

Aus der Anatomischen Anstalt (Lehrstuhl II)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. U. Welsch

**Ultrastrukturelle und immunhistochemische Untersuchungen am
Atemwegsepithel der etruskischen Spitzmaus, *Suncus etruscus***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dorothea Hatz

aus

Offenburg

2005

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Bartels

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Schliwa

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen
Prüfung: 23.06.2005

Inhalt

1	Einleitung	4
1.1	Speziesbedingte Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung des Atemwegepithels	5
1.2	Suncus etruscus – physiologische Extreme des kleinsten europäischen Säugetiers	7
1.3	Ziel der Arbeit	8
2	Material und Methoden	10
2.1	Tiere	10
2.2	Fixierung der entnommenen Organe	10
2.3	Transmissionselektronenmikroskopie	10
2.3.1	Verhältnis der Flimmerzellen zu kinezilienfreien Zellen	11
2.4	Rasterelektronenmikroskopie	11
2.5	Immunhistochemie	11
3	Befunde	14
3.1	Trachea	14
3.1.1	Ultrastruktur des Trachealepithels	17
3.1.1.1	Flimmerzellen	17
3.1.1.2	Sekretorische Zellen	22
3.1.1.3	Neuroendokrine Zellen	28
3.2	Intrapulmonale Atemwege	31
3.2.1	Ultrastruktur des Epithels der intrapulmonalen Atemwege	31
3.2.1.1	Flimmerzellen	31
3.2.1.2	Clara Zellen	32
3.2.1.3	Neuroendokrine Zellen und neuroepitheliale Körper	34
3.3	Immunhistochemie	37
4	Diskussion	39
5	Zusammenfassung	49
6	Literatur	51

1 Einleitung

Die Atemwege bilden ein verzweigtes Röhrensystem für den konvektiven Transport der Atemgase O_2 und CO_2 , das die Umgebung des Körpers mit den Lungenalveolen als Ort des Gasaustausches zwischen Luft und Blut verbindet (Weibel 1963, Horsfield 1978). Die Atemwege umfassen die Nase, den Pharynx, den Larynx, die Trachea, die Bronchien und Bronchiolen. Da in den Atemwegen mit Ausnahme der letzten Aufzweigungen der Bronchiolen, in deren Wand zumindest bei einigen Spezies, wie z. B. dem Mensch, Alveolen vorkommen, kein Gasaustausch stattfindet, stellen die Atemwege den sogenannten anatomischen Totraum dar. Die intrapulmonale, unregelmäßig dichotome Aufzweigung der Atemwege in zahlreiche – beim Menschen bis zu 19 – Generationen von Bronchien und Bronchiolen (Horsfield und Cumming 1968, Horsfield 1978) ist die Voraussetzung für eine den physiologischen Erfordernissen angepasste Verteilung der inhalierten Luft innerhalb der Lunge.

Während der Passage durch die Atemwege wird die inhalierte Luft von Fremd- und Schadstoffen gereinigt, erwärmt und angefeuchtet. Die Voraussetzung für eine effektive und kontinuierliche Reinigung ist das fein aufeinander abgestimmte Zusammenwirken von Flimmerzellen, deren Kinozilien in allen Abschnitten der Atemwege rachenwärts schlagen, und den sekretorischen Zellen im Deckepithel und in den Drüsen der Atemwege (Nadel 1985, Nadel et al. 1985). Die Erwärmung der inhalierten Luft auf Körpertemperatur erfolgt vor allem im Bereich der Nase mit Hilfe der in der Schleimhaut gelegenen Venenplexus. Die mukosalen Venolen und Venen stellen weiterhin dem Deckepithel und den Drüsen die für die Anfeuchtung notwendige Flüssigkeit zur Verfügung.

1.1 Speziesbedingte Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung des Atemwegepithels

Das Epithel der Atemwege ist in der Regel ein zwei- oder mehrreihiges hochprismatisches Flimmerepithel (Rhodin 1966, Pavelka et al. 1976). Es weist in seiner zellulären Zusammensetzung nicht nur erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies auf, sondern auch innerhalb einer Art existieren Unterschiede zwischen großen und kleinen bzw. zentralen und peripheren Atemwegen (Breeze und Wheeldon 1977, Mariassy 1991, Plopper und Hyde 1991). Während Flimmerzellen bei allen Arten und auf allen Ebenen der Atemwege von der Nase bis hinab in die feinsten Aufzweigungen des Bronchialbaums, den Bronchioli respiratorii, konstant vorhanden sind, betreffen die Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung vor allem die sekretorischen Zellen.

Die sekretorischen Zellen in den Atemwegen können auf Grund morphologischer und histochemischer Charakteristika sowie der chemischen Beschaffenheit des Sekrets unterschieden werden in schleimproduzierende Becherzellen, Zellen mit kleinen Schleimgranula (small mucous granule cell, Mc Dowell et al. 1978), seröse Zellen, seromuköse Zellen und Clara-Zellen (Übersicht : Breeze und Wheeldon 1977, Mariassy 1991). Die sekretorischen Zellen mit kleinen Schleimgranula werden als Becherzellen in einer frühen Phase des Sekretionszyklus angesehen (Mc Dowell et al. 1978). Die seromukösen Zellen stellen Zwischenformen zwischen mukösen und serösen Zellen dar. Ihre Sekretgranula zeichnen sich ultrastrukturell durch einen inhomogenen Inhalt aus. In der Regel findet sich ein elektronendichter „seröser“ Kern, der von einem weniger elektronendichten „mukösen“ Ring umgeben ist (Krause und Leeson 1973, Jeffery und Reid 1975, Mariassy und Plopper 1983). Seromuköse Zel-

len treten vor allem nach chronischer Schadstoffexposition der Atemwege auf, z.B. bei Ratten nach Tabakrauchexposition und wurden auch im „gesunden“ Bronchialepithel von Patienten mit einem Bronchialkarzinom beobachtet (Jeffery 1981).

Clara-Zellen sind durch einen sich ins Lumen vorwölbenden apikalen Zellpol, der ein ausgedehntes glattes endoplasmatisches Retikulum enthält, kugelige oder ovale Sekretgranula und raues endoplasmatisches Retikulum im basalen Zytoplasma charakterisiert (Smith et al. 1979, Plopper 1983) und werden daher auch als „nonciliated bronchiolar cells“ bezeichnet (Mariassy 1991). Sie wurden zuerst von Clara (1937) im Bronchiolarepithel von Mensch und Kaninchen beschrieben. Diese Zellen zeigen eine Reihe speziesbedingter ultrastruktureller Unterschiede (Smith et al. 1979, Plopper 1983, Plopper und Hyde 1991) und kommen bei einigen kleinen Säugetieren (Maus, Kaninchen, Hamster) auch in größeren Atemwegen vor (Pack et al. 1980, Plopper et al. 1983 a,b). Neben diesen exokrinen Zellen kommen in geringer Zahl neuroendokrine Zellen (APUD-Zellen) und neuroepitheliale Körper im Epithel der Atemwege vor (Lauweryns et al. 1972, Scheuermann 1987, 1997, Hoyt et al. 1990, 1991).

Im Tracheal- und Bronchialepithel des Menschen sind die sekretorischen Zellen durch Becherzellen repräsentiert. Diese nehmen in den knorpelfreien Bronchiolen an Zahl ab und sind in den Bronchioli terminales vollständig durch Clara-Zellen ersetzt, die ihrerseits in den großen Atemwegen (Trachea und Bronchien) fehlen (Clara 1937). Seröse Zellen kommen beim Menschen in den Atemwegen zahlreich in den Drüsen (Meyrick et al. 1969), aber sehr selten im Bronchialepithel vor (Gilljam et al. 1987). Sie sind im Trachealepithel nicht beschrieben (Pavelka et al. 1976, Korhonen et al. 1969, Übersicht: Mariassy 1991). Ähnliche Verteilungsmus-

ter der sekretorischen Zellen finden sich im Epithel der Atemwege z.B. bei Rhesusaffen (Plopper et al. 1989) und Schafen (Mariassy et al. 1983).

Im Gegensatz zu der beschriebenen Situation bei Mensch, Rhesus und Schaf ist die seröse Zelle der vorherrschende sekretorische Zelltyp im Tracheal- und Bronchialepithel der Ratte. Becherzellen sind in den unteren Atemwegen bei dieser Spezies sehr selten anzutreffen. Ihre Häufigkeit beträgt ca. 1% oder weniger (Jeffery et al. 1975, Plopper et al. 1983a, Nikula et al. 1988, Evans et al. 1989). In den Bronchiolen sind die serösen Zellen durch Clara-Zellen ersetzt (Young et al. 1986, Chang et al. 1988). Auch im Trachealepithel von Maus, Hamster und Kaninchen sind Becherzellen extrem rar (Kaninchen ca. 1%, Plopper et al. 1983b; Maus <1% Pack et al. 1980) oder fehlen ganz wie beim Hamster (Kennedy et al. 1978; Plopper et al. 1983a). Bei diesen letztgenannten Spezies kommen als sekretorische Zellen in der Trachea und den intrapulmonalen Atemwegen praktisch nur Clara-Zellen vor (Kennedy et al. 1978, Pack et al. 1980, Plopper 1983 a,b).

1.2 Suncus etruscus – physiologische Extreme des kleinsten europäischen Säugetiers

Die etruskische Spitzmaus, *Suncus etruscus*, gehört in die Ordnung der Insektivoren, Familie Soricinae. Sie kommt im Mittelmeerraum vor (Fons 1975). Nach der in Thailand beheimateten Fledermaus *Craesonycteris tonglongyai* ist diese Spitzmaus mit einem Körpergewicht von 2-2,5 g das kleinste nicht fliegende Säugetier (Storch und Welsch 1997). *S. etruscus* zeichnet sich durch einen sehr hohen Metabolismus aus, der extreme Anforderungen an den Kreislauf und die Atmung stellt. In Ruhe beträgt die Herzfrequenz ca. 835 Schläge/min und die Atemfrequenz ca. 660 Atemzüge/min

(Jürgens et al. 1996). Die höchste einzeln gemessene Schlagfrequenz betrug 1511 Schläge/min und die höchste einzeln gemessene Atemfrequenz 894 Atemzüge/min (Jürgens et al. 1996). Während die Atemfrequenz der etruskischen Spitzmaus in Ruhe etwa 47 mal höher als die des Menschen ist, ist die Herzfrequenz nur um den Faktor 12 größer. Um seinen Stoffwechsel aufrecht zu halten, frisst *S. etruscus* täglich das Mehrfache des Körpergewichts an Insekten.

Vergleichende morphometrische Untersuchungen an der Lunge von Spitzmäusen haben ergeben, dass diese Tiere über einen ungewöhnlich ausgedehnten Gasaustauschapparat als Anpassung an den hohen Stoffwechsel verfügen. So beträgt die Oberflächendichte der Alveolen bei *S. etruscus* mit bis zu $1900 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ das Fünffache, die Oberflächendichte der Alveolarkapillaren das Vierfache und die mittlere Dicke der Luft-Blut-Schranke die Hälfte der für die Lunge des Menschen jeweils bestimmten Werte (Gehr et al. 1980). Selbst im Vergleich mit kleinen Säugetieren wie der Maus sind die für *S. etruscus* ermittelten Daten extrem (Gehr et al. 1980).

1.3 Ziel der Arbeit

Während die Lungenalveolen von *S. etruscus* auf Grund des physiologischen Interesses auch unter quantitativen Aspekten hinreichend untersucht sind (Gehr et al. 1980), fehlen morphologische Untersuchungen an den Atemwegen. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die Trachea und die intrapulmonalen Atemwegen von *S. etruscus* in Dünnschnitten transmissions- und rasterelektronenmikroskopisch mit dem Ziel untersucht, die am Aufbau des Epithels beteiligten Zellen ultrastrukturell zu charakterisieren und das Verhältnis von sekretorischen zu Flimmerzellen zu bestimmen. Darüber hinaus wurden die neuroendokrinen Zellen immunhistochemisch

auf das Vorkommen von Substanzen wie Serotonin und Neuropeptide untersucht, die in anderen Spezies regelmäßig in diesen Zellen vorkommen (Übersicht: Scheuermann 1987, 1997).

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

Etruskische Spitzmäuse, *S. etruscus*, wurden in den Pyrenäen in der Gegend von Banyuls-sur-Mer, Frankreich, gefangen und in der dortigen Versuchsstation oder in der Abt. Vegetative Physiologie der Medizinischen Hochschule Hannover zu Organentnahmen für physiologische und biochemische Untersuchungen durch eine Überdosis Halothan getötet. Die gesetzlichen Bestimmungen des Tierschutzes wurden strikt eingehalten.

2.2 Fixierung der entnommenen Organe

Die Trachea und die Lungen wurden in toto entnommen und sofort in 3% Glutaraldehyd in 0,1M Na-Cacodylat-HCl-Puffer, pH 7,3 oder in 4% Formaldehyd, der frisch aus Paraformaldehyd hergestellt war, in PBS immersionsfixiert und zerkleinert. Das Gewebe wurde über Nacht bei 4°C fixiert.

2.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Glutaraldehyd-fixiertes Gewebe wurde anschließend in 0,1M Na-Cacodylat-HCl-Puffer gründlich gespült, in 2% OsO₄ in 0,1M Na-Cacodylat-HCl-Puffer für 2 h bei 4°C oder in 1% OsO₄ und 1,5 % Kalium-Ferrocyanid in H₂O (Karnovsky 1971) nachfixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Agar-Araldite CY 212 (Agar-Aids, Stansted, Essex, UK) eingebettet. Zur Auswahl der für Dünnschnitte geeigneten Areale wurden zunächst Schnitte von 0,5-1,0 µm Dicke erstellt und mit alkalischer Toluidin-Blau Lösung gefärbt. Für die Elektronenmikroskopie wurden Dünnschnitte mit einer Dicke zwischen 60 und 80 nm an einem Reichert Ultracut Mikrotom

hergestellt, auf Pioloform-befilmte Einlochblenden aufgenommen und mit Uranylacetat und Bleizitrat kontrastiert (Reynolds 1963). Die Schnitte wurden in einem Philips CM 10 Elektronenmikroskop bei 80 KV untersucht.

2.3.1 Verhältnis der Flimmerzellen zu kinzilienfreien Zellen

Das Verhältnis von Flimmerzellen zu sekretorischen Zellen wurde in Dünnschnitten am Elektronenmikroskop bei einer Vergrößerung von 1650:1 bestimmt. Es wurde das Trachealepithel von 3 Spitzmäusen und das Epithel der intrapulmonalen Atemwege bei 2 Spitzmäusen in jeweils bis zu 5 Blöcken untersucht. Insgesamt wurden 465 Trachealepithelzellen und 552 Bronchialepithelzellen beurteilt.

2.4 Rasterelektronenmikroskopie

Die Trachea einer etruskischen Spitzmaus wurde nach Glutaraldehydfixierung (s.o.) der Länge nach geteilt und die beiden Hälften nach gründlicher Spülung in 0,1M Na-Cacodylat-HCl-Puffer in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in einer Baltec CPD 030 Apparatur (Balzers, Liechtenstein) am kritischen Punkt getrocknet. Die Proben wurden mit einem leitfähigen Klebeband (Plano) auf Metallträger montiert und in einer Kathodenzerstäuberanlage (Polaron) mit einer 30 nm dicken Goldschicht bedampft, bevor sie in einem JEOL JSM-35CF Rasterelektronenmikroskop bei 15 KV untersucht wurden.

2.5 Immunhistochemie

Formaldehyd-fixiertes Gewebe der Trachea und Lunge wurden nach einem standardisierten Verfahren im Histomaten (Bavimed) in Paraffin eingebettet. Schnitte von ca.

4-5 µm Dicke wurden in einer absteigenden Xylolreihe entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte zunächst mit 3% H₂O₂ für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die endogenen Peroxidasen zu blocken. Darauf erfolgte die Inkubation für 30 min mit einem Non-Immunsereum der Spezies, von der der zweite Antikörper stammt, in der Regel der Ziege, um unspezifische Bindungsstellen des zweiten Antikörpers zu blocken. Schließlich erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (s. unten) und Markierung nach der Avidin-Biotin-Peroxidase-(ABC-) Methode (Hsu et al.1981). Einige Schnitte wurden zur Antigen-Demaskierung vor der Inkubation mit 3% H₂O₂ in einer mit Zitratpuffer (0,01M, pH 6,0) gefüllten Küvette in der Mikrowelle für 2 x 5 min erhitzt.

Folgende polyklonale Antiseren vom Kaninchen wurden in den Untersuchungen in den angegebenen Arbeitsverdünnungen verwendet:

Anti-Serotonin 1:200 (Grube und Forssmann 1979)

Anti- Calcitonin 1:100 (Kameda et al.1980)

Anti-NSE 1:10 (Lloyd 1984)

Anti-CGRP 1:5000 (Sikri et al. 1985)

Die Antiseren (Ausnahme: anti-CGRP, Biotrend) wurden von der Firma BioGenex bezogen. Die Schnitte wurden zunächst mit dem primären Antikörper in der angegebenen Verdünnung für 20 h bei 4°C, darauf mit biotinyliertem anti-Kaninchen-IgG der Ziege (VECTOR, Burlingame, CA, USA) für 30 min bei Raumtemperatur und anschließend mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (VECTOR) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Alle eingesetzten Antiseren und Reagenzien waren in einer Lösung, die 0,01 M Phosphatpuffer und 0,15 M NaCl, pH 7,3, enthielt, ver-

dünnt. Die Verdünnung der ABC-Reagenzien erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Der Nachweis des Peroxidase-Komplexes erfolgte durch Inkubation der Schnitte mit einer Lösung aus 0,7 mM DAB (3'3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, Sigma) und 0,002% H₂O₂ in PBS, pH 7,3, für 10 min bei Raumtemperatur. Zwischen den oben angeführten Inkubationsschritten wurden die Schnitte jeweils gründlich in einer Lösung aus 0,01 M Phosphatpuffer, 0,5 M NaCl und 0,1 % Tween 20 (Sigma), pH 7,6 gespült.

In Kontrollschnitten wurde die Inkubation mit dem ersten Antikörper ausgelassen, alle anderen Inkubationsschritte wurden unverändert durchgeführt. In den Kontrollschnitten war keine Immunreaktivität nachweisbar.

3 Befunde

3.1 Trachea

Der Wandbau der Trachea der etruskischen Spitzmaus, *S. etruscus*, ähnelt weitgehend dem anderer Säugetiere. Die Trachea wird von einem Flimmerepithel ausgekleidet, das auf einer Basalmembran (*Basal lamina*) ruht. Diese bildet die Grenze zu einer schmalen Lamina propria, in der Kapillaren und Abwehrzellen vorkommen. Auf die Lamina propria folgen im ventralen Bereich der Trachea C-förmige Spangen aus hyalinem Knorpel, deren dorsal freie Enden durch quer verlaufende Bündel glatter Muskulatur (*M. trachealis*) verbunden sind. Drüsen fehlen. Die Trachea ist durch adventitielles Bindegewebe in die Umgebung eingebaut. Im dorsalen Bereich findet sich zu ihren beiden Seiten ein Nervenfaserbündel, das von Perineurium eingeschichtet ist und auf Grund seiner Lage am ehesten dem N. laryngeus recurrens entspricht.

Im Gegensatz zur Situation in den meisten anderen Säugetieren, deren Trachea von einem zwei- oder mehrreihigen hochprismatischen Epithel aus Flimmerzellen, sekretorischen, intermediären und basalen Zellen ausgekleidet wird (Rhodin 1966, Pavelka et al. 1976, Mariassy 1991), ist das Trachealepithel der etruskischen Spitzmaus, *S. etruscus*, ein einschichtiges iso- bis hochprismatisches Epithel, in dem Flimmerzellen, sekretorische Zellen und neuroendokrine Zellen vorkommen (Abb.1). Betrachtet man die Gesamtpopulation der Epithelzellen, so sind die sekretorischen Zellen mit ca. 54% (50,0 - 55,3%) etwas häufiger als die Flimmerzellen mit ca. 46% (44,4 -50,0%). Obwohl die beiden Zelltypen in etwa gleich häufig sind, ist ihre Verteilung über die gesamte Oberfläche jedoch nicht gleichmäßig, sondern regional unterschiedlich. Im Bereich über dem dorsal gelegenen M. trachealis kommen relativ mehr Flimmerzellen als sekretorische Zellen vor, während in den knorpeligen Abschnitten

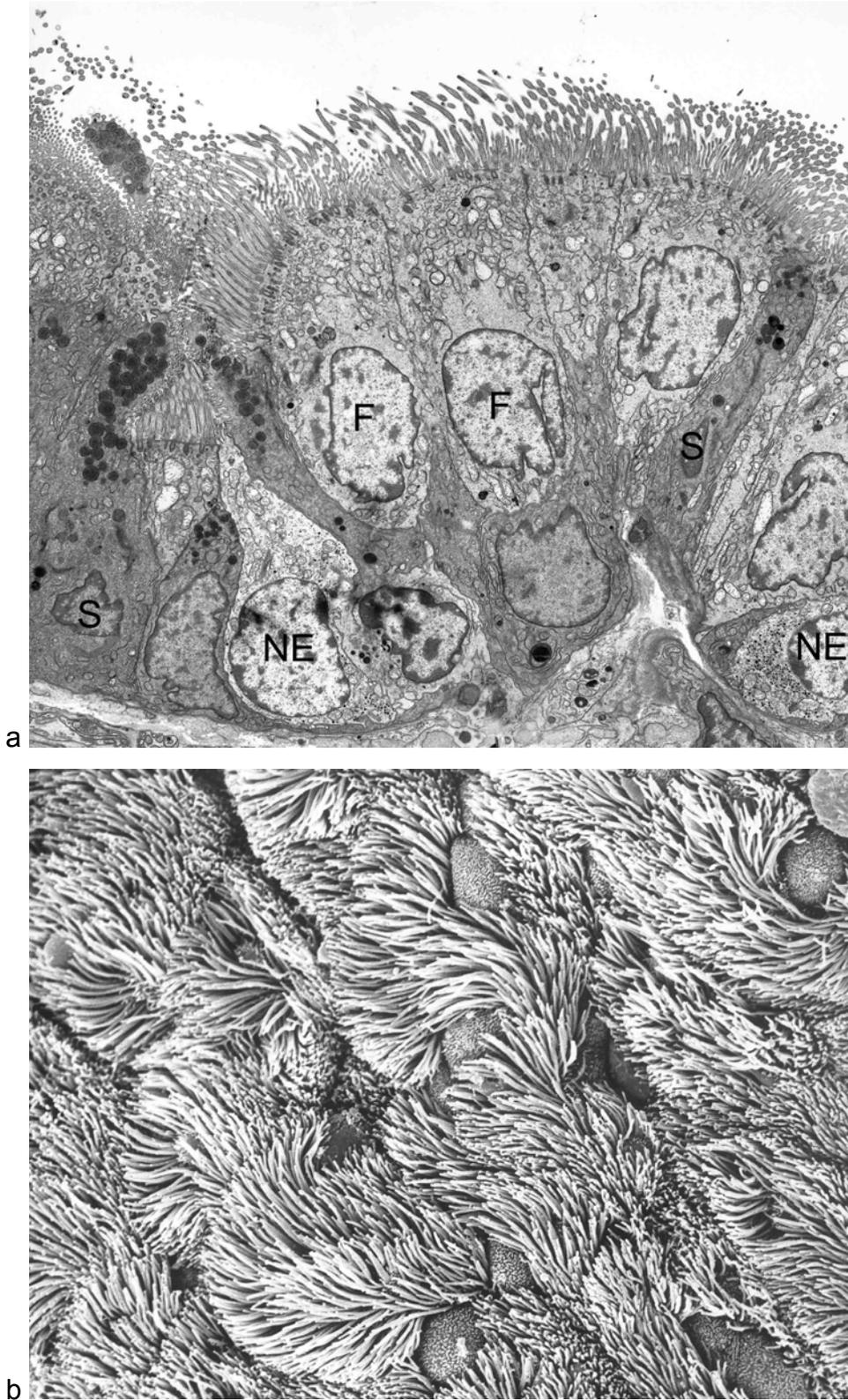
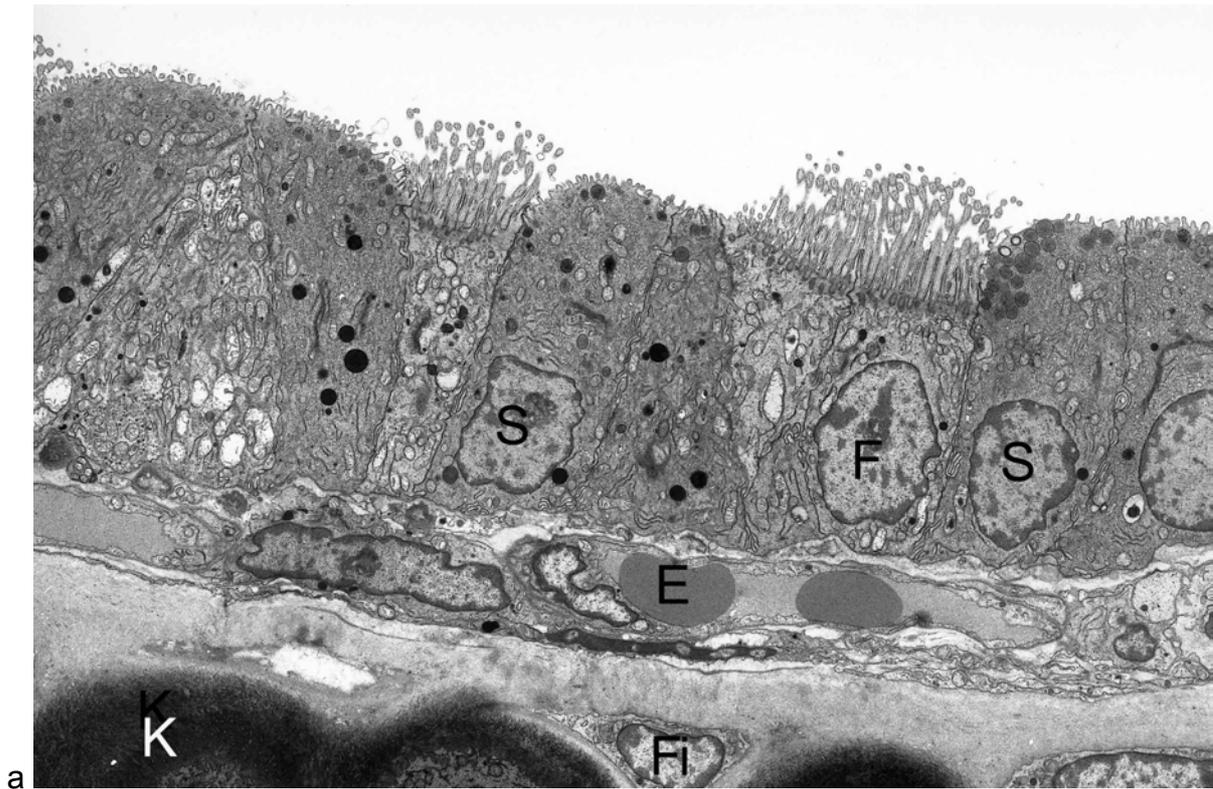
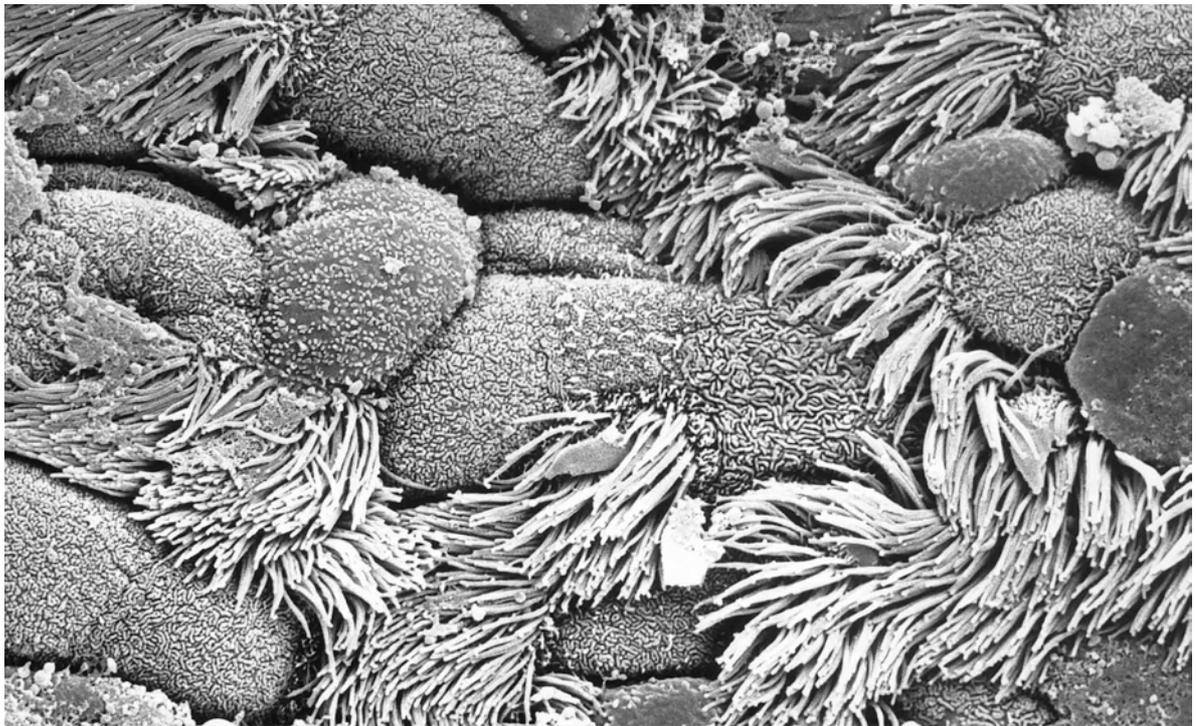


Abb. 1 Trachealepithel der etruskischen Spitzmaus, *Suncus etruscus* oberhalb des M. trachealis mit zahlreichen Flimmerzellen (F) und wenigen sekretorischen Zellen (S). NE, neuroendokrine Zellen.

a x 3600; **b** x 2700



a



b

Abb. 2 Trachealepithel der etruskischen Spitzmaus, *Suncus etruscus* im knorpeligen Teil mit mehr sekretorischen Zellen (S) als Flimmerzellen (F). E, Erythrozyten; Fi, Fibroblast; K, Knorpel.

a x 4600; b x 7000

die sekretorischen Zellen überwiegen (vergleiche Abb.1 und 2). Diese an Dünnschnitten gemachten Beobachtungen konnten durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden (Abb.1b, 2b)

Neuroendokrine Zellen treten im Trachealepithel von *S. etruscus* nur vereinzelt auf (Abb.1a) und sind sehr selten (<1%). Basale, intermediäre und Bürstenzellen (Luciano et al. 1969) konnten nicht identifiziert werden.

3.1.1 Ultrastruktur des Trachealepithels

3.1.1.1 Flimmerzellen

Die Flimmerzellen im Trachealepithel der etruskischen Spitzmaus ähneln ultrastrukturell den Flimmerzellen in den Atemwegen anderer Säugetiere (Rhodin 1966, Pavelka et al. 1976, Breeze und Wheeldon 1977, Aiello und Sleigh 1977). Die Höhe ihres Zellkörpers (ohne Kinozilien) mißt ca. 10 µm. An der freien Oberfläche der Flimmerzellen sind zahlreiche dicht stehende Kinozilien mit einer Länge von ca. 5 µm und einem Durchmesser von ca. 0,25 µm ausgebildet (Abb.1-3). Das Achsenskelett der Kinozilien zeigt die typische 9x2+2 Anordnung der Mikrotubuli. Jede Kinozilie ist in einem Kinetosom („Basalkörperchen“), das unterhalb der apikalen Zelloberfläche liegt und aus 9x3 Mikrotubuli besteht, verankert (Abb.3,4). Einzelne Kinetosomen schließen feingranuläres elektronendichtes Material ein (Abb.5a). Kugelförmige Fortsätze kommen regelmäßig auf einer Seite etwa in der Mitte der Kinetosomen vor (Abb.5a). Sie stellen Satelliten („Basalfüßchen“) dar (Dustin 1984). Von ihrer Spitze gehen einzelne Mikrotubuli aus, die zwischen den Kinetosomen parallel oder schräg zur Zelloberfläche liegen. Wurzelfüßchen („ciliary rootlets“), die charakteristischer-

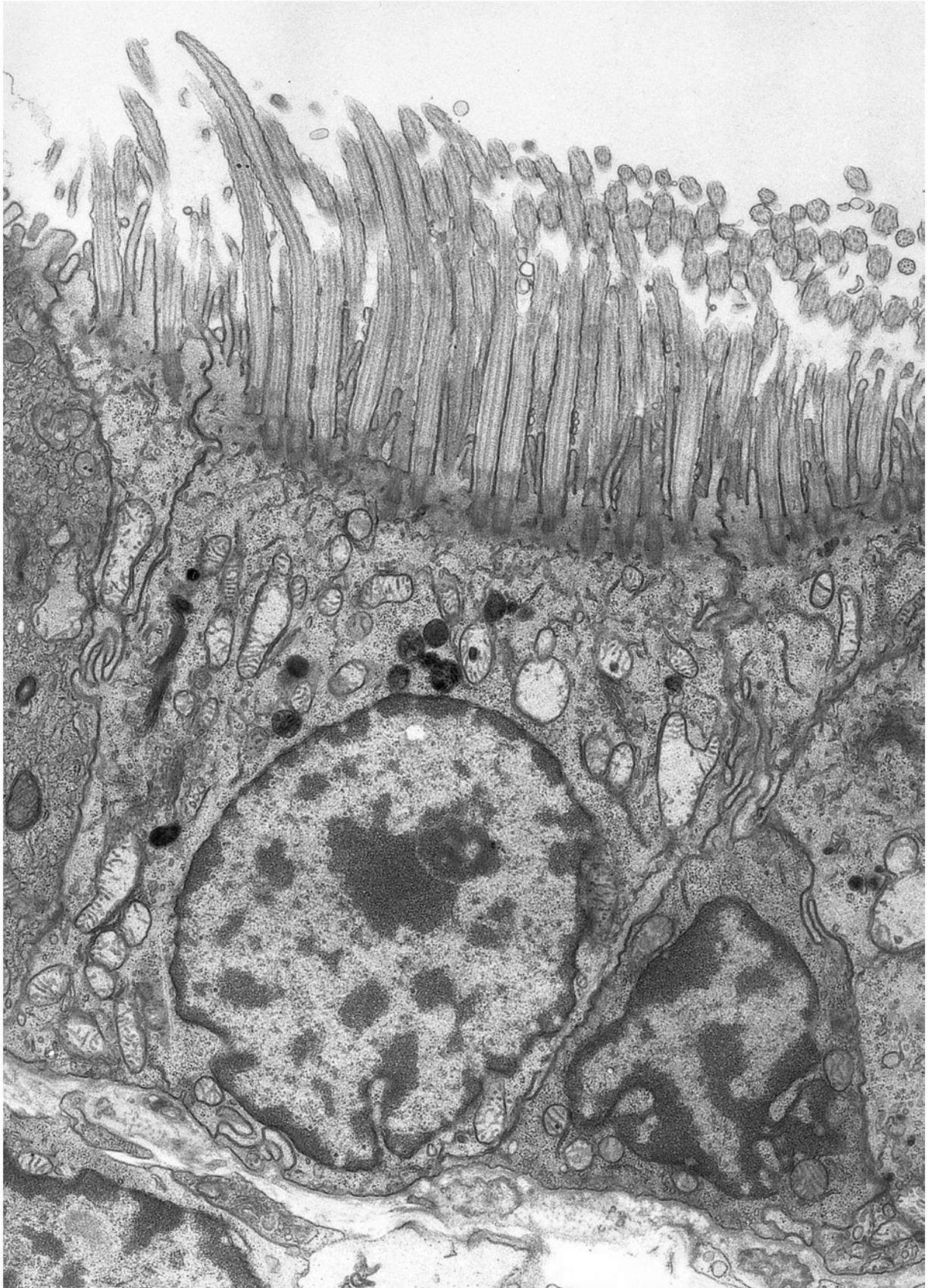


Abb. 3 Flimmerzelle im Trachealepithel von *S. etruscus*. x 16000

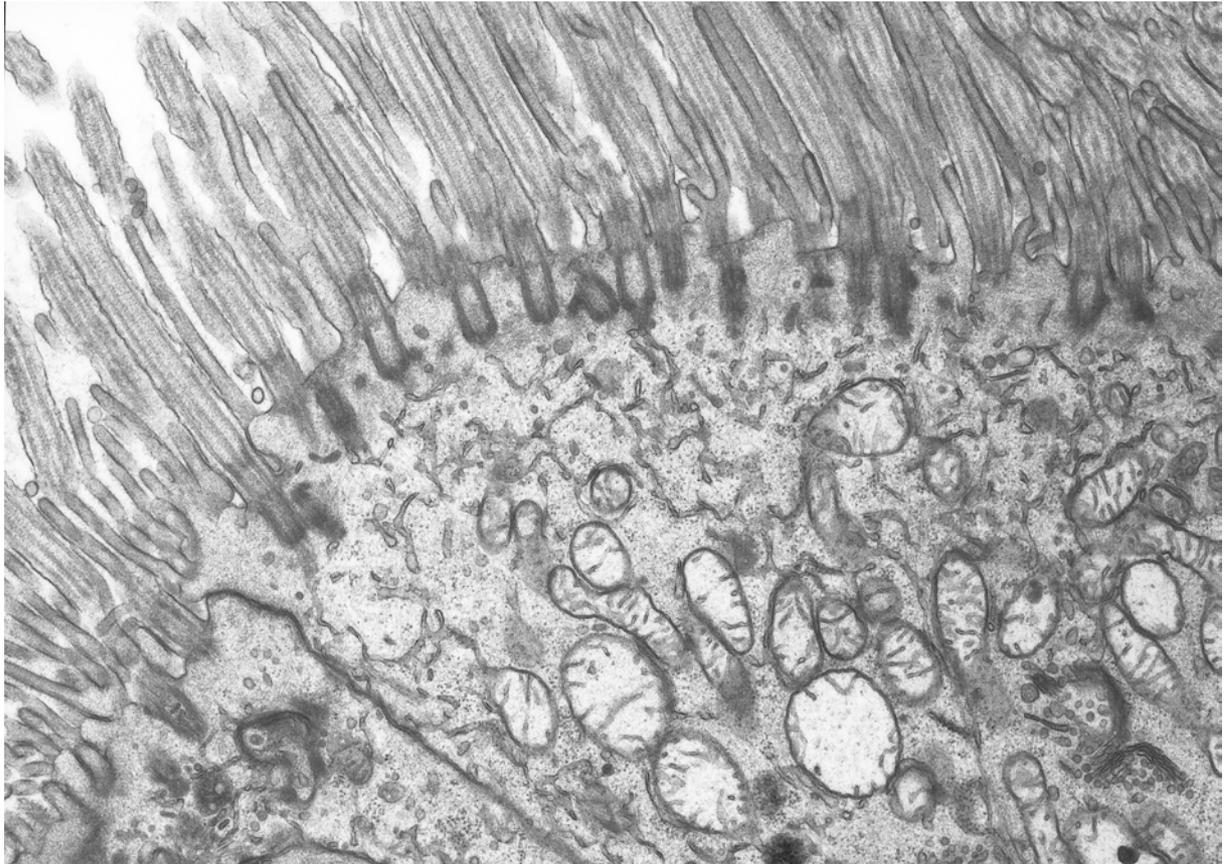


Abb. 4 Apikaler Zellpol einer Flimmerzelle mit zahlreichen Anschnitten des glatten ER zwischen den Kinetosomen und Mitochondrien. x 21000

weise eine periodische Querstreifung aufweisen, sind am basalen Pol der Kinetosomen bestenfalls rudimentär ausgebildet (Abb.4). Zwischen den Kinozilien kommen zahlreiche, sich verzweigende Zytofila mit einem Durchmesser von 70-100 nm vor, die ein axiales Bündel von wenigen dünnen (5nm) Filamenten enthalten (Abb. 3, 4).

Direkt unterhalb der Kinetosomen kommen zahlreiche glattwandige membranöse Tubuli vor (Abb.4), die dem glatten endoplasmatischen Retikulum zuzuordnen sind (Graf und Stockinger 1966). Darunter liegen zahlreiche Mitochondrien vom

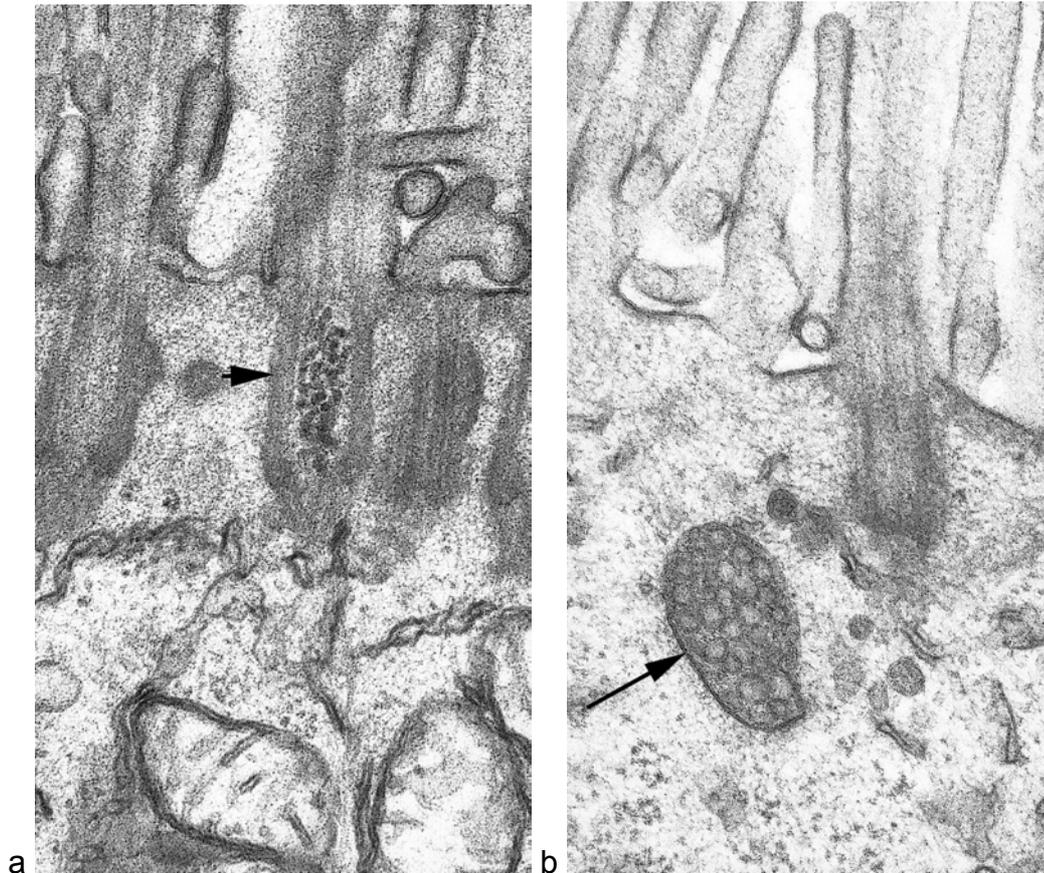


Abb. 5 a Feingranuläres Material innerhalb eines Kinetosoms (Pfeil). b Der Pfeil zeigt auf einen multivesikulären Körper in der Nähe eines Kinetosoms.

a x 63000; b x 75000

Crista-Typ mit auffallend wenigen Cristae und einem weiten Matrixraum (Abb.3, 4), vereinzelt multivesikuläre Körper (Abb. 5) und dichte Körper mit heterogenem Inhalt, die Lysosomen entsprechen (Abb. 3). Zwischen den Mitochondrien und den Tubuli des glatten endoplasmatischen Retikulums finden sich zahlreiche Polysomen, aber nur wenige Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums. In der Regel liegen ein oder zwei kleine Golgi-Apparate (Abb. 6) oberhalb oder seitlich des Kerns. Der runde oder ovale Kern, der in den unteren zwei Drittel der Zelle liegt, enthält ein oder zwei Nucleoli und wenig Heterochromatin (Abb. 1-3).

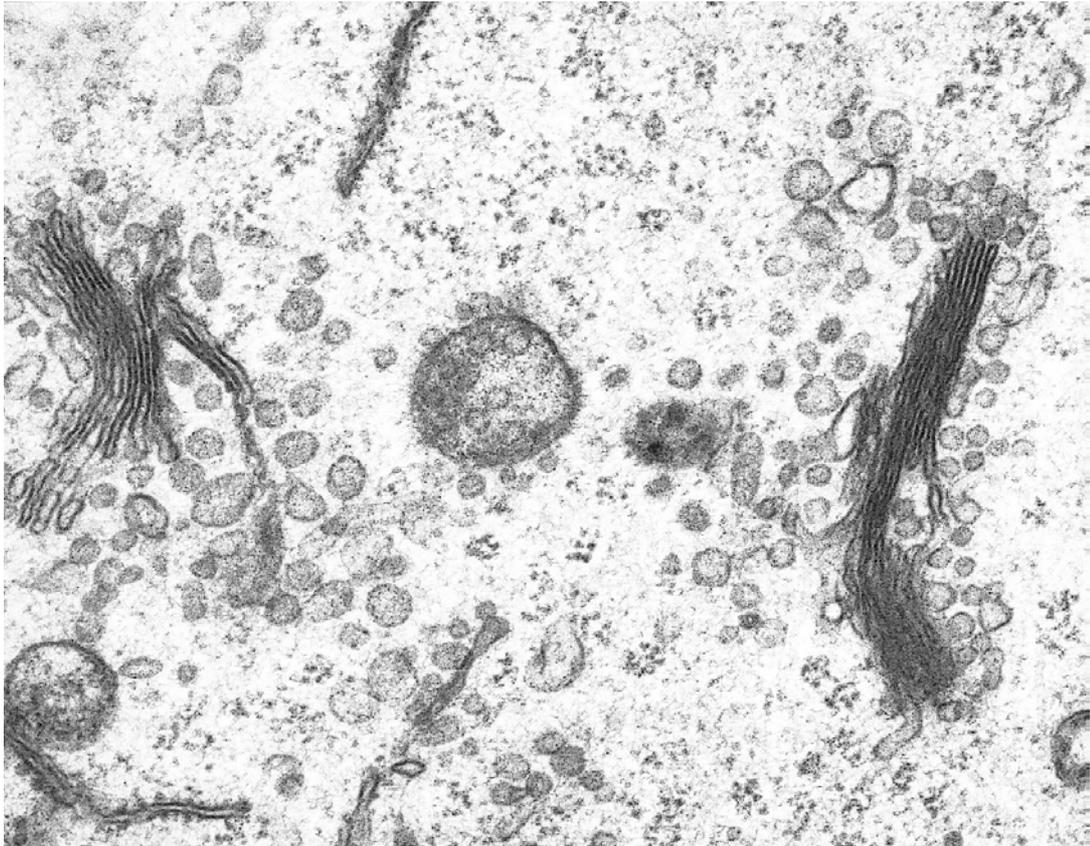


Abb. 6 Ein multivesikulärer Körper zwischen zwei Golgi-Apparaten in einer Flimmerzelle. X 56000

Die Flimmerzellen sind mit ihren Nachbarzellen im apikalen Bereich der lateralen Membran durch einen epithelialen Verbindungskomplex, bestehend aus Zonula occludens („Tight junction“), Zonula adhaerens („Intermediate junction“) und Macula adhaerens („Desmosom“) verbunden. Weitere Desmosomen in tieferen Abschnitten der lateralen Zellmembran sind selten. Es wurden weder Gap junctions zwischen Flimmerzellen noch Hemidesmosomen zwischen der basalen Zellmembran und der epithelialen Basalmembran beobachtet. Die lateralen Zellmembranen der Flimmerzellen ist weitgehend glatt und nicht durch Falten signifikant vergrößert (Abb.1a, 2a, 3, 4).

3.1.1.2 Sekretorische Zellen

Die sekretorischen Zellen sind 10-15 μm hoch. Sie enthalten unterschiedliche Mengen an Sekretgranula. Ihre apikale Oberfläche ist frei von Kinozilien, erscheint im Dünnschnitt aber selten glatt, sondern ist durch zahlreiche kurze Protrusionen vergrößert (Abb.7). Rasterelektronenmikroskopisch können diese Protrusionen entweder als Mikrovilli oder als Anschnitte durch Mikrofalten („microridges“) identifiziert

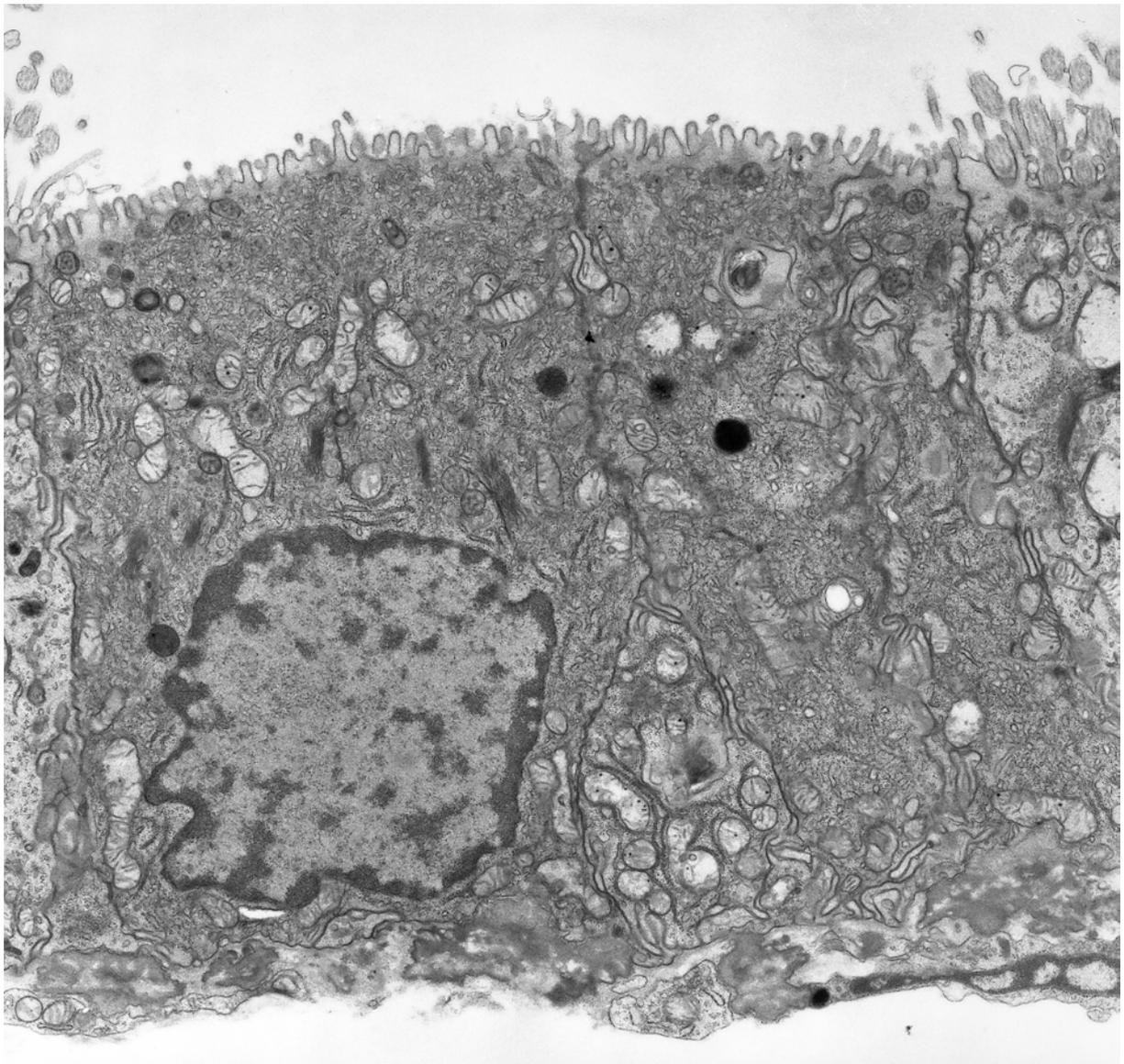


Abb. 7 Zwei Kinozilien-freie Zellen im Trachealepithel von *Suncus etruscus*, die nur wenige Sekretgranula enthalten. x 15000

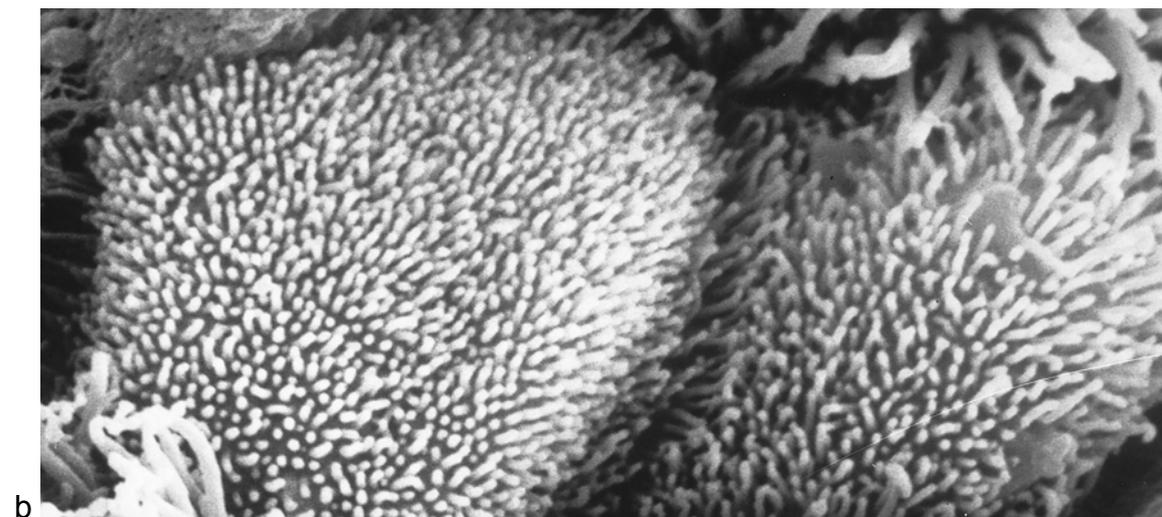
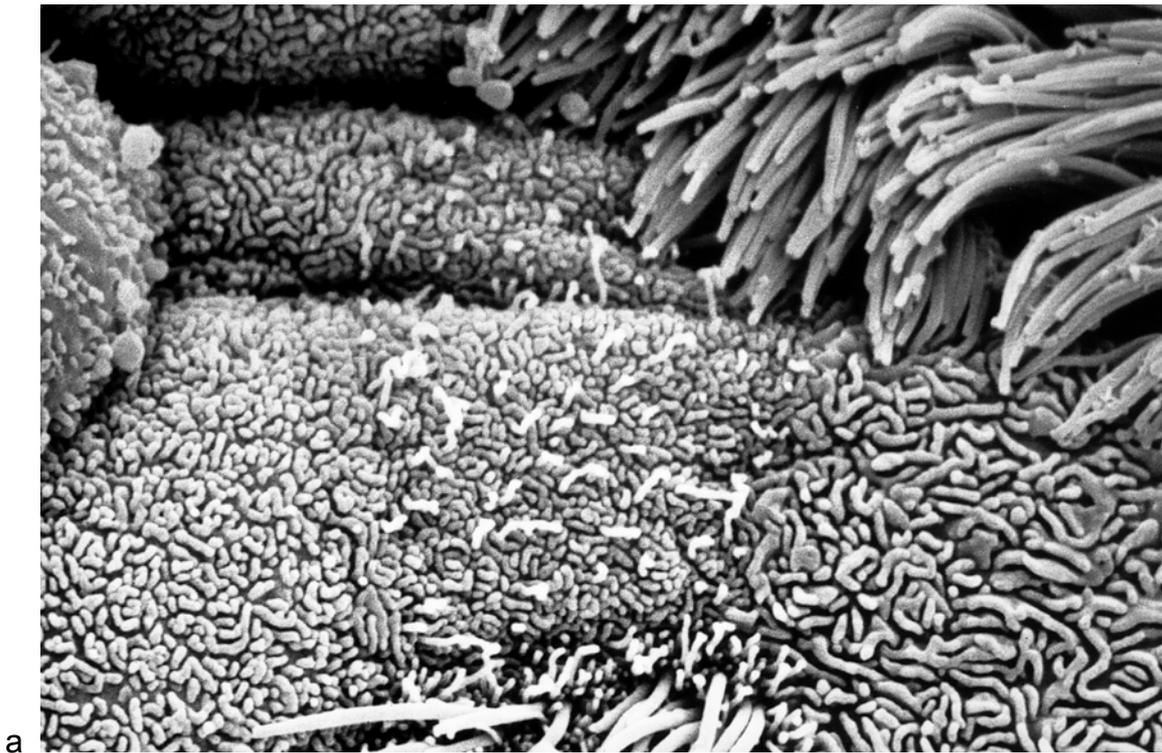


Abb. 8 Oberfläche der Kinozilien-freien (sekretorischen) Zellen im Trachealepithel von *S. etruscus*.
a und **b** x 13000

werden (Abb. 8a). In der Mehrzahl der sekretorischen Zellen ist die Oberfläche durch dicht stehende kurze Mikrofalten und einige Mikrovilli charakterisiert (Abb. 8a). Daneben kommen aber auch sekretorische Zellen vor, deren Oberfläche nur durch Mikrovilli vergrößert ist (Abb. 8b).

Globuläre Sekretgranula mit einem Durchmesser von ca. 500 nm liegen unterhalb der apikalen Zelloberfläche und sind von dieser durch ein dünnes Gespinnst von Mikrofilamenten getrennt. Der Inhalt der Granula erscheint nach konventioneller Glutaraldehyd- und Osmiumfixierung homogen elektronendicht. Nach Fixierung mit Glutaraldehyd und reduziertem OsO_4 lässt sich zentral gelegenes, fein granuläres Material von einer weniger dichten Matrix unterscheiden (Abb. 9). Auf Grund der Feinstruktur ist der Inhalt der Granula am wahrscheinlichsten ein Glykoprotein. Vereinzelt sind Sekretgranula während der Exozytose beobachtet (Abb. 10a). Oberhalb der und zwischen den Mikrovilli und -falten der sekretorischen Zellen ist feines, filamentöses Material vorhanden (Abb. 10b), sofern dieses nicht durch die Immersionsfixierung entfernt wurde.

Zwischen den und unterhalb der Sekretgranula finden sich zahlreiche Tubuli des glatten endoplasmatischen Retikulums sowie vereinzelt Polysomen, feine Bündel von Intermediär- (Tono-) filamenten und Mitochondrien vom Cristatyp (Abb. 11). In einigen Mitochondrien sind myelinartige Strukturen in der Matrix vorhanden (Abb. 11b). Der heterochromatinarme Kern liegt in der basalen Hälfte der Zelle und ist häufig stark eingebuchtet. Er enthält einen ausgeprägten Nucleolus. In der Umgebung des Kerns kommen Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums, ein oder mehrere Golgi-Apparate sowie große Lysosomen mit heterogenem Inhalt vor (Abb. 11a, b). Vereinzelt treten im basalen Zytoplasma große Myelinkörper auf.

Die Zellverbindungen der sekretorischen Zellen ähneln denen der Flimmerzellen. Sie sind mit ihren Nachbarzellen im apikalen Bereich der lateralen Zellmembran durch Verbindungskomplexe verbunden. Zusätzliche Desmosomen waren selten, Gap junctions und Hemidesmosomen wurden nicht beobachtet. Im Vergleich mit der

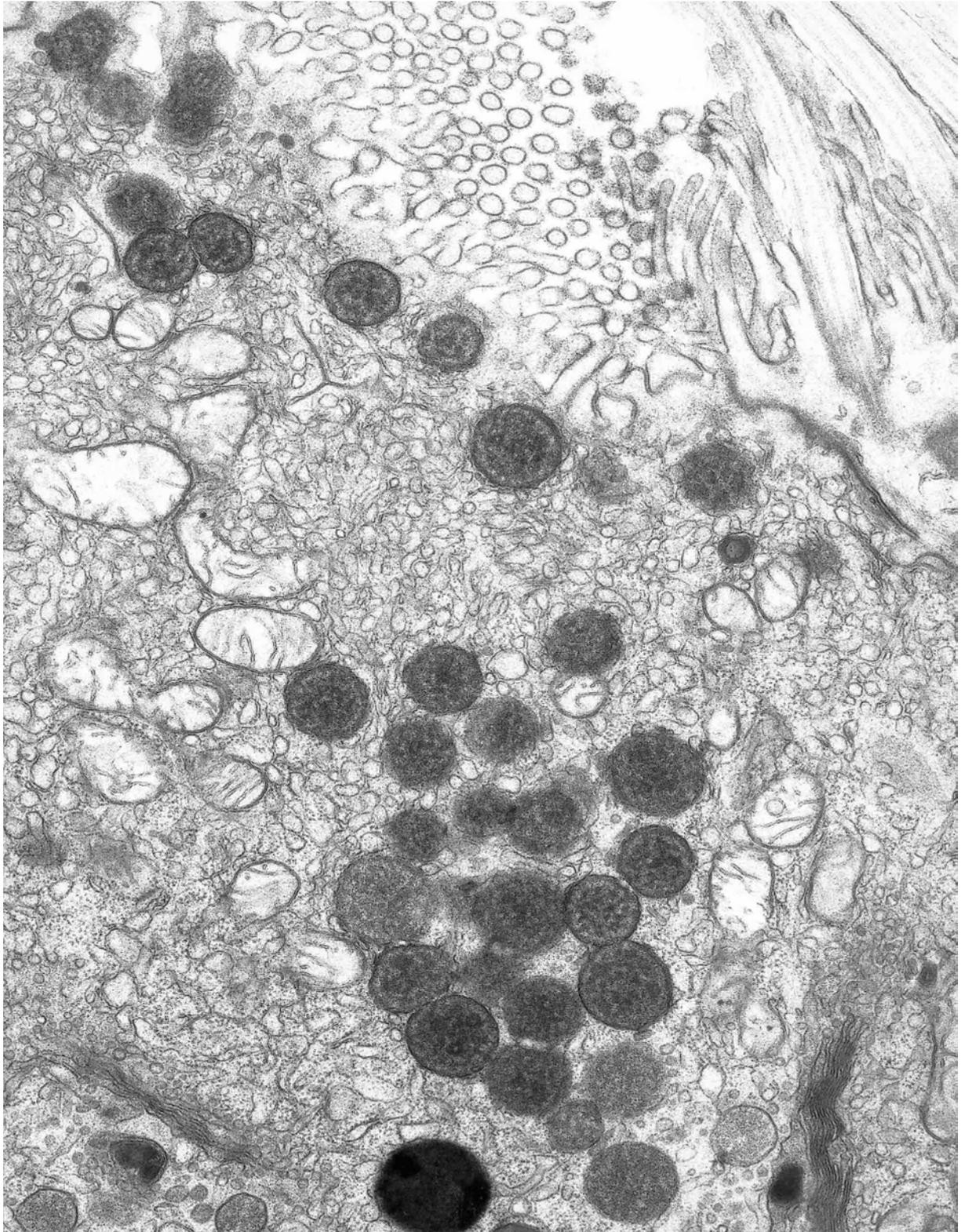
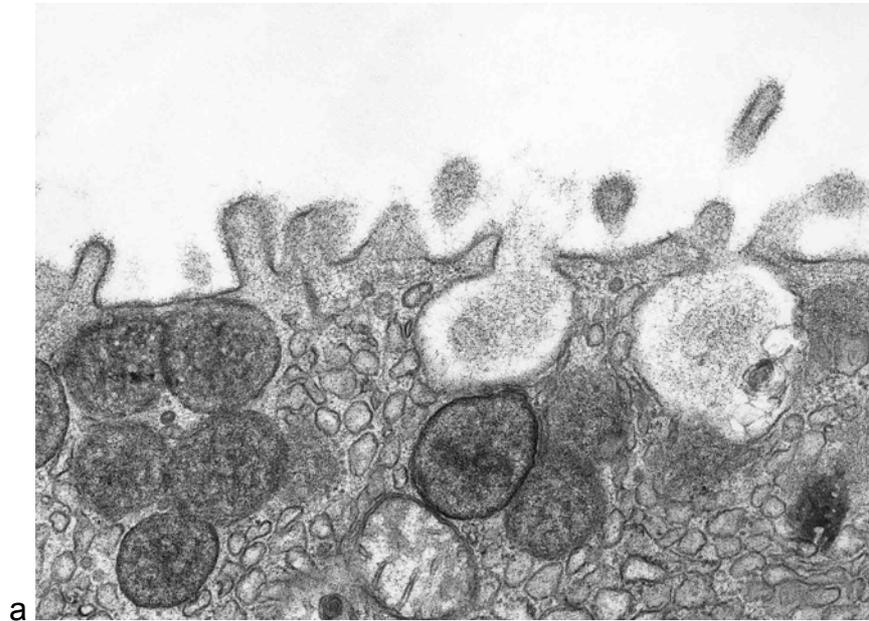
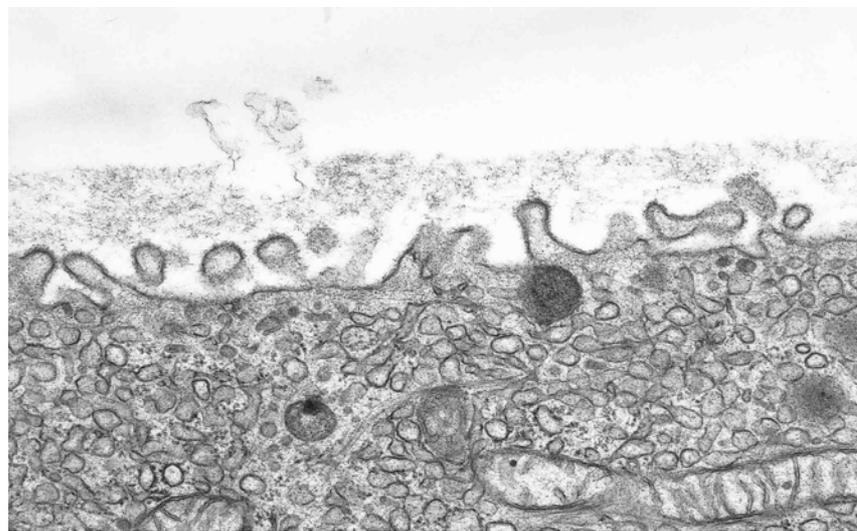


Abb. 9 Die Sekretgranula haben einen heterogenen Inhalt nach Fixierung mit reduziertem Osmiumtetroxid. Zentral gelegenes, fein granuläres Material ist in eine weniger dichte Matrix eingebettet.
x 33000

lateralen Oberfläche der Flimmerzellen war die der sekretorischen Zellen geringfügig durch Falten vergrößert.



a

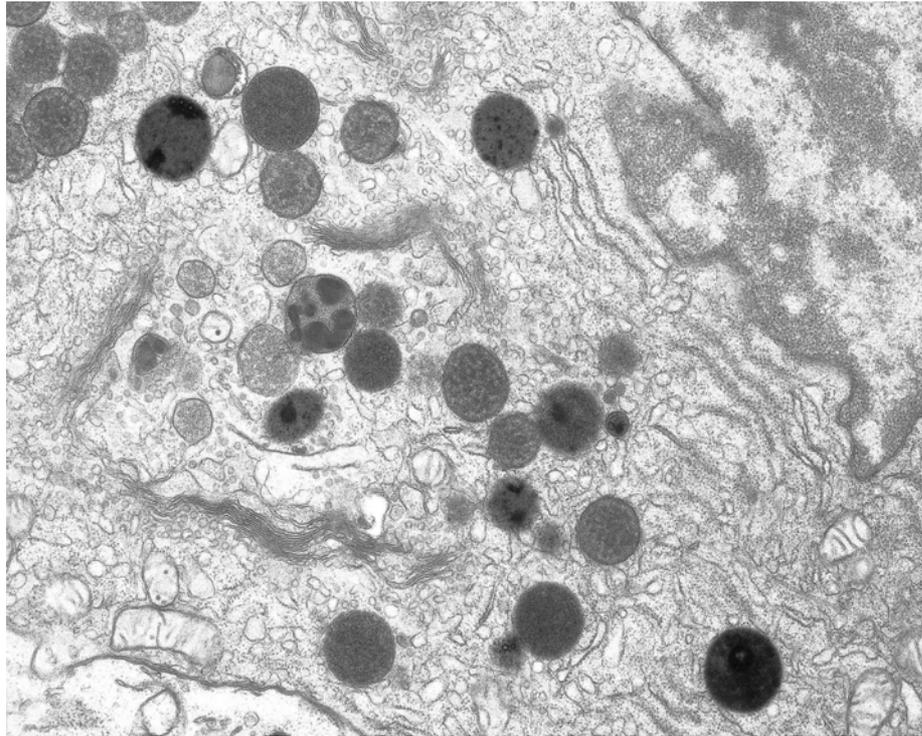


b

Abb. 10a Zwei Granula einer sekretorischen Zelle während der Exozytose.

b Fein filamentöses Sekret an der Oberfläche des Trachealepithels.

a x 39000; b x 21000



a



b

Abb. 11 Detailaufnahmen von zwei sekretorischen Zellen. In **a** sind die Beziehungen zwischen rauem ER, glattem ER, Golgi-Apparat und Sekretgranula dargestellt, in **b** drei Lysosomen mit heterogenem Inhalt (Pfeile), glattes ER, Polysomen und Mitochondrien.

a x 17000; **b** x 28000

3.1.1.3 Neuroendokrine Zellen

Die neuroendokrinen Zellen liegen einzeln zwischen den Flimmerzellen und sekretorischen Zellen, in der Regel in der Tiefe des Trachealepithels (Abb.12). In dem vorliegenden Material konnte nur in zwei Zellen ein Kontakt mit der epithelialen Oberfläche über einen schmalen Fortsatz nachgewiesen werden (Abb.13). In diesen beiden Zellen war die apikale Oberfläche durch einige kurze Mikrovilli vergrößert und die neuroendokrinen Zellen mit Verbindungskomplexen mit den Nachbarzellen verbunden.

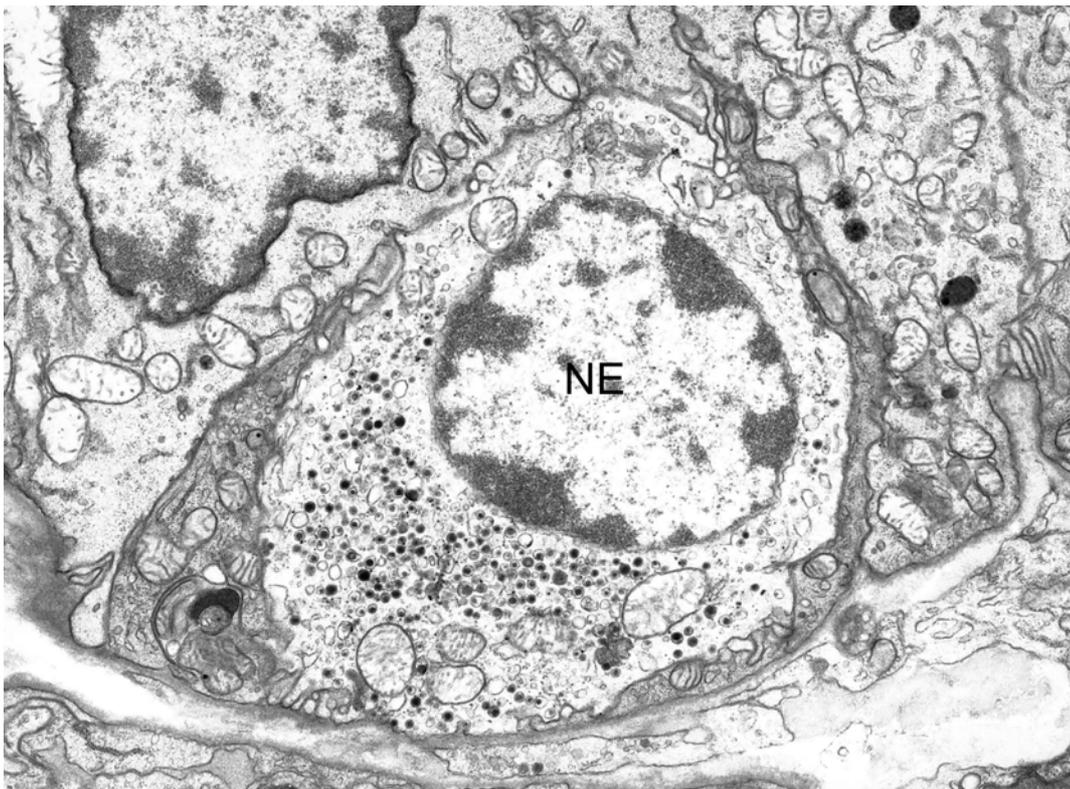


Abb. 12 Neuroendokrine Zelle im Trachealepithel von *Suncus etruscus*. Zumindest in diesem Schnitt fehlt der Kontakt zur Oberfläche des Epithels. x 14000

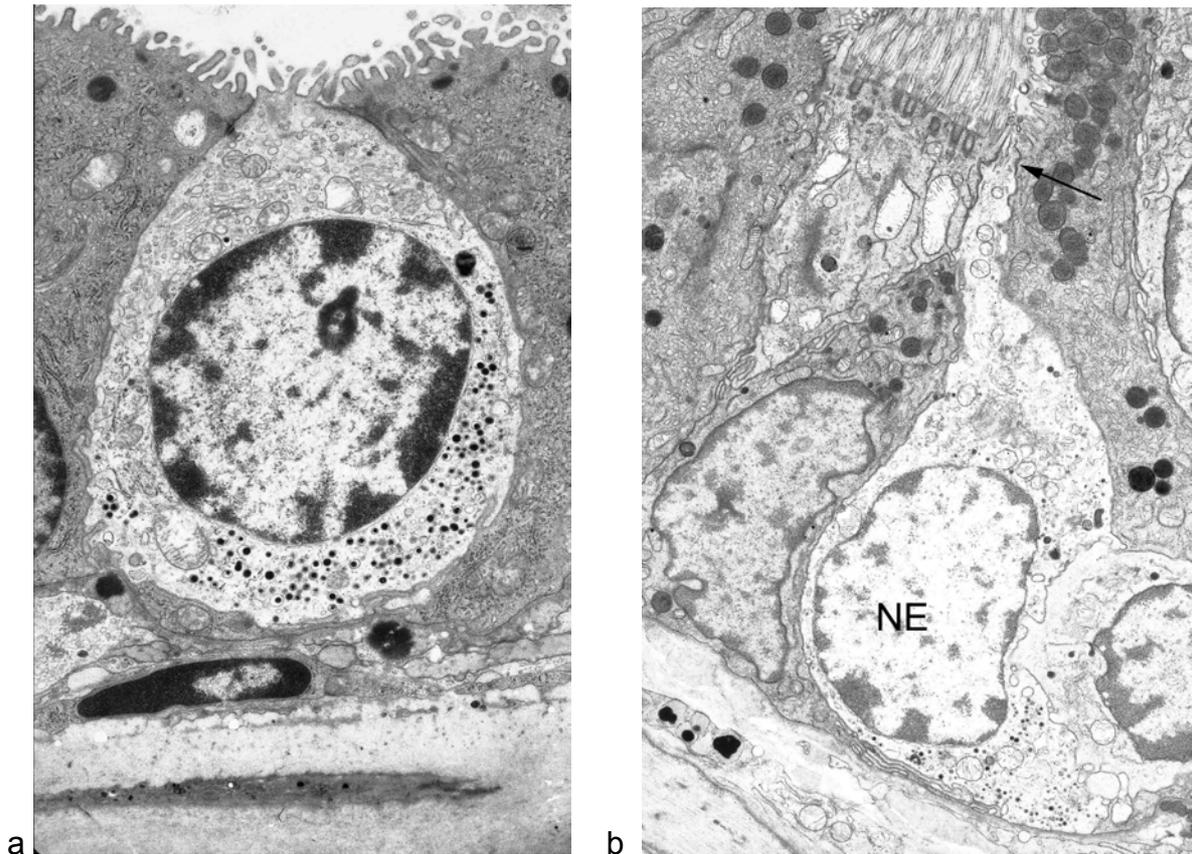


Abb. 13 Neuroendokrine Zellen im Trachealepithel von *Suncus etruscus*, beide mit Kontakt zur Epitheloberfläche. Der Pfeil in **b** zeigt auf den Verbindungskomplex mit einer benachbarten sekretorischen Zelle.

a x 10400; **b** x 7500

Das hervorstechende Merkmal der neuroendokrinen Zellen ist das Vorkommen von elektronendichten Granula im Zytoplasma. Die Granula liegen bevorzugt im basalen Zytoplasma zwischen dem Kern und der basalen Zellmembran (Abb. 3a, b). Insbesondere nach Fixierung mit reduziertem Osmium können verschiedene Granulapopulationen unterschieden werden (Abb.14):

1. runde Granula mit einem Durchmesser von 80-130 nm, deren elektronendichterer Kern nur von einem eher schmalen Hof umgeben ist;
2. runde Granula mit einem Durchmesser von 100-200 nm, deren elektronendichterer Kern von einem breiten Hof

umgeben ist. Bei dieser Granulapopulation können zwei Subtypen unterschieden werden: Granula mit zentral gelegenem elektronendichten Kern oder mit exzentrisch gelegenem Kern, und 3. ovale, längliche (110-150nm lang) oder tropfenförmige Granula mit einem elektronendichten Kern und sehr schmalen elektronenlichten Saum.

Darüber hinaus ist die Ausstattung der neuroendokrinen Zellen mit Zellorganellen wenig charakteristisch. Sie enthalten Mitochondrien, Polysomen, einige wenige Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums und einen supranukleär gelegenen Golgi-Apparat.

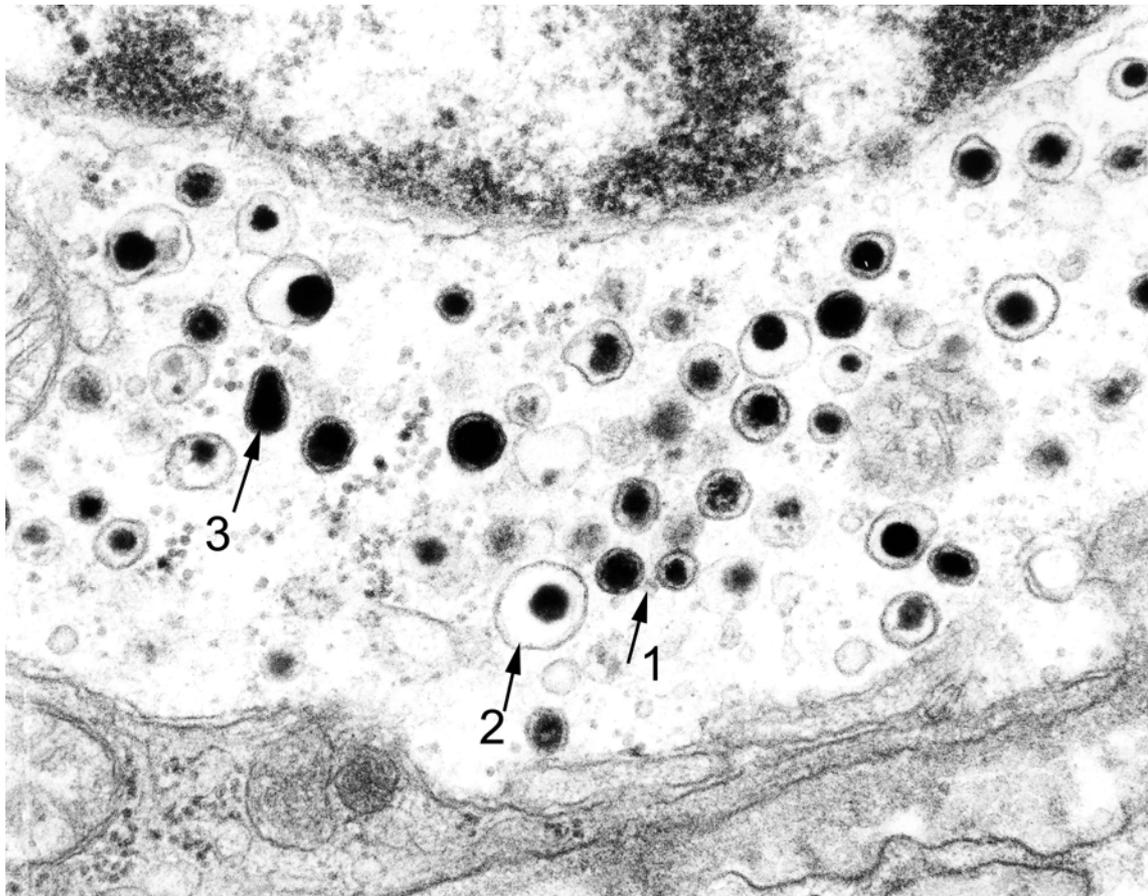


Abb. 14 Unterschiedliche Sekretgranulapopulationen in einer neuroendokrinen Zelle. Pfeil 1 weist auf eine Gruppe kleiner runder Granula mit schmalen Hof und elektronendichtem Kern, Pfeil 2 auf ein großes rundes Granulum mit breitem Hof und elektronendichtem Kern, Pfeil 3 auf ein ovales Granulum mit elektronendichtem Kern. x 67000

3.2 Intrapulmonale Atemwege

Nach dem Eintritt der Hauptbronchien in die Lunge kommt es zu einer Aufzweigung der Atemwege in Bronchien und Bronchiolen, aus denen die Ductus alveolares hervorgehen. Bronchioli respiratorii sind bei *S. etruscus* nicht vorhanden. Im Gegensatz zur Trachea ist in der Wand der Bronchien kein Knorpel ausgebildet, dafür bildet die glatte Muskulatur eine zirkuläre Schicht, die vom Epithel nur durch eine dünne Lamina propria getrennt ist.

Die intrapulmonalen Atemwege werden wie die Trachea von einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel ausgekleidet, in dem die Flimmerzellen mit ca. 52% der vorherrschende Zelltyp sind. Die kinzilienfreien Zellen wölben sich mit ihrem apikalen Zellpol kuppelförmig ins Lumen vor und entsprechen damit dem klassischen Bild der bronchiolaren Clara-Zelle anderer Spezies. Ihr Anteil an den Epithelzellen betrug ca. 48%. Außerdem kommen neben einzelnen neuroendokrinen Zellen im Epithel der intrapulmonalen Atemwege auch neuroepitheliale Körper vor.

3.2.1 Ultrastruktur des Epithels der intrapulmonalen Atemwege

3.2.1.1 Flimmerzellen

Die Flimmerzellen in den intrapulmonalen Atemwegen ähneln in ihrer Ultrastruktur weitgehend denen der Trachea, so dass sich eine detaillierte Beschreibung erübrigt. Vor allem in den kleinsten peripheren Aufzweigungen der Atemwege kommen gelegentlich Zellen ohne Kinozilien, aber mit zahlreichen Kinetosomen im apikalen Zytoplasma vor (Abb. 15). Diese Zellen sind offenbar Vorstufen der Flimmerzellen und im Begriff, sich zu diesen zu differenzieren.

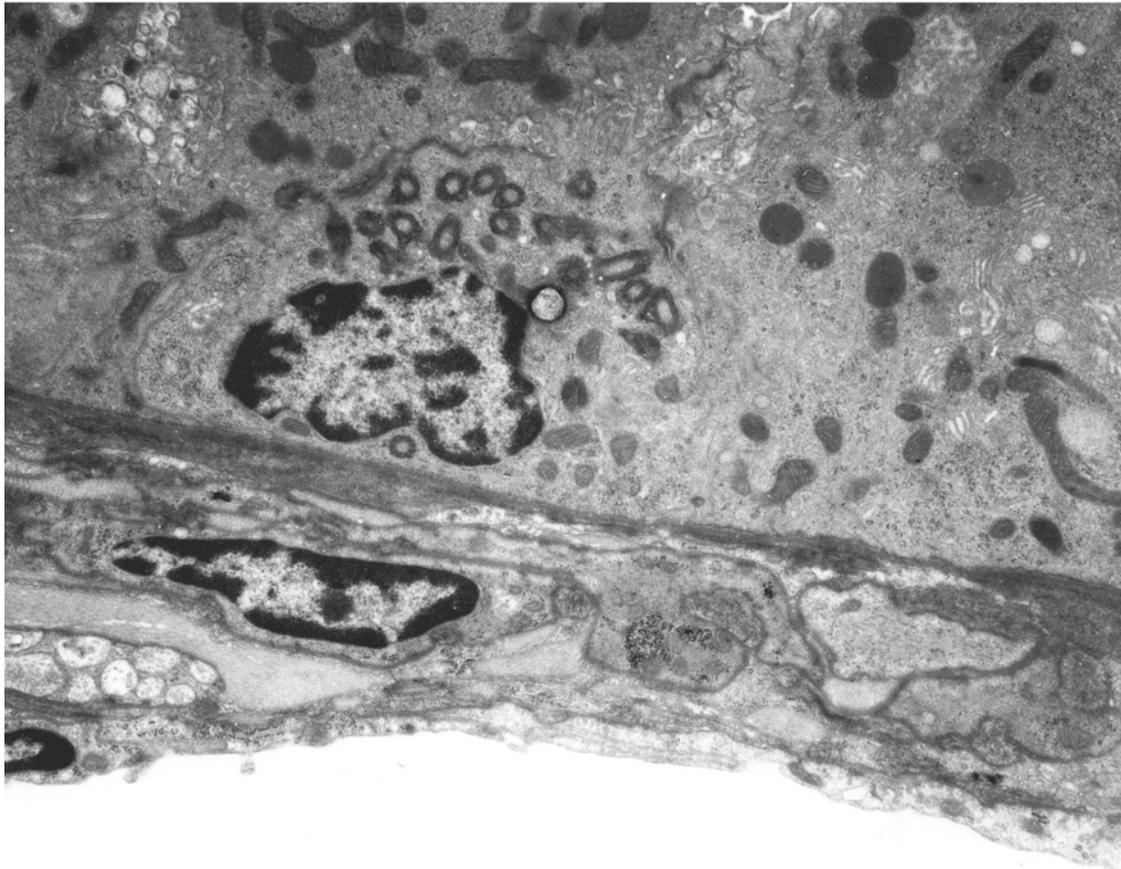


Abb. 15 Vorstufe einer Flimmerzelle mit zahlreichen Kinetosomen im apikalen Zytoplasma.
x 14000

3.2.1.2 Clara Zellen

Die Clara Zellen sind bis zu 15 μm hoch. Mit ihrem apikalen Zellpol überragen sie vielfach die Spitzen der Kinozilien der Flimmerzellen. Die apikale Membran erscheint weitgehend glatt. Direkt unterhalb dieser Membran ist ein feiner filamentöser Filz sichtbar, der frei ist von Organellen. Das apikale Zytoplasma ist angefüllt mit glattem endoplasmatischem Reticulum, während basal Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums zahlreich sind (Abb. 16). Im Unterschied zu den sekretorischen Zellen im Trachealepithel enthalten die Clarazellen keine Sekretgranula. Mitochon-

drien sind eher basal lokalisiert, dichte Körper mit heterogenem Inhalt, vermutlich sekundäre Lysomen, kommen bevorzugt supranukleär vor. Die laterale Zellmembran ist nur geringfügig durch Falten vergrößert.

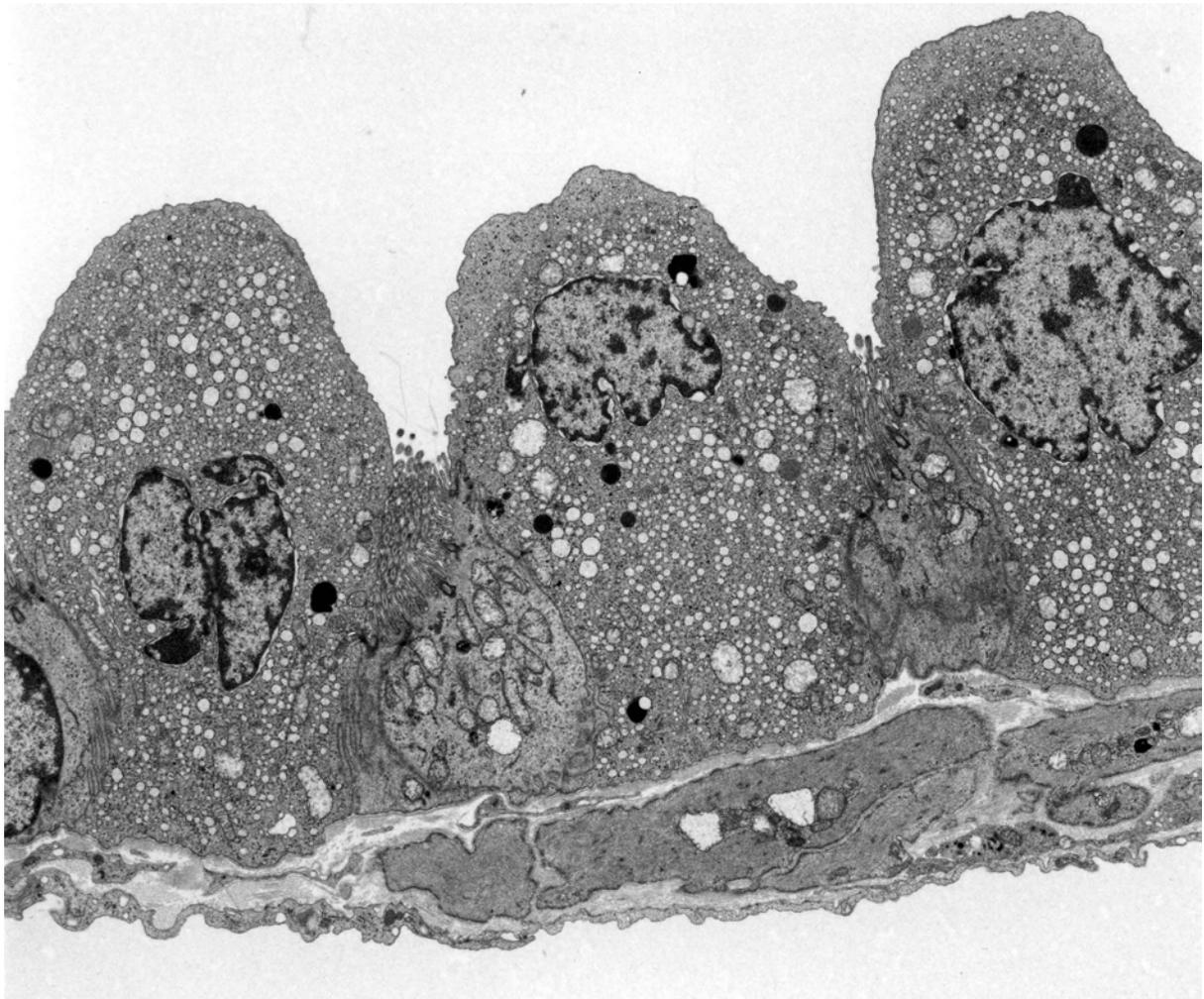


Abb. 16 Drei Clara-Zellen in einem Bronchiolus. Der apikale Zellpol überragt bei weitem die zwischen den Clara-Zellen liegenden Flimmerzellen. Sekretgranula fehlen. Unter der apikalen Zellmembran befindet sich ein schmaler Zytoplasmasaum, der frei ist von Organellen.

x 6000

3.2.1.3 Neuroendokrine Zellen und neuroepitheliale Körper

Die disseminiert im Epithel der intrapulmonalen Atemwege auftretenden neuroendokrinen Zellen ähneln ultrastrukturell denen im Trachealepithel. Daneben kommen unmittelbar präalveolär und an den Aufzweigungen des Bronchialbaums Gruppen von neuroepithelialen Zellen vor, die engen Kontakt zu intraepithelial gelegenen Nervenfasern aufweisen und den von Lauweryns et al. (1972) zuerst in der Kaninchenlunge beschriebenen neuroepithelialen Körpern entsprechen. Ein am Übergang der terminalen Atemwege zu Alveolen gelegener neuroepithelialer Körper wurde in einer großen Schnittserie exemplarisch elektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 17,18). Dabei konnte ein Kontakt der neuroepithelialen Zellen mit dem Atemwegslumen nicht nachgewiesen werden. Vielmehr waren die neuroepithelialen Zellen von einem flachen Ausläufer einer pneumozytenartigen Zelle vom Typ I bedeckt (Abb. 17 b). Da die neuroepithelialen Zellen aber oftmals nur sehr geringe luminale Kontakte haben, ist es durchaus möglich, dass diese außerhalb der Schnittserie lagen.

Die neuroepithelialen Zellen sind schlank und hochprismatisch und haben eine palisadenartige Anordnung. Die tonnenförmigen Kerne nehmen den größten Teil der Zelle ein, die Granula mit elektronendichtem Inhalt liegen bevorzugt an der Zellbasis, aber auch seitlich des Kerns (Abb. 17a, 18a). Der Golgi-Apparat ist ebenfalls seitlich des Kerns lokalisiert. Daneben fallen zahlreiche Glykogenpartikel auf.

Zwischen den Zellen eines neuroepithelialen Körpers kommen zwei Typen von Nervenendigungen im Epithel vor. Die einen Nervenendigungen sind dick mit einem Durchmesser bis zu 2 μm und enthalten zahlreiche dicht gepackte, große Mitochondrien, während die anderen dünner sind und wenige kleine Mitochondrien sowie zahlreiche Neurotubuli und Neurofilamente enthalten (Abb. 18a,b). Synapsen wurden

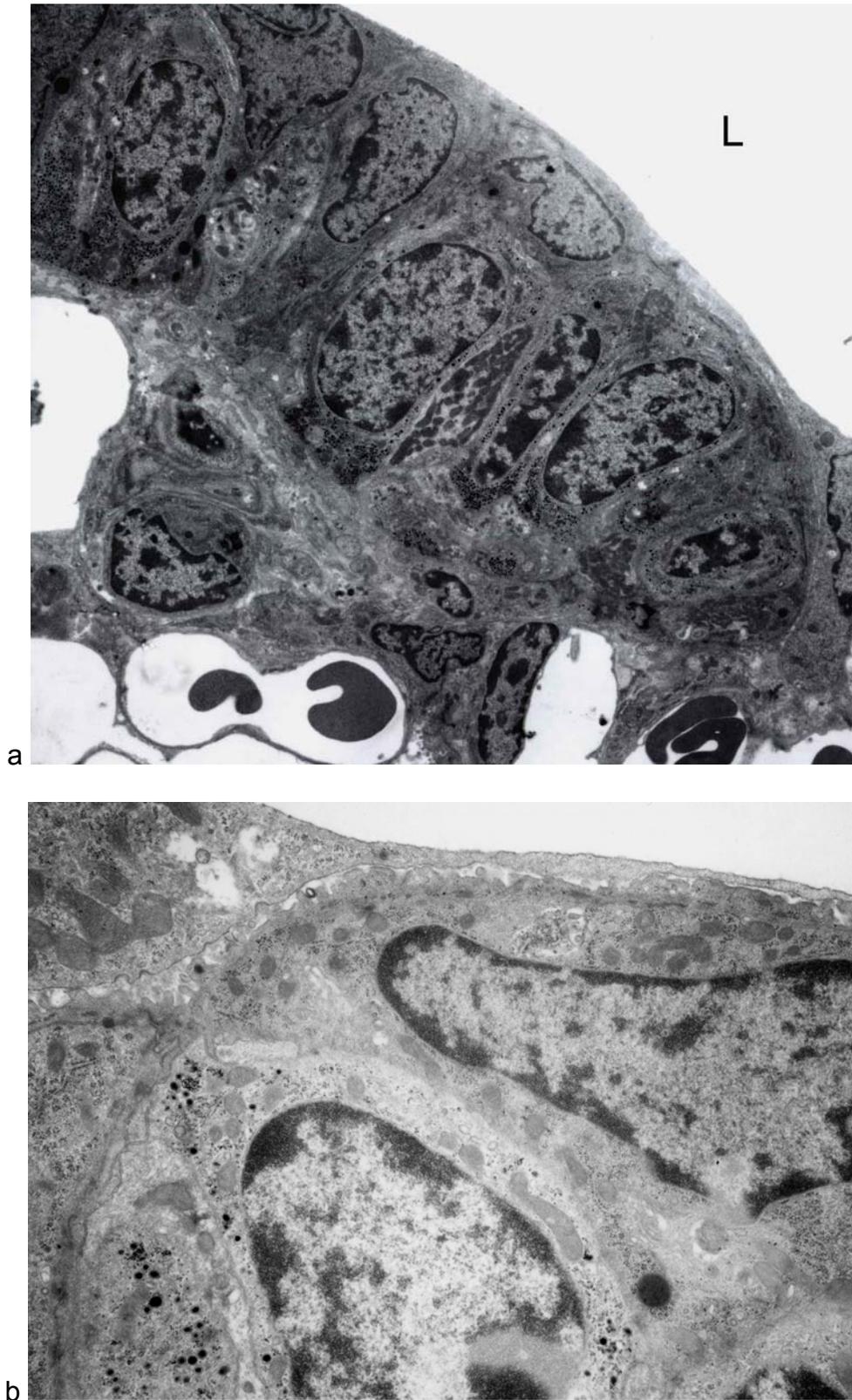
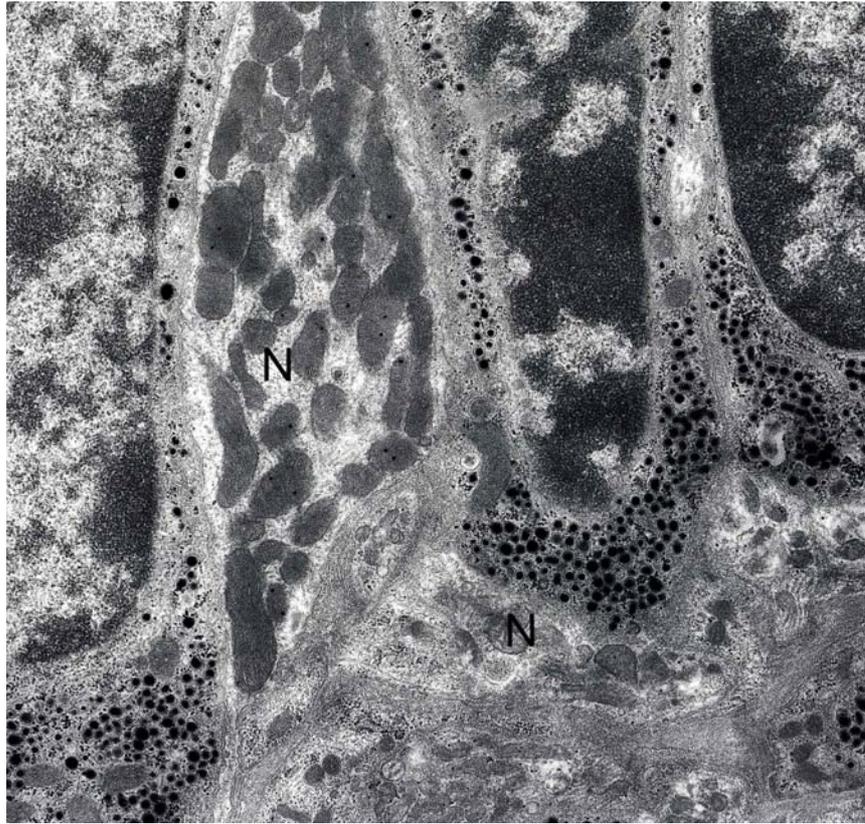
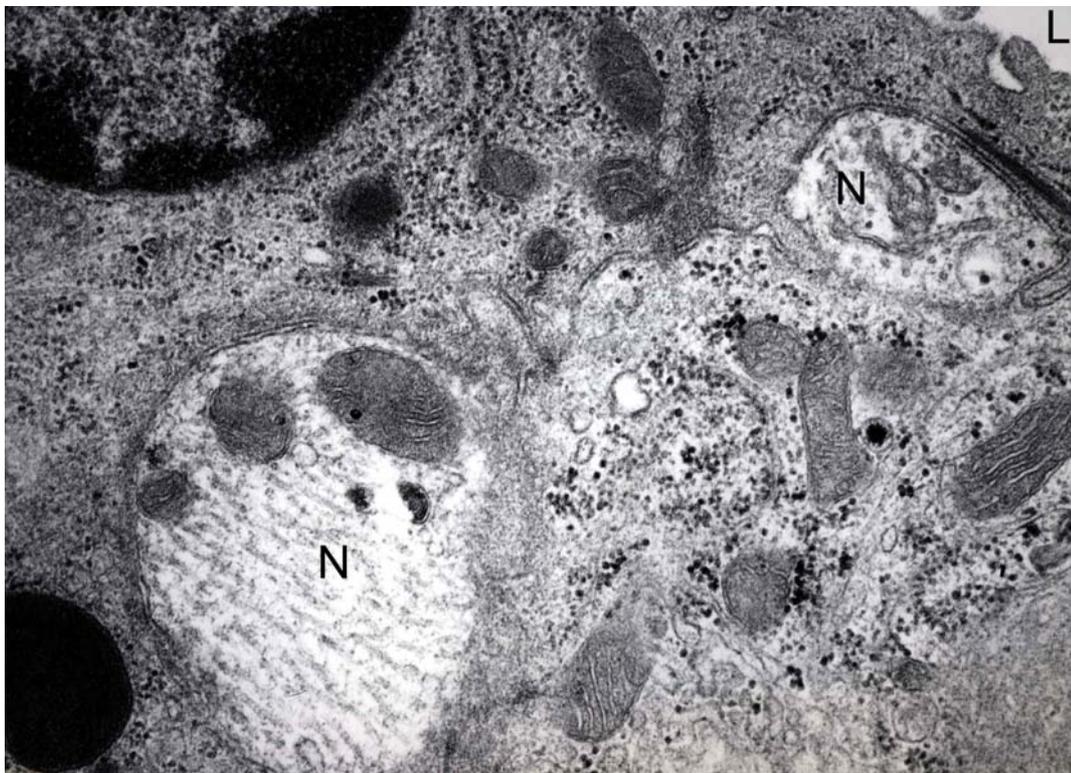


Abb. 17 **a** Neuroepithelialer Körper unmittelbar präalveolär. L , Lumen des Bronchiolus. x 4000
b Bei stärkerer Vergrößerung ist an der Oberfläche der flache Ausläufer eines Typ I-Pneumozyten erkennbar. Die neuroendokrinen Zellen sind an den elektronendichten Granula erkennbar. x 11000



a



b

Abb. 18 Intraepitheliale Nervenfasern (N) im Bereich neuroepithelialer Körper. **a** die Nervenfasern enthalten zahlreiche Mitochondrien, **b** zwei Nervenendigungen direkt unterhalb der Epitheloberfläche. L, Atemwegslumen. **a** x 16000; **b** x 42000

zwischen den neuroepithelialen Zellen und intraepithelialen Nervenfasern nicht beobachtet.

3.3 Immunhistochemie

In Schnitten der in Formaldehyd fixierten und in Paraffin eingebetteten Trachea von *S. etruscus* wurden im Epithel einzelne Zellen beobachtet, die nach Inkubation mit einem anti-Serotonin-Serum eine positive Immunreaktion zeigten (Abb. 19). Inkubation der Nachbarschnitte mit Antiseren gegen Calcitonin bzw. CGRP zeigten hingegen keine Immunreaktivität. Darüber hinaus waren einige Nervenfasern in den großen, die Trachea begleitenden Nerven, vermutlich dem N. laryngeus recurrens, Serotonin-immunreaktiv.

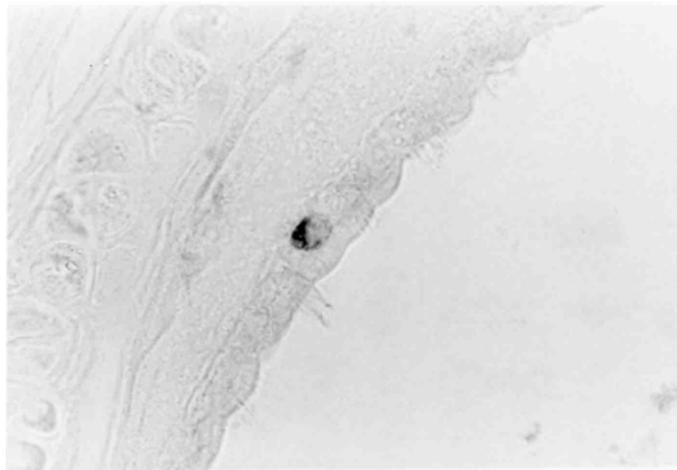


Abb. 19 Serotonin-immunreaktive Zelle im Trachealepithel. x 1000

Serotonin-immunreaktive Zellen traten im Atemwegsepithel in der Lunge überwiegend als Cluster auf (Abb. 20a). Sie entsprechen den neuroepithelialen Körpern. Diese Zellen zeigten eine deutliche, wenn auch schwächere Calcitonin-Immunreaktivität (Abb. 20b), jedoch keine CGRP-Immunreaktivität. In Schnittserien, die alternierend mit einem anti-Serotonin, anti-Calcitonin und einem anti-NSE-Serum

inkubiert waren, war im Bereich der neuroepithelialen Körper eine feine lineare intraepitheliale NSE-Immunreaktivität nachweisbar (Abb. 20c). Daneben waren NSE-immunreaktive Nervenfasern in den Wänden von Atemwegen, Arterien und Venen nachweisbar.

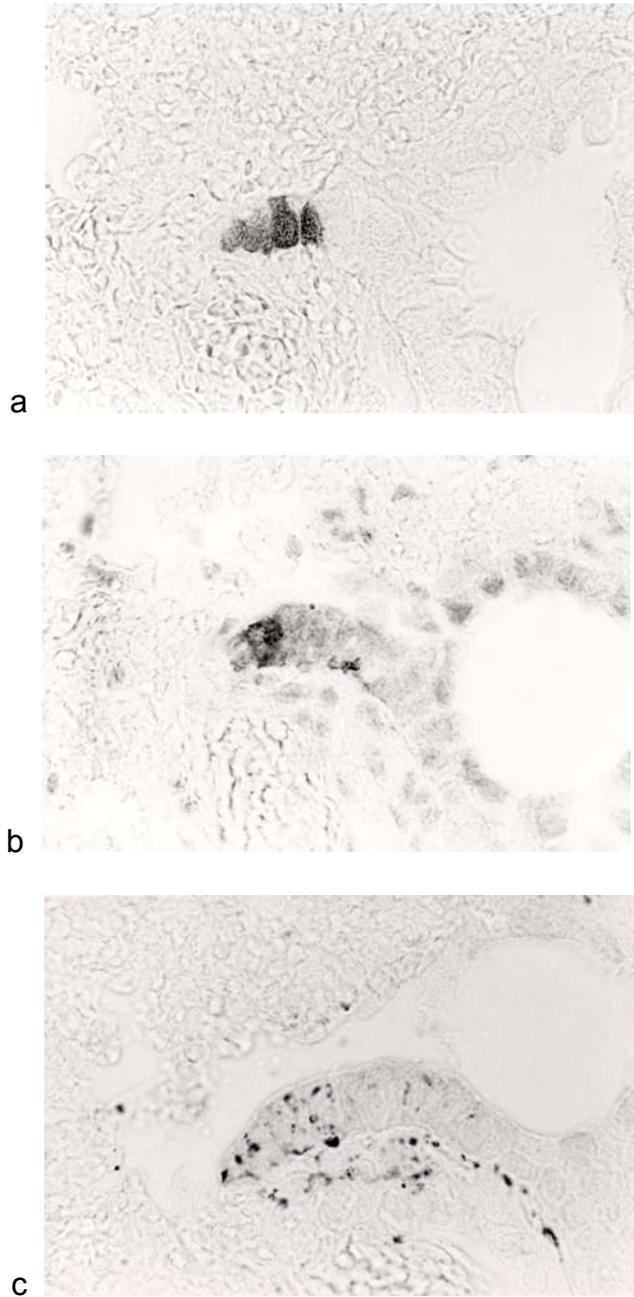


Abb. 20 Immunhistochemischer Nachweis von **a** Serotonin, **b** Calcitonin und **c** NSE in neuroepithelialen Körpern der Lunge von *S. etruscus*. **a**, **b** und **c** x 1000

4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich das Tracheal- und Bronchialepithel der etruskischen Spitzmaus, *Suncus etruscus*, in der zellulären Zusammensetzung voneinander unterscheiden. Die Unterschiede betreffen insbesondere die sekretorischen Zellen. Während im einschichtigen hochprismatischen Trachealepithel Flimmerzellen, sekretorische Zellen und einzelne neuroendokrine Zellen vorkommen, besteht das Epithel der intrapulmonalen Atemwege aus Flimmerzellen, Clara-Zellen und neuroepithelialen Körpern, das sind Gruppen neuroendokriner Zellen, die in enger Beziehung zu intraepithelialen Nervenfasern liegen.

Die Trachea von *Suncus etruscus* weist den gleichen Bauplan auf wie die anderer Säugetiere: Die Tunica mucosa besteht aus einem Flimmerepithel und einer Lamina propria, die zahlreiche Abwehrzellen und Blutgefäße enthält; eine Lamina muscularis mucosae fehlt typischerweise. Das Skelett besteht aus C-förmigen, dorsal offenen Knorpelspannen, deren freie Enden durch Bündel glatter Muskulatur verbunden sind. Über den Tonus der glatten Muskulatur kann so die lichte Weite der Trachea reguliert werden. Die Abwesenheit von Drüsen in der Trachea ist ein charakteristisches Merkmal für kleine Säugetiere. So enthält auch die Trachea der Maus - mit Ausnahme der Region direkt unterhalb des Larynx – keine Drüsen (Pack et al. 1980). Dieses Fehlen wird weiter unten im Zusammenhang mit den sekretorischen Zellen im Trachealepithel diskutiert.

Die beiden vorherrschenden Zelltypen im Trachealepithel sind die Flimmerzellen und die sekretorischen Zellen, die zusammen über 99 % ausmachen, wobei die sekretori-

schen Zellen mit 54% leicht überwiegen. Aus einer Reihe von Untersuchungen geht hervor, dass das Verhältnis von Flimmerzellen zu sekretorischen Zellen von der Größe der Atemwege abhängig ist. So kommen im Trachealepithel des Menschen auf eine Becherzelle fünf Flimmerzellen, während im Bronchialepithel das Verhältnis nur noch 3:1 ist (Rhodin 1966, McDowell et al. 1978). Dagegen machen die Flimmerzellen im Trachealepithel der Maus nur knapp 40% der Epithelzellen aus (Pack et al. 1980). Dies bedeutet, dass in Atemwegen mit kleinem Durchmesser die Flimmerzellen an Häufigkeit ab und die sekretorischen Zellen zunehmen.

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass regionale Unterschiede in der Häufigkeit von Flimmerzellen und sekretorischen Zellen vorhanden sind, wobei Flimmerzellen im membranösen Teil und kinezilienfreie sekretorische Zellen über dem knorpeligen Teil der Trachea häufiger sind. Ähnliche regionale Unterschiede in der Häufigkeit von sekretorischen Zellen sind in der Trachea von Hund (Mohr und Schlüsche 1991) und Katze (Tandler et al. 1983 a,b) beschrieben. In der Trachea des Hundes sind die kinezilienfreien Zellen ausschließlich durch Becherzellen und dunkle Zellen repräsentiert, wobei ausdifferenzierte Becherzellen ausschließlich im knorpeligen Teil der Trachea vorkommen und im dorsalen membranösen Teil fehlen. Die dunklen Zellen, die möglicherweise undifferenzierte Zellen oder Vorstufen von Becherzellen darstellen, sind überwiegend im dorsalen Teil lokalisiert (Mohr und Schlüsche 1991). Auch bei der Katze kommen Becherzellen im membranösen Teil seltener vor als im knorpeligen Teil (Tandler et al. 1983 a,b). Es ist daher anzunehmen, dass die Ausbildung sekretorischer Zellen durch die stabile Unterlage im knorpeligen Teil der Trachea gefördert bzw. im mobilen Teil durch Muskelkontraktionen

beeinträchtigt wird. Weitergehende vergleichende Untersuchungen, die diese Hypothese stützen, stehen noch aus.

Während bei den meisten Säugetieren die Trachea von einem zwei- oder sogar mehrreihigen Epithel ausgekleidet wird (Rhodin 1966, Pavelka et al. 1976, Breeze und Wheeldon 1977), ist das Trachealepithel bei *Suncus etruscus* ein einschichtiges iso- bis hochprismatisches Flimmerepithel. Dieser Unterschied mag mit der sehr viel geringeren Körpergröße und dem damit geringeren Durchmesser der Trachea von *S. etruscus* im Vergleich mit anderen Säugetieren zusammenhängen. Untersuchungen an anderen sehr kleinen Insektivoren (Spitzmäuse, Fledermäuse) fehlen und auch bei der Maus, der nächstkleinen in dieser Hinsicht untersuchten Art, findet man ein einschichtiges hochprismatisches Epithel (Pack et al. 1980). Dies deutet darauf hin, dass die Epithelhöhe und -art (einschichtig oder mehrreihig) in der Trachea von der Körpergröße der betreffenden Spezies abhängig ist. Da auch in den kleinsten Bronchiolen in der Lunge des Menschen das Epithel einschichtig ist, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Epithelart vom Durchmesser der Atemwege abhängig ist. Demzufolge hätten weitlumige Atemwege ein zwei- oder mehrreihiges Epithel und kleine englumige ein einschichtiges hochprismatisches Epithel.

Die Flimmerzellen im Tracheal- und Bronchialepithel von *S. etruscus* zeigen die ultrastrukturellen Merkmale von Flimmerzellen im Atemwegsepithel anderer Spezies, bei denen sie, sofern Becherzellen im Epithel und Drüsen in der Wand vorhanden sind, einen Schleimfilm rachenwärts transportieren und so eine Komponente des mukoziliären Transportsystems darstellen. In Abwesenheit von Becherzellen und Drüsen in der Trachea der etruskischen Spitzmaus stellt sich die Frage nach der Art

des Oberflächenfilms, den die Kinozilien transportieren, d.h. nach der Art des Sekrets der sekretorischen Zellen.

Die kinozilienfreien Zellen im Trachealepithel unterscheiden sich ultrastrukturell von den sekretorischen Zellen (Becherzellen und seröse Zellen), wie sie im Trachealepithel anderer Spezies vorkommen. Während in Becherzellen und serösen Zellen Sekretgranula in der Regel in großer Zahl vorhanden sind und leicht die Hälfte des Zellvolumens einnehmen, kommen diese Strukturen in den kinozilienfreien Zellen im Trachealepithel von *S. etruscus* in vergleichsweise geringer Zahl vor. Auch sind das raue endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat relativ gering entwickelt. Da die Exozytose einiger Granula, die in der Nähe der apikalen Zellmembran liegen, beobachtet wurde, ist es gerechtfertigt, diese Zellen als sekretorische Zellen zu bezeichnen. Das in diesen Zellen reichlich vorhandene glatte endoplasmatische Retikulum kommt in Atemwegsepithelzellen in großer Menge, charakteristischerweise in Clara-Zellen vor, die die sekretorischen Zellen in Atemwegen mit geringem Durchmesser darstellen, wie z.B. im Trachealepithel von Maus, Hamster und Kaninchen, aber auch in den Bronchioli terminales des Menschen. Von diesen Zellen, die speziesbedingte Unterschiede in ihrer Ultrastruktur aufweisen (Smith et al. 1979, Plopper et al. 1983), unterscheiden sich die sekretorischen Zellen im Trachealepithel von *Suncus etruscus* durch das Fehlen einer kuppelförmigen Vorwölbung des apikalen Zellpols, d.h. eines ihrer hervorstechenden morphologischen Merkmale. Zellen, die die morphologischen Kriterien von Clara-Zellen (apikale Protrusionen, glattes endoplasmatische Retikulum) erfüllen, kommen jedoch in den intrapulmonalen Atemwegen bei *Suncus etruscus* in großer Zahl vor. Es stellt sich die Frage, ob es sich bei den sekretorischen Zellen im Trachealepithel von *S. etruscus* um einen

Subtyp von Clara-Zellen handelt, wie das reichlich vorhandene glatte endoplasmatische Retikulum vermuten lässt, oder ob ein eigenständiger Zelltyp vorliegt.

In Clara-Zellen u.a. von Mensch, Ratte und Maus sind verschiedene sekretorische Peptide und Proteine nachgewiesen, wie z.B. das Clara-Zell 10kD-Protein (CC 10), ein Phospholipase A2-Inhibitor, das große Ähnlichkeit mit dem Uteroglobulin aufweist (Singh et al. 1990, 1993), Surfactant Protein B (Phelps und Floros, 1991), ein Leukozyten Protease Inhibitor (de Water et al. 1986), eine Trypsin-ähnliche Protease (Sakai et al. 1993) und das Peptid Guanylin (Cetin et al. 1995), das die Guanylatzyklase aktiviert und z.B. im Dünndarm die Chlorid-Sekretion stimuliert. Von diesen Proteinen hat das CC10 den Status eines Clara-Zellmarkers erlangt. Vorläufige immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten der Trachea und Lunge von *Suncus etruscus* haben eine schwache Immunreaktivität unterhalb der apikalen Zellmembran, d.h. im Bereich der Sekretgranula, in einigen der sekretorischen Zellen in der Trachea und im Bereich des apikalen Zellpols der intrapulmonalen Clara-Zellen ergeben. Sollten sich diese Befunde mit verfeinerten Methoden und bei höherer Auflösung (Semidünnschnitt-Technik, Immungold-Lokalisation) bestätigen, wären die sekretorischen Zellen im Trachealepithel von *S. etruscus* trotz des Fehlens der charakteristischen apikalen Vorwölbung als Clara-Zellen zu bezeichnen. Diese Zuordnung stünde weiterhin in Einklang mit dem Vorhandensein eines stark ausgebildeten glatten endoplasmatischen Retikulums in diesen Zellen, das in bronchiolären Clara-Zellen als Ort der Cytochrom P-450 Monooxygenase-Aktivität identifiziert wurde (Devereux et al. 1981, Plopper et al. 1992).

Das Cytochrom P-450 Monooxygenase-System spielt eine wichtige Rolle in der Entgiftung körperfremder (xenobiotischer) Substanzen. So ist es z.B. in der Leber

für die Hydroxylierung von Phenobarbital und damit für dessen erhöhte Wasserlöslichkeit und vermehrte Ausscheidung verantwortlich. Andererseits werden durch das Cytochrom P-450 System einige der wirksamsten Karzinogene *in vivo* in ihre chemisch aktive Form überführt. Da das Atemwegsepithel mit zahlreichen in der Atemluft vorhandenen, potentiell karzinogenen Schadstoffen in Kontakt kommt, könnte das reichliche Vorkommen des glatten endoplasmatischen Retikulums in Clara-Zellen der Atemwege bzw. den sekretorischen Zellen im Trachealepithel von *S. etruscus* eher nachteilig sein und die Entstehung von Tumoren durch Aktivierung von Karzinogenen begünstigen.

Auch wenn das Sekret der sekretorischen Zellen im Trachealepithel von *Suncus etruscus* nicht identifiziert ist, ist doch festzuhalten, dass es sich auf Grund der ultrastrukturellen Eigenschaften um ein Glykoprotein und nicht um Muzin handelt. Die oben diskutierte Aussage, dass die Form des Epithels (mehrschichtig oder einschichtig) von der Dimension der Atemwege abhängig ist, kann insofern erweitert werden, dass auch das Vorkommen der sekretorischen Zellen bzw. Art des Sekrets, d.h. Schleim oder Glykoprotein, mit der Größe der Atemwege korreliert. Schleimproduzierende Becherzellen kommen charakteristischerweise in großkalibrigen Atemwegen vor, während seröse Zellen oder Clara-Zellen, die Glykoproteine bilden, die sekretorischen Zellen kleinkalibriger Atemwege darstellen (s. auch Einleitung). Weiterhin fehlen in Atemwegen, die keine Becherzellen aufweisen, auch die Drüsen, so dass sowohl die Menge als auch die Art des Sekrets den Größenverhältnissen der Atemwege angepasst ist.

Die neuroendokrinen Zellen und neuroepithelialen Körper sind Mitglieder der Gruppe des APUD (amine precursor uptake and decarboxylation) –Zellsystems (Pearse

1969) bzw. des diffusen neuro-endokrinen Systems (DNES, Grube und Forssmann 2004). Sie wurden zuerst von Feyrter (1938, 1954) in den Atemwegen beschrieben und zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, biogene Amine aufzunehmen bzw. Aminosäuren zu decarboxylieren und außerdem Peptidhormone oder regulatorische Peptide zu synthetisieren. Der Begriff „neuroendokrin“ beruht auf der Tatsache, dass die von diesen Zellen gebildeten Peptidhormone auch von Neuronen gebildet werden, und als Neuropeptide als Transmitter oder Neuromodulatoren wirken.

In der vorliegenden Arbeit wurden neuroendokrine Zellen ultrastrukturell durch das Vorkommen zahlreicher elektronendichter Sekretgranula im basalen Zytoplasma sowie durch den Nachweis einer positiven Serotonin-Immunreaktion identifiziert. Wie bei den meisten Spezies kommen bei *S. etruscus* im Trachealepithel ausschließlich einzelne neuroepitheliale Zellen vor, während die neuroepithelialen Körper in den intrapulmonalen Atemwegen vorherrschen.

Die am häufigsten in den neuroepithelialen Zellen der Atemwege vorkommenden Peptide sind Calcitonin, Gastrin-releasing peptide (GRP, Bombesin) und Enkephaline (Scheuermann 1987). Für die vorliegende Untersuchung standen nur Antiseren gegen Calcitonin und das verwandte Calcitonin-gene-related peptide (CGRP) zur Verfügung, von denen nur das anti-Calcitonin Antiserum eine positive Immunreaktion an den intrapulmonalen neuroepithelialen Körpern, nicht jedoch an den neuroendokrinen Zellen im Trachealepithel ergab. Untersuchungen an den Atemwegen des Menschen haben gezeigt, dass die disseminierten neuroendokrinen Zellen zwar in allen Altersstufen (Fetus, Neugeborenes, Erwachsener) in der Regel eine positive Calcitonin-Immunreaktivität zeigen, dass aber Calcitonin-immunreaktive Zellen bei Neugeborenen sehr viel häufiger sind als bei Feten oder Erwachsenen (Becker et

al.1980; Cutz et al. 1981; Stahlman et al. 1984, 1985). Die Tatsache, dass in den neuroendokrinen Zellen der Trachea von *S. etruscus* keine Calcitonin-Immunreaktivität nachgewiesen werden konnte, könnte also altersbedingt sein, denn es standen für diese Untersuchung nur adulte Tiere zur Verfügung. Ein falsch negativer Befund kann ausgeschlossen werden, da mit denselben Antikörpern unter gleichen Fixierungsbedingungen und bei gleichem immunhistochemischem Protokoll in den neuroepithelialen Körpern der intrapulmonalen Atemwege eine positive Reaktion erzielt wurde. Das Vorkommen mehrerer ultrastrukturell unterscheidbarer Granulapopulationen in den neuroendokrinen Zellen spricht dafür, dass diese Zellen neben Serotonin auch Neuropeptide produzieren. Da Leu-Enkephalin beim Menschen ausschließlich in disseminierten neuroendokrinen Zellen der Atemwege und nicht in neuroepithelialen Körpern vorkommt (Cutz et al. 1981), wäre dieses Molekül ein Peptidkandidat auch für die neuroepithelialen Zellen im Trachealepithel der etruskischen Spitzmaus.

Ein weiterer Marker der Zellen des DNES ist das Enzym Neuron-spezifische Enolase (NSE), das primär in Nervenzellen und deren Fortsätzen vorkommt (Schmechel et al. 1978a,b; Tapia et al. 1981). In der vorliegenden Arbeit konnte dieses Enzym allerdings nur in Nervenfasern, darunter auch solchen innerhalb der neuroepithelialen Körper, nicht jedoch in neuroendokrinen Zellen nachgewiesen werden.

Die neuroendokrinen Zellen wurden von Fujita in die Liste der „Paraneurone“ aufgenommen (Fujita 1977). Paraneurone weisen ähnliche Eigenschaften wie die Zellen des DNES auf. Fujita (1977) schreibt ihnen aber zusätzlich eine „rezeptor-sekretorische“ Funktion zu, d. h. als Antwort auf adäquate Reize sollen sie Sekrete,

d.h. Hormone oder Transmitter (z. B. biogene Amine), freisetzen, die auf Zielzellen wirken. Zumindest einige der neuroendokrinen Zellen im Trachealepithel gehören zum „offenen Typ“ (Grube und Forssmann 2004) und stehen über Mikrovilli mit dem Lumen in Verbindung. Damit erfüllen diese Zellen auch morphologisch die Kriterien eines (Chemo-)Rezeptors. Zielzellen, die durch Serotonin parakrin beeinflusst werden können, sind vor allem die sekretorischen Zellen, möglicherweise auch die glatten Muskelzellen des M. trachealis.

Für die intrapulmonal gelegenen neuroepithelialen Körper wird allgemein eine chemorezeptive Funktion angenommen. Es konnte in Lungen von Kaninchen experimentell gezeigt werden, dass eine Hypoxie zur Degranulation der neuroendokrinen Zellen und Freisetzung von Serotonin führt, das seinerseits vasokonstriktiv wirkt und die Durchblutung in hypoxischen Lungenbezirken drosselt (Lauweryns und Cokelaere 1973). Die Lokalisation an Aufzweigungen der Atemwege und unmittelbar präalveolär scheint daher von besonderer strategischer Bedeutung für eine chemorezeptive Funktion der neuroepithelialen Körper zu sein.

Auf Grund der Ultrastruktur der intraepithelialen Nervenendigungen sind die neuroepithelialen Körper sowohl afferent als auch efferent innerviert. Sie ähneln damit sowohl in dieser Hinsicht als auch in ihren ultrastrukturellen und einigen histochemischen Eigenschaften den Typl-Zellen im Glomus caroticum, die ebenfalls eine chemorezeptive Funktion haben und auf hypoxische Reize mit einer Degranulation reagieren. Zwischen den beiden Rezeptoren existieren allerdings eine Reihe Unterschiede. So enthalten die Zellen des Glomus caroticum Katecholamine und nicht Serotonin wie die der neuroepithelialen Körper im Atemwegsepithel. Auch kommen im Glomus caroticum, nicht aber im Atemwegsepithel Ganglienzellen vor.

Schließlich reagieren die neuroepithelialen Körper auf eine Hypoxie der eingeatmeten Luft, während das Glomus caroticum auf eine Hypoxie des Blutes reagiert. Die neuroepithelialen Körper scheinen somit keine vaskulären Chemorezeptoren zu sein (Scheuermann 1987).

Schließlich haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass die neuroendokrinen Zellen eine wichtige Rolle bei der Epithelregeneration spielen (Hoyt et al. 1990, 1991). Aus Untersuchungen an Mäusen geht hervor, dass die neuroepithelialen Körper ein Reservoir an Vorläuferzellen enthalten, aus dem das Bronchialepithel nach einer Schädigung regeneriert werden kann (Reynolds et al. 2000 a, b). Es ist anzunehmen, dass auch im Atemwegsepithel von *Suncus etruscus* die neuroendokrinen Zellen an der Epithelregeneration beteiligt sind, insbesondere da in diesem einschichtigen Epithel basale Zellen fehlen. Basale Zellen kommen charakteristischerweise in mehrreihigen Epithelien vor. Sie haben Kontakt mit der Basalmembran, erreichen aber nicht das Lumen. In mehrreihigen Atemwegsepithelien spielen sie eine wichtige Rolle für die Epithelregeneration, da sie sich teilen können und ihre Tochterzellen sich zu Flimmerzellen und sekretorischen Zellen differenzieren (Mc Dowell et al. 1978, 1981). Inwieweit die neuroendokrinen Zellen den Charakter von Stammzellen haben, ist jedoch nicht geklärt.

5 Zusammenfassung

Die etruskische Spitzmaus, *Suncus etruscus*, (Ordnung Insektivoren, Familie Soricinae) ist mit einem Körpergewicht von ca. 2 g das kleinste in Europa vorkommende Säugetier. Es beansprucht auf Grund seiner extremen physiologischen Leistungen mit einer Herzfrequenz von über 800 Schlägen/ Min. und einer Atemfrequenz von ca. 660 Atemzügen/Min, jeweils in Ruhe gemessen, besonderes biologisches Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde das Epithel der Trachea und der intrapulmonalen Atemwege transmissions- und rasterelektronenmikroskopisch sowie mit immunhistochemischen Methoden untersucht.

Das Trachealepithel ist ein einschichtiges hochprismatisches Epithel, das in etwa zu gleichen Teilen aus Kinozilien-tragenden Flimmerzellen und Kinozilien-freien sekretorischen Zellen besteht. Daneben kommen vereinzelt neuroendokrine Zellen vor. Die Flimmerzellen und sekretorischen Zellen sind nicht gleichmäßig im Epithel verteilt. Sekretorische Zellen sind im knorpeligen Teil der Trachea zahlreicher als im membranösen Abschnitt, während Flimmerzellen im membranösen Abschnitt häufiger als im knorpeligen vorkommen. Die sekretorischen Zellen sind durch unterschiedliche Mengen an Sekretgranula und ein ausgedehntes glattes ER charakterisiert. Sie unterscheiden sich von Clara-Zellen durch das Fehlen eines sich ins Lumen vorwölbenden apikalen Zellpol und sezernieren vermutlich Glykoproteine. In den neuroendokrinen Zellen konnte Serotonin, jedoch weder Calcitonin noch CGRP nachgewiesen werden. Diese Zellen sind dem APUD-System bzw. diffusen neuroendokrinen System (DNES) zuzurechnen. Becherzellen sowie Drüsen fehlen in der Trachea von *S. etruscus*.

Die intrapulmonalen Atemwege sind ebenfalls von einem iso- bis hochprismatischem Flimmerepithel ausgekleidet, in dem als Kinozilien-freie Zellen typische Clara-Zellen vorkommen. Neben einzelnen neuroendokrinen Zellen kommen intrapulmonal dicht innervierte neuroepitheliale Körper vor, die Chemorezeptoren darstellen. In ihnen konnte immunhistochemisch neben Serotonin auch Calcitonin nachgewiesen werden.

Der Vergleich des Trachealepithels der etruskischen Spitzmaus mit verschiedenen Atemwegsepithelien anderer Spezies legt den Schluss nahe, dass die zelluläre Zusammensetzung der Atemwegsepithelien von der Größe der Atemwege und nicht von der Lokalisation (Trachea, Bronchien, Bronchiolen) abhängt. Demzufolge ist in Atemwegen mit kleinem Durchmesser wie z.B. der Trachea von *S. etruscus* das Verhältnis von Flimmerzellen zu sekretorischen Zellen in etwa 1, während in Atemwegen mit großem Durchmesser wesentlich mehr Flimmerzellen als sekretorische Zellen vorkommen. Die sekretorischen Zellen in Atemwegen mit kleinem Durchmesser sind sowohl morphologisch als auch von der Art des Sekrets uneinheitlich, in jedem Fall fehlen aber Becherzellen, d.h. ein muzinartiges Sekret.

6 Literaturverzeichnis

Aiello E, Sleigh M (1977) Ciliary function of the frog oro-pharyngeal epithelium. *Cell Tissue Res* 178:267-78

Becker KL, Monaghan KG, Silva OL (1980) Immunocytochemical localization of calcitonin in Kulchitsky cells of human lung. *Arch Pathol Lab Med* 104:196-8

Breeze RG, Wheeldon EB (1977) The cells of the pulmonary airways. *Am Rev Respir Dis* 116:705-77

Cetin Y, Kulaksiz H, Redecker P, Bargsten G, Adermann K, Grube D, Forssmann WG (1995) Bronchiolar nonciliated secretory (Clara) cells: source of guanylin in the mammalian lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5925-9

Chang LY, Mercer RR, Stockstill BL, Miller FJ, Graham JA, Ospital JJ, Crapo JD (1988) Effects of low levels of NO₂ on terminal bronchiolar cells and its relative toxicity compared to O₃. *Toxicol Appl Pharmacol* 96:451-64

Clara M (1937) Zur Histobiologie des Bronchialepithels. *Z Mikrosk Anat Forsch* 41:321-66

Cutz E, Chan W, Track NS (1981) Bombesin, calcitonin and leu-enkephalin immunoreactivity in endocrine cells of human lung. *Experientia* 37:765-7

Devereux TR, Serabjit-Singh CJ, Slaughter SR, Wolf CR, Philpot RM, Fouts JR (1981) Identification of cytochrome P-450 isozymes in nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) and alveolar type II cells isolated from rabbit lung. *Exp Lung Res* 2:221-30

De Water R, Willems LN, Van Muijen GN, Franken C, Fransen JA, Dijkman JH, Kramps JA (1986) Ultrastructural localization of bronchial antileukoprotease in central and peripheral human airways by a gold-labeling technique using monoclonal antibodies. *Am Rev Respir Dis* 133:882-90

Dustin P (1984) *Microtubules*. 2.Auflage. Springer – Verlag: Berlin, Heidelberg, New York.

Evans MJ, Cox RA, Shami SG, Wilson B, Plopper CG Evans (1989) The role of basal cells in attachment of columnar cells to the basal lamina of the trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1:463-9

Feyrter F (1938) *Über diffuse Endokrine epitheliale Organe*, J. A. Barth, Leipzig

Feyrter F (1954) Argyrophilia of bright cell system in bronchial tree in man. *Z Mikrosk Anat Forsch* 61:73-81

Fons R, Saint Girons MC (1975) Mammals of France. XIV. Morphological data concerning the Etruscan shrew, *Suncus etruscus* (Savi, 1822). *Mammalia* 39:685-8

Fujita T (1977) Concept of paraneurons. *Arch Histol Jpn* 40 Supp1:1-12

Gehr P, Sehovic S, Burri PH, Claassen H, Weibel ER (1980) The lung of shrews: morphometric estimation of diffusion capacity. *Respir Physiol* 40:33-47

Gilljam H, Motakefi AM, Robertson B, Strandvik B (1987) Ultrastructure of the bronchial epithelium in adult patients with cystic fibrosis. *Eur J Respir Dis* 71:187-94

Graf J, Stockinger L (1966) Endoplasmic reticulum and impulse transmission in ciliary epithelium. Localization of cholinesterase. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 72:184-92

Grube D, Forssmann WG (1979) Morphology and function of the enteroendocrine cells. *Horm Metab Res* 11: 589-606

Grube D, Forssmann WG 2004 Disseminierte endocrine Zellen In: Benninghoff Drenckhahn Anatomie, herausgegeben von D Drenckhahn Elsevier, Urban & Fischer, München, pp. 218-227

Horsfield K, Cumming G (1968) Morphology of the bronchial tree in man. *J Appl Physiol* 24:373-83

Horsfield K (1978) Quantitative morphology and structure: functional correlations in the lung. *Monogr Pathol* 19:151-9

Hoyt RF Jr, McNelly NA, Sorokin SP (1990) Dynamics of neuroepithelial body (NEB) formation in developing hamster lung: light microscopic autoradiography after 3H-thymidine labeling in vivo. *Anat Rec* 227:340-50

Hoyt RF Jr, McNelly NA, McDowell EM, Sorokin SP (1991) Neuroepithelial bodies stimulate proliferation of airway epithelium in fetal hamster lung. *Am J Physiol* 260 (Pt 1):L234-40

Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 75:816-21

Jeffery PK (1981) The effect of tobacco smoke, with or without phenylmethyloxadiazole (PMO), on rat bronchial epithelium: a light and electron microscopic study. *J Pathol* 133:341-59

Jeffery PK, Reid L (1975) New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron microscopic study. *J Anat* 120:295-320

Jurgens KD, Fons R, Peters T, Sender S (1996) Heart and respiratory rates and their significance for convective oxygen transport rates in the smallest mammal, the Etruscan shrew *Suncus etruscus*. *J Exp Biol* 199:2579-84

Kameda Y, Shigemoto H, Ikeda A (1980) Development and cytodifferentiation of C cell complexes in dog fetal thyroids. An immunohistochemical study using anti-calcitonin, anti-C-thyroglobulin and anti-19S thyroglobulin antisera. *Cell Tissue Res* 206: 403-15

Karnovsky MJ (1971) Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy. *Proc 11th Annual Meeting Am Soc Cell Biol, New Orleans*, p 146

Kennedy AR, Desrosiers A, Terzaghi M, Little JB (1978) Morphometric and histological analysis of the lungs of Syrian golden hamsters. *J Anat* 125:527-53

Korhonen LK, Holopainen E, Paavolainen M (1969) Some histochemical characteristics of tracheobronchial tree and pulmonary neoplasms. *Acta Histochem* 32:57-73

Krause WJ, Leeson CR (1973) The postnatal development of the respiratory system of the opossum I. Light and scanning electron microscopy. *Am J Anat* 137:337-55

Lauweryns JM, Cokelaere M. (1973) Intrapulmonary neuro-epithelial bodies: hypoxia-sensitive neuro(chemo-)receptors. *Experientia* 29:1384-6

Lauweryns JM, Cokelaere M (1973) Hypoxia-sensitive neuro-epithelial bodies. Intrapulmonary secretory neuroreceptors, modulated by the CNS. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 145:521-40

Lauweryns JM, Cokelaere M, Theunynck P (1972) Neuro-epithelial bodies in the respiratory mucosa of various mammals. A light optical, histochemical and ultrastructural investigation. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 135:569-92

Lloyd RV (1984) Immunohistochemistry of neuron specific enolase. *Advances in Immunohistochemistry.*: Roland A. DeLellis (ed) Masson Publishing USA, Inc., New York, pp.127-140

Luciano L, Reale E, Ruska H (1969) Brush cells in the alveolar epithelium of the rat lung. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 95:198-201

Mariassy AT (1991) Epithelial cells of trachea and bronchi.: Parent RA (ed) *Comparative Biology of the normal lung, Vol I.*CRC Press, Boca Raton, pp 63-76

Mariassy AT, Plopper CG (1983) Tracheobronchial epithelium of the sheep: I. Quantitative light-microscopic study of epithelial cell abundance, and distribution. *Anat Rec* 205:263-75

McDowell EM, Barrett LA, Glavin F, Harris CC, Trump BF (1978) The respiratory epithelium I. Human bronchus. *J Natl Cancer Inst* 61:539-49

Meyrick B, Sturgess JM, Reid L (1969) A reconstruction of the duct system and secretory tubules of the human bronchial submucosal gland. *Thorax* 24:729-36

Mohr OE, Schluesche G (1991) Trachealepithel des Hundes – Regionale Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung, Ultrastruktur der Zelltypen und Gefrierbruchaspekte der Zonulae occludentes. *Diss. Med. Hochschule Hannover*

Nadel JA (1985) Regulation of airway secretions. *Chest* 87 (1 Suppl):111S-113S

Nadel JA, Widdicombe JH, Peatfield AC (1985) Control of airway secretion, ion transport and water movement. *Handbook of Physiology. The Respiratory System. Circulation and nonrespiratory functions. Bethesda, MD. Am Physiol Soc, sect 3, Vol I, pp 419-45*

Nikula KJ, Wilson DW, Dungworth DL, Plopper CG (1988) In vitro evidence of cellular adaptation to ozone toxicity in the rat trachea. *Toxicol Appl Pharmacol* 93:394-402

Pack RJ, Al-Ugaily LH, Morris G, Widdicombe JG (1980) The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell Tissue Res* 208:65-84

Pavelka M, Ronge HR, Stockinger G (1976) Comparative study of tracheal epithelium of different mammals. *Acta Anat (Basel)* 94:262-82

Pearse AG (1969) The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem* 17:303-13

Phelps DS, Floros J (1991) Localization of pulmonary surfactant proteins using immunohistochemistry and tissue in situ hybridization. *Exp Lung Res* 17:985-95

Plopper CG (1983) Comparative morphologic features of bronchiolar epithelial cells. The Clara cell. *Am Rev Respir Dis* 128:S37-41

Plopper CG Hyde DM (1991) Epithelial cells of bronchioles.: Parent RA (ed) *Comparative Biology of the normal lung, Vol I.* CRC Press, Boca Raton, pp 85-92

Plopper CG, Mariassy AT, Lollini LO (1983) Structure as revealed by airway dissection. A comparison of mammalian lungs. *Am Rev Respir Dis* 128:S4-7

Plopper CG, Alley JL, Serabjitsingh CJ, Philpot RM (1983) Cytodifferentiation of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell during rabbit lung maturation: an ultrastructural and morphometric study. *Am J Anat* 167:329-57

Plopper CG, Halsebo JE, Berger WJ, Sonstegard KS, Nettesheim P (1983)
Distribution of nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cells in intra- and
extrapulmonary airways of the rabbit. *Exp Lung Res* 5:79-98

Plopper CG, Heidsiek JG, Weir AJ, George JA, Hyde DM (1989) Tracheobronchial
epithelium in the adult rhesus monkey: a quantitative
histochemical and ultrastructural study. *Am J Anat* 184:31-40

Plopper CG, Macklin J, Nishio SJ, Hyde DM, Buckpitt AR (1992) Relationship of
cytochrome P-450 activity to Clara cell cytotoxicity. III. Morphometric comparison of
changes in the epithelial populations of terminal bronchioles and lobar bronchi in
mice, hamsters, and rats after parenteral administration of naphthalene. *Lab Invest*
67:553-65

Plopper CG, Mariassy AT, Wilson DW, Alley JL, Nishio SJ, Nettesheim P (1983)
Comparison of nonciliated tracheal epithelial cells in six mammalian
species: ultrastructure and population densities. *Exp Lung Res* 5:281-94

Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in
electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208-12

Reynolds SD, Giangreco A, Power JH, Stripp BR (2000) Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am J Pathol* 156:269-78

Reynolds SD, Hong KU, Giangreco A, Mango GW, Guron C, Morimoto Y, Stripp BR (2000) Conditional clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:L1256-63

Rhodin JA (1966) The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *Am Rev Respir Dis* 93:Suppl:1-15

Sakai K, Kawaguchi Y, Kishino Y, Kido H (1993) Electron immunohistochemical localization in rat bronchiolar epithelial cells of tryptase Clara, which determines the pneumotropism and pathogenicity of Sendai virus and influenza virus. *J Histochem Cytochem* 41:89-93

Scheuermann DW (1987) Morphology and cytochemistry of the endocrine epithelial system in the lung. *Int Rev Cytol* 106:35-88

Scheuermann DW (1997) Comparative histology of pulmonary neuroendocrine cell system in mammalian lungs. *Microsc Res Tech* 1 37:31-42

Schmechel D, Marangos PJ, Brightman M (1978) Neurone-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* 276:834-6

Schmechel D, Marangos PJ, Zis AP, Brightman M, Goodwin FK (1978) Brain endolases as specific markers of neuronal and glial cells. *Science* 199:313-5

Sikri KL, Varndell IM, Hamid QA, Wilson BS, Kameya T, Pomnder BA, Lloyd RV, Bloom SR, Polak JM (1985) Medullary carcinoma of the thyroid. An immunocytochemical and histochemical study of 25 cases using eight separate markers. *Cancer* 56: 2481-91

Singh G, Katyal SL, Brown WE, Kennedy AL, Singh U, Wong-Chong ML (1990) Clara cell 10 kDa protein (CC10): comparison of structure and function to uteroglobin. *Biochim Biophys Acta* 1039:348-55

Singh G, Katyal SL, Brown WE, Kennedy AL (1993) Mouse Clara cell 10-kDa (CC10) protein: cDNA nucleotide sequence and molecular basis for the variation in progesterone binding of CC10 from different species. *Exp Lung Res* 19:67-75

Smith MN, Greenberg SD, Spjut HJ (1979) The Clara cell: a comparative ultrastructural study in mammals. *Am J Anat* 155:15-30

Stahlman MT, Gray ME (1984) Ontogeny of neuroendocrine cells in human fetal lung. I. An electron microscopic study. *Lab Invest* 51:449-63

Stahlman M, Grey ME, Kasselberg AG (1985) Immunoreactive bombesin and calcitonin paracrine cells of human fetal and newborn airways. *Pediatr Pulmonol* 3 Suppl:S6-12

Stahlman MT, Kasselberg AG, Orth DN, Gray ME (1985) Ontogeny of neuro-endocrine cells in human fetal lung. II. An immunohistochemical study. *Lab Invest* 52:52-60

Storch V, Welsch U (1997) *Systematische Zoologie*. 5. Aufl., Gustav Fischer Verlag: 690-92

Tandler B, Sherman JM, Boat TF (1983) Surface architecture of the mucosal epithelium of the cat trachea: I. Cartilaginous portion. *Am J Anat* 168:119-31

Tandler B, Sherman JM, Boat TF, Wood RE (1983) Surface architecture of the mucosal epithelium of the cat trachea: II. Structure and dynamics of the membranous portion. *Am J Anat* 168:133-44

Tapia FJ, Polak JM, Barbosa AJ, Bloom SR, Marangos PJ, Dermody C, Pearse AG (1981) Neuron-specific enolase is produced by neuroendocrine tumours. *Lancet* 1:808-11

Weibel ER (1963) Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest* 12:131-55

Young SL, Fram EK, Randell SH (1986) Quantitative three-dimensional reconstruction and carbohydrate cytochemistry of rat nonciliated bronchiolar (Clara) cells. *Am Rev Respir Dis* 133:899-907

Danksagung

Herrn Prof . Dr. Dr. U. Welsch, Vorstand der Anatomischen Anstalt der LMU München (Lehrstuhl II), danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Bartels für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die hilfreiche Unterstützung und Beratung bei der Durchführung dieser Arbeit und seine nette und vorbildliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. K.-D. Jürgens und Herrn Dr. T. Peters, Abt. Vegetative Physiologie der Medizinischen Hochschule Hannover, danke ich für die Gewebeproben.

Nicht zuletzt sei auch Frau U. Fazekas und Frau E. Eppinger für die sehr gute technische Assistenz gedankt.

Ganz besonders danken möchte ich auch meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mein beruflicher Werdegang und die Erstellung dieser Arbeit nicht denkbar gewesen wäre.

Ralf Kemmerling und Heike Haufe danke ich für die unermüdliche Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Hatz
Vornamen: Dorothea Marie-Luise
Anschrift: Kunigundenstraße 14
80802 München
geboren am/in: 19.03.1967 in Offenburg
Religion: römisch-katholisch

Bildungsweg

1977-1986 Gymnasium Heimschule Lender in Sasbach,
Baden-Württemberg
1987-1990 Ausbildung zur Krankenschwester
1990-1991 Krankenschwester im Klinikum Großhadern
1991-1999 Studium der Humanmedizin
Ludwig Maximilians Universität München
Juni 1999 Ärztliche Prüfung

ÄiP

01.09.1999-
28.02.2001 Pathologisches Institut der LMU München, Prof. Dr. Löhrs

Assistenzarztzeit

01.03.2001-
28.02.2005 Institut für Rechtsmedizin der Universität München,
Prof. Dr. W. Eisenmenger
ab 01.03.05 Institut für Rechtsmedizin der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz, Prof. Dr. Dr. Urban