferens* und der Bläschendrüse sowie des terminalen Ausführungsganges der Koagulationsdrüsen in das urethrale Lumen darstellt, reich an neuroendokrinen Zellen. In den *Ductus deferentes*, *Ampullae ductus deferentes* und Harnblase fehlen neuroendokrine Zellen gänzlich [6, 39].

Auch die menschliche Urethra weist eine ähnliche Verteilung neuroendokriner Zellen auf. Im proximalen Organabschnitt findet man sie kaudal des *Ostium urethrae internum* mit einem Schwerpunkt im pericolliculären Bereich beim Mann [17, 38, 46, 103]. Ihre Anwesenheit setzt sich in der penilen Urethra fort, wo 5-HT-positive neuroendokrine Zellen auch in den PUD lokalisiert sind [46, 84]. Sowohl die blasennahen zwei Drittel der weiblichen Urethra als auch die Hauptausführungsgänge der *Glandulae vestibulares majores* und *minores* enthalten zahlreiche neuroendokrine Zellen [45, 46, 103].

1.3 Gustatorische Signaltransduktionsmechanismen in der murinen Geschmacksknospe

1.3.1 Funktionsweise des heterotrimeren G-Proteins „Gustducin“ und seine Kopplung an Geschmacksrezeptoren

Das heterotrimere GTP-bindende-Protein befindet sich im inaktiven Zustand, wenn die α -Untereinheit ein Guanosindiphosphat-Molekül gebunden hat und über eine Bindung zur β -Untereinheit gleichzeitig mit γ assoziiert ist. Im Falle der für die Geschmackstransduktion spezialisierten G-Proteine weist $G\alpha$ überdies eine Kopplung an Geschmacksrezeptoren auf, die zu der Tas1R- und Tas2R-Familie (taste receptor(s), Geschmacksrezeptor(en)) aus der Familie der sog. **G-Protein-Coupled Receptors (GPCRs)** gehören. Besetzt nun ein adäquater Geschmacksstoff einen TasR, kommt es zum Austausch von Guanosindiphosphat durch Guanosin triphosphat an der *switch-II*-Region der α -Untereinheit des G-Proteins und daraus resultierenden Konformationsänderungen, die letztendlich zur Dissoziation der β - und γ -Untereinheiten von $G\alpha$ führen. Dabei werden an den entstandenen funktionellen Monomeren ($G\alpha$ und $G\beta\gamma$, letzteres besteht als Einheit fort) Bindestellen für Effektoren sich anschließender Signaltransduktionsmechanismen frei [24, 90]. Im Gegensatz zum ausschließlich intrazellulär lokalisierten $G\beta\gamma$, das durch Isoprenylierung an die Zellmembran gebunden ist, durchspannen die TasR mit sieben transmembranären Domänen die Plasmamembran und kommunizieren mit dem extrazellulären Milieu, indem sie hier bestimmte Stimuli einer Geschmacksqualität detektieren [9, 24, 90]. Basierend auf immunhistochemischen Beobachtungen und entsprechenden In-situ-Hybridisierungen an murinen Geschmacksknospen lässt sich der Schluss ziehen, dass sich die geschmackszellspezifische α -Untereinheit des G-Proteins, α -Gustducin (Gustducin), insbesondere zur Transduktion des Geschmacks bitter mit der γ -Untereinheit 13 und jeweils einer β -Untereinheit, $\beta 1$ bzw. $\beta 3$, zum heterotrimeren G-Protein Gustducin/ $\beta 1/\gamma 13$ oder Gustducin/ $\beta 3/\gamma 13$ zusammenlagert [27, 77]. Verwandt mit α -Transducinen, die an der Signaltransduktion beim Sehprozess beteiligt sind, wird Gustducin der G αi -Familie zugeordnet und spezifisch in geschmacksrezeptiven Zellen

exprimiert [57, 124, 179, 211], wo es als Bestandteil von Signaltransduktionskaskaden die Wahrnehmung der Geschmacksqualitäten süß, bitter und umami initiiert [20, 126, 211].

1.3.2 Identifizierung und Charakterisierung der GPCRs der Familien Tas1r und Tas2r

In den Geschmacksknospen der Ratte und Maus konnten bisher Tas1r1, Tas1r2, Tas1r3 und Tas2rs identifiziert und funktionell charakterisiert werden [73, 135]. Aufgrund von ähnlicher topographischer Expression innerhalb der Geschmacksknospen und Funktionseinbußen des Rezeptordimers bei Modifikation des C-terminalen Endes von Tas1r2 (Salahpour 2000, zitiert in [135]) lässt sich darauf schließen, dass Tas1r2 und Tas1r3 ein Heterodimer bilden. Dieses übermittelt die erfolgte Bindung von beispielsweise Saccharose, Saccharin, Fruktose und Acesulfam-K (ein Süßstoff) an das G-Protein, was im Schmecken der Geschmacksqualität süß gipfelt [73, 105, 135]. Ein Heterodimer aus Tas1r3 und Tas1r1 fungiert hingegen als Rezeptor für die Geschmacksqualität umami [105, 134]. Hervorgerufen wird diese gustatorische Empfindung durch L-Aminosäuren (L-AS), beispielsweise L-Glutamat, und wird durch zusätzliche Anwesenheit von 5-Ribonukleotiden wie Inosinmonophosphat (IMP) oder Guaninmonophosphat (GMP) verstärkt [9, 105, 134]. Neben dem Rezeptordimer Tas1r1/Tas1r3 wird auch der metabotrope Glutamatrezeptor 4 (mGluR4) als Bindestelle für „Umamiliganden“ diskutiert [20]. mGluR4 stellt eine modifizierte Form des metabotropen Glutamatrezeptors des Gehirns dar, unterscheidet sich jedoch vom hirneigenen Rezeptor durch eine wesentlich hochschwelligere Sensitivität zum Substrat Glutamat [20]. GPCRs der Untergruppe Tas2r ermöglichen das Schmecken von Bitterstoffen [1, 19, 73, 218]. Hierzu zählen beispielsweise die Substanzen Denatonium, das am murinen Subtyp 8 des Tas2r (mTas2R-8 bzw. Tas2r108) bindet, und der Ligand des mTas2R-5 bzw. Tas2r105, Cycloheximid [19, 95].

1.3.3 Bedeutung der Signalproteine Adenylatzyklase und Phospholipase C β 2 sowie ihrer *second messenger* cAMP bzw. IP_3 und des Ionenkanals „TRPM5“ für die Erregung süß- und bitter-detektierender geschmacksrezeptiver Zellen

In seiner aktivierten Form besteht das G-Protein aus den beiden Monomeren $G\alpha$ und $G\beta\gamma$, die im Folgenden auf zwei verschiedene Wege der Signalweiterleitung Einfluss nehmen. $G\alpha$ stimuliert die Bildung von zyklischen Nukleotiden (zyklisches Adenosinmonophosphat, cAMP) durch die Adenylatzyklase [182]. Ein erhöhter Spiegel an cAMP rekrutiert die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), welche über Phosphorylierung Kaliumkanäle (K^+) inaktiviert und somit die Depolarisation der Geschmackszelle einleitet [7,

8, 133]. Zum selben Effekt führt die cAMP-getriggerte Öffnung von T- und L-Typ- Kalziumkanälen (Kalzium, Ca^{2+}), da durch extrazellulären Einstrom die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht wird [11]. Diskutiert wird dieser Mechanismus zur Generation eines Reizes in Geschmacksnerven für süße Geschmacksstoffe wie Saccharose, Maltose und Glukose [7, 11, 182]. Dahingegen scheinen Süßstoffe (SC-45647, Saccharin) sowie Bitterstoffe (Denatoniumbenzoat, Strychnin) vorzugsweise über eine andere Signalkaskade transduziert zu werden. Das Monomer $\text{G}\beta\gamma$ ist funktionell an die $\beta 2$ -Untereinheit des Enzyms Phospholipase C ($\text{PLC}\beta 2$) gekoppelt [169], so dass $\text{PLC}\beta 2$ nach Aktivierung durch $\text{G}\beta\gamma$ die *second messenger* Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) produziert [24, 27, 77, 90, 179, 213]. Während DAG vermutlich über Interaktion mit der Proteinkinase C (PKC) die Phosphorylierung von Rezeptoren und Ionenkanälen anstößt [179], besetzt IP_3 am glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) Rezeptoren vom Typ III (IP_3RIII), wodurch eine Ca^{2+} -Ausschüttung initiiert wird [27, 128, 179, 218]. Die $\text{PLC}\beta 2$ -vermittelte Leerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher geschieht dabei unabhängig von Gustducin, was durch funktionelle Blockaden mittels Antikörper bewiesen werden konnte: Trotz der Zugabe von Antikörpern gegen Gustducin blieb der durch Bitterstoffe induzierbare Anstieg des intrazellulären IP_3 -Level unbeeinflusst [213]. Arbeiten an süß- und bitterstoffdetektierenden Geschmackszellen deuten jedoch darauf hin, dass sowohl die durch $\text{G}\alpha$ als auch $\text{G}\beta\gamma$ angeregte Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels innerhalb ein und derselben Zelle synergetisch und synchron stattfinden kann [11, 168, 213]. So resultierte die Stimulation geschmacksrezeptiver Zellen mit Saccharose ebenfalls in einer Zunahme des IP_3 -Level, wenn auch wesentlich geringer ausgeprägt als nach Stimulation mit den Süßstoffen Saccharin und SC-45647 [11]. Denatonium und Strychnin senken in bitter-schmeckenden Zellen den Spiegel zyklischer Nukleotide, woran eine an Gustducin gekoppelte Phosphodiesterase (PDE) beteiligt sein könnte [141, 168, 213].

Perez et al. charakterisierten 2002 eine Untergruppe von geschmacksrezeptiven Zellen, die zusätzlich zu den Komponenten für die gustatorische Signaltransduktion – Gustducin, $\text{G}\beta 3$, $\text{G}\gamma 13$, $\text{PLC}\beta 2$, IP_3RIII - den transienten spannungsabhängigen Ionenkanal „transient receptor potential cation channel subfamily M member 5“ (TRPM5) exprimieren [152]. Es handelt sich hierbei um einen unspezifischen Ionenkanal, der in Folge eines schnellen Anstiegs des intrazellulären Ca^{2+} -Level - verursacht beispielsweise durch Aktivierung von $\text{PLC}\beta 2$ und Generation von IP_3 - für monovalente Kationen permeabel wird [157]. Dies führt zur Depolarisation und Transmitterfreisetzung.

Zusammenfassend werden den GPCRs der Familien Tas1r und Tas2r, der α -Untereinheit eines selektiv in geschmacksrezeptiven Zellen exprimierten G-Proteins, α -Gustducin, dem Enzym $\text{PLC}\beta 2$ und dem Ionenkanal TRPM5 die Bedeutung beigemessen, die

Geschmackssensationen süß, bitter und umami zu transduzieren. Auf molekularer Ebene handelt es sich bei der Sinnesmodalität Geschmack jedoch keinesfalls um ein an die Geschmacksknospen des Mundraums gebundenes Geschehen, denn tatsächlich verfügen auch chemosensitive Zellen der Atemwege über die intrazellulären Signalproteine zur Geschmackswahrnehmung (vgl. Abb. 1.3) [49, 50, 95], wodurch die Definition des Geschmacksvermögens eine grundlegende Erweiterung erfahren könnte.

1.4 Die cholinerge Bürstenzelle der Atemwege und ihr chemosensitives Potential

1.4.1 Entdeckung der Bürstenzelle im trachealen Epithel und strukturelle Analyse ihres Mikrovillisaums

Die „cholinerge chemozeptive Bürstenzelle“ der Atemwege besitzt die Fähigkeit, auf luminale Stimuli mit sekretorischen Vorgängen zu reagieren [88, 95, 126, 141]. Rhodin und Dalhamn charakterisierten 1956 als erste die Bürstenzelle der murinen Trachea, welche als vierter Epithelzelltyp neben den zilientragenden, sekretorischen und Basalzellen elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden konnte. Bestückt mit büstenartigen Fortsätzen, durchzieht die eher seltene, polygonale Zelle die gesamte Höhe des hochprismatischen Epithels, wobei das basale konische Zellkompartiment an die Basalmembran grenzt und das adluminale einen Bürstenschopf ins tracheale Lumen vorstreckt [70, 117, 163]. Höfer et al. beschrieben zudem stachelartige Vorstülpungen im basolateralen Zellkompartiment, die aufgrund ihrer Immunreaktivität gegen Villin- und Fimbrin-Antikörper als basolaterale Äquivalente apikaler Mikrovilli identifiziert wurden [70]. Aufgrund des stabilen Aufbaus aus dichten, aktinfilamenthaltigen, durch die Strukturproteine Villin und Fimbrin quervernetzten Mikrovilli verleiht das adluminale Mikrovillibüschel dem Bürstenzellapex ein rigides Aussehen [70, 117]. Darüber hinaus ließen sich beispielsweise auch im *Ductus pancreaticus* und *Ductus choledochus* sowie in Dünndarm, Magen, *Tuba auditiva*, Lungen und Bronchien Bürstenzellen aufgrund ihres Gehalts an Villin darstellen, so dass sich der Antikörper gegen dieses Strukturprotein als immunologischer Marker für Bürstenzellen etablierte [70, 89, 96, 113]. Tracheale Bürstenzellen verfügen des Weiteren über das Enzym Acetylcholintransferase (**choline acetyltransferase**, ChAT) und den vesikulären Acetylcholintransporter (**vesicular acetylcholine transporter**, VACHT), die benötigt werden, um Acetylcholin zu synthetisieren und vesikulär zu speichern [97].

1.4.2 Expression von Komponenten der geschmackszellspezifischen Signaltransduktionskaskade durch die tracheale Bürstenzelle und ihre „Wächterfunktion“

Bereits kurz nach ihrer Erstbeschreibung wurde der trachealen Bürstenzelle wegen ihres Vesikelgehalts und der „epithelioneurale“ Verbindungen mit durch die Basalmembran hindurchtretenden Axonen eine Funktion als sekundäre Sinneszelle zugeschrieben [117]. Erste Hinweise auf das chemosensorische Potential trachealer Bürstenzellen lieferten Merigo et al. 2005, indem sie immunhistochemisch flaschen- bis birnenförmige Zellen mit apikalen und lateralen Mikrovilli nachwiesen, die Gustducin exprimieren [126] (vgl. Abb. 1.3).

Der Arbeitsgruppe um Finger gelang 2011 der Nachweis TRPM5- und Tas1r3-exprimierender Zellen in der Trachea, wobei sich herausstellte, dass alle Zellen, die den GPCR Tas1r3 beherbergen, Gustducin und TRPM5 koexprimieren [196]. In Übereinstimmung mit der Auffassung, dass verschiedene Geschmacksrezeptorfamilien, verteilt über die geschmacksrezeptiven Felder der Zunge, für die Erkennung unterschiedlicher Geschmacksliganden verantwortlich sind [2, 9, 11], existieren in der Trachea TRPM5- oder Gustducin-immunreaktive Zellen, die Tas1R3 nicht aufweisen [196]. Zudem werden in den trachealen chemosensitiven Zellen TRPM5 und PLC β 2 koexprimiert. Neben Tas1R3, dem obligatorischen Baustein zur Bildung funktionstüchtiger Rezeptoren für süße und Aminosäure (AS)-haltige Geschmacksstoffe, exprimieren chemosensitive Zellen des respiratorischen Apparats überdies Tas2r, die sie zur Wahrnehmung bitterer Substanzen in dem das Lumen benetzenden Flüssigkeitsfilms befähigen [95, 196].

Die eingangs erwähnte Arbeit von Merigo et al. rückte das tracheale Epithel, und hierin besonders die Bürstenzelle, in den Fokus der Aufmerksamkeit, da sich dieser Zelltyp durch seinen Gehalt an Gustducin und PLC β 2 für die periphere Chemozeption qualifizierte [126]. Gestützt wurden diese Ergebnisse

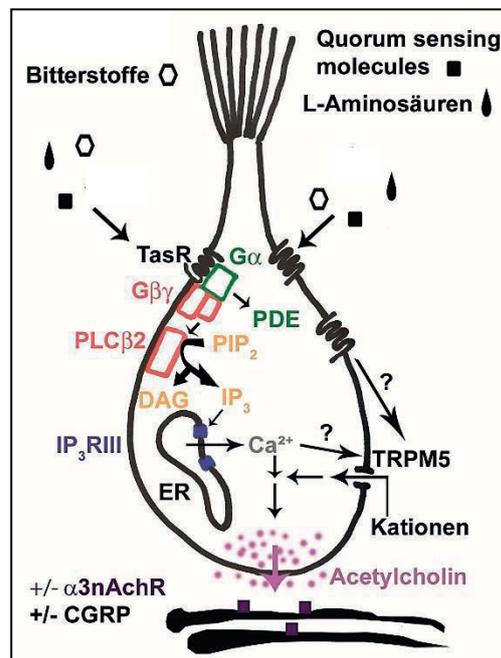


Abb. 1.3 Übersicht über die Komponenten der kanonischen Geschmacks-transduktionskaskade der chemosensitiven Bürstenzelle. Abk: α 3nAChR: nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor Untereinheit α 3. CGRP: Calcitonin-ge Verwandtes Peptid. DAG: Diacylglycerol. ER: Endoplasmatisches Retikulum. G α : α -Untereinheit des G-Proteins. G $\beta\gamma$: β - und γ -Untereinheiten des G-Proteins. IP $_3$: Inositol-1,4,5-trisphosphat. IP $_3$ RIII: Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor Typ III. PDE: Phosphodiesterase. PIP $_2$: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. PLC β 2: Phospholipase C Untereinheit β 2. TasR: Taste Receptor. TRPM5: Transient-Rezeptor-Potential-Kation-Kanal Unterfamilie M Mitglied 5

durch die Tatsache, dass es sich bei den in der Trachea gefundenen, TRPM5-exprimierenden Zellen ebenfalls um Bürstenzellen handelt, da ihre apikalen und basolateralen Zelldifferenzierungen sich durch eine Villin-Immunreaktivität auszeichnen [88].

Bitterstoffe fallen beispielsweise im Rahmen einer bakteriellen Kolonisation an. In die unteren Atemwege gelangen Bakterien dabei hauptsächlich über die Atemluft. Krasteva et al. gelang der Nachweis, dass tracheale chemosensitive Bürstenzellen diese Bitterstoffe detektieren und über eine Ausschüttung von Acetylcholin cholinozeptive Nervenfasern mit den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor-(nAChR)-Untereinheiten $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ erregen, was über die Reduktion der Atemfrequenz einer weiteren Bakterieninokulation entgegenwirkt [95]. Cholinergen chemosensitiven Bürstenzellen kommt im trachealen Epithel somit eine „Wächterfunktion“ zu.

1.5 Fragestellung

Die Atemwege werden auf mehreren „Stufen“ durch chemosensitive Bürstenzellen vor einwandernden Bakterien geschützt (vgl. Abb. 1.4). Zusätzlich zur trachealen Bürstenzelle, die einer Ausbreitung schädigender Mikroorganismen in Bronchien und Lunge entgegenwirkt, existieren bereits weiter proximal auch in der Nase cholinerge chemosensitive Zellen, deren Stimulation eine Herabsetzung der Atemfrequenz und somit ähnliche Schutzreflexe hervorruft [49, 198]. Über die Erregung trigeminaler Nozizeptoren durch cholinerge Neurotransmission initiieren Bürstenzellen

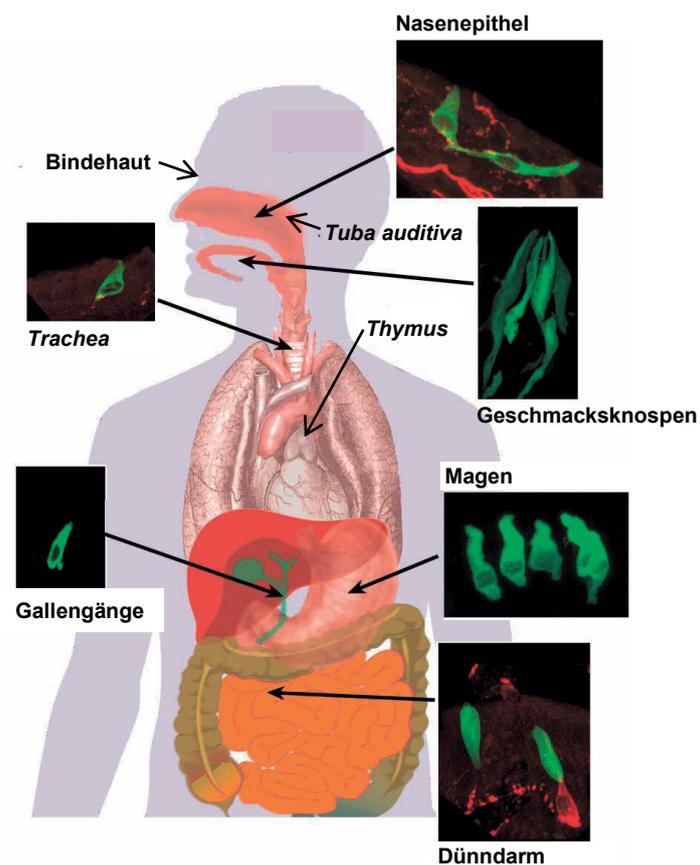


Abb. 1.4 Übersicht über das Vorkommen chemosensitiver Bürstenzellen, modifiziert nach [50]. Abdruck mit Genehmigung von Faculty of 1000.

ebenfalls eine neurogene Inflammation [172]. Chemosensitive Bürstenzellen am Eingang in das Vomeronasalorgan regulieren den Flüssigkeitseinstrom und damit den Eintritt schädigender chemischer Stimuli in dieses Organ [139]. Des Weiteren finden sich

diese Wächterzellen in der *Tuba auditiva*, die Bakterien auf ihrem Weg in das Mittelohr vorgeschaltet ist [96]. Cholinerge chemosensitive Bürstenzellen „bewachen“ zudem okuläre Eintrittspforten: Hierfür sind sie am medialen Augenwinkel im Fornix der Bindehaut lokalisiert, um möglicherweise über die Freisetzung von Acetylcholin die Mukussekretion durch benachbarte Becherzellen sowie ebenfalls die Entwicklung einer neurogenen Inflammation zu stimulieren [209].

Die Nachbarschaft zum Anus sowie ihre kurze Länge – zumindest bei der Frau – prädisponieren die Urethra für eine bakterielle Besiedlung, was sich in der Häufigkeit urogenitaler Infektionen widerspiegelt. Unter der Annahme einer Wächterfunktion wäre die Positionierung der cholinergen chemosensitiven Bürstenzelle an dieser weiteren potenziellen Eintrittspforte für Mikroorganismen daher äußerst sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit immunhistochemischen Methoden die Möglichkeit des Vorkommens einer chemosensorischen Bürstenzelle des Urogenitaltrakts untersucht werden. Ihre weitere Charakterisierung und Abgrenzung zur bekannten urethralen neuroendokrinen Zelle erfolgte anhand gentechnisch veränderter Mausstämmen, die das verstärkte grün fluoreszierende Protein (enhanced green fluorescent protein, eGFP) unter Kontrolle des Promoters der ChAT exprimieren [42, 190].

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Strukturformel	Quelle
Dinatriumcarbonat	Na_2CO_3	Merck; Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Carl Roth; Karlsruhe
Flüssigstickstoff	N_2	Linde; Leuna
Formaldehyd	CH_2O	Merck; Darmstadt
Glycerin	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	Merck; Darmstadt
Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluorethyl-difluoromethylether)	$\text{C}_3\text{H}_2\text{ClF}_5\text{O}$	Baxter; Unterschleißheim
2-Methylbutan	C_5H_{12}	Carl Roth; Karlsruhe
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth; Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Carl Roth; Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO_3	Merck; Darmstadt
Natronlauge	NaOH	Merck; Darmstadt
Paraformaldehyd	$\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$	Merck; Darmstadt
Pikrinsäure (Trinitrophenol)	$\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$	Merck; Darmstadt
Polyvinylpyrrolidon	$(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$	Merck; Darmstadt
Procainhydrochlorid	$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_2$	Merck; Darmstadt
Saccharose D (+)	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Carl Roth; Karlsruhe
Salzsäure	HCl	Merck; Darmstadt
Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat)	$\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$	Sigma-Aldrich Chemical Co; St. Louis, USA

Tab. 2.1: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

2.2 Lösungen und Puffer

Carbonat-gepuffertes Glycerol: 50 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonat werden mit 0,5 M Dinatriumcarbonat auf einen pH-Wert von 8,6 eingestellt. Ein Teil dieser Lösung wird mit zwei Teilen Glycerin gemischt.

Lösung A: 31,2 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat werden in einem Liter Aqua dest. gelöst und bei 4°C gelagert.

Lösung B: 35,6 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat löst man in einem Liter destillierten Wassers. Der Ansatz kann bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

PBS (Phosphate-Buffered Saline): 28,75 ml der Lösung A, 96,2 ml der Lösung B und 22,4 g Natriumchlorid werden vermischt und mit destilliertem Wasser auf 5 l aufgefüllt. Der Ansatz wird gut gerührt und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

PBS+S: Die Herstellung entspricht der des PBS mit der Ausnahme, dass 44,8 g statt 22,4 g Natriumchlorid zugesetzt werden.

Blocklösung: Das Blockserum besteht aus 10%-igem normalen Pferdeserum (PAA Laboratories GmbH; Pasching, Österreich), 0,1%-igem bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich Chemical Co; St. Louis, USA) und 0,5%-igem Tween 20, die in PBS gelöst werden.

Phosphatpuffer, 0,1 M: 115 ml Lösung A und 385 ml Lösung B werden vermengt, 500 ml Aqua dest. hinzugefügt und ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer: 40 g Paraformaldehyd werden mit 500 ml destilliertem Wasser unter dem Abzug verrührt und dabei auf 70°C erhitzt. In diese milchig-trübe Lösung wird tropfenweise 0,2 M Natronlauge eingebracht bis sie klar wird. Nach Erkalten des Ansatzes werden 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer hinzugefügt und ein pH von 7,4 eingestellt. Nach zweimaligem Filtrieren durch eine Membran mit einer Porengröße von 3 µm bzw. 0,6 µm ist die Lösung gebrauchsfertig.

Gesättigte Pikrinsäure: 30 bis 50 g Pikrinsäure löst man in ca. einem Liter heißem Aqua dest. und lässt die Lösung über Nacht erkalten, wodurch sich ein Bodensatz in Form von Kristallen bildet. Der Überstand stellt die gesättigte Pikrinsäure dar, die nach zweimaligem Filtrieren weiterverwendet werden kann.

Vorspüllösung: Nach Forssmann et al. werden in einem Liter Aqua dest. 25 g Polypyrrolidon, 9 g Natriumchlorid und 5 g Procainhydrochlorid gelöst und vermischt. Vor dem Gebrauch wird die Lösung durch zwei Membranen mit 3 µm und 0,6 µm großen Poren filtriert [52].

Zamboni-Fixans: 50 ml 37%-ige Formaldehydlösung, 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer und 150 ml gesättigte Pikrinsäure werden vermengt. Mit destilliertem Wasser wird die Lösung auf einen Liter aufgefüllt [180].

2.3 Antikörper

Zur Untersuchung der urogenitalen Bürstenzelle wurden folgende Primär- und Sekundärantikörper verwendet (Tab. 2.2 und 2.3).

2.3.1 Primäre Antikörper

Antigen	Wirtsspezies/Klon	Verdünnung	Quelle
eGFP	Hühnchen, polyklonal NB 100-1614	1: 16000	Novus Biologicals; Littleton, USA
Gustducin	Kaninchen, polyklonal sc-395	1: 6000	Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Heidelberg
PGP 9.5	Kaninchen, polyklonal BT 78-6305-04	1: 4000	Biotrend Chemikalien GmbH; Köln
PLCβ2	Kaninchen, polyklonal sc-206	1: 800	Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Heidelberg
TRPM5	Kaninchen 72, polyklonal	1: 4000	Kaske et al. (2007); Marburg
VACHT	Ziege, polyklonal BT 1007	1: 40000	Biotrend Chemikalien GmbH; Köln
Villin	Kaninchen, polyklonal V-2121-95	1: 100	US-Biological; Swampscott, USA
CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide)	Ziege, polyklonal BT 17-2090-07	1: 4000	Biotrend Chemikalien GmbH; Köln
CgA	Kaninchen, polyklonal, C-term	1: 400	Epitomics, Inc.; Burlingame, USA
5-HT	Ratte, monoklonal ab 6336	1: 100	Abcam; Cambridge, UK

Tas1r3	Kaninchen, polyklonal ab 74732	-	Abcam; Cambridge, UK
ChAT	Ziege, polyklonal AB144P	-	Chemicon; Temecula, USA

Tab. 2.2: Verwendete Primärantikörper für immunhistochemische Untersuchungen am murinen Urogenitaltrakt

2.3.2 Sekundäre Antikörper

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-IgG	Esel	Cy3	1: 2000	Millipore; Temecula, USA
Ziegen-F(ab)²	Esel	Cy3	1: 800	Millipore; Temecula, USA
Hühnchen-Ig	Esel	Cy3	1: 2000	Jackson-Immuno Research Laboratories; Suffolk, Großbritannien
Hühnchen-Ig	Esel	FITC	1: 400 bzw. 1: 800 (chargenabhängig)	Jackson-Immuno Research Laboratories; Suffolk, Großbritannien
Ratten-Ig	Esel	Cy3	1: 1000	Jackson-Immuno Research Laboratories; Suffolk, Großbritannien

Tab. 2.3: Verwendete Sekundärantikörper für immunhistochemischen Untersuchungen am murinen Urogenitaltrakt, Abk.: **Cy3**: Indocarbocyanin, **FITC**: Fluoresceinisothiocyanat

Um einen Vergleich zwischen der Eigenfluoreszenz des eGFP cholinergischer Zellen und des durch einen Antikörper verstärkten eGFP-Signals ziehen zu können, wurden stichprobenartig urethrale Schnittpräparate unter den ChAT^{BAC}-eGFP-positiven Mäusen ausgewählt und mit dem Antikörper Hühner-anti-eGFP sowie nachfolgend einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. EGFP-positive Zellen leuchteten grün; band der Antikörper an das Antigen eGFP, sah man ein rot-oranges Signal. Im Falle einer positiven Eigenfluoreszenz und Antikörperverstärkung stellte sich die Zelle zweifarbig dar, was durch Wahl geeigneter Filter am Fluoreszenzmikroskop nachweisbar war. Die Fluoreszenz eGFP-positiver Zellen wurden in den meisten Gewebeschnitten durch Inkubation mit dem Primärantikörper Hühner-anti-eGFP und Sekundärantikörper Esel-anti-Hühner-Ig-FITC verstärkt.

2.4 Laborbedarf und Geräte

2.4.1 Laborbedarf

Fabrikat	Hersteller
Cryomold Standard (25 × 20 × 5 mm), Intermediate (15 × 15 × 5 mm), Biopsy (10 × 10 × 5 mm)	Sakura Finetek USA, Inc.; Torrance, USA
Deckgläser 24 × 60 mm, Dicke 0,13-0,16 mm	R. Langenbrinck; Emmendingen
Fettstift Super PAP PEN IM 3580	Immunotech; Marseille, Frankreich
Filterpapier	Schleicher und Schuell; Dassel
Objektträger Super Frost Plus 25 × 75 × 1,0 mm	R. Langenbrinck; Emmendingen
Pipetten 0,2-1000 µl	Gilson; Middleton, USA
Pipettenspitzen 10 µl, 1-200 µl, 101-1000 µl	Star Lab; Ahrensburg
Tissue Tek O.C.T Compound	Sakura; Alphen aan den Rijn, Niederlande

Tab. 2.4: Fabrikate für den Gebrauch im Labor und deren Hersteller

2.4.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Kryostat Leica CM 1900, Seriennummer 0737	Leica; Bensheim
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan 2 imaging	Zeiss; Jena
Kamera Axio Cam color	Zeiss; Jena

Tab. 2.5: Verwendete Geräte

2.5 Tiere

Die vorliegende Arbeit wurde an transgenen ChAT^{BAC}-eGFP-Mäusen durchgeführt, deren Zellen und Nerven vom cholinergen Phänotyp eGFP exprimieren [42, 190]. Tallini et al. generierten 2006 und von Engelhardt et al. 2007 gentechnisch veränderte Tiere, sodass zwei Gründerstämme existieren. In beiden Fällen wurde ein eGFP-Genkonstrukt mittels homologer Rekombination in ein bakterielles künstliches Chromosom (BAC: bacterial artificial chromosome) als Vektor integriert. Transkription und Translation des eGFP erfolgen unter der Expression der Promotorsequenz der ChAT.

Die Versuchstiere wurden im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität in Gießen nach Genehmigung durch die zuständige Behörde gehalten und gezüchtet (RP Gießen, Referenznummer A 29/2009, A 5/2010, A 11/2011). Alle Tiere wurden in Käfigen mit einer *ad libitum* Wasser- und Futterversorgung sowie einem Hell-Dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden gehalten.

Sieben männliche und fünf weibliche ChAT^{BAC}-eGFP- Mäuse aus dem Labor Tallini, zwei männliche Mäuse aus dem Labor von Engelhardt, sowie fünf Tiere des Wildtyps C57Bl/6N (Zentrales Tierlabor, Justus-Liebig-Universität Gießen) wurden durch eine inhalative Überdosierung des volatilen Anästhetikums Isofluran in einer abgeschlossenen Glasglocke getötet.

2.6 Gewebebegewinnung und -aufbereitung

2.6.1 Perfusionsfixation

Um sich Zugang zum Herzen unter gleichzeitiger Schonung des Lungengewebes zu verschaffen, wurde vorerst ein Hautschnitt vom Abdomen bis zur Kehlkopfregion gesetzt. Durch Eröffnung des Bauchfells wurden die Abdominalorgane dargestellt und

das Diaphragma eingeschnitten. Die resultierende Atelektase der Lunge schaffte den nötigen Raum, um die *Pars parietalis* des Perikards von der Brustwand zu lösen und das Rippenkorsett am Sternum über dem Herzen zurückzuklappen. Um unzureichende Gewebepfusion durch Thrombenbildung zu vermeiden, wurden 0,1 ml Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, ratiopharm GmbH; Ulm) in den linken Ventrikel des freigelegten Mauserzes gespritzt. Der rechte Vorhof wurde eröffnet und der linke Ventrikel sondiert. Durch diese Sonde wurde das Tier zuerst mit ca. 200 ml Vorspüllösung perfundiert. Im Anschluss erfolgte die Perfusionsfixation mit ca. 500 ml 4%-igen PFA oder Zamboni-Fixans.

2.6.2 Gewebepreparation

Nach Entnahme eines kurzen Stücks des Colons wurden zunächst große Teile des Darmkonvoluts entfernt, um Einsicht in den retroperitonealen Raum zu erlangen. Die am oberen Nierenpol liegenden Nebennieren wurden herauspräpariert. Der Verlauf der Urethra innerhalb des urogenitalen Systems konnte bei beiden Geschlechtern durch Spaltung der Symphyse lückenlos nachvollzogen werden. Die Ureteren und *Ductus deferentes* des männlichen Tieres wurden blasennah abgesetzt, sodass Nieren, Hoden und Nebenhoden *in situ* verblieben, während die restlichen Organe des urogenitalen Systems - Blase, Bläschendrüsen, Koagulationsdrüsen, Prostata, Urethra, Vorhautdrüsen und Penis - en bloc entnommen wurden. Beim Weibchen wurden die Harnleiter ebenfalls nahe ihrer Einmündungsstellen in die Blase durchtrennt und die Vagina senkrecht zu ihrem Verlauf ausgehend vom *Orificium* halbiert, um auch den distalen, in der vaginalen Wand verlaufenden Anteil der Urethra und das urethrale *Ostium* zu erfassen. Somit konnten die Blase, Urethra, Vagina und Drüsen der Klitoris zusammenhängend präpariert werden. Weiterhin wurde der bis zur Kehlkopfregion geführte Hautschnitt erweitert und die Trachea entnommen. Ebenfalls wurde das Fell über der Kaumusculatur abgezogen, um ein Stück dieser kräftig ausgebildeten Skelettmusculatur herauszunehmen. Darauf wurden der Unterkiefer und die Mundbodenmusculatur großzügig abgetrennt, was Zugang zur Zunge schaffte, die ebenfalls herausgeschnitten wurde.

2.6.3 Darstellung des Harntrakts durch transurethrale retrograde Farbstoffinjektion

An jeweils einem männlichen und einem weiblichen Tier wurde die Urethra wie unter 2.6.2 beschrieben *in situ* freigelegt und mit einer peripheren Venenverweilkanüle („Vasofix Safety“, 22 Gauge, B. Braun Melsungen AG; Melsungen) sondiert. Eine

Einmalspritze („Injekt Solo“, 5 ml, B. Braun Melsungen AG; Melsungen) wurde mit dem Farbstoff Methylenblau (1-2%-ig in Aqua dest., Merck; Darmstadt) gefüllt und mit der Kanüle verbunden. Der Farbstoff wurde hiernach retrograd über die intraurethrale Kanüle langsam injiziert, bis eine blaue Färbung der Harnblase zu beobachten war, die eine komplette Füllung des Harntrakts anzeigte.

2.6.4 Aufbereitung des Gewebes für die Kryokonservierung

Die entnommenen Organe wurden vier bis fünf Tage mit 0,1 M Phosphatpuffer gespült, um Reste der Fixationslösung und Verunreinigungen auszuwaschen. Es folgte die Lagerung des Gewebes in 18%-iger Saccharose, gelöst in 0,1 M Phosphatpuffer über Nacht, um Gefrierschutz zu gewährleisten. Danach wurde das Gewebe in mit Tissue Tek gefüllte Cryomold-Plastikförmchen (Tab. 2.4) eingebettet und in 2-Methylbutan, das durch flüssigen Stickstoff unter 0°C gekühlt wurde, schockgefroren. In dieser Form wurden die Organproben bis zur Einleitung weiterer Arbeitsschritte bei -80°C konserviert.

2.7 Herstellung von Gefrierschnitten

Mit einem Kryostaten (Tab. 2.5) wurden aus den Gewebeblöckchen 10 µm dünne Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Hierbei schnitt man die Urethra hauptsächlich in der Transversalebene an, so dass Anschnitte mit rundem bzw. ovalem, in sich geschlossenem Lumen resultierten. Nach einstündiger Trocknung bei Raumtemperatur lagerten die Objektträger bei -20°C bis zu ihrer Verwendung für immunhistochemische Versuche.

2.8 Indirekte Immunhistochemie

2.8.1 Einfache indirekte Immunhistochemie

Jeder Objektträger wurde mit vier bis fünf Gewebeanschnitten versehen, welche im Folgenden zur Vorbereitung auf die immunhistochemische Inkubation mit einem Fettstift (Tab. 2.4) umrandet wurden. Für ca. zehn Minuten trockneten die Präparate bei Raumtemperatur. Danach wurden sie für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit Blocklösung inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Im nächsten Arbeitsschritt wurde das Blockserum abgesaugt und der primäre Antikörper, der zuvor mit PBS+S auf seine optimale Konzentration verdünnt worden war (Tab. 2.2), aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht ebenfalls in einer

feuchten, mit Parafilm (Bemis; Neenah, USA) luftdicht verschlossen Kammer. Es schlossen sich zwei jeweils zehn Minuten dauernde Waschvorgänge in PBS an, bevor die Objektträger für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper bestückt wurden (Tab. 2.3). Dieser Antikörper stammte aus einem Wirtstier (z. B. Esel), das gegen Immunglobuline der Spezies, aus der der Primärantikörper stammte (z. B. Kaninchen), immunisiert worden war. Der sekundäre Antikörper richtete sich gegen den Fc-Teil des primären und war an ein Fluorochrom gekoppelt. Im Hinblick auf ein mögliches Verblässen des Fluoreszenzfarbstoffes durch langen oder intensiven Lichteinfall wurden diese Inkubation und alle folgenden Schritte im Dunkeln durchgeführt. Nach zwei weiteren, je zehn Minuten dauernden Wäschen in PBS-Puffer wurden die Schnittpräparate für zehn Minuten in 4%-igem PFA nachfixiert. Reste des Fixiermittels wurden in PBS für zwei Mal zehn Minuten abgespült und die Gewebeanschnitte mit gepuffertem Glycerol eingedeckelt. Vor der mikroskopischen Auswertung lagerten die Objektträger über Nacht bei 4°C in Dunkelheit.

Während die Arbeitsschritte ab der Bestückung mit dem Sekundärantikörper bei allen Tieren lichtgeschützt durchgeführt wurden, musste bei ChAT^{BAC}-eGFP-positiven Mäusen grundsätzlich schon beim initialen Trocknen, Blockieren, Inkubieren mit dem Primärantikörper und Waschen darauf geachtet werden, das Gewebe vor Licht abzuschirmen, auch wenn von einer relativ beständigen Fluoreszenz des eGFP ausgegangen werden kann [18].

Zusätzlich wurde allen Gewebeanschnitten zusammen mit dem sekundären Antikörper der DNA-bindende Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, 1 mg/ml, 1:1000 verdünnt in PBS, Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) zugesetzt. Dieser ließ Zellkerne blau fluoreszieren, wodurch die Auszählung und Erfassung durch andere Fluorochrome markierter Zellen ermöglicht bzw. erleichtert wurde.

2.8.2 Doppelimmunfluoreszenz

Die Methodik der Doppelimmunfluoreszenz ermöglicht die gleichzeitige Markierung zweier Antigene im Schnittpräparat. Das Versuchsprotokoll für die Doppelmarkierung entspricht dem für die einfache indirekte Immunhistochemie (Immunhistochemie IHC), mit der Ausnahme, dass jeweils zwei primäre und zwei sekundäre Antikörper verwendet und zusammen auf den Objektträger aufgetragen werden. Um methodische Fehler durch Wechselwirkungen zwischen beiden Primärantikörpern auszuschließen, erfolgte stichprobenartig auch eine getrennte Inkubation. Im Fall der getrennten Inkubation mit den Primärantikörpern verlängerte sich der Versuchsablauf um einen Tag, da beide Antikörper nacheinander jeweils eine Nacht auf den Schnitten verblieben. Am nächsten

bzw. übernächsten Tag wurde die überschüssige Antikörperlösung mit PBS abgewaschen, so dass die Schnittpräparate mit den sekundären Antikörpern bestückt werden konnten. Hierbei verwendete man Antikörper, die sich jeweils gegen diejenige Tierspezies richteten, die den Primärantikörper gebildet hatte und die an Fluorochrome zweier gut voneinander unterscheidbarer Farbspektren gekoppelt waren. Die nachfolgenden Waschvorgänge und die Schnittfixierung in 4%-igem PFA fanden analog zum Protokoll für die einfache IHC statt.

Immunhistochemische Markierungen mit zwei aus derselben Tierspezies stammenden Primärantikörpern ermöglichte die Verwendung des Alexa Fluor® Antibody Labeling Kits (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA), mit dem der zweite primäre Antikörper vor der Schnittinkubation direkt an ein Fluorophor gekoppelt wurde. Analog zum Vorgehen bei der einfachen indirekten IHC erfolgte die Bestückung der Objektträger mit dem ersten Primär- und Sekundärantikörper (siehe 2.8.1) über Nacht (Primärantikörper) bzw. für eine Stunde (Sekundärantikörper). Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils zehn Minuten und Nachfixieren in 4% PFA für 10 min wurden die Schnitte mit dem zweiten primären Antikörper inkubiert, welcher zuvor an Alexa Fluor® 647, einen rot fluoreszierenden Farbstoff, gekoppelt worden war: Der Antikörper (z.B. Anti-PLC β 2, Verdünnung 1:250) wurde erst mit der Labeling-Komponente A (17,6 μ l, berechnet aus 2200 μ l benötigtem Endvolumen bei 22 Objektträgern, 8,8 μ l bzw. 1,76 μ g benötigtem Antikörper bei einer Antikörper-Konzentration von 200 μ g/ml und 10 μ l der Komponenten A und B pro 1 μ g Ig), dann mit der Blocking-Komponente B (17,6 μ l) für jeweils fünf Minuten inkubiert. Die mit PBS auf das Endvolumen aufgefüllte Antikörperlösung (2156 μ l, berechnet aus 2200 μ l - 8,8 μ l - 2 x 17,6 μ l) wurde weitere fünf Minuten inkubiert, bevor sie für eine Stunde auf die Schnitte aufgebracht wurde. Nach 20 Minuten Waschen in zwei Schritten in PBS und Schnittfixierung in 4%-igem PFA konnten die Schnittpräparate in Glycerol eingedeckelt werden.

2.9 Auswertung am Fluoreszenzmikroskop

2.9.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der inkubierten Schnitte erfolgte an einem Auflichtfluoreszenzmikroskop (Tab. 2.5). Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampfampe, deren generiertes Licht das gesamte sichtbare Spektrum umfasst. Dieses Licht passiert einen Anregungsfilter, der nur Licht eines bestimmten Wellenlängenbereiches durchtreten lässt, entsprechend des Absorptionsspektrums des jeweils an den Sekundärantikörper gekoppelten

Fluorochroms. Der dadurch angeregte Fluoreszenzfarbstoff emittiert das Licht wiederum in Form eines spezifischen Emissionsspektrums. Das Licht durchläuft einen dichroischen Spiegel und einen Sperrfilter, wodurch es dem Betrachter im charakteristischen Farbton erscheint, wohingegen der dichroische Spiegel das Licht der benötigten Wellenlängen zur Anregung des Fluorophors reflektiert. Auf diese Weise stellen sich die Fluorochrome FITC grün, Cy3 rot-orange und Alexa Fluor® 647 rot dar. Zellkerne wurden mit DAPI markiert, wobei es sich um einen DNA-Farbstoff handelt, der blau leuchtet. Die Filterbezeichnungen, Farben, Erregerfilter- und Sperrfilterspektren, sowie Wellenlängen der dichroischen Spiegel der verwendeten Fluorophore sind in Tabelle 2.6 genauer aufgeführt.

Farbstoff	Filterbezeichnung	Farbe	Erregerfilterspektrum	Sperrfilterspektrum	Dichroischer Spiegel
DAPI	U-MNUA	Blau	360-370 nm	420-460 nm	400 nm
FITC	U-MNIBA	Grün	460-490 nm	515-550 nm	505 nm
Cy3	U-M41007A	Rot-Orange	525-560 nm	570-650 nm	555 nm
Alexa Fluor® 647	U-M41008	Infrarot	590-650 nm	665-740 nm	655 nm

Tab 2.6: Übersicht über Filterbezeichnungen, Farbstoffe und deren Farben, Erregerfilterspektren, Sperrfilterspektren und dichroische Spiegel des Fluoreszenzmikroskops.

2.9.2 Auswertung der inkubierten Schnittpräparate

Jeder urethrale Anschnitt wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, insofern man die Urethra in ihrer gesamten Zirkumferenz sehen konnte. Je nachdem welche Fluorophore im Detektionssystem Verwendung gefunden hatten, wurden die passenden Fluoreszenzfilter eingestellt und alle Zellen gezählt, die grün, rot bzw. rot-orange leuchteten. Fanden sich nach Durchführung von immunhistochemischen Doppelmarkierungen zwei Antigene in einer Zelle, fluoreszierte diese grün und rot bzw. rot-orange. Alle Zellen, die fluoreszierten und so angeschnitten waren, dass der Zellkern sichtbar war, fanden Eingang in die statistische Wertung.

Mithilfe der Kamera „Axio Cam color“ und der Bildverarbeitungssoftware „Axio Vision Release“ (Versionen 4.7 und 4.8) wurden fluoreszenzmarkierte Zellen fotografiert und als zvi- sowie tif-Dateien gespeichert. Die Bildbearbeitung beschränkte sich auf Anpassungen der Helligkeit und des Kontrasts mittels des Programms „Power Point“.

2.10 Spezifitätskontrollen der immunhistochemischen Markierungen

2.10.1 Positivkontrolle

Die Positivkontrolle dient als Test für die Funktionalität des primären Antikörpers, sein Antigen zu erkennen. Es wurde hierfür Gewebe, in dem das jeweilige Antigen nachweislich exprimiert wird, entsprechend des Protokolls für die einfache indirekte IHC inkubiert. Bei jeder Inkubationsserie wurde zusammen mit den urethralen Schnittpräparaten eine Positivkontrolle mitgeführt und hinsichtlich Blockierung, Schnittfixierung und Einbettung identisch behandelt.

Die nachfolgende Tabelle 2.7 listet das jeweils verwendete Organ für die Positivkontrollen der verschiedenen Primärantikörper auf.

Nachzuweisendes Antigen	Organ für Positivkontrolle
eGFP	Colon
PGP	Colon, Harnblase
CgA	Nebennierenmark
Villin	Colon, Trachea
Gustducin	Geschmacksknospen der Zunge
PLC β 2	Trachea
TRPM5	Geschmacksknospen der Zunge
CGRP	Colon
5-HT	Colon
VACht	Skelettmuskel
ChAT	Skelettmuskel
Tas1r3	Geschmacksknospen der Zunge

Tab 2.7: Auflistung der für immunhistochemische Positivkontrollen verwendeten Organe

2.10.2 Negativkontrolle

Mithilfe der Negativkontrolle kann festgestellt werden, ob der sekundäre Antikörper unspezifische Bindungen im Gewebe eingeht. Bei dieser Kontrolle wird ebenfalls nach dem Protokoll für die einfache indirekte IHC vorgegangen, anstatt des primären Antikörpers jedoch nur PBS auf Gewebe mit gesicherter Immunreaktivität mit dem Primärantikörper aufgetragen. Bei fehlender Fluoreszenz liegen keine falsch-positiven Immunmarkierungen durch die Sekundärreagenzien vor.

2.10.3 Präabsorptionskontrolle

Die Präabsorptionskontrolle dient dem Nachweis, dass ein Primärantikörper sein Epitop spezifisch erkennt. Durch Vorinkubation mit einem Peptid, das sich gegen die Antigenstrukturen des primären Antikörpers richtet, werden die Antigenbindungsstellen des Antikörpers besetzt und eine Bindung an das Antigen im Gewebe verhindert. Das Gewebe bleibt nach Inkubation mit dem präabsorbierten Antikörper folglich immunnegativ.

Das Peptid (sc-395 P und sc-206 P zur Präabsorption von Gustducin bzw. PLC β 2, beide von Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Heidelberg) wurde in der Konzentration 20 μ g/ml in der entsprechenden Gebrauchskonzentration des Primärantikörpers über Nacht im Kühlschrank bei 4°C zusammengeführt. Mit dem präabsorbierten Gemisch wurde ein Schnittpräparat analog zum Vorgehen bei der einfachen indirekten IHC bestückt. Zusätzlich wurde ein Gewebeanschnitt mitgeführt, der mit dem jeweiligen, nicht-präabsorbierten Primärantikörper inkubiert wird. An einem weiteren Präparat wurde eine Negativkontrolle durchgeführt.

Da für den Anti-TRPM5-Antikörper kein Peptid für eine Präabsorptionskontrolle erhältlich war, wurde die Spezifität der Markierung durch Inkubation mit einem Präimmunserum überprüft [88].

2.11 Auszählung der Zellen und statistische Auswertung

Fluoreszierende Zellen wurden in Tabellen erfasst. Die erstellten Tabellen umfassten drei Kategorien. Leuchtete eine Zelle sowohl im FITC-Filter grün als auch rot-orange im Cy3-Filter, sprach dies für eine Kolo-kalisation der Antigene innerhalb der Zelle, welche folglich zur Kategorie +/+ gezählt wurde. Je nachdem, ob eine Zelle allein positiv mit dem in der Tabelle an erster oder zweiter Stelle stehenden Antikörper reagierte, wurde sie der Kategorie +/- oder -/+ zugeordnet. Bei dem an zweiter Stelle aufgeführten Antikörper handelte es sich zumeist um Hühnchen-anti-eGFP zur Verstärkung des eGFP. Für jeden einzelnen der untersuchten Objektträger mit urethralen Anschnitten wurde eine Tabelle erstellt.

Unter Berücksichtigung des Geschlechts der Maus und unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb der Harnröhre wurden alle Zellen, die mit demselben Antikörper aus Tab. 2.2 bestückt worden waren, zusammengezählt. Ausgehend von dieser absoluten Zahl an leuchtenden Zellen, wurden relative Prozentsätze der Zellen berechnet, die für beide oder nur ein Antigen immunreaktiv waren. In Abhängigkeit von der Anzahl an Versuchstieren (n) ergaben sich n mal drei (für drei Kategorien) Prozentzahlen, welche

in der Folge statistisch ausgewertet wurden. Unter Zuhilfenahme des Kalkulationsprogrammes „Microsoft Excel“ wurden der Mittelwert und die Standardabweichung ausgerechnet und die Daten grafisch veranschaulicht.

3. ERGEBNISSE

3.1 Abschnittsgliederung der Urethra

3.1.1 Männchen

Makroskopisch wird die Harnröhre des Männchens in penilen Abschnitt, von Muskulatur umhülltes Divertikel, pelvinen Abschnitt und *Colliculus seminalis* (Abb. 3.1) eingeteilt. Auf mikroskopischer Eben wurden die Segmentgrenzen der urethralen Organabschnitte festgelegt, indem transversale, mittels des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI gefärbte Schnittserien in Abständen von jeweils ca. 500 µm, untersucht wurden.

Der vom Harn zuletzt passierte – distalste - Teil der Harnröhre ist der penile Abschnitt (Abb. 3.2-3.4). Am *Orificium externum urethrae* besteht die urethrale Mukosa aus einem bis zu neunschichtigen verhornten Epithel. In Richtung der Harnblase läuft die Hornschicht nach ca. einem Millimeter aus und das Epithel verfügt über drei bis fünf Zellschichten. Das vorerst sternförmig gefaltete urethrale Lumen nimmt harnblasenwärts eine zunehmend hufeisen- bis bananenförmige Konfiguration ein und wird von wenigen PUD umrandet (Abb. 3.3).

Am konvexen Bogen der hufeisenförmigen Urethra bildet sich das pilzhutartige urethrale Divertikel aus (Abb. 3.4). Im Bereich der Abzweigung des Divertikels aus dem penilen Harnröhrenstück befinden sich die Ausführungsgänge der bulbourethralen Drüsenkörper. Mit der Trennung des pilzhutförmigen Teilstücks des urethralen Divertikels vom hufeisenartigen Querschnitt der Urethra (Abb. 3.5) beginnt der pelvine Organabschnitt. Die als Pilzhut bezeichnete Struktur stellt folglich die quer angeschnittene Verbindung zum sackförmigen urethralen Divertikel dar. In Abhängigkeit von Anchnittswinkel und Füllungszustand variiert die Höhe der das urethrale Divertikel auskleidenden Zellschichten. Stellenweise blickt man auf ein ein- bis zweireihiges Epithel. Im submukösen Gewebe um das Divertikel liegen viele PUD (Abb. 3.5).

Das pelvine Segment der Urethra des Männchens zeichnet sich durch ein ausgesprochen weites Lumen und das Vorkommen zahlreicher PUD um die gesamte urethrale Zirkumferenz aus (Abb. 3.6), wobei sich die AG mehrerer Drüsen zu wenigen großkalibrigen vereinigen. Das kubische bis hochprismatische Epithel der pelvinen Urethra ist ein-

bis dreireihig, z.T. mehrschichtig (Abb. 3.7), und bildet Schleimhautfalten aus, so dass eine Abgrenzung von urethralem Epithel und Epithelauskleidung der großen AG stellenweise stark erschwert ist. Die pelvine Urethra endet am Beginn des *Colliculus seminalis*, der dadurch gekennzeichnet ist, dass die Urethra von dorsal durch einen Gewebehügel eingedellt wird (Abb. 3.8). Innerhalb dieses transversal angeschnittenen Hügels stellen sich die Endstücke der Ausführungsgänge von *Ductus deferentes*, Koagulationsdrüsen und Bläschendrüsen vor ihrer Einmündung in die zwei- bis sechsschichtige oder –reihige prostatistische Urethra dar (Abb. 3.8-3.10). Im proximalen Bereich des *Colliculus seminalis* sieht man multiple kleinere Lumina, die Anschnitten der murinen dorsolateralen Prostata sowie den exkretorischen Gängen der Samenbläschen, Koagulationsdrüsen und *Ductus deferentes* entsprechen, die während ihres Verlaufs quer angeschnitten wurden (Abb. 3.10). Kranial des *Colliculus seminalis* ist das Lumen der Harnröhre schlitzförmig und das Epithel weist vereinzelt Deckzellen auf (Abb. 3.11). Dieser Organabschnitt vor dem Übergang in die Harnblase mit transitorischem, drei- bis vierschichtigem bzw. -reihigem Epithel wird als Blasen Hals bezeichnet (Abb. 3.12). In enger Nachbarschaft zur Blasenhalmsmukosa finden sich regelmäßig transversal angeschnittene Ausführungsgänge der ventralen Prostata (Abb. 3.11). Die Beurteilung von exkretorischen Gängen des ventralen Anteils der murinen Prostata erfolgt im Weiteren getrennt von der der exkretorischen Gänge der dorsolateralen Prostata, da letztere aufgrund ihrer Lokalisation zum *Colliculus seminalis* gezählt werden.

3.1.2 Weibchen

Die Harnröhre der weiblichen Maus wird in einen distalen und proximalen Abschnitt eingeteilt (Abb. 3.13). An ihrem distalsten (äußersten) Punkt ist die Urethra des Weibchens schlitzförmig und wird von den Ausführungsgängen der Klitorisdrüsen und von Haarfollikeln umrahmt (Abb. 3.14, 3.15). Das verhornte Epithel besteht aus bis zu acht Schichten. Proximal des *Orificium externum urethrae* nimmt die Höhe der Mukosa ab und weist keine Verhornung auf. Drei bis fünf Zelllagen in mehrschichtiger sowie auch mehrreihiger Anordnung begrenzen das schmale, weiterhin schlitzförmige Lumen (Abb. 3.16). Das histologische Bild der distalen Hälfte der Urethra des Weibchens wird bestimmt durch das Vorkommen zahlreicher paraurethraler Drüsenpakete, welche in das die Urethra umgebende Schwellkörpergewebe eingebettet sind (Abb. 3.17). Das hier rundliche Lumen nimmt weiter in Richtung Blase eine H-Form ein (Abb. 3.18). Die Anzahl der PUD verringert sich zunehmend bis zu ihrer völligen Abwesenheit im periurethralen Gewebe der proximalen Hälfte des Organs. In diesem Abschnitt verfügt die urethrale Mukosa

über drei bis fünf Zellschichten bzw. stellenweise auch –reihen (Abb. 3.19). Das Erschei-
nen von apikalen Deckzellen im urethralen Epithel kennzeichnet den Übergang in den
Blasenhals, begleitet von einer steten Aufweitung des Lumens.

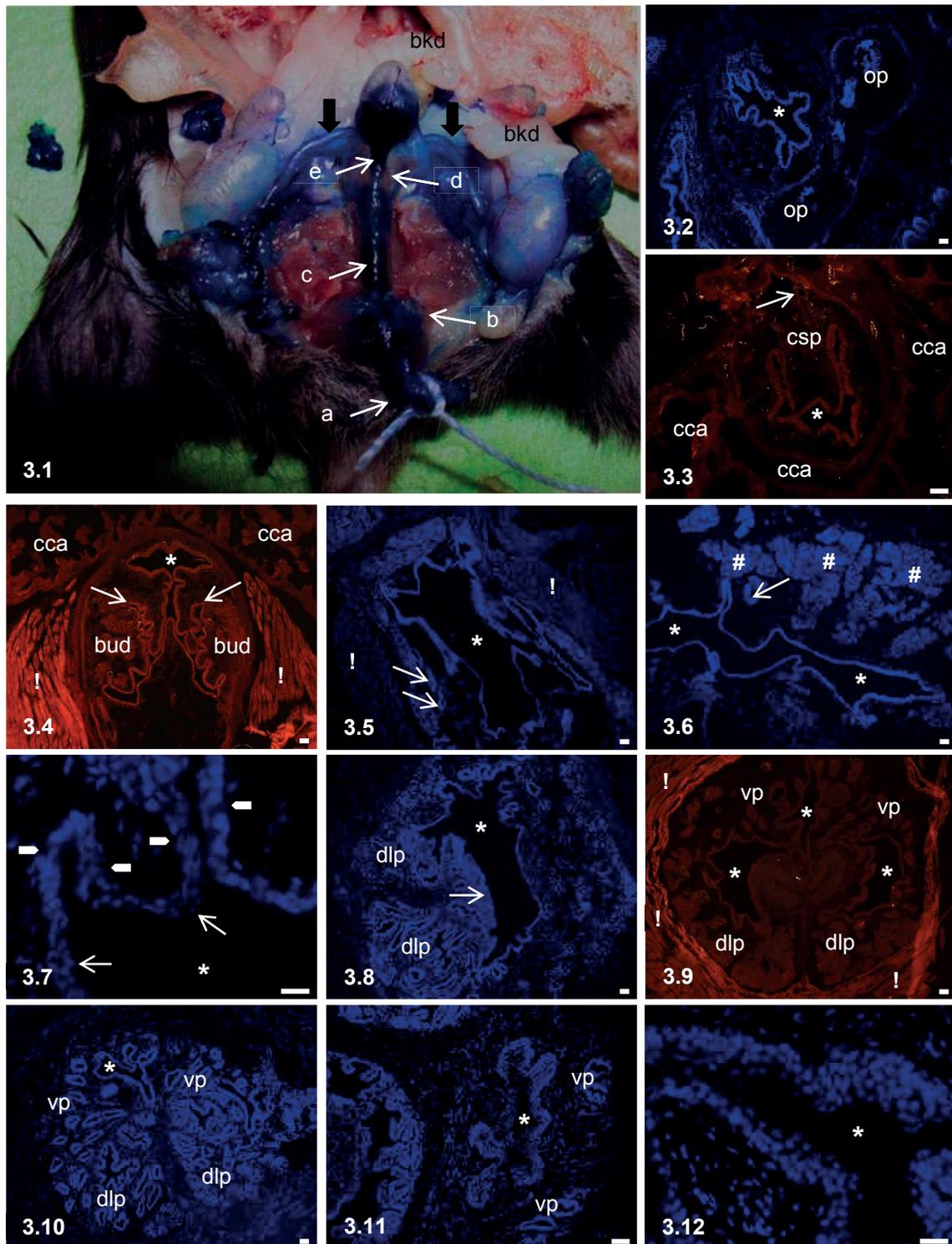


Abb. 3.1-3.12 Abschnittsgliederung der männlichen Urethra. **Abb. 3.1** Makroskopie der männlichen Urethra nach Methylenblauinstillation. Die Urethra des Männchens wird eingeteilt in penilen Abschnitt (a), Divertikel (b), pelvinen Abschnitt (c), *Colliculus seminalis* (d) und Harnblasenhals (e). Hb: Harnblase, Blockpfeile: *Ductus deferens*, bkd: Bläschen- und Koagulationsdrüse (linksseitig herunter-, rechtsseitig hochgeklappt). **Abb. 3.2** Kernfärbung mit DAPI. Penile Urethra (*: Lumen), *Orificium externum*. op: *Os penis*. **Abb. 3.3** IHC Anti-eGFP, Cy3. Penile Urethra (*: Lumen). csp: *Corpus spongiosum*, cca: *Corpora cavernosa*, Pfeil: PU-DAG. **Abb. 3.4** IHC Anti-eGFP, Cy3. Penile Urethra (*: Lumen) im Bereich der Abspaltung des Divertikels und Einmündung der Ausführungsgänge (Pfeile) der bulbourethralen Drüsen (bud). cca: *Corpora cavernosa*, !: *M. urethralis*/*M. bulbocavernosus*.

Abb. 3.5 Kernfärbung mit DAPI. Divertikel (*: Lumen). Pfeile: PUDAG, !: *M. bulbocavernosus*. **Abb. 3.6** Kernfärbung mit DAPI. Pelvine Urethra (*: Lumen). Pfeil: PUDAG, #: PUD. **Abb. 3.7** Kernfärbung mit DAPI. Epithel (Pfeile) der pelvinen Urethra (*: Lumen) mit Schleimhautfalten (Pfeilspitzen). **Abb. 3.8** Kernfärbung mit DAPI. Beginn des *Colliculus seminalis* (*: Lumen) mit Vorwölbung der urethralen Hinterwand (Pfeil). dlp: dorsolaterale Prostata. **Abb. 3.9** IHC Anti-eGFP, Cy3. *Colliculus seminalis* (*: Lumen). vp: ventrale Prostata, dlp: dorsolaterale Prostata, !: *M. urethralis*. **Abb. 3.10** Kernfärbung mit DAPI. *Colliculus seminalis* (*: Lumen), weiter proximal. vp: ventrale Prostata, dlp: dorsolaterale Prostata. **Abb. 3.11** Kernfärbung mit DAPI. Blasen Hals (*: Lumen). vp: ventrale Prostata. **Abb. 3.12** Kernfärbung mit DAPI. Transitorisches Epithel des Blasen Halses (*: Lumen). Maßstabbalken Abb. 3.2-3.6: 50 µm, Abb. 3.7: 20 µm, Abb. 3.8-3.11: 50 µm, Abb. 3.12: 20 µm.

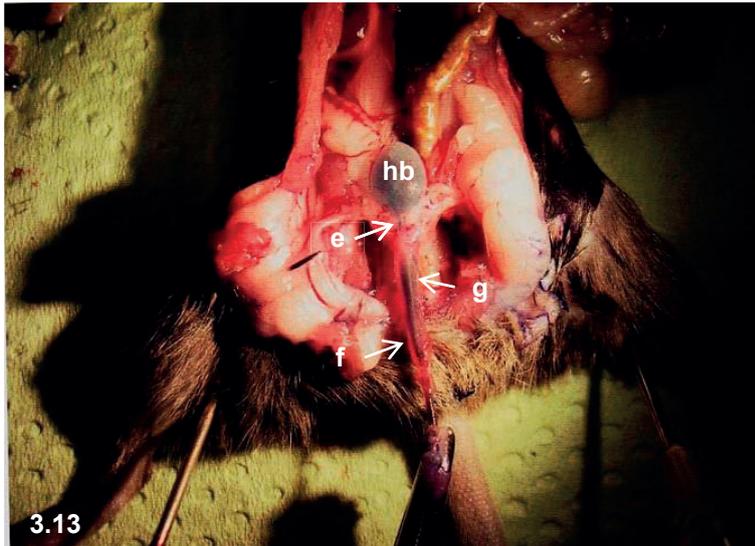


Abb. 3.13-3.19 Abschnitgliederung der weiblichen Urethra. **Abb. 3.13** Makroskopie der weiblichen Urethra nach Methylenblauinstillation. Die Urethra des Weibchens wird eingeteilt in distalen (f), proximalen Abschnitt (g) und Harnblasenhals (e). hb: Harnblase.

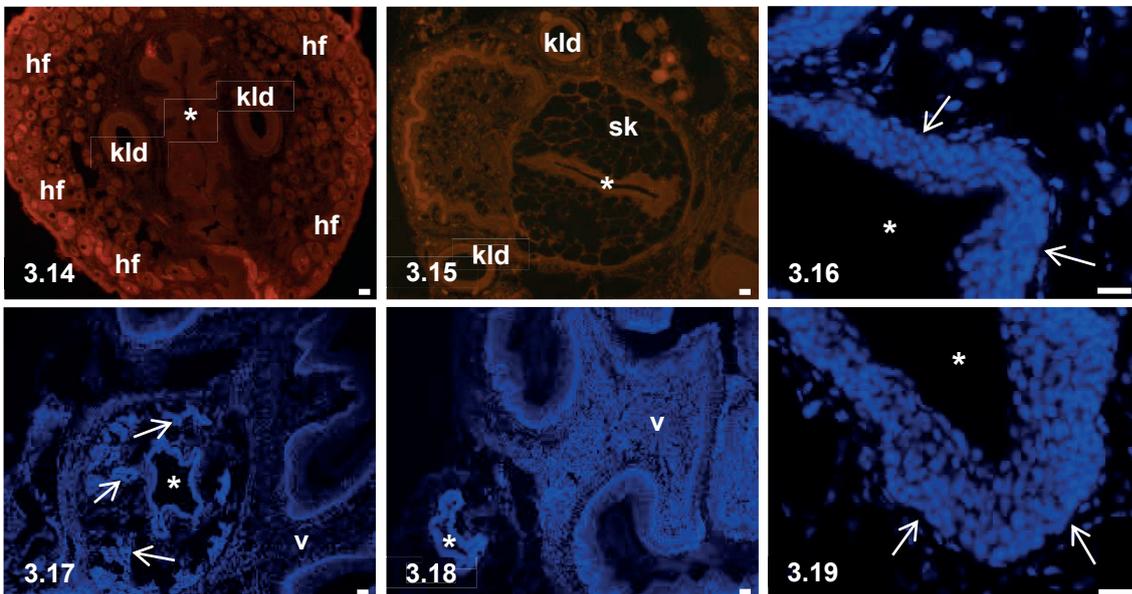


Abb. 3.14 IHC Anti-eGFP, Cy3. Urethra (*: Lumen), *Orificium externum*. kld: Ausführungsgänge der Klitorisdrüsen, hf: Haarfollikel. **Abb. 3.15** IHC Anti-eGFP, Cy3. Distale Urethra (*: Lumen). kld: Ausführungsgänge der Klitorisdrüsen, sk: Schwellkörper. **Abb. 3.16** Kernfärbung mit DAPI. Epithel (Pfeile) der distalen Urethra (*: Lumen). **Abb. 3.17** Kernfärbung mit DAPI. Distale Urethra (*: Lumen). Pfeile: PUDAG, v: vaginales Epithel. **Abb. 3.18** Kernfärbung mit DAPI. Proximale Urethra (*: Lumen). v: vaginales Epithel. **Abb. 3.19** Kernfärbung mit DAPI. Epithel (Pfeile) der proximalen Urethra (*: Lumen). Maßstabbalken Abb. 3.14-3.15: 50 µm, Abb. 3.16: 20 µm, 3.17-3.18: 50 µm, Abb. 3.19: 20 µm.

3.2 Vorkommen solitärer cholinerges Epithelzellen im Urogenitaltrakt

3.2.1 Nierenbecken, Ureteren und Harnblase

Im Urothel des Nierenbeckens, des Ureters und der Harnblase fehlten solitäre cholinerge Epithelzellen sowohl bei der männlichen als auch weiblichen ChAT^{BAC}-eGFP-Maus (Abb. 3.20a-c).

Ohne immunhistochemische Behandlung zeigte sich keine Autofluoreszenz; auch durch die Verstärkung des eGFP mittels eines Antikörpers wurde weder im Nierenbecken (Abb. 3.20a) und Ureter (Abb. 3.20b), noch in der Harnblase (Abb. 3.20c) eine Epithelzelle markiert. Gelegentlich fanden sich im Urothel und subepithelialen Stroma der Harnblase grün fluoreszierende, kleine, rundliche Zellen des Immunsystems. Cholinerge Nervenfasern waren stets zu erkennen (Abb. 3.20a-c).

Der Anti-eGFP-Antikörper markierte auf Positivkontrollen aus dem Colon cholinerge Zellen und Nervenfasern (Abb. 3.21a-c).

3.2.2 Urethra und akzessorische Drüsen des Männchens

Das Vorkommen cholinerges Epithelzellen in der Mukosa der Urethra und akzessorischen Drüsen des Männchens variierte je nach untersuchtem Organabschnitt (Tab. 3.1). Im penilen Segment fanden sich durchschnittlich 0,4 Zellen pro Abschnitt (Tab. 3.1). Dabei kamen cholinerge Zellen im Bereich des verhornten Epithels des *Orificium externum* nicht vor; mit zunehmender Nähe zum Divertikel stieg ihre Anzahl, auch in den penilen paraurethralen Drüsen, an. Innerhalb der Drüsen befanden sich cholinerge Zellen ausschließlich im Epithel der Ausführungsgänge; in den Drüsenendstücken wurden sie nicht beobachtet.

Pro Divertikelanschnitt wurden ca. 2,6 cholinerge ChAT^{BAC}-eGFP-positive Epithelzellen verzeichnet (Tab. 3.1). Sie waren insbesondere im dem als Pilzhut beschriebenen Teil des Divertikels zahlreich, wo sie auch Gruppen aus zwei bis drei benachbarten Zellen bildeten. Cholinerges Zellen waren auch in den Ausführungsgängen der bulbourethralen Drüsen und im Gangepithel peridivertikulärer Drüsen nachweisbar.

Im pelvinen Organabschnitt wurden durchschnittlich 1,2 Zellen pro Abschnitt gezählt (Tab. 3.1). Ihr Vorkommen war in der Umgebung des Divertikels am zahlreichsten und verringerte sich in Richtung des *Colliculus seminalis*. Häufig waren sie an den Einmündungsstellen paraurethraler exkretorischer Gänge in die pelvine Urethra, zum Teil auch in sich gegenüberliegenden Gruppen lokalisiert. Häufig waren solitäre cholinerge Zellen in Epithelnischen nachweisbar.

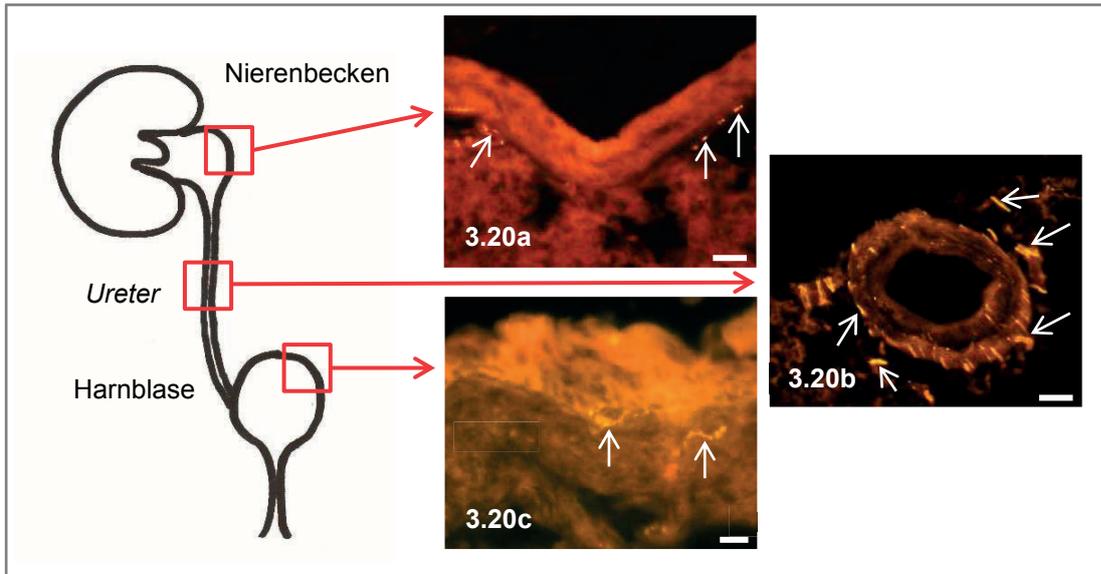


Abb. 3.20a-c Fehlen solitärer cholinergischer Epithelzellen in den ableitenden Harnwegen proximal der Urethra. IHC Anti-eGFP, Cy3. Pfeile: subepitheliale cholinergische Nervenfasern. a: Nierenbecken, b: Ureter, c: Harnblase. EGFP-positive Epithelzellen sind jeweils nicht nachweisbar.
 Maßstabbalken: Abb. 3.20a und b: 50 μm , Abb. 3.20c: 20 μm .

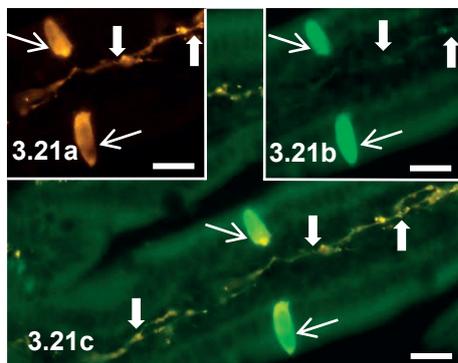


Abb. 3.21a-c Positivkontrolle des Anti-eGFP-Antikörpers. Dünndarm. IHC a: Anti-eGFP, Cy3, b: EGFP, c: *Mischbild*. Der Anti-eGFP-Antikörper markiert intraepitheliale Zellen (Pfeile) und cholinergische Nervenfasern (Blockpfeile).
 Maßstabbalken Abb. 3.21a-c: 20 μm .

Pro *Colliculus seminalis* fanden sich 3,6 Zellen pro Schnitt; bezieht man die durchschnittliche Zellzahl auf alle auf diesem *Colliculus seminalis*-Anschnitt gezählte Anschnitte von AG, resultieren 0,1 cholinerge Zellen pro AG (Tab. 3.1). Neben der Mukosa der prostatichen Urethra wiesen zudem auch die Urethra-nahen terminalen Stücke, insbesondere von Samenbläschen und Koagulationsdrüsen, regelmäßig solitäre ChAT^{BAC}-eGFP-positive Epithelzellen auf. Vereinzelt waren cholinerge Zellen auch in Urethra-ferneren, Drüsenkörper-nahen Abschnitten zu verzeichnen. Kleinere, direkt in der Umgebung der prostatichen Urethra lokalisierte und mittelgroße, distalere exkretorische Gänge der murinen Prostata enthielten häufig ChAT^{BAC}-eGFP-positive z.T. in Klustern organisierte Zellen.

Im transitorischen Epithel des Blasenhalses waren cholinerge solitäre Zellen mit 0,3 Zellen pro Anschnitt im Durchschnitt selten (Tab. 3.1).

Penile Urethra

	nZellen	nAnschnitte	Ø (Zellen pro Anschnitt)
#1	4	126	0,03
#2	67	185	0,4
#3	116	232	0,5
#4	104	431	0,2
#5	112	165	0,7
#6	140	277	0,5
#7	155	293	0,5
gesamt	698	1709	0,4

Divertikel

	nZellen	nAnschnitte	Ø (Zellen pro Anschnitt)
#2	40	30	1,3
#3	35	41	0,9
#5	134	32	4,2
#6	50	76	0,7
#7	29	19	1,5
#8	25	51	0,5
#9	424	33	12,8
gesamt	737	282	2,6

Pelvine Urethra

	n _{Zellen}	n _{Anschnitte}	Ø (Zellen pro Anschnitt)
#1	32	49	0,7
#2	119	246	0,5
#3	229	179	1,3
#4	99	88	1,1
#5	80	91	0,9
#6	351	129	2,7
#7	175	121	1,4
gesamt	1085	903	1,2

Colliculus seminalis

	n _{Zellen}	n _{Colliculus-Anschnitte}	Ø (Zellen pro Colliculus-Anschnitt)	n _{AG-Anschnitte}	Ø (Zellen pro AG-Anschnitt)
#2	50	20	2,5	845	0,1
#3	78	36	2,2	1226	0,1
#4	110	21	5,2	668	0,2
#5	340	70	5	2208	0,2
#6	123	38	3,2	1324	0,1
#7	157	46	3,4	1244	0,1
#8	45	31	1,5	1105	0,04
#9	114	18	6,3	793	0,1
Gesamt	1017	280	3,6	9413	0,1

Blasenhals, Männchen

	n _{Zellen}	n _{Anschnitte}	Ø (Zellen pro Anschnitt)
#3	6	10	0,6
#4	16	19	0,8
#5	8	40	0,2
#6	1	19	0,1
#7	5	32	0,2
#8	4	17	0,2
gesamt	40	137	0,3

Tab. 3.1 Durchschnittliche Anzahl ChAT^{BAC}-eGFP-positiver Zellen (Ø (Zellen pro Anschnitt)) pro Tier (#1-9) berechnet aus absoluter Anzahl eGFP-positiver Zellen (n_{Zellen}) pro Anzahl an Urethraanschnitten (n_{Anschnitte}), eingeteilt nach Organabschnitt der männlichen Urethra. Für den Colliculus-Bereich wurde die durchschnittliche Anzahl eGFP-positiver Zellen (Ø (Zellen pro Colliculus-Anschnitt)) pro Colliculus-Anschnitt (n_{Colliculus-Anschnitte}) sowie die durchschnittliche Zellzahl (Ø (Zellen pro AG-Anschnitt)) bezogen auf alle ausgezählten AG (n_{AG-Anschnitte}) eines Colliculus-Anschnitts berechnet.

3.2.3 Urethra und akzessorische Drüsen des Weibchens

Cholinerge solitäre Epithelzellen waren auch in der urethralen Mukosa und den PUDAG im Bereich der distalen Urethra der weiblichen Maus nachweisbar (Tab. 3.2). Die Zelle

war in der distalen Hälfte der Harnröhre mit durchschnittlich 2,7 Zellen pro Anschnitt wesentlich häufiger als in der proximalen mit 1,2 Zellen (Tab. 3.2). Oft lagen sich zwei bis drei Zellen im Gangepithel der PUD gegenüber oder waren direkt benachbart. Innerhalb der distalen urethralen Organhälfte befanden sich cholinerge Zellen, oft auch in Gruppen zu zwei bis drei Zellen, bevorzugt proximal des *Orificium externum* im unverhornten Epithel sowie in Nachbarschaft der Einmündungsstellen paraurethraler exkretorischer Drüsengänge in die Urethra. Die Anzahl cholinerg Zellen nahm nach proximal stetig ab. Im Blasenhalss waren sie mit durchschnittlich 0,1 Zellen pro Anschnitt sehr selten (Tab. 3.2).

Nebenbefundlich stellten sich einzelne cholinerge solitäre Epithelzellen im mehrschichtig verhornten Plattenepithel der Vagina dar, die vorwiegend basal anzutreffen waren und nur nach Antikörperverstärkung des eGFP-Signals leuchteten.

Distale Urethra

	nZellen	nAnschnitte	Ø (Zellen pro Anschnitt)
#10	487	141	3,5
#11	533	272	2
#12	719	205	3,5
#13	184	82	2,2
gesamt	1923	700	2,7

Proximale Urethra

	nZellen	nAnschnitte	Ø (Zellen pro Anschnitt)
#10	281	268	1,1
#11	20	27	0,7
#12	141	68	2,1
#13	126	95	1,3
gesamt	568	458	1,2

Blasenhalss, Weibchen

	nZellen	nAnschnitte	Ø (Zellen pro Anschnitt)
#10	0	31	0
#13	5	52	0,1
#14	5	12	0,4
gesamt	10	95	0,1

Tab. 3.2 Durchschnittliche Anzahl ChAT^{BAC}-eGFP-positiver Zellen (Ø (Zellen pro Anschnitt)) pro Tier (#10-14) berechnet aus absoluter Anzahl eGFP-positiver Zellen (n_{Zellen}) pro Anzahl an Urethraanschnitten (n_{Anschnitte}), eingeteilt nach Organabschnitt der weiblichen Urethra.

3.3 Abgrenzung neuroendokriner Zellen von solitären cholinergen Epithelzellen

3.3.1 Form neuroendokriner Zellen in den Urethrae und periurethralen Drüsen von männlicher und weiblicher Maus

Die Darstellung neuroendokriner Zellen erfolgte immunhistochemisch mittels Antikörpern gegen PGP, 5-HT und CgA. Geschlechtsübergreifend fanden sich im Epithel der murinen Urethra und der PUDAG PGP-, 5-HT- und CgA-positive Zellen (Abb. 3.22a-d-3.27a-c).

Der Zelleib neuroendokriner Zellen war innerhalb der Harnröhrenschleimhaut hauptsächlich basal lokalisiert; selten befanden sie sich in mittlerer und äußerst selten in apikaler Lage. Das Perikaryon war rund, oval, dreieckig oder tropfen- bis flaschenförmig. Der große Nukleus befand sich meist mittig im Zelleib der größenvariablen Zelle. Urethrale neuroendokrine Zellen wiesen häufig apikale (Abb. 3.22a, b, 3.23a, b, 3.25a, b, 3.27a, b) basale (Abb. 3.27a, b) oder horizontale (Abb. 3.23a, b, 3.25a, b, 3.26a, b) Zellfortsätze auf. Dabei verfügte eine Zelle überwiegend über einen Fortsatz, doch auch zwei oder drei Fortsätze wurden regelmäßig beobachtet. Über ihre apikalen Projektionen erreichten neuroendokrine Zellen insbesondere in Epithelien niedrigerer Zellschichthöhe - in pelviner Urethra, *Colliculus seminalis* und Divertikel - das urethrale Lumen. Sehr lange Fortsätze basal gelegener neuroendokriner Zellen erstreckten sich über mehrere Zellschichten bis zum Lumen. In apikalen bis mittleren Zellschichten innerhalb der urethralen Mukosa lokalisierte neuroendokrine Zellen verfügten vornehmlich über einen basalen Fortsatz in Richtung Basalmembran. Überdies zeigten sich in basalen Zellschichten neuroendokrine Zellen, die beidseits je einen sehr langen Fortsatz nach horizontal projizierten, welcher sowohl intraepithelial als auch subepithelial parallel zur Basalmembran verlief. In zahlreichen Fällen wiesen die Projektionen jeglicher Ausrichtungen terminale Auftreibungen auf.

Die Antikörper Anti-PGP und Anti-CgA banden entlang der adluminalen Zellschicht von Harnblasenhals- und Harnblasenschnitten (Abb. 3.28a-c). In den Positivkontrollen stellte der Anti-PGP-Antikörper Nervengeflechte in Colon, Zunge und Harnblase dar (Abb. 3.29a-c).

Einzelne intraepitheliale Zellen der Colonschleimhaut (Positivkontrolle) fluoreszierten nach Inkubation mit dem Anti-5-HT-Antikörper (Abb. 3.30a-c).

Auf als Positivkontrollen dienenden Nebennierenanschnitten markierte der Anti-CgA-Antikörper die Zellen des Marks (Abb. 3.31).

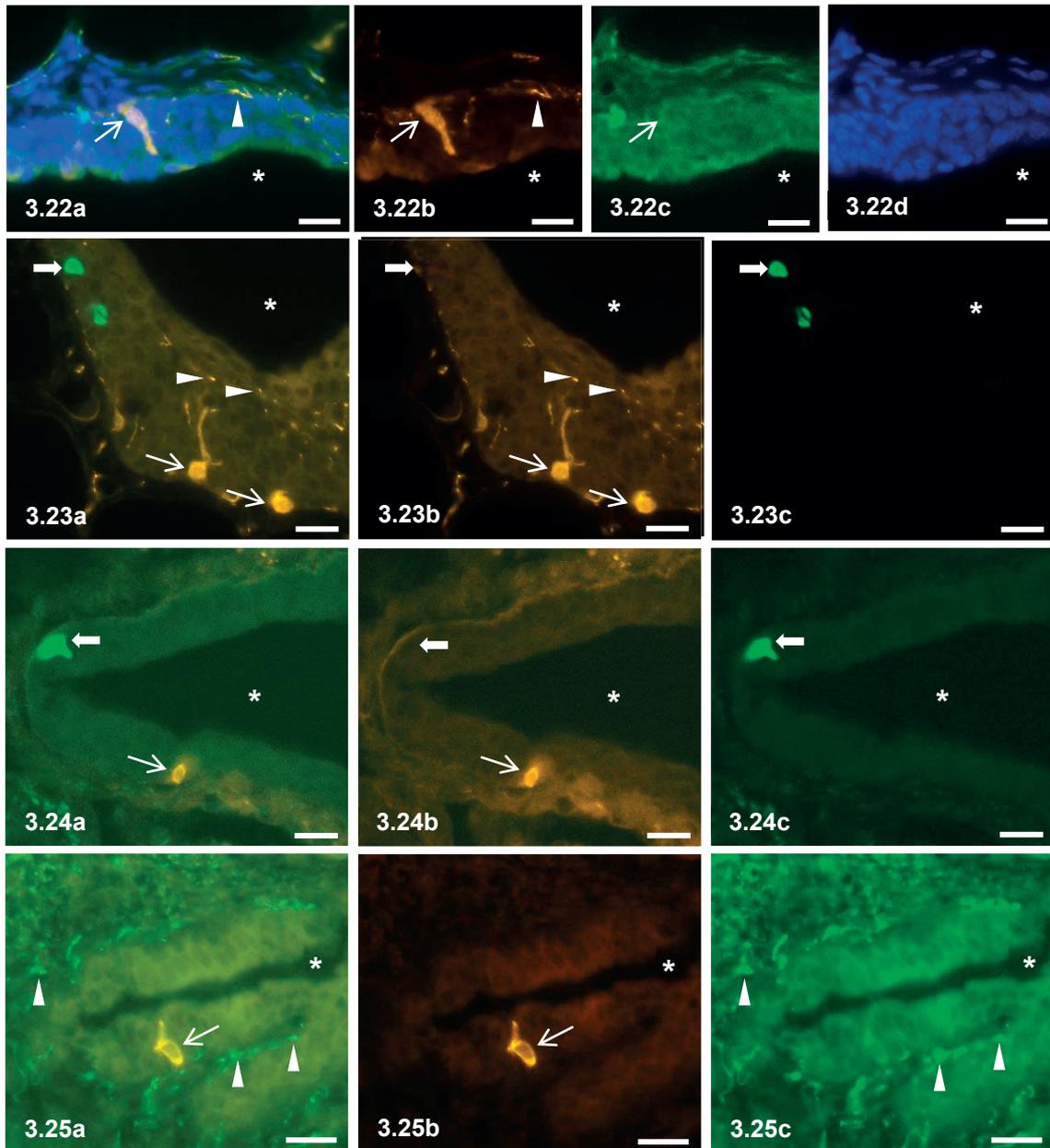


Abb. 3.22a-d-3.27a-c Die Form der neuroendokrinen Zelle und ihre immunhistochemische Abgrenzung von der solitären cholinergen Epithelzelle in der Urethra. Abb. 3.22a-d IHC und Kernfärbung mit DAPI. a: Mischbild, b: Anti-PGP, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC, d: DAPI. Proximale Urethra (*: Lumen), Weibchen. PGP-positive Zelle (Pfeil in a und b), welche eGFP-negativ ist (Pfeil in c). Pfeilspitze in a und b: PGP-positive subepitheliale Nervenfasern. **Abb. 3.23a-c** IHC. a: Mischbild, b: Anti-PGP, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC. Distale Urethra (*: Lumen), Weibchen. PGP-positive Zellen (Pfeile in a und b) mit Fortsätzen. Blockpfeile in a und c: eGFP-positive Zelle, die PGP-negativ ist (Blockpfeil in b). Pfeilspitzen: PGP-positive Nervenfasern. **Abb. 3.24a-c** IHC und eGFP. a: Mischbild, b: Anti-5-HT, Cy3, c: EGFP. Penile Urethra (*: Lumen) mit 5-HT-immunreaktiver Zelle (Pfeil in a und b) und eGFP-positiver Zelle mit apikalem Fortsatz (Blockpfeil in a und c). Die eGFP-positive Zelle ist 5-HT-negativ (Blockpfeil in b). **Abb. 3.25a-c** IHC. a: Mischbild, b: Anti-CgA, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC. *Colliculus seminalis*. CgA-positive Zelle (Pfeil in a und b). Der Fortsatz der neuroendokrinen Zelle kontaktiert das Lumen (*). Pfeilspitzen in a und c: subepitheliale cholinerge Nervenfasern. Maßstabbalken Abb. 3.22a-d-3.25a-c: 20 µm.

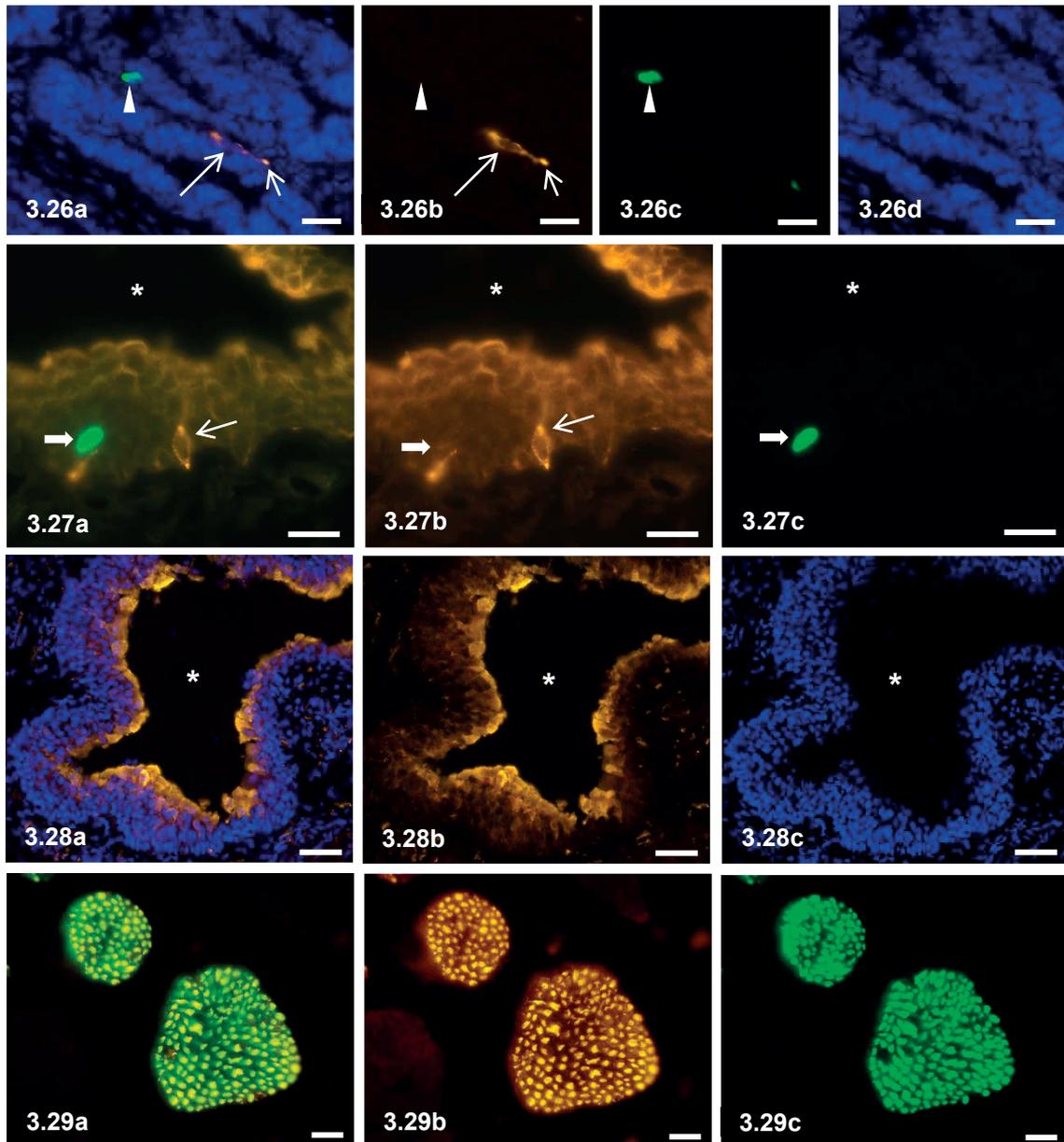


Abb. 3.26a-d IHC und Kernfärbung mit DAPI. a: Mischbild, b: Anti-CgA, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC, d: DAPI. *Colliculus seminalis*, AG. CgA-positive Zelle (langer Pfeil in a und b) mit starker Markierung des terminalen Endes des Zellfortsatzes (kurzer Pfeil in a und b). Pfeilspitze in a und c: EGFP-positive Zelle, die CgA-negativ ist (Pfeilspitze in b). **Abb. 3.27a-c** IHC. a: Mischbild, b: Anti-CgA, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC. Weibliche Urethra (*: Lumen). CgA-positive Zelle (Pfeil in a und b) in Nachbarschaft einer cholinergen Zelle (Blockpfeil in a und c). Die eGFP-positive Zelle ist CgA-negativ (Blockpfeil in b). **Abb. 3.28 a-c Unspezifische Markierung durch den Anti-PGP-Antikörper.** IHC und Kernfärbung mit DAPI. a: Mischbild, b: Anti-PGP, Cy3, c: DAPI. Blasen Hals, Männchen (*: Lumen). Unspezifische adluminale Markierung (oranger Saum in a und b). **Abb. 3.29 a-c Positivkontrolle des Anti-PGP-Antikörpers.** IHC. a: Mischbild, b: Anti-PGP, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC. Zunge. PGP- und eGFP-positive, quer angeschnittene Nervenfasern der Zunge. Maßstabbalken Abb. 3.26a-d-3.27a-c: 20 µm, Abb. 3.28a-c: 50 µm, Abb. 3.29a-c: 20 µm.

3.3.2 Verteilung PGP-, 5-HT- und CgA-positiver neuroendokriner Zellen

3.3.2.1 Urethra der männlichen Maus

Neuroendokrine und cholinerge Zellen bildeten im penilen Segment der murinen Urethra distinkte Zellpopulationen: ChAT^{BAC}-eGFP-positive Zellen waren negativ für die neuroendokrinen Marker PGP, 5-HT und CgA (Tab. 3.3, Anhangstab. 1 und Abb. 3.23a-c-3.24a-c, Abb. 3.26a-d-3.27a-c). Bezogen auf alle markierten cholinergen und neuroendokrinen Zellen im penilen urethralen Abschnitt waren PGP-immunreaktive Neuroendokrine mit 74% am häufigsten. Im Divertikel war jeweils ein Drittel der markierten Zellen neuroendokrin, zwei Drittel waren cholinerg (Tab. 3.3 und Anhangstab. 2). Jeweils ca. die Hälfte aller mit Antikörpern markierten Epithelzellen der pelvinen Urethra war CgA- bzw. PGP- oder ChAT^{BAC}-eGFP-positiv. Unter den insgesamt 134 im pelvinen Abschnitt mit Anti-eGFP- oder Anti-CgA-Antisera erfassten Zellen befand sich eine doppelt positive (Tab. 3.3 und Anhangstab. 3). Im Bereich des *Colliculus seminalis* kam der neuroendokrine Zelltyp wesentlich häufiger vor als der cholinerge (Tab. 3.3 und Anhangstab. 4). Im Blasenhalss waren 5-HT-positive neuroendokrine Zellen mit 85 % anteilig am stärksten vertreten (Tab. 3.3 und Anhangstab. 5).

Generell wiesen neuroendokrine und cholinerge Epithelzellen in der Urethra (und PUDAG) eine enge Nachbarschaft zueinander auf. Dabei lagen cholinerge Zellen in einigen Fällen direkt in der Zellschicht über neuroendokrinen Zellen bzw. waren im mehrreihigen Epithel unmittelbar benachbart. Zusätzlich befanden sich die Zellfortsätze oft in unmittelbarer Nähe zueinander.

3.3.2.2 Periurethrale Drüsen und akzessorische Drüsen der männlichen Maus

In den PUDAG des penilen Abschnitts waren keine neuroendokrinen Zellen nachweisbar (Anhangstab. 6). Divertikel-assoziierte AG wurden nicht mit Antikörpern gegen neuroendokrine Antigene untersucht.

Im Gangepithel pelviner PUD zeigten sich häufiger cholinerge als PGP- bzw. 5-HT-positive Zellen. Im Gegensatz dazu kamen ChAT^{BAC}-eGFP-positive Zellen seltener vor als CgA-positive (Anhangstab. 7).

Die vor dem Blasenhalss lokalisierten AG der ventralen murinen Prostata wiesen deutlich mehr neuroendokrine, insbesondere 5-HT-enthaltende, als cholinerge Zellen auf (Anhangstab. 8).

3.3.2.3 Urethra der weiblichen Maus

CgA-, PGP- bzw. 5-HT-immunreaktive Zellen bildeten im Vergleich zu eGFP-positiven Zellen jeweils einen Anteil von ca. einem Drittel an allen fluoreszierenden Zellen der distalen Urethra. Im proximalen Organabschnitt waren 5-HT-immunreaktive Zellen mit 71% anteilig stärker vertreten als cholinerge (Tab. 3.3 und Anhangstab. 9 und 10). Das Vorkommen cholinergischer und neuroendokriner Zellpopulationen im Harnblasenhalsepithel wurde bereits unter dem Punkt 3.3.2.1 beschrieben.

3.3.2.4 Periurethrale Drüsen der weiblichen Maus

Im Epithel der PUDAG der distalen Urethra betrug der Prozentsatz cholinergischer Zellen 71 bzw. 63 % nach Inkubation mit Anti-PGP- und Anti-eGFP- bzw. Anti-CgA- und Anti-eGFP-Antisera. 5-HT-immunreaktive neuroendokrine Zellen waren nicht nachweisbar (Anhangstab. 11).

	PGP/eGFP			5-HT/eGFP			CgA/eGFP		
	+/+	+/-	-/+	+/+	+/-	-/+	+/+	+/-	-/+
♂									
Penile Urethra	0	74	26	0	43,5	56,5	0	60	40
Divertikel	0	40	60	0	32	68	0	35	65
Pelvine Urethra	0	47	53	0	29	71	1	51	48
Colliculus seminalis	0	74	26	0	76	24	0	79	21
♀									
Distale Urethra	0	34	66	0	37	63	0	39	61
Proximale Urethra	0	58	42	0	71	29	0	46	54
♂ und ♀									
Blasenhals	0	43	57	0	85	15	0	65,5	34,5

Tab. 3.3 Übersicht über den Anteil PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PGP-, 5-HT- bzw. CgA-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen in den Urethrae beider Geschlechter (♂, ♀) in % aufgeteilt nach Organabschnitt mit $n < 3$ Tiere in grün, $n = 3$ Tiere in rot und $n > 3$ Tiere in violett. „CgA/eGFP, Blasenhals“: Daten nur aus männlichen Tieren. Quelldaten siehe Anhangstab. 1-11.

3.3.3 Intra- und subepitheliale Nervenfasern in der Urethra

Der Anti-PGP-Antikörper stellte zudem zahlreiche Nervenfasern dar, die über ihre Lokalisation im subepithelialen (Abb. 3.22a-d-23a-c) und perivaskulären Gewebe hinaus auch zahlreich das urethrale Epithel durchzogen (Abb. 3.32). Größtenteils verliefen sie parallel zur Basalmembran in basalen Zellschichten des Epithels, stiegen jedoch auch senkrecht auf, wobei sie in einigen Fällen nahe an das urethrale Lumen herantreten

konnten. Ähnliche Ergebnisse brachte die Markierung von Nervenfasern mit einem Antikörper gegen CGRP (Abb. 3.33), wobei CGRP-positive Nervenfasern insgesamt seltener anzutreffen waren. CGRP-positive Epithelzellen wurden in der Urethra nahezu nie beobachtet. Der in vielen Verdünnungen (1:125, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000) und in Kombination mit unterschiedlichen sekundären Antikörpern (Esel-Anti-Schaf-Ig, gekoppelt an Cy3 und Esel-Anti-Ziege-Ig, gekoppelt an Cy3) getestete VACHT-Antikörper markierte wenige intraepitheliale und submuköse Nervenfasern, jedoch keinen Zellkörper. Inkubationen mit ChAT-Immunsereen führten zu keinen auswertbaren Ergebnissen, da es in jeglicher Verdünnung des Antikörpers und Anwendung verschiedener Blocklösungen zur Präzipitation kam. Gelegentlich schien eine ChAT^{BAC}-eGFP-positive Zelle in ein Netz aus PGP- sowie CGRP-immunreaktiven Nervenfasern eingebettet zu sein und wesentlich öfter stellten sich immunreaktive quer angeschnittene Nervenfasern in Nachbarschaft der ChAT^{BAC}-eGFP-positiven Epithelzellen dar (Abb. 3.34a-d). Überdies wurden cholinerge Nervenfasern perivaskulär beobachtet. In einem Fall fiel eine enge Nachbarschaft zwischen einer intraepithelialen cholinergen Nervenfasern und einer CgA-immunreaktiven Zelle auf. Für die Antikörper Anti-CGRP, Anti-VACHT und Anti-ChAT wurden jeweils Positivkontrollen durchgeführt. Im Colon fluoreszierten Nervenfasern nach Inkubation mit Anti-CGRP (nicht dargestellt). Die Antikörper Anti-VACHT und Anti-ChAT wurden am Skelettmuskel getestet, wo sie die neuromuskulären Endplatten markierten (nicht dargestellt).

3.4 Cholinerge und nicht-cholinerge Bürstenzellen in der Urethra

3.4.1 Villin-Immunreaktivität cholinergischer und nicht-cholinergischer Epithelzellen

3.4.1.1 Urethra der männlichen Maus

Villin-positive nicht-cholinerge Epithelzellen bildeten prozentual den größten Anteil an allen mit Anti-Villin- und Anti-eGFP-Antisereen markierten Zellen (Tab. 3.4, Abb. 3.62 und Anhangstab. 12). Die zweitgrößte Fraktion bildeten Villin-immunreaktive cholinerge Epithelzellen. Villin-negative ChAT^{BAC}-eGFP-positive Zellen waren am seltensten nachweisbar.

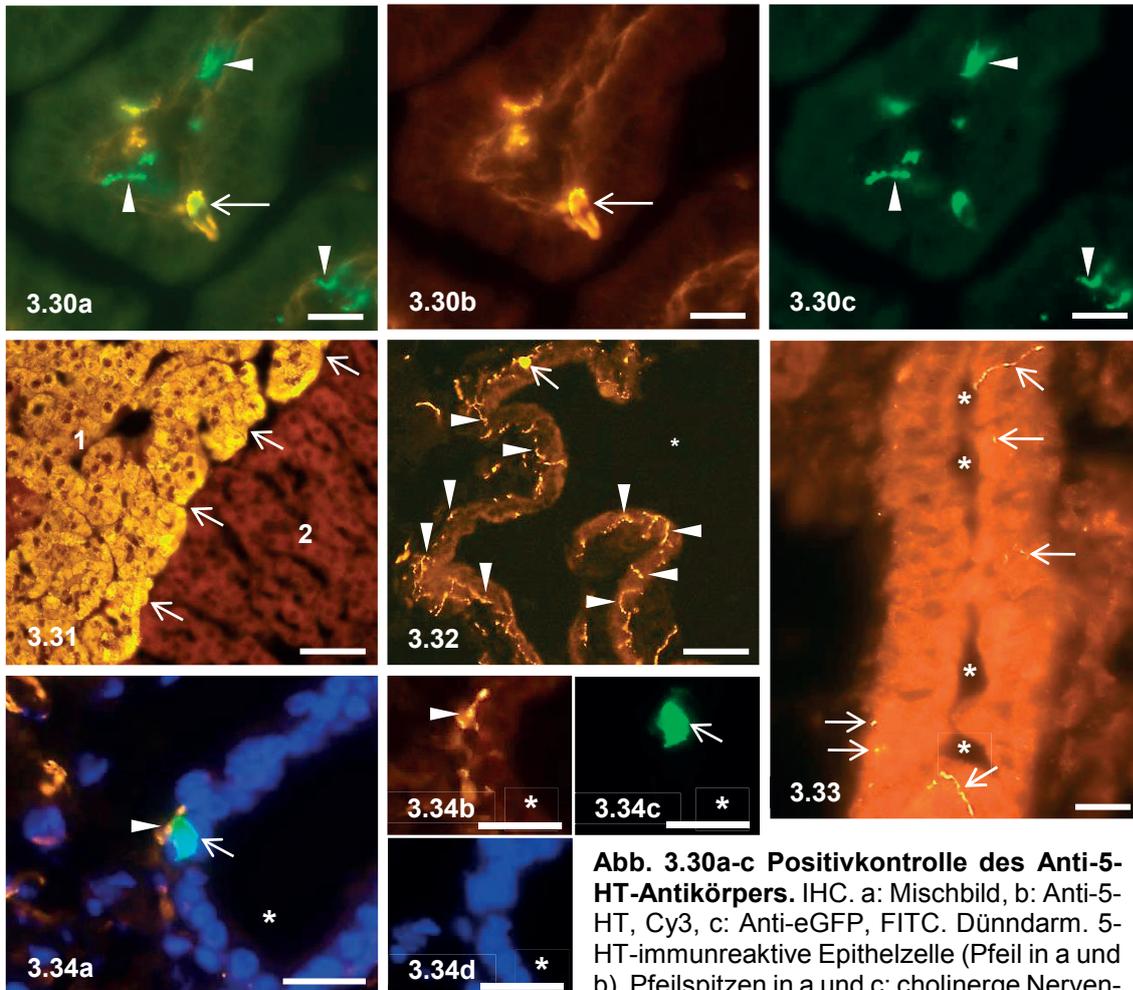


Abb. 3.30a-c Positivkontrolle des Anti-5-HT-Antikörpers. IHC. a: Mischbild, b: Anti-5-HT, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC. Dünndarm. 5-HT-immunreaktive Epithelzelle (Pfeil in a und b). Pfeilspitzen in a und c: cholinerge Nervenfasern. **Abb. 3.31 Positivkontrolle des**

Anti-CgA-Antikörpers. IHC. Anti-CgA, Cy3. Nebenniere. Der Anti-CgA-Antikörper markiert das Nebennierenmark (1), wodurch die Grenze (Pfeile) zur Nebennierenrinde (2) deutlich zu sehen ist. **Abb. 3.32-3.34a-d Intraepitheliale Nervenfasern in der Urethra.** **Abb. 3.32** IHC. Anti-PGP, Cy3. Pelvine Urethra (*: Lumen), Männchen. Zahlreiche PGP-immunreaktive Nervenfasern (Pfeilspitzen) durchziehen das Epithel. Pfeil: PGP-positive neuroendokrine Zelle. **Abb. 3.33** IHC. Anti-CGRP, Cy3. Penile Urethra (*: Lumen), Männchen. CGRP-positive Nervenfasern (Pfeile) im Epithel. **Abb. 3.34a-d** IHC und Kernfärbung mit DAPI. a: Mischbild, b: Anti-PGP, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC, d: DAPI. Pelvine Urethra (*: Lumen), Männchen. Enger Kontakt zwischen PGP-positiver Nervenfasern (Pfeilspitze in a und b) und einer cholinergen Zelle (Pfeil in a und c) im Epithel.

Maßstab balken Abb. 3.30a-c: 20 µm, Abb. 3.31-3.32: 50 µm, Abb. 3.33-3.34a-d: 20 µm.

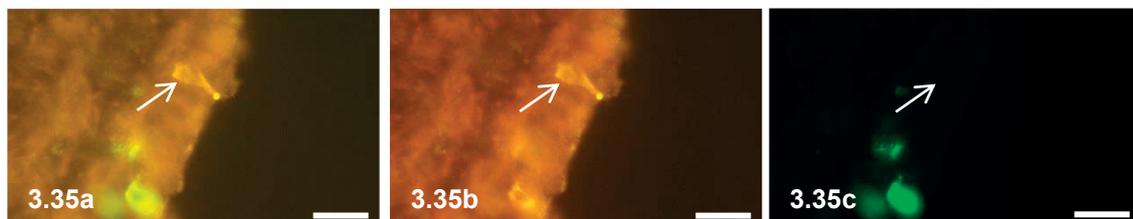


Abb. 3.35a-c Positivkontrolle des Anti-Villin-Antikörpers. IHC. a: Mischbild, b: Anti-Villin, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC. Trachea. Villin-immunreaktive (Pfeil in a und b), eGFP-negative (Pfeil in c) Epithelzelle.

Maßstab balken Abb. 3.35a-c: 20 µm.

3.4.1.2 Periurethrale Drüsen und akzessorische Drüsen der männlichen Maus

Nach Inkubation mit Anti-eGFP- und Anti-Villin-Antisera waren doppelt positive Zellen am häufigsten in den penilen PUDAG und Ausführungsgängen der ventralen Prostata nachweisbar (Anhangstab. 13). In den paradivertikulären AG bildeten cholinerge Villin-negative und in den pelvinen PUDAG Villin-immunreaktive non-cholinerge Zellen den jeweils größten Anteil.

3.4.1.3 Urethra der weiblichen Maus

Im distalen sowie proximalen Organabschnitt überwogen non-cholinerge Villin-positive Epithelzellen (Tab. 3.4, Abb. 3.63 und Anhangstab. 14).

3.4.1.4 Periurethrale Drüsen der weiblichen distalen Urethra

Cholinerge und nicht-cholinerge Bürstenzellen kamen mit ca. 46 bzw. 43% bezogen auf alle mit Anti-Villin- und Anti-eGFP-Antisera markierten Zellen gleich häufig vor (Anhangstab. 15).

	Villin/eGFP		
	+/+	+/-	-/+
♂			
Penile Urethra	18	70	12
Divertikel	46	51	3
Pelvine Urethra	30	69	1
Colliculus seminalis	17	82	1
♀			
Distale Urethra	45	54	1
Proximale Urethra	29	70	1
♂			
Blasenhals	0	93	7

Tab. 3.4 Übersicht über den Anteil Villin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), Villin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und Villin-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen in den Urethrae beider Geschlechter (♂, ♀) in % eingeteilt nach Organabschnitt mit **n=3 Tiere in rot** und **n>3 Tiere in violett**. „Villin/eGFP, Blasenhal“: Daten nur aus männlichen Tieren. Quelldaten siehe Anhangstab.12 und 14.

3.4.2 Gestalt und Lage der cholinergen Bürstenzelle und ihrer Fortsätze

Die cholinerge Bürstenzelle war definiert durch eine grüne, ChAT^{BAC}-eGFP-bedingte Fluoreszenz bei gleichzeitiger immunhistochemischer Reaktion mit Villin-Antisera. Für die Positivkontrollen des Anti-Villin-Antikörpers wurden Anschnitte aus der Trachea und dem

Colon benutzt, in denen der Antikörper die intratrachealen Bürstenzellen bzw. Epithelzellen der Colonmukosa markierte (Abb. 3.35a-c).

Bei Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop zeigte sich ein gleichmäßig über der gesamten Zelle sichtbares eGFP-Signal (Abb. 3.36a-d-3.42a-c); im Bereich des Nukleus war es fleckartig stärker ausgeprägt. Der Villin-Antikörper band zellmembranständig entlang der gesamten zellulären Zirkumferenz (Abb. 3.36-3.42, jeweils b). Die Perikarya befanden sich hauptsächlich in basalen bis mittigen Schichten bzw. Reihen des Epithels. Zum größten Teil wiesen cholinerge Bürstenzellen einen oder mehrere Fortsätze auf, wobei ihre Gestalt flaschen- bis keulenförmig, mandelförmig oder dreieckig sowie rund bis oval war. Fehlten die Projektionen oder waren diese nicht angeschnitten, so stellten sich diese Zellen typischerweise rundlich bis oval dar und lagen eher basal (Abb. 3.40a-c). Flaschenförmige Bürstenzellen besaßen einen charakteristischen, flaschenhalsartigen apikalen Fortsatz, der über eine terminale Auftreibung mit starker Villin-Immunreaktivität in das Lumen hineinragte (Abb. 3.38a-d). Neben dem apikalen Zellhals konnten weitere Projektionen am basalen Zellpol ausgebildet sein (Abb. 3.36a-d, 3.42a-c). Bis zu drei solcher basalen Fortsätze multipolarer Bürstenzellen wiesen in Richtung Basalmembran. Keulenförmige cholinerge Bürstenzellen lagen auch mittig im Epithel und durchzogen mit zwei Fortsätzen die gesamte Höhe des Epithels (Abb. 3.36a-c). Auch in diesem Fall war die apikale ins Lumen vorgestreckte Projektion Villin-immunreaktiv, war jedoch zumeist länger und dünner ausgebildet als der sich verjüngende, nach basal gerichtete Fortsatz. Gelegentlich war diese keulenförmige schmale Zelle in Schleimhautfalten der Urethra anzutreffen. Des Weiteren waren Bürstenzellen dieser Form quer im Epithel lokalisiert, d.h. ihre Fortsätze erstreckten sich beidseits nach horizontal, wobei der eine gleichbleibend dicke Fortsatz terminal Villin-immunreaktiv und aufgeweitet war und der andere sich im Verlauf nach horizontal verjüngte (Abb. 3.37a-c, 3.39a-c). Zusätzlich zu den beschriebenen - dünnen, länglichen oder flaschenhalsartigen - Formen der adluminalen Projektionen konnten diese auch schweifartig gestaltet sein und in einem Bogen zum Lumen verlaufen. Schweifartige, bogenförmig ausgebildete Fortsätze wurden manchmal auch am basalen Zellpol beobachtet. Manche cholinergen Bürstenzellen wiesen an einem Zellpol ein starkes Villin-Signal auf, das nicht in Richtung Lumen, sondern Zellzwischenräume gerichtet war (Abb. 3.37a-c, 3.39a-c).

3.4.3 Gestalt und Lage der nicht-cholinergen Bürstenzelle und ihrer Fortsätze

Die ChAT^{BAC}-eGFP-negative Bürstenzelle zeigte eine ovale, runde, dreieckige, flaschen- oder mandelförmige Gestalt (Abb. 3.39a-c-3.43a-c). In der Regel verfügte die Zelle über mindestens einen Fortsatz. Fortsatzlose, meist runde, nicht-cholinerge Bürstenzellen saßen in basalen Zellschichten des verhornten urethralen Plattenepithels. Die Bürstenzelle lag bevorzugt basal bis mittig im Epithel; im Gegensatz zur cholinergen Bürstenzelle befand sie sich öfter auch oberflächennah im Epithel. An den Abgängen der Fortsätze aus dem Perikaryon und ihren terminalen Enden war die Fluoreszenz punkt- bis strichförmig und auffallend stark ausgeprägt (Abb. 3.41a, b, 3.42a, b, 3.43a, b). Beim Vergleich der Fortsätze beider Bürstenzelltypen miteinander fiel auf, dass die Fortsätze der nicht-cholinergen Zelle schwächer gestaltet und länger waren, weil die typischen als Flaschenhals bezeichneten dicken Zellprojektionen seltener ausgebildet wurden (Abb. 3.42a-c-3.43a-c). Oft waren basal liegende Villin-immunreaktive Zellen mit beidseits nach horizontal reichenden und mehrere Mikrometer parallel zur Basalmembran verlaufenden Fortsätze nachweisbar. Zur Basalmembran ziehende basale Projektionen konnten jedoch auch sehr kräftig und schweiförmig gestaltet sein. Insbesondere in niedrigen Epithelien dominierten ovale, basal situierte Villin-positive Zellen, die über einen dünnen, kurzen Fortsatz Anbindung ans Lumen gewannen (Abb. 3.41a-d). Regelmäßig waren zusätzlich basale Projektionen ausgebildet (Abb. 3.40a-c).

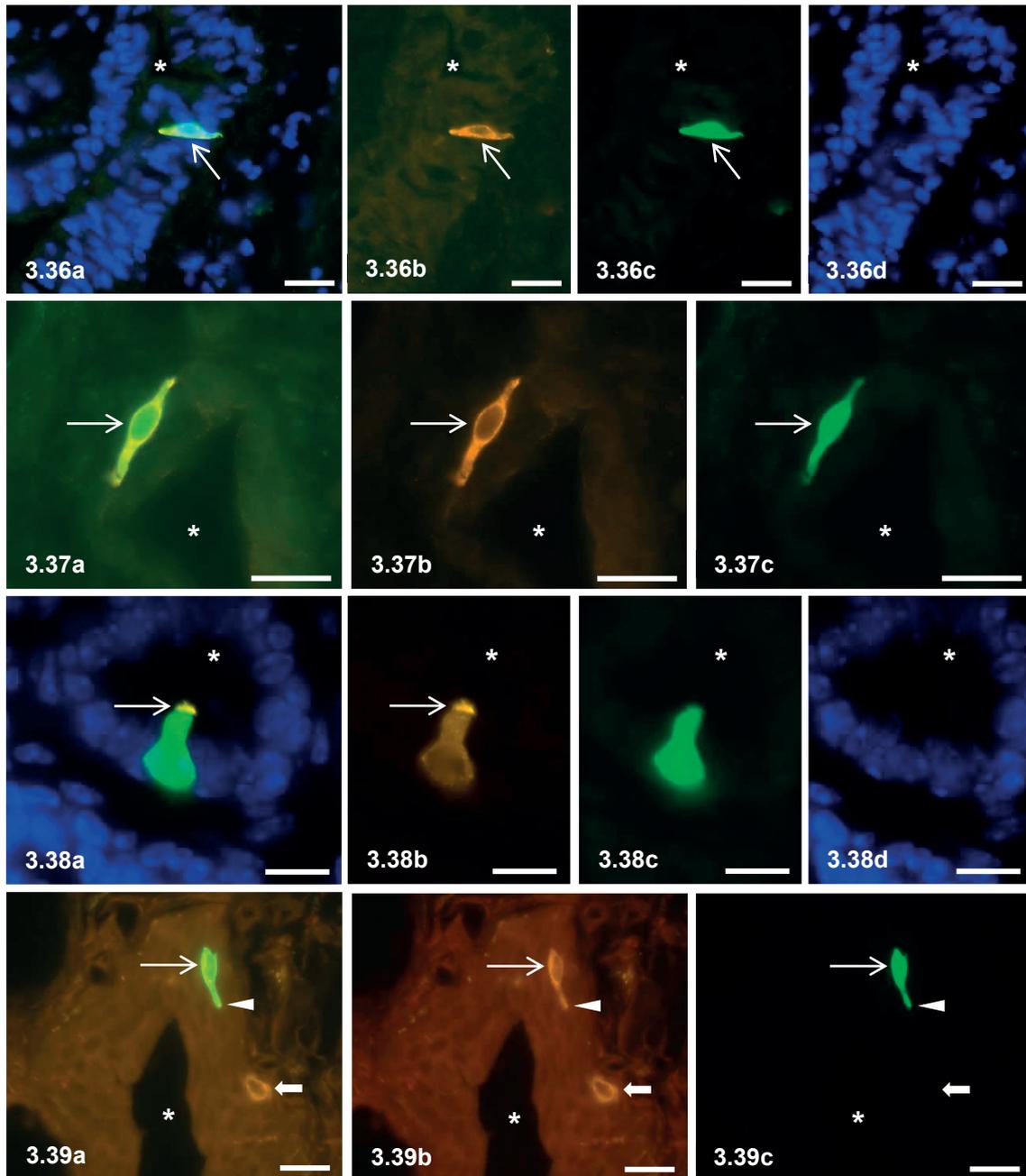


Abb. 3.36a-d-3.43a-c Gestalt und Lage der cholinergen und nicht-cholinergen Bürstenzelle und ihrer Fortsätze. Abb. 3.36a-d IHC, eGFP und Kernfärbung mit DAPI. a: Mischbild, b: Anti-Villin, Cy3, c: EGFP, d: DAPI. Penile Urethra, Männchen. Cholinerge Bürstenzelle (Pfeil in a, b, c) mit zwei Fortsätzen und Lumenkontakt (*). **Abb. 3.37a-c** IHC und eGFP. a: Mischbild, b: Anti-Villin, Cy3, c: EGFP. Penile Urethra, Männchen. Die cholinerge Bürstenzelle liegt horizontal in der Mukosa, sodass kein Fortsatz das Organlumen (*) erreicht. **Abb. 3.38a-d** IHC, eGFP und Kernfärbung mit DAPI. a: Mischbild, b: Anti-Villin, Cy3, c: EGFP, d: DAPI. *Colliculus seminalis*. Flaschenförmige, eGFP- und Villin-positive Bürstenzelle mit Lumenkontakt (*). Ausgeprägtes Villinsignal am terminalen Ende des ins Lumen vorgestreckten Fortsatzes (Pfeil in a und b). **Abb. 3.39a-c** IHC. a: Mischbild, b: Anti-Villin, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC. Distale weibliche Urethra (*: Lumen). Der Fortsatz (Pfeilspitze) der cholinergen Bürstenzelle (Pfeil) projiziert sich in den Zellzwischenraum. Die andere Villin-immunreaktive Zelle (Blockpfeil in a und b) ist eGFP-negativ (Blockpfeil in c). Maßstabbalken Abb. 3.36a-d-3.38a-d: 10 µm, Abb. 3.39a-c: 20 µm.

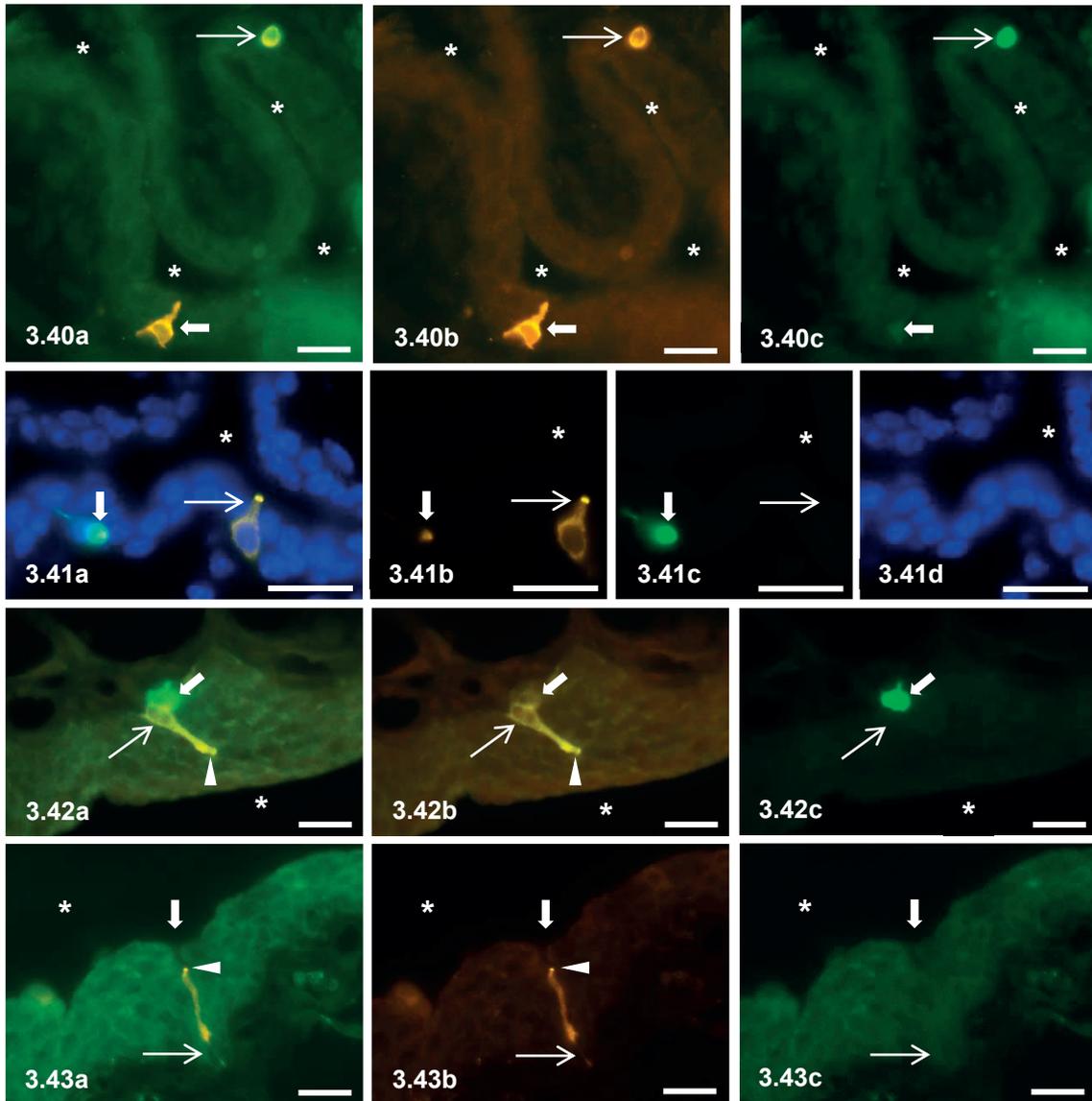


Abb. 3.40a-c IHC und eGFP. a: Mischbild, b: Anti-Villin, Cy3, c: EGFP. Penile Urethra, Männchen mit einer cholinergen (Pfeile) und non-cholinergen (Blockpfeile) Bürstenzelle. EGFP-negative Zelle mit zwei basalen Fortsätzen und Kontakt zum urethralen Lumen (*) über apikalen Fortsatz. **Abb. 3.41a-d** IHC, eGFP und Kernfärbung mit DAPI. a: Mischbild, b: Anti-Villin, Cy3, c: EGFP, d: DAPI. Penile Urethra, Männchen. Starkes Villinsignal am terminalen Ende des Fortsatzes der eGFP-negativen Bürstenzelle (Pfeil in a, b, c) mit Kontakt zum urethralen Lumen (*). Blockpfeil in a, b, c: ChAT^{BAC}-eGFP-positive Bürstenzelle. **Abb. 3.42a-c** IHC. a: Mischbild, b: Anti-Villin, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC. Proximale weibliche Urethra (*: Lumen). Enger Kontakt zwischen cholinergem (Blockpfeil) mit kurzem basalem Fortsatz und non-cholinergem (Pfeil) Zelle. Pfeilspitze in a und b: langer, dünner Fortsatz der eGFP-negativen Zelle mit terminaler Auftreibung und Projektion in den Zellzwischenraum. **Abb. 3.43a-c** IHC. a: Mischbild, b: Anti-Villin, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC. Distale weibliche Urethra (*: Lumen). EGFP-negative (Pfeil in c), Villin-positive Zelle (Pfeil in a und b) mit langem dünnen, luminalem Fortsatz und akzentuiertem terminalen Villinsignal (Pfeilspitze in a und b). Blockpfeil: Invagination der Mukosa. Maßstabbalken Abb. 3.40a-c-3.43a-c: 20 µm.

3.5 Komponenten der gustatorischen Signaltransduktion in cholinergen Bürstenzellen

3.5.1 Gustducin

3.5.1.1 Urethra der männlichen Maus

Cholinerge Bürstenzellen in der Urethra der männlichen Maus waren immunreaktiv für die α -Untereinheit des geschmacksspezifischen G-Proteins Gustducin (Abb. 3.44a-c, 3.45a-c), jedoch differierte der Anteil zugleich Gustducin- und ChAT^{BAC}-eGFP-positiver Zellen je nach Lokalisation in der Harnröhre (Tab. 3.5 und Abb. 3.62).

Auf Präabsorptionskontrollen für den Gustducin-Antikörper zeigten sich keine unspezifischen Antikörperbindungen (Abb. 3.45a-c, 3.46a-c). Der Antikörper markierte auf Positivkontrollen aus der Zunge Geschmacksknospen (Abb. 3.47).

Ca. die Hälfte aller cholinergen Bürstenzellen im penilen urethralen Segment und im Divertikel war Gustducin-immunreaktiv; die andere Hälfte nicht (Tab. 3.5, Abb. 3.62 und Anhangstab. 16). Im Epithel der pelvinen Urethra, des *Colliculus seminalis* und des Blasenhalses waren cholinerge Gustducin-negative Zellen am häufigsten nachweisbar.

3.5.1.2 Periurethrale Drüsen und akzessorische Drüsen der männlichen Maus

Nach Inkubation mit Anti-eGFP- und Anti-Gustducin-Antisera waren in den AG des Divertikels und pelvinen urethralen Segments 13 bis 17% der Zellen doppelt positiv. Cholinerge Gustducin-negative Bürstenzellen bildeten den größten Anteil (Anhangstab. 17).

3.5.1.3 Urethra der weiblichen Maus

Der Anteil Gustducin-immunreaktiver Zellen an allen erfassten cholinergen Bürstenzellen betrug etwa ein Fünftel in der distalen und ein Drittel in der proximalen Urethra (Tab. 3.5, Abb. 3.63 und Anhangstab. 18). Cholinerge Gustducin-negative Zellen waren am häufigsten nachweisbar.

3.5.1.4 Periurethrale Drüsen der weiblichen Maus

Ca. die Hälfte aller cholinergen Bürstenzellen in den PUDAG exprimierte Gustducin (Anhangstab. 19).

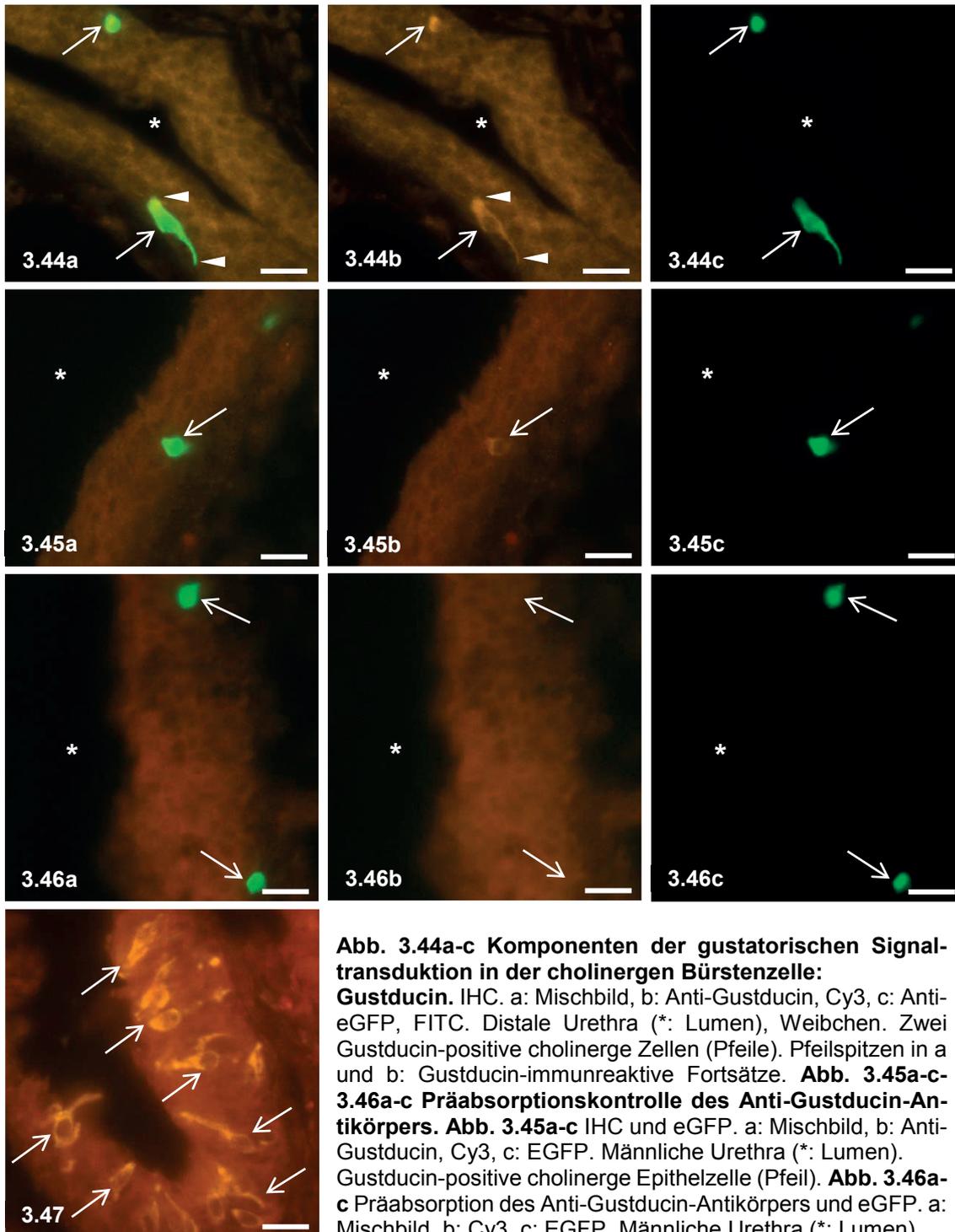


Abb. 3.44a-c Komponenten der gustatorischen Signaltransduktion in der cholinergen Bürstenzelle: Gustducin. IHC. a: Mischbild, b: Anti-Gustducin, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC. Distale Urethra (*: Lumen), Weibchen. Zwei Gustducin-positive cholinerge Zellen (Pfeile). Pfeilspitzen in a und b: Gustducin-immunreaktive Fortsätze.

Abb. 3.45a-c-3.46a-c Präabsorptionskontrolle des Anti-Gustducin-Antikörpers. Abb. 3.45a-c IHC und eGFP. a: Mischbild, b: Anti-Gustducin, Cy3, c: EGFP. Männliche Urethra (*: Lumen). Gustducin-positive cholinerge Epithelzelle (Pfeil).

Abb. 3.46a-c Präabsorption des Anti-Gustducin-Antikörpers und eGFP. a: Mischbild, b: Cy3, c: EGFP. Männliche Urethra (*: Lumen).

Nach Präabsorption des Antikörpers leuchteten die cholinergen Zellen (Pfeile in a und c) im Cy3-Filter (Pfeile in b) nicht. **Abb. 3.47 Positivkontrolle des Anti-Gustducin-Antikörpers. IHC. Anti-Gustducin, Cy3. Zunge. Der Anti-Gustducin-Antikörper markiert die Geschmackszellen in Geschmacksknospen (Pfeile).**

Maßstab balken Abb. 3.44a-c-3.47: 20µm.

	Gustducin/eGFP		
	+/+	+/-	-/+
♂			
Penile Urethra	47,5	4	48,5
Divertikel	46	0	54
Pelvine Urethra	9	0	91
<i>Colliculus seminalis</i>	14	6	80
♀			
Distale Urethra	22	2	76
Proximale Urethra	30	0	70
♂			
Blasenhals	0	0	100

Tab. 3.5 Übersicht über den Anteil Gustducin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), Gustducin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und Gustducin-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen in den Urethrae beider Geschlechter (♂, ♀) in % eingeteilt nach Organabschnitt mit **n<3 Tiere in grün**, **n=3 Tiere in rot** und **n>3 Tiere in violett**. „Gustducin/eGFP, Blasenhals“: Daten nur aus männlichen Tieren. Quelldaten siehe Anhangstab. 16 und 18.

3.5.2 PLCβ2

3.5.2.1 Urethra der männlichen Maus

Cholinerge urethrale Bürstenzellen waren immunreaktiv für das Enzym PLCβ2 (Abb. 3.48a-c, 3.49a-c); darüber hinaus existierten PLCβ2-positive Epithelzellen in der urethralen Mukosa, die ChAT^{BAC}-eGFP-negativ waren (Abb. 3.48a, b). Die für den Antikörper durchgeführten Präabsorptionskontrollen zeigten keine unspezifischen Markierungen (Abb. 3.50a, b). In Positivkontrollen aus der Trachea band der Antikörper an intraepitheliale Zellen (Abb. 3.51).

Nach Inkubation mit Anti-eGFP- und Anti-PLCβ2-Antikörpern zeigten sich 27 bis 56% doppelt immunreaktiver Zellen. Im Epithel der penilen und pelvinen Urethra sowie des Blasenhalsses war der Anteil non-cholinerges PLCβ2-immunreaktiver Zellen am größten. Cholinerge PLCβ2-negative Zellen bildeten einen Anteil von bis zu 20 % (*Colliculus seminalis*; Tab. 3.6, Abb. 3.62 und Anhangstab. 20).

3.5.2.2 Periurethrale Drüsen und akzessorische Drüsen der männlichen Maus

Der Großteil cholinerges Bürstenzellen im Gangepithel exkretorischer PUD des Beckens und Divertikels sowie in Ausführungsgängen der ventralen Prostata war immunreaktiv mit PLCβ2-Antiseren (Anhangstab. 21).

3.5.2.3 Urethra der weiblichen Maus

In der distalen urethralen Hälfte betrug der Anteil PLC β 2-ChAT^{BAC}-eGFP-positiver Zellen ca. 60%. Im proximalen Organabschnitt waren PLC β 2-positive cholinerge Bürstenzellen, PLC β 2-positive nicht-cholinerge Zellen und PLC β 2-negative cholinerge Bürstenzellen jeweils gleich häufig verteilt (Tab. 3.6, Abb. 3.63 und Anhangstab. 22).

3.5.2.4 Periurethrale Drüsen der weiblichen Maus

PLC β 2- und ChAT^{BAC}-eGFP-positive Zellen konnten am häufigsten verzeichnet werden (Anhangstab. 23).

	PLC β 2/eGFP		
	+/+	+/-	-/+
♂			
Penile Urethra	27	67	5
Divertikel	47	50	3
Pelvine Urethra	40	44	16
Colliculus seminalis	56	25	19
♀			
Distale Urethra	59	24	17
Proximale Urethra	28	38	34
♂/♀			
Blasenhals	33	67	0

Tab. 3.6 Übersicht über den Anteil PLC β 2-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PLC β 2-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PLC β 2-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen in den Urethrae beider Geschlechter (♂, ♀) in % eingeteilt nach Organabschnitt mit **n=3 Tiere in rot** und **n>3 Tiere in violett**. Quelldaten siehe Anhangstab. 20 und 22.

3.5.3 TRPM5

3.5.3.1 Urethra der männlichen Maus

Bürstenzellen in der Urethra des Männchens waren größtenteils zugleich cholinerg und TRPM5-immunreaktiv (Abb. 3.52a-d, 3.53a-c). In Abhängigkeit von der intraurethralen Lokalisation fanden sich zusätzlich intraepitheliale TRPM5-positiv non-cholinerge Zellen (Abb. 3.54a-c).

Auf Anschnitten aus Harnröhren, die mit einem Kaninchen-Präimmunserum inkubiert wurden, zeigten sich keine unspezifischen Bindungen (Abb. 3.55a-f). Auf Positivkontrollen aus der Zunge wurden mit dem TRPM5-Antikörper Geschmacksknospen markiert (Abb. 3.56).

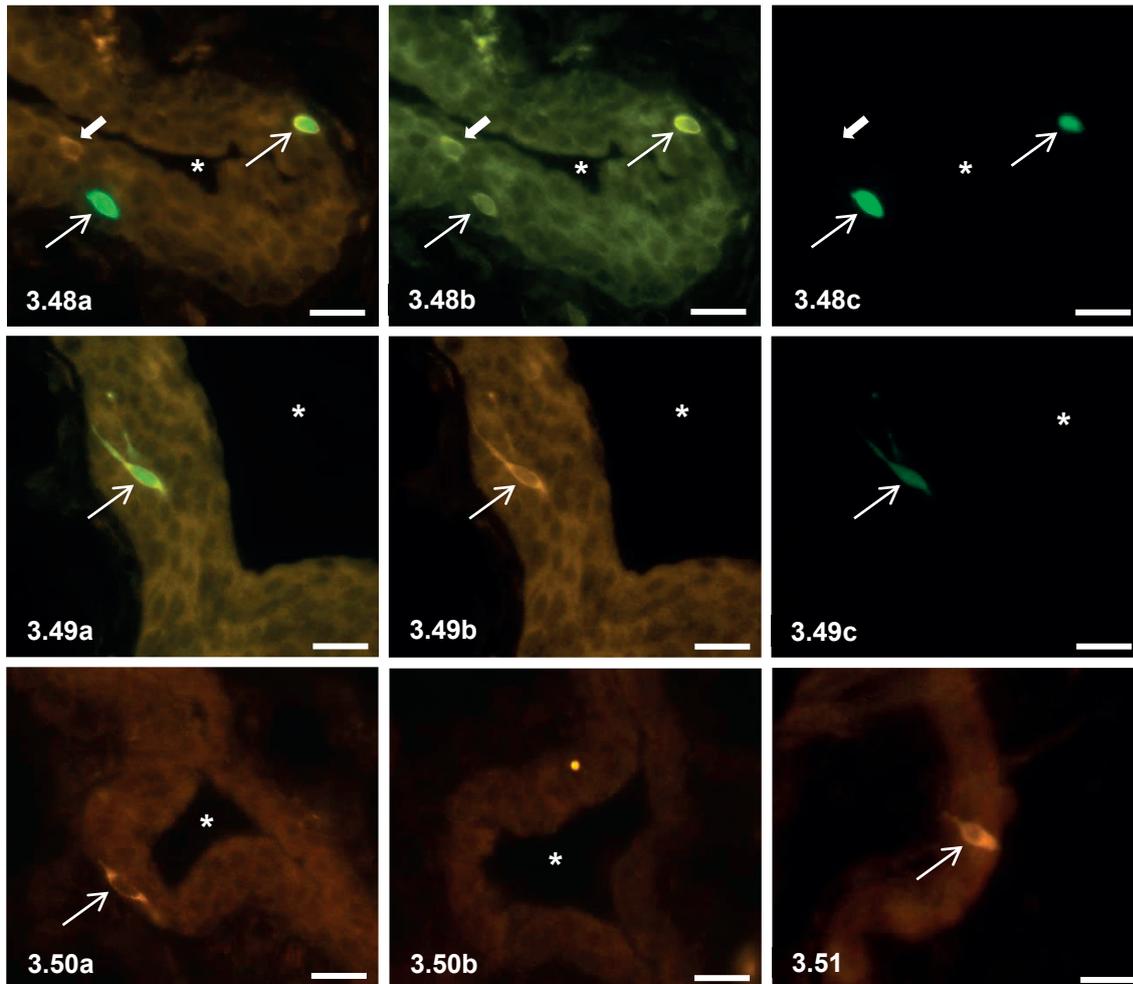


Abb. 3.48a-c-3.49a-c Komponenten der gustatorischen Signaltransduktion in der cholinergen Bürstenzelle: PLC β 2, und Subpopulation non-cholinerg PLC β 2-immunreaktiver Zellen. **Abb. 3.48a-c** IHC. a: Mischbild, b: Anti-PLC β 2, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC. Proximale Urethra (*: Lumen), Weibchen. Zwei cholinerge, PLC β 2-positive Zellen (Pfeile) und eine non-cholinerge, PLC β 2-immunreaktive Zelle (Blockpfeil), welche weiter luminal in der Mukosa liegt. **Abb. 3.49a-c** IHC. a: Mischbild, b: Anti-PLC β 2, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC. Proximale Urethra (*: Lumen), Weibchen. PLC β 2-immunreaktive, cholinerge Zelle (Pfeil) mit basalem und apikal-horizontalem Fortsatz. **Abb. 3.50a-b** Präabsorptionskontrolle des Anti-PLC β 2-Antikörpers. **Abb. 3.50a** IHC. Anti-PLC β 2, Cy3 und **3.50b** Präabsorption des Anti-PLC β 2-Antikörpers. Der Anti-PLC β 2-Antikörper markiert eine Epithelzelle (Pfeil in a) in der Urethra (*: Lumen). Nach Präabsorption des Antikörpers leuchtet keine Zelle (b). **Abb. 3.51** Positivkontrolle des PLC β 2-Antikörpers. IHC. Anti-PLC β 2, Cy3. Trachea. PLC β 2-positive Epithelzelle (Pfeil) in der Trachealschleimhaut (*: tracheales Lumen). Maßstab Balken Abb. 3.48a-c-3.51: 20 μ m.

Nach Inkubation mit Anti-eGFP- und Anti-TRPM5-Antisera waren 70 bis 100 % doppelt positive Zellen nachweisbar (Tab. 3.7, Abb. 3.62 und Anhangstab. 24). TRPM5-immunreaktive nicht-cholinerge Zellen bildeten einen Anteil von bis zu 13% (penile Urethra), cholinerge TRPM5-negative von bis zu 19% (*Colliculus seminalis*).

3.5.3.2 Periurethrale Drüsen und akzessorische Drüsen der männlichen Maus

Eine deutliche Mehrzahl cholinergischer Bürstenzellen im Epithel der pelvischen PUDAG und exkretorischen Gänge der ventralen Prostata exprimiert gleichzeitig TRPM5 (Anhangstab. 25).

3.5.3.3 Urethra der weiblichen Maus

In beiden urethralen Segmenten bildeten TRPM5-ChAT^{BAC}-eGFP-positive Zellen nach Inkubation mit Anti-eGFP- und Anti-TRPM5-Antisera den prozentual größten Anteil (Tab. 3.7, Abb. 3.63 und Anhangstab. 26).

3.5.3.4 Periurethrale Drüsen der weiblichen Maus

Die meisten Zellen waren ChAT^{BAC}-eGFP- und TRPM5-positiv (Anhangstab. 27).

	TRPM5/eGFP		
	+/+	+/-	-/+
♂			
Penile Urethra	87	13	0
Divertikel	85	6	9
Pelvine Urethra	93	3	4
<i>Colliculus seminalis</i>	70	11	19
♀			
Distale Urethra	93	0	7
Proximale Urethra	100	0	0
♀/♂			
Blasenhals	100	0	0

Tab. 3.7 Übersicht über den Anteil TRPM5-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), TRPM5-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und TRPM5-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen in den Urethrae beider Geschlechter (♂, ♀) in % eingeteilt nach Organabschnitt mit n<3 Tiere in grün, n=3 Tiere in rot und n>3 Tiere in violett. Quelldaten siehe Anhangstab. 24 und 26.

3.5.4 Inkubation der Urethra mit Tas1r3-Immunsere

Zusätzlich wurde die Urethra auf Immunreaktivität mit Tas1r3-Immunsere untersucht. Der in zahlreichen Verdünnungen (1:150, 1:300, 1:600, 1:1200, 1:2400, 1:4800, 1:8000) in Kombination mit verschiedenen Blockseren getestete Antikörper führte zu keinen positiven Ergebnissen bei generell stark ausgeprägter unspezifischer Fluoreszenz des Gewebes (nicht dargestellt). Auf Positivkontrollen aus der Zunge markierte der Antikörper Geschmacksknospen generell sehr schwach (Abb. 3.57).

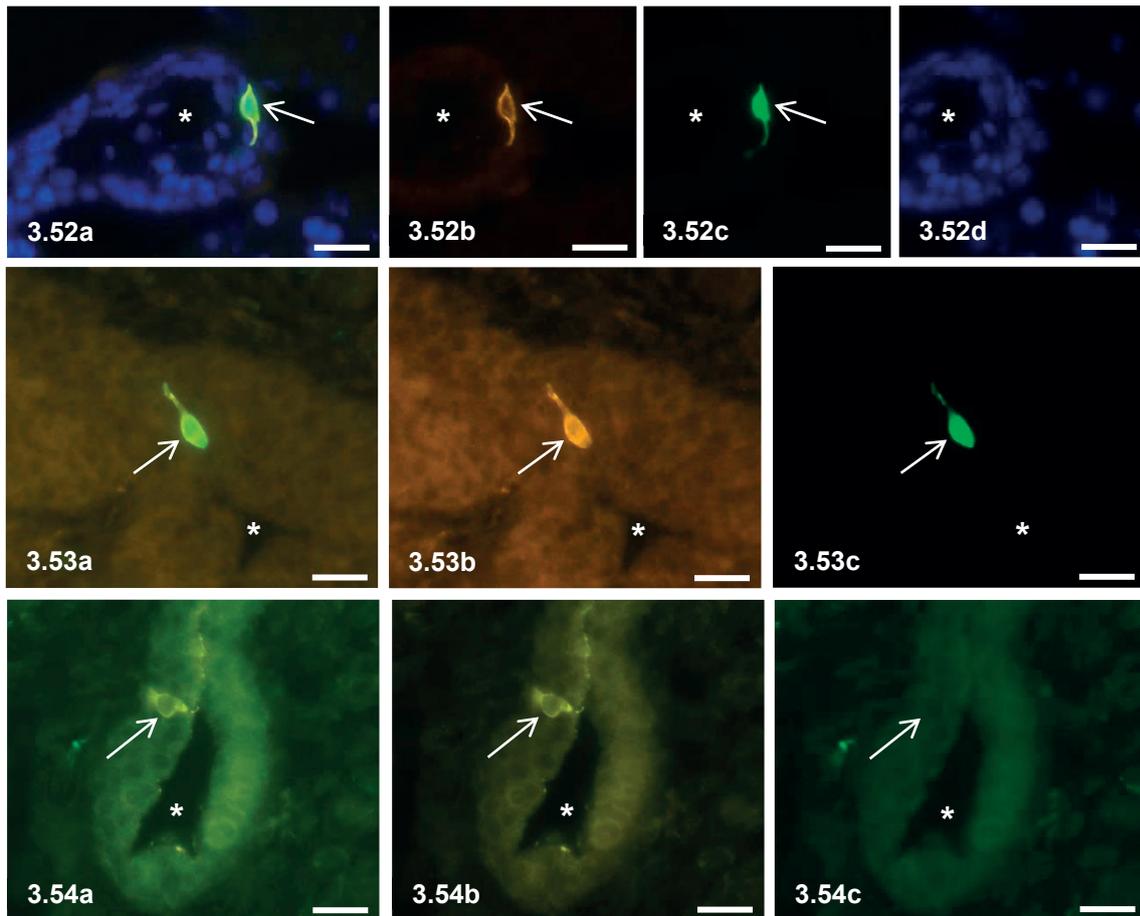


Abb. 3.52a-d-3.53a-c Komponenten der gustatorischen Signaltransduktion in der cholinergen Bürstenzelle: TRPM5. Abb. 3.52a-d IHC und Kernfärbung mit DAPI. a: Mischbild, b: Anti-TRPM5, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC, d: DAPI. Pelvine Urethra (*: Lumen), Männchen. TRPM5- und eGFP-positive Zelle mit zwei horizontalen Fortsätzen (Pfeil). **Abb. 3.53a-c** IHC. a: Mischbild, b: Anti-TRPM5, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC. Blasen Hals (*: Lumen), Männchen. Apikal gelegene TRPM5- und eGFP-positive Zelle (Pfeil) mit basalem Fortsatz. **Abb. 3.54a-c Subpopulation non-cholinerg TRPM5-immunreaktiver Zellen.** IHC. a: Mischbild, b: Anti-TRPM5, Cy3, c: Anti-eGFP, FITC. Urethra, Männchen. Die TRPM5-positive Zelle (Pfeil in a und b) mit apikalem, in das Lumen (*) vorgestreckten und basalem Fortsatz, ist eGFP-negativ (Pfeil in c). Maßstab balken Abb. 3.52a-d-3.54a-c: 20 µm.

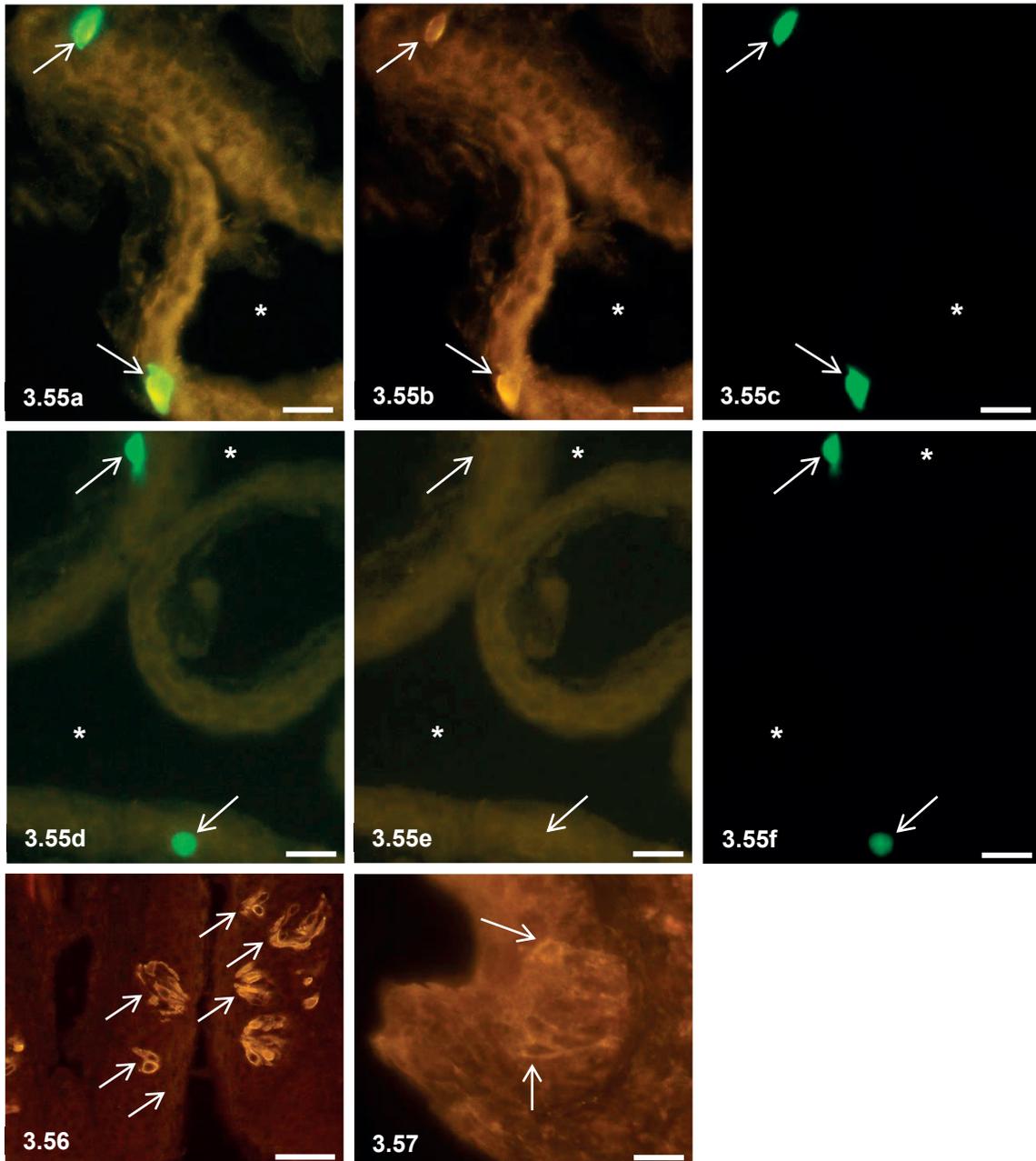


Abb. 3.55 a-f Inkubation mit dem TRPM5-Präimmunserum. **Abb. 3.55a-c** IHC und e-GFP. a: Mischbild, b: Anti-TRPM5, Cy3, c: EGFP. **Abb. 3.55d-f** Inkubation mit dem TRPM5-Präimmunserum rb77 und eGFP. d: Mischbild, e: Cy3, f: EGFP. Urethra (*: Lumen), Männchen. Der Anti-TRPM5-Antikörper markiert zwei urethrale Epithelzellen (Pfeile in b), die cholinerg sind (Pfeile in a und c). Nach Vorbehandlung des Antikörpers mit dem Präimmunserum ist keine der cholinergen Zellen in d und f markiert (Pfeile in e). **Abb. 3.56 Positivkontrolle des Anti-TRPM5-Antikörpers.** IHC. Anti-TRPM5, Cy3. Zunge. TRPM5-immunreaktive Geschmackszellen (Pfeile) in Geschmacksknospen der Zunge leuchten. **Abb. 3.57 Positivkontrolle des Anti-T1R3-Antikörpers.** IHC. Anti-T1R3, 1:2400, Cy3. Zunge. Quer angeschnittene Geschmacksknospe, welche vom Anti-T1R3-Antikörper nur schwach markiert wird. Maßstabbalken Abb. 3.55a-f: 20 µm, Abb. 3.56: 50 µm, Abb. 3.57: 20 µm.

3.6 Nachweis von Bürstenzellen und Komponenten der gustatorischen Signaltransduktion im Epithel der Urethrae von Wildtypmäusen

Villin-immunreaktive sowie Gustducin-, PLC β 2- und TRPM5-positive Epithelzellen wurden im Epithel der Urethrae von männlichen und weiblichen Wildtypmäusen nachgewiesen (Abb. 3.58a-c-3.61a-c). Sie glichen morphologisch den Zellen, die mit denselben Antikörpern in den Urethrae von ChAT^{BAC}-eGFP-Tieren markiert waren.

Antikörper gegen eGFP markierten keine urethrale Epithelzelle beim Wildtyp.

Zusätzlich wurden Doppelnukubationen mit Anti-Villin- und Anti-PLC β 2-, Anti-Gustducin- und Anti-PLC β 2- sowie Anti-TRPM5- und Anti-PLC β 2-Immunsereen an Wildtypurethrae durchgeführt. Bei beiden Geschlechtern wurden Villin- und PLC β 2-koexprimierende urethrale Epithelzellen beobachtet, welche z.T. über apikale Fortsätze das Lumen kontaktierten. Während sich das Fluoreszenzsignal beider Antikörper in zellmembrannahen Bezirken der Zelle überlappte, markierte nur das Villin-Antiserum einen Zellpol besonders kräftig. Alle Zellen waren sowohl positiv für Villin als auch für PLC β 2. Zudem gelang der Nachweis Gustducin- und PLC β 2-immunreaktiver Zellen; Neben doppelt immunreaktiven Zellen fanden sich jedoch auch nur Gustducin- oder PLC β 2-positive, wobei letztere häufiger auftraten. Weiterhin zeigten sich TRPM5- und PLC β 2-positive Zellen. TRPM5-immunreaktive Zellen waren zugleich PLC β 2-immunreaktiv. Demgegenüber kamen PLC β 2-positive Zellen ohne TRPM5-Immunreaktivität vor.

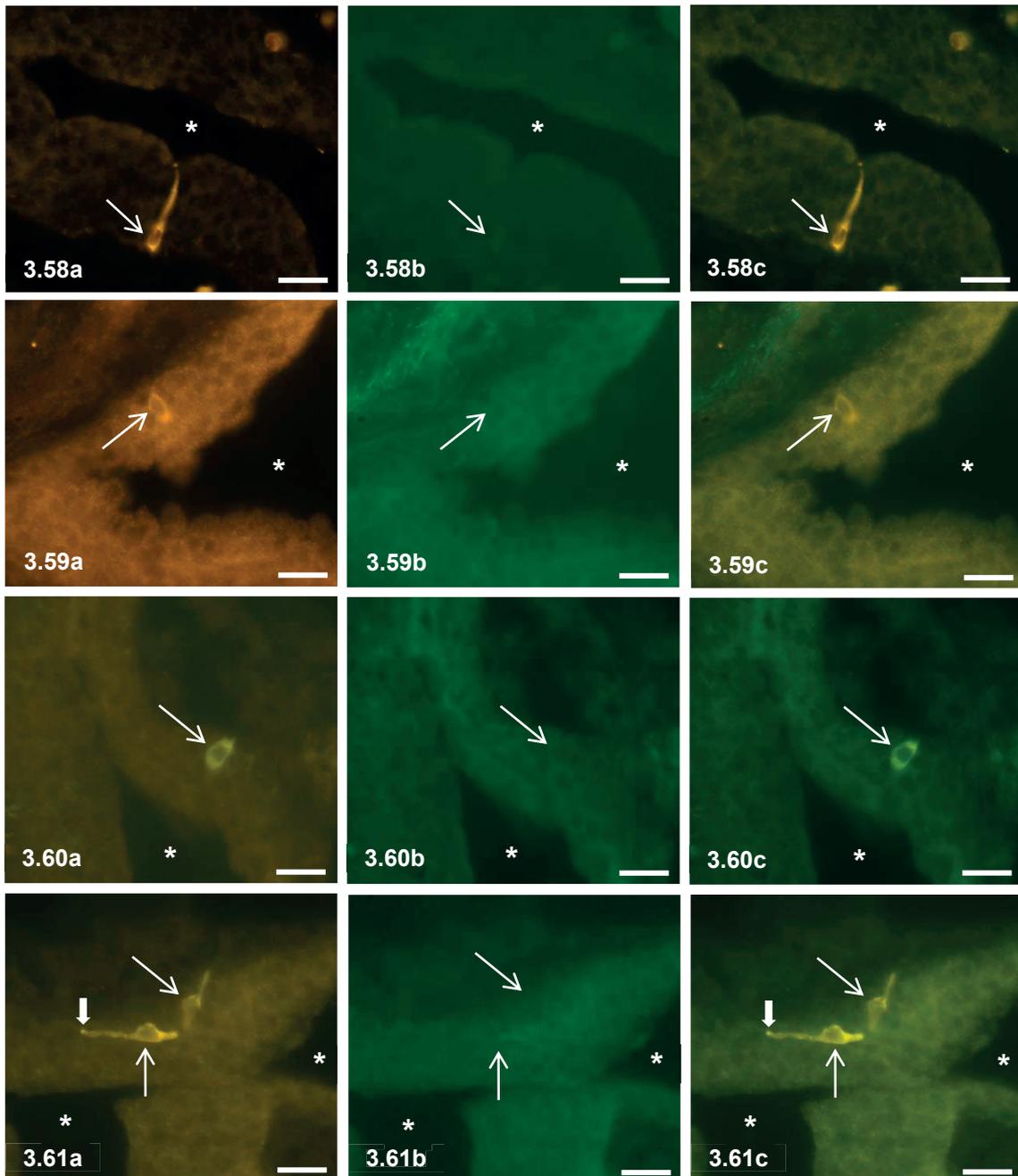


Abb. 3.58a-c-3.61a-c Bürstenzellen und Zellen mit Komponenten der gustatorischen Signaltransduktionskaskade im Wildtyp. Abb. 3.58a-c IHC. a: Anti-Villin, Cy3, b: FITC, c: Mischbild. Urethra, Wildtyp, Weibchen. Villin-immunreaktive Zelle (Pfeil in a und c) mit langem, dünnen Fortsatz und Lumenkontakt (*). Die Zelle leuchtet im FITC-Filter nicht (Pfeil in b). **Abb. 3.59a-c IHC. a:** Anti-Gustducin, Cy3, b: FITC, c: Mischbild. Urethra, Wildtyp, Männchen. Die im Cy3-Filter markierte Zelle (Pfeil in a und c) leuchtet im FITC-Filter (Pfeil in b) nicht. *: urethrales Lumen. **Abb. 3.60a-c IHC. a:** Anti-PLC β 2, Cy3, b: FITC, c: Mischbild. Urethra, Wildtyp, Weibchen. PLC β 2-positive Zelle (Pfeil in a und c), welche basal im Epithel liegt. Kein Fluoreszenzsignal im FITC-Filter in der Wildtypurethra (Pfeil in b). *: urethrales Lumen. **Abb. 3.61a-c IHC. a:** Anti-TRPM5, Cy3, b: FITC, c: Mischbild. Urethra, Wildtyp, Männchen. Zwei TRPM5-immunreaktive Zellen mit horizontaler und apiko-basaler Ausrichtung innerhalb des Epithels (Pfeile in a und c). Im FITC-Filter leuchten die Zellen nicht (Pfeile in b). Akzentuiertes Fluoreszenzsignal terminal (Blockpfeil in a und c). Maßstabbalken Abb. 3.58a-c-3.61a-c: 20 μ m.

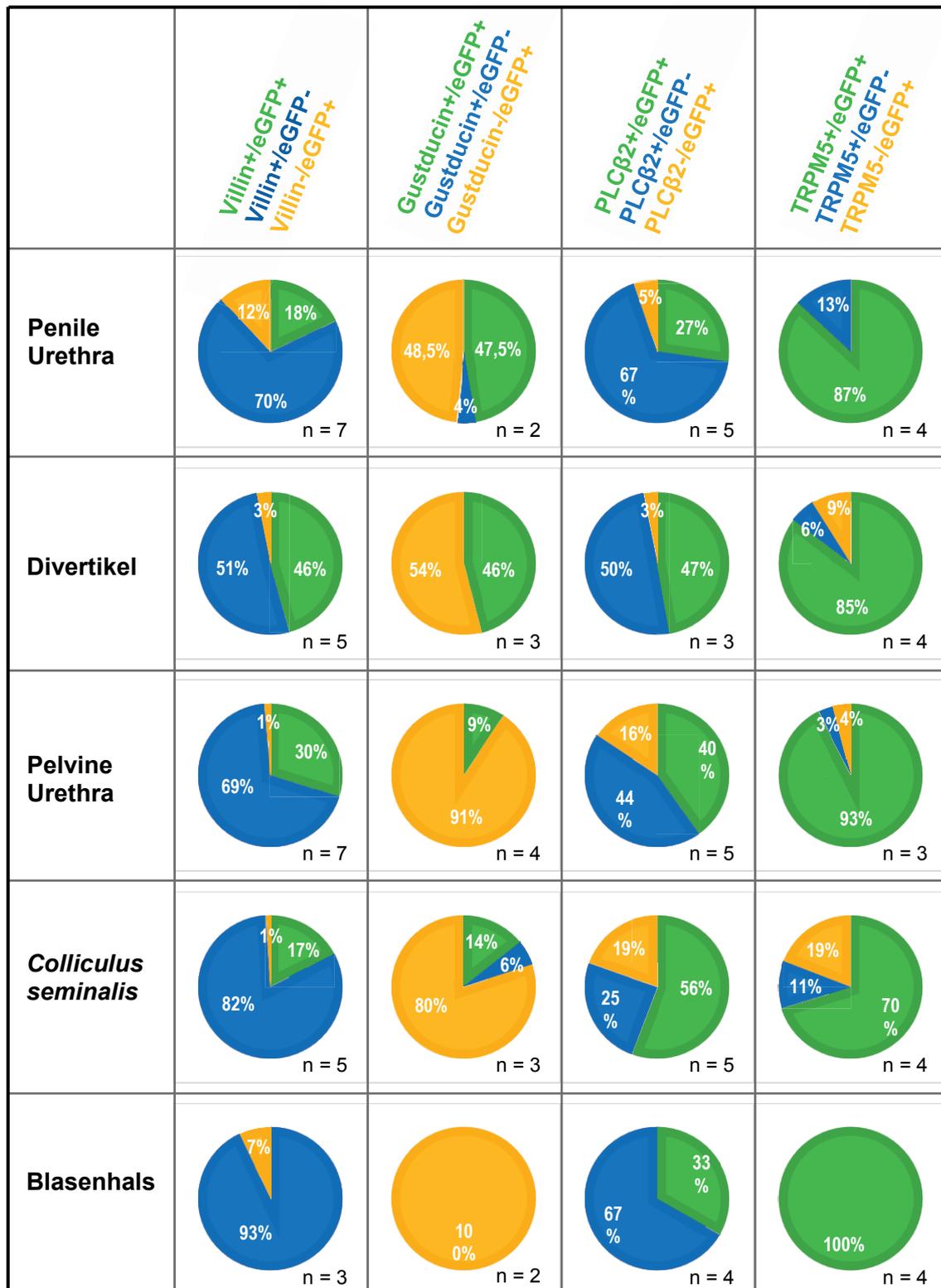


Abb. 3.62 Schematische Darstellung der Anteile cholinergere Villin-, Gustducin-, PLCβ2- bzw. TRPM5-positiver – doppelt positiver – Zellen (grün), non-cholinergere Villin-, Gustducin-, PLCβ2- bzw. TRPM5-positiver Zellen (blau) und cholinergere Villin-, Gustducin-, PLCβ2- bzw. TRPM5-negativer Zellen (gelb) in % in den verschiedenen Abschnitten der männlichen (Blasenhals auch weiblichen) Urethra. Quelldaten siehe Anhangstab. 12, 16, 20 und 24.

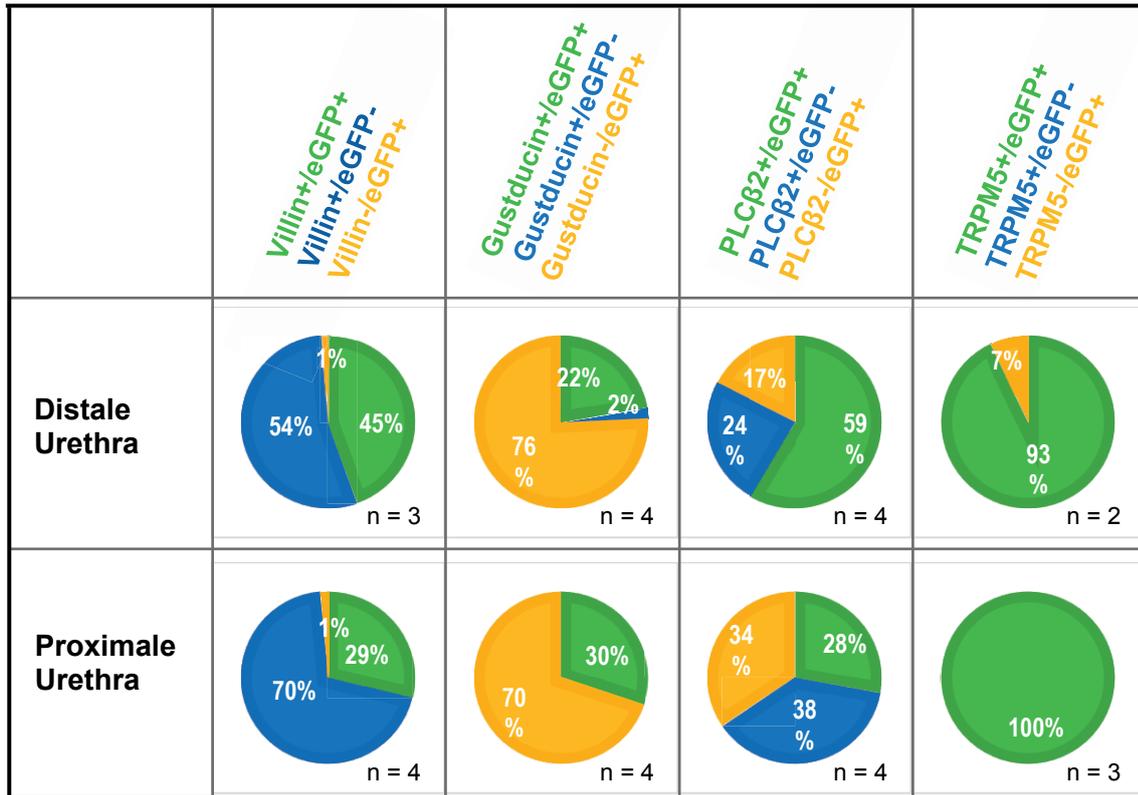


Abb. 3.63 Schematische Darstellung der Anteile cholinergere Villin-, Gustducin-, PLC β 2- bzw. TRPM5-positiver – doppelt positiver – Zellen (grün), non-cholinergere Villin-, Gustducin-, PLC β 2- bzw. TRPM5-positiver Zellen (blau) und cholinergere Villin-, Gustducin-, PLC β 2- bzw. TRPM5-negativer Zellen (gelb) in % in den verschiedenen Abschnitten der weiblichen Urethra. Quelldaten siehe Anhangstab. 14, 18, 22 und 26.

4. DISKUSSION

4.1 Die cholinerge urethrale Zelle ist eine Bürstenzelle und kontaktiert das urethrale Lumen

Im urethralen Epithel imponierte die cholinerge Bürstenzelle durch ihre flaschen-, keulen- oder mandelförmige, auch dreieckige Gestalt. Dabei bildete der apikale Zellpol den Hals der Flasche bzw. Keule; einer bis zu drei basale Zellfortsätze war bzw. waren in der Regel ebenfalls ausgebildet. Die mandelförmige cholinerge Zelle besaß je einen apikalen und basalen Fortsatz. Im Falle der dreieckig geformten cholinergen Zelle fanden sich je nach Orientierung der Zelle im Epithel eine apikale und zwei basale bzw. eine apikale, eine basale und eine horizontale Projektion. Hinsichtlich der Form und Formvariabilität ähnelt die urethrale Bürstenzelle den in anderen Organen beschriebenen äquivalenten Zellen. Cholinerge Bürstenzellen in der Trachea wurden ebenfalls als flaschenförmig beschrieben [95], nehmen im trachealen Epithel jedoch auch dreieckige bis konische Gestalt an [95, 117, 163]. Darüber hinaus verfügen auch die Schleimhäute der *Tuba auditiva*, Nase und Bindehäute über Bürstenzellen, die als flaschen- oder birnenförmige Zellen im respiratorischen bzw. konjunktivalen Epithel situiert sind [96, 106, 209]. Morphologische Parallelen bestehen zudem zum Bürstzelltyp der gastrointestinalen Organe. In den Gallenwegen von Maus und Ratte sowie in der Gallenblase und dem Rektum existieren Bürstenzellen mit typischer Spindel- oder Flaschenform, wohingegen sie im Magen des Schweins und Dünndarm der Maus eher säulenartig und länglich zu sein scheinen [35, 112, 113, 185, 208].

Die Gemeinsamkeit aller beschriebenen Zellen besteht in der Nachweisbarkeit eines differenzierten apikalen Mikrovillibüschels, das sie als Bürstenzelle charakterisiert. Dabei wurden die Mikrovilli organübergreifend als rigide Strukturen umschrieben [49, 96, 106], anhand derer sich die Bürstenzellen von benachbarten Zellen unterscheiden lassen, auch wenn diese Nachbarzellen selbst Mikrovilli tragen [49, 115, 117, 163]. Aus immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Bürstenzellen mit Antikörpern gegen die mikrovillösen Strukturproteine Villin und Fimbrin wurde ersichtlich, dass diese Zellen neben apikalen mikrovillösen Differenzierungen auch basolaterale Mikrovilli ausbilden können. Bei elektronenmikroskopischen Studien der trachealen Bürstenzelle fielen den Erstbeschreibern Rhodin und Dalhamn neben apikalen Mikrovilli weitere Fortsätze auf, die zu zilienträgenden und Becherzellen gerichtet waren. Je nach Zielzelle entsendete die Bürstenzelle unterschiedlich viele und längenvariable Projektionen [163]. Dass die basolateralen Zellausläufer der Bürstenzelle einen engen Kontakt zu Nachbarzellen erlauben, zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen der Bürsten-

zelle in der murinen Gallenblase. Die bis zu drei Mikrometer messenden multiplen Mikrovilli stülpten sich bis in das Zytoplasma umgebender Zellen vor [114]. Wie ihre apikalen Äquivalente bestanden auch diese basolateralen Projektionen aus Mikrofilamentbündeln, die sie rigide erscheinen ließen und die Verzahnung mit der Zellmembran ermöglichten. Sie entsprangen der basolateralen Bürstenzellmembran jedoch nicht büschelweise, sondern eher solitär mit variablen Austrittswinkeln [115]. Untermauert wurden die elektronenmikroskopischen Befunde durch immunhistochemische Untersuchungen der Bürstenzelle in den Atemwegen und dem Gastrointestinaltrakt der Ratte mit Antikörpern gegen Villin und Fimbrin. Apikale und basolaterale Zellkompartimente waren Villin- und Fimbrin-immunreaktiv, entsprechend des erwarteten Vorkommens von Mikrovilli [70], so dass Höfer et al. die Nachweisbarkeit apikaler und basolateraler Mikrovilli als Hauptmerkmal der Bürstenzellen postulierten. Die urethralen Bürstenzellen erfüllen dieses Kriterium auch. Aus Inkubationen der Bürstenzellen mit Villin-Antisera resultierte in der Regel eine apikale sowie basolaterale Markierung der Zellzirkumferenz einschließlich der Projektionen, soweit sie vorhanden bzw. sichtbar waren. Ein besonders ausgeprägtes Fluoreszenzsignal zeigte sich adluminal entsprechend eines apikalen Mikrovillibüschels. Dahingegen leuchtete die basolaterale Zellmembran schwächer; horizontale bzw. laterale Projektionen waren regelrecht gut erkennbar, woraus die Vermutung erwächst, dass es sich dabei ebenfalls um Mikrovilli handeln könnte. Fortführend zu diesen immunhistologischen Beobachtungen wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen an der urethralen Bürstenzelle durchgeführt, die das Vorhandensein des apikalen Mikrovillibüschels bestätigen [35]. Beachtlich ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass das Mikrovillibüschel zwar in der Mehrheit der Fälle zum urethralen Lumen ausgerichtet ist, es jedoch auch in interzellulären Zwischenräumen platziert sein kann, was bereits für Bürstenzellen der murinen Gallenblase beschrieben wurde [112]. Auch fortsatzlose rundliche bis ovale Zellen waren im urethralen Epithel neben den cholinergen und non-cholinergen Bürstenzellen mit charakteristischem Mikrovillibüschel Villin-immunreaktiv. Eine Kontaktaufnahme mit dem Lumen oder der Basalmembran war, zumindest auf den jeweiligen Schnittebenen, nicht ersichtlich. Die Immunreaktivität der gesamten Zellzirkumferenz dieser Zellen deutete jedoch auch auf das Vorhandensein des Antigens Villin hin, woraus gefolgert werden kann, dass es sich auch hierbei um urethrale Bürstenzellen handelt. Ähnliche Beobachtungen machten Luciano et al. an Bürstenzellen der Gallenblase der Maus. Sie führten die Formvariabilität der Zellen zurück auf schnitttechnische Ursachen, insofern als dass der Zelleib unter verschiedenen Winkeln angeschnitten wurde und Fortsätze somit nicht zur Darstellung kamen. Da die Gestalt und Ausdehnung der kompletten Bürstenzelle anhand von ultradünnen Nachbarschnitten nachvollzogen werden konnte, wurde gefolgert, dass die Zelle schräg im Epithel der

Gallenblase liege und in der Regel immer das Lumen sowie die Basalmembran kontaktiere [115]. Vor dem Hintergrund der Existenz basolateraler Mikrovilli bei Bürstenzellen der Gallenblase und vermutlich auch der Urethra erscheint es jedoch fraglich, warum bei der elektronenmikroskopischen Auswertung solcher Zellanschnitte kein basolateraler Fortsatz beobachtet wurde. Bei der Betrachtung fortsatzloser urethraler Bürstenzellen im Fluoreszenzmikroskop kann jedoch aufgrund von eingeschränkter Möglichkeit zur Vergrößerung nicht sicher ausgeschlossen werden, dass kein lateraler Mikrovillus angetroffen ist. Überdies fanden sich in direkter Umgebung der urethralen Bürstenzellen gelegentlich Villin-immunreaktive punkt- bis faserartige Strukturen. Hierbei könnte es sich um laterale Mikrovilli handeln, wenngleich die Zugehörigkeit dieser Ausläufer zu einer Bürstenzelle nicht lückenlos nachvollziehbar war. Würden die lateralen Mikrovilli der urethralen Bürstenzelle eine vergleichbare Länge mit denen der Bürstenzellen in der murinen Gallenblase von ca. drei Mikrometern haben [114, 115], so eignet sich die Anfertigung von zehn Mikrometer dicken Schnittserien nicht für deren Darstellung und Beurteilung. Ultradünne Schnittserien, die Durchmusterung angeschnittener Bürstenzellen und ihrer Nachbarzellen im Elektronenmikroskop oder Untersuchungen mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop könnten hinsichtlich dieser Fragestellung Aufschluss geben. Die Vielgestaltigkeit basaler Fortsätze der urethralen Bürstenzelle erinnert zudem an vorbeschriebene Ergebnisse aus Studien an Bürstenzellen anderer Organe. Die untersuchten Bürstenzellen in der Harnröhre wiesen regelmäßig basale Fortsätze auf. Ihre Anzahl pro Zelle variierte von keinem bis zu dreien. Basale Zellausläufer verjüngten sich häufig in Richtung Basalmembran und waren schweifartig gestaltet. Bürstenzellen in Trachea und Magen liegen der Basalmembran mit zugespitzten bzw. konischen basalen Zellpolen auf [117, 163, 208]. Von Bürstenzellen der Gallenblase ist bekannt, dass sie wie die urethralen Äquivalente über mehrere basale Fortsätze die Basalmembran kontaktieren können. Luciano et al. beschrieben im Bezug darauf eine sich verjüngenden breitbasige sowie bis zu zwei dünner und länger gestaltete Projektionen [115].

4.2. Abgrenzung neuroendokriner Zellen von cholinergen Bürstenzellen in der Urethra

4.2.1 Histomorphologie der urethralen neuroendokrinen Zelle im Vergleich zu Vorarbeiten

Die neuroendokrine Zelle in der murinen Harnröhre besaß zumeist eine runde oder ovale, gelegentlich auch dreieckige, tropfen- oder flaschenförmige Gestalt. Dies steht im Einklang mit Beschreibungen neuroendokriner Zellen in den Urethrae gleicher oder anderer Tierspezies und des Menschen, wo diese Zellen flaschen- oder spindelartig [39,

64, 66, 103], länglich [32, 103, 206, 207], oval [64], rund [6, 17, 32, 206, 207] sowie dreieckig [6, 32, 206, 207] geformt sein können. Urethrale neuroendokrine Zellen besaßen einen eher großen mittig situierten Nukleus, wohingegen in der Literatur vornehmlich kleine Nuklei beschrieben werden in mittlerer bis basaler, selten auch apikaler Lokalisation [66]. In der vorliegenden sowie in früheren Studien verfügte das apikale Zellkompartiment häufig über konische, lange, z.T. doppelt ausgeprägte Fortsätze, die sich in das urethrale Lumen oder umschriebene extrazelluläre Aufweitungen zwischen den Epithelzellen vorstülpten [17, 32, 38, 39, 66, 84, 103, 206, 207]. Neuroendokrine Zellen besaßen des Weiteren nach lateral/horizontal gerichtete Fortsätze, wodurch gelegentlich eine räumliche Annäherung zu den Ausläufern anderer neuroendokriner Zellen bzw. ihrer Zellkörper geschaffen wurde [35, 66, 84, 206, 207]. Mit der Basalmembran treten die Zellen entweder über ihren basalen Zellpol oder über basale Fortsätze in Kontakt; letztere konnten sich verzweigen und einen bis zu 100 Mikrometer langen horizontalen, zur Basalmembran parallelen Verlauf aufweisen, bevor sie in knöpfchenartigen Schwellungen ausliefen [17, 66, 84, 206, 207]. Dies fand in vorliegender Studie Bestätigung, da ebenfalls neuroendokrine Zellen mit sehr langen horizontalen Zellausläufern auffielen, die sowohl intra- als auch subepithelial parallel zur Basalmembran verliefen und terminale Auftreibungen besaßen. Somit resultierte eine Bi- oder Multipolarität der urethralen neuroendokrinen Zellen, die eine Einteilung in den „offenen“ bzw. „geschlossenen“ Typ nach Fujita [56] zulässt, je nachdem, ob über apikale Zellausläufer ein Kontakt mit dem Organlumen zustande kommt oder nicht. Untersuchungen an der Urethra des Schafs zufolge besaßen insbesondere neuroendokrine Zellen mit 5-HT-haltigen Granula multiple Fortsätze, von denen sich einer bis zum Lumen erstreckte [17], wodurch diese Zellen dem offenen Typ zugerechnet werden konnten. Als Beispiel für Paraneurone ohne luminale Beziehung lassen sich Somatostatin-positive Zellen aufführen, die lediglich einen Ausläufer zur Basalmembran aufweisen [17, 206, 207]. Ein Zusammenhang zwischen 5-HT-immunreaktiven Zellen und der Art ihrer Fortsätze konnte in dieser Arbeit nicht hergestellt werden, da diese Subpopulation neuroendokriner Zellen nicht überproportional häufig in eine bestimmte Richtung gerichtete Fortsätze zeigte.

4.2.2 Neuroendokrine und chemosensorische Zellen bilden distinkte Zellpopulationen in der Urethra: Unterschiede in Ultrastruktur, Immunhistochemie und Vorkommen

Vergleicht man neuroendokrine Zellen und non-cholinerge Bürstenzellen in der murinen Urethra unter morphologischen Gesichtspunkten, fallen mehrere Gemeinsamkeiten auf. Zum einen bildeten beide Zelltypen charakteristische, sehr lange und dünne apikale

Zellausläufer mit terminalem Mikrovillibesatz aus, wohingegen die cholinerge Bürstenzelle in der Regel kürzere, flaschenhalsähnliche Fortsätze zum Lumen besaß. Zum anderen projizierten neuroendokrine sowie ChAT^{BAC}-eGFP-negative Bürstenzellen weitreichende horizontale Fortsätze entlang der Basalmembran, was für cholinerge Bürstenzellen nicht typisch war. Hinsichtlich der prozentualen Verteilung beider Zellpopulationen in der urethralen Mukosa fallen insbesondere drei Lokalisationen innerhalb der Urethra männlicher Mäuse auf, in denen die Häufigkeit des Vorkommens neuroendokriner PGP-positiver und non-cholinerges Bürstenzellen einander gleicht: Im penilen Abschnitt fanden sich 74% PGP-immunreaktive Zellen; die Inkubation dieser urethralen Region mit dem Anti-Villin-Antikörper erbrachte 70% Villin-immunreaktive non-cholinerge Zellen. Im Divertikel waren 40% der Zellen PGP-positiv und 51% Villin-positiv sowie ChAT^{BAC}-eGFP-negativ. 74% der Zellen im *Colliculus seminalis* reagierten mit PGP-Antiseren; ein Prozentsatz von 82 war Villin-immunreaktiv ohne ChAT^{BAC}-eGFP-Expression. Vor diesem Hintergrund erwächst der Eindruck, dass es sich bei den non-cholinergen Bürstenzellen z.T. um neuroendokrine Zellen handeln könnte. Es sprechen jedoch einige Beobachtungen dagegen. Die Mikrovilli der Bürstenzellen werden typischerweise als rigide, fingerartige, dicht stehende und gerade Strukturen von 1 bis 1,5 Mikrometer Länge und 0,05 bis 0,1 Mikrometer Breite beschrieben, anhand derer sich Bürstenzellen von ihren benachbarten Zellen unterscheiden [70, 140, 163, 171, 202]. Mikrovilli neuroendokriner Zellen in der Urethra wurden dahingegen als kurze Zelldifferenzierungen ohne starre Anordnung beschrieben [155, 161]. Um mittels Antikörpern Bürstenzellen selektiv darstellen zu können, analysierten Höfer et al. viele Organe mit bekanntem Vorkommen dieser Zellpopulation anhand von Villin- und Fimbrin-Antiseren. Die positive Immunreaktion mit Antikörpern gegen die Strukturproteine der Mikrovilli, Villin und Fimbrin, in den Bürstenzellen des Gastrointestinaltrakts und der Atemwege ermöglichte eine sichere Identifizierung der Bürstenzellen. Höfer et al. leiteten aus diesen immunhistochemischen Untersuchungen das gemeinsame Merkmal aller Bürstenzellen ab: Ausschließlich Bürstenzellen zeigten zusätzlich zur apikalen eine basolaterale Villin-Immunreaktivität. Bürstenzellen stellen somit den einzigen Zelltyp mit basolateral ausgebildeten Mikrovilli dar, was sie von allen anderen Zellen mit apikalen Mikrovillibüscheln unterscheidet. Neuroendokrinen Zellen in der Urethra würde demnach das basolaterale Fluoreszenzsignal bei Inkubation mit Villin-Antiseren fehlen, wodurch sie klar von den non-cholinergen Bürstenzellen abgegrenzt werden könnten. Überdies gelang eine genauere Abgrenzung der Bürstenzelle von neuroendokrinen bzw. enteroendokrinen Zellen mit Antikörpern gegen Villin, CK18, β -Tubulin und 5-HT. Der Antikörper Anti-CK18 richtet sich gegen Intermediärfilamente und der Anti- β -Tubulin-Antikörper markiert Mikrotubuli, die in Bürsten-

zellen insbesondere supranukleär vorkommen [71, 89, 114, 171, 202]. Villin-immunreaktive Zellen waren nahezu immer zugleich CK18- bzw. β -Tubulin-positiv, wodurch deren Charakterisierung als Bürstenzellen gelang. CK18-immunreaktive Bürstenzellen reagierten jedoch in keinem Fall mit 5-HT- und CgA-Antiseren [71]. Außerhalb der genannten Organabschnitte der männlichen Maus, der penilen Urethra, des Divertikels und des *Colliculus seminalis*, deckte sich das relative Vorkommen neuroendokriner Zellen und non-cholinerges Bürstenzellen nicht. Insbesondere beim weiblichen Tier zeigten sich unterschiedliche prozentuale Verteilungsmuster beider Zelltypen. Die Untersuchung der distalen und proximalen weiblichen Urethra mit Anti-Villin-Antikörpern erbrachte 54% bzw. 70% Villin-positiv non-cholinerges Bürstenzellen; die Inkubation mit PGP-Immunsereen zeigte 34 bzw. 58% PGP-immunreaktive eGFP-negative Zellen. In keinem der urethralen Abschnitte der weiblichen Maus entsprach daher die Häufigkeit des Vorkommens neuroendokriner Zellen derer non-cholinerges Bürstenzellen. Es erscheint folglich als äußerst unwahrscheinlich, dass es sich bei den diskutierten Zellen um ein und dieselbe Zellart handeln könnte, was hauptsächlich durch die Ergebnisse aus der immunhistochemischen Inkubation urethraler Schnitte ChAT^{BAC}-eGFP-positiver Tiere mit Antikörpern gegen PGP, 5-HT und CgA gestützt wird. Nahezu keine ChAT-positiv Zelle exprimiert neuroendokrine Marker mit Ausnahme des pelvinen urethralen Abschnitts des Männchens, wo eine Kollokalisierung von ChAT und CgA zu 1% auftrat. Dies entspricht einer doppelt-positiv Zelle von insgesamt 134 Zellen, die mit Anti-eGFP- und Anti-CgA-Antiseren im pelvinen Segment von fünf Versuchstieren reagierten. Da der Anteil doppelt-positiv Zellen verschwindend gering ist, lässt er sich am ehesten durch methodische Ungenauigkeiten erklären, zumal neuroendokrine und cholinerges Zellen häufig eng benachbart im Epithel situiert waren, so dass die Zellmembrangrenzen fluoreszenzmikroskopisch unter höchstens 100-facher Vergrößerung nicht immer zuverlässig voneinander abgegrenzt werden konnten. Somit könnten anhand der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung und der Wahl einer Schnittdicken von 10 Mikrometern Zellen fälschlicherweise als doppelt-immunreaktiv erfasst worden sein. Durch die Verwendung neuroendokriner Antiseren zur Abgrenzung der bereits bekannten neuroendokrinen Zellen von den cholinergen wurde die Verteilung der neuroendokrinen Zellen über die verschiedenen urethralen Segmente orientierend miterfasst. In der Mukosa der penilen Urethra waren PGP- und CgA-positiv Zellen prozentual stärker vertreten als ChAT-exprimierende. Cholinerges Zellen traten jedoch häufiger auf als 5-HT-speichernde neuroendokrine Zellen. Da PGP als panneuronaler Marker [195] in allen neuroendokrinen Zellen nachweisbar ist, wurden mit dem Anti-PGP-Antiserum mehr Zellen markiert als mit dem Anti-5-HT-Immunsereum, was vereinbar ist mit der Tatsache, dass 5-HT-speichernde Zellen lediglich einen Subtyp der neuroendokrinen Zellpopulation darstellen

[17, 64, 66, 84]. Die Granula des restliche Anteils PGP-positiver, 5-HT-negativer Zellen könnte somit eine andere Substanz enthalten und sezernieren, beispielsweise Somatostatin, dessen Vorkommen in neuroendokrinen Zellen des Schafs belegt wurde [32, 207], oder Cholezystikinin in neuroendokrinen Zellen von Pferd, Rind, Schaf und Schwein [206]. Im nach proximal folgenden Abschnitt, dem urethralen Divertikel, halbierte sich der relative Anteil neuroendokriner Zellen, wobei die überwiegende Mehrzahl 5-HT-immunreaktiv war. Die Beckenurethra des Männchens zeigte ungefähr gleiche Mengen an neuroendokrinen und cholinergen Zellen. PGP-positive, 5-HT-negative Zellen traten auch hier auf. Besonders stark waren Neuroendokrine im Bereich des *Colliculus seminalis* vertreten; nahezu alle PGP- oder CgA-immunreaktiven Zellen speicherten 5-HT. Das gehäufte Vorkommen neuroendokriner Zellen insbesondere vom 5-HT-haltigen Subtyp in der Region um den *Colliculus seminalis* ist ebenfalls aus anderen Tierpezies bekannt. Beim Rüden, Schaf und Meerschweinchen wurde die größte Anzahl 5-HT-positiver Zellen im *Colliculus seminalis* gefunden, die Zellen besiedelten zudem auch die periurethralen prostatistischen Gänge; in Richtung Ostium externum nahm ihre Menge ab [17, 66, 207]. Für das Äquivalent des *Colliculus seminalis* in der Ratte beschrieb Aumüller das Auftreten neuroendokriner Zellen in den terminalen, Urethra-nahen Stücken der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, außer dem *Ductus deferens* und der *Ampulla*, sowie eine steigende Anzahl dieses Zelltyps in den urethralen Abschnitten direkt unterhalb der Einmündungen der genannten Drüsen [6]. Die aus der Literatur vorbekannten Ergebnisse zur Verteilung neuroendokriner Zellen in der Urethra deckten sich somit weitgehend mit den vorliegenden. Die tendenzielle Abnahme der Häufigkeit neuroendokriner Zellen in kranio-kaudaler Richtung in der Urethra des Männchens konnte auch hier nachvollzogen werden; die zahlenmäßige Dominanz neuroendokriner über cholinerge Zellen im penilen Abschnitt ist vor dem Hintergrund einer insgesamt niedrigen Zahl markierter Zellen zu sehen. Während im *Colliculus seminalis* von fünf männlichen Mäusen insgesamt 423 Zellen mit dem Anti-PGP-Antikörper markiert wurden, sank ihre Anzahl auf 216 in insgesamt sechs beurteilten männlichen penilen Harnröhren. In den 105 durchmusterten paraurethralen Drüsenausführungsgängen der penilen Urethra vier verschiedener Mäuse fehlten neuroendokrine Zellen. Je nach verwendetem Antiserum zeigten sich in pelvinen Drüsenausführungsgängen 23 (Anti-5-HT- und Anti-eGFP-Immunsereen) bis 75 % (Anti-CgA- und Anti-eGFP-Immunsereen) markierte neuroendokrine Zellen. Eine deutliche Dominanz des 5-HT-immunreaktiven Zelltyps gegenüber dem cholinergen fand sich in den pericolliculären Drüsenausführungsgängen der murinen Prostata.

Vergleicht man das Vorkommen neuroendokriner und cholinerg Zellen in der weiblichen Urethra miteinander, so fällt auf, dass neuroendokrine Zellen stärker in der proximalen Hälfte des Organs und cholinerge Bürstenzellen eher in der distalen Hälfte präsent waren. Diese Beobachtung stimmt nur z.T. überein mit Studien über die Verteilung neuroendokriner Zellen in Urethrae anderer Spezies. Der proximale Anteil der weiblichen menschlichen Harnröhre und der des weiblichen Meerschweinchens stellen analog zu den Verhältnissen bei der Maus den bevorzugten Sitz Neuroendokriner dar; dahingegen zeigte sich in den Urethrae von Hunden, Schweinen, Schafen, Pferden und Rindern ein vorwiegendes Auftreten dieses Zelltyps in distalen Organteilen [66, 206].

Fetissof et al. beschrieben das Vorkommen endokriner, insbesondere serotonerger Zellen in den Ausführungsgängen kleiner und großer vestibulärer Drüsen bei der Frau [45]; im distalen Bereich der murinen Urethra wurden zusätzlich zu den PUDAG auch die Hauptausführungsgänge der Klitorisdrüsen beurteilt und die neuroendokrinen Zellen in diesem Bereich mit ausgezählt. Ein Drittel aller markierten neuroendokrinen Zellen beider Drüsentypen war neuroendokrin, zwei Drittel waren cholinerg.

4.2.3 Funktion der einzelnen und im Zellverband organisierten neuroendokrinen Zelle

Unter funktionellen Gesichtspunkten wurde den neuroendokrinen urethralen Zellen häufig Ähnlichkeit mit den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltrakts und der Atemwege zugesprochen [32, 56, 64, 66, 103]. Aufgrund ihres Besatzes mit Mikrovilli und der Ausbildung von Fortsätzen wurde die Fähigkeit, Stimuli im urethralen Lumen zu detektieren und mit einer basalen Sekretion gespeicherter Amine oder Peptidhormone zu antworten, diskutiert [38, 39, 56, 64, 66, 206]. Bereits 1951 sprach Feyrter – der Erstbeschreiber des „Helle-Zellen-Systems“ - in diesem Zusammenhang von Chemozeption [46]. Als Stimuli der neuroendokrinen Zellen wurden generell chemische oder physikalische Reize innerhalb des urethralen Lumens in Betracht gezogen [38, 66, 161]. In Folge der basolateral freigesetzten Substanzen kommunizieren die neuroendokrine Zelle mit benachbarten Epithel- oder neuroendokrinen Zellen im Sinne einer parakrinen Funktion, zumal die langen und multiplen zum reichen Netzwerk ausgebildeten Projektionen einen engen interzellulären Kontakt ermöglichen. Diskutiert wurden zudem die Einflussnahme neuroendokriner auf endokrine Signalwege über die Sekretion ihres Granulainhalts in Blutgefäße, sowie eine mögliche Exzitation sensorischer subepithelialer oder intraepithelialer Nervenfasern mit konsekutiver Auslösung lokaler Reflexe [38, 39, 84, 161, 206, 207]. Insbesondere das freigesetzte 5-HT spielt im urogenitalen Bereich eine wichtige Rolle. Es bewirkt die Kontraktion glatter Muskulatur, wodurch sowohl das Sekret in den prostatistischen exkretorischen Gängen als auch im *Colliculus seminalis* abgeführt und

das urogenitale Gefäßsystem reguliert wird [6, 17, 66, 84, 206, 207]. Aus der zusätzlichen Funktion des 5-HT die Sekretproduktion exokriner Drüsen zu stimulieren, erklärt sich die Lokalisation serotonerger neuroendokriner Zellen im Bereich des murinen *Colliculus seminalis* und der pericolliculären prostatistischen Ausführungsgänge. Je nach Ausmaß der 5-HT-Sekretion ändert sich somit die Zusammensetzung der Samenflüssigkeit und damit ihre Fruchtbarkeit. Aus den Ergebnissen zur Untersuchung der prozentualen Vorkommen neuroendokriner Zellen und Bürstenzellen geht hervor, dass die Anteile beider Zelltypen in einigen Segmenten der murinen Urethra gleich groß sind. Da sich nahezu keine Kolo-kalisation zwischen neuroendokrinen und büstenzellspezifischen Markern in einer Zelle nachweisen lässt und ein enger Kontakt beider Zellpopulationen untereinander – sei es durch reich ausgebildete Zellfortsätze zum Perikaryon oder zu den Fortsätzen der jeweils anderen Zelle oder durch benachbarte Lage der Zellkörper - auf-fiel, wäre eine synergistische Funktion im urethralen Zellverband denkbar. Demnach könnten die Bürstenzellen nach Detektion bestimmter Stimuli über ihr Mikrovillibuschel die neuroendokrine Zelle zur Sekretion ihrer Stoffe anregen, wodurch sowohl das Monitoring eines breiteren Spektrums an Stimuli als auch eine gesteigert basolaterale Freisetzung von Amininen, Peptidhormonen usw. im Sinne einer positiven Verstärkung stattfinden könnte. Merigo et al., die die sog. solitären chemosensorischen Zellen (SCC) in den Atemwegen der Ratte beschrieben, äußerten die Vermutung, dass diese Zellen mit sekretorischen Zellen, z.B. Clara-Zellen oder Becherzellen, des respiratorischen Epithels synergistisch zusammenarbeiten könnten [125, 126]. Die Termini Bürstenzelle und SCC sind dabei weitgehend als Synonyme zu verstehen; sie bezeichnen beide die solitär im Epithel situierte mikrovillitragende Zelle, die über diejenigen, zur Verarbeitung gustatorischer Signale benötigten Enzymen verfügt [97]. Zudem wäre es möglich, dass neuroendokrine Zellen in manchen Fällen ausschließlich über Bürstenzellen Anbindung ans urethrale Lumen erhalten, da sie im Gegensatz zu Bürstenzellen nicht regelmäßig apikale Zellprojektionen aufweisen, d.h. auch vom geschlossenen Typ sein können [45, 64, 84]. Neuroendokrine Zellen, die sich in der Lunge zu sog. Neuroepithelial bodies (NEB) gruppieren, reagieren auf einen Abfall des Sauerstoffpartialdrucks mit einer gesteigerten Freisetzung von 5-HT, vermittelt über eine Inhibition von mit einer NADPH-Oxidase assoziierten, sauerstoffsensitiven K^+ -Kanälen mit konsekutiver Depolarisation, Ca^{2+} -Einwärtsströmen über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und Vesikelexozytose [31, 54, 55]. An aus neonatalen Hamsterlungen isolierten nativen NEB konnte mittels amperometrischen Messungen eine signifikant erhöhte 5-HT-Sekretion nachgewiesen werden, wenn diese mit Kohlendioxid angereicherten und/oder sauren Lösungen ausgesetzt wurden. Die Kombination aus Hyperkapnie und Azidose hatte dabei einen additiven Effekt auf die

seziernierte Menge an 5-HT zur Folge und konnte durch zusätzliche Senkung des Sauerstoffpartialdrucks nochmals gesteigert werden [109]. Nach aktuellem Forschungsstand gelang es bisher jedoch nicht, die spezifischen Stimuli neuroendokriner Zellen in der Urethra zu identifizieren, so dass sich die Frage stellt, ob die apikalen mikrovillibestückten oder die basolateralen Fortsätze andere als chemozeptive Funktionen erfüllen könnten. Hakanson et al. entdeckten neben den formaldehyd-induziert gelb leuchtenden serotonergen neuroendokrinen Zellen in der Urethra des Meerschweinchens zusätzlich grün fluoreszierende Zellen, die sich nach intraperitonealer Verabreichung von L-DOPA als Dopamin-speichernde Neuroendokrine erwiesen [64]. Die Aufnahme der Aminvorstufen in die Zelle könnte vornehmlich an den multiplen Fortsätzen der Zellen und insbesondere an den mit Mikrovillibüscheln versehenen Projektionen stattfinden, womit diesen statt einer chemozeptiven eher eine resorptive Funktion zukommen würde.

4.3 Die cholinerge Bürstenzelle detektiert Substanzen im Lumen der Urethra über die kanonische gustatorische Signaltransduktionskaskade

4.3.1 Gustducin- und PLC β 2-vermittelte Signaltransduktion

Anhand immunhistochemischer und elektrophysiologischer Untersuchungen an murinen Harnröhren konnte nachgewiesen werden, dass in diesem Organ PLC β 2- sowie Gustducin-exprimierende cholinerge Zellen existieren, die in Analogie zu geschmacksrezeptiven Zellen der Zunge eine chemosensitive Funktion ausüben. Die urethralen chemosensitiven Zellen nutzen z.T. dieselben Rezeptoren, Enzyme, *second messenger* und Ionenkanäle zur Signaltransduktion wie die geschmacksrezeptiven Zellen der Geschmacksknospen. Die Geschmackstransduktion von Bitterstoffen, Süßstoffen und L-AS erfolgt in den geschmacksrezeptiven Zellen vornehmlich über die Aktivierung eines G-Proteins, das sich aus den Untereinheiten G α Gustducin, G β 13 oder G β 1 und G γ 13 oder G γ 3 zusammensetzt [90, 168]. G α und G $\beta\gamma$ leiten im Folgenden zwei voneinander unabhängige, doch synchron ablaufende Signalwege ein [213]. Aktuellen Erkenntnissen zufolge spielt zur Erkennung und Signalweitergabe von bitteren, süßen und Umami-Liganden hauptsächlich der IP $_3$ -vermittelte Signalweg eine Rolle. Er wird eingeleitet durch G $\beta\gamma$, die zusammen das Enzym PLC β 2 aktivieren, welches zur Synthese von IP $_3$ führt. IP $_3$ besetzt den Rezeptor Typ 3 am ER der Zelle, das als Ca $^{2+}$ -Speicher gilt, wodurch der intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Level über eine Ca $^{2+}$ -Ausschüttung aus dem ER ansteigt. Der schnelle Anstieg des intrazellulären Ca $^{2+}$ -Levels fungiert dabei – wahrscheinlich zusammen mit GPCR - als Trigger für die Öffnung von TRPM5, einem monovalenten, unspezifischen Kationenkanal. Durch den Einstrom positiver Ladungsträger depolarisiert die

geschmacksrezeptive Zelle und setzt ihren Transmitter frei. In Abhängigkeit vom urethralen Segment fanden sich in der Urethra 27 (peniler Abschnitt, Abb. 3.62) bis 59% (distale Urethra des Weibchens, Abb. 3.63) cholinerge PLC β 2-exprimierende Zellen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die urethrale chemosensitive Zelle ebenfalls dazu befähigt ist, bittere, süße und umami-Substanzen über den PLC β 2-vermittelten IP $_3$ -Signalweg zu schmecken und als Folge ihrer Depolarisation – bei der TRPM5 eine Rolle spielt – Acetylcholin sezerniert. Die Signaltransduktion von Bitter- und Süßstoffen sowie von L-AS in geschmacksrezeptiven Zellen stützt sich darüber hinaus auf einen weiteren, Gustducin-vermittelten Signalweg. Parallel zur Aktivierung der PLC β 2 durch G $\beta\gamma$ stimuliert Gustducin eine PDE, welche zyklische Nukleotide – cAMP oder cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) - abbaut. Als Folge des Abfalls zyklischer Nukleotid-Level vermutet man, dass cAMP- bzw. cGMP-abhängige Kanäle beeinflusst werden und ihre Leitfähigkeit supprimiert wird [168], wodurch es zur Depolarisation und Transmitterausschüttung kommt. Dieser zweite, wahrscheinlich parallel ablaufende Signalweg könnte ebenfalls von urethralen chemosensitiven Zellen genutzt werden. Neun (pelvine Urethra, Abb. 3.62) bis 47% (penile Urethra, Abb. 3.62) der anhand cholinergischer Marker und Anti-Gustducin-Antikörper identifizierten Zellen sind zugleich cholinerg und Gustducin-immunreaktiv, was darauf hindeutet, dass in der Urethra geschmacksrezeptive Zellen existieren, die Geschmacksliganden anhand einer Gustducin-vermittelten Transduktionskaskade detektieren und mit einer basolateralen Acetylcholinausschüttung reagieren könnten. Es wird vermutet, dass in den geschmacksrezeptiven Zellen der Geschmacksknospen die Signalwege über PLC β 2 und Gustducin synchron und voneinander unabhängig in ein und derselben Zelle ablaufen. Dies könnte auch für die urethrale chemosensitive Zelle gelten, da anhand von immunhistochemischen Doppelmarkierungen nachgewiesen wurde, dass eine Zelle sowohl mit Anti-PLC β 2- als auch Anti-Gustducin-Immunseren reagierte. Clapp et al. diskutierten zudem eine mögliche Schnittstelle zwischen beiden dargestellten Signalwegen, die chemosensitive Zellen zu potenzierten Antworten auf Geschmacksliganden befähigen würde: Über den durch Gustducin eingeleiteten Abfall intrazellulärer zyklischer Nukleotide würde die cAMP-abhängige Phosphorylierung des IP $_3$ RIII am ER inhibiert werden, wodurch die PLC β 2- und IP $_3$ -vermittelte Ca $^{2+}$ -Ausschüttung gebahnt werden könnte [26, 27]. Des Weiteren würde der Abfall des cAMP-Levels eine Inhibierung der cAMP-abhängigen PKA nach sich ziehen, so dass die durch Phosphorylierung bedingte Hemmung der PLC β 2 durch die PKA entfallen würde [108, 169]. Durch Versuche an Gustducin-KO-Mäusen wurde gezeigt, dass der Ausfall dieser G-Protein-Untereinheit die Wahrnehmung von Bitterstoffen in Verhaltenstests und Nervenantworten nach Stimulation nicht vollständig auslöscht, was als Hinweis darauf zu werten

ist, dass die Geschmackstransduktion in diesem Fall über die PLC β 2-IP $_3$ -Kaskade unabhängig von Gustducin vonstattengeht [211]. Zudem stellt die Tatsache, dass PLC β 2-KO-Mäuse die Fähigkeit bitter, süß und umami zu schmecken, verlieren, ein Indiz für die Dominanz des PLC β 2-Signalwegs dar. Dies könnte auch für die chemosensitive urethrale Zelle gelten, da im pelvinen urethralen Segment, im *Colliculus seminalis*, im Blasen Hals beider Geschlechter und im distalen urethralen Abschnitt des Weibchens cholinerge Zellen prozentual öfter PLC β 2 als Gustducin exprimierten (Abb. 3.62 und 3.63). In den genannten Organteilen scheinen andere G α -Untereinheiten als Gustducin eine Rolle bei der Ausübung der Funktion dieser Zellen zu spielen. Dahingegen waren cholinerge Zellen der proximalen Urethra des Weibchens und im urethralen Divertikel zu jeweils ca. 30% PLC β 2- bzw. Gustducin- immunreaktiv, was auf das Vorhandensein sowohl des PLC β 2-IP $_3$ - als auch des Gustducin-Signalwegs in einer urethralen Bürstenzelle hindeutet. Eine Besonderheit stellten die Verhältnisse im penilen Segment der männlichen Harnröhre dar: Hier exprimierten cholinerge Zellen häufiger Gustducin (Kokalisation zwischen ChAT^{BAC}-eGFP und Gustducin 47%, Abb. 3.62) als PLC β 2 (Kokalisation zwischen ChAT^{BAC}-eGFP und PLC β 2 in 27%, Abb. 3.62). Das G α -Gustducin könnte in diesen cholinergen Zellen mit einer anderen G $\beta\gamma$ -Untereinheit gekoppelt sein, welche im Folgenden zur Exzitation einer alternativen Untereinheit oder Familie der PLC führen würde [28]. Von den geschmacksrezeptiven Zellen der Zunge ist bekannt, dass Geschmacksliganden an GPCR, die *Taste Receptors* (TasR), binden und so die intrazelluläre Transduktionskaskade einleiten [1, 2, 9, 73, 218]. Dabei binden natürliche und künstliche süße Liganden an das Rezeptorheteromer T1R2/T1R3, Bitterstoffe an T2R und L-AS an das Heteromer T1R1/T1R3 [1, 73, 105, 134, 135].

Zusätzlich zur immunhistochemischen Charakterisierung der chemosensitiven Bürstenzelle in der Urethra wurden Experimente mittels RT-PCR durchgeführt, durch welche die Expression von TasR in urethralem Gewebe und speziell urethralen Bürstenzellen nachgewiesen werden konnte [35]. Primer gegen Tas1r1, Tas1r3, Tas2r108 und β 2-Mikroglobulin (housekeeping-gene als Positivkontrolle) erbrachten Produkte spezifischer Größe (Tas1r1: 192 bp, Tas1r3: 297 bp, Tas2r108: 158 bp, β -MG: 192 bp) [35, 96]. Unter Abwesenheit von der jeweiligen cDNA bzw. der RT wurden keine Produkte amplifiziert, was Verunreinigungen der Ansätze ausschließt. Mit dem Primer für Tas1r2 wurde aus urethralem Gewebe kein Produkt amplifiziert, somit war dieses Rezeptormonomer zur Detektion von süßen Geschmacksliganden in der Urethra nicht nachweisbar. Die Kombination aus Tas1r1 und Tas1r3 erlaubt jedoch die Geschmackstransduktion von L-AS, und das Vorhandensein von Tas2r108, welcher unter anderem den Bitterstoff Denatonium [96] erkennt, deutet auf eine Chemozeption von Bitterstoffen in der Urethra hin. An die Aktivierung der G α - und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten durch die GPCR schließen sich die oben

beschriebenen intrazellulären Signalwege an. Eine geringe, sich unterhalb der Nachweisgrenze bewegende Expression von Tas1r2 kann jedoch anhand der RT-PCR nicht ausgeschlossen werden, zudem wurde für dieses Experiment ein Lysat aus der gesamten Urethra verwendet und nur ein qualitativer Nachweis von TasR-mRNA erfolgte. Spezifischere Ergebnisse mit quantitativer Aussagekraft würden die Real-Time-PCR aus isolierten chemosensitiven urethralen Zellen erbringen. Ein Versuch der immunhistochemischen Darstellung der Tas1r3 mittels eines polyklonalen Antikörpers aus dem Kaninchen misslang, da der Antikörper in der getesteten Verdünnungsreihe generell unspezifisch band und selbst geschmacksrezeptive Zellen der *Papillae circumvallatae* lediglich schwach markierte.

4.3.2 Alternative G α -Untereinheiten in der gustatorischen Signaltransduktionskaskade

Cholinerge Zellen in der Urethra exprimierten G α -Gustducin zu 0 bis 47% (Abb. 3.62 und 3.63), woraus gefolgert werden kann, dass zusätzliche – alternative - G α -Untereinheiten in die Signaltransduktion involviert sein müssen. Mittels RT-PCR konnte aus Geschmacksknospen, deren geschmacksrezeptiven Zellen nur zu 20 bis 30% Gustducin-immunreaktiv waren [77, 101], mRNA u.a. folgender G α -Untereinheiten nachgewiesen werden: Transducin (beteiligt an den molekularen Prozessen des Sehvorgangs), G α 14, G α 15, G α i2 und G α s [57, 101, 124]. Transducin ist in geschmacksrezeptiven Zellen der *Papillae circumvallatae* der Ratte mittels In-situ-Hybridisierung und IHC nachweisbar [170]. Hoon et al. zeigten, dass Gustducin und Transducin in vitro funktionell gegeneinander austauschbar sind, in vivo jedoch ein Ausfall des Gustducins lediglich partiell durch Transducin kompensiert werden kann [67, 68, 74]. Als der G α i-Familie zugehörige G α -Untereinheiten senken G α -Gustducin und G α -Transducin über die Aktivierung der PDE die intrazelluläre Konzentration an zyklischen Nukleotiden, wodurch cAMP-gesteuerte Ca²⁺-Kanäle geöffnet werden und der Ca²⁺-Einstrom zur Depolarisation führt, was weitestgehend PLC-unabhängig verläuft [74, 94, 124, 143, 170, 194, 212]. G α 14 und G α 15, Mitglieder der G α q-Familie, aktivieren dagegen die PLC β 2 über Bindung am C-terminalen Drittel des Enzyms und werden in Geschmacksknospen der Zunge exprimiert [72, 100, 101, 138, 194, 197, 210, 212]. Das mittels quantitativer RT-PCR ermittelte Level an G α 14-mRNA in Geschmacksknospen der *Papillae vallatae* und *foliatae* wies ähnlich hohe Werte auf wie das mRNA-Level von PLC β 2, und G α 14 wird in Zellen exprimiert, die zusätzlich T1R2/T1R3-, PLC β 2- und TRPM5-immunreaktiv sind [197]. Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Kusakabe ergaben relevante Level an G α 15-mRNA in der RT-PCR und im Northern Blot [100]; Anschnitte der *Papillae circumvallatae* reagierten deutlich mit Anti-G α 15-Antiseren. In Zellkulturen transfizierte und konsekutiv aktive G α 15-

Proteine erhöhten intrazelluläre IP₃-Konzentrationen signifikant, was auf eine funktionelle Kopplung zwischen Gα15 und einer PLC-Isoform hinweist [100, 138]. Da Gα15 jedoch von Tizzano et al. in höherem Maße auch in nicht-geschmacksrezeptivem Gewebe der Maus gefunden werden konnte, rückte die Bedeutung dieser Gαq-Untereinheit wieder in den Hintergrund [197]. Kusakabe et al. isolierten zudem u.a. mRNA der Gα-Untereinheit Gai2 [101]. Gai2 wurde auf mRNA- und Proteinlevel in Geschmacksknospen nachgewiesen, wobei Gai2-immunreaktive Zellen mit 30% einen größeren Anteil als Gustducin-positive mit 20% ausmachten [101]. In allen Gustducin- bzw. Gai2- oder T2R-exprimierenden Zellen konnte zugleich PLCβ2-mRNA nachgewiesen werden und PLCβ2-mRNA-enthaltende Zellen koexprimierten Gustducin zu 50%. Weil zusätzlich eine Subpopulation PLCβ2-exprimierender Zellen ohne T2R-mRNA existiert und keine Koexpression von T2R mit Gustducin gefunden wurde, schlossen Asano et al., dass in geschmacksrezeptiven Zellen T2R-Bitterrezeptoren primär an Gai2 gekoppelt sein könnten [4, 101]. Vor dem Hintergrund der bekannten Expression von T2R durch urethrale chemosensitive Bürstenzellen und einem Anteil von 53-100% Gustducin-negativer Bürstenzellen in der Urethra wäre die Erforschung einer Koexpression von Gai2 von besonderem Interesse. In Gai2-exprimierenden Zellen wurde mittels Southern-Blot-Analysen zusätzlich Gustducin- und Gas-mRNA nachgewiesen [101]. Gas aktiviert die Adenylatzyklase, was über die Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel, Öffnung cAMP-gesteuerter Kanäle, Aktivierung der PKA mit Phosphorylierung und verminderter Öffnungsrate von K⁺-Kanälen zur Depolarisation der Zelle [7, 10, 127, 135, 182, 192, 200] führt. Die aktivierte PKA kann in vitro speziell die PLC-Isoform β2 an der Interaktionsdomäne mit Gβγ phosphorylieren, und PLCβ2 dadurch inaktivieren. Eine mittels Gai verursachte Inaktivierung der Adenylatzyklase würde gleichzeitig zu weniger aktiven PKA führen, so dass folglich PLCβ2 für Gβγ stimulierbar bleibe [108]. Vereinbar mit dieser These sind die Ergebnisse von elektrophysiologischen Untersuchungen zur Kinetik der Bildung von *second messengern* in den *Papillae circumvallatae* und *foliatae* der Maus, die zeigten, dass durch Denatoniumstimulation ein intrazellulärer IP₃-Anstieg ausgelöst wurde, welcher durch Blockade der PLCβ2 mit Anti-PLCβ2-Antikörpern ausfiel. In denselben Zellen bewirkte Denatonium einen Abfall des cAMP-Spiegels; durch Zugabe eines Anti-Gustducin-Antikörpers änderte er sich nicht. Folglich laufen beide Signalwege zwar per se unabhängig voneinander ab, arbeiten aber synergistisch [213]. Der PLCβ2-Aktivierung ist die Besetzung von IP₃RIII-Rezeptoren an internen Ca²⁺-Speichern durch IP₃ nachgeschaltet [27]. Diese Rezeptoren unterliegen einer cAMP-abhängigen Regulierung, d.h. dass der Ca²⁺-Strom durch IP₃RIII-Rezeptoren durch Phosphorylierung unterbrochen werden kann, was an pankreatischen Zellen untersucht wurde [61]. Auf diese

Weise könnte Gai durch Hemmung der PKA und dadurch fehlende Phosphorylierung an IP₃RIII die PLCβ₂-IP₃-vermittelte Ca²⁺-Erhöhung bahnen.

4.3.3 Alternative PLC-Isoformen in der gustatorischen Signaltransduktionskaskade

Weitläufig wird die Meinung geteilt, dass die Isoform β₂ der PLC eine Hauptrolle in der Geschmackstransduktionskaskade spielt [27, 168, 169, 213, 218]; PLCβ₂-KO-Mäuse verlieren die Fähigkeit, bitter, süß und umami zu schmecken bei erhaltener Wahrnehmung von salzigen und sauren Geschmacksstoffen [218]. Wurde diesen PLCβ₂-KO-Mäusen in verhaltensbiologischen Tests jedoch Wasser mit hohen (1000 mM) Konzentrationen an Sucrose angeboten, zogen sie das süße dem ungesüßten Wasser vor [218]. Die erhaltene Antwort auf hohe Konzentrationen von natürlichen Süßstoffen kann einerseits auf den Gas-cAMP-Signalweg zurückgeführt werden, der in diesem Fall erst bei höheren Stimulanskonzentrationen eine Depolarisation der süß-perzeptiven Geschmackszellen erreichte, andererseits aber die Anwesenheit anderer PLC-Isoformen andeuten.

Unter den urethralen cholinergen Zellen ist ein Anteil von 27 bis 59 % PLCβ₂-immunreaktiv (Abb. 3.62 und 3.63); in den restlichen 41 bis 73% konnte PLCβ₂ mit immunhistochemischen Methoden nicht nachgewiesen werden. Das Enzym PLCβ₂ zeichnet sich dadurch aus, dass es über eine Domäne am C-terminalen Ende durch Gβγ stimulierbar ist [12, 28, 90, 108, 143]. Darüber hinaus gibt es weitere PLCβ-Isoformen, die auf dieselbe Weise aktivierbar sind und als Bindeglied zwischen aktiviertem G-Protein und Erhöhung intrazellulärer Ca²⁺-Konzentrationen fungieren können. Beispielsweise gelang aus dem Hirn der Ratte die Isolierung einer PLCβ₃-Isoform, die außer im Gehirn in großen Mengen auch in Speicheldrüsen, Leber und Lunge der Ratte vorkam [86]. Eine Stimulierbarkeit der PLCβ₃ durch die Gβγ-Untereinheiten des Transducins konnte von Carozzi et al. bewiesen werden [16]. Park et al. zeigten weiterhin, dass diese Isoform der PLC stärker als PLCβ₂ durch Gβγ stimulierbar war, gemessen an der Zunahme des intrazellulären IP₃-Spiegels. Eine weitere Isoform des Enzyms, PLCβ₁, die ebenfalls im Hirn der Ratte nachweisbar war, induzierte auch mit einem IP₃-Konzentrationsanstieg, wenngleich schwächer als PLCβ₃ und PLCβ₂ [143]. PLCβ₁ spricht hauptsächlich auf Stimulation durch Gαq-Proteine an, was in geringerem Maße auch auf PLCβ₃ zutrifft, jedoch eher nicht auf PLCβ₂ [143]. Vor dem Hintergrund von 53 bis 100% Gustducin-negativer urethraler Bürstenzellen und dem bisher fraglichen, doch denkbaren Vorkommen von G-Proteinen der Gαq-Familie in diesen chemosensitiven Zellen, stellen PLCβ₁

und $\beta 3$ wichtige Kandidaten für den Anteil PLC $\beta 2$ -negativer Bürstenzellen dar. Die Expression beider genannter β -Isoformen könnte den Prozentsatz von 41 bis 73% PLC $\beta 2$ -negativer Zellen erklären.

4.3.4 Bedeutung von TRPM5 in der gustatorischen Signaltransduktionskade

Die vorliegenden immunhistochemischen Untersuchungen an cholinergen Zellen in der Urethra zeigen, dass ChAT^{BAC}-eGFP-positive Zellen zu 70 bis 100% den Ionenkanal TRPM5 exprimieren (Abb. 3.62 und 3.63). Aus Doppelinkubationen geht hervor, dass alle TRPM5-immunreaktiven Zellen zusätzlich mit Anti-PLC $\beta 2$ -Immunsereen reagieren. Der unselektive monovalente Kationenkanal TRPM5 gehört der Familie der TRP-Kanäle an und konnte spezifisch in geschmacksrezeptiven Zellen der Zunge nachgewiesen werden, wo er als gemeinsames Glied der Geschmackstransduktionskaskaden die Süß-, Bitter- und Umamidetektion vermittelt [25, 27, 33, 152, 157, 218]. Zwei Studien untersuchten die Auswirkungen eines Knockouts dieses Ionenkanals an Mäusen. Zhang et al. zeigten, dass die betroffenen Tiere verhaltensbiologisch und in Messungen von Nervenantworten in *Nervus glossopharyngeus* und *Chorda tympani* nach Stimulation mit mehreren Süß-, Umami- und Bitterstoffen keine Reaktion mehr auf die getesteten Geschmacksstoffe aufwiesen und folgerten, dass TRPM5 essenziell an der Detektion von süßen, bitteren und umami-Geschmacksliganden beteiligt ist [218]. Damak et al. hingegen, die TRPM5-KO-Mäuse ähnlichen Tests unterzogen, fanden heraus, dass die jeweiligen Reaktionen der Tiere auf Geschmacksstoffe zwar im Vergleich zu Wildtypen beeinträchtigt waren, jedoch nicht gänzlich fehlten [33]. Als Ursache dieser differierenden Ergebnisse beider Arbeitsgruppen wurden die unterschiedlichen Methoden des TRPM5-Genknockouts diskutiert, insofern als dass Damak et al. nicht die Erzeugung eines komplett inaktiven TRPM5 gelungen sein könnte. Nichtsdestotrotz weisen beide Studien auf die exklusive Rolle des TRPM5 in der Geschmackstransduktionskaskade hin. Kaske et al. und Krasteva et al., denen der Nachweis von TRPM5 in Bürstenzellen der Trachea, Nase, Bronchien, Vomeronasalorgan und Gastrointestinaltrakt gelang, sprachen diesen Zellen eine Bedeutung in der Chemozeption der Peripherie zu [88, 95]. Die cholinerge urethrale TRPM5-exprimierende Zelle erweitert somit die Liste potenziell chemosensitiver Zellen im Urogenitaltrakt. Diese These wird zudem gestützt durch die Tatsache, dass alle TRPM5-positiven Zellen in immunhistochemischen Doppelmarkierungen zusätzlich PLC $\beta 2$ exprimierten, folglich über alle in den IP₃-Signalweg eingebundenen Komponenten zur Geschmackstransduktion von bitter, süß und umami verfügen. Eine Koexpression von PLC $\beta 2$ und TRPM5 ist auch aus den *Papillae circumvallatae* und *foliatae* und aus chemosensitiven Zellen der unteren Atemwege bekannt [33, 152, 196]. In

Analogie zu den Ergebnissen aus der Urethra war TRPM5 in Zellen der Atemwege nicht mit CgA und PGP kolokalisiert; TRPM5-exprimierende Zellen zeigten Bürstenzellmerkmale, da sie zugleich Villin- und CK18-immunreaktiv waren [88]. Dasselbe könnte auch für urethrale chemosensitive Zellen gelten, da in der Doppelinkubation alle PLC β 2-positiven Zellen auch TRPM5-positiv waren sowie alle PLC β 2-immunreaktiven Zellen auch Villin-immunreaktiv. Um die Ergebnisse aus der Urethra zu komplettieren und mit denen aus Geschmacksknospen vergleichen zu können, stünde jedoch noch der Nachweis von G β 3 γ 13 und IP $_3$ R111, die in geschmacksrezeptiven Zellen mit PLC β 2 und TRPM5 koexprimiert werden, mittels RT-PCR und IHC aus [27, 128, 152]. Damak et al. postulierten aufgrund ihrer Ergebnisse, dass es TRPM5-abhängige und –unabhängige Signalkaskaden in der Zunge geben könnte, weil TRPM5-KO-Mäuse nur eine beeinträchtigte, aber nicht ausgefallene Bitter-, Süß- und Umamigeschmacksdetektion hatten [33]. Hinweise darauf finden sich auch in der Urethra, weil bis zu 30% der cholinergen Zellen im *Collliculus seminalis*-Bereich nicht TRPM5 exprimieren, dabei alle TRPM5-immunreaktiven Zellen auch PLC β 2-immunreaktiv waren, aber PLC β 2-positive Zellen existieren, die nicht TRPM5-positiv sind. Fraglich bleibt, ob andere Vertreter der TRPM- oder TRPC-Subfamilien in urethralen Zellen an der Chemosensitivität beteiligt sind, v.a. vor dem Hintergrund, dass TRP-Untereinheiten sich in anderen Geweben zu Heteromeren zusammenlagern [25, 83]. In Geschmacksknospen wurde jedenfalls mittels RT-PCR die Expression von TRPM1 und M2 sowie TRPC1-6 nicht nachgewiesen [152].

4.4 Mechanismen der Signalübermittlung aktivierter urethraler chemosensitiver Bürstenzellen

4.4.1 Erregung peptiderger CGRP/PGP-positiver und PGP-positiver Nervenfasern und die Wirkung des CGRP im Harntrakt

Die urethrale Mukosa männlicher und weiblicher Mäuse war reich an intraepithelialen PGP-immunreaktiven Nervenfasern. Die Nervenfasern verliefen innerhalb des Epithels sowohl parallel zur Basalmembran als auch senkrecht zur Oberfläche der Schleimhaut ansteigend. Subpopulationen PGP-immunreaktiver Nervenfasern zeichneten sich durch zusätzliche Immunreaktivität mit Anti-CGRP-Immunsereen aus. Subepithelial und innerhalb von Muskelbündeln begleiteten die Nervenfasern in der Regel Gefäße; viele der die Gefäße umgebenden Nervenfasern waren cholinerg. Das Vorkommen zahlreicher epithelialer, subepithelialer und perivaskulärer Nervenfasern im Urogenitaltrakt ist aus der Literatur bekannt: In den Urethrae von Ratten, Meerschweinchens, Schweinen und

Hunden wurden neben PGP-, ChAT- und CGRP-positiven Nervenfasern auch adrenerge, NO-Synthase-positive und weitere peptiderge (VIP, NPY, SP) Nervenfasern nachgewiesen [3, 60, 85, 119, 153, 160, 183]. In diesen Studien wurde hauptsächlich von der perivaskulären und Muskelbündel-assoziierten Lokalisation dieser Nervenfasern gesprochen; Persson et al., die CGRP- und PGP-immunreaktive Nervenfasern im unteren Urogenitaltrakt von Schweinen untersuchten, betonten, dass ausschließlich PGP-positive Nervenfasern die Basalmembran durchbrechen würden, um einen verzweigten intraepithelialen Verlauf zu nehmen [153]. Dies steht im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen an der Maus, wo PGP- und/oder CGRP-immunreaktive Nervenfasern regelmäßig innerhalb der Mukosa beobachtet wurden. Die reiche Innervation der urethralen Mukosa ähnelt demnach eher den Verhältnissen in den Atemwegen. McDonald et al. berichteten von einer dichten nervalen Versorgung insbesondere der trachealen Epithelbasis und bezifferten sie mit 7,9 „Nervenprofilen pro 1000 μm^2 “, übertroffen nur durch die größere Anzahl an Nerven periarteriolar mit 15 „Nervenprofilen pro 1000 μm^2 “ [123]. Das den *Papillae circumvallatae* angrenzenden Zungenepithel ist ebenfalls von zahlreichen peptidergen (CGRP- oder SP-enthaltenden oder ausschließlich CGRP- oder SP-enthaltenden) Nervenfasern durchsetzt [47]. Auf urethralen Anschnitten bot sich häufig das Bild einer engen Nachbarschaft zwischen cholinergen Bürstenzellen und intraepithelialen Nervenfasern. Dabei verlief die Nervenfasern nahe an der cholinergen Zelle oder umwand sie korbartig. An Tracheen konnte der vermutlich enge Kontakt zwischen cholinergen Bürstenzellen und peptidergen, CGRP-positiven sowie weiteren CGRP-negativen, PGP-positiven intraepithelialen Nervenfasern genauer ermittelt werden: In Whole-Mount-Präparaten, die mit Anti-PGP-, Anti-eGFP- und Anti-CGRP-Immunsereen inkubiert wurden, zeigten sich in der konfokalen Auswertung in ca. 6% Kontakte zwischen CGRP-immunreaktiven Nervenfasern und Bürstenzellen sowie in ca. 22% Kontakte zwischen CGRP-negativen PGP-positiven Nervenfasern und Villin-immunreaktiven Zellen [95]. Weiterhin gelang an transgenen Mäusen, die eGFP unter Kontrolle des Promotors des nAChR-Clusters $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ exprimierten, der Nachweis, dass eine Subpopulation dieser CGRP-positiven, sensorisch vagalen Nervenfasern nikotinische Rezeptoren aufwies, welche durch Stimulation mit Nikotin eine zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung vermittelten [95]. Während die Perikarya sensorischer Neurone der Trachea der Ratte ihren Sitz im *Ganglion jugulare* und rostralen Bereich des *Ganglion nodosum* haben [95, 123], nehmen urethrale peptiderge Nervenfasern ihren Ursprung in den Spinalganglien der Rückenmarkssegmente L6 bis S1, was mittels retrogradem Tracing mit True Blue und IHC mit Anti-CGRP-Antisereen an Urethrae von Ratte und Meerschweinchen nachgewiesen werden konnte [183]. Bei diesen peptidergen Nervenfasern

handelte es sich um CGRP-exprimierende Fasern, die eine Capsaicinsensibilität aufwiesen, da durch intraperitoneale Gabe von Capsaicin an wenige Tage alte Ratten sowohl die immunhistochemisch ermittelte Anzahl CGRP-immunreaktiver Nervenfasern gemindert als auch die absolute Menge an extrahierbarer CGRP-Gewebskonzentration reduziert wurde. Die Ergebnisse einer Capsaicinsensibilität CGRP-immunreaktiver Nervenfasern weisen zusammen mit denen der retrograden Labelings auf die sensorische Funktion dieser Nervenfasern hin. Als potenzielle Stimuli der CGRP-Freisetzung aus capsaicinsensitiven Nervenfasern der isolierten Trachea der Ratte erwiesen sich Nikotin, Acetylcholin und der nAChR-Agonist Cytisin. Mit steigenden Dosen dieser Transmitter erhöhte sich die mittels Radioimmunoassay gemessene CGRP-Ausschüttung [87]. Im Einklang damit reduzierte sich die CGRP-Ausschüttung aus isolierten Tracheen durch die Zugabe der Acetylcholin-Rezeptorantagonisten Hexamethonium (Antagonist am nAChR) und Atropin (Antagonist am muskarinischen Rezeptor) um 85 bzw. nahezu 100% [87]. Zusammenfassend resultiert daraus, dass cholinerge chemosensitive Zellen über die Ausschüttung von Acetylcholin CGRP-positive sensorische, nikotinische Rezeptoren exprimierende Nervenfasern erregen und somit eine CGRP-Ausschüttung induzieren könnten. Dass dies nicht nur für cholinerge Bürstenzellen in der trachealen Mukosa gilt, sondern auch für cholinerge urethrale Bürstenzellen postuliert werden kann, zeigen Whole-Mount-Untersuchungen an Tieren, die eGFP unter der Kontrolle des Promotors des o.g. nAChR-Clusters $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ exprimieren und deren Urethrae mit Anti-Villin-Antisera inkubiert wurden: Auch in der urethralen Mukosa existieren Villin-immunreaktive Bürstenzellen, die von nAChR $\alpha 3$ -exprimierenden, sensorischen Nervenfasern kontaktiert werden [35].

Das in der Urethra freigesetzte CGRP erfüllt mehrere Funktionen. Intraarteriell zugeführtes CGRP führte zu einem Abfall des maximalen Drucks in Urethrae von Ratten, in vivo gemessen über einen intraurethralen Katheter. Daraus und aus der Tatsache, dass der kompetitive Acetylcholinrezeptor-Antagonist Pancuronium den CGRP-vermittelten Druckabfall nicht verändert, folgerten die Autoren, dass das CGRP hauptsächlich eine relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur der Harnröhre ausübe [160]. Auf den relaxierenden Effekt des Neuropeptids wiesen auch Studien von Maggi in vivo und vitro hin [119]. Interessante Ergebnisse ergab die Administration von Papaverin allein und von Papaverin und CGRP zusammen. Während Papaverin, ein cAMP-PDE-Hemmer, den intraurethralen Druck erwartungsgemäß senkte, da es über einen Anstieg des cAMP die glatte Muskulatur relaxierte, führte die intraarterielle Verabreichung von CGRP nach Papaveringabe zu einem wesentlich geringeren Druckabfall als durch CGRP alleine [160], was zunächst verwundert, wie für CGRP ebenfalls eine Wirkung über Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel angenommen wird, aber über Desensibilisierung der

CGRP-Rezeptors durch Papaverin erklärt werden könnte [40]. Bereits im femtomolaren Bereich hat das Neuropeptid CGRP eine starke vasodilatatorische Wirkung. In Kaninchenhaut injiziertes CGRP erhöhte dabei den lokalen Blutfluss in ähnlich potenter Weise wie Prostaglandin (Prostaglandin 2) und bewirkte bei menschlichen Probanden eine ausgeprägte lokale Hautrötung, die bis zu 12 Stunden anhielt. Dabei scheint die vasodilatatorische Wirkung des CGRP sich vor allem an Arteriolen abzuspielen [14]. Vor dem Hintergrund der bereits beschriebenen und in dieser Studie bestätigten reichen Innervation urethraler Gefäße ist in der Urethra nach Stimulation CGRP-exprimierender perivaskulärer Nervenfasern eine Vasodilatation mit konsekutiver Hyperämie des gesamten Organs oder von Teilbereichen denkbar, was v.a. im Entzündungsfall zum Antransport von Entzündungszellen und proinflammatorischen Substanzen wichtig wäre. Tatsächlich wurde in Tracheen von Ratten gezeigt, dass es im Rahmen der neurogenen Entzündung, an deren Auslösung zum größten Teil sensorische peptiderge Nervenfasern beteiligt sind, zu erhöhter Gefäßpermeabilität mit Plasmaextravasation durch Bildung von Endothellücken in Venolen und Leukozyten-, Thrombozyten-, sowie Erythrozytenadhäsion kommt [122, 123].

4.4.2 Funktionelle Kopplung mit neuroendokrinen Zellen in Analogie zu Typ-II- und -III-Zellen in der Geschmacksknospe

Wie bereits beschrieben, waren in konfokal betrachteten Whole-Mount-Präparaten der Trachea Kontakte zwischen cholinergen Bürstenzellen bzw. neuroendokrinen Zellen und Nervenfasern nur zu einem geringen Prozentsatz sichtbar [95]; obwohl die vorliegenden immunhistochemischen Untersuchungen urethraler Querschnitte mit Anti-PGP-Antikörpern eine äußerst reiche Innervation der urethralen Mukosa zeigten, konnten in vielen Fällen keine räumliche Annäherung zwischen der cholinergen Bürstenzelle und einer Nervenfaser nachvollzogen werden. Es stellt sich somit die Frage, auf welche Weise die als chemosensitiv charakterisierte cholinerge Bürstenzelle ihre Aktivierung übermitteln soll, wenn sie über keinen direkten Nervenfaserkontakt verfügt. Cholinerge Bürstenzellen könnten Nachbarzellen mit Nervenfaserschluss als Signalübermittler nutzen. Das durch die chemosensitive Zelle ausgeschüttete Acetylcholin würde demnach benachbarte Epithelzellen mit Acetylcholinrezeptoren erregen und zur Transmitterausschüttung bewegen, wodurch wiederum nah gelegene Nervenfasern erregt werden würden. Ein solches Konzept wird für Rezeptorzellen (Typ II) und präsynaptische Zellen (Typ III) der *Papillae circumvallatae* und *foliatae* postuliert: Rezeptorzellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie über alle zur Geschmackstransduktion benötigten Proteine - T1R3, T2R, Gustducin, PLC β 2, IP $_3$ RIII, TRPM5 - verfügen, jedoch keine synaptischen Kontakte mit

gustatorischen Nerven ausbilden. Die diesen Zellen fehlenden Bausteine, z.B. SNAP25 (SNARE-Protein, assoziiert mit konventionellen Synapsen), $\alpha 1C$ (ein spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanal, der essenziell für die Transmitterexozytose ist) oder NCAM (Oberflächenglykoprotein zur Vesikeladhäsion), sind jedoch in den präsynaptischen Zellen der Geschmacksknospen nachweisbar [26, 36]. Ewald et al. wiesen eine Verbindung beider Zelltypen über Synapsen nach, indem sie über jeweils eine Mikroelektrode in Rezeptorzellen und präsynaptische Zellen mit paralleler Potenzialaufzeichnung ein postsynaptisches Potenzial in präsynaptischen Zellen maßen, das mit 100 ms Latenz nach Stimulation der Rezeptorzelle auftrat. Ewald et al. machten zusätzlich die Beobachtung einer „bidirektionalen synaptischen Transmission“ zwischen den genannten Zelltypen, weil die wiederholte Stimulation der präsynaptischen Zellen Einfluss auf Rezeptorzellen nahm: Es kam zur Membranhyperpolarisation und –resistenzerhöhung sowie zu größeren stimulusassoziierten Antwortamplituden, was die Autoren als „modulatorischen Effekt“ der präsynaptischen auf Rezeptorzellen bezeichneten [43]. Aktuell geht man bezüglich der Transduktionsmechanismen in Geschmacksknospen der Zunge von folgendem Modell aus: Die „eigentlichen“ geschmacksrezeptiven Zellen schütten nach stattgehabter Erregung durch einen bitteren, süßen oder umami Geschmacksstoff und Transduktion über GPCR, G-Proteine, PLC β 2, IP $_3$ R111 und TRPM5, den Transmitter Adenosintriphosphat (ATP) aus [48, 76, 166]. ATP wird dabei nicht mittels Vesikelexozytose im klassischen Sinn freigesetzt, sondern über Pannexin-Kanäle (Px1), Connexin-Hemikanäle (Cx 30, 43) oder CALHM1-Kanäle (calcium homeostasis modulator 1) [76, 166, 193]. In der Folge erregt ATP Purinozeptoren des Typs P2X2/P2X3 auf sensorischen, die Geschmacksknospen umgebenden und penetrierenden Nervenfasern [13, 21, 41, 48, 104]. Peptidhormone könnten dabei die Wirkung des ATP auf seinen Rezeptor modulieren, da beispielsweise ein Subtyp süß schmeckender Geschmackszellen der Maus nach Stimulation mit natürlichen sowie künstlichen Süßstoffen GLP-1 (glucagon-like peptide 1) ausschüttet. Über den GLP-1-Rezeptor stimuliert GLP-1 eine Untergruppe an Nervenfasern der *Chorda tympani*, welche zugleich durch süße Geschmacksliganden erregbar ist [188]. Über Synapsen oder auf parakrinem Wege ist auch eine Erregung präsynaptischer Zellen über ATP möglich, welche wiederum 5-HT als Transmitter ausschütten [43, 76, 78, 91, 92]. Diese 5-HT-Ausschüttung erfolgt ausschließlich durch präsynaptische Zellen innerhalb der Knospe und ließ sich durch Inkubation präsynaptischer Zellen mit Purinozeptorantagonisten, ATPasen, Px1-Blocker und Verschluss der Hemikanäle durch Zytosolansäuerung komplett und reversibel inhibieren [76]. Dies und die Tatsache, dass 5-HT dieselben von Ewald et al. beschriebenen modulatorischen Effekte auf Rezeptorzellen hat, wie eine wiederholte Stimulation der präsynaptischen Zellen, deutet auf eine

funktionelle Kopplung beider Zelltypen hin; Ewald et al. postulierten sogar einen positiven Feedbackmechanismus zwischen präsynaptischen und Rezeptorzellen, der über bidirektionale Synapsen ablaufen soll. Dem mittels IHC in Knospen von Mäusen, Ratten, Kaninchen und Amphibien nachgewiesenem 5-HT wird demnach v.a. eine neuromodulatorische Wirkung auf die Exzitabilität der eigentlich geschmacksrezeptiven Zellen zugeschrieben [43, 78, 92]. Ein möglicher Wirkmechanismus wäre die Blockade von Na⁺-Strömen durch 5-HT in Zellen mit 5-HT-Rezeptoren, welche nach Kaya et al. im Sinne einer lateralen Inhibition die Transduktion einer gegensätzlichen Geschmacksmodalität blockiert und somit das Output der geschmacksrezeptiven Zelle optimiert. Unterstützt wird diese These u.a. dadurch, dass es Kaya et al. mittels Doppelinkubationen mit Anti-5-HT-Antikörpern und Anti-5-HT_{1A}-Rezeptor-Antikörpern gelang nachzuweisen, dass 5-HT und sein Rezeptor 1A nicht in derselben Geschmackszelle vorkommen [91]. Vor diesem Hintergrund ist denkbar, dass in der Urethra die Signaltransduktion von der chemosensitiven Zelle auf sensorische Nervenfasern auch über neuroendokrine Zellen vermittelt werden könnte, v.a. da häufig enge räumliche Beziehungen zwischen den beiden Zelltypen gesehen wurden. Auch eine entgegengesetzte Signalweitergabe – von der neuroendokrinen zur chemosensitiven Zelle - kann nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus können Acetylcholin und 5-HT neben ihrer Funktion als Transmitter zur Nervenfasernerregung auch parakrine Funktion wahrnehmen. 5-HT moduliert beispielsweise entzündliche Entwicklungen in der Peripherie [217]. In den Atemwegen ist Acetylcholin an pro- sowie antiinflammatorischen Prozessen beteiligt, steigert die Sekretausschüttung aus Drüsen und moduliert den Tonus glatter Muskulatur [98, 158].

4.5 Funktionen der cholinergen chemosensitiven Bürstenzelle im Urogenitaltrakt

Anhand der vorliegenden Arbeit und weiterführenden Versuchen durch Deckmann et al. konnte eine urethrale Epithelzelle charakterisiert werden, die über Mikrovilli Kontakt mit dem Organlumen aufnehmen kann und über ihre Ausstattung mit GPCR der Familie T2R und T1R (T1R1, T1R3) darin befindliche Bitterstoffe und AS detektieren kann. Die erfolgte Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor transduziert die Zelle über aus geschmacksrezeptiven Zellen der Zunge bekannte Signalkaskade - Gustducin, PLC β 2 und TRPM5. Die Verwendung ChAT^{BAC}-eGFP-positiver Mäuse für immunhistochemische Untersuchungen zeigte, dass jeweils Untergruppen Gustducin-, PLC β 2- und TRPM5-immunreaktiver chemosensitiver Zellen ChAT koexprimierten. Acetylcholin dient einer Subpopulation urethraler Epithelzellen somit potenziell als Transmitter zur Erregung cholinzeptiver Nervenfasern [35]. Im Folgenden soll diskutiert werden, in welcher Situation

die Fähigkeit des „Schmeckens“ in der Urethra sinnvoll ist bzw. welche systemischen und lokalen Funktionen die cholinergen chemosensitiven Zellen wahrnehmen können.

4.5.1 Systemische Wächterfunktion: Detektion schädigender Mikroorganismen im urethralen Lumen und potentielle Einleitung des urethrovesikalen Reflexes als Schutzmechanismus gegen die bakterielle Besiedlung des Harntrakts

Harnwegsinfekte zählen zu den häufigsten bakteriellen Entzündungskrankheiten des Menschen. Auslöser sind u.a. uropathogene *E. coli*, Enterokokken oder Pseudomonaden [176, 204]. Während der Besiedlung des Harntrakts setzen Bakterien bestimmte Stoffe sog. acetylierte Homoserinlactone – AHL - frei, die ihnen eine Kommunikation untereinander ermöglichen. Dies wird als „Quorum-sensing“ bezeichnet und bewirkt, dass in Bakterien die Transkription bestimmter Gene in Abhängigkeit der Populationsdichte gesteuert wird [34, 102, 147, 149, 181]. Quorum sensing spielt z.B. eine Rolle für die Virulenz eines Bakterienstamms [191] und die Differenzierung bzw. Reifung des durch Bakterien produzierten Biofilms [34]. Biofilme AHL-defizienter Bakterienstämme erreichten nur 20% der Dicke von Wildtypbiofilmen und zeigten eine gestörte bakterielle Wachstumsorganisation innerhalb des Films. Dicke sowie Mikroarchitektur konnten durch Zugabe des fehlenden AHLs zum Mutantenstamm wieder normalisiert werden [34]. Im Harntrakt wirkt sich die Verfügbarkeit von Stickstoff und Eisen limitierend auf das Bakterienwachstum aus; dem begegnen die Mikroorganismen, indem sie z.B. Gene zur Eisenaufnahme und Eisenassimilation während der Urogenitaltraktbesiedlung hochregulieren [5, 178]. Zusätzlich verfügen einige Bakterienstämme über Toxine wie das α -Hämolsin, mit deren Hilfe eine Proteolyse der Wirtszelle möglich ist [37, 204]. Als Resultat der bakteriellen Kolonisation fallen AHL sowie AS an.

Dass AHL als Stimulus auf chemosensitive Zellen wirken, zeigten Tizzano et al. an Gustducin- und TRPM5-positiven nasalen Zellen der Maus [198]. Dabei reagierten diese Zellen sowohl auf Zugabe von Denatonium als auch AHL mit intrazellulären, PLC β 2-vermittelten Ca²⁺-Erhöhungen. Die Stimulation menschlicher sinusoidaler Zellen in Kultur mit Phenylthiocarbamid (PTC), einem Bitterstoff, und AHL führte ebenfalls zu einer Ca²⁺-Mobilisierung und war abhängig von einem GPCR der Familie der Bitterstoffrezeptoren, T2R38: Zellen von Patienten mit homozygot intaktem T2R38 wiesen stärkere Ca²⁺-Antworten auf AHL-Stimulation auf als Zellen von Patienten mit T2R38-Mutation, so dass Lee et al. folgerten, dass speziell der Rezeptor T2R38 für die Detektion von durch gramnegative Bakterien sezernierten AHL essenziell sei [102]. Urethrale chemosensitive Zellen exprimieren T2R; ob sie auch den Subtyp T2R38 exprimieren, wurde bisher noch nicht untersucht. Die Detektion von AHL muss in der Urethra jedoch nicht

zwingend durch denselben Subtyp vermittelt werden, der in den oberen Atemwegen involviert zu sein scheint. Werden chemosensitive Zellen der Nase durch AHL erregt, kommt es über eine trigeminale Reflexantwort zu einer Verlangsamung der Atemfrequenz der Maus [198], was als Schutzmechanismus vor weiterer Bakterieninokulation über die Atemluft verstanden wird. Zu den Abwehrmechanismen der Urethra zählt neben der Organlänge per se und variierender Urinosmolarität und Urinelektrolytzusammensetzung v.a. der Miktionsreflex [176], der zur Elimination urogenitaler Mikroorganismen über den Harn beiträgt. Für eine effiziente Blasenentleerung ohne Verbleib eines Restharnvolumens ist ein koordiniertes Zusammenspiel zwischen Blase und Urethra vonnöten. In der Literatur werden zwei an der Miktion beteiligte Reflexe beschrieben. Initiiert wird die Miktion über den sensorischen Input von Dehnungsrezeptoren in der Blasenwand; ein sog. urethrovesikaler Reflex ist für die Fortsetzung des Harnflusses bis zur vollständigen Blasenentleerung verantwortlich [173]. Bestimmte dehnungs- und fluss-sensitive Rezeptoren in der urethralen Wand werden dabei durch den fließenden Harn stimuliert und erregen im *Nervus pudendus* verlaufende afferente Nervenfasern. Im Rückenmark (beim Menschen auf Höhe von S2 bis S4) wird das Signal auf autonome Efferenzen umgeschaltet, die die Harnblase über die *Nervi pelvici* erreichen und zu höheren Kontraktionsamplituden und längerer Kontraktionsdauer des *Musculus detrusor vesicae* führen sowie das Aktivitätsmuster des äußeren urethralen Sphinkter beeinflussen, um eine effektive Blasenentleerung zu ermöglichen. Die Bedeutung des sensorischen urethralen Inputs für die Detrusorfunktion wird deutlich, wenn der *Nervus pudendus* uni- oder bilateral durchtrennt wird oder die urethralen dehnungs- und flowregistrierenden Rezeptoren über eine topische Anästhetikainstillation ruhiggestellt werden: Die Kontraktionsamplituden und –dauer des Detrusors nehmen ab bzw. werden kürzer, das Kontraktionsareal nimmt ab, der äußere urethrale Sphinkter verfällt in eine tonische Aktivität und es stellt sich eine Dyssynergie zwischen Blase und Sphinkter ein [63, 121, 150, 151, 165, 173, 174, 177]. Der urethrovesikale Reflex impliziert somit, dass die Reizung sensorischer Nervenfasern in der Urethra Auswirkungen auf die Detrusoraktivität hat und die Miktion auslösen kann. D.h., dass auch die Erregung sensorischer urethraler Nervenfasern durch Acetylcholin aus den chemosensitiven Bürstenzellen, die Bitterstoffe und/oder AS im urethralen Lumen detektiert haben, eine Miktion provozieren kann. Die vorliegenden histologischen Untersuchungen initiierten zystometrische Versuche an Ratten, die tatsächlich zeigten, dass die Denatoniuminstillation über einen Katheter in die Urethra die Detrusoraktivität erhöhte [35]. Den cholinergen chemosensitiven urethralen Bürstenzellen kommt somit wahrscheinlich eine Funktion in der Einleitung von Schutzmechanismen gegen bakterielle Besiedlung des Harntrakts zu. Um diese Aufgabe auszuführen, sind murine chemosensitive Bürstenzellen an strategisch wichtigen

Stellen innerhalb der Urethra positioniert. Pro Anschnitt von Harnröhren weiblicher Tiere fanden sich die meisten cholinergen Zellen in der distalen Hälfte des Organs, der potenziellen Eintrittspforte von Bakterien in den Harntrakt. Da die Urethra von Weibchen bzw. Frauen generell kürzer ist als die von männlichen Tieren bzw. Männern, ist eine zeitlich sowie räumlich frühe Detektion – also schon im distalen urethralen Abschnitt - besonders wichtig, um einer Zystitis oder generalisierten urogenitalen Entzündung entgegen zu wirken. Die Urethra des Männchens ist aufgrund ihrer doppelten Funktion als harnableitendes und Fortpflanzungsorgan Einmündungsort zahlreicher akzessorischer Drüsen. Die starke Präsenz chemosensitiver Zellen an Mündungsstellen von Drüsen in die Urethra, wie im *Colliculus seminalis* und im Bereich des Divertikels, wo bulbourethrale Drüsen ihr Sekret drainieren, könnte dem Monitoring bakterieller Bestandteile dienen, die sich von der Urethra in die akzessorischen Drüsen oder umgekehrt ausbreiten, um die Unversehrtheit der Geschlechtsdrüsen und damit die Fortpflanzungsfähigkeit zu gewährleisten. Chemosensitive Bürstenzellen saßen zudem häufig im urethralen Divertikel; es ist als Organaussackung dem distalen urethralen Ende angeschlossen. Viele Monitorzellen an dieser Lokalisation könnten einer reservoirartigen Ansammlung an Bakterien und Biofilmbildung an dieser sackartigen Struktur entgegenwirken und zu einer räumlich gesehen früheren Detektion einer Bakterienkolonisation beitragen. Die Lokalisation chemosensitiver Bürstenzellen in Ausführungsgängen paraurethraler und akzessorischer Drüsen könnte Anhalt für eine mögliche parakrine Funktionsweise dieser Zellen bieten, denn die Ausführungsgänge und Azini paraurethraler Drüsen von Ratten und Mäusen zeigten ein reiches Vorkommen an IgA-synthetisierenden Plasmazellen [145, 146]. Dem sekretorischen IgA kommt im Rahmen von Harnwegsinfekten Bedeutung zu. Es wird konstitutiv in den Urin sezerniert und ist im Falle einer apparenten Harnwegsentzündung mit Bakteriurie signifikant höher konzentriert [51]. An Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass sIgA in steigenden Konzentrationen die Adhäsion von *E. coli* an Epithelzellen effektiv inhibierte und somit einen wichtigen Mechanismus im Rahmen der angeborenen Immunabwehr darstellte [187]. Da in den PUDAG der Maus ebenfalls chemosensitive Zellen mit zur Urethra analogen enzymatischen Ausstattung zur Detektion bakterieller Bestandteile gefunden werden konnten, ist eine synergistische Wirkung zwischen chemosensitiven Bürstenzellen und IgA-Plasmazellen enthaltenden Drüsen denkbar, insofern als dass das von erregten cholinergen Zellen im Gangepithel ausgeschüttete Acetylcholin einen parakrinen Effekt auf benachbarte Epithelien mit konsekutiver Induktion der IgA-Freisetzung haben könnte. Im Bereich der PUDAG sezerniertes Acetylcholin könnte zudem die Drüsenkörper zur Mukussekretion anregen, was der Drainage bakte-

rienthaltenden Sekrets dienen würde. In den Atemwegen ist die gesteigerte Mukusproduktion als eine von vielen Antworten auf sezerniertes Acetylcholin bereits bekannt [98, 99].

4.5.2 Lokale Abwehrmechanismen und Ausblick auf die Interaktion mit dem Immunsystem am Beispiel der gastrointestinalen chemosensitiven Bürstenzelle

Chemosensitive Bürstenzellen könnten ihre Reaktion auf bakterielle Bestandteile über die Initiation eines Miktionsreflexes vermitteln. Sie würden daher präventiv auf eine Kolonisation des Urogenitaltrakts mit Mikroorganismen wirken. Ebenfalls präventiv wirksam sind sog. antimikrobielle Peptide, die durch zahlreiche Epithelien sowohl konstitutiv als auch nach Bakterienadhäsion vermehrt ausgeschüttet werden [15, 22, 216]. Zu den antimikrobiellen Peptiden zählen beispielsweise Cathelicidin und β -Defensin. Cathelicidin wurde in Homogenaten humanen Gewebes aus dem Nierenbecken und der Nierenrinde nachgewiesen und wird im Modell der ascendierenden Pyelonephritis mit uropathogenen *E. coli* infizierter Mäuse bereits nach fünf Minuten exzessiv freigesetzt. Cathelicidin zerstört die Bakterienzellmembran und beugt der bakteriellen Adhäsion an die Epithelwand vor [15, 22, 216]. Über die Zerstörung bakterieller Zellwände entfalten auch die Defensine ihre Wirkung. Humanes β -Defensin-1 als Vertreter dieser antimikrobiellen Peptide ist besonders stark im Urogenitaltrakt vertreten, wo es mittels Northern Blot, In-situ-Hybridisierung und IHC in Rinde und Mark der Nieren detektiert wurde; es hat eine starke antimikrobielle Wirksamkeit gegen *E. coli* und *S. aureus* [132, 205]. Da durch die Sekretion antimikrobieller Peptide durch Epithelzellen und Auslösung eines Miktionsreflexes durch chemosensitive Zellen dasselbe Ziel, nämlich die rasche und präventive Bakterienelimination, verfolgt wird, wäre ein Zusammenspiel zwischen beiden Abwehrmechanismen möglich. Dabei könnte sowohl die Bürstenzelle als Epithelzelle nach Bakterienkontakt antimikrobielle Proteine in das urethrale Lumen sezernieren als auch über Acetylcholin parakrin auf Epithelzellen in ihrer Nachbarschaft einwirken, woraus eine gesteigerte Peptidfreisetzung resultieren könnte. Da chemosensitive Bürstenzellen oft über lange, sich horizontal innerhalb der Mukosa erstreckende Nervenfasern verfügen, würde eine Acetylcholinfreisetzung über ein größeres Areal erfolgen mit konsekutiv größeren Mengen an Defensin- oder Cathelicidinsekretion durch Epithelzellen. Eine derartige Interaktion zwischen Epithelzellen und chemosensitiven Bürstenzellen wurde durch Deckmann et al. nachgewiesen, da gezeigt werden konnte, dass es stimulusinduziert zu einem Ca^{2+} -Konzentrationsanstieg in ChAT^{BAC}-eGFP-positiven Zellen und benachbarten Zellen kam; Isolierte man jedoch Zellverbände von cholinergen Zellen oder fügte den

muskarinischen Acetylcholinrezeptor-Antagonist Atropin und nikotinischen Acetylcholinrezeptor-Antagonist Mecamylamin hinzu, blieb der stimulusinduzierte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in nicht-cholinergen Zellen aus [35]. Es bleibt jedoch spekulativ, ob Acetylcholin die Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden hervorrufen kann, wengleich in der Literatur darauf hingewiesen wird, dass theoretisch alle Epithelien, die in Kontakt mit Bakterien geraten können, antimikrobielle Peptide produzieren und sezernieren können [216], wurde bisher nicht beschrieben, dass speziell urethrale Epithelzellen sich dieses Abwehrmechanismus bedienen, weil bisher nur die oberen Harnwege auf ihren Gehalt an antimikrobiellen Peptiden hin untersucht wurden [132, 205, 216]. Nichtsdestotrotz gilt die Urethra als immunkompetentes Organ und stellt mit ihrer Schleimhaut eine immunologische Barriere dar, weil sich in PUD IgA-Plasmazellen, in Lamina propria und Epithel Makrophagen, CD4- und CD8-positive T-Lymphozyten und dendritische Zellen nachweisen lassen, die zusammen eine Immunantwort initiieren können [159]. Zudem siedelten sich immunkompetente Leukozyten in der urethralen Mukosa an, nachdem Mäuse durch intraperitoneale Gabe von Ovalbumin immunisiert und das Antigen Ovalbumin in das duodenale und urethrale Lumen injiziert worden waren [80]. In der Gesamtheit verfügt die Urethra somit über die zellulären Komponenten eine Immunantwort zu initiieren. Unterstützend würden sich dabei die CGRP-vermittelte Vasodilatation mit konsekutiver Durchblutungssteigerung und die chemotaktische Wirkung von Cathelicidin und Defensinen auf Monozyten, Gewebsmakrophagen und dendritische Zellen auswirken [216]. Interessanterweise weisen neueste Erkenntnisse, die an Äquivalenten der urethralen Bürstenzelle im Darm gewonnen wurden, auf eine enge Verzahnung mit dem Immunsystem und eine Schlüsselfunktion der Bürstenzelle in der Induktion der Typ-2-Immunantwort zur parasitären Abwehr hin. Hauptquelle des Zytokins IL25, das nach Kontakt der intestinalen Mukosa mit Helminthen oder Protozoen sezerniert wird, sind die chemosensitiven Bürstenzellen im Darmtrakt, welche in dieser Lokalisation als „tuft cells“ – frei übersetzt „Büschelzellen“ - bezeichnet werden [58, 75]. IL25 stimuliert angeborene lymphoide Zellen (ILCs) der Lamina propria [130]. Bei diesen ILCs handelt es sich um morphologisch T- und B-Lymphozyten ähnelnden Zellen, die je nach ausgeschüttetem Zytokinmuster in drei Gruppen eingeteilt werden können. ILCs der Gruppe 2 (ILC2) bilden durch ihre Freisetzung von Typ-2-Zytokinen einen Baustein im Abwehrmechanismus gegen Helminthen, da sie stimuliert durch u.a. IL25, IL13 und IL5 sezernieren [53]. Diese Zytokine induzieren in der Folge adaptive Umbauprozesse innerhalb der intestinalen Mukosa wie eine Hyperplasie der muzinproduzierenden Becherzellen und Ausbreitung sowie Einwanderung eosinophiler Granulozyten, welche in der Ausscheidung des Parasiten münden [58, 75, 129, 130, 131]. Über bislang unbekannte, eventuell den Notch-Signalweg betreffende Mechanismen, fördert IL13 an Stammzellen

intestinaler Epithelzellen im Kryptengrund deren Differenzierung zu Becher- sowie Büschelzellen, was in einer Hyperplasie auch der chemosensitiven Zellen resultiert, entsprechend eines positiven Feedbackmechanismus zwischen ILC2 und Büschelzelle im Falle einer parasitären Infektion [129]. Ihre Schlüsselfunktion in der Induktion einer Typ-2-Immunantwort wird anhand von Beobachtungen an KO-Mäusen deutlich: Mäuse, die aufgrund einer Mutation des Pou2f3-Transkriptionsfaktors (kodierend für das Protein Skn-1a, das für die Expression des TRPM5 essentiell ist [120]) keine Büschelzellen exprimierten, weisen lediglich eine fokale, moderate Becherzellhyperplasie auf und waren im Vergleich zum Wildtyp noch 29 Tage später infiziert, hinweisend auf eine kompromittierte Typ-2-Immunantwort [58]. Dass das Erschmecken des Parasiten dabei den ersten Schritt darstellt, zeigte sich an TRPM5-defizienten Mäusen, die 36 Tage nach Infektion eine signifikant höhere Erregerlast aufwiesen als Wildtypen [75]. Bisher ist unbekannt, ob es in der Urethra eine ähnliche Interaktion zwischen chemosensitiver Bürstenzelle und dem Immunsystem gibt, sowie ob die urethrale Bürstenzelle durch im Rahmen einer parasitären Besiedlung anfallende Stoffe überhaupt erregt wird. Angesichts von 143 Mio. Neuinfektionen mit Trichomonaden sind urethrale parasitäre Infektionen keine Seltenheit. Dass die chemosensitive Bürstenzelle eine Rolle bei der parasitären Abwehr spielt, indem sie Schutzreflexe einleitet und/oder chemotaktisch eosinophile Granulozyten rekrutiert, wäre zumindest denkbar und sinnvoll.

4.6 Mögliche Funktionen der non-cholinerger urethralen Bürstenzelle

4.6.1 Mechanozeption

Aus den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit an der Urethra der Maus mit Antikörpern gegen Komponenten der Geschmackstransduktionskaskade und den Bürstenzell-Strukturmarker Villin folgt, dass die cholinerge chemosensitive Bürstenzelle eine Untergruppe urethraler Epithelzellen darstellt. Zusätzlich existieren Zellpopulationen, die sich durch Villin-Positivität alleine, Villin-, ChAT-, TRPM5-, +/- PLC β 2-Immunreaktivität oder Villin-, ChAT-, TRPM5-, PLC β 2-, +/-Gustducin-Immunreaktivität auszeichnen (Abb. 5.1). Daneben findet sich die neuroendokrine urethrale Epithelzelle. Villin-immunreaktive Zellen werden in allen Abschnitten der Urethra von Männchen und Weibchen beobachtet (Abb. 3.62 und 3.63). Die Mehrheit dieser Zellen exprimierte ChAT nicht. V.a. in der proximalen Urethra des Weibchens, der penilen und pelvinen Urethra, dem *Colliculus seminalis* und dem Blasenhalss überwiegt der Anteil Villin-positiver non-cholinerger Zellen besonders stark mit 70 bis 93% (Abb. 3.62). Luci-

ano und Reale, die die Bürstenzelle der murinen Gallenblase untersucht, räumten diesen Zellen eine Funktion als Mechanosensoren ein, da die lateral ausgebildeten Villi Ähnlichkeit mit „zytoplasmatischen spines“ von Merkelzellen oder „axonalen spines“ von Pacini-Körperchen aufwiesen und ihre Präsenz v.a. im Druckkräften ausgesetzten Gallenblasenhals mit der Wahrnehmung mechanozeptiver Aufgaben kongruiert [115, 116]. Vor dem Hintergrund ihrer Expression Villin-immunreaktiver „Fühler“ [114], könnten diesen Zellen eine Funktion in der Transduktion mechanischer Stimuli entlang der Urethra zukommen. Der urethrovesikale Reflex fußt auf der Stimulation urethraler Afferenzen, die in der Folge zu Detrusorkontraktionen führen [63, 165, 173, 174, 177]. Es bedarf daher mechanosensitiver Strukturen in der urethralen Mukosa, deren Stimulation eine Erregung urethraler afferenter Nervenfasern bewirkt. Bei der Katze registrierte Todd rasch-adaptierende Entladungen pudendaler Afferenzen, wenn die Urethra mit Flüssigkeit gefüllt wurde und wenn diese Flüssigkeit wieder ausgeleitet wurde [199]. Zusätzlich löste ein Durchfluss der Urethra mit Flüssigkeit andauernde Entladungen der sensorischen Afferenzen aus, wobei die Entladungsfrequenz abhängig von der Flussrate stieg. Todd leitete daraus die Existenz flowsensibler Rezeptoren in der Urethra ab und postulierte ihre Bedeutung für die Auslösung des urethrovesikalen Reflexes [199]. Andere Studien bestätigten die Ausbildung von flowsensiblen Rezeptoren mit rascher sowie auch langsamer Adaptation [177]. Todd beobachtete zudem im Bereich der prostatistischen Urethra und Einmündung bulbourethraler Drüsen „lamellierte Endkörperchen“ von 30 µm Durchmesser und 250 µm Länge, die er mit vibrationssensitiven Pacini-Körperchen verglich. Deren Vorkommen brachte er mit der Prädisposition zu Turbulenzen an den genannten Stellen der Urethra in Verbindung. In der Urethra der Maus wurden keine den Pacini-Körperchen ähnelnden Strukturen unter Zuhilfenahme immunhistochemischer Methoden und Analysen mit dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Weil aber Villin-immunreaktive, ChAT-negative Zellen v.a. im Bereich des *Colliculus seminalis* und der penilen Urethra – Stellen, an denen zahlreiche Drüsenausführungsgänge in die Harnröhre einmünden und Flussturbulenzen erwartet werden - sowie in Blasenhalshals und Beckenurethra und proximaler weiblicher Urethra auftraten, könnten sie potenzielle Mechanosensoren darstellen. Diese Hypothese wird durch Beobachtungen von Gustafson et al. gestützt, die Blasenkontraktionen bei Rückenmarksverletzten durch Stimulation der prostatistischen Urethra auslösten und postulierten, dass insbesondere den proximalen Abschnitten der Harnröhre eine Bedeutung in der Auslösung des urethrovesikalen Reflexes zukomme [63].

4.6.2 PH-sensing

Besiedeln Bakterien im Rahmen von Harnwegsinfekten die Urethra, kommt es während des entzündlichen Geschehens im Gewebe zu azidotischen Verhältnissen, d.h. sinkendem pH. Protonen gelten generell als Stimulus einer Untergruppe an geschmacksrezeptiven Zellen, die nach dem Eintritt von Protonen durch ihre apikale oder basolaterale Membran die Geschmacksmodalität sauer transduzieren. Die Mechanismen bzw. zellulären Kanäle, die einen Eintritt von Protonen vermitteln, sind bisher nicht gänzlich aufgeklärt, vermutet wird u.a. die Beteiligung von amiloridsensitiven, epithelialen Natriumkanälen sog. ENaC, und einem der ENaC/DEG-Familie zugehörndem Heteromer ASIC2a/2b (acid-sensing ion-channels) [59, 107, 203]. Als Auslöser der Transduktion mit resultierender Erregung gustatorischer Nervenfasern gilt dabei die durch Protonen hervorgerufene Azidifizierung intra- sowie extrazellulärer Kompartimente, die nur in einer Untergruppe geschmacksrezeptiver Zellen, den sauer schmeckenden, einen Ca^{2+} -Anstieg durch Depolarisation und Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle führt [164]. Eine Beteiligung dieser Kanäle bei der Wahrnehmung azidotischer Zustände in der Urethra bleibt spekulativ, zumal da nicht in allen Knospen die durch saure Stoffe vermittelten Ionenströme über die Zellmembran amiloridsensibel zu sein scheinen [59, 203]. Ein weiterer potenzieller Kandidat zur Geschmackstransduktion von sauren Stimuli wurde in Ratten sowie Mäusen und zudem in allen Geschmacksknospen dieser Nagetiere nachgewiesen: PKD2L1 (polycystic kidney disease 2-like 1) – ein Vertreter der PKD-Familie (polycystic-kidney-disease), deren Mutation die polyzystische Nierenerkrankung hervorruft, einer Subfamilie der TRP-Ionenkanäle [76, 82, 83, 111]. PKD2L1 stellt dabei einen nonselektiven Kationenkanal mit Permeabilität für Natrium und Ca^{2+} dar und bildet Heteromere mit PKD1L3 (polycystic kidney disease 1-like 3), das vermutlich modulierend auf PKD2L1 einwirkt [62, 82, 111, 215]. In einer Untergruppe von geschmacksrezeptiven Zellen werden PKD1L3 und PKD2L1 transkribiert und koexprimiert, was In-situ-Hybridisierungen veranschaulichten. Innerhalb der Zelle banden Anti-PKD2L1-Antikörper am apikalen – dem Geschmacksporus zugewandten - Pol, was die These der rezeptiven Funktion dieser Proteine unterstützt [76, 82, 111]. Ihre Rolle bei der Detektion saurer Stimuli kristallisierte sich an PKD2L1-gendefizienten Mäusen heraus: In der *Chorda tympani* dieser Tiere lösten saure Stoffe, wie Zitronensäure oder Chlorwasserstoff keine neuronalen Antworten mehr aus [76], vereinbar mit dem Verlust der Fähigkeit sauer zu schmecken. Das PKD-Heteromer scheint dabei in der geschmacksrezeptiven Zelle unter sehr azidotischen Bedingungen (pH unter 3) eine „Off-Antwort“ zu generieren, indem es erst durch die Dissoziation der sauren Substanz vom

Rezeptor zu einer Ca^{2+} -Mobilisierung mit intrazellulärem Ca^{2+} -Anstieg kommt. Bemerkenswert ist, dass eine leichte pH-Änderung von pH 2,7 auf pH 2,5 *in vitro* eine Rezeptoraktivierung auslöste. Die Autoren folgerten, dass *in vivo* die Verdünnung bzw. Lösung der sauren Substanz im Speichel die nötige pH-Wert-Änderung zur Generation einer Off-Antwort herbeiführen könnte [81]. Huang et al. entdeckten darüber hinaus, dass PKD1L3 und PKD2L1 über ihre geschmackstransduktive Funktion dem pH-Monitoring von Körperflüssigkeiten dienen, woraus sich eine Bedeutung ihrer Expression in der Urethra ableitet [76]. Huang et al. gelang der Nachweis, dass PKD2L1 von Neuronen im Bereich des Zentralkanals und IV. Ventrikels exprimiert wird, wo es an der Überwachung des Liquors beteiligt ist, da PKD2L1-positive Neurone sensitiv auf Abweichungen des pH-Werts vom physiologischen Normwert mit Erhöhung der Aktionspotenzialfrequenzen antworteten. Da im Rahmen von azidotischen Zuständen, hervorgerufen durch Entzündungen, der pH von Gewebe sowie Urin ebenfalls von seiner Norm abweicht, wäre die Expression von PKDs durch urethrale Epithelzellen sinnvoll, v.a. vor dem Hintergrund einer möglichen synergistischen Wirkung mit chemosensitiven cholinergen Zellen, die auch eine Monitorfunktion ausüben. In diesem Kontext könnte eine Untergruppe der allein Villin-positiven Epithelzellen, der ChAT-positiven Villin-negativen Epithelzellen, der cholinergen Zellen ohne PLC β 2-Expression oder der ChAT-positiven TRPM5-negativen Zellen über Rezeptoren zur Registrierung von Protonen bzw. pH-Wert-Abweichungen verfügen. Bekräftigt würde diese Vermutung durch die Tatsache, dass PKD-positive geschmacksrezeptive Zellen nicht T1R3, Gustducin, TRPM5 oder IP $_3$ RIII koexprimierten [76, 82, 111], was heißt, dass unterschiedliche Zellgruppen in der Zunge für die Geschmacksfähigkeit von sauer bzw. süß, bitter und umami verantwortlich sind. Die Frage, ob sich diese Beobachtung auch auf die Urethra ausweiten lässt und tatsächlich Rezeptoren zum Sauerschmecken in diesem Organ ausgebildet sind, bleibt aktuell noch unbeantwortet. Neueste Forschungsergebnisse relativieren jedoch die strikte Trennung in sauer und nicht-sauer schmeckende Geschmackszellen. Ye et al. wiesen an PKD2L1-exprimierenden Geschmackszellen der Maus nach, dass die intrazelluläre Ansäuerung mittels Essigsäure und Propionsäure in diesen Zellen die Generation von Aktionspotentialen auslöste, und dass dies über die Inhibition des K^+ -Kanals $\text{K}_{\text{IR}} 2.1$ (inward rectifier) vermittelt wurde, der über K^+ -Einwärtsgleichrichterströme an der Aufrechterhaltung des Ruhepotentials beteiligt ist. Interessanterweise war $\text{K}_{\text{IR}} 2.1$ nicht nur auch in TRPM5-exprimierenden Geschmackszellen nachweisbar, sondern in diesen bitter, süß und umami schmeckenden Zellen auch durch eine intrazelluläre Ansäuerung inhibierbar. Stimulierte man PKD2L1- und TRPM5-exprimierende Zellen mit identisch konzentrierten Säuren, wurde nur in PKD2L1-exprimierenden ein Aktionspotential ausgelöst; blockierte man jedoch einen gewissen Prozentsatz der K^+ -Kanäle von TRPM5-exprimierenden Zellen

durch eine Bariumvorbehandlung, reagierten sie wie sauer schmeckende Geschmackszellen. Der Unterschied bei TRPM5-exprimierenden Zellen liegt dabei in der größeren Menge an K_{IR} 2.1 passierenden K^+ -Ionen, was zur Folge hat, dass die weniger sensibel auf intrazelluläre Ansäuerung reagierenden TRPM5-exprimierenden Zellen im Vergleich zu PKD2L1-exprimierenden einer 4,5-fach stärkeren Ansäuerung des Zytosols bedürfen, um den Schwellenwert zur Auslösung eines Aktionspotentials zu erreichen [214]. Diese Ergebnisse erbringen wichtige Ansatzpunkte für das Konzept der „polymodalen Chemosensation“ (s.u.) TRPM5-exprimierender urethraler Bürstenzellen. Des Weiteren existieren u.a. in murinen Osteoblasten, Osteozyten und Chondrozyten GPCR, die beim Anfall von Protonen mit konsekutiver pH-Änderung mit einer Produktion von IP_3 reagieren: OGR1 (ovarian cancer GPCR1) und GPR4 [118]. Da die Formation von IP_3 die Aktivierung der PLC voraussetzt, ergibt sich die Frage, ob eine Untergruppe unter den urethralen PLC β 2-positiven ChAT-negativen Zellen – in Doppelinkubationsversuchen waren alle PLC β 2-immunreaktiven Zellen auch Villin-immunreaktiv - oder den Villin-positiven ChAT-negativen Zellen einen dieser Rezeptoren exprimieren könnte.

4.6.3 Thermosensation

Zahlreiche Studien über die Mechanismen der Geschmackstransduktion in geschmackrezeptiven Zellen der Zunge belegen, dass die Geschmacksqualitäten bitter, süß und umami distinkte Zellpopulationen stimulieren, da die benötigten GPCR T1R1, T1R2 und T2R nicht zusammen in einer Zelle vorkommen. Die Wahrnehmung dieser unterschiedlichen Modalitäten erfährt somit in der Peripherie schon eine topische Trennung. Jüngste Ergebnisse über die cholinerge chemosensitive Bürstenzelle in der Urethra zeigen jedoch, dass diese eine Funktion als „polymodaler Chemosensor“ wahrnimmt, da die isolierte cholinerge Bürstenzelle sowohl auf die Zugabe von Denatonium als auch von Glutamat mit intrazellulärer Ca^{2+} -Erhöhung reagiert [35]. Auf diese Weise würde die urethrale Zelle von Bitterstoffen (AHL) und AS aus der Proteolyse von Wirtszellen stimuliert, die während der bakteriellen Kolonisation des Harntrakts zugleich anfallen. Zur Detektion von bitteren Stimuli und Stimuli, die die Geschmackswahrnehmung umami auslösen, wird TRPM5 benötigt. Aktuellen Untersuchungen zufolge stimulieren bitter und umami in der Urethra die Freisetzung von Acetylcholin aus den chemosensitiven Bürstenzellen. Die Mehrheit cholinergischer Bürstenzellen koexprimiert TRPM5; dennoch existieren z.B. in der penilen Urethra und dem *Colliculus seminalis* TRPM5-positiv noncholinerge Zellen (Abb. 3.62). Diese Zellen könnten auch in die Geschmackstransduktion eingebunden sein und dafür einen anderen Transmitter zur Erregung von Nervenfa-

ern freisetzen, sie könnten die polymodalen Chemosensoren jedoch auch zu einer weiteren Wahrnehmung befähigen: der Thermosensation. Die Stimulation muriner Zungen mit Süßstoffen steigender Temperatur von 15 bis 35°C rief eine temperaturabhängige Verstärkung der Antworten in der *Chorda tympani* um das Drei- bis Zehnfache hervor [189], zurückführbar auf TRPM5-vermittelt größere einwärtsgerichtete Ströme in die geschmacksrezeptive Zelle bei Temperaturerhöhung. Talavera et al. charakterisierten den Ionenkanal TRPM5 folglich als einen temperatursensiblen, durch Wärme aktivierbaren Kanal und diskutierten, dass Wärme eine TRPM5-exprimierende Zelle unabhängig von der Anwesenheit eines Geschmacksstoffes stimulieren könnte. Cruz et al. bekräftigten diese Hypothese durch Versuche an menschlichen Zungen, indem sie unterschiedliche Zungenareale erwärmten bzw. abkühlten und die von den Probanden angegebenen Sinneindrücke erfassten [30]. Cruz et al. fanden heraus, dass eine Temperaturänderung an sich tatsächlich Geschmacksempfindungen auslösen kann, da sie Erwärmung vorderer Zungenareale bei Probanden den Geschmack süß und die Abkühlung dieses Areals die Geschmacksempfindungen sauer sowie salzig hervorriefen. Vor diesem Hintergrund wäre die zusätzliche Erfassung schädigender thermaler Einflüsse durch die polymodalen urethralen Epithelzellen denkbar. Unter der Annahme, dass Acetylcholin den chemosensitiven urethralen Zellen als Transmitter dient, wurde eine mögliche Rolle cholinergischer Zellen ohne Villin-, TRPM5- oder PLC β 2-Koexpression bei der Detektion von Protonen oder pH-Wert-Abweichungen diskutiert. Weiterhin könnte die Existenz non-cholinergischer Villin-, TRPM5-, PLC β 2- und Gustducin-immunreaktiver Zellen in der Urethra auf eine Geschmackstransduktion ohne Beteiligung von Acetylcholin hindeuten. Diese Zellen könnten ATP als Transmitter zur Erregung purinergischer Nervenfasern freisetzen und somit den Rezeptorzellen in Geschmacksknospen ähneln, welche als Resultat der Anwesenheit von Geschmacksstoffen ATP sezernieren, um benachbarte purinerge Nerven oder präsynaptische Zellen zu stimulieren.

5. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die vorliegende Arbeit beschreibt als erste das Vorkommen der cholinergen chemosensitiven Bürstenzelle in der urethralen Mukosa sowie im Epithel der PUDAG und akzessorischer Geschlechtsdrüsen. Wie die bereits bekannten Äquivalente in der Trachea, *Tuba auditiva*, Nase, Gallenwegen und Dünndarm ist auch die urethrale cholinerge Bürstenzelle zumeist flaschen-, keulen- oder mandelförmig und trägt ein apikales Mikrovillibü-

schel [49, 95, 96, 106, 113, 117, 163, 185]. Zusätzlich ermöglicht die fehlende Expression von PGP, 5-HT und CgA und somit abwesenden neuroendokrinen Merkmalen eine klare Abgrenzung von der urethralen neuroendokrinen Zelle. Eine Subpopulation der urethralen cholinergen chemosensitiven Bürstenzelle exprimiert mit PLC β 2, Gustducin sowie TRPM5 Komponenten der gustatorischen Signaltransduktionskaskade, die in Geschmackszellen der Zunge die Transduktion der Geschmacksmodalitäten süß, bitter und umami vermitteln (Abb. 5.1) [25, 33, 124, 152, 157, 169, 211, 213, 218]. Über die Fähigkeit, Bestandteile des urethralen Lumens zu erschmecken, könnte der chemosensitiven cholinergen Bürstenzelle eine Monitorfunktion zukommen, da Bitterstoffe und AS beispielsweise im Rahmen einer bakteriellen Besiedlung des Harntrakts anfallen. Die Chemozeption schädigender Bestandteile von Mikroorganismen würde über die Aktivierung der kanonischen Bitter- und Umami-Signaltransduktionskaskade zur Freisetzung von Acetylcholin und Erregung cholinozeptiver Nervenfasern führen, was die Auslösung des Miktionsreflexes zur Ausschwemmung potentieller Krankheitserreger bewirken könnte. Um die zugeordnete Wächterfunktion zu optimieren, sind cholinerge Bürstenzellen an strategisch günstigen Stellen innerhalb des Harntrakts, z.B. der distalen Hälfte der Urethra beim Weibchen und dem *Colliculus seminalis* sowie Divertikel als Mündungsstellen zahlreicher Drüsen in die männliche Urethra, positioniert. Darüber hinaus waren Subpopulationen cholinergischer Bürstenzellen nachweisbar, die Gustducin, PLC β 2 und TRPM5 nicht exprimierten (Abb. 3.62 und 3.63). In diesen Zellen könnte die Chemosensorik über alternative G-Proteinuntereinheiten und/oder Ionenkanäle ablaufen. In Frage kommen hierfür beispielsweise die in Geschmackszellen der Zunge exprimierten G α -Untereinheiten Transducin, G α 14, G α 15, G α s und G α i2, die im Gehirn von Ratten nachweisbaren PLC-Isoformen β 3 und β 1 sowie andere Vertreter der TRPM- oder TRPC-Subfamilien [25, 72, 83, 86, 100, 101, 124, 138, 143, 194, 197, 210]. Gustducin, PLC β 2 und TRPM5 werden in geschmacksrezeptiven Zellen der Zunge, die die Geschmacksmodalität sauer transduzieren, nicht exprimiert, so dass cholinergischen Bürstenzellen in der Urethra, in denen die Komponenten der kanonischen Signaltransduktion ebenfalls nicht nachweisbar sind, möglicherweise eine ähnliche Funktion bei der Detektion azidotischer Stimuli, z.B. im Rahmen eines entzündlichen Geschehens zukommt [76, 82, 111]. Eine weitere Subpopulation urethraler Bürstenzellen ist nicht cholinerg. Non-cholinerge Bürstenzellen könnten ebenfalls chemosensitiv sein und zur Geschmackstransduktion statt Acetylcholin einen anderen Transmitter freisetzen, beispielsweise ATP wie geschmacksrezeptive Zellen der Zunge [48, 166]. Allerdings könnten diese Zellen auch eine Rolle bei der Mechanozeption spielen, indem sie z.B. als flow-sensitive Rezeptoren an der Auslösung des urethrovesikalen Reflexes beteiligt sein könnten, wofür ihre Lokalisation im *Colliculus seminalis*, penilen urethralen Segments

beim Männchen, proximaler Urethra beim Weibchen sowie im Blasen Hals beider Geschlechter spräche, da es sich jeweils um Abschnitte mit turbulenterem Urinfluss innerhalb der Urethra handelt [177, 199]. Unter den non-cholinergen urethralen Bürstenzellen existiert zudem eine – wenn auch prozentual kleine - Subpopulation TRPM5-positiver Zellen, die die polymodale Chemozeption in der Urethra möglicherweise um die Thermosensorik ergänzen könnten, vermittelt durch den temperatursensitiven, durch Wärme aktivierbaren TRPM5-Ionenkanal zur potenziellen Detektion schädigender thermaler Einflüsse auf die Mukosa [30, 189]. Neben der ihr zugedachten systemischen Funktion bei der Auslösung des Miktionsreflexes zur Ausschwemmung von Mikroorganismen könnte die Sekretion von Acetylcholin auf parakrinem Wege ergänzend lokale zelluläre Schutzmechanismen, wie die Ausschüttung antimikrobieller Peptide aus benachbarten Epithelzellen, fördern [15, 22, 132, 205, 216]. Vor dem Hintergrund, dass chemosensitive Bürstenzellen im Dünndarm über eine Zytokinfreisetzung mit lymphoiden Zellen interagieren und somit zur Elimination von Helminthen aus dem Gastrointestinaltrakt beitragen, stellt sich schließlich die Frage, ob und wie weit die chemosensitive urethrale Bürstenzelle bei der Wahrnehmung bakterieller Bestandteile im Lumen mit dem Immunsystem verknüpft sein könnte [58, 75, 129].

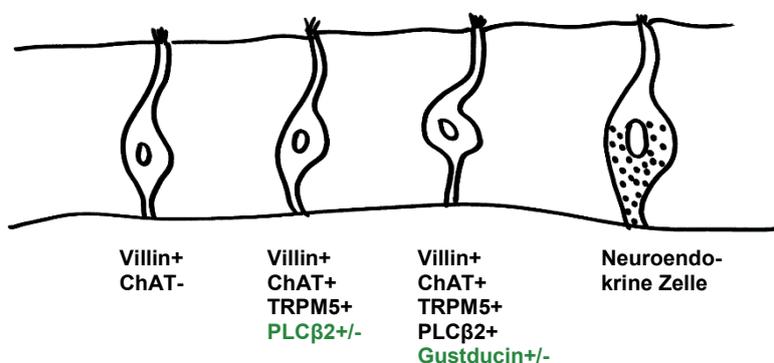


Abb. 5.1 Übersicht über die verschiedenen Bürstenzellsubpopulationen und die neuroendokrine Zelle in der murinen Urethra

6. ZUSAMMENFASSUNG

Chemosensitive Bürstenzellen detektieren als Wächter der oberen Atemwege freigesetzte Bestandteile eingedrungener Mikroorganismen über Geschmacksrezeptoren, Gustducin, PLC β 2 und TRPM5 - Komponenten der kanonischen Signaltransduktionskaskade -, die in geschmacksrezeptiven Zellen der Zunge die Transduktion der Geschmacksmodalitäten bitter und umami vermitteln. Die chemosensitive Bürstenzelle der oberen Atemwege ist cholinerg und setzt bei Stimulation Acetylcholin frei, was bei Mäusen über die Erregung cholinozeptiver vagaler Afferenzen zur Reduktion der Atemfrequenz führt. Da auch die Urethra eine potenzielle Eintrittspforte für Mikroorganismen darstellt, wurde das Vorkommen dieser Zelle in der Urethra antizipiert und in der vorliegenden Arbeit an transgenen Mäusen, die eGFP unter Kontrolle der Promotorsequenz der ChAT exprimieren, mittels einfacher indirekter und Doppelimmunfluoreszenz untersucht. Solitäre cholinerge Zellen sind in der murinen Urethra und PUDAG beider Geschlechter sowie im Gangepithel akzessorischer Geschlechtsdrüsen beim Männchen nachweisbar. Sie exprimieren den Bürstenzellmarker Villin und sind nicht immunreaktiv mit PGP-, CgA- und 5-HT-Antiseren, wodurch sie von den bereits bekannten urethralen neuroendokrinen Zellen abgrenzbar sind. Doppelmarkierungen mit Anti-eGFP- und Anti-Gustducin, Anti-PLC β 2- bzw. Anti-TRPM5-Antiseren zeigen, dass bis zu 47% der Zellen cholinerg und Gustducin-positiv, 27-59% cholinerg und PLC β 2-positiv und 70-100% cholinerg und TRPM5-positiv sind. Aus diesem Immunprofil lässt sich die Existenz mehrerer Subpopulationen der urethralen Bürstenzelle ableiten. Eine weitere Subpopulation der Villin-positiven Zellen ist zudem nicht cholinerg. Diese neu entdeckten Zellen könnten eine Funktion bei der Detektion von Bestandteilen in die Urethra eindringender Mikroorganismen wahrnehmen und über die Freisetzung von Acetylcholin den Miktionsreflex zur Ausschwemmung potenzieller Krankheitserreger auslösen. Parallel zum Äquivalent in den oberen Atemwegen würde dieser urethralen chemosensitiven Bürstenzelle eine Monitorfunktion im Harntrakt zukommen. Fortführende Arbeiten bekräftigen diese Hypothese, da sie zeigen konnten, dass urethrale Bürstenzellen auf mRNA- und Proteinlevel die Geschmacksrezeptoren Tas1R1, Tas1R3 und Tas2R105 exprimieren, durch bittere und Umami-Substanzen stimulierbar sind, in enger Nachbarschaft zu cholinozeptiven Nervenfasern liegen und infolge ihrer Stimulation eine erhöhte Aktivität des *Musculus detrusor vesicae* verzeichnet werden kann.

7. SUMMARY

Chemosensory brush cells serve as sentinels of the upper airways by detecting hazardous substances produced by microorganisms. Chemoreception is effected via molecular components of the umami and bitter taste transduction cascade, taste receptors, gustducin, PLC β 2 and TRPM5, known from receptor (Type I) cells of taste buds. The chemosensory brush cell in the upper airways is cholinergic and releases acetylcholine upon stimulation thereby eliciting stimulatory effects on cholinoreceptive vagal sensory nerve fibres which leads to a reduction of the breathing frequency in mice. As the urethra constitutes a possible entry site for hazardous microorganisms, the existence of chemosensory cells was hypothesized at this place, too. To address this issue, the urogenital tract of transgenic mice expressing eGFP under the control of the ChAT promotor was examined by means of single- and double-labelling immunohistochemistry. Solitary cholinergic epithelial cells were observed in the urethra and excretory ducts of paraurethral glands in male and female mice as well as in excretory ducts of the accessory sex glands in males. They are immunoreactive for the brush cell marker villin and differ from the already known urethral neuroendocrine cells as they are not immunoreactive with PGP-, CgA- and 5-HT-antisera. Double-labelling with antibodies against eGFP and gustducin, PLC β 2 and TRPM5, respectively, revealed up to 47% of cholinergic gustducin-positive cells, 27-59% of cholinergic PLC β 2-positive and 70-100% of cholinergic TRPM5-positive cells. These immunohistochemical patterns imply the existence of more than one subtype of the urethral chemosensory cell. Further, there is a subpopulation of villin-positive cells not expressing ChAT and, therefore, not being cholinergic. The cholinergic chemosensory cell may serve as a sentinel monitoring harmful substances secreted by microorganisms colonizing the urogenital tract. By triggering of the micturition reflex via release of acetylcholine, potential pathogens would be washed out to prevent further retrograde ingress. This hypothesis proved itself well-founded by following studies showing that urethral brush cells express the taste receptors Tas1R1, Tas1R3 and Tas2R105 on mRNA and protein level, react to stimulation by bitter and umami substances, are approached by sensory cholinoreceptive nerve fibres and increase contractions of the bladder detrusor muscle upon stimulation.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
AG	Drüsenausführungsgänge
AHL	Acetylierte Homoserinlactone
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome, künstliches Bakterienchromosom
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CgA	Chromogranin A
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide, Calcitoningen-verwandtes Peptid
ChAT	Choline Acetyltransferase, Acetylcholintransferase
CK	Cytokeratin
Cy3	Indocarbocyanin
DAG	Diacylglycerol
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein, verstärkt grün fluoreszierendes Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GLP-1	Glucagon-Like Peptide 1, Glucagon-ähnliches Peptid 1
GMP	Guaninmonophosphat
GPCR	G-Protein-Coupled Receptor, G-Proteingekoppelter Rezeptor
GPCR4	G-Protein-Coupled Receptor 4, G-Proteingekoppelter Rezeptor 4
Gustducin	G α -Gustducin
IHC	Immunhistochemie
ILC	Innate Lymphoid Cell, angeborene lymphoide Zelle
ILC2	Innate Lymphoid Cell Type 2, angeborene lymphoide Zelle Typ 2
IMP	Inosinmonophosphat
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ RIII	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor Typ III

K _{IR} 2.1	Inward Rectifier Potassium Channel 2.1, Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanal 2.1
L-AS	L-Aminosäure(n)
mGluR4	metabotroper Glutamatrezeptor 4
NEB	Neuroepithelial Bodies, neuroepitheliale Körperchen
nAChR	Nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
PDE	Phosphodiesterase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKD1L3	Polycystic Kidney Disease 1-like 3 protein, polyzystische Nierenerkrankung 1-ähnliches Protein 3
PKD2L1	Polycystic Kidney Disease 2-like 1 protein, polyzystische Nierenerkrankung 2-ähnliches Protein 1
PLCβ2	Phospholipase C Untereinheit β2
PUD	periurethrale Drüsen
PUDAG	periurethrale Drüsenausführungsgänge
SCC	Solitary Chemosensory Cell, solitäre chemosensorische Zelle
TasR	Taste Receptor, Geschmacksrezeptor
TRPM5	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 5, Transient-Rezeptor-Potential-Kation-Kanal Unterfamilie M Mitglied 5
VAChT	Vesicular Acetylcholine Transporter, vesikulärer Acetylcholintransporter

9. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *Adler E., Hoon M. A., Mueller K. L., Chandrashekar J., Ryba N. J., Zuker C. S.* A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*. 2000; 100: 693–702.
- [2] *Akabas M. H., Dodd J., Al-Awqati Q.* A bitter substance induces a rise in intracellular calcium in a subpopulation of rat taste cells. *Science*. 1988; 242: 1047–1050.
- [3] *Alm Z., Zygmunt P. K. E., Iselin C., Larsson B., Uvelius B., Werner S., Andersson K.-E.* Nitric oxide synthase-immunoreactive, adrenergic, cholinergic, and peptidergic nerves of the female rat urinary tract: a comparative study. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 1995; 56: 105–114.
- [4] *Asano-Miyoshi M., Abe K., Emori Y.* Co-expression of calcium signaling components in vertebrate taste bud cells. *Neuroscience Letters*. 2000; 283: 61–64.
- [5] *Aubron C., Huet O., Ricome S., Borderie D., Pussard E., Leblanc P.-E., Bouvet O., Vicaut E., Denamur E., Duranteau J.* Changes in urine composition after trauma facilitate bacterial growth. *BMC Infectious Diseases*. 2012; 12: 330–339.
- [6] *Aumüller G., Doll A., Wennemuth G., Dizeyi N., Abrahamsson P.-A., Wilhelm B.* Regional distribution of neuroendocrine cells in the urogenital duct system of the male rat. *The Prostate*. 2012; 72: 326–337.
- [7] *Avenet P., Hofmann F., Lindemann B.* Transduction in taste receptor cells requires cAMP-dependent protein kinase. *Nature*. 1988; 331: 351–354.
- [8] *Avenet P., Lindemann B.* Patch-clamp study of isolated taste receptor cells of the frog. *The Journal of Membrane Biology*. 1987; 97: 223–240.
- [9] *Bachmanov A. A., Beauchamp G. K.* Taste receptor genes. *Annual Review of Nutrition*. 2007; 27: 389–414.
- [10] *Bayewitch M. L., Avidor-Reiss T., Levy R., Pfeuffer T., Nevo I., Simonds W. F., Vogel Z.* Inhibition of adenylyl cyclase isoforms V and VI by various Gbetagamma subunits. *The FASEB Journal*. 1998; 12: 1019–1025.
- [11] *Bernhardt S. J., Naim M., Zehavi U., Lindemann B.* Changes in IP3 and cytosolic Ca²⁺ in response to sugars and non-sugar sweeteners in transduction of sweet taste in the rat. *The Journal of Physiology*. 1996; 490: 325–336.
- [12] *Blake B. L., Wing M. R., Zhou J. Y., Lei Q., Hillmann J. R., Behe C. I., Morris R. A., Harden T. K., Bayliss D. A., Miller R. J., Siderovski D. P.* G beta association and effector interaction selectivities of the divergent G gamma subunit G gamma(13). *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276: 49267–49274.
- [13] *Bo X., Alavi A., Xiang Z., Oglesby I., Ford A., Burnstock G.* Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. *Neuroreport*. 1999; 10: 1107–1111.
- [14] *Brain S. D., Williams T. J., Tippins J. R., Morris H. R., MacIntyre I.* Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*. 1985; 313: 54–56.
- [15] *Brogden K. A.* Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. 2005; 3: 238–250.
- [16] *Carozzi A., Camps M., Gierschik P., Parker P. J.* Activation of phosphatidylinositol lipid-specific phospholipase C-beta 3 by G-protein beta gamma subunits. *Federation of European Biochemical Societies*. 1993; 315: 340–342.
- [17] *Cecio A., Vittoria A.* Urogenital paraneurons in several mammals. *Archives of Histology and Cytology*. 1989; 52: 403–413.
- [18] *Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994; 263: 802–805.
- [19] *Chandrashekar J., Mueller K. L., Hoon M. A., Adler E., Feng L., Guo W., Zuker C. S., Ryba N. J.* T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*. 2000; 100: 703–711.
- [20] *Chaudhari N., Landin A. M., Roper S. D.* A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nature Neuroscience*. 2000; 3: 113–119.

- [21] Chen C.-C., Akopian A. N., Sivilotti L., Colquhoun D., Burnstock G., Wood J. N. A P2X purinoreceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*. 1995; 377: 428–431.
- [22] Chromek M., Slamová Z., Bergman P., Kovács L., Podracká L., Ehrén I., Hökfelt T., Gudmundsson G. H., Gallo R. L., Agerberth B., Brauner A. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nature Medicine*. 2006; 12: 636–641.
- [23] Ciner M., van Vorstenbosch C. J. A. H. V., Dijkstra G., van Hurk R. D. Penile bulb and its relationship with the pelvic urethra and the penile urethra in the rat: light and scanning electron microscopical observations. *The Anatomical Record*. 1996: 452–469.
- [24] Clapham D. E., Neer E. J. G protein beta gamma subunits. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1997; 37: 167–203.
- [25] Clapham D. E., Runnels L. W., Strübing C. The TRP ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001; 2: 387–396.
- [26] Clapp T. R., Medler K. F., Damak S., Margolskee R. F., Kinnamon S. C. Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage-gated calcium channels and SNAP-25. *BMC Biology*. 2006; 4: 7.
- [27] Clapp T. R., Stone L. M., Margolskee R. F., Kinnamon S. C. Immunocytochemical evidence for co-expression of Type III IP3 receptor with signaling components of bitter taste transduction. *BMC neuroscience*. 2001; 2: 6.
- [28] Cockcroft S., Thomas G. M. H. Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *The Biochemical Journal*. 1992; 288: 1–14.
- [29] Cook M. J. Viscera. In *The Anatomy of the Laboratory Mouse*. Academic Press Inc.. (London) LTD. 1965; S. 80–81.
- [30] Cruz A., Green B. G. Thermal stimulation of taste. *Nature*; 403: 889–892.
- [31] Cutz E., Pan J., Yeager H., Domnik N. J., Fisher J. T. Recent advances and controversies on the role of pulmonary neuroepithelial bodies as airway sensors. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2013; 24: 40–50.
- [32] Czaja K., Sienkiewicz W., Vittoria A., Costagliola A., Cecio A. Neuroendocrine cells in the female urogenital tract of the pig, and their immunohistochemical characterization. *Acta Anatomica*. 1996; 157: 11–19.
- [33] Damak S., Rong M., Yasumatsu K., Kokrashvili Z., Pérez C. A., Shigemura N., Yoshida R., Mosinger B., Glendinning J. I., Ninomiya Y., Margolskee R. F. Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds. *Chemical Senses*. 2005; 31: 253–264.
- [34] Davies D. G. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998; 280: 295–298.
- [35] Deckmann K., Filipowski K., Krasteva-Christ G., Fronius M., Althaus M., Rafiq A., Papadakis T., Renno L., Jurastow I., Wessels L., Wolff M., Schutz B., Weihe E., Chubanov V., Gudermann T., Klein J., Bschleipfer T., Kummer W. Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014; 111: 8287–8292.
- [36] DeFazio R. A., Dvoryanchikov G. A., Maruyama Y., Kim J. W., Pereira E., Roper S. D., Chaudhari N. Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *The Journal of Neuroscience*. 2006; 26: 3971–3980.
- [37] Dhakal B. K., Mulvey M. A. The UPEC pore-forming toxin α -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host and Microbe*. 2012; 11: 58–69.
- [38] Di Sant'Agnese P. A., Mesy Jensen K. L. de. Endocrine-paracrine cells of the prostate and prostatic urethra: an ultrastructural study. *Human Pathology*. 1984; 15: 1034–1041.
- [39] Dixon J. S., Gosling J. A., Ramsdale D. R. Urethral chromaffin cells. A light and electron microscopic study. *Zeitschrift für Zellforschung*. 1973; 138: 397–406.

- [40] Drake W. M., Lowe, SR, Mirtella A., Bartlett T. J., Clark A. J. Desensitisation of calcitonin gene-related peptide responsiveness but not adrenomedullin responsiveness in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Endocrinology*. 2000; 165: 133–138.
- [41] Eddy M. C., Eschle B. K., Barrows J., Hallock R. M., Finger T. E., Delay E. R. Double P2X2/P2X3 purinergic receptor knockout mice do not taste NaCl or the artificial sweetener SC45647. *Chemical Senses*. 2009; 34: 789–797.
- [42] Engelhardt J. von, Eliava M., Meyer A. H., Rozov A., Monyer H. Functional characterization of intrinsic cholinergic interneurons in the cortex. *The Journal of Neuroscience*. 2007; 27: 5633–5642.
- [43] Ewald D. A., Roper S. D. Bidirectional synaptic transmission in *Necturus* taste buds. *The Journal of Neuroscience*. 1994; 14: 3791–3804.
- [44] Fernandez E., Dail W. G., Walton G., Martinez G. The vasculature of the rat penis: a scanning electron microscopic and histologic study. *The American Journal of Anatomy*. 1991; 192: 307–318.
- [45] Fetissov F., Berger G., Dubois M. P., Arbeille-Brassart B., Lansac J., Sam-Giao M., Jobard P. Endocrine cells in the female genital tract. *Histopathology*. 1985; 9: 133–145.
- [46] Feyrter F. The urogenital light-cell system of man. *Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung*. 1951; 57: 324–344.
- [47] Finger T. E. Peptide immunohistochemistry demonstrates multiple classes of perigemmal nerve fibers in the circumvallate papilla of the rat. *Chemical senses*. 1986; 11: 135–144.
- [48] Finger T. E. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science*. 2005; 310: 1495–1499.
- [49] Finger T. E., Böttger B., Hansen A., Anderson K. T., Alimohammadi H., Silver W. L. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100: 8981–8986.
- [50] Finger T. E., Kinnamon S. C. Taste isn't just for taste buds anymore. *F1000 biology reports*. 2011; 3: 20.
- [51] Fliedner M., Mehls O., Rauterberg E.-W., Ritz E. Urinary sIgA in children with urinary tract infection. *The Journal of Pediatrics*. 1986; 109: 416–421.
- [52] Forssmann W. G., Ito S., Weihe E., Aoki A., Dym M., Fawcett D. W. An improved perfusion fixation method for the testis. *The Anatomical Record*. 1977; 188: 307–314.
- [53] Fort M. M., Cheung J., Yen D., Li J., Zurawski S. M., Lo S, Menon S., Clifford T., Hunte B., Lesley R., Muchamuel T., Hurst S. D., Zurawski G., Leach M. W., Gorman D. M., Rennick D. M. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*. 2001; 15: 985–995.
- [54] Fu X. W., Nurse C. A., Wong V., Cutz E. Hypoxia-induced secretion of serotonin from intact pulmonary neuroepithelial bodies in neonatal rabbit. *The Journal of Physiology*. 2002; 539: 503–510.
- [55] Fu X. W., Wang D., Nurse C. A., Dinauer M. C., Cutz E. NADPH oxidase is an O₂ sensor in airway chemoreceptors: evidence from K⁺ current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000; 97: 4374–4379.
- [56] Fujita T., Kanno T., Kobayashi S. What are Paraneurons? In *The Paraneuron*. Springer-Verlag; 1988. S. 6, S. 12.
- [57] Fung B. K., Hurley J. B., Stryer L. Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981; 78: 152–156.
- [58] Gerbe F., Sidot E., Smyth D. J., Ohmoto M., Matsumoto I., Dardalhon V., Cesses P., Garnier L., Pouzolles M., Brulin B., Bruschi M., Harcus Y., Zimmermann V. S.,

- Taylor N., Maizels R. M., Jay P.* Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*. 2016; 529: 226–230.
- [59] *Gilbertson T. A., Roper S. D., Kinnamon S. C.* Proton currents through amiloride-sensitive Na⁺ channels in isolated hamster taste cells: enhancement by vasopressin and cAMP. *Neuron*. 1993; 10: 931–942.
- [60] *Gillespie J. I.* Inhibitory actions of calcitonin gene-related peptide and capsaicin: evidence for local axonal reflexes in the bladder wall. *BJU International*. 2005; 95: 149–156.
- [61] *Giovannucci D. R., Groblewski G. E., Sneyd J., Yule D. I.* Targeted phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively inhibits localized Ca²⁺ release and shapes oscillatory Ca²⁺ signals. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275: 33704–33711.
- [62] *González-Perrett S., Kim K., Ibarra C., Damiano A. E., Zotta E., Batelli M., Harris P. C., Reisin I. L., Arnaout M. A., Cantiello H. F.* Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a calcium-permeable nonselective cation channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98: 1182–1187.
- [63] *Gustafson K. J., Creasey G. H., Grill W. M.* A urethral afferent mediated excitatory bladder reflex exists in humans. *Neuroscience Letters*. 2004; 360: 9–12.
- [64] *Hakanson R., Larsson L. I., Sjöberg N. O., Sundler F.* Amine-producing endocrine-like cells in the epithelium of urethra and prostate of the guinea-pig. A chemical, fluorescence histochemical, and electron microscopic study. *Histochemie*. 1974; 38: 259–270.
- [65] *Hall K.* The structure and development of the urethral sinus in the male white mouse, with notes on its occurrence in other rodents. *Journal of Anatomy*; 1936; 70: 413–428.1.
- [66] *Hanyu S., Iwanaga T., Kano K., Fujita T.* Distribution of serotonin-immunoreactive paraneurons in the lower urinary tract of dogs. *The American Journal of Anatomy*. 1987; 180: 349–356.
- [67] *He W., Danilova V., Zou S., Hellekant G., Max M., Margolskee R. F., Damak S.* Partial rescue of taste responses of alpha-gustducin null mice by transgenic expression of alpha-transducin. *Chemical Senses*. 2002; 27: 719–727.
- [68] *He W., Yasumatsu K., Varadarajan V., Yamada A., Lem J., Ninomiya Y., Margolskee R. F., Damak S.* Umami taste responses are mediated by alpha-transducin and alpha-gustducin. *The Journal of Neuroscience*. 2004; 24: 7674–7680.
- [69] *Hebel R., Stromberg M. W.* Male Reproductive Organs. In *Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat*. BioMed Verlag. 1986; SS. 70-80.
- [70] *Höfer D., Drenckhahn D.* Identification of brush cells in the alimentary and respiratory system by antibodies to villin and fimbrin. *Histochemistry*. 1992; 98: 237–242.
- [71] *Höfer D., Puschel B., Drenckhahn D.* Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93: 6631–6634.
- [72] *Honda Z.-I., Takano T., Hirose N., Suzuki T., Muto A., Kume S., Mikoshiba K., Itoh K., Shimizu T.* Gq pathway desensitizes chemotactic receptor-induced calcium signaling via inositol triphosphate receptor down-regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270: 4840–4844.
- [73] *Hoon M. A., Adler E., Lindemeier J., Battey J. F., Ryba N. J., Zuker C. S.* Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*. 1999; 96: 541–551.
- [74] *Hoon M. A., Northup J. K., Margolskee R. F., Ryba N. J. P.* Functional expression of the taste specific G-protein, alpha-gustducin. *The Biochemical Journal*. 1995; 309: 629–636.
- [75] *Howitt M. R., Lavoie S., Michaud M., Blum A. M., Tran S. V., Weinstock J. V., Gallini C. A., Redding K., Margolskee R. F., Osborne L. C., Artis D., Garrett W. S.* Tuft cells,

- taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science*. 2016; 351: 1329–1333.
- [76] Huang A. L., Chen X., Hoon M. A., Chandrashekar J., Guo W., Tränkner D., Ryba N. J. P., Zuker C. S. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature*. 2006; 442: 934–938.
- [77] Huang L., Shanker Y. G., Dubauskaite J., Zheng J. Z., Yan W., Rosenzweig S., Spielman A. I., Max M., Margolskee R. F. Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nature Neuroscience*. 1999; 2: 1055–1062.
- [78] Huang Y.-J. Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter. *The Journal of Neuroscience*. 2005; 25: 843–847.
- [79] Hummel, K. P., Richardson, F. L., Fekete E. Anatomy. In Green Earl L., Colemann D. L., Dagg C. P., Fuller J. L., Green M. C., Kaliss N., Russell E. S., Staats J., Fahey E. U. *Biology of the Laboratory Mouse*. Dover Publications, Inc., New York. 1966; S. 288.
- [80] Husband A. J., Clifton V. L. Role of intestinal immunization in urinary tract defense. *Immunology and Cell Biology*. 1989; 67: 371–376.
- [81] Inada H., Kawabata F., Ishimaru Y., Fushiki T., Matsunami H., Tominaga M. Off-response property of an acid-activated cation channel complex PKD1L3–PKD2L1. *EMBO reports*. 2008; 9: 690–697.
- [82] Ishimaru Y., Inada H., Kubota M., Zhuang H., Tominaga M., Matsunami H. Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103: 12569–12574.
- [83] Ishimaru Y., Matsunami H. Transient receptor potential (TRP) channels and taste sensation. *Journal of Dental Research*. 2009; 88: 212–218.
- [84] Iwanaga T., Hanyu S., Fujita T. Serotonin-immunoreactive cells of peculiar shape in the urethral epithelium of the human penis. *Cell and Tissue Research*. 1987; 249: 51–56.
- [85] Iwanaga T., Tamaki M., Adachi I., Fujita T. Substance P/calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive nerve terminals in the whole mount preparations of the dog urethra. *Regulatory Peptides*. 1993; 46: 402–404.
- [86] Jhon D.-Y., Lee H.-H., Park D., Lee C.-W., Lee K.-H., Yoo O. J., Rhee S. G. Cloning, sequencing, purification, and Gq-dependent activation of phospholipase C-beta 3. *Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268: 6654–6661.
- [87] Jinno S., Hua X.-Y., Yaksh T. L. Nicotine and acetylcholine induce release of calcitonin gene-related peptide from rat trachea. *Journal of Applied Physiology*. 1994; 76: 1651–1656.
- [88] Kaske S., Krasteva G., König P., Kummer W., Hofmann T., Gudermann T., Chubanov V. TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neuroscience*. 2007; 8: 49–60.
- [89] Kasper M., Hofer D., Woodcock-Mitchell J., Migheli A., Attanasio A., Rudolf T., Müller M., Drenckhahn D. Colocalization of cytokeratin 18 and villin in type III alveolar cells (brush cells) of the rat lung. *Histochemistry*. 1994; 101: 57–62.
- [90] Katz A., Wu D., Simon M. I. Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature*. 1992; 360: 686–689.
- [91] Kaya N., Shen T., Lu S., Zhao F., Herness S. A paracrine signaling role for serotonin in rat taste buds: expression and localization of serotonin receptor subtypes. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2004; 286: R649–R658.
- [92] Kim D.-J., Roper S. D. Localization of serotonin in taste buds: A comparative study in four vertebrates. *The Journal of Comparative Neurology*. 1995; 353: 364–370.

- [93] *Knoblauch S., True L.* Male Reproductive System. In *Treuting P. M., Dintzis S. M.* Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas. Elsevier. 2012; SS. 285-308.
- [94] *Kolesnikov S. S., Margolskee R. F.* A cyclic-nucleotide suppressible conductance activated by transducin in taste cells. *Nature.* 1995; 376: 85–88.
- [95] *Krasteva G., Canning B. J., Hartmann P., Veres T. Z., Papadakis T., Mühlfeld C., Schliecker K., Tallini Y. N., Braun A., Hackstein H., Baal N., Weihe E., Schutz B., Kotlikoff M., Ibanez-Tallon I., Kummer W.* Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011; 108: 9478–9483.
- [96] *Krasteva G., Hartmann P., Papadakis T., Bodenbenner M., Wessels L., Weihe E., Schutz B., Langheinrich A. C., Chubanov V., Gudermann T., Ibanez-Tallon I., Kummer W.* Cholinergic chemosensory cells in the auditory tube. *Histochemistry and cell biology.* 2012; 137: 483–497.
- [97] *Krasteva G., Kummer W.* “Tasting” the airway lining fluid. *Histochemistry and Cell Biology.* 2012; 138: 365–383.
- [98] *Kummer W., Lips K. S.* Non-neuronal acetylcholine release and its contribution to COPD pathology. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.* 2006; 3: 47–52.
- [99] *Kummer W., Lips K. S., Pfeil U.* The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochemistry and Cell Biology.* 2008; 130: 219–234.
- [100] *Kusakabe Y., Yamaguchi E., Tanemura K., Kameyama K., Chiba N., Arai S., Emori Y., Abe K.* Identification of two α -subunit species of GTP-binding proteins, G α 15 and G α q, expressed in rat taste buds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 1998; 1403: 265–272.
- [101] *Kusakabe Y., Yasuoka A., Asano-Miyoshi M. I. K., Matsumoto I., Arai S., Emori Y., Abe K.* Comprehensive study on G protein alpha-subunits in taste bud cells, with special reference to the occurrence of Galphai2 as a major Galpha species. *Chemical Senses.* 2000; 25: 525–531.
- [102] *Lee R. J., Xiong G., Kofonow J. M., Chen B., Lysenko A., Jiang P., Abraham V., Doghramji L., Adappa N. D., Palmer J. N., Kennedy D. W., Beauchamp G. K., Doulias P.-T., Ischiropoulos H., Kreidler J. L., Reed D. R., Cohen N. A.* T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *The Journal of Clinical Investigation.* 2012; 122: 4145–4159.
- [103] *Lendon R. G., Dixon J. S., Gosling J. A.* The distribution of endocrine-like cells in the human male and female urethral epithelium. *Experientia.* 1976; 32: 377–378.
- [104] *Lewis C., Neidhardt S., Holy C., North R. A., Buell G., Surprenant A.* Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature.* 1995; 377: 432–435.
- [105] *Li X., Staszewski L., Xu H., Durick K., Zoller M., Adler E.* Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002; 99: 4692–4696.
- [106] *Lin W., Ezekwe E. A. D., Zhao Z., Liman E. R., Restrepo D.* TRPM5-expressing microvillous cells in the main olfactory epithelium. *BMC Neuroscience.* 2008; 9: 114.
- [107] *Lin W., Ogura T., Kinnamon S. C.* Acid-activated cation currents in rat vallate taste receptor cells. *Journal of Neurophysiology.* 2002; 88: 133–141.
- [108] *Liu M., Simon M. I.* Regulation by cAMP-dependent protein kinase of a G-protein-mediated phospholipase C. *Nature.* 1996; 382: 83–87.
- [109] *Livermore S., Zhou Y., Pan J., Yeger H., Nurse C. A., Cutz E.* Pulmonary neuroepithelial bodies are polymodal airway sensors: evidence for CO₂/H⁺ sensing. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* 2015; 308: 15.
- [110] *Lloyd R. V., Wilson B. S.* Specific endocrine tissue marker defined by a monoclonal antibody. *Science.* 1983: 628–630.
- [111] *LopezJimenez N. D., Cavenagh M. M., Sainz E., Cruz-Ithier M. A., Battey J. F., Sullivan S. L.* Two members of the TRPP family of ion channels, Pkd113 and Pkd211,

- are co-expressed in a subset of taste receptor cells. *Journal of Neurochemistry*. 2006; 98: 68–77.
- [112] *Luciano L.* Die Feinstruktur der Gallenblase und der Gallengänge. *Zeitschrift für Zellforschung*. 1972; 135: 87–114
- [113] *Luciano L., Castellucci M., Reale E.* The brush cells of the common bile duct of the rat. Thin section, freeze-fracture and scanning electron microscopy. *Cell and Tissue Research*. 1981; 218: 403–420.
- [114] *Luciano L., Reale E.* A new morphological aspect of the brush cells of the mouse gallbladder epithelium. *Cell and Tissue Research*. 1979; 201: 37–44.
- [115] *Luciano L., Reale E.* Brush cells of the mouse gallbladder. A correlative light- and electron-microscopical study. *Cell and Tissue Research*. 1990; 262: 339–349.
- [116] *Luciano L., Reale E.* Presence of brush cells in the mouse gallbladder. *Microscopy Research and Technique*. 1997; 38: 598–608.
- [117] *Luciano L., Reale E., Ruska H.* Über eine „chemorezeptive“ Sinneszelle in der Trachea der Ratte. *Zeitschrift für Zellforschung*. 1968; 85: 350–375.
- [118] *Ludwig M.-G., Vanek M., Guerini D., Gasser J. A., Jones C. E., Junker U., Hofstetter H., Wolf R. M., Seuwen K.* Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2003; 425: 93–98.
- [119] *Maggi C. A., Giuliani S., Santicioli P., Abelli L., Meli A.* Visceromotor responses to calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the rat lower urinary tract: evidence for a transmitter role in the capsaicin-sensitive nerves of the ureter. *European Journal of Pharmacology*. 1987; 143: 73–82.
- [120] *Matsumoto I., Ohmoto M., Narukawa M., Yoshihara Y., Abe K.* Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. *Nature Neuroscience*. 2011; 14: 685–687.
- [121] *Mazières L., Jiang C.-H., Lindström S.* The C fibre reflex of the cat urinary bladder. *The Journal of Physiology*. 1998; 513: 531–541.
- [122] *McDonald D. M.* Neurogenic inflammation in the rat trachea. I. Changes in venules, leucocytes and epithelial cells. *Journal of Neurocytology*. 1988; 17: 583–603.
- [123] *McDonald D. M., Mitchell R. A., Gabella G., Haskell A.* Neurogenic inflammation in the rat trachea. II. Identity and distribution of nerves mediating the increase in vascular permeability. *Journal of Neurocytology*. 1988; 17: 605–628.
- [124] *McLaughlin S. K., McKinnon P. J., Margolskee R. F.* Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature*. 1992; 357: 563–569.
- [125] *Merigo F., Benati D., Di Chio M., Osculati F., Sbarbati A.* Secretory cells of the airway express molecules of the chemoreceptive cascade. *Cell and Tissue Research*. 2007; 327: 231–247.
- [126] *Merigo F., Benati D., Tizzano M., Osculati F., Sbarbati A.* alpha-Gustducin immunoreactivity in the airways. *Cell and Tissue Research*. 2005; 319: 211–219.
- [127] *Misaka T., Kusakabe Y., Emori Y., Gono T., Arai S.* Taste buds have a cyclic nucleotide-activated channel, CNGgust. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272: 22623–22629.
- [128] *Miyoshi M. A., Abe K., Emori Y.* IP(3) receptor type 3 and PLCbeta2 are co-expressed with taste receptors T1R and T2R in rat taste bud cells. *Chemical Senses*. 2001; 26: 259–265.
- [129] *Moltke J. von, Ji M., Liang H.-E., Locksley R. M.* Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature*. 2016; 529: 221–225.
- [130] *Moro K., Koyasu S.* Innate lymphoid cells, possible interaction with microbiota. *Seminars in Immunopathology*. 2015; 37: 27–37.
- [131] *Moro K., Yamada T., Tanabe M., Takeuchi T., Ikawa T., Kawamoto H., Furusawa J.-i., Ohtani M., Fujii H., Koyasu S.* Innate production of TH2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit+Sca-1+ lymphoid cells. *Nature*. 2009; 463: 540–544.
- [132] *Morrison G.* Characterization of the mouse beta defensin 1, Defb1, mutant mouse model. *Infection and Immunity*. 2002; 70: 3053–3060.

- [133] *Nakashima K., Ninomiya Y.* Transduction for sweet taste of saccharin may involve both inositol 1,4,5-trisphosphate and cAMP pathways in the fungiform taste buds in C57BL mice. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 1999; 9: 90–98.
- [134] *Nelson G., Chandrashekar J., Hoon M. A., Feng L., Zhao G., Ryba N. J. P., Zuker C. S.* An amino-acid taste receptor. *Nature*. 2002; 416: 199–202.
- [135] *Nelson G., Hoon M. A., Chandrashekar J., Zhang Y., Ryba N. J., Zuker C. S.* Mammalian sweet taste receptors. *Cell*. 2001; 106: 381–390.
- [136] *Nichols D. B., Cheng H., Leblond C. P.* Variability of the shape and argentaffinity of the granules in the enteroendocrine cells of the mouse duodenum. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1974; 22: 929–944.
- [137] *O'Connor D. T., Burton D., Deftos L. J.* Chromogranin A: immunohistology reveals its universal occurrence in normal polypeptide hormone producing endocrine glands. *Life Sciences*. 1983; 33: 1657–1663.
- [138] *Offermanns S., Simon M. I.* G alpha 15 und G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270: 15175–15180.
- [139] *Ogura T., Krosnowski K., Zhang L., Bekkerman M., Lin W.* Chemoreception regulates chemical access to mouse vomeronasal organ: role of solitary chemosensory cells. *PLoS one*. 2010; 5: e11924.
- [140] *Okamoto K., Hanazaki K., Akimori T., Okabayashi T., Okada T., Kobayashi M., Ogata T.* Immunohistochemical and electron microscopic characterization of brush cells of the rat cecum. *Medical Molecular Morphology*. 2008; 41: 145–150.
- [141] *Osculati F., Bentivoglio M., Castellucci M., Cinti S., Zancanaro C., Sbarbati A.* The solitary chemosensory cells and the diffuse chemosensory system of the airway. *European Journal of Histochemistry*. 2007; 51 Suppl 1: 65–72.
- [142] *Owman C., Owman T., Sjöberg N. O.* Short adrenergic neurons innervating the female urethra of the cat. *Experientia*. 1971; 27: 313–315.
- [143] *Park D., Jhon D.-Y., Lee C.-W., Lee K.-H., Rhee S. G.* Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268: 4573–4576.
- [144] *Parr M. B., Franca L. R. de, Kepple L., Ying L., Parr E. L., Russell L. D.* The urethral glands of male mice in relation to depletion of secretory granules upon mating. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1994; 101: 675–680.
- [145] *Parr M. B., Parr E. L.* Immunohistochemical investigation of secretory component and immunoglobulin A in the genital tract of the female rat. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1989; 85: 105–113.
- [146] *Parr M. B., Ren H. P., Russell L. D., Prins G. S., Parr E. L.* Urethral glands of the male mouse contain secretory component and immunoglobulin A plasma cells and are targets of testosterone. *Biology of Reproduction*. 1992; 47: 1031–1039.
- [147] *Parsek M. R., Greenberg E. P.* Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000; 97: 8789–8793.
- [148] *Pearse A. G.* The diffuse neuroendocrine system and the APUD concept: related "endocrine" peptides in brain, intestine, pituitary, placenta, and anuran cutaneous glands. *Medical Biology*. 1977; 55: 115–125.
- [149] *Pearson J. P., Passador L., Iglewski B. H., Greenberg E. P.* A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92: 1490–1494.
- [150] *Peng C.-W., Chen J.-J. J., Cheng C.-L., Grill M. G.* Role of pudendal afferents in voiding efficiency in the rat. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2008; 294: R660-R672.

- [151] Peng C.-W., Chen J.-J. J., Cheng C.-L., Grill W. M. Improved bladder emptying in urinary retention by electrical stimulation of pudendal afferents. *Journal of Neural Engineering*. 2008; 5: 144–154.
- [152] Perez C. A., Huang L., Rong M., Kozak J. A., Preuss A. K., Zhang H., Max M., Margolskee R. F. A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nature Neuroscience*. 2002; 5: 1169–1176.
- [153] Persson K., Alm P., Johansson K., Larsson B., Andersson K.-E. Co-existence of nitrenergic, peptidergic and acetylcholine esterase-positive nerves in the pig lower urinary tract. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 1995; 52: 225–236.
- [154] Phillips J. I., Davies I. The comparative morphology of the bladder and urethra in young and old female C57BL/1crfat mice. *Experimental Gerontology*. 1980; 15: 551–562.
- [155] Pinheiro P., Segatelli T., Francia C. A., Martinez M., Padovani C., Franchi M. R., Martinez F. Morphologic changes in the urethral epithelium in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). *Micron*. 2007; 38: 734–746.
- [156] Pinheiro P. F. F., Almeida C. C. D., Segatelli T. M., Martinez M., Padovani C. R., Martinez F. E. Structure of the pelvic and penile urethra- relationship with the ducts of the sex accessory glands of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Anatomy*. 2003; 202: 431–444.
- [157] Prawitt D., Monteilh-Zoller M. K., Brixel L., Spangenberg C., Zabel B., Fleig A., Penner R. TRPM5 is a transient Ca²⁺-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca²⁺]_i. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100: 15166–15171.
- [158] Profita M., Bonanno A., Siena L., Ferraro M., Montalbano A. M., Pompeo F., Riccobono L., Pieper M. P., Gjomarkaj M. Acetylcholine mediates the release of IL-8 in human bronchial epithelial cells by a NFκB/ERK-dependent mechanism. *European Journal of Pharmacology*. 2008; 582: 145–153.
- [159] Quayle A. J., Pudney J., Munoz D. E., Anderson D. J. Characterization of T lymphocytes and antigen-presenting cells in the murine male urethra. *Biology of Reproduction*. 1994; 51: 809–820.
- [160] Radziszewski P., Soller W., Mattiasson A. Calcitonin gene-related peptide and substance P induce pronounced motor effects in the female rat urethra in vivo. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*. 2003; 37: 275–280.
- [161] Ramsdale D. R. Further observations on urethral chromaffin cells: an electron microscopic study. *Cell and Tissue Research*. 1974; 148: 499–504.
- [162] Rendi M. H., Muehlenbachs A., Garcia R. L., Boyd K. L. Female Reproductive System. In *Treuting P. M., Dintzis S. M. Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas*. Elsevier. 2012; SS. 253- 273.
- [163] Rhodin J., Dalhamn T. Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Zeitschrift für Zellforschung*. 1956; 44: 345–412.
- [164] Richter T. A., Caicedo A., Roper S. D. Sour taste stimuli evoke Ca²⁺ and pH responses in mouse taste cells. *The Journal of Physiology*. 2003; 547: 475–483.
- [165] Robain G., Combrisson H., Mazières L. Bladder response to urethral flow in the awake ewe. *Neurology and Urodynamics*. 2001; 20: 641–649.
- [166] Romanov R. A., Rogachevskaja O. A., Bystrova M. F., Jiang P., Margolskee R. F., Kolesnikov S. S. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *The EMBO Journal*. 2007; 26: 657–667.
- [167] Romih R., Korošec P., Mello W. de, Jezernik K. Differentiation of epithelial cells in the urinary tract. *Cell and Tissue Research*. 2005: 259–268.
- [168] Rossler P., Boekhoff I., Tareilus E., Beck S., Breer H., Freitag J. G protein beta-gamma complexes in circumvallate taste cells involved in bitter transduction. *Chemical Senses*. 2000; 25: 413–421.
- [169] Rossler P., Kroner C., Freitag J., Noe J., Breer H. Identification of a phospholipase C beta subtype in rat taste cells. *European Journal of Cell Biology*. 1998; 77: 253–261.

- [170] Ruiz-Avila L., McLaughlin S. K., Wildmann D., McKinnon P. J., Robichon A., Spickofsky N., Margolskee R. F. Coupling of bitter receptor to phosphodiesterase through transducin in taste receptor cells. *Nature*. 1995; 376: 80–85.
- [171] Sato A., Miyoshi S. Ultrastructure of the main excretory duct epithelia of the rat parotid and submandibular glands with a review of the literature. *The Anatomical Record*. 1988; 220: 239–251.
- [172] Saunders C. J., Christensen M., Finger T. E., Tizzano M. Cholinergic neurotransmission links solitary chemosensory cells to nasal inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014; 111: 6075–6080.
- [173] Shafik A., Shafik A. A., El-Sibai O., Ahmed I. Role of positive urethrovesical feedback in vesical evacuation. The concept of a second micturition reflex: the urethrovesical reflex. *World Journal of Urology*. 2003; 21: 167–170.
- [174] Shefchyk S. J., Buss R. R. Urethral pudendal afferent-evoked bladder and sphincter reflexes in decerebrate and acute spinal cats. *Neuroscience Letters*. 1998; 244: 137–140.
- [175] Shehata R. Urethral glands in the wall of the female urethra of rats, mice and closely related rodents. *Acta Anatomica*. 1974; 90: 381–387.
- [176] Shuman E. K., Chenoweth C. E. Recognition and prevention of healthcare-associated urinary tract infections in the intensive care unit. *Critical Care Medicine*. 2010; 38: S373-S379.
- [177] Snellings A. E., Yoo P. B., Grill W. M. Urethral flow-responsive afferents in the cat sacral dorsal root ganglia. *Neuroscience Letters*. 2012; 516: 34–38.
- [178] Snyder J. A., Haugen B. J., Buckles E. L., Lockatell C. V., Johnson D. E., Donnenberg M. S., Welch R. A., Mobley H. L. T. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infection and Immunity*. 2004; 72: 6373–6381.
- [179] Spielman A. I., Huque T., Nagai H., Whitney G., Brand J. G. Generation of inositol phosphates in bitter taste transduction. *Physiology and Behavior*. 1994; 56: 1149–1155.
- [180] Stefanini M., Martino C. de, Zamboni L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*. 1967; 216: 173–174.
- [181] Stickler D. J., Morris N. S., McLean R. J. C., Fuqua C. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998; 64: 3486–3490.
- [182] Striem B. J., Pace U., Zehavi U., Naim M., Lancet D. Sweet tastants stimulate adenylate cyclase coupled to GTP-binding protein in rat tongue membranes. *The Biochemical Journal*. 1989; 260: 121–126.
- [183] Su H., Wharton J., Polak J., Mulderry P., Ghatei M., Gibson S., Terenghi G., Morrison J., Ballesta J., Bloom S. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in afferent neurons supplying the urinary tract: Combined retrograde tracing and immunohistochemistry. *Neuroscience*. 1986; 18: 727–747.
- [184] Sugimura Y., Cunha G. R., Donjacour A. A. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biology of Reproduction*. 1986; 34: 961–971.
- [185] Sutherland K., Young R. L., Cooper N. J., Horowitz M., Blackshaw L. A. Phenotypic characterization of taste cells of the mouse small intestine. *American Journal of Physiology*. 2007; 292: 8.
- [186] Suzuki Y., Lamb J. C., 4th., McLachlan J. A. Age-dependent morphological changes in the seminal colliculus in male mice. Light and scanning electron microscopic study. *Anatomy and Embryology*. 1979; 158: 1–12.
- [187] Svanborg-Edén C., Svennerholm A.-M. Secretory immunoglobulin A and G antibodies prevent adhesion of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells. *Infection and Immunity*. 1978; 22: 790–797.
- [188] Takai S., Yasumatsu K., Inoue M., Iwata S., Yoshida R., Shigemura N., Yanagawa Y., Drucker D. J., Margolskee R. F., Ninomiya Y. Glucagon-like peptide-1 is

- specifically involved in sweet taste transmission. *The FASEB Journal*. 2015; 29: 2268–2280.
- [189] *Talavera K., Yasumatsu K., Voets T., Droogmans G., Shigemura N., Ninomiya Y., Margolskee R. F., Nilius B.* Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature*. 2005; 438: 1022–1025.
- [190] *Tallini Y. N., Shui B., Greene K. S., Deng K.-Y., Doran R., Fisher P. J., Zipfel W., Kotlikoff M. I.* BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons. *Physiological Genomics*. 2006; 27: 391–397.
- [191] *Tang H. B., DiMango E., Bryan R., Gambello M., Iglewski B. H., Goldberg J. B., Prince A.* Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis in a neonatal mouse model of infection. *Infection and Immunity*. 1996; 64: 37–43.
- [192] *Tang W.-J., Gilman A. G.* Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science*. 1991; 254: 1500–1503.
- [193] *Taruno A., Vingdeux V., Ohmoto M., Ma Z., Dvoryanchikov G., Li A., Adrien L., Zhao H., Leung S., Abernethy M., Koppel J., Davies P., Civan M. M., Chaudhari N., Matsumoto I., Hellekant G., Tordoff M. G., Marambaud P., Foskett J. K.* CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature*. 2013; 495: 223–226.
- [194] *Taylor S. J., Chae H. Z., Rhee S. G., Exton J. H.* Activation of the beta1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins. *Nature*. 1991; 350: 516–518.
- [195] *Thompson R. J., Doran J. F., Jackson P., Dhillon A. P., Rode J.* PGP 9.5 - a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Research*. 1983; 278: 224–228.
- [196] *Tizzano M., Cristofolletti M., Sbarbati A., Finger T. E.* Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways. *BMC Pulmonary Medicine*. 2011; 11: 3–14.
- [197] *Tizzano M., Dvoryanchikov G., Barrows J. K., Kim S., Chaudhari N., Finger T. E.* Expression of Galpha14 in sweet-transducing taste cells of the posterior tongue. *BMC Neuroscience*. 2008; 9: 110.
- [198] *Tizzano M., Gulbransen B. D., Vandenbeuch A., Clapp T. R., Herman J. P., Sibhatu H. M., Churchill M. E. A., Silver W. L., Kinnamon S. C., Finger T. E.* Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 107: 3210–3215.
- [199] *Todd J. K.* Afferent impulses in the pudendal nerves of the cat. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*. 1964; 49: 258–267.
- [200] *Tonosaki K., Funakoshi M.* Cyclic nucleotides may mediate taste transduction. *Nature*. 1988; 331: 354–356.
- [201] *Treuting P. M., Kowalewska J.* Urinary System. In *Treuting P. M., Dintzis S. M.* Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas. Elsevier. 2012; SS. 229- 251.
- [202] *Trier J. S., Allan C. H., Marcial M. A., Madara J. L.* Structural features of the apical and tubulovesicular membranes of rodent small intestinal tuft cells. *The Anatomical Record*. 1987; 219: 69–77.
- [203] *Ugawa S., Yamamoto T., Ueda T., Ishida Y., Inagaki A., Nishigaki M., Shimada S.* Amiloride-insensitive currents of the acid-sensing ion channel-2a (ASIC2a)/ASIC2b heteromeric sour-taste receptor channel. *The Journal of Neuroscience*. 2003; 23: 3616–3622.
- [204] *Ulett G. C., Totsika M., Schaale K., Carey A. J., Sweet M. J., Schembri M. A.* Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Current Opinion in Microbiology*. 2013; 16: 100–107.

- [205] *Valore E. V., Park C. H., Quayle A. J., Wiles K. R., McCray P. B., JR, Ganz T.* Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *The Journal of Clinical Investigation.* 1998; *101*: 1633–1642.
- [206] *Vittoria A., Cocca T., La Mura E., Cecio A.* Immunocytochemistry of paraneurons in the female urethra of the horse, cattle, sheep, and pig. *The Anatomical Record.* 1992; *233*: 18–24.
- [207] *Vittoria A., La Mura E., Cocca T., Cecio A.* Serotonin-, somatostatin- and chromogranin A-containing cells of the urethro-prostatic complex in the sheep. An immunocytochemical and immunofluorescent study. *Journal of Anatomy.* 1990; *171*: 169–178.
- [208] *Widmayer P., Breer H., Hass N.* Candidate chemosensory cells in the porcine stomach. *Histochemistry and Cell Biology.* 2011; *136*: 37–45.
- [209] *Wiederhold S., Papadakis T., Chubanov V., Gudermann T., Krasteva-Christ G., Kummer W.* A novel cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in the murine conjunctiva. *International Immunopharmacology.* 2015; *29*: 45–50.
- [210] *Wilkie T. M., Scherle P. A., Strathmann M. P., Slepak V. Z., Simon M. I.* Characterization of G-protein alpha subunits in the Gq class: expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1991; *88*: 10049–10053.
- [211] *Wong G. T., Gannon K. S., Margolskee R. F.* Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature.* 1996; *381*: 796–800.
- [212] *Wu D., Katz A., Simon M. I.* Activation of phospholipase C beta 2 by the alpha and beta gamma subunits of trimeric GTP-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1993; *90*: 5297–5301.
- [213] *Yan W., Sunavala G., Rosenzweig S., Dasso M., Brand J. G., Spielman A. I.* Bitter taste transduced by PLC-beta(2)-dependent rise in IP(3) and alpha-gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides. *American Journal of Physiology.* 2001; *280*: 51.
- [214] *Ye W., Chang R. B., Bushman J. D., Tu Y. H., Mulhall E. M., Wilson C. E., Cooper A. J., Chick W. S., Hill-Eubanks D. C., Nelson M. T., Kinnamon S. C., Liman E. R.* The K⁺ channel KIR2.1 functions in tandem with proton influx to mediate sour taste transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2016; *113*: 38.
- [215] *Yu Y., Ulbrich M. H., Li M. H., Dobbins S., Zhang W. K., Tong L., Isacoff E. Y., Yang J.* Molecular mechanism of the assembly of an acid-sensing receptor ion channel complex. *Nature Communications.* 2012; *3*: 1252.
- [216] *Zasloff M.* Antimicrobial peptides, innate immunity, and the normally sterile urinary tract. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2007; *18*: 2810–2816.
- [217] *Zeitz K. P., Guy N., Malmberg A. B., Dirajlal S., Martin W. J., Sun L., Bonhaus D. W., Stucky C. L., Julius D., Basbaum A. I.* The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *The Journal of Neuroscience.* 2002; *22*: 1010–1019.
- [218] *Zhang Y., Hoon M. A., Chandrashekar J., Mueller K. L., Cook B., Wu D., Zuker C. S., Ryba N. J. P.* Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell.* 2003; *112*: 293–301.

10. ANHANGSTABELLEN

PGP/eGFP

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#1	0	100	0	3	20
#2	0	65	35	46	37
#3	0	96	4	53	26
#4	0	66	34	32	32
#6	0	50	50	18	13
#7	0	66	34	64	62
\bar{x}	0	73,8	26,2		
SD	±0	±19,7	±19,7		
				Σ 216	Σ 190

5-HT/eGFP

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#2	0	47	53	19	20
#3	0	40	60	35	23
\bar{x}	0	43,5	56,5		
SD	±0	±5	±5		
				Σ 54	Σ 43

CgA/eGFP

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#1	0	100	0	4	32
#4	0	76	24	76	82
#5	0	50	50	6	14
#6	0	36	64	11	18
#7	0	39	61	70	46
\bar{x}	0	60,2	39,8		
SD	±0	±27,3	±27,3		
				Σ 167	Σ 192

Anhangstabelle 1 Prozentualer Anteil PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PGP-, 5-HT- bzw. CgA-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren Urethraanschnitten (n_{Urethraanschnitte}) in der **männlichen penilen Urethra**. #1-#7: Tiernummer.

PGP/eGFP

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Divertikel-anschnitte}
#2	0	57	43	21	6
#6	0	15	85	13	15
#7	0	47	53	19	5
\bar{x}	0	39,7	60,3		
SD	±0	±21,9	±21,9		
				Σ 53	Σ 26

5-HT/eGFP

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Divertikel-} anschnitte
#2	0	37,5	62,5	8	3
#3	0	27	73	11	8
\bar{x}	0	32,3	67,8		
SD	±0	±7,4	±7,4		
				Σ 19	Σ 11

CgA/eGFP

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Divertikel-} anschnitte
#5	0	35	65	31	7

Anhangstabelle 2 Prozentualer Anteil PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PGP-, 5-HT- bzw. CgA-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren Divertikelanschnitten (n_{Divertikelanschnitte}) im **Divertikel der männlichen Urethra**. #2, #3, #5-#7: Tiernummer.

PGP/eGFP

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-} anschnitte
#1	0	33	67	3	4
#2	0	72	28	36	10
#3	0	50	50	14	28
#4	4	40	56	25	13
#5	0	57	43	21	9
#6	0	35	65	113	20
#7	0	40	60	78	26
\bar{x}	0,6	46,7	52,7		
SD	±1,5	±14	±13,7		
				Σ 290	Σ 110

5-HT/eGFP

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-} anschnitte
#1	0	0	100	5	8
#2	0	41	59	41	51
#3	0	40	60	58	56
#4	0	0	100	12	5
#5	0	27	73	11	8
#7	0	67	33	3	5
\bar{x}	0	29,2	70,8		
SD	±0	±26,1	±26,1		
				Σ 130	Σ 133

CgA/eGFP

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-} anschnitte
#2	0	79	21	39	38
#4	3	66	31	29	14
#5	0	62	38	34	18
#6	0	0	100	5	5
#7	0	48	52	27	19
\bar{x}	0,6	51	48,4		
SD	±1,3	±30,6	±31		
				Σ 134	Σ 94

Anhangstabelle 3 Prozentualer Anteil PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PGP-, 5-HT- bzw. CgA-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren Urethraanschnitten (n_{Urethraanschnitte}) in der **männlichen pelvinen Urethra**. #1-#7: Tiernummer.

PGP/eGFP

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Colliculus-} /Urethraanschnitte
#3	0	92	8	12	5/0
#4	0	62	38	34	3/0
#5	0	62	38	120	6/5
#6	0	72	28	120	9/4
#7	0	81	19	91	5/5
\bar{x}	0	73,8	26,2		
SD	±0	±12,9	±12,9		
				Σ 377	Σ 28/14

5-HT/eGFP

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Colliculus-} /Urethraanschnitte
#2	0	86	14	77	4/3
#5	0	76	24	75	7/6
#7	0	67	33	49	5/5
\bar{x}	0	76,3	23,7		
SD	±0	±9,5	±9,5		
				Σ 201	Σ 16/14

CgA/eGFP

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Colliculus- /Urethraanschnitte}
#2	0	91	9	113	4/4
#3	0	64	36	99	16/6
#4	0	72	28	160	6/0
#5	0	73	27	171	11/11
#6	0	81	19	98	5/0
#7	0	94	6	142	5/5
\bar{x}	0	79,2	20,8		
SD	±0	±11,7	±11,7		
				Σ 783	Σ 47/26

Anhangstabelle 4 Prozentualer Anteil PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PGP-, 5-HT- bzw. CgA-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren *Colliculus*-/Urethraanschnitten (n_{Colliculus-/Urethraanschnitte}) im **Colliculus seminalis**. #2-#7: Tiernummer.

PGP/eGFP

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra- anschnitte}
#3	0	100	0	2	1
#4	0	64	36	14	3
#5	0	0	100	2	4
#6	0	0	100	1	5
#10	0	0	0	0	5
#13	0	50	50	6	7
\bar{x}	0	42,8	57,2		
SD	±0	±43,1	±43,1		
				Σ 25	Σ 25

5-HT/eGFP

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra- anschnitte}
#5	0	79	21	19	6
#7	0	83	17	12	9
#8	0	100	0	4	7
#13	0	100	0	1	7
#14	0	62,5	37,5	8	4
\bar{x}	0	84,9	15,1		
SD	±0	±15,8	±15,8		
				Σ 44	Σ 33

CgA/eGFP

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#3	0	60	40	5	5
#4	0	71	29	7	3
#10	0	0	0	0	4
#13	0	0	0	0	2
\bar{x}	0	65,5	34,5		
SD	±0	±7,8	±7,8		
				Σ 12	Σ 14

Anhangstabelle 5 Prozentualer Anteil PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PGP-, 5-HT- bzw. CgA-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren Urethraanschnitten (n_{Urethraanschnitte}) im **Harnblasenhals beider Geschlechter**. #3-#8: Tiernummer Männchen, #10, #13, #14: Tiernummer Weibchen. Die grün markierten Tiere (#10 und #13) wurden nicht in die statistische Auswertung „CgA/eGFP“ aufgenommen.

PGP/eGFP, penile PUDAG, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#2	0	0	0	0	31
#7	0	0	0	0	23
				Σ 0	Σ 54

5-HT/eGFP, penile PUDAG, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#2	0	0	0	0	26
#3	0	0	0	0	11
				Σ 0	Σ 37

CgA/eGFP, penile PUDAG, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#4	0	0	0	0	2
#7	0	0	100	3	12
				Σ 3	Σ 14

Anhangstabelle 6 Prozentualer Anteil PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PGP-, 5-HT- bzw. CgA-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren PUDAG-Anschnitten (n_{PUDAG-Anschnitte}) in den **penilen PUDAG des Männchens**. #2-#4, #7: Tiernummer. Die grün markierten Tiere (#2-#4 und #7) wurden nicht in die Auswertung „PGP/eGFP, penile PUDAG, Männchen“ bzw. „5-HT/eGFP, penile PUDAG, Männchen“ bzw. „CgA/eGFP, penile PUDAG, Männchen“ aufgenommen.

PGP/eGFP, pelvine PUDAG, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#1	0	0	0	0	23
#2	0	29	71	7	64
#3	0	69	31	16	129
#4	0	36	64	11	72
#5	0	33	67	3	61
#6	0	0	100	4	232
#7	0	25	75	4	131
\bar{x}	0	32	68		
SD	±0	±22,2	±22,2		
				Σ 45	Σ 712

5-HT/eGFP, pelvine PUDAG, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#1	0	50	50	6	30
#2	0	32	68	31	325
#3	0	56	44	25	199
#4	0	0	100	4	26
#5	0	0	100	1	32
#7	0	0	100	5	44
\bar{x}	0	23	77		
SD	±0	±26,4	±26,4		
				Σ 72	Σ 656

CgA/eGFP, pelvine PUDAG, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#2	0	82	18	17	235
#4	0	55	45	20	126
#5	0	71	29	14	99
#6	0	0	0	0	53
#7	0	90	10	10	104
\bar{x}	0	74,5	25,5		
SD	±0	±15,2	±15,2		
				Σ 61	Σ 617

Anhangstabelle 7 Prozentualer Anteil PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PGP-, 5-HT- bzw. CgA-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren PUDAG-Anschnitten (n_{PUDAG-Anschnitte}) in den **pelvinen PUDAG des Männchens**. #1-#7: Tiernummer. Das grün markierte Tier (#6) wurde nicht in die statistische Auswertung „CgA/eGFP, pelvine PUDAG, Männchen“ aufgenommen.

PGP/eGFP, AG Blasenhals, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{AG-Anschnitte}
#3	0	65	35	17	55
#4	0	50	50	6	11
#5	0	78	22	32	36
#6	0	86	14	7	25
\bar{x}	0	69,8	30,3		
SD	±0	±15,8	±15,8		
				Σ 62	Σ 127

5-HT/eGFP, AG Blasenhals, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{AG-Anschnitte}
#5	0	79	21	24	45
#7	0	100	0	16	38
\bar{x}	0	89,5	10,5		
SD	±0	±14,8	±14,8		
				Σ 40	Σ 83

CgA/eGFP, AG Blasenhals, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{AG-Anschnitte}
#3	0	58	42	12	64
#4	0	78	22	18	34
#5	0	0	0	0	4
\bar{x}	0	68	32		
SD	±0	±14,1	±14,1		
				Σ 30	Σ 102

Anhangstabelle 8 Prozentualer Anteil PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PGP-, 5-HT- bzw. CgA-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren AG-Anschnitten (n_{AG-Anschnitte}) im Bereich des **Blasenhalbes des Männchens**. #3-#7: Tiernummer. Das grün markierte Tier (#5) wurde nicht in die Auswertung „CgA/eGFP, AG Blasenhals, Männchen“ aufgenommen.

PGP/eGFP, distale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{urethra-anschnitte}
#10	0	29	71	24	7
#11	0	53	47	183	47
#12	0	23	77	96	22
#13	0	30	70	23	8
\bar{x}	0	33,8	66,3		
SD	±0	±13,2	±13,2		
				Σ 326	Σ 84

5-HT/eGFP, distale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#10	0	43	57	7	5
#13	0	31	69	16	11
\bar{x}	0	37	63		
SD	±0	±8,5	±8,5		
				Σ 23	Σ 16

CgA/eGFP, distale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#10	0	32	68	31	11
#11	0	61	39	204	46
#12	0	26	74	148	23
#13	0	38	62	29	11
\bar{x}	0	39,3	60,8		
SD	±0	±15,3	±15,3		
				Σ 412	Σ 91

Anhangstabelle 9 Prozentualer Anteil PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PGP-, 5-HT- bzw. CgA-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren Urethraanschnitten (n_{Urethraanschnitte}) in der **weiblichen distalen Urethra**. #10-#13: Tiernummer.

PGP/eGFP, proximale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#10	1	55	44	135	38
#11	0	70	30	10	3
#12	0	33	67	30	5
#13	0	75	25	16	4
\bar{x}	0,3	58,3	41,5		
SD	±0,5	±18,9	±18,8		
				Σ191	Σ50

5-HT/eGFP, proximale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#10	0	33	67	18	12
#11	0	80	20	5	3
#13	0	100	0	2	3
\bar{x}	0	71	29		
SD	±0	±34,4	±34,4		
				Σ 25	Σ 18

CgA/eGFP, proximale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#10	0	36	64	107	45
#11	0	75	25	8	3
#12	0	10	90	10	5
#13	0	62	38	50	19
\bar{x}	0	45,8	54,3		
SD	±0	±28,8	±28,8		
				Σ 175	Σ 72

Anhangstabelle 10 Prozentualer Anteil PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PGP-, 5-HT- bzw. CgA-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren Urethraanschnitten (n_{Urethraanschnitte}) in der **weiblichen proximalen Urethra**. #10-#13: Tiernummer.

PGP/eGFP, PUDAG distale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#10	0	0	100	1	14
#11	0	67	33	3	130
#12	0	0	100	3	10
#13	0	50	50	2	32
\bar{x}	0	29,3	70,8		
SD	±0	±34,5	±34,5		
				Σ 9	Σ 186

5-HT/eGFP, PUDAG distale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#10	0	0	0	0	10

CgA/eGFP, PUDAG distale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#10	0	50	50	2	13
#11	0	0	0	0	123
#12	0	0	0	0	65
#13	0	25	75	8	57
\bar{x}	0	37,5	62,5		
SD	±0	±17,7	±17,7		
				Σ 10	Σ 258

Anhangstabelle 11 Prozentualer Anteil PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PGP-, 5-HT- bzw. CgA-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PGP-, 5-HT- bzw. CgA-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren PUDAG-Anschnitten (n_{PUDAG-Anschnitte}) in den **PUDAG der distalen Urethra des Weibchens**. #10-#13: Tiernummer. Die grün markierten Tiere (#10-#12) wurden nicht in die statistische Auswertung „5-HT/eGFP, PUDAG distale Urethra, Weibchen“ bzw. „CgA/eGFP, PUDAG distale Urethra, Weibchen“ aufgenommen.

Villin/eGFP, penile Urethra, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#1	0	33	67	3	16
#2	20	80	0	93	34
#3	35	63	2	81	45
#4	15	69	15	26	41
#5	11	89	0	9	11
#6	20	80	0	5	9
#7	24	76	0	17	10
\bar{x}	17,9	70	12		
SD	±10,9	±18,3	±24,9		
				Σ 234	Σ 166

Villin/eGFP, Divertikel, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Divertikel-anschnitte}
#2	19	81	0	42	12
#3	27	73	0	33	15
#5	73	27	0	11	4
#8	30	61	9	23	8
#9	80	14	6	111	6
\bar{x}	45,8	51,2	3		
SD	±28,4	±29,3	±4,2		
				Σ 220	Σ 45

Villin/eGFP, pelvine Urethra, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#1	0	100	0	6	7
#2	16	84	0	256	68
#3	58	42	0	158	38
#4	43	55	2	53	14
#5	50	43	7	14	8
#6	25	75	0	24	5
#7	17	83	0	24	8
\bar{x}	29,9	68,9	1,3		
SD	±21	±22,4	±2,6		
				Σ 535	Σ 148

Villin/eGFP, Colliculus seminalis, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Colliculus- /Urethraanschnitte}
#2	4	95	1	133	4/4
#3	8	92	0	249	8/6
#4	24	76	0	66	4/0
#5	48	50	2	44	4/4
#7	3	95	2	57	5/4
\bar{x}	17,4	81,6	1		
SD	±19,1	±19,3	±1		
				Σ 549	Σ 25/18

Villin/eGFP, Blasenhal, Männchen und Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#3	0	90	10	29	2
#4	0	89	11	9	3
#5	0	100	0	1	4
#10	0	0	0	0	4
#13	0	0	0	0	2
\bar{x}	0	93	7		
SD	±0	±6,1	±6,1		
				Σ 39	Σ 15

Anhangstabelle 12 Prozentualer Anteil Villin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), Villin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und Villin-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren Urethraanschnitten (n_{Urethraanschnitte}) bzw. Divertikelanschnitten (n_{Divertikelanschnitte}) bzw. Colliculus- und Urethraanschnitten (n_{Colliculus-/Urethraanschnitte}) in der **männlichen Urethra**, eingeteilt nach Organabschnitten bzw. dem **Blasenhal**s beider Geschlechter. #1-#9: Tiernummern Männchen, #10 und #13: Tiernummern Weibchen. Die grün markierten Tiere (#10 und #13) wurden nicht in die statistische Auswertung „Villin/eGFP, Blasenhal, Männchen und Weibchen“ aufgenommen.

Villin/eGFP, PUDAG penile Urethra, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#2	0	100	0	4	33
#3	100	0	0	1	10
#4	0	0	0	0	2
\bar{x}	50	50	0		
SD	±70,7	±70,7	±0		
				Σ 5	Σ 45

Villin/eGFP, PUDAG Divertikel, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#8	0	0	0	0	32
#9	20	20	60	5	39
				Σ 5	Σ 71

Villin/eGFP, PUDAG pelvine Urethra, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#1	31	69	0	13	48
#2	7	67	26	42	410
#3	22	73	5	63	223
#4	35	65	0	23	109
#5	50	0	50	2	57
#6	22	78	0	9	41
#7	33	67	0	6	54
\bar{x}	28,6	59,9	11,6		
SD	±13,4	±26,8	±19,4		
				Σ 158	Σ 942

Villin/eGFP, AG Blasenhal, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{AG-Anschnitte}
#3	100	0	0	1	29
#4	29	71	0	17	24
#5	0	100	0	10	20
\bar{x}	43	57	0		
SD	±51,4	±51,4	±0		
				Σ 28	Σ 73

Anhangstabelle 13 Prozentualer Anteil Villin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), Villin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und Villin-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren PUDAG- bzw. AG-Anschnitten (n_{PUDAG-Anschnitte} bzw. n_{AG-Anschnitte}) in den **PUDAG** eingeteilt nach Organabschnitten bzw. **AG im Bereich des Blasenhalbes des Männchens**. #1-#9: Tiernummern Männchen. Die grün markierten Tiere (#4, #8) wurden nicht in die statistische Auswertung „Villin/eGFP, PUDAG penile Urethra, Männchen“ bzw. „Villin/eGFP, PUDAG Divertikel, Männchen“ aufgenommen.

Villin/eGFP, distale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#11	46	53	1	217	55
#12	27	73	0	33	5
#13	61	36	3	31	6
\bar{x}	44,7	54	1,3		
SD	±17	±18,5	±1,5		
				Σ 281	Σ 66

Villin/eGFP, proximale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#10	26	74	0	53	29
#11	0	100	0	18	3
#12	50	50	0	16	5
#13	39	55	6	31	11
\bar{x}	28,8	69,8	1,5		
SD	±21,5	±22,7	±3		
				Σ 118	Σ 60

Anhangstabelle 14 Prozentualer Anteil Villin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), Villin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und Villin-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren Urethraanschnitten (n_{Urethraanschnitte}) in der weiblichen Urethra, eingeteilt nach Organabschnitten. #10-#13: Tiernummern Weibchen.

Villin/eGFP, PUDAG distale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#11	37	63	0	8	120
#12	100	0	0	2	15
#13	0	67	33	3	11
\bar{x}	45,7	43,3	11		
SD	±50,6	±37,6	±19,1		
				Σ 13	Σ 146

Anhangstabelle 15 Prozentualer Anteil Villin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), Villin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und Villin-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren PUDAG-Anschnitten (n_{PUDAG-Anschnitte}) in den PUDAG der distalen weiblichen Urethra. #11-#13: Tiernummern Weibchen.

Gustducin/eGFP, penile Urethra, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#1	0	0	0	0	13
#4	38	8	54	24	92
#5	57	0	43	7	30
\bar{x}	47,5	4	48,5		
SD	±13,4	±5,7	±7,8		
				Σ 31	Σ 135

Gustducin/eGFP, Divertikel, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Divertikel-anschnitte}
#5	73	0	27	56	8
#8	0	0	100	2	12
#9	65	0	35	114	9
\bar{x}	46	0	54		
SD	±40	±0	±40		
				Σ 172	Σ 29

Gustducin/eGFP, pelvine Urethra, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#1	8	0	92	13	15
#4	0	0	100	5	9
#5	29	0	71	7	9
#7	0	0	100	1	5
\bar{x}	9,3	0	90,8		
SD	±13,7	±0	±13,7		
				Σ 26	Σ 38

Gustducin/eGFP, *Colliculus seminalis*, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Colliculus- /Urethraanschnitte}
#4	0	0	100	1	2/0
#5	26	5	69	58	9/9
#7	17	12	71	24	5/5
\bar{x}	14,3	5,7	80		
SD	±13,2	±6	±17,3		
				Σ 83	Σ 16/14

Gustducin/eGFP, Blasenhal, Männchen und Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#3	0	0	0	0	2
#4	0	0	100	2	3
#5	0	0	100	1	4
#10	0	0	0	0	4
#13	0	0	0	0	6
\bar{x}	0	0	100		
SD	±	±	±0		
				Σ 3	Σ 19

Anhangstabelle 16 Prozentualer Anteil Gustducin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), Gustducin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und Gustducin-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren Urethraanschnitten (n_{Urethraanschnitte}) bzw. Divertikelanschnitten (n_{Divertikelanschnitte}) bzw. Colliculus- und Urethraanschnitten (n_{Colliculus-/Urethraanschnitte}) in der **männlichen Urethra**, eingeteilt nach Organabschnitten bzw. dem **Blasenhal beider Geschlechter**. #1, #3-5, #7-#9: Tiernummern Männchen, #10 und #13: Tiernummern Weibchen. Die grün markierten Tiere (#1, #10, #13) wurden nicht in die statistische Auswertung „Gustducin/eGFP, penile Urethra, Männchen“ bzw. „Gustducin/eGFP, Blasenhal, Männchen und Weibchen“ aufgenommen.

Gustducin/eGFP, PUDAG Divertikel, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#5	33	0	67	3	10
#8	0	0	100	2	68
#9	17	0	83	6	28
\bar{x}	16,7	0	83,3		
SD	±16,5	±0	±16,5		
				Σ 11	Σ 106

Gustducin/eGFP, PUDAG pelvine Urethra, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#1	0	0	100	7	56
#4	0	0	100	3	56
#5	50	0	50	8	62
#7	0	0	100	6	50
\bar{x}	12,5	0	87,5		
SD	±25	±0	±25		
				Σ 24	Σ 224

Gustducin/eGFP, AG Blasenhal, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{AG-Anschnitte}
#3	0	0	100	12	30
#5	0	0	100	2	25
\bar{x}	0	0	100		
SD	±0	±0	±0		
				Σ 14	Σ 55

Anhangstabelle 17 Prozentualer Anteil Gustducin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), Gustducin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und Gustducin-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren PUDAG- bzw. AG-Anschnitten (n_{PUDAG-Anschnitte} bzw. n_{AG-Anschnitte}) in den **PUDAG** eingeteilt nach Organabschnitten bzw. **AG im Bereich des Blasenhalbes des Männchens**. #1, #3-#5, #7-#9: Tiernummern Männchen.

Gustducin/eGFP, distale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-Anschnitte}
#10	0	0	100	128	39
#11	56	0	44	70	38
#12	29	8	63	143	40
#13	4	0	96	25	9
\bar{x}	22,3	2	75,8		
SD	±25,9	±4	±26,9		
				Σ 366	Σ 126

Gustducin/eGFP, proximale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-Anschnitte}
#10	44	0	56	9	14
#11	0	0	100	2	3
#12	35	0	65	43	24
#13	41	0	59	22	13
\bar{x}	30	0	70		
SD	±20,3	±0	±20,3		
				Σ 76	Σ 54

Anhangstabelle 18 Prozentualer Anteil Gustducin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), Gustducin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und Gustducin-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren Urethraanschnitten (n_{Urethraanschnitte}) in der **weiblichen Urethra**, eingeteilt nach Organabschnitten. #10-#13: Tiernummern Weibchen.

Gustducin/eGFP, PUDAG distale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#10	0	0	100	24	115
#11	100	0	0	1	111
#12	0	0	100	3	132
#13	100	0	0	2	21
\bar{x}	50	0	50		
SD	±57,7	±0	±57,7		
				Σ 30	Σ 379

Anhangstabelle 19 Prozentualer Anteil Gustducin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), Gustducin-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und Gustducin-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren PUDAG-Anschnitten (n_{PUDAG-Anschnitte}) in den **PUDAG der distalen weiblichen Urethra**. #10-#13: Tiernummern Weibchen.

PLCβ2/eGFP, penile Urethra, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#1	0	100	0	2	10
#4	36	61	3	64	84
#5	3	94	3	28	12
#6	67	33	0	3	25
#7	30	50	20	10	28
\bar{x}	27,3	67,4	5,3		
SD	±27,3	±28,5	±8,4		
				Σ 107	Σ 159

PLCβ2/eGFP, Divertikel, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Divertikel-anschnitte}
#5	61	36	3	33	4
#8	19	81	0	31	12
#9	62	32	6	123	6
\bar{x}	47,3	49,7	3		
SD	24,5	27,2	3		
				Σ 187	Σ 22

PLCβ2/eGFP, pelvine Urethra, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#1	73	20	7	15	15
#4	0	100	0	4	6
#5	20	77	3	39	10
#6	75	12,5	12,5	8	5
#7	33	11	56	9	16
\bar{x}	40,2	44,1	15,7		
SD	33	41,5	23		
				Σ 75	Σ 52

PLCβ2/eGFP, *Colliculus seminalis*, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Colliculus- /Urethraanschnitte}
#3	80	20	0	5	1/0
#4	31	6	63	16	2/0
#5	43	57	0	42	4/4
#6	43	33	24	21	5/0
#7	81	8	11	26	5/5
\bar{x}	55,6	24,8	19,6		
SD	23,3	21	26,2		
				Σ 110	Σ 17/9

PLCβ2/eGFP, Blasenhal, Männchen und Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#3	0	100	0	2	1
#4	33	67	0	3	3
#5	0	0	0	0	4
#6	0	0	0	0	5
#10	0	100	0	1	5
#13	100	0	0	1	7
\bar{x}	33,3	66,8	0		
SD	±47,1	±47,1	±0		
				Σ 7	Σ 25

Anhangstabelle 20 Prozentualer Anteil PLCβ2-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PLCβ2-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PLCβ2-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren Urethraanschnitten (n_{Urethraanschnitte}) bzw. Divertikelanschnitten (n_{Divertikelanschnitte}) bzw. *Colliculus*- und Urethraanschnitten (n_{Colliculus-/Urethraanschnitte}) in der **männlichen Urethra**, eingeteilt nach Organabschnitten bzw. dem **Blasenhal beider Geschlechter**. #1, #3-#9: Tiernummern Männchen, #10 und #13: Tiernummern Weibchen. Die grün markierten Tiere (#5, #6) wurden nicht in die statistische Auswertung „PLCβ2/eGFP, Blasenhal, Männchen und Weibchen“ aufgenommen.

PLCβ2/eGFP, PUDAG penile Urethra, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#4	0	0	0	0	2

PLCβ2/eGFP, PUDAG Divertikel, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#8	0	0	0	0	52
#9	60	40	0	5	32
				Σ 5	Σ 84

PLCβ2/eGFP, PUDAG pelvine Urethra, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#1	100	0	0	5	92
#4	67	0	33	6	65
#5	50	50	0	12	73
#6	0	0	0	0	59
#7	67	33	0	6	122
\bar{x}	71	20,8	8,3		
SD	±20,9	±24,9	±16,5		
				Σ 29	Σ 411

PLCβ2/eGFP, AG Blasenhalshals, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{AG-Anschnitte}
#3	0	88	12	26	43
#4	100	0	0	4	5
#5	86	14	0	7	19
\bar{x}	62	34	4		
SD	±54,1	±47,3	±6,9		
				Σ 37	Σ 67

Anhangstabelle 21 Prozentualer Anteil PLCβ2-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PLCβ2-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PLCβ2-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren PUDAG- bzw. AG-Anschnitten (n_{PUDAG-Anschnitte} bzw. n_{AG-Anschnitte}) in den **PUDAG** eingeteilt nach Organabschnitten bzw. **AG im Bereich des Blasenhalshalses des Männchens**. #1, #3-#9: Tiernummern Männchen. Die grün markierten Tiere (#4, #8, #6) wurden nicht in die statistische Auswertung „PLCβ2/eGFP, PUDAG penile Urethra, Männchen“ bzw. „PLCβ2/eGFP, PUDAG Divertikel, Männchen“ bzw. „PLCβ2/eGFP, PUDAG pelvine Urethra, Männchen“ aufgenommen.

PLCβ2/eGFP, distale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#10	67,5	15	17,5	206	36
#11	63	21	16	90	33
#12	72	15	13	93	25
#13	31	46	23	39	12
\bar{x}	58,4	24,3	17,4		
SD	18,6	14,8	4,2		
				Σ 428	Σ 106

PLCβ2/eGFP, proximale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#10	0	47	53	17	14
#11	31	44	25	16	4
#12	44	28	28	18	9
#13	36	32	32	25	15
\bar{x}	27,8	37,8	34,5		
SD	19,3	9,2	12,7		
				Σ 76	Σ 42

Anhangstabelle 22 Prozentualer Anteil PLCβ2-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PLCβ2-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PLCβ2-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren Urethraanschnitten (n_{Urethraanschnitte}) in der **weiblichen Urethra**, eingeteilt nach Organabschnitten. #10-#13: Tiernummern Weibchen.

PLCβ2/eGFP, PUDAG distale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#10	58	20	22	40	111
#11	33	59	8	12	135
#12	54	38	8	13	31
#13	89	0	11	18	60
\bar{x}	58,5	29,3	12,3		
SD	±23,1	±25,2	±6,7		
				Σ 83	Σ 337

Anhangstabelle 23 Prozentualer Anteil PLCβ2-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), PLCβ2-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und PLCβ2-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren PUDAG-Anschnitten (n_{PUDAG-Anschnitte}) in den **PUDAG der distalen weiblichen Urethra**. #10-#13: Tiernummern Weibchen.

TRPM5/eGFP, penile Urethra, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#4	100	0	0	3	29
#5	93	7	0	28	34
#6	55	45	0	22	48
#7	100	0	0	2	22
\bar{x}	87	13	0		
SD	±21,6	±21,6	±0		
				Σ 55	Σ 133

TRPM5/eGFP, Divertikel, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Divertikel-anschnitte}
#5	84	8	8	13	3
#6	89	11	0	9	20
#8	75	0	25	8	19
#9	94	4	2	135	12
\bar{x}	85,5	5,8	8,8		
SD	±8,1	±4,8	±11,4		
				Σ 165	Σ 54

TRPM5/eGFP, pelvine Urethra, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#5	89	0	11	19	11
#6	97	2	1	105	32
#7	92	8	0	37	18
\bar{x}	92,7	3,3	4		
SD	±4	±4,2	±6,1		
				Σ 161	Σ 61

TRPM5/eGFP, *Colliculus seminalis*, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Colliculus- /Urethraanschnitte}
#5	85	7	8	135	25/8
#7	55	10	35	62	16/5
#8	52	20	28	56	31/7
#9	89	6	5	121	18/793
\bar{x}	70,3	10,8	19		
SD	±19,4	±6,4	±14,8		
				Σ 374	Σ 90/813

TRPM5/eGFP, Blasenhals, Männchen und Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#5	100	0	0	1	14
#7	100	0	0	3	20
#8	100	0	0	4	10
#13	0	0	0	0	12
#14	100	0	0	2	8
\bar{x}	100	0	0		
SD	±0	±0	±0		
				Σ 10	Σ 64

Anhangstabelle 24 Prozentualer Anteil TRPM5-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), TRPM5-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und TRPM5-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren Urethraanschnitten (n_{Urethraanschnitte}) bzw. Divertikelanschnitten (n_{Divertikelanschnitte}) bzw. Colliculus- und Urethraanschnitten (n_{Colliculus-/Urethraanschnitte}) in der **männlichen Urethra**, eingeteilt nach Organabschnitten bzw. dem **Blasen Hals beider Geschlechter**. #4-#9: Tiernummern Männchen, #13 und #14: Tiernummern Weibchen. Das grün markierte Tier (#13) wurden nicht in die statistische Auswertung „TRPM5/eGFP, Blasen Hals, Männchen und Weibchen“ aufgenommen.

TRPM5/eGFP, PUDAG penile Urethra, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#5	0	0	0	0	3

TRPM5/eGFP, PUDAG pelvine Urethra, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#5	67	33	0	3	65
#6	100	0	0	29	326
#7	100	0	0	3	104
\bar{x}	89	11	0		
SD	±19,1	±19,1	±0		
				Σ 35	Σ 495

TRPM5/eGFP, AG Blasenhal, Männchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{AG-Anschnitte}
#5	91	9	0	23	106
#7	80	20	0	5	72
#8	0	0	0	0	120
\bar{x}	85,5	14,5	0		
SD	±7,8	±7,8	±0		
				Σ 28	Σ 298

Anhangstabelle 25 Prozentualer Anteil TRPM5-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), TRPM5-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und TRPM5-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren PUDAG- bzw. AG-Anschnitten (n_{PUDAG-Anschnitte} bzw. n_{AG-Anschnitte}) in den **PUDAG** eingeteilt nach Organabschnitten bzw. **AG im Bereich des Blasenhalbes des Männchens**. #5-#8: Tiernummern Männchen. Die grün markierten Tiere (#5, #8) wurden nicht in die statistische Auswertung „TRPM5/eGFP, PUDAG penile Urethra, Männchen“ bzw. „PLCβ2/eGFP, PUDAG Divertikel, Männchen“ bzw. „TRPM5/eGFP, AG Blasenhal, Männchen“ aufgenommen.

TRPM5/eGFP, distale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#12	97	0	3	163	34
#13	89	0	11	36	17
\bar{x}	93	0	7		
SD	±5,7	±0	±5,7		
				Σ 199	Σ 51

TRPM5/eGFP, proximale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{Urethra-anschnitte}
#11	100	0	0	1	3
#12	100	0	0	18	10
#13	100	0	0	25	13
\bar{x}	100	0	0		
SD	±0	±0	±0		
				Σ 44	Σ 26

Anhangstabelle 26 Prozentualer Anteil TRPM5-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), TRPM5-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und TRPM5-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren Urethraanschnitten (n_{Urethraanschnitte}) in der **weiblichen Urethra**, eingeteilt nach Organabschnitten. #11-#13: Tiernummern Weibchen.

TRPM5/eGFP, PUDAG distale Urethra, Weibchen

	+/+	+/-	-/+	n _{total}	n _{PUDAG-Anschnitte}
#12	56	6	38	16	145
#13	80	0	20	20	70
\bar{x}	68	3	29		
SD	±17	±4,2	±12,7		
				Σ 26	Σ 215

Anhangstabelle 27 Prozentualer Anteil TRPM5-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (+/+), TRPM5-positiver ChAT^{BAC}-eGFP-negativer (+/-) und TRPM5-negativer ChAT^{BAC}-eGFP-positiver (-/+) Zellen an der absoluten Anzahl ausgezählter Zellen (n_{total}), summiert aus mehreren PUDAG-Anschnitten (n_{PUDAG-Anschnitte}) in den **PUDAG der distalen weiblichen Urethra**. #12, #13: Tiernummern Weibchen.

11. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS UND AUFLISTUNG DER KONGRESSBEITRÄGE

11.1 Originalarbeit

*Deckmann K. *, Filipski K. *, Krasteva-Christ G., Fronius M., Althaus M., Rafiq A., Papadakis T., Renno L., Jurastow I., Wessels L., Wolff M., Schutz B., Weihe E., Chubanov V., Gudermann T., Klein J., Bschiepfer T., Kummer W.* Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014; *111*: 8287–8292. *gleichwertige Erstautorenschaft

11.2 Kongressbeiträge

1. *Filipski K., Wolff M., Papadakis T., Bschiepfer T., Krasteva G., Kummer W.* Chemosensitive Bürstenzellen in der Urethra der Maus.
Posterpräsentation auf der 29. Arbeitstagung der *Anatomischen Gesellschaft* in Würzburg, 26.-28. September 2012.
Gewinn des Posterpreises 2012 der *Anatomischen Gesellschaft*
2. *Filipski K., Papadakis T., Wolff M., Schütz B., Weihe E., Bschiepfer T., Krasteva-Christ G., Kummer W.* Cholinergic brush cells expressing chemoreceptor traits in the murine urethra.
Posterpräsentation auf der 1. Tagung des *LOEWE-Research Focus Non-Neuronal Cholinergic Systems* in Gießen, 10. November 2012.
3. *Filipski K. *, 1, Deckmann K. *, Bschiepfer T., 2, Krasteva-Christ G., Papadakis T., Rafiq A., Wolff M., Ibanez-Tallon I., Schütz B., Weihe E., Kummer W.* A new cell in the urogenital tract - cholinergic chemosensory brush cells are sentinels of the urethra. *gleichwertige Erstautorenschaft
Vortrag auf dem 28. Kongress der *European Association of Urology* in Mailand, 15.-19. März 2013.
Gewinn des zweiten Preises für das beste Abstract (Non-Oncology)

*Filipski K. *, Deckmann K. *, Papadakis T., Wolff M., Schütz B., Weihe E., Bschiepfer T., Krasteva G., Kummer W.* Cholinergic brush cells expressing chemoreceptor traits in the murine urethra. *gleichwertige Erstautorenschaft
Posterpräsentation auf dem 28. Kongress der *European Association of Urology* in Mailand, 15.-19. März 2013.
Gewinn des Preises für das beste Poster in der Poster-Session „Neuro-urology: Basic research“

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 Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13. DANKSAGUNG

Mein größtes Dankeschön gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Kummer, der mich den Grundstein für die Erforschung der urethralen chemosensitiven Bürstenzellen legen ließ. Über die Jahre hinweg stand er mir mit Rat und Tat bezüglich fachlichen sowie persönlichen Fragen zur Seite und schuf ein inspirierendes Umfeld für eigene Ideen zur Mitgestaltung des Forschungsprojekts. Sein fortwährender Elan prägte nachhaltig.

Den Mitarbeitern der Abteilung für kardiopulmonale Neurobiologie danke ich für die freundliche und herzliche Aufnahme in das Team, hierunter besonders Tamara Papadakis, Martin Bodenbenner-Türich, Patricia Berger, Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ, Dr. Rajender Nandigama, Aya Sultanova, Liane Renno und auch Claudia Tag. Tamara Papadakis danke ich für ihre Zeit und unermüdliche Geduld bei der Einarbeitung in die Immunhistochemie, Fluoreszenzmikroskopie und allem Drum und Dran, wobei anzumerken ist, dass sich hinter diesen unscheinbaren Worten so einiges versteckt. Martin Bodenbenner-Türich danke ich für seine Unterstützung bei der Beschaffung, Haltung, Tötung und Perfusionsfixation der Versuchstiere sowie tatkräftige Hilfe bei allen möglichen alltäglichen Hürden.

Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ, Dr. Klaus Deckmann, Dr. Amir Rafiq, Dr. Zbigniew Mikulski, Prof. Dr. Dr. Thomas Bschiepfer und vielen meiner Mitdoktoranden möchte ich meinen Dank ausdrücken für anregende Diskussionen, Kritik, fachliche Hilfestellungen, Anregungen und die schöne gemeinsame Zeit. Besonders bei Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ bedanke ich mich sehr für die gemeinsame Anfertigung und die Überlassung der makroskopischen Bilder für meine Doktorarbeit.

Karola Michel danke ich für ihre Unterstützung bei Fragen rund ums Grafikdesign und bei der Ausgestaltung meiner Poster.

Meinen herzlichen Danke möchte ich weiterhin Patricia Berger für alle bürokratische und organisatorische Belange und nicht zuletzt ihre beständige Freundlichkeit ausdrücken.

Zuletzt danke ich Andreas Weber, meinen Freunden und meiner Familie für die durchgehende und langatmige seelische Unterstützung.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6633-8



9 783835 196633 8