

Aus der Abteilung Neurophysiologie und Zelluläre Biophysik  
(Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. D. Schild)  
im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Pharmakologische Charakterisierung der purinergen Rezeptoren der  
Stützzellen der olfaktorischen Mukosa des larvalen *Xenopus laevis*.**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
für Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Silvia Kurtanska**  
aus Bratislava / Slowakei

Göttingen 2010

Dekan:

Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. D. Schild

II. Berichterstatter/ -in:

III. Berichterstatter/ -in:

Tag der mündlichen Prüfung:

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1	Der Geruchssinn .....	3
1.1.1	Die Duftklassen und die Störungen des Geruchssinnes .....	5
1.2	Das olfaktorische System .....	8
1.2.1	Der Aufbau des olfaktorischen Systems.....	9
1.3	Purinerge Rezeptoren.....	14
1.3.1	Purine und Pyrimidine .....	14
1.3.2	Die Nomenklatur der purinerger Rezeptoren .....	18
1.3.3	P2-Rezeptoren.....	22
1.3.3.1	P2X-Rezeptoren .....	22
1.3.3.2	P2Y-Rezeptoren.....	26
1.4	Intention der Arbeit.....	29
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>30</b>
2.1	Das Versuchstier - <i>Xenopus laevis</i> .....	30
2.1.1	Das olfaktorische System von <i>Xenopus laevis</i> .....	32
2.1.1.1	Das olfaktorische System im adulten <i>Xenopus laevis</i> .....	32
2.1.1.2	Das olfaktorische System im larvalen <i>Xenopus laevis</i> .....	33
2.2	Gewebeschnittpräparation.....	34
2.3	Fluoreszenzmikroskopie .....	35
2.3.1	Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie .....	35
2.3.2	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie und Calcium Imaging .....	36
2.3.3	Kalziumsensitiver Farbstoff.....	38
2.3.4	Färben der Gewebeschnitte.....	39
2.4	Applikationssystem.....	40
2.5	Messungen und Datenauswertung .....	42
2.6	Lösungen und Pharmaka .....	43

---

2.6.1	Die Badlösung.....	43
2.6.2	P2-Rezeptor-Agonisten .....	44
2.6.3	P2-Rezeptor-Antagonisten.....	44
2.6.4	Cyclopiazonsäure .....	46
2.6.5	Ektonukleotidase-Hemmstoff ARL 67156 .....	46
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
3.1	ATP-induzierte $[Ca^{2+}]$ -Zunahme in Stützzellen des olfaktorischen Epithels von larvalen <i>Xenopus laevis</i> .....	47
3.2	Pharmakologische Charakterisierung der purinergen Rezeptoren der Stützzellen des larvalen <i>Xenopus laevis</i> .....	48
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>54</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>61</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>62</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>66</b>

---

# 1. Einleitung

*„Denn die Menschen konnten die Augen zumachen vor der Größe, vor dem Schrecklichen, vor der Schönheit und die Ohren verschließen vor Melodien und betörenden Worten. Aber sie konnten sich nicht dem Duft entziehen. Denn der Duft war ein Bruder des Atems.“*

Aus: *Patrick Süskind: Das Parfum* (Süskind, 1994, Seite 198)

## 1.1 Der Geruchssinn

Der Geruchssinn ist eines der ältesten, aber auch der am wenigsten erforschten Sinnessysteme. Sogar die ersten primitiven Organismen konnten chemische Substanzen aufspüren (Leffingwell et. al., 2002).

Dies wurde dann bei der Nahrungssuche und bei der Umgehung von Gefahren durch Feinde ausgenutzt (Marjorie, 2001). In der Evolutionsgeschichte entwickelten sich aus diesem allgemeinen chemischen Sinn bei den Vertebraten der Geschmacks- und der Geruchssinn.

Sie gehören zu den so genannten „Nah-Sinnen“, ebenso wie der Tastsinn. Diese Sinne ermöglichen eine Orientierung in der unmittelbaren Umgebung. Dagegen werden „Sehen“ und „Hören“ eher für die Wahrnehmung von Signalen und Umweltreizen über eine größere Entfernung gebraucht. Der Geruchssinn ist dem Geschmackssinn überlegen: Gasförmige Duftstoffe wirken über größere Entfernungen als im Wasser gelöste Geschmacksstoffe. Es lassen sich außerordentlich viele Duftqualitäten wahrnehmen (Amoore, 1952). Landwirbeltiere können durch den Geruchssinn die Beute bzw. den Feind erkennen und daraufhin entsprechend reagieren. Der Geschlechtspartner und die Revierabgrenzung werden auch am Geruch erkannt.

Auch im Wasser sind Geruchsstoffe von Bedeutung. Es ist eine Vielzahl von wasserlöslichen Substanzen bekannt, die im Wasser als Odorantien fungieren. Die wichtigsten sind: Prostaglandine (Sorensen, 1992), Nucleotide (Kang und Caprio, 1995), Gallensäuren (Kang

---

und Caprio, 1995; Sato und Suzuki, 2001) und Aminosäuren (Caprio und Byrd, 1984; Kang und Caprio, 1995; Vogler und Schild, 1999; Sato und Suzuki, 2001; Manzini und Schild, 2003a; Manzini und Schild, 2004; Manzini et al., 2002a, 2002b; Czesnik et al., 2006).

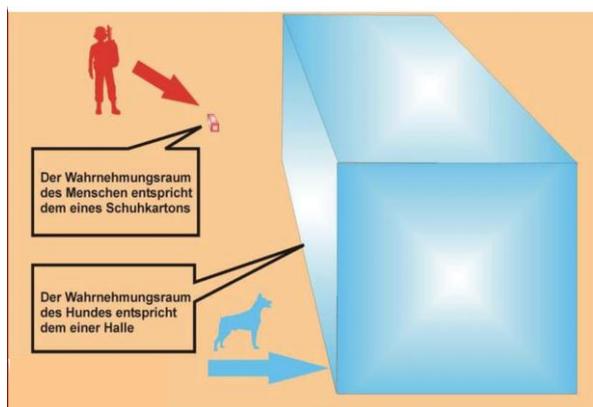
Ein Schwarm von Kleinfischen stiebt auseinander, sobald Spuren eines Schreckstoffes aus der Haut von einem verletzten Artgenossen ins Wasser gelangen. In den Nasenhöhlen der Fische befinden sich wie bei den übrigen Wirbeltieren primäre Sinneszellen. Einige Fische wie Lachs und Aal haben einen leistungsfähigeren Geruchssinn als der Hund, wo nur wenige Moleküle bestimmter Stoffe reichen, um die Rezeptoren zu erregen (Müller, 1975).

Beim Menschen ist der Geruch schon bei der Geburt weit entwickelt. Die Riecheindrücke entstehen bereits im Uterus. Ab der 28. Schwangerschaftswoche exprimieren die Rezeptorneurone das so genannte olfaktorische Markerprotein (Chuah und Zheng, 1987). Die Nervenbahnen, die für das Riechen zuständig sind, fangen im siebten Schwangerschaftsmonat an zu funktionieren. Der Fötus kann die Gerüche über seine Nasenschleimhaut und über das Fruchtwasser ab der 32.-35. Schwangerschaftswoche (d.h. erst wenn die Verbindung zum ZNS besteht) wahrnehmen und dementsprechend verarbeiten (Chuah und Zheng, 1987). Die Plazenta wird zum Ende der Schwangerschaft immer durchlässiger, und damit die Geruchswahrnehmung des Ungeborenen umso besser. Durch die Atem- und Schluckbewegungen des Embryos werden die Odorantien zu den Rezeptoren der Nasenschleimhaut befördert. Über neuronale Reizleitungen werden sie in die entsprechenden Areale seines Gehirns weitergeleitet und können somit vom Embryo wahrgenommen werden. Kurz vor der Geburt kann das ungeborene Kind so gut wie alles riechen, was auch die werdende Mutter an Gerüchen wahrnimmt: Essensdüfte, Parfüm, Abgase. Auch das Fruchtwasser an sich hat einen eigenen charakteristischen Geruch, der zur vertrauten Umgebung des Embryos gehört (Plattig, 1995).

Daher nimmt man an, dass ungewaschene Neugeborene in ihrer ersten Lebensstunde schneller die eigene Hand zum Saugen finden als die Neugeborenen, die kurz nach der Geburt gewaschen worden sind (Biancuzzo, 2004; Reiff und Essock-Vitale, 1985). Das ist einer der Gründe, warum man Neugeborene nicht sofort nach der Geburt waschen sollte. Dies gilt natürlich nicht bei Neugeborenen von HIV-infizierten Müttern, hier soll das Fruchtwasser so weit wie möglich entfernt werden, um die Schleimhautexposition des Neugeborenen gegenüber HIV möglichst gering zu halten.

### 1.1.1 Die Duftklassen und die Störungen des Geruchssinnes

Der Geruchssinn ist für das Überleben der meisten Tierarten enorm wichtig. Das olfaktorische Epithel des Menschen enthält mehrere Millionen Riechsinneszellen (Hatt, 2004). Damit gehört der Mensch zu dem Mikrosmaten. Schäferhunde mit rund zwanzigmal mehr Riechsinneszellen gelten als Makrosmate.



**Abb. 1.1 Wahrnehmungsraum des Geruchssinnes bei Mensch und Hund**, modif. nach Haller, 2010

Trotzdem ist der Mensch in der Lage, ca. zehntausend Geruchsstoffe wahrzunehmen. Leider kann er sie sprachlich nicht adäquat benennen. Deshalb richtet man sich immer noch nach einer Einteilung des Geruchs in sieben Primärgerüche: blumig, ätherisch, moschusartig, kampferartig, faulig, schweißig, stechend (Amoore, 1952). Bei allen natürlich vorkommenden Düften handelt es sich um Duftmodalitäten, in denen es charakteristische Leitdüfte gibt (z.B. Geraniol für blumig). Amoore stellte eine Geruchstheorie auf, nach der es eine Korrelation zwischen dem Geruch und der dazugehörigen Molekülform zu geben schien. Tropfenartige Moleküle sollten einen minzeartigen Geruch hervorrufen, während kugelförmige Moleküle einen kampferartigen Geruch verströmen. Minimale Veränderungen, wie zum Beispiel die Stellung von funktionellen Gruppen, könnten so zum Geruchsverlust von vorher stark riechenden Stoffen führen. Auch Enantiomere, also Stereoisomere von Molekülen, zeigten nach Amoores Theorie starke Unterschiede hinsichtlich ihrer Geruchsqualitäten auf (Amoore, 1986). Seine Theorien bestätigten sich weder mit physiologischen, biochemischen sowie psychophysischen Methoden, trotzdem besitzt die Unterteilung in sieben Duftklassen bis heute ihre Gültigkeit (Schmidt et al., 2007). Die Kreuzadaptation stellt eine weitere

Möglichkeit in der Duftklassifikation dar. Von Kreuzadaptation spricht man, wenn die Adaptation an einen Duftreiz A auch die Empfindlichkeit für andere, aber nicht für alle Substanzen herabsetzt, die wiederum bei Adaptation die Schwelle für den Duftreiz A erhöhen oder nicht. Dies bedeutet, dass man nach einiger Zeit Zigarettenrauch in einem Raum nicht mehr wahrnehmen kann. Das Riechsystem ist adaptiert. Ob dieser Mechanismus peripher (Rezeptorebene) und/oder Zentral (Mitralzellen, Kortex) bedingt ist, ist noch unbekannt. Die Adaptation beschränkt sich auf eine bestimmte, reproduzierbare Gruppe von Düften, all die anderen Düfte sind davon nicht betroffen. Ist man auf Zigarettenrauch adaptiert, kann man Kaffeeduft trotzdem noch wahrnehmen (Schmidt und Schaible, 2006).

Duftklasse	Riecht nach	Verbindungen
Blumig	Rosen	Geraniol
Ätherisch	Birnen	Benzylacetat
Moschusartig	Moschus	Moschus
Kampferartig	Eukalyptus	Cineol, Kampfer
Faulig	faulen Eiern	Schwefel-Wasserstoff
Schweißig	Schweiß	Buttersäure
Stechend	Essig	Ameisensäure, Essigsäure

**Tabelle 1.1: Die Einteilung der Primärgerüche in Qualitätsklassen und die dazugehörigen biochemischen Verbindungen**, modif. nach Amoore (nach Boeckh 1972), modif. nach Schmidt et al., 2007, Seite 431

Für den erwachsenen Menschen wird die Funktion und Bedeutung des Geruchssinns meist erst bei seinem Verlust richtig klar. Etwa 5 % der Bevölkerung können nicht riechen, ab einem Alter von 50 Jahren zeigen mehr als 20 % ein ausgeprägtes Riechdefizit (Landis et al., 2003). Zu den häufigsten Ursachen zählen dabei die akute virale Rhinitis und andere sinunasale Erkrankungen (Damm et al., 2004), sowie der altersbedingte Verlust des Riechvermögens (Mackay-Sim et al., 2006). Aber auch schwerwiegende Erkrankungen wie z.B. die Multiple Sklerose, die Parkinsonsche Erkrankung, die Demenz vom Alzheimer-Typ und die Leberzirrhose (Schiffmann, 1983a, 1983b), können die olfaktorische Wahrnehmung stark beeinträchtigen. Eine weitere schwerwiegende Störung tritt bei dem sog. Kallmann-Syndrom auf, dabei handelt sich um eine komplette Anosmie infolge einer Aplasie des Bulbus olfactorius in Kombination mit einem hypogonadotropen Hypogonadismus (Kallmann et al., 1944). Zytostatika und andere Medikamente können das Geruchssystem ebenfalls negativ beeinflussen. Die Riechstörungen haben schwerwiegende Konsequenzen, insbesondere bei Berufen in der Gastronomie oder der chemischen Industrie.

Die Bezeichnung der jeweiligen möglichen Geruchsstörung ist oft ungenau, da der Geruchssinn schon an sich sehr komplex und nicht mit wenigen Messwerten zu erfassen ist. Deshalb ist die Diagnostik von Riechstörungen von besonderer Wichtigkeit. Viel Hoffnung wird in die neuen Therapiefortschritte gesetzt. Die größte Rolle bei der Bewertung von Geruchsstörungen spielen psychophysische Methoden (Hummel und Welge-Lüssen, 2009). Diese Tests beruhen hauptsächlich auf der Befragung des Patienten. Bei Patienten, bei welchen dies schwer oder gar nicht möglich ist (Kleinkinder bzw. nicht motivierte Patienten oder Patienten mit kognitiven Schwächen), muss man zwangsweise zu anderen Methoden greifen. Dazu gehören Verfahren, die vor allem auf elektrophysiologischen Methoden beruhen, z. B. die Ableitung von olfaktorisch evozierten Potenzialen. Des Weiteren stehen auch bildgebende Verfahren, wie funktionelles MRT nach olfaktorischer Reizung und Volumetrie des Bulbus olfactorius und eine immunohistochemische Untersuchung nach der Biopsie der Riechschleimhaut zur Verfügung (Hummel und Welge-Lüssen, 2009).

Das normale Riechvermögen wird Normosmie genannt. Die Anosmie bezeichnet den vollständigen Ausfall des Geruchssinnes. Eine Herabsetzung der Geruchswahrnehmung nennt man Hyposmie. Diese Bezeichnungen müssten aber eigentlich auf das jeweilige Odorans, das sie betrifft, abgegrenzt werden. Deshalb ist es auch sinnvoll, zwischen qualitativen und quantitativen Geruchsstörungen zu unterscheiden (Mumenthaler et al., 2005).

Von einer partiellen Anosmie, d.h. einem fehlenden Wahrnehmungsvermögen für bestimmte Geruchsqualitäten, die angeboren oder erworben sind, ist ca. 1 % der Bevölkerung betroffen (Hick und Hick, 2009).

Obwohl der Geruchssinn beim Menschen gegenüber anderen Säugern viel weniger ausgeprägt ist, gibt es keinen Zweifel daran, dass er für das Zusammenleben wichtige Steuerfunktionen hat.

## Störungen des Geruchssinnes

<b>Normal</b>	<b>Quantitativ</b>	<b>Qualitativ</b>
<b>Normosmie</b>	<b>Hyperosmie</b> (übersteigerte Wahrnehmung)	<b>Dysosmie</b> (qualitative Geruchsstörung)
	<b>Hyposmie</b> (verminderte Wahrnehmung)	<b>Parosmie</b> (verzerrte Geruchsempfindung)
	<b>Anosmie</b> (vollständiger Ausfall)	<b>Kakosmie</b> (falsche Wahrnehmung/ faul)
		<b>Heterosmie</b> (Unfähigkeit, Gerüche zu unterscheiden)
		<b>Agnosmie</b> (Unfähigkeit, Gerüche zu erkennen)
		<b>Phantosmie</b> (Halluzination von Gerüchen)

**Tabelle 1.2: Einteilung der Geruchsstörungen beim Menschen**, modif. nach Mumenthaler et al., 2005, Seite 258

## 1.2 Das olfaktorische System

Das olfaktorische System gehört zu den sensorischen Systemen des Menschen die externe Reize aufnehmen und anschließend die Signale in das zentrale Nervensystem übermitteln, wo die Informationen anschließend verarbeitet werden. Dort entsteht aus der Kombination der Geruchseindrücke dann das spezifische und immer wieder abzurufende Geruchsmuster.

Somit können wir diese Reize wahrnehmen und voneinander unterscheiden. Wenn der Mensch einen Geruch erstmals wahrgenommen hat, bekommt er für ihn eine Bedeutung, d.h. er wird als angenehm oder unangenehm empfunden. Diese subjektive Bewertung wird als Hedonik bezeichnet. Ein bestimmter Geruch kann auch mit einer Situation bzw. einer Person in Verbindung gesetzt werden und wenn man sich an diese erinnert, erinnert man sich automatisch an den Geruch. Die Verknüpfung des Geruchs mit unseren Empfindungen und Emotionen wird über das limbische System gesteuert. Diese Verbindungen zum limbischen System zeigen, dass durch Geruchsinformationen direkte, bewusstseinunabhängige Wirkungen auf das Verhalten übertragen werden (Prinz zu Waldeck und Frings, 2005).

---

## 1.2.1 Der Aufbau des olfaktorischen Systems

Die Riechschleimhaut befindet sich in der Regio olfactoria der obersten Nasenmuschel (Concha nasalis). Bei Säugetieren mit gutem Geruchsvermögen, wie Hund und Reh, sind alle drei Nasenmuscheln mit Riechepithel (olfaktorisches Epithel) ausgekleidet, beim Menschen ist es nur eine. Die Riechschleimhaut besteht aus einem mehrreihigen olfaktorischen Epithel und der subepithelialen Lamina propria, in der sich Bindegewebe, Blutgefäße, Bowman-Drüsen sowie die gebündelten Axone der olfaktorischen Rezeptorneuronen befinden.

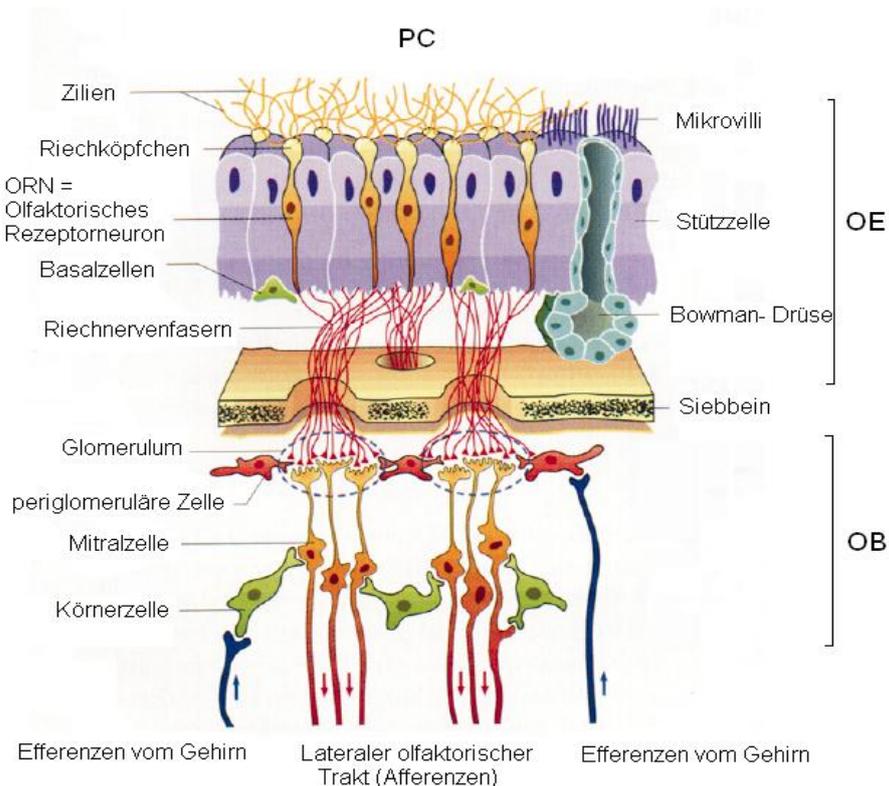
Nach Brunn beträgt die Gesamtfläche des olfaktorischen Epithels (unter dem Ausschluss der mittleren Muschel) bei einem etwa 30jährigen Mann ca. 500 mm<sup>2</sup>, bei Neugeborenen ist sie noch ausgeprägter (Brunn, 1892).

Das olfaktorische Epithel aller Vertebraten ist analog aufgebaut. Deshalb kann man Abbildung 1.2 sowie die anschließende Erklärung des Aufbaus und der Funktion des olfaktorischen Epithels in diesem Kapitel sowohl für den Menschen als auch für das Versuchstier, die Krallenfroschlarve (*Xenopus laevis*-Larve) verstehen.

Das olfaktorische Epithel lässt sich in zwei Kompartimente einteilen, in die eigentliche Riechschleimhaut und in das Vomeronasalorgan (Jacobsonsches Organ) (Schmidt et al., 2007). Beim Menschen ist die eigentliche Aufgabe des Vomeronasalorgans umstritten und wird eher als nicht funktionell bezeichnet (Witt und Hummel, 2006). Das Jacobsonsche Organ wurde im 18. Jahrhundert von Frederik Ruysch bei den Säugetieren entdeckt. Anfang des 19. Jahrhunderts wurde es nach dem Dänen Ludwig Levin Jacobson benannt. Es liegt beim Menschen auf beiden Seiten im Bereich der vorderen Nasenscheidewand (Halpern und Martinez-Marcos, 2003). Lange dachte man, dass das Vomeronasalorgan sei ebenfalls olfaktorisches Gewebe. In den siebziger Jahren hat man bewiesen, dass es zwar dem olfaktorischen System ähnelt, trotzdem aber Unterschiede aufweist. Im Gegensatz zum Menschen grenzt sich bei den meisten Tierarten dieses System (samt seiner Reizleitung) deutlich vom Riechsystem ab und funktioniert unabhängig davon (Witt und Hummel, 2006). Es dient der Wahrnehmung bzw. Rezeption von Pheromonen, die bei vielen Säugetieren für die Aufnahme und Synchronisation der Kaskade des Fortpflanzungsverhaltens von grundlegender Bedeutung sind (Brennan, 2001; Wysocki und Lepri, 1991; Leinders-Zufall et al., 2004). Wird das Vomeronasalorgan bei sexuell unerfahrenen Hamstern entfernt, ist ihr

Sexualverhalten stark geschädigt (Meredith, 1994). Die Pheromone sind meist Sexuallockstoffe, dienen aber auch als Abwehrstoffe und Markierungsstoffe (Halpern, 1987). Im Jahr 1959 wurde von Adolf Butenandt erstmals ein Pheromon nachgewiesen. Es handelte sich um die Substanz Bombykol, einem Sexuallockstoff des Seidenspinners (*Bombyx mori*) (Butenandt et al., 1961). Die Pheromone werden definiert als: „Substanzen, die von einem Individuum nach außen abgegeben werden und bei einem anderen Individuum der gleichen Art spezifische Reaktionen auslösen“ (Karlson und Lüscher, 1959). Bei dem Menschen werden sie in der Haut und in den Schweißdrüsen vermutlich aus Sexualhormonen gebildet.

Das eigentliche Riechepithel besteht grundsätzlich aus drei Zelltypen und zwar den eigentlichen olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN), den Stütz- und den Basalzellen (Getchell, 1986; Gold, 1999; Schild und Restrepo, 1998; Getchell et al., 1984).

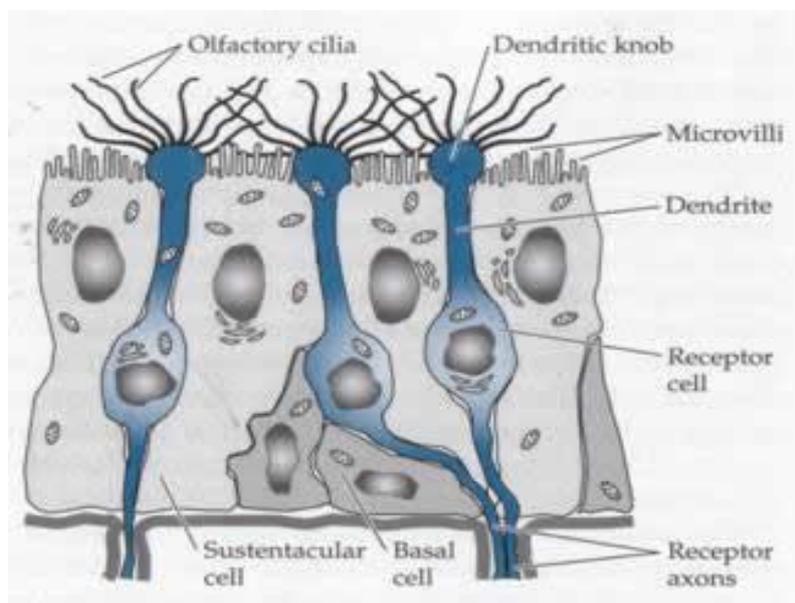


**Abb. 1.2 Aufbau des olfaktorischen Epithels**, modif. nach Schmidt et al. , 2000, Seite 198

PC = „principal cavity“ = Hauptriechhöhle, OE = olfaktorisches Epithel,  
OB = Bulbus olfactorius

Eine einzelne Schicht von Epithelzellen (Stützzellen) begrenzt das Riechepithel gegen die Nasenhöhle. Sie sind mit den Gliazellen verwandt (Okano und Tagaki, 1974). Alle ORN sind

von den Stützzellen umgeben, die wiederum miteinander durch Tight Junctions verbunden sind (Rafols und Getchell, 1983). Sie haben eine unverwechselbare Ziegelsteinform und einen in einer Ebene liegenden Zellkern. Die Stützzellen sind genauso wie die ORN bipolar, ihre feinen basalen Füßchen liegen zwischen den Basalzellen. Ein kammartiger Saum aus Mikrovilli schließt diese Zellen zur Nasenhöhle hin ab. Nach der allgemein verbreiteten Meinung sind sie so etwas wie „Hilfszellen“ und ihre Aufgabe soll vor allem in der Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts in der Riechschleimhaut, der Phagozytose toter und sterbender Zellen (Suzuki et al., 1996), der Eliminierung schädlicher Substanzen und der physischen und chemischen Isolation der Rezeptorneurone (Breipohl et al., 1974) liegen. Mittlerweile gibt es aber fundierte Hinweise für eine direkte Beteiligung der Stützzellen an intraepithelialen Signal- und Modulationsmechanismen (Getchell und Getchell, 1992; Hegg et al., 2003). Aktuelle Experimente zeigen deutlich, dass die Applikation von extrazellulären Nukleotiden einen starken  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den Stützzellen der Maus und des larvalen *Xenopus laevis* induzieren (Hegg et al., 2003; Czesnik et al., 2006).



**Abb. 1.3** Schematische Darstellung der Stützzellen (Sustentacular cell), Basalzellen und Rezeptorzellen, modif. nach Fain, 2003, [www.studentenlabor.de/ss04block/geruchssinn.htm](http://www.studentenlabor.de/ss04block/geruchssinn.htm)

Zwischen den Stützzellen befinden sich die olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN). Sie besitzen einen rundlichen Körper von ca. 5-8  $\mu\text{m}$  Durchmesser. Die Anzahl der ORN im menschlichen Riechepithel variiert je nach Schätzung zwischen 12 Millionen (Moran et al., 1991) und 30 Millionen (Hatt, 2004). Die olfaktorischen Rezeptorneurone sind bipolare

Neurone mit schmalem Soma. Ihre Zellkörper liegen meist unterhalb der Stützzellen, und ein einzelner Dendrit verläuft zur Nasenhöhle und endet dort mit einem Riechkolben, der Zilien oder Mikrovilli trägt. In der Zilienmembran der Rezeptorzellen findet man spezifische Rezeptoren, die mit dem passenden Duftstoffmolekül in Wechselwirkung treten (olfaktorische Transduktion) (Schild und Restrepo, 1998).

Insgesamt gibt es beim Menschen ca. 1000 Gene, die die olfaktorischen Rezeptoren verschlüsseln, das ist ca. 1 % des menschlichen Genoms, somit viel mehr als für jeden anderen Sinn bzw. jede andere Körperfunktion (Axel, 1995; Buck, 1996; Buck und Axel, 1991). Das Dogma, dass eine einzelne Rezeptorzelle immer nur einen olfaktorischen Rezeptortyp exprimiert (Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993; Malnic et al., 1999), wird durch neue Studien an einigen Vertebraten sowie Nichtvertebraten in Frage gestellt. So konnte z.B. in Ratten Messenger-Ribonukleinsäure (mRNS) von zwei olfaktorischen Rezeptoren nachgewiesen werden (Rawson et al., 2000). Neuere Untersuchungen am südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* weisen auch darauf hin, dass einzelne ORN mehrere olfaktorische Rezeptortypen exprimieren (Schild und Manzini, 2004; Manzini und Schild, 2004).

Die Rezeptorzellen haben eine kurze Lebensdauer von nur wenigen Monaten (30-60 Tage bei Nagern; Buck, 1996), unter bestimmten Umständen können sie allerdings auch älter werden (Farbmann, 2000). Es handelt sich dabei um Daten aus Tiermodellen, Daten vom Menschen sind nicht bekannt. Man nimmt an, dass die mitotische Aktivität der Basalzellen im Laufe des Lebens nachlässt und dadurch die Zellen älter werden (Farbmann, 2000). Der wichtigste Weg zum Abbau neuroepithelialer Zellen des Riechepithels ist die caspasevermittelte Apoptose (Cowan und Roskams, 2002).

Unterhalb der Riechzellen befinden sich rundliche Zellen, die sog. Basalzellen. Sie sind teilungsfähige Vorläuferzellen, aus denen kontinuierlich durch Mitose, Wanderung und Reifungsprozesse Riechzellen differenzieren (Graziadei und Monti Graziadei, 1979). Diese regelmäßige Regeneration wirkt somit dem Zelltod der ORN entgegen. Dies ist eines der seltenen Beispiele von postnataler Bildung von Neuronen und beweist, dass die Basalzellen eine entscheidende Aufgabe bei einer langfristigen Funktionsfähigkeit des peripheren Geruchsorgans aufweisen (Ronnett und Moon, 2002). Allerdings entstehen aus Basalzellen nicht nur ORN, sondern auch Stützzellen und die Zellen des Ausführungsgangsystems der Bowman-Drüsen (Farbmann, 2000).

---

Die flaschenförmigen intraepithelialen Bowman'schen Drüsen (Gll. olfactoriae) produzieren zusammen mit den Stützzellen eine dünnflüssige Schleimschicht, in die die Zilien der Rezeptorzellen eingebettet sind. Die Schleimschicht ist einerseits für die molekularen und ionischen Vorgänge der Geruchserkennung von entscheidender Bedeutung (Aufbau siehe Abb. 1.2, Getchell, 1986; Gold, 1999; Schild und Restrepo, 1998; Getchell et al., 1984), zweitens spült sie die alten Riechstoffe von den Zilien weg. Das Sekret der Bowman'schen Drüsen ist auch an der Immunbarriere beteiligt (Mellert et al., 1992), weil es die ORN vor Pathogenen wie z.B. den Herpes-simplex- oder Polioviren schützt, welche die ORN als transneuronalen Transport Richtung Gehirn nutzen könnten.

Basal vom Soma der ORN zweigt ein Axon ab. Die Axone aller ORN (Fila olfactoria) sind von gliaähnlichen Zellen, den sog. olfaktorischen ensheathing Zellen umgeben, die sowohl Schwann-Zell- als auch Astrozytencharakter haben (Schwartz et al., 2000). Die Axone bilden zusammen den ersten Hirnnerv, den Nervus olfactorius (Pinching und Powell, 1971b). Sie projizieren in den Bulbus olfactorius (OB). Hier besteht eine synaptische Verbindung mit den Dendriten der Mitralzellen. Eine einzige Mitralzelle wird von mehr als 1000 Axonen der ORN innerviert, es besteht hier also eine sog. Konvergenz. Der hier vorkommende Neurotransmitter heißt Glutamat. Wegen ihrer spezifischen Struktur werden diese Schaltstellen im Bulbus olfactorius als Glomerula bezeichnet. Den OB kann man in den Bulbus olfactorius principalis (BOP) und Bulbus olfactorius accessorius (BOA) einteilen. Der BOP nimmt die Informationen von dem olfaktorischen Epithel auf (Strotmann, 2001; Korsching, 2001; Nagao et al., 2002). In dem BOA werden dagegen die Signale aus dem Vomeronasalorgan verarbeitet (Keverne, 1999; Brennan, 2001).

Im Bulbus olfactorius kann man zwei unterschiedliche Schichten erkennen: eine äußere und eine innere plexiforme Schicht. Bei der äußeren plexiformen Schicht handelt es sich um die Glomerula plus die Mitralzellen und die periglomerulären Zellen. Die innere plexiforme Schicht besteht aus den Körnerzellen. Dies sind spezielle inhibitorische Interneurone, die für den Informationsaustausch zwischen den einzelnen Mitralzellen sorgen. Des Weiteren haben die Mitralzellen Kontakt zu den periglomerulären Zellen, welche durch ihren inhibitorischen Einsatz die Geruchsinformation modulieren (Pinching und Powell, 1971a, 1971c; Mori et al., 1999).

Die Axone der Mitralzellen verlassen den OB über den lateralen olfaktorischen Trakt und ziehen zu den übergeordneten Hirnstrukturen ins limbische System und zum Neokortex (Scott, 1986; Nezlin und Schild, 2000; Nezlin et al., 2003).

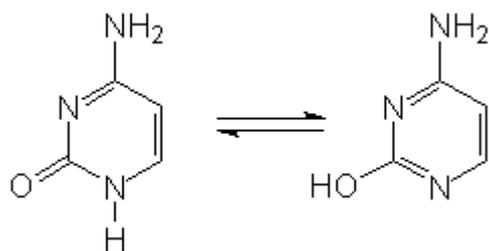
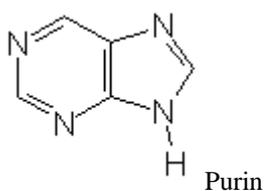
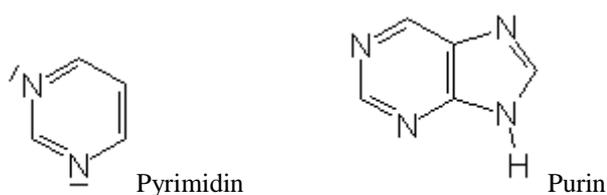
## 1.3 Purinerge Rezeptoren

### 1.3.1 Purine und Pyrimidine

Purine wurden zum ersten Mal im Jahr 1884 von Hermann Emil Fischer (1852-1919; 1902-Nobelpreis in Chemie) isoliert. Purine sind organische, heterozyklische, aromatische Stoffe, die aus einem Pyrimidinring und einem Imidazolring bestehen.

Pyrimidin wurde zum ersten Mal von Ernst Ludwig Pinner (1885–1911) aus einem Acetessigester und einem Amidin 1885 synthetisiert. Pyrimidin ist eine sechsgliedrige heterozyklische Verbindung mit zwei Stickstoffatomen in 1,3-Stellung.

Die Pyrimidine und die Purine sind neben ihren anderen wichtigen Aufgaben auch die Grundkörper der organischen Basen der Nucleinsäuren, wobei die DNS in den meisten Organismen als Speicher des genetischen Materials dient. Die RNS hat zahlreiche verschiedene Aufgaben. Sowohl DNS als auch RNS sind Polymere aus Nucleosidmonophosphaten (Nucleotiden). Jedes Nucleotid besteht aus einem Pentosezucker und einer stickstoffhaltigen Base.



Cytosin

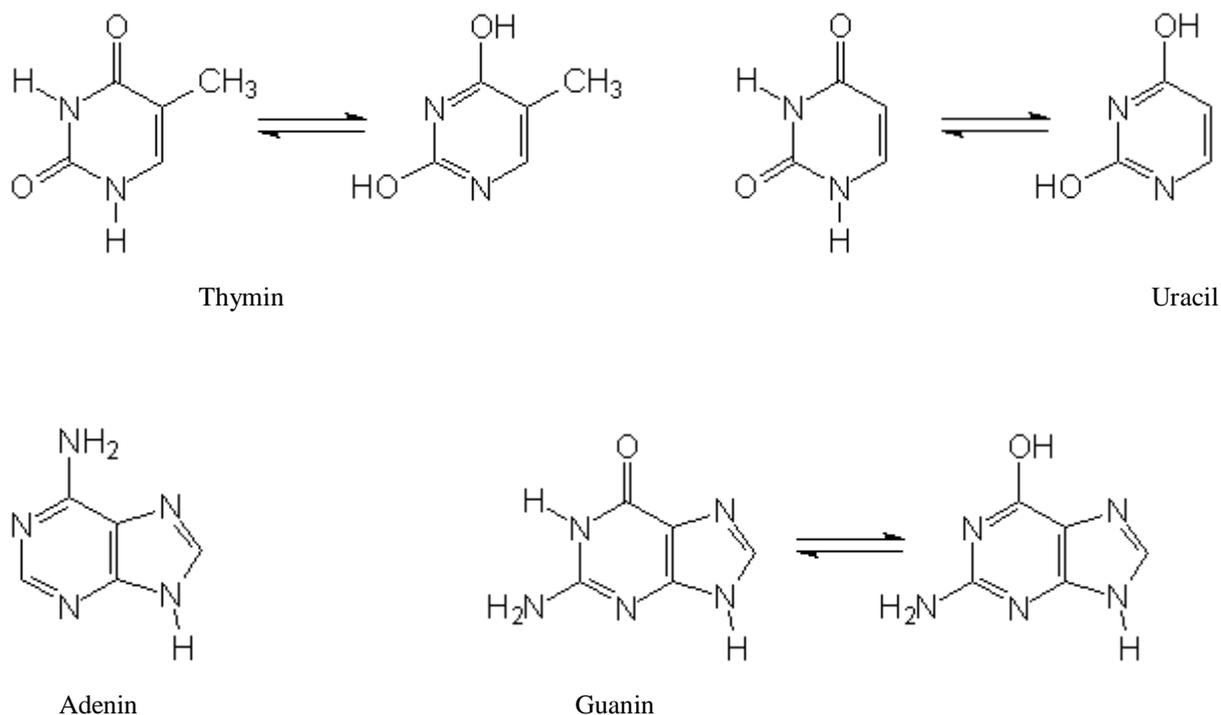
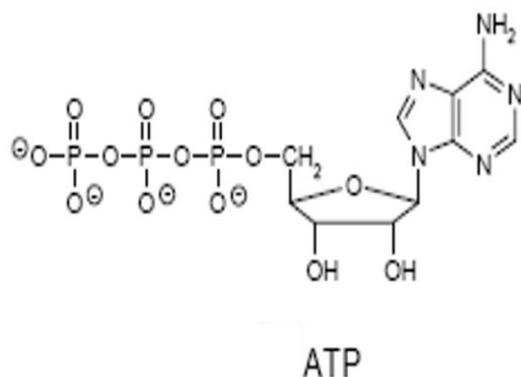


Abb. 1.4 Chemische Strukturformeln der einzelnen Nukleotide

Viele fundamentale Aufgaben die für das Funktionieren eines lebenden Organismus unentbehrlich sind, werden durch das Purinnukleotid Adenosin-5'-triphosphat (ATP) übernommen.

Das ATP ist der hauptsächliche Donor freier Energie innerhalb biologischer Systeme (Lipmann et. al., 1950). Die freie Energie der ATP-Hydrolyse besitzt einen mittleren Wert, welcher zwischen Verbindungen mit hohem Phosphattransferpotential und solchen mit einem geringeren Übertragungspotential liegt. Auf diese Weise kann das ATP als Energieträger zwischen katabolen Reaktionswegen, wo es gebildet wird, und anabolen Reaktionsketten, wo es verbraucht wird, fungieren. Deshalb kann das ATP auch als eine so genannte „Energiewährung der Zelle“ bezeichnet werden. Das ATP wird in den Mitochondrien (die sog. „Energiefabriken der Zelle“) als Resultat der Atmungskette (Elektronentransportkette) produziert (Belitser und Tsibakova, 1939). Die oxidative Phosphorylierung ist die Hauptenergiequelle für aerobe Reaktionen in Zellen aller sauerstoffabhängigen Organismen. Es ist der Vorgang, bei dem die freie Energie, die bei dem Transfer von Elektronen entlang der Atmungskette entsteht, an die Bildung von ATP aus ADP und P<sub>i</sub> gekoppelt ist.



**Abb. 1.5** Chemische Strukturformel von Adenosin-5'-triphosphat

Zusätzlich zu der Bedeutung für den intrazellulären Stoffwechsel spielt ATP als ein universeller Botenstoff (Messenger) in der interzellulären Signalübertragung eine unentbehrliche Rolle. Die ersten Hinweise auf die Aufgabe des ATP als extrazellulären Neurotransmitter lieferte Holton, als er die Freisetzung von ATP aus dem Nervus auricularis nachwies (Holton P, 1959; Holton FA und Holton P, 1953; Holton FA und Holton P, 1954). Mittlerweile ist bewiesen, dass nicht nur ATP, sondern auch Nucleoside bzw. Nucleotide anderer Purine (Adenosin, AMP, ADP, GDP, GTP) und Pyrimidine (UDP, UTP, CTP) eine Signalfunktion im Organismus ausüben (Burnstock, 2001; Ralevic und Burnstock 1998). Um diese biologischen Effekte zu entfalten müssen sie aber an membranständige Rezeptoren andocken. Diese werden als purinerge Rezeptoren bezeichnet (Burnstock, 2007).

Das ATP und die verwandten Nucleotide wurden zum ersten Mal im Jahr 1929 aus dem Herzmuskel isoliert (Drury und Szent-Györgyi, 1929). Drury und Szent-Györgyi beschrieben erstmals die physiologische Wirkung der Nucleotide im Zusammenhang mit ihrer Funktion als extrazelluläre Signalmoleküle. Sie konnten nachweisen, dass AMP und Adenosin unterschiedlich starke Reaktionen an den Versuchstieren auslösten (Drury und Szent-Györgyi, 1929). Wurden die aus einem Herzmuskel extrahierten Purine einem Versuchstier injiziert, folgten Herzstillstand, arterielle Dilatation, Hypotension und eine Inhibition der Darmkontraktion. Somit war dies der erste Nachweis einer biologischen Aktivität von adeninhaltigen Nucleotiden im kardiovaskulären System (Drury und Szent-Györgyi, 1929). Im Jahr 1934 verfeinerte Gillespie diese Aussagen, wobei er die Abhängigkeit des ausgelösten biologischen Effekts (die Art und auch die Stärke) von der Struktur der Adenosinderivate nachgewiesen hat (Gillespie, 1934). Darüber hinaus bewies er auch, dass das ATP eine

stärkere Kontraktion am Ileum und dem Uterus des Meerschweinchens verursachte als AMP und Adenosin (Gillespie, 1934).

Diese Versuche Gillespies haben zum ersten Mal auf die unterschiedliche Wirkung von Adenosin, AMP und ATP hingewiesen. Dies waren somit auch die ersten Anhaltspunkte für die Existenz von mehreren unterschiedlichen purinergen Rezeptoren (Burnstock, 1978).

Im Grunde war es aber Burnstock, der in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts durch seine experimentellen Arbeiten das Interesse für dieses neue Forschungsgebiet erweckte. Schon in den frühen 60er Jahren behauptete er, dass der Gastrointestinaltrakt von autonomen Nerven begleitet wird, die weder cholinerge noch adrenerge Botenstoffe ausschütten, sondern sich purinerg Substanzen bedienen (Martinson und Muren, 1963; Burnstock et al., 1963). Bei der Substanz handelte es sich um ATP (Eccles, 1964). Und es war wiederum Burnstock, der 1972 die Beteiligung von ATP bei der Erregungsübertragung zwischen Neuronen oder Neuronen und Glattmuskelzellen bewies (Burnstock, 1972). Er stellte damit endgültig klar, dass ATP als ein wichtiger Transmitter in den nicht-adrenergen-nicht-cholinergen Nerven des Gastrointestinaltraktes und der Harnblase fungiert. Dabei bediente er sich zum ersten Mal des Begriffes "purinerge Neurotransmission" und wies die Existenz purinerg Nervenendigungen mit entsprechenden Rezeptorproteinen nach (Burnstock, 1972).

Im Jahr 1978 hat Burnstock mit seiner Arbeit nachgewiesen, dass spezifische, extrazellulär lokalisierte Rezeptoren für Adenosin und ATP existieren, diese nannte er im Allgemeinen „purinerge Rezeptoren“ (Burnstock, 1978). Die Rezeptoren für ATP und andere Adenin-Nukleotide benannte er dann als P2-Purinorezeptoren und grenzte sie ab von den P1-Purinorezeptoren, an die Adenosin andockte (Burnstock, 1978). Im Jahr 1990 wurde der erste ATP-spezifische Rezeptor geklont (Kennedy, 2000; Kennedy et al., 2000).

In den letzten Jahren wurden Purin- und Pyrimidin-Rezeptoren (P2-Rezeptoren) in unzähligen Zellen verschiedener Gewebe und Organismen nachgewiesen. Ihre Bedeutung an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen ist mittlerweile unumstritten (Burnstock, 2007; Ralevic und Burnstock, 1998).

---

### 1.3.2 Die Nomenklatur der purinergen Rezeptoren

Als Erster summarisierte Geoffrey Burnstock die Rezeptoren für die extrazellulären Adenin-Nukleoside und Nukleotide unter dem Begriff purinerge Rezeptoren (Burnstock, 1972).

Im Jahr 1978 grenzte er die P1-Purinorezeptoren von den P2-Purinorezeptoren ab (Burnstock, 1978). Diese Einteilung Burnstocks berücksichtigte mehrere unterschiedliche Eigenschaften der Nukleotide, als auch der Purinorezeptoren selbst. Das war zu Einem die relative Potenz von ATP, AMP und Adenosin auf die einzelnen Purinorezeptoren. Dabei hat sich das Adenosin an den P1-Purinorezeptoren als die wirksamste Substanz gezeigt (Burnstock, 1978). ATP, ADP und AMP waren wiederum an den P2-Purinorezeptoren die stärkeren Agonisten (Burnstock, 1978). Dann spielte die Aktivierung der Adenylatzyklase durch Adenosin und die Stimulation der Prostaglandinsynthese durch ATP und ADP eine wesentliche Rolle bei der Einteilung (Burnstock, 1978; Fredholm et al., 1994). Auch sollte man noch den selektiven Antagonismus der Methylxantine (z.B. Theophyllin) an Adenosinrezeptoren erwähnen (Burnstock, 1978; Jacobson et al., 1992). Die P2-Purinorezeptoren werden im Gegensatz zu den P1-Purinorezeptoren nicht von den Methylxantinen geblockt (Jacobson et al., 2002). In ähnlicher Form gilt diese Klassifikation der purinergen Rezeptoren bis heute (Fredholm et al., 1997), wobei die Molekularstruktur heutzutage die wichtigste Rolle für die Einteilung spielt. Im Laufe der Jahre wurden immer mehr Rezeptoren identifiziert und die Nomenklatur wurde teilweise leicht irreführend. Auf den nächsten Seiten wird versucht, ihre Entwicklung seit Ende der siebziger Jahre bis zur endgültigen IUPHAR-Einteilung näher zu bringen.

**Die P1-Rezeptoren** (P1-Purinorezeptoren, Adenosinrezeptoren) sind seit mehreren Jahren beschrieben, das Wissen über den Antagonismus der Methylxanthine wird in der Medizin genutzt (Jacobson et al., 1992).

Organ	Effekt	Theophyllin	Koffein	Adenosin
Lunge	Bronchodilatation	+ + +	+	Über A1-Rezeptoren, Konstriktion
ZNS	Aktivitätssteigerung	+ + +	+ + +	dämpfend
Herz	Kardiale Stimulation	+ + +	+	dämpfend
Kreislauf	Vasodilatation	+ + +	+	Vasodilatation außer Niere
Hirngefäße	Vasokonstriktion	+ + +	+ + +	Vasodilatation
Niere	Diuresesteigerung	+ + +	+	Diurese

**Tabelle 1.3: Wirkungen der Methylxanthine gegenüber dem Adenosin**

An der Nomenklatur der heptahelikalen Adenosinrezeptoren hat sich nicht viel verändert. Sie werden nach wie vor in vier G-Protein-gekoppelte Subtypen unterteilt: A1, A2a, A2b und A3 (Fredholm et al., 2001).

Diese Einteilung beruht auf den verschiedenen Molekülstrukturen. Sie befinden sich in unterschiedlichen Geweben und besitzen unterschiedliche pharmakologische Profile (Jacobson et al., 1992). Alle vier Subtypen sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die einerseits über die Hemmung (A1, A3) oder durch Stimulation (A2a) der Adenylatzyklase bzw. über die Aktivierung der Phospholipase C (A1, A2b, A3) ihre Wirkung entfalten (Ralevic und Burnstock, 1998).

Es gibt mehrere Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz verschiedener Spezies bei den A1, A2a und A2b Rezeptoren. Beim A3 Rezeptor sieht man hingegen mehr Variabilität (Jacobson et al., 1992). Es gibt mittlerweile auch Berichte über Bindungsstellen an die pharmakologische Substanzen andocken, die für die vier Subformen nicht typisch sind (Lindström et al., 1996). Diese Aussagen könnte man so verstehen, dass es noch unentdeckte Adenosinrezeptoren gibt. Jedoch konnten bis jetzt in den von verschiedenen Laboren durchgeführten Klonierungsversuchen, noch keine eindeutigen Beweise auf zusätzliche Adenosinrezeptoren gefunden werden (IUPHAR, 1998).

---

Das NC-IUPHAR-Subcommittee (IUPHAR, 1998) hat ein Statement abgegeben, dass wenn zusätzliche Adenosinrezeptoren von Säugetieren extrahiert werden, die sich strukturell und durch ein anderes pharmakologisches Profil (sowohl in der Bindung als auch der funktionellen Antwort) von den vier bekannten Subtypen unterscheiden, diese A4, A5 Rezeptoren usw. genannt werden sollen.

**Die P2-Purinorezeptoren** wurden im Jahr 1985 durch Burnstock und Kennedy in die P2X- und P2Y-Purinorezeptoren unterteilt. Diese Gliederung basierte erstens auf den verschiedenen pharmakologischen Profilen der beiden Rezeptortypen, und zweitens auf den ungleichen Effekten, die durch Aktivierung dieser Rezeptoren hervorgerufen wurden (Burnstock und Kennedy, 1985).

Da man im Laufe der Jahre immer mehr Nukleosiden und Nukleotiden aus den Reihen der Purine und Pyrimidine eine Funktion an den Purinorezeptoren nachgewiesen hatte, deren Agonisten bzw. Antagonisten entdeckte und die Versuche in unterschiedlichen Geweben verschiedener Spezies durchführte, stieg die Anzahl der P2-Rezeptorsubtypen dazu proportional an (Barnard et al., 1997). Zu diesen gehörten zusätzlich die P2X- und P2Y- die P2Z-, P2T und P2U-Purinorezeptoren (Fredholm et al., 1994). Der P2U-Purinorezeptor wird nicht nur durch ATP und ATP $\gamma$ S aktiviert, sondern auch durch das Pyrimidin-Nukleotid UTP (Abbraccio und Burnstock, 1994). Der P2T-Purinorezeptor löst eine durch ADP vermittelte Antwort, eine Aggregation von Thrombozyten aus, während ATP und andere Nukleosid-Triphosphate diese Wirkung blockieren. Der P2Z- Purinorezeptor findet sich auf Mastzellen und Makrophagen und wird durch ATP aktiviert (Abbraccio und Burnstock, 1994; Nuttle et al., 1993). Zusätzlich kamen dazu noch atypische Purinorezeptoren: P2S-, P2R-, P2D-, P3- und P4-Purinorezeptor. Dies war leicht unübersichtlich und irreführend. Zum Beispiel der P2U-Purinorezeptor, dieser Rezeptor wird durch UTP aktiviert, also von einem Pyrimidinnukleotid, hat aber Purin als Base in seinem Namen (Abbraccio und Burnstock, 1994). Deshalb haben Burnstock und Abbraccio vorgeschlagen, die P2-Purinorezeptoren in erster Linie nach ihren Signaltransduktionswegen zu unterscheiden. Dieser Vorschlag wurde vom IUPHAR-Committee übernommen. P2X-Rezeptoren sind demnach unselektiv permeable ligandenaktivierte Ionenkanäle (Ausnahme: P2X7-Rezeptor) und P2Y-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Kennedy, 2000; North, 2002; Simon et al., 1995; Barnard et al., 1998). Es wurde der Terminus P1-/P2-Purinorezeptor durch P1-/P2- Rezeptor ersetzt (Ralevic und Burnstock, 1998; Fredholm et al., 1997; Fredholm et al., 2001). Damit entstand bei den durch Pyrimidin-Nukleotide aktivierten Rezeptoren keine Verwirrung mehr. Nach

dieser neuen Klassifikation entspricht der frühere P2X- dem P2X<sub>1</sub>-Rezeptor, der P2Y- dem P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor, der P2U- dem P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor, der P2T- dem P2Y<sub>3</sub>-Rezeptor und der P2Z- Rezeptor dem P2X<sub>7</sub>-Rezeptor (Abbraccio und Burnstock, 1994; Ralevic und Burnstock, 1998; Fredholm et al., 1997).

Derzeit unterscheidet man sieben P2X- (P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub>) und acht P2Y- Subtypen (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>) (IUPHAR, 1998).

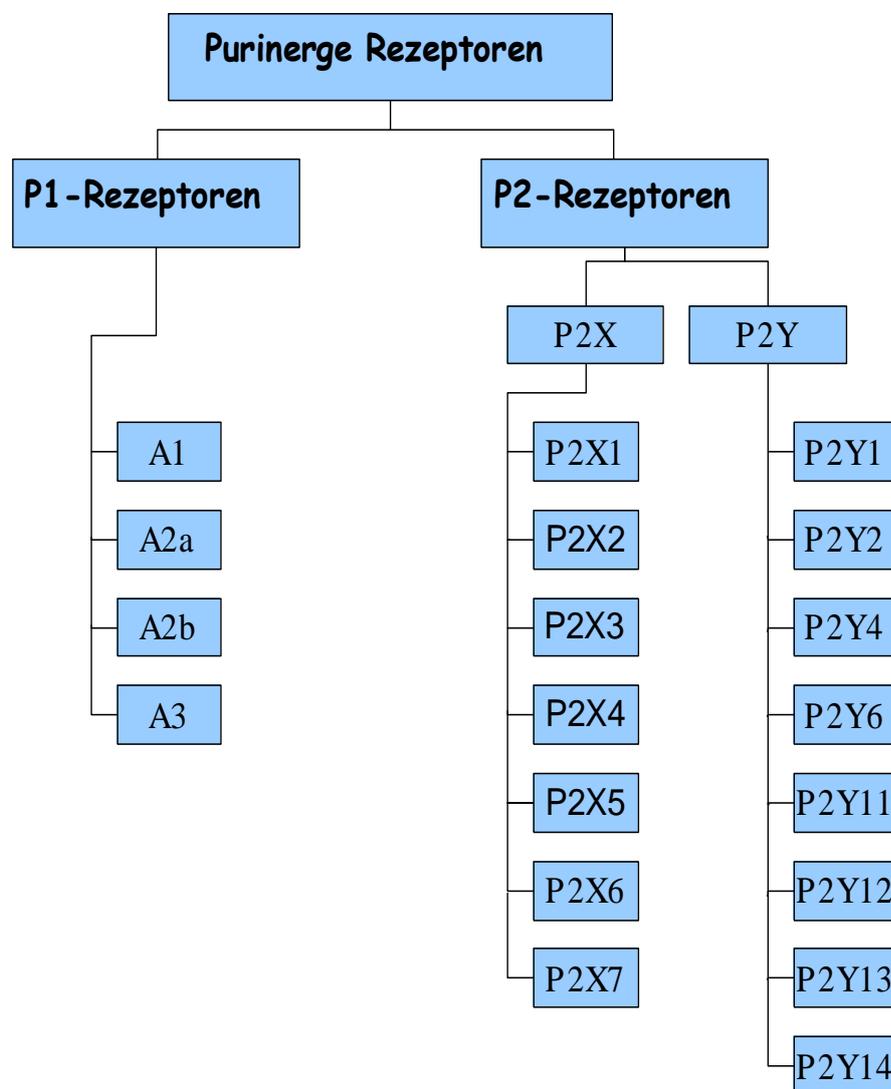


Abb. 1. 6 Aktuelle Einteilung der purinergen Rezeptoren, modif. nach Burnstock, 2007

---

### 1.3.3 P2-Rezeptoren

#### 1.3.3.1 P2X-Rezeptoren

Die P2X-Rezeptoren besitzen eine wichtige Rolle als Vermittler der schnellen Erregungsübertragung zwischen Neuronen im zentralen und peripheren Nervensystem (Abbraccio und Burnstock, 1994) und befinden sich in fast allen Zellarten und Gewebetypen.

Im Jahr 2000 gaben Nörenberg und Illes bekannt, dass P2X-Rezeptoren in vielen Neuronen der Gehirn- und Rückenmarkregionen zu finden sind (Nörenberg und Illes, 2000). Sie wurden auch in verschiedenen Epithel- und Endothelzellen, im Skelettmuskel und im hämatopoetischen Gewebe exprimiert (North, 2002). In zahlreichen Retinazellarten und autonomen und primär-sensorischen Neuronen konnten die P2X-Rezeptoren ebenfalls lokalisiert werden (Brändle et al., 1998; Neal et al., 1998; Dunn et al., 2001). Sie wurden noch dazu in zahlreichen Arten von Gliazellen exprimiert, z.B. Müller-Zellen der Retina (Liu und Wakakura, 1998; Neal et al., 1998; Pannicke et al., 2000) und in Schwannzellen (Verkhatsky und Steinhauser, 2000). Wie schon erwähnt, wurden bisher sieben verschiedene P2X-Subtypen (P2X<sub>1-7</sub>) bei den Säugetieren beschrieben (Buell et al., 1996). Der P2X<sub>7</sub>-Rezeptor weist die meisten Abweichungen zu den anderen Subtypen auf, sowohl in der Wirkung, als auch in der Struktur (North und Surprenant, 2000; Pannicke et al., 2000). Außer den oben genannten Rezeptoren wurde noch ein zusätzlicher Rezeptor der P2X-Familie (P2X<sub>8</sub>) im Huhn beschrieben (Bo et al., 2000).

Die P2X-Rezeptoren vermitteln eine non-selektive Passage von Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>-, und Ca<sup>2+</sup>- Ionen über die Zellmembran, die zu einer Depolarisation führt (Dubyak und el-Moatassim, 1993). Der Kalziumeinstrom kann entweder direkt über den Rezeptorkanal oder über spannungsabhängige Kalziumkanäle, die durch die Depolarisation geöffnet werden, stattfinden. Die letzteren leisten vermutlich den wichtigeren Beitrag zum Kalziumeinstrom. Die vollständige Desensibilisierung kann sehr schnell verlaufen (ca. 10 ms bei P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>) oder 100-1000mal langsamer sein (P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub>) (North, 2002). Einige Rezeptorsubtypen (P2Z / P2X<sub>7</sub>) sind auch für größere Moleküle permeabel (Di Virgilio, 1995).

Der Hauptagonist der P2X-Rezeptoren ist in den meisten Fällen ATP. Die weiteren Agonisten sind  $\alpha$ ,  $\beta$ -Methylen-ATP ( $\alpha$ ,  $\beta$ -MeATP), Adenosin 5'-(gamma-thio)triphosphat, (ATP $\gamma$ S), UTP, ADP, 2-Methylthio-ATP (2MeSATP), 2',3'-(Benzoyl-4-benzoyl)-ATP (BzATP) und CTP (Kennedy und Leff, 1995). Die verschiedenen Agonisten besitzen eine unterschiedlich starke Wirkpotenz an den einzelnen P2X-Rezeptortypen (North, 2000; Ralevic und Burnstock, 1998). Der P2X<sub>7</sub>-Rezeptor weist im Gegensatz zu den anderen Subtypen eine 10- bis 100-fach höhere Potenz von BzATP gegenüber ATP auf (North und Surprenant, 2000; Nuttle et al., 1993). Im Vergleich zu den anderen P2X-Rezeptoren benötigt er zur Aktivierung eine deutlich höhere ATP-Konzentration (ab 100  $\mu$ M) (North und Surprenant, 2002).

P2X-Rezeptor	Wirkpotenz der Agonisten
P2X <sub>1</sub>	BzATP >> 2MeSATP $\geq$ ATP > $\alpha$ , $\beta$ -MeATP >> ADP
P2X <sub>2</sub>	2MeSATP = ATP $\gamma$ S ( $\alpha$ , $\beta$ -MeATP, $\beta$ , $\gamma$ -MeATP unwirksam)
P2X <sub>3</sub>	BzATP >> 2MeSATP > ATP = $\alpha$ , $\beta$ -MeATP
P2X <sub>4</sub>	BzATP = ATP > 2MeSATP >> $\alpha$ , $\beta$ -MeATP
P2X <sub>5</sub>	ATP > 2MeSATP > ( $\alpha$ , $\beta$ -MeATP unwirksam)
P2X <sub>6</sub>	ATP > 2MeSATP > ADP ( $\alpha$ , $\beta$ -MeATP unwirksam)
P2X <sub>7</sub>	BzATP >> ATP (2MeSATP, ATP $\gamma$ S, ADP unwirksam)

**Tabelle 1.4: Wirkreihenfolge von Agonisten an den P2X-Rezeptoren**, modif. nach Ralevic und Burnstock, 1998, Seite 446

P2X-Rezeptoren	Antagonisten	Transduktionsmechanismus
P2X <sub>1</sub>	TNP-ATP, IP <sub>5</sub> I, NF023, NF449	Intrinsischer Kationkanal I <sub>Na/K</sub> /Ca <sup>2+</sup>
P2X <sub>2</sub>	Suramin, isoPPADS, RB2, NF770, NF279	Intrinsischer Ionenkanal, spez. Ca <sup>2+</sup>
P2X <sub>3</sub>	TNP-ATP, PPADS, A317491, NF110, IP <sub>5</sub> I, phenol red	Intrinsischer Kationenkanal I <sub>Na/K</sub> /Ca <sup>2+</sup>
P2X <sub>4</sub>	TNP-ATP, BBG, phenolphthalein	Intrinsischer Ionenkanal, spez. Ca <sup>2+</sup>
P2X <sub>5</sub>	Suramin, PPADS, BBG	Intrinsischer Ionenkanal
P2X <sub>6</sub>		Intrinsischer Ionenkanal
P2X <sub>7</sub>	KN62, KN04, MRS2427, O-ATP Coomassie brilliant blue G, RN6189, Az11645373, A-740003	Intrinsischer Kationenkanal und eine große Pore mit lang anhaltender Aktivierung

**Tabelle 1.5: P2X-Rezeptoren Antagonisten, Transduktionsmechanismus an den P2X-Rezeptoren**, modif. nach Burnstock, 2007, Seite 666

Die P2X-Rezeptoren werden über die Wirkreihenfolge der Agonisten, Antagonisten und anhand ihrer Zink- und Protonenempfindlichkeit charakterisiert (North, 2002). Jedoch gibt es

---

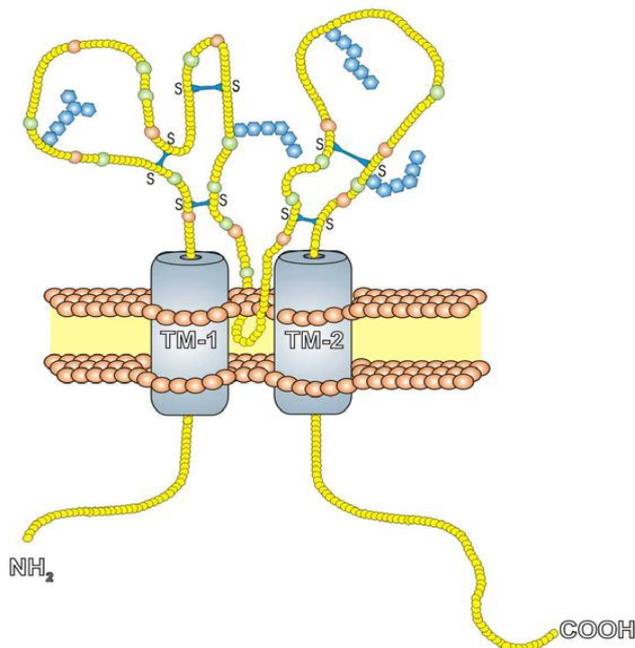
heutzutage noch nicht ausreichend subtypenselektive Antagonisten für P2X-Rezeptoren die zur Verfügung stehen. PPADS und Suramin sind unselektive Antagonisten.

P2X-Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer molekularen Struktur stark von den anderen ionotropen Rezeptoren (North, 2002; Nicke et al., 1998). Bisher wurde keine Homologie in der Sequenz von P2X-Rezeptoren und anderen Proteinen beschrieben (North, 2002). Lediglich wurde auf eine Ähnlichkeit mit Klasse II-Aminoacyl-tRNS-Synthetasen hingewiesen (North, 2002).

Allerdings weisen die einzelnen P2X-Subtypen eine sehr starke Ähnlichkeit in ihrer Topologie auf (Nicke et al., 1998). Die Aminosäureanzahl der Peptidketten bei der Ratte erstreckt sich von 388 beim P2X<sub>4</sub>- bis zu 595 beim P2X<sub>7</sub>-Rezeptor (Ralevic und Burnstock, 1998). Bei jedem Subtyp liegen sowohl der Amino-, als auch der Carboxy-Terminus intrazellulär. Sie sind die Angriffstellen für Proteinkinase-vermittelte Phosphorylierungsreaktionen (Burnstock, 2004). Der Amino-Terminus ist bei allen sieben Subtypen fast gleich lang (Nicke et al., 1998). Beträchtliche Unterschiede liegen hingegen bei dem Carboxy-Terminus, wo die Länge zwischen 30 Aminosäuren beim P2X<sub>6</sub>- bis zum 240 Aminosäuren beim P2X<sub>7</sub>-Rezeptor reicht (Ralevic und Burnstock, 1998). Jeder Subtyp weist zwei hydrophobe Domänen auf, die die Plasmamembran durchqueren. Diese so genannten Transmembranregionen (TM-1, TM-2) sind am Aufbau der Ionenporen beteiligt (Nicke et al., 1998; Burnstock, 2007). Eine Ausnahme bildet der P2X<sub>7</sub>-Rezeptor, der zusätzlich eine dritte hydrophobe Domäne besitzt (North, 2002). Diese ermöglicht ihm die Bildung einer unselektiven Pore für große organische Moleküle (bis zu 900 Da) (North, 2002; Dubyak und el-Moatassim, 1993; Ralevic und Burnstock, 1998).

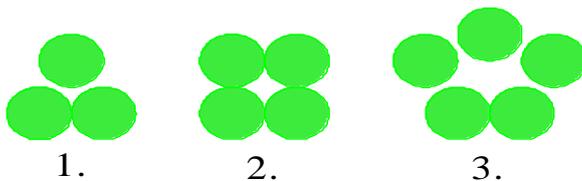
Der dazwischenliegende Teil der Peptidkette (siehe Abb.1.7) bildet eine Schleife, die extrazellulär der Plasmamembran herausragt. Sie enthält 10 konstante Cysteinreste, 14 Glyzinreste und 2 bis 6 Glykolisierungsstellen. Die Cysteinreste bilden paarweise Disulfidbrücken. Diese sind für die dreidimensionale Struktur der P2X-Rezeptoren verantwortlich. Die Glykolisierung ist notwendig, um das Protein in die Zellmembran zu integrieren. Die Anzahl der Glykolisierungsstellen variiert, je nachdem um welchen Subtyp bzw. um welche Spezies es sich handelt (North, 2002). Nah am Porenvorhof bildet der extrazelluläre Peptid-Loop noch eine H5-Region, die für eine mögliche Rezeptorregulierung durch Kationen (Magnesium-, Kalzium-, Zink-, Kupfer-Ionen sowie Protonen) verantwortlich ist. Die Aminosäuresequenz der Peptidketten der P2X-Subtypen ist in 30 % bis 50 % identisch (Burnstock, 2007; Nicke et al., 1998).

Die ATP-Bindungsstelle befindet sich in dem extrazellulären Teil der Peptidkette in der Nähe der zwei Transmembranregionen (TM-1, TM-2) (Nicke et al., 1998).



**Abb. 1.7** allgemeine Topologie einer P2X-Rezeptoruntereinheit, modif. nach Ralevic und Burnstock, 1998, Seite 447

**TM-1, TM-2:** Transmembranregionen, **rote Punkte:** Cysteinreste, **blaue Verbindungsstellen:** Disulfidbrücken, **sechseckige blaue Ketten:** Glykosylierungsstellen



**Abb. 1.8** Rezeptorstrukturen der ionotropen Rezeptoren

1. P2X-Rezeptoren (ausgenommen P2X7)
2. ionotrope Glutamatrezeptoren (NMDA, AMPA, Kainat)
3. Nicotinrezeptoren, GABA-Rezeptoren, Glycinrezeptor, 5-HT3-Rezeptor

Dabei können die P2X-Rezeptoren aus gleichen (Homomeren) oder ungleichen (Heteromeren) Untereinheiten bestehen. Dabei besteht der P2X<sub>7</sub>-Rezeptor immer nur aus homomeren Untereinheiten (North, 2002). Der P2X<sub>6</sub> enthält wiederum ausnahmslos heteromere Proteinuntereinheiten (North, 2002). Zurzeit kennt man 11 verschiedene heteromere P2X-Rezeptoren (North, 2002, Burnstock, 2007).

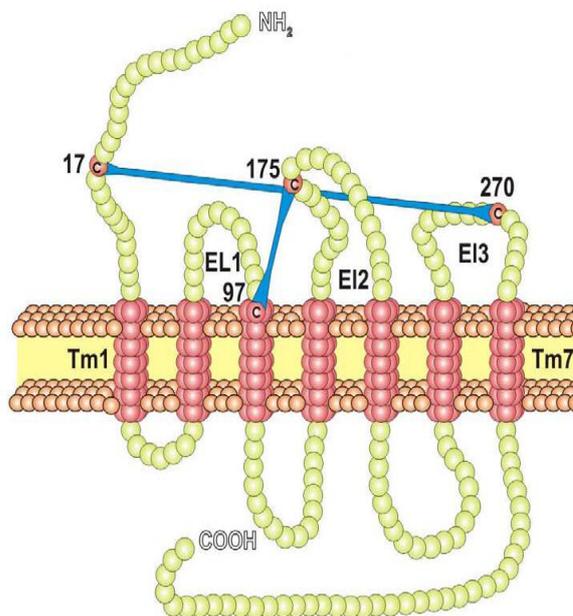
---

Die heteromeren P2X-Rezeptoren unterscheiden sich von den homomeren P2X-Rezeptoren in ihren pharmakologischen Eigenschaften (North, 2002, Burnstock, 2007).

### 1.3.3.2 P2Y-Rezeptoren

Die ersten Gene der P2Y-Rezeptoren wurden im Jahr 1993 durch die Isolierung der cDNS von einem Küken-Gehirn (Webb et.al., 1993) und von einer neuroblastischen Zelllinie einer Maus (Lustig et.al., 1993) geklont. Es wurden bis jetzt acht verschiedene säugetierartige P2Y-Rezeptoren (P2Y<sub>1</sub>-, P2Y<sub>2</sub>-, P2Y<sub>4</sub>-, P2Y<sub>6</sub>-, P2Y<sub>11</sub>-, P2Y<sub>12</sub>-, P2Y<sub>13</sub>-, P2Y<sub>14</sub>-Rezeptor) festgelegt (Ralevic und Burnstock, 1998). Außerdem wurden auch die Rezeptoren p2y3 (Küken), p2y8 (Xenopus), p2y (Truthahn) als funktionelle Nukleotid-Rezeptoren definiert. Allerdings schließt die offizielle NC-IUPHAR-Klassifikation nur die acht im Säugetier vorkommenden P2Y-Rezeptoren ein (Fredholm et al., 1997).

Die P2Y-Rezeptoren besitzen wie alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sieben hydrophobe Transmembranregionen (Barnard et al., 1994; Burnstock, 2007). Zwischen dem extrazellulären Amino- und dem intrazellulären Carboxy-Terminus befinden sich drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Peptidschleifen. Alle acht P2Y-Subtypen enthalten vier Cystein-Reste, die zwei Disulfidbrücken bilden. Eine Disulfidbrücke befindet sich zwischen dem Amino-Terminus und der dritten extrazellulären Schleife; die zweite Disulfidbrücke zwischen der ersten und der zweiten extrazellulären Schleife (Hoffmann et al., 1999; Ding et al., 2003).



**Abb. 1.9 Struktur des P2Y-Rezeptors**, modif. nach Burnstock, 2007  
Seite 665

Die Peptidketten der P2Y-Rezeptoren bestehen aus 328 bis 376 Aminosäuren und sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 19 bis 55 % identisch (Burnstock, 2007). Die Aktivierung der meisten P2Y-Rezeptoren (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>) führt zur Stimulation der Phospholipase C (PLC), die wiederum Phosphatidylinositol-4,5-phosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) hydrolysiert. Das führt zur Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern. Dies kann dann eine Reihe anderer wichtiger Signalwege induzieren (Simon et al., 1995; Burnstock, 2007). Über die Bildung von DAG und Stimulierung der Proteinkinase C (PKC) ist zum Beispiel eine Aktivierung der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase D (PLD), des MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Weges und über Ca<sup>2+</sup>-Kanäle ein Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über die Zellmembran möglich (Boader und Webb, 2001). Des Weiteren ist auch eine Aktivierung der NO-synthetase möglich. Diese wiederum leitet dann die Bildung des EDRF's (endothelium derived relaxing factor) ein (Communi et al, 2000). Die Stimulation der P2Y<sub>12</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren löst im Gegensatz zu den anderen P2Y-Rezeptoren eine Hemmung der Adenylatcyclase aus (Burnstock, 2007). Der P2Y<sub>11</sub>-Rezeptor ist sowohl an eine Aktivierung der Phospholipase C, als auch der Adenylatcyclase gekoppelt (Burnstock, 2007).

Es ist auch eine Beeinflussung neuronaler Kalzium- und Kaliumkanäle durch einige P2Y-Rezeptoren beschrieben (Boehm, 2003; Ralevic und Burnstock, 1998). Der P2Y<sub>14</sub>-Rezeptor

ist ein für UDP-Glukose sensitiver G-Protein gekoppelter Rezeptor (Boarder und Webb, 2001). Im Vergleich zu den P2X-Rezeptoren ist die Zeit zwischen der Aktivierung der P2Y-Rezeptoren und dem Auftreten des Effekts in der Signalkaskade relativ lang. Diese beträgt einige Sekunden (Boehm, 2003).

Die P2Y-Subtypen unterscheiden sich erheblich in der Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Agonisten (Burnstock, 2007). Die Subtypen P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>13</sub> sind selektiv durch Adenin-Nukleotide aktivierbar (Ralevic und Burnstock, 1998; Barnard et al., 1998;). Auf den P2Y<sub>4</sub>- und P2Y<sub>6</sub>-Subtypen sind die Uridin-Nukleotide als Agonisten wirksam (Ralevic und Burnstock, 1998; Bogdanov et al., 1998;). Der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor wird durch ATP und UTP gleichermaßen aktiviert (Burnstock, 2007).

P2Y-Rezeptor	Wirkpotenz der Agonisten	Inaktive Nukleotide
P2Y <sub>1</sub>	2MeSATP ≥ ATP >> ADP	α,β-meATP, β,γ-meATP, UTP, UDP
P2Y <sub>2</sub>	ATP=UTP	ADP, UDP, 2MeSATP, β,γ-meATP
P2Y <sub>4</sub>	UTP > ATP	ADP, UDP, 2MeSATP, 2MeSADP
P2Y <sub>6</sub>	UDP >> UTP >> ADP	ATP, 2MeSATP, 2MeSADP
P2Y <sub>11</sub>	ATP > 2meSATP >>> ADP	UTP, UDP
P2Y <sub>12</sub>	2MeSADP > ADP	ATP (Antagonist), UTP, UDP
P2Y <sub>14</sub>	2MeSADP = 2MeSATP > ADP	UTP, UDP

**Tabelle 1.6: Wirkpotenz der Agonisten der homomeren P2Y-Rezeptoren**, modif. nach Ralevic und Burnstock, 1998, Seite 459

P2Y- Rezeptoren	Antagonisten	Transduktionsmechanismus
P2Y <sub>1</sub>	MRS2179, MRS2500, MRS2279, PIT	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> ; PLC-β - Aktivierung
P2Y <sub>2</sub>	Suramin > RB2, AR-C126313	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> und evtl. eine G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> PLC-β - Aktivierung
P2Y <sub>4</sub>	RB2 > Suramin	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> und evtl. eine G <sub>i</sub> , PLC-β - Aktivierung
P2Y <sub>6</sub>	MRS2578	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> ; PLC-β - Aktivierung
P2Y <sub>11</sub>	Suramin > RB2, NF157, 5'-AMPS, NF340	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> und G <sub>s</sub> ; PLC-β - Aktivierung
P2Y <sub>12</sub>	CT50547, AR-C69931MX, INS49266, AZD6140, PSB0413, ARL 66096, 2MeSAMP	G <sub>ai</sub> , Hemmung der Adenylatecyklase
P2Y <sub>13</sub>	MRS2211, 2-MeSAMP	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub>
P2Y <sub>14</sub>	UDP-Glukose ≥ UDP-Galaktose	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub>

**Tabelle 1.7: P2Y-Rezeptoren Antagoniste, Transduktionmechanismus an den P2Y-Rezeptoren**, modif. nach Burnstock, 2007, Seite 666

## 1.4 Intention der Arbeit

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit den Reaktionen von Stützzellen der olfaktorischen Mukosa von *Xenopus-laevis*-Larven der Stadien 51-54 (Nieuwkoop und Faber, 1994) auf Nukleotide, die mittels des konfokalen Laserscanning Mikroskops unter der Verwendung der *Calcium-Imaging*-Technik aufgezeichnet wurden.

Eine Veröffentlichung aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schild hat gezeigt, dass Stützzellen der olfaktorischen Mukosa von *Xenopus-laevis*-Larven auf ATP reagieren (Czesnik et al., 2006). Offen blieb dagegen die Frage, welche purinergen Rezeptorsubtypen für die charakteristischen ATP-Antworten von Stützzellen verantwortlich sind. In der vorliegenden Arbeit wurde eine pharmakologische Studie durchgeführt, um die von Stützzellen exprimierten purinergen Rezeptorsubtypen zu identifizieren.

Die während dieser Dissertation erhaltenen Daten beschreiben erstmalig von Stützzellen der olfaktorischen Mukosa von *Xenopus-laevis*-Larven exprimierte purinerge Rezeptorsubtypen. Dies zeigt, dass in der Riechschleimhaut von larvalen *Xenopus laevis* ein purinerges System existiert, dessen Aktivierung spezifische Signale in Stützzellen generiert. Die physiologische(n) Funktion(en) dieses intraepithelialen Signalweges sind noch unbekannt, geplante weiterführende Arbeiten werden aber hoffentlich auch diese noch offene Frage beantworten.

---

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Das Versuchstier - *Xenopus laevis*

*Xenopus laevis*, der afrikanische Krallenfrosch (auch Apothekerfrosch genannt) wurde 1802 vom französischen Zoologen Francois-Marie Daudin (1774-1804) entdeckt und beschrieben (Histoire naturelle, generale et particuliere des reptiles 1802-05).

Die Unterfamilie der Krallenfrösche (*Xenopodinae*) umfasst zwei Gattungen, die tropischen Krallenfrösche (*Silurana*) und die eigentlichen Krallenfrösche (*Xenopus*).

Die natürliche Heimat von *Xenopus laevis* ist das mittlere bis südliche Afrika. Mittlerweile ist der Krallenfrosch aber auch im Süden der USA, Großbritannien und in Mitteleuropa anzutreffen. Das ist vor allem der jahrzehntenlangen unüberlegten Auswilderung nach abgeschlossenen Tierversuchen und der guten Anpassungsfähigkeit der Tiere (Tinsley et al., 1996) zu verdanken. In der freien Wildbahn bevölkert er kleine Gräben, Pfützen und schlammige Teiche und andere warme, meist stehende Gewässer. In Gefangenschaft werden die Krallenfrösche in Glasaquarien gehalten. *Xenopus laevis* verbringt die meiste Zeit unter Wasser und taucht nur zum Atmen auf (Simmonds, 1985; Nieuwkoop und Faber, 1994; Tinsley et al., 1996).

Mit ca. zwei Jahren werden die Frösche geschlechtsreif. Sie erreichen eine Körpergröße von etwa 13 bis 15 cm, dabei sind die weiblichen Tiere größer als die männlichen Tiere. Man kann die weiblichen Tiere auch durch die Kloakalpapillen im Genitalbereich von den Männchen unterscheiden (Nieuwkoop und Faber, 1994). In den Zuchtaquarien sind die Tiere meist kleiner als in der freien Natur.

Der Körper des adulten Frosches ist oval mit flachem, eher kleinem Kopf. Die Vorderbeine sind schwach entwickelt und haben vier Finger ohne Schwimmhäute. Die sehr muskulösen Hinterbeine enden mit je fünf Zehen. Nur an den inneren drei der fünf Zehen, befinden sich kräftige schwarze Hornkrallen. Zwischen den Zehen der Hinterbeine sind Schwimmhäute, die bis an die Zehenspitzen reichen sichtbar. Die Haut der Tiere ist drüsenreich und grünbräunlich gefärbt (Altner, 1962). Der Krallenfrosch kann seine Hautfarbe durch äußere

---

Stimuli (Hormone, Lichtverhältnisse) heller oder dunkler erscheinen lassen. Diese unbewusste Hautfarbenänderung dient hauptsächlich zur Tarnung und zur Thermoregulation des Tieres. Sie wird durch die im Hautniveau liegenden pigmenthaltigen Zellen, den Chromatophoren, ermöglicht (Karlsson, 2001). Der Krallenfrosch gehört zu den zungenlosen Fröschen (*Aglossa, Pipidae*), kann also seine Opfer nicht mit der Zunge fangen. Die Nahrung sucht er deshalb durch Wirbeln der vorderen Gliedmaßen im Boden des beheimateten Gewässers. In der freien Wildbahn ernährt sich der *Xenopus laevis* von Insekten, Würmern und kleinen Wirbeltieren, also omnivor und teils auch kannibalisch. Seine Larven ernähren sich von Algen (Avila und Frye, 1978).

Die Augen sind nach oben gerichtet. Da das optische Organ des *Xenopus laevis* nicht so gut ausgebildet ist, sind die Krallenfrösche mit einem weiteren Sinnesorgan, dem Seitenlinienorgan ausgestattet (Kramer, 1933). Dieses auch bei den Fischen anzufindende Organ, das aus ca. 200 Sinneszellen besteht, verläuft über den ganzen Körper und nimmt Schwingungen im Wasser wahr (Caprio, 1988). Im Gegensatz zu den Augen ist der Geruchssinn sehr gut entwickelt (siehe folgende Kapitel). Die Orientierung und Nahrungssuche erfolgt über den Tast- und den Geruchssinn (Föske, 1934; Weiss, 1986; Avila und Frye, 1978).

Erwachsene Krallenfrösche kann man für Versuchszwecke bei einer Tierzucht erwerben (Kaehler, Hamburg, Deutschland). Die Tiere werden mit Pondsticks (Tetra Pond, Melle, Deutschland) und kleinen Stücken von Rinderherzen gefüttert und in handelsüblichen Aquarien mit einem Wasser von ca. 20°C und einem pH-Wert zw. 7 und 8 gehalten. Die Krallenfrösche reagieren sehr empfindlich auf ein saueres Wassermilieu (pH unter 5).

Die Haltung und die Aufzucht der Tiere sind relativ unproblematisch, deshalb eignen sie sich hervorragend als Versuchstiere (Simmonds, 1985). In der Vergangenheit wurden mit Hilfe von *Xenopus-laevis* -Weibchen Schwangerschaftstest durchgeführt. Dabei wurde dem Tier der Morgenurin der Probandin in den dorsalen Lymphsack gespritzt. Wenn das Froschweibchen innerhalb von 12 Stunden laichte (bis zu 2000 Eier), galt die Probandin als schwanger. Das Tier reagiert dabei auf das Humane Choriongonadotropin Hormon (HCG) (Thorborg, 1952). Dies macht man sich auch bei der Aufzucht zu Nutze. So injiziert man den männlichen 400 µl und den weiblichen Krallenfröschen 800 µl humanes Choriongonadotropin (1000 I.E. Chorionic Gonadotropin CG-10, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in den dorsalen Lymphsack. Anschließend werden die Frösche pärcchenweise in abgedunkelte Wasserbecken gesetzt und dort über Tage in Ruhe gelassen, da der Leistenamplexus, auch Lendenamplexus genannt (das Umklammern des

---

Weibchens durch das Männchen), sich über eine längere Zeit erstrecken kann. Die Eier, bis zu 2000 Stück, werden meist über Nacht in Schüben abgegeben und nach 2 - 3 Tagen schlüpfen dann die ersten Larven. Die geschlüpften Larven werden wie die adulten Tiere in Aquarien mit 20°C warmen Wasser gehalten und erhalten Algenfutter als Nahrung (Mikrozell-Algenfutter 30410, Dohse Aquaristik, Bonn).

Für die Experimente in dieser Doktorarbeit wurden *Xenopus-laevis*-Larven in den Stadien 51 bis 54 verwendet. Das Stadium 51 erreichen diese Tiere nach etwa drei Wochen und nach weiteren vier Wochen das Stadium 54. Im Stadium 55 beginnt die Metamorphose, welche nach etwa 8 Wochen im Stadium 66 endet (Weiss, 1986; Nieuwkoop und Faber, 1994).

### **2.1.1 Das olfaktorische System von *Xenopus laevis***

Das olfaktorische System des Frosches unterliegt während der Metamorphose einer starken Umwandlung, die sich im Grad der Intensität stark von den anderen Amphibien unterscheidet (Hansen et al., 1998). An dieser Stelle wird die Einteilung der Riechorgane im adulten *Xenopus laevis*, gefolgt von der in larvaalem *Xenopus laevis*, dargestellt.

#### **2.1.1.1 Das olfaktorische System im adulten *Xenopus laevis***

Das olfaktorische System von geschlechtsreifen *Xenopus-laevis*-Fröschen besteht aus drei unterschiedlichen Kammern: einer Haupthöhle, einer Nebenhöhle und dem Vomeronasalorgan (Föske, 1934; Weiss, 1986; Oikawa et al., 1998).

Die medial gelegene Haupthöhle („Luftnase“) bildet den größten Teil des Systems. Sie ist vorne durch die Nasenöffnung mit der äußeren Umgebung verbunden. Durch eine ventrale Falte (Plica terminalis) ist sie von der Nebenhöhle getrennt. Sie ist ständig mit Luft gefüllt und wird unter Wasser durch eine Membran verschlossen. Die Haupthöhle dient zur Erkennung von Odorantien, die durch die Luft übertragen werden (Weiss, 1986; Oikawa et al., 1998). Zu diesem Zwecke werden hier die sog. XOR-2-Rezeptoren exprimiert, die eine Ähnlichkeit mit den olfaktorischen Rezeptoren der Säugetiere aufweisen (Freitag et al., 1998).

---

Die Axone der XOR-2-Rezeptoren projizieren in den dorsalen Teil des Bulbus olfactorius principalis.

Die Nebenhöhle („Wassernase“) befindet sich lateral der Haupthöhle. Sie ist im Gegensatz zu der Hauptkammer permanent mit Wasser gefüllt (Weiss, 1986; Oikawa et al., 1998). Hier werden ausschließlich XOR-1-Rezeptoren exprimiert, die den olfaktorischen Rezeptoren von Fischen ähneln und zur Wahrnehmung von im Wasser gelösten Duftstoffen (Freitag et al., 1995) dienen. Die Axone dieser Rezeptoren projizieren in den ventralen Bulbus olfactorius principalis.

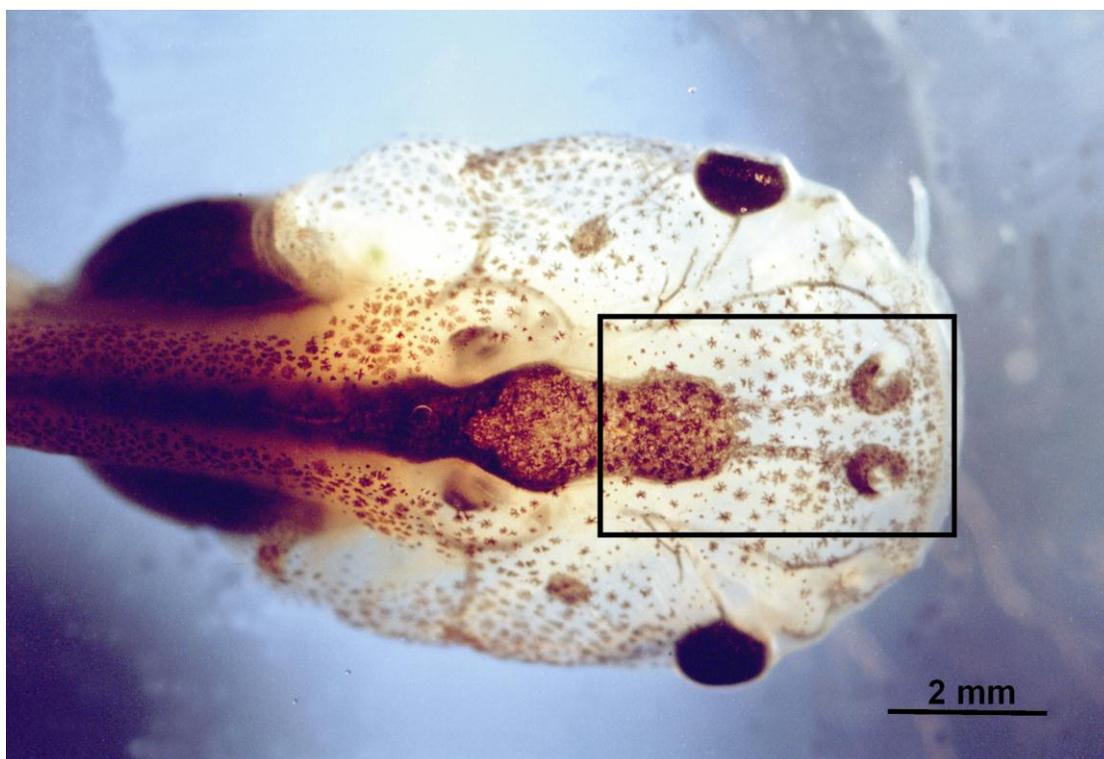
Das Vomeronasalorgan (Jacobsonsche Organ), das auch mit Wasser gefüllt ist, dient höchstwahrscheinlich der Detektion von Pheromonen (Halpern, 1987; Oikawa et al., 1998; Halpern und Martinez-Marcos, 2003). Die Axone projizieren in den akzessorischen Bulbus olfactorius.

#### **2.1.1.2 Das olfaktorische System im larvalen *Xenopus laevis***

Bei den Kaulquappen findet man im Unterschied zu den erwachsenen *Xenopus-laevis*-Fröschen nur zwei voneinander abgegrenzte Kammern (Hansen et al., 1998). Eine von den beiden Kammern beinhaltet das Vomeronasalorgan, das in den akzessorischen Bulbus olfactorius projiziert (Weiss, 1986). Die zweite Kammer enthält ORN, die beide Typen von olfaktorischen Rezeptoren, sowohl die XOR-1- wie auch die XOR-2-Rezeptoren, exprimieren (Freitag et al., 1995; Mezler et al., 1999). Die Entwicklung des olfaktorischen Kammersystems beginnt bei der Larve des *Xenopus laevis* wie bei jedem Frosch zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Riechplakoden lassen sich schon ab dem Stadium 23 beobachten. Die spätere Haupthöhle und das Vomeronasalorgan entwickeln sich ab dem Stadium 40. Die Entwicklung der späteren Nebenhöhle beginnt dagegen erst ab dem Stadium 51 bzw. 52 und differenziert sich während der Metamorphose zw. den Stadien 55 und 66 weiter (Hansen et al., 1998; Mezler et al., 1999). Auch die oben erwähnten Sinnesrezeptoren entwickeln sich zeitlich unterschiedlich. Die XOR-1-Rezeptoren der späteren Nebenhöhle findet man schon ab dem Stadium 32. Die XOR-2-Rezeptoren der späteren Haupthöhle findet man dagegen erst ab dem Stadium 49 (Freitag et al., 1995).

## 2.2 Gewebeschnittpräparation

Larven des *Xenopus laevis* in den Stadien 51 bis 54 wurden aus dem Aufzuchtaquarium entnommen und in ein mit Leitungswasser gefülltes Plastikgefäß gegeben. Danach wurden sie für ca. 2 Minuten in ein Glasgefäß mit Eiswasser gelegt, um sie zu anästhesieren. Die betäubten Tiere wurden mit zwei Nadeln auf einer Silikonplatte fixiert und anschließend mit einem Skalpell durch einen Schnitt durch die Medulla oblongata getötet.



**Abb. 2.1** *Xenopus laevis*-Larve, die schwarze Umrandung entspricht dem Areal, aus dem die Gewebeschnitte entnommen wurden

Ein Gewebeschnitt, bestehend aus den beiden intakten Mukosen und olfaktorischen Nerven, sowie dem vorderen Teil des Gehirns mit dem olfaktorischen Bulb (s. Abb. 2.1) wurde mit einem Skalpell herauspräpariert. Dieser Gewebestück wurde dann mit Cyanacrylat-Klebstoff (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) auf den Probenhalter eines Vibratoms (VT 1000S, Leica, Bensheim, Deutschland) geklebt. Der Probenhalter wurde in dem mit Ringerlösung gefüllten Probenbehälter des Vibratoms fixiert. Als Erstes wurde die pigmentierte Epidermis durch einen horizontalen Schnitt von 100 µm Dicke entfernt. Nachdem die Deckschicht

entfernt worden war, wurde das Versuchsgewebe durch einen horizontalen Schnitt von 120-130  $\mu\text{m}$  gewonnen. Die Schnitte wurden mit einer Vortriebsgeschwindigkeit von 0,2 - 0,3 mm/s, bei einer Oszillationsgeschwindigkeit von 60 - 70 Hz durchgeführt. Auf diese Weise hat man pro Versuchstier einen Gewebeschnitt gewonnen. Der Gewebeschnitt wurde dann mitsamt Ringerlösung, mit Hilfe einer Pipette aus dem Probehälter entnommen und in eine modifizierte Falcon-3001-Petrischale ( $d = 35$  mm; Becton Dickinson and Company, Plymouth, UK) überführt. Diese besitzt eine Fräsung von ca. 8 x 20 mm, die von unten durch ein mit Paraffin befestigtes dünnes Deckglas verschlossen ist. Die gleiche Petrischale wurde später auch bei der Messung verwendet.

## **2.3 Fluoreszenzmikroskopie**

### **2.3.1 Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie**

In der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie wird das gesamte Präparat mit dem darin befindlichen Fluorophor gleichzeitig vom Anregungslicht beleuchtet. Das vom Fluorophor emittierte Fluoreszenzlicht wird dann meist direkt mit dem Auge beobachtet oder mit einem Detektor erfasst. Die simultane Fluoreszenzanregung in allen Raumebenen des Präparates ist ein Nachteil dieser Methode. Das aus der Fokusebene stammende Fluoreszenzsignal wird also mehr oder weniger durch die Fluoreszenzemission aus anderen Ebenen des Präparates verfälscht, Regionen starker Fluoreszenz überstrahlen dabei Regionen schwacher Fluoreszenz (Ricken et al., 1998).

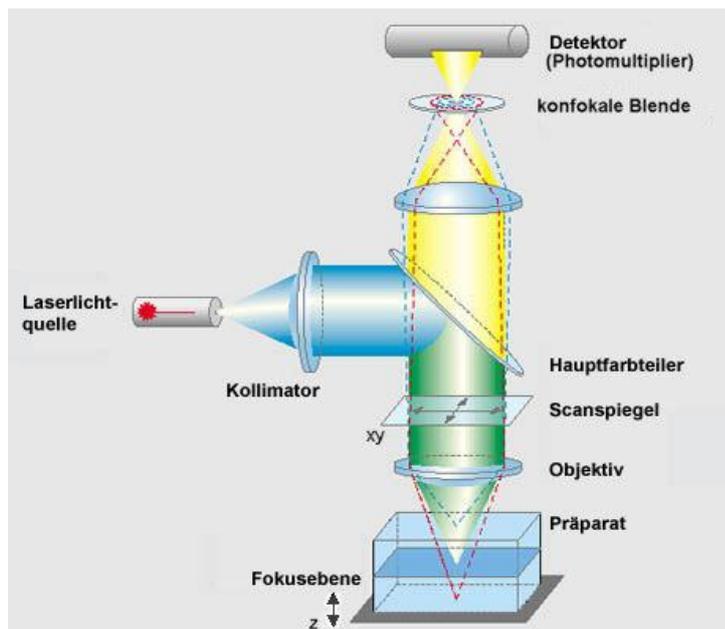
---

### 2.3.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie und Calcium Imaging

Die in der vorliegenden Dissertation beschriebenen *Calcium-Imaging* Experimente wurden alle mittels eines konfokalen Laserrastermikroskops durchgeführt (Zeiss LSM 510/Axiovert 100, Jena, Deutschland). Während bei der konventionellen Lichtmikroskopie das Objekt in seiner Gesamtheit gleichzeitig beleuchtet und betrachtet wird, wird bei dem konfokalen Laserrastermikroskop das zu untersuchende Material Punkt für Punkt mit einem Laser gerastert und folgerichtig auch Punkt für Punkt registriert. Hierbei lässt sich aufgrund einer Lochblende (auch „konfokale Blende“ oder „Pinhole“ genannt) Licht, welches nicht aus dem Fokus des Lasers stammt („out-of-focus light“) herausfiltern, was wiederum eine Tiefendiskriminierung und somit die Möglichkeit zum Aufzeichnen optischer Schnitte bietet (Schild, 1996). Dabei gilt: Je enger die Lochblenden, desto dünner der optische Schnitt.

Der Strahlengang läuft wie folgt: Der aus dem Argon-Ion-Laser emittierte Photonenstrahl durchquert die Lochblende und wird von einem dichromatischen Spiegel auf zwei galvanometerbetriebene, bewegliche Scann-Spiegel gelenkt, die für die Abtastung des Präparats auf der x - und der y -Achse und somit für das zeilenförmige Scannen sorgen. Die Elektronen des Präparats werden durch den Strahl auf ein höheres Energielevel gebracht; fallen sie auf ihr ursprüngliches Level zurück, so gelangen die dabei entstehenden Photonen nun rückläufig durch den dichromatischen Spiegel zu einer weiteren Lochblende, welche störende, von außen eindringende Lichteffekte (das oben beschriebene „out-of-focus light“) herausfiltert. Anschließend werden die Photonen von einem Photomultiplier detektiert und an einen angeschlossenen Rechner weitergeleitet (Zur Vergegenwärtigung siehe auch Abbildung 2.2).

Aufgrund des seriellen Aufbaus eines Scanns, also der Abtastung durch den Laser Punkt für Punkt, entsteht zwischen der Darstellung zweier Pixel ein Zeitunterschied, wodurch die Detektion eines Bildes je nach gewählter Auflösung unterschiedlich lange dauert. Allerdings sind die dabei zu berücksichtigenden Zeitspannen kurz genug, um das An- und Abfluten des intrazellulären Kalziums in den ORN bzw. Stützzellen verwertbar darzustellen.



**Abb. 2.2** Schematische Abbildung des optischen Prinzips eines konfokalen Laserrastermikroskops, modif. nach Abb. Zeiss, 2003, Seite 6

Unter Calcium Imaging versteht man Messungen der Kalziumkonzentrationsänderung, mit denen die neuronale Aktivität der Zellen optisch dargestellt wird. Die Aktionspotentiale einer Zelle sind mit einem Einstrom von Kalzium verbunden. Um die  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderungen sichtbar zu machen, verwendet man sog. Kalziumindikatoren ( $Ca^{2+}$ -abhängige Fluoreszenzfarbstoffe,  $Ca^{2+}$ -Chelatoren).

Die resultierende  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme nach einem Aktionspotential bewirkt, dass mehr Kalzium an das Indikatormolekül gebunden werden kann. Das Gleichgewicht zwischen dem freien und dem gebundenen Farbstoff verschiebt sich und wird als eine Änderung der Fluoreszenz gemessen.

Die Calcium Imaging Versuche dieser Arbeit wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserrastermikroskops der Firma Zeiss durchgeführt (Zeiss LSM 510/Axiovert 100M, Seriennummer 850 489, Jena, Deutschland) und mit einer Software LSM 510 V 2.02 (Zeiss, Jena, Deutschland) gesteuert. Als Kalziumindikator wurde der  $Ca^{2+}$ -sensitive Farbstoff Fluo-4 benutzt (siehe Kapitel 2.3.3). Als Anregung wurde ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm verwendet. Um das Anregungslicht möglichst vollständig zu entfernen, wurde der Hauptfarbteiler (Abb. 2.2) in Kombination mit einem Langpassfilter als Emissionsfilter eingesetzt. Die LP-Einstellung (Langpassfilter) war 505 nm.

### 2.3.3 Kalziumsensitiver Farbstoff

Die Calcium Imaging Versuche dieser Arbeit wurden mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-4 durchgeführt.

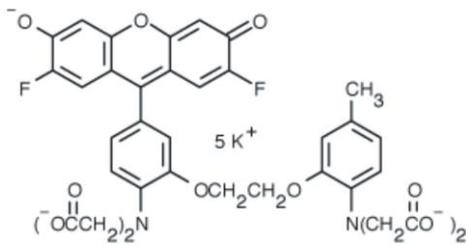
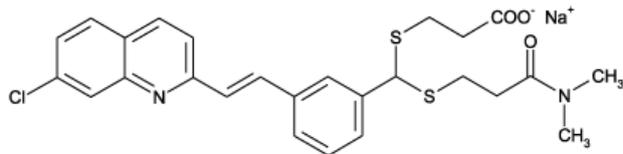


Abb. 2.3 Strukturformel des kalziumsensitiven Farbstoffes Fluo-4

Dabei handelt sich um eine Esterform des Farbstoffes mit einer AM-Gruppe (Fluo-4-AM, Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Das heißt, dass die Carboxylgruppen von dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Farbstoff mit Acetoxymethylestergruppen verestert sind. In dieser Form als ungeladenes und lipophiles Molekül kann der Farbstoff die Zellmembran ungehindert passieren. Seine schlechte Löslichkeit kann mit Hilfe 2,5 % Pluronsäure (Detergens Pluronic F-127, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) und DMSO (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) erleichtert werden. Die hydrophoben Estergruppen der Farbstoffester werden intrazellulär von Esterasen gespalten und es entsteht ein polares Molekül. So kann der Farbstoff nicht wieder in den extrazellulären Raum gelangen. Durch ionische Bindungen wird  $\text{Ca}^{2+}$  angelagert. So können die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderungen nachvollzogen werden. Die zelleigenen Esterasen sorgen außerdem für ein Aufrechterhalten des Fluo-4-AM Gradienten zwischen extra- und intrazellulärem Raum, wodurch sich der Farbstoff in der Zelle anreichert und die extrazelluläre Konzentration um ein Vielfaches übersteigt. So lässt sich auch mit einer geringen Farbstoffkonzentration der Gewebeschnitt deutlich und homogen anfärben (Deitmer und Schild, 2000).



**Abb. 2.4 Strukturformel des MRP-Blockers MK-571** Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland.  
Summenformel:  $C_{26}H_{26}ClN_2O_3S_2Na$ ;

Die intrazelluläre Farbstoffkonzentration nach AM-Beladung nimmt erfahrungsgemäß mit der Zeit ab. Das liegt erstens daran, dass der Farbstoff durch das Anregungslicht zerstört wird, zweitens werden die polaren Farbstoffmoleküle zum Teil von speziellen Transportern, die in Zellen der Riechschleimhaut von den *Xenopus-laevis*-Larven exprimiert werden, aus den Zellen heraustransportiert. Das sind die Multidrug-resistance-assoziierten Proteine (MRP) (Abrahamse und Rechkemmer, 2001; Gekeler et al., 1995). Um diesen transmembranösen Transport zu verhindern, werden die MRP während des Fluo-4-Ladevorgangs mit einem spezifischen Blocker, MK 571 (Alexis, Grünberg, Deutschland) geblockt (Manzini und Schild, 2003b).

### 2.3.4 Färben der Gewebeschnitte

Die Gewebeschnitte wurden nach folgender Vorgehensweise beladen: 50 µg der Esterform des Farbstoffes Fluo-4 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) wurden in 5 µl Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gelöst und dann in eine Lösung aus 50 µl 2,5 % Pluronsäure (Pluronic F-127, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) und 445 µl Badlösung pipettiert. Die nun 100 µM Farbstofflösung wurde dann für 15 Minuten in ein Ultraschallbad (Transsonic 310, Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland) gestellt.

Eine 10 mM-Stammlösung MK 571 (Alexis, Grünberg, Deutschland) wurde mit Badlösung auf 100 µM verdünnt. Dieser Transporterblocker wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt. 500 µl Blockerlösung und 500 µl Farbstofflösung wurden vermischt. Die Fluo-4-AM-Endkonzentration und die Blockerendkonzentration lagen damit dann bei 50 µM. Von je einem Gewebeschnitt pro Messkammer wurde die vorhandene Badlösung mittels einer Pipette abgenommen und durch 200 µl der Farbstoff-Blocker-Mischung ersetzt. Danach wurden die Gewebeschnitte unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur ca. 30 Minuten auf einem

Schütteltisch inkubiert (Duomax 1030, Heidolph, Kelheim, Deutschland). Danach wurde die Lösung wieder mit normaler Badlösung ersetzt.

Um mit dem inversen Mikroskop arbeiten zu können, wurden die Gewebestücke unter dem Binokular mit der zu untersuchenden Seite nach unten in der Mitte der Messschale positioniert. Damit der Gewebeschnitt während des ganzen Versuches stabil in der Messkammer liegen blieb, wurde er mit einem Netz fixiert. Dieses bestand aus einem platten Platindraht (0,5 mm breit, Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland), der U-förmig gebogen und mit Nylonfäden bespannt war.

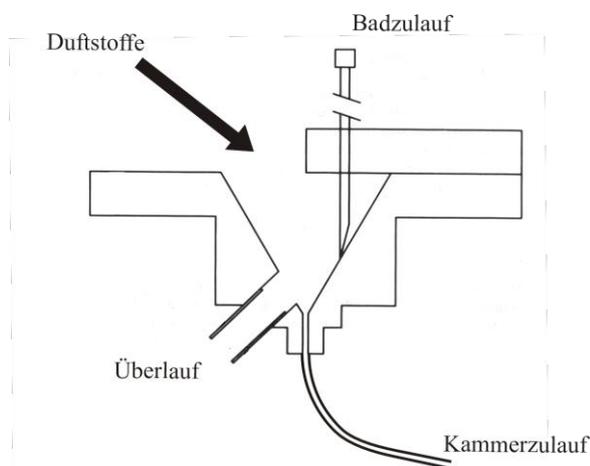
Man platzierte dann die Messschale mit dem Präparat in die Messkammer des Mikroskops Axiovert 100M, das mit einer Laser-Scann-Einheit (LSM 510) verbunden war. Bevor mit den Imaging Versuchen begonnen werden konnte, wurden der Zulauf und der Ablauf der Badlösung sorgfältig überprüft und platziert. Dann wurden die Gewebeschnitte noch für 10 Minuten mit Badlösung gespült.

## **2.4 Applikationssystem**

Die Zellen des olfaktorischen Systems reagieren sehr empfindlich auf mechanische Störfaktoren. Diese können sehr leicht, z.B. bei der Applikation von Substanzen anhand einer Pipette, zustande kommen und so Messdaten verfälschen. Um solche Artefakte weitestgehend auszuschließen, muss während des gesamten Experiments eine laminäre Strömung der Badlösung ohne Druckspitzen bei Applikation von Nukleotiden oder bei Wechsel der Badlösungen gewährleistet sein.

Diese Voraussetzung wird durch das Applikationssystem nach Schild (Schild, 1985), das in der Abbildung 2.5 schematisch dargestellt ist, erfüllt. Der vernickelte Trichter öffnete sich nach unten in eine Metallkanüle, die in das Messvolumen führte. Diese wurde direkt unterhalb der Mukosa platziert, ohne den Gewebeschnitt zu beschädigen. So war ein rasches Anfluten der Nukleotide gewährleistet. Bei diesem System läuft die Badlösung mit Hilfe der Schwerkraft von 50 ml fassenden Einmalspritzen über Silikonschläuche, die mit einer Kanüle endeten, zu einem Trichter mit Überlauf. Der Überlauf ist durch einen flexiblen Gummischlauch mit einem Auffanggefäß verbunden, dessen Inhalt verworfen wird. Auf diese Weise wurde nicht nur die Standardbadlösung, sondern auch die Badlösung, die mit CPA oder

Antagonisten versetzt war, beziehungsweise die kalziumfreie Badlösung, appliziert. Der Applikationstrichter besitzt mehrere Öffnungen, wo die Kanülen des Zulaufs befestigt werden können. Unterhalb des Überlaufes befindet sich in der Kegelspitze des Trichters ein kleines, konstantes Volumen an Badflüssigkeit. Das konstante Volumen der Badflüssigkeit in der Kegelspitze erzeugt einen laminären Fluss der Badlösung. Dadurch werden Druckspitzen bei der Applikation der Nukleotide, die mit einer 1 ml Pipette über einen Zeitraum von 2 Sekunden direkt in den Trichter gegeben wurden, verhindert. Die Nukleotide wurden vorsichtig an die Wand des Trichters pipettiert. Dadurch konnte eine Reizung der Stützzellen durch einen mechanischen Impuls bei Gabe der Nukleotidlösungen vermieden werden. Die Verdünnung der Nukleotidlösungen im Trichter kann mit weniger als 1 % vernachlässigt werden (Manzini und Schild, 2003a). Der Ablauf für die Badlösung wurde in unmittelbarer Nähe der Applikationsnadel positioniert. Nukleotide wurden so, kurz nachdem sie die Zellen der Mukosa aktiviert haben, sofort wieder abgesaugt. Dadurch konnte eine Dauerstimulation der Stützzellen durch die Nukleotide verhindert werden.



**Abb. 2.5 Schematische Darstellung des Applikationssystems für Nukleotide und Badlösung,** modif. nach Schild, 1985, Seite 73

---

## 2.5 Messungen und Datenauswertung

Die Calcium-Imaging-Bildsequenz wurde, wie oben erwähnt, mit der Laserrastermikroskop-Einheit LSM 510 (Zeiss) aufgenommen.

Der Farbstoff in dem Gewebeschnitt wurde durch den Photonenstrahl einer Wellenlänge von 488 nm, ausgehend von dem Argonlaser, angeregt. Die Photonenemission lag dabei in einem Wellenlängenbereich von  $> 505$  nm. Die Aufnahmen wurden mit einer Frequenz von 1,27 Hz durchgeführt. Die Nukleotide wurden über einen Zeitraum von ca. 2 Sekunden appliziert, ohne den Badzufluss zu unterbrechen. Zwischen den einzelnen Serien lagen mindestens 2 Minuten.

Die Fluoreszenzänderung  $\Delta F/F$  wurde für die einzelnen Zellen mit der Formel:  $\Delta F/F = (F_1 - F_2) / F_2$  berechnet, wobei  $F_1$  die über alle Pixel gemittelte Fluoreszenz darstellt.  $F_2$  ist die Grundfluoreszenz der Zelle vor der Nukleotidapplikation bzw. der Agonistenapplikation, die durch Mittelung der ersten 8 Bilder berechnet wurde. Eine Reaktion einer Zelle auf die Nukleotidapplikation wurde angenommen, wenn (a) die beiden ersten Fluoreszenzintensitäten  $\Delta F/F(t_1)$  und  $\Delta F/F(t_2)$  nach einer Aktivierung der Zellen durch die Nukleotide größer waren als die Grundfluoreszenz und wenn (b)  $\Delta F/F(t_2) > \Delta F/F(t_1)$  mit  $t_2 > t_1$ .

## 2.6 Lösungen und Pharmaka

### 2.6.1 Die Badlösung

Alle Versuche wurden mit Hilfe einer sog. Standardbadlösung, deren Zusammensetzung aus der Tabelle 2.1 zu entnehmen ist, durchgeführt. Die Badlösung wurde mit bidestilliertem Wasser (Aqua bidestillata) hergestellt. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter und 1N NaOH an einen Wert von 7.8 angeglichen (Howell et al., 1970). Die Osmolarität der Badlösung betrug 230 mOsmol.

<b>Inhaltsstoffe</b>	NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	Glukose	Na-Pyruvat	Hepes
<b>Konzentration [mM]</b>	98	2	1	2	5	5	10

**Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Standardbadlösung, pH 7,8; Osmolarität 230 mOsmol; Chemikalien von Merck, Darmstadt, Deutschland außer Na-Pyruvat von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland**

Die kalziumfreie Badlösung die in den Versuchen, welche in Kapitel 3.2 beschrieben sind, ist frei an CaCl<sub>2</sub>.

<b>Inhaltsstoffe</b>	NaCl	KCl	MgCl <sub>2</sub>	Glukose	Na-Pyruvat	Hepes	EGTA
<b>Konzentration [mM]</b>	98	2	2	5	5	10	2

**Tabelle 2.2: Zusammensetzung der kalziumfreien Badlösung, pH 7,8; Osmolarität 230 mOsmol; Chemikalien von Merck, Darmstadt, Deutschland außer Na-Pyruvat von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland**

## 2.6.2 P2-Rezeptor-Agonisten

Bei den natürlichen und synthetischen P2-Rezeptor-Agonisten handelt es sich ausschließlich um Nukleotide und deren Analoga. Die synthetischen ATP-Analoga weisen dabei Modifikationen in der Triphosphat-Kette, in den Positionen 2' und 3' der Ribose sowie in den Positionen C-2, C-8 und N<sup>6</sup> des Purins auf. ADP, UTP und das gegen Exonukleotidasen stabile ADP-Analogon ATP $\gamma$ S sind die gebräuchlichsten P2Y-Rezeptor-Agonisten.

Folgende P2-Rezeptor-Agonisten wurden für die Versuche in dieser Doktorarbeit verwendet (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland): **Uridin**; Uridin 5'-Monophosphat (**UMP**); Uridin 5'-Diphosphat (**UDP**); Uridin 5'-Triphosphat (**UTP**); **Adenosin**; Adenosin 5'-Monophosphat (**AMP**); Adenosin 5'-Diphosphat (**ADP**); Adenosin 5'-Triphosphat (**ATP**); Cytidin-5'-Triphosphat (**CTP**); Guanosin-5'-Triphosphat (**GTP**);  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP ( **$\alpha,\beta$ -meATP**);  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP ( **$\beta,\gamma$ -meATP**); 2-Methyl-Thio-ATP (**2MeSATP**); 3'-O-(4-Benzoyl)-ATP (**BzATP**); Adenosin 5'-O-(3-Thiotriphosphat) (**ATP $\gamma$ S**); P<sup>1</sup>,P<sup>4</sup>-Diadenosin Tetraphosphat (**Ap<sub>4</sub>A**); 2-(MethylThio)adenosin 5'-Diphosphat (**2MeSADP**); Adenosin 5'-[ $\beta$ -Thio]diphosphat (**ADP $\beta$ S**);

Alle Agonisten wurden in den Versuchen dieser Doktorarbeit mit einer Konzentration von 200  $\mu$ M angewendet.

## 2.6.3 P2-Rezeptor-Antagonisten

Die P2-Antagonisten sind Substanzen, die das Binden des Agonisten, z.B. ATP, an seinen P2-Rezeptor verhindern, ohne selbst einen Effekt auszulösen. Diese Substanzen leiten sich im Gegensatz zu den Agonisten nicht ausschließlich von den Nukleotiden ab.

In den Versuchen dieser Arbeit wurde die Wirkung von **Suramin**, **RB2**, und **PPADS** (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) an Stützzellen des olfaktorischen Epithels vom larvalen *Xenopus laevis* auf ATP-Reaktionen untersucht. In allen Versuchen wurden die Antagonisten in einer Konzentration von 200  $\mu$ M appliziert.

Suramin ist ein symmetrisches polysulfoniertes Trypanozid und ist trotz seiner schwachen antagonistischen Wirkung einer der am häufigsten verwendeten P2-Rezeptor-Antagonisten (Jacobson et al., 2002). Es hemmt viele von den Effekten, die die P2-Rezeptoren vermitteln, ist aber nicht selektiv (Baghdiguian und Fantini, 1997). Zum einen blockiert es ionotrope Rezeptoren, zum anderen beeinträchtigt es die Funktion von G-Proteinen (Bültmann et al., 1996).

Der histochemische Farbstoff Reaktivblau 2 (RB2) zählt neben Suramin zu den meistverwendeten P2-Rezeptor-Antagonisten (Choo, 1981; Jacobson et al., 2002). Es handelt sich um ein Gemisch zweier strukturisomerer Antrachinonsulfonatderivate. Im Jahr 1979 beschrieben Kerr und Krantis zum ersten Mal die antagonistische Wirkung von RB2 auf das extrazelluläre ATP (Kerr und Krantis, 1979).

PPADS ist ein Pyridoxalphosphatderivat (Lambrecht, 2000; Lambrecht et al., 2002), das hauptsächlich rekombinante P2X<sub>1</sub>-, P2X<sub>2</sub>-, P2X<sub>5</sub>-Rezeptoren blockiert (Ralevic und Burnstock, 1998). Es ist bekannt, dass PPADS in einer hohen Konzentration zum Teil auch P2Y-Rezeptoren hemmt (Burnstock, 2007; Ralevic und Burnstock, 1998).

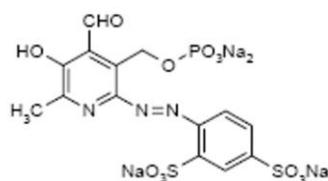
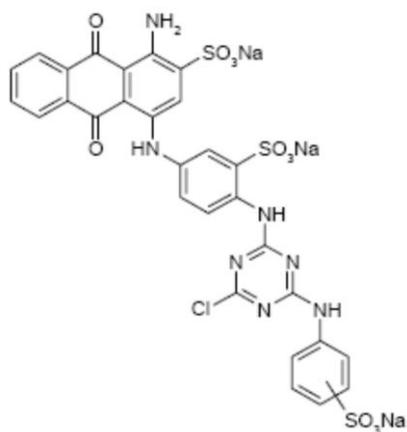
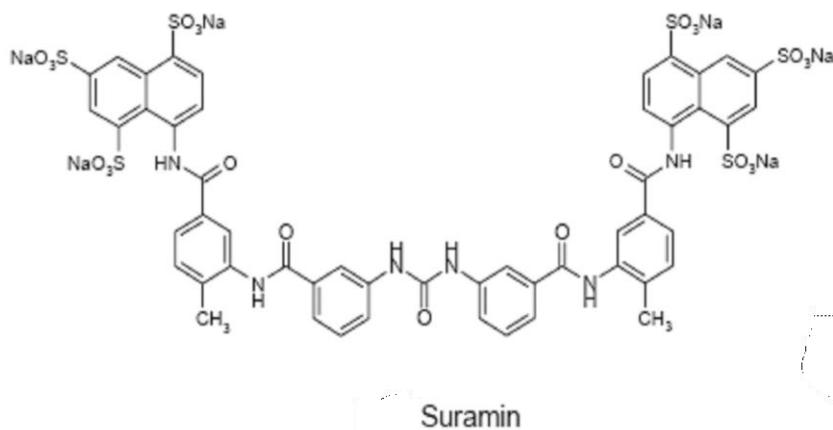


Abb. 2.6 Die Strukturformeln von den P2-Rezeptoragonisten: Suramin, Reaktivblau 2, PPADS.

## 2.6.4 Cyclopiazonsäure

Cyclopiazonsäure ist ein pentazyklisches Alkaloid (Gruppe der Indoltriaminsäure) aus *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten. Das Mycotoxin ist ein Inhibitor der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des endoplasmatischen Retikulums (Seidler et al., 1989). Es ist in Methanol und DMSO löslich. In den Versuchen dieser Doktorarbeit wurde CPA in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  verwendet.

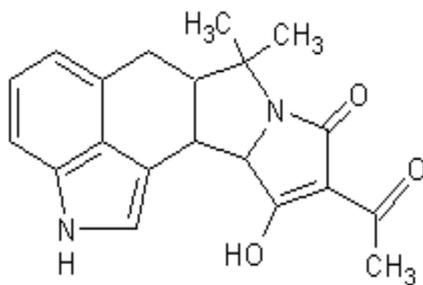


Abb. 2.7 Die Strukturformel der Cyclopiazonsäure

## 2.6.5 Ektonukleotidase-Hemmstoff ARL 67156

Extrazelluläres ATP wird von Ektonukleotidasen durch sequenzielle Dephosphorylierung abgebaut (Zimmermann, 2006). In den Versuchen dieser Arbeit wurde der Ektonukleotidasehemmer ARL 67156 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), der den Abbau der P2-Rezeptoragonisten hemmt, verwendet (Westfall et al., 1996). Die Konzentration des ARL 67156 lag in allen Versuchen bei 100  $\mu\text{M}$ .

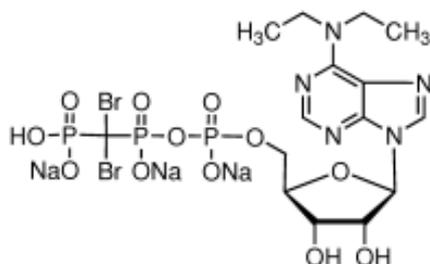
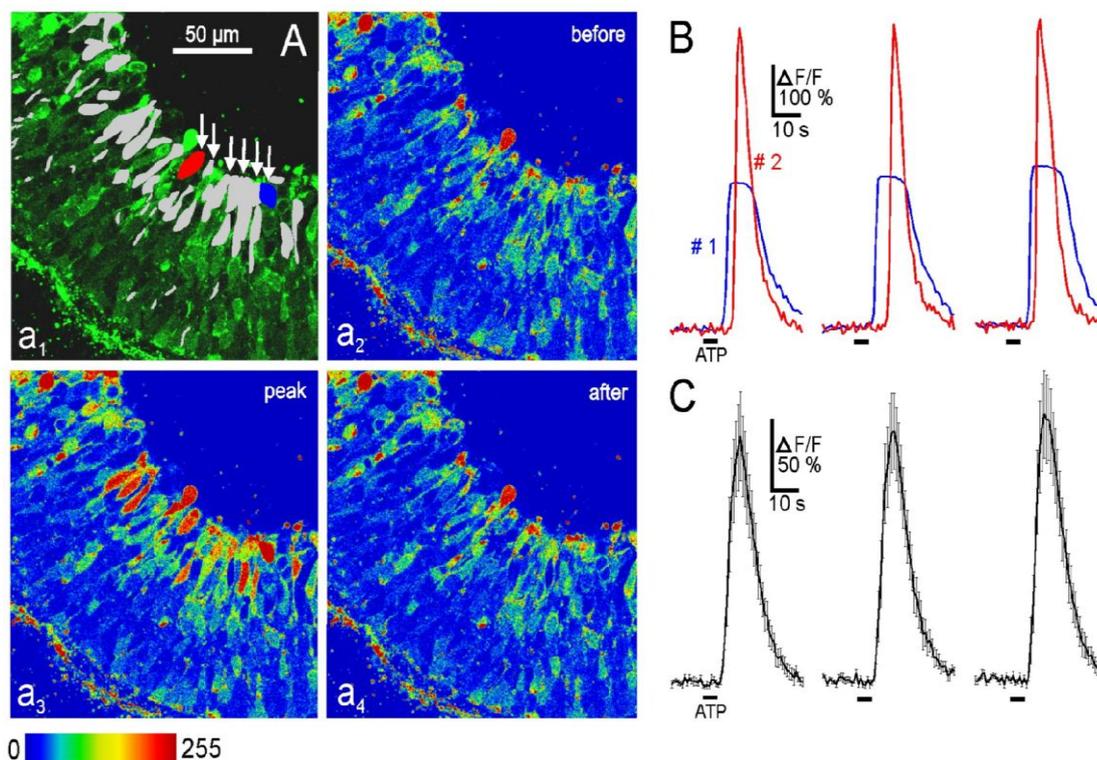


Abb. 2.8 Die Strukturformel des Ektonukleotidaseinhibitors ARL 67156

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 ATP-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme in Stützzellen des olfaktorischen Epithels von larvalen *Xenopus laevis*

Wird ATP auf einen frischen mit Fluo-4 gefärbten Gewebeschnitt des olfaktorischen Epithels appliziert, so ergeben sich spezifische zelluläre Antwortmuster (Abbildung 3.1 A bis 3.1 C). Die zeitlichen Abläufe von zwei ATP induzierten Kalziumtransienten in zwei ATP-sensitiven Zellen sind in Abbildung 3.1 B dargestellt. Die Form und die Dauer der intrazellulären Kalziumtransienten waren reproduzierbar wenn ATP wiederholt appliziert wurde. In Abbildung 3.1 C wird der mittlere intrazelluläre Kalziumtransient, aller auf ATP reagierenden Zellen dieses Gewebeschnittes, anhand drei aufeinander folgender ATP-Applikationen gezeigt. Ähnliche Ergebnisse wurden bei allen Gewebeschnitten des olfaktorischen Epithels, die auf ihre ATP-Sensitivität geprüft worden sind, beobachtet. Aufgrund ihrer Form und Lage im olfaktorischen Epithel können die ATP-sensitiven Zellen eindeutig als Stützzellen identifiziert werden (Siehe Abb. 1A a<sub>1</sub>).



**Abb. 3.1** ATP-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme in Stützzellen des olfaktorischen Epithels in einem Gewebeschnitt des olfaktorischen Epithels von larvalen *Xenopus laevis*

**A:** (**a<sub>1</sub>**) Fluoreszenzbild eines Riechepithelgewebeschnittes (Stadium 54; Fluo-4 Färbung; Aufnahme im Ruhezustand). Zellen, die nach der Applikation von ATP (200µM) mit einer  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme reagiert haben, sind grau hervorgehoben. (**a<sub>2</sub>-a<sub>4</sub>**) Sequenz von drei in Falschfarben dargestellten Bildern desselben Gewebeschnittes. Sie zeigen den vorübergehenden kalziumabhängigen Fluoreszenzanstieg nach einer ATP-Applikation [(**a<sub>2</sub>**) Zustand vor der ATP-Applikation; (**a<sub>3</sub>**) Höhepunkt der Reaktion; (**a<sub>4</sub>**) Rückkehr auf das Basisniveau].

**B:** Zeitverlauf des ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten der rot und blau gekennzeichneten Zellen in Abbildung (**a<sub>1</sub>**). Der Zeitverlauf und die Amplitude der ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten der Stützzellen sind reproduzierbar, wenn ATP mehrmals wiederholt appliziert wird.

**C:** Mittlerer intrazellulärer Kalziumanstieg ( $\pm$  SEM) aller auf ATP reagierenden Zellen dieses Gewebeschnittes drei aufeinander folgender ATP-Applikationen.

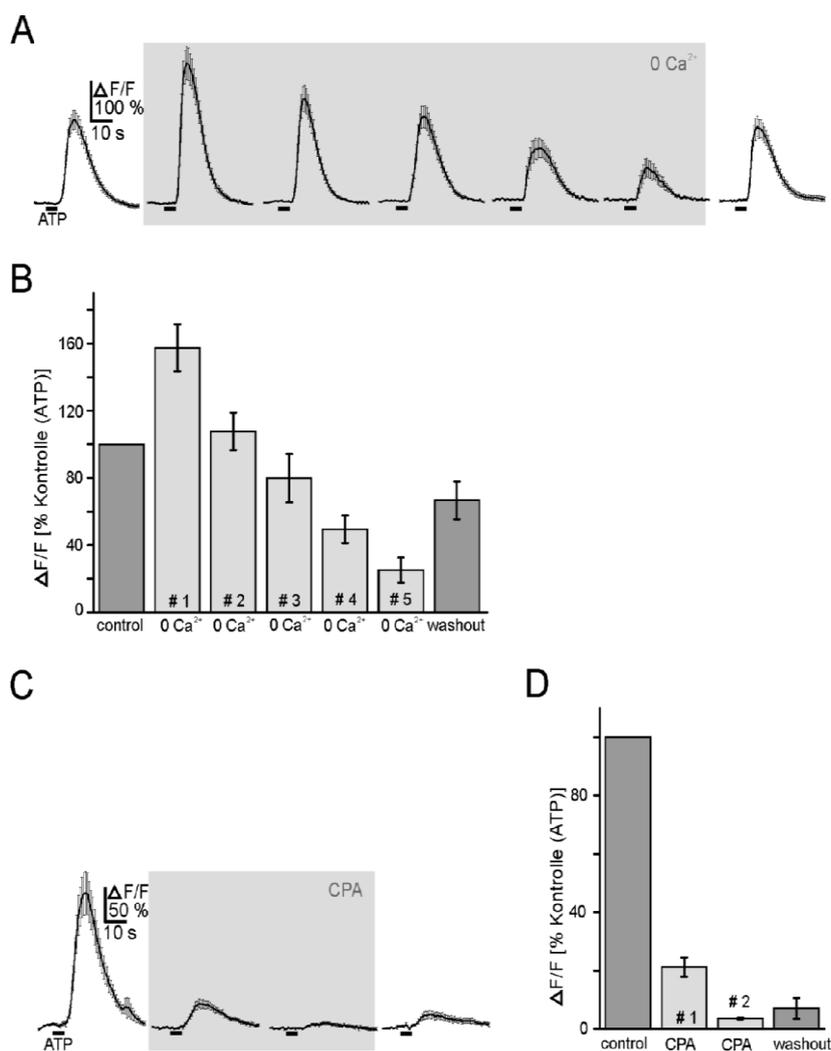
### 3.2 Pharmakologische Charakterisierung der purinergen Rezeptoren der Stützzellen des larvalen *Xenopus laevis*.

Um zu überprüfen, welche purinergen Rezeptorsubtypen für die ATP-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme in den Stützzellen verantwortlich sind, wurde zuerst untersucht, ob extrazelluläres Kalzium für die ATP-induzierten Antworten erforderlich ist.

ATP-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen von Stützzellen in kalziumfreier Badlösung waren genauso stark oder sogar größer, als diejenigen in der Standardbadlösung (**Abb. 3.2 A**). Erst die wiederholte Applikation von ATP in kalziumfreier Badlösung resultierte in einem Abfall der

---

Amplitude der  $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten, vermutlich wegen der langsamen Erschöpfung der intrazellulären Kalziumspeicher. Nach Wiederherstellung der Standardbedingungen erholten sich die ATP-Antworten (**Abb. 3.2 A**). Nahezu identische Ergebnisse wurden in allen 66 Stützzellen der 3 getesteten Gewebesschnitte der olfaktorischen Mukosa erzielt (**Abb. 3.2 B**). Des Weiteren konnten durch Entleeren der intrazellulären Kalziumspeicher mit CPA (Cyclopiazonsäure), ein Blocker der Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, die ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen in Stützzellen gehemmt werden. Die Kalzium-ATPase transportiert normalerweise Kalzium in die intrazellulären Speicher. Wenn diese allerdings durch CPA gehemmt wird, werden die Kalziumspeicher der Zelle nicht wieder beladen. Deshalb kann man, wie es in der **Abbildung 3.2 C** zu sehen ist, nach der ersten ATP-Applikation in der Badlösung mit CPA eine normale Kalziumantwort auslösen, da die Speicher noch voll sind. Folgt allerdings eine erneute Reizapplikation, werden die Kalziumantworten deutlich kleiner. Das freie intrazelluläre Kalzium wird, anders als normal, vermehrt in den extrazellulären Raum über die Plasmamembran transportiert. Da CPA aus einem Gewebeschnitt sehr schwer auswaschbar ist (enge Bindung an die geblockte Kalzium-ATPase), kehren die ATP Antworten nach dem Austausch der CPA-haltigen Badlösung gegen die Standardbadlösung nicht wieder zurück und bleiben weiterhin größtenteils unterdrückt (**Abb. 3.2 C**). Nahezu identische Ergebnisse wurden in allen 56 Stützzellen der 3 Gewebesschnitte der olfaktorischen Mukosa erhalten die mit CPA behandelt wurden (**Abb. 3.2 D**). Die oben gezeigten Messungen deuten darauf hin, dass die ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen durch Kalziumfreisetzung aus CPA-sensitiven intrazellulären Kalziumspeichern vermittelt wurden. Keine, oder höchstens eine geringe Rolle spielte der  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch die Plasmamembran. Dieses zeigt, dass die Antworten auf ATP nicht zwangsläufig extrazelluläres Kalzium benötigen, sondern dass das Kalzium nahezu gänzlich aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird. Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass die Stützzellen metabotrope P2Y-Rezeptoren exprimieren.

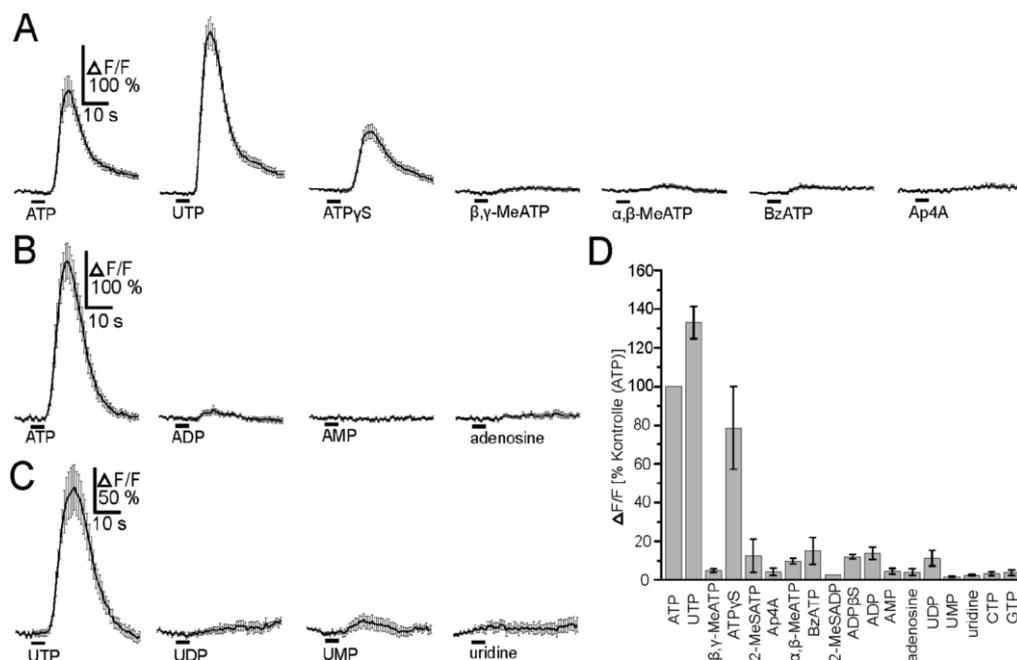


**Abb. 3.2** Antworten auf ATP brauchen kein extrazelluläres Kalzium aber intakte intrazelluläre Kalziumspeicher

**A:** ATP-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten bleiben in kalziumfreier Badlösung bestehen [ATP (200  $\mu$ M)]; gezeigt ist die mittlere Antwort von allen auf ATP reagierenden Zellen eines Gewebeschnittes der olfaktorischen Mukosa]. Im grauen Feld sind wiederholte Applikationen von ATP im Abstand von 1, 5, 10, 20 und 25 Minuten in einer kalziumfreien Badlösung gezeigt. **B:** Mittlere Antwort als Prozent der Kontrollantwort auf ATP dargestellt (66 Stützzellen aus 3 Gewebeschnitten der olfaktorischen Mukosa). Dunkelgraue Balken = Reaktion in Standardbadlösung; hellgraue Balken = Reaktion in kalziumfreier Badlösung (1, 5, 10, 20 und 25 Minuten in der kalziumfreien Badlösung (#1 bis #5)). **C:** ATP-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme in einer CPA-haltigen Badlösung [ATP (200  $\mu$ M); CPA (25  $\mu$ M)]; gezeigt ist die mittlere Antwort von allen auf ATP reagierenden Zellen eines Gewebeschnittes der olfaktorischen Mukosa]. Im grauen Feld sind wiederholte Applikationen von ATP im Abstand von 4 und 8 Minuten in einer CPA-haltigen Badlösung gezeigt. **D:** Die durchschnittliche Antwort dargestellt als Prozent der Kontrollantwort auf ATP (56 Stützzellen aus 3 Gewebeschnitten der olfaktorischen Mukosa). Dunkelgraue Balken = Reaktion in der Standardbadlösung als Kontrolle, hellgraue Balken = Reaktion in der CPA-haltigen Badlösung nach 4 (#1) und 8 (#2) Minuten.

Um zu bestimmen, welche(r) P2Y-Rezeptorsubtyp(en) von Stützzellen des olfaktorischen Epithels des larvalen *Xenopus laevis* exprimiert werden, wurde die Wirkung von einer Vielzahl purinergener Agonisten auf Stützzellen geprüft. Es ist bekannt, dass verschiedene purinergene Agonisten an den P2Y-Rezeptoren unterschiedlich starke Reaktionen auslösen. Die  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen gemittelt aus allen auf Agonisten reagierende Stützzellen dreier

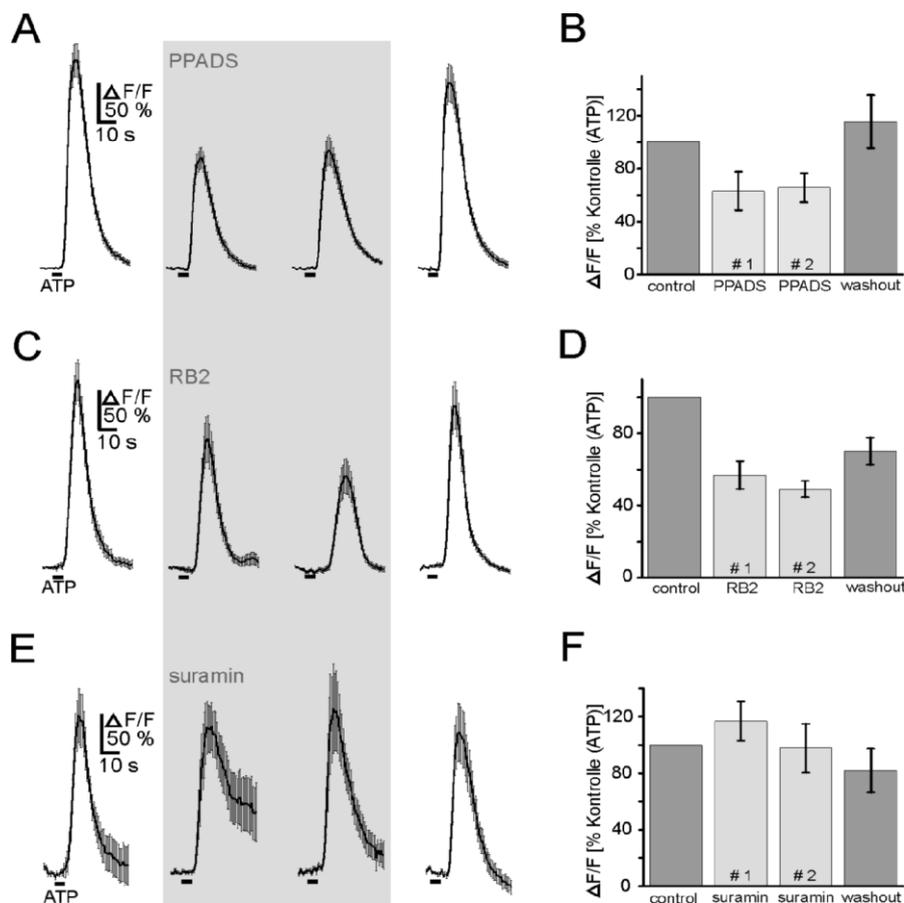
Gewebeschnitte sind in den **Abbildungen 3.3 A bis 3.3 C** gezeigt. Die **Abbildung 3.3 D** fasst die aus 323 Stützzellen (21 Gewebeschnitte) gewonnenen Versuchsergebnisse zusammen. Zusätzlich zu ATP lösten nur UTP und ATP $\gamma$ S eine Antwort aus. Es ergab sich folgende Agonistenwirkreihenfolge: UTP>ATP>ATP $\gamma$ S. Alle anderen getesteten Agonisten waren inaktiv oder reagierten nur sehr schwach.



**Abb. 3.3** Antworten auf eine Vielzahl von purinergen Agonisten in Stützzellen des larvalen *Xenopus laevis*

**A-C:**  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme in den Stützzellen dreier unterschiedlicher Gewebeschnitte als Antwort auf die Applikation diverser purinerner Agonisten (alle 200  $\mu$ M). Gezeigt ist die durchschnittliche Antwort aller auf ATP reagierender Stützzellen eines Gewebeschnittes der olfaktorischen Mukosa. **D:** Die durchschnittliche Antwort dargestellt als Prozent der Kontrollantwort auf ATP (UTP: Daten von 189 Stützzellen von 13 Gewebeschnitten der olfaktorischen Mukosa;  $\beta,\gamma$ -meATP: 139/9; ATP $\gamma$ S: 129/8; 2MeSATP: 75/6; Ap $_4$ A: 114/7;  $\alpha,\beta$ -meATP: 124/8; BzATP: 90/5; 2MeSADP: 10/1; ADP $\beta$ S: 23/2; ADP: 124/7; AMP: 78/5; Adenosine: 78/5; UDP: 24/2; UMP: 24/2; Uridine: 24/2; CTP: 36/3; GTP: 36/3).

Als Nächstes wurde eine Reihe von Versuchen mit purinergen Antagonisten durchgeführt. In diesen Experimenten wurde der Effekt von drei nicht-selektiven P2-Antagonisten (RB2, PPADS, Suramin) auf den ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den Stützzellen geprüft (**Abb. 3.4 A bis 3.4 B**). Der durchschnittliche ATP-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in Gegenwart von PPADS (200  $\mu$ M, **Abb. 3.4 A und 3.4 B**) und RB2 (200  $\mu$ M, **Abb. 3.4 C und 3.4 D**) wurde im Vergleich zu den ATP-induzierten intrazellulären Kalziumanstiegen in antagonistischer Lösung auf ungefähr 70 % und 50 % reduziert. Suramin dagegen zeigte keine antagonistische Wirkung (**Abbildung 3.4 E und 3.4 F**).

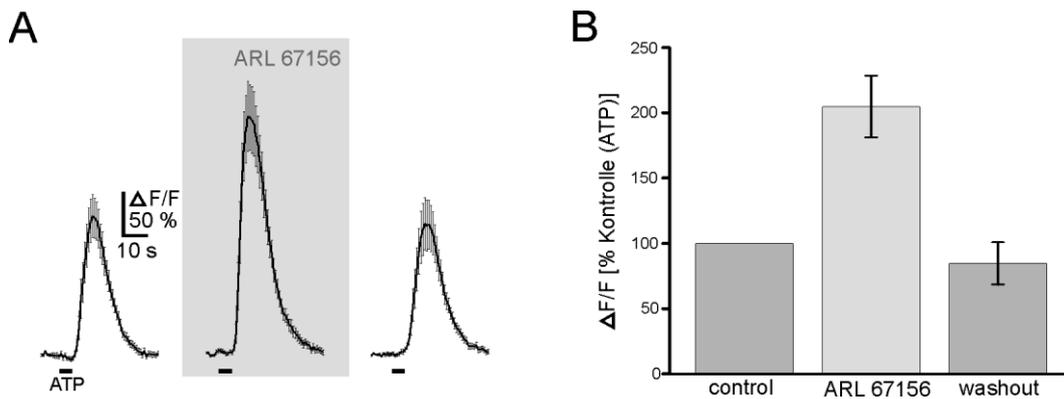


**Abb. 3.4** Auswirkung verschiedener purinerger Antagonisten auf den ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in Stützzellen von larvalen *Xenopus laevis*

**A:** Die ATP induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme wurde gedämpft, aber nicht völlig durch PPADS blockiert [PPADS (200  $\mu$ M)]. Im grauen Feld sind ATP-Applikationen 10 und 15 Minuten nach der PPADS-Anwendung abgebildet. Nach einer Auswaschzeit (washout) von 10 Minuten erholten sich die Antworten fast vollständig. Gezeigt ist die durchschnittliche Antwort aller auf ATP reagierenden Stützzellen eines Gewebeschnittes der olfaktorischen Mukosa. **B:** Die durchschnittliche Antwort als Prozent der Kontrollantwort auf ATP in einer Standardbadlösung (dunkelgraue Balken) und nach 10 Min. (#1) und 15 Min. (#2) in PPADS-haltiger Badlösung (hellgraue Balken) von insgesamt 63 Stützzellen aus 4 Gewebeschnitten der olfaktorischen Mukosa. **C:** Die ATP induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme wurde gedämpft, aber nicht völlig durch RB2 blockiert, [RB2 (200  $\mu$ M)]. Im grauen Feld sind ATP-Applikationen 10 und 15 Minuten nach der RB2-Anwendung abgebildet. Nach einer Auswaschzeit (washout) von 10 Minuten erholten sich die Antworten nahezu komplett. Gezeigt ist die durchschnittliche Antwort aller auf ATP reagierenden Stützzellen eines Gewebeschnittes der olfaktorischen Mukosa. **D:** Die durchschnittliche Antwort als Prozent der Kontrollantwort auf ATP in einer Standardbadlösung (dunkelgraue Balken) und nach 10 Min. (#1) und 15 Min. (#2) in RB2-haltiger Badlösung. (hellgraue Balken) von insgesamt 66 Stützzellen aus 4 Gewebeschnitten der olfaktorischen Mukosa. **E:** Die ATP induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme wurde durch Suramin nicht beeinträchtigt [Suramin (200  $\mu$ M)]. Im grauen Feld sind ATP-Applikationen 10 und 15 Minuten nach der Suramin-Anwendung abgebildet. Gezeigt ist die durchschnittliche Antwort aller auf ATP reagierenden Stützzellen eines Gewebeschnittes der olfaktorischen Mukosa. **F:** Die durchschnittliche Antwort dargestellt als Prozent der Kontrollantwort auf ATP in einer Standardbadlösung (dunkelgraue Balken) und nach 10 Min. (#1) und 15 Min. (#2) in suraminhaltiger Badlösung (hellgraue Balken) von insgesamt 37 Stützzellen aus 4 Gewebeschnitten der olfaktorischen Mukosa.

Der ATP-Abbau durch Ektonukleotidasen im Extrazellulärraum kann die Konzentration von endogen freigesetztem, sowie auch durch die Badlösung appliziertem ATP beträchtlich reduzieren. Deshalb wurde der Einfluss des Ektonukleotidase-Hemmstoffes ARL 67156 auf

die ATP-induzierten Antworten der Stützzellen untersucht. ARL 67156 vergrößerte den ATP-induzierten intrazellulären Kalziumanstieg klar (**Abbildung 3.5 A**). Die Antwort nahm in den Stützzellen dieses Gewebeschnittes um 70 % zu. In 84 Stützzellen (vier Gewebeschnitte) erhöhte ARL 67156 den Kalziumanstieg um mehr als 100 % (**Abbildung 3.5 B**).



**Abb. 3.5** Auswirkung des Ektonukleotidasehemmstoffes (ARL 67156) auf die ATP-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme in den Stützzellen des olfaktorischen Epithels des larvalen *Xenopus laevis*

**A:** ATP induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Antworten wurden in Badlösung mit ARL 67156 (100  $\mu$ M) erhöht. Im grauen Feld ist die ATP-Applikation nach 5 Minuten in einer ARL 67156-haltigen Badlösung abgebildet. Die Antworten sind, nach dem Wechsel zu Standardbedingungen wieder auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt. **B:** Die durchschnittliche Antwort dargestellt als Prozent der Kontrollantwort auf ATP in einer Standardbadlösung (dunkelgraue Balken) und in der ARL 67156-haltigen Badlösung (hellgraue Balken) von insgesamt 84 Stützzellen aus 4 Gewebeschnitten der olfaktorischen Mukosa.

---

## 4. Diskussion

Das olfaktorische Epithel wurde bislang noch nicht als Ganzes studiert. Während sich unzählige Studien auf die olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) (Getchell, 1986; Schild und Restrepo, 1998) und die olfaktorischen Rezeptoren (Mombaerts, 1999) konzentrieren, wurde den Stützzellen des olfaktorischen Epithels viel weniger Aufmerksamkeit geschenkt (Getchell und Getchell, 1992). Bis vor kurzem gab es keine Belege für eine direkte Beteiligung der Stützzellen an intraepithelialen Signal- und Modulationsmechanismen (Hegg et al., 2003). Drei neue Studien haben jedoch gezeigt, dass die Applikation von extrazellulären Nukleotiden eine starke  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme in den Stützzellen der Maus und des larvalen *Xenopus laevis* induziert (Hegg et al., 2003; Czesnik et al., 2006), und dass eine mukosale Applikation von Nukleotiden bei der Maus die Expressierung von Hitzeschockproteinen in den Stützzellen hervorruft (Hegg und Lucero, 2006). Mit der vorliegenden Arbeit wurde versucht, zu einem gründlicheren Verständnis des olfaktorischen Epithels beizutragen. Das Hauptanliegen war, die purinergen Rezeptorsubtypen zu bestimmen, die für die  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme in den Stützzellen verantwortlich sind und diese pharmakologisch zu charakterisieren.

Wie die Versuche gezeigt haben, waren die ATP induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen in den Stützzellen sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium ähnlich stark. Interessant war dabei, dass die erste Antwort auf ATP in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium stets größer als die Antwort in Anwesenheit von extrazellulärem Kalzium war. Über eine ähnliche Verstärkung des  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium ist in einer Studie mit Müllerzellen, den radialen Gliazellen der Netzhaut, berichtet worden (Saltzberg et al., 2003). Wiederholte ATP Applikationen in kalziumfreier Badlösung resultierten immer in einem fortschreitenden Abfall der kalziumabhängigen Antworten. Diese Beobachtung lässt sich durch eine fortschreitende Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher erklären (siehe auch weiter unten). Nachdem die Standardbedingungen wieder hergestellt worden waren, erholten sich die ATP induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen stets beinahe vollständig. Anders bei Versuchen mit CPA, einem spezifischen Hemmstoff der  $Ca^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen bzw. endoplasmatischen Retikulums (Seidler et al., 1989). Bei diesen Versuchen wurden die ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -

---

Zunahmen komplett aufgehoben und stellten sich auch unter Standardbedingungen nicht wieder her.

Zusammen betrachtet suggerieren diese Experimente, dass die ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen in Stützzellen des olfaktorischen Epithels zum größten Teil, wenn nicht vollständig, durch die Aktivierung von metabotropen purinergen P2Y-Rezeptoren, gefolgt von einer Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern, erklärt werden können.

Um diese Vermutung zu bestätigen und die involvierten P2Y-Rezeptorsubtypen zu identifizieren, wurde im zweiten Teil der Studie eine Vielzahl von purinergen Agonisten getestet. Alle getesteten Agonisten wurden mit einer Konzentration von 200  $\mu$ M angewendet. Außer ATP lösten nur zwei weitere Agonisten eine  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme in den Stützzellen aus, nämlich UTP und ATP $\gamma$ S. UTP war dabei geringfügig besser im Auslösen von  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen als ATP, dieses wiederum war wirksamer als ATP $\gamma$ S. Daraus hat sich eine relativ kurze Wirkreihenfolge der Agonisten in den Stützzellen des olfaktorischen Epithels des larvalen *Xenopus laevis* ergeben: Nämlich UTP>ATP>ATP $\gamma$ S. Eine Studie aus unserem Labor zeigt, dass der berechnete Dosis-Wirkungs-Zusammenhang für die UTP- und ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen in den Stützzellen des olfaktorischen Epithels, mit der hier ermittelten Wirkpotenz der Agonisten übereinstimmt, da der EC<sub>50</sub>-Wert (die halbmaximale Konzentration, bei der die  $[Ca^{2+}]_i$ -abhängige Fluoreszenzintensität die Hälfte ihres Maximum erreicht hat) für UTP etwas geringer als für ATP ausfällt (Bartoszek, 2004). Die anderen fünfzehn getesteten Agonisten waren entweder unwirksam oder nur sehr schwach wirksam. Es ist an dieser Stelle wichtig zu erwähnen, dass alle Stützzellen die oben erwähnte Wirkreihenfolge gezeigt haben. Dies beweist, dass alle Stützzellen dieselben purinergen Rezeptoren exprimieren. Die hier bestimmte Wirkreihenfolge der Agonisten ist allerdings nicht mit den aktuell bekannten pharmakologischen Studien für den P2Y<sub>1</sub>- (2MeSATP=2MeSADP>ADP>ATP), P2Y<sub>6</sub>- (UDP>>UTP>>ATP), P2Y<sub>11</sub>- (BzATP=ATP $\gamma$ S>ATP, UTP), P2Y<sub>12</sub>- (2-MeSADP>ADP>ATP), P2Y<sub>13</sub>- (2-MeSADP=ADP>>ATP) oder P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor (UDP-glucose) übereinstimmend (von Kügelgen, 2006; Burnstock, 2007). Nur über den P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>4</sub>-Rezeptor wurde berichtet, dass sie bevorzugt und nahezu gleich stark durch UTP und ATP aktiviert werden können (von Kügelgen, 2006; Burnstock, 2007; Bogdanov et al., 1998).

Diese Rezeptoren werden auch durch ATP $\gamma$ S, aber mit einer niedrigeren Wirkung als die von UTP und ATP, aktiviert (Brunschweiger und Müller, 2006; Wildman et al., 2003). Das entspricht der hier bestimmten und oben erwähnten Wirkreihenfolge der Agonisten.

---

Die Tatsache, dass die purinergen Agonisten wie  $\alpha,\beta$ -meATP and  $\beta,\gamma$ -meATP, welche selektiv P2X-Rezeptoren aktivieren (Burnstock, 2007; Ralevic und Burnstock, 1998) und Adenosin, das P1-Rezeptoren aktiviert (Burnstock, 2007; Ralevic und Burnstock, 1998), unwirksam waren, ist ein zusätzlicher Beweis dafür, dass die Stützzellen keine P2X- und P1-Rezeptoren exprimieren.

Um den Verdacht auf einen P2Y<sub>2</sub>- bzw. P2Y<sub>4</sub>-Rezeptor zu verstärken, wurden die Reaktionen auf ATP unter Einwirkung von P2-Antagonisten getestet. Es wurden drei unselektive P2-Antagonisten getestet: PPADS, RB2 und Suramin. Obwohl alle drei in einer relativ hohen Konzentration (200  $\mu$ M) appliziert wurden, haben nur PPADS und RB2 die ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen vermindert. Suramin dagegen zeigte keine antagonistische Wirkung bei den ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen. Diese Antagonisten sind seit mehreren Jahren erfolgreich zum Inhibieren der P2-Rezeptor Antworten eingesetzt worden (von Kügelgen, 2006; Ralevic und Burnstock, 1998; Lambrecht et al., 2002; Jacobson et al., 2004). Bezüglich seiner Wirksamkeit an den P2Y-Rezeptoren hat sich gezeigt, dass Suramin, wenn man es in hoher mikromolarer Konzentration anwendet, seine inhibitorische Wirkung an allen P2Y-Subtypen außer an den P2Y<sub>4</sub>-Rezeptoren entfaltet (von Kügelgen, 2006). PPADS und RB2 hemmen viele P2Y-Rezeptoren, mit der stärksten Wirkung an den P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>6</sub>-Rezeptoren (von Kügelgen, 2006). Nur in einer höheren mikromolaren Konzentration zeigen sie ihren Effekt an dem P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>4</sub>-Rezeptor (von Kügelgen, 2006). Somit liefern die Antagonistenversuche innerhalb dieser Arbeit einen stärkeren Hinweis dafür, dass die Stützzellen des olfaktorischen Epithels eher P2Y<sub>4</sub>-Rezeptoren als P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren exprimieren.

Allerdings sind die halbmaximalen Konzentrationen (EC<sub>50</sub>) von UTP (56,3  $\mu$ M) und ATP (82,6  $\mu$ M), die in unserem Labor gemessen wurden (Bartoszek, 2004), beträchtlich höher als die EC<sub>50</sub>-Werte die für in Oozyten exprimierten P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>4</sub>-Rezeptoren ermittelt wurden (Wildman et al., 2003). Diese Tatsache mag mit einer hohen Ektonukleotidase-Aktivität im olfaktorischen Epithel des larvalen *Xenopus laevis* zusammenhängen. Im letzten Teil dieser Arbeit wurde diese Hypothese überprüft.

Ektonukleotidasen sind Enzyme der Plasmamembran, mit einer nach extrazellulär orientierten katalytischen Seite, welche für die Hydrolyse von extrazellulären Nukleotiden verantwortlich sind (Zimmermann, 2000; Zimmermann, 2006). Es ist bekannt, dass der Nukleotidabbau durch die Ektonukleotidasen die Konzentration von endogen freigesetztem, sowie in die Badlösung appliziertem ATP bzw. UTP beträchtlich reduzieren kann (Zimmermann, 2000; Zimmermann, 2006). Die Versuche mit dem Ektonukleotidase-Hemmstoff ARL 67156

(Westfall et al., 1996) bestätigten die oben genannte Vermutung, da sich die ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen in Gegenwart des ARL 67156-Hemmstoffes erheblich verstärkten. Diese Ergebnisse erklären die vorhin erwähnten hohen Werte der halbmaximalen Konzentrationen ( $EC_{50}$ ) von UTP und ATP in den Stützzellen des olfaktorischen Epithels von larvalen *Xenopus laevis* (Bartoszek, 2004).

Im olfaktorischen Epithel der Maus exprimieren Stützzellen ausschließlich P2Y-Rezeptoren (Hegg et al., 2003), während Rezeptorneurone sowohl P2X- als auch P2Y-Rezeptoren exprimieren (Hegg et al., 2003). Im Gegensatz dazu zeigen Daten aus dieser Arbeit und Daten aus einer früheren Studie aus unserem Labor (Czesnik et al., 2006), dass in larvalen *Xenopus laevis* die Rezeptorneurone keine purinergen Rezeptoren exprimieren. Im olfaktorischen Epithel des larvalen *Xenopus laevis* werden Stützzellen, aber nicht Rezeptorneurone, von extrazellulären Nukleotiden aktiviert. Die Tatsache, dass die Rezeptorneurone im olfaktorischen Epithel von larvalen *Xenopus laevis*, anders als die olfaktorischen Rezeptorneuronen einer Maus, keine purinergen Rezeptoren exprimieren, zeigt, dass es Unterschiede im purinergen System des olfaktorischen Epithel von Maus und *Xenopus* gibt. Ob dieser Unterschied funktionell entscheidend ist, muss noch bewiesen werden.

---

## 5. Zusammenfassung

Extrazelluläre Purine und Pyrimidine sind wichtige Signalmoleküle, die über membranständige Rezeptoren, so genannte purinerge Rezeptoren ihre biologischen Effekte vermitteln (Barnard et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden ATP-induzierte Antworten in den Stützzellen des olfaktorischen Epithels mit Hilfe der Calcium-Imaging-Technik charakterisiert.

Die Applikation von ATP induzierte Zunahmen der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium. Anders bei Anwendung von CPA, einem spezifischen Hemmstoff der  $Ca^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen bzw. endoplasmatischen Retikulums. In diesen Versuchen wurden die ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen komplett aufgehoben. Das zeigt, dass die ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen in Stützzellen größtenteils, wenn nicht vollständig, durch die Aktivierung von G-Protein gekoppelten P2Y-Rezeptoren ausgelöst werden. Die ermittelte Wirkpotenz purinerges Agonisten war  $UTP > ATP > ATP\gamma S$ . Die ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahmen konnten durch die purinergen Antagonisten PPADS und RB2 reduziert werden. Die hemmende Wirkung des purinergen Antagonisten Suramin blieb aus. Zusammen weisen die oben genannten Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass extrazelluläre Nukleotide die Stützzellen des olfaktorischen Epithels über P2Y2 / P2Y4-artige Rezeptoren aktivieren. Zusätzlich zeigten die Versuche mit dem Ektonukleotidase-Hemmstoff ARL 67156, dass im olfaktorischen Epithel von larvalen *Xenopus laevis* eine hohe Ektonukleotidasenaktivität herrscht.

Welche physiologische Funktion die Nukleotidreaktionen der Stützzellen des olfaktorischen Epithels von *Xenopus laevis* haben, kann man zum jetzigen Zeitpunkt nur erahnen und wird sicherlich Bestandteil kommender Studien sein.

## 6. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b> Wahrnehmungsraum des Geruchssinnes beim Mensch und Hund .....	5
<b>Abbildung 1.2:</b> Aufbau des olfaktorischen Epithels .....	10
<b>Abbildung 1.3:</b> Schematische Darstellung der Stützzellen, Basalzellen und Rezeptorzellen.....	11
<b>Abbildung 1.4:</b> Chemische Strukturformeln der einzelnen Nukleotide .....	14 - 15
<b>Abbildung 1.5:</b> Chemische Strukturformel von Adenosin-5'-triphosphat .....	16
<b>Abbildung 1.6:</b> Aktuelle Einteilung der purinergen Rezeptoren .....	21
<b>Abbildung 1.7:</b> Allgemeine Topologie einer P2X-Rezeptoruntereinheit .....	25
<b>Abbildung 1.8:</b> Rezeptorstrukturen der ionotropen Rezeptoren .....	25
<b>Abbildung 1.9:</b> Allgemeine Topologie einer P2Y-Rezeptoruntereinheit .....	27
<b>Abbildung 2.1:</b> <i>Xenopus laevis</i> -Larve .....	34
<b>Abbildung 2.2:</b> Schematische Abbildung des optischen Prinzips eines konfokalen Laserrasternmikroskops.....	37
<b>Abbildung 2.3:</b> Strukturformel des kalziumsensitiven Farbstoffes Fluo-4.....	38
<b>Abbildung 2.4:</b> Strukturformel des MRP-Blockers MK-571.....	39
<b>Abbildung 2.5:</b> Schematische Darstellung des Applikationssystems für Nukleotide und Badlösung.....	41
<b>Abbildung 2.6:</b> Die Strukturformeln von den P2-Rezeptoragonisten: Suramin, Reaktiv-blau 2, PPADS .....	45
<b>Abbildung 2.7:</b> Die Strukturformel der Cyclopiazonsäure.....	46
<b>Abbildung 2.8:</b> Die Strukturformel des Ektonukleotidaseinhibitors ARL 67156.....	46
<b>Abbildung 3.1:</b> ATP-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Zunahme in Stützzellen des olfaktorischen Epithels in einem Gewebeschnitt des olfaktorischen Epithels von larvalen <i>Xenopus laevis</i> .....	48
<b>Abbildung 3.2:</b> Antworten auf ATP brauchen kein extrazelluläres Kalzium aber intakte intrazelluläre Kalziumspeicher.....	50
<b>Abbildung 3.3:</b> Antworten auf eine Vielzahl von purinergen Agonisten in Stützzellen des larvalen <i>Xenopus laevis</i> .....	51

- 
- Abbildung 3.4:** Auswirkung verschiedener purinerner Antagonisten auf den ATP-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den Stützzellen von larvalen *Xenopus laevis*..... 52
- Abbildung 3.5:** Auswirkung des Ektonukleotidasehemmstoffes (ARL 67156) auf die ATP-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$  -Zunahme in den Stützzellen des olfaktorischen Epithels des larvalen *Xenopus laevis*.....53

---

## 7. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1:</b> Die Einteilung der Primärgerüche in Qualitätsklassen und die dazugehörigen biochemischen Verbindungen.....	6
<b>Tabelle 1.2:</b> Einteilung der Geruchsstörungen beim Menschen.....	8
<b>Tabelle 1.3:</b> Wirkungen der Methylxanthine gegenüber dem Adenosin.....	19
<b>Tabelle 1.4:</b> Wirkreihenfolge von Agonisten an den P2X-Rezeptoren.....	23
<b>Tabelle 1.5:</b> P2X-Rezeptoren Antagonisten, Transduktionmechanismus an den P2X-Rezeptoren.....	23
<b>Tabelle 1.6:</b> Wirkpotenz der Agonisten der homomeren P2Y-Rezeptoren.....	28
<b>Tabelle 1.7:</b> P2Y-Rezeptoren Antagonisten, Transduktionmechanismus an den P2Y-Rezeptoren.....	28
<b>Tabelle 2.1:</b> Zusammensetzung der Standardbadlösung.....	43
<b>Tabelle 2.2:</b> Zusammensetzung der kalziumfreien Badlösung.....	43

## 8. Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b><math>\alpha</math>, <math>\beta</math>-meATP</b>	$\alpha$ , $\beta$ -Methylen ATP
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>ADP<math>\beta</math>S</b>	Adenosin 5'-[ $\beta$ -Thio]diphosphat
<b>AM</b>	Acetoxymethyl
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat
<b>5'-AMPS</b>	Adenosin-5'-O-monophosphorothioat
<b>Ap<sub>4</sub>A</b>	P <sup>1</sup> , P <sup>4</sup> -Diadenosin-Tetraphosphat
<b>AR-C126313</b>	5-(7-chloro-4 <i>H</i> -1-thia-3-aza-benzo[ <i>f</i> ]-4-yl)-3-methyl-6-Thioxo-piperadin-2-on
<b>AR-C69931MX</b>	[(2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>R</i> )-3, 4-Dihydroxy-5-[6-(2-Methylsulfanylethylamino)-2-(3, 3, 3-Trifluoropropylsulfanyl)purin-9-yl]oxolan-2-yl]methyldihydrogenphosphat
<b>ARL 66096</b>	2- propylthio-D-beta,gamma-difluoromethylen-ATP
<b>ARL 67156</b>	6-N, N-Diethyl-D- $\beta$ -y-dibromomethylen Adenosintriphosphat
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>ATP<math>\gamma</math>S</b>	Adenosin 5-O-(3-Thiotriphosphat)
<b>AZD6140</b>	(1 <i>S</i> , 2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 5 <i>S</i> )-3-[7-[(1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> )-2-(3, 4-Difluorophenyl)cyclopropylamino]-5-(propylthio)-3 <i>H</i> -[1, 2, 3]triazolo[4, 5- <i>d</i> ]pyrimidin-3-yl]-5-(2-hydroxyethoxy)cyclopentan-1, 2-diol / Ticagrelor
<b><math>\beta</math>, <math>\gamma</math>-meATP</b>	$\beta$ , $\gamma$ -Methylen-ATP
<b>BOA</b>	Bulbus olfactorius accessorius
<b>BOP</b>	Bulbus olfactorius principalis
<b>BzATP</b>	3'-O-(4-Benzoyl) ATP
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	circa
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>cDNS</b>	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<b>CPA</b>	Cyclopiazonsäure

---

<b>CT50547</b>	N-(6-Ethoxybenzothiazol-2-yl)-2-(8-ethoxy-4-hydroxy-2,2-dioxo[1, 2, 4]thiadiazino[3, 4-b]benzothiazol-3-yl)-2-oxoethan-1-Sulfonamid / Antikoagulant
<b>CTP</b>	Cytidintriphosphat
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dF/F</b>	Fluoreszenzintensitätsänderung
<b>EC50</b>	Konzentration bei halbmaximaler Reaktion
<b>EDRF</b>	endothelium derived relaxing factor
<b>Fluo-4-AM</b>	N-[4-[6-[(acetyloxy)methoxy]-2, 7-difluoro-3-oxo-3H-xanthen-9-yl]-2-[2-[2-[bis[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl] amino]-5-methylphenoxy]ethoxy]phenyl]-N-[2-[(acetyloxy) methoxy]-2-oxoethyl]-, (acetyloxy)methyl-Ester
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>G-Protein</b>	Guanin-Nukleotid-bindendes Protein
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>HCG</b>	Humanes Choriongonadotropin
<b>Hepes</b>	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure, „pH-Puffer“
<b>HIV</b>	human immunodeficiency virus
<b>INS49266</b>	6-phenylurea-2', 3'-phenylacetaldehyd acetal-ATP
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol-1, 4, 5- Triphosphat
<b>IUPHAR</b>	International Union of Pharmacology
<b>LSM</b>	Laserscanmikroskop
<b>2MeSADP</b>	2-Methyl-Thio-ADP
<b>2MeSAMP</b>	2-Methyl-Thio-AMP
<b>2MeSATP</b>	2-Methyl-Thio-ATP
<b>MK-571</b>	(E)-3-[[[3-[2-(7-chloro-2-quinoliny)Ethenyl]phenyl]][[3-(Dimethylamino)-3-Oxopropyl]thio]methyl]thio]-Propansäure, Natriumsalz
<b>modif.</b>	modifiziert
<b>mRNS</b>	„messenger“ Ribonukleinsäure
<b>MRP</b>	Multidrug-resistance-assoziierte Proteine

---

<b>MRS2179</b>	2'-deoxy-N <sup>6</sup> -methyladenosin-3', 5'-Bisphosphat
<b>MRS2211</b>	2-[(2-Chloro-5-nitrophenyl)azo]-5-hydroxy-6-methyl-3-[(phosphonooxy)methyl]-4-pyridineCarboxaldehyd Dinatriumsalz
<b>MRS2279</b>	(N)-methanocarba-N <sup>6</sup> -methyl-2chloro-2'-deoxyadenosin-3', 5'-Bisphosphat
<b>MRS2500</b>	2-iodo-N <sup>6</sup> -methyl-(N)-methanocarba-20-deoxyadenosin-30, 50-Bisphosphat
<b>MRS2578</b>	1, 4-di-[(3-isothio-cyanato phenyl)-thioureido]Butan
<b>MRT</b>	Magnet-Resonanz-Tomographie
<b>NF157</b>	8, 8'-[Carbonylbis(imino-3, 1-phenylenecarbonylimino(4-fluoro-3, 1-phenylene)carbonylimino)]bis-1, 3, 5-naphthalen –Trisulfon-Säure Hexanatrium Salz / von Suramin abgeleiteter Antagonist / sc-204125
<b>NF340</b>	[4, 4'-(carbonylbis(imino-3, 1-(4 methyl-phenylen)carbonylimino))bis(naphthalen-2, 6-Disulfon-Säure) Tetranatrium Salz] / von Suramin abgeleiteter Antagonist
<b>OB</b>	olfaktorischer Bulb
<b>OE</b>	olfaktorisches Epithel
<b>OR</b>	olfaktorischer Rezeptor
<b>ORN</b>	olfaktorisches Rezeptorneuron
<b>PC</b>	principal cave, Hauptriechhöhle
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PLD</b>	Phospholipase D
<b>PPADS</b>	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2', 4'-Disulfonsäure / Pyridoxalphosphatderivat
<b>PSB-0413</b>	2-Propylthioadenosin-5'-adenyl-Säure (1, 1-dichloro-1-Phosphonomethyl-1-phosphonyl) Anhydrid
<b>RB2</b>	„Reaktivblau 2“, 1-Amino-4-[[4-[[4-chloro-6-[[3 (oder 4)-sulfophenyl]amino]-1, 3, 5-triazin-2-yl]amino]-3-sulfophenyl]amino]-9, 10-dihydro-9, 10-dioxo-2-Anthracensulfonsäure
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure

---

<b>Suramin</b>	8-[[4-methyl-3-[[3-[[3-[[2-methyl-5-[(4, 6, 8-Trisulfonaphthalen-1-yl)carbamoyl]phenyl]carbamoyl]Phenyl]carbamoylamino]benzoyl]amino]benzoyl]amino]Naphthalen-1, 3, 5-Trisulfonsäure
<b>TM-1</b>	Transmembranregion-1
<b>TM-2</b>	Transmembranregion-2
<b>UDP</b>	Uridindiphosphat
<b>UMP</b>	Uridinmonophosphat
<b>UTP</b>	Uridintriphosphat
<b>XOR-1</b>	Xenopus Olfactory receptor-1
<b>XOR-2</b>	Xenopus Olfactory receptor-2
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

---

## 9. Literaturverzeichnis:

**Abbraccio MP, Burnstock G** (1994): Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64: 445-475

**Abrahamse SL, Rechkemmer G** (2001): Identifikation of an organic anion transport system in the human colon carcinoma cell line HT 29 clone 19 A. *Pflugers Arch* 441: 529-537

**Altner H** (1962): Untersuchungen über Leistungen und Bau des Südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. *Z Vergl Physiol* 45: 272-306

**Amoore JE** (1952): The stereochemical specificities of human olfactory receptors. *Perfum. essent. Oil Ree* 43: 321-330

**Amoore JE**: Effects of chemical exposures on olfaction in humans. In: Barrow CS, ed. Toxicology of the nasal passages. Hemisphere Publishing, Washington DC 1986: 155-190

**Avila VL, Frye PG** (1978): Feeding behavior of the African Clawed frog (*Xenopus laevis* Daudin): effect of prey type. *J Herpetol* 12: 391-396

**Axel R** (1995): The molecular logic of smell. *Sci Am* 273: 154-159

**Baghdiguian S, Fantini J** (1997): Suramin: a molecule with a broad spectrum of biological and therapeutic properties. *Cancer J* 10: 31-37

**Barnard EA, Burnstock G, Webb TE** (1994): G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 15: 67-70

**Bartoszek I**: Calcium-Imaging-Analyse von olfaktorischen Rezeptorneuronen von *Xenopus laevis* Kaulquappen, Charakterisierung der Reaktionen auf Nukleotide, Diplomarbeit der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen, Göttingen 2004

- 
- Belitser VA, Tsibakova ET** (1939): O mechanizme fosforilirovanija, soprjazénno s dychaniem (The mechanism of phosphorylation associated with respiration). *Biochimija* 4: 516-535
- Biancuzzo M**: Stillberatung: Mutter und Kind professionell unterstützen (Taschenbuch), 1. Auflage, Elsevier, München 2004
- Bo X, Schoepfer R, Burnstock G** (2000): Molecular cloning and characterization of a novel ATP P2X receptor subtype from embryonic chick skeletal muscle. *J Biol Chem* 275: 14401–14407
- Boarder MR, Webb T**: P2Y receptors: structure and function. In: Purinergic and Pyrimidinergic Signalling (Abbracchio MP, Williams M), Hrsg. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 151, Part 1. Molecular Aspects, Central and Peripheral Nervous System Function, Springer Verlag, Heidelberg 2001: 65-88
- Boeckh J** (1972): Die Reaktion von Neuronen im Deuteroerebrum der Wanderheuschrecke bei Duftreizung der Antennen. *Verh Dtsch Zool Ges Mainz* 66: 189-193
- Boehm S** (2003): P2Ys go neuronal: modulation of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels by recombinant receptors. *Br J Pharmacol* 138: 1-3
- Bogdanov YD, Wildman SS, Clements MP, King BF, Burnstock G** (1998): Molecular cloning and characterization of rat P2Y4 nucleotide receptor. *Br J Pharmacol* 124: 428–430
- Brändle U, Guenther E, Irrie C, Wheeler- Schilling TH** (1998): Gene expression of the P2X receptors in the rat retina. *Brain Res* 59: 269-272
- Breipohl W, Laugwitz HJ, Bornfeld N** (1974): Topological relation between the dendrites of olfactory sensory cells and sustentacular cells in different vertebrates. An ultrastructural study. *J Anat* 117: 89-94
- Brennan PA** (2001): The vomeronasal system. *Cell Mol Life Sci* 58: 546-555

- 
- Brunn A** (1892): Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der menschlichen Nasenhöhle. *Arch Mikr Anat* 39: 632-651
- Brunschweiger A, Müller CE** (2006): P2 receptors activated by uracil nucleotides-an update. *Curr Med Chem* 13: 289-312
- Buck LB** (1996): Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu Rev Neurosci* 19: 517-544
- Buck LB, Axel R** (1991): A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65: 175-187
- Buell G, Collo G, Rassendren F** (1996): P2X receptors: an emerging channel family. *Eur J Neurosci* 8: 2221-2228
- Bültmann R, Wittenburg H, Pause B, Kurz G, Nickel P, Starke K** (1996): P2-purinoceptor antagonists. III. blockade of P2-purinoceptor subtypes and ecto-nucleotidases by compounds related to suramin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 354: 498-504
- Burnstock G** (1972): Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24: 509-581
- Burnstock G**: A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones, (Bolis L and Straub RW eds), Raven, New York 1978: 107-118
- Burnstock G** (2001): Expanding field of purinergic signalling. *Drug Dev Res* 52: 1-10
- Burnstock G** (2004): Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* 4: 47-52
- Burnstock G** (2007): Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. *Physiol Rev* 87: 659-797
- Burnstock G, Kennedy C** (1985): Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16: 433-440

- 
- Burnstock G, Campbell G, Bennett M, Holman ME** (1963): Inhibition of the smooth muscle of taenia coli. *Nature* 200: 581-582
- Butenandt A, Beckmann, R, Hecker E** (1961): Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners. In: Der biologische Test und die Isolierung des reinen Sexuallockstoffes Bombykol. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie* 324: 71-83
- Caprio J**: Peripheral filters and chemoreceptor cells in fishes. In: *Sensory Biology in Aquatic Animals*, Ed. by J. Atema, R. R. Fay, A. N. Popper, and W. N. Tavolga, Springer Verlag, Berlin 1988: 313-338.
- Caprio J, Byrd RP Jr.** (1984): Electrophysiological evidence for acidic, basic, and Neutral amino acid olfactory receptor sites in the catfish. *J Gen Physiol* 84: 403-22
- Choo LK** (1981): The effect of reactive blue, an antagonist of ATP, on the isolated urinary bladders of guinea-pig and rat. *J Pharm Pharmacol* 33: 248-250
- Chuah MI, Zheng DR** (1987): Olfactory marker protein is present in olfactory receptor cells of human fetuses. *Neurosci* 23: 363-370
- Communi D, Janssens R, Suarez-Huerta N, Robaye B, Boeynaems JM** (2000): Advances in signalling by extracellular nucleotides: the role and transduction mechanisms of P2Y receptors. *Cell Signal* 12: 351-360
- Cowan CM, Roskams AJ** (2002): Apoptosis in the mature and developing olfactory neuroepithelium. *Microsc Res Tech* 58: 204-215
- Czesnik D, Kuduz J, Schild D, Manzini I** (2006): ATP activates both receptor and sustentacular supporting cells in the olfactory epithelium of *Xenopus laevis* tadpoles. *Eur J Neurosci* 23: 119-128
- Damm M, Temmel A, Welge-Lüssen A, Eckel H, Kreft M P, Klussmann J, Gudziol H, Hüttenbrink K B, Hummel T** (2004): Epidemiologie und Therapie von Reichstörungen in Deutschland, Österreich und in der Schweiz. *HNO* 52: 112-120

---

**Deitmer WD, Schild D:** Ca<sup>2+</sup> und pH: Ionenmessungen in Zellen und Geweben (Labor im Fokus), 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 2000

**Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP** (2003): Inactivation of the human P2Y<sub>12</sub> receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* 101: 3908–3914

**Di Virgilio F** (1995): The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today* 16: 524-528

**Drury AN, Szent-Gyorgyi A** (1929): The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213-237

**Dubyak GR, el-Moatassim C** (1993): Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265: 577-606

**Dunn PM, Zhong Y, Burnstock G** (2001): P2X receptors in peripheral neurones. *Prog Neurobiol* 65: 107-134

**Eccles JC:** The Physiology of Synapses, 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin 1964

**Fain GL:** Sensory Transduction, 1. Auflage, Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts 2003

**Farbmann AI:** Cell biology of olfactory epithelium. In: Finger TE, Silver W, Restrepo D, The neurobiology of taste and smell. Wiley Liss, New York 2000: 131-158

**Föske H** (1934): Das Geruchsorgan von *Xenopus laevis*. *Z Anat Entwicklungsgesch* 103: 519-550

**Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M** (1994): Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46: 143-156

---

**Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M** (1997): Nomenclature and classification of purinoceptors. *Trends Pharmacol Sci* 46: 143-156

**Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J** (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol Rev* 53: 527-552

**Freitag J, Krieger J, Strotmann J, Breer H** (1995): Two classes of olfactory receptors in *Xenopus laevis*. *Neuron* 15: 1383-1392

**Freitag J, Ludwig G, Andreini I, Rossler P, Breer H** (1998): Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates. *J Comp Physiol [A]* 183: 635-650

**Gekeler V, Ise W, Sanders KH, Ulrich WR, Beck J** (1995): The leukotriene LTD4 antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 208: 345-352

**Getchell TV** (1986): Functional properties of vertebrate olfactory receptor neurons. *Physiol Rev* 66: 772-818

**Getchell ML, Getchell TV** (1992): Fine structural aspects of secretion and extrinsic innervation in the olfactory mucosa. *Microsc Res Tech* 23: 111-127

**Getchell ML, Rafols JA, Getchell TV** (1984): Histological and histochemical studies of the secretory components of the salamander olfactory mucosa: effects of isoproterenol and olfactory nerve section. *Anat Res* 208: 553-565

**Gillespie JH** (1934): The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol* 80: 345-349

**Gold GH** (1999): Controversial issues in vertebrate olfactory transduction. *Annu Rev Physiol* 61: 857-871

---

**Graziadei PPC, Monti Graziadei GA** (1979): Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol* 8: 1-18

**Haller MM** (2010): Wahrnehmungsraum des Geruchssines beim Mensch und Hund  
<http://hundekosmos.de/biologie/diesinne/dergeruchssinn/501851968c09a5446/d000.html>

**Halpern M** (1987): The organization and function of the vomeronasal system. *Annu Rev Neurosci* 10: 325-362

**Halpern M, Martinez-Marcos A** (2003): Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol* 70: 245-318

**Hansen A, Reiss JO, Gentry CL, Burd GD** (1998): Ultrastructure of the olfactory organ in the clawed frog, *Xenopus laevis*, during larval development and metamorphosis. *J Comp Neurol* 398: 273-288

**Hatt H** (2004): Molecular and cellular basis of human olfaction. *Chem Biodivers* 1: 1857-1869

**Hegg CC, Lucero MT** (2006): Purinergic receptor antagonists inhibit odorant-evoked heat shock protein 25 induction in mouse olfactory epithelium. *Glia* 53: 182-190

**Hegg CC, Greenwood D, Huang W, Han P, Lucero MT** (2003): Activation of purinergic receptor subtypes modulates odor sensitivity. *J Neurosci* 23: 8291-301

**Hick C, Hick A**: Intensivkurs Physiologie, 6.Auflage, Elsevier, München 2009

**Hoffmann F, Moro S, Nicholas RA, Harden TK, Jacobson KA** (1999): The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y<sub>1</sub> receptor in surface expression and activation processes. *J Biol Chem* 274: 14639-14647

---

**Holton FA, Holton P** (1953): The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings. *J Physiol* 119: 50-51

**Holton FA, Holton P** (1954): The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings *J Physiol* 126: 124-140.

**Holton P** (1959): The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 145: 494–504

**Howell BJ, Baumgardner FW, Bondi K, Rahn H** (1970): Acid-base balance in cold-blooded vertebrates as a function of body temperature. *Am J Physiol* 218: 600-606

**Hummel T, Welge-Lüssen A**: Riech- und Schmeckstörungen. Physiologie, Pathophysiologie und therapeutische Ansätze, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2009

**IUPHAR**: Compendium on Receptor Characterization and Classification. *International Union of Pharmacology*, IUPHAR Media, London 1998

**Jacobson KA, van Galen PM, Williams M** (1992): Perspective: Adenosine receptors: pharmacology, structure activity relationships, and therapeutic potential. *J Med Chem* 35: 407-422

**Jacobson KA, Jarvis MF, Williams M** (2002): Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *Journal of Medicinal Chemistry* 45: 4057-93

**Jacobson KA, Costanzi S, Ohno M, Joshi BV, Besada P, Xu B, Tchilibon S** (2004): Molecular recognition at purine and pyrimidine nucleotide (P2) receptors. *Current Trends Med Chem* 4: 805-819

**Kallmann FJ, Schoenfeld WA, Barrera** (1944): The genetic aspect of primary eunuchoidism. *Am J Ment Defic* 48: 203-236

- 
- Kang J, Caprio J** (1995): In vivo responses of single olfactory receptor neurons in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Neurophysiol* 73: 172-177
- Karlson P, Lüscher M** (1959): Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183: 55-56
- Karlsson A**: Signaling for color change in melanophores and a biosensor application. Med. Diss. Linköping, Schweden 2001
- Kennedy C** (2000): The discovery and development of P2 receptor subtypes. *J Auton Nerv Syst* 81: 158-163
- Kennedy C, Leff P** (1995): How should P2X purinoceptors be classified pharmacologically? *Trends Pharmacol Sci* 16: 168-174
- Kennedy C, Herold CL, Qi A, Harden TK, Nicholas RA** (2000): ATP, an agonist at the rat P2Y4 receptor, is an antagonist at the human P2Y4 receptor. *Mol Pharmacol* 57: 926-931
- Kerr DIB, Krantis A** (1979): A new class of ATP antagonists (Abstract). *Proc Aust Physiol Pharmacol Soc* 10: 156
- Keverne EB** (1999): The vomeronasal organ. *Science* 286: 716-720
- Korsching SI** (2001): Odor maps in the brain: spatial aspects of odor representation in the sensors surface and olfactory bulb. *Cell Mol Life Sci* 58: 520-530
- Kramer M** (1933): Untersuchungen über die Sinnesleistungen und das Orientierungsverhalten von *Xenopus laevis* Daudin. *Zool Jahrb Abt Allg Zool Physiol* 52: 629-676
- Lambrecht G** (2000): Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362: 340-350

---

**Lambrecht G, Braun K, Damer M, Ganso M, Hildebrandt C, Ullmann H, Kassack MU, Nickel P** (2002): Structure-activity relationship of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as P2 receptor antagonists. *Curr Pharm Des* 8: 2371-2399

**Landis BN, Hummel T, Hugentobler M, Giger R, Lacroix J S** (2003): Ratings of overall olfactory function. *Chem Senses* 28: 691-694

**Leffingwell JC and Associates** (2002): Olfaction - A review; Olfaction - Page 2.  
<http://www.ChemWeb.com>, <http://www.leffingwell.com/olfaction.htm>

**Leinders-Zufall T, Brennan P, Widmayer P, Prashanth-Chandramani S, Maul-Pavicic A, Jager M, Li XH, Breer H, Zufall F, Boehm T** (2004): MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* 306: 1033-1037

**Lindström K, Ongini E, Fredholm BB** (1996): The selective A2A receptor antagonist SCH 58261 discriminates between two different binding sites for [<sup>3</sup>H]-CGS 21680 in the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 354: 539-541

**Lipmann F, Kaplan NO, Novelli GD, Tuttle LC, Guirard BM** (1950): Isolation of coenzyme A. *J Biol Chem* 186: 235-243

**Liu Y, Wakakura M** (1998): P1-/P2-purinergic receptors on cultured rabbit retinal Müller cells. *Jpn J Ophthalmol* 42: 33-40

**Lustig KD, Shiao AK, Brake AJ, Julius D** (1993): Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*: 5113-5117

**Mackay-Sim A, Johnston A, Owen C, Burne THJ** (2006): Olfactory Ability in the Healthy Population: Reassessing Presbyosmia. *Chem Sens* 31: 763-771

**Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB** (1999): Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96: 713-723

---

**Manzini I, Schild D** (2003a): cAMP-independent olfactory transduction of amino acids in *Xenopus laevis* tadpoles. *J Physiol* 551: 115-123

**Manzini I, Schild D** (2003b): Multidrug resistance transporters in the olfactory receptor neurons of *Xenopus laevis* tadpoles. *J Physiol* 546: 375-385

**Manzini I, Schild D** (2004): Classes and narrowing selectivity of olfactory receptor neurons of *Xenopus laevis* tadpoles. *J Gen Physiol* 123: 99-107

**Manzini I, Peters F, Schild D** (2002a): Odorant responses of *Xenopus laevis* tadpole olfactory neurons: a comparison between preparations. *J Neurosci Methods* 121: 159-167

**Manzini I, Rössler W, Schild D** (2002b): cAMP-independent responses of olfactory neurons in *Xenopus laevis* tadpoles and their projection onto olfactory bulb neurons. *J Physiol* 545: 475-484

**Marjorie AM** (2001): Our Chemical Senses: 1. Olfaction.  
<http://faculty.washington.edu/chudler/chems.html>

**Martinson J, Muren A** (1963): Excitatory and inhibitory effects of vagus stimulation on gastric motility in the cat. *Acta Physiol Scand* 57: 309-316

**Mellert TK, Getchell ML, Sparks L, Getchell TV** (1992): Characterization of the immune barrier in human olfactory mucosa. *Otolaryngol Head Neck Surg* 106: 181-188

**Meredith M** (1994): Chronic recording of vomeronasal pump activation in awake behaving hamsters. *Physiol Behav* 56: 345-354

**Mezler M, Konzelmann S, Freitag J, Rossler P, Breer H** (1999): Expression of olfactory receptors during development in *Xenopus laevis*. *J Exp Biol* 202: 365-376

**Mombaerts P** (1999): Seven-transmembrane proteins as odorants and chemosensory receptor. *Science* 286: 707-711

- 
- Moran, DT, Jafek BW, Rowley JC** (1991): The vomeronasal (Jacobson's) organ in man: ultrastructure and frequency of occurrence. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39: 545-552
- Mori K, Nagao H, Yoshihara Y** (1999): The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* 286: 711-715
- Müller H**: Die Aale: Lebenszyklus und wirtschaftliche Bedeutung der Wanderfische zwischen Meer und Süßwasser, 1. Auflage, Ziemsen-Verlag, Wittenberg-Lutherstadt 1975
- Mumenthaler M, Bassetti C, Daetwyler C**: Neurologische Differenzialdiagnostik, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005
- Nagao H, Yamaguchi M, Takahash Y, Mori K** (2002): Grouping and representation of odorant receptors in domains of the olfactory bulb sensory map. *Mikrosc Res Tech* 58: 168-175
- Neal MJ, Cunningham JR, Dent Z** (1998): Modulation of extracellular GABA levels in the retina by activation of glial P2X-purinoceptors. *Br J Pharmacol* 124: 317-322
- Nezlin LP, Schild D** (2000): Structure of the olfactory bulb in tadpoles of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res* 302: 21-29
- Nezlin LP, Heermann S, Schild D, Rössler W** (2003): Organization of Glomeruli in the Main Olfactory Bulb of *Xenopus laevis* Tadpoles. *J Comp Neurol* 464: 257-268
- Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G** (1998): P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>3</sub> receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17: 3016-3018
- Nieuwkoop PD, Faber J**: Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin), 3. Auflage, North Holland Company, Amsterdam 1994
- Nörenberg W, Illes P** (2000): Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol* 362: 324-339

---

**North RA** (2002): Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013-1067

**North RA, Surprenant A** (2000): Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 563-580

**Nuttall LC, el-Moatassim C, Dubyak GR** (1993): Expression of the pore-forming P2Z purinoreceptor in *Xenopus* oocytes injected with poly (A) + RNA from murine macrophages. *Mol Pharmacol* 44: 93-101

**Oikawa T, Suzuki K, Saito TR, Takahashi KW, Taniguchi K** (1998): Fine structure of three types of olfactory organs in *Xenopus laevis*. *Anat Rec* 252: 301-310

**Okano M, Takagi SF** (1974): Secretion and electrogenesis of the supporting cell in the olfactory epithelium. *J Physiol* 242: 353-370

**Pannicke T, Fischer W, Biedermann B, Schädlich H, Grosche J, Faude F, Wiedermann P, Allgaler C, Illes P, Burnstock G, Reichenbach A** (2000): P2X<sub>7</sub> receptors in Müller glial cells from the human retina. *J Neurosci* 20: 5965-5972

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

**Pinching AJ, Powell TPS** (1971b): The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9: 347-377

**Pinching AJ, Powell TPS** (1971c): The neuropil of the periglomerular region of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9: 379-401

**Plattig KH**: Spürnasen und Feinschmecker: Die chemischen Sinne des Menschen (Taschenbuch), 1. Auflage, Springer, Berlin 1995

**Prinz zu Waldeck C, Frings S** (2005): Die molekularen Grundlagen der Geruchswahrnehmung. Wie wir riechen, was wir riechen. *Biol Unserer Zeit* 5: 302-310

- 
- Rafols JA, Getchell TV** (1983): Morphological relations between the receptor neurons, sustentacular cells and Schwann cells in the olfactory mucosa of the salamander. *Anat Rec* 206: 87-101
- Ralevic V, Burnstock G** (1998): Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413-492
- Rawson NE, Eberwine J, Dotson R, Jackson J, Ulrich P, Restrepo D** (2000): Expression of mRNAs encoding for two different olfactory receptors in a subset of olfactory receptor neurons. *J Neurochem* 75: 185-195
- Reiff MI, Essock-Vitale SM** (1985): Hospital influences on early infant-feeding practices. *Pediatrics* 76: 872-879
- Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB** (1993): A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 73: 597-609
- Ricken S, Leipziger J, Greger R, Nitschke R** (1998): Simultaneous measurements of cytosolic and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transients in HT29 cells. *J Biol Chem* 273: 34961–34969
- Ronnett GV, Moon C** (2002): G proteins and olfactory signal transduction. *Annu Rev Physiol* 64: 189-222
- Saltzberg JMR, Garvey KA, Keirstead SA** (2003): Pharmacological characterization of P2Y receptor subtypes on isolated tiger salamander Müller cells. *Glia* 42: 149-159
- Sato K, Suzuki N** (2001): Whole-cell response characteristics of ciliated and microvillous olfactory receptor neurons to amino acids, pheromone candidates and urine in rainbow trout. *Chem Senses*: 26: 1145-1156
- Schiffmann SS** (1983a): Taste and smell in disease (first of two parts). In: Mechanisms of disease; hrsg. v. Epstein FH, *N Engl J Med* 308: 1275-1279

---

**Schiffmann SS** (1983b): Taste and smell in disease (second of two parts). In: Mechanisms of disease; hrsg. v. Epstein FH, *N Engl J Med* 308: 1337-1343

**Schild D** (1985): A computer-controlled device for the application of odours to aquatic animals. *J Elektrophysiol Techn* 12: 71-79

**Schild D** (1996): Laser scanning microscopy and calcium imaging. *Cell Calcium* 19: 281-296

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

**Schild D, Manzini I** (2004): Cascades of response vectors of olfactory receptor neurons in *Xenopus laevis* tadpoles. *Eur J Neurosci* 20: 2111-2123

**Schmidt RF, Schaible HG**: Neuro- und Sinnesphysiologie, 5. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg 2006

**Schmidt RF, Thews G, Lang F**: Die Physiologie des Menschen, 27. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2000

**Schmidt RF, Lang F, Heckmann M**: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, 30. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 2007

**Schwartz GA, Kostek C, Ahmad N Dibble C, Pays L, Püschel AW** (2000): Semaphorin 3A is required for guidance of olfactory axons in mice. *J Neurosci* 20: 7691-7697

**Scott JW** (1986): The olfactory bulb and central pathways. *Experientia* 42: 223-232.

**Seidler NW, Jona I, Vegh M, Martonosi A** (1989): Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 264: 17816-17823

**Simmonds MP** (1985): African Clawed toad survey. *Br Herpetol Soc Bull* 13

---

**Simon J, Webb TE, King BF, Burnstock G, Barnard EA** (1995): Characterization of a recombinant P2Y receptor. *Eur J Pharmacol* 291: 281-289

**Sorensen PW** (1992): Hormonally derived sex pheromones in goldfish: a model for understanding the evolution of sex pheromone systems in fish. *Biol bull* 183: 173-177

**Strotmann J** (2001): Targeting of olfactory neurons. *Cell Mol Life Sci* 58: 531-537

**Süskind P** : Das Parfum: Die Geschichte eines Mörders, 40. Auflage, Diogenes Verlag, Zürich 1994

**Suzuki Y, Takeda M, Farbmann AI** (1996): Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bulbectomy. *J Comp Neurol* 376: 509-517

**Thorborg JV** (1952): The use of *Xenopus laevis*, *Bufo bufo*, and *Rana esculenta* as test animals for gonadotrophic hormones. V. Experience with the Gali-Mainini spermination reaction as a routine test for pregnancy diagnosis and quantitative assay of chorionic gonadotrophin. *Acta Endocrinol* (Copenh.) 11: 147-155

**Tinsley RC, Loumont C, Kobel HR**: Geographical distribution and ecology. In: The biology of *Xenopus*, Clarendon Press, Oxford 1996: 35-59

**Vassar R, Ngai J, Axel R** (1993): Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* 74: 309-318

**Verkhatsky A, Steinhauser C** (2000): Ion channels in glial cells. *Brain Res Rev* 32: 380-412

**Vogler C, Schild D** (1999): Inhibitory and excitatory responses of olfactory receptor neurons of *xenopus laevis* tadpoles to stimulation with amino acids. *J Exp Biol* 202: 997-1003

**Von Kügelgen I** (2006): Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 110: 415-432

---

**Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock K G, Barnard EA** (1993): Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett* 324: 219-225

**Weiss G**: Die Struktur des Geruchsorgans und des Telencephalons beim südafrikanischen Krallenfrosch, *Xenopus laevis* (Daudin), und ihre Veränderungen während der Metamorphose. Diss. rer. nat., Regensburg 1986

**Westfall TD, Kennedy C, Sneddon P** (1996): Enhancement of sympathetic purinergic neurotransmission in the guinea-pig isolated vas deferens by the novel ecto-ATPase inhibitor ARL 67156. *Br J Pharmacol* 117: 867-872

**Wildman SS, Unwin RJ, King BF** (2003): Extended pharmacological profiles of rat P2Y<sub>2</sub> and rat P2Y<sub>4</sub> receptors and their sensitivity to extracellular H<sup>+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions. *Br J Pharmacol* 140: 1177-1186

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

**Wysocki CJ, Lepri JJ** (1991): Consequences of removing the vomeronasal organ. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39: 661-669.

**ZEISS-Broschüre**: Das konfokale Laser Scanning Mikroskop. Zeiss, Jena 2003

**Zimmermann H** (2000): Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 299-309

**Zimmermann H** (2006): Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp* 276: 113-130

**Aus dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichung:**

**Hassenklöver T, Kurtanska S, Bartoszek I, Junek S, Schild D, Manzini I (2008):**  
Nucleotide-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in sustentacular supporting cells of the olfactory epithelium. *Glia* 56: 1614-1624

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mir durch ihre Zeit und ihre fachliche Unterstützung diese Arbeit ermöglicht haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Schild für die Vergabe des Themas dieser Arbeit und für die Möglichkeit, diese in seinem Institut durchführen zu können.

Mein besonderer Dank geht an meinen Betreuer Dr. Ivan Manzini, der mich nicht nur bei der Auswertung der Ergebnisse meiner Arbeit unterstützt hat, sondern auch stets seine fachliche Hilfe bei wissenschaftlichen Fragestellungen und der Fertigstellung der Dissertationsschrift gewährt hat.

Mein Dank geht natürlich auch an alle anderen Mitarbeiter der Abteilung Molekulare Neurophysiologie der Georg-August-Universität Göttingen für ihre fachliche Unterstützung und freundliche Aufnahme in ihrem Team während meiner Zeit als Doktorandin.

## Lebenslauf

Am 12. Januar 1979 wurde ich in der Hauptstadt der slowakischen Republik Bratislava geboren. Von 1985 bis 1993 besuchte ich die Grundschule in Bratislava. In der Zeit von 1986 bis 1993 war ich auch in der Volkshochschule in Bratislava für das Fach bildende Kunst eingeschrieben. Ab dem Jahr 1993 besuchte ich das Gymnasium Metodova in Bratislava, das ich im Mai 1997 mit dem Abitur und der Endnote „sehr gut“ abgeschlossen habe.

Von 1997 bis 1998 habe ich meine Französisch-Kenntnisse aus dem Gymnasium in dem Institute de France in Bratislava verbessert. Von 1998 bis 2006 studierte ich an der medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen in dem Fach Zahnheilkunde. Das Studium habe ich im Dezember 2006 mit dem Staatsexamen mit der Endnote „gut“ beendet. Zwischen dem Januar 2007 und dem Juli 2007 widmete ich mich der Auswertung der Versuche meiner Dissertation. Von August 2007 bis September 2008 arbeitete ich als Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. Lechte und Fr. Recke in Einbeck. In dem Zeitraum von Oktober 2008 bis Dezember 2009 war ich ebenfalls als eine Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Hr. Vandr  und Fr. Vandr -Hormes in Göttingen tätig. Seit Januar 2010 bin ich als Wohnsitz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Prof. Dr. Weiss in Himberg b. Wien in Österreich beschäftigt.