„Trigeminale Innervation des olfaktorischen Systems: Anatomie und Funktion“

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation
vorgelegt von

Diplom Biologin
Melanie Anne Söchtig

aus München

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Frank Müller
Universitätsprofessor Dr. Marc Spehr

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Februar 2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten
der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Trigeminale Innervation des olfaktorischen Systems: Anatomie und Funktion

Melanie Anne Söchtig

Berichte des Forschungszentrums Jülich; 4372
ISSN 0944-2952
Institute of Complex Systems
Zelluläre Biophysik (ICS-4)
Jül-4372

D 82 (Diss., RWTH Aachen University, 2014)

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter http://www.fz-juelich.de/zb/juwel

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

ZUSAMMENFASSUNG

Das olfaktorische System dient der Wahrnehmung von Gerüchen und somit vor allem der Erkennung von Nahrungs- oder Gefahrenquellen. Dem trigeminalen System werden in erster Linie somatosensorische Eigenschaften zugeschrieben. Fast alle Gerüche aktivieren jedoch neben dem olfaktorischen auch das trigeminale System. Viele Studien, die sich mit der Wahrnehmung von Gerüchen beschäftigen, beweisen, dass es wechselseitige Einflüsse zwischen den beiden Systemen gibt. Die molekularen Mechanismen dieser Interaktionen sind jedoch unbekannt.
Um ein besseres Verständnis dieser Mechanismen zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit neben der trigeminalen Innervation des Riechsystems auch funktionelle Aspekte der trigeminal/olfaktorischen Interaktion untersucht.
Immunhistochemisch wurden trigeminale Fasern, die die Peptide Substanz P (SP) und *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) enthalten und auf einen Reiz hin ausschütten können, im olfaktorischen Epithel (OE) und *Bulbus olfactorius* (OB) gefunden. Im OE stehen diese Fasern oft mit Zelltypen, die sich von regulären olfaktorischen Neuronen unterscheiden, in Verbindung. Zu diesen zählen unter anderem microvilliäre Zellen, die Komponenten eines Inositoltrisphosphat (IP3) Signalweges und den SP Rezeptor NK1R exprimieren.
Die Ergebnisse von Ca^{2+}-Imaging Experimenten an Gewebsschnitten durch das OE deuten darauf hin, dass die microvilliären Zellen auf SP sowie auf Duftstoffe mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration reagieren. Die Antwort auf SP wird vermutlich hauptsächlich durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus internen Speichern getragen.
Immunhistochemische Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass CGRP Rezeptoren in einer Subpopulation von regulären olfaktorischen Neuronen exprimiert werden. In Ca^{2+}-Imaging Versuchen antworteten einige der Zellen, die auf Duftstoffe reagierten, auch auf CGRP mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration. Manche dieser Zellen antworteten zudem auf SP, was vermuten lässt, dass es sich bei diesen Zellen ebenfalls um IP3 Rezeptor-positive microvilliäre Zellen (s.o.) handeln könnte. Vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl reguläre olfaktorische Neurone als auch microvilliäre IP3 Rezeptor-positive Zellen auf CGRP reagieren können.
Im OB werden alle Schichten trigeminal innerviert, aber es gibt eine klare Präferenz für ventral gelegene Glomeruli. Quantitative Ergebnisse zeigen einen Anstieg der trigeminalen Innervation der Glomeruli in der postnatalen Entwicklungsphase, was darauf hindeutet, dass die trigeminale Innervation des OB eine Rolle bei Entwicklungsprozessen, wie beispielsweise dem olfaktorischen Lernen, spielen könnte. Die Rezeptoren für SP und CGRP konnten im OB nicht eindeutig lokalisiert werden. Bei NK1R-positiven Zellkörpern könnte es sich um lokale Interneurone oder um Zellen handeln, die Signale aus dem OB in höhere Gehirnareale weiterleiten.

Die Aktivierung der microvilliären Zellen durch trigeminale Botenstoffe wie SP könnte die Grundlage für Mechanismen der Modulation der Duftstoffdetektion darstellen. Weiterhin wird diskutiert, inwiefern das trigeminale System beim Schutz und der Regeneration des olfaktorischen Systems, bei der durch Duftstoffe stimulierten Nahrungsaufnahme und/oder beim olfaktorischen Lernen eine Rolle spielen könnte.

ABSTRACT

The olfactory system serves for the detection of odorants and thus mainly for the identification of food sources or hazards. The trigeminal system is commonly known to have somatosensory properties. However, almost every odorant activates the olfactory as well as the trigeminal system. Many studies dealing with the perception of odorants demonstrate that there are mutual influences between the two systems, but the molecular mechanisms of these interactions are unknown.
To gain a better insight into these mechanisms the trigeminal innervation of the olfactory system as well as functional aspects of the trigeminal olfactory interaction were investigated in the present work.
Trigeminal fibers that contain and upon stimulation can release the peptides Substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) were found in the olfactory epithelium (OE) and the olfactory bulb (OB). Within the OE in many cases these fibers are associated with cell types that differ from regular olfactory neurons. These include microvillous cells, which express components of an inositoltris-phosphate (IP3) signalling pathway and the SP receptor NK1R.
Ca^{2+}-imaging experiments show that these cells respond to SP with an increase in the intracellular Ca^{2+}-concentration. Presumably, the response to SP is primarily carried by the release of Ca^{2+} from internal stores.
Immunohistochemical studies indicate the expression of CGRP receptors in a subpopulation of regular olfactory neurons. In Ca^{2+}-imaging experiments some of the cells that responded to odorants also responded to CGRP with an increase in the intracellular Ca^{2+}-concentration. In addition, some of these cells also responded to SP indicating that they might be IP3 receptor-positive microvillous cells (see above). Preliminary results suggest that both regular olfactory neurons and microvillous IP3 receptor-positive cells can respond to CGRP.
In the OB every layer is trigeminally innervated, but there is a clear preference for ventrally located glomeruli. Quantitative results show an increase in trigeminal innervation of the glomeruli during postnatal development indicating a role of trigeminal innervation of the OB in developmental processes like olfactory learning. It was not possible to clearly localize the receptors for SP and CGRP. NK1R-positive cell bodies might be local interneurons, or cells that relay signals from the OB to higher brain areas.

The activation of microvillous cells by trigeminal messengers like SP might be the basis for the trigeminal modulation of odorant detection. Furthermore, a potential contribution of the trigeminal system to the protection and regeneration of the olfactory system, to olfactory stimulated food intake, and/or to olfactory learning are discussed.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG ..... **I**

ABSTRACT ..... **III**

INHALTSVERZEICHNIS ..... **V**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... **IX**

1. EINLEITUNG **1**

1.1. Anatomie und Physiologie des olfaktorischen Systems **2**
1.1.1. Anatomie und Subsysteme des olfaktorischen Systems 2
1.1.2. Signaltransduktion in regulären olfaktorischen Neuronen 6
1.1.3. Weitere Zelltypen im olfaktorischen Epithel 7

1.2. Anatomie des trigeminalen Systems und Nozizeption **11**
1.2.1. Anatomie des trigeminalen Systems 11
1.2.2. Nozizeption allgemein 12
1.2.3. Rezeptoren für die Peptide SP und CGRP 14

1.3. Wechselwirkungen zwischen dem trigeminalen und dem olfaktorischen System **15**

2. MATERIAL UND METHODEN **19**

2.1. Versuchstiere **19**

2.2. Geräte **19**

2.3. Verwendete Lösungen **20**

2.4. Präparation der NK1R-cDNA und Transfektion von HEK293-Zellen **24**
2.4.1. Transformation und Plasmid-DNA-Präparation (Maxipräparation) 24
2.4.2. Reinigung, Trennung und Quantifizierung von Nukleinsäuren 25
2.4.2.1. Phenol/Chloroform-Extraktion 25
2.4.2.2. Ethanol-Präzipitation 25
2.4.2.3. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration 26
2.4.2.4. Auftrennung von DNA in Agarosegelen 26
2.4.2.5. Quantifizierung von Nukleinsäuren mithilfe von Agarosegelen 26
2.4.3. Transiente Transfektion von HEK293-Zellen 26

2.5. Immuncytochemie **27**

2.6. Immunhistochemie **28**
2.6.1. Präparation 28
2.6.2. Anfertigung der Schnitte 28

2.6.3. Antikörperfärbungen 29
2.6.4. Herstellung von Antikörpern gegen NK1R 33
2.6.4.1. Antipeptid-Antikörper 33
2.6.4.1.1. Herstellung des Peptids und Immunisierung 33
2.6.4.1.2. Aufreinigung 35
2.6.4.2. Antikörper gegen das Fusionsprotein MBP-NK1R 35
2.6.4.2.1. Herstellung der Fusionsproteine 35
2.6.4.2.2. Immunisierung 39
2.6.4.2.3. Aufreinigung 39
2.6.5. Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie 40
2.6.6. Bildbearbeitung und Auswertung 41
2.6.6.1. Bildbearbeitung 41
2.6.6.2. Bestimmung der trigeminal innervierten Glomeruli 41
2.6.6.3. 3D-Rekonstruktionen 42

2.7. Calcium-Fluorimetrie 43

2.8. Calcium-Imaging 43
2.8.1. Imaging von HEK293-Zellen 43
2.8.2. *In situ* Imaging von Schnitten des olfaktorischen Epithels 44
2.8.3. Imaging von dissoziierten Zellen des olfaktorischen Epithels 45

3. ERGEBNISSE 47

3.1. Anatomie der trigeminalen Innervation des olfaktorischen und respiratorischen Systems 47
3.1.1. Trigeminale Innervation der olfaktorischen Subsysteme und des respiratorischen Epithels 47
3.1.2. Anatomie der trigeminalen Innervation im olfaktorischen Epithel 53
3.1.3. Anatomie der trigeminalen Innervation im *Bulbus olfactorius* 56

3.2. Lokalisation der Rezeptoren für trigeminale Peptide im olfaktorischen und respiratorischen System 60
3.2.1. Lokalisation der Rezeptoren für CGRP 60
3.2.1.1. Nachweis von CGRP Rezeptoren im olfaktorischen Epithel 60
3.2.1.2. Nachweis von CGRP Rezeptoren im *Bulbus olfactorius* 63
3.2.2. Lokalisation der Rezeptoren für Substanz P 64
3.2.2.1. Nachweis von NK1R in transfizierten HEK293-Zellen 64
3.2.2.2. Nachweis von NK1R im olfaktorischen und respiratorischen Epithel 66
3.2.2.3. Zelluläre Lokalisation von NK1R in IP3R3 exprimierenden Zellen des respiratorischen und olfaktorischen Epithels 73
3.2.2.4. Nachweis von NK1R im *Bulbus olfactorius* 81

3.3. Analyse der Calcium-Antworten in mit NK1R transfizierten HEK293-Zellen 92

3.4. Analyse der Calcium-Antworten im olfaktorischen Epithel 95

3.5. Analyse der Calcium-Antworten in dissoziierten Zellen 99

4. DISKUSSION 103

4.1. Trigeminale Innervation der Nasenhöhle und Expression der Rezeptoren für SP und CGRP 103

4.2. Mögliche Funktionen der IP3R3 exprimierenden Zellen im olfaktorischen Epithel 107

4.3. Trigeminale Modulation der Duftstoffantworten im olfaktorischen Epithel? 109

4.4. Trigeminale Innervation des *Bulbus olfactorius* und Expression der Rezeptoren für SP und CGRP 111

4.5. Physiologische Relevanz der trigeminalen Innervation des olfaktorischen Systems 113

4.6. Bedeutung für Industrie und Medizin 115

4.7. Ausblick 116

5. LITERATURVERZEICHNIS 119

ANHANG 135

DANKSAGUNG 137

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Alexa Fluor® (Fluoreszenzfarbstoff Immunhistochemie)
ACIII	Typ 3 Adenylatcyclase
AOB	akzessorischer olfaktorischer Bulbus
ASIC	*acid-sensing ion channel*
ATP	Adenosintriphosphat
BES	N,N-Bis(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	*complementary DNA*, komplementäre DNA
CFP	*cyan fluorescent protein*
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	*calcitonin gene-related peptide*
CNBr	Cyanobromid
CNG	*cyclic nucleotide-gated (ion channel)*
CRCP	*calcitonin gene-related peptide-receptor-coupling protein*
CRLR	*calcitonin receptor-like receptor*
C-Terminus	Carboxyterminus einer Polypeptidkette
Cy2, Cy3, Cy5	Carbocyanin-Derivate (Fluoreszenzfarbstoffe Immunhistochemie)
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EC_{50}	mittlere effektive Konzentration
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em	Emission (hier: Aussendung von Licht durch einen Fluoreszenzfarbstoff)
EPL	*external plexiform layer*, äußere plexiforme Schicht im *Bulbus olfactorius*
Ex	Excitation (hier: Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffes)
Fluo-4 AM	Fluo-4 Acetoxymethyl-Ester (Fluoreszenzfarbstoff Imaging)

FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GABA	*γ-Aminobutyric acid*, γ-Aminobuttersäure
GC-D	Guanylatcyclase D
GCL	*granule cell layer*, Granulärzellschicht im *Bulbus olfactorius*
GFP	*green fluorescent protein*
GG	Grüneberg Ganglion
GL	*glomerular layer*, glomeruläre Schicht im *Bulbus olfactorius*
GST	Glutathion-S-Transferase
HEK293-Zellen	*human embryonic kidney 293 cells*, Zellen der menschlichen embryonalen Nierenzelllinie 293
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
His	Histidin
IB4	Isolectin B4 Biotin-Konjugat (ein aus der afrikanischen Schwarzbohne *Griffonia simplicifolia* gewonnenes, an Biotin gekoppeltes Glycoprotein, das unter anderem auch in der Immunhistochemie eingesetzt wird; die B-Untereinheit bindet selektiv an α-D-Galactosyl-Reste)
IP3	Inositoltrisphosphat
IP3R3	Typ 3 Inositoltrisphosphat Rezeptor
IPL	*internal plexiform layer*, innere plexiforme Schicht des *Bulbus olfactorius*
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KLH	*keyhole limpet hemocyanin* (ein Schneckenprotein, das als Trägerprotein für niedermolekulare Moleküle in der Herstellung von Antikörpern eingesetzt wird)
ko	*knock-out*
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MBP	Maltose-Bindeprotein
MCL	*mitral cell layer*, Mitralzellschicht im *Bulbus olfactorius*
NK1R	Typ 1 Neurokinin Rezeptor
N-Terminus	Aminoterminus einer Polypeptidkette
OB	*Bulbus olfactorius*
OD	optische Dichte
OE	olfaktorisches Epithel

OMP	*olfactory marker protein*
ONL	*olfactory nerve layer*, Schicht im *Bulbus olfactorius*, in der der *Nervus olfactorius* verläuft
Px	Postnataltag x
p.A.	*pro analysi*, zur Analyse
PA	Paraformaldehyd
PB	*phosphate buffer*, Phosphat Puffer
PBS	*phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Saline
PCR	*polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PDE	Phosphodiesterase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RAMP	*receptor-activity-modifying protein*
RE	respiratorisches Epithel
ROI	*region of interest*
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SO	Septalorgan
SP	Substanz P
TAAR	*trace amine-associated receptor*
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)1,3-propandiol
TRP	*transient receptor potential (cation channel)*
U	*Units* (Enzymeinheit)
VNO	Vomeronasalorgan
v/v	Volumen pro Volumen
YFP	*yellow fluorescent protein*
ü.N.	über Nacht

Es wurden die üblichen Abkürzungen des *Système International* und dessen Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen Vielfachen und Teilen verwendet.

1. EINLEITUNG

„Smells are surer than sounds and sights to make your heart-strings crack.“ – Rudyard Kipling

Mit diesem Satz verdeutlich Rudyard Kipling in seinem Gedicht „Lichtenberg“ wie stark unser Geruchssinn unsere Emotionen beeinflusst. Über eine direkte Verbindung zum limbischen System vermag der Geruchssinn Gefühle und Erinnerungen in uns hervorzurufen noch bevor wir die Natur eines Geruchs bewusst wahrnehmen. Während manche Gerüche, wie beispielsweise der Duft von Rosen, als angenehm empfunden werden, rufen andere eher negative Assoziationen hervor. Hierzu zählen unter anderem Duftstoffe, die ein stechendes oder beißendes Gefühl in der Nase auslösen. Diese Duftstoffe stimulieren oftmals neben dem olfaktorischen System auch das trigeminale System, dem hauptsächlich die Übertragung somatosensorischer Informationen zugeschrieben wird. Doch nicht nur als unangenehm bewertete Gerüche haben eine trigeminale Komponente. Fast alle Duftstoffe können abhängig von ihrer Konzentration vom trigeminalen System detektiert werden (Cain, 1977; Doty et al., 1978; Silver und Moulton, 1982). Weiterhin haben olfaktorisches und trigeminales System einen wechselseitigen Einfluss aufeinander (1.3.). Hierbei scheint es sich um hochkomplexe Mechanismen zu handeln, deren Grundlagen weitestgehend unbekannt sind.
In der vorliegenden Arbeit sollen erste Einblicke in die molekulare Basis der Interaktion zwischen trigeminalem und olfaktorischem System gegeben werden. Folgende Teilaspekte wurden bearbeitet:

- Anatomie der trigeminalen Innervation des Riechsystems: Welche olfaktorischen Subsysteme werden trigeminal innerviert? Gibt es Bereiche, die dichter innerviert werden als andere und was könnte das bedeuten?
- Lokalisation der Rezeptoren für trigeminale Peptide: Welche Zellen könnten Zielzellen für eine trigeminale Modulation sein?
- Effekte der trigeminalen Peptide auf Zellen im olfaktorischen Epithel: Gibt es Grundlagen für eine trigeminale Modulation auf peripherer Ebene und wie könnte eine solche Modulation aussehen?

In den folgenden Kapiteln wird zunächst ein Überblick über Aufbau und Funktion des olfaktorischen sowie des trigeminalen Systems gegeben. Im Anschluss daran werden olfaktorisch-trigeminale Wechselwirkungen eingehender beleuchtet.

1.1. Anatomie und Physiologie des olfaktorischen Systems

1.1.1. Anatomie und Subsysteme des olfaktorischen Systems

Der Geruchssinn dient der chemosensorischen Wahrnehmung von Umweltreizen. Mithilfe des olfaktorischen Systems können chemische Substanzen, teilweise auf große Distanzen hinweg, detektiert werden. Neben dem gustatorischen System – also dem Geschmackssinn – spielt es eine wichtige Rolle bei der Nahrungsaufnahme. Olfaktorische Reize tragen nicht nur zum gesamten Geschmackserlebnis und so dem hedonischen Erleben von Nahrungsmitteln bei, sondern dienen auch der Erkennung von potentiell gefährlichen Substanzen vor der Ingestion sowie der Einleitung von Verdauungsreflexen. Weiterhin stellt der olfaktorische Sinn ein Früh-Warnsystem vor vielen Gefahrensituationen (z.B. Feuer) dar. Im Tierreich kann er daneben auch soziale Verhaltensweisen (z.B. über Erkennung von Artgenossen, Sexualpartnern, Familienmitgliedern oder Feinden) auslösen.

Olfaktorisches Epithel und *Bulbus olfactorius*

Der Großteil der menschlichen Nase ist mit respiratorischem Epithel (RE), welches der Anfeuchtung und Anwärmung der Atemluft dient, ausgekleidet. Das olfaktorische Epithel (OE) nimmt dahingegen nur eine sehr kleine Fläche in Anspruch. Im Tierreich (z.B. bei Hunden oder Nagetieren) kann es eine verhältnismäßig große Fläche erreichen und sich über mehrere Knorpelspangen (Conchen) wölben. Der Nasenraum steht mit dem Rachen in Verbindung und wird durch die Nasenscheidewand (Septum) in zwei Hälften unterteilt.

Neben den olfaktorischen Neuronen, welche die Duftstoffe detektieren, gibt es im OE Basalzellen (Vorläuferzellen olfaktorischer Neurone), Stützzellen und eine Reihe von Zellen, deren Funktion noch nicht sicher geklärt werden konnte (1.1.3.). Ein typisches olfaktorisches Neuron besitzt einen Dendriten, der ausgehend vom Zellkörper (Soma) zur Oberfläche zieht und dort einen sogenannten dendritischen Knopf, welcher die Cilien trägt, ausbildet (Abb. 1.1.). Die Cilien befinden sich in einer Schleimschicht (Mucus), die von Bowman-Drüsen sezerniert wird. In die Membran der Cilien sind die Duftstoffrezeptoren integriert. Im Lumen der Cilien findet die Signaltransduktion statt (1.1.2.). Bei olfaktorischen Neuronen handelt es sich um primäre Sinneszellen. Das heißt ihre Axone ziehen direkt zum Gehirn. Gebündelt als *Nervus olfactorius* (I. Hirnnerv) passieren sie die Siebbeinplatte und enden im *Bulbus olfactorius* (OB).

Im OB konvergieren die Axone von olfaktorischen Neuronen, die den gleichen Duftstoffrezeptor exprimieren, in jeweils einem oder einigen wenigen Glomeruli pro Hemisphäre (Ressler et al., 1994; Mombaerts et al., 1996) (Abb. 1.1.). Im OE gibt es eine grobe zonale Unterteilung (von dorsomedian nach ventrolateral), die durch die Expression bestimmter Rezeptortypen in den olfaktorischen Neuronen definiert wird. Diese Topographie wird auch im OB mehr oder weniger aufrecht erhalten (Ressler et al., 1994; Mori et al., 1999, 2000; Kobayakawa et al., 2007). Das heißt beispielsweise, dass olfaktorische Neurone aus der dorsomedianen Zone des OE in dorsomedian gelegene Glomeruli im OB projizieren.

Innerhalb der Glomeruli werden Synapsen zwischen olfaktorischen Neuronen und anderen Zelltypen gebildet (Abb. 1.1.). Mitralzellen und Büschelzellen (*tufted cells*) integrieren die Information aus jeweils einem Glomerulus und leiten diese in höhere Gehirnareale weiter. Die Information wird im OB durch eine Reihe von Interneuronen modifiziert. Um die Glomeruli herum befinden sich verschiedene

Typen von juxtaglomerulären Zellen, welche die Information auf verschiedenen Ebenen modulieren. Die juxtaglomerulären Zellen können synaptische Kontakte untereinander, zu olfaktorischen Neuronen und zu Mitral- und Büschelzellen bilden. Sie können anhand ihrer Morphologie in drei Gruppen unterteilt werden: periglomeruläre Zellen (*periglomerular cells*), *short axon cells* und externe Büschelzellen (*external tufted cells*) (Pinching und Powell, 1971; Kosaka et al., 1998). Je nach Typ verzweigen die Dendriten in einem oder mehreren Glomeruli. Weiterhin bilden die tiefer im Bulbus sitzenden Granulärzellen (*granule cells*) reziproke dendrodendritische Synapsen zu Mitralzellen. Diese Synapsen ermöglichen laterale Inhibition zwischen Mitralzellen, die benachbarte Glomeruli innervieren, und könnten somit die Grundlage für das Feintuning von olfaktorischen Informationen darstellen (Yokoi et al., 1995; Saghatelyan et al., 2003). Aus der Anordnung der Zellen im OB ergibt sich seine typische Schichtung, die man mithilfe einer Färbung der Zellkerne gut erkennen kann (3.1.3. Abb. 3.7. A). Obwohl hier nicht näher darauf eingegangen wird, soll darauf hingewiesen werden, dass die Aktivität im OB auch durch efferente Eingänge aus anderen Gehirnarealen moduliert wird (Restrepo et al., 2009).
Eine Besonderheit des OB ist die Neurogenese von Interneuronen auch in adulten Individuen. Über den sogenannten *rostral migratory stream* wandern stetig neuronale Vorläuferzellen in den OB und differenzieren sich dort zu Interneuronen aus (Luskin, 1993; Saghatelyan et al., 2003; Lazarini und Lledo, 2011). Dieser Prozess scheint eine wichtige Rolle beim olfaktorischen Lernen und der Ausbildung des Geruchsgedächtnisses zu spielen (Saghatelyan et al., 2003; Moreno et al., 2009; Lazarini und Lledo, 2011).

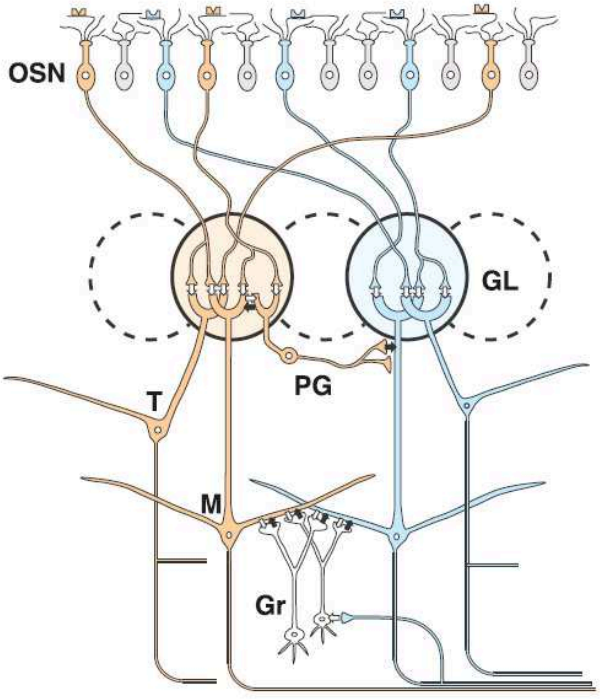

Abbildung 1.1.: Vereinfachtes Schema der synaptischen Verbindungen im OB (Mori et al., 1999). Olfaktorische Neurone bilden innerhalb der Glomeruli Synapsen zu Mitral- und Büschelzellen, welche in höhere Gehirnareale projizieren. Um die Glomeruli herum sitzen verschiedene juxtaglomeruläre Zellen (hier nur periglomeruläre Zellen; nicht gezeigt: *short axon cells* und externe Büschelzellen). Granulärzellen bilden dendrodendritische Synapsen zu Mitralzellen. Die weißen Pfeile deuten exzitatorische synaptische Übertragung an, die schwarzen inhibitorische. GL = Glomerulus, Gr = Granulärzelle, M = Mitralzelle, OSN = olfaktorische sensorische Neurone, PG = periglomeruläre Zelle, T = Büschelzelle.

Grüneberg Ganglion, Vomeronasalorgan und Septalorgan

Im Nasenraum befinden sich neben dem OE im engeren Sinne (*main olfactory epithelium,* hier als OE bezeichnet) weitere chemosensorische Sinnesorgane (einen Überblick geben Breer et al., 2006; Munger et al., 2009; Ma, 2010)(Abb. 1.2.).
Am weitesten anterior gelegen findet man das Grüneberg Ganglion (GG) (s. a. 3.1.1. Abb. 3.3. A+B), das nach seinem Entdecker benannt ist (Grüneberg, 1973). Es befindet sich paarig im dorsalen Bereich der Nasenspitze nahe der Nasenöffnung und besteht aus einer Anhäufung von mehr oder weniger abgerundeten Zellen, die auf den ersten Blick scheinbar keine Dendriten, Cilien oder Microvilli besitzen. Weiterhin werden die Zellen durch keratinisiertes Gewebe vom Nasenraum abgegrenzt. Daher war lange unklar, ob und wie chemosensorische Stimuli das GG erreichen und welche Funktion es einnehmen könnte. Mittlerweile konnten auf elektronenmikroskopischer Ebene Cilien an den Zellen nachgewiesen werden (Brechbühl et al., 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass zumindest hydrophile Substanzen das keratinisierte Epithel passieren können (Brechbühl et al., 2008). Die Axone der Zellen im GG projizieren in einige Glomeruli im dorsocaudalen Teil des OB, die sich in der Nähe des akzessorischen Bulbus (AOB; s.u.) befinden (Fuss et al., 2005). Über die exprimierten Rezeptoren und die Signaltransduktion der Zellen im GG ist bisher noch wenig bekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass bestimmte Rezeptoren, die es auch im OE oder im Vomeronasalorgan (s.u.) gibt, exprimiert werden (Fleischer et al., 2006, 2007). Man vermutet, dass das GG an der Detektion von bisher unidentifizierten „Alarm-Pheromonen", die bei Stress, Verletzung oder der Anwesenheit von Räubern Artgenossen warnen könnten, beteiligt ist (Brechbühl et al., 2008).
Weiter posterior gelegen als das GG findet man in vielen terrestrischen Tieren das Vomeronasalorgan (VNO) (s.a. 3.1.1. Abb. 3.3. C+D), das bereits 1813 von Jacobson entdeckt wurde (Trotier und Døving, 1998). Das VNO besteht aus zwei röhrenförmigen Einstülpungen, die bilateral an der ventralen Basis des Septums liegen und von einer am anterioren Ende offenen, knorpeligen Hülle umgeben sind. Der Zugang von Substanzen zum VNO kann aktiv über einen Pumpmechanismus eines großen Blutgefäßes, das das VNO in seiner kompletten Länge durchzieht, reguliert werden (Meredith und O'Connel, 1979). Das Epithel des VNO unterteilt sich in einen sensorischen und einen nicht-sensorischen Bereich. Die Rezeptorneurone im sensorischen Epithel weisen wie die olfaktorischen Neurone eine bipolare Organisation auf. Im Gegensatz zu den regulären olfaktorischen Neuronen tragen die Dendriten der sensorischen Neurone im VNO jedoch Microvilli an Stelle von Cilien. Die Axone der vomeronasalen sensorischen Neurone projizieren in den sogenannten akzessorischen Bulbus (AOB), der sich im posterior-dorsalen Teil des OB befindet und der ähnlich wie der Teil des OB, in den die olfaktorischen Neurone projizieren, geschichtet ist (s.o.). Die sensorischen Neurone des VNO können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Neurone im apikalen Bereich des VNO exprimieren vornehmlich Rezeptoren aus der V1R Familie und senden ihre Axone zum rostralen Teil des AOB (Dulac und Axel, 1995). Neurone im basalen Bereich exprimieren Rezeptoren aus der V2R Familie und projizieren in den caudalen Teil des AOB (Herrada und Dulac, 1997; Matsunami und Buck, 1997; Ryba und Tirindelli, 1997). Dem VNO wird hauptsächlich die Detektion von volatilen und nicht-volatilen Pheromonen zugeschrieben (Tirindelli et al., 2009; Trotier, 2011). Pheromone sind chemische Botenstoffe, die der intraspezifischen Kommunikation dienen. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass Neurone im VNO, die einen bestimmten Rezeptor der V1R Familie exprimieren, auf ein Pheromon im Urin männlicher Mäuse, das Änderungen im Zyklus weiblicher Mäuse hervorruft, reagieren (Boschat et al., 2002).

Bisher konnten allerdings nur wenige Liganden ihren Rezeptoren im VNO zugeordnet werden. Auch die Signaltransduktion in Neuronen des VNO ist noch nicht gänzlich geklärt, scheint sich aber von der Transduktion in regulären olfaktorischen Neuronen (1.1.2.) zu unterscheiden (Brann et al., 2002; Spehr et al., 2002a; Lucas et al., 2003). Eine ehemals angenommene strikte funktionelle Unterteilung von VNO (Detektion nicht-flüchtiger Pheromone) und OE (Detektion flüchtiger Duftstoffe) ist jedoch unhaltbar. Es konnte gezeigt werden, dass manche Stimuli von beiden Systemen detektiert und parallel verarbeitet werden können (Spehr et al., 2006; Tirindelli et al., 2009). Obwohl diskutiert wird, dass es auch menschliche Pheromone geben könnte (Stern und McClintock, 1998; Tirindelli et al., 2009; Trotier 2011), scheint es kein funktionelles VNO beim erwachsenen Menschen zu geben (Trotier et al., 2000; Witt und Hummel, 2006; Tirindelli et al., 2009; Trotier, 2011).
Dicht hinter dem VNO befindet sich das Septalorgan (SO) (s.a. 3.1.1. Abb. 3.4.), welches erstmals von Rodolfo-Masera eingehender beschrieben wurde (Rodolfo-Masera, 1943). Hierbei handelt es sich um eine bilateral organisierte „Insel“ olfaktorischen Epithels (im weiteren Sinne) an der ventralen Basis des Septums. Das SO ist von allen Seiten vom RE umgeben und ist somit vom OE (im engeren Sinne) abgegrenzt. Der zelluläre Aufbau des SO entspricht mehr oder weniger dem des OE (s.o.). Das Epithel des SO ist allerdings etwas dünner und die olfaktorischen Neurone zeigen geringe morphologische Abweichungen zu denen im OE (Ma et al., 2003). Die Axone der olfaktorischen Neurone im SO projizieren in den posterioren, ventromedianen Teil des OB. Hier finden sich sowohl Glomeruli, die hauptsächlich (oder ausschließlich) Eingänge aus dem SO erhalten, als auch Glomeruli, die gemischte Eingänge aus SO und OE erhalten (Levai und Strotmann, 2003). In den Cilien der olfaktorischen Neurone im SO werden Rezeptoren exprimiert, die auch im OE exprimiert werden. Während es im OE ca. 1000 verschiedene Duftstoffrezeptoren gibt (1.1.2.), exprimiert der Großteil der Zellen (ca. 93%) im SO einen von nur neun dominierenden Rezeptoren. Von diesen neun wird am häufigsten MOR256-3 (ca. 50%) exprimiert (Kaluza et al., 2004; Tian und Ma, 2004). In den meisten Fällen werden olfaktorische Neurone im SO über den gleichen Signalweg wie reguläre olfaktorische Neurone im OE aktiviert (s.u.) (Ma et al., 2003; Grosmaitre et al., 2007). Daneben wurden Guanylatcyclase D (GC-D)-positive Neurone gefunden, wie sie auch im OE vorkommen (1.1.3.) (Ma et al., 2003). Neben verschiedenen Duftstoffen scheint das SO auch auf mechanische Stimuli zu reagieren. Diese Mechanosensivität, die auch für bestimmte olfaktorische Neurone im OE festgestellt werden konnte (hauptsächlich solche, die auch MOR256-3 exprimieren), könnte beispielsweise dazu dienen die Sensitivität der Neurone dem Luftstrom anzupassen oder rhythmische Aktivität im OB mit der Atmung zu synchronisieren (Grosmaitre et al., 2007). Eine weitere Hypothese besagt, dass das SO aufgrund seiner Nähe zum *Ductus incisivus*, der bei einigen Säugetieren die Nasenhöhle mit dem Rachenraum verbindet, Duftstoffe aus der Mundhöhle detektieren könnte. Dies wären beispielsweise volatile und nicht- volatile Nahrungsgerüche oder Signalstoffe, die mit Sozialverhalten in Verbindung stehen (Breer et al., 2006). Die tatsächliche Funktion des SO ist allerdings noch ungeklärt.

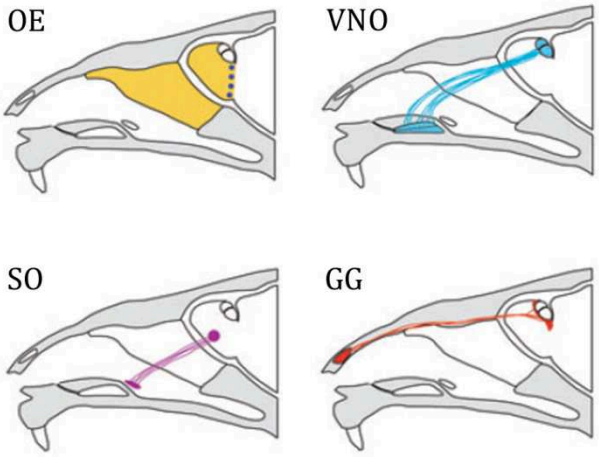

Abbildung 1.2.: Olfaktorische Subsysteme in der Maus (nach Munger et al., 2009). GG = Grüneberg Ganglion, OE = olfaktorisches Epithel (im engeren Sinne; *main olfactory epithelium*), SO = Septalorgan, VNO = Vomeronasalorgan.

1.1.2. Signaltransduktion in regulären olfaktorischen Neuronen

Der Mechanismus, über den olfaktorische Neurone in Landwirbeltieren ein chemisches Signal in ein elektrisches Signal umwandeln, das in den OB weitergeleitet wird, ist sehr gut beschrieben (einen Überblick geben Schild und Restrepo, 1998; Frings, 2001; Manzini und Korsching, 2011) (Abb. 1.3.).
Duftstoffe aktivieren eine bestimmte Population olfaktorischer Neurone, indem sie an ihre Rezeptoren binden. Jedes olfaktorische Neuron exprimiert nur einen Rezeptortyp (Buck und Axel, 1991) aus einem Repertoire von ca. 350 funktionellen Rezeptorgenen beim Menschen (Glusman et al., 2001) bzw. über 1000 bei der Maus (Zhang et al., 2002). Ein Duftstoff kann an mehrere unterschiedliche Rezeptoren binden, somit bestimmte Gruppen von olfaktorischen Neuronen aktivieren und ein charakteristisches Aktivierungsmuster der Glomeruli im OB hervorrufen.
Die Rezeptoren regulärer olfaktorischer Neurone sind an ein spezielles G-Protein gekoppelt (G_{olf}) (Jones und Reed, 1989). Die Bindung eines Duftstoffes ruft eine Konformationsänderung in dem jeweiligen Rezeptor hervor, wodurch G_{olf} aktiviert wird und in zwei Untereinheiten zerfällt. Eine davon, die α-Untereinheit, aktiviert ihrerseits die Adenylatcyclase vom Typ 3 (ACIII) (Pfeuffer et al., 1989), die daraufhin Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umwandelt (Pace et al., 1985). Der Botenstoff cAMP öffnet einen durch zyklische Nukleotide gesteuerten Kanal (CNG, *cyclic nucleotide-gated ion channel*) (Nakamura und Gold, 1987; Frings et al., 1992). Der geöffnete CNG Kanal ermöglicht den Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} in das Cilienlumen und somit eine leichte Depolarisation (Firestein und Werblin, 1989; Leinders-Zufall et al., 1997). Zusätzlich führt der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels zur Öffnung von Ca^{2+} gesteuerten Cl^--Kanälen (Lowe und Gold, 1993; Kurahashi und Yau, 1993). Da olfaktorische Neurone im Vergleich zum Mucus eine erhöhte intrazelluläre Cl^--Konzentration aufweisen (Reuter et al., 1998; Kaneko et al., 2004), kommt es zu einem Cl^--Ausstrom und zur weiteren Depolarisation. Nach ausreichender Depolarisation werden Aktionspotentiale ausgebildet, die über das Axon zum OB weitergeleitet werden.
Länger andauernde Erregung der olfaktorischen Neurone führt zur Adaptation, die zu einem großen Teil von Ca^{2+}-abhängigen Mechanismen getragen wird. Durch die Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin (CaM) wird ein Ca^{2+}/CaM-Komplex gebildet. Dieser Komplex setzt zum einen die cAMP-Empfindlichkeit des CNG Kanals herab und verringert so dessen Öffnungswahrscheinlichkeit (Chen und Yau, 1994; Bradley et al.,

2004). Zum anderen aktiviert er eine Phosphodiesterase (PDE), die cAMP hydrolysieren kann (Yan et al., 1995). Weiterhin könnte eine Ca^{2+}/CaM-abhängige Kinase zur Adaptation beitragen, indem sie die ACIII phosphoryliert und somit inhibiert (Wei et al., 1998). Daneben gibt es noch weitere Mechanismen (z.B. Phosphorylierung oder Internalisierung der Rezeptoren), die zur Adaptation beitragen könnten, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

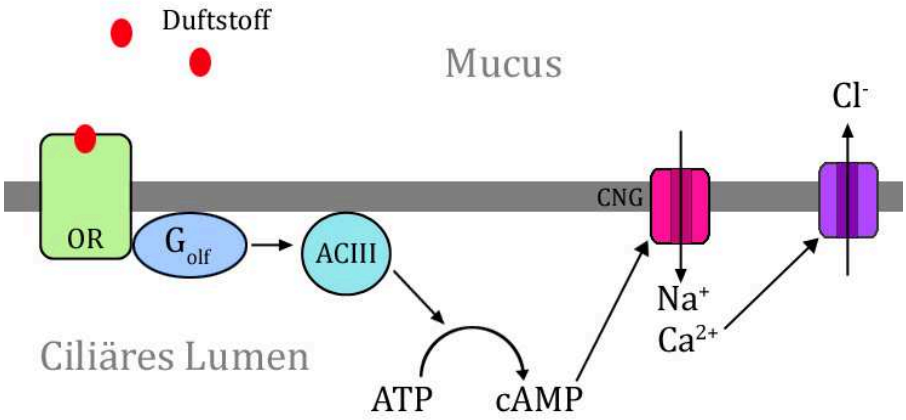

Abbildung 1.3.: Vereinfachtes Schema der Signaltransduktion in regulären olfaktorischen Neuronen. Die Bindung eines Duftstoffes an olfaktorische Rezeptoren (OR) führt zur Aktivierung eines speziellen G-Proteins (G_{olf}). Die α-Untereinheit von G_{olf} stimuliert eine Adenylatcyclase (ACIII) Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umzuwandeln. Der Botenstoff cAMP bindet an zyklisch Nucleotid-gesteuerte Kanäle (CNG), durch die Na^+ und Ca^{2+} einströmen und eine Depolarisation hervorrufen. Der Einstrom von Ca^{2+} führt zur Öffnung von Ca^{2+}-abhängigen Cl^--Kanälen, somit zum Ausstrom von Cl^- und weiterer Depolarisation. Nicht dargestellt sind Transporter, die der Aufrechterhaltung und Wiederherstellung des Rezeptorpotentials dienen, und Adaptationsmechanismen.

1.1.3. Weitere Zelltypen im olfaktorischen Epithel

Im OE gibt es weitere Zelltypen, die sich im Hinblick auf ihre Morphologie und/oder molekulare Ausstattung von regulären olfaktorischen Neuronen (1.1.1., 1.1.2., Abb. 1.4. A) unterscheiden und deren Funktion teilweise unbekannt bzw. umstritten ist (einen Überblick geben Munger et al., 2009; Ma, 2010). Einige dieser Zelltypen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit mithilfe von entsprechenden Antikörpern als Marker identifiziert werden (Abb. 1.4. B-D, Tab. 1.1.). Im Folgenden soll zusammengefasst werden, welche irregulären Zelltypen im OE (im engeren Sinne) von Säugetieren bisher gefunden werden konnten. Das Vorhandensein von Cilien, wie es typischerweise für reguläre olfaktorische Neurone der Fall ist, oder Microvilli stellt ein Merkmal da, das die Unterteilung der irregulären Zelltypen in zwei Gruppen ermöglicht.

Ciliäre Zellen im OE

Einige Zellen im OE, die ebenfalls Cilien tragen, exprimieren sogenannte TAARs (*trace amine-associated receptor*) (Liberles und Buck, 2006), welche nicht zur Familie der klassischen Duftstoffrezeptoren zählen. Die TAAR-exprimierenden Neurone scheinen sich im Hinblick auf ihre Morphologie und die Signaltransduktion nicht von regulären olfaktorischen Neuronen zu unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass sie auf volatile Amine antworten (Liberles und Buck, 2006; Zhang et al., 2013).

Ebenso cilientragend sind Neurone, die GC-D-positiv sind (Abb. 1.4. B; Fülle et al., 1995; Julifs et al., 1997; Meyer et al., 2000). Die GC-D gehört zu einer Familie membranständiger Guanylatcyclasen, die eine Rezeptordomäne, eine regulatorische und eine katalytische Domäne enthalten und über die Bindung von Peptiden aktiviert werden können. An der katalytischen Domäne wird nach Aktivierung der Botenstoff zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) synthetisiert (Fülle und Garbers, 1994; Foster et al., 1999). Die GC-D-positiven Zellen im OE sind wie die regulären olfaktorischen Neurone bipolar aufgebaut. Ihre Axone ziehen zu den sogenannten *necklace glomeruli*, die das caudale Ende des OB einrahmen (Julifs et al., 1997; Hu et al., 2007; Leinders-Zufall et al., 2007). Anders als reguläre olfaktorische Neurone exprimieren sie keine Komponenten des cAMP-abhängigen Signalwegs (wie G_{olf}, ACIII, CNGA2, PDE1C2 oder PDE4A) (1.1.2.). Das Vorhandensein von Komponenten eines cGMP-abhängigen Signalwegs (wie GC-D, CNGA3 und die durch cGMP regulierte PDE2A), deutet vielmehr darauf hin, dass die Signaltransduktion über cGMP vermittelt wird (Julifs et al., 1997; Meyer et al., 2000). Die Funktion der GC-D-exprimierenden Neurone im OE konnte bisher noch nicht sicher geklärt werden. Vermutlich detektieren sie aber keine typischen Duftstoffe, sondern natriuretische Peptide (Leinders-Zufall et al., 2007) und/oder CO_2 (Hu et al., 2007).
In einer weiteren Gruppe von ciliären Zellen im OE konnte der Melostatin Rezeptor TRPM5 gefunden werden (Kaske et al., 2007; Lin et al., 2007a, 2008). Neben dieser cilientragenden Gruppe gibt es auch TRPM5-positive Zellen, die Microvilli tragen (s. u.). Die ciliären TRPM5-positiven Zellen befinden sich vor allem im ventrolateralen Bereich des OE und projizieren zu ventral gelegenen Glomeruli im OB (Lin et al., 2007a). Sie exprimieren neben TRPM5 die Phospholipase C (PLC) und CNGA2 (Lin et al., 2007a). Somit könnten sie sowohl über einen PLC-abhängigen als auch über einen cAMP-abhängigen Signalweg wie die regulären olfaktorischen Neurone (1.1.2.) aktiviert werden. Vermutlich spielen die TRPM5-positiven ciliären Neurone im OE unter anderem eine Rolle bei der Detektion von Pheromonen (Lin et al., 2007a).

Microvilliäre Zellen im OE

Neben den eben beschriebenen gibt es andere Zellen im OE, die ebenfalls TRPM5 exprimieren (Abb. 1.4. C; Kaske et al., 2007; Lin et al., 2007a, 2008; Hansen und Finger, 2008). Diese Zellen tragen Microvilli und weisen weitere morphologische Unterschiede zu den regulären olfaktorischen Neuronen auf. Ihre Zellkörper befinden sich im oberen Bereich des OE, sie besitzen anscheinend kein richtiges Axon (wenn auch in manchen Fällen kurze, axonartige Fortsätze gefunden werden können) und projizieren folglich vermutlich nicht in den OB. Die Funktion dieser Zellen ist unbekannt. Ähnliche Zellen findet man auch unter anderem im RE (Finger et al., 2003; Kaske et al., 2007; Lin et al., 2007b; Gulbransen et al., 2008a, 2008b; Tizzano et al., 2010) und im VNO (Kaske et al., 2007; Ogura et al., 2010). Diese sogenannten *solitary chemosensory cells* exprimieren Bitterrezeptoren (T2R), ein G-Protein, das typisch für Geschmackssinneszellen ist (Gustducin), und PLC (Finger et al., 2003; Lin et al., 2007b; Gulbransen et al., 2008a; Ogura et al., 2010; Tizzano et al., 2010). Weiterhin stehen sie oft in enger Verbindung mit trigeminalen Fasern. Auf elektronenmikroskopischer Ebene konnten an entsprechenden Stellen synaptische Spezialisierungen nachgewiesen werden (Finger et al., 2003). Die *solitary chemosensory cells* detektieren bittere Substanzen, Duftstoffe in hohen Konzentrationen und bakterielle Signale und aktivieren vermutlich trigeminale Fasern um Schutzreflexe, wie Änderung der Atemfrequenz oder des Zugangs von Substanzen zum VNO, hervorzurufen (Finger et al., 2003; Lin et al., 2007b; Gulbransen et al., 2008a; Ogura et al., 2010; Tizzano et al., 2010). Ob es sich bei den

microvilliären TRPM5-positiven Neuronen im OE auch um *solitary chemosensory cells* handelt, ist umstritten. Während Kaske et al. (2007) postulieren, dass TRPM5 ein allgemeiner Marker für chemosensorische Zellen ist, wird diese These von anderer Seite verworfen (Hansen und Finger, 2008; Lin et al., 2008). In den Studien von Hansen und Finger (2008) sowie Lin et al. (2008) konnten die microvilliären TRPM5-positiven Zellen im OE weder mit Markern für reguläre olfaktorische Neurone (CNGA2, OMP), neuronalen Markern (PGP9.5) oder Stützzellmarkern (SUS-1), noch mit Markern für *solitary chemosensory cells* (Gustducin, PLC) gefärbt werden. Auch die Färbungen mit einem Antikörper gegen PDE2A fielen negativ aus. Weiterhin wurden keine synaptischen Spezialisierungen zwischen den Zellen und trigeminalen Fasern auf elektronenmikroskopischer Ebene gefunden. In der vorliegenden Arbeit konnten die Zellen jedoch mit einem Antikörper gegen PLCβ2 und PDE2A gefärbt werden (Tab. 1.1., nicht gezeigt). Außerdem wurden Strukturen an Stellen, an denen sich TRPM5-positive Zellen in unmittelbarer Nähe zu trigeminalen Fasern befinden, mit einem Antikörper gegen Synaptophysin, einem vesikulären Protein, gefärbt (3.1.2. Abb. 3.6. A+B). Ob die microvilliären TRPM5-positiven Zellen im OE mit trigeminalen Fasern interagieren oder welche Funktion sie einnehmen, bleibt weiterhin ungeklärt.

Morphologisch deutlich von den TRPM5-positiven Zellen zu unterscheiden sind andere microvilliäre Zellen im OE, die den Typ 3 Inositoltrisphosphat Rezeptor (IP3R3) exprimieren (Abb. 1.4. D; Elsaesser et al., 2005; Montani et al., 2006; Hegg et al., 2010; Jia et al., 2013). Ihre Zellkörper liegen ebenfalls in den oberen Schichten des OE. Von diesen ausgehend erstrecken sich kurze, dicke Dendriten und dicke, axonartige Fortsätze. Vermutlich haben diese jedoch keine direkte Verbindung zum OB (Elsaesser et al., 2005; Hegg et al., 2010). Die IP3R3-positiven Zellen exprimieren weitere Komponenten des Phosphoinositol-Signalwegs ($G_{q/11}$, TRPC6, PLCβ2) sowie microvilliäre Proteine (Ezrin, Actin), jedoch keine Komponenten des cAMP-Signalwegs (G_{olf}, CNGA2, ACIII) (Elsaesser et al., 2005; Hegg et al., 2010: hier jedoch ohne PLCβ2). Trotzdem können diese Zellen auf Duftstoffe mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration antworten (Elsaesser et al., 2005; Hegg et al., 2010). Hierfür könnten zwei verschiedene Mechanismen verantwortlich sein. Zum einen kann Ca^{2+} über die Aktivierung von IP3R3 aus internen Speichern freigesetzt werden. Zum anderen kann Diacylglycerin (DAG) TRPC6 aktivieren (Hofmann et al., 1999), wodurch es zur Depolarisation und somit zum Einstrom von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum kommen kann. Bisher konnte noch nichts über die Expression von Duftstoffrezeptoren in diesen Zellen herausgefunden werden. Auch im Falle der IP3R3-positiven Zellen ist unklar welche Funktion sie übernehmen. Zur Debatte steht, dass sie wie olfaktorische Neurone an der Detektion von Duftstoffen beteiligt sind (direkt oder indirekt über Modulation der Duftstoffantwort) oder, dass sie eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase und/oder bei der Regeneration des OE spielen (4.2.).

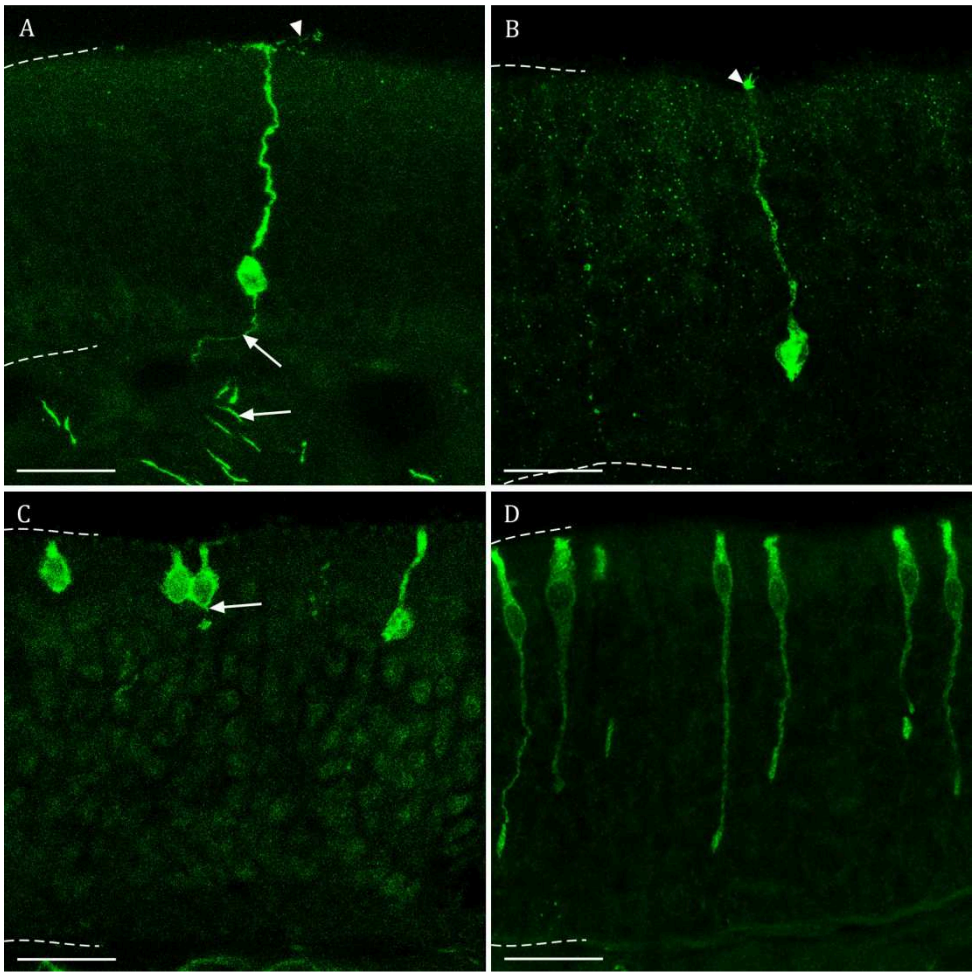

Abbildung 1.4.: Morphologischer Vergleich von regulären olfaktorischen Neuronen (A) und anderen Zelltypen (B-D), die im Rahmen dieser Arbeit im OE der Ratte identifiziert werden konnten. A: reguläres olfaktorisches Neuron im OE einer M71-RFP-Maus (Schnitte entstanden im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Philipp Daiber, Heidelberg). B: GC-D-positive, ciliäre Zelle. C: TRPM5-positive, microvilliäre Zellen. D: IP3R3-positive, microvilliäre Zellen. Die Pfeilspitzen in A und B deuten auf Cilien. Die Pfeile deuten auf Axone (A) bzw. axonartige Fortsätze (C). Die gestrichelten Linien markieren die Begrenzungen des OE. Größenbalken A-D: 20 µm.

Tabelle 1.1: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten irregulären Zelltypen im OE (vgl. Abb. 1.4.) und deren molekulare Ausstattung. Die Expression der aufgeführten Komponenten wurde durch immunhistochemische Analysen in anderen Arbeiten (Literatur) bzw. in der vorliegenden Arbeit bestätigt. *** =** Komponenten, die im Rahmen dieser Arbeit, nicht jedoch in anderen Arbeiten identifiziert wurden.

Zelltyp	Literatur	Vorliegende Arbeit
Ciliär, GC-D-positiv (Abb. 1.4. B)	GC-D, PDE2A, CNGA3 (Julifs et al., 1997; Meyer et al., 2000)	GC-D, PDE2A
Microvilliär, TRPM5-positiv (Abb. 1.4. C)	TRPM5, Villin, Espin (Hansen und Finger, 2008; Lin et al., 2008)	TRPM5, Villin, PLCβ2*, PDE2A*
Microvilliär, IP3R3-positiv (Abb. 1.4. D)	IP3R3, TRPC6, PLCβ2, $G_{q/11}$, MAP2b, SPOT-35, NPY, Ezrin, Actin, P2X3 (Elsaesser et al., 2005; Montani et al., 2006; Hegg et al., 2010: hier jedoch ohne PLCβ2; Jia und Hegg, 2010, Jia et al., 2013)	IP3R3, IB-4*, PLCβ2, $G_{q/11}$, PKG1*, NK1R*

1.2. Anatomie des trigeminalen Systems und Nozizeption

1.2.1. Anatomie des trigeminalen Systems

Das Trigeminalganglion befindet sich bei Säugetieren unterhalb des Gehirns, bilateral in etwa auf Höhe des Innenohrs gelegen. Es beherbergt die Zellkörper des *Nervus trigeminus* (V. Hirnnerv). Der *Nervus trigeminus* besteht aus motorischen und sensorischen Fasern, die große Teile des Kopfes (z.B. Gesichtshaut, Hirnhäute, Blutgefäße, Teile des Auges, Mund- und Nasenhöhle) innervieren. Er unterteilt sich in drei Hauptäste: *Nervus ophthalmicus* (Augenast), *Nervus maxillaris* (Oberkieferast) und *Nervus mandibularis* (Unterkieferast). Von diesen hat nur letzterer neben sensorischen auch motorische Eigenschaften. Die beiden anderen Äste dienen ausschließlich der Sensorik, das heißt unter anderem der Wahrnehmung von Temperatur, Berührung und Schmerz.
Die Nasenhöhle wird durch den *Nervus ophthalmicus* und den *Nervus maxillaris* innerviert (Hunter und Dey, 1998). Fasern im RE sorgen für Schutzreflexe, wie z.B. Reduktion der Atmung, Niesen oder Husten (Anton und Peppel, 1991). Möglicherweise werden diese Funktionen durch die Interaktion sogenannter *solitary chemosensory cells* mit den trigeminalen Fasern vermittelt (1.1.3., 4.1.). Welche Funktionen die Fasern, die im OE (Finger et al., 1990; Finger und Böttger, 1993; Schäfer et al., 2002; Daiber et al., 2012) und im OB (Finger und Böttger, 1993; Schäfer et al., 2002) gefunden werden konnten, einnehmen ist bisher unklar. Vermutlich werden OE und OB durch Kollaterale innerviert. Es konnte gezeigt werden, dass zumindest einige Zellen im Trigeminalganglion sensorische Endigungen haben, die

sich aufspalten, um sowohl zum OE als auch zum OB zu ziehen (Abb. 1.5.; Schäfer et al., 2002).
Bei den trigeminalen Fasern im OE und OB handelt es sich vornehmlich, wenn nicht sogar ausschließlich, um nozizeptive Fasern der Klasse C (unmyelinisiert, zweiter Schmerz) und/oder Aδ (leicht myelinisiert, erster Schmerz) (Anton und Peppel, 1991). Sie gehören, wie die meisten Schmerzfasern, zu den polymodalen Nozizeptoren und weisen daher neben somatosensorischen auch chemosensorische Eigenschaften auf, wodurch sie durch fast alle Duftstoffe aktiviert werden können (Cain, 1977; Doty et al., 1978; Silver und Moulton, 1982). Im nächsten Kapitel wird daher neben allgemeinen Mechanismen der Nozizeption näher auf Kanäle und Rezeptoren, die für die Detektion von chemischen Substanzen durch nozizeptive Fasern zuständig sind, eingegangen.

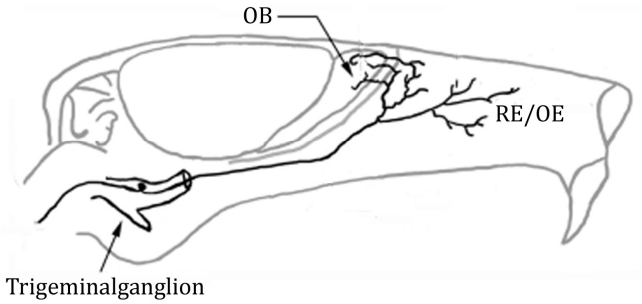

Abbildung 1.5.: Schematische Darstellung der kollateralen Innervation von respiratorischem Epithel (RE), olfaktorischem Epithel (OE) und *Bulbus olfactorius* (OB) durch den *Nervus trigeminus* (nach Schäfer et al., 2002).

1.2.2. Nozizeption allgemein

Nozizeption bezeichnet die Detektion potentiell gewebsschädigender Umweltreize bzw. der Vermittlung von Entzündungsquellen innerhalb des Körpers durch periphere Nervenendigungen, die Nozizeptoren. Die Aktivierung von Nozizeptoren kann, muss aber nicht, zur bewussten Wahrnehmung von Schmerz führen. Es gibt Nozizeptoren, die durch mechanische, thermische oder chemische Reize aktiviert werden. In den meisten Fällen handelt es sich jedoch um polymodale Nozizeptoren, die auf verschiedene Reize antworten. Hier sollen in erster Linie Mechanismen der Detektion chemischer Reize behandelt werden (einen Überblick geben Gerhold und Bautista, 2009; Viana, 2011).
Eine sehr große Rolle spielen hierbei verschiedene TRP (*transient receptor potential*) Kanäle. Hierbei handelt es sich um Kationen-durchlässige Kanäle, die sowohl durch mechanische und thermische als auch durch chemische Reize aktiviert werden können. Die Öffnung der Kanäle wird allosterisch reguliert. Der Vanilloid Rezeptor TRPV1 kann beispielsweise durch Protonen (pH < 6,0) geöffnet werden. Geringere Änderungen im physiologischen pH-Wert (pH ≈ 6,0) reichen zwar nicht aus um den Kanal zu öffnen, erhöhen aber seine Sensitivität für andere Liganden (Jordt et al., 2000). Im Folgenden sind einige Vertreter der TRP-Familie mit chemorezeptiven Eigenschaften aufgeführt sowie die Stimuli durch die die jeweiligen Kanäle (unter anderem) aktiviert werden können:

- TRPV1: Capsaicin (Chili), Hitze > 43°C (Caterina et al., 1997), Protonen (Jordt et al., 2000)
- TRPM8: Menthol, Kälte < 25°C (McKemy et al., 2002)
- TRPA1: Allylisothiocyanat (Senföl), Cannabinoide (Jordt et al., 2004), Allicin (Knoblauch) (Bautista et al., 2005)

Neben den TRP Kanälen gibt es noch andere Kanäle bzw. Rezeptoren, die die Detektion von chemischen Substanzen vermitteln können. Diese sind zum Beispiel:

- Purin Rezeptoren: aktiviert durch ATP (Chen et al., 1995; Spehr et al., 2004)
- K2P Kanäle („Zwei-Porendomänen Kalium Leckkanäle"): z.B. KCNK3, 9, 18 inhibiert durch Sanshool (Szechuanpfeffer) (Bautista et al., 2008); es ist jedoch noch unklar, ob nur Druckrezeptoren oder auch Nozizeptoren Sanshool-sensitiv sind (Lennertz et al., 2010)
- ASICs (*acid-sensing ion channels*): aktiviert und moduliert durch Protonen (Waldmann et al., 1997)

Werden die nozizeptiven Neurone überschwellig aktiviert, so bilden sie Aktionspotentiale aus und verschalten die Information über Synapsen auf zentrale Neurone. Im Falle der trigeminalen Neurone, die die Nasenhöhle innervieren, findet diese erste Verschaltung im *Subnucleus caudalis* und *Subnucleus interpolaris* im Pons statt, von wo aus die Information zu verschiedenen Gehirnarealen gebracht wird (Anton und Peppel, 1991). Die Aktivierung von Nozizeptoren führt aber nicht nur zu synaptischer Übertragung, sondern kann auch einen sogenannte „Axonreflex" hervorrufen (Abb. 1.6.). Der „Axonreflex" führt zur Ausschüttung verschiedener Peptide, wie beispielweise Substanz P (SP) und *calcitonin gene-related peptide* (CGRP), von peripheren Endigungen des stimulierten Neurons (Holzer, 1988). Diese Peptide können eine Reihe von Reaktionen im umliegenden Gewebe auslösen, wie Ausdehnung der Blutgefäße, Ausschüttung von Histamin aus Mastzellen, was wiederum weitere Entzündungsreaktionen hervorruft, und Sensitivierung von benachbarten Nozizeptoren (Abb. 1.6.). Die Ausschüttung dieser Peptide aus trigeminalen Fasern im olfaktorischen System könnte die Grundlage für Interaktionen zwischen dem olfaktorischen und dem trigeminalen System (1.3.) darstellen. Um also weitere Einsichten auf diesem Gebiet zu erhalten, muss festgestellt werden, ob Zielzellen, die Rezeptoren für die Peptide exprimieren, im olfaktorischen System vorhanden sind. Daher behandelt das nächste Kapitel die Rezeptoren für SP und CGRP.

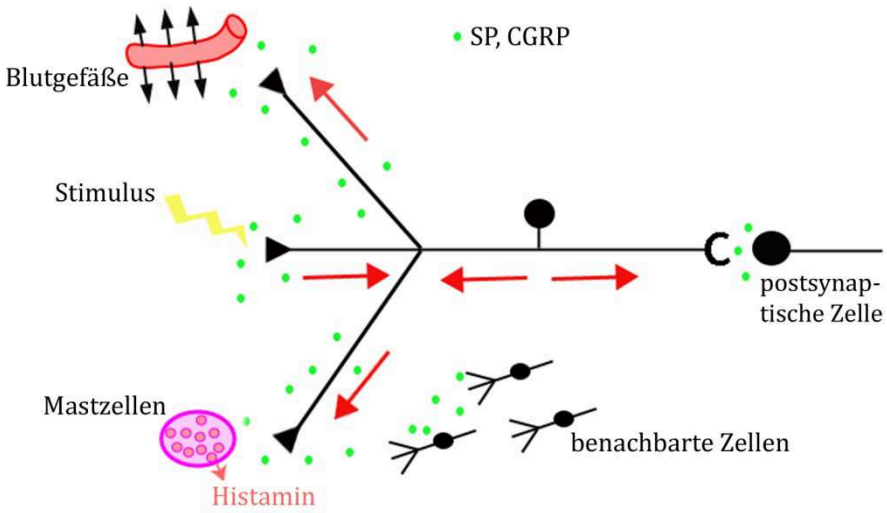

Abbildung 1.6.: Schematische Darstellung der Aktivierung eines nozizeptiven Neurons und die dadurch ausgelösten Reaktionen im umliegenden Gewebe. Reicht die Reizung eines Nozizeptors aus, um Aktionspotentiale hervorzurufen, so wird die Information über Synapsen zu einem zentralen Neuron (postsynaptische Zelle) ins Gehirn weitergeleitet. Außerdem werden über den „Axonreflex" die Peptide CGRP und SP von den peripheren Verzweigungen des Nozizeptors ausgeschüttet und lösen verschiedene Reaktionen im umliegenden Gewebe aus: Ausdehnung der Blutgefäße, Ausschüttung von Histamin aus Mastzellen, Sensitivierung benachbarter Neurone.

1.2.3. Rezeptoren für die Peptide SP und CGRP

Im Folgenden werden Aufbau und Funktionsweise der Rezeptoren für die Peptide SP und CGRP beschrieben. In beiden Fällen handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembran-Domänen.
Das Peptid SP kann an eine Reihe von Tachykinin Rezeptoren binden, hat jedoch die höchste Affinität zu NK1R (einen Überblick geben Maggi, 1995; Khawaja und Rogers, 1996; Quartara und Maggi, 1997; Page, 2005). Bindung eines Agonisten an NK1R kann verschiedene G-Proteine (G_s, G_i, $G_{q/11}$) aktivieren und so zur Stimulation (bzw. Inhibierung im Falle von G_i) verschiedener Effektorenzyme (AC, PLC, Phospholipase A2) führen (Laniyonu et al., 1988; Nakajima et al., 1992; Garcia et al., 1994). Hier wird nur einer der möglichen Signalwege eingehender beschrieben (Abb. 1.7.), da dieser in den meisten NK1R-exprimierenden Zelltypen im zentralen und peripheren Nervensystem zu finden ist (Mantyh et al., 1984; Hunter et al., 1985) und die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hindeuten, dass dieser auch im Falle der NK1R-exprimierenden Zellen im OE der dominierende Signalweg ist (3.4.). Er beginnt mit der Aktivierung eines G-Proteins aus der Familie $G_{q/11}$. Das G-Protein stimuliert seinerseits die PLC, welche das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in IP3 und DAG spaltet. IP3 kann frei durch das Cytoplasma diffundieren, an entsprechende Rezeptoren binden und so den Ausstrom von Ca^{2+} aus internen Speichern ermöglichen. Die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration kann außerdem über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch DAG verändert werden. Die PKC kann unter anderem Kanäle in der Zellmembran phosphorylieren und so deren Öffnungswahrscheinlichkeit verändern (Doerner et al., 1988; Yang und Tsien, 1993). Weiterhin kann DAG selbst Kanäle öffnen und so zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration beitragen (Hofmann et al., 1999).

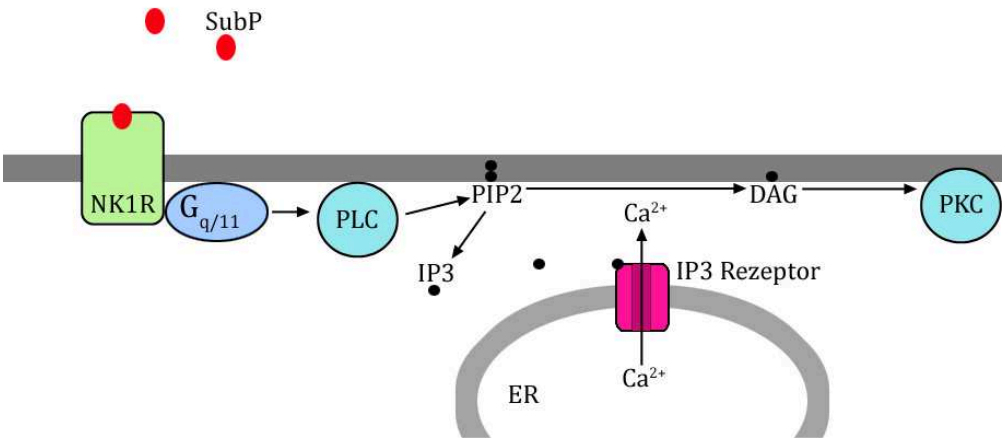

Abbildung 1.7.: Schematische Darstellung eines Signalwegs von NK1R. Die Bindung von SP an NK1R führt zur Aktivierung eines G-Proteins der Familie $G_{q/11}$. Das aktivierte G-Protein stimuliert die PLC, welche PIP2 in IP3 und DAG spaltet. IP3 bindet an IP3 Rezeptoren innerhalb der Zelle und ermöglicht so den Ausstrom von Ca^{2+} aus internen Speichern (hier: ER = Endoplasmatisches Reticulum). DAG aktiviert die PKC, welche ihrerseits Kanäle in der Zellmembran (nicht gezeigt) phosphorylieren und somit die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration verändern kann.

Der Rezeptor für CGRP ist ein Komplex, der sich aus drei Proteinen zusammensetzt (einen Überblick geben Juaneda et al., 2000; Walker et al., 2010). Neben dem eigentlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptor CRLR (*calcitonin receptor-like receptor*) werden zwei weitere Proteine benötigt, um die Funktionalität zu gewährleisten. RAMP (*receptor-activity-modifying protein*) vermittelt den Transport des Rezeptors in die Membran sowie die Spezifität für bestimmte Agonisten (McLatchie et al., 1998; Miyauchi et al., 2002). CRCP (*calcitonin gene-related peptide-receptor-coupling protein*) dient der Kopplung von CRLR an das jeweilige G-Protein (Evans et al., 2000). Die Signalübertragung am CGRP Rezeptor kann über verschiedene G-Proteine erfolgen. In vielen Fällen führt die Bindung von CGRP zur Aktivierung von G_s und daraufhin zur Produktion von cAMP durch die ACIII (Abb. 1.8.; Aiyar et al., 1999; Miyauchi et al., 2002). Es gibt starke Hinweise darauf, dass Stimulation mit CGRP zu einem Anstieg des cAMP-Spiegels im OE führt (Daiber et al., 2012).

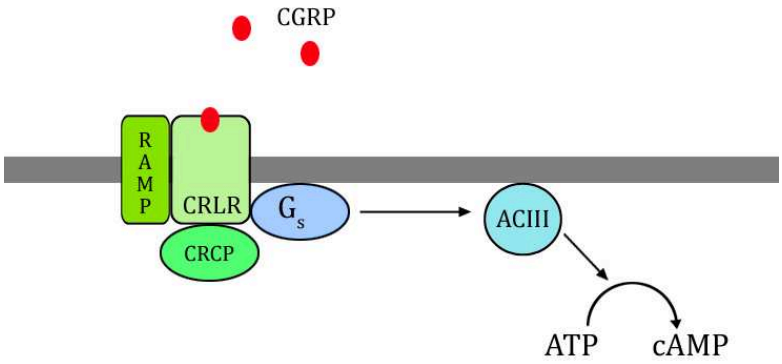

Abbildung 1.8.: Schematische Darstellung eines Signalwegs des CGRP Rezeptorkomplexes. Der CGRP Rezeptor setzt sich aus einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (CRLR), einem Protein, das den Transport des Rezeptors in die Membran und dessen Spezifität vermittelt (RAMP), und einem Protein, das die Kopplung an das G-Protein ermöglicht (CRCP), zusammen. Aktivierung von G_s führt zur Stimulation von ACIII, die ATP in cAMP umwandelt.

1.3. Wechselwirkungen zwischen dem trigeminalen und dem olfaktorischen System

Wie eingangs beschrieben werden sowohl OE als auch OB vom *Nervus trigeminus* innerviert. Daraus resultiert die Möglichkeit, dass olfaktorisches und trigeminales System auf peripherer und/oder zentraler Ebene miteinander interagieren. Weiterhin besteht die Option, dass es eine Interaktion in höheren Gehirnzentren gibt. Die Wechselwirkungen zwischen den beiden Systemen sind nur teilweise aufgeklärt (einen Überblick geben Hummel und Livermore, 2002; Brand, 2006), wobei molekulare Mechanismen noch unbekannt sind. Es konnte gezeigt werden, dass fast alle Duftstoffe in Abhängigkeit von ihrer Konzentration neben dem olfaktorischen auch das trigeminale System stimulieren (Cain, 1977; Doty et al., 1978; Silver und Moulton, 1982), welches chemische Stoffe entweder selbst über verschiedene Kanäle und Rezeptoren (1.2.2.) oder indirekt über Kommunikation mit assoziierten Zellen (1.1.3., 4.1.) detektieren könnte.

Viele psychophysische Studien beschreiben Wechselwirkungen zwischen olfaktorischem und trigeminalem System, die sich in der Wahrnehmung äußern. Die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich vermutlich auf hochkomplexe Mechanismen zurückführen, die von der Qualität des Stimulus (Detektion durch olfaktorisches/trigeminales System oder beides), der Intensität des Stimulus, dem Verhältnis von trigeminalen und olfaktorischen Komponenten (bei simultaner Reizung) sowie der zeitlichen Abfolge der Stimulierung beeinflusst werden.
Einige Studien lassen vermuten, dass das trigeminale System die olfaktorische Wahrnehmung unterdrückt. In einer dieser Studien (Daiber et al., 2012) wurden Phenylethylalkohol, ein Duftstoff der vermutlich rein olfaktorisch wahrgenommen wird (Doty et al., 1978; Silver und Moulton, 1982), und CO_2, das beim Menschen nur das trigeminale System stimuliert (Cain, 1976; Young et al., 2007), getrennt und zusammen appliziert. Mit steigender CO_2 Konzentration wurde die wahrgenommene Intensität des Duftstoffes von den Probanden geringer eingestuft, die Intensität der Irritation höher. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien erzielt (Cain, 1976; Cain und Murphy, 1980).
Im Gegensatz dazu konnten Jacquot et al. (2004) zeigen, dass das trigeminale System die Empfindlichkeit des olfaktorischen Systems unter bestimmten Bedingungen heraufsetzen kann. In dieser Studie wurden Phenylethylalkohol (Stimulation olfaktorisches System), Butanol (Stimulation olfaktorisches und trigeminales System) und Senföl (Stimulation trigeminales System) verwendet. Wurde das Irritanz Senföl vor den Duftstoffen Phenylethylalkohol oder Butanol präsentiert, so war die Detektionsschwelle für die Duftstoffe niedriger als unter normalen Bedingungen.
Weiterhin gibt es Studien, die auf eine Unterdrückung des trigeminalen Systems durch das olfaktorische hindeuten (Cain und Murphy, 1980; Livermore et al., 1992). Hier wurde gezeigt, dass olfaktorische Reize die wahrgenommene Intensität von CO_2 herabsetzen können. Dieser Effekt ist größer, wenn Stimuli verwendet werden, die sowohl vom olfaktorischen als auch vom trigeminalen System detektiert werden können.
Mechanismen möglicher Interaktionen zwischen trigeminalem und olfaktorischem System auf Ebene des OE und des OB wurden bisher nur wenig studiert. Im OE von Fröschen rief elektrische Stimulation des *Nervus trigeminus* eine Reduktion der Summenantwort im EOG sowie der Feuerrate einzelner olfaktorischer Neurone als Antwort auf den Duftstoff Isoamylacetat hervor (Bouvet et al., 1987). Weiterhin veränderte die Stimulation des *Nervus trigeminus* die basale Aktivität im OE (Bouvet et al., 1987, 1988).
Da die Stimulation von trigeminalen Fasern in der Nase zur Ausschüttung von Peptiden führt (Stjärne et al., 1989; Kuhn et al., 1997; Vause et al., 2007) (1.1.2.), kann die Aktivierung des trigeminalen Systems mit Peptiden, wie SP oder CGRP, zumindest partiell nachgeahmt werden. Bouvet et al. (1987, 1988) konnten mit SP am OE von Fröschen einen ähnlichen Effekt auf die Basalaktivität hervorrufen, wie er durch die elektrische Stimulation des *Nervus trigeminus* erreicht wurde (s.o.) (vgl. 4.3.). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass CGRP eine inhibitorische Wirkung auf das durch den Duftstoff Phenylethylalkohol hervorgerufene Summenpotential im Elektroolfaktogramm hat (Daiber et al., 2012).
Soweit bekannt gibt es nur eine Studie, die sich mit der Wirkung trigeminaler Peptide im OB beschäftigt (Olpe et al., 1987). In dieser wurde eine inhibitorische Wirkung von SP auf juxtaglomeruläre Neurone nachgewiesen (vgl. 4.4., 4.7.).

Um die oben genannten Wechselwirkungen zwischen trigeminalem und olfaktorischem System, die auf Ebene der Wahrnehmung festgestellt werden konnten, besser zu verstehen, ist es nötig mehr Erkenntnisse über mögliche Modulationen in der Peripherie und im OB zu gewinnen. Bisher ist nur sehr wenig über die Effekte, die trigeminale Peptide im olfaktorischen System hervorrufen, bekannt. Die vorliegende Arbeit entwirft ein detailliertes Bild der Innervation des olfaktorischen Systems durch trigeminale Fasern. Weiterhin werden potentielle Zielstrukturen für trigeminale Peptide aufgezeigt und die Möglichkeiten wie trigeminales und olfaktorisches System miteinander interagieren könnten diskutiert.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Wistar-Ratten im Alter von 2-14 Wochen sowie Mäuse verschiedener Stämme verwendet. Die Wistar-Ratten und die Mäuse des Stammes C57BL/6 wurden von Charles River (Sulzfeld/BRD) bezogen, die MF1 Mäuse von Harlan OLAC (Bicester/UK). Die TN-L15 Mäuse wurden der Zucht im Tierhaus des Forschungszentrums Jülich entnommen. Zuchttiere von diesem Stamm wurden freundlicherweise von Dr. Oliver Griesbeck (Max-Planck-Institut für Neurobiologie) zur Verfügung gestellt. Die Gewebeproben der NK1R *knock-out* Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Stephen Hunt (University College London) zur Verfügung gestellt (für nähere Informationen s. De Felipe et al., 1998; Herpfer et al., 2004; Yan et al., 2010).
Für das funktionelle Imaging im olfaktorischen Epithel (OE) wurden dicke Gewebsschnitte („Slices“) durch die Nasenhöhle von C57BL/6 Jungtieren (Postnataltag P0-P4) erstellt. Diese Tiere wurden der Zucht im Tierhaus des Forschungszentrums Jülich entnommen.

2.2. Geräte

Kryostat:	**HM 560 Cryo-Star**	MICROM (Walldorf/BRD)
Vibratom:	**VT 100 S**	Leica Microsystems (Wetzlar/BRD)
Durchlichtmikroskop:	**Axiovert 35**	Zeiss (Oberkochen/BRD)
Konfokale Laser-Scanning Setups:	**TCS SP**	Leica Microsystems (Wetzlar/BRD) ausgestattet mit einem Argonlaser (458, 488nm) und zwei Helium-Neonlasern (543, 633nm) Objektive: 5x/0.15 Luft, 10x/0.30 Luft, 20x/0.70 Öl, 40x/1.0 Öl, 63x/1.32-0.6 Öl
	TCS SP5 II	Leica Microsystems (Wetzlar/BRD) ausgestattet mit einem Argonlaser (458, 476, 488, 496, 514nm) und drei Helium-Neonlasern (543, 594, 633nm) Objektive: 5x/0.15 Luft, 10x/0.30 Luft, 20x0.70 Öl, 63x/1.4 Öl
Fluorimeter:	**FluoStar Galaxy**	BMG Labtech (Offenburg/BRD)

Fluoreszenz-Imaging Setup:	Mikroskop:	**Examiner.Z1**	Zeiss (Oberkochen/BRD)
		Objektiv: 40x/1.0 Wasser	
	LEDs:	Colibri (436±25 nm, 470±40 nm)	Zeiss (Oberkochen/BRD)
	Kamera:	iXon	Andor Technology (South Windsor/CT)
PCR-Gerät:	**Primus 96**		PEQLAB (Erlangen/BRD)

2.3. Verwendete Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben wurden Chemikalien in p.A. Qualität von den Firmen AppliChem (Darmstadt/BRD), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg/BRD), Merck (Darmstadt/BRD), Riedel-de Haen AG (Seelze/BRD), Serva (Heidelberg/BRD), Sigma (Deisenhofen/BRD), Macherey-Nagel (Düren/BRD), Molecular Probes (Darmstadt/BRD) und Millipore (Schwalbach/BRD) bezogen.

Nachfolgend sind die für diese Arbeit verwendeten Lösungen aufgeführt.
Alle Lösungen wurden soweit nicht anders angegeben mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt. Der pH-Wert wurde bei Bedarf mit NaOH bzw. mit HCl titriert.

Puffer (allgemein)

Phosphatpuffer (PB)	81 mM Na_2HPO_4 19 mM NaH_2PO_4 pH 7,4
Phosphatgepufferte Saline (PBS)	130 mM NaCl 7 mM Na_2HPO_4 3 mM NaH_2PO_4 pH 7,4

Fixativ

4% Paraformaldehyd (PA) in PB

Puffer und Medien für die Transformation

CM-Puffer	10 mM $CaCl_2$ 40 mM $MgCl_2$
LB-Medium	1% Baktotrypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl

Puffer und Lösungen für Membranproteinpräparationen (Maxipräparation, LiCl-Minipräparation, Plasmid-Minipräparation)

Lösung I	25 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA
Lösung II	200 mM NaOH 1% SDS
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer	40 mM Tris/Acetat pH 7,5 1 mM EDTA
10x Probenpuffer	50% (v/v) Glycerin 0,1% Xylen-Cyanol in 10x TAE

Puffer für die Transfektion

2x BBS	50 mM BES 280 mM NaCl 1,5 mM Na_2HPO_4

Lösungen für die Immunhistochemie und -cytochemie

10% Saccharose in PB (mit 0,05% NaN_3 versetzt)

30% Saccharose in PB (mit 0,05% NaN_3 versetzt)

Inkubationslösung I (CTA)	5% Chemiblocker 0,5% Triton X-100 0,05% NaN_3 in PB
Inkubationslösung II (CT)	5% Chemiblocker 0,5% Triton X-100 in PB
Richardson Blau	0,5% Azur 2 0,05% Methylenblau (in 0,05% $Na_2B_4O_7$)
Isolectin B4 Biotin-Konjugat (IB4)	Stock: 1 µg/µl IB4 0,05% NaN_3 0,1 mM $CaCl_2$ in PB

1mM ToPro®-3 Iodid in DMSO (Stock)

Puffer für die Antigendemaskierung

Citratpuffer	10 mM $C_6H_5Na_3O_7$ pH 6,0
Natriumboratpuffer	40 mM H_3BO_3 pH 8,0 (mit NaOH-Plätzchen eingestellt)

Puffer für die Ligation von DNA-Fragmenten

10x Ligase-Puffer	600 mM Tris/HCl pH 7,5 50 mM $MgCl_2$ 10 mM DTE 10 mM ATP

Puffer für die Amylose-Säulenchromatographie

Säulenpuffer	200 mM NaCl 20 mM Tris/HCl pH 7,4 10 mM β-Mercaptoethanol 1 mM EDTA

Puffer für die Ni-NTA-Säulenchromatographie

NPI-10-Puffer	50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8,0
DNPI-10/20/250-Puffer	50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 10/20/250 mM Imidazol 8 M CH_4N_2O (Harnstoff) pH 8,0

Puffer für die CNBr-aktivierte Sepharose 4B-Säulenchromatographie

Kopplungspuffer	100 mM $NaHCO_3$ pH 7,3 0,5 M NaCl
Waschpuffer 1	100 mM Tris/HCl pH 8,0 0,5 M NaCl
Waschpuffer 2	100 mM Na-Acetat pH 4,0 0,5 M NaCl
Equilibrierungspuffer	100 mM Tris/HCl pH 8,0 0,5 M NaCl
Aufbewahrungspuffer	100 mM Tris/HCl pH 8,0 0,5 M NaCl 0,02% NaN_3

Lösungen für die Ca^{2+}-Fluorimetrie und das Ca^{2+}-Imaging von HEK293-Zellen

Extrazellulärlösung (ES)	120 mM NaCl 5 mM KCl 2 mM $MgCl_2$ 2 mM $CaCl_2$ 10 mM HEPES 10 mM Glucose pH 7,4

400 µM Substanz P (SP) (Stock) (Bachem, Bubendorf/CH)

1,5 mM U-73122 (Stock) (Sigma, Deisenhofen/BRD)

1,7 mM Fluo-4 AM in DMSO (Stock)

20% Pluronic F-127 in DMSO (Stock)

0,3 M Probenecid in 0,4M NaOH (Stock)

Beladelösung Einzelzellmessungen	1,7 µM Fluo-4 AM 0,02% Pluronic F-127 in ES
Beladelösung Fluostar	1,7 µM Fluo-4 AM 0,02% Pluronic F-127 3 mM Probenecid in ES

Lösungen für das Ca^{2+}-Imaging an Schnitten durch das olfaktorische Epithel und an dissoziierten Zellen

Extrazellulärlösung (S1)	145 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM $CaCl_2$ 1 mM $MgCl_2$ 10 mM HEPES pH 7,3 300 mosm (mit Glucose eingestellt)
Oxygenierte Extrazellulärlösung (S2)	120 mM NaCl 25 mM $NaHCO_3$ 5 mM KCl 1 mM $CaCl_2$ 1 mM $MgSO_4$ 5 mM BES pH 7,3 300 mosm (mit Glucose eingestellt)
Hoch-K^+ Lösung	100 mM NaCl 50 mM KCl 1 mM $CaCl_2$ 1 mM $MgCl_2$ 10 mM HEPES pH 7,3 300 mosm (mit Glucose eingestellt)

Niedrig-Ca^{2+} Lösung	135 mM NaCl 5 mM EGTA 1,5 mM CaCl2 5 mM KCl 10 mM NaOH 1 mM MgCl2 10 mM HEPES pH 7,3 300 mosm (mit Glucose eingestellt)
„Henkel 97“	Mischung aus 97 verschiedenen Duftstoffen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Firma Henkel (Krefeld/BRD)

400 µM Substanz P (SP) (Stock) (Bachem, Bubendorf/CH)

1,5 mM U-73122 (Stock) (Sigma, Deisenhofen/BRD)

1 mM *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) (Stock) (Bachem, Bubendorf/CH)

4% Agarose („peqGOLD Low Melt Agarose“ Peqlab, Erlangen/BRD) in S1

1,7 mM Fluo-4 AM in DMSO (Stock)

5 mg/ml Concanavalin A („Type IV-S” Sigma, Deisenhofen/BRD) in PBS

2.4. Präparation der NK1R-cDNA und Transfektion von HEK293-Zellen

2.4.1. Transformation und Plasmid-DNA-Präparation (Maxipräparation)

Um sowohl die Antikörper gegen NK1R zu testen als auch die Eigenschaften des Rezeptors in einem einfachen System zu verstehen, wurden in der vorliegenden Arbeit HEK293-Zellen mit muriner und humaner NK1R-cDNA transfiziert.
Zunächst wurden kompetente *E. coli* XL1 Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla/CA) mit dem Plasmidvektor pEZ-M07 (ImaGenes, Berlin/BRD) transformiert. Dieser enthält neben der vollständigen cDNA für den murinen NK1R eine dreifache HA Sequenz und vermittelt Ampicillin-Resistenz. Für die Transformation mit der humanen NK1R-cDNA wurde der Plasmidvektor pcDNA3.1+ (Missouri S&T cDNA Resource Center, Rolla/MO) verwendet, welcher ebenfalls Ampicillin-Resistenz vermittelt und eine dreifache HA Sequenz enthält.

<u>Transformationsansatz:</u>
1 µl Plasmid-DNA
5 µl 10x CM-Puffer
ad 50 µl H_2O

Der Transformationsansatz wurde zu 50 µl der kompetenten Zellen gegeben und mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Nach 1 min bei 42 °C („Hitzepuls“) und weiteren 10-15 min auf Eis wurden 200 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz anschließend 30-45 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf LB-

Agarplatten (+Ampicillin) ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit dem Zahnstocher eine Kolonie in ein Röhrchen mit LB-Medium (+Ampicillin) überführt (Vorkultur). Die Vorkultur wurde ü.N. bei 37 °C rotiert und am nächsten Tag in einen großen Kulturkolben überführt. Dieser wurde ü.N. bei 37 °C mit 160 rpm im Schüttler inkubiert (Übernachtkultur).
Für die Maxipräparation wurden die Bakterienzellen aus einer 250 ml Übernachtkultur pelletiert (15.000 g, 5 min, 4 °C), in 20 ml Lösung I resuspendiert und mit 24 ml Lösung II lysiert. Proteine, chromosomale DNA und Zelltrümmer wurden durch Zugabe von 30 ml 3 M Kaliumacetat pH 4,8 gefällt und pelletiert (22.000 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, zentrifugiert (5.000 g, 10 min, 4 °C) und das Nukleinsäurepellet in 1,5 ml 30 mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Durch Zugabe von 2,5 ml 4 M LiCl wurde die RNA gefällt und anschließend pelletiert (5.000 g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und die darin enthaltene Plasmid-DNA durch Zugabe von 12 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (5.000 g, 15 min, 4 °C) wurde das DNA-Pellet in 500 µl TE-Puffer mit RNase (Ambion, Austin/TX) resuspendiert und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch Phenol/Chloroform-Extraktion (2.4.2.1.) und Ethanol-Präzipitation (2.4.2.2.) gereinigt. Das Pellet wurde getrocknet und in 300 µl TE-Puffer aufgenommen. Danach wurde die Konzentration der DNA mittels photometrischer Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration (2.4.2.3.) und Quantifizierung über Agarosegele (2.4.2.4.) bestimmt und zur transienten Transfektion von HEK293-Zellen (2.4.3.) sowie zur Gewinnung der Fusionsproteine für die Herstellung der Anti-MBP-NK1R-Antikörper (2.6.4.2.1.) verwendet.

2.4.2. Reinigung, Trennung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.4.2.1. Phenol/Chloroform-Extraktion

Verunreinigungen von DNA-Lösungen mit Proteinen, Membranbestandteilen etc., die in organischen Lösungsmitteln löslich sind, wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen einer 1:1-Mischung aus Phenol und Chloroform versetzt, die Phasen gut gemischt und zur Trennung zentrifugiert (15.000 g, 3 min, RT). Die wässrige Phase wurde abgenommen und nochmals mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert, um Phenolreste zu entfernen. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert (2.4.2.2.).

2.4.2.2. Ethanol-Präzipitation

Um DNA zu konzentrieren oder umzupuffern, kann sie durch Einstellung definierter Salz- und Alkoholkonzentrationen präzipitiert werden. Die DNA-Lösung wurde auf eine Natriumacetat-Konzentration von 0,3 M (pH 4,8) eingestellt und mit dem 2,5 - 3fachen Volumen absoluten Ethanols versetzt und kurz gemischt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (17.000 g, 4°C) pelletiert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach der Größe und Konzentration der DNA. Je geringer konzentriert die DNA war, desto länger wurde zentrifugiert (10 - 30 min). Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE aufgenommen.

2.4.2.3. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurden diese in TE verdünnt und die Absorption bei 260 nm in einer Küvette (Schichtdicke 1 cm) gemessen. Als DNA-freie Referenz diente TE. Bei der Berechnung der Konzentration wurden folgende Werte zugrunde gelegt:

Doppelsträngige DNA: 50 µg/ml bei $OD_{260} = 1$
RNA: 40 µg/ml bei $OD_{260} = 1$
Oligonukleotide: 33 µg/ml bei $OD_{260} = 1$

Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten konnten durch den Quotienten der Absorptionen bei 260 und 280 nm beurteilt werden. Er sollte nicht kleiner als 1,8 sein.
Chromosomale DNA, RNA und Nukleotide sind bei dieser Methode nicht von Plasmid-DNA zu unterscheiden.

2.4.2.4. Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke der Größe nach getrennt werden.
Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht bis sie vollständig gelöst war. Nachdem die Gellösung auf 60 °C abgekühlt war, wurde sie mit 1 µg Ethidiumbromid/ml versetzt und in einen Gelträger mit einem Former für die Probentaschen gegossen. Nach dem Erkalten der Gellösung wurden die Proben, die zuvor mit 1x Probenpuffer versetzt worden waren, aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit TAE als Laufpuffer bei 90-120 V durchgeführt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basenpaaren der DNA und fluoresziert dann unter UV-Licht. Die unterschiedlichen Nukleinsäurebanden wurden somit unter UV-Licht sichtbar.

2.4.2.5. Quantifizierung von Nukleinsäuren mithilfe von Agarosegelen

Die Menge an DNA, die auf ein Agarosegel mit Ethidiumbromid (2.4.2.4.) aufgetragen wurde, konnte durch Vergleich mit einem zusätzlich aufgetragenen Größen- und Mengenstandard anhand der Intensität der Banden abgeschätzt werden.
Als DNA Standard wurde λ-DNA (MBI Fermentas, Vilnius/LI) mit EcoRI und HindIII geschnitten verwendet. Die Fragmentgrößen und die entsprechende Menge an DNA/10 µl Auftrag betrugen: 21.226 Bp (≈ 292 ng), 5.184 Bp (≈ 71 ng), 4.973 Bp (≈ 69 ng), 4.268 Bp (≈ 59 ng), 3.530 Bp (≈ 49 ng), 2.027 Bp (≈ 28 ng), 1.904 Bp (≈ 27 ng), 1.584 Bp (≈ 24 ng), 1.375 Bp (≈ 19 ng), 947 Bp (≈ 13 ng), 831 Bp (≈ 11 ng), 564 Bp (≈ 8 ng), 125 Bp (≈ 2 ng).

2.4.3. Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Die Transfektion wurde nach der $CaPO_4$-Methode (Chen und Okayama, 1987) durchgeführt. Für immuncytochemische Untersuchungen (2.5.) sowie fluorimetrische (2.7.) und Imaging Experimente (2.8.) wurden HEK293-Zellen in Ø 5 cm Schalen transfiziert. Die Menge der DNA, die für die Transfektion verwendet wurde, wurde über die Bestimmung der maximalen Transfektionseffizienz mittels Immuncytochemie (2.5.) festgelegt. Die Transfektionsansätze sind in Tabelle 2.1. aufgeführt.

Tabelle 2.1.: Transfektionsansätze

	Ø 5 cm Schale	**Ø 9 cm Schale**
DNA	14 µg in 124 µl H_20	42 µg in 372 µl H_20
$CaCl_2$ (1 M)	41 µl	123 µl
2x BBS	165 µl	495 µl

Die Transfektionsansätze wurden 20 min (RT) inkubiert und anschließend auf Schalen mit logarithmisch wachsenden Zellen (bei einer Zelldichte von ca. $4x10^5$) pipettiert. Die DNA wurde durch eine 20-22 h Inkubation bei 35°C, 3% CO_2 und ~ 95% Luftfeuchtigkeit präzipitiert. Für immuncytochemische Untersuchungen und Imaging Experimente wurden die transfizierten Zellen mit 3 ml PBS und mit 2 ml PBS/EDTA (0,05%) gewaschen. Anschließend wurden 300 µl Trypsin/EDTA (0,05%) hinzugefügt und die Zellen bis zu ihrer Ablösung bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden in M10 Nährmedium (Sigma, Deisenhofen/BRD) resuspendiert und auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen in 4er- oder 24er-Multiwellplatten (Immuncytochemie und Imaging am 2-Photonen-Mikroskop) bzw. auf direkt mit Poly-L-Lysin beschichtete 96er-Multiwellplatten (Fluorimetrie) pipettiert. Danach wurden sie 20-22 h bei 37°C, 5% CO_2 und ~ 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zur Steigerung der Expressionseffizienz wurden die Zellen nach ca. 5 h in Nährmedium mit 5 mM Butyrat weiterinkubiert.

2.5. Immuncytochemie

Die transient NK1R-exprimierenden HEK293-Zellen (2.4.) wurden am zweiten Tag nach der Transfektion mit PBS gewaschen und 5-10 min mit 4% Paraformaldehyd auf den Glasplättchen fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PB gewaschen, mit PB versetzt mit 0,05% NaN_3 bedeckt und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.
Die Färbung erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Zellen im Primärantikörper verdünnt in Inkubationslösung I für 1 h inkubiert. Danach wurden sie zweimal 10 min mit PB gewaschen und anschließend mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (2.6.3. Tab. 2.3.) verdünnt in Inkubationslösung II 30 min inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden abermals zweimal 10 min mit PB gewaschen und in Aqua Poly-Mount (Polysciences, Warrington/PA) auf einem Objektträger eingedeckt. Neben den verschiedenen anti-NK1R Antikörpern (2.6.3. Tab. 2.3.), wurde ein anti-HA Antikörper aus der Ratte (Roche Applied Science, Mannheim/BRD) in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt, um die erfolgreich transfizierten Zellen zu markieren. Die Auswertung der Färbungen erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (2.6.5.).

2.6. Immunhistochemie

2.6.1. Präparation

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an Nasen, olfaktorischen Bulben, Trigeminalganglien und Hinterwurzelganglien von Ratten und Mäusen (2.1.) durchgeführt. Zur Gewebepräparation wurden die Tiere zunächst mit Isofluran tief betäubt und in der Narkose durch Dekapitation getötet.
Nach dem Entfernen des Fells, der Augen und möglichst viel weichem Gewebe, wie Muskeln, wurde der Unterkiefer vom Kopf abgetrennt. Weiterhin wurden die Schneidezähne und die Gaumenplatte entfernt. Um das Gehirn freizulegen, wurde der letzte Halswirbel abgetrennt und die Schädelplatten abpräpariert. Hierfür wurde vom Hinterhauptsloch ausgehend ein Medianschnitt bis Bregma geführt. Ein beidseitiger Transversalschnitt von Bregma ausgehend ermöglichte das Abnehmen der Schädelplatten mit einer Pinzette. Danach wurde mit einem Skalpell der hintere Teil des Gehirns (ca. 0,5 cm hinter dem *Bulbus olfactorius* (OB)) abgetrennt und verworfen. Auf der darunter liegenden Schädelbasis befinden sich beidseitig, in etwa auf Höhe des Innenohres, die Trigeminalganglien. Diese wurden durch vorsichtiges Schaben mit einem Raspatorium vom Felsenbein gelöst und mit einer Schere von den Nerven getrennt. Danach wurde der überstehende Teil der Schädelbasis abgetrennt und entweder der Rest des Kopfes als Ganzpräparat (Nase und OB) verwendet oder der OB gesondert freipräpariert. In letzterem Fall wurde mithilfe einer Pinzette der Rest der Schädeldecke vorsichtig abgetragen und der Bulbus entnommen. Die Hinterwurzelganglien wurden zugänglich gemacht, indem die Wirbelsäule freigelegt und auf der ventralen Seite eröffnet wurde. Die Ganglien, die sich zu beiden Seiten des Rückenmarks befinden, wurden vorsichtig mit einer Pinzette herausgenommen und mit einer Mikroschere vom Rückenmark getrennt. Alle Präparate wurden anschließend für 30-60 min in 4% PA fixiert (Immersionsfixierung, RT). Um das Eindringen des Fixatives in die Nasen zu erleichtern, wurden diese in einem Exsikkator entgast. Danach wurden die Präparate für mindestens 20 min in PB gewaschen. Zur Kryoprotektion wurden die Präparate erst in 10%ige Saccharoselösung (1h, 4°C), dann in 30%ige Saccharoselösung (ü.N, 4°C) überführt. Eine Ausnahme bildeten die Nasen, die ü.N. in einer 1:1-Mischung aus 30%iger Saccharoselösung und dem Eindeckmedium Tissue Tek (Sakura Finetek, Zouterwoude/NL) belassen wurden, um das vollständige Eindringen des Mediums zu gewährleisten. Am darauffolgenden Tag wurden alle Präparate in Tissue Tek eingebettet, eingefroren und bis zum Schneiden bei -80°C aufbewahrt.

2.6.2. Anfertigung der Schnitte

Die Gefrierschnitte für die Immunhistochemie wurden an einem Kryostaten angefertigt. Die gewählten Schnittdicken betrugen abhängig von der Fragestellung zwischen 18 und 40 µm. Weiterhin wurden die Objekttemperatur auf -15°C und die Messertemperatur auf -20°C gestellt. Die Schnitte wurden auf Superfrost Plus Objektträger (Menzel, Braunschweig/BRD) aufgenommen und angetrocknet. Danach wurden sie entweder direkt gefärbt oder bei -20°C gelagert. Zur Überprüfung der Gewebserhaltung wurden stichprobenartig Schnitte mit Richardson Blau gefärbt und unter einem Durchlichtmikroskop betrachtet.
Sollten Antikörperfärbungen (2.6.3.) an sehr dicken Schnitten durchgeführt werden, so wurden die Schnitte alternierend eingefroren, indem die Objektträger auf einen

mithilfe von flüssigem Stickstoff heruntergekühlten Metallblock gelegt wurden, und aufgetaut. Diese Prozedur wurde bis zu dreimal wiederholt, um das Eindringen der Antikörper zu erleichtern.

2.6.3. Antikörperfärbungen

Mithilfe von Antikörperfärbungen können Proteine nachgewiesen und lokalisiert werden sowie unterschiedliche Zelltypen charakterisiert werden. In dieser Arbeit wurde mit der indirekten Nachweismethode gearbeitet. Das heißt, dass die Bindung des Erstantikörpers an ein Epitop (die Region eines Proteins, gegen die sich der Antikörper richtet) indirekt über einen fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper nachgewiesen wird, der seinerseits gegen den Erstantikörper gerichtet ist.
Für die Färbung wurden die Gefrierschnitte aufgetaut und kurz angetrocknet. Anschließend wurden sie mit einem Fettstift („Liquid Blocker“ SCI Science Services, München/BRD) umrandet, was die Inkubation der Schnitte in kleinen Volumina (ca. 100 µl für 3 Schnitte) erlaubt. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt. Die Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer (mit feuchten Tüchern ausgelegte Box).
Zur Markierung der Proteine wurden die Schnitte mit den entsprechenden Erstantikörpern verdünnt in Inkubationslösung I ü. N. bzw. bei dickeren Schnitten bis zu 72 h inkubiert. Das in Inkubationslösung I enthaltene Detergenz Triton X-100 dient dazu die Zellmembran für die Antikörper permeabel zu machen, der Chemiblocker soll alle unspezifischen Bindungen abdecken und das Natriumazid eine Kontamination mit Mikroorganismen vermeiden. Tabelle 2.3. gibt Auskunft über die verwendeten Erstantikörper. Neben Antikörpern wurde für manche Färbungen auch an Biotin gekoppeltes Isolectin B4 (IB4) verwendet, das an Galactosyl-Reste bindet. Dieses wurde auch in Inkubationslösung I verdünnt und zusammen mit den Erstantikörpern auf die Schnitte gegeben.
Im nächsten Schritt wurden die Schnitte zweimal mit ca. 3 ml PB abgespült, 10 min in PB gewaschen und für 1 h bzw. ü.N. bei dickeren Schnitten mit den entsprechenden Zweitantikörpern verdünnt in Inkubationslösung II inkubiert. In Tabelle 2.4. sind die verwendeten Zweitantikörper, die Laserlinie mit der die gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe angeregt wurden sowie deren Emissionsmaxima aufgelistet. Es wurden nur kreuzabsorbierte Zweitantikörper verwendet. Bei Mehrfachfärbungen wurden entsprechende Tests durchgeführt, um auszuschließen, dass einer der Zweitantikörper mit dem falschen Erstantikörper reagiert. Zusammen mit den Zweitantikörpern wurde in manchen Fällen auch der Fluoreszenzfarbstoff ToPro®-3 (Molecular Probes, Darmstadt/BRD) bzw. an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltes Streptavidin auf die Schnitte gegeben. ToPro®-3 interkaliert in die DNA und färbt somit die Kerne aller Zellen an. Da Streptavidin an Biotin bindet, ist es möglich mit den Streptavidin-gekoppelten Farbstoffen die Bindungen von IB4-Biotin sichtbar zu machen. Das Resultat ist also ein IB4-Biotin-Streptavidin-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex. In Tabelle 2.5. sind alle Fluoreszenzfarbstoffe aufgeführt, die keine Antikörper sind.
Die gefärbten Schnitte wurden danach zweimal mit ca. 3 ml PB abgespült, 10 min in PB im Dunkeln gewaschen und in Aqua Poly-Mount (Polysciences, Warrington/PA) mit einem Deckgläschen eingedeckt.
In manchen Fällen wurde vor der Antikörperfärbung eine Antigendemaskierung durchgeführt. Bei der Fixierung von Gewebe kann es vorkommen, dass das Epitop, gegen das ein Antikörper gerichtet ist, aufgrund von Quervernetzungen nicht mehr

erkannt werden kann. Die sogenannte Antigendemaskierung ist der Sammelbegriff für verschiedene Methoden, mit denen man diese Quervernetzungen teilweise rückgängig machen kann, sodass der Antikörper wieder bindet. Hier wurde mit der Citratpufferdemaskierung gearbeitet. Dafür wurden die Schnitte zuerst für 3 min in Citratpuffer gekocht, dann für 5 min mit Boratpuffer equilibriert, 3 min in PB gewaschen und danach wie oben beschrieben gefärbt.

Tabelle 2.2.: Übersicht über verwendete Erstantikörper. Neben den Antikörpern wurde in manchen Färbungen an Biotin gekoppeltes IB4 (Molecular Probes, Darmstadt/BRD) in einer 1:500 Verdünnung verwendet.

Erstantikörper	Antigen	Herkunft	Verdünnung	Quelle
2H7	*cyclic nucleotide-gated ion channel A2* (CNGA2)	Maus	1:100	In Zusammen-arbeit mit Fr. Dr. Kremmer (s. Müller et al. 2003)
AC3	Typ 3 Adenylatcyclase	Kaninchen	1:1500	Santa Cruz sc-588
CabP	Calbindin D-28k	Maus	1:1000	Sigma C9848
Cal	Calretinin	Ziege	1:3000	Millipore AB1550
CGRP	*calcitonin gene-related peptide*	Kaninchen	1:16000	Millipore AB15360
CGRP	*calcitonin gene-related peptide*	Schaf	1:4000	Enzo Life Sciences CA1137
CRCP	*calcitonin gene-related peptide-receptor-coupling protein*	Kaninchen	1:100	Sigma HPA007216
CRLR	*calcitonin receptor-like receptor*	Kaninchen	1:50	Abcam ab83697
$G\alpha_{q/11}$	α-Untereinheit des G-Proteins G_q bzw. G_{11}	Kaninchen	1:500	Santa Cruz sc-392

$G\alpha_{olf/s}$	α-Untereinheit des olfaktorischen G-Proteins G_{olf} bzw. des G-Proteins G_s	Kaninchen	1:3200	Santa Cruz sc-383
GC-D	Guanylatcyclase D	Kaninchen	1:200	FGI PGCD-401AP
GFP	*green fluorescent protein*	Huhn	1:1000	Millipore AB16901
IP3R3	Typ 3 Inositoltrisphosphat Rezeptor	Maus	1:500	BD Biosciences 610312
rbNK1R	Typ 1 Neurokinin Rezeptor (C-Terminus)	Kaninchen	1:500-1000	Millipore AB5060
gtNK1R	Typ 1 Neurokinin Rezeptor (interne Region)	Ziege	1:50	Santa Cruz sc-5220
gpNK1R	Typ 1 Neurokinin Rezeptor (C-Terminus)	Meerschweinchen	1:500-1000	Millipore AB15810
rbNK1Rn	Typ 1 Neurokinin Rezeptor (N-Terminus)	Kaninchen	1:500-1000	Abnova PAB12009
rbNK1R PSL	Typ 1 Neurokinin Rezeptor (C-Terminus, Peptid)	Kaninchen	1:1000	Diese Arbeit (Zusammen-arbeit mit PSL)
gpNK1R PSL	Typ 1 Neurokinin Rezeptor (C-Terminus, Peptid)	Meerschweinchen	1:200-400	Diese Arbeit (Zusammen-arbeit mit PSL)
rbNK1Rα	Typ 1 Neurokinin Rezeptor (C-Terminus, Fusionsprotein)	Kaninchen	1:100	Diese Arbeit (Zusammen-arbeit mit Pineda)

rbNK1Rδ	Typ 1 Neurokinin Rezeptor (C-Terminus, Peptid)	Kaninchen	1:500	Diese Arbeit (Zusammen-arbeit mit Pineda)
rbNK1Rγ	Typ 1 Neurokinin Rezeptor (C-Terminus, Fusionsprotein)	Kaninchen	1:100-500	Diese Arbeit (Zusammen-arbeit mit Pineda)
gpNK1Rβ	Typ 1 Neurokinin Rezeptor (C-Terminus, Fusionsprotein)	Meerschweinchen	1:500	Diese Arbeit (Zusammen-arbeit mit Pineda)
gpNK1Rγ	Typ 1 Neurokinin Rezeptor (C-Terminus, Peptid)	Meerschweinchen	1:500	Diese Arbeit (Zusammen-arbeit mit Pineda)
OMP	*Olfactory marker protein*	Ziege	1:1000	Wako 019-22291
PDE2A	Phosphodiesterase 2A	Ziege	1:500	Santa Cruz sc-17227
PLCβ2	β2-Isoform der Phospholipase C	Kaninchen	1:300	Santa Cruz sc-206
SP	Substanz P	Meerschweinchen	1:1000	Abcam ab10353
Syn	Synaptophysin	Maus	1:10	Abcam ab8049
TH	Tyrosinhydroxylase	Maus	1:500-1000	Sigma T2928
TRPM5	Typ 5 Melastatin Rezeptor	Kaninchen	1:1000	Abcam ab74849
TRPV1	Typ 1 Vanilloid Rezeptor	Kaninchen	1:100-200	Santa Cruz sc-28759
TRPV1	Typ 1 Vanilloid Rezeptor	Ziege	1:200	Santa Cruz sc-47527

Tabelle 2.3.: Übersicht über verwendete Zweitantikörper. Ex = Laserlinie mit der angeregt wurde. Em_{max} = Emissionsmaximum des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes. Alle mit Alexa-Farbstoffen markierten Antikörper wurden von Molecular Probes (Darmstadt/BRD) bezogen, alle mit Cy–Farbstoffen markierten Antikörper von Dianova (Hamburg/BRD).

Zweitantikörper	Verdünnung	Ex [nm]	Em_{max} [nm]
Ziege anti Kaninchen A488	1:500	488	519
Esel anti Kaninchen Cy3	1:500	543	565
Esel anti Meerschweinchen Cy2	1:400	488	510
Esel anti Meerschweinchen Cy3	1:800	543	565
Esel anti Meerschweinchen Cy5	1:100	633	670
Ziege anti Ratte A488	1:500	488	519
Esel anti Ratte Cy3	1:500	543	565
Ziege anti Maus A488	1:500	488	519
Esel anti Maus Cy3	1:100	543	565
Esel anti Ziege Cy2	1:400	488	510
Esel anti Huhn Cy2	1:200	488	510

Tabelle 2.4.: Übersicht über verwendete Fluoreszenzfarbstoffe, die nicht zu Zweitantikörpern zählen

Farbstoff	Verdünnung	Ex [nm]	Em_{max} [nm]
ToPro®-3	1:1000	633	661
Streptavidin-A488	1:1000	488	519
Streptavidin-Cy3	1:500	543	565
Streptavidin-A647	1:100	633	670

2.6.4. Herstellung von Antikörpern gegen NK1R

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf zwei verschiedene Arten Antikörper hergestellt:
1. Antikörper gegen ein Peptid aus dem C-Terminus des Substanz P Rezeptors NK1R.
2. Antikörper gegen Fusionsproteine aus einer Sequenz des C-Terminus von NK1R und des Maltose-Bindeproteins (MBP).
Die so gewonnenen Antikörper sind in Tabelle 2.2. (2.6.3.) aufgelistet.
Da die cDNA lediglich von der Maus, nicht von der Ratte verfügbar war und sich die beiden Sequenzen in nur drei Aminosäuren unterscheiden, wurde für die Herstellung der Antikörper die Sequenz des Maus NK1R verwendet.

2.6.4.1. Antipeptid-Antikörper

2.6.4.1.1. Herstellung des Peptids und Immunisierung

Die Herstellung des Antipeptid-Antikörpers wurde bei der Firma PSL (Heidelberg/BRD) in Auftrag gegeben. Hierfür wurde zunächst zusammen mit der Firma eine geeignete Sequenz gewählt. Es wurde ein Peptid hergestellt, das den Aminosäurepostitionen 329-347 des C-Terminus vom NK1R der Maus entspricht (s. Anhang). Mit diesem Peptid, das zuvor von der Firma über Maleimid an *Keyhole*

Limpet Hemocyanin (KLH) gekoppelt wurde, wurden in komplettem Freud'schen Adjuvans zwei Kaninchen und ein Meerschweinchen immunisiert. Danach wurde die Immunisierung mehrmals in inkomplettem Freud'schen Adjuvans aufgefrischt (*Boost*). Tabelle 2.5. gibt den Zeitverlauf des Immunisierungsprojektes wider. Die Serumproben wurden immuncytochemisch auf transfizierten Zellen (2.5.) getestet. Anhand der Ergebnisse wurde entschieden, wann die Entblutung vorgenommen werden sollte. Das gleiche Peptid wurde an die Firma Pineda (Berlin/BRD) geschickt, die damit ebenfalls zwei Kaninchen und ein Meerschweinchen immunisierte. Der Zeitverlauf ist in Tabelle 2.6. zusammengefasst.

Tabelle 2.5.: Zeitverlauf des Immunisierungsprojektes für die Anti-NK1R-Peptid Antikörper von PSL

	Kaninchen	**Meerschweinchen**
Primärimmunisierung	Tag 0	Tag 0
1. *Boost*	Tag 28	Tag 14
2. *Boost*	Tag 42	Tag 28
1. Serumprobe	Tag 52	Tag 38
3. *Boost*	Tag 56	Tag 42
4. *Boost*	Tag 70	Tag 56
2. Serumprobe	Tag 87	Tag 84
Entblutung	Tag 93	Tag 93

Tabelle 2.6.: Zeitverlauf des Immunisierungsprojektes für die Anti-NK1R-Peptid Antikörper von Pineda

	Kaninchen	**Meerschweinchen**
Primärimmunisierung	Tag 0	Tag 0
1. *Boost*	Tag 20	Tag 20
2. *Boost*	Tag 30	Tag 30
3. *Boost*	Tag 40	Tag 40
1. Serumprobe	Tag 61	Tag 61
4. *Boost*	Tag 61	Tag 61
5. *Boost*	Tag 75	Tag 75
2. Serumprobe	Tag 91	Tag 91
6. *Boost*	Tag 91	Tag 91
7. *Boost*	Tag 105	Tag 105
3. Serumprobe	Tag 121	Tag 121
8. *Boost*	Tag 121	Tag 121
9. *Boost*	Tag 135	Tag 135
4. Serumprobe	Tag 151	Tag 151
10. *Boost*	Tag 151	Tag 151
11. *Boost*	Tag 165	Tag 165
5. Serumprobe	Tag 181	Tag 181
12. *Boost*	Tag 181	Tag 181
Entblutung	Tag 190	Tag 190

2.6.4.1.2. Aufreinigung

Die Reinigung erfolgte mittels einer von der Firma PSL mitgelieferten Säule, an deren Matrix das synthetisierte Peptid gekoppelt wurde. Nachdem die Säule fünfmal mit PBS gewaschen wurde, wurde die Matrix in zwei Teile zu je 0,5 ml aufgeteilt, von denen einer in PBS mit 0,05% Natriumazid bei 4°C aufbewahrt wurde und der andere sofort verwendet wurde. Danach wurden bis zu 4 ml des jeweiligen Serums 1:1 (v/v) mit PBS verdünnt und zusammen mit der Säulenmatrix über Nacht bei 4°C rotiert. Am nächsten Tag wurde diese Mischung zweimal über die Säule laufen gelassen. Nach drei Waschschritten mit PBS und zwei mit 10 mM Natriumphosphat pH 6,8 wurden die Antikörper mit zehnmal 0,5 ml 0,1 M Glycinpuffer pH 2,4 eluiert. Jedes Eluat wurde mit 35 µl 2 M K_2HPO_4 pH-neutralisiert und direkt danach auf Eis gekühlt. Der pH-Wert wurde mithilfe von pH-Papier überprüft.
Über eine Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde die Proteinkonzentration in jedem Eluat ermittelt. Hierfür wurde das "Protein Assay"-Farbreagenz von BioRad (München/BRD) verwendet. Die zu vermessende Proteinprobe wurde mit 200 µl Farbreagenz vermischt und mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Danach wurde die OD_{595} bestimmt. Eine Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin erstellt. Im linearen Bereich der Eichkurve entspricht eine OD_{595} von 1 ca. 20 µg/ml Protein.
Die aufgereinigten Seren wurden gegebenenfalls vereinigt, mit 0,05% Natriumazid versetzt und bei -20°C aufbewahrt.
Um die Säule zum Aufreinigen mehrerer Serum-Aliquots verwenden zu können, wurde diese regeneriert. Hierfür wurde die Säule zuerst mit 10 ml 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 und dann mit 10 ml PBS mit 1 M NaCl gewaschen. Zuletzt wurden zweimal 10 ml PBS mit 0,05% Natriumazid über die Säule laufen gelassen. Die Säule wurde bis zum nächsten Gebrauch in PBS mit 0,05% Natriumazid bei 4°C aufbewahrt.

2.6.4.2. Antikörper gegen das Fusionsprotein MBP-NK1R

2.6.4.2.1. Herstellung der Fusionsproteine

Für die Produktion des Anti-MBP-NK1R-Antikörpers wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Fusionsproteine hergestellt:
1. MBP-NK1R (C-Terminus, Aminosäureposition 306-407, s. Anhang) für die Immunisierung.
2. GST-NK1R (C-Terminus)-6xHis zur Aufreinigung.

Hierfür wurde zunächst mittels **PCR** (Polymerasekettenreaktion) die zuvor präparierte cDNA für NK1R aus der Maus (2.4.1. und 2.4.2.) amplifiziert. Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg/BRD) hergestellt. Der Primer für die PCR zur Herstellung des GST-NK1R-6xHis-Proteins enthielt die Sequenz für die His-*Tags*.

<u>Primer (für MBP-NK1R)</u>

Forward #5157: 5‘ GAGGAATTCTGCTGCCTCAATGACAGGTTCCG 3‘
Backward #5158: 5‘ GAGAAGCTTTTAGGCCAGCATGTTAGAGTAGAAGC 3‘

Primer (für GST-NK1R-6xHis)

Forward #5207: 5‘ AAAGGATCCATGTGCTGCCTCAATGACAGGTTCCG 3‘
Backward #5208: 5‘ ATCGAATTCTCAGTGATGGTGATGGTGATGGGCCAGCATGTTAG AGTAGAAGCT 3‘

PCR-Ansatz:
1-30 ng cDNA für NK1R
5,0 µl 10x PCR-Puffer für KOD Hot Start DNA Polymerase (Merck, Darmstadt/BRD)
5,0 µl 2 mM dNTP
1,0 µl 25 mM $MgSO_4$
2,2 µl #5157 [75 ng/µl]/2,4 µl #5207 [75 ng/µl]
2,4 µl #5158 [75 ng/µl]/3,7 µl #5208 [75 ng/µl]
32,9 µl H_2O
1,0 µl KOD Hot Start DNA Polymerase [1 U/µl] (Merck, Darmstadt/BRD)

Reaktionsbedingungen:

Schritt	**Temperatur**	**Zeit**
1. Initiale Denaturierung	94°C	3 min
2. Denaturierung	94°C	20 sec
3. Hybridisierung	52°C	20 sec
4. Elongation	72°C	20 sec

Die Schritte 2-4 wurden 45 Mal wiederholt. Im Anschluss daran wurden die PCR-Produkte durch Phenol/Chloroform-Extraktion (2.4.2.1.) und Ethanol-Präzipitation (2.4.2.2.) gereinigt.

Um den amplifizierten C-Terminus des NK1 Rezeptors in Plasmide zu bringen (Ligation), in kompetenten Zellen zu vervielfältigen (Transformation) und später zu sequenzieren, wurde zunächst ein **Restriktionsverdau** an den PCR Produkten und dem Plasmidvektor pBluescriptSK(-) durchgeführt. Für MBP-NK1R wurden die Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII (Roche Applied Science, Mannheim/BRD) verwendet. Für GST-NK1R-6xHis wurden EcoRI und BamHI (Roche Applied Science, Mannheim/BRD) verwendet.
Zum Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die Ansätze in 1x Inkubationspuffer des jeweiligen Herstellers bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (meist 37 °C) für 1-2 h inkubiert. Inkubationen mit mehreren Enzymen wurden bei übereinstimmenden Pufferbedingungen gleichzeitig durchgeführt. Die Anzahl der Units (U), die ein effizientes Schneiden der DNA ermöglichen, wurde berechnet. Das Volumen eingesetzter Nukleasen lag unter 1/10 des Gesamtvolumens, da das Glycerin im Aufbewahrungspuffer der Enzyme inhibitorische Wirkung haben kann. Das Gesamtvolumen für Restriktionsanalysen betrug 10 µl, das für präparative Ansätze 20-100 µl.

Nach der Restriktion wurden die Fragmente aus einem **präparativen Agarosegel** eluiert. Hierfür wurden sie zunächst über Agarose-Gelelektrophorese (2.4.2.4.) aufgetrennt. Aus dem Gel wurde dann die ca. 300 bp (C-Terminus von NK1R) und die ca. 3000 bp (offener Plasmidvektor) große Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Für die Isolierung der Fragmente aus dem Gel mit der Zentrifugationsmethode (Heery et al., 1990) wurde der Deckel eines Eppendorfreaktionsgefäßes entfernt, der Boden mit einer Kanüle durchstoßen und der untere Teil des Gefäßes mit silanisierter Glaswatte gefüllt. Je eines der ausgeschnittenen Agarosestücke wurde auf die Glaswatte gelegt. Das Reaktionsgefäß wurde in ein zweites Gefäß gesetzt und in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugiert (6.000 g, 5 min, RT). Die Eluate enthielten die jeweiligen Fragmente.

Zur **Ligation** wurden ca. 50 ng geschnittener Vektor und ein 3-5facher molarer Überschuß an DNA-Fragment in 1x Ligasepuffer gemischt. Ligiert wurde mit 0,5 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) (Roche Applied Science, Mannheim/BRD) für 30 - 90 min bei RT. Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl.

Die Transformation (2.4.1.) wurde in *E. coli* XL1 Blue Zellen durchgeführt. Im Anschluss daran wurde eine **LiCl-Minipräparation** an zehn 5 ml Übernachtkulturen durchgeführt. Dazu wurden die Bakterienzellen aus je einer Kultur durch zwei Zentrifugationsschritte (17.000 g, 4°C, 1 min) pelletiert. Dann wurden die Zellen in 150 µl Lösung I resuspendiert, durch Zugabe von 180 µl Lösung II lysiert und Zelltrümmer und Proteine mit 225 µl 3 M Kaliumacetat pH 4,8 präzipitiert. Nach Zentrifugation (17.000 g, 5 min, 4°C) wurde der Überstand mit 1,5 ml Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 120 µl 30 mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Zur Präzipitation der RNA wurden 200 µl 4 M LiCl zugegeben, vorsichtig gemischt und zentrifugiert (17.000 g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde mit 1 ml eiskaltem Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer mit RNase (Ambion, Austin/TX) aufgenommen und 10-20 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit Phenol extrahiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 300 µl eiskaltem Ethanol präzipitiert und zentrifugiert. Nach Waschen mit 70% Ethanol wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 20 µl TE aufgenommen.

Die **Sequenzierung** der zehn Klone wurde bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg/BRD) in Auftrag gegeben. Hierfür wurde DNA von den Minipräparationen mit H_2O auf eine Konzentration von 50 ng/µl verdünnt.

Um die NK1R Sequenz in die geeigneten Vektoren für die Expression der Fusionsproteine zu bringen, folgte eine **Umklonierung**. Im ersten Schritt wurden die Vektoren pMalc2 (NEB, Schwalbach/BRD) und pGEX-2T (GE Healthcare, München/BRD) sowie die DNA der Klone, die die korrekte Sequenz des NK1R C-Terminus enthielten, mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII bzw. EcoRI und BamHI geschnitten (s. o.). Danach wurden, wie oben beschrieben, aus einem präparativen Agarosegel die offenen Plasmidvektoren sowie der C-Terminus von NK1R eluiert und im Anschluss daran ligiert.

Nach der Transformation (2.4.1.) wurde eine **Plasmid-Minipräparation** durch alkalische Lyse nach Birnboim & Doly (1979) durchgeführt. Für die Präparation wurden die Bakterien aus ca. 1,5 ml einer Übernachtkultur durch Zentrifugation (14.000 g, 1 min, RT) pelletiert und in 50 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 60 µl Lösung II und vorsichtigem Mischen lysieren die Zellen, wobei die chromosomale DNA an die Zellwand gebunden bleibt. Zur Präzipitation der Zelltrümmer und Proteine wurden 75 µl 3 M Kaliumacetat pH 4,8 zugegeben, durch

Invertieren gemischt und 7 min zentrifugiert (17.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 550 µl Ethanol präzipitiert und abzentrifugiert. Das Nukleinsäurepellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen (17.000 g, 5 min, 4 °C) und dann in 20 µl TE-Puffer mit RNase aufgenommen.

Anschließend wurden die Klone ausgewählt, die beim Kontrollverdau mit den entsprechenden Enzymen (s. o.) ein positives Ergebnis lieferten. Mit diesen Klonen wurde eine **Maxipräparation** (2.4.1.) durchgeführt, um ausreichend DNA zu gewinnen.

Nach einer erneuten Sequenzierung wurde eine Transformation (2.4.1.) in *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3) plysE Zellen (Stratagene, La Jolla/CA) durchgeführt. Danach wurden je Plasmid 500 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und Chloramphenicol (18 µg/ml) mit 500 µl einer Übernachtkultur versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,4. Die **Expression** der GST- bzw. MBP-Fusionsproteine wurde dann durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kulturen wurden bei 20°C weiter inkubiert. Nach 18 h Inkubation wurden die Zellen pelletiert (5.000 g, 5 min, RT) und bis zur Reinigung der Fusionsproteine (s. u.) bei –20°C gelagert.

Das **MBP-NK1R**-Fusionsprotein wurde über **Amylose-Säulenchromatographie** in Anlehnung an Kellermann und Ferenci (1982) gereinigt. Vor der Reinigung wurde das Zellpellet in einem zwanzigstel Volumen TE-Puffer resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung (5x12 sec, 4°C) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (17.000 g, 10 min, 4°C) wurden die löslichen Zellbestandteile (Überstand) von den unlöslichen Zellbestandteilen (Pellet) getrennt. Zur Reinigung der löslichen Fusionsproteine wurde der Überstand weiterverarbeitet.
Als Affinitätsmaterial wurde Amylose-Agarose (NEB, Schwalbach/BRD) verwendet. Nachdem die Säule (BioRad, München/BRD) mit Säulenpuffer equilibriert wurde, wurde der Überstand aufgetragen. Nachdem mit zehn Säulenvolumen Säulenpuffer gewaschen wurde, wurde das gebundene Protein mit 20 mM Maltose in Säulenpuffer eluiert. Die Konzentration des Fusionsproteins wurde mithilfe einer Proteinbestimmung nach Bradford (2.6.4.1.2) ermittelt. Das Eluat wurde in PBS umgepuffert, um es zur Immunisierung (2.6.4.2.2.) zu verwenden.

Die Reinigung des **GST-NK1R-6xHis**-Fusionsproteins erfolgte über **Ni-NTA Säulenchromatographie**. Da das GST-Fusionsprotein nicht wie das MBP-Fusionsprotein in die lösliche Fraktion überführt werden konnte, wurde die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurde das Zellpellet in NPI-10-Puffer gelöst. Dann wurde 1 mg/ml Lysozym hinzugegeben, die Suspension wurde für 30 min auf Eis gerührt und im Anschluss sonifiziert (5x12 sec, 4°C). Nach einem Zentrifugationsschritt (10.000 g, 30 min, 4°C) wurde das Pellet in 10 ml/g NPI-10-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (10.000 g, 30 min, 4°C). Um das Protein in Lösung zu bringen, wurden 2 ml/g DNPI-10-Puffer zugegeben und für 1 h auf Eis gerührt. Die restlichen unlöslichen Anteile wurden abzentrifugiert (10.000 g, 30 min, RT). Das Fusionsprotein befand sich dann im Überstand.
Als Affinitätsmaterial wurde in diesem Fall Protino® Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel, Düren/BRD) verwendet. Nachdem die Säule (BioRad, München/BRD) mit

DNPI-10-Puffer equilibriert wurde, wurde der Überstand aufgetragen, die Säule geschlossen und 60 min bei RT rotiert. Nach dieser Zeit wurde die Säule wieder geöffnet, der ungebundene Anteil abgelassen und zweimal mit zehn Säulenvolumen DNPI-20-Puffer gewaschen. Das über die His-*Tags* gebundene Fusionsprotein wurde mit DNPI-250-Puffer eluiert. Die Konzentration des Fusionsproteins wurde mithilfe einer Proteinbestimmung nach Bradford (2.6.4.1.2) ermittelt. Das Eluat wurde in PBS mit 8 M CH_4N_2O (Harnstoff) umgepuffert und für die Aufreinigung der Antikörper (2.6.4.2.3.) verwendet.

2.6.4.2.2. Immunisierung

Die Immunisierung mit dem Fusionsprotein verlief nach dem gleichen Prinzip wie die beiden Immunisierungen mit den Peptiden (2.6.4.1.). Unterschiede bestanden nur im zeitlichen Ablauf (Tab. 2.7.). Für die Immunisierung wurde das zuvor hergestellte MBP-NK1R-Fusionsprotein (2.6.4.2.1.) verwendet.

Tabelle 2.7.: Zeitverlauf des Immunisierungsprojektes für die Antikörper gegen das MBP-NK1R-Fusionsprotein.

	Kaninchen	**Meerschweinchen**
Primärimmunisierung	Tag 0	Tag 0
1. *Boost*	Tag 20	Tag 20
2. *Boost*	Tag 30	Tag 30
3. *Boost*	Tag 40	Tag 40
1. Serumprobe	Tag 61	Tag 61
4. *Boost*	Tag 61	Tag 61
5. *Boost*	Tag 75	Tag 75
2. Serumprobe	Tag 91	Tag 91
6. *Boost*	Tag 91	Tag 91
Entblutung	Tag 119	Tag 119

2.6.4.2.3. Aufreinigung

Die Aufreinigung der spezifischen Antikörper erfolgte affinitätschromatographisch über Säulen, an die das Antigen, gegen das die Antikörper hergestellt wurden, kovalent gebunden war.
Da zur Immunisierung MBP-Fusionsproteine (2.6.4.2.1.) verwendet wurden, wurden zur Kopplung an die Säule GST-Fusionsproteine (2.6.4.2.1.) mit gleichem Fusionsanteil benutzt. Die Kopplung der GST-Fusionsproteine erfolgte an CNBr-aktivierter Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg/BRD). 0,6 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde in 50 ml eiskalter 1 mM HCl aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 3 min bei 1000 g bei 4°C. Danach wurde mit 120 ml 1 mM HCl gewaschen und nochmals wie beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurde das GST-Fusionsprotein in 5 ml Kopplungspuffer zur Sepharose gegeben. Die Kopplung erfolgte ü.N. bei 4°C *end-over-end*. Danach wurde das Säulenmaterial abzentrifugiert (1000 g, 3 min, 4°C), der Überstand zur Bestimmung der Kopplungseffizienz aufbewahrt und die Sepharose nochmals mit Kopplungspuffer gewaschen. Noch vorhandene reaktive Gruppen wurden durch Inkubation mit 100 mM Tris/HCl pH 8,0 für 1 h bei RT blockiert. Danach wurde das

Säulenmaterial in eine Fertigsäule von BioRad (München/BRD) überführt. Nicht kovalent gekoppeltes Protein wurde durch viermaliges, alternierendes Waschen entfernt (je drei Säulenvolumen Waschpuffer 1 und 2). Im letzten Schritt wurde das Säulenmaterial mit Equilibrierungspuffer eingestellt und in Aufbewahrungspuffer bei 4°C aufbewahrt.
Vor Inkubation des mit Antigen gekoppelten Säulenmaterials mit dem Serum der immunisierten Tiere wurde die Säule vorbereitet. Zu diesem Zweck wurde die Säule mit je zehn Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM Glycin pH 2,5, 10 mM Tris/HCl pH 8,8 und nochmals 10 mM Tris/HCl pH 7,5 gewaschen. Anschließend wurde das Serum 1:5 mit 10 mM Tris/HCl pH 7,5 verdünnt und zum Säulenmaterial gegeben. Die Inkubation erfolgte *end-over-end* bei 4°C ü.N. Anschließend wurden durch zwei Waschschritte (je 20 Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl pH 7,5 und 10 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 0,5 M NaCl) nicht gebundene Antikörper und andere Serumproteine entfernt. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte mit zehn Säulenvolumen 100 mM Glycin pH 2,5 in Eppendorf-Reaktionsgefäße, in denen jeweils 0,1 Säulenvolumen 1 M Tris/HCl, pH 8,0 vorgelegt wurde. Über eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (2.6.4.1.2) wurde ermittelt, in welchen Eluaten sich potentiell Antikörper befanden. Entsprechende Eluate wurden vereinigt, mit 0,05% Natriumazid versetzt und bei -20°C gelagert. Die Regeneration der Säule erfolgte mit 20 Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl pH 7,5 und die Lagerung bei 4°C in 100 mM Tris/HCl pH 8,0 mit 0,5 M NaCl und 0,05% Natriumazid.

2.6.5. Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Die Analyse der immunhisto- sowie immuncytochemischen Färbungen (2.6.3. bzw. 2.5.) erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop. Der Vorteil im Vergleich zur herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie besteht darin, dass nur Licht aus der jeweiligen Fokusebene detektiert wird. Dadurch wird nicht nur ein schärferes Gesamtbild erzeugt, sondern es besteht auch die Möglichkeit des „optischen Schneidens“. Des Weiteren bietet die Verfügbarkeit von verschiedenen Lasern und frei einstellbaren Detektoren die Möglichkeit, Signale verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe zu detektieren und besser voneinander zu trennen als dies mit breitbandigem Licht erreicht werden kann.
In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Systemen gearbeitet (2.2.). Für die automatische Steuerung des Mikroskoptisches und der Laser sowie für die Erstellung der digitalen Aufnahmen wurden die Programme Leica TCS NT (System TSC SP) und Leica Application Suite Advanced Fluorescence (System TCS SP5 II) verwendet. Die Bilder wurden mit 1024x1024 Pixel aufgenommen. Um eine bessere Auflösung zu erlangen, wurde jede Aufnahme viermal erstellt und über die Einzelaufnahmen gemittelt. Die Verstärkung und der Signal-Offset (Untergrenze ab der alle Helligkeitswerte des gemessenen Signals „schwarz“ zugeordnet werden, also den Helligkeitswert Null erhalten) wurde für jeden Kanal so eingestellt, dass innerhalb der 8-bit Dynamik der Bilder keine Strukturinformationen verloren gingen. In vielen Fällen wurden z-Stapel von Bildern aus mehreren Ebenen des Präparates erstellt. Hier wurden die Einstellungen so gewählt, dass der Abstand der optischen Schnitte weniger als 1 µm betrug. Bei Mehrfachfärbungen wurden die Aufnahmen der einzelnen Kanäle im seriellen Modus erstellt. Die Filtereigenschaften wurden so gewählt, dass es nicht zu einem Übersprechen der verschiedenen Kanäle kommen konnte. Folgende Einstellungen wurden für die Bandpassfilter vorgenommen (vgl. 2.6.3. verwendete Zweitantikörper Tab. 2.3. und andere

Fluoreszenzfarbstoffe Tab. 2.4.): 500–530 nm (Cy2, A488), 580–650 nm (Cy3) und 680–750 nm (Cy5, A647, ToPro®-3).

2.6.6. Bildbearbeitung und Auswertung

2.6.6.1. Bildbearbeitung

Für die Bildbearbeitung wurde neben den in den Setups für die Konfokalmikroskope enthaltenen Programmen (2.6.5.) die Programme ImageJ und Adobe® Photoshop® CS3 verwendet.
In Fällen in denen ein z-Stapel aufgenommen wurde, wurde mittels einer *brightest point projection* ein Einzelbild erstellt, das ein maximal helles Gesamtbild darstellt, indem an jeder Position der jeweils hellste Punkt aus den übereinander liegenden Ebenen gewählt wurde. Weiterhin wurden in Adobe® Photoshop® Helligkeit und Kontrast der einzelnen Kanäle optimiert sowie Überlagerungen der Kanäle bei Mehrfachfärbungen und somit ein RGB-Bild erstellt.
Soweit nicht anders angegeben wurden die Abbildungen in dieser Arbeit wie beschrieben bearbeitet. Eine Ausnahme stellen Bilder für die Bestimmung der trigeminal innervierten Glomeruli und die 3D-Rekonstruktionen dar. Die Bearbeitung in diesen Fällen wird in den jeweiligen Kapiteln (2.6.6.2. bzw. 2.6.6.3.) ausgeführt.

2.6.6.2. Bestimmung der trigeminal innervierten Glomeruli

Die durch den Trigeminus innervierten Glomeruli im OB wurden anhand von immunhistochemischen Färbungen (2.6.3.) bestimmt. Hierfür wurden 40 µm dicke Coronalschnitte (2.6.2.) der OB von Ratten verschiedenen Alters (2-19 Wochen) mit Antikörpern gegen CGRP und TH sowie dem Fluoreszenzfarbstoff ToPro®-3 gefärbt. Für die Auswertung am Konfokalmikroskop (2.6.5.) wurde aus Zeitgründen nur jeder zweite Objektträger verwendet (drei Schnitte pro Objektträger).
Zunächst wurden mit dem 5x Objektiv Übersichtsaufnahmen von der ToPro®-3 Färbung erstellt, um die Gesamtzahl der Glomeruli auf dem jeweiligen Schnitt zu bestimmen. Da ToPro®-3 alle Zellkerne anfärbt, war es möglich die einzelnen Glomeruli gut voneinander abzugrenzen. Weil der Bildausschnitt des 5x Objektivs nicht ausreicht, um eine komplette Übersicht von einem Schnitt zu erhalten, wurden Teilbilder im Programm Adobe® Bridge® kombiniert mit Adobe® Photoshop® CS3 (Funktion „Automerge“) oder, falls dies nicht möglich war, manuell zusammengesetzt. Weiterhin wurden die Farbfotos in 8-bit-Graustufen Bilder konvertiert.
Im nächsten Schritt wurden mit dem 63x Objektiv die trigeminal innervierten Glomeruli bestimmt und manuell in die Übersichtsbilder eingetragen. Dies war nötig, da die feinen Fasern mit dem 5x Objektiv nicht zu sehen sind. Die Bestimmung erfolgte mittels der CGRP Färbung, bei der alle Fasern des Trigeminus in der Nase und dem Bulbus markiert werden, und der TH Färbung, bei der alle Glomeruli sichtbar werden.
In der zweiten Phase des Projektes stand ein neueres konfokales System (2.2. TCS SP5 II) zur Verfügung. Mit diesem System konnten die gefärbten Fasern mit dem 20x Objektiv detektiert werden. Zudem verfügt dieses System über die Funktion „Tile Scan“, über welche der Scankopf automatisch über alle Positionen innerhalb zuvor manuell gesetzter Grenzen geführt wird. Am Ende des Scanvorganges werden die

Teilbilder automatisch zusammengefügt. So war es möglich hochaufgelöste Übersichten über die kompletten Bulbusschnitte zu erstellen. In diesen wurden anschließend die trigeminal innervierten Glomeruli markiert.
Um festzustellen, ob die Innervation des Bulbus durch den Trigeminus lokal begrenzt ist und ob eine regionale Verteilung der innervierten Glomeruli in verschiedenen Individuen gleich ist, wurden die Übersichtsaufnahmen in vier Sektoren (dorsolateral, dorsomedian, ventrolateral, ventromedian) unterteilt. Dann wurde sowohl die Gesamtzahl der Glomeruli als auch die Anzahl der trigeminal innervierten Glomeruli in jedem Sektor separat bestimmt und der Prozentsatz der innervierten Glomeruli errechnet.
So war es möglich jeweils die dorsalen/ventralen bzw. lateralen/medianen Teile getrennt voneinander auszuwerten. Um anterioren und posterioren Teil miteinander zu vergleichen, wurden jeweils die Glomeruli der vorderen bzw. hinteren Hälfte der Schnitte zusammengezählt.

2.6.6.3. 3D-Rekonstruktionen

Um die Verteilung der trigeminal innervierten Glomeruli besser zu veranschaulichen, wurde neben der quantitativen Auswertung ein kompletter Bulbus in 3D rekonstruiert. Hierfür wurde eine Serie der Übersichtsbilder (vgl. 2.6.6.2.) verwendet. Bevor diese Bilder für die Rekonstruktion in das Programm Amira® 5.4.2 eingeladen werden konnten, mussten sie im Programm Adobe® Photoshop® CS3 wie folgt weiter bearbeitet werden:

- Die Bilder wurden so zugeschnitten, dass die für die Rekonstruktion relevanten Strukturen gerade noch zu sehen waren.
- Der Kontrast wurde mit der Funktion „Autokontrast“ verstärkt.
- Die Bilder wurden mit einem Filter unscharf maskiert (Stärke: 50 %, Radius: 1 Pixel).
- Die Größe der Arbeitsfläche wurde so gewählt, dass das Bild mit den größten Abmessungen noch ganz hineinpasste und noch ein Rand für die Rotation beim Alignieren in Amira® 5.4.2 übrig blieb.

Beim Einladen der Bilder in Amira® 5.4.2 musste die Voxelgröße angegeben werden. Diese betrug für x/y = 1,953 µm (Pixelgröße des 5x Objektivs bei einer Auflösung von 1024x1024 Pixeln) und z = 80 µm (da nur jeder zweite Objektträger bei einer Schnittdicke von 40 µm verwendet wurde).
Zu Beginn wurden die aufeinanderfolgenden Bilder teilweise durch automatisches Rotieren und Verschieben, teilweise manuell zur Deckung gebracht (= Alignment) und zu einem Stapel zusammengefügt. Dieser Stapel wurde verwendet, um auf einzelnen Schnitten den Umriss des Bulbus, des akzessorischen Bulbus (AOB) und der zuvor bestimmten trigeminal innervierten Glomeruli (2.6.6.2.) in verschiedenen Farben zu markieren (= Labeling). Je nachdem wie stark sich eine Struktur beim Übergang zu den nächsten Schnitten veränderte, wurde über eine unterschiedliche Anzahl von Schnitten interpoliert. Um eine gefälligere Oberfläche zu erzeugen und große Datenmengen zu vermeiden, wurde mit verschiedenen Funktionen des Programms („Smooth labels“, „Remove islands“, „Fill holes“, „Resample“) geglättet. Danach wurden mit der Funktion „Surface Gen“ die Oberflächen aus vielen zusammengesetzten Dreiecken generiert. Diese wurden so weit verschmolzen bis ihre Anzahl in etwa 500.000 oder weniger erreicht hatte. Im letzten Schritt wurden

die Oberflächen mit 20 Iterationen geglättet. Nun bestand die Möglichkeit die Oberflächen alleine oder zusammen darzustellen, zu drehen oder die Darstellung zu verändern (z.B. transparent).

2.7. Calcium-Fluorimetrie

Mithilfe von Ca^{2+}-Fluorimetrie wurden Dosis-Wirkungskurven für den murinen und humanen NK1R erstellt.
Bei der Fluorimetrie wird die Intensität des emittierten Lichtes, hier die des Ca^{2+}-Indikators Fluo-4, gemessen. Ein Anstieg in der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration, wie er als Antwort auf Substanz P (SP) in Zellen zu erwarten ist (1.2.3., vgl. 2.8.), führt zu Erhöhung der Fluoreszenzintensität von Fluo-4 und kann somit indirekt über die Messung der Fluoreszenz über die Zeit nachgewiesen werden.
Es wurden NK1R-exprimierende (2.4.3.) sowie nicht-transfizierte HEK293-Zellen für die Negativkontrolle in 96er Multiwellplatten bis zu einer Dichte von ca. 4×10^4 Zellen pro Well vermehrt und bei RT mit 50 µl Beladelösung inkubiert. Nach 60 min wurde die Beladelösung durch 90 µl ES ersetzt. Dann wurden die Multiwellplatten in das Fluorimeter überführt und die Fluoreszenz wurde nacheinander in jedem Well gemessen. Die Anregung erfolgte bei 485 nm mit zehn Blitzen pro Well, die Emission wurde bei 520 nm gemessen. Nach der Aufzeichnung der basalen Fluoreszenz (fünf Messzyklen) wurden verschiedene Konzentrationen SP in ES (vier Wells pro Konzentration) sowie reine ES als zweite Negativkontrolle (acht Wells) manuell mit einer Mehrkanalpipette zugegeben. Es wurden 12 verschiedene Konzentrationen SP zwischen 0,003 und 300 nM eingesetzt.
Die Dosis-Wirkungskurven wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5.04 erstellt. Damit wurde auch der EC_{50} Wert, bei dem die Hälfte der Sättigung der Antwort auf SP erreicht wird, bestimmt.

2.8. Calcium-Imaging

2.8.1. Imaging von HEK293-Zellen

Da der SP Rezeptor NK1 üblicherweise an den IP3-Weg gekoppelt ist (1.2.3.), sollte die Aktivierung des Rezeptors zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration führen. Um das nachzuweisen und um die Eigenschaften dieser Antwort in einem relativ einfachen System zu studieren, wurden Ca^{2+}-Imaging Experimente an mit NK1R transfizierten HEK293-Zellen, die mit dem Ca^{2+}-Indikator Fluo-4 beladen wurden, durchgeführt. Des Weiteren stellt das Imaging eine Möglichkeit dar festzustellen, ob die exprimierten NK1 Rezeptoren in HEK293-Zellen funktionell sind.
Die Imaging Experimente wurden an mit murinem NK1R transfizierten (2.4.3.) und an nicht-transfizierten HEK293-Zellen mithilfe eines Fluoreszenz-Imaging Setups (2.2.) durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür auf Glasplättchen ausgesät. Nachdem

das Nährmedium kurz mit ES ausgewaschen wurde, wurden die Zellen für 30 min bei RT in Beladelösung inkubiert und danach wieder in ES überführt. Dann wurden die Plättchen in einer selbstangefertigten Imaging-Kammer unter das Mikroskop gebracht und kontinuierlich über eine schwerkraftgetriebene Perfusion mit ES überspült. Die Flussrate betrug 3-4 ml/min. Das Perfusionssystem war mit magnetgetriebenen Ventilen (LEE Hydraulische Miniaturkomponenten, Sulzbach/BRD) ausgestattet, so dass das Öffnen der Kanäle und somit der Lösungsfluss elektrisch gesteuert werden konnte.
Für die Aktivierung des NK1 Rezeptors wurden verschiedene Konzentrationen von SP (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM; verdünnt in ES) appliziert. Pro Versuchsreihe wurde nur eine Konzentration SP verwendet. Diese wurde dreimal hintereinander appliziert. Vor und nach jeder Applikation wurde mit ES gespült. Weiterhin wurde der PLC-Inhibitor U-73122 (5 µM) verwendet. Dieser wurde vor der zweiten Applikation von 1 µM SP eingespült. Für die zweite Applikation von SP wurde eine Mischung aus 1 µM SP und 5 µM U-73122 (in ES) verwendet.
Der Ca^{2+}-Indikator Fluo-4 wurde bei 470±40 nm angeregt und die emittierte Fluoreszenz bei 525±50 nm detektiert. Es wurde mit einer CCD-Kamera alle zwei Sekunden ein Bild mit 502x502 Pixeln aufgenommen.
Die Auswertung der Zeitreihen erfolgte mit dem Programm ImageJ in Kombination mit Microsoft Office Excel 2007. Zuerst wurden in ImageJ *regions of interest* (ROI) um alle Zellen gezeichnet. Danach wurden die Helligkeitswerte in den ROIs zu allen Zeitpunkten bestimmt. Diese Werte wurden in Excel eingeladen. Der Hintergrund wurde mithilfe des Durchschnittswertes der ersten fünf ROIs an Stellen ohne Zellen ermittelt und abgezogen. Danach wurde die Änderung der Fluoreszenz nach folgender Formel berechnet:

$$\Delta F = \frac{F - F0}{F0}$$

Wobei *F* der gemessene Helligkeitswert ist und *F0* die Basisfluoreszenz, die anhand des Mittelwertes der ersten zehn Werte zu Zeitpunkten, an denen mit ES gespült wurde, bestimmt wurde.

2.8.2. *In situ* Imaging von Schnitten des olfaktorischen Epithels

Für das Ca^{2+}-Imaging an Schnitten des OE wurden ausschließlich Mäuse im Alter von P0 bis P4 verwendet, da bei späteren Stadien die Verknöcherung zunimmt und die Nasenhöhlen nicht mehr gut mit dem Vibratom geschnitten werden können.
Als erstes wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Alle weiteren Präparationsschritte wurden in einer Petrischale auf einem Kühlakku durchgeführt. Zunächst wurde der Unterkiefer mit einer Schere abgetrennt. Im nächsten Schritt wurden Haut, Augen und weiches Gewebe (z.B. Kiefermuskulatur) mit einer Pinzette entfernt. Danach wurde der Gaumen abgezogen und Zähne sowie harte Teile des Oberkiefers wurden entfernt. Zuletzt wurden die Nase und der vordere Teil des Kopfes unmittelbar hinter dem OB abgetrennt. Bevor die Nase in der ca. 40 °C warmen Agarose eingebettet wurde, wurde sie in eiskalter S1 Lösung gespült.
Nachdem die Agarose ausgehärtet war, wurde um die Nase herum eine Pyramide getrimmt, welche mit Sekundenkleber auf dem Halter des Vibratoms so festgeklebt wurde, dass die Nase aufrecht stand und Coronalschnitte gemacht werden konnten. Die Kammer des Vibratoms wurde mit eiskalter S2 Lösung befüllt, mit Eis gekühlt

und begast (95% O_2/5% CO_2). Folgende Einstellungen wurden vorgenommen: Schnittdicke: 150-250 µm; Geschwindigkeit: 3,5; Frequenz: 7. Danach wurden die Schnitte bis zu ihrer späteren Verwendung in einer Kammer mit begaster (95% O_2/5% CO_2) S2 Lösung aufbewahrt.
Für das Ca^{2+}-Imaging wurden die Schnitte 30 min bei RT mit 4 µM Fluo-4 beladen und danach kurz mit S1 Lösung gewaschen. Im Anschluss daran wurden sie in einer selbstangefertigten Imaging-Kammer (Fassungsvolumen ca. 300 µl) mit einem Grid (u-förmig gebogener Draht, der mit Nylonfäden bespannt ist) fixiert, unter das Mikroskop gebracht und mit S1 Lösung überspült. Die Perfusion erfolgte mit dem gleichen System, das auch für die Imaging Experimente von HEK293-Zellen verwendet wurde (2.8.1.).
Die Testsubstanzen wurden in S1 Lösung verdünnt. Appliziert wurden nacheinander 1 µM SP und/oder 1 µM CGRP sowie in jedem Versuch „Henkel 97“ (1:10.000 v/v). Vor und nach jeder Applikation wurde mit S1 Lösung gespült. In manchen Versuchen wurde nur SP oder CGRP verwendet. Für die serielle Applikation beider Substanzen wurden sowohl Experimente durchgeführt in welchen zuerst SP gefolgt von CGRP appliziert wurde, als auch Experimente mit umgekehrter Reihenfolge. Nach dem gleichen Schema wie in den transfizierten HEK293-Zellen (2.8.1.) wurden Versuche mit dem PLC-Inhibitor U-73122 (5 µM) durchgeführt. Des Weiteren wurde getestet, ob die Zellen im OE auf SP antworten, wenn nur sehr wenig Ca^{2+} im extrazellulären Raum vorhanden ist. Hierfür wurde vor der Applikation von SP (1 µM in Niedrig-Ca^{2+} Lösung) anstatt mit regulärer S1 Lösung mit Niedrig-Ca^{2+} Lösung gespült. In allen Versuchen wurde am Ende Hoch-K^+ Lösung appliziert, um zu bestimmen, welche Zellen noch intakt waren.
Der Ca^{2+}-Indikator Fluo-4 wurde mit einer LED bei 470±40 nm angeregt und das Signal wurde bei 525±50 nm detektiert. Alle zwei Sekunden wurde ein Bild mit einer CCD-Kamera mit 502x502 Pixeln aufgenommen.
Die Auswertung erfolgte analog zum Imaging von HEK293-Zellen (2.8.1.). Es wurden nur Zellen ausgewertet, die auf Hoch-K^+ Lösung reagiert hatten.

2.8.3. Imaging von dissoziierten Zellen des olfaktorischen Epithels

Um die Zelltypen zu identifizierten, die bei den Imaging Experimenten im OE (2.8.2.) eine Antwort zeigten, wurden zusätzlich Experimente an dissoziierten Zellen durchgeführt. Hierfür wurde Epithel vom Septum und von den Conchen adulter Ratten in eiskalter S1 Lösung abpräpariert, in ca. 1 mm^2 große Stücke zerteilt und für 15 min bei 37°C mit Papain (10U/ml in Niedrig-Ca^{2+} Lösung) verdaut. Danach wurde die Lösung durch S1 Lösung ersetzt und vorsichtig mit einer feuerpolierten Glaspipette 2-3 Mal trituriert. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension auf mit Concanavalin A beschichtete, mit Gravuren unterteilte und nummerierte Glasplättchen (Electron Microscopy Sciences, Hatfield/PA) gegeben und für 15 min bei RT ruhen gelassen, damit sich die Zellen absetzen konnten. Die Zellen wurden mit 2 µM Fluo-4 für 30 min bei RT beladen und dann in S1 Lösung überführt. Die Imaging Experimente und Auswertung erfolgten wie bei Schnitten des OE (2.8.2.).
Um die Zelltypen nach dem Experiment zu identifizieren, wurde die Position auf dem Glasplättchen notiert und es wurden Antikörperfärbungen (2.5.) gegen IP3R3, OMP und NK1R (rbNK1R)(2.6.3. Tab. 2.2.) durchgeführt. Anschließend wurden die gefärbten Zellen am Konfokalmikroskop (2.6.5.) lokalisiert und es wurden Aufnahmen von der Färbung erstellt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Anatomie der trigeminalen Innervation des olfaktorischen und respiratorischen Systems

Ein Ziel dieser Arbeit war es die Anatomie der trigeminalen Innervation des olfaktorischen Systems inklusive seiner Subsysteme im Detail zu beschreiben. Hierfür wurden immunhistochemische Methoden (2.6.) angewandt.
In der Literatur finden sich bereits Hinweise auf die trigeminale Innervation des respiratorischen Epithels (RE) (Finger et al., 1990; Anton und Peppel, 1991; Finger et al., 2003; Lin et al., 2007b), des olfaktorischen Epithels (OE) (Finger et al., 1990; Finger und Böttger, 1993; Schäfer et al., 2002; Daiber et al., 2012) sowie des *Bulbus olfactorius* (OB) (Finger und Böttger, 1993; Schäfer et al., 2002). Im Vomeronasalorgan (VNO) wurden trigeminale Fasern im zuführenden Gang und im nicht-sensorischen Epithel beschrieben (Matsuda et al., 1996; Ogura et al., 2010). Die trigeminale Innervation des Grüneberg Ganglions (GG) sowie des Septalorgans (SO) wurde bisher noch nicht untersucht. Ob das GG und das SO trigeminal innerviert werden, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals untersucht.

3.1.1. Trigeminale Innervation der olfaktorischen Subsysteme und des respiratorischen Epithels

Der *Nervus trigeminus* setzt sich aus peptidergen und nicht-peptidergen Fasern zusammen. Die peptidergen Fasern sezernieren auf einen Reiz hin Substanz P (SP) und *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) (Stjärne et al., 1989; Kuhn et al., 1997; Vause et al., 2007) (1.2.2.). Antikörperfärbungen zeigen eine Colokalisation beider Peptide in trigeminalen Fasern im OE und im OB der Ratte. Dieselben Fasern können auch mit einem Antikörper gegen den Vanilloid Rezeptor TRPV1, einem weiteren Marker für nozizeptive Fasern (1.2.2.), angefärbt werden (Abb. 3.1.). Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Fasern gefunden, die nur mit dem Antikörper gegen TRPV1 und nicht mit den Antikörpern gegen SP und CGRP gefärbt wurden. Die gleiche Situation findet man auch in der Maus vor (nicht gezeigt). Sowohl SP und CGRP als auch TRPV1 konnten zudem in Zellkörpern und Fasern im Trigeminalganglion nachgewiesen werden (nicht gezeigt).
Abbildung 3.1. zeigt exemplarisch jeweils eine Dreifachfärbung auf Schnitten durch das OE und den OB der Ratte. SP, CGRP und TRPV1 sind in den hier abgebildeten trigeminalen Fasern im OE und der Submucosa sowie in der äußeren plexiformen Schicht des OB colokalisiert. In der Nase ist weiterhin nur mit dem CGRP Antikörper eine Färbung auf Höhe der Basalmembran, die das OE von der darunter liegenden *Lamina propria* trennt, zu erkennen. Hierbei handelt es sich vermutlich um eine unspezifische Färbung.
Die Ergebnisse bestätigen andere Studien, in denen gezeigt wurde, dass trigeminale Fasern, die die Nasenhöhle bzw. den OB innervieren, SP und CGRP coexprimieren (Stjärne et al., 1989; Finger et al., 1990; Silver et al., 1991; Finger und Böttger, 1993).

Die Färbung derselben Fasern mit einem Antikörper gegen TRPV1 steht im Einklang mit Beobachtungen, dass peptiderge Fasern in der Nasenhöhle Capsaicin-sensitiv sind (Stjärne et al., 1989; Silver et al., 1991; Kuhn et al., 1997; Gulbransen et al., 2008b). Die Färbungen mit weiteren Antikörpern, die als Marker für trigeminale Fasern dienen können (KCNK3, KCNK9, KCNK18, TRPM8, P2X3; vgl. 1.2.2.), fielen in der vorliegenden Arbeit für trigeminale Fasern im OE negativ aus (nicht gezeigt). Im Rahmen einer Kooperation (Daiber, 2011, Dissertation) wurden Proben eines transgenen Mausstammes, der unter dem Opioid Rezeptor δ-Promotor ein mit GFP markiertes funktionales Rezeptorprotein exprimiert, welches exklusiv in nicht-peptidergen Neuronen exprimiert wird, untersucht. Es wurden keine Strukturen im OE oder OB gefunden, die die Morphologie von Nervenfasern aufwiesen. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass OE und OB vermutlich nur von peptidergen, nozizeptiven Fasern des *Nervus trigeminus* innerviert werden. Dies wurde bereits von Finger et al. (1990) aufgrund von elektronenmikroskopischen Untersuchungen postuliert.

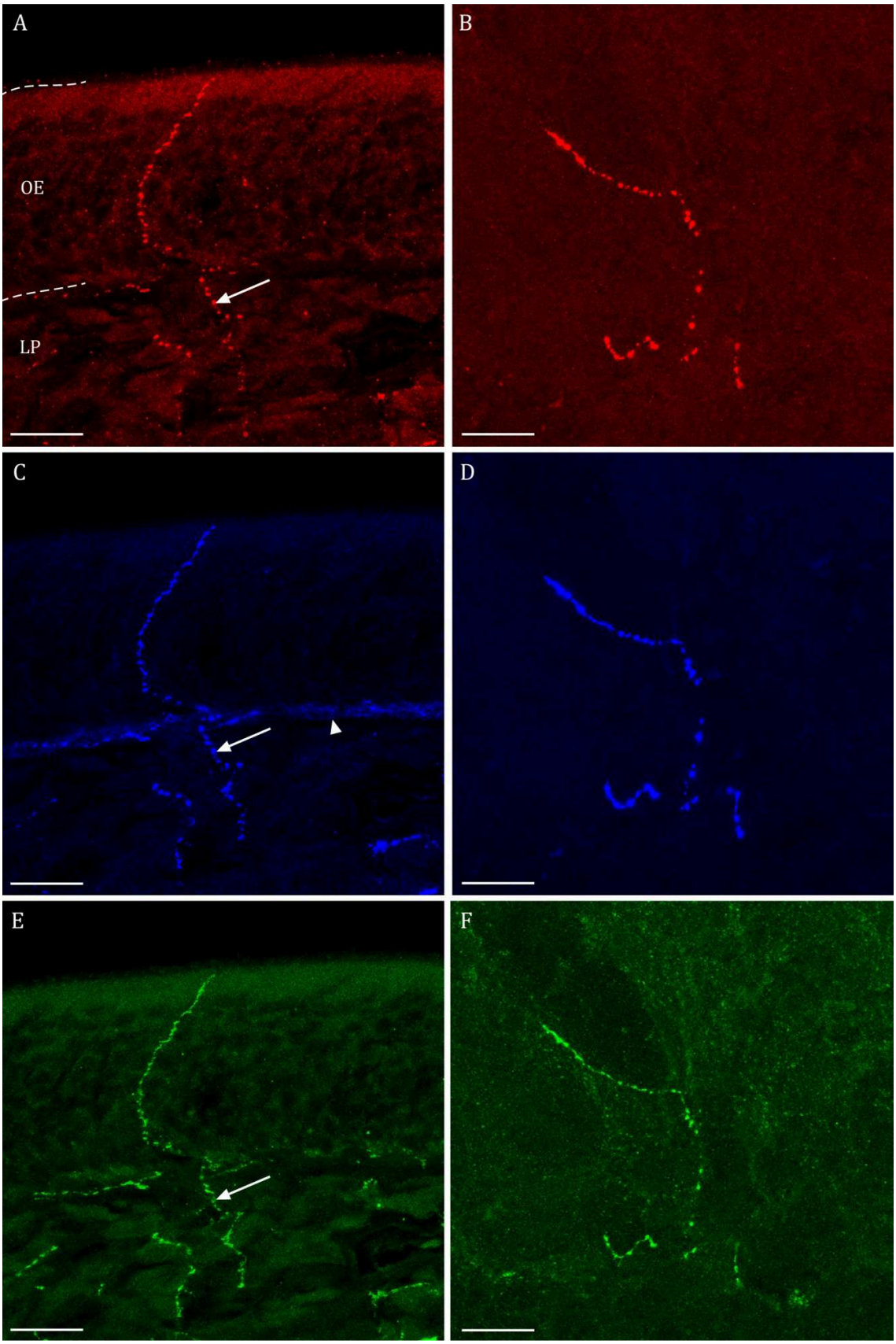

Abbildung 3.1.: Colokalisation von SP (rot), CGRP (blau) und TRPV1 (grün) in trigeminalen Fasern des OE (A/C/E) und OB (äußere plexiforme Schicht) (B/D/F) der Ratte. Die gestrichelten Linien in A markieren die Begrenzungen des OE und der darunter liegenden *Lamina propria* (LP). Die Pfeilspitze in C deutet auf eine vermutlich unspezifische Färbung mit dem CGRP Antikörper auf Höhe der Basalmembran. Die Pfeile in A, C und E markieren eine Faser in der Submucosa, in der SP, CGRP und TRPV1 colokalisiert sind. Größenbalken A-F: 20 µm.

Die Schleimhaut der Nase setzt sich aus OE und RE zusammen. Die Epithelien lassen sich sehr gut mithilfe einer Antikörperfärbung gegen das *olfactory marker protein* (OMP) voneinander unterscheiden. Die Funktion dieses Proteins ist noch nicht sicher geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass es in allen reifen olfaktorischen Neuronen exprimiert wird (Margolis und Tarnoff, 1972). Somit wird bei einer Antikörperfärbung gegen OMP das OE, aber nicht das RE gefärbt.
Antikörperfärbungen gegen OMP und SP zeigen, dass trigeminale Fasern parallel unterhalb des RE und des OE verlaufen und sich hier stark verzweigen. Einige dieser Verzweigungen reichen in die Epithelien hinein und durchziehen sie senkrecht (Abb. 3.2.). Die Fasern enden dicht an der Oberfläche der Epithelien. Ob sie jedoch auch die *tight junction*-Barriere durchdringen kann mithilfe der in dieser Arbeit zum Einsatz kommenden Lichtmikroskopie nicht sicher geklärt werden. Auf Basis elektronenmikroskopischer Untersuchungen der trigeminalen Fasern in der Nasenhöhle wird das angezweifelt (Finger et al., 1990).

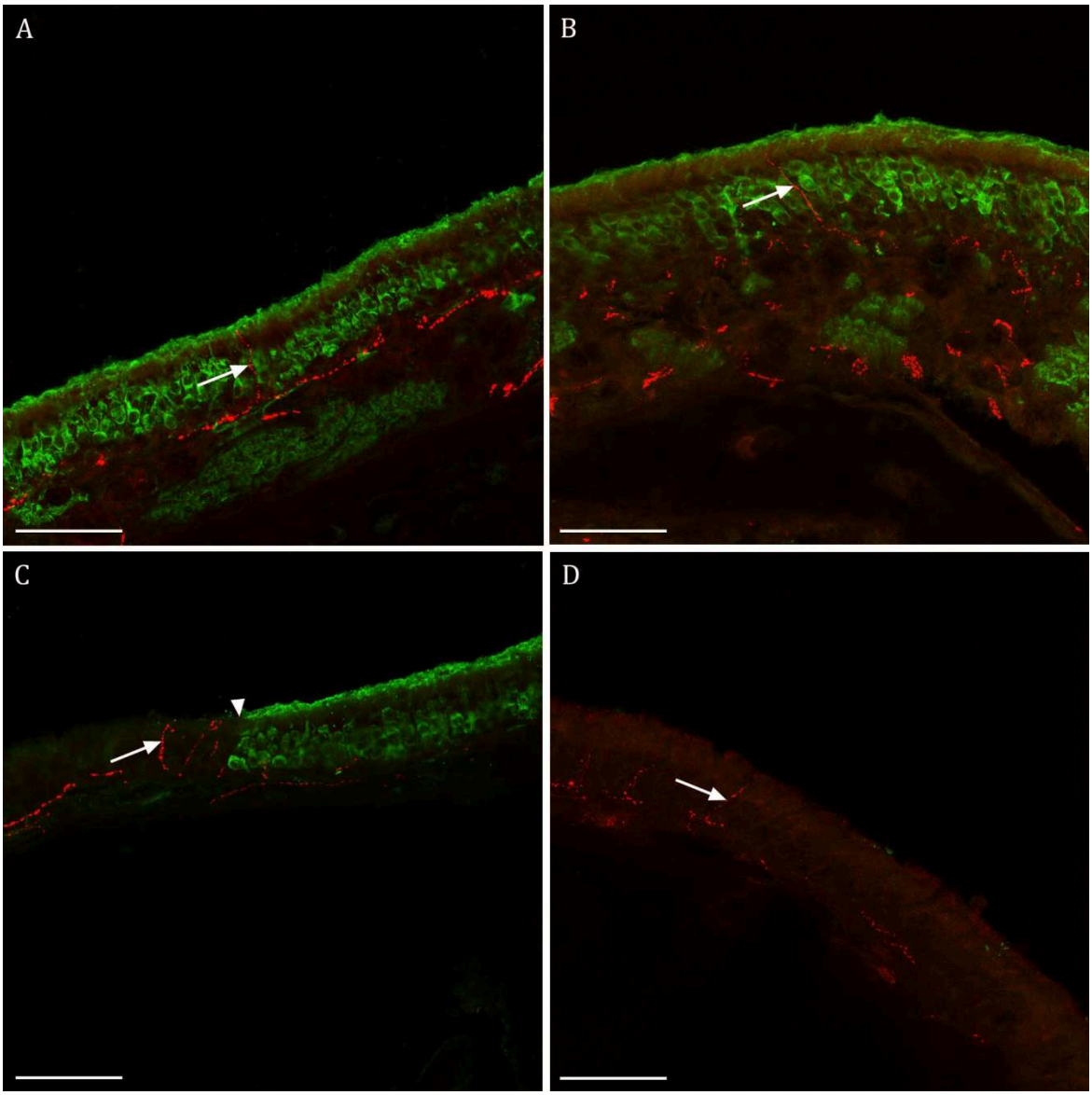

Abbildung 3.2.: Trigeminale Fasern im OE und RE der Maus (A+C) und der Ratte (B+D). Die trigeminalen Fasern sind mit einem Antikörper gegen SP gefärbt (rot), die olfaktorischen Neurone mit einem Antikörper gegen OMP (grün). Die Pfeile deuten auf trigeminale Fasern, die das OE (A+B) sowie das RE (C+D) senkrecht durchlaufen. Die Pfeilspitze in C markiert die Grenze zwischen RE und OE. Größenbalken A-D: 50 µm.

Neben dem OE befinden sich in der Nase weitere chemosensorische Systeme (1.1.1.). Die sensorischen Zellen dieser Organe lassen sich ebenfalls mit einem Antikörper gegen OMP markieren.
Sehr weit vorne an der Nasenspitze befindet sich dorsal das paarig angelegte GG. Hierbei handelt es sich um ein Organ, dessen chemosensorische Zellen morphologisch stark von den olfaktorischen Neuronen abweichen und das durch ein keratinisiertes Epithel zur Nasenhöhle hin begrenzt wird. Die Antikörperfärbungen gegen SP zeigen deutlich Fasern, die von dorsal in das GG ziehen, dort entlang der lateral-medianen Achse verlaufen und teilweise in enger Assoziation mit sensorischen Zellen stehen (Abb. 3.3. A+B).
Weiter hinter dem GG findet man paarig am ventralen Ende des Septums gelegen das VNO. Das VNO wird von einer röhrenförmigen Knorpelkapsel umgeben und besteht aus einem sensorischen und einem nicht-sensorischen Teil. Der Antikörper gegen SP färbt Fasern, die unter dem nicht-sensorischen Epithel verlaufen und Abzweigungen, die in das Epithel hineinziehen. Auch dicht unter dem sensorischen Epithel verlaufen Fasern. Diese scheinen jedoch nicht in das Epithel hinein zu reichen (Abb. 3.3. C+D).
Dicht hinter dem VNO befindet sich das SO, eine kleine „Insel“ OMP-positiven Epithels paarig am Septum, die von allen Seiten durch RE begrenzt wird. Ähnlich wie im Fall des RE, des OE und des VNO finden sich hier SP-positive Fasern unterhalb des Epithels. In der Maus wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Fasern gefunden, die in das Epithel ziehen. In der Ratte finden sich jedoch vereinzelte Fasern, die wie im OE senkrecht durch das Epithel des SO verlaufen (Abb. 3.4.).

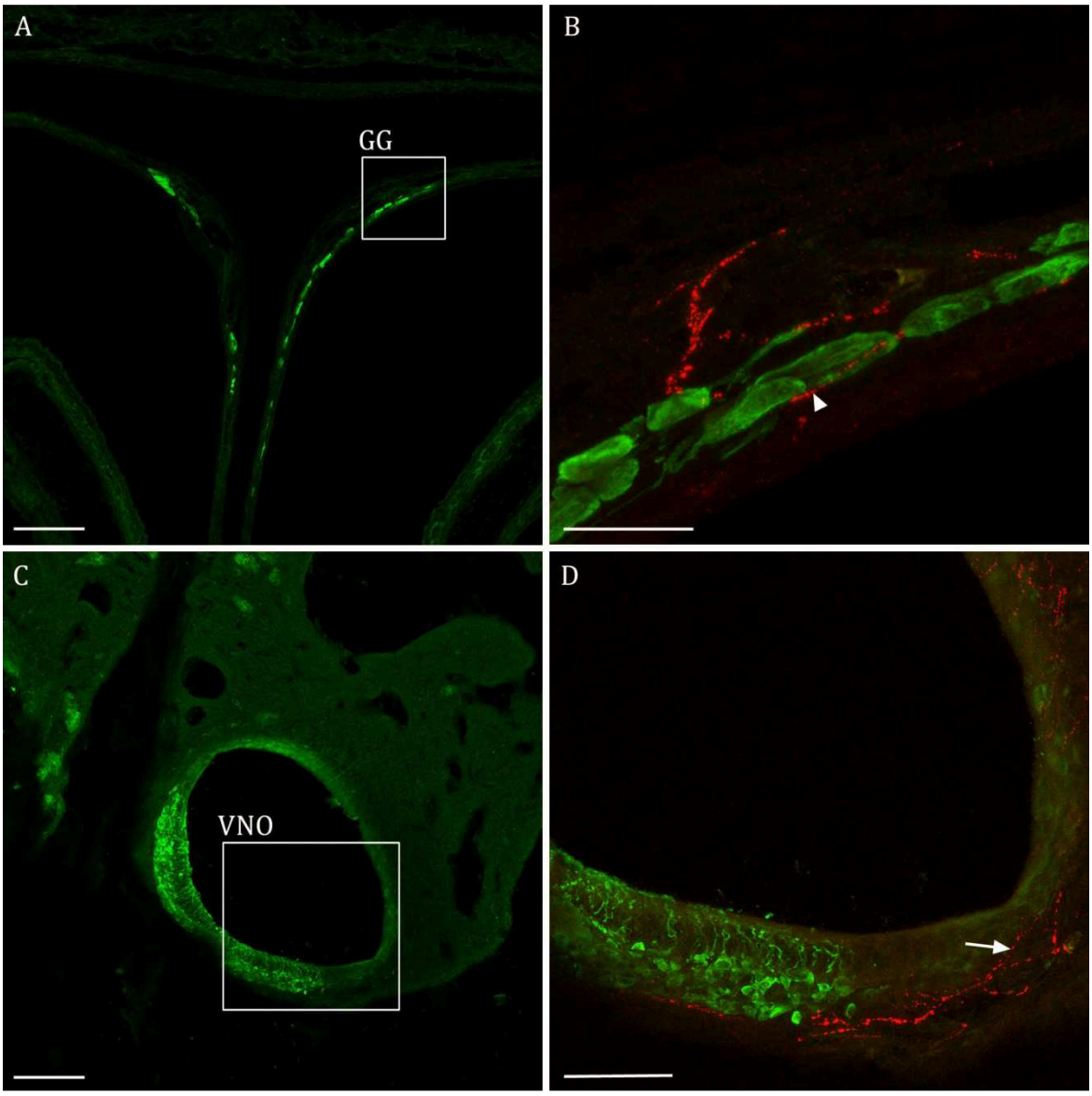

Abbildung 3.3.: Trigeminale Fasern im GG und VNO der Maus. Die trigeminalen Fasern sind mit einem Antikörper gegen SP gefärbt (rot), die sensorischen Zellen in beiden Organen mit einem Antikörper gegen OMP (grün). Trigeminale Fasern ziehen von dorsal in das Grüneberg Ganglion (A+B). Die Pfeilspitze in B markiert eine trigeminale Faser, die sich in nächster Nähe zu den sensorischen Zellen befindet. Unterhalb des Epithels im VNO (C+D) befinden sich ebenfalls trigeminale Fasern, die jedoch nur im nicht sensorischen Teil in Richtung Oberfläche ziehen (Pfeil in D). Größenbalken A+C: 100 µm, B: 20 µm, D: 50 µm.

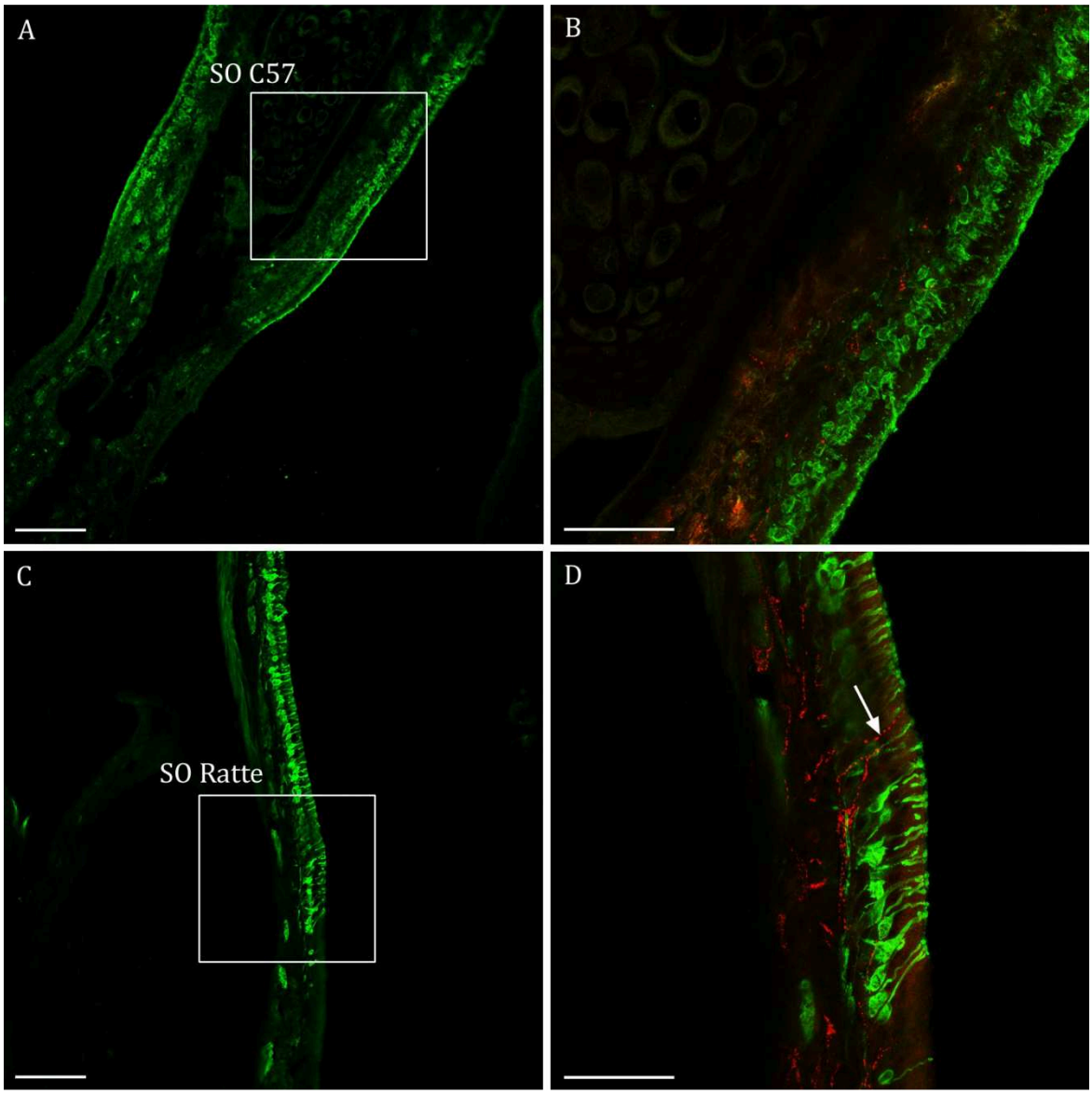

Abbildung 3.4.: Trigeminale Fasern im SO der Maus und der Ratte. Die trigeminalen Fasern sind mit einem Antikörper gegen SP gefärbt (rot), die olfaktorischen Neurone mit einem Antikörper gegen OMP (grün). In der Maus (A+B) finden sich trigeminale Fasern nur unterhalb des Epithels. In der Ratte (C+D) kann man Fasern erkennen, die das Epithel senkrecht durchziehen (Pfeil in D). Größenbalken A/C: 100 µm, B/D: 50 µm.

3.1.2. Anatomie der trigeminalen Innervation im olfaktorischen Epithel

Wie beschrieben wird das OE von senkrecht verlaufenden Abzweigungen des *Nervus trigeminus* durchzogen (3.1.1.). Erste Hinweise auf die potentiellen Zielzellen ergeben sich durch eingehendere morphologische Untersuchungen. Wie in der Einleitung erwähnt (1.1.3.) findet man im OE neben den klassischen olfaktorischen Neuronen auch Zellen, die sich im Hinblick auf ihre molekulare Ausstattung und/oder Morphologie von erstgenannten unterscheiden. Daher kamen neben dem Antikörper gegen OMP, welcher reife olfaktorische Neurone färbt, auch Antikörper, die als Marker für irreguläre Zellen im OE dienen, zum Einsatz (1.1.3.).
Mehrfachfärbungen mit diesen Antikörpern und einem Antikörper gegen SP, welcher trigeminale Fasern färbt, zeigen, dass es in manchen Fällen eine starke Assoziation

zwischen bestimmten Zelltypen und SP-positiven trigeminalen Fasern gibt (Abb. 3.5. B-D). In solchen Fällen schmiegen sich die Fasern an die Zellen und folgen in ihrem Verlauf deutlich der Form der Zelle. Eine derartige Assoziation kann für Zellen, die mit Antikörpern gegen den Ionenkanal TRPM5 (Abb. 3.5. B), gegen IP3R3 (Abb. 3.5. C+ blau in D) oder gegen PDE2A (Abb. 3.5. grün in D) gefärbt wurden, gezeigt werden. Bei den TRPM5-positiven Zellen handelt es sich um microvilliäre Zellen, die den sogenannten *solitary chemosensory cells* im RE ähneln (1.1.3. Abb. 1.4. C, Tab. 1.1.). Die IP3R3-positiven Zellen stellen einen weiteren Typ von microvilliären Zellen im OE dar (1.1.3. Abb. 1.4. D, Tab. 1.1.). Mit dem Antikörper gegen PDE2A konnten in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Zelltypen gefärbt werden (1.1.3. Tab. 1.1.). Zum einen werden mit diesem Antikörper in Einklang mit anderen Arbeiten (Julifs et al., 1997; Meyer et al., 2000) ciliäre Zellen gefärbt, die GC-D-positiv sind, zum anderen werden microvilliäre TRPM5-positive Zellen, die *solitary chemosensory cells* im RE ähneln (s.o.), gefärbt. Aufgrund der Morphologie der PDE2A-positiven Zellen, die mit trigeminalen Fasern assoziiert sind (Abb. 3.5. grün in D), kann davon ausgegangen werden, dass es sich in diesen Fällen um microvilliäre TRPM5-positive Zellen handelt.

Weiterhin kann es vorkommen, dass sich eine Faser aufspaltet und die zwei Faserenden mit unterschiedlichen Zellen assoziiert sind. In Färbungen bei denen Antikörper gegen SP und IP3R3 verwendet wurden, wurde immer eine IP3R3-positive Zelle an mindestens einem Faserende gefunden (Abb. 3.5. D). Seltener wurden IP3R3-positive Zellen an beiden Verzweigungen gefunden (nicht gezeigt).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine Assoziation zwischen trigeminalen Fasern und Zellen, die mit einem Antikörper gegen GC-D gefärbt werden, festgestellt (Abb. 3.5. A). Weiterhin gab es keine Hinweise auf eine deutlich ersichtliche Assoziation zwischen Fasern und regulären olfaktorischen Neuronen (nicht gezeigt). In Doppelfärbungen mit SP und jeweils einem der verwendeten Zellmarker für irreguläre Zellen (Antikörper gegen TRPM5, IP3R3 oder PDE2A) findet man neben trigeminalen Fasern, die mit gefärbten Zellen assoziiert sind (s.o.), stets auch solche, die keine Assoziation zu gefärbten Zellen aufweisen. Aus diesem Grund wurden Mehrfachfärbungen durchgeführt, in welchen alle genannten Zellmarker zusammen sowie Antikörper gegen trigeminale Fasern verwendet wurden. Auch in diesen Fällen gibt es weiterhin einige Fasern, die nicht mit den markierten Zelltypen in Verbindung gebracht werden können (nicht gezeigt). Möglicherweise handelt es sich hierbei um „freie“ trigeminale Fasern, die mit keinen Zellen assoziiert sind. Weiterhin besteht aber auch die Möglichkeit, dass diese Fasern mit bisher unidentifizierten Zellen im OE assoziiert sind.

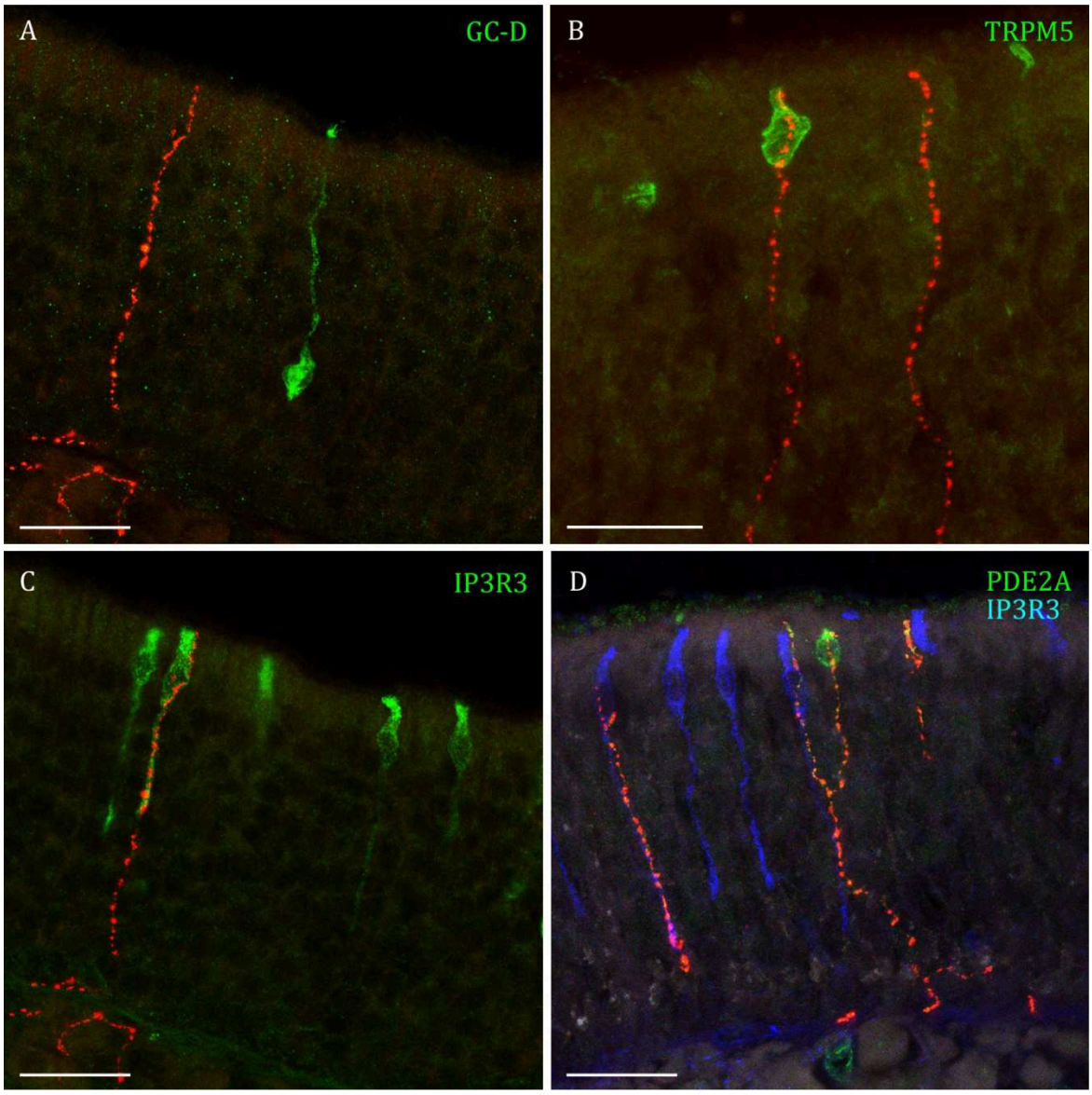

Abbildung 3.5.: Trigeminale Fasern und verschiedene Zelltypen im OE der Ratte. Die mit einem Antikörper gegen SP gefärbten trigeminalen Fasern (rot) befinden sich teilweise in unmittelbarer Nähe zu TRPM5- (grün B), IP3R3- (grün C, blau D) und PDE2A-positiven Zellen (grün D). Keine Assoziation konnte mit GC-D-positiven Zellen festgestellt werden (grün A). Manche Fasern „kontaktieren" keine Zellen (A+B). Andere spalten sich auf und „kontaktieren" zwei unterschiedliche Zellen (D). Größenbalken A-D: 20 µm.

Auf ihrem Weg durch das OE könnte es auch passieren, dass die trigeminalen Fasern „zwangsweise" dem Verlauf einer Zelle folgen und die beobachtete Assoziation keine funktionelle Bedeutung hat. Deshalb wurden Mehrfachfärbungen mit einem Antikörper gegen Synaptophysin durchgeführt. Synaptophysin ist ein vesikuläres Glycoprotein, das in allen Synapsen und neuroendokrinen Zellen vorkommt. Abbildung 3.6. zeigt Synaptophysin-positive Strukturen dicht an den trigeminalen Fasern an Stellen, wo die Fasern die Zellen „kontaktieren" oder nahe an sie heranreichen. Hier ist die Färbung exemplarisch für zwei Zellen gezeigt, die mit Antikörpern gegen TRPM5 bzw. mit IB4 (färbt IP3R3-positive Zellen; 1.1.3.) gefärbt wurden. Eine ähnliche Situation findet man im Falle der mit Antikörpern gegen PDE2A gefärbten Zellen (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Assoziation zwischen den hier untersuchten Zelltypen und den trigeminalen Fasern nicht zufällig ist, sondern eine funktionelle Signifikanz haben könnte.

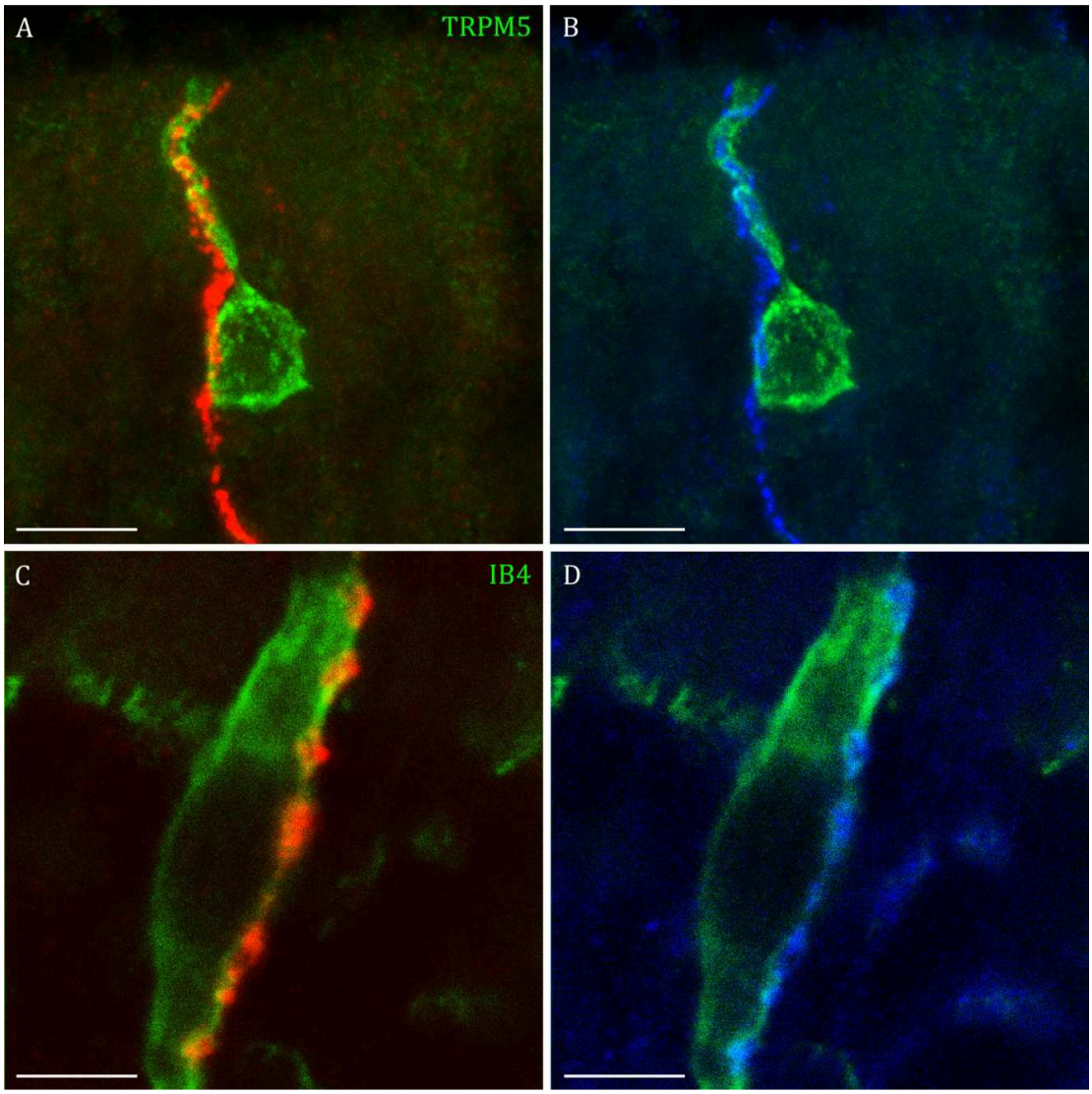

Abbildung 3.6.: Dreifachfärbungen mit Antikörpern gegen Zellmarker (grün), SP (rot) und Synaptophysin (blau) im OE der Ratte. Dargestellt ist die Assoziation von SP-positiven trigeminalen Fasern mit einer TRPM5-positiven (A) und einer IB4-positiven Zelle (C). In beiden Fällen sind Synaptophysin-positive Strukturen an den Kontaktstellen zu erkennen (B+D). Größenbalken A-D: 5 µm.

3.1.3. Anatomie der trigeminalen Innervation im *Bulbus olfactorius*

Wie das OE so wird auch der OB stark durch den Trigeminalnerv innerviert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum einen geklärt werden, ob sich in allen Schichten des Bulbus trigeminale Fasern finden lassen, zum anderen sollte festgestellt werden, ob der Bulbus an allen Stellen gleich stark innerviert wird oder ob es eine Tendenz zu einer lokal begrenzten Innervation gibt.
Die Ergebnisse der Immunhistochemie mit Antikörpern gegen CGRP zeigen, dass es trigeminale Fasern in allen Schichten des Bulbus gibt. In Abbildung 3.7. sind exemplarisch Fasern in der Granulärzellschicht (GCL) und in der Schicht im OB, in der der *Nervus olfactorius* verläuft (ONL), gezeigt (3.7. B-D). In letzterer befinden sich besonders viele Fasern, die parallel zu den Axonen der olfaktorischen Neurone in Richtung Glomeruli ziehen und dort verzweigen. Teilweise kann man erkennen, dass sich eine Faser aufspaltet und benachbarte Glomeruli innerviert (3.7. E+F).

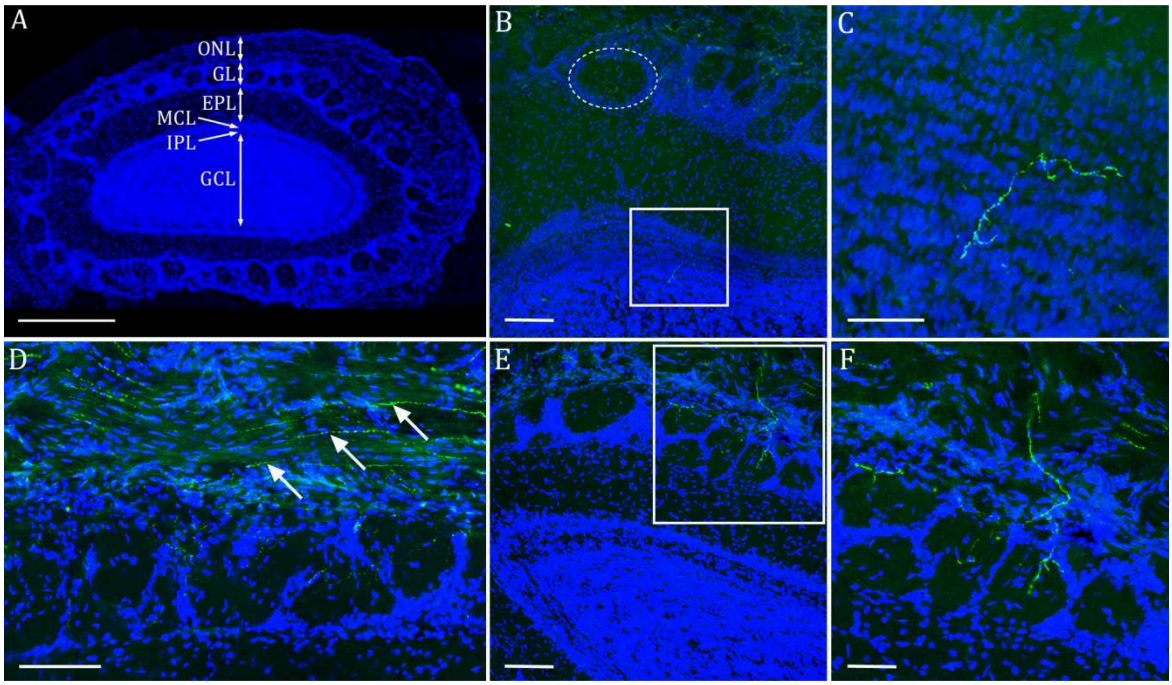

Abbildung 3.7.: Verteilung von trigeminalen Fasern im OB der Ratte. Dargestellt ist eine Übersicht über die Schichten des Bulbus (A) sowie trigeminale Fasern in der Granulärzellschicht (B+C), in der Schicht des olfaktorischen Nervs (D) und Fasern, die in die Glomeruli ziehen und sich dort verzweigen (E+F). In B ist exemplarisch ein Glomerulus durch die gestrichelte Linie markiert. C: Ausschnitt aus B. F: Ausschnitt aus E. Die trigeminalen Fasern sind mit einem Antikörper gegen CGRP gefärbt (grün). Die Kerne sind mit ToPro®-3 gefärbt (blau). ONL = Schicht des *Nervus olfactorius*, GL = glomeruläre Schicht, EPL = äußere plexiforme Schicht, MCL = Mitralzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Granulärzellschicht. Größenbalken A: 500 µm, B/D/E: 100 µm, C+F: 50 µm.

Obwohl in allen Schichten des Bulbus trigeminale Fasern vorkommen, scheint in den Glomeruli die Innervation am stärksten zu sein. In einigen Glomeruli bilden die trigeminalen Fasern ein stark verzweigtes Geflecht, in anderen findet man weniger Fasern und in manchen überhaupt keine. Das Beispiel in Abbildung 3.8. zeigt eine Übersicht über einen Teil der glomerulären Schicht. Die Vergrößerungen geben einen Hinweis darauf, dass eher ventral gelegene Glomeruli stärker innerviert sind als weiter dorsal gelegene. Dieser Eindruck wird durch die 3D-Rekonstruktion eines OB (2.6.6.3.) verstärkt. Obwohl die innervierten Glomeruli über den ganzen Bulbus verteilt sind, gibt es eine Konzentrierung im ventralen Teil, die in der rechten Bulbushälfte deutlicher ausgeprägt ist als in der linken (Abb. 3.9., Video 3D Rekonstruktion.mpg auf beigelegter CD bzw. angehängte Datei). Aufgrund des immensen Zeitaufwandes konnte im Rahmen dieser Arbeit nur ein OB rekonstruiert werden. Daher ist unklar, ob der Unterschied zwischen den beiden Bulbushälften von Bedeutung ist. Im akzessorischen Bulbus (AOB) wurden im Rahmen dieser Arbeit keine trigeminalen Fasern gefunden (nicht gezeigt).

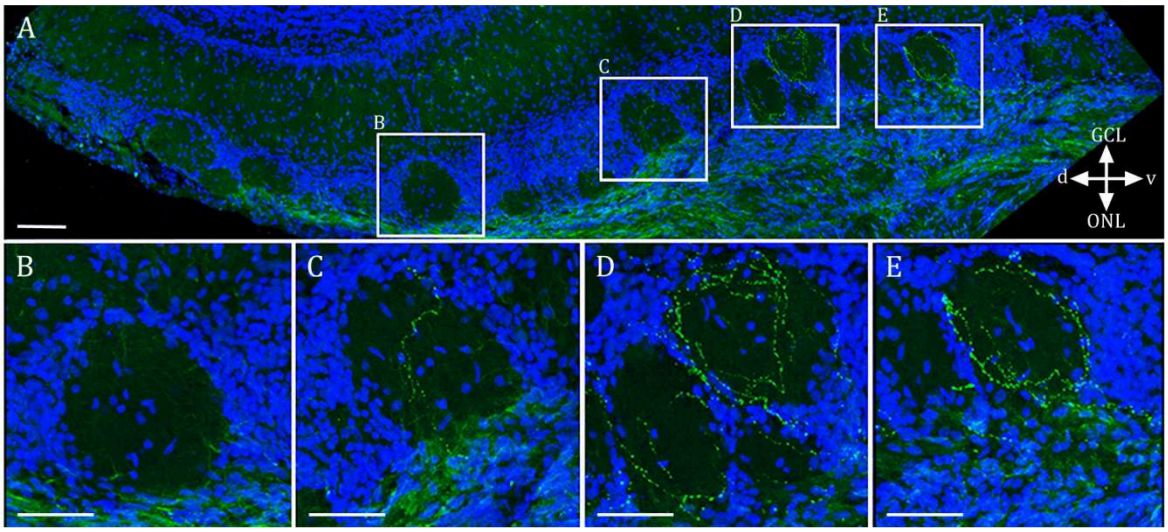

Abbildung 3.8.: Dorsoventraler Gradient der trigeminalen Innervation der Glomeruli im OB der Ratte. Der am weitesten dorsal gelegene Glomerulus (B) wird nicht vom Trigeminus kontaktiert. Die Stärke der Innervation nimmt von dorsal nach ventral (B►E) zu. Die trigeminalen Fasern sind mit einem Antikörper gegen CGRP gefärbt (grün). Die Kerne sind mit ToPro®-3 gefärbt (blau). d = dorsal, v = ventral, GCL = Granulärzellschicht, ONL = Schicht des *Nervus olfactorius*. Größenbalken A: 100 µm, B-E: 50 µm.

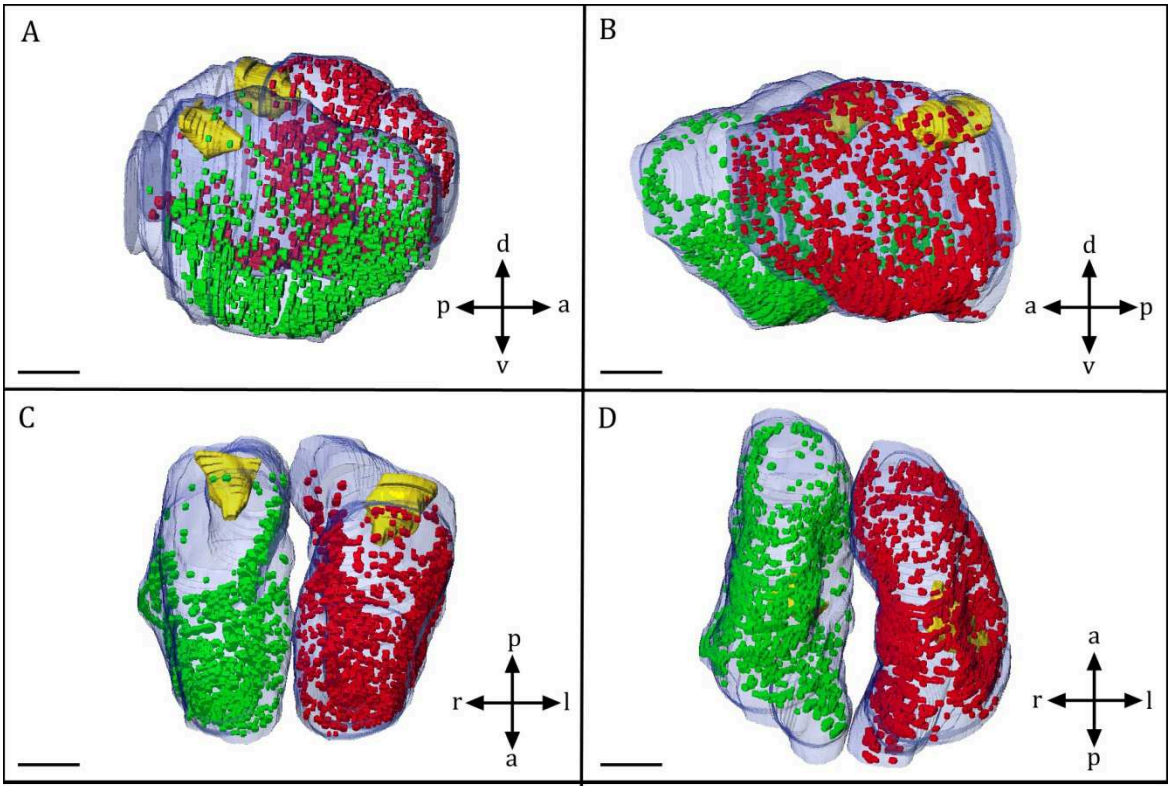

Abbildung 3.9.: 3D-Rekonstruktion des OB einer Ratte. Der komplette Bulbus ist in transparentem blau dargestellt. In grün (rechte Bulbushälfte) und in rot (linke Bulbushälfte) sind die trigeminal innervierten Glomeruli markiert. Diese konzentrieren sich deutlich im ventralen Teil. A: Seitenansicht rechts. B: Seitenansicht links. C: Ansicht von oben (dorsal). D: Ansicht von unten (ventral). Gelb: Akzessorischer Bulbus. a = anterior, p = posterior, d = dorsal, v = ventral, r = rechts, l = links. Größenbalken A-D: 1 mm. (s.a. Video 3D Rekonstruktion.mpg auf beigelegter CD bzw. angehängte Datei)

Um quantitative Ergebnisse zu der lokalen Verteilung der innervierten Glomeruli zu bekommen und festzustellen, ob sich die Innervation mit dem Alter der Tiere ändert, wurden die trigeminal innervierten Glomeruli in mehreren Ratten bestimmt (2.6.6.2.) und in Relation zur Gesamtzahl der Glomeruli gesetzt. Das Diagramm in Abbildung 3.10. zeigt, dass der Anteil der trigeminal innervierten Glomeruli zunächst mit dem Alter zunimmt. Ab der 8. Woche scheint die Innervation trotz einer gewissen Variabilität stabil zu bleiben. Unabhängig vom Alter ist der Anteil der innervierten Glomeruli ventral größer als dorsal (Abb. 3.11.). Weiterhin wurden posteriore und anteriore bzw. laterale und mediane Glomeruli separat ausgewertet. Hier konnten keine eindeutigen Präferenzen der Innervation gefunden werden. Vielmehr scheint es sich um eine zufällige Variabilität zwischen unterschiedlichen Individuen zu handeln (nicht gezeigt).

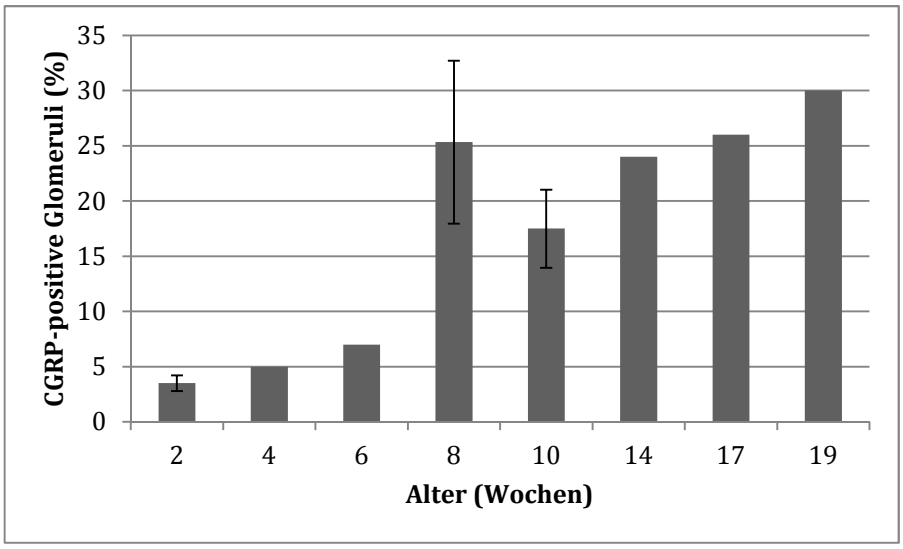

Abbildung 3.10.: Verhältnis der trigeminal innervierten Glomeruli zur Gesamtzahl der Glomeruli in Ratten verschiedenen Alters. n (2, 10 Wochen) = 2, n (8 Wochen = 3), n (4 ,6, 14, 17, 19 Wochen) = 1.

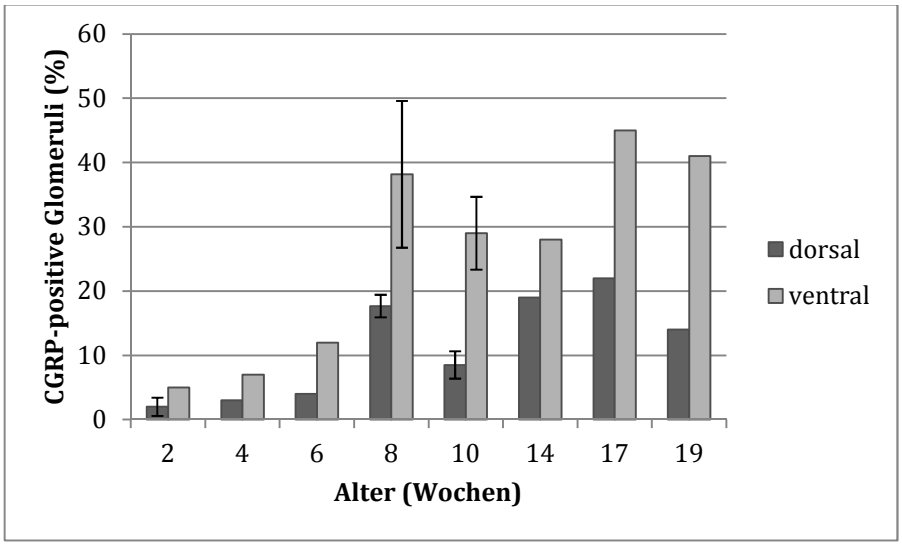

Abbildung 3.11.: Verhältnis der trigeminal innervierten Glomeruli zur Gesamtzahl der Glomeruli in Ratten verschiedenen Alters. Dorsale (dunkelgrau) und ventrale (hellgrau) Glomeruli wurden separat ausgewertet. n (2, 10 Wochen) = 2, n (8 Wochen = 3), n (4, 6, 14, 17, 19 Wochen) = 1.

3.2. Lokalisation der Rezeptoren für trigeminale Peptide im olfaktorischen und respiratorischen System

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das olfaktorische System stark durch den *Nervus trigeminus* innerviert wird (3.1.), sollte im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden, wo sich die Zielstrukturen für diese Innervation befinden. Hierfür wurden Antikörperfärbungen (2.6.) gegen die Rezeptoren für die trigeminalen Peptide CGRP und SP durchgeführt.

3.2.1. Lokalisation der Rezeptoren für CGRP

Wie eingangs beschrieben (1.2.3.) besteht der CGRP Rezeptorkomplex aus mehreren Komponenten mit unterschiedlichen Funktionen. Für die Lokalisation der CGRP Rezeptoren wurden in der vorliegenden Arbeit Antikörper gegen zwei dieser Komponenten, CRLR und CRCP, eingesetzt. Die Antikörper wurden auf Coronalschnitten durch die Nase und den OB der Ratte (2.6.2.) verwendet.

3.2.1.1. Nachweis von CGRP Rezeptoren im olfaktorischen Epithel

Die Färbungen mit Antikörpern gegen CRCP und CRLR im OE der Ratte weisen ein vergleichbares Färbemuster auf. In beiden Fällen sind knopfartige Strukturen auf der Oberfläche des Epithels zu erkennen. Mit dem Antikörper gegen CRLR sieht man zudem eine schwächere einheitliche Färbung im gesamten Epithel, bei der es sich vermutlich um eine Hintergrundfärbung handelt. Die knopfartigen Strukturen werden mit dem Antikörper gegen CRCP kräftiger gefärbt und treten dadurch, dass der Hintergrund hier schwächer ist, deutlicher hervor. Eine Doppelfärbung mit Antikörpern gegen CRCP und CRLR war nicht möglich, da es sich um Antikörper aus derselben Spezies handelt (vgl. Tab. 2.2.). Doppelfärbungen mit einem Antikörper gegen OMP, der alle olfaktorischen Neurone färbt, zeigen, dass es sich bei den CRCP-positiven Strukturen um die dendritischen Knöpfe aller olfaktorischer Neurone handelt (Abb. 3.13.). Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen OMP und CRLR führen zum gleichen Ergebnis (nicht gezeigt), woraus geschlossen werden kann, dass CRCP und CRLR in dendritischen Knöpfen colokalisiert sind.

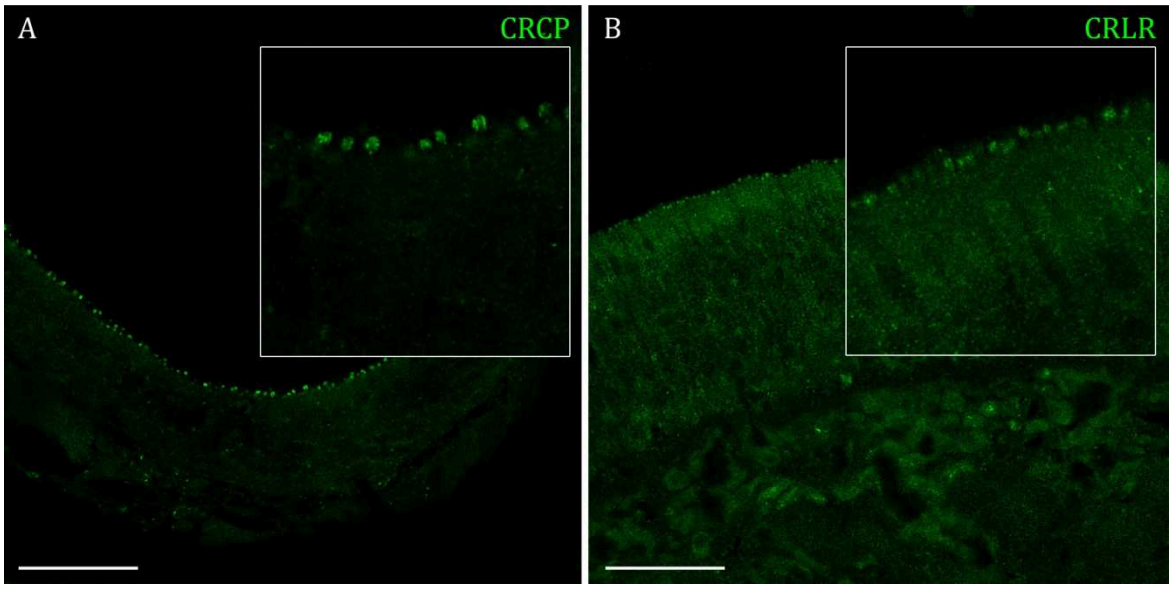

Abbildung 3.12.: Antikörperfärbungen gegen Komponenten von CGRP Rezeptoren im OE der Ratte. Die Antikörper gegen CRCP (A) und CRLR (B) färben ähnliche Strukturen an der Oberfläche des Epithels. Größenbalken A+B: 50 µm (für Vergrößerungen: 15 µm).

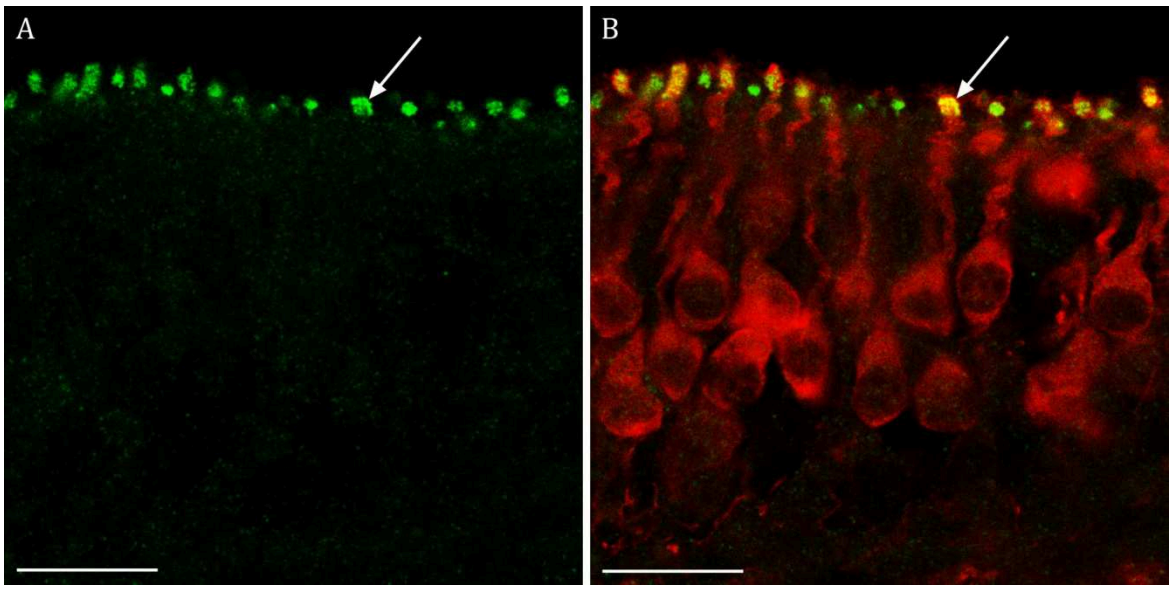

Abbildung 3.13.: Färbung der dendritischen Knöpfe aller olfaktorischer Neurone mit einem Antikörper gegen CRCP (grün). Die olfaktorischen Neurone sind mit einem Antikörper gegen OMP (rot in B) gefärbt. Die Pfeile deuten auf einen der dendritischen Knöpfe, in dem OMP und CRCP colokalisiert sind. Die Tatsache, dass in B Strukturen zu erkennen sind, die nur grün (also CRCP-positiv, aber OMP-negativ) erscheinen, könnte auf eine geringere Färbeintensität des OMP-Antikörpers in der entsprechenden Ebene zurückzuführen sein. Größenbalken A+B: 20 µm.

Eine Antigendemaskierung mit Citratpuffer (2.6.3.) verändert das Färbemuster des CRCP Antikörpers nicht (nicht gezeigt). Die Färbung mit dem CRLR Antikörper verändert sich jedoch beträchtlich. Hier werden nach Demaskierung olfaktorische Neurone gefärbt. Deutlich kann man die Dendriten samt dendritischen Knöpfen, die Zellkörper und die Axone erkennen. Die Färbung ist auch in den Axonbündeln unterhalb des OE noch zu sehen (Abb. 3.14.). Da die Färbung mit dem Antikörper gegen OMP nach Demaskierung verloren geht, war in diesem Fall eine Doppelfärbung, um zu überprüfen ob es sich um alle oder nur einige olfaktorische Neurone handelt, nicht möglich. Eine Mehrfachfärbung mit ToPro®-3, einem Farbstoff der alle Zellkerne färbt, lässt jedoch vermuten, dass nicht alle olfaktorischen Neurone gefärbt sind, sondern dass es sich um eine Subpopulation handelt. In der Nähe der gefärbten Zellen befinden sich SP-positive trigeminale Fasern. Diese können ausgehend von ihrer Position allerdings nicht eindeutig den CRCP-positiven Zellen zugeordnet werden (Abb. 3.14. B), so wie es bei einigen irregulären Zellen im OE der Fall ist (3.1.2. Abb. 3.5. B-D).
Anhand der Färbungen mit Antikörpern gegen Komponenten des CGRP Rezeptorkomplexes kann im Rahmen dieser Arbeit keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob CGRP Rezeptoren in allen (Färbungen ohne Demaskierung) oder nur manchen (Färbungen mit CRLR Antikörper nach Demaskierung) olfaktorischen Neuronen exprimiert werden.

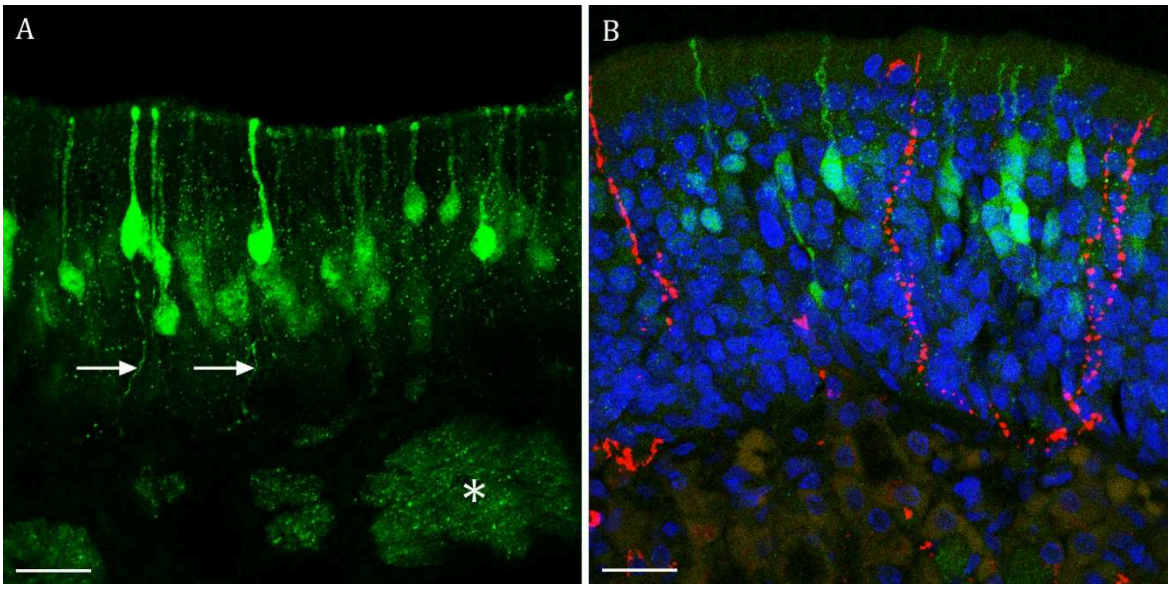

Abbildung 3.14.: Färbung mit einem Antikörper gegen CRLR (grün) nach Antigendemaskierung im OE der Ratte. Alle Kerne sind mit ToPro®-3 gefärbt (blau in B). Trigeminale Fasern sind mit einem Antikörper gegen SP gefärbt (rot in B). Der Antikörper gegen CRLR färbt nach Demaskierung eine Subpopulation olfaktorischer Neurone. Die Färbung lässt sich bis in die Axone (Pfeile in A) und Axonbündel (* in A) nachverfolgen. Die Verteilung der trigeminalen Fasern scheint nicht direkt mit der Verteilung der CRLR-positiven olfaktorischen Neurone zu korrelieren (B). Größenbalken A+B: 20 µm.

3.2.1.2. Nachweis von CGRP Rezeptoren im *Bulbus olfactorius*

Wie im OE (3.2.1.1.) so wurden auch im OB die Antikörper gegen CRCP und CRLR eingesetzt. Beide Antikörper färben in diesem Fall keine Strukturen. Eine Antigendemaskierung mit Citratpuffer (2.6.3.) führt nur im Falle des CRLR Antikörpers zu einer Färbung. Hier erkennt man eine Färbung in der Schicht des *Nervus olfactorius* sowie in einigen Glomeruli mit unterschiedlicher Intensität (Abb. 3.15.). Mehrfachfärbungen mit einem Antikörper gegen CGRP zeigen, dass CRLR-positive Glomeruli nicht unbedingt trigeminal innerviert werden und dass trigeminal innervierte Glomeruli nicht unbedingt CRLR-positiv sind. Obwohl sich trigeminal innervierte Glomeruli teilweise in direkter Nachbarschaft zu CRLR-positiven Glomeruli befinden, kann keine direkte Korrelation zwischen der Innervation durch den Trigeminus und der Färbung mit dem CRLR Antikörper festgestellt werden (Abb. 3.15. B).

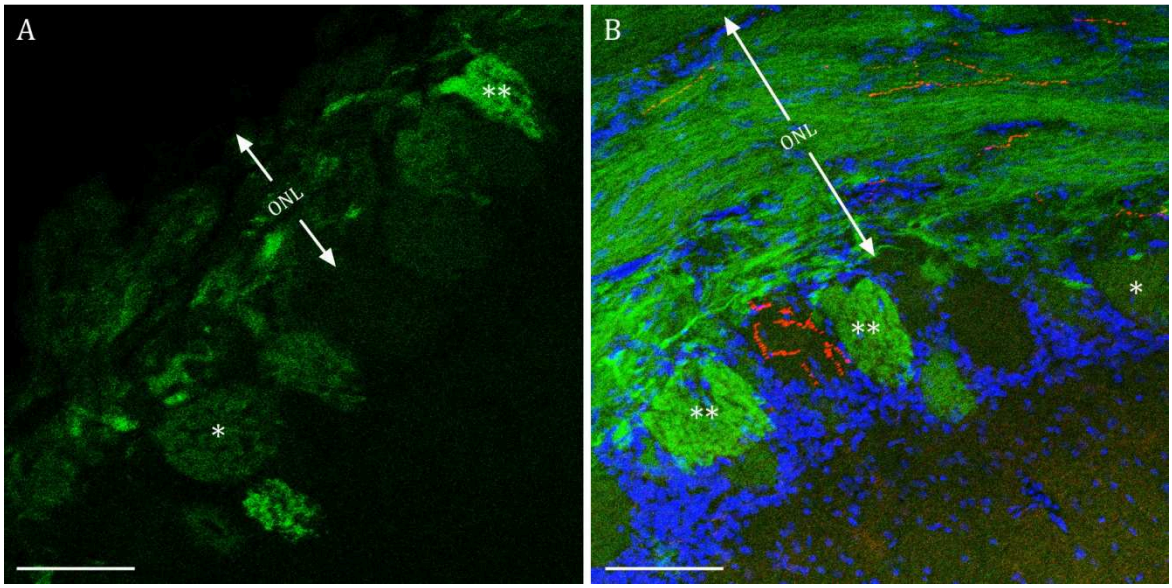

Abbildung 3.15.: Färbung mit einem Antikörper gegen CRLR nach Antigendemaskierung im OB der Ratte. Alle Kerne sind mit ToPro®-3 gefärbt (blau in B). Trigeminale Fasern sind mit einem Antikörper gegen SP gefärbt (rot in B). Der Antikörper gegen CRLR (grün) färbt nach Demaskierung einige Glomeruli schwach (*), andere stärker (**) sowie die olfaktorischen Nerven. Das trigeminale Innervationsmuster der Glomeruli korreliert nicht direkt mit der CRLR Antikörperfärbung (B). ONL = Schicht des *Nervus olfactorius*. Größenbalken A+B: 100 µm.

3.2.2. Lokalisation der Rezeptoren für Substanz P

Unter allen beschriebenen Neurokinin Rezeptoren hat der NK1 Rezeptor die höchste Affinität zu SP. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl kommerziell erhältliche als auch eigens hierfür hergestellte Antikörper gegen den NK1 Rezeptor verwendet (2.6.3., 2.6.4.). Die Antikörper wurden auf transfizierten HEK293-Zellen (2.4.) und auf Coronalschnitten durch die Nase und den OB (2.6.2.) verwendet.

3.2.2.1. Nachweis von NK1R in transfizierten HEK293-Zellen

Um festzustellen, ob die verwendeten Antikörper den NK1 Rezeptor (NK1R) erkennen, wurden diese zunächst auf mit NK1R transfizierten HEK293-Zellen getestet (2.5.).
Da die für die Transfektion verwendete cDNA für den murinen NK1R die Expression eines HA-tags am N-Terminus kodiert, markiert ein Antikörper gegen HA alle erfolgreich transfizierten HEK293-Zellen. Teilweise lässt sich sehr gut eine membranständige Färbung erkennen. Weiterhin werden Strukturen in der Nähe des Nucleus gefärbt (Abb. 3.16.).
Ausgenommen gpNK1R zeigen alle verwendeten NK1R Antikörper Colokalisation mit dem HA Antikörper. Abbildung 3.17. zeigt exemplarisch die Färbungen mit rbNK1R und rbNK1Rn, die beide transfizierte Zellen färben, sowie gpNK1R, mit dem keine Zellen gefärbt werden.

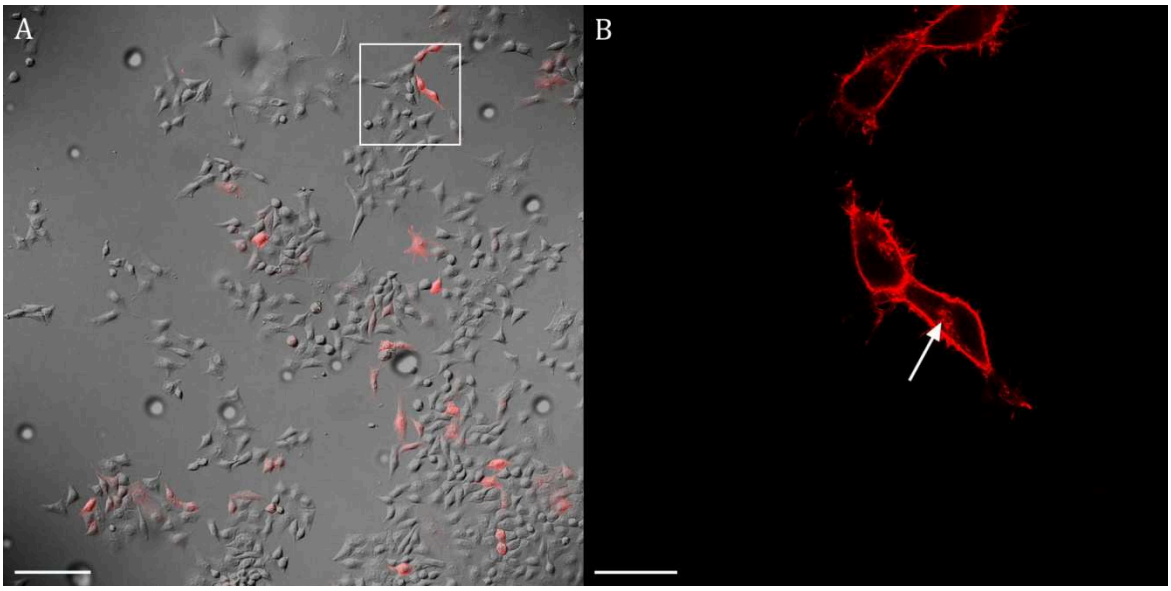

Abbildung 3.16.: Mit NK1R transfizierte HEK293-Zellen. Ein Antikörper gegen HA (rot) färbt alle transfizierten Zellen. In diesem Beispiel sind ca. 15% der Zellen transfiziert. Neben einer deutlich membranständigen Färbung sind gefärbte Strukturen in der Nähe des Nucleus zu erkennen (Pfeil). Größenbalken A: 100 µm, B: 10 µm.

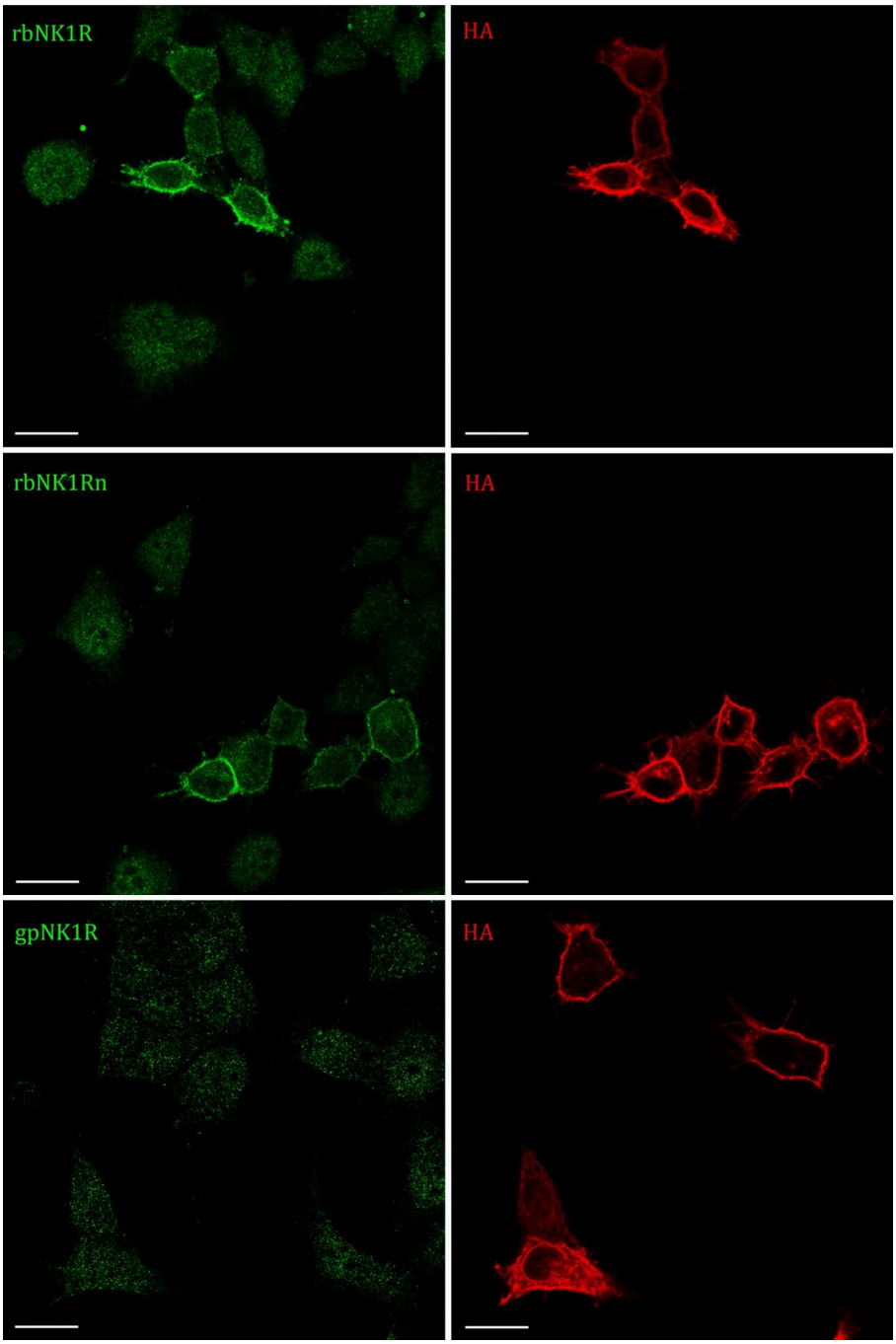

Abbildung 3.17.: Färbung der transfizierten HEK293-Zellen mit Antikörpern gegen NK1R. Die Antikörper rbNK1R und rbNK1Rn (grün oben und Mitte) zeigen Colokalisation mit der HA Färbung (rot). Trotz einer gewissen Hintergrundfärbung mit den NK1R Antikörpern in allen Zellen treten die transfizierten Zellen klar hervor. Die Färbung ist jedoch schwächer als die mit dem Antikörper gegen HA. Mit dem Antikörper gpNK1R (grün unten) ist keine sich vom Hintergrund abhebende Färbung zu erkennen. Größenbalken: 10 µm.

3.2.2.2. Nachweis von NK1R im olfaktorischen und respiratorischen Epithel

Nachdem alle NK1R Antikörper auf transfizierten Zellen getestet wurden (3.2.2.1.), sollte das Färbemuster auf Schnitten durch die Nase analysiert werden. Um die Spezifität der Antikörper für NK1R zu überprüfen, wurden neben Proben aus der Ratte auch Proben von NK1R *knock-out* (NK1R ko) Mäusen analysiert. Weiterhin wurden zum Vergleich Färbungen an Proben von Mäusen des Stammes MF1 und C57BL/6 durchgeführt, da die NK1R ko Mäuse den genetischen Hintergrund dieser beiden Stämme in sich tragen (De Felipe et al., 1998; Herpfer et al., 2004; Yan et al., 2009).
Abbildung 3.18. zeigt einen Schnitt durch die Nasenhöhle, in dem OE und RE aufeinander treffen. In diesem Beispiel sind nur die Färbungen mit rbNK1R gezeigt. Hier sieht man eine deutliche Färbung auf Ebene der Cilien im RE der Ratte und der MF1 Maus. Diese Färbung ist auch im RE von C57BL/6 Mäusen zu erkennen (nicht gezeigt), jedoch nicht im RE von NK1R ko Mäusen. Das gleiche Färbemuster wie für rbNK1R im RE weisen alle anderen NK1R Antikörper auf mit Ausnahme von rbNK1Rn, der weder in der Ratte noch in C57BL/6, MF1 und NK1R ko Mäusen eine Färbung im RE aufweist (nicht gezeigt).

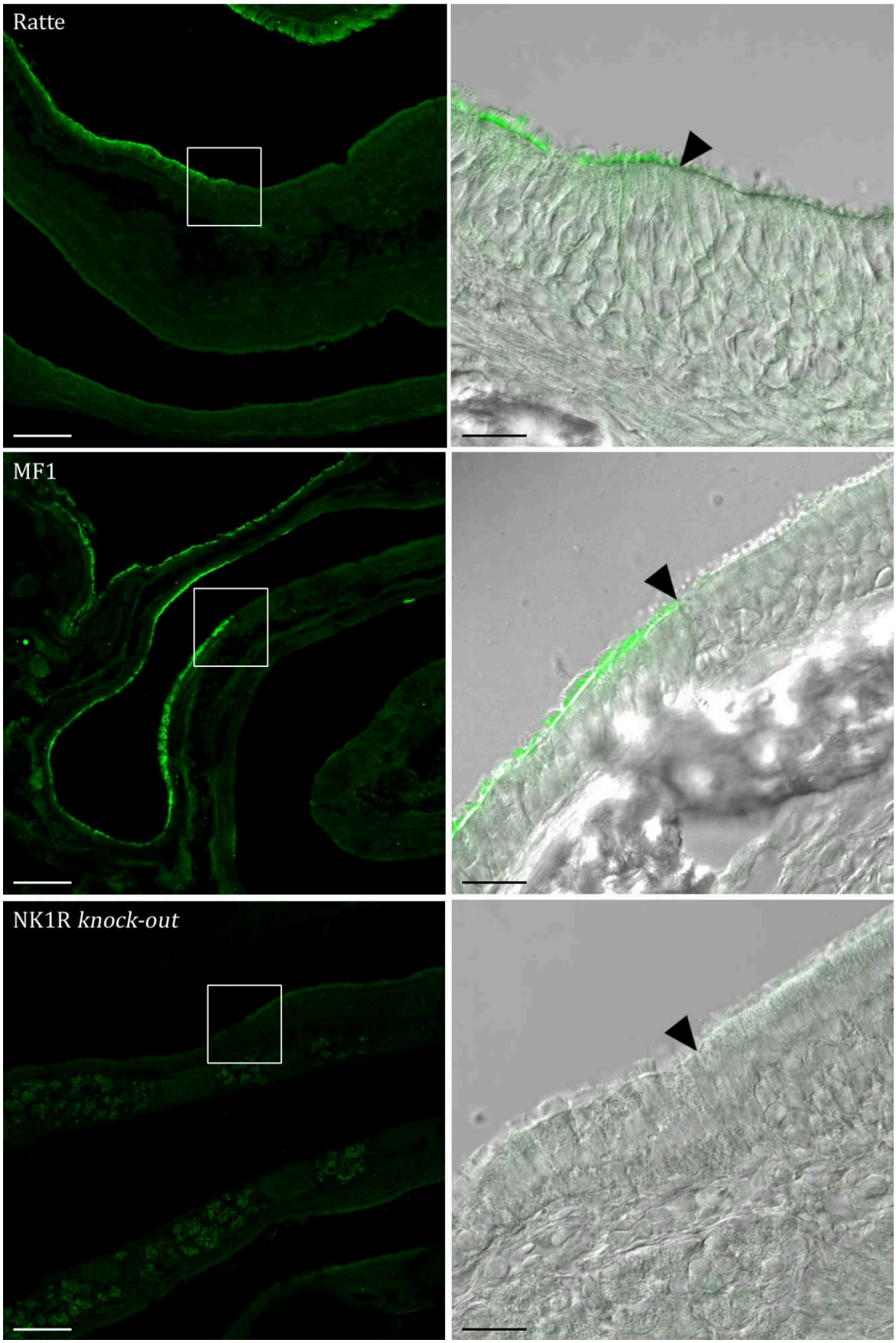

Abbildung 3.18.: Färbung mit dem Antikörper rbNK1R im RE. Der Antikörper rbNK1R (grün) zeigt eine deutliche Färbung auf Höhe der Cilien in der Ratte sowie in MF1 Mäusen. Diese Färbung ist in den NK1R ko Mäusen nicht zu sehen. Die Pfeilspitzen in den Vergrößerungen in der rechten Spalte markieren die Grenze zwischen OE und RE. Größenbalken linke Spalte: 100 µm, rechte Spalte: 20 µm.

Im OE färben die verschiedenen Antikörper unterschiedliche Strukturen (Abb. 3.19.-3.22.). Ein Unterschied in Bezug auf Färbeintensität oder -muster lässt sich teilweise auch bei Färbung mit denselben Antikörpern zwischen den beiden Mausstämmen C57BL/6 und MF1 sowie der Ratte erkennen. Um zuverlässige Hinweise auf das Expressionsmuster von NK1R im OE zu erhalten, musste daher zunächst die Spezifität der Antikörper überprüft werden.
Ein wichtiges Kriterium ist hierbei, dass die Färbung in den anderen Stämmen sich von der in den NK1R ko Mäusen unterscheidet. Einige Antikörper konnten ausgeschlossen werden, da sie ein Färbemuster in der Ratte und allen Mausstämmen aufweisen, das auch in NK1R ko Tieren zu sehen ist. Dies ist der Fall für gtNK1R (Abb. 3.19.), der eine durchgängige Färbung auf Höhe der Cilien zeigt sowie für gpNK1R (Abb. 3.19.), rbNK1R PSL (Abb. 3.19.) und rbNK1Rδ (Abb. 3.20.), die Strukturen auf Höhe der *tight junctions* färben. Auch bei Färbungen mit gpNK1Rγ (Abb. 3.20.), rbNK1Rγ (Abb. 3.20.) und gpNK1Rβ (Abb. 3.21.) lassen sich keine deutlich gefärbten Strukturen festmachen, die in der Ratte, den C57BL/6 oder den MF1 Mäusen, nicht aber in den NK1R ko Tieren zu sehen sind.
Ein weiteres Kriterium für die Spezifität von Antikörpern ist die Reproduzierbarkeit der Färbung mit unabhängigen Antikörpern, das heißt mit Antikörpern gegen verschiedene Epitope. Der Antikörper rbNK1Rα (Abb. 3.21.) färbt neben potentiellen Zellkernen oder –körpern in der oberen Schicht des Epithels Strukturen, die an Cilienbüschel einzeln verstreuter olfaktorischer Neurone erinnern. Diese Färbung ist jedoch nur in der Ratte zu sehen und konnte mit keinem der anderen Antikörper reproduziert werden, sodass rbNK1Rα aus weiteren immunhistochemischen Untersuchungen ausgeschlossen wurde.
In mehreren Fällen findet man über die Cilienschicht verstreut sehr kleine gefärbte Strukturen (gpNK1R PSL, rbNK1R, rbNK1Rn), welche in keinem Fall in den NK1R ko Tieren zu sehen sind (Abb. 3.21., 3.22.). Obwohl die Färbungen zwischen den anderen Stämmen nicht immer übereinstimmen (die Strukturen werden mit gpNK1R PSL nur in MF1 Mäusen, mit rbNK1R in Ratte und C57BL/6 Mäusen und mit rbNK1Rn in Ratte und MF1 Mäusen gefärbt), wurden alle drei Antikörper in die nachfolgenden Untersuchungen eingeschlossen, da sie eine Färbung aufweisen, die zum einen nicht in NK1R ko Tieren zu sehen ist und zum anderen mit unabhängigen Antikörpern reproduziert werden kann. Im nächsten Abschnitt (3.2.2.3.) wird ausführlicher auf die hier gefärbten Strukturen eingegangen.

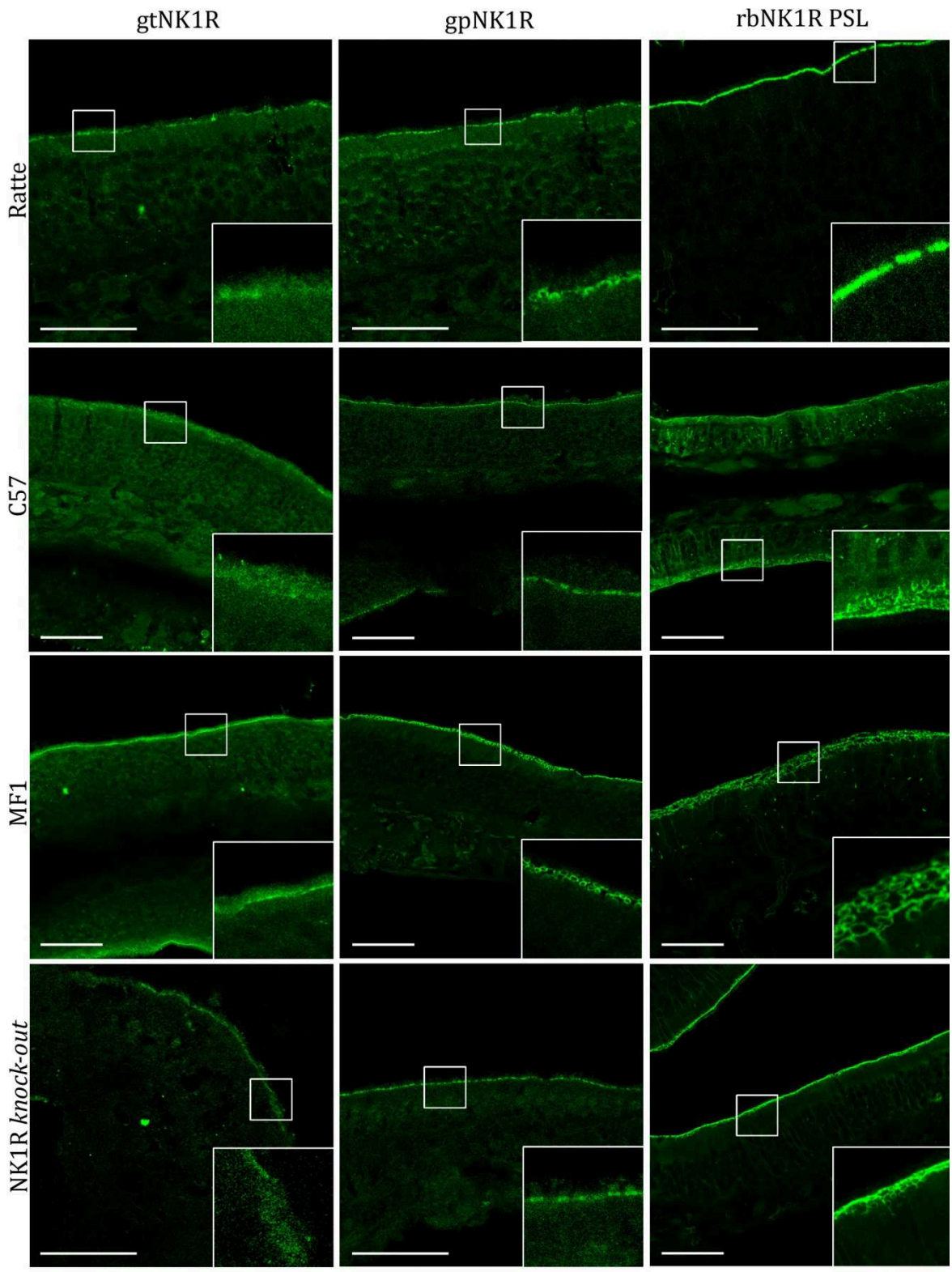

Abbildung 3.19.: Färbungen mit NK1R Antikörpern im OE der Ratte und Mäusen des Stammes C57BL/6, MF1 und NK1R ko (Teil 1). Größenbalken: 50 µm (für Vergrößerungen ca. 17µm).

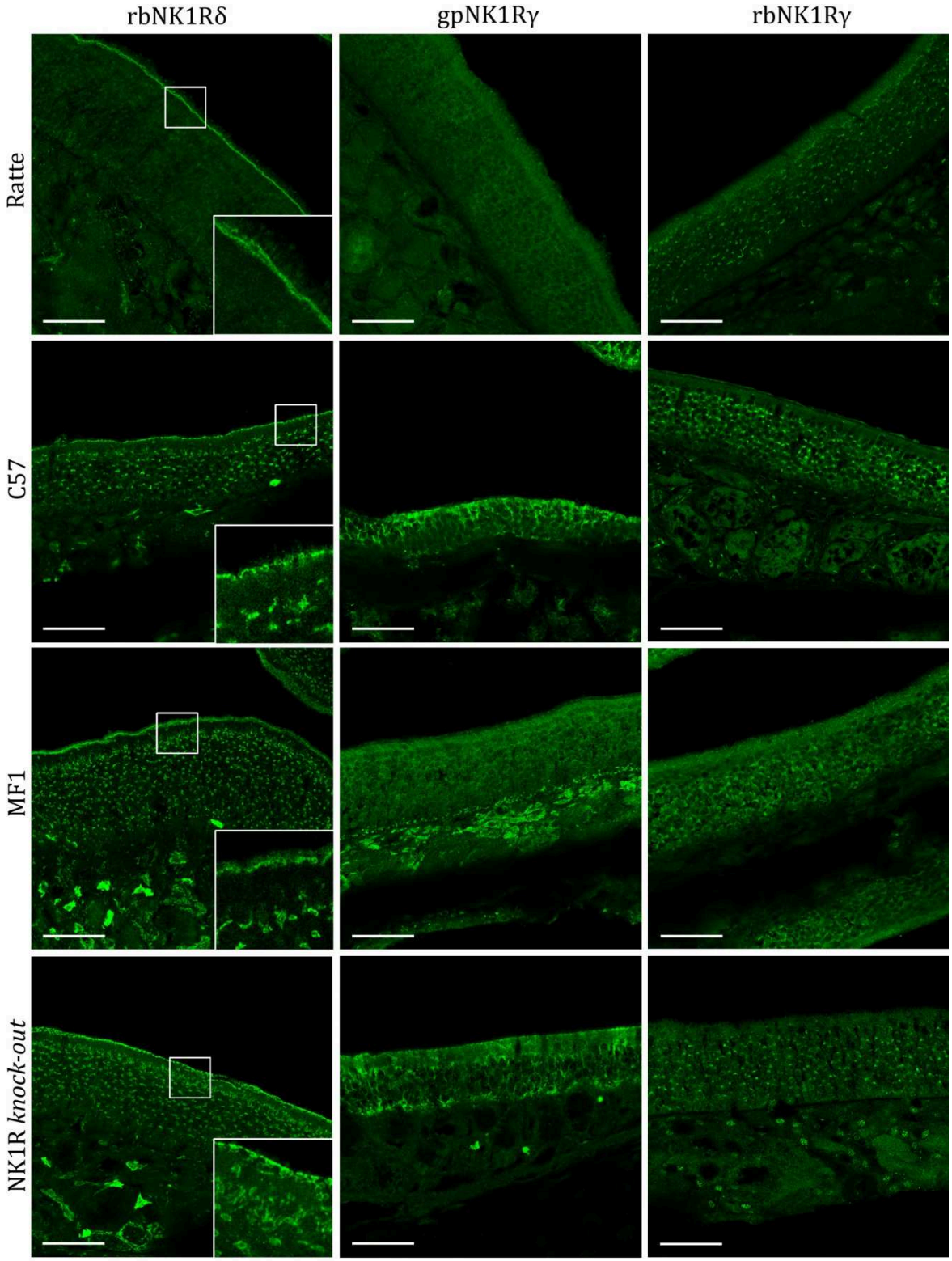

Abbildung 3.20.: Färbungen mit NK1R Antikörpern im OE der Ratte und Mäusen des Stammes C57BL/6, MF1 und NK1R ko (Teil 2). Größenbalken: 50 µm (für Vergrößerungen ca. 17 µm).

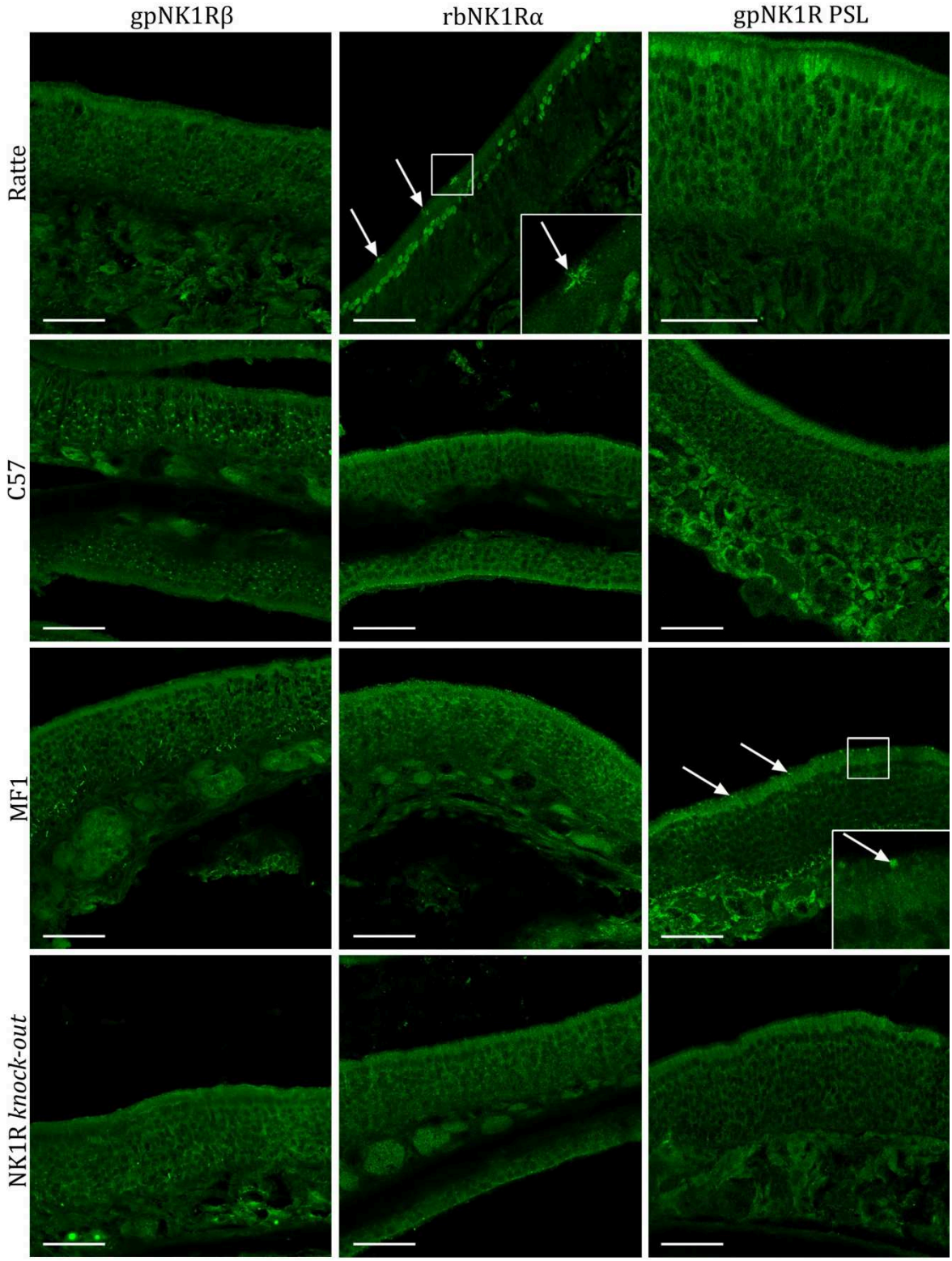

Abbildung 3.21.: Färbungen mit NK1R Antikörpern im OE der Ratte und Mäusen des Stammes C57BL/6, MF1 und NK1R ko (Teil 3). Die Pfeile markieren vereinzelte gefärbte Strukturen in der Cilienschicht. Größenbalken: 50 µm (für Vergrößerungen ca. 17 µm).

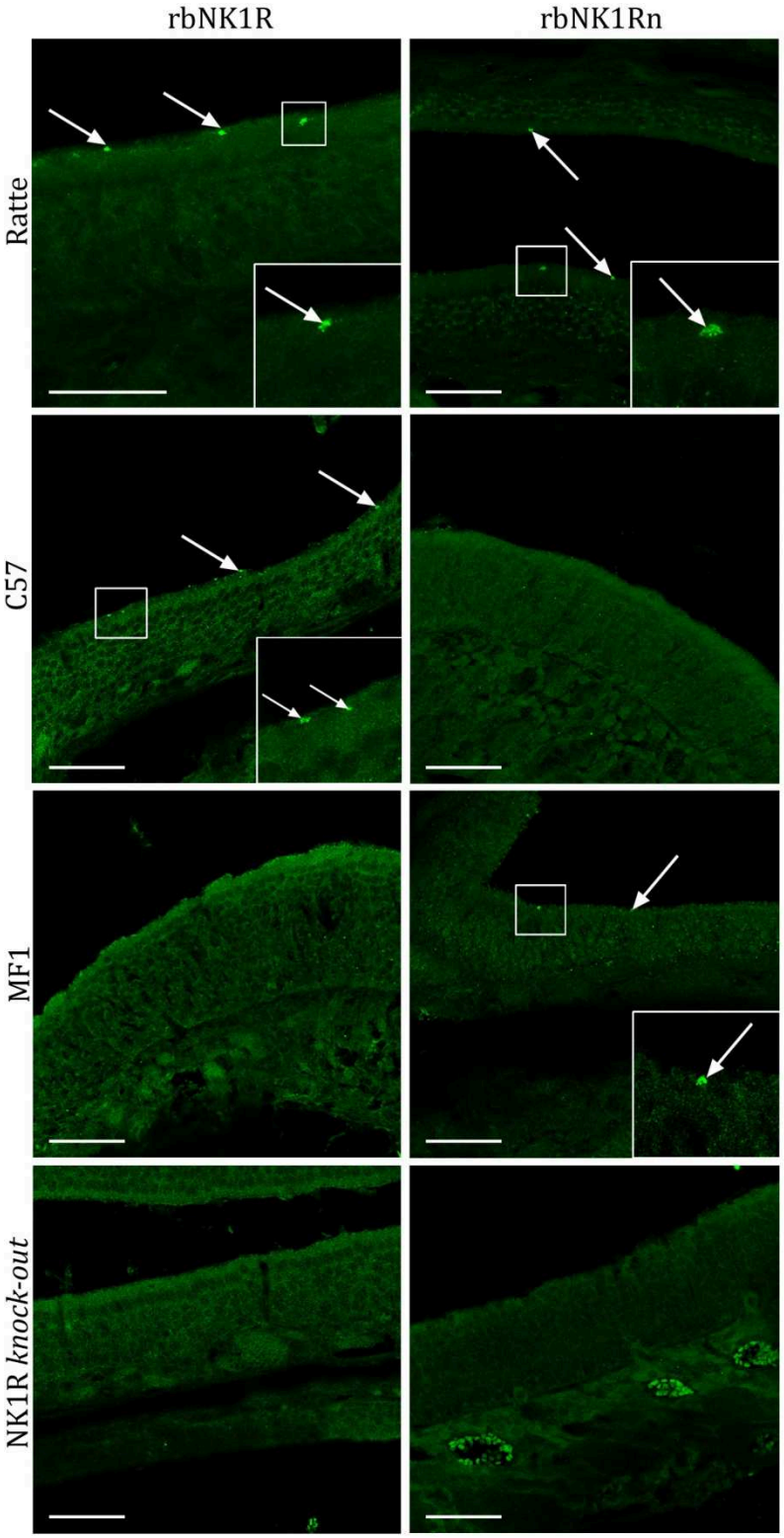

Abbildung 3.22.: Färbungen mit NK1R Antikörpern im OE der Ratte und Mäusen des Stammes C57BL/6, MF1 und NK1R ko (Teil 4). Die Pfeile markieren vereinzelte gefärbte Strukturen in der Cilienschicht. Größenbalken: 50 µm (für Vergrößerungen ca. 17 µm).

3.2.2.3. Zelluläre Lokalisation von NK1R in IP3R3 exprimierenden Zellen des respiratorischen und olfaktorischen Epithels

Färbungen mit verschiedenen Antikörpern gegen den SP Rezeptor NK1R im OE zeigen in mehreren Fällen vereinzelte Strukturen auf Höhe der Cilienschicht, die nicht in NK1R ko Tieren zu sehen sind. Weiterhin kann diese Färbung mit unabhängigen Antikörpern (gpNK1R PSL, rbNK1R, rbNK1Rn) reproduziert werden (3.2.2.2. Abb. 3.21., 3.22.). Bei den gefärbten Strukturen könnte es sich möglicherweise um Microvillibüschel handeln, die zu verschiedenen beschriebenen Zelltypen, welche sich von regulären olfaktorischen Neuronen unterscheiden, gehören (1.1.3.). Um aufzudecken um welche Strukturen es sich hierbei wirklich handelt, wurden Mehrfachfärbungen mit Zellmarkern (1.1.3.; vgl. 3.1.2.) durchgeführt.
Eine eindeutige Zuweisung der NK1R Antikörper Färbung zu einem bestimmten Zelltypen war nur für rbNK1R sowie rbNK1Rn in der Ratte möglich. Die Intensität der Färbungen nimmt nach Antigendemaskierung mit Citratpuffer (2.6.3.) zu, das Färbemuster bleibt jedoch unverändert. Doppelfärbungen mit einem Antikörper gegen IP3R3 zeigen, dass die beiden NK1R Antikörper die Microvilli von IP3R3-exprimierenden Zellen anfärben. Weiterhin erkennt man im Falle des rbNK1R Antikörpers eine leichte Färbung am Dendriten und Zellkörper, die man im Falle des rbNK1Rn Antikörpers nicht findet. In beiden Fällen gibt es IP3R3-exprimierende Zellen, an welchen man keine Färbung der Microvilli bzw. des Zellkörpers mit dem entsprechenden NK1R Antikörper sieht. Doppelfärbungen mit einem Villin Antikörper, der alle Microvilli färbt, zeigen, dass in diesen Fällen keine Microvilli mehr vorhanden sind (nicht gezeigt), vermutlich weil diese bei der Präparation oder beim Schneiden verloren gegangen sind. In jedem Fall, in dem eine Färbung mit rbNK1R oder rbNK1Rn zu sehen ist, kann diese jedoch einer IP3R3-exprimierenden Zelle zugeordnet werden (Abb. 3.23.). Dies scheint weder der Fall zu sein bei den Strukturen, die mit beiden Antikörpern in den Mausstämmen gefärbt werden, noch bei den Strukturen, die mit gpNK1R PSL gefärbt werden (nicht gezeigt), woraus sich schließen lässt, dass es sich in diesen Fällen vermutlich nicht um Microvillibüschel von IP3R3-exprimierenden Zellen handelt. Klar ist aber, dass in den Wildtyp-Stämmen ähnlich aussehende Strukturen wie in der Ratte gefärbt sind und diese Färbung in NK1R ko Mäusen fehlt. Die Natur der gefärbten Strukturen konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht aufgeklärt werden.

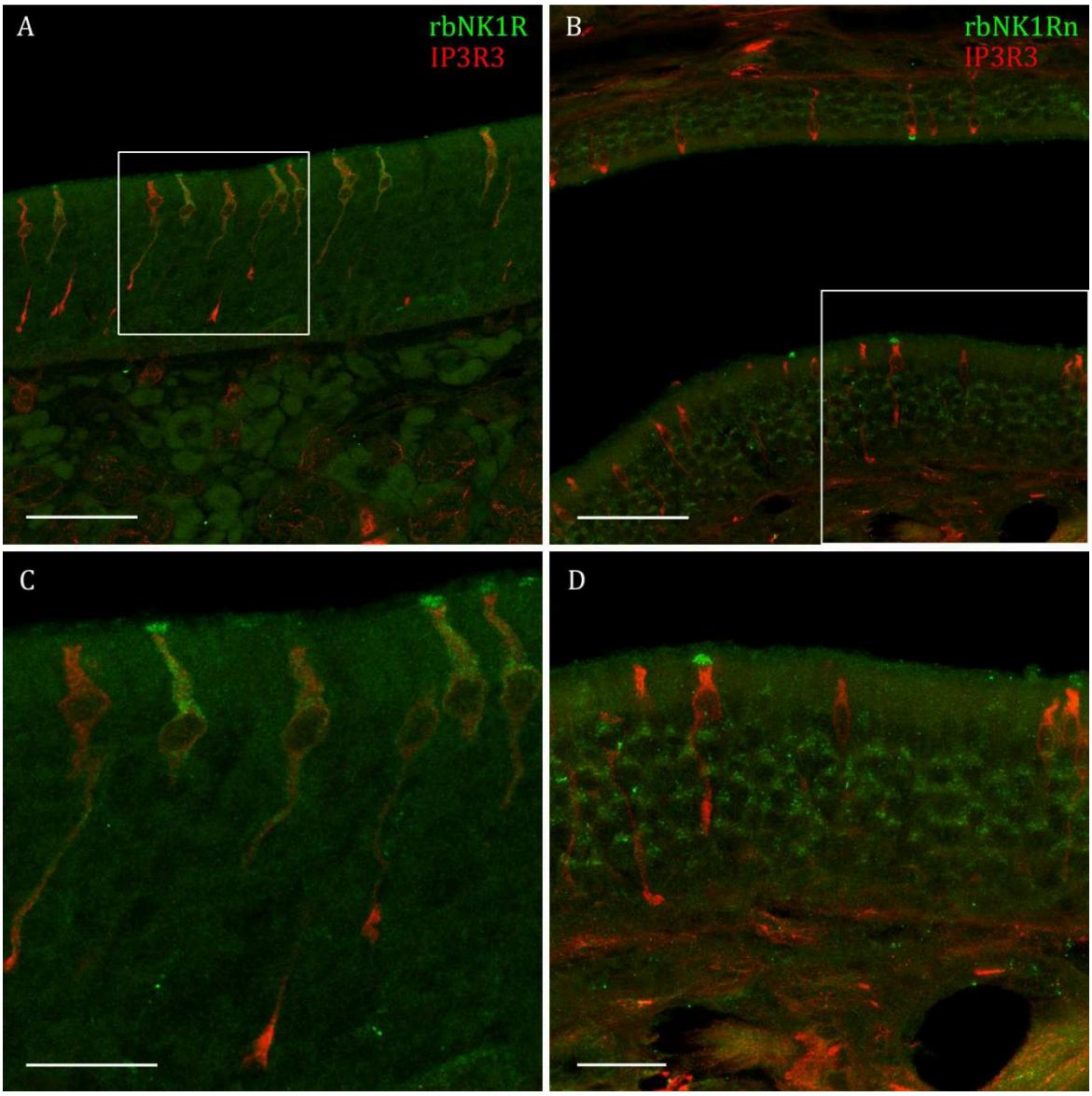

Abbildung 3.23.: Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen NK1R und IP3R3 im OE der Ratte. Sowohl der Antikörper rbNK1R (grün A+C) als auch rbNK1Rn (grün B+D) färbt Microvilli von IP3R3-positiven Zellen (rot). Der Antikörper rbNK1R färbt zusätzlich den apikalen Teil der Zelle (C). Größenbalken A+B: 50 µm, C+D: 20 µm.

In Kapitel 3.1.2. wurde bereits beschrieben, dass es in manchen Fällen eine enge Assoziation zwischen trigeminalen Fasern und – neben anderen Zelltypen – IP3R3-exprimierenden Zellen gibt. Abbildung 3.24. verdeutlicht diese Assoziation an konfokalmikroskopischen Aufnahmen eines Ganzpräparates des Septums. Mehrfachfärbungen mit Antikörpern gegen rbNK1R/rbNK1Rn, IP3R3 und SP zeigen weiterhin, dass eine Färbung der Microvilli von IP3R3-exprimierenden Zellen, welche eine Assoziation zu trigeminalen Fasern aufweisen, mit rbNK1R und rbNK1Rn erreicht werden kann. Die Färbungen sind aber auch in Microvilli von Zellen zu sehen, die sich nicht in unmittelbarer Nähe zu trigeminalen Fasern befinden (Abb. 3.25.).

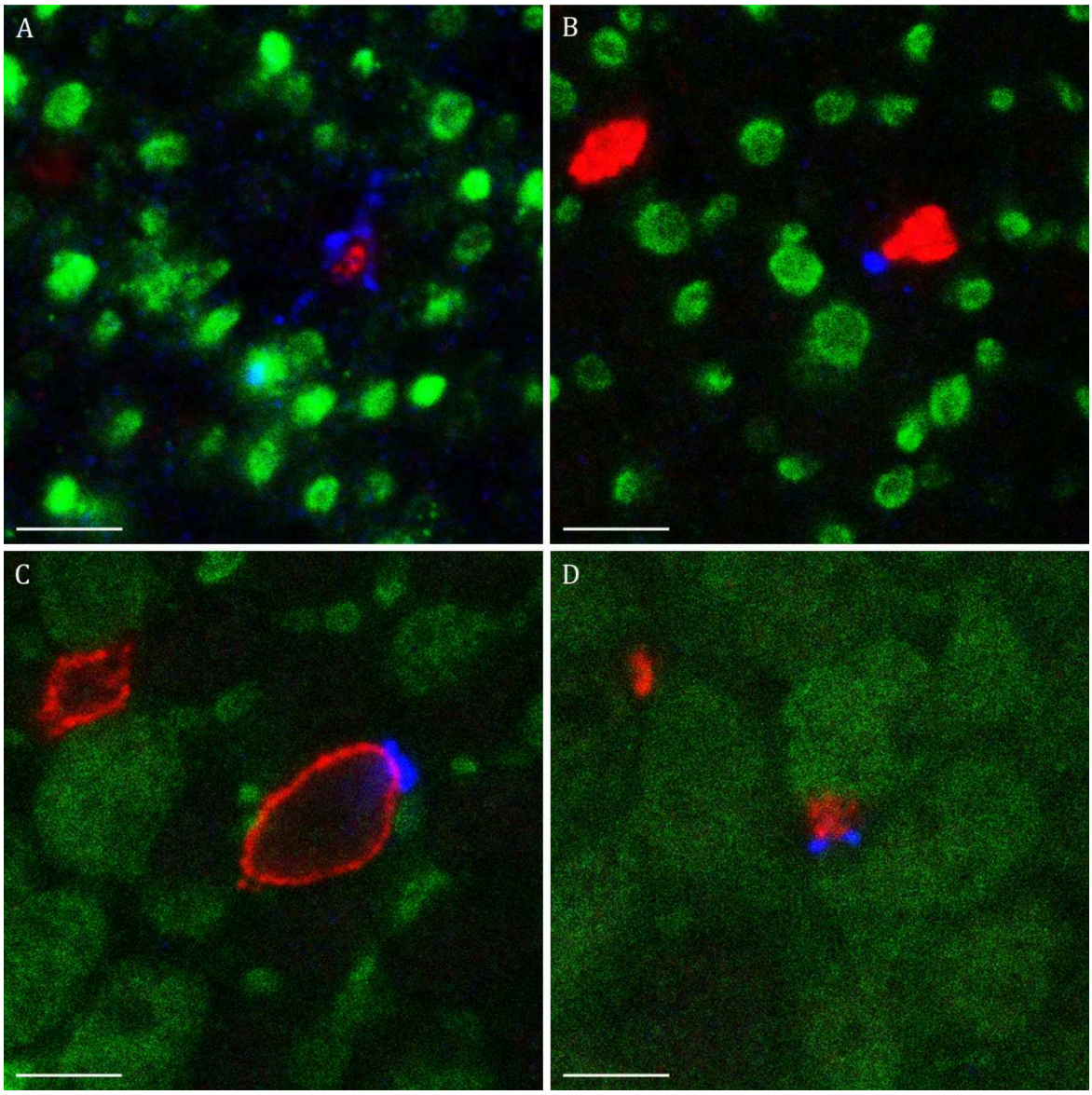

Abbildung 3.24.: Assoziation zwischen einer trigeminalen Faser und einer IP3R3-positiven Zelle in einem Ganzpräparat des Septums einer Ratte (Aufsichten aus vier Fokusebenen). Die mit einem Antikörper gegen SP gefärbte Faser (blau) steht in engem Kontakt zu der IP3R3-positiven Zelle (rot). Beginnend am apikalen Teil kurz unter der ciliären Schicht (A) über den Dendriten (B) und den Zellkörper (C) folgt die Faser dem Verlauf der Zelle bis hin zum Axon (D). Die regulären olfaktorischen Neurone sind mit einem Antikörper gegen OMP gefärbt (grün). Größenbalken A-D: 5 µm.

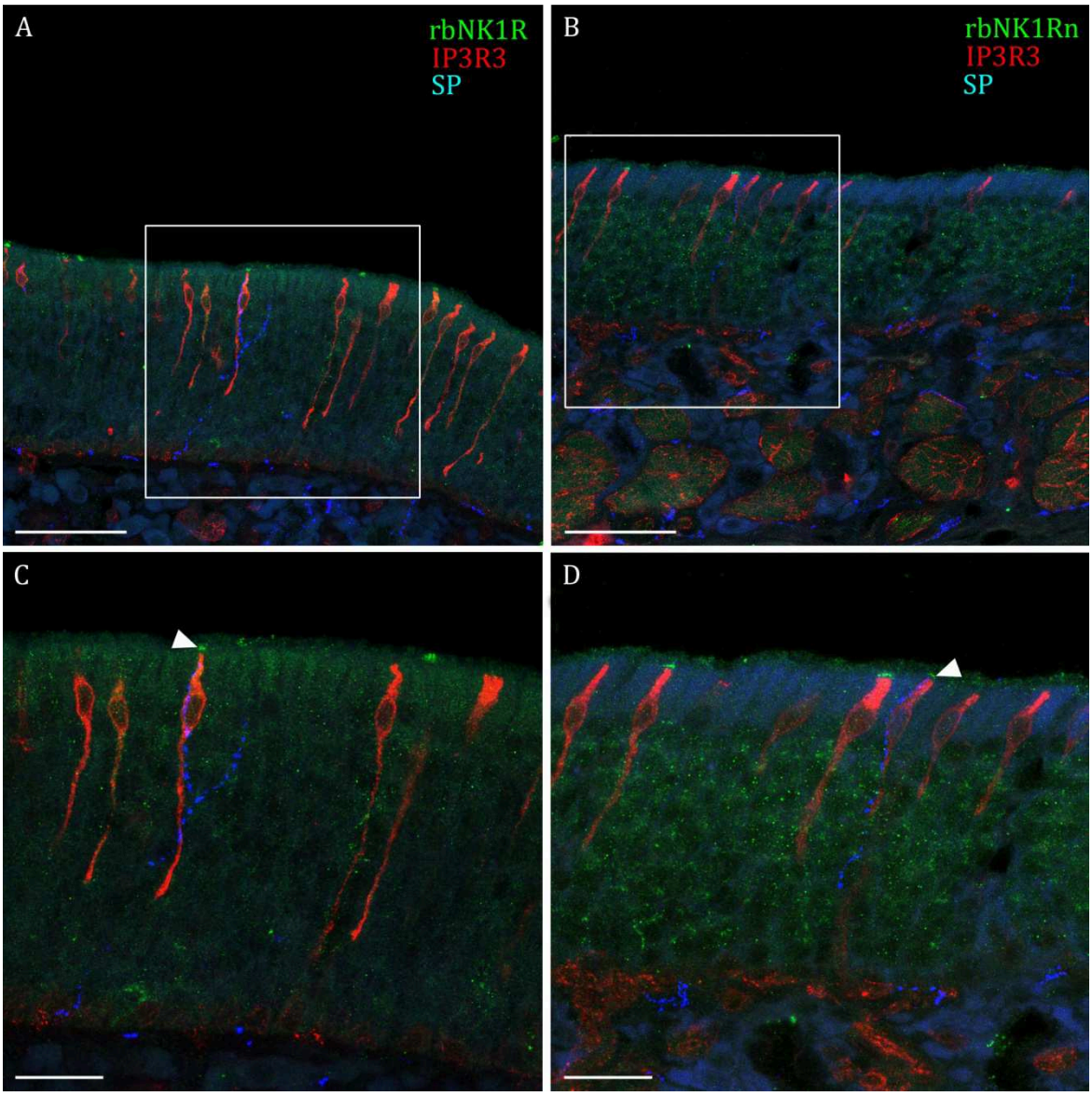

Abbildung 3.25.: Dreifachfärbung mit Antikörpern gegen NK1R, IP3R3 und SP im OE der Ratte. Die Pfeilköpfe markieren mit rbNK1R (grün A+C) und rbNK1Rn (grün B+D) gefärbte Microvilli von IP3R3-positiven Zellen (rot), die in unmittelbarer Nähe zu SP-positiven trigeminalen Fasern (blau) stehen. Andere NK1R-positive Zellen scheinen nicht direkt von trigeminalen Fasern „kontaktiert" zu werden. Größenbalken A+B: 50 µm, C+D: 20 µm.

Da die enge Assoziation zwischen den IP3R3-positiven Zellen und trigeminalen Fasern sowie die Färbungen mit den beiden NK1R Antikörpern darauf hinweisen, dass dieser Zelltyp im OE auf SP reagieren könnte, wurden die Zellen weiterhin in Bezug auf ihre molekulare Ausstattung untersucht. Es gibt keine Colokalisation der IP3R3 Antikörperfärbung mit einem Antikörper gegen OMP, der reguläre olfaktorische Neurone färbt. Außerdem färben Antikörper gegen Komponenten des Signalweges von olfaktorischen Neuronen ($G\alpha_{olf/s}$, AC3, CNGA2; vgl. 1.1.2.) die Microvilli dieser Zellen nicht an (Abb. 3.26.). Antikörper gegen $G\alpha_{q/11}$ und PLCβ2, potentielle Komponenten eines NK1R Signalweges (1.2.3.), zeigen jedoch eine deutliche Färbung der Microvilli (Abb. 3.27.). Diese Ergebnisse stehen größtenteils im Einklang mit anderen Studien, die sich mit microvilliären IP3R3-exprimierenden Zellen im OE von Nagern beschäftigen (Elsaesser et al., 2005; Hegg et al., 2010: hier jedoch PLCβ2 negativ).

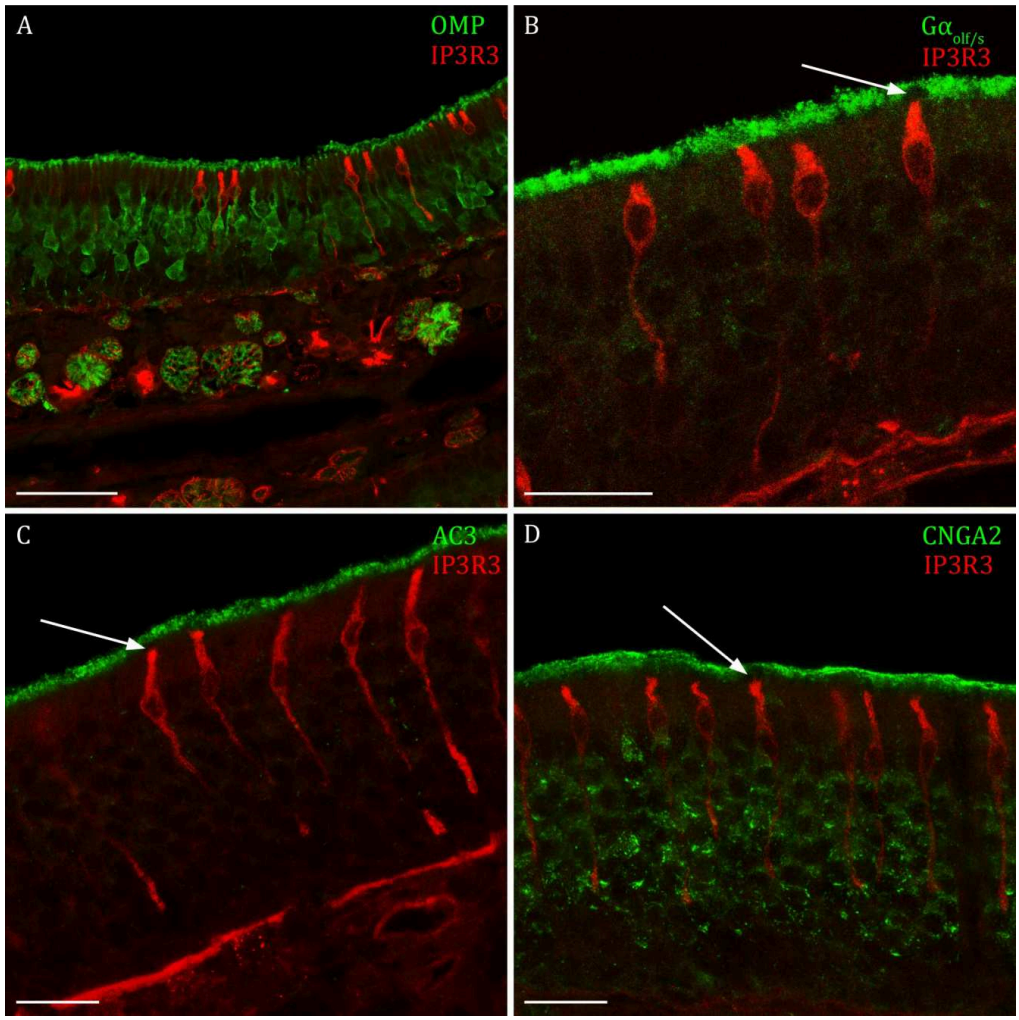

Abbildung 3.26.: IP3R3-positive Zellen im OE der Ratte exprimieren keine typischen Marker für reguläre olfaktorische Neurone. Es gibt keine Colokalisation zwischen den Antikörpern gegen OMP (grün A) und IP3R3 (rot). Die Pfeile in B-D markieren Microvilli von IP3R3-positiven Zellen, die nicht mit Antikörpern gegen $G\alpha_{olf/s}$ (grün B), AC3 (grün C) oder CNGA2 (grün D) gefärbt werden. Größenbalken A: 50 µm, B-D: 20 µm.

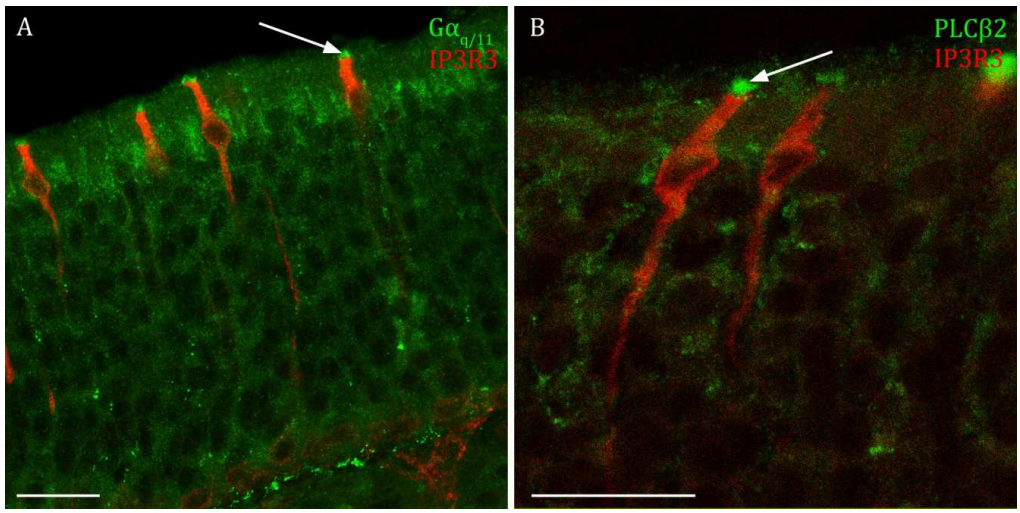

Abbildung 3.27.: IP3R3-positive Zellen im OE der Ratte exprimieren Komponenten des NK1R Signalweges. Die Pfeile markieren Microvilli von IP3R3-positiven Zellen (rot). Diese können mit Antikörpern gegen $G\alpha_{q/11}$ (grün A) und PLCβ2 (grün B) gefärbt werden. Größenbalken A+B: 20 µm.

Weiterhin sollte die Häufigkeit der IP3R3 exprimierenden Zellen im Verhältnis zu regulären olfaktorischen Neuronen bestimmt werden. Hierfür wurden Färbungen mit Antikörpern gegen OMP, IP3R3 und PLCβ2 an Coronalschnitten durch die Nase und an einem Ganzpräparat des Septums durchgeführt. Die Anzahl der IP3R3-positiven Zellen im Septum wurde aus technischen Gründen indirekt über die PLCβ2-Färbung bestimmt, da sich die mit diesem Antikörper gefärbten Microvilli der IP3R3-positiven Zellen (vgl. Abb. 3.27. B) in etwa auf Höhe der dendritischen Knöpfe olfaktorischer Neurone befinden. Die Werte, die anhand der Coronalschnitte ermittelt wurden, schwanken zwischen 16% an dickeren Stellen des Epithels und 28% an dünneren Stellen, woraus sich ein Mittelwert von 22% ergibt. In der Septumpräparation können hingegen nur 5-6% IP3R3-exprimierende Zellen in Relation zu regulären olfaktorischen Neuronen gefunden werden. Dieser Wert entspricht einer vergleichbaren Studie im OE von OMP-GFP-Mäusen (Elsaesser et al., 2005).

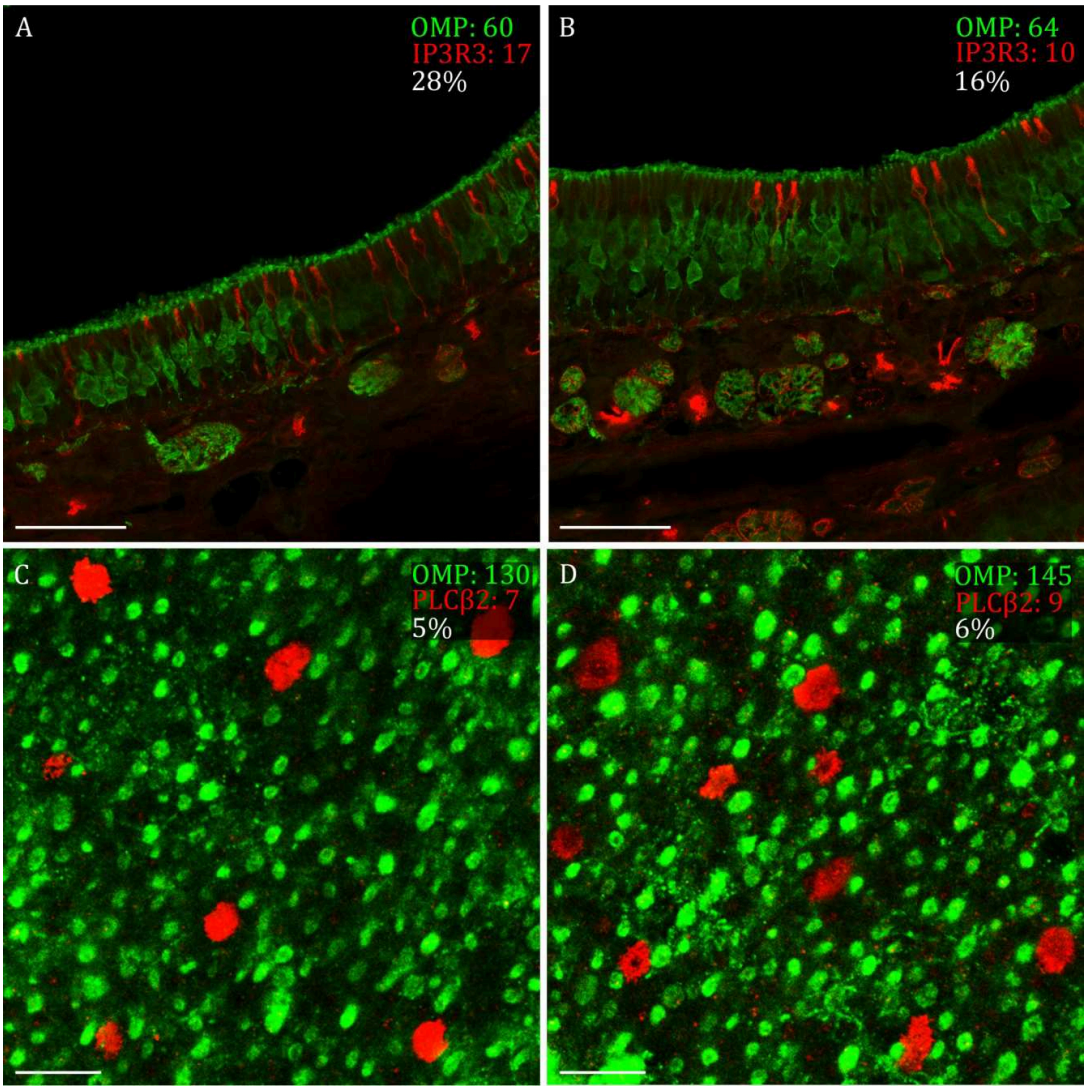

Abbildung 3.28.: Anzahl von IP3R3-positiven Zellen in Relation zu regulären olfaktorischen Neuronen in OE (A+B) und Septum (C+D, Aufsicht) der Ratte. IP3R3-positive Zellen bzw. deren Microvilli sind mit Antikörpern gegen IP3R3 (rot A+B) bzw. gegen PLCβ2 (rot C+D) gefärbt. Olfaktorische Neurone sind mit einem Antikörper gegen OMP gefärbt (grün). Die Anzahl der PLCβ2-positiven Microvillibüschel beträgt hochgerechnet 1.944/mm² für C bzw. 2.500/mm² für D, die der regulären olfaktorischen Neurone 36.111/mm² für C bzw. 40.277/mm² für D. Größenbalken A+B: 50 µm, C+D: 10 µm.

Nachdem NK1R im OE in IP3R3-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden konnte, sollte festgestellt werden, ob dies auch im RE, wo eine sehr starke Färbung mit fast allen NK1R Antikörpern auf Höhe der Cilien zu sehen ist (3.2.2.2. Abb. 3.18.), der Fall ist. Hier färbt ein Antikörper gegen IP3R3 deutlich ein schmales Band im apikalen Teil von regulären Cilienzellen und die Basalzellen. Weiterhin findet man gefärbte Zellkörper im Epithel, die sich morphologisch von regulären Cilienzellen unterscheiden. Der rbNK1R Antikörper zeigt eine Färbung auf Höhe der kompletten Cilienschicht. Diese Färbung ist im basalen Teil der Cilien sehr kräftig und wird zu den Spitzen hin schwächer. Der stark gefärbte Teil befindet sich sehr nahe, wenn auch nicht unmittelbar, an dem IP3R3-positiven Band. Bei näherer Betrachtung erkennt man außerdem eine leichte Färbung mit rbNK1R in Zellkörpern der irregulären Zellen, die auch mit dem IP3R3 Antikörper gefärbt werden. Außerdem werden deren Fortsätze, bei denen es sich möglicherweise um Microvilli handelt, gefärbt (Abb. 3.29.).

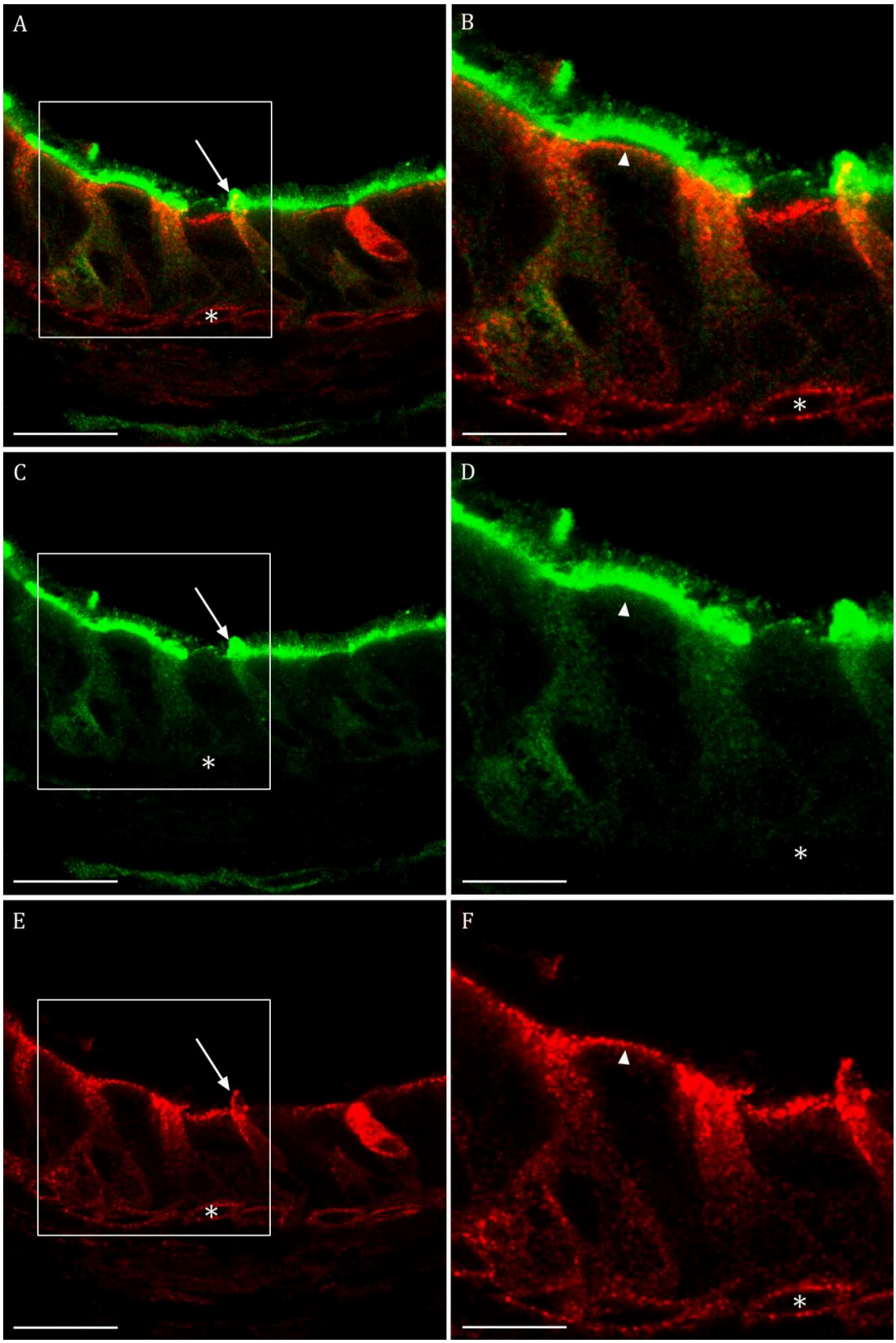

Abbildung 3.29.: Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen NK1R und IP3R3 im RE der Ratte. Abbildungen A+B stellen Überlagerungen von C+E bzw. D+F dar. Der Antikörper gegen IP3R3 (rot) färbt ein schmales Band im apikalen Teil von regulären Cilienzellen (Pfeilspitze), die Basalzellen (*) und Zellen im Epithel, die sich morphologisch von regulären Cilienzellen unterscheiden (Pfeil). Der rbNK1R Antikörper (grün) färbt die apikalen Fortsätze dieser Zellen (Pfeil). Weiterhin sind deren Zellkörper leicht gefärbt. In regulären Cilienzellen färbt rbNK1R ein Band über der IP3R3 Färbung und schwächer die kompletten Cilien. Größenbalken A/C/E: 20 µm, B/D/F: 10 µm.

3.2.2.4. Nachweis von NK1R im *Bulbus olfactorius*

Neben der Lokalisation des NK1 Rezeptors in der Nase (3.2.2.2., 3.2.2.3.) sollte im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden wo dieser Rezeptor im OB exprimiert wird.
Ähnlich wie im OE weisen auch hier die NK1R Antikörper ein heterogenes Färbemuster untereinander sowie zwischen Ratte und verschiedenen Mausstämmen auf (Abb. 3.30.-3.33.). Daher mussten auch im Bulbus die Färbungen auf ihre Spezifität überprüft werden. Bei Färbungen mit gtNK1R, rbNK1Rγ und gpNK1R PSL gibt es keine Unterschiede zwischen Ratte, C57BL/6, MF1 und den NK1R ko Tieren (Abb. 3.30.). Die mit rbNK1Rδ gefärbten Strukturen in der Mitralzellschicht (MCL) von C57BL/6 und MF1 Mäusen sind ebenfalls in den NK1R ko Tieren zu sehen (Abb. 3.31.). Das gleiche trifft für mit gpNK1Rγ gefärbte faserartige Strukturen, die von der äußeren plexiformen Schicht (EPL) in die Glomeruli ziehen, zu (Abb. 3.31.). Aufgrund der Färbungen in NK1R ko Tieren wurden alle in diesem Abschnitt aufgeführten Antikörper für die Lokalisation von NK1R im Bulbus ausgeschlossen.
Weiterhin wurde gpNK1Rβ „aussortiert", da in allen Tieren inklusive der NK1R ko Tiere die Schicht in welcher der olfaktorische Nerv verläuft (ONL) gefärbt ist (Abb. 3.31.). Eine diffuse Färbung in der EPL sieht man mit diesem Antikörper lediglich in der Ratte, aber in keinem der Mausstämme. Somit konnte die Spezifität nicht über einen Vergleich der Färbungen zwischen einem der beiden Wildtyp-Stämme und NK1R ko Tieren gesichert werden.
Im nächsten Schritt wurde das Kriterium der Reproduzierbarkeit der Färbungen überprüft. In vielen Fällen findet man eine diffuse Färbung, die sich vom Hintergrund abhebt, in der EPL oder in der ONL. Die Intensität dieser Färbung variiert zwischen den verschiedenen Antikörpern. Folgende Antikörper färben die EPL in der Ratte und/oder den Mäusen, nicht aber in den NK1R ko Tieren: gpNK1R (Abb. 3.32.; Ratte, C57BL/6), rbNK1R PSL (Abb. 3.32.; C57BL/6, MF1), rbNK1Rα (Abb. 3.32.; Ratte, C57BL/6), gpNK1Rβ (Abb. 3.31.; Ratte) und rbNK1R (Abb. 3.33.; Ratte, C57BL/6, MF1). Folgende Antikörper färben die ONL in der Ratte und/oder den Mäusen, nicht aber in den NK1R ko Tieren: rbNK1Rn (Abb. 3.33.; MF1) und rbNK1R PSL (Abb. 3.32.; Ratte, C57BL/6, MF1). Somit kann die Färbung in der EPL und ONL mit mehreren unabhängigen Antikörpern reproduziert werden.
Teilweise finden sich neben der diffusen Färbung in ONL und/oder EPL strukturierte Färbungen von Zellkernen und/oder –körpern (Abb. 3.32.; gpNK1R, rbNK1R PSL und Abb. 3.33.; rbNK1Rn), die jedoch auch in den NK1R ko Tieren zu sehen sind. Daher wurden auch diese Antikörper von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Mit dem Antikörper rbNK1Rα ist keine strukturierte Färbung zu erkennen (Abb. 3.32.). Lediglich rbNK1R färbt Zellen zwischen der Mitralzellschicht (MCL) und der Granulärzellschicht (GCL), die nicht in NK1R ko Tieren gefärbt werden (Abb. 3.33.). Diese Färbung hebt sich am deutlichsten in der Ratte vom Hintergrund ab. Obwohl diese Färbung mit keinem anderen Antikörper reproduziert werden konnte, wurde der rbNK1R Antikörper für die Lokalisation von NK1R im Bulbus aus folgenden Gründen verwendet: 1. Die Färbung in der EPL kann mit anderen Antikörpern reproduziert werden. 2. Die Färbung in EPL und Zellen zwischen MCL und GCL sieht in Ratte, C57BL/6 und MF1 Mäusen ähnlich aus. 3. Es ist keine Färbung in den NK1R ko Mäusen zu sehen. 4. Die Spezifität des Antikörpers wurde bereits auf mit NK1R transfizierten HEK293-Zellen (3.2.2.1.) sowie im RE und OE (3.2.2.2.) überprüft.

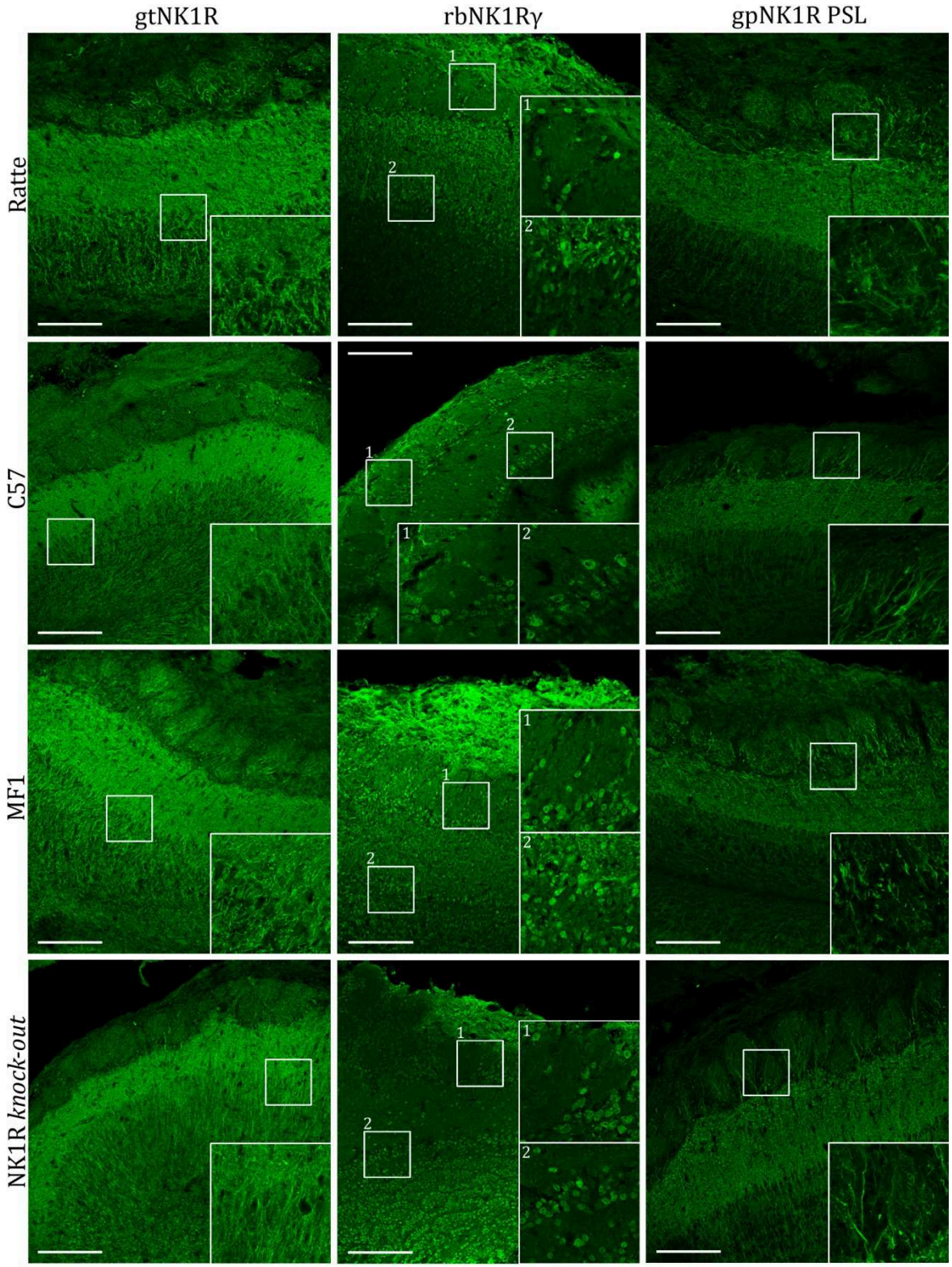

Abbildung 3.30.: Färbungen mit NK1R Antikörpern im OB der Ratte und Mäusen des Stammes C57BL/6, MF1 und NK1R ko (Teil 1). Größenbalken: 100 µm (für Vergrößerungen ca. 33 µm).

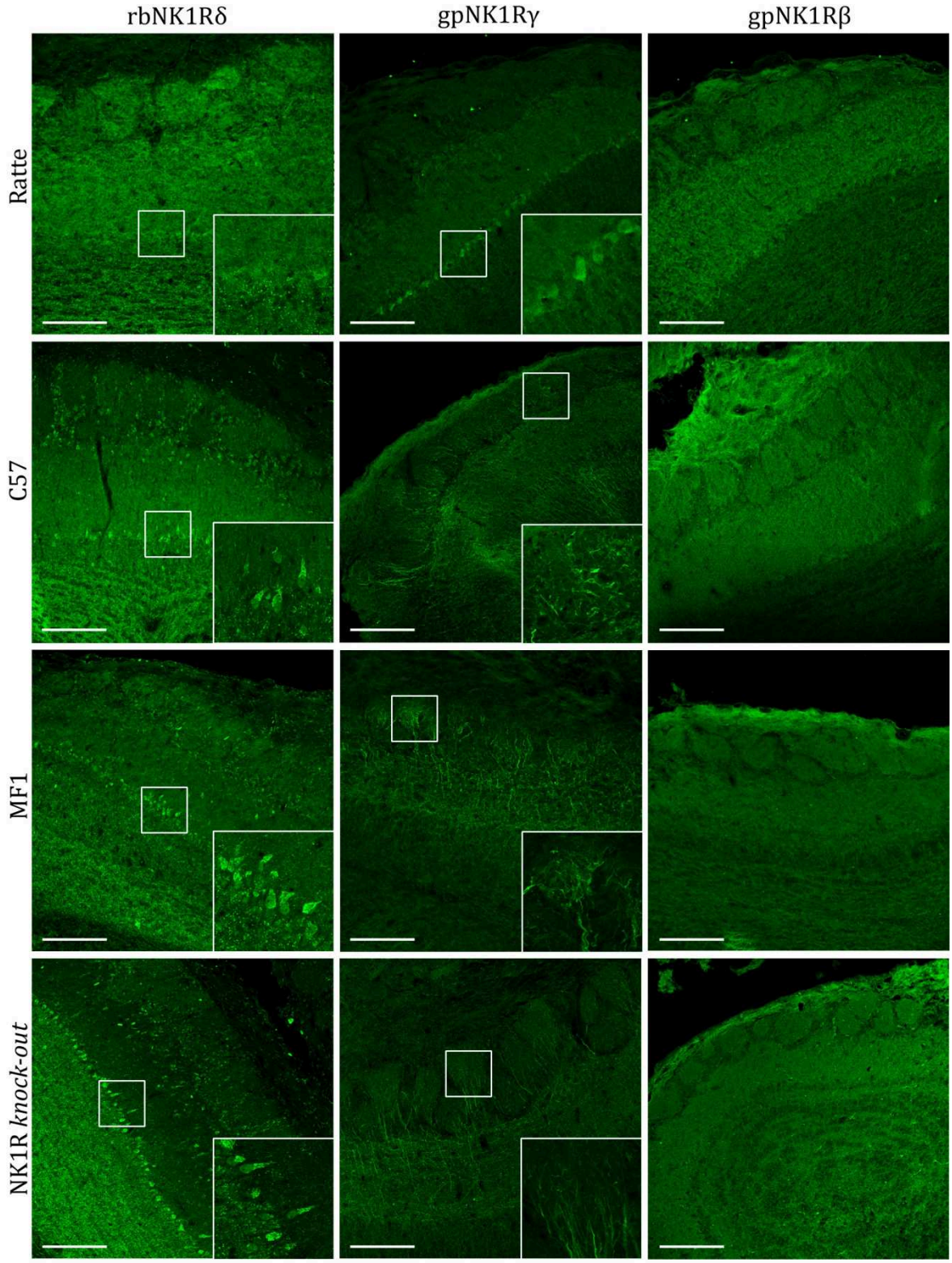

Abbildung 3.31.: Färbungen mit NK1R Antikörpern im OB der Ratte und Mäusen des Stammes C57BL/6, MF1 und NK1R ko (Teil 2). Größenbalken: 100 µm (für Vergrößerungen ca. 33 µm).

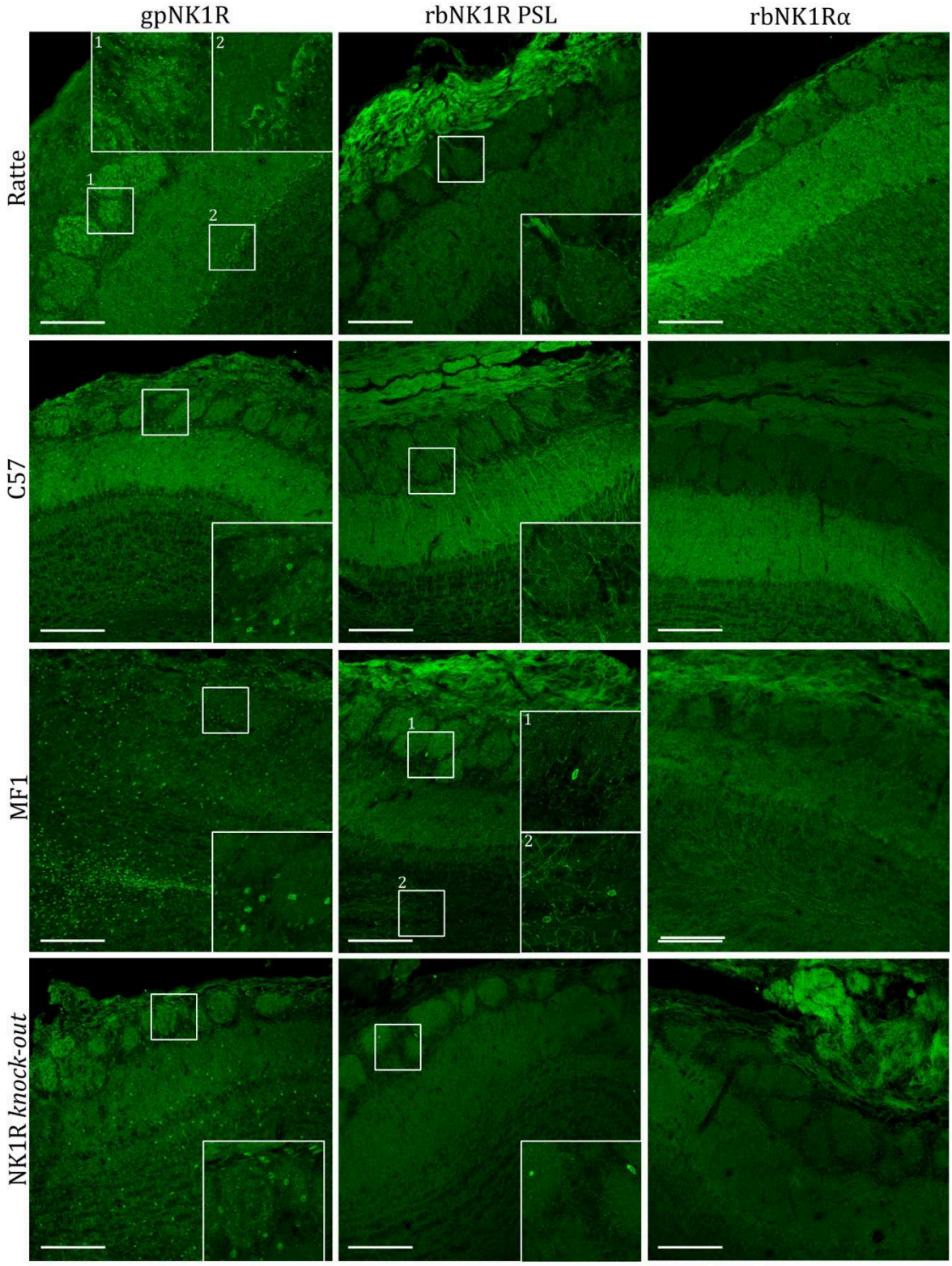

Abbildung 3.32.: Färbungen mit NK1R Antikörpern im OB der Ratte und Mäusen des Stammes C57BL/6, MF1 und NK1R ko (Teil 3). Größenbalken: 100 µm (für Vergrößerungen ca. 33 µm).

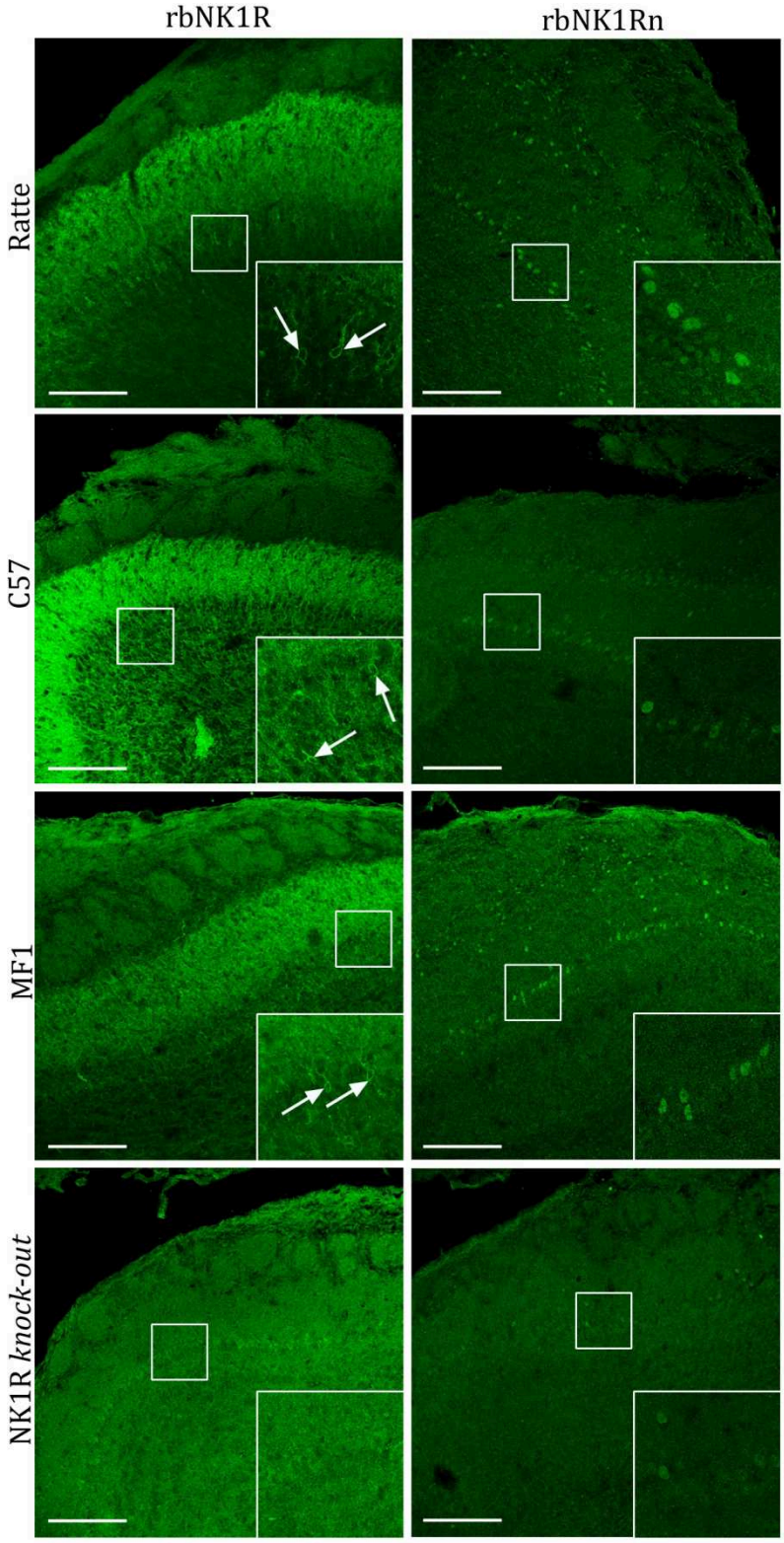

Abbildung 3.33.: Färbungen mit NK1R Antikörpern im OB der Ratte und Mäusen des Stammes C57BL/6, MF1 und NK1R ko (Teil 4). Die Pfeile markieren gefärbte Zellen zwischen der Mitral- und Granulärzellschicht. Größenbalken: 100 µm (für Vergrößerungen ca. 33 µm).

Eine eingehendere Betrachtung der Färbung mit rbNK1R im Bulbus der Ratte zeigt, dass die Zellen zwischen MCL und GCL eine membranständige Färbung aufweisen (3.34. A). Neben dieser Färbung und der diffusen Färbung in der EPL heben sich teilweise einzelne Glomeruli unterschiedlich stark von den anderen Glomeruli ab (3.34. B, 3.35. A, B). Mit höherer Vergrößerung ist zu erkennen, dass diese Färbung von faserartigen Strukturen, die von der EPL in die Glomeruli ziehen und dort stark verzweigen, herrührt (Abb. 3.34. B). Weiterhin findet man sehr selten juxtaglomeruläre Zellen und Fasern (Abb. 3.34. C+D), sowie große Zellen tief in der GCL (Abb. 3.34. E+F). Im nächsten Schritt sollte festgestellt werden, ob sich ein Bezug zwischen trigeminalen Fasern, die den Bulbus innervieren (3.1.3.), und den gefärbten Strukturen herstellen lässt. In unmittelbarer Nähe der gefärbten Zellen konnten nur sehr selten trigeminale Fasern gefunden werden, was eher auf Zufälle schließen lässt (nicht gezeigt). Da die trigeminale Innervation in den Glomeruli am stärksten zu sein scheint und sich manche Glomeruli bei einer Färbung mit rbNK1R abheben, wurde überprüft, ob hier ein Zusammenhang bestehen könnte. Die Verteilung der mit rbNK1R gefärbten Glomeruli korreliert nur teilweise mit dem Muster der trigeminal innervierten Glomeruli (Abb. 3.35.). Oft werden NK1R-positive Glomeruli gefunden, die von sich stark verzweigenden trigeminalen Fasern durchzogen werden (* in Abb. 3.35. A, C, E). Es gibt aber auch teilweise trigeminal innervierte Glomeruli, die NK1R-negativ sind (nicht gezeigt) sowie mit rbNK1R gefärbte Glomeruli, die keine trigeminalen Fasern aufweisen (** in Abb. 3.35. B, D, F).

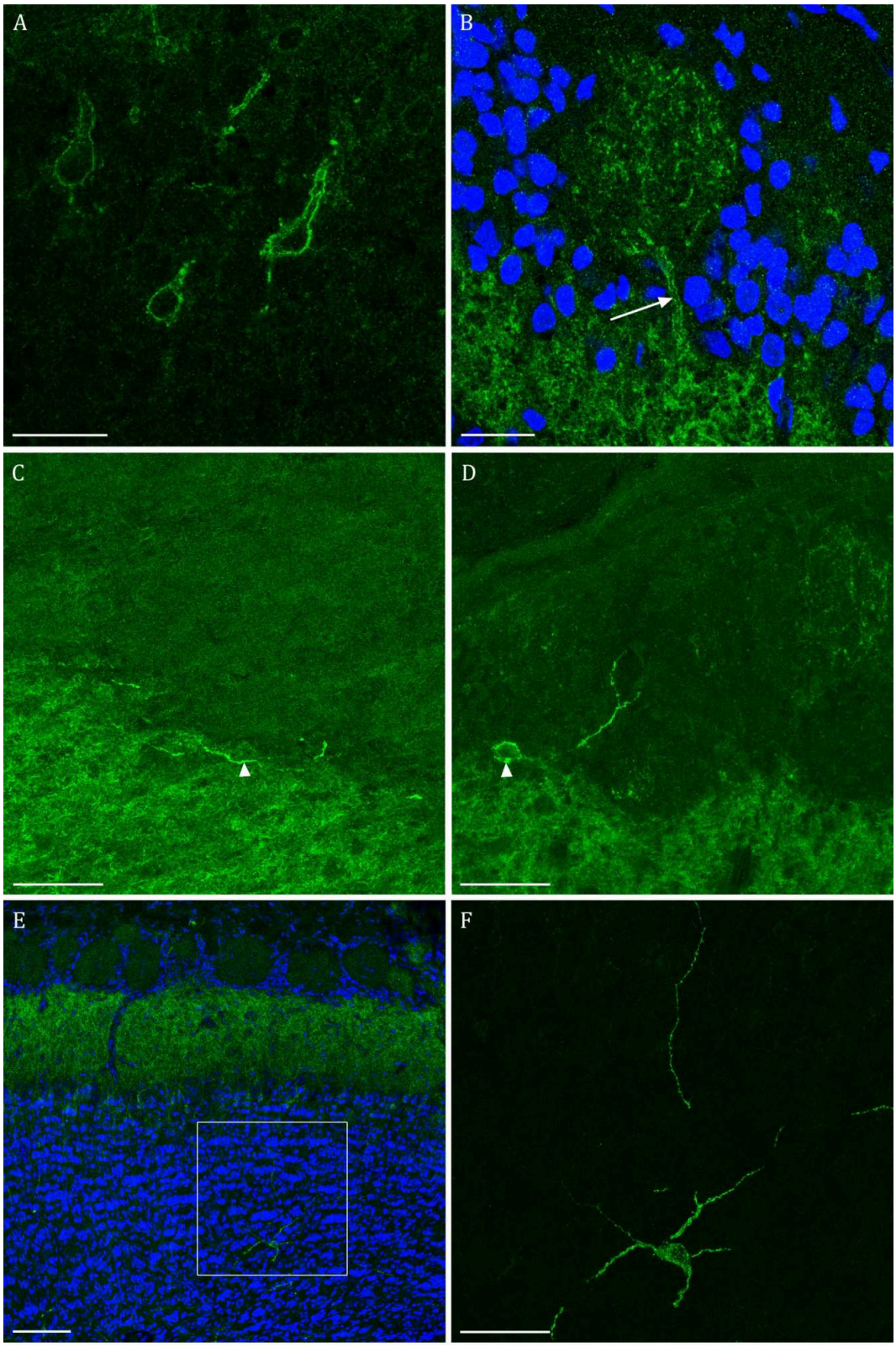

Abbildung 3.34.: Details der Färbung mit rbNK1R (grün) im OB der Ratte. Kerne sind mit ToPro®-3 gefärbt (blau). An Zellen zwischen der Mitral- und Granulärzellschicht lässt sich eine deutliche Membranfärbung erkennen (A). Teilweise sind faserartige Strukturen gefärbt, die aus der äußeren plexiformen Schicht in die Glomeruli ziehen (Pfeil) und dort stark verzweigen (B). Weiterhin findet man selten feinere faserartige Strukturen zwischen äußerer plexiformer Schicht und den Glomeruli (Pfeilspitze C), die vermutlich zu juxtaglomerulären Zellen (Pfeilspitze D) gehören. Tief in der Granulärzellschicht gibt es vereinzelt große gefärbte Zellen (E+F). Größenbalken A+B: 20 µm, C/D/F: 50 µm, E: 100 µm.

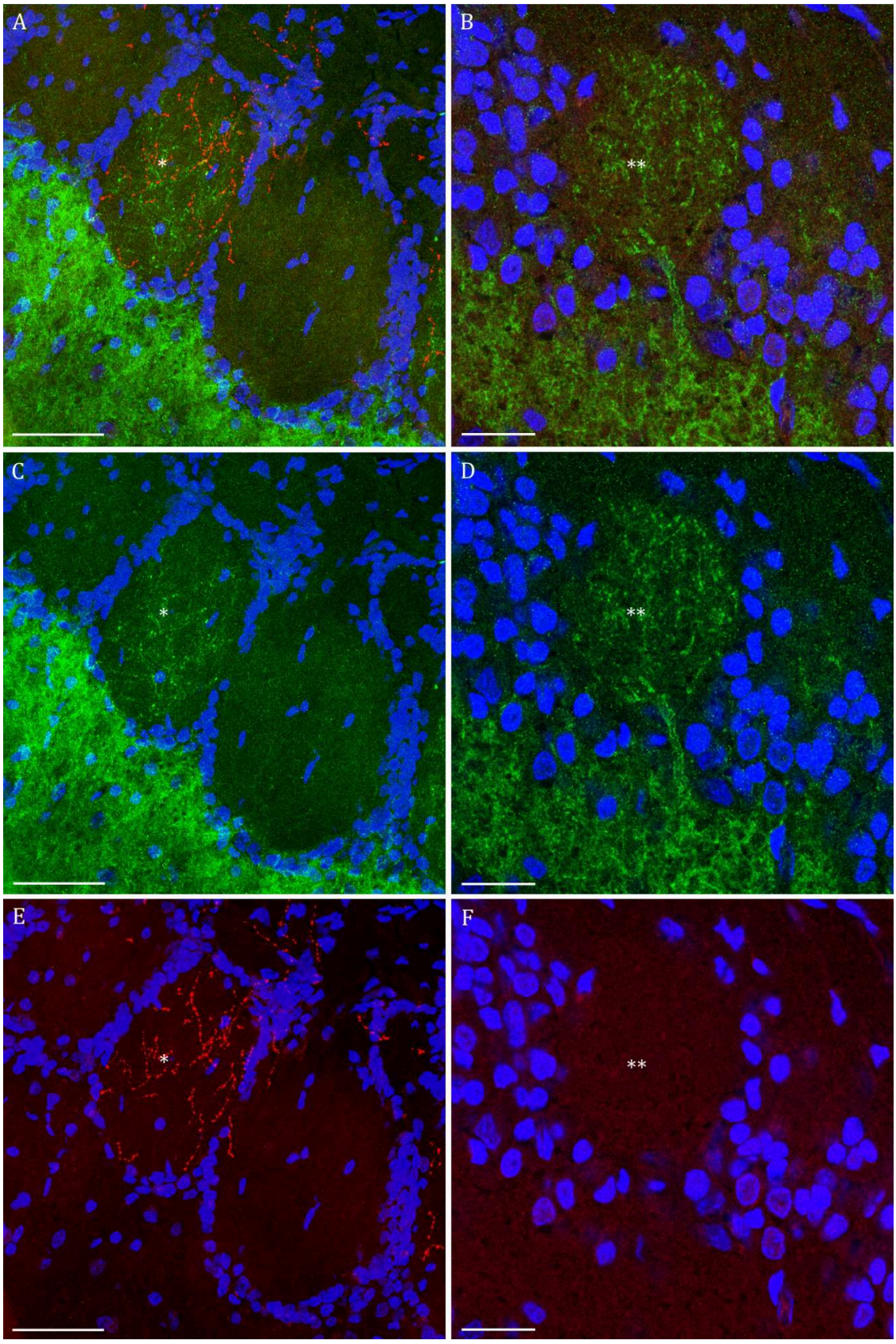

Abbildung 3.35.: Trigeminale Innervation der NK1R-positiven Glomeruli. Trigeminale Fasern sind mit einem Antikörper gegen CGRP gefärbt (rot). Kerne sind mit ToPro®-3 gefärbt (blau). Glomeruli, die mit dem rbNK1R Antikörper gefärbt werden (grün), sind teilweise sehr stark trigeminal innerviert (A, C, E *), können aber auch nicht innerviert sein (B, D, F **). Abbildungen A+B stellen Überlagerungen von C+E bzw. D+F dar. Größenbalken A, C, E: 50 µm, B, D, F: 20 µm.

Um herauszufinden welche Zellen im OB mit dem rbNK1R Antikörper gefärbt werden, wurden verschiedene Mehrfachfärbungen durchgeführt.
Im ersten Schritt wurden Schnitte durch den Bulbus von TN-L15 Mäusen gefärbt. Diese Mäuse exprimieren unter dem Thy1-Promotor den FRET-basierten genetisch kodierten Ca^{2+}-Sensor TN-L15 mit einem CFP/YFP-Donor/Empfänger-Paar. Die beiden Fluoreszenzproteine können mit Antikörpern gegen GFP nachgewiesen werden. Im Bulbus von TN-L15 Mäusen färben Antikörper gegen GFP Mitralzellen sowie kleinere Zellen in der GCL (Abb. 3.36. A-D). Des Weiteren erkennt man eine Färbung in der EPL, die im oberen Teil nahe den Glomeruli eine Aussparung aufweist (Abb. 3.36. Doppelpfeil in A+C). Doppelfärbungen mit dem rbNK1R und dem GFP Antikörper zeigen keine Colokalisation von NK1R und dem Sensor in den Zellen (Abb. 3.36. A+B). Wie die Morphologie der mit rbNK1R gefärbten Zellen zwischen GCL und MCL schon vermuten lässt, handelt es sich hierbei also anscheinend nicht um Mitralzellen. Auch bei den mit dem GFP Antikörper gefärbten kleineren Zellen handelt es sich nicht um rbNK1R-positive Zellen. Außerdem scheinen auch in der EPL NK1R und der Sensor nicht vollständig colokalisiert zu sein. Mit dem rbNK1R Antikörper wird die EPL mehr oder weniger einheitlich bis zu den Glomeruli hin angefärbt (Abb. 3.36. A+E).
Doppelfärbungen mit dem rbNK1R Antikörper und einem Calretinin Antikörper im Bulbus der Ratte zeigen, dass es neben Zellen, die nur Calretinin-positiv sind und Zellen, die nur rbNK1R-positiv sind, auch Zellen in der GCL gibt, in denen NK1R und Calretinin colokalisiert sind (Abb. 3.37.).Calretinin ist ein Ca^{2+}-bindendes Protein, das im Bulbus der Ratte in diversen Zelltypen vorkommt (Briñón et al., 1999). Zwischen MCL und GCL findet man es vor allem in Granulärzellen. Vermutlich handelt es sich also bei den rbNK1R-positiven Zellen zwischen MCL und GCL um eine Subpopulation selbiger.
Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterhin Mehrfachfärbungen mit rbNK1R und anderen Zellmarkern im OB der Ratte durchgeführt. Es konnte keine Colokalisation zwischen NK1R und Tyrosinhydroxylase, einem Enzym das an der Synthese von Katecholaminen beteiligt ist, sowie Calbindin D-28k, einem weiteren Ca^{2+}-bindenen Protein, festgestellt werden (nicht gezeigt).
Da die selten vorkommenden mit rbNK1R gefärbten juxtaglomerulären Zellen in keiner der Mehrfachfärbungen mit eben genannten Antikörpern angefärbt werden, konnten sie hier nicht näher klassifiziert werden. Das gleiche gilt für die sehr großen Zellen, die sich tief in der GCL befinden.

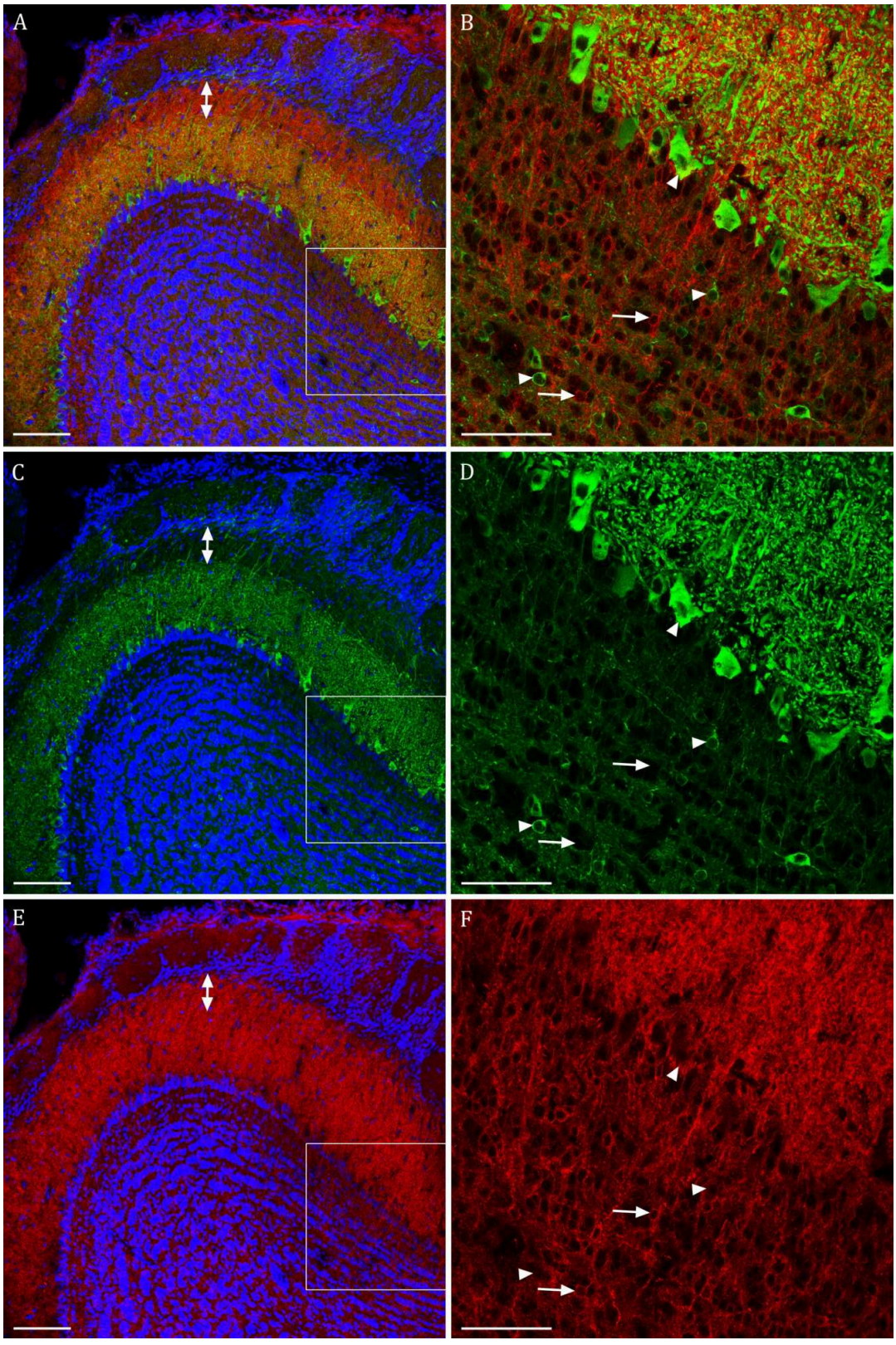

Abbildung 3.36.: Färbung mit rbNK1R (rot) im OB einer TN-L15 Maus. Kerne sind mit ToPro®-3 gefärbt (blau). Zellen, die unter dem Thy1-Promotor TN-L15 exprimieren, sind mit einem Antikörper gegen GFP gefärbt (grün). Abbildungen A+B stellen Überlagerungen von C+E bzw. D+F dar. Auf der Übersichtsaufnahme (A/C/E) erkennt man, dass die äußerste Schicht der äußeren plexiformen Schicht nur mit rbNK1R angefärbt wird, nicht aber mit dem GFP Antikörper (Doppelpfeil). In der Detailaufnahme (B/D/F) sind Zellen markiert, die nur mit dem GFP Antikörper (Pfeilspitzen) bzw. nur mit rbNK1R (Pfeile) gefärbt werden. In keinem Fall kann eine Colokalisation festgestellt werden. Größenbalken A/C/E: 100 µm, B/D/F: 50 µm.

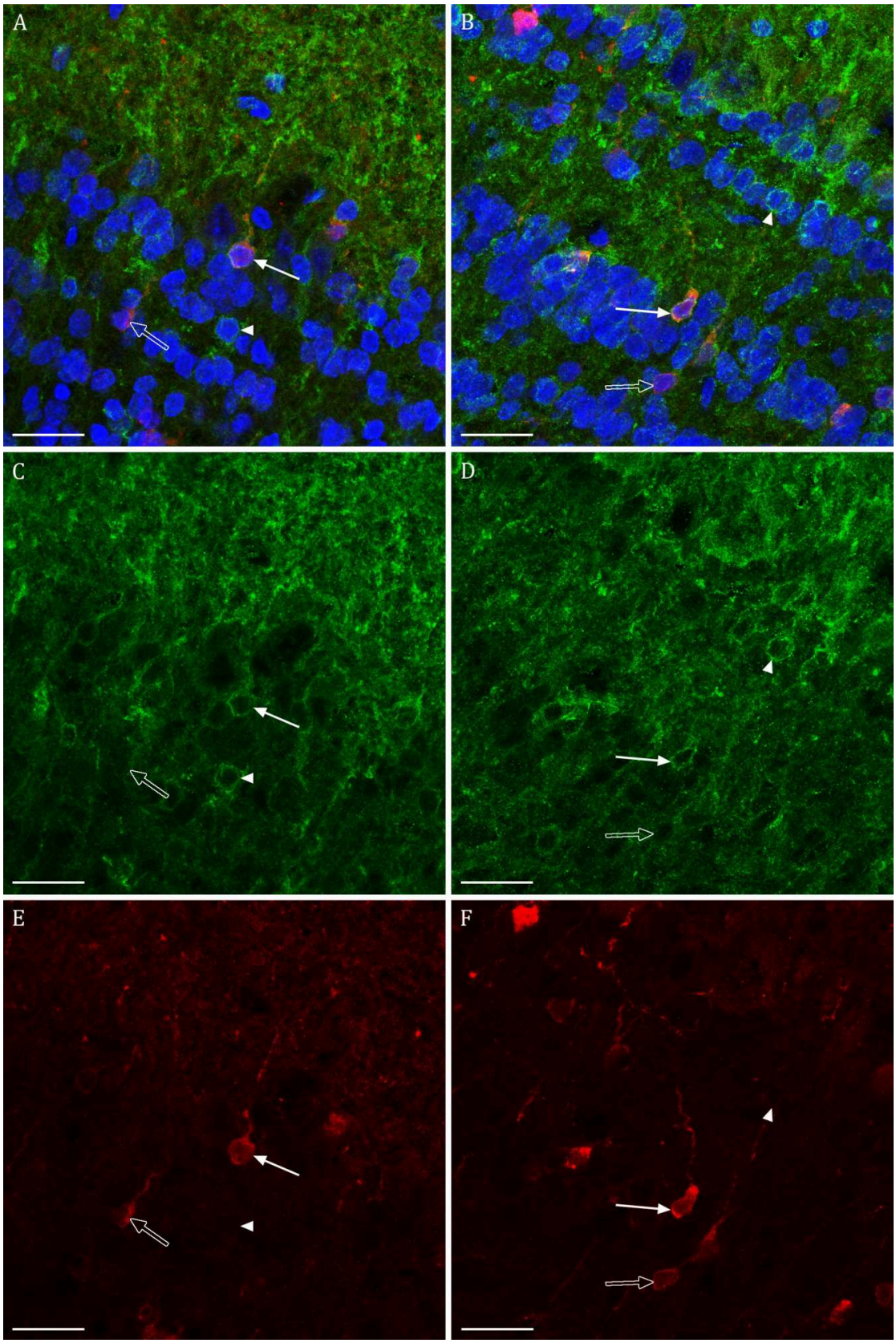

Abbildung 3.37.: Doppelfärbung mit dem rbNK1R Antikörper (grün) und einem Antikörper gegen Calretinin (rot) im OB der Ratte. Kerne sind mit ToPro®-3 gefärbt (blau). Abbildungen A+B zeigen Detailaufnahmen von zwei unterschiedlichen Stellen zwischen Mitral- und Granulärzellschicht und stellen Überlagerungen von C+E bzw. D+F dar. Man findet neben Zellen, die nur mit rbNK1R gefärbt werden (Pfeilspitzen) und Zellen, die nur mit dem Calretinin Antikörper gefärbt werden (nicht-ausgefüllte Pfeile), auch Zellen, in welchen es eine Colokalisation von rbNK1R und Calretinin gibt (ausgefüllte Pfeile). Größenbalken A-F: 20 µm.

3.3. Analyse der Calcium-Antworten in mit NK1R transfizierten HEK293-Zellen

Bevor die Wirkung trigeminaler Peptide *in situ* auf Schnitten durch das OE getestet wurde (3.4.), sollte die Ca^{2+}-Antwort auf SP in den mit NK1R transfizierten HEK293-Zellen (2.4.) charakterisiert werden. Hierfür wurden zunächst über Ca^{2+}-Fluorimetrie (2.7.) Dosis-Wirkungskurven für den humanen (Abb. 3.38.) und den murinen (nicht gezeigt) NK1R erstellt. Die auf den höchsten gemessenen Wert normierten Fluoreszenzwerte von Fluo-4 wurden gegen die Konzentrationen der applizierten SP-Lösungen aufgetragen. Mit steigender SP-Konzentration steigt auch die Fluoreszenz und folglich die Ca^{2+}-Konzentration in den Zellen an. Die gefittete Kurve folgt einem typischen sigmoidalen Verlauf, der bei hohen Konzentrationen in die Sättigung geht. Die Form der Kurven von humanem und murinem NK1R unterscheidet sich kaum (nicht gezeigt). Der ermittelte EC_{50}-Wert, bei dem die halbmaximale Antwort auf SP erreicht wird, liegt bei 1,4 nM für den humanen bzw. 2,2 nM für den murinen NK1R. Dies entspricht in etwa dem Wert, der mit ähnlichen Methoden in einer anderen Studie ermittelt wurde. Hier wurde für NK1R ein EC_{50}-Wert von 4 nM angegeben (Lai et al., 2008). Als Negativkontrolle wurde das gleiche Experiment mit nicht-transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Hier konnte kein Anstieg der Fluoreszenz nach Applikation von SP festgestellt werden (nicht gezeigt).

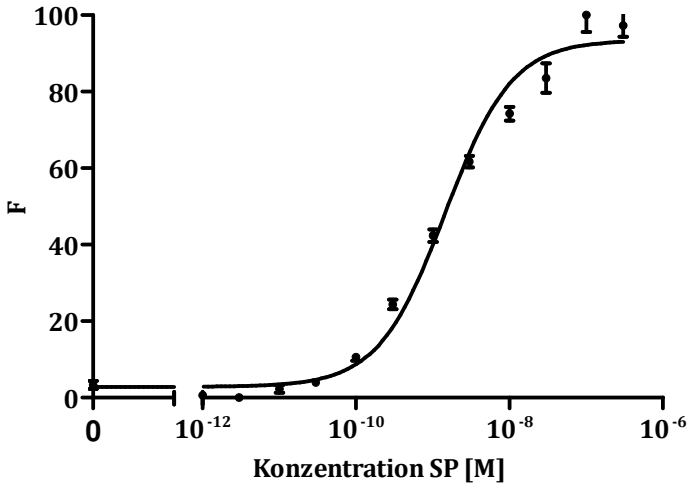

Abbildung 3.38.: Dosis-Wirkungskurve von humanem NK1R für SP in transfizierten HEK293-Zellen. Die normierten Fluoreszenzwerte (F) wurden gegen die verschiedenen applizierten Konzentrationen von SP aufgetragen. Der EC_{50}-Wert liegt bei 1,4 nM.

Im nächsten Schritt wurde die Ca^{2+}-Antwort auf verschiedene Konzentrationen SP in einzelnen Zellen (2.8.1.) charakterisiert. Hierfür wurde jede Zelle dreimal hintereinander jeweils von Auswaschphasen mit ES gefolgt mit der gleichen Konzentration SP stimuliert. Die Versuche wurden an verschiedenen Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen SP (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM) durchgeführt. Ausgewertet wurden nur die Zellen, die bei jeder der drei aufeinanderfolgenden SP-Applikationen geantwortet haben. In fast allen Fällen fällt die Amplitude der Antwort bei wiederholter Stimulation ab (d.h. die zweite Antwort ist kleiner als die erste und die dritte kleiner als die zweite). Die Ursache hierfür könnten diverse Adaptationsmechansimen oder sogenannte *run-down* Effekte sein. Prinzipiell lassen

sich grob zwei Antwort-Typen unterscheiden (Abb. 3.39.). Zellen, deren Antworten hier dem Typ 1 zugewiesen werden, reagieren relativ schnell und langanhaltend auf SP mit einem intrazellulären Ca^{2+}-Anstieg. Zusätzlich sind oft Oszillationen der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration zu beobachten (Abb. 3.39. links).
Ähnliche Oszillationen kann man auch in Zellen beobachten, die andere Rezeptoren, beispielsweise Octopamin Rezeptoren, exprimieren. Hier konnte nachgewiesen werden, dass die Oszillationen durch Desensitivierung und Sensitivierung aufgrund von Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Rezeptors zustande kommen (Hoff et al., 2011). Die Vermutung liegt nahe, dass bei den Oszillationen, die man bei Stimulation der NK1 Rezeptoren sieht, ähnliche Mechanismen eine Rolle spielen. Entsprechende Experimente mit Inhibitoren von Proteinkinasen wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt. Weiterhin konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass auch einige andere nicht-neuronale Zellen Ca^{2+}-Oszillationen aufweisen, die entweder auf pulsatiler Ausschüttung von Ca^{2+} aus internen Speichern oder dem periodischen Einstrom von Ca^{2+} über die Zellmembran basieren (Berridge, 1993). In beiden Fällen bilden komplizierte Wechselwirkungen, an denen Ca^{2+} und IP3 beteiligt sind, die Grundlage hierfür. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass den Ca^{2+}-Oszillationen in mit NK1R transfizierten HEK293-Zellen ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegt.
Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Ca^{2+}-Oszillationen treten lediglich bei der ersten Applikation von SP auf. Bei der zweiten und dritten Applikation von SP sind die Oszillationen meist nicht mehr zu erkennen.
Zellen mit dem Antwort-Typ 2 reagieren erst spät mit einem kurzfristigen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration. Daneben gibt es auch vereinzelt Antworten, die keinem der beiden Antwort-Typen eindeutig zugeordnet werden können (nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Antwort-Typen könnte in einer heterogenen Verteilung der Rezeptordichte in den verschiedenen Zellen liegen.

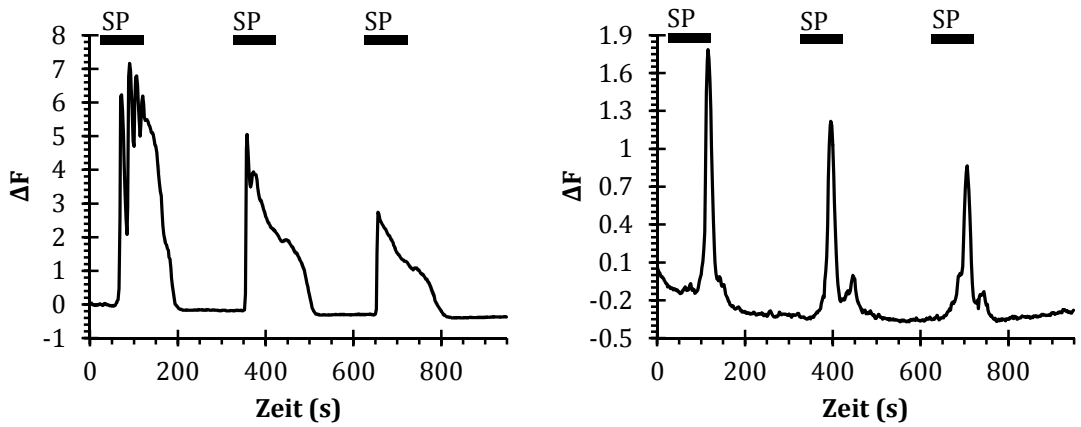

Abbildung 3.39.: Calcium-Antworten auf 1 µM SP in mit NK1R transfizierten HEK293-Zellen. Dargestellt sind Ca^{2+}-Antworten vom Typ 1 (links) und Typ 2 (rechts) in verschiedenen Zellen.

Die beiden Beispiele in Abbildung 3.39. zeigen Ca^{2+}-Antworten vom Typ 1 und 2 in Zellen, die mit 1 µM SP stimuliert wurden. Die Amplitude der Ca^{2+}-Signale bei der ersten Applikation von 1 µM SP liegt für Typ 1 zwischen 200% und 700%, für Typ 2 zwischen 100% und 250%. Ähnliche Antworten findet man auch bei Versuchen mit 10 nM und 100 nM SP. Ein Unterschied zwischen Versuchen mit verschiedenen

Konzentrationen von SP lässt sich weder in Bezug auf die Amplitude, noch den Typ der Antworten feststellen. Keine Antworten können mit 1 nM SP ausgelöst werden, obwohl dies nach Bestimmung der Dosis-Wirkungskurve (Abb. 3.38.) möglich sein sollte. Die Ursache könnte darin liegen, dass im Gegensatz zu den Experimenten am Fluorimeter (2.7.) bei Einzelzellmessungen (2.8.1.) nicht direkt appliziert wurde, sondern die Substanzen über ein Perfusionssystem zugeführt wurden. Es könnte sein, dass sich das Peptid SP an den Kunststoffschläuchen festsetzt, wodurch ein Konzentrationsabfall entsteht und somit eine geringere Konzentration von SP an den Zellen ankommt.
Des Weiteren sollte festgestellt werden welcher Signalweg der Antwort auf SP in mit NK1R transfizierten HEK293 Zellen zugrunde liegt. Da der NK1R Rezeptor in den meisten Fällen an den IP3-Weg gekoppelt ist (1.2.3.), wurden pharmakologische Experimente mit einem Inhibitor der Phospholipase C (PLC) durchgeführt. Hierfür wurde der PLC-Inhibitor U-73122 (5 µM) vor und während der zweiten SP-Applikation (1 µM) eingespült. Die zweite Antwort auf SP konnte so in fast allen Fällen (n = 31/32) komplett inhibiert werden. Abbildung 3.40. zeigt zwei Beispiele von Zellen mit Antworten vom Typ 1 und 2.
Die Ergebnisse der pharmakologischen Experimente deuten darauf hin, dass der Antwort auf SP die Freisetzung von Ca^{2+} durch IP3 aus internen Speichern zugrunde liegt. Mögliche *run down* Effekte (s.o.) könnten also auf eine Entleerung der internen Ca^{2+}-Speicher zurückzuführen sein. Eine weitere Ursache für diese Effekte könnte jedoch auch z.B. die Internalisierung von NK1 Rezeptoren sein.

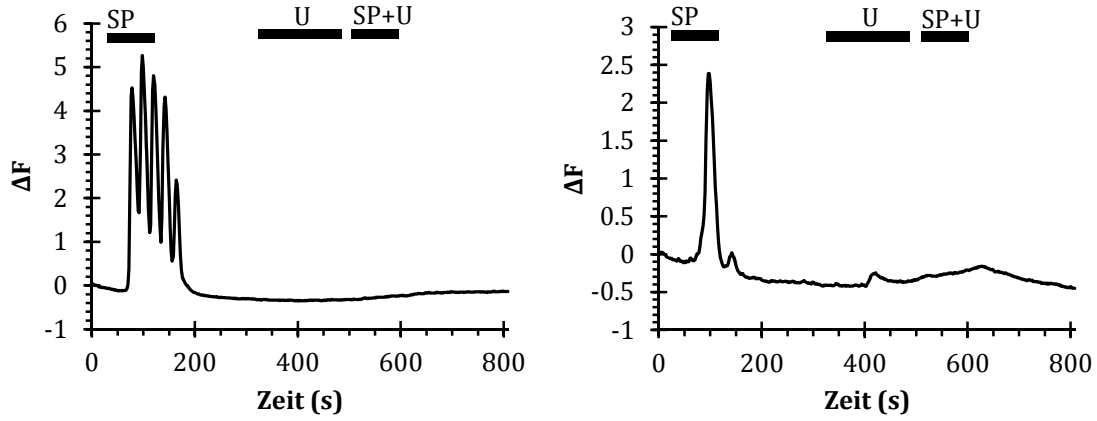

Abb. 3.40.: Blockierung der Antwort auf 1 µM SP durch den PLC-Inhibitor U-73122 (5 µM) in mit NK1R transfizierten HEK293-Zellen. Die beiden Beispiele zeigen Blockierung der SP-Antwort in Zellen vom Antwort-Typ 1 (links) und 2 (rechts). U = U-73122 (5 µM).

3.4. Analyse der Calcium-Antworten im olfaktorischen Epithel

Bisher ist über die Wirkung trigeminaler Peptide im OE nur wenig bekannt (1.3.). Es konnte bereits gezeigt werden, dass trigeminale Peptide die Summenantwort des OE im Elektroolfaktogramm verändern (Daiber et al., 2012). Weiterhin wurde dort gezeigt, dass zumindest CGRP selbst eine duftstoffähnliche Antwort hervorruft. In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von SP und CGRP auf Einzelzellebene mithilfe von Ca^{2+}-Imaging Experimenten an intakten Schnitten des OE (2.8.2.) charakterisiert werden.
Sowohl die Applikation von CGRP als auch von SP führte zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration in manchen Zellen (Abb. 3.41.). Da zum einen die Größe der Antworten zwischen unterschiedlichen Schnitten aber auch zwischen verschiedenen Zellen im gleichen Schnitt stark variiert und zum anderen Bewegungen in den Schnitten zu einem Drift der Basislinie führen, wurde von quantitativen Auswertungen abgesehen. Auffällig ist jedoch, dass innerhalb einer Zelle die Antworten auf die trigeminalen Peptide in etwa in der gleichen Größenordnung liegen wie die Antworten auf die Duftstoffmischung „Henkel 97". Auch die Dynamik der Antworten auf trigeminale Peptide ist vergleichbar mit der Duftstoffantwort. Nach einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration fällt diese langsam wieder ab. Oszillationen, wie sie in den mit NK1R transfizierten HEK293-Zellen auftreten (3.3.), konnten hier nicht festgestellt werden. Dies könnte entweder daran liegen, dass die Oszillationen in diesem Fall nicht aufgelöst werden können (weil sie zu klein und/oder zu hochfrequent sind) oder, dass hier aufgrund von unterschiedlichen Signalwegen und/oder Mechanismen der Ca^{2+}-Freisetzung (im Vergleich zu denen in HEK293-Zellen) keine Oszillationen auftreten.
In die Auswertung wurden nur Zellen mit einbezogen, die eine Hoch-K^+ (50 mM K^+) Antwort aufwiesen (n_{SP} = 191, n_{CGRP} = 284). Nicht alle Zellen, die auf die Duftstoffmischung reagierten, antworteten auch auf die trigeminalen Peptide. Die Tabellen 3.1. und 3.2. geben einen Überblick darüber, welche „Antwort-Kombinationen" in wie vielen Zellen beobachtet werden konnten. Im Fall von SP antworteten 31% (n = 11/36) der Zellen, die eine Duftstoffantwort zeigten, auf das Peptid, im Fall von CGRP 13% (n = 4/31). Weiterhin gab es Zellen, die nur auf SP und Hoch-K^+ Lösung, nicht jedoch auf die Duftstoffmischung reagierten (Abb. 3.42., n = 5/191).

Tabelle 3.1.: Anzahl der Zellen im OE der Maus, die auf SP bzw. „Henkel 97" antworteten (von allen Zellen, die auf Hoch-K^+ antworteten n = 191).

	Henkel -	**Henkel +**	**∑**
SP +	5	11	16
SP -	150	25	175
∑	155	36	191

Tabelle 3.2.: Anzahl der Zellen im OE der Maus, die auf CGRP bzw. „Henkel 97" antworteten (von allen Zellen, die auf Hoch-K^+ antworteten n = 284).

	Henkel -	**Henkel +**	**∑**
CGRP +	0	4	4
CGRP -	253	27	280
∑	253	31	284

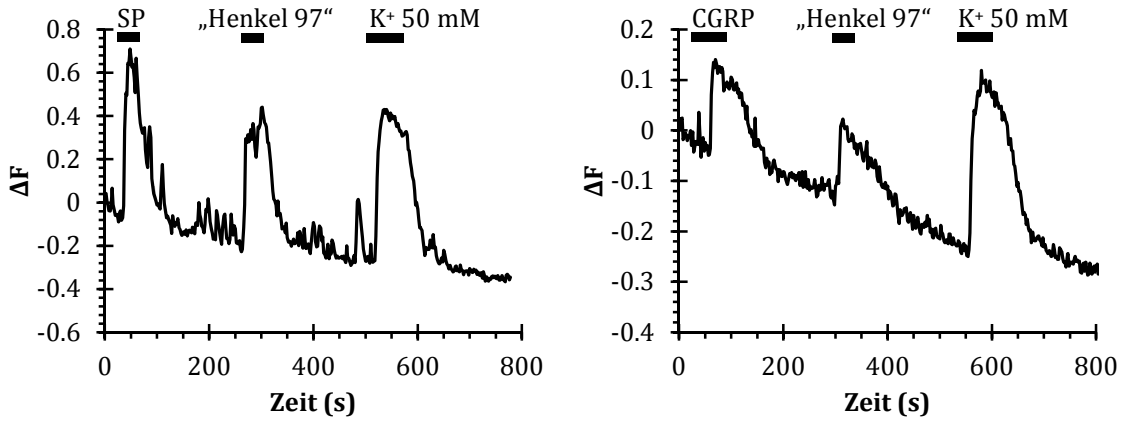

Abb. 3.41.: Ca^{2+}-Antworten auf 1 µM SP (links) bzw. 1 µM CGRP (rechts), „Henkel 97“ und Hoch-K^+ Lösung (K^+ 50 mM) in Zellen des OE der Maus.

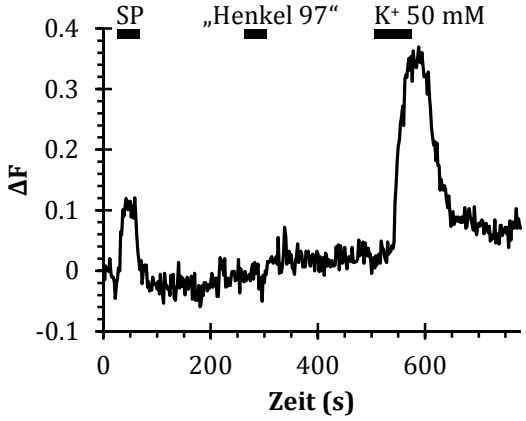

Abb. 3.42.: Ca^{2+}-Antworten auf 1 µM SP und Hoch-K^+ Lösung (K^+ 50 mM) in einer Zelle des OE der Maus, die nicht auf „Henkel 97“ reagiert.

Im nächsten Schritt sollte getestet werden, ob es sich bei den Zellen, die auf SP bzw. CGRP antworten, um die gleichen Zellen handelt. Abbildung 3.43. zeigt exemplarisch eine Zelle, die sowohl auf SP als auch auf CGRP mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration antwortete. Ausgewertet wurden 493 Zellen, die auf Hoch-K^+ reagierten. Davon antworteten 55 auf „Henkel 97“. Tabelle 3.3. gibt einen Überblick darüber wie viele von diesen Zellen auf SP und/oder CGRP geantwortet haben. Von allen Zellen, die auf mindestens eines der trigeminalen Peptide antworteten, reagierten 44% auf beide Peptide (n = 7/16). Nur auf SP und die Duftstoffmischung reagierten 38% der Zellen (n = 6/16). Nur auf CGRP und die Duftstoffmischung reagierten 19% der Zellen (n = 3/16). Weiterhin gab es jeweils eine Zelle, die nicht auf die Duftstoffmischung antwortete, aber auf SP und/oder CGRP.
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unterschiedliche Antwortmuster beobachtet werden können und es sich deshalb um verschiedene Subpopulationen von Zellen im OE der Maus handeln könnte, die auf trigeminale Peptide reagieren. In den meisten Fällen können diese Zellen auch auf Duftstoffe reagieren.

Tabelle 3.3.: Anzahl der Zellen im OE der Maus, die auf CGRP bzw. SP antworteten (von allen Zellen die auf Hoch-K^+ und mindestens eines der beiden Peptide antworteten n = 16).

	SP +	**SP -**	**∑**
CGRP +	7	3	10
CGRP -	6		6
∑	13	3	16

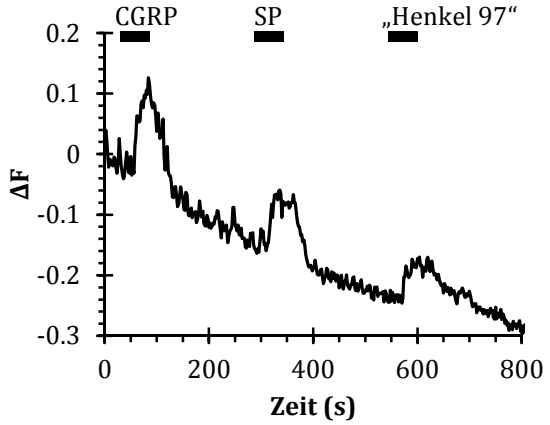

Abb. 3.43.: Ca^{2+}-Antworten auf 1 µM CGRP, 1 µM SP und „Henkel 97“ in einer Zelle des OE der Maus.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen immunhistochemischen Untersuchungen an Schnitten durch das OE der Ratte weisen darauf hin, dass der SP Rezeptor NK1R in microvilliären Zellen des OE mit einem G-Protein der Familie $G_q/_{11}$, mit PLCβ2 und mit IP3R3 coexprimiert wird (3.2.2.3. Abb. 3.23., 3.25., 3.27.). Um festzustellen, ob den Ca^{2+}-Antworten einzelner Zellen des OE auf SP der IP3-Signalweg (1.2.3. Abb. 1.7.) zugrunde liegt, wurden analog den Experimenten an mit NK1R transfizierten HEK293-Zellen (3.3.) Versuche mit dem PLC-Inhibitor U-73122 durchgeführt.
Zuerst wurde überprüft, ob die Zellen im OE auf mehrfache Applikation von SP reagieren. In Abbildung 3.44. (links) ist ein Beispiel hierfür gezeigt, das belegt, dass es möglich ist die Zellen nach einer Auswaschphase mit S1 Lösung wiederholt mit SP zu stimulieren (n = 5). Danach wurde U-73122 appliziert, um die SP-Antworten zu blockieren. Die Antworten auf SP konnten in allen 5 Zellen, die auch auf „Henkel 97“ und Hoch-K^+ reagierten, vollständig mit U-73122 inhibiert werden (n = 5/5). Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 3.44. (rechts) gezeigt. Die Ca^{2+}-Antworten auf SP sind folglich PLC-abhängig. Dieses Ergebnis unterstützt die auf der Immunhistochemie basierende Schlussfolgerung, dass der SP Rezeptor NK1R in Zellen exprimiert wird, die oben genannte Komponenten des IP3-Signalweges coexprimieren. Hegg et al. (2010) untersuchten wie diese Zellen auf ATP und Duftstoffe reagieren und erwähnen dabei ebenfalls Antworten auf SP.

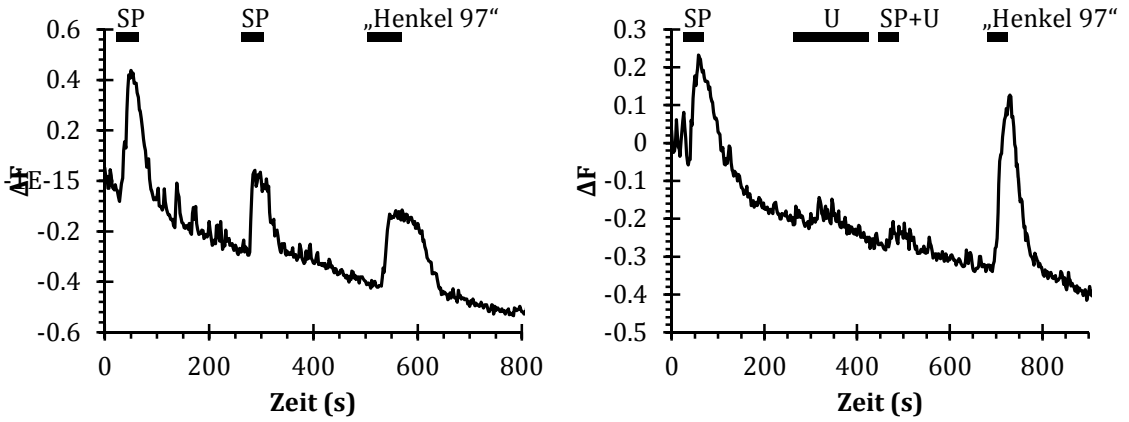

Abb. 3.44.: Ca^{2+}-Antworten auf wiederholte Applikation von 1 µM SP und „Henkel 97“ (links) und Blockierung der zweiten Antwort auf 1 µM SP durch den PLC-Inhibitor U-73122 (5 µM) (rechts) in Zellen des OE der Maus. U = U-73122 (5 µM).

Der von der PLC ausgehende Signalweg ist wie eingangs beschrieben gegabelt (1.2.3.). Neben IP3 kann auch Diacylglycerin (DAG) als Hydrolyseprodukt der PLC entstehen. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die ihrerseits unter anderem die Öffnungswahrscheinlichkeit von verschiedenen Kanälen durch deren Phosphorylierung beeinflussen kann. Weiterhin kann DAG selbst Kanäle, wie beispielsweise TRPC6 aktivieren, was eine Depolarisation und somit den Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsgesteuerte Kanäle hervorrufen kann (Hofmann et al., 1999). Somit könnte der beobachtete PLC-abhängige Ca^{2+}-Anstieg entweder aufgrund der Freisetzung von Ca^{2+} aus internen Speichern durch IP3 entstehen oder aufgrund von Ca^{2+}-Einstrom durch Kanäle in der Zellmembran. Um zu testen inwieweit die Ca^{2+}-Antworten auf SP von Ca^{2+}-Freisetzung aus internen Speichern getragen werden, wurden Versuche durchgeführt, in denen SP in Ca^{2+}-„freier“ (auf 100 nM gepufferter) Lösung appliziert wurde. Hier wurde vor und während der Applikation von SP Niedrig-Ca^{2+} Lösung anstelle von S1 Lösung verwendet. Danach wurde wieder mit S1 gespült. Die Applikationen von „Henkel 97“ und Hoch-K^+ erfolgten also wieder unter Verwendung von Lösungen mit physiologischen Ca^{2+}-Konzentrationen. Ausgewertet wurden 122 Zellen, von denen 6 auf „Henkel 97“ reagierten. Abbildung 3.45. verdeutlicht, dass auch unter diesen Bedingungen eine Antwort auf SP, „Henkel 97“ und Hoch-K^+ Lösung vorhanden ist (n = 4). Auch in diesem Experiment gab es Zellen, die nur auf SP und Hoch-K^+ reagierten, nicht aber auf die Duftstoffmischung (n = 2/122). Die Tatsache, dass die Zellen eine Ca^{2+}-Antwort auf SP zeigen, auch wenn die extrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration sehr niedrig ist, deutet darauf hin, dass die beobachteten Antworten zumindest teilweise auf der Freisetzung von Ca^{2+} aus internen Speichern, wie sie von IP3 hervorgerufen wird, basieren. Ob daneben auch Mechanismen, die Ca^{2+}-Einstrom aus dem extrazellulären Raum ermöglichen, an der Antwort beteiligt sind, kann hier nicht geklärt werden. Die Tatsache, dass Zellen, die auf SP antworten, auch auf Hoch-K^+ mit einem Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration antworten, deutet zumindest darauf hin, dass sie spannungsgesteuerte Ca^{2+}-Kanäle exprimieren. Weiterführende Experimente bei denen die internen Ca^{2+}-Speicher z.B. mit Thapsigargin entleert werden, könnten zu detaillierteren Erkenntnissen führen.

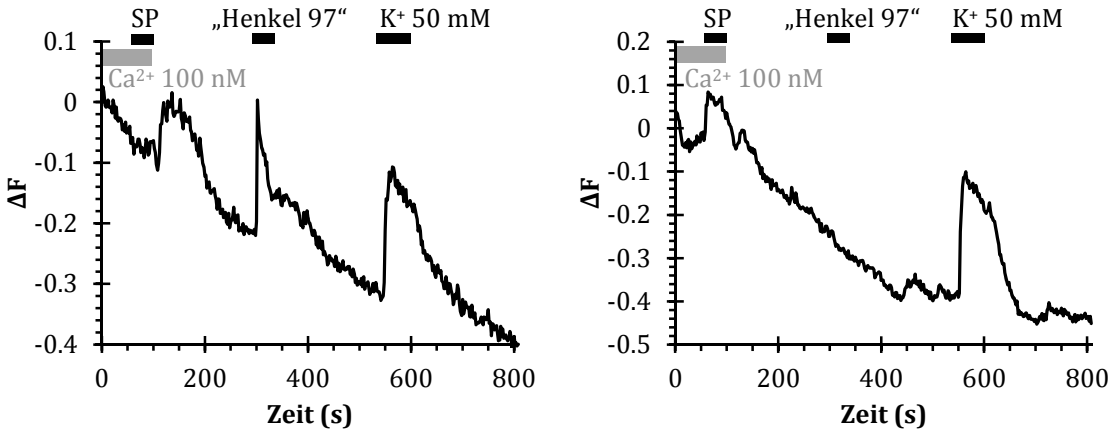

Abb. 3.45.: Ca^{2+}-Antworten auf 1 µM SP in Niedrig-Ca^{2+} Lösung (Ca^{2+} 100 nM), „Henkel 97“ und Hoch-K^+ Lösung (K^+ 50 mM) in Zellen des OE der Maus. Dargestellt ist eine Zelle, die sowohl auf SP als auch auf „Henkel 97“ reagiert (links) und eine Zelle, die auf SP, aber nicht auf Henkel reagiert (rechts). Vor der SP-Applikation wurde hier anstatt mit S1 mit Niedrig-Ca^{2+} Lösung gespült.

Die Ca^{2+}-Antworten auf CGRP wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht detaillierter mithilfe pharmakologischer Experimente untersucht. Mögliche Mechanismen werden später diskutiert (4.3., 4.7.).

3.5. Analyse der Calcium-Antworten in dissoziierten Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es im OE Subpopulationen von Zellen gibt, die auf trigeminale Peptide antworten (3.4.), sollte im nächsten Schritt festgestellt werden um welche Zellen es sich handelt. Wie eingangs beschrieben (1.1.3.) gibt es neben regulären olfaktorischen Neuronen einige „untypische“ Zellen mit teilweise unbekannter Funktion. Die immunhistochemischen Untersuchungen deuten darauf hin, dass der NK1R für SP in IP3R3-positiven Zellen exprimiert wird (3.2.2.3.). Diese Vermutung hat sich durch pharmakologische Experimente beim Ca^{2+}-Imaging weiter erhärtet (3.4.). Die Antikörperfärbungen gegen Komponenten des CGRP Rezeptorkomplexes lassen keine eindeutige Aussage zu. Die Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass der CGRP Rezeptor entweder in allen olfaktorischen Neuronen oder in einer Subpopulation olfaktorischer Neurone exprimiert wird. Um weitere Hinweise darauf zu bekommen welche Zellen im OE auf trigeminale Peptide reagieren, wurden Ca^{2+}-Imaging Experimente an dissoziierten Zellen des OE durchgeführt (2.8.3.). Die Zellen wurden auf Glasplättchen, die mit einem eingravierten Gitternetz markiert waren, ausplattiert, um die antwortenden Zellen nach dem Experiment identifizieren zu können. Die darauf folgenden Färbungen mit Antikörpern gegen OMP (als Marker für olfaktorische Neurone), IP3R3 und NK1R sollten Aufschluss über die Zugehörigkeit der reagierenden Zellen zu einer bestimmten Zellpopulation geben.
Ausgewertet wurden nur Zellen, die auf Hoch-K^+ und mindestens eines der trigeminalen Peptide antworteten (n = 6). Eine Übersicht über den Ausgang der Experimente bietet Tabelle 3.4. Die Abbildungen 3.46. und 3.47. zeigen beispielhaft die Ca^{2+}-Antwort auf SP oder CGRP, „Henkel 97“ und Hoch-K^+ in zwei Zellen sowie die entsprechenden Bilder nach der Antikörperfärbung. In den beiden gezeigten Beispielen lässt sich auch die charakteristische Morphologie von IP3R3-positiven

Zellen (3.46. rechts, vgl. z.B. 1.1.3. Abb. 1.4. D) und olfaktorischen Neuronen (3.47. rechts, vgl. z.B. 1.1.3. Abb. 1.4. A) gut erkennen. Dies war jedoch nicht immer der Fall, da die Fortsätze der Zellen im Dissoziat meist nicht so gut zu erkennen waren wie ursprünglich erhofft. Die Ca^{2+}-Antworten ähneln in Form und Größenordnung denen, die beim Imaging an den Schnitten beobachtet werden konnten (2.8.3.). Wie nach den Experimenten an den Schnitten zu erwarten war, konnten auch hier sowohl Zellen gefunden werden, die auf „Henkel 97" und eines der beiden trigeminalen Peptide oder beide antworteten, als auch Zellen, die auf trigeminale Peptide, nicht jedoch auf die Duftstoffmischung antworteten. Die Zellen wurden aufgrund ihrer immuncytochemischen Eigenschaften in zwei Gruppen unterteilt: solche, die OMP-positiv sind und somit zu den regulären olfaktorischen Neuronen zählen, und solche, die IP3R3- und rbNK1R-positiv sind und somit vermutlich eine Gruppe irregulärer Zellen im OE darstellen. Anhand der Daten lassen sich Zellen, die auf trigeminale Peptide antworten, nicht eindeutig einer Gruppe zuordnen. Eine Antwort auf CGRP kann beispielsweise in beiden Zellpopulationen gefunden werden. Ebenso verhält es sich mit Antworten auf die Duftstoffmischung „Henkel 97". Man findet eine Antwort auf SP nicht in allen Zellen, die IP3R3-positiv sind. Aber immer wenn eine Antwort auf SP beobachtet wurde, so handelte es sich um IP3R3-positive Zellen (n = 3). Auch wenn diese Tatsache die Vermutung unterstützt, dass IP3R3-positive Zellen den NK1R exprimieren und auf SP antworten, muss betont werden, dass es sich hier bisher eher um unsichere Ergebnisse handelt, da im Rahmen dieser Arbeit nur sehr wenige Zellen ausgewertet werden konnten.

Tabelle 3.4.: Übersicht über die durchgeführten Ca^{2+}-Imaging-Experimente an einzelnen dissoziierten Zellen des OE der Ratte und Ergebnisse der anschließenden Antikörperfärbung.
Linke Spalte: Antworten auf SP, CGRP und Henkel. Obere Reihe: Einteilung der Zellen in zwei Gruppen anhand ihres immuncytologischen Profils. n = 1 für jeden Versuch.

	OMP+ IP3R3-	IP3R3+ OMP-
SP+, Henkel+		X
SP+, CGRP+, Henkel-		X
SP+, CGRP-, Henkel+		X
SP-, CGRP+, Henkel+		X
SP-, CGRP+, Henkel+	X	
SP-, CGRP+, Henkel -	X	

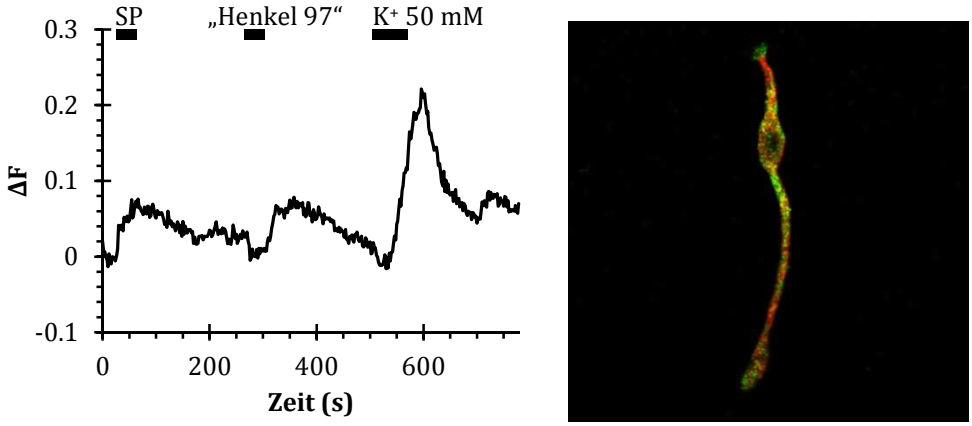

Abbildung 3.46.: Ca^{2+}-Antworten auf 1 µM SP, „Henkel 97“ und Hoch-K^+ (K^+ 50 mM) (links) in einer aus dem OE der Ratte dissoziierten Zelle. Die Zelle konnte nach dem Experiment mit rbNK1R (rechts, grün) und einem Antikörper gegen IP3R3 (rechts, rot) gefärbt werden.

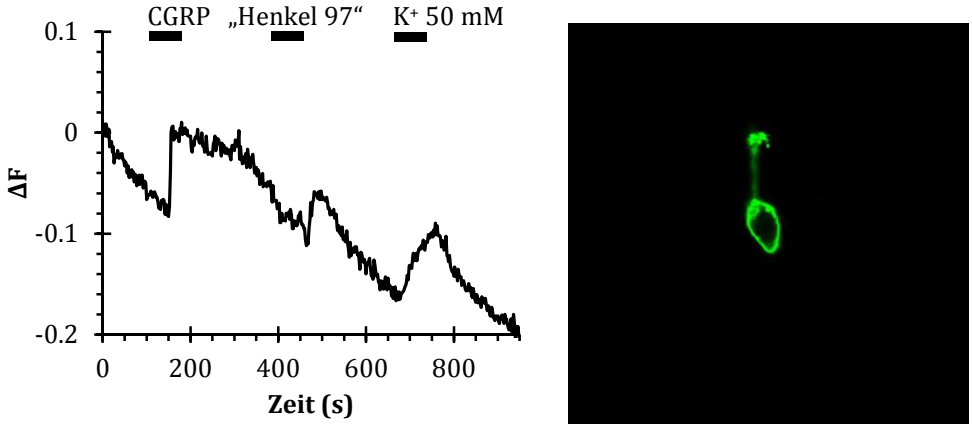

Abbildung 2.47.: Ca^{2+}-Antworten auf 1 µM CGRP, „Henkel 97“ und Hoch-K^+ (K^+ 50 mM) (links) in einer aus dem OE der Ratte dissoziierten Zelle. Die Zelle konnte nach dem Experiment mit einem Antikörper gegen OMP (rechts, grün) gefärbt werden.

4. DISKUSSION

4.1. Trigeminale Innervation der Nasenhöhle und Expression der Rezeptoren für SP und CGRP

In der vorliegenden Arbeit konnte im Einklang mit anderen Studien (vgl. 3.1.; Finger et al., 1990; Anton und Peppel, 1991; Finger und Böttger, 1993; Schäfer et al., 2002; Finger et al., 2003; Lin et al., 2007b; Daiber et al., 2012) gezeigt werden, dass das olfaktorische Epithel (OE) und das respiratorische Epithel (RE) in der Maus und in der Ratte durch peptiderge, nozizeptive Fasern des *Nervus trigeminus* innerviert werden, die die Epithelien senkrecht durchziehen (3.1.1. Abb. 3.2.). Im Vomeronasalorgan (VNO) wurden diese Fasern lediglich im nicht-sensorischen Epithel gefunden (3.1.1. Abb. 3.3. C+D). Andere Arbeiten bestätigen dieses Ergebnis (Matsuda et al., 1996; Ogura et al., 2010). Soweit bekannt wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die trigeminale Innervation des Septalorgans (SO) (3.1.1. Abb. 3.4.) und des Grüneberg Ganglions (GG) (3.1.1. Abb. 3.3. A+B) eingehender beschrieben. Die Auswirkungen der trigeminalen Innervation dieser beiden Organe, deren Funktion selbst noch umstritten ist (1.1.1.), können anhand der aktuellen Datenlage nicht abgeschätzt werden. Ogura et al. (2010) konnten zeigen, dass trigeminale Fasern im VNO mit sogenannten *solitary chemosensory cells* (1.1.3.) in Verbindung stehen. Die Ergebnisse der genannten Studie lassen vermuten, dass diese Verbindung eine Rolle bei der Limitierung des Zuganges gefährlicher Substanzen zum VNO spielt. Die *solitary chemosensory cells* wurden im Nasenraum vorrangig im RE beschrieben (1.1.3.). Hier sollen sie zusammen mit trigeminalen Fasern an der Detektion von potentiell gefährlichen Substanzen beteiligt sein und somit der Auslösung von Schutzreflexen dienen. Es wird angenommen, dass lipophile Substanzen (z.B. Capsaicin), welche die *tight junction*-Barriere durchdringen können, die Fasern selbst stimulieren. Hydrophile Substanzen (z.B. der Bitterstoff Denatonium) können die *tight junction*-Barriere vermutlich nicht passieren. Diese Substanzen könnten von den *solitary chemosensory cells* detektiert werden, welche ihrerseits Signale an benachbarte trigeminale Fasern senden könnten (Abb. 4.1.; Finger et al., 2003; Silver und Finger, 2009; Tizzano et al., 2010).

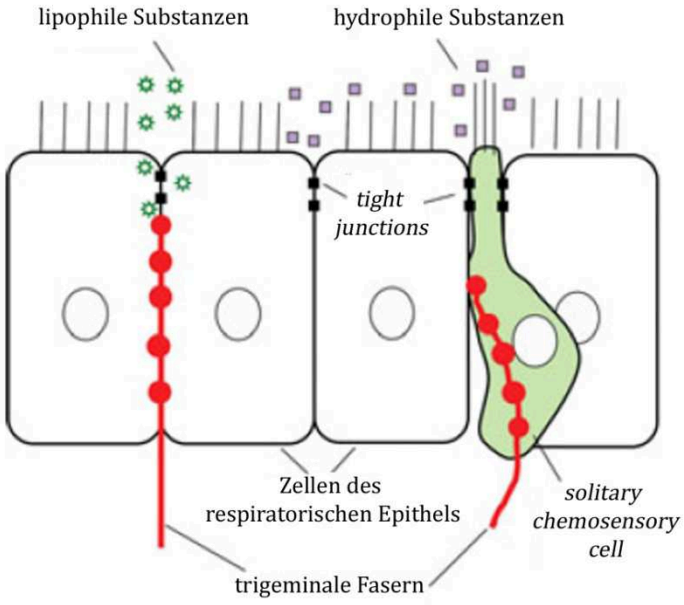

Abbildung 4.1.: Schema eines potentiellen Mechanismus der Detektion von Irritanzien im respiratorischen Epithel (nach Silver und Finger, 2009). Demnach sollen lipophile Substanzen von freien Nervenendigungen des *Nervus trigeminus* direkt detektiert werden, wohingegen hydrophile Substanzen, die die *tight junction*-Barriere nicht passieren können, eher von *solitary chemosensory cells* detektiert werden, welche das Signal dann an trigeminale Fasern weiterleiten.

Es konnte gezeigt werden, dass Irritanzien wie Capsaicin, Denatonium und bakterielle Signale unter anderem eine Reduktion der Atemfrequenz hervorrufen (Tizzano et al., 2010). Der gleiche Effekt konnte über Stimulation des *Nervus trigeminus* erzielt werden (Finger et al., 2003). Weiterhin sollen Bitterstoffe die Schlagfrequenz von ciliären Zellen aus Epithelien der menschlichen Luftröhre und der Bronchien erhöhen (Shah et al., 2009). Ähnliche Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit im RE der Maus durch die Applikation von Substanz P (SP) erzielt werden. Das Video (Cilienschlag RE.mp4) auf beigelegter CD (bzw. angehängte Datei) zeigt schlagende Cilien im RE in einem Schnitt durch die Nase einer Maus (vgl. 2.8.2.). In etwa 20 Sekunden nach der Applikation von SP ist zu erkennen, dass die Cilien schneller und/oder stärker schlagen. Um eine dezidierte Aussage treffen zu können, müssten quantitative Auswertungen erfolgen, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht möglich war. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen deuten stark darauf hin, dass der SP Rezeptor NK1R in der ciliären Schicht im RE der Maus und der Ratte exprimiert wird (3.2.2.2. Abb. 3.18., 3.2.2.3. Abb. 3.29.). Weiterhin wurden mit einem Antikörper gegen den Typ 3 Inositoltrisphosphat Rezeptor (IP3R3), der eine große Rolle bei der Antwort in NK1R-exprimierenden Zellen spielt (1.2.3.), Strukturen in nächster Nähe zu den Cilien gefärbt (3.2.2.3. Abb. 3.29.). Somit wäre die Voraussetzung für eine Modulation der Schlagfrequenz der Cilien im RE durch SP gegeben. In der Tat deuten Messungen in Gewebeproben aus dem menschlichen RE darauf hin, dass die Cilienschlagfrequenz über Aktivierung von NK1R durch SP erhöht wird (Smith et al., 1996).
Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass trigeminale Fasern, die senkrecht durch das OE laufen, in manchen Fällen mit bestimmten Zelltypen, die sich von regulären olfaktorischen Neuronen unterscheiden, „assoziiert“ sind (3.1.2. Abb. 3.5., 3.6.; vgl. 1.1.3. Abb. 1.4., Tab. 1.1.). Unter anderem zählen dazu Zellen, die

aufgrund ihrer Morphologie an *solitary chemosensory cells* erinnern und den Melostatin Rezeptor TRPM5 exprimieren (3.1.2. Abb. 3.5. B). Ob es sich hierbei tatsächlich um *solitary chemosensory cells* handelt bleibt umstritten und konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden (1.1.3.). Dafür spricht jedoch, dass des Öfteren trigeminale Fasern in unmittelbarer Nähe zu den TRPM5-positiven Zellen gefunden werden können (3.1.2. Abb. 3.5. B, 3.6. A) und an den „Kontaktstellen" Synaptophysin, ein Protein, das in synaptischen Vesikeln vorkommt, gefunden werden konnte (3.1.2. Abb. 3.6. A+B). Da auch im OE eine *tight junction*-Barriere auf Höhe der dendritischen Knöpfe olfaktorischer Neurone existiert (Menco, 1980) und die trigeminalen Fasern diese vermutlich nicht durchdringen (Finger et al., 1990), könnten die TRPM5-positiven Zellen ähnlich wie es für die *solitary chemosensory cells* im RE vorgeschlagen wurde (Abb. 4.1.) hydrophile Irritanzien detektieren und die Information an trigeminale Fasern weiterleiten.
Des Weiteren „kontaktieren" trigeminale Fasern in sehr vielen Fällen IP3R3-positive Zellen (u.a. 3.1.2. Abb. 3.5. C+D, Abb. 3.6. C+D). In Fällen in denen sich Fasern aufspalten um zu zwei unterschiedlichen Zelltypen zu führen sitzt meist eine IP3R3-positive Zelle an mindestens einem Ende (3.1.2. Abb. 3.5. D). Die immunhistochemischen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der SP Rezeptor NK1R in den Microvilli und schwächer in der Membran am Zellkörper dieser Zellen exprimiert wird (3.2.2.3. Abb. 3.23., 3.25.). Außerdem scheinen die Zellen die molekulare Ausstattung zu haben, die für eine durch Aktivierung von NK1R ausgelöste Antwort nötig ist (3.2.2.3. Abb. 3.27.; vgl. 1.2.3.). Diese Annahmen werden durch die Ergebnisse der Ca^{2+}-Imaging Experimente unterstützt. An Schnitten durch das OE konnte gezeigt werden, dass es hier Zellen gibt, die auf SP mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration antworten (3.4. u.a. Abb. 3.41. links). Diese Antwort wird durch Zugabe eines Inhibitors der Phospholipase C (PLC), welche ein Schlüsselenzym bei der durch Aktivierung von NK1R ausgelösten Ca^{2+}-Antwort ist (1.2.3.), unterdrückt (3.4. Abb. 3.44.). Die Zellen reagieren auch dann mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration auf SP, wenn fast kein Ca^{2+} in der extrazellulären Lösung ist (3.4. Abb. 3.45.). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, die durch Aktivierung von IP3R3 entstehen kann (1.2.3.), einen großen Beitrag zur Antwort auf SP leistet. Sowohl PLC als auch IP3R3 werden in Zellen exprimiert in denen NK1R gefunden wurde (3.2.2.3. Abb. 3.23., 3.25., 3.27. B). Zusammengefasst führen die Ergebnisse dieser Arbeit zu der Vermutung, dass microvilliäre IP3R3-exprimierende Zellen im OE auf das trigeminale Peptid SP antworten. Erste Ergebnisse aus Imaging Experimenten an dissoziierten Zellen (3.5. Abb. 3.46.) sowie die Ergebnisse einer anderen Arbeit (Hegg et al., 2010) unterstützen diese Vermutung. Welche Funktionen die IP3R3-exprimierenden Zellen haben könnten und welche Bedeutung für den Einfluss der trigeminalen Innervation des olfaktorischen Systems sich daraus ergibt, wird an anderen Stellen dieser Arbeit diskutiert (4.2., 4.3., 4.5.). Die starke Expression des SP Rezeptors in den Microvilli (s.o.) lässt vermuten, dass das Peptid hauptsächlich die Signaltransduktion im Lumen der Microvilli von IP3R3-positiven Zellen beeinflusst. Die Microvilli befinden sich allerdings über der *tight junction*-Barriere im OE und trigeminale Fasern durchdringen diese Barriere vermutlich nicht (3.1.1.). Da die Zugänglichkeit von Substanzen zum OE in Schnitten und dissoziierten Zellen im Vergleich zur intakten Nase erleichtert wird, muss die Überlegung angestellt werden, ob die beobachteten Antworten auf SP physiologisch relevant sind. Ein eindeutiger Beweis konnte mit den hier angewandten Methoden nicht erbracht werden. Soweit bekannt ist bisher ungeklärt, ob SP die *tight junction*-Barriere passieren und so eine

Antwort in den Microvilli der IP3R3-positiven Zellen auslösen kann. Auch wenn die Expression von NK1R in der Membran des Zellkörpers vergleichsweise geringer ist als in den Microvilli (s.o.), besteht trotzdem die Möglichkeit, dass, selbst wenn SP die *tigth junction*-Barriere nicht durchdringen kann, das Peptid einen Effekt in IP3R3-positiven Zellen in der intakten Nase hervorrufen kann.
Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Komponenten des *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) Rezeptorkomplexes (CRCP und CRLR, vgl. 1.2.3. Abb. 1.8.) deuten auf die Expression des Rezeptors in regulären olfaktorischen Neuronen hin (3.2.1.1.). Der eigentliche Rezeptor (CRLR) ist nur funktionell, wenn auch die Komponenten CRCP und RAMP exprimiert werden. Die hier verwendeten Antikörper gegen CRLR und CRCP färben beide die dendritischen Knöpfe olfaktorischer Neurone (3.2.1.1. Abb. 3.12.). Es wurden keine Antikörper gegen RAMP getestet. In Einklang mit den hier gezeigten Ergebnissen konnte bereits nachgewiesen werden, dass in olfaktorischen Neuronen die Gene für CRLR, CRCP und RAMP aktiv sind (Daiber et al., 2012). Was die Expression auf subzellulärer Ebene betrifft, so werden unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Daiber et al. (2012) konnten Immunreaktivität für CRCP und CRLR vornehmlich in den Cilien olfaktorischer Neurone feststellen, für CRCP weiterhin leicht in allen Teilen der Zellen. Nach Antigendemaskierung (2.6.3.) wurde jedoch das gleiche Ergebnis wie in der vorliegenden Arbeit erzielt: der Antikörper gegen CRLR färbt komplette olfaktorische Neurone, das Färbemuster des CRCP Antikörpers ändert sich nicht (3.2.1.1. Abb. 3.14.; vgl. Daiber et al., 2012). Während ohne Demaskierung die dendritischen Knöpfe aller olfaktorischer Neurone mit beiden Antikörpern gefärbt sind (3.2.1.1. Abb. 3.12.), werden nach der Demaskierung mit dem Antikörper gegen CRLR nur manche olfaktorische Neurone komplett gefärbt (3.2.1.1. Abb. 3.14.). Antigendemaskierung ist ein etabliertes Mittel, um Antikörpern einen besseren Zugang zu ihrem Antigen zu verschaffen. Die Auflösung von Quervernetzungen kann aber auch dazu führen, dass der Antikörper Zugang zu Epitopen anderer Antigene bekommt, die er normalerweise nicht erkennen würde. Die Frage ob alle oder nur einige olfaktorische Neurone CGRP Rezeptoren exprimieren und in welchen Kompartimenten die Rezeptoren exprimiert werden bleibt also offen. Allerdings deuten alle Ergebnisse darauf hin, dass (zumindest einige, wenn nicht alle) olfaktorische Neurone prinzipiell Rezeptoren für CGRP exprimieren.
In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass CGRP im Elektroolfaktogramm am OE adulter Mäuse eine duftstoffähnliche Antwort hervorruft (Daiber et al., 2012). Die Amplitude dieser Antwort beträgt allerdings nur 20% der Amplitude einer Duftstoffantwort. Das lässt entweder den Schluss zu, dass es eine Antwort, deren Amplitude 20% einer Duftstoffantwort ausmacht, in allen olfaktorischen Neuronen gibt, oder, dass nur 20% der Zellen im OE eine Reaktion aufweisen, deren Amplitude in etwa der einer Duftstoffantwort entspricht.
Die in dieser Arbeit durchgeführten Imaging Experimente an Schnitten durch die Nasen postnataler Mäuse zeigen, dass es Zellen im OE gibt, die auf CGRP mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration, dessen Amplitude in etwa der einer Duftstoffantwort entspricht, reagieren (3.4. Abb. 3.41. rechts, Abb. 3.43.). Diese machen jedoch nur einen kleinen Bruchteil aller Zellen aus, die auf Duftstoffe antworten (13%)(3.4. Tab. 3.2.), was eher dafür sprechen würde, dass es sich um eine Subpopulation handelt als um alle olfaktorischen Neurone. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass neben diesen 13% alle anderen Zellen so schwach reagieren, dass die Antwort hier nicht detektiert werden konnte.

Es ist zu betonen, dass die Antikörperfärbungen (s.o.) an Schnitten durch die Nasen adulter Ratten durchgeführt wurden, wohingegen die Imaging Experimente an Schnitten durch die Nasen postnataler Mäuse erfolgten und daher für einen direkten Vergleich der Ergebnisse zunächst bestätigt werden müsste, dass die Färbungen mit Antikörpern gegen Komponenten des CGRP Rezeptors unabhängig von Alter oder Spezies die gleichen Ergebnisse liefern.
Beim Imaging in dissoziierten Zellen wurden Ca^{2+}-Antworten auf CGRP sowohl in Zellen die OMP-positiv sind (also reguläre olfaktorische Neurone) (3.5. Abb. 3.47.) als auch in Zellen die OMP-negativ, aber IP3R3-positiv sind beobachtet (3.5. Tab. 3.4.). Obwohl es sich hier aufgrund der kleinen Stichprobe nur um vorläufige Ergebnisse handelt, spricht auch die Tatsache, dass eine Antwort auf SP und CGRP teilweise in gleichen Zellen in Schnitten durch das OE erzielt werden konnte (3.4. Abb. 3.43.) dafür, dass neben einigen regulären olfaktorischen Neuronen auch irreguläre, IP3R3-positive Zellen auf CGRP reagieren könnten. Die möglichen Funktionen dieser Zellen werden im nächsten Abschnitt erörtert.

4.2. Mögliche Funktionen der IP3R3 exprimierenden Zellen im olfaktorischen Epithel

Obwohl IP3R3-exprimierende microvilliäre Zellen im OE relativ gut beschrieben sind (1.1.3.), kann über deren Rolle im OE nur spekuliert werden. Eine Hypothese besagt, dass es sich bei den microvilliären Zellen um eine andere Klasse von olfaktorischen Neuronen handelt, die wie ciliäre olfaktorische Neurone Informationen über Duftstoffe an den *Bulbus olfactorius* (OB) weiterleiten (Moran et al., 1982; Rowley et al., 1989). In diesem Zusammenhang sind mehrere Studien interessant, die die Vermutung aufwerfen, dass Inositoltrisphosphat (IP3) einen alternativen Botenstoff zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) bei der Detektion von manchen Gerüchen darstellen könnte (Boekhoff et al., 1990; Breer et al., 1990; Noé und Breer, 1998). Später konnte jedoch gezeigt werden, dass in Mäusen, bei denen die Gene für verschiedene Komponenten des klassischen cAMP-abhängigen Signalwegs (1.1.2.) ausgeschaltet wurden, keine oder verminderte Duftstoffantworten auf Ebene einzelner olfaktorischer Neurone (Brunet et al., 1996) oder des gesamten OE (im Elektroolfaktogramm) (Belluscio et al., 1998; Wong et al., 2000) zu beobachten sind. Trotzdem wird die Coexistenz von IP3- und cAMP-abhängigen Signalwegen in olfaktorischen Neuronen weiterhin kontrovers diskutiert. So konnten beispielsweise Hinweise darauf gefunden werden, dass es antagonistische Wechselwirkungen zwischen den beiden Signalwegen in olfaktorischen Neuronen gibt (Vogl et al., 2000; Spehr et al., 2002b; Ukhanov et al., 2010). Da diese Studien allerdings lediglich reguläre olfaktorische Neurone behandeln, ist weiterhin unklar, welche Rolle microvilliäre IP3R3-exprimierende Zellen bei der Detektion von Duftstoffen spielen könnten. Während Rowley et al. (1989) postulieren, dass diese Zellen eine Verbindung zum OB haben, sprechen andere Ergebnisse klar dagegen (Hegg et al., 2010; Elsaesser et al., 2005).
Teilweise wird bezweifelt, dass microvilliäre Zellen im OE von neuronaler Natur sind (Carr et al., 1991; Asan und Drenckhahn, 2005; Hansen und Finger, 2008). Asan und Drenckhahn (2005) vermuten, dass sie an der Aufrechterhaltung der Homöostase im Mucus des OE beteiligt sind. Bisher konnten für diese Theorie allerdings nur wenige Belege erbracht werden. Es gibt einige Argumente, die für eine neuronale Natur der

IP3R3-positiven Zellen sprechen: der bipolar angelegte Bauplan (Dendrit mit Microvilli, axonartiger Fortsatz) (1.1.3. Abb. 1.4.), die Immunreaktivität gegenüber einem neuronalen Marker (MAP2b) (1.1.3. Tab. 1.1.; Elsaesser et al., 2005) und die Ca^{2+}-Antworten auf erhöhte K^{+}-Konzentrationen in der extrazellulären Lösung (3.5. Abb. 3.46.; Elsaesser et al., 2005).
Es könnte sich also vermutlich um neuronale Zellen handeln, die jedoch keine direkte Verbindung zum OB haben (s.o.). Trotzdem können diese Zellen auf Duftstoffe reagieren (3.5. Abb. 3.46.; Elsaesser et al., 2005; Hegg et al., 2010), d.h. sie sind chemosensorisch. Die IP3R3-positiven Zellen scheinen keine primären sensorischen Neurone zu sein, deren Axon ins zentrale Nervensystem projiziert. Sie könnten aber sekundäre Sinneszellen sein, die ähnlich wie die *solitary chemosensory cells* im RE Duftstoffe detektieren und Informationen an andere Zellen weitergeben. Sowohl in der vorliegenden (u.a. 3.1.2. Abb. 3.5. C+D, Abb. 3.6. C+D) als auch in einer anderen Arbeit (Hegg et al., 2010) konnte gezeigt werden, dass zumindest einige IP3R3-positive Zellen auch von trigeminalen Fasern „kontaktiert" werden. So bestünde also die Möglichkeit, dass sie wie die *solitary chemosensory cells* eine Rolle bei der Detektion von Irritanzien spielen, indem sie Informationen auf trigeminale Fasern übertragen.
Daneben gibt es jedoch auch Hinweise auf einen umgekehrten Informationsfluss, d.h. von den trigeminalen Fasern zu den IP3R3-positiven Zellen. Die Zellen exprimieren nicht nur den Rezeptor NK1R für das trigeminale Peptid SP (3.2.2.3. Abb. 3.23., 3.25.), sondern reagieren auf SP mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration (3.5. Abb. 3.46.; Hegg et al., 2010). Zusätzlich konnten der Purin Rezeptor P2X3 und durch Adenosintriphosphat (ATP) ausgelöste Antworten in IP3R3-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Hegg et al., 2010). ATP könnte sowohl von trigeminalen Fasern als auch von umliegenden beschädigten Zellen freigesetzt werden. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse auf die Beteiligung der IP3R3-positiven Zellen an durch Irritation bzw. Verletzung ausgelöste Reaktionen im OE hin. Es wurde bereits ein Mechanismus beschrieben über den IP3R3-positive Zellen zur Regeneration des OE beitragen (Montani et al., 2006; Jia und Hegg, 2010; Jia et al., 2013). Die Aktivierung von P2X Rezeptoren durch ATP führt zur Ausschüttung von Neuropeptid Y (NPY) aus den IP3R3-positiven Zellen. NPY stimuliert die Proliferation von olfaktorischen Vorläuferzellen (Basalzellen), die sich zu reifen olfaktorischen Neuronen ausdifferenzieren können. Somit scheinen die IP3R3-positiven Zellen eine wichtige Rolle bei der adulten Neurogenese im OE zu spielen.
Die Tatsache, dass IP3R3-exprimierende microvilliäre Zellen NPY ausschütten können, bietet weiterhin die Grundlage für eine Modulation der Duftstoffantwort durch diese Zellen. Im nächsten Abschnitt wird neben anderen Aspekten der trigeminalen Modulation von Duftstoffantworten auch die Möglichkeit diskutiert, dass die Antworten in regulären olfaktorischen Neuronen indirekt durch trigeminale Fasern über deren Interaktion mit IP3R3-positiven Zellen verändert werden.

4.3. Trigeminale Modulation der Duftstoffantworten im olfaktorischen Epithel?

Mittlerweile wird zunehmend deutlich, dass olfaktorische Neurone die Duftstoffantworten nicht 1:1 zum OB weiterleiten, sondern dass es diverse Modulationsmechanismen auf peripherer Ebene im OE gibt (einen Überblick gibt Lucero, 2012). Obwohl eine ganze Reihe von Modulatoren bekannt sind (u.a. Acetylcholin, Dopamin und andere Katecholamine, Insulin), soll hier nur auf einige von diesen eingegangen werden, die direkt oder indirekt in die Veränderung der Duftstoffantworten durch das trigeminale System involviert sein könnten (Abb. 4.2.). Der Fokus liegt hier auf den Peptiden SP und CGRP, die nach Reizung des *Nervus trigeminus* von nozizeptiven Fasern des selbigen im OE und OB ausgeschüttet werden können (1.2.2., 1.3.). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Modulation der Duftstoffantwort durch SP und CGRP bisher nicht direkt untersucht werden. Es wird jedoch erörtert inwiefern die Ergebnisse dieser Arbeit zum Verständnis der molekularen Mechanismen der trigeminalen Modulation im OE beitragen könnten.

Der Einfluss von SP auf die Duftstoffantwort in olfaktorischen Neuronen wurde soweit bekannt bisher nur im Frosch eingehender untersucht (Bouvet, et al. 1987). Über die Stimulation des *Nervus trigeminus* konnte indirekt eine Reduktion der Antwort auf den Duftstoff Isoamylacetat durch SP festgestellt werden (vgl. 1.3.). Im Gegensatz dazu geben vorläufige Ergebnisse, die im Rahmen einer Kooperation entstanden sind, Hinweise darauf, dass SP im OE der Ratte zu einer Erhöhung der Duftstoffantwort führen könnte (Daiber, 2011, Dissertation). Allerdings ist dieser Effekt nur sehr klein (für 1 µM und 3 µM SP) und schlägt bei der Applikation der höchsten Konzentration (10 µM) ins Gegenteil um. Weitere Untersuchungen sind nötig, um den Einfluss von SP auf Duftstoffantworten im OE von Säugetieren zu bestimmen. Da bisher keine Rezeptoren für SP in regulären olfaktorischen Neuronen gefunden werden konnten, scheint eine direkte Modulation der Duftstoffantwort eher unwahrscheinlich.

Für CGRP wurde eine inhibitorische Wirkung auf das durch den Duftstoff Phenylethylalkohol hervorgerufene Summenpotential im Elektroolfaktogramm nachgewiesen (Daiber et al., 2012). Weitere Experimente im Rahmen dieser Studie deuten darauf hin, dass CGRP olfaktorische Neurone direkt moduliert. Es konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass in olfaktorischen Neuronen CGRP Rezeptoren exprimiert werden, die wie Duftstoffrezeptoren an einen cAMP-abhängigen Signalweg gekoppelt sind (vgl. 1.1.2., 1.2.3.; Daiber et al., 2012). Weiterhin löst CGRP selbst eine duftstoffähnliche Antwort im Elektroolfaktogramm (Daiber et al., 2012) und auf Ebene einzelner Zellen im OE (3.4. Abb. 3.41. rechts, Abb. 3.43.) aus. Wie es dazu kommt, dass CGRP duftstoffähnliche Antworten auslöst, andererseits aber duftstoffinduzierte Antworten inhibiert, muss noch geklärt werden. In Frage kommen beispielsweise Ca^{2+}-abhängige Adaptationsmechanismen (1.1.2.). Andere Mechanismen kompetitiver oder nicht-kompetitiver Hemmung können jedoch auch nicht ausgeschlossen werden (zur Diskussion s. Daiber, 2011, Dissertation).

Einen weiteren Modulator der Duftstoffantwort stellt ATP dar. Hegg et al. (2003) konnten nachweisen, dass ATP zwar selbst einen Ca^{2+}-Anstieg in olfaktorischen Neuronen hervorruft, bei Coapplikation jedoch die Antwort auf Duftstoffe vermindert. Da toxische Substanzen ATP in Epithelien der Nase freisetzen (Kilgour et al., 2000), wird vermutet, dass ATP die Sensitivität für Duftstoffe in Anwesenheit schädlicher Substanzen herabsetzt, um eine Überstimulation zu vermeiden. Obwohl

eindeutige Beweise erst noch erbracht werden müssen, besteht die Möglichkeit, dass neben beschädigten Zellen aus dem umliegenden Gewebe auch trigeminale Fasern im OE, die durch verschiedene Substanzen aktiviert werden, eine Quelle für ATP sein könnten (Maul und Saers, 1979; Matsuka et al., 2001). So könnte ATP neben SP und CGRP einen weiteren Botenstoff darstellen über den Duftstoffantworten durch trigeminale Fasern direkt moduliert werden.
Des Weiteren konnte das Peptid NPY als Modulator von Duftstoffantworten identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass NPY in hungrigen Axolotln die Antwort auf Glutaminsäure im Elektroolfaktogramm erhöht (Mousley et al., 2006). Dieser Effekt konnte auch bei der Duftstoffantwort auf Isoamylacetat in hungrigen Ratten beobachtet werden (Negroni et al., 2012). In dieser Studie wurde weiterhin nachgewiesen, dass es in olfaktorischen Neuronen NPY Rezeptoren (Y1) gibt, die in hungrigen Tieren überexprimiert werden. Mäuse, bei denen das Gen für den NPY Rezeptor ausgeschaltet wurde, schneiden bei olfaktorischen Funktionstests schlechter ab (Doyle et al., 2008). Dies könnte zum einen damit zusammenhängen, dass die Proliferation von Basalzellen beeinträchtigt ist (4.2.), und zum anderen, dass eine Verstärkung der Duftstoffantwort durch NPY in reifen olfaktorischen Neuronen wegfällt. Eine Modulation der Duftstoffantwort in olfaktorischen Neuronen durch NPY konnte bisher nur in hungrigen Tieren nachgewiesen werden, was auf eine Rolle des Peptides bei durch Duftstoffe stimulierter Nahrungsaufnahme hindeutet. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Modulation durch NPY auch andere Funktionen übernimmt, da der NPY Rezeptor auch in reifen olfaktorischen Neuronen von satten Tieren exprimiert wird. Dadurch, dass das Expressionsniveau in satten Tieren jedoch sehr viel geringer ist als in hungrigen, könnte es sein, dass nur kleine Modulationen stattfinden, die im Elektroolfaktogramm nicht aufgelöst werden können.
Die Ausschüttung von NPY aus IP3R3-exprimierenden Zellen erfolgt über die Aktivierung von purinergen Rezeptoren durch ATP (4.2.). Somit könnte von trigeminalen Fasern sezerniertes ATP nicht nur direkt die Antwort auf Duftstoffe beeinflussen (s.o.), sondern auch indirekt über die Stimulation von IP3R3-positiven Zellen. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass das Endocannabinoid 2-Arachidonylglycerol die Detektionsschwelle für Duftstoffe in olfaktorischen Neuronen von Froschlarven über Aktivierung von CB1 Rezeptoren herabsetzt und so deren Sensitivität erhöht (Czesnik et al., 2006; Breunig et al., 2010). Die Aktivierung von NK1R kann neben einer Erhöhung von IP3 (1.2.3.) auch zur Produktion von Arachidonsäure, einem Hydrolyseprodukt von 2-Arachidonylglycerol, führen (Garcia et al., 1994). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf die Expression von NK1R in IP3R3-exprimierenden Zellen im OE hin (3.2.2.3. Abb. 3.23., 3.25.). Ob die Aktivierung von NK1R durch SP in diesen Zellen ebenfalls zur Produktion von Arachidonsäure führt, muss noch getestet werden. Sollte das der Fall sein, so wäre dies ein weiterer Mechanismus über den SP aus trigeminalen Fasern die Duftstoffantwort in olfaktorischen Neuronen indirekt über die Stimulation von IP3R3-positiven Zellen modulieren kann.
Die Tatsache, dass einige der hier beschriebenen Mechanismen zu einer Verstärkung der Duftstoffantwort führen (NPY, Cannabinoide), andere diese jedoch vermindern (SP, CGRP, ATP) könnte erklären warum auf psychophysischer Ebene teilweise widersprüchliche Aussagen über die trigeminale Modulation der olfaktorischen Wahrnehmung getroffen werden (1.3.). Weiterhin könnte es noch eine ganze Reihe anderer Mechanismen geben, die zu einer Veränderung der olfaktorischen Wahrnehmung führen. So kann die Antwort auf Duftstoffe nicht nur direkt über die

Modulation der Antwort in olfaktorischen Neuronen verändert werden, sondern auch indirekt über Regulierung des Zuganges von Duftstoffen zu den Rezeptoren z.B. über Änderung der Atemfrequenz oder der Mucus Sekretion.
Die Ausbildung von trigeminalen Kollateralen, die das OE und den OB innervieren (1.2.1.), und die periphere Ausschüttung von Peptiden über den „Axonreflex“ (1.2.2.) könnten weitere Aspekte der trigeminalen Modulation von Duftstoffantworten eröffnen. Im nächsten Abschnitt wird auf die trigeminale Innervation des OB und die Expression der Rezeptoren für SP und CGRP eingegangen. Außerdem werden mögliche Konsequenzen der Kollateralbildung diskutiert.

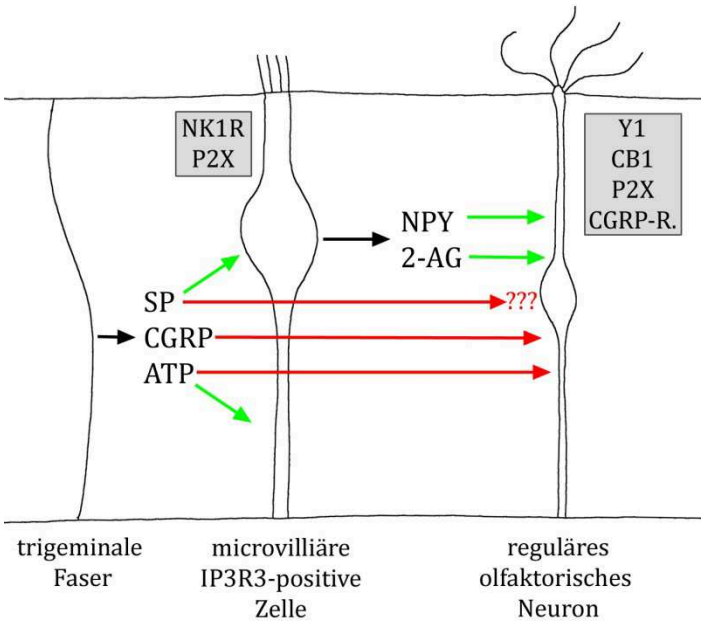

Abbildung 4.2.: Potentielle Wege der direkten und indirekten trigeminalen Modulation von Duftstoffantworten. Grüne Pfeile: erregende Wirkung, rote Pfeile: hemmende Wirkung, 2-AG = 2-Arachidonylglycerol, CB1 = Cannabinoid Rezeptoren, CGRP-R. = CGRP Rezeptorkomplex, P2X = purinerge Rezeptoren, Y1 = Rezeptoren für NPY. Eine direkte hemmende Wirkung von SP auf reguläre olfaktorische Neurone ist eher unwahrscheinlich, da bisher keine Rezeptoren für SP in regulären olfaktorischen Neuronen gefunden werden konnten. Nicht gezeigt ist die stimulierende Wirkung von NPY auf die Proliferation olfaktorischer Vorläuferzellen.

4.4. Trigeminale Innervation des *Bulbus olfactorius* und Expression der Rezeptoren für SP und CGRP

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass peptiderge Fasern des *Nervus trigeminus* in allen Schichten des OB zu finden sind und dass diese vermutlich zusammen mit dem *Nervus olfactorius* vom OE in den OB ziehen (3.1.3. Abb. 3.7.). Auffällig viele, sich stark verzweigende Fasern wurden in den Glomeruli gefunden (3.1.3. Abb. 3.7. E+F, 3.8. A, C, D, E). Es konnte allerdings festgestellt werden, dass nicht alle Glomeruli trigeminal innerviert sind, sondern, dass es einen Gradienten gibt von ventral gelegenen Glomeruli, die stark innerviert werden, zu dorsal gelegenen, die schwach bzw. gar nicht innerviert werden (3.1.3. Abb. 3.8.). Weiterhin wurde festgestellt, dass die trigeminale Innervation der Glomeruli mit dem Alter der Tiere zunimmt (3.1.3. Abb. 3.10.). Obwohl das olfaktorische System zum Zeitpunkt der Geburt schon funktionsfähig ist, könnten postnatale Reifungs- bzw. Entwicklungsprozesse zu Veränderungen führen. Einen solchen Entwicklungsprozess könnte beispielsweise der Vorgang des Lernens darstellen. Vor diesem Hintergrund ist eine Studie von Kobayakawa et al. (2007) interessant, in der gezeigt werden konnte, dass dorsale Glomeruli eine Rolle bei der Verarbeitung von Duftstoffen, die angeborene Verhaltensweisen auslösen, spielen und ventrale

Glomeruli bei der Verarbeitung von Duftstoffen, die erlernte Verhaltensweisen auslösen. Die Präferenz für eine Innervation der ventralen Glomeruli, wie sie hier beobachtet wurde (3.1.3. Abb. 3.8., 3.9., 3.11., Video 3D Rekonstruktion.mpg auf beigelegter CD bzw. angehängte Datei), und die Zunahme der trigeminalen Innervation im OB mit dem Alter könnten also auf eine Beteiligung des trigeminalen Systems beim durch Gerüche gesteuerten Lernen hindeuten. Allerdings nimmt auch die Innervation der dorsalen Glomeruli mit dem Alter zu (3.1.3. Abb. 3.11.). Ob der Entwicklungsprozess, der im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden konnte, tatsächlich etwas mit Lernen zu tun hat, bleibt offen. Nichtsdestoweniger eröffnen die hier gezeigten Ergebnisse interessante Aspekte für zukünftige Nachforschungen.
Die Information über Duftstoffe wird im OB von Mitral- und Büschelzellen integriert und weitergeleitet und von einer Reihe von Interneuronen modifiziert (1.1.1.). Die Anordnung der Zellen ergibt die typische Schichtung des OB (von außen nach innen): Schicht des *Nervus olfactorius* (ONL), glomeruläre Schicht (GL), äußere plexiforme Schicht (EPL), Mitralzellschicht (MCL), innere plexiforme Schicht (IPL), Granulärzellschicht (GCL) (3.1.3. Abb. 3.7. A). Um feststellen zu können welchen Einfluss die peptiderge trigeminale Innervation auf Prozesse im OB hat, sollten die Rezeptoren für trigeminale Peptide im OB lokalisiert werden.
In der vorliegenden Arbeit konnten für den CGRP Rezeptorkomplex im OB nur mit einem Antikörper gegen CRLR Ergebnisse erzielt werden (3.2.1.2.). Die Verteilung der mit diesem Antikörper gefärbten Glomeruli korreliert nicht mit der trigeminalen Innervation (3.2.1.2. Abb. 3.15.). Im Rahmen einer Zusammenarbeit wurde die mRNA für CRLR und CRCP in Zellkörpern in der MCL und um die Glomeruli herum detektiert (Daiber, 2011, Dissertation). Folglich könnten Mitralzellen und/oder juxtaglomeruläre Zellen im OB auf CGRP reagieren. Soweit bekannt gibt es bisher keine Studien, die den Effekt von CGRP auf Zellen im OB untersuchen.
Der SP Rezeptor NK1R konnte in der vorliegenden Arbeit vor allem in Zellkörpern zwischen der MCL und der GCL (vermutlich also in der IPL) lokalisiert werden (3.2.2.4. Abb. 3.34. A, 3.36. B+F, 3.37. A-D). In seltenen Fällen trat auch eine Färbung mit dem NK1R Antikörper in anderen Zellen auf (3.2.2.4. Abb. 3.34. D+F). Weiterhin konnte eine diffuse, jedoch kräftige Färbung in der kompletten EPL gefunden werden (3.2.2.4. z.B. 3.36. A+E). In dieser Schicht traten keine Zellkörper hervor, sodass vermutlich nur Neurite gefärbt werden. Gefärbte Neurite sind auch in manchen Glomeruli zu finden (3.2.2.4. Abb. 3.34. B). Wie bei dem CGRP Rezeptor (s.o.) scheint deren Verteilung jedoch auch nicht mit der trigeminalen Innervation zu korrelieren (3.2.2.4. Abb. 3.35.). Die mRNA für NK1R wurde ebenfalls in Zellkörpern in der MCL und um die Glomeruli herum detektiert (Daiber, 2011, Dissertation). Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem SP deuten auf Expression des Rezeptors in der EPL, der MCL, der IPL und Teilen der GCL hin (Rothman et al., 1984; Shults et al., 1984; Dam et al., 1990). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass NK1R nicht in Mitralzellen exprimiert wird (3.2.2.4. Abb. 3.36.). Die Lage der gefärbten Zellkörper und die starke Färbung in der EPL deuten darauf hin, dass es sich um Granulärzellen und/oder Büschelzellen bzw. deren Dendriten handelt. Allerdings kann es auch sein, dass zumindest manche juxtaglomeruläre Zellen NK1R exprimieren (3.2.2.4. Abb. 3.34. D). Olpe et al. (1987) konnten *in vivo* und an Schnitten durch den OB zeigen, dass SP einen inhibitorischen Effekt auf die Spontanaktivität von unidentifizierten juxtaglomerulären Zellen hat. Dieser Effekt konnte mit GABA (γ-Aminobuttersäure) Antagonisten aufgehoben werden, weshalb SP die Spontanaktivität periglomerulärer Neurone vermutlich indirekt über die Ausschüttung von GABA inhibiert. GABA ist der wichtigste inhibitorische Transmitter

im zentralen Nervensystem und wird auch im OB von vielen verschiedenen Zellen ausgeschüttet (periglomeruläre Zellen, *short axon cells*, Granulärzellen) (Mugnaini et al., 1984; Panzanelli et al., 2007). Da die Quelle der vermutlich durch SP hervorgerufenen Ausschüttung von GABA nicht bekannt ist, gibt auch diese Studie keinen Aufschluss über die Expression von NK1R im OB.
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, obwohl die Expression von CGRP und SP Rezeptoren im OB nicht sicher einem Zelltyp zugeordnet werden kann, die Ausschüttung der beiden trigeminalen Peptide im OB Modulationen auf verschiedenen Ebenen (Weiterleitung des Signals zu höheren Hirnarealen z.B. über Büschelzellen und/oder Modifizierung in OB-internen Schaltkreisen z.B. über Granulärzellen) hervorrufen kann.
Wie bereits erwähnt, werden OE und OB von Kollateralen des *Nervus trigeminus* innerviert (1.2.1.). Das bedeutet, dass sich die Dendriten ein und desselben trigeminalen Neurons aufspalten und sowohl in das OE als auch in den OB ziehen. Da trigeminale Peptide über den „Axonreflex“ über die Dendriten ausgeschüttet werden können (1.2.2.), könnte die Aktivierung trigeminaler Fasern im OE auch zur Ausschüttung von Peptiden im OB führen. Umgekehrt wäre es möglich, dass die Aktivierung von trigeminalen Fasern im OB ebenfalls zur Ausschüttung der Peptide im OE führt. Da der OB im Gegensatz zum OE keinen äußerlichen Umweltreizen ausgesetzt ist, ist dies eher unwahrscheinlich, sollte aber trotzdem nicht kategorisch ausgeschlossen werden. Weiterhin ist zu beachten, dass es, ähnlich wie es für Rückenmarksganglien gezeigt werden konnte (Amir und Devor, 1996, 2000), im Trigeminalganglion interne Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen geben könnte (Thalakoti et al., 2007).

4.5. Physiologische Relevanz der trigeminalen Innervation des olfaktorischen Systems

Die Detektion von Irritanzien (potentiell giftige Substanzen, Schadstoffe, Duftstoffe in hohen Konzentrationen) durch nozizeptive Fasern des *Nervus trigeminus* in der Nase (zumindest im RE) dient generell dem Auslösen von Schutzreflexen (1.2.1.). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das trigeminale System eine essentielle Rolle bei der Lokalisation von Duftstoffen spielt (Kobal et al., 1989; Kleemann et al., 2009). Vorstellbar wäre auch eine Beteiligung des trigeminalen Systems an durch Duftstoffe hervorgerufener Migräne. So ist bekannt, dass die Ausschüttung von CGRP aus trigeminalen Fasern mit der Auslösung von Migräne in Zusammenhang steht (einen Überblick geben Ho et al., 2010).
Während einige Studien darauf hindeuten, dass ein intaktes trigeminales System nicht unbedingt für die Detektion von Duftstoffen *per se* benötigt wird (Silver et al., 1985; Mason et al., 1987), konnte festgestellt werden, dass Anosmiker, die kein funktionales olfaktorisches System besitzen, einige Duftstoffe – vermutlich über das trigeminale System – wahrnehmen (Doty et al., 1978; Kobal und Hummel, 1998).
Mit Sicherheit spielt das trigeminale System zumindest eine modulatorische Rolle bei der Wahrnehmung von Duftstoffen (1.3., 4.3.). So konnte teilweise festgestellt werden, dass die Aktivierung des trigeminalen Systems zu einer Minderung der Wahrnehmung von Duftstoffen führen kann bzw. die trigeminalen Peptide und ATP die Duftstoffantwort im OE vermindern können. Das könnte zum einen dazu führen, dass die Aufmerksamkeit auf die Detektion von gefährlichen Substanzen gelenkt

wird, da diese Information akut wichtiger fürs Überleben sein kann als die Information über andere Duftstoffe, und zum anderen, dass eine Überstimulation im OE und OB bei der Exponierung von Irritanzien verhindert wird.
Weiterhin könnte das trigeminale System indirekt über eine Verbindung zu IP3R3-positiven Zellen, welche durch die Ausschüttung von NPY die Proliferation von Basalzellen stimulieren (4.2.), an der Regeneration des OE nach Beschädigung beteiligt sein.
Es besteht die Möglichkeit, dass IP3R3-positive Zellen neben NPY auch Endocannabinoide freisetzen (4.3.). Sowohl NPY (eine Übersicht geben Kalra und Kalra, 2004) als auch Endocannabinoide (eine Übersicht geben Di Marzo und Matias, 2005) sind bekannt für ihre orexigene (appetitssteigernde) Wirkung. Auch im OE konnten Zusammenhänge zwischen Endocannabinoiden bzw. NPY und mit durch Duftstoffe stimulierter Nahrungsaufnahme hergestellt werden (vgl. 4.3.). So konnte gezeigt werden, dass die Synthese des Endocannabinoids 2-Arachidonylglycerol im OE hungriger Froschlarven erhöht ist und dass dieses Endocannabinoid die Detektionsschwelle olfaktorischer Neurone für Duftstoffe, die in der Nahrung vorkommen, herabsetzt (Czesnik et al., 2006; Breunig et al., 2010). Weiterhin wurde eine Erhöhung der Duftstoffantworten durch NPY in hungrigen, nicht aber in satten Axolotln (Mousley et al., 2006) und Ratten sowie eine Überexpression von NPY-Rezeptoren in den olfaktorischen Neuronen hungriger Ratten (Negroni et al., 2012) festgestellt. Somit könnte es weiterhin sein, dass das trigeminale System indirekt über die Freisetzung von Endocannabinoiden und/oder NPY eine Rolle bei der Vermittlung von duftstoffinduziertem Appetit spielt.
Im OB konnte eine Zunahme der trigeminalen Innervation mit dem Alter festgestellt werden. Zusammen mit der Tatsache, dass bevorzugt ventrale Glomeruli innerviert werden, könnte das auf eine Beteiligung des trigeminalen Systems beim olfaktorischen Lernen hindeuten (4.4.). Ayers et al. (2013) konnten zeigen, dass das trigeminale System nicht für die Auslösung von angeborenen Reaktionen auf eine Komponente aus dem Analsekret von Füchsen, welches bei Mäusen und Ratten Abwehrverhalten auslöst, benötigt wird. Diese Versuche bestätigen zwar nicht, dass das trigeminale System am Lernen beteiligt ist, bekräftigen jedoch diese Theorie, da dorsal gelegene Glomeruli, welche kaum bis gar nicht trigeminal innerviert werden (3.1.3. Abb. 3.8., 3.9., 3.11., Video 3D Rekonstruktion.mpg auf beigelegter CD bzw. angehängte Datei), an angeborenen Duftstoffreaktionen beteiligt zu sein scheinen (Kobayakawa et al., 2007). Weiterhin konnten Larsson et al. (2009) zeigen, dass Gerüche, die von Versuchspersonen als irritierend eingestuft wurden, besser im Gedächtnis bleiben als andere.
Zusammengefasst lässt sich sagen, dass das trigeminale System an diversen Aspekten der Olfaktion beteiligt sein könnte. Welche physiologische Relevanz die trigeminale Innervation des olfaktorischen Systems tatsächlich hat, muss erst noch geklärt werden. Fest steht jedoch, dass Nachforschungen in dieser Richtung zu vielversprechenden und interessanten Ergebnissen führen können, die langfristig gesehen auch eine große Bedeutung für Industrie und Medizin haben könnten.

4.6. Bedeutung für Industrie und Medizin

In diesem Teil der Arbeit soll die Bedeutung einiger zuvor diskutierter Funktionen, welche die trigeminale Innervation des olfaktorischen Systems einnehmen könnte (4.5.), für Industrie und Medizin hervorgehoben werden.

Modulation der Duftstoffantwort

Die Mechanismen der Interaktionen zwischen trigeminalem, olfaktorischem und gustatorischem System und die daraus resultierende Wahrnehmung sind für verschiedene Industriezweige von großem Interesse. Megerdichian et al. (2007) geben beispielsweise einen Überblick über die Bemühungen der Tabakindustrie die Stimulation von olfaktorischen und trigeminalen Nerven durch Tabakrauch zu verstehen. Eine große Rolle spielt der Einfluss des trigeminalen Systems auf das Geruchs- und Geschmackserlebnis auch für die Parfüm-, Kosmetik- und Lebensmittelindustrie (Abb. 4.3.).



Abbildung 4.3.: Beispiele für Produkte aus der Parfüm-, Kosmetik- und Lebensmittelindustrie, die das trigeminale System ansprechen.
Die Anosmie ihrer Mutter inspirierte Kedra Hart dazu das Parfüm „Eau Pear Tingle“ (oben links) zu entwickeln. Es soll trigeminal-stimulierende Komponenten enthalten und so auch von Anosmikern wahrgenommen werden können. (Quelle: http://www.opusoils.com/page16.html)
Neben vielen anderen Herstellern bietet Lindt Schokolade mit Chili an (unten links). Aus Chili gewonnenes Capsaicin aktiviert trigeminale Fasern über den TRPV1 Rezeptor (1.2.2.). (Quelle: http://www.produkt.at/uploads/tx_chiliprodukte/lindt_04.jpg)
Der kühlende Effekt von Minze wird unter anderem für Duschgele, wie „Ice Shower“ von der Firma Rituals (rechts), genutzt. In der Minze enthaltenes Menthol kann trigeminale Fasern über den TRPM8 Rezeptor aktivieren (1.2.2.). (Quelle: http://www.styleandskin.com/by-Brand/rituals-3/ice-shower-gel)

Schutz und Regeneration

Eine Störung des Geruchssinnes beeinträchtigt die Lebensqualität der Betroffenen erheblich. Solche Störungen können angeboren sein oder verschiedene Auslöser haben (z.B. Infektionen, Krankheiten wie Parkinson, medikamentöse Behandlung; einen Überblick gibt Spielmann, 1998). Eine fehlende oder veränderte Geruchswahrnehmung kann entweder auf Fehlfunktionen in der zentralen Verarbeitung oder in der peripheren sensorischen Perzeption zurückgeführt werden. Eine reduzierte Proliferation von Vorläuferzellen scheint in manchen Fällen mitunter für solche Fehlfunktionen verantwortlich zu sein (Laymann et al., 2009; Turner et al., 2010). Das trigeminale System dient nicht nur der Auslösung von Schutzreflexen, die das Eindringen von gewebsschädigen Substanzen in die Epithelien der Nase verhindern, sondern könnte auch nach einer erfolgten Schädigung zur Regeneration des OE beitragen.

Nahrungsaufnahme

Das Geschmackserlebnis und somit auch der hedonische Aspekt der Nahrungsmittelaufnahme ist eine Komposition aus gustatorischen (über Geschmacksknospen in der Zunge vermittelt), olfaktorischen (im engeren Sinn, über olfaktorische Neurone in der Nase vermittelt) und haptischen (über somatosensorische Strukturen vermittelt) Sinneswahrnehmungen. Eine Verschlechterung der olfaktorischen Leistungen trägt mit zu Appetitlosigkeit bei älteren Menschen, einer Chemotherapie oder Krankheit bei (Schiffman und Warwick, 1988; Steinbach et al., 2009; Armstrong et al., 2010). Zur Entwicklung von Therapiemaßnahmen könnte auch das Verständnis von peripheren und/oder zentralen Einflüssen des trigeminalen Systems auf den Appetit von Bedeutung sein.

4.7. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die peptiderge trigeminale Innervation des olfaktorischen Systems und die Expression von Rezeptoren für die Peptide CGRP und SP untersucht (3.1., 3.2.). Weiterhin wurde mithilfe von Ca^{2+}-Imaging Experimenten gezeigt, dass einige Zellen im OE auf die beiden Peptide reagieren (3.4., 3.5.). Bei den Zellen, die auf SP reagieren, handelt es sich vermutlich um IP3R3-positive microvilliäre Zellen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in diesen Zellen die Aktivierung von NK1R über eine PLC-abhängige Erhöhung von IP3 zur Öffnung von internen Ca^{2+}-Speichern führt. Durch eine Entleerung der internen Speicher (z.B. mit Thapsigargin) kann getestet werden, ob auch ein Ca^{2+}-Einstrom von außen zur Antwort beiträgt. Weiterhin könnte mithilfe weiterer pharmakologischer und/oder immunhistochemischer Experimente überprüft werden, ob neben IP3 andere sekundäre Botenstoffe nach Aktivierung von NK1R gebildet werden.
Obwohl Aktivierung von CGRP Rezeptoren in den meisten Fällen zur Produktion von cAMP führt und dies auch im OE bestätigt werden konnte (Daiber et al., 2012), gibt es Berichte, dass auch andere Signalwege involviert sein könnten. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass Aktivierung von CGRP Rezeptoren neben Adenylatcyclasen auch die Phospholipase C stimulieren kann (Drissi et al., 1998) bzw. zur Produktion von IP3 führen kann (Laufer und Changeux, 1989; Drissi et al.,

1998). Über solche Mechanismen könnte erklärt werden, warum es Zellen im OE gibt, die auf SP und CGRP antworten bzw. warum manche IP3R3-exprimierenden Zellen auch auf CGRP antworten. Ähnliche pharmakologische Experimente wie sie in dieser Arbeit mit SP durchgeführt wurden, würden Aufschluss darüber geben in wie weit CGRP und SP in IP3R3-exprimierenden Zellen im OE die gleichen oder überlappende Signalwege in Gang setzen können.
Es wurde erörtert inwiefern eine Ausschüttung von SP und CGRP zu einer Modulation der Duftstoffantwort im OE führen könnte (4.3.). Der Einfluss von den Peptiden auf die Duftstoffantwort in einzelnen Zellen wurde jedoch nicht direkt nachgewiesen. Daher wären weiterführende Ca^{2+}-Imaging Experimente, in welchen dieser Sachverhalt getestet wird, interessant. Es wurde bereits damit begonnen die Duftstoffantwort auf wiederholte Applikation von „Henkel 97“ zu analysieren. Hierfür wurde die relative Größe der folgenden Antworten zur ersten Antwort berechnet, um den Abfall der Antwort unter Kontrollbedingungen zu bestimmen. Im nächsten Schritt soll vor der zweiten Stimulation mit der Duftstoffmischung CGRP oder SP appliziert werden und festgestellt werden, ob die relative Größe der zweiten Antwort im Vergleich zur Kontrollbedingung durch die Peptide beeinflusst wird. Darauf aufbauend wäre weiterhin interessant zu testen, ob die gleichen Effekte, die durch die Applikation von CGRP und SP hervorgerufen werden, auch über eine direkte Stimulation der Fasern des *Nervus trigeminus* (z.B. über Aktivierung mit Capsaicin) erreicht werden können. Solche Experimente würden nicht nur die tatsächliche *in vivo* Situation besser wiedergeben, sondern könnten auch Aufschluss darüber geben, ob neben der Ausschüttung von CGRP und SP weitere Mechanismen an der trigeminalen Modulation der Duftstoffantwort beteiligt sind.
Die trigeminale Innervation des OB ist bisher kaum erforscht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine trigeminale Innervation aller Schichten des OB, speziell aber der ventral gelegenen Glomeruli festgestellt werden (3.1.3.). Die immunhistochemischen Ergebnisse geben erste Hinweise darauf, dass Rezeptoren für SP im OB exprimiert werden, auch wenn erst noch eingehender bestimmt werden muss, um welche Zelltypen es sich bei den NK1R-positiven Zellen handelt (3.2.2.4.). Immunhistochemische Untersuchungen lieferten keine eindeutigen Hinweise auf die Expression von CGRP Rezeptoren im OB (3.2.1.2.). Hier sollten weitere Tests mit anderen Antikörpern, Fixierungszeiten oder Färbeprotokollen erfolgen. Olpe et al. (1987) konnten zeigen, dass SP eine inhibitorische Wirkung auf die Spontanaktivität einiger juxtaglomerulärer Neurone hat (vgl. 4.4.). Weitere Effekte, die durch eine Ausschüttung von SP und/oder CGRP im OB hervorgerufen werden könnten, sind unbekannt. Verschiedene Herangehensweisen könnten zu weiteren Ergebnissen führen. Zum einen bieten sich elektrophysiologische und/oder Ca^{2+}-Imaging Experimente mit den Peptiden an Schnitten durch den OB an. Zum Anderen könnten am lebenden Tier trigeminale Fasern im OE durch Irritanzien stimuliert werden und die Aktivität im OB mithilfe von bildgebenden Verfahren diagnostiziert werden. Einen Mittelweg zwischen Untersuchungen im lebenden Tier und an Schnitten durch den OB würde eine Präparation wie sie von Ishikawa et al. (2007) beschrieben wurde anbieten. Hier wird das komplette Gehirn sowie die Verbindung zum intakten OE erhalten. Auch wenn es schwierig sein könnte bei dieser Präparation zusätzlich die Verbindung zum Trigeminalganglion zu erhalten, könnte der Einfluss des trigeminalen Systems auf Duftstoffantworten im OB zumindest teilweise über die Applikation von CGRP und SP simuliert werden.
In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Möglichkeiten diskutiert, welche Funktionen die trigeminale Innervation des olfaktorischen Systems einnehmen

könnte (4.5.). Verhaltensversuche mit NK1R *knock-out* Mäusen würden mit Sicherheit Einblicke darüber, welche dieser Funktionen das trigeminale System tatsächlich einnimmt, liefern. Ayers et al. (2013) konnten mithilfe von Läsionsexperimenten des *Nervus trigeminus* nachweisen, dass das trigeminale System nicht für angeborene Verhaltensweisen als Reaktion auf Duftstoffe verantwortlich ist (vgl. 4.5.). Analog könnte getestet werden, ob ein intaktes trigeminales System für die Auslösung erlernter Reaktionen auf Duftstoffe nötig ist. Welchen Beitrag die Peptide CGRP und SP speziell zur trigeminalen Innervation des olfaktorischen Systems und deren physiologischer Relevanz leisten, könnte gut mithilfe von Verhaltensexperimenten mit Nacktmullen festgestellt werden. Diese Tiere besitzen zwar ein trigeminales System und nozizeptive Fasern, die Capsaicin-sensitiv sind, zeigen aber auf viele schmerzhafte Reize keine typischen Schmerzreaktionen, was vermutlich daran liegt, dass kein SP oder CGRP in ihren nozizeptiven Fasern vorhanden ist (Park et al., 2003, 2008; LaVinka et al., 2009).

5. LITERATURVERZEICHNIS

Aiyar N, Disa J, Stadel JM, Lysko PG (1999): Calcitonin gene-related peptide receptor independently stimulates 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and Ca^{2+} signaling pathways. *Mol. Cell. Biochem.* ***197(1-2)****, 179-185.*

Amir T, Devor M (1996): Chemically mediated cross-excitation in rat dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* ***16(15)****, 4733-4741.*

Amir T, Devor M (2000): Functional cross-excitation between afferent A- and C-neurons in dorsal root ganglia. *Neuroscience* ***95(1)****, 189-195.*

Anton F, Peppel P (1991): Central projections of trigeminal primary afferents innervating the nasal mucosa: a horseradish peroxidase study in the rat. *Neurosci.* ***41(2-3)****, 617-628.*

Armstrong JE, Laing DG, Wilkes FJ, Kainer G (2010): Smell and taste function in children with chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* ***25(8)****, 1497-1504.*

Asan E, Drenckhahn D (2005): Immunocytochemical characterization of two types of microvillar cells in rodent olfactory epithelium. *Histochem. Cell Biol.* ***123****, 157-168.*

Ayers LW, Asok A, Heyward FD, Rosen JB (2013): Freezing to the predator odor 2,4,5 dihydro 2,5 trimethylthiazoline (TMT) is disrupted by olfactory bulb removal but not trigeminal deafferentation. *Behav. Brain Res.* ***253****, 54-59.*

Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Högestätt ED, Julius D, Jordt SE, Zygmunt PM (2005): Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ***102****, 12248-12252.*

Bautista DM, Sigal YM, Milstein AD, Garrison JL, Zorn JA, Tsuruda PR, Nicoll RA, Julius D (2008): Pungent agents from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels. *Nat. Neurosci.* ***11****, 772-779.*

Belluscio L, Gold GH, Nemes A, Axel R (1998): Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron* ***20****, 69-81.*

Berridge MJ (1993): Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* ***361****, 315-325.*

Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* ***7****, 1513-1523.*

Boekhoff I, Tareilus E, Strotmann J, Breer H (1990): Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *EMBO J.* ***9(8)****, 2453-2458.*

Boschat C, Pelofi C, Randin O, Roppolo D, Luscher C, Broillet MC, Rodriguez I (2002): Pheromone detection mediated by a V1r vomeronasal receptor. *Nat. Neurosci.* ***5****, 1261-1262.*

Bouvet JF, Delaleu JC, Holley A (1987): Olfactory receptor cell function is affected by trigeminal nerve activity. *Neurosci. Lett.* ***77(2)****, 181-186.*

Bouvet JF, Delaleu JC, Holley A (1988): The activity of olfactory receptor cells is affected by acetylcholine and substance P. *Neurosci. Res.* ***5(3)****, 214-223.*

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* ***72****, 248-254.*

Bradley J, Bönigk W, Yau KW, Frings S (2004): Calmodulin permanently associates with rat olfactory CNG channels under native conditions. *Nat. Neurosci.* ***7(7)****, 705-710.*

Brand G (2006): Olfactory/trigeminal interactions in nasal chemoreception. *Neurosci. Biobehav. Rev.* ***30(7)****, 908-917.*

Brann JH, Dennis JC, Morrison EE, Fadool DA (2002): Type-specific inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localization in the vomeronasal organ and its interaction with a transient receptor potential channel, TRPC2. *J. Neurochem.* ***83****, 1452-1460.*

Brechbühl J, Klaey M, Broillet MC (2008): Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. *Science* ***321****, 1092-1095.*

Breer H, Boekhoff I, Tareilus E (1990): Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature* ***345(6270)****, 65-68.*

Breer H, Fleischer J, Strotmann J (2006): The sense of smell: Multiple olfactory subsystems. *Cell. Mol. Life Sci.* ***63****, 1465-1475.*

Breunig E, Manzini I, Piscitelli F, Gutermann B, Di Marzo V, Schild D, Czesnik D (2010): The endocannabinoid 2-arachidonoyl-glycerol controls odor sensitivity in larvae of *Xenopus laevis*. *J. Neurosci.* ***30(26)****, 8965-8973.*

Briñon JG, Martínez-Guijarro FJ, Bravo IG, Arévalo R, Crespo C, Okazaki K, Hidaka H, Aijón J, Alonso JR (1999): Coexpression of Neurocalcin with other calcium-binding proteins in the rat main olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* ***407****, 404-414.*

Brunet LJ, Gold GH, Ngai J (1996): General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* ***17****, 681-693.*

Buck LB, Axel R (1991): A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. C*ell* ***65****, 175–187.*

Cain WS (1976): Olfaction and the common chemical sense: some psychophysical contrasts. *Sens. Processes* ***1(1)****, 57-67.*

Cain WS (1977): Bilateral interaction in olfaction. *Nature* ***268****, 50-52.*

Cain WS, Murphy C (1980): Interaction between chemoreceptive modalities of odor and irritation. *Nature* ***268****, 50-53.*

Carr VM, Farbman AI, Colletti LM, Morgan JI (1991): Identification of a new non-neuronal cell type in rat olfactory epithelium. *Neurosci.* ***45****, 433-449.*

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997): The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* ***389****, 421-430.*

Chen C, Okayama H (1987): High-efficiency transformation of mammalian cells by DNA. *Molec. Cell. Biol.* ***7****, 2745-2752.*

Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN (1995): A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* ***377****, 428-431.*

Chen TY, Yau KW (1994): Direct modulation by Ca^{2+}-calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons. *Nature* ***368****, 545-548.*

Czesnik D, Schild D, Kuduz J, Manzini I (2006): Cannabinoid action in the olfactory epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ***104(8)****, 2967-2972.*

Daiber P (2011): Die trigeminale Modulation der olfaktorischen Rezeption. *Dissertation an der Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg.*

Daiber P, Genovese F, Schriever VA, Hummel T, Möhrlen F, Frings S (2012): Neuropeptide receptors provide a signalling pathway for trigeminal modulation of olfactory transduction. *Eur. J. Neurosci.* ***37(4)****, 572-582.*

Dam TV, Martinelli B, Quirion R (1990): Autoradiographic distribution of brain neurokinin-1/substance P receptors using a highly selective ligand [3H]-[Sar9,Met(O2)11]-substance P. *Brain Res.* ***531(1-2)****, 333-337.*

De Felipe C, Herrero JF, O'Brien JA, Palmer JA, Doyle CA, Smith AJH, Laird JMA, Belmonte C, Cervero F, Hunt SP (1998): altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* ***392****, 394-397.*

Di Marzo V, Matias I (2005): Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Neurosci.* ***8(5)****, 585-589.*

Doerner D, Pitler TA, Alger BE (1988): Protein kinase C activators block specific calcium and potassium current components in isolated hippocampal neurons. *J. Neurosci. 8(11), 4069-4078.*

Doty RL, Brugger WE, Jurs PC, Orndorff MA, Snyder PJ, Lowry LD (1978): Intranasal trigeminal stimulation from odours volatiles: psychometric responses from anosmic and normal humans. *Physiol. Behav.* ***20****, 175-185.*

Doyle KL, Karl T, Hort Y, Duffy L, Shine J, Herzog H (2008): Y1 receptors are critical for the proliferation of adult mouse precursor cells in the olfactory neuroepithelium. *J. Neurochem.* ***105****, 641-652.*

Drissi H, Lasmoles F, Le Mellay V, Marie PJ, Lieberherr M (1998): Activation of phospholipase C-beta1 via Galphaq/11 during calcium mobilization by calcitonin gene-related peptide. *J. Biol. Chem.* ***273(32)****, 20168-20174.*

Dulac C, Axel R (1995): A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* ***83****, 195-206.*

Elsaesser R, Montani G, Tirindelli R, Paysan J (2005): Phosphatidyl-inositide signaling proteins in a novel class of sensory cells in the mammalian olfactory epithelium. *Europ. J. Neurosci.* ***21****, 2692-2700*.

Evans BN, Rosenblatt MI, Mnayer LO, Oliver KR, Dickerson IM (2000): CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J. Biol. Chem.* ***275****, 31438-31443.*

Finger TE, Böttger B (1993): Peripheral peptidergic fibers of the trigeminal nerve in the olfactory bulb of the rat. *J. Comp. Neurol.* ***334****, 117-124.*

Finger TE, Böttger B, Hansen A, Anderson KT, Alimohammadi H, Silver WL (2003): Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ***100 (15)****, 8981-8968.*

Finger TE, St. Jeor VL, Kinnamon JC, Silver WL (1990): Ultrastructure of Substance P- and CGRP-immunoreactive nerve fibers in the nasal epithelium of rodents. *J. Comp. Neurol.* ***294****, 293-305.*

Firestein S, Werblin F (1989): Odor-induced membrane currents in vertebrate-olfactory receptor neurons. *Science* ***244****, 79–82.*

Fleischer J, Schwarzenbacher K, Besser S, Hass N, Breer H (2006): Olfactory receptors and signaling elements in the Grueneberg ganglion. *J. Neurochem.* ***98****, 543 554.*

Fleischer J, Schwarzenbacher K, Breer H (2007): Expression of trace amine-associated receptors in the Grueneberg ganglion. Chem. Senses **32**, 623-613.

Foster DC, Wedel BJ, Robinson BJ, Garbers DL (1999): Mechanisms of regulation and functions of guanylylcyclases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmakol.* ***135****, 1-39.*

Frings S (2001): Chemoelectrical signal transduction in olfactory sensory neurons of air-breathing vertebrates. *Cell. Mol. Life Sci.* ***58****, 510-519.*

Frings S, Lynch JW, Lindemann B (1992): Properties of cyclic nucleotide-gated channels mediating olfactory transduction. Activation, selectivity and blockage. *J. Gen. Physiol.* ***100****, 45-67.*

Fülle HJ, Garbers DL (1994): Guanylyl cyclases: a family of receptor-linked enzymes. *Cell. Biochem. Funct.* ***12****, 157-165.*

Fülle HJ, Vassar R, Foster DC, Yang RB, Axel R, Garbers DL (1995): A receptor guanylyl cylcase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ***92****, 3571-3575.*

Fuss SH, Omura M, Mombaerts P (2005): The Grueneberg ganglion of mouse projects axons to glomeruli in the olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* ***22****, 2649-2654.*

Garcia M, Sakamoto K, Shigekawa M, Nakanishi S, Ito S (1994): Multiple mechanisms of arachidonic acid release in chinese hamster ovary cells transfected with cDNA of SP receptor. *Biochem. Pharmakol.* ***48****, 1735-1741.*

Gerhold KA, Bautista DM (2009): Molecular and cellular mechanisms of trigeminal chemosensation. *Ann. NY Acad. Sci.* ***1170****, 184-189.*

Glusman G, Yanai I, Rubin I, Lancet D (2001): The complete human olfactory subgenome. *Genome Res.* ***11****, 685-702.*

Grosmaitre X, Santarelli LC, Tan J, Luo M, Ma M (2007): Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nat. Neurosci.* ***10****, 348-354.*

Grüneberg H (1973): A ganglion probably belonging to the N. terminalis system in the nasal mucosa of the mouse. *Z. Anat. Entwickl.* ***140****, 39-52.*

Gulbransen BD, Clapp TR, Finger TE, Kinnamon SC (2008a): Nasal solitary chemoreceptor cell responses to bitter and trigeminal stimulants in vitro. *J. Neurophysiol.* ***99****, 2929-2937.*

Gulbransen B, Silver W, Finger TE (2008b): Solitary chemoreceptor cell survival is independent of intact trigeminal innervations. *J. Comp. Neurol.* ***508****, 62-71.*

Hansen A, Finger TE (2008): Is TRPM5 a reliable marker for chemosensory cells? Multiple types of microvillous cells in the main olfactory epithelium of mice. *BMC Neurosci.* ***9****, 115.*

Heery DM, Gannon F, Powell R (1990): A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends Genet.* ***6****, 173*.

Hegg CC, Greenwood D, Huang W, Han P, Lucero MT (2003): Activation of purinergic receptor subtypes modulates odor sensitivity. *J. Neurosci.* ***23(23)****, 8291-8301.*

Hegg CC, Jia C, Chick WS, Restrepo D, Hansen A (2010): Microvillous cells expressing IP3 receptor type 3 in the olfactory epithelium of mice. *Eur. J. Neurosci.* ***32(10)****, 1-14*.

Herpfer I, Hunt SP, Stanford SC (2004): A comparison of neurokinin 1 receptor knock-out (NK1-/-) and wildtype mice: exploratory behaviour and extracellular noradrenaline concentration in the cerebral cortex of anaesthetised subjects. *Neuropharmacology* ***48****, 706-719.*

Herrada G, Dulac C (1997): A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* ***90****, 763–773.*

Ho TW, Edvinsson L, Goadsby PJ (2010): CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. *Nat. Rev. Neurol.* ***6(10)****, 573-582.*

Hoff M, Balfanz S, Ehling P, Gensch T, Baumann A (2011): A single amino acid residue controls Ca2+ signaling by an octopamine receptor from Drosophila melanogaster. *FASEB J. 25(7),2484-2489.*

Hofmann T, Obukhov AG, Schäfer M, Harteneck C, Gudermann T, Schulz G (1999): Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* ***297****, 259-263.*

Holzer P (1988): Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of the thachykinins, calcitonin gene related peptide and other neuropeptides. *Neurosci.* ***24****, 739-768.*

Hu J, Zhong C, Ding C, Chi Q, Walz A, Mombaerts P, Matsunami H, Luo M (2007): Detection of near-atmospheric concentrations of CO_2 by an olfactory subsystem in the mouse. *Science* ***317****, 953-957.*

Hummel T, Livermore A (2002): Intranasal chemosensory function of the trigeminal nerve and aspects of its relation to olfaction. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* ***75****, 305-313.*

Hunter DD, Dey RD (1998): Identification and neuropeptide content of trigeminal neurons innervating the rat nasal epithelium. *Neurosci.* ***83****, 591-599.*

Hunter JC, Goedert M, Pinnock RD (1985): Mammalian tachykinin-induced hydrolysis of inositol phospholipids in rat brain slices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* ***127****, 616-622.*

Ishikawa T, Sato T, Shimizu A, Tsutsui K, de Curtis M, Iijima T (2007): Odor-driven activity in the olfactory cortex of an in vitro isolated guinea pig whole brain with olfactory epithelium. *J. Neurophysiol.* ***97(1)****, 670-679.*

Jacquot L, Monnin J, Brand G (2004): Influence of nasal trigeminal stimuli on olfactory sensitivity. *C. R. Biol.* ***327****, 305-311.*

Jia C, Hegg CC (2010): NPY mediates ATP-induced neuroproliferation in adult mouse olfactory epithelium. *Neurobiol. Dis.* ***38****, 405-413.*

Jia C, Hayoz S, Hutch CR, Iqbal TR, Pooley AE, Hegg CC (2013): An IP3R3- and NPY-expressing microvillous cell mediates tissue homeostasis and regeneration in the mouse olfactory epithelium. *PLoS ONE* ***8 (3)****, e58668.*

Jones DT, Reed RR (1989): Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. Science **244**, 790–795.

Jordt SE, Tominaga M, Julius D (2000): Acid potentiation of the capsaicin receptordetermined by a key extracellular site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ***97(14)****, 8134-8139.*

Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D (2004): Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* ***427****, 260-265.*

Juaneda C, Dumont Y, Quirion R (2000): The molecular pharmacology of CGRP and related peptide receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* ***21(11)****, 432-438.*

Julifs DM, Fülle HJ, Zhao AZ, Houslay M, Garbers DL, Beavo JA (1997): A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cylcase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ***94****, 3388-3395.*

Kalra SP, Kalra PS (2004): NPY and cohorts in regulating appetite, obesity andmetabolic syndrome: beneficial effects of gene therapy. *Neuropeptides* ***38(4)****, 201-211.*

Kaluza JF, Gussing F, Bohm S, Breer H, Strotmann J (2004): Olfactory receptors in the mouse septal organ. *J. Neurosci. Res.* ***76****, 442-452.*

Kaneko H, Putzier I, Frings S, Kaupp UB, Gensch T (2004): Chloride accumulation in mammalian olfactory sensory neurons. *J. Neurosci.* ***24****, 7931–7938.*

Kaske S, Krasteva G, König P, Kummer W, Hofmann T, Gudermann T, Chubanov V (2007): TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells. *BMC Neurosci.* ***8****, 49.*

Kellermann OK, Ferenci T (1982): Maltose binding protein from *E. coli*. *Methods Enzymol.* ***90****, 459-463.*

Khawaja AM, Rogers DF (1996): Tachykinins: receptor to effector. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* ***28(7)****, 721-738.*

Kilgour JD, Simpson SA, Alexander DJ, Reed CJ (2000): A rat nasal epithelial model for predicting upper respiratory tract toxicity: in vivo-in vitro correlations. *Toxicology* ***145****, 39-49.*

Kleemann AM, Albrecht J, Schöpf V, Haegler K, Kopietz R, Hempel JM, Linn J, Flanagin VL, Fesl G, Wiesmann M (2009): Trigeminal perception is necessary to localize odors. *Physiol. Behav.* ***97(3-4)****, 401-405.*

Kobal G, Van Toller S, Hummel T (1989): Is there directional smelling? *Experientia* ***45(2)****, 130-132.*

Kobal G, Hummel T (1998): Olfactory and intranasal trigeminal event-related potentials in anosmic patients. *Laryngoscope* ***108(7)****, 1033-1035.*

Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, Ikawa M, Okabe M, Ikeda T, Itohara S, Kikusui T, Mori K, Sakano H (2007): Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* ***450****, 503-508.*

Kosaka K, Toida K, Aika Y, Kosaka T (1998): How simple is the organization of the olfactory glomerulus? The heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci. Res.* ***30****, 101-110.*

Kuhn FA, Gonzalez S, Rodriguez M, Siller CC, Zachariou V, Goldstein BD (1997): Capsaicin's effect on rat nasal mucosa substance P release: experimental basis for vasomotor rhinitis treatment. *Am. J. Rhinol.* ***11(4)****, 313-316.*

Kurahashi T, Yau KW (1993): Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature* ***363****, 71–74.*

Lai JP, Lai S, Tuluc F, Tansky MF, Kilpatrick LE, Leeman SE, Douglas SD (2008): Differences in the lenght of the carboxyl terminus mediate functional properties of neurokinin-1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ***105(34)****, 12605-12610.*

Laniyonu A, Sliwinski-Lis E, Fleming N (1988): Different tachykinin receptor subtypes are coupled to the phosphoinositide or cyclic AMP signal transduction pathways in rat submandibular cells. *FEBS Lett.* ***240****, 186-190.*

Larsson M, Oberg-Blåvarg C, Jönsson FU (2009): Bad odors stick better than good ones. *Exp. Psychol.* ***56(6)****, 375-380.*

Laufer R, Changeux JP (1989): Calcitonin gene-related peptide and cyclic AMP stimulate phosphoinositide turnover in skeletal muscle cells. Interaction between two second messenger systems. *J. Biol. Chem.* ***264(5)****, 2683-2689.*

LaVinka PC, Brand A, Landau VJ, Wirtshafter D, Park TJ (2009): Extreme tolerance to ammonia fumes in African naked mole-rats: animals that naturally lack neuropeptides from trigeminal chemosensory nerve fibers. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* ***195(5)****, 419-427.*

Layman WS, McEwen DP, Beyer LA, Lalani SR, Fernbach SD, Oh E, Swaroop A, Hegg CC, Raphael Y, Martens JR, Martin DM (2009): Defects in neural stem cell

proliferation and olfaction in Chd7 deficient mice indicate a mechanism for hyposmia in human CHARGE syndrome. *Hum. Mol. Genet.* ***18(11)****, 1909-1923.*

Lazarini F, Lledo PM (2011): Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends Neurosci.* ***34(1)****, 20-30.*

Leinders-Zufall T, Rand MN, Shepherd GM, Greer CA, Zufall F (1997) Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics. *J. Neurosci.* ***17****, 4136–4148.*

Leinders-Zufall T, Cockerham RE, Michalakis S, Biel M, Garbers DL, Reed RR, Zufall F, Munger SD (2007): Contribution of the receptor guanylyl cylcase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ***104****, 14507-14512.*

Lennertz RC, Tsunozaki M, Bautista DM, Stucky CL (2010): Physiological basis of tingling paresthesia evoked by hydroxy-α-sanshool. *J. Neurosci. 30, 4353-4361.*

Levai O, Strotmann J (2003): Projection patterns of nerve fibers from the septal organ: DiI-tracing studies with transgenic OMP mice. *Histochem. Cell Biol.* ***120****, 483-492.*

Liberles SD, Buck LB (2006): A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature* ***442****, 645–650.*

Lin W, Margolskee R, Donnert G, Hell SW, Restrepo D (2007a): Olfactory neurons expressing transient receptor potential channel M5 (TRPM5) are involved in sensing semiochemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ***104****, 2471-2476.*

Lin W, Ogura T, Margolskee RF, Finger TE, Restrepo D (2007b): TRPM5-expressing solitary chemosensory cells respond to odorous irritants. *J. Neurophysiol.* ***99****, 1451-1460.*

Lin W, Ezekwe EAD, Zhao Z, Liman ER, Restrepo D (2008): TRPM5-expressing microvillous cells in the main olfactory epithelium. *BMC Neurosci.* ***9****, 114.*

Livermore A, Hummel T, Kobal G (1992): Chemosensory event-related potentials in the investigation of interactions between the olfactory and the somatosensory (trigeminal) systems. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* ***83****, 201-210.*

Lowe G, Gold GH (1993): Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature* ***366****, 283–286.*

Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F (2003): A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* ***40****, 551-561.*

Lucero MT (2012): Peripheral modulation of smell: fact or fiction? *Semin. Cell Dev. Biol.* ***24(1)****, 58-70.*

Luskin MB (1993): Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron **11**, 173-189.*

Ma M (2010): Multiple olfactory subsystems convey various sensory signals. *In: The neurobiology of olfaction, Menini A (Editor), Boca Raton (FL), CRC Press, Kap.9.*

Ma M, Grosmaitre X, Iwema CL, Baker H, Greer CA, Shepherd GM (2003): Olfactory signal transduction in the mouse septal organ. *J. Neurosci. **23**, 317-324.*

Maggi CA (1995): The mammalian tachykinin receptors. *Gen. Pharmacol. **26(5)**, 911-944.*

Mantyh PW, Pinnock RD, Downes CP, Goedert M, Hunt SP (1984): Correlation between inositol phospholipid hydrolysis and substance P receptors in rat CNS. *Nature **309**, 795-797.*

Manzini I, Korsching S (2011): The peripheral olfactory system of vertebrates: molecular, structural and functional basics of the sense of smell. *e-Neuroforum **2 (3)**, 68-77.*

Margolis FL, Tarnoff JF (1972): Site of biosynthesis of the mouse brain olfactory bulb protein. *J. Biol. Chem. **248**, 451-455.*

Mason JR, Greenspon JM, Silver WL (1987): Capsaicin and its effects on olfaction and trigeminal chemoreception. *Acta Physiol. Hung. **69(3-4)**, 469-479.*

Matsuda H, Kusakabe T, Kawakami T, Takenaka T, Sawada H, Tsukada M (1996): Coexistence of nitric oxide synthase and neuropeptides in the mouse vomeronasal organ demonstrated by a combination of double immunofluorescence labeling and a multiple dye filter. *Brain Res. **712**, 35-39.*

Matsuka Y, Neubert JK, Maidment NT, Spigelman I (2001): Concurrent release of ATP and substance P within guinea pig trigeminal ganglia in vivo. *Brain. Res. **915(2)**, 248-255.*

Matsunami H, Buck LB (1997): A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell **90**, 775-784.*

Maul E, Saers M (1979): ATP is released into the rabbit eye by antidromic stimulation of the trigeminal nerve. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **18(3)**, 256-262.*

McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D (2002): Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature **416**, 52-58.*

McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM (1998): RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature **393**, 333-339.*

Menco BP (1980): Qualitative and quantitative freeze-fracture studies on olfactory and nasal respiratory epithelial surfaces of frog, ox, rat, and dog. III. Tight-junctions. *Cell Tissue Res.* ***211(3)****, 361-373.*

Megerdichian CL, Rees VW, Wayne GF, Connolly GN (2007): Internal tobacco industry research on olfactory and trigeminal nerve response to nicotine and other smoke components. *Nicotine Tob. Res.* ***9(11)****, 1119-1129.*

Meredith M, O'Connel RJ (1979): Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *J. Physiol.* ***286****, 301-316.*

Meyer MR, Angele A, Kremmer E, Kaupp UB, Müller F (2000): A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* ***97****, 10595-10600.*

Miyauchi K, Tadotsu N, Hayashi T, Ono Y, Tokoyoda K, Tsujikawa K, Yamamoto H (2002): Molecular cloning and characterization of mouse calcitonin gene-related peptide receptor. *Neuropeptides* ***36(1)****, 22-33.*

Moreno MM, Linster C, Escanilla O, Sacquet J, Didier A, Mandairon N (2009): Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ***106 (42)****, 17980-17985.*

Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996): Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* ***87****, 675-686.*

Montani G, Tonelli S, Elsaesser R, Paysan J, Tirindelli R (2006): Neuropeptide Y in the olfactory microvillar cells. *Europ. J. Neurosci.* ***24****, 20-24.*

Moran DT, Rowley JC 3rd, Jafek BW (1982): Electron microscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: the microvillar cell. *Brain Res.* ***253****, 39-46.*

Mori K, Nagao H, Yoshihara Y (1999): The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* ***286****, 711-715.*

Mori K, von Campenhausen H, Yoshihara Y (2000): Zonal organization of the mammalian main and accessory olfactory systems. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* ***355****, 1801-1812.*

Mousley A, Polese G, Marks NJ, Eisthen HL (2006): Terminal nerve-derived neuropeptide Y modulates physiological responses in the olfactory epithelium of hungry axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *J. Neurosci.* ***26(29)****, 7707-7717.*

Müller F, Scholten A, Ivanova E, Haverkamp S, Kremmer E, Kaupp UB (2003): HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals. *Eur. J. Neurosci.* ***17****, 2084-2096.*

Mugnaini E, Wouterlood FG, Dahl AL, Oertel WH (1984): Immunocytochemical identification of GABAergic neurons in the main olfactory bulb of the rat. *Arch. Ital. Biol.* ***122(2)****, 83-113.*

Munger SD, Leinders-Zufall T, Zufall F (2009): Subsystem organization of the mammalian sense of smell. *Annu. Rev. Physiol.* ***71****, 115-140.*

Nakajima Y, Tsuchida K, Negishi M, Ito S, Nakanishi S (1992): Direct linkage of three tachykinin receptors to both phosphatidylinositol hydrolysis and cAMP cascades in transfected chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* ***267****, 2437-2442.*

Nakamura T, Gold GH (1987): A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* ***325****, 442-444.*

Negroni J, Meunier N, Monnerie R, Salesse R, Baly C, Caillol M, Congar P (2012): Neuropeptide Y enhances olfactory mucosa responses to odorant in hungry rats. *PLoS ONE* ***7(9)****, e45266.*

Noé J, Breer H (1998): Functional and molecular characterization of individual olfactory neurons. *Journal of Neurochemistry* ***71****, 2286-2293.*

Ogura T, Krosnowski K, Zhang L, Bekkerman M, Lin W (2010): Chemoreception regulates chemical access to mouse vomeronasal organ: role of solitary chemosensory cells. *PLoS ONE* ***5(7)****, e11924.*

Olpe HR, Heid J, Bittiger H, Steinmann MW (1987): Substance P depresses neuronal activity in the rat olfactory bulb in vitro and in vivo: possible mediation via γ-aminobutyric acid release. *Brain Res.* ***412****, 269-274.*

Pace U, Hanski E, Salomon Y, Lancet D (1985): Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature* ***316****, 255–258.*

Page NM (2005): New challenges in the study of the mammalian tachykinins. *Peptides* ***26****, 1356-1368.*

Panzanelli P, Fritschy JM, Yanagawa Y, Obata K, Sassoè-Pognetto M (2007): GABAergic phenotype of periglomerular cells in the rodent olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* ***502(6)****, 990-1002.*

Park TJ, Comer C, Carol A, Lu Y, Hong HS, Rice FL (2003): Somatosensory organization and behavior in naked mole-rats: II. Peripheral structures, innervation, and selective lack of neuropeptides associated with thermoregulation and pain. *J. Comp. Neurol.* ***465(1)****, 104-120.*

Park TJ, Lu Y, Jüttner R, Smith ES, Hu J, Brand A, Wetzel C, Milenkovic N, Erdmann B, Heppenstall PA, Laurito CE, Wilson SP, Lewin GR (2008): Selective inflammatory pain insensitivity in the African naked mole-rat (Heterocephalus glaber). *PLoS Biol.* ***6(1)****, e13.*

Pfeuffer E, Mollner S, Lancet D, Pfeuffer T (1989): Olfactory adenylyl cyclase. Identification and purification of a novel enzyme form. *J. Biol. Chem.* ***264(31)****, 18803–18807.*

Pinching AJ, Powell TP (1971): The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J. Cell. Sci.* ***9****, 305-345.*

Quartara L, Maggi CA (1997): The tachykinin NK1 receptor. Part I: ligands and mechansims of cellular activation. *Neuropeptides* ***31(6)****, 537-563.*

Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB (1994): Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* ***79****, 1245-1255.*

Restrepo D, Doucette W, Whitesell JD, McTavish TS, Salcedo E (2009). From the top down: flexible reading of a fragmented odor map. *Trends Neurosci.* ***32(10)****, 525-531.*

Reuter D, Zierold K, Schroder WH, Frings S (1998): A depolarizing chloride current contributes to chemoelectrical transduction in olfactory sensory neurons in situ. *J. Neurosci.* ***18****, 6623-6630.*

Rodolfo-Masera T (1943): Su l'esistenza di un particolare organo olfacttivo nel setto nasale della cavia e di altri roditori. *Arch. Ital. Anat. Embryol.* ***48****, 157–205.*

Rothman RB, Herkenham M, Pert CB, Liang T, Cascieri MA (1984): Visualization of rat brain receptors for the neuropeptide, substance P. *Brain Res.* ***309(1)****, 47-54.*

Rowley JC 3rd, Moran DT, Jafek BW (1989): Peroxidase backfills suggest the mammalian olfactory epithelium contains a second morphologically distinct class of bipolar sensory neuron: the microvillar cell. *Brain Res.* ***502****, 387-400.*

Ryba NJ, Tirindelli R (1997). A new multigene family of putative pheromone receptors*. Neuron* ***19****, 371-379.*

Saghatelyan A, Carleton A, Lagier S, de Chevigny A, Lledo PM (2003): Local neurons play key roles in the mammalian olfactory bulb. *J. Physiol.* ***97****, 517-528.*

Schäfer ML, Böttger B, Silver WL, Finger TE (2002): Trigeminal collaterals in the nasal epithelium and olfactory bulb: a potential route for direct modulation of olfactory information by trigeminal stimuli. *J. Comp. Neurol.* ***444****, 221-226.*

Schiffman SS, Warwick ZS (1988): Flavor enhancement of foods for the elderly can reverse anorexia. *Neurobiol. Aging* ***9(1)****, 24-26.*

Schild D, Restrepo D (1998): Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol. Rev.* ***78****, 429-466.*

Shah AS, Ben-Shahar Y, Moninger TO, Kline JN, Welsh MJ (2009): Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science* ***325****, 1131-1134.*

Shults CW, Quirion R, Chronwall B, Chase TN, O'Donohue TL (1984): A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. *Peptides* ***5(6)****, 1097-1128.*

Silver WL, Finger TE (2009): The anatomical and electrophysiological basis of peripheral nasal trigeminal chemoreception. *Ann. NY Acad. Sci.* ***1170****, 202-205.*

Silver WL, Moulton DG (1982): Chemosensitivity of rat nasal trigeminal receptors. Physiol. Behav. ***28****, 927-931.*

Silver WL, Mason JR, Marshall DA, Maruniak JA (1985): Rat trigeminal, olfactory and taste responses after capsaicin desensitization. *Brain Res.* ***333(1)****, 45-54.*

Silver WL, Farley LG, Womble M, Finger TE (1991): The effect of neonatal capsaicin administration on trigeminal nerve fibers in the nasal cavity. *Brain Res.* ***561****, 212-216.*

Smith RP, Shellard R, Di Benedetto G, Magnus CJ, Mehta A (1996): Interaction between calcium, neutral endopeptidase and the substance P mediated ciliary response in human respiratory epithelium. *Eur. Respir. J.* ***9****, 86-92.*

Spehr M, Hatt H, Wetzel CH (2002a): Arachidonic acid plays a role in rat vomeronasal signal transduction. *J. Neurosci.* ***22****, 8429-8437*

Spehr M, Wetzel CH, Hatt H, Ache BW (2002b): 3-Phosphoinositides modulate cyclic nucleotide signaling in olfactory receptor neurons. *Neuron* ***33****, 731-739.*

Spehr J, Spehr M, Hatt H, Wetzel CH (2004): Subunit-specific P2X-receptor expression defines chemosensory properties of trigeminal neurons. *Eur. J. Neurosci.* ***19****, 2497-2510.*

Spehr M, Spehr J, Ukhanov K, Kelliher KR, Leinders-Zufall T, Zufall F (2006). Parallel processing of social signals by the mammalian main and accessory olfactory systems. *Cell Mol. Life Sci.* ***63****, 1476-1484.*

Spielmann AI (1998): Chemosensory function and dysfunction. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* ***9(3)****, 267-291.*

Steinbach S, Hummel T, Böhner C, Berktold S, Hundt W, Kriner M, Heinrich P, Sommer H, Hanusch C, Prechtl A, Schmidt B, Bauerfeind I, Seck K, Jacobs VR, Schmalfeldt B, Harbeck N (2009): Qualitative and quantitative assessment of taste and smell changes in patients undergoing chemotherapy for breast cancer or gynecologic malignancies. *J. Clin. Oncol.* ***27(11)****, 1899-1905.*

Stern K, McClintock MK (1998): Regulation of ovulation by human pheromones. *Nature* ***392****, 177–179.*

Stjärne P, Lundblad L, Anggård A, Hökfelt T, Lundberg JM (1989): Tachykinins and calcitonin gene-related peptide: co-existence in sensory nerves of the nasal mucosa and effects on blood flow. *Cell. Tissue Res.* ***256(3)****, 439-446.*

Thalakoti S, Patil VV, Damodaram S, Vause CV, Langford LE, Freeman SE, Durham PL (2007): Neuron-glia signaling in trigeminal ganglion: implications for migraine pathology. *Headache* ***47(7)****, 1008-1025.*

Tian H, Ma M (2004): Molecular organization of the olfactory septal organ. *J Neurosci.* ***24(38)****, 8383-8390.*

Tirindelli R, Dibattista M, Pifferi S, Menini A (2009): From pheromones to behavior. *Physiol Rev.* ***89****, 921-956.*

Tizzano M, Gulbransen BD, Vandenbeuch A, Clapp TR, Herman JP, Sibhatu HM, Churchill MEA, Silver WL, Kinnamon SC, Finger TE (2010): Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ***107****, 3210-3215.*

Trotier D (2011): Vomeronasal organ and human pheromones. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.* ***128(4)****, 184-190.*

Trotier D, Døving KB (1998): Anatomical description of a new organ in the nose of domesticated animals by Ludvig Jacobson (1813). *Chem. Senses* ***23****, 743–754.*

Trotier D, Eloit C, Wassef M, Talmain G, Bensimon JL, Døving KB, Ferrand J (2000): The vomeronasal cavity in adult humans. *Chem. Senses* ***25****, 369-380.*

Turner JH, Liang KL, May L, Lane AP (2010): Tumor necrosis factor alpha inhibits olfactory regeneration in a transgenic model of chronic rhinosinusitis-associated olfactory loss. *Am. J. Rhinol. Allergy* ***24(5)****, 336-340.*

Ukhanov K, Corey EA, Brunert D, Klasen K, Ache BW (2010): Inhibitory odorant signaling in mammalian olfactory receptor neurons. *J. Neurophysiol.* ***103****, 1114-1122.*

Vause C, Bowen E, Spierings E, Durham P (2007): Effect of carbon dioxide on calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal neurons. *Headache* ***47****, 1385-1397.*

Viana F (2011): Chemosensory properties of the trigeminal system. *ACS Chem. Neurosci.* ***2(1)****, 38-50.*

Vogl A, Noé J, Breer H, Boekhoff I (2000): Cross-talk between olfactory second messenger pathways. *Eur. J. Biochem.* ***267****, 4529-4535.*

Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M (1997): A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* ***386****, 173–177.*

Walker CS, Conner AC, Poyner DR, Hay DL (2010): Regulation of signal transduction by calcitonin gene-related peptide receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* ***31(10)****, 476-483.*

Wei J, Zhao AZ, Chan GCK, Baker LP, Impey S, Beavo JA, Strom DR (1998): Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in neurons: a mechanism for attenuation of olfactory signals. *Neuron* ***21****, 495-504.*

Witt M, Hummel T (2006): Vomeronasal versus olfactory epithelium: is there a cellular basis for human vomeronasal perception? *Int. Rev. Cytol.* ***248****, 209-259.*

Wong ST, Trinh K, Hacker B, Chan GCK, Lowe G, Gaggar A, Xia ZG, Gold GH, Storm DR (2000): Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron* ***27****, 487-497.*

Yan C, Zhao AZ, Bentley JK, Loughney K, Ferguson K, Beavo JA (1995): Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ***92****, 9677-9681.*

Yan TC, McQuillin A, Thapar A, Asherson P, Hunt SP, Stanford SC, Gurling G (2010): NK1 (TACR1) receptor gene 'knockout' mouse phenotype predicts genetic association with ADHD. *J. Psychopharmacol.* ***24(1)****, 27-38.*

Yang J, Tsien RW (1993): Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. *Neuron* ***10****, 127-136.*

Yokoi M, Mori K, Nakanishi S (1995): Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ***92****, 3371-3375.*

Young JM, Waters H, Dong C, Fülle HJ, Liman ER (2007): Degeneration of the olfactory guanylyl cyclase D gene during primate evolution. *PLoS One* ***2(9)****, e884.*

Zhang J, Pacifico R, Cawley D, Feinstein P, Bozza T (2013): Ultrasensitive detection of amines by a trace amine-associated receptor. *J. Neurosci.* ***33****, 3228–3239.*

Zhang X, Firestein S (2002): The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat. Neurosci.* ***5****, 124-133.*

ANHANG

Aminosäuresequenz des murinen NK1R

Aminosäuren 329-347, die zur Herstellung der NK1R Peptide verwendet wurden, sind grau hervorgehoben. Aminosäuren 306-407, die zur Herstellung der NK1R Fusionsproteine verwendet wurden, sind unterstrichen.

1 mdnvlpvdsd lfpntstnts esnqfvqptw qivlwaaayt vivvtsvvgn vvviwiilah
61 krmrtvtnyf lvnlafaeac maafntvvnf tyavhnvwyy glfyckfhnf fpiaalfasi
121 ysmtavafdr ymaiihplqp rlsatatkvv ifviwvlall lafpqgyyst tetmpsrvvc
181 miewpehpnr tyekayhicv tvliyflpll vigyaytvvg itlwaseipg dssdryheqv
241 sakrkvvkmm ivvvctfaic wlpfhiffll pyinpdlylk kfiqqvylas mwlamsstmy
301 npiiycclnd rfrlgfkhaf rccpfisagd yeglemkstr ylqtqssvyk vsrlettist
361 vvgahedepe egpkatpssl dltsngssrs nsktmtesss fysnmla

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Zelluläre Biophysik (ICS-4) im Forschungszentrum Jülich angefertigt. Mein Dank gilt allen Kollegen für die herzliche Aufnahme im Institut, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft eines jeden einzelnen.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Frank Müller für die Überlassung des spannenden Themas und die engagierte wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Marc Spehr für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit und sein Interesse.

Frau Dr. Daniela Flügge danke ich für die Einführung in die Ca^{2+}-Imaging Technik an Schnitten durch die Nase und ihre Ratschläge zu deren Etablierung in unserem Institut.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Stephen Hunt für die Bereitstellung der NK1R *knock-out* Mäuse zur Entnahme von Gewebeproben.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Stephan Frings und Dr. Philipp Daiber für die wertvolle und interessante Zusammenarbeit im Rahmen des DFG Schwerpunktprogrammes „Integrative analysis of olfaction“ bedanken.

Große Unterstützung bekam ich von Joachim Schmitz beim Ausplattieren und Transfizieren von Zellen, Prof. Arnd Baumann und Arne Franzen im molekularbiologischen Bereich und Christoph Aretzweiler („MacGyver“) bei der Immunhistochemie und allem Möglichen sowie Unmöglichem. Vielen Dank!

Aus tiefstem Herzen danke ich meiner Schwester Stephanie Söchtig, meiner Mutter Elisabeth Söchtig und ihrem Lebensgefährten Halil Neideck dafür, dass sie immer wieder die Sonne in meinem Leben scheinen lassen und mir Zuversicht geben. Meinem Vater Wolfgang Söchtig bin ich unendlich dankbar dafür, dass er immer an mich geglaubt hat und für die Erinnerungen, die mich auf allen Wegen begleiten und stärken.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Müller betreut worden.