

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

Das purinerge System im vorderen Telenzephalon der Kaulquappe von *Xenopus laevis* und
dessen Beteiligung an der Verarbeitung von Duftstoffantworten

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

vorgelegt von
Anna Peters
aus Recklinghausen

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

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

Ko-Referent/ -in: Prof. Dr. Susanne Lutz

Drittreferent/ -in: Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 15.03.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1 Der Aufbau des olfaktorischen Systems	5
1.1.1 Das olfaktorische Epithel	5
1.1.2 Der olfaktorische Bulbus	7
1.1.3 Neurogenese im olfaktorischen Bulbus.....	9
1.2 Das purinerge System.....	11
1.2.1 Purinrezeptoren im Nervensystem.....	14
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	16
1.4 Veröffentlichung der Ergebnisse.....	17
2. Material und Methoden.....	18
2.1 Das Versuchstier <i>Xenopus laevis</i>	18
2.1.1 Aufzucht und Haltung.....	19
2.1.2 Aufbau und Entwicklung des olfaktorischen Systems der <i>Xenopus laevis</i> - <i>Kaulquappe</i>	20
2.1.3 Der olfaktorische Bulbus der <i>Xenopus laevis</i> - <i>Kaulquappe</i>	22
2.2 Die Präparate	24
2.2.1 Die Präparation des olfaktorischen Bulbus.....	24
2.2.2 Die <i>nose-to-brain</i> -Präparation	25
2.2.3 BrdU-Injektion und Färbung der Zellkerne.....	26
2.2.4 Immunhistochemische Technik: Klassifizierung der Rezeptoren	27
2.3 Durchführung der Versuche	29
2.3.1 Ca ²⁺ -Imaging und Datenauswertung	29
2.3.2 Das Applikationssystem	30
2.3.3 Versuchsalgorithmus.....	32
2.4 Reagenzien und Badlösungen.....	34
2.4.1 Fura-2	34
2.4.2 Badlösung	35
2.4.3 Aminosäuren.....	35
2.4.4 Purinerge Agonisten.....	36
2.5.5 Purinerge Antagonist Suramin.....	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Der zelluläre Aufbau des vorderen Telenzephalons.....	38
3.2 Nukleotid-induzierte Ca ²⁺ -Anstiege	40
3.3 Immunhistochemische Identifikation einzelner Purinrezeptortypen	42

3.4 Die Beteiligung des purinergen Systems des OB an der bulbären Verarbeitung olfaktorischer Stimuli bei <i>Xenopus laevis</i>	44
4. Diskussion	48
4.1 Die Experimente im Kontext der Forschung	49
4.2 Analyse der Ergebnisse	52
5. Zusammenfassung.....	56
6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	58
7. Abkürzungsverzeichnis	59
8. Literaturverzeichnis.....	61

1. Einleitung

Wie jedes Lebewesen ist auch der Mensch auf eine kommunikative Auseinandersetzung mit seiner Umwelt angewiesen. Dies geschieht in erster Linie über die verschiedenen Sinnessysteme, mit denen er sich in seiner Umgebung orientiert, die ihn Gefahren wahrnehmen lassen, emotionale Bindungen vermitteln und die Nahrungssuche erlauben. Zu den klassischen Sinnen gehören das visuelle, das akustische, das gustatorische, das taktile und das olfaktorische System. Jedem System ist ein Organ zugeordnet, mit dem die Sinnesreize aufgenommen und über neuronale Bahnen zu höher gelegenen Zentren weitergeleitet werden.

Die Weiterleitung der Sinnesreize und der Aufbau der neuronalen Zellen sowie ihre Regeneration und Ausreifung wird über verschiedene Signalsysteme gesteuert. Eines dieser Systeme ist das purinerge System, welches im gesamten menschlichen Organismus in unterschiedlicher Ausdehnung und Zusammensetzung vorhanden zu sein scheint (Ralevic und Burnstock 1998).

In Tierexperimenten zeigt sich ein breites purinerges System auch in den olfaktorischen Organen. Bei der Kaulquappe von *Xenopus laevis*, deren Anatomie im Weiteren noch genauer beschrieben wird, konnten P2Y₂/P2Y₄-Rezeptoren an Stützzellen des olfaktorischen Epithels (OE) nachgewiesen werden. Zudem werden Purinrezeptoren von Basalzellen des OE exprimiert und scheinen an dessen Zellumsatz beteiligt zu sein (Hassenklöver et al. 2008; Hassenklöver et al. 2009). Diesen Hinweisen auf das Vorliegen eines purinergen Systems im gesamten olfaktorischen System der Kaulquappe von *Xenopus laevis* folgend, wird in dieser Arbeit die Anatomie und die Funktion des purinergen Systems in Bezug auf den olfaktorischen Bulbus dargestellt.

Das olfaktorische System ist eines der ältesten phylogenetischen Sinnessysteme und für viele Spezies von existentieller Bedeutung. Schon primitive Organismen konnten verschiedene chemische Substanzen detektieren, diese Fähigkeit half ihnen bei der Nahrungssuche, der Orientierung in der Umwelt und dem Reproduktionsverhalten.

Auch beim Menschen spielt das olfaktorische System in seinem Alltagsleben sowie in der Medizin eine wichtige Rolle. In der bewussten Wahrnehmung scheinen jedoch der visuelle und der akustische Sinn zu dominieren. So zeigt sich die Relevanz des olfaktorischen Systems vor allem dann, wenn es zu Störungen in der Geruchswahrnehmung kommt.

Hierbei sind Infektionen der oberen Atemwege neben Störungen des sinunasalen Systems (z. B. Polypen) und dem Schädel-Hirn-Trauma die häufigste Ursache, wobei es bei Infekten der oberen Atemwege am häufigsten zu vollständig reversiblen Störungen kommt (Deems et al. 1991; Temmel et al. 2002).

Ohne funktionierenden Geruchssinn verändern sich das emotionale Erleben, die Gedächtnisleistungen und die Geschmackswahrnehmung, auch das Immunsystem wird negativ beeinflusst. Die stärkste Ausprägung ist hierbei der komplette Verlust der Geruchswahrnehmung (Anosmie), die für den Betroffenen eine große Einschränkung bedeutet. So zeigen verschiedene Studien, dass die meisten Patienten Probleme beim Zubereiten von Speisen und beim Erkennen von verdorbenen Lebensmitteln haben. Auch über Stimmungsschwankungen und Probleme in der Partnerschaft wird von über 60 % der Patienten berichtet (Miwa et al. 2001; Temmel et al. 2002).

Häufig treten Geruchsstörungen auch als Komorbidität bei anderen Systemerkrankungen auf. So kommt es bei neurodegenerativen Erkrankungen zu einem teilweisen Verlust des Geruchssinns, wie zum Beispiel beim Morbus Parkinson. Die neuronale nigrostriatale Denervation scheint bei dieser Erkrankung mit dem Verlust des Geruchssinns zu korrelieren (Wong et al. 2010). Der Geruchssinn ist hier als Screening-Parameter für die Frühdiagnostik sogar ähnlich gut geeignet wie die deutlich kostenintensivere Dopamintransporter-Szintigraphie (Deeb et al. 2010).

Die Relevanz des olfaktorischen Systems zeigt sich außerdem in seiner Präsenz im menschlichen Genom. Man kann beim Menschen von ca. 1000 Genen ausgehen, die olfaktorische Rezeptoren codieren, wovon wiederum ca. 300 aktiv sind. Dabei ist der Mensch in der Lage, tausende verschiedene Gerüche wahrzunehmen, ohne sie jedoch alle benennen zu können (Axel 1995).

Im Vergleich zu anderen Sinnessystemen ist das Wissen über dieses wichtige System, besonders was Anatomie und Funktion angeht, aber begrenzt. Jedoch

gelangen in den letzten Jahren enorme Fortschritte im Verständnis der Teilvorgänge des Riechens, von den Transduktionsmechanismen der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) im OE bis hin zur zentralnervösen Verarbeitung von olfaktorischen Reizen, wie z. B. im olfaktorischen Bulbus (OB). Dies wurde besonders durch die Entdeckung der olfaktorischen Rezeptorgene im Jahre 1990 vorangetrieben (Buck und Axel 1991).

1.1 Der Aufbau des olfaktorischen Systems

In den folgenden Abschnitten wird insbesondere auf die Struktur und die Funktion des OB beim Säugetier eingegangen. Aber auch die vorgeschalteten Strukturen, das olfaktorische Epithel (OE) und der Nervus olfactorius, werden erläutert.

Mit der Atemluft inhalierte Duftstoffmoleküle erreichen über die Nase die Zilien der ORN. Dort binden sie an die OR und führen zu einer Änderung des Membranpotentials der ORN, auch Transduktion genannt. Diese wird in eine Abfolge von Aktionspotentialen umcodiert (Transformation), die über den ersten Hirnnerv - den Nervus olfactorius - in den olfaktorischen Bulbus weitergeleitet wird. Beim Menschen zieht der Nervus olfactorius hierbei durch eine knöcherne Struktur, die sogenannte Lamina cribosa. Der olfaktorische Bulbus ist die dem Hirn vorgelagerte erste Verschaltungsstelle innerhalb des olfaktorischen Systems. Von dort gelangen die Geruchsinformationen über den Traktus olfactorius zu den höher gelagerten Hirnstrukturen (Shipley und Ennis 1996).

1.1.1 Das olfaktorische Epithel

Das olfaktorische Epithel, welches beim Menschen in der obersten der drei Nasenmuscheln lokalisiert ist, steht in direktem Kontakt mit den inhalierten Odorantien (Lledo et al. 2005). Es besteht vor allem aus drei Zelltypen: den olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN), den Stützzellen und den Basalzellen (siehe Abbildung 1.1). Es ist stets von einer dünnen Schleimschicht bedeckt, die zur Lösung von Odorantien aus der Atemluft nötig ist. Die Schleimschicht wird von den intraepithelialen Bowman'schen Drüsen gebildet und soll sogenannte Odorantien-

bindende Proteine (OBP) enthalten, die an die Duftstoffe binden und so den Transport zu den Zilien ermöglichen (Pelosi 1996).

Die Stützzellen sind im gesamten olfaktorischen Epithel anzufinden. Es handelt sich um zylinderförmige Zellen mit apikal gelegenem Zellkern. Sie betten die ORN ein und haben vielfältige Funktionen. Über exprimierte Cytochrom P450-Enzyme haben sie eine Entgiftungsfunktion, phagozytieren tote und sterbende Zellen und sind an der mechanischen und chemischen Isolierung der ORN beteiligt (Chen et al. 1992; Ding und Coon 1988; Engström et al. 1989; Suzuki et al. 1996).

Die ORN sind bipolare Neurone mit einem kleinen Zellkörper. Ein einzelner Dendrit zieht in Richtung Riechhöhle und endet in einem dendritischen Kolben, von dem aus mehrere Zilien in die olfaktorische Mukosa (OM) ragen (Schild und Restrepo 1998). Das Axon eines ORN zieht beim Menschen mit den Axonen der anderen ORN gebündelt als paariger Nervus olfactorius durch die Lamina cribosa zum OB, der in Abschnitt 1.1.2 genauer beschrieben wird. Hier findet eine erste Verarbeitung der ankommenden Signale statt. Vom OB gelangen die Informationen über den Traktus olfactorius lateralis in höher gelegene Hirnstrukturen des zentralen Nervensystems (Shipley und Ennis 1996; Lledo et al. 2005; Elsaesser und Paysan 2007).

Ebenfalls zum olfaktorischen System gehört das Vomeronasalorgan (VNO). Seine Hauptfunktion scheint in der Detektion von Pheromonen zu liegen, welche einen Einfluss auf das Sexual- und Sozialverhalten von Säugern nehmen. Im Gegensatz zu früheren Ansichten kann man heute davon ausgehen, dass das VNO nicht nur Pheromone detektiert, sondern auch andere Geruchsentitäten erkennen kann (Trinh und Storm 2004; Zufall und Leinders-Zufall 2007). Es ist nicht bei allen Menschen nachweisbar und scheint nur geringen Einfluss auf das Verhalten des Menschen zu haben (Monti-Bloch et al. 1994; Leinders-Zufall et al. 2000; Meredith 2001). Lokalisiert ist das VNO in einer knorpeligen Hülle an der Basis der Nasenhöhle und endet mit einem Schlauch im Nasenseptum (Keverne 1999). Seine Neurone projizieren in den akzessorischen olfaktorischen Bulbus (Brennan und Zufall 2006).

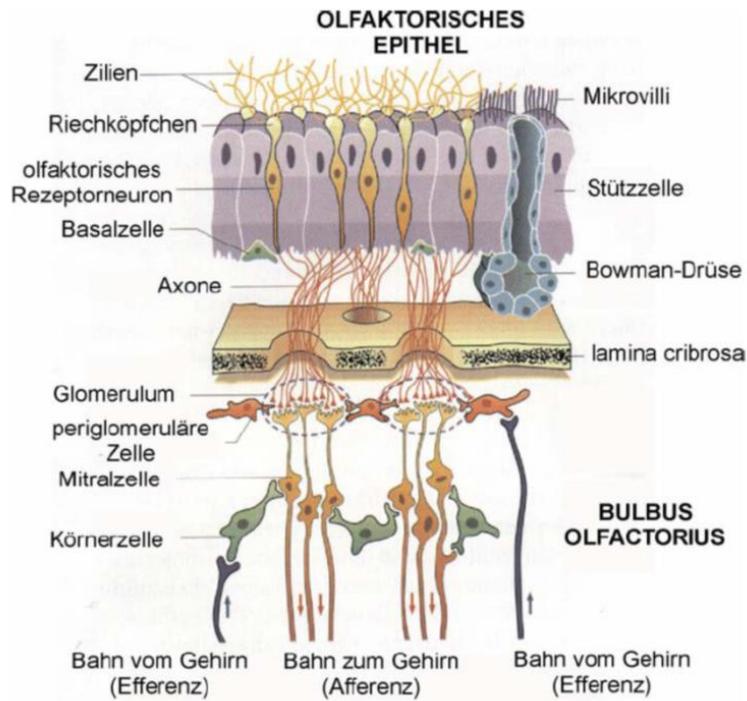


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau des olfaktorischen Epithels.

Modifiziert nach Hatt (2000), Seite 322, Abb. 17-5, die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.

1.1.2 Der olfaktorische Bulbus

Der olfaktorische Bulbus lässt sich in den Bulbus olfactorius principalis (BOP) und den Bulbus olfactorius accessorius (BOA) unterteilen. Die Zellen des BOP verarbeiten die Informationen aus dem olfaktorischen Epithel, welche – wie in Abschnitt 1.1.1 beschrieben – über den Nervus olfactorius hierher gelangen. Es handelt sich hierbei um die erste Schaltstelle zwischen den Odorantien aus der Umwelt und höher gelegenen Hirnzentren. Als Derivat des Vorderhirnbläschens ist im OB eine laminaire Schichtung erkennbar, die sechs verschiedene Schichten unterscheiden lässt. Nach rostral beginnt er mit der Nervenschicht, auf diese folgt die glomeruläre Schicht, darauf die externe plexiforme Schicht, die Mitralzellschicht, die interne plexiforme Schicht und schließlich die Körnerzellschicht (Shipley und Ennis 1996).

Die Nervenschicht, in der die Axone der ORN in den OB ziehen, ist eine insgesamt zellarme Schicht (Shiple und Ennis 1996). Neben den Axonen der ORN, die hier gebündelt in Form von 10 bis 15 Filae olfactoriae aus der Lamina cribosa in die vordere Schädelhöhle ziehen, finden sich in der Nervenschicht noch Gliazellen.

Auf sie folgt direkt die glomeruläre Schicht. Hier gehen die Axone der ORN synaptische Verbindungen mit den Primärdendriten der Mitralzellen und mit den Dendriten der Interneurone über den Transmitter Glutamat ein (Lledo et al. 2005). Dadurch entstehen kugelige Gebilde, die als Glomeruli bezeichnet werden. Die Glomeruli sind von einer dünnen Hülle aus Astrozytenzellkörpern und sogenannten juxtglomerulären Zellen umgeben. Diese lassen sich drei Typen zuordnen: Kleine *periglomerular cells*, etwas größere *external tufted cells* und die *short axon cells* (Pinching und Powell 1971). Die Größe der Glomeruli variiert zwischen 80 und 160 µm. Beispielsweise wird die Anzahl bei Kaninchen und Mäusen zwischen 2000 und 3000 Glomeruli pro Bulbus angegeben (Allison und Warwick 1949). Mehrere tausend ORN konvergieren in einem Glomerulum auf wenige Mitralzellen (Allison 1953; Brunjes und Borror 1983; Royet et al. 1988; White 1972).

Die externe plexiforme Schicht besteht in erster Linie aus den Dendriten der Mitral-, Büschel- und Körnerzellen. Es gibt wenige neuronale Zellen; dies sind hauptsächlich Büschelzellen, die nach ihrer Lokalisation in der externen plexiformen Schicht *external-*, *middle-* und *deep tufted cells* genannt werden (Shiple und Ennis 1996). Sie können eine variable Anzahl an Dendriten aufweisen. Meistens ist jedoch nur ein apikaler Dendrit vorhanden, der, ähnlich zu den Mitralzellen, in ein olfaktorisches Glomerulum zieht. Im Unterschied zu den Mitralzellen konnte bei den Büschelzellen aber beobachtet werden, dass gelegentlich auch zwei oder drei Dendriten einer Zelle zu verschiedenen Glomeruli Kontakt aufnehmen. Man nimmt an, dass die sekundären Dendriten der Büschelzellen reziproke Synapsen mit den apikalen Dendriten von Körnerzellen bilden (Shepherd 1972). Außerdem gibt es noch die van-Gehuchten-Zellen, deren zwei bis drei dicken Axone in der Umgebung von Mitral- und Büschelzellen enden (Shiple und Ennis 1996).

Die Somata der Mitralzellen bilden die vierte Schicht des OB. Ihre typische Form erhalten sie durch die Anordnung der beiden Sekundärdendriten und des bereits

genannten apikalen Primärdendriten. Ihren Namen haben die Mitralzellen dadurch erhalten, dass ihre Form einer bischöflichen Kopfbedeckung, der Mitra, ähnelt. Die Sekundärdendriten verlaufen waagrecht im OB und bilden mit den Körnerzellen Synapsen. Die Axone der Mitralzellen ziehen im Traktus olfactorius zusammen mit den Büschelzellen zu höheren Hirnzentren.

Die Körnerzellen sind wichtige Interneurone des olfaktorischen Systems und bilden nach der internen plexiformen Schicht die sechste Schicht. Körnerzellen liegen in Gruppen aus 3 bis 5 Zellen, in denen sie über gap-junctions verschaltet sind. So bilden sie eine funktionelle Einheit. Sie besitzen keine Axone, sondern sogenannte dendritische Dornen, über die sie mit Mitralzellen und Büschelzellen über reziproke, dendrodendritische Synapsen kommunizieren (Price und Powell 1970a, 1970b; Rall et al. 1966). Die Mitralzellen erregen über NMDA- und AMPA-Rezeptoren die Körnerzellen mittels Glutamat. Glutamat führt bei den Körnerzellen zu einer Erregung, in deren Folge die Körnerzellen über GABA eine reziproke dendrodendritische Hemmung der Mitralzellen herbeiführen (Jahr und Nicoll 1980; Nowycky et al. 1981; Jahr und Nicoll 1982; Wellis und Kauer 1993).

Der akzessorische olfaktorische Bulbus (BOA) ist die Verarbeitungsstelle für Informationen aus dem Vomeronasalorgan (VNO). Das VNO ist ein am Boden der Nasenhöhle gelegenes Chemorezeptororgan. Seine Funktion liegt im Erkennen und Weiterleiten von Pheromonen. Die detektierten Informationen werden über den BOA und die Amygdala an den Hypothalamus weitergeleitet. Der BOA findet sich nicht bei allen Säugern, er fehlt zum Beispiel bei den Meerkatzen. Bei vielen Spezies ist der BOA in der Fetalperiode zunächst nachweisbar, bildet sich jedoch später komplett zurück, so zum Beispiel beim Altweltaffen und beim Menschen (Meisami und Bhatnagar 1998; Keverne 1999).

1.1.3 Neurogenese im olfaktorischen Bulbus

Im Gehirn von Säugetieren findet auch nach Abschluss der Hirnentwicklung adulte Neurogenese statt. Im Gegensatz zu niederen Vertebraten, bei denen in zahlreichen Hirnarealen neuronale Vorläuferzellen gefunden werden konnten, ist bei Säugetieren

die Neurogenese auf zwei Areale beschränkt. Sowohl in der subventrikulären Zone (SVZ) des lateralen Ventrikels als auch in der subgranulären Zone im Gyrus dentatus des Hippocampus konnten lebenslang funktionale neuronale Stammzellen nachgewiesen werden, beide Areale gehören zum Telenzephalon (Altmann und Das 1965; Kaplan und Hinds 1977; Gage 2000).

Bei Nagetieren und einigen Primaten wandern die neuronalen Vorläuferzellen in langen Ketten in Richtung des olfaktorischen Bulbus. Dieser kettenförmige Strom aus neuronalen Zellen ist zum Teil vom Astrozyten umgeben und wird rostraler migratorischer Strom (RMS) genannt (Lois et al. 1996; Pencea et al. 2001a, Pencea et al. 2001b; Alvarez-Buylla 1997).

Beim Menschen konnte der RMS nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den kettenartig wandernden Neuroblasten, findet sich beim Menschen eine bandartige, dem Seitenventrikel folgende Struktur aus Astrozyten. Diese proliferieren in vivo und verhalten sich bei In-vitro-Versuchen wie multipotente Vorläuferzellen (Sanai et al. 2004; Quinones-Hinojosa et al. 2006).

1.2 Das purinerge System

Purine und Pyrimidine sind über ihre Abkömmlinge in Form von Basen in den meisten Organsystemen in vielfältige physiologische und pathophysiologische Prozesse eingebunden. So sind sie u. a. bei Übertragungsvorgängen im Nervensystem beteiligt, spielen eine Rolle bei der Kontraktilität der glatten Muskulatur und bei der endogenen und exogenen Sekretion. Auch auf die Entstehung von Schmerz und auf die Immunantwort haben sie Einfluss (Burnstock 2002; Burnstock 2007; Ralevic und Burnstock 1998).

ATP als das bekannteste Nukleotid dient nicht nur als intrazellulärer Energielieferant. In den 1990er Jahren wurden auch extrazelluläre Funktionen gezeigt, die ATP und andere Nukleotide und Nukleoside (ADP, UTP, UDP, Adenosin) über eine Vielzahl von Purinrezeptoren wahrnehmen. Über die Purinrezeptoren agieren sie als extrazelluläre Botenstoffe. Diese Rezeptoren scheinen zu den vielfältigsten Rezeptorgruppen überhaupt zu gehören; man kann sie in nahezu allen Zellen, einschließlich neuronaler Zellen, finden, wodurch sie in allen Organsystemen vertreten sind (Burnstock und Knight 2004; Abbracchio et al. 2009). So finden sich auch im peripheren und zentralen Nervensystem in vielen Regionen Purinrezeptoren; neben dem Hippocampus, dem Neokortex, dem Kleinhirn und den Basalganglien auch in der olfaktorischen Mukosa und dem OB. Sie zeigen somit eine breite Verteilung in den Zentren des olfaktorischen Systems (Nörenberg und Illes 2000; Hegg et al. 2003; Gayle und Burnstock 2005).

In anderen Organsystemen ist das purinerge System hinsichtlich seiner Funktion bereits gut erforscht und zeigt eine breite klinische Relevanz. Zum Beispiel stimuliert ATP die Surfactant-Freisetzung aus Typ-II-Pneumozyten über einen P2Y-Rezeptor (Gilfillan et al. 1983; Rice und Singleton 1986; Rice und Singleton 1987; Rice 1990). Am Herzen nehmen Purinrezeptoren Einfluss auf die Kontraktilität und die Frequenzregulation (Vahlensieck et al. 1996).

Das purinerge System als Gesamtheit der Rezeptoren und ihrer Liganden in Form von Nukleosiden und Nukleotiden wurde erstmalig von Burnstock definiert (Burnstock 1972; Burnstock 1978). Die verschiedenen Nukleotide und Nukleoside ATP, ADP, UTP, UDP und Adenosin stellen eine ubiquitäre Gruppe extrazellulärer Liganden dar. Ihre Rezeptoren teilte Burnstock zunächst nur in P1- und P2-Rezeptoren ein. Die spätere Unterteilung der P1- und P2-Rezeptoren in jeweils mehrere Subtypen wird im Folgenden beschrieben.

P1-Rezeptoren werden durch Adenosin aktiviert, sie sind G-Protein gekoppelt und lassen sich aufgrund molekularer, biochemischer und pharmakologischer Unterschiede vier Subklassen zuordnen: A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃. Sie sind prinzipiell an eine Adenylatzyklase gekoppelt. Dabei sind die A₁ und A₃ über eine G_{i/o} Protein- α -Untereinheit negativ gekoppelt. A_{2A} und A_{2B} sind über G_s positiv an eine Adenylatzyklase gebunden.

Es wurden verschiedene Agonisten und Antagonisten für die P1-Rezeptoren gefunden. Sie alle haben bis auf wenige Modifikationen strukturelle Ähnlichkeiten mit Adenosin (Ralevic und Burnstock 1998; Schwiebert et al. 2003).

Die P2-Rezeptoren lassen sich nach ihrer Signalkaskade in die P2X- und P2Y-Rezeptorgruppen unterteilen. Die Nummerierung erfolgt chronologisch nach ihrer Klonierung. Lücken in der Nummerierung ergeben sich durch zunächst fälschlich als Purinrezeptoren bezeichnete Rezeptoren oder solche, die bisher nur bei Nicht-Säugetier-Spezies kloniert werden konnten (Khakh et al. 2001; Ralevic und Burnstock 1998; Webb et al. 1996).

Die P2X-Rezeptoren sind selektive Ionenkanäle, sie binden ausschließlich ATP als endogenen Liganden und werden über diesen aktiviert. Da sie für Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ durchlässig sind, eignen sie sich besonders für eine schnelle Signalübertragung und eine lokale Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration. Es sind inzwischen sieben verschiedene P2X-Untereinheiten (P2X₁ - P2X₇) bekannt, diese bilden entweder Homooligomere oder Heterooligomere aus (Ralevic und Burnstock 1998; Schwiebert et al. 2003).

Die P2Y-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit ATP, ADP, UTP, UDP und UDP-Glukose als endogene Liganden. Die einzelnen Subtypen, von denen mittlerweile acht verschiedene bekannt sind (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂,

P2Y₁₃ und P2Y₁₄) unterscheiden sich in ihrer Ligandenbindefähigkeit deutlich (Ralevic und Burnstock 1998; Schwiebert et al. 2003). Bei vielen der P2Y-Rezeptor-Subtypen fehlen potente und selektive synthetische Agonisten und Antagonisten. Im Folgenden sind Beispiele genannt, bei denen bereits potente Agonisten und Antagonisten identifiziert wurden. Ein P2Y₈-Rezeptor mit einem breiten Spektrum an Agonisten konnte bei Embryonen von *Xenopus laevis* nachgewiesen werden (Bogdanov et al. 1997). Der P2Y₁-Rezeptor konnte bei Menschen, Ratten, Mäusen, Kühen, Truthähnen und *Xenopus* kloniert werden. Als Agonist ist ADP hier ATP überlegen, noch wirksamer sind die 2-Methylthioderivate, v. a. 2-MeSADP. Der P2Y₁₂-Rezeptor ist ein bei Mensch, Ratte und Maus gut untersuchter Rezeptortyp mit ADP als natürlichem Agonisten; ein potenter Antagonist ist das 5`Triphosphat-Derivat AR-C69931MX, Cangrelor genannt (Abbraccio et al. 2006; Burnstock 2007).

Als Antagonist wurde in dieser Arbeit vor allem Suramin verwendet. Suramin ist selektiv als Antagonist von P2-Rezeptoren gegenüber anderen Rezeptoren, diskriminiert jedoch nicht zwischen P2X- und P2Y-Rezeptoren und ist innerhalb der P2-Rezeptoren nicht universell (Dunn und Blakeley 1988).

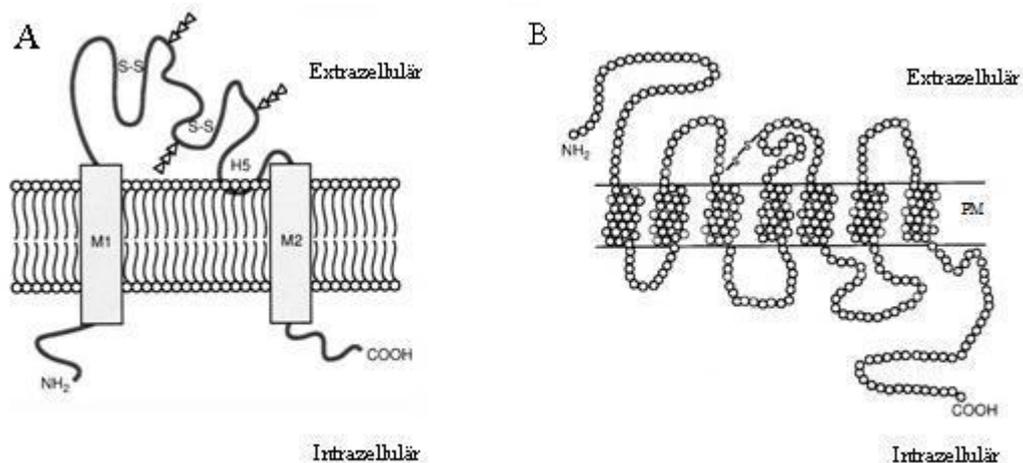


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der P2-Rezeptoren.

A: P2X-Rezeptor (ligandengesteuerter Ionenkanal); **B:** P2Y-Rezeptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor). PM: Plasmamembran (Abb.1.2 A: modifiziert nach Brake et al. 1994, S.521, mit freundlicher Genehmigung des Nature-Verlags; Abb. 1.2 B: modifiziert nach Barnard et al. 1994, S. 69, mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags).

1.2.1 Purinrezeptoren im Nervensystem

In Abschnitt 1.2 der Einleitung wurde die Gesamtheit des purinergen Systems mit seinem breiten Vorkommen und seinen vielfältigen Funktionen beschrieben. In diesem Abschnitt soll nun das purinerge System im zentralen und peripheren Nervensystem, insbesondere im olfaktorischen System von *Xenopus laevis*, beschrieben werden. Wie genannt, ist das purinerge System in fast allen Strukturen des ZNS und PNS vertreten, so auch in der olfaktorischen Mukosa und dem OB (Kanjhan et al. 1999; Nörenberg und Illes 2000; Hegg et al. 2003; Gayle und Burnstock 2005). In diesen beiden Regionen sind die Funktion und der anatomische Aufbau des purinergen Systems bisher jedoch kaum erforscht.

Die Purine und ihre Rezeptoren agieren im Nervensystem als Neuromodulatoren und Neurotransmitter. So sind sie an der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Apoptose, der Kontrolle von Sekretionsvorgängen sowie der Genexpression beteiligt (Burnstock 2006).

Zur Signalübertragung wird ATP aus Nervenzellen mithilfe von synaptischen Vesikeln ausgeschüttet und dann enzymatisch bis zum Adenosin abgebaut. Dieses wird dann über Nukleosidtransporter in Nervenendigungen aufgenommen (Zimmermann 2000; Zimmermann 2006).

Neuere Studien zeigen eine Expression von Purinrezeptoren nicht nur in Nervenzellen, sondern auch in allen Hauptklassen von Gliazellen, inklusive Schwannzellen im PNS und Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia im ZNS (Burnstock 2003; Burnstock 2006; Fields und Burnstock 2006). Dies lässt auf ein interzelluläres Signalsystem schließen, das Gliazellen und Neurone über ATP und Purinrezeptoren funktionell verbindet (Fields und Stevens 2000). ATP kann z. B. in Astrozyten, Oligodendrozyten, Stützzellen des olfaktorischen Systems und Schwannzellen Ca^{2+} -Wellen über Aktivierung von P2Y- und P2X-Rezeptoren auslösen (Fiacco und Mc Carthy 2006; Rieger et al. 2007; Butt 2006; Rouse und Robitaille 2006). Das purinerge System hat demnach alles, was ein ideales interzelluläres Kommunikationssystem im Nervensystem besitzen muss.

		Transduktions- mechanismen	Agonisten	Antagonisten
P2X	P2X ₁	intrinsischer Kationen-Kanal Na ⁺ und Ca ²⁺	α,β-meATP=ATP=2-MeSATP,Lβ,γ-meATP (schnelle Desensibilisierung)	TNP-ATP, IP5I, NF023, NF449
	P2X ₂	intrinsischer Ionen-Kanal (speziell Ca ²⁺)	ATP≥ATPγS≥2-MeSATP>>α,β meATP (pH + Zink-sensitiv)	Suramin, isoPPADS, RB2, NF770, NF279
	P2X ₃	intrinsischer Kationen-Kanal	2-MeSATP≥ATP≥α,β,-meATP≥Ap ₄ A (schnelle Desensibilisierung)	TNP-ATP, PPADS, A317491, NF110, Ip5I, Phenolrot
	P2X ₄	intrinsischer Ionen-Kanal (außer Ca ²⁺)	ATP>>α,β-meATP, CTP, Ivermectin Potenzierung	TNP-ATP (schwach), BBG (schwach), Phenolphthalein
	P2X ₅	intrinsischer Ionen-Kanal	ATP>>α, β-meATP, ATPγS	Suramin, PPADS, BBG
	P2X ₆	intrinsischer Ionen-Kanal	funktioniert nicht als Homomultimer	–
	P2X ₇	intrinsischer Kationen-Kanal und eine große Pore mit verlängerter Aktivität	BzATP>ATP≥2-MeSATP>>α, β meATP	KN62, KN04, MRS2427, OATP Coomassie-Brillant-Blau
P2Y	P2Y ₁	G _q /G ₁₁ ; PLC-β-Aktivierung	2-MeSADP= ADPβS>2-MeSATP = ADP>ATP, MRS2365	MRS2179, MRS2500, MRS2279, PIT
	P2Y ₂	G _q /G ₁₁ und ev.Gi ; PLC-β-Aktivierung	UTP=ATP, UTPγS, INS 37217, INS 365	Suramin > RB2, ARC126313
	P2Y ₄	G _q /G ₁₁ und ev.Gi; PLC-β-Aktivierung	UTP≥ATP, UTPγS, INS 37217	RB2 > Suramin
	P2Y ₆	G _q /G ₁₁ ; PLC-β-Aktivierung	UDP>UTP>>ATP, UDPβS, IDP	MRS2578
	P2Y ₁₁	G _q /G ₁₁ und G _s ; PLC-β-Aktivierung	ARC67085MX> BzATP≥ATPgS>ATP	Suramin > RB2, NF157, 5'- AMPS
	P2Y ₁₂	G _{i/o} ; Hemmung der Adenylatzyklase	2-MeSADP≥ADP>>ATP	CT50547, AR-C69931MX, INS49266, AZD6140, PSB0413, ARL66096, 2-MeSAMP
	P2Y ₁₃	G _{i/o}	ADP=2-MeSADP>>ATP=2-MeSATP	MRS2211, 2-MeSAMP
	P2Y ₁₄	G _q /G ₁₁	UDP Glukose = UDP-Galaktose	–

Tabelle 1.1: Charakteristika von P2X- und P2Y-Rezeptoren

(modifiziert nach Burnstock 2003 und Burnstock 2007). Abkürzungen: BBG: (engl.) Brilliant Blue Green; BzATP: 2-&3-O-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP; CTP: Cytosin Triphosphat; Ip5I: di-Inosin Pentaphosphat; 2-Me-SADP: 2-Methylthio ADP; 2-MeSATP: 2-Methylthio ATP; PLC: Phospholipase C; RB2: (engl.) reactive blue 2

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Diese Dissertation beschäftigt sich mit dem purinergen System im olfaktorischen Bulbus der Kaulquappe von *Xenopus laevis* in den Stadien 51 - 54 (Nieuwkoop und Faber 1994). Als Methoden nutzte ich Ca^{2+} -Imaging, ein BrdU-Inkorporationsassay und Antikörper-Färbungen. Hierbei soll zunächst der Aufbau des Telenzephalons visualisiert werden, anschließend sollen purinerge Rezeptoren klassifiziert und im dritten Schritt die Funktion des purinergen Systems im OB dargestellt werden.

Im ersten Schritt wird die mithilfe von BrdU-Inkorporationsassays stattfindende Neurogenese im Bereich der PVZ im vorderen Telenzephalon von *Xenopus laevis* visualisiert. Hiermit kann das Ausmaß der Neurogenese ebenso beurteilt werden wie die Grenze zwischen der PVZ und dem OB.

Die Bedeutung des purinergen Systems wurde besonders im olfaktorischen Bulbus bisher kaum erforscht. Das Vorhandensein eines purinergen Systems im OB von *Xenopus laevis* konnte in unserem Labor durch direkte Applikation von ATP auf akute Bulbschnitte bereits nachgewiesen werden. Die Zellen zeigten hierbei klare Reaktionen. Da in dieser Arbeit ein Bezug auf jene Ergebnisse genommen wird, wurden zur Verifizierung Ca^{2+} -Imaging-Experimente durchgeführt, um eine Reaktion auf Agonisten für purinerge Rezeptoren nachzuweisen. Anschließend strebte ich die Identifikation einzelner Rezeptoren mithilfe von AK-Assays an. In Bezug auf *Xenopus laevis* gibt es bisher kaum veröffentlichte Arbeiten, die sich diesem Thema widmen. Bei Mäusen hingegen konnten bereits in Astrozyten des olfaktorischen Bulbus Purinrezeptoren nachgewiesen werden (Doengi et al. 2008). Zudem wurden weitere purinerge Rezeptoren und mit diesen assoziierte Nukleotid-abbauende Enzyme nachgewiesen (Vulchanova et al. 1996). In weiteren Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass neuronale Zellen aus der subventrikulären Zone P2Y-Rezeptoren exprimieren (Mishra et al. 2006). Hogg et al. ist es 2004 gelungen, neuronale Vorläuferzellen in der subgranulären Zone durch Nukleotide zu stimulieren.

Im dritten Schritt wird mithilfe der *nose-to-brain*-Präparation und Ca^{2+} -Imaging der Frage nachgegangen, ob das purinerge System in die Weiterleitung oder Verarbeitung olfaktorischer Stimuli eingebunden ist.

In diesen drei Schritten soll erstmalig ein Einblick in die Lokalisation, die Klassifizierung und die Funktion des purinergen Systems im OB der Kaulquappe von *Xenopus laevis* gegeben werden.

1.4 Veröffentlichung der Ergebnisse

Ein Teil der hier beschriebenen Experimente wurde 2010 veröffentlicht, einige Abbildungen (Abb.: 3.1; 3.2; 3.3 und 3.4) und Aussagen dieser Arbeit decken sich daher mit denen der Veröffentlichung (mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlages):

Hassenklöver T, Schulz P, Peters A, Schwartz P, Schild D, Manzini I (2010): Purinergic receptor-mediated Ca^{2+} signaling in the olfactory bulb and neurogenic area of the lateral ventricles. *Purinergic Signaling* **6**, 429–445

2. Material und Methoden

2.1 Das Versuchstier *Xenopus laevis*

Für die Experimente, die dieser Dissertation zugrunde liegen, wurden die Larven des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (Stadien 51 - 54 nach Nieuwkoop und Faber 1994) verwendet.

Xenopus laevis lässt sich innerhalb der Klasse der Amphibia (Amphibien) und der Ordnung der Anura (Froschlurche) der Familie der Pipidae (Zungenlosen) zuordnen. Bei *Xenopus laevis* handelt es sich um eine sehr widerstandsfähige Spezies. Als im Süßwasser lebendes Tier kann er auch längere Trockenperioden überstehen, indem er von stehenden in fließende Gewässer wechselt oder nur Regenwasser für den Feuchtigkeitshaushalt nutzt.

Xenopus laevis hat mittlerweile weltweite Verbreitung sowohl in Versuchslaboren als auch in der Aquaristik und der freien Wildbahn gefunden. Dort richtet er große ökologische Schäden an, indem er andere Tiere aus ihren ökologischen Nischen verdrängt. Während die Larven von *Xenopus laevis* Algen als Futter benötigen, ist das erwachsene Tier ein Allesfresser (Omnivor), der sich hauptsächlich von lebenden oder toten Arthropoden ernährt. Dabei benutzen die Erwachsenen wie auch die Larven ihren Geruchssinn zur Nahrungssuche (Kramer 1933).

Als Versuchstier zeichnet *Xenopus laevis* besonders seine unkomplizierte Haltung und seine hohe Nachkommenschaft von bis zu 500 Tieren pro Paarungsvorgang aus. Er lässt sich als poikilothermes Tier in Leitungswasser bei Raumtemperatur halten. So entfällt auch eine komplizierte Thermoregulation bei den Experimenten.

Durch das Fehlen von knöchernen Strukturen bei den Larven eignet sich *Xenopus laevis* besonders für die im Folgenden beschriebene *nose-to-brain*-Präparation. Im Gegensatz zu den erwachsenen Tieren ziehen die Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone nicht durch eine knöcherne Lamina cribosa. So kann ein durchgehender Gewebeschnitt der olfaktorischen Mukosa und des OB mit unbeschädigtem N. olfactorius erstellt werden.

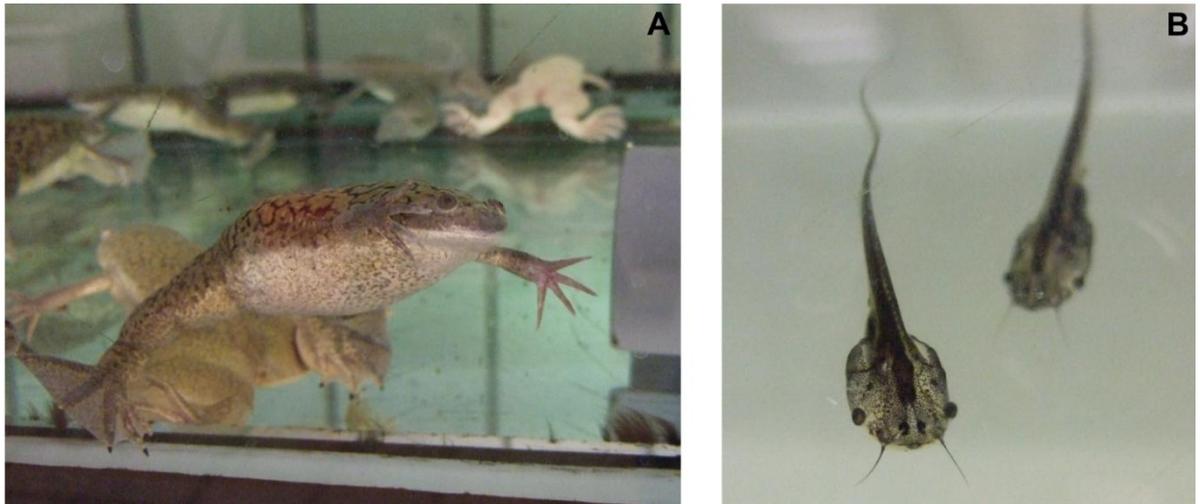


Abb. 2.1: Das Versuchstier *Xenopus laevis* (mit freundlicher Genehmigung von Thomas Hassenklöver).

A: Das erwachsene Tier

B: Die Larve im Stadium 51

2.1.1 Aufzucht und Haltung

Haltung, Aufzucht und Präparation der Tiere erfolgte nach den Tierschutzbestimmungen der Ethikkommission der Universität Göttingen.

Die fortpflanzungsfähigen Tiere stammen aus eigener Zucht und können ohne besondere Zusätze in Trinkwasser bei Raumtemperatur gehalten werden. Sie erhielten zweimal wöchentlich Pondsticks (Tetra Pond, Melle, Deutschland) und Stücke von Rinderherzen aus örtlichen Metzgereibetrieben.

Die Tiere wurden vier Tage lang bei strenger Dunkelheit und Ruhe nach Geschlechtern getrennt gehalten. Am fünften Tag wurden die männlichen Frösche mit Injektionen von humanem Choriongonadotropin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in den dorsalen Lymphsack zur Fortpflanzung angeregt. Am sechsten Tag erhielt auch das Weibchen eine Injektion mit 200 µl des humanen Choriongonadotropins, sechs Stunden später erfolgte beim Weibchen noch einmal eine Injektion mit 600 µl und beim Männchen eine Injektion mit 200 µl. Die Tiere wurden zur Anästhesie vor der Injektion in Eiswasser betäubt.

Die Zuchttiere wurden dann über Nacht zur Paarung und Ablaihung in einem Becken, wieder in Abwesenheit von Licht und Lärm, untergebracht. Nach dem

Schlüpfen der Larven wurden diese in einem separaten Becken bei Raumtemperatur in Leitungswasser gehalten. Der Wasseraustausch erfolgte kontinuierlich, die Larven wurden mit Algenfutter gefüttert (Dohse Aquaristik, Bonn, Deutschland). Waren die Larven in den gewünschten Stadien, konnten sie mit einem Kescher gefangen und bis zum Beginn der Experimente in einem mit Aquariumwasser gefüllten Behälter mehrere Stunden aufbewahrt werden.

2.1.2 Aufbau und Entwicklung des olfaktorischen Systems der *Xenopus laevis*-Kaulquappe

Das olfaktorische System von *Xenopus laevis* besteht aus der Nase mit der olfaktorischen Mukosa, dem Nervus olfactorius, dem OB mit seinen sechs Schichten und den höher geschalteten neuronalen Bahnen.

Im Rahmen der Entwicklung entsteht das olfaktorische Epithel aus zwei Plakoden des kranialen Ektoderms. Diese sind ab Stadium 23 vom umgebenden Ektoderm zu unterscheiden (Nieuwkoop und Faber 1994) und bilden jeweils eine neuronale Schicht und eine nicht-neuronale Schicht.

Die Zellen der neuronalen Schicht beginnen ab Stadium 26 Richtung Körperoberfläche zu wandern. Dabei zieht ein apikaler Zellfortsatz Richtung Körperoberfläche und erreicht diese im Stadium 28. Er entspricht nach Struktur und Ultrastruktur dem apikalen Dendriten eines olfaktorischen Neurons. Ab Stadium 28 zieht ein basaler Zellfortsatz Richtung Telenzephalon, dieser entspricht der Struktur nach dem Axon eines olfaktorischen Neurons. Einige Zellen der neuronalen Schicht bilden keine Zellfortsätze und wandern nicht aus; sie bilden die Basalzellen (Klein und Graziadei 1983).

Die Zellen der nicht-neuronalen Schicht bilden ab Stadium 27 die Stützzellen des olfaktorischen Epithels. Ab Stadium 30 erreichen die Axone der olfaktorischen Neurone den olfaktorischen Bulbus, dessen Entwicklung im nachfolgenden Abschnitt beschrieben wird (Byrd und Burd 1991). Bis zur fortgeschrittenen Metamorphose dient das olfaktorische System als sogenannte „Wassernase“. Hier kommen olfaktorische Rezeptorneurone (ORN) vor, die Klasse I-OR exprimieren,

welche durch wasserlösliche Odorantien stimuliert werden. Mittlerweile geht man davon aus, dass auch Klasse II-OR exprimiert werden und aktivierbar sind (Freitag et al. 1998; Mezler et al. 2001).

Ab Stadium 49 – 59 bilden sich in der Haupthöhle die Klasse II-OR, die am Ende die einzigen hier exprimierten OR darstellen. Währenddessen entsteht die Nebenhöhle, welche ausschließlich Klasse I-OR exprimiert und die Funktion der Haupthöhle als „Wassernase“ ablöst (Reiss und Burd 1997; Mezler et al. 1999).

Die Nase des erwachsenen Tieres lässt sich nun in die jeweils paarig angelegte Haupthöhle, die Nebenhöhle und das Vomeronasalorgan (VNO, Jacobson'sches Organ) gliedern. Jede dieser Höhlen wird von einem Epithel aus olfaktorischen Rezeptorneuronen, Stützzellen und Basalzellen ausgekleidet.

Die Haupthöhle steht nach vorne mit der äußeren Umwelt in Verbindung, nach hinten grenzt sie an die Rachenhöhle. Aus diesem Grund wird die Haupthöhle als Luftnase bezeichnet, während die mit Wasser gefüllte Nebenhöhle auch Wassernase genannt wird (Föske 1934; Altner 1962). Da *Xenopus laevis* sowohl im Wasser als auch an der Luft lebt, muss er sich in beiden Elementen über Gerüche orientieren können.

Es gibt zwei Typen von ORN, die entweder Zilien oder Mikrovilli tragen (Hansen et al. 1998). Sie exprimieren, wie beschrieben, je nach Lokalisation unterschiedliche olfaktorische Rezeptoren (OR). In der Haupthöhle (PC) lokalisierte ORN exprimieren Klasse II-OR (Freitag et al. 1995), diese werden durch volatile Odorantien stimuliert. Die ORN der Nebenhöhle exprimieren Klasse I-OR, welche durch wasserlösliche Odorantien stimuliert werden.

Die in der Haupthöhle liegenden Klasse II-OR tragen Zilien, welche ständig von einer Schleimschicht umhüllt sind. Die Zusammensetzung der Schleimschicht scheint eine wichtige Rolle bei den Transduktionsmechanismen in den ORN zu spielen (Schild und Restrepo 1998). Die vtilen Odorantien müssen, bevor sie an die ORN binden können, in dieser Schleimschicht gelöst werden. Die Informationen werden dann in den dorsomedialen OB zur ersten Verarbeitung weitergeleitet.

Nicht alle ORN exprimieren olfaktorische Rezeptoren der Klasse I oder II: Bei Säugetieren wurde eine kleine Gruppe von Rezeptoren für Spurenamine (*trace amine-associated receptors* = TAAR) in einer Subpopulation von ORN

nachgewiesen. Diese ORN exprimieren keine OR, die exprimierten TAAR agieren wahrscheinlich als Rezeptoren für Pheromone (Munger et al. 2009).

Die Nebenhöhle liegt lateral der Haupthöhle und ist von dieser durch eine ventrale Grenzfalte (Plica terminalis) getrennt. Außerdem ist der dorsale Teil der Nebenhöhle von einer Knorpelhöhle umgeben und zwischen Haupt- und Nebenhöhle finden sich Knorpelanteile (Föske 1934). Diese Grenzfalte ermöglicht eine vollständige und dichte Abgrenzung der Haupthöhle von der Nebenhöhle. Die räumliche Trennung dient dem Erkennen von in Wasser oder Luft gelösten Odorantien.

Die ORN der Nebenhöhle ziehen in den ventrolateralen Teil des OB (Hofmann und Meyer, 1991; Meyer et al. 1996).

Das VNO, das ebenfalls ständig mit Wasser gefüllt ist, liegt kaudal-medial der Nebenhöhle (Föske 1934; Altner 1962). Es dient dem Erkennen von Pheromonen und ist wie die Nebenhöhle immer mit Wasser gefüllt. Für das Erkennen der Pheromone besitzt es eigene vomeronasale Rezeptoren, die sich von den Klasse I-OR und Klasse II-OR unterscheiden. Sie ähneln den V1- und V2-Rezeptoren, die bei Säugetieren nachgewiesen werden konnten und in den akzessorischen Bulbus olfactorius projizieren (Freitag et al. 1995; Mezler et al 1999; Yang et al 2005).

2.1.3 Der olfaktorische Bulbus der *Xenopus laevis*-Kaulquappe

In den Experimenten wurden Larven der Stadien 51 - 54 benutzt, die zu diesem Zeitpunkt noch ausschließlich im Wasser leben.

Der olfaktorische Bulbus entwickelt sich aus einer Region der Neuralrohrs, die direkt unterhalb der oben genannten Plakoden liegt. Die Differenzierung beginnt, wenn in Stadium 30 die ersten Axone den entstehenden OB erreichen. Ab Stadium 36 ist der Nervus olfactorius sichtbar (Nieuwkoop und Faber 1994). Die in der Einleitung beschriebenen Schichten des olfaktorischen Bulbus sind auch bei *Xenopus laevis* ab Stadium 44 sichtbar und entwickeln sich weiter, bis sie ab Stadium 48 nicht mehr von den Schichten des erwachsenen Bulbus zu unterscheiden sind (Byrd und Burd 1991). In der Haupthöhle werden schon ab dem Stadium 49 die Rezeptoren zur Detektion von luftlöslichen Odorantien ausgebildet, diese projizieren ab Stadium 54 in den dorsalen Bulbus (Freitag et al. 1995; Mezler et al. 1999).

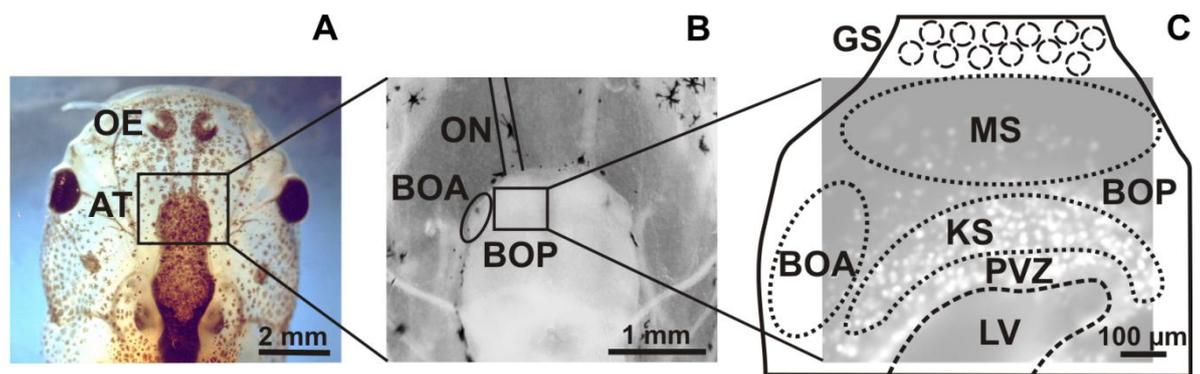
Analog zu der in der Einleitung beschriebenen Schichtung lassen sich im ventralen OB einzelne Glomeruli darstellen, im dorsalen Teil hingegen laufen die Fasern der ORN durcheinander, ohne einzelne erkennbare Glomeruli zu bilden (Nezlin und Schild 2000).

Die Körnerzellschicht reicht als tiefste Schicht bis an die lateralen Ventrikel des Telenzephalons. Die Ventrikel ragen bei der Larve von *Xenopus laevis* weit in das vordere Telenzephalon hinein (Endo et al. 2007). Sie sind von einer Zellschicht umgeben, der bereits erwähnten periventrikulären Zone (PVZ). Es ist bekannt, dass diese Zone neuronale Stammzellen enthält und dass hier Neurogenese stattfindet (Filoni et al. 1995). Die PVZ und der OB stehen also bei *Xenopus laevis* in direktem Kontakt.

2.2 Die Präparate

2.2.1 Die Präparation des olfaktorischen Bulbus

Für die Ca^{2+} -Imaging-Experimente am OB wurde ein Gewebeblock des vorderen Telenzephalons angefertigt. Die Tiere wurden artgerecht in Leitungswasser, bei Raumtemperatur und reichlich Platz gehalten. Vor der Gewebepräparation wurde mittels eines Eisbades eine Bewegungsunfähigkeit erreicht. Nachdem das Tier ausreichend betäubt war, erfolgte die Fixation auf einem Silikonbett mittels Insektennadeln jeweils links und rechts des Kopfes. Anschließend wurde das Tier mit einem schnellen Schnitt durch ein Skalpell dekapitiert. Es wurde ein Gewebeblock, der den posterioren Anteil des Nervus olfactorius und den anterioren Anteil des Telenzephalons enthält, mit dem Skalpell ausgeschnitten. Der Gewebeblock wurde auf die Metallplatte eines Gewebeschniders (VT 1000 S, Leica, Bensheim, Deutschland) geklebt und horizontal in 120-130 μm dicke Präparate geschnitten. Diese wurden in einer Badlösung (siehe Reagenzien) aufbewahrt und anschließend mit 50 μM Fura-2/AM (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) gefärbt. Der fertige Gewebeblock wurde dann in eine modifizierte Petrischale mittels einer Pipette überführt. Die Petrischalen (Durchmesser 35 mm, Beckton, Dickinson and Company, Plymouth, UK) wurden im Boden mit einem Loch (8 x 20 mm) versehen, welches wiederum mit einem Deckgläschen (21 x 26 mm) (Schütt, Göttingen) von unten verschlossen wurde. So bildete sich eine Vertiefung, in welcher der Gewebeblock lag.



**Abb. 2.2: Die Präparation des OB (modifiziert nach Czesnik et al. 2003, S. 114)
Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.**

A: Der Kopf einer *Xenopus laevis* Larve in der Aufsicht von oben. **B:** Das vordere Telenzephalon in einer Ausschnittvergrößerung. **C:** Der olfaktorische Bulbus mit den verschiedenen Zellschichten. **Abk.:** OE = olfaktorisches Epithel, AT: anteriores Telenzephalon, ON = *olfactory nerve*, BOA = Bulbus olfactorius accessorius, BOP: Bulbus olfactorius principalis, GS: glomeruläre Schicht, MS: Mitralzellschicht, KS: Körnerzellschicht, PVZ: Periventrikuläre Zone, LV: lateraler Ventrikel

2.2.2 Die *nose-to-brain*-Präparation

Die Vorbereitungen liefen analog zu der Präparation des OB ab. Der aus dem Kopf herausgetrennte Gewebeblock enthielt das OE, die beiden Nervi olfactorii und den OB. Mittels eines Klebers (Cyanoacrylat, Henkel KgaA, Düsseldorf, Deutschland) wurde der Block auf der beweglichen Schneideplatte des Gewebeschniders (VT 1000 S, Leica, Bensheim, Deutschland) fixiert. Dabei wurde besonders darauf geachtet, den Block so zu fixieren, dass alle Strukturen sich möglichst in einer Ebene befinden. Die Schneideplatte wurde dann in dem mit Ringerlösung gefüllten Becken des Gewebeschniders platziert. Die Schnitte erfolgten in mehreren Abstufungen von rostral her, um möglichst kranial der Pigmentschicht des Nervus olfactorius zu bleiben. Die Pigmentschicht des Bulbus wurde entfernt, um die Lage der Ventrikel abschätzen zu können. Dann wurde ein letzter horizontaler Schnitt auf Höhe des unteren Drittels des Ventrikels gesetzt. Dabei musste der Nervus olfactorius unbedingt geschont werden, damit während der Messung Antworten auf olfaktorische Reize, die über die Nase in den Bulbus projiziert wurden, im OB gemessen werden konnten.

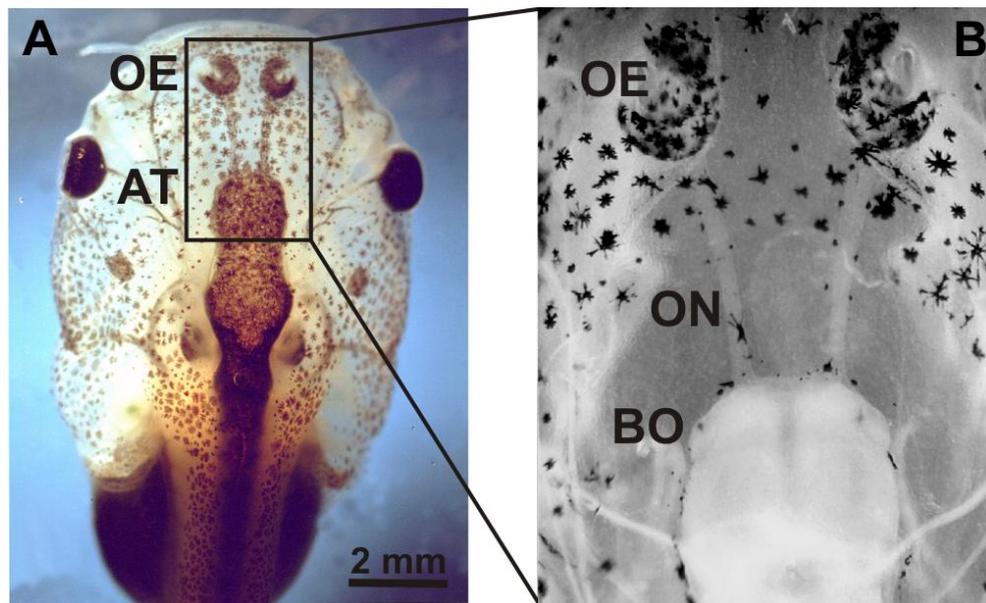


Abbildung 2.3: Das *nose-to-brain*-Präparat (modifiziert nach Czesnik et al. 2003, S. 114). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

A: Der Gewebekblock für die *nose-to-brain*-Präparation ist markiert. **B:** Gewebeschnitt der *nose-to-brain*-Präparation. **Abk.:** AT: anteriores Telenzephalon, OE: olfaktorisches Epithel, ON: *olfactory nerve*, BO: Bulbus olfactorius.

2.2.3 BrdU-Injektion und Färbung der Zellkerne

Die Larven von *Xenopus laevis* wurden in Eiswasser anästhesiert, um ihnen anschließend 200 μ M BrdU intraperitoneal zu injizieren. Dies geschah mit einer handelsüblichen Injektionsnadel für subkutane Injektionen in die Bauchhöhle. BrdU ist ein Thymidin-Analogon und wirkt als synthetisches Nukleosid. Die Einstichwunde wurde mit einem Gewebekleber (Braun, Melsungen, Deutschland) verschlossen. Nach 16 bis 18 Stunden wurde erneut BrdU injiziert, um das BrdU-Level möglichst konstant hoch zu halten. Nach 24 Stunden wurden die Tiere wie beschrieben getötet und ein Gewebekblock, der den vorderen Gehirnabschnitt und den hinteren Teil des Nervus olfactorius enthält, entnommen. Dieser Gewebekblock wurde zur Fixation in 4 %-igem Formaldehyd für eine Stunde inkubiert, anschließend mit PBS ausgewaschen und im Kühlschrank in PBS aufbewahrt. Für die weitere Bearbeitung wurden die Schnitte in 5 %-ige Agarose gebettet und 75 μ m dicke Schnitte mit dem Vibrotom (Leica) gefertigt. Nach zweimaligem Auswaschen mit

PBST für jeweils zehn Minuten wurden die Schnitte für 45 Minuten in 1 N HCl bei 37 °C inkubiert und anschließend mit PBS neutralisiert, indem sie dreimal fünf Minuten ausgewaschen wurden. Unspezifische Bindungen wurden mit 2 %-igem *normal-goat-serum* (NGS; ICN, Aurora, Ohio, USA) in PBST bei einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur geblockt. Die Schnitte wurden dann bei 37 °C eine Stunde lang mit dem primären Antikörper (AK) [anti-BrdU (B2531, monoklonaler Mausantikörper, Sigma) verdünnt in PBST und 2 %-igem NGS (1:1000)] inkubiert. Mit PBS wurde der primäre AK gründlich ausgewaschen und die Schnitte im sekundären AK *goat-anti-mouse* (Molecular Probes) in einer Verdünnung von 1:250 in PBS mit 2 %-igem NGS zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Der sekundäre AK wurde gründlich mit mehrfachen Wechseln von PBS ausgewaschen.

Anschließend wurde der Schnitt für 15 Minuten in Propidium-Iodid zur Färbung der Zellkerne inkubiert und nach fünfmaligem Auswaschen in PBS auf Glasträger übertragen und mit einem Mounting-Medium (Daco, Hamburg, Deutschland) fixiert. Die Präparate wurden am Laserscanning-Mikroskop (LSM 510/Axiovert 100) begutachtet und ausgewertet.

2.2.4 Immunhistochemische Technik: Klassifizierung der Rezeptoren

Um die purinergen Rezeptoren immunhistochemisch zu klassifizieren, wurden – wie bereits beschrieben – in Formaldehyd fixierte Gehirne in PBS gewaschen, in 5 %-iger Agarose (Sigma) eingebettet und auf dem Vibratom (Sigma) in 70 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden in PBS, das 0,2 % Triton X-100 enthielt (PBST), gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation in 2 %-igem NGS mit PBST bei Raumtemperatur für eine Stunde blockiert. Die Gewebeschnitte wurden über Nacht bei 4 °C in primären AK inkubiert (anti rat P2X₁, anti rat P2X₂, anti rat P2X₄, anti rat P2X₇, anti rat P2Y₂, und anti rat P2Y₄ (1:200), gezüchtet in Kaninchen, Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Diese AK wurden in 2 %-igem NGS/PBST verdünnt. Die primären AK wurden mit PBS ausgewaschen und der Schnitt im sekundären AK (Alexa 488-konjugierter *goat-anti-rabbit*-AK, Molecular Probes) in einer Verdünnung von 1:250 in 1 %-igem

NGS/PBS für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre AK wurde dann ebenfalls durch mehrfaches Spülen mit PBS ausgewaschen. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgetragen und im Mounting-Medium (Daco) fixiert. Die Bilder wurden am LSM erstellt und ausgewertet (Zeiss LSM 510/Axiovert 100M, Jena, Deutschland). Die Spezifität der P2-Rezeptor-AK wurde zuvor durch den Produzenten getestet. An *Xenopus laevis* wurde die Testung durch die Hinzugabe eines immunisierenden Peptids (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) mit resultierender fehlender Bindung der AK an die Rezeptoren bestätigt.

2.3 Durchführung der Versuche

2.3.1 Ca²⁺-Imaging und Datenauswertung

Im Gegensatz zu Messungen, die am OE stattfinden und bei denen sich der Aufbau eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (CLSM) bewährt hat, wurden die Fluoreszenzaufnahmen an einem aufrechten Mikroskop (Axioskop, Zeiss, Göttingen, Germany) durchgeführt. Die Fluoreszenzbilder (Anregung bei 380 nm; Emission > 505 nm) wurden mittels einer CCD-Kamera (Charged-Coupled-Device, 16 bits/pixel, Micromax, Visitron, München, Germany) und eines speziell angefertigten Monochromators durchgeführt. Hierbei handelt es sich, im Gegensatz zu dem inversen konfokalen Set-up, um ein aufrechtes Set-up, um direkt die Applikation der Agonisten und Antagonisten auf die Bulbuszellen darstellen zu können.

Alle Pixel des abzubildenden Objekts werden simultan und mit einer hohen zeitlichen Auflösung aufgenommen, so dass es zu keiner Verschiebung kommt, wenn die Reaktion an verschiedenen Orten gleichzeitig stattfindet. Ein Vorteil gegenüber anderen Ca²⁺-sensitiven Farbstoffen ist unter anderem das geringe Bleichen des Farbstoffes während der Messung. Nachteilig sind die durch den fehlenden konfokalen Kontrast leicht verschwommen wirkenden Bilder, die nicht die gleiche Tiefenschärfe erreichen wie die Bilder eines CLSM.

Die Bilder wurden mit dem erworbenen Programm MATLAB (Math Works, Natick, USA) ausgewertet. Um einzelne Regionen besonderen Interesses (ROI = *region of interest*) hervorzuheben, wurde eine *pixel correlation map* erstellt, bei der die Korrelation des Fluoreszenz-Signals eines Pixels mit denen seiner Nachbarn kalkuliert wurde und in einer Graustufen-Skala dargestellt werden konnte.

Die Fluoreszenzänderungen für die einzelnen ROI wurden als $\Delta F/F$ angegeben und mit der Formel $\Delta F/F = (F_1 - F_2) / F_2$ berechnet. F_1 ist hierbei die über allen Pixeln gemittelte Fluoreszenz und F_2 die gemittelte Fluoreszenz derselben Pixel vor Applikation der Odorantien über die ersten acht Bilder. Dabei kann eine eindeutige Reaktion angenommen werden, wenn erstens die beiden ersten Fluoreszenzintensitäten $\Delta F/F$

(t_1) und $\Delta F/F$ (t_2) nach Applikation der Odorantien größer sind als die Grundfluoreszenz und wenn zweitens $\Delta F/F$ (t_2) > $\Delta F/F$ (t_1). Da manche Schnitte während des Versuches eine Änderung der Fluoreszenzintensität (Artefakte durch Bleichung) aufwiesen, wurden die $\Delta F/F$ -Werte durch eine nicht-lineare Anpassung korrigiert.

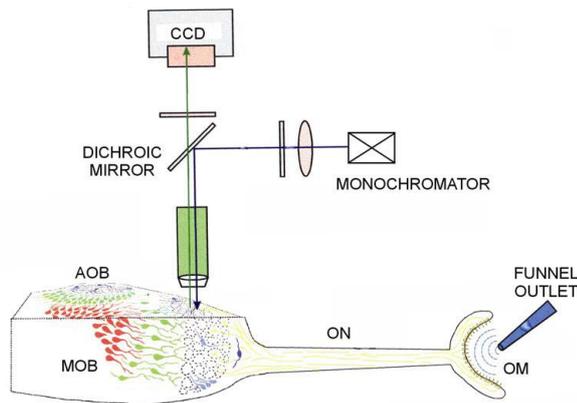


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des CCD-Imaging-Aufbaus (mit freundlicher Genehmigung von Ivan Manzini).

2.3.2 Das Applikationssystem

Während der Experimente an den *nose-to-brain*-Präparaten wurde eine Mischung aus 15 Aminosäuren als olfaktorischer Stimulus direkt auf die OM und purinerge Agonisten und Antagonisten auf den OB appliziert. Unter der Applikation von Duftstoffen und anderen Reagenzien auf den Gewebeblock kann es zu mechanischen und visuellen Störungen der Messung durch Strömungserscheinungen kommen. Um diese Faktoren zu minimieren, wurde ein Applikationssystem gewählt, das eine möglichst laminare Strömung ohne hohe Druckwellen bei Applikation von Duftstoffen und anderen gelösten Stoffen erzeugt.

Bei den Bulbuspräparaten wurden die Agonisten mittels eines Trichters in die Badlösung gespült, auch hier wurde auf eine möglichst laminare Strömung geachtet. Das Applikationssystem ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Es besteht aus einem vernickelten Trichter, der über eine 50-ml-Spritze einen kontinuierlichen Zulauf

erhält. Der Abfluss erfolgt über zwei Wege, einen höher gelegenen Überlauf und eine in der Kegelspitze des Trichters gelegene Applikationsnadel. Die Applikationsnadel lässt sich durch Bewegung des Trichters möglichst genau über der OM platzieren. Die Ringerlösung fließt, der Schwerkraft folgend, durch einen Silikonschlauch aus der Spritze in den Trichter und entweder über einen Überlauf in einen Abwurf oder über die Applikationsnadel in die Badlösung. Durch den Überlauf ist in dem Trichterbecken ein konstanter Flüssigkeitsspiegel erreichbar, so dass die Strömung über die Applikationsnadel laminar ist. So können auch Druckspitzen verhindert werden, wenn über eine 1-ml-Eppendorf-Pipette die Odorantien in gleichmäßiger Geschwindigkeit direkt in den Trichter gegeben werden. Die Badlösung lässt sich verändern, indem man mehrere 50-ml-Spritzen mit dem Trichter verbindet, diese mit einer Klemme verschließt und die jeweils gewünschte Badlösung öffnet.

Eine Absaugvorrichtung befand sich schräg neben der Applikationsnadel, um ein direktes Absaugen der applizierten Stoffe nach dem Einwirken auf die Mukosa zu gewährleisten.

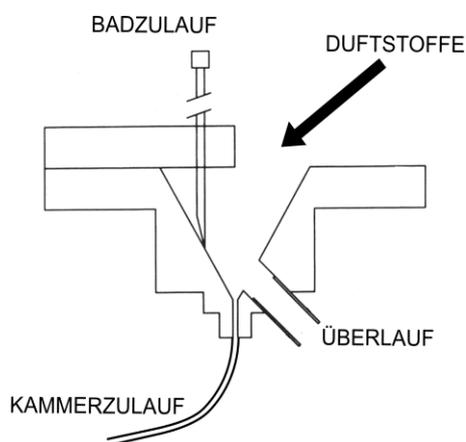


Abb. 2.5: Das Applikationssystem (modifiziert nach Schild 1985, S. 74)

2.3.3 Versuchsalgorithmus

Für die Messung an den *nose-to-brain*-Präparaten und den Bulbuspräparaten wurde der präparierte Gewebeschnitt (s. o.) für eine Stunde in einer Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert. Die Färbelösung bestand aus 200 µl Badlösung mit 50 µM Fura2/AM (Molecular Probes, Leiden, Niederlande), das zur besseren Löslichkeit in DMSO (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und Pluronic Acid F127 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) gelöst worden war (Jacob und Herschler 1986).

Nach Inkubation wurde die Färbelösung entfernt und nach mehrfacher Spülung mit Badlösung wurde der Gewebeschnitt in der Petrischale mithilfe eines speziell angefertigten Netzes fixiert.

Dann wurde der Schnitt unter dem Mikroskop begutachtet und auf Verwertbarkeit überprüft. Kriterien waren die Anschnitthöhe im Bereich des Ventrikelbodens, die Unversehrtheit des Nervus olfactorius bei *den nose-to-brain*-Präparaten und die Lage der Zellen. Anschließend wurde der Zulauf für die Aminosäuren direkt über der olfaktorischen Mukosa platziert und die Badlösung über eine 50-ml-Spritze zugeführt. An den Zulauf war auch die Spritze mit dem gelösten Antagonisten bzw. Agonisten angeschlossen, diese wurde entsprechend des Messprotokolls geöffnet und geschlossen. Die Sonde des Saugers wurde seitlich des Schnittes platziert, um eventuelle Verwirbelungen zu vermeiden. Der Aminosäuremix konnte nun über eine Pipette direkt in den Trichter des Zulaufs gegeben werden.

Bei den Bulbusschnitten wurde der Agonist mit der Badlösung über einen Trichter auf den Bulbus appliziert.

Es wurde eine feste Abfolge von Bildern mit einer Belichtungszeit von 200 ms aufgenommen. Dafür wurde die Bilderfassungssoftware WinView (Visitron) benutzt. Um die Vitalität der Zellen zu testen, wurde zunächst zweimalig der Duftstoffmix mittels einer 1-ml-Pipette im Abstand von zwei Minuten appliziert. Anschließend wurde die Spritze mit dem Agonisten/Antagonisten geöffnet und die Badlösung geschlossen, so dass der Schnitt mit dem Agonisten bzw. Antagonisten umspült wurde. Währenddessen wurde erneut die Duftstoffantwort ca. fünfmal gemessen. Um die verbleibende Vitalität des Schnittes zu messen, wurden dann drei weitere Duftstoffantworten unter erneuter Spülung mit normaler Badlösung gemessen.

Durch die exakt eingehaltenen und dokumentierten Zeitabstände konnten anschließend die zellulären Reaktionen eindeutig der applizierten Substanz zugeordnet werden. Führten Fehler im Aufbau des Versuches oder anatomische Eigenarten des Versuchstieres zu Verzögerungen, so verliefen diese in allen Zellen synchron und konnten so durch Vergleiche mit einem größeren Ausschnitt zugeordnet werden. Nach der Messung wurden die Daten, wie bereits beschrieben, ausgewertet.

2.4 Reagenzien und Badlösungen

2.4.1 Fura-2

In den Experimenten sollten zelluläre Antworten auf Reize erzeugt und visualisiert werden. Hierfür eignet sich die Methode des Ca^{2+} -Imaging, mithilfe derer die Aktivität von erregbaren Zellen über eine Fluoreszenzänderung, welche durch Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration entsteht, dargestellt wird. Für die Messungen an einem konventionellen Mikroskop mit dem beschriebenen CCD-Imaging-Setup wurde der Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 benutzt.

Fura-2 enthält fünf Carboxylgruppen und ist deswegen stark polar. Da er in diesem Zustand die Plasmamembran nicht durchdringen kann, benutzt man einen AM-Ester des Fura-2. Hierbei tragen die Carboxylgruppen Acetoxymethylreste und befinden sich in einem unpolaren Zustand. Nach dem Durchdringen der Zellmembran werden die Esterbindungen von zytosolischen Esterasen gespalten, und es liegen Formaldehyd, Acetat und die Säureform des Fura-2 vor. Dieses kann nun als Indikator für Zellaktivität genutzt werden.

Durch das intrazelluläre Abspalten des Esters bleibt der Gradient für den veresterten Fura-2-Farbstoff erhalten, so dass die intrazelluläre Farbstoffkonzentration die Konzentration des Lösungsbades übersteigt. Aus diesem Grund sollte die Konzentration des Lösungsbades so gering wie möglich gewählt werden (Deitmer und Schild 2000).

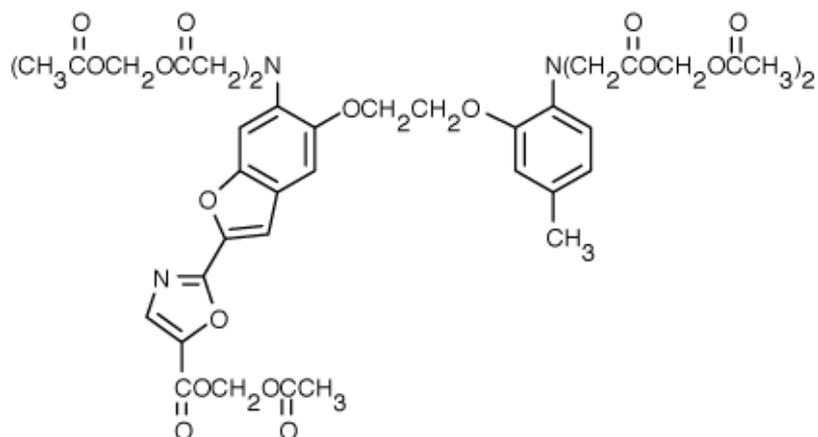


Abb. 2.6: Strukturformel von Fura-2 (Molecular Probes®)

2.4.2 Badlösung

Die *nose-to-brain*-Präparate und die Bulbuspräparate lagen während der gesamten Versuchsreihe in Ringerlösung (siehe Tabelle 2.1) und wurden je nach Versuchsablauf von verschiedenen Badlösungen umspült. Die in der Tabelle dargestellten Substanzen (Merck, Darmstadt, Deutschland; außer Natrium-Pyruvat von Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurden zur Herstellung der Ringerlösung in destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde anschließend mit einem pH-Meter und 1N NaOH auf pH 7,8 justiert. Die Osmolarität betrug 230 mOsmol.

Inhaltsstoffe	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	Glukose	Na-Pyruvat	Hepes
Konzentration (mM)	98	2	1	2	5	5	10

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Ringerlösung:

pH 7,8; Osmolarität 230 mOsmol; Chemikalien von Merck, Darmstadt, Deutschland, außer Na-Pyruvat von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland. NaCl: Natriumchlorid; KCl: Kaliumchlorid; CaCl₂: Calciumchlorid; MgCl₂: Magnesiumchlorid, Na-Pyruvat: Natriumpyruvat, Hepes: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

2.4.3 Aminosäuren

Zur Stimulation der Zellen des olfaktorischen Systems wurden Aminosäuren verwendet, die als Stimulanzen für die olfaktorischen Rezeptorneurone der Kaulquappe von *Xenopus laevis* gelten (Vogler und Schild 1999). Da die einzelnen AS L-Glutamat, L-Aspartat, L-Glutamin und L-Asparagin auch direkt die Zellen des OB stimulieren können (Czesnik et al. 2003, Manzini et al. 2002), wurden sie bei den Ca²⁺-Imaging-Experimenten nicht verwendet. Stattdessen wurde ein Aminosäuren-Mix mit den in Tabelle 2.2. enthaltenen 15 AS in einer Konzentration von je 200 µmol appliziert. Sämtliche AS wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Mischung	Aminosäuren
NK-AS	Glycin, Alanin, Serin, Threonin, Cystein
NL-AS	Prolin, Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin
BAS-AS	Arginin, Lysin, Histidin
AROM-AS	Tryptophan, Phenylalanin
AS-Mix	NK-AS, NL-AS, BAS-AS, ARO-AS

Tabelle 2.2: Die verwendeten Aminosäuren

Die L-AS wurden in verschiedene Gruppen eingeteilt (nach Caprio und Byrd 1984). NK-AS: AS mit neutralen kurzen Seitenketten; NL-AS: AS mit neutralen langen Seitenketten; BAS-AS: AS mit basischen Seitenketten; AROM-AS: AS mit aromatischen Seitenketten.

2.4.4 Purinerge Agonisten

Die P2-Rezeptoren haben eine breite Ligandenspezifität (siehe Tabelle 1.1). P2X-Rezeptoren erkennen ATP als endogenen Liganden. P2Y-Rezeptoren erkennen ATP, ADP, UTP, UDP, sowie Diadenosin-Polyphosphat als Liganden. Aufgrund fehlender Stabilität und unterschiedlicher Bindungsaktivität können nicht alle Liganden gleichermaßen genutzt werden, um P2-Rezeptoren zu identifizieren (Evans und Kennedy 1994; Humphrey et al. 1995; Khakh et al. 1995).

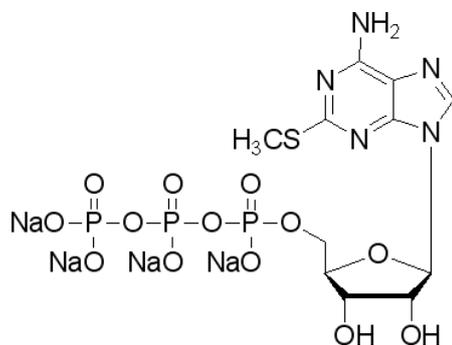


Abb. 2.7: Strukturformel von 2-MeSATP (Molecular Probes®)

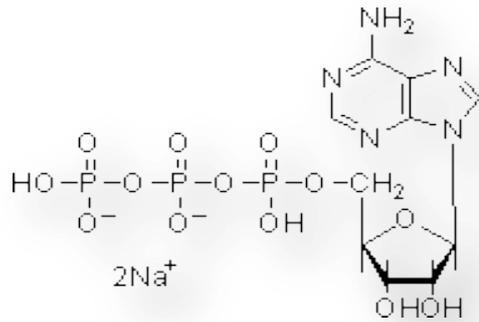


Abb.2.8: Strukturformel von ATP (Molecular Probes®)

2.5.5 Purinerge Antagonist Suramin

Suramin (8-(3-benzamido-4-methylbenzamido)-naphthalen-1, 3, 5-trisulfonsäure) ist ein selektiver Antagonist der P2-Rezeptoren gegenüber anderen Rezeptortypen (Dunn und Blakely 1988). Es ist kein universeller P2-Rezeptor-Antagonist und diskriminiert nicht zwischen P2X- und P2Y-Rezeptoren. Der Antagonismus von Suramin gegen P2X- und P2Y-Rezeptoren hat eine niedrige Potenz und ist nicht kompetitiv. Rekombinante P2X₆- und P2X₄-Rezeptoren sowie P2Y₆- und P2Y₄-Rezeptoren werden nur schwach oder gar nicht antagonisiert (Buell et al. 1996; Chang et al. 1995; Communi et al. 1996; Robaye et al. 1997).

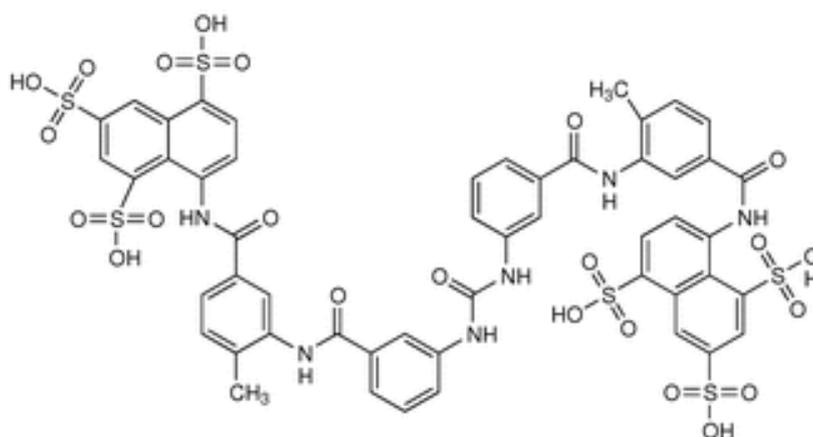


Abb. 2.9: Strukturformel von Suramin (Molecular Probes®)

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, an der Larve von *Xenopus laevis* die Grenze zwischen PVZ und OB festzulegen, das Ausmaß der Neurogenese in der PVZ zu bestimmen und die Identifikation einzelner purinergere Rezeptoren und ihre mögliche Rolle im Riechvorgang zu untersuchen. Die Experimente wurden unter Zuhilfenahme von BrdU-Inkorporations-Assays, Ca^{2+} -Imaging-Versuchen an akuten *nose-to-brain*-Präparaten und an akuten Bulbusschnitten sowie durch Antikörpermarkierung einzelner Purinrezeptoren durchgeführt.

3.1 Der zelluläre Aufbau des vorderen Telenzephalons

Bei der Larve von *Xenopus laevis* ist, wie bei anderen Wirbeltieren, der paarig angelegte olfaktorische Bulbus im vorderen Teil des Telenzephalons lokalisiert. Er mündet, wie beschrieben, nach rostral in die Nervi olfaktorii und endet nach kaudal auf Höhe des Seitenventrikels.

In Abb. 3.1 ist die anatomische Aufteilung des vorderen Telenzephalons in horizontaler Aufsicht, wie in der Einleitung beschrieben, aufgezeichnet. Um die Grenze zwischen der PVZ und dem vorderen Telenzephalon zu visualisieren, stellte ich die Zellen des olfaktorischen Bulbus mithilfe von BrdU und Propidium-Iodid dar. Mithilfe von BrdU dargestellte Zellen sind in den Abbildungen gelb gefärbt, die durch Propidium-Iodid dargestellten Zellen sind rot abgebildet und konnten dem OB zugeteilt werden.

Zudem zeigte sich im Bereich der PVZ eine hohe Teilungsrate: $42,54 \pm 6,65$ % (SEM; n = 3 Tiere, 6 OB/PVZ) aller Zellen, die den lateralen Ventrikel umgeben, waren BrdU-positiv. In den folgenden Abbildungen wird dies noch an Ausschnittsaufnahmen verdeutlicht.

Die Abb. 3.1 C₁₋₃ zeigen einen Ausschnitt des lateralen Ventrikels mit dem angrenzenden OB. Dabei ist in C₁ wiederum eine Färbung mit Propidium-Iodid und anti-BrdU zu sehen, in C₂ ist der Schnitt nur mit Propidium-Iodid gefärbt und in C₃ nur mit anti-BrdU; in dieser Abbildung sind die BrdU-positiven Zellen an der grünen Fluoreszenz zu erkennen. Diese Abbildungen veranschaulichen, dass die mit BrdU

markierten Zellen periventriculär gelegen sind. In Abb. D ist eine Vergrößerung der PVZ zu sehen, hier wurde mit anti-BrdU und Propidium-Iodid gefärbt.

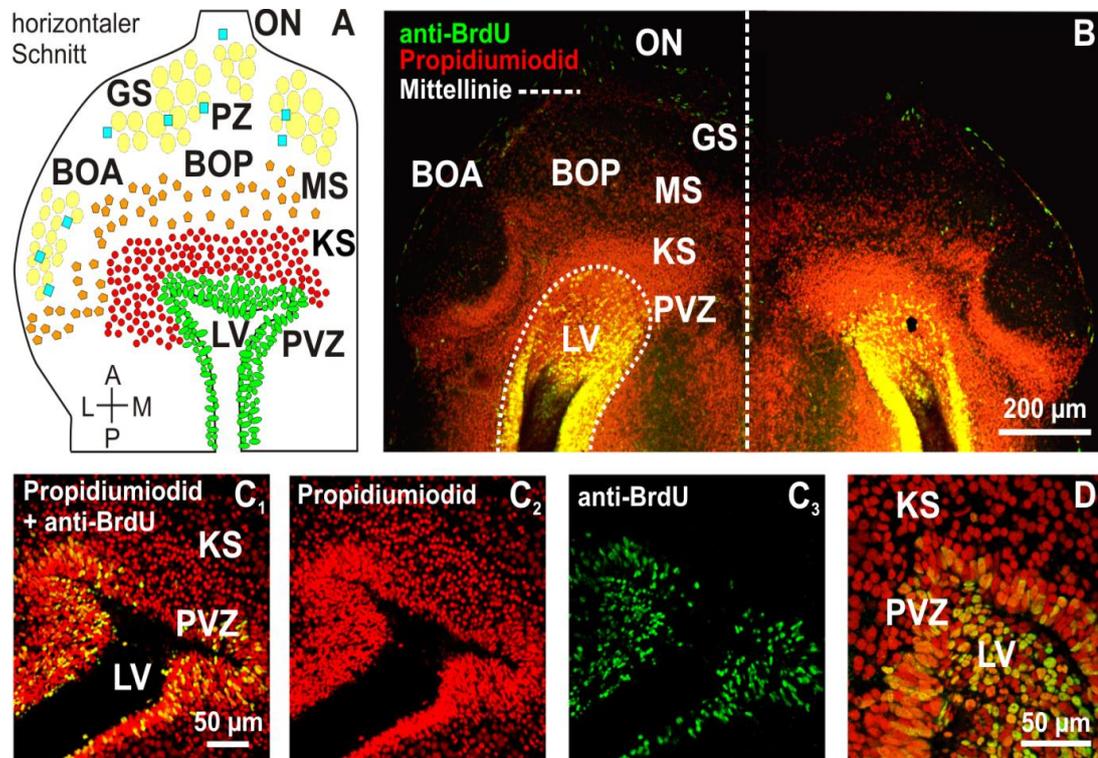


Abbildung 3.1: Die Zellen in der periventriculären Zone des lateralen Ventrikels proliferieren aktiv (Hassenklöver et al. 2010, S. 434). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.

A: Schematische Darstellung des OB der Kaulquappe von *Xenopus laevis* in horizontaler Aufsicht. **B:** Übersicht über das vordere Telenzephalon. Die kernhaltigen Zellen sind mit Propidium-Iodid (rote Fluoreszenz) dargestellt, proliferierende Zellen sind durch ein BrdU-Inkorporations-Assay (grüne Fluoreszenz) visualisiert. Proliferierende Zellen erscheinen gelb. **C₁₋₃:** Vergrößerung des OB und der periventriculären Zone bei verschiedenen Tieren. **D:** Vergrößerter Ausschnitt aus dem lateralen Ventrikel. Abk.: ON: Nervus olfactorius; GS: glomeruläre Schicht; PZ: periglomeruläre Zellen; BOA: Bulbus olfactorius accessorius; BOP: Bulbus olfactorius principalis; MS: Mitralzellschicht; KS: Körnerzellschicht; LV: lateraler Ventrikel; PVZ periventriculäre Zone

3.2 Nukleotid-induzierte Ca^{2+} -Anstiege

Um das Vorhandensein von Purinrezeptoren im vorderen Telenzephalon von *Xenopus laevis* nachzuweisen, führte ich Ca^{2+} -Imaging-Versuche an akuten Bulbuspräparaten durch.

Abb. 3.2 A zeigt einen mit Fura-2 gefärbten Ausschnitt des olfaktorischen Bulbus. Dabei ist der OB rot gekennzeichnet und die PVZ und der laterale Ventrikel sind grün gekennzeichnet. In Abb. 3.2 B ist derselbe Ausschnitt nach Applikation von 2-MeSATP (5 μM) zu sehen. Die Applikation des Nukleotids führte hier zu deutlich sichtbaren Zellantworten. Das Bild zeigt den Schnitt nach dem Erstellen einer Pixel-Korrelations-Karte (siehe *Material und Methoden*). Die Antwort der Zellen läuft synchron ab, der Ventrikel in diesem Schnitt scheint auf die Applikation von 2-MeSATP als eine Einheit zu reagieren.

In Abb. 3.2 C₁₋₃ ist die Reaktion von sechs individuellen Zellen im OB und sechs individuellen Zellen in der PVZ eingezeichnet. Abb. C₁ zeigt die Reaktion von sechs Zellen des OB auf die Applikation von 2-MeSATP (5 μM), Abb. C₂ die Reaktion von sechs Zellen der PVZ ebenfalls unter Applikation von 2-MeSATP (5 μM). Die Zellen zeigen eine gleichförmige spezifische Reaktion auf die Applikation des purinergergen Agonisten, die in Abb. C₃ als der Haupt- Ca^{2+} -Strom (\pm Standardabweichung) aller Zellen dieses OB und der PVZ unter Applikation von 2-MeSATP (5 μM) dargestellt ist. Die Kurven sind dabei analog zu den Färbungen in Abb. A dargestellt, d. h. die Reaktion der Zellen (n = 138) des OB ist rot und die Reaktion der Zellen (n = 32) der PVZ ist grün dargestellt.

In Abb. 3.2 D sind Zellen des OB und der PVZ unter Applikation von ATP (50 μM) dargestellt. Auch hier zeigen die Zellen eine gleichförmige charakteristische Reaktion auf die Applikation. Es zeigt sich aber, dass unter ATP ein insgesamt geringerer Ca^{2+} -Strom stattfindet. Ähnliche Resultate wurden in allen Versuchen gemessen, in denen ATP und 2-MeSATP auf Gewebeschnitte des vorderen Telenzephalons appliziert wurden. Die Versuche bestätigen die parallel zu dieser Arbeit in unserem Labor laufenden Versuche und gemeinsam veröffentlichten Ergebnisse (siehe Hassenklöver et al. 2010) über das Vorhandensein purinerger Rezeptoren im OB und in der PVZ.

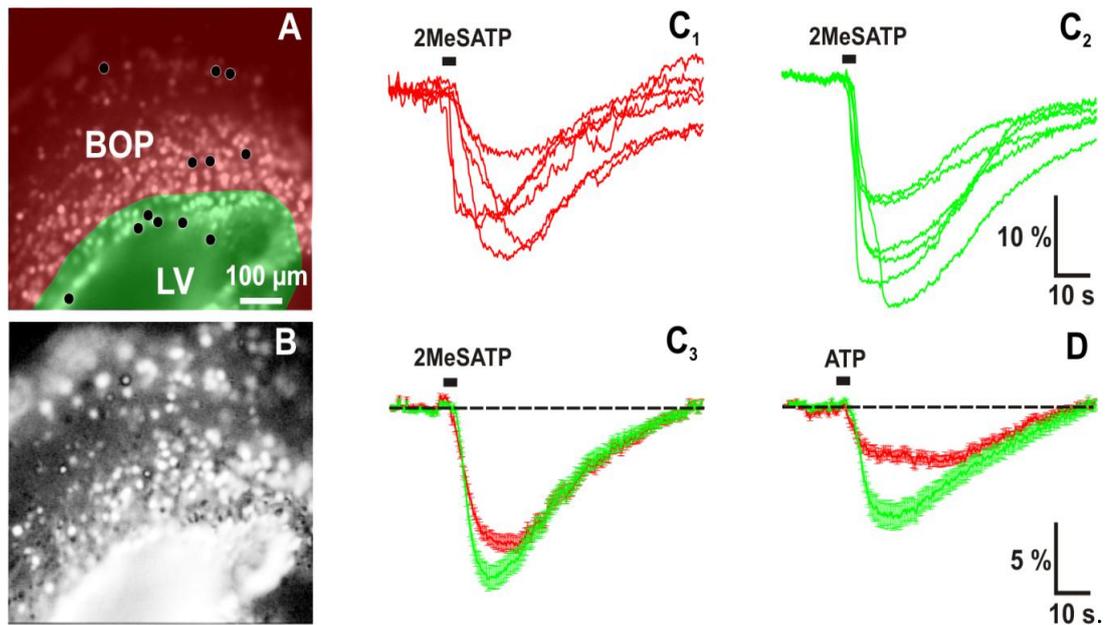


Abbildung 3.2: Nukleotid-induzierte Ca^{2+} -Anstiege in Zellen des OB und der PVZ (Hassenklöver et al 2010, S. 435). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.

A: Ein Ausschnitt des vorderen Telenzephalons, der mit Fura-2/AM gefärbt wurde; die schwarzen Punkte markieren die beobachteten Zellen. Der OB ist hier rot gefärbt, die PVZ und der laterale Ventrikel grün. **B:** Der gleiche Schnitt nach Erstellen einer Pixel-Korrelations-Karte. Der Ventrikel scheint als Ganzes zu reagieren, was aus der Zellantwort der am Ventrikelboden liegenden ependymalen Zellen resultiert. **C₁-C₃:** Reaktionen von Zellen auf Applikation von 2-MeSATP (\pm SEM). **C₁:** Die Reaktion von 6 Zellen des OB (vgl. schwarze Punkte in der rot gefärbten Zone in Abb. A). **C₂:** Die Reaktion von 6 Zellen der PVZ (vgl. schwarze Punkte in der grün gefärbten Zone in Abb. A). **C₃:** Die Reaktion aller Zellen des Schnittes, wobei die roten Kurven die Zellen des OB und die grünen Kurven die Zellen der PVZ darstellen. **D:** Die Reaktion der gleichen Zellen nach Applikation von ATP. Abk.: BOP: Bulbus olfactorius principalis; LV: lateraler Ventrikel; ATP: Adenosintriphosphat; 2-MeSATP: 2-Methylthioadenosintriphosphat

3.3 Immunhistochemische Identifikation einzelner Purinrezeptortypen

Um einzelne Subtypen der Purinrezeptoren im vorderen Telenzephalon zu identifizieren, applizierte ich gegen verschiedene Rezeptortypen gerichtete Antikörper. Abb. 3.3 A₁ zeigt einen Schnitt des vorderen Telenzephalons, hier sind der akzessorische olfaktorische Bulbus, der Bulbus olfactorius principalis, die Mitralzellschicht, die Körnerzellschicht, die periventrikuläre Zone und der laterale Ventrikel zu sehen. Diese Strukturen wurden mit Propidium-Iodid und Anti-P2X₇ nach dem beschriebenen Protokoll (siehe Material und Methoden) inkubiert. In der Abbildung sind nun sämtliche Zellkerne rot gefärbt. Zellen, die den P2X₇-Rezeptor tragen, sind grün gefärbt. Eine Ausschnittvergrößerung aus dem weißen Rechteck in 3.3 A₁ zeigen die Abb. 3.3 A₁₋₁, A₁₋₂, A₁₋₃. In der höheren Auflösung sind besonders gut die einzelnen Zellen in der Körnerzellschicht zu erkennen. Abb. A₁₋₁ zeigt, dass fast alle mit Propidium-Iodid gefärbten kernhaltigen Zellen auch ein anti-P2X₇-Färbemuster aufweisen. In Abb. 3.3 A₁₋₂ und Abb. 3.3 A₁₋₃ ist jeweils nur das Färbemuster von Propidium-Iodid bzw. anti-P2X₇ dargestellt. Abb. 3.3 B zeigt einen Gewebeschnitt, hierfür wurde zunächst anti-P2X₇ mit einem immunisierenden Peptid präinkubiert und dann auf den Schnitt appliziert. Anschließend erfolgte, wie bei den anderen Versuchen auch, eine Inkubation mit Propidium-Iodid. In dieser Abbildung ist kein Färbemuster des anti-P2X₇-AK zu erkennen.

In Abb. C und D ist die Immunreaktion auf anti-P2X₄ zu sehen. Es zeigt sich ein besonders starkes Färbemuster im Bereich der PVZ, was in Abb. D mit den weißen Pfeilen gekennzeichnet ist. Hier scheint es, als ob die anti-P2X₄-positiven Zellen in Form einer schlauchartigen Struktur von der PVZ zum OB ziehen.

Die Applikation von AK gegen P2X₁, P2X₂, P2Y₂ und P2Y₄ erbrachte kein positives Färberegebnis. Da die benutzen P2-Antikörper zur Forschung an Rezeptoren von Ratten hergestellt wurden, ist eine Interpretation hier nur eingeschränkt möglich.

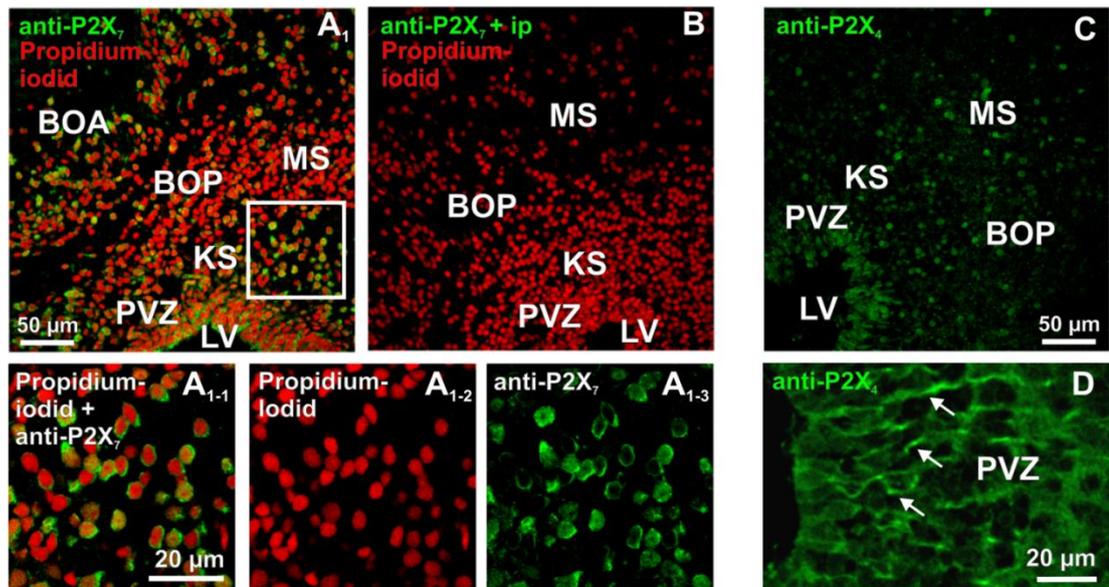


Abbildung 3.3: Die Verteilung von P2X₄- und P2X₇-ähnlicher Immunreaktivität im anterioren Telenzephalon (Hassenklöver et al 2010, S. 439). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.

A: Der OB mit den verschiedenen Zellschichten und ein Anschnitt des lateralen Ventrikels. **A₁:** Immunreaktivität auf einen P2X₇ Antikörper (grüne Fluoreszenz) und Zellkernfärbung mit Propidium-Iodid (rote Fluoreszenz) eines Schnittes des vorderen Telenzephalons. **B:** Ein anderer Schnitt, der mit einem anti-P2Y₇-Antikörper inkubiert wurde; zuvor erfolgte die Inkubation mit einem immunisierenden Peptid und mit Propidium-Iodid. **A₁₋₁-A₁₋₃:** Höhere Auflösungen des weißen Rechtecks aus Abb. A₁. **C:** Immunreaktivität eines mit P2X₄-Antikörper inkubierten Schnittes. **D:** Höhere Auflösung des gleichen Schnittes. Die gefärbten tubulären Strukturen, die vom lateralen Ventrikel in den OB hineinreichen, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Abk.: BOA: Bulbus olfactorius accessorius; BOP: Bulbus olfactorius principalis; MS: Mitralzellschicht; KS: Körnerzellschicht; LV: lateraler Ventrikel; PVZ: periventriculäre Zone

3.4 Die Beteiligung des purinergen Systems des OB an der bulbären Verarbeitung olfaktorischer Stimuli bei *Xenopus laevis*

Diese Versuchsreihe soll eine Antwort auf die Frage geben, ob das purinerge System direkt bei der Verarbeitung olfaktorischer Informationen im OB von *Xenopus laevis* eingebunden ist. Hierzu führte ich Ca^{2+} -Imaging-Versuche an akuten *nose-to-brain*-Präparaten durch, wobei ich, wie im letzten Kapitel beschrieben, mit Aminosäuren (Mischung aus 15 Aminosäuren, je 100 μM) als stimulierenden Odorantien und verschiedenen purinergen Agonisten und Antagonisten arbeitete. Aus dieser Methode ergibt sich der Vorteil, dass simultan Odorantien über der Mukosa appliziert und die Reaktionen im OB nachvollzogen werden können. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen durch die mittels MATLAB berechneten Kurven- und Balkendiagramme dargestellt. In Abb. 3.4 A ist eine Skizze mit einer horizontalen Aufsicht auf ein *nose-to-brain*-Präparat zu sehen. Die verschiedenen Zuläufe wurden markiert, um den Versuchsaufbau nachvollziehbar zu machen.

In Abb. 3.4 B werden die Reaktionen von Zellen individueller *nose-to-brain*-Präparate auf die Applikation von AS unter Zufluss purinerner Agonisten und Antagonisten gezeigt. In Abb. 3.4 B₁ ist die Reaktion (\pm SEM) der ausgewählten Zellen ($n = 45$) auf die Applikation von AS unter Zufluss von 2-MeSATP (5 μM) dargestellt. Die grau unterlegte Kurve zeigt die Reaktion der Zellen nach zehnminütigem Zufluss von 2-MeSATP. Die linke Kurve zeigt die Reaktion der Zellen auf den AS-Mix vor Zufluss von 2-MeSATP, die rechte Kurve zeigt die Reaktion der Zellen fünf Minuten nach dem Beenden des Zuflusses. Die untere Kurve zeigt die Reaktion einer einzelnen Zelle (\pm SEM) aus demselben Experiment. Die Applikation des Agonisten 2-MeSATP scheint keinen Einfluss auf die Zellantwort zu haben, die Antwortprofile verlaufen während des gesamten Experiments gleichförmig.

In Abb. 3.4 B₂ ist die Applikation von ATP (100 μM) auf ein *nose-to-brain*-Präparat dargestellt. Dieser potente Agonist purinerner Rezeptoren scheint die Ca^{2+} -Ströme

über die Zellmembran ebenfalls nicht zu beeinflussen, es kommt zu keiner nennenswerten Abnahme der Zellaktivität (n = 23).

In Abb. 3.4 B₃ ist das Experiment unter Zufluss des P2-Rezeptor-Antagonisten Suramin (200 µM) über fünf Minuten (gelb unterlegt) auf n = 35 Zellen eines Präparates dargestellt. Die Aktivität der Zellen nimmt hier geringfügig ab. Nach Beenden des Zuflusses sinkt die Zellaktivität jedoch weiter, statt wie erwartet wieder anzusteigen.

Die Balkendiagramme in Abb. 3.4 C stellen die Maximalantworten der Zellen (± SEM) in Prozent der Kontrollreaktion auf die Applikation von 100µM AS-Mix dar. In Abb. 3.4 C₁ ist die Antwort auf den AS-Mix von 200 Zellen des OB aus vier Präparaten dargestellt. Der linke dunkelgraue Balken zeigt die AS-Kontrolle vor Zufluss von 2-MeSAMP, der mittlere helle Balken zeigt die Reaktion auf die AS-Applikation unter ständigem Zufluss von 2-MeSAMP, der rechte dunkelgraue Balken zeigt die Kontrolle mit Zufuhr der Aminosäuremischung nach Auswaschen des Agonisten. Auch hier ist insgesamt nur eine leichte Abnahme der Ca²⁺-Ströme zu beobachten.

In Abb. 3.4 C₂ ist die Maximalantwort (± SEM) in Prozent der Kontrollreaktion unter dem Zufluss von ATP (100 µM) auf 78 Zellen des OB aus 5 Präparaten dargestellt. Die Abbildung folgt dem gleichen Schema wie Abb. C₁, der rosa Balken stellt die Reaktion der Zellen auf den ATP-Zufluss dar; auch hier zeigt sich keine Zunahme der zellulären Aktivität.

Abb. 3.4 C₃ gibt die Maximalantwort der Zellen (± SEM) in Prozent der Kontrollreaktion unter dem Zufluss von Suramin (200 µM) aus 81 Zellen des OB von insgesamt vier Präparaten an. Auch hier scheint es zu keinem Effekt auf die Zellantwort zu kommen. Insgesamt konnte in diesen Experimenten keine Beeinflussung des purinergen Systems durch die Applikation von Duftstoffen in Kombination mit purinergen Agonisten und Antagonisten festgestellt werden.

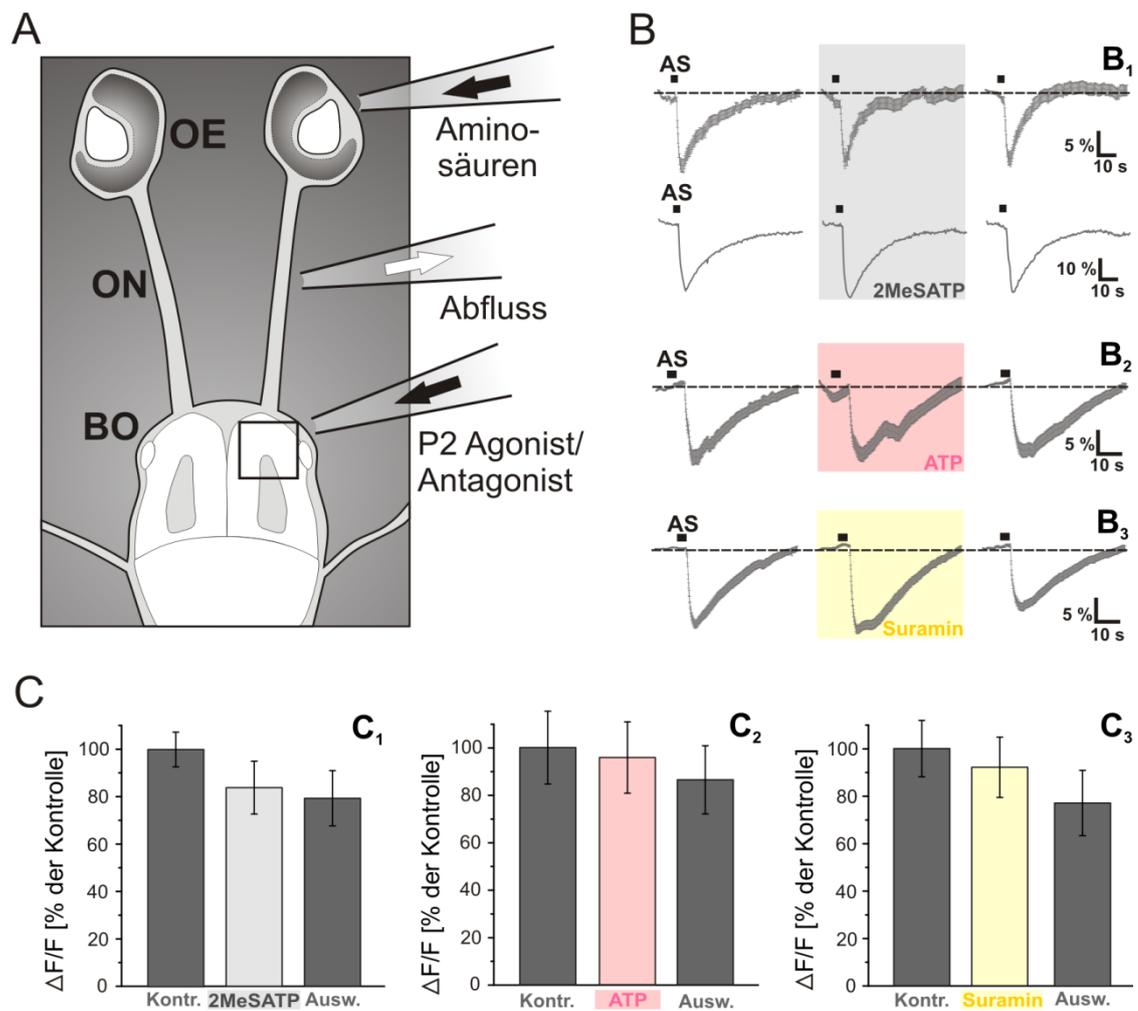


Abbildung 3.4: Der Einfluss des purinergen Systems des olfaktorischen Bulbus auf die Verarbeitung olfaktorischer Reize in Zellen des olfaktorischen Bulbus (Hassenklöver et al. 2010, S. 440). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.

A: Schematische Darstellung eines *nose-to-brain*-Präparates der Larve von *Xenopus laevis*. Das Quadrat zeigt den Bereich an, in dem die Zellreaktionen während der Ca^{2+} -Imaging-Experimente gemessen wurden. Die Pfeile kennzeichnen den Zu- und Abfluss der verwendeten Substanzen. **B:** Die Zellantwort (\pm SEM) der gemessenen Zellen des OB auf einen applizierten Duftstoffmix (15-AS-Mix, 100 μM , siehe Material und Methoden) wurde nicht durch die Applikation purinergener Agonisten und Antagonisten beeinflusst. **B₁:** Reaktion (\pm SEM) der Bulbuszellen ($n = 45$) auf die Applikation von 100 μM 15-AS-Mix unter Zufluss von 2-MeSATP über zehn Minuten (grau unterlegte Kurve). Links davon die Reaktion auf den 15-AS-Mix vor Zufluss des Agonisten, rechts davon zehn Minuten nach Auswaschen des Agonisten. Die untere Kurve zeigt die Reaktion einer einzelnen ausgewählten Zelle. **B₂:** Reaktion (\pm SEM) der Zellen des OB ($n = 23$) auf die Applikation von 100 μM 15-AS-Mix unter Zufluss von ATP (100 μM) über zehn Minuten (rot unterlegte Kurve). Die Kurve links davon zeigt die Reaktion der Zellen vor Zufluss von ATP, die Kurve

rechts davon zeigt die Reaktion zehn Minuten nach Beenden des Zuflusses von ATP. **B₃**: Reaktion (\pm SEM) der Zellen des OB auf die Applikation von 100 μ M 15-AS-Mix unter Zufluss von Suramin (200 μ M) über fünf Minuten (gelb unterlegte Kurve). Die Kurve links davon zeigt die Reaktion der Zellen vor Zufluss von Suramin, die Kurve rechts davon zeigt die Reaktion fünf Minuten nach Beenden des Zuflusses von Suramin. **C**: Die Maximalantwort (\pm SEM) in Prozent der Kontrollreaktion auf die epitheliale Applikation von 100 μ M AS-Mix (200 OB-Zellen von vier *nose-to-brain*-Präparaten) als Kontrolle (rechte dunkelgraue Säule) nach 5 – 10 Minuten in Badlösung mit 2-MeSATP (hellgraue mittlere Säule) sowie zehn Minuten nach dem Auswaschen (dunkelgraue rechte Säule) ist in **c₁** dargestellt. Die Maximalantwort (\pm SEM) in Prozent der Kontrollreaktion auf die epitheliale Applikation von 100 μ M AS-Mix (78 OB-Zellen aus 5 *nose-to-brain*-Präparaten für ATP (100 μ M); und 81 OB-Zellen aus 4 *nose-to-brain*-Präparaten für Suramin (200 μ M)) als Kontrolle (jeweils dunkelgraue linke Säule) nach 5 – 10 Minuten in Badlösung mit ATP oder Suramin (hellrote bzw. hellgelbe Säule) sowie zehn Minuten nach dem Auswaschen (jeweils dunkelgraue rechte Säule) ist in **c₂** und **c₃** gezeigt.

4. Diskussion

In dieser Doktorarbeit wird erstmalig das purinerge System im olfaktorischen Bulbus der Kaulquappe von *Xenopus laevis* in Bezug auf seine Lokalisation und die mögliche Funktion untersucht. In diesem Rahmen erfolgte zudem die Klassifikation einzelner Rezeptoren. Die Arbeit wurde in vier Arbeitsschritte gegliedert.

Um die Lokalisation der in einem nachfolgenden Schritt klassifizierten Rezeptoren festlegen zu können, wurde zunächst der zelluläre Aufbau des vorderen Telenzephalons, insbesondere die Grenze zwischen der PVZ und dem OB, dargestellt. Zusätzlich konnte das Ausmaß der Neurogenese in dieser Region bestimmt werden.

Zum Nachweis purinergere Rezeptoren im OB wurde im zweiten Schritt durch Ca^{2+} -Imaging die Reaktion des OB auf die purinergen Agonisten 2-MeSATP und ATP untersucht. Einzelne dieser purinergen Rezeptoren konnten nachfolgend mittels immunhistochemischer Techniken klassifiziert werden.

Im Anschluss ging ich der Fragestellung nach, welche Rolle das purinerge System in der Verarbeitung von olfaktorischen Reizen bei der Larve von *Xenopus laevis* spielt. Hierzu führte ich erneut Ca^{2+} -Imaging-Versuche unter Applikation purinergere Agonisten und Antagonisten sowie olfaktorischer Stimuli durch.

In diesem Kapitel werden die Experimente auf den aktuellen Forschungsstand bezogen und anschließend die Ergebnisse analysiert.

4.1 Die Experimente im Kontext der Forschung

Wie in der Einleitung beschrieben, findet die Neurogenese bei Säugetieren in zwei Regionen, der subventrikulären Zone (SVZ) und der subgranulären Zone des Hippocampus statt. Die neuronalen Vorläuferzellen aus der SVZ wandern über den sogenannten rostralen migratorischen Strom (RMS) in den OB aus.

Im Gegensatz dazu findet bei niederen Vertebraten, wie zum Beispiel den Amphibien, die Neurogenese an vielen Orten des adulten Gehirns statt. So konnte beim Teichfrosch (*Rana esculenta*) Neurogenese im basalen Vorderhirn, im Mesencephalon und in der Medulla oblongata nachgewiesen werden (Rauci et al. 2006). Auch in der an den OB grenzenden periventriculären Zone (PVZ) scheint Neurogenese stattzufinden (Kaslin et al. 2007). Da bei *Xenopus laevis* der paarige Seitenventrikel tief in das vordere Telenzephalon hineinragt, steht die PVZ bei *Xenopus laevis* in direktem Kontakt zum OB. Die Zellen in der PVZ proliferieren aktiv und wurden bereits als echte neuronale Stammzellen identifiziert (Endo et al. 2007; Filoni et al. 1995). Dieser Aspekt wurde in der vorliegenden Arbeit u. a. genutzt, um die Grenze zwischen der PVZ und dem OB festzulegen. Mittels BrdU-Inkorporationsassays kann zwischen den proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen unterschieden werden (Taupin 2007). Hierbei musste die Inkubationszeit für die Assays so gewählt werden, dass ausreichend Zellen in der PVZ markiert wurden, beim Fixieren der Proben die Zellen aber noch nicht in den OB ausgewandert waren. Gleichzeitiges Färben mit Propidium-Iodid stellt alle kernhaltigen Zellen dar. Für die nachfolgenden Experimente war die Visualisierung der Grenze der PVZ (siehe Abb. 3.1) unerlässlich, um die ermittelten Rezeptoren ihrer Lokalisation zuordnen zu können. Außerdem konnte so das Ausmaß der Proliferation in dieser Region beobachtet werden, das erstaunlich hoch war.

Im purinergen System dienen extrazelluläre Purine und Pyrimidine als Botenstoffe zur Weiterleitung unterschiedlicher Informationen. Sie agieren über die bereits beschriebene Gruppe der Purinrezeptoren (Ralevic und Burnstock 1998).

Von einem Mitglied unserer Arbeitsgruppe wurde parallel zu meinen Arbeiten nachgewiesen, dass es ein funktionierendes purinerges System im OB von *Xenopus laevis* gibt. Mit ATP- und 2-MeSATP-Applikationen ließen sich im OB Ca^{2+} -Ströme auslösen, die mit PPADS und Suramin antagonisierbar waren. Anhand von Ca^{2+} -

Imaging-Experimenten wurde festgestellt, dass im OB ionotrope P2X-Rezeptoren lokalisiert sind. Diese Ergebnisse wurde gemeinsam mit den in meiner Arbeit dargestellten Ergebnisse veröffentlicht (Hassenklöver et al. 2010). In der PVZ finden sich hingegen ionotrope P2X-Rezeptoren und metabotrope P1-Rezeptoren, eventuell auch P2Y-Rezeptoren.

Dies konnte durch ATP und 2-MeSATP induzierte Zellaktivität in Ca^{2+} -freier Badlösung differenziert werden: Sowohl in der PVZ als auch im OB war die Zellantwort in Ca^{2+} -freier Badlösung schwächer als in Ca^{2+} -reicher Badlösung. Im OB konnte jedoch eine konstant stärkere Abschwächung gemessen werden als in der PVZ, wo durchgehend einige Zellen weiterhin reagierten. Nach erneuter Messung in Ca^{2+} -reicher Badlösung konnte in beiden Bereichen wieder eine erhöhte Zellantwort erreicht werden. Zusätzlich zeigte die Applikation von Adenosin, einem selektiven P1-Rezeptor Agonisten, keine Reaktion im OB, jedoch in der PVZ (Hassenklöver et al. 2010).

In vielen Regionen des ZNS wurden sowohl an Nerven- als auch an Gliazellen, bereits Purinrezeptoren entdeckt und klassifiziert: P1- (Doengi et al. 2008), P2X₂- (Vulchanova et al. 1996; Kanjhan et al. 1999; Hegg et al. 2003), P2X₄- (Bo et al. 1995; Lê et al. 1998), P2X₅- (Guo et al. 2008), P2X₆- (Collo et al. 1996; Soto et al. 1996), P2X₇- (Yu et al. 2008; Collo et al. 1996), P2Y₁ (Simon et al. 1997) und P2Y₂- Rezeptoren (Hegg et al. 2003) wurden im OB der Maus nachgewiesen. P2X₁₋₆- (Worthington et al.1999), P2X₂ (Kanjhan et al. 1999), P2X₆ (Collo et al. 1996; Soto et al. 1996) und P2X₇-Rezeptoren (Yu et al. 2008; Collo et al.1997; Sim et al. 2004; Genzen et al. 2009) konnten in der PVZ der Maus nachgewiesen werden. In nur zwei dieser Arbeiten werden funktionelle Purinrezeptoren im olfaktorischen System der Maus beschrieben. Sie zeigen, dass Astrozyten im OB der Maus P1A_{2A} und PY₁-Rezeptoren exprimieren (Doengi et al. 2008) und Zellen der SVZ im lateralen Ventrikel der Maus P2Y₇-Rezeptoren exprimieren (Genzen et al. 2009). Außerdem wurde das Vorkommen von Ektonukleotidasen beschrieben: Dies sind Enzyme, die sich auf Zelloberflächen befinden, extrazelluläre Nukleotide und Nukleoside spalten und so deren Wirkung beenden können (Langer et al. 2008). Pharmakologische Klassifizierungen der Rezeptoren gab es bisher kaum, auch über die physiologische Funktion der Rezeptoren ist bisher wenig bekannt. In anderen Organsystemen ist die Funktion purinerge Rezeptoren hingegen deutlich besser er-

forscht. Besonders über Purinrezeptoren im kardiovaskulären System gibt es viele Arbeiten, die die vielfältigen Funktionen zeigen und in einigen Fällen klinisch genutzt werden. So gibt es Hinweise, dass P2Y₁-, P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren über Stimulation von ATP (oder – nach Abbau von ATP über Ectonukleotidasen – über ADP) an Endothelzellen Stickstoffmonoxid (NO), endothelialen hyperpolarisierenden Faktor (EDHF) und Prostaglandine freisetzen. Dies führt zur Vasodilatation bei hypoxischem Stress in der Endothelzelle (Ralevic und Burnstock 1998; Ralevic 2001; Motte et al. 1995; Malmsjö et al. 2000).

Das aus der Kardiologie bekannte Medikament Clopidogrel, welches vor allem im Rahmen der koronaren Herzkrankheit nach der Implantation von Stents in die Herzkranzgefäße eingesetzt wird, hemmt über einen seiner Metaboliten den P2Y₁₂-Rezeptor und somit die Thrombozytenaggregation (Gachet 2001).

In dieser Arbeit klassifizierte ich verschiedene Rezeptoren. Dies geschah unter der Verwendung von AK, die gegen einzelne Rezeptoren gerichtet sind. Ich applizierte AK gegen P2X₇-, P2X₄-, P2X₁-, P2X₂-, P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren. Positive Ergebnisse im Sinne eines AK-Färbemusters ergaben sich bei P2X₄ und P2X₇.

Das olfaktorische System wird beim Säugetier über verschiedene Signalsysteme gesteuert. Vor allem das GABAerge System und das noradrenerge System (Shipley und Ennis 1996) sind hier involviert. Wie beschrieben wirkt Glutamat als Transmitter in der glomerulären Schicht des OB zwischen den Primärdendriten der Mitralzellen und den Dendriten der Interneurone (Lledo et al. 2005). Bei Säugetieren scheint es auch als Transmitter im N. olfactorius eine wichtige Rolle zu spielen (Ennis et al. 1995). Von Marcoli et al. wurde beschrieben, dass der Purinrezeptorsubtyp P2X₇ eine signifikante Rolle in der ATP-induzierten Glutamatfreisetzung spielt (Marcoli et al. 2008). Dies führte zusammen mit dem breiten Vorkommen von Purinrezeptoren sowohl im OE (Hassenklöver et al. 2008, Hassenklöver et al. 2010) als auch im OB zu der Vermutung, dass das purinerge System im OB in die Verarbeitung olfaktorischer Signale eingebunden ist. Wir führten aus diesem Grund Ca²⁺-Imaging-Versuche unter gleichzeitiger Stimulation mit olfaktorischen Reizen und der Applikation purinerner Agonisten und Antagonisten durch. Das Ziel war es hierbei, eine Verstärkung oder Herabsetzung der Duftstoffantwort über den Antagonismus bzw. Agonismus an den purinergen Rezeptoren zu erreichen.

4.2 Analyse der Ergebnisse

Festlegung der Grenze zwischen dem OB und der PVZ

Um die Grenze zwischen der PVZ und dem OB darzustellen und um die Proliferationsrate in der PVZ zu bestimmen, führte ich eine Studie mit BrdU-Inkorporations-Assays durch. BrdU wird von proliferierenden Zellen aktiv aufgenommen (Taupin 2007). Hierbei zeigten sich nahezu 40 % der Zellen (42.54 ± 6.65 % SEM; n = 3 Tiere) 24 h nach Inkubation mit BrdU in der PVZ als BrdU-positiv. Dies spricht für eine sehr hohe Proliferationsrate der neuronalen Stammzellen in der PVZ. Das Zeitfenster für die Inkubation wurde so gewählt, dass sich ausreichend Zellen in der PVZ teilen konnten, diese jedoch noch nicht in den OB auswanderten. So konnte die Grenze zwischen den beiden Hirnregionen festgelegt werden (Abb. 3.1). Die Festlegung dieser Grenze ermöglicht es, die mittels Ca^{2+} -Imaging und immunhistochemischer Markierung ermittelten Rezeptoren den einzelnen Hirnregionen zuzuordnen, außerdem können so zukünftig die anatomischen Verhältnisse der PVZ besser untersucht werden.

Nukleotid-induzierte Ca^{2+} -Ströme

Die Applikation der purinergen Agonisten 2-MeSATP und ATP auf den OB und die PVZ führte in beiden Regionen zu deutlichen Ca^{2+} -Anstiegen. Abb. 3.2 zeigt, dass die Ca^{2+} -Ströme sich infolge der Applikation zeitlich synchron und in charakteristischer Weise veränderten. Das purinerge System scheint somit im gesamten vorderen Telenzephalon vorhanden zu sein. Es ging nun darum, die genaue Lokalisation einzelner Purinrezeptoren herauszufinden und etwas über die Funktion zu erfahren.

Immunhistochemische Lokalisation purinerner Rezeptoren

Von den sechs gegen purinerge Rezeptoren (P2X₁, P2X₂, P2X₄, P2X₇, P2Y₂ und P2Y₄) gerichteten AK zeigte sich nur bei P2X₄-AK und P2X₇-AK ein positives Färbemuster im vorderen Telenzephalon. Das Färben mit dem P2X₇-AK zeigte positive Ergebnisse sowohl in der PVZ als auch im OB (siehe Abb. 3.3 A). Dies

passt zu den weiteren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, nach denen Ca^{2+} -Imaging-Experimente das Vorkommen von P2X₇-Rezeptoren in diesen Regionen vermuten lassen (Hassenklöver et al 2010).

Der AK gegen den P2X₄-Subtyp zeigte ebenfalls positive Ergebnisse; hier konnte ein positives Färbemuster in der PVZ und im OB dargestellt werden, das aber andere Charakteristika zeigte als das Färbemuster des P2X₇-Antikörpers.

In Abb. 3.3 D ist zu erkennen, dass sich die mit Rezeptoren versehenen Zellen in schlauchartiger Form von der ependymalen Schicht des lateralen Ventrikels über die PVZ in den OB ausbreiten. Es scheint, als würden die Zellen, die den P2X₄-Rezeptor exprimieren, von der PVZ in den OB auswandern. Diese Strukturen könnten Ausläufer radiärer glialer Strukturen oder anderer proliferierender Vorläuferzellen sein. Es wurde bereits in einigen Arbeiten beschrieben, dass solche Vorläuferzellen eine ähnliche Struktur aufweisen (Tramontin et al. 2003; Kriegstein und Alvarez-Buylla 2009; Zhao et al. 2006; Bonfanti und Peretto 2007). Auch Experimente aus unserem Labor, in denen die Ultrastruktur der PVZ untersucht wurde, zeigten das Vorkommen von solchen radiären glia-ähnlichen Zellen (Nezlin et al. 2003).

Die positiven Ergebnisse an den P2X₄-Subtyp-Rezeptoren und den P2X₇-Subtyp-Rezeptoren kann man als höchstwahrscheinlich richtig ansehen. Dass nur zwei der sechs Rezeptoren nachgewiesen werden konnten, liegt wahrscheinlich an den zum Nachweis von P2-Rezeptoren hergestellten AK, die gegen Rattenproteine gerichtet sind. In Zukunft wird es hoffentlich gelingen, mit speziell für *Xenopus laevis* produzierten AK bzw. mit anderen Methoden, wie In-situ-Hybridisation oder Einzelzell-PCR, einen genaueren Einblick in die Subtypen des purinergen Systems im OB zu erlangen.

Zusammen mit den parallel erworbenen und gemeinsam veröffentlichten pharmakologischen Ergebnissen (Hassenklöver et al. 2010) zeigen diese immunhistochemischen Ergebnisse klar, dass im OB und der PVZ purinerge Rezeptoren vorkommen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass offenbar unterschiedliche Subtypen in der PVZ und dem OB vorhanden sind.

Die Rolle des purinergen Systems im Riechvorgang

Die Ca^{2+} -Imaging Versuche an *nose-to-brain*-Präparaten brachten keine Hinweise darauf, dass das purinerge System des vorderen Telenzephalons in die Verarbeitung von olfaktorischen Reizen eingebunden ist. Wie in Abb. 3.4 zu sehen ist, variieren die Ca^{2+} -Ströme unter längerem Zufluss des purinergen Agonisten 2-MeSATP nicht. Auch nach Beendigung des Zuflusses ist keine aussagekräftige Änderung der Duftstoffantwort vorhanden. Dies war in allen mit 2-MeSATP durchgeführten Versuchen ähnlich. Die Messungen mit dem purinergen Agonisten ATP zeigten ähnliche Ergebnisse. Hier blieb die Antwort auf olfaktorische Reize unter Zufluss von ATP gleich und zeigte sich nach dem Auswaschen leicht abgeschwächt. Die Abschwächung der Zellantwort ist jedoch am ehesten auf das Altern des Gewebepräparates zurückzuführen.

Auch unter Suramin, einem Antagonisten an P2X- und P2Y-Rezeptoren, zeigte sich eine leichte Abschwächung der Duftstoffantwort, die jedoch nach dem Auswaschen nicht reversibel war und so am ehesten als Alterungsprozess des Schnittes zu werten ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in drei Punkten zusammenfassen:

- Die Grenze zwischen dem OB und der PVZ und die Proliferationsrate der PVZ wurden bestimmt. Das Ausmaß der Proliferation erscheint in diesem Bereich sehr hoch.
- Das Vorkommen purinerner Rezeptoren sowohl in der PVZ als auch im OB wurde bestätigt und die beiden Subtypen P2X₄ und P2X₇ lokalisiert. P2X₇-tragende Zellen kommen sowohl in der PVZ als auch im OB vor. Das Vorkommen und die charakteristische Verteilung von P2X₄-tragenden Zellen legen die Vermutung nahe, dass es sich um Ausläufer radiärer glialer Strukturen oder proliferierender Vorläuferzellen handelt.
- Zudem konnte die Annahme, dass das purinerge System an der Verarbeitung von olfaktorischen Reizen im olfaktorischen Bulbus der Kaulquappe von *Xenopus laevis* beteiligt ist, mit unseren Experimenten nicht bestätigt werden. Hier wird man in

zukünftigen Arbeiten noch die einzelnen Teilbereiche der olfaktorischen Informationsweiterleitung beobachten müssen, um diese Frage detaillierter beantworten zu können. Weitere Erkenntnisse könnten Arbeiten bringen, die sich mit der Rolle des purinergen Systems bei der Neurogenese im vorderen Telenzephalon beschäftigen. Dies legt vor allem die Lokalisation des P2X₇-Rezeptors in der PVZ und dem OB nahe. Dieser Rezeptorsubtyp wurde mit der Einleitung von Apoptose in verschiedenen Zellen in Verbindung gebracht (Chow et al. 1997; Di Virgilio et al. 1998).

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das purinerge System der Kaulquappe von *Xenopus laevis* in den Stadien 51-54 (Nieuwkoop und Faber 1994) untersucht. Im vorderen Telenzephalon von *Xenopus laevis* konnte das Vorhandensein eines purinergen Systems nachgewiesen werden (Hassenklöver et al. 2010), hier finden sich als paarig vorkommende anatomische Strukturen der laterale Ventrikel, die PVZ und der OB mit den ankommenden olfaktorischen Nerven. Die PVZ und der OB ragen bei *Xenopus laevis* weit in das vordere Telenzephalon hinein. Mehrere Arbeiten beschreiben die stattfindende Neurogenese in der PVZ; Vorläuferzellen wandern von dort in den OB aus (Endo et al. 2007; Filoni et al. 1995). In dieser Arbeit werden die Funktion und die Lokalisation des purinergen Systems sowie die Proliferationsrate und die anatomische Grenze zwischen PVZ und OB untersucht.

Funktionelle purinerge Rezeptoren sind im gesamten ZNS und PNS verteilt und in vielfältige physiologische und pathophysiologische Prozesse eingebunden.

Die Purinrezeptoren werden in zwei Hauptklassen unterteilt: die P1- und die P2-Rezeptoren. Die P1-Rezeptoren haben Adenosin als Liganden und bilden eine Gruppe aus vier Subtypen (A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3). Die P2-Rezeptoren lassen sich nach ihrer Struktur in P2X- und P2Y-Rezeptoren unterteilen, die jeweils wieder mehrere Untergruppen bilden. Die P2X-Rezeptoren lassen sich in insgesamt sieben Subtypen ($P2X_{1-7}$) unterteilen, die P2Y-Rezeptoren bilden bisher eine Gruppe von acht Subtypen ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$). Ein $P2Y_8$ -Rezeptor mit einem breiten Spektrum an Agonisten konnte bei Embryonen von *Xenopus laevis* nachgewiesen werden (Bogdanov et al. 1997).

Um das Vorkommen des purinergen Systems im OB und der PVZ zu verifizieren, applizierte ich im Rahmen von Ca^{2+} -Imaging-Experimenten die purinergen Agonisten ATP und 2-MeSATP auf akute Bulbschnitte. Die Zellen zeigten hierauf charakteristische Antwortprofile in Form von Ca^{2+} -Strömen. Um die Lokalisation der purinergen Rezeptoren zu bestimmen, legte ich die Grenze zwischen der PVZ und dem OB von *Xenopus laevis* fest. Dies geschah mithilfe von BrdU-

Inkorporationsassays, die ich an Schnitten des vorderen Telenzephalons durchführte. Anhand des Proliferationsmusters ließ sich die PVZ gut von dem OB abgrenzen, außerdem konnte eine erstaunlich hohe Proliferationsrate gemessen werden.

Mithilfe von immunhistochemischen Techniken konnten einzelne Rezeptoren klassifiziert werden. Positive Ergebnisse ergaben sich für den P2X₄-Rezeptor: Das Färbemuster der Zellen wies eine strahlenförmig von der PVZ in Richtung OB reichende Struktur auf. Die ebenfalls positiven Ergebnisse für den P2X₇-Rezeptor zeigten ein Färbemuster, das relativ gleichförmig in der PVZ und im OB verteilt war. Dies konnte durch die vorhergehende Festlegung der Grenze zwischen OB und PVZ festgestellt werden. Keine positiven Ergebnisse brachten die AK gegen P2X₁, P2X₂, P2Y₂, und P2Y₄, die negativen Ergebnisse waren jedoch nur bedingt aussagekräftig, da die verwendeten AK für Experimente an Ratten bestimmt waren. Zukünftig könnten hier für *Xenopus laevis* bestimmte AK eindeutiger Ergebnisse bringen. Auch andere Methoden, wie z. B. In-situ-Hybridisation oder Einzelzell-PCR, könnten sich als geeignet erweisen.

Durch Ca²⁺-Imaging-Experimente an *nose-to-brain*-Präparaten wurden olfaktorische Stimuli auf das OE appliziert. Gleichzeitig erfolgte der Zufluss purinerner Agonisten und Antagonisten auf das vordere Telenzephalon. Nun konnte bei simultaner Stimulation des OE die Reaktion der Zellen des OB gemessen werden. Hier zeigte sich, dass das Antwortprofil der Zellen, sowohl des OB als auch der PVZ, sich weder unter Zufluss der purinergen Agonisten ATP und 2-MeSATP noch unter Zufluss des purinergen Antagonisten Suramin veränderte. Dies deutet darauf hin, dass das purinerge System nicht direkt in die Verarbeitung von Antwortprofilen auf olfaktorische Reize eingebunden ist (Hassenklöver et al. 2010).

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1	Schematischer Aufbau des olfaktorischen Epithels	7
Abbildung 1.2	Schematische Darstellung der P2-Rezeptoren	13
Abbildung 2.1	Das Versuchstier <i>Xenopus laevis</i>	19
Abbildung 2.2	Die Präparation des OB	25
Abbildung 2.3	Das <i>nose-to-brain</i> -Präparat	26
Abbildung 2.4	Schematische Darstellung des CCD-Imaging-Aufbaus	30
Abbildung 2.5	Das Applikationssystem	31
Abbildung 2.6	Strukturformel von Fura-2	34
Abbildung 2.7	Strukturformel von 2-MeSATP	36
Abbildung 2.8	Strukturformel von ATP	37
Abbildung 2.9	Strukturformel von Suramin	37
Abbildung 3.1	Zellen in der periventriculären Zone des lateralen Ventrikels proliferieren aktiv	39
Abbildung 3.2	Nukleotid-induzierte Ca^{2+} -Anstiege im OB und der PVZ	41
Abbildung 3.3	Die Verteilung von P2X ₄ - und P2X ₇ -ähnlicher Immunreaktivität im anterioren Telenzephalon	43
Abbildung 3.4	Der Einfluss des purinergen Systems des Telenzephalons auf die Verarbeitung olfaktorischer Reize in Zellen des Bulbus olfactorius	46
Tabelle 1.1	Charakteristika von P2X- und P2Y-Rezeptoren	15
Tabelle 2.1	Zusammensetzung der Ringerlösung	35
Tabelle 2.2	Die verwendeten Aminosäuren	36

7. Abkürzungsverzeichnis

AM	Acetoxymethyl
AS-Mix	Aminosäuren-Mix
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AOB	<i>anterior olfactory bulb</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BOP	Bulbus olfactorius principalis
BOA	Bulbus olfactorius accessorius
BrdU	Bromo Desoxyuridin
CCD	<i>charge couple device</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDHF	endothelialer hyperpolarisierender Faktor
GABA	<i>gamma-aminobutylacid</i>
GS	glomeruläre Schicht
KHK	koronare Herzkrankheit
KS	Körnerzellschicht
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
LV	lateraler Ventrikel
2- MeSATP	2-Methylthioadenosintriphosphat
MOB	<i>main olfactory bulb</i>
MS	Mitralzellschicht
NGS	<i>normal goat serum</i>
NO	Stickstoffmonoxid
OB	olfaktorischer Bulbus
OBP	Odorantien-bindende Proteine
OE	olfaktorisches Epithel
ON	<i>olfactory nerve</i> , olfaktorischer Nerv
ORN	olfaktorische Rezeptorneurone
PC	<i>principal cavity</i>
PNS	peripheres Nervensystem
PVZ	periventrikuläre Zone

RMS	rostraler migratorischer Strom
ROI	<i>region of interest</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SVZ	subventrikuläre Zone
XOR1/2	<i>Xenopus olfactory receptor</i>
VNO	Vomeronasalorgan (Jacobson'sches Organ)
ZNS	zentrales Nervensystem

8. Literaturverzeichnis

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA et al. (2006): International Union of Pharmacology. Update and subclassification of the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58, 281 – 341

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009): Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 32, 19-29

Allison AC (1953): The morphology of the olfactory system in the vertebrates. *Biol Rev* 28,195–244

Allison AC, Warwick RTT (1949): Quantitative observations on the olfactory system of the rabbit. *Brain* 72, 186-197

Altman J, Das GD (1965): Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124(3), 319–335

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

Alvarez-Buylla A (1997): Mechanism of migration of olfactory bulb interneurons. *Semin Cell & Developmental Biology*, 8, 207–213

Axel R (1995): The molecular logic of smell. *Scientific American*, 273, 4, 154–159

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. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Bo X, Zhang Y, Nassar M, Burnstock G, Schoepfer R (1995): A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett* 375, 129-133

Bogdanov YD, Dale L, King BF, Whittock N, Burnstock G (1997): Early expression of a novel nucleotide receptor in the neural plate of *Xenopus* embryos. *J Biol Chem* 272, 12583-12590

Bonfanti L, Peretto P (2007): Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone. *Prog Neurobiol* 83, 24-36

Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D (1994): New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature (Wash DC)* 371, 519–523. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Nature-Verlags.

Brennan PA, Zufall F (2006): Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 444, 308-315

Brunjes PC, Borrer MJ (1983): Unilateral odor deprivation: differential effect due to time of onset. *Brain Res Bull* 11, 501-503

Buck L, Axel R (1991): A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175-187

Buell G, Michel AD, Lewis C, Collo G, Humphrey PP, Surprenant A (1996): P2X₁ receptor activation in HL60 cells. *Blood* 87, 2659–2664

Burnstock G (1972): Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24, 509–581

Burnstock, G (2002): Purinergic signalling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 364–373

Burnstock G (2003): Purinergic receptors in the nervous system. In: *Current Topics in Membranes. Purinergic Receptors and Signalling*. Academic Press, 54, 307–368

Burnstock G and Knight GE (2004): Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240, 31–304

Burnstock G (2006): Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signalling. *Pharmacol Rev* 58, 58–86

Burnstock G (2007): Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87, 659-797

Burnstock G: A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub R, Bolis L (Hrsg): *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. Raven Press, New York 1978, 107–118

Butt AM (2006): Neurotransmitter-mediated calcium signaling in oligodendrocyte physiology and pathology. *Glia* 54, 666–675

Byrd CA, Burd GD (1991): Development of the olfactory bulb in the clawed frog, *Xenopus laevis*: a morphological and quantitative analysis. *J Comp Neurol* 314, 79-90.

Chang K, Hanaoka K, Kumada M, Takuwa Y (1995): Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor. *J Biol Chem (Tokyo)* 270, 26152–26158

Chen Y, Getchell ML, Ding X, Getchell TV (1992): Immunolocalization of two cytochrome isoenzymes in rat nasal chemosensory tissue. *Neuroreport* 3, 749-752

Chow SC, Kass GE, Orrenius S (1997): Purines and their roles in apoptosis. *Neuropharmacology* 36, 1149-1156

Collo G, North R A, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, and Buell G (1996): Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and

properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J. Neurosci.* 16, 2495-2507

Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North R A, and Buell G (1997): Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36, 1277-1283

Communi D, Motte S, Boeynaems J-M, Piroton S (1996): Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor. *Eur J Pharmacol* 317, 383–389

Czesnik D, Rössler W, Kirchner F, Gennerich A, Schild D (2003): Neuronal representation of odourants in the olfactory bulb of *Xenopus laevis* tadpoles. *European Journal of Neuroscience* 17, 113–118. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

Deeb J, Shah M, Muhammed N, Gunasekera R, Gannon K, Findley LJ, Hawkes CH (2010): A basic smell test is as sensitive as a dopamine transporter scan: comparison of olfaction, taste and DaTSCAN in the diagnosis of Parkinson's disease. *QJM* 103, 941-952

Deems DA, Doty RL, Settle RG, Moore-Gillon V, Shaman P, Mester AF, Kimmelman CP, Brightman VJ, Snow J (1991): Smell and taste disorders: a study of 750 patients from the University of Pennsylvania Smell and Taste Center. *Arch. Otorhinolaryngol. Head Neck Surg* 117, 519-528

Deitmer JW, Schild D (2000): Ca und ph: Ionenmessungen in Zellen und Geweben. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2000

Ding X, Coon MJ (1988): Purification and characterization of two unique forms of cytochrome P-450 from rabbit nasal microsomes. *Biochemistry* 27, 8330–8337

Di Virgilio F, Chiozzi P, Falzoni S, Ferrari D, Sanz JM, Venketaraman V, Baricordi OR (1998): Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ* 5, 191-199

Doengi M, Deitmer JW, Lohr C (2008): New evidence for purinergic signaling in the olfactory bulb: A2A and P2Y1 receptors mediate intracellular calcium release in astrocytes. *FASEB J* 22, 2368-2378

Dunn PM and Blakeley AGH (1988): Suramin: A reversible P2-purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens. *Br J Pharmacol* 93, 243–245

Elsaesser R, Paysan J (2007): The sense of smell, its signalling pathways, and the dichotomy of cilia and microvilli in olfactory sensory cells. *BMC Neuroscience* 8, 1

Endo T, Yoshino J, Kado K, Tochinai S (2007): Brain regeneration in anuran amphibians. *Dev Growth Differ* 49, 121-129

Engström B, Ekblom A, Hansson P (1989): The olfactory and respiratory epithelium in rhesus and squirrel monkeys studied with freeze-fracture technique. *Acta Otolaryngol* 108, 259-267

Ennis M, Zimmer LA, Shipley MT (1995): Long term potentiation of NMDA-mediated responses at the primary olfactory synapse. *Soc Neurosci Abstr* 21, 1812

Evans RJ, Kennedy C (1994): Characterisation of P2-purinoceptors in the smooth muscle of the rat tail artery: A comparison between contractile and electrophysiological responses. *Br J Pharmacol* 113, 853–860

Fiacco TA, McCarthy KD (2006): Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling. *Glia* 54, 676–690

Fields RD, Stevens B (2000): ATP in signaling between neurons and glia. *Trends Neurosci* 23, 625–633

Fields RD, Burnstock G (2006): Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7, 423-436

Filoni S, Bernardini S, Cannata SM (1995): Differences in the decrease in regenerative capacity of various brain regions of *Xenopus laevis* are related to differences in the undifferentiated cell populations. *J Hirnforsch* 36, 523-529

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

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

Gachet C (2001): ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 86, 222–232

Gage FH (2000): Mammalian Neural Stem Cells, *Science* 287, 1433 – 1438

Gayle S, Burnstock G (2005): Immunolocalisation of P2X and P2Y nucleotide receptors in the rat nasal mucosa; *Cell Tissue Res* 319, 27–36

Genzen JR, Platel JC, Rubio ME, Bordey A (2009): Ependymal cells along the lateral ventricle express functional P2X7 receptors. *Purinergic Signal* 5, 299-307

Gilfillan AM, Hollingsworth M, Jones AW (1983): The pharmacological modulation of [3H]-disaturated phosphatidylcholine overflow from perfused lung slices of adult rats: a new method for the study of lung surfactant secretion. *Br J Pharmacol* 79(2), 363–371

Guo W, Xu X, Gao X, Burnstock G, He C, Xiang Z (2008): Expression of P2X5 receptors in the mouse CNS. *Neuroscience* 156, 673-692

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.

Hassenklöver T, Kurtanska S, Bartoszek I, Junek S, Schild D, Manzini I (2008): Nucleotide-induced Ca²⁺ signaling in sustentacular supporting cells of the olfactory epithelium. *Glia* 56, 1614-1624

Hassenklöver T, Schwartz P, Schild D, Manzini, I (2009): Purinergic signaling regulates cell proliferation of olfactory epithelium progenitors, *Stem Cells* 27, 2022–2031

Hassenklöver T, Schulz P, Peters A, Schwartz P, Schild D, Manzini I (2010): Purinergic receptor mediated Ca²⁺ signaling in the olfactory bulb and neurogenic area of the lateral ventricles. *Purinergic signaling* 6, 429–445

Hatt H: Geschmack und Geruch; in: *Physiologie des Menschen*; Hrsg. Schmidt RF, Thews G, Lang F u.a.; Springer Verlag, Berlin 2000, 322. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags.

Hegg CC, Greenwood D, Huang W, Han P, Lucero MT (2003): Activation of Purinergic Receptor Subtypes Modulates odor Sensitivity *J Neurosci* 23, 8291–8301

Hofmann MH, Meyer DL (1991): Functional subdivisions of the olfactory system correlate with lectin-binding properties in *Xenopus*. *Brain Res* 564, 344-347

Hogg RC, Chipperfield H, Whyte KA, Stafford MR, Hansen MA, Cool SM, Nurcombe V, Adams DJ (2004): Functional maturation of isolated neural progenitor cells from the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 19, 2410–2420

Humphrey PPA, Buell G, Kennedy I, Khakh BS, Michel AD, Surprenant A, Trezise DJ (1995): New insights on P2X purinoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 352, 585–596

- Jacob SW, Herschler R** (1986): Pharmacology of DMSO. *Cryobiology* 23, 14-27
- Jahr CE, Nicoll RA** (1980): Primary afferent depolarization in the in vitro frog olfactory bulb *J Physiol* 318, 375-384
- Jahr CE, Nicoll RA** (1982): An intracellular analysis of dendrodendritic inhibition in the turtle in vitro olfactory bulb. *J Physiol* 326, 213-234
- Kanjhan R, Housley GD, Burton LD, Christie DL, Kippenberger A, Thorne P R, Luo L, Ryan AF** (1999): Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 407, 11–32
- Kaplan MS, Hinds JW** (1977): Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197, 1092-1094
- Kaslin J, Ganz J, Brand M** (2007): Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 101-122
- Keverne EB** (1999): The vomeronasal organ. *Science* 286, 716-720
- Khakh BS, Surprenant A, Humphrey PPA** (1995): A study on P2X purinoceptors mediating the electrophysiological and contractile effects of purine nucleotides in rat vas deferens. *Br J Pharmacol* 115, 177–185
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North R A, Seguela P, Voigt M, Humphrey PP** (2001): International union of pharmacology. XX IV Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 53, 107–118
- Klein SL, Graziadei PP** (1983): The differentiation of the olfactory placode in *Xenopus laevis*: a light and electron microscope study. *J Comp Neurol* 217, 17-30

Kramer M (1933): Untersuchungen über die Sinnesleistungen und das Orientierungsverhalten von *Xenopus laevis*. Zool Jahrb Abt Allg Zool Physiol 52, 629-676

Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009): The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. Annu Rev Neurosci 32, 149-184

Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, Zimmermann H (2008): Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. Cell Tissue Res 334, 199-217

Lê KT, Villeneuve P, Ramjaun AR, McPherson PS, Beaudet A, Séguéla P (1998): Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. Neuroscience 83, 177-190

Leinders-Zufall T, Lane AP, Puche AC, Ma W, Novotny MV, Shipley MT (2000): Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. Nature 405, 792-796

Lledo PM, Gheusi G, Vincent JD (2005): Information processing in the mammalian olfactory system. Physiol Rev 85, 281-317

Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996): Chain migration of neuronal precursors. Science 271, 978-981

Malmsjö M, Edvinsson L, Erlinge D. (2000): P2X receptors counteract the vasodilatory effects of endothelium derived hyperpolarising factor. Eur J Pharmacol 390, 173–180

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

Marcoli M, Cervetto C, Paluzzi P, Guarnieri S, Alloisio S, Thellung S, Nobile M, Maura G (2008): P2X₇ pre-synaptic receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals: a role in ATP-induced glutamate release. *Journal of Neurochemistry* 105, 2330–2342

Meisami E, Bhatnagar KP (1998): Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microsc Res Tech* 43, 476–499

Meredith M (2001): Human Vomeronasal Organ Function: A Critical Review of Best and Worst Cases. *Chem Senses* 26, 433–44

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

Mezler M, Fleischer J, Breer H (2001): Characteristic features and ligand specificity of the two receptor classes from *Xenopus laevis*. *J Exp Biol* 204, 2987–2997

Meyer DL, Jadhao AG, Bhargava S, Kicliter E (1996): Bulbar representation of the “water-nose” during *Xenopus* ontogeny. *Neurosci Lett* 220, 109–112

Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Govindarajan R, Kuriakose SV, Prasad MNV (2006): Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monniera*. *Plant Physiol Biochem* 44, 25–37

Miwa T, Furukawa M, Tsukatani T, Costanzo M, DiNardo LJ, Reiter ER (2001): Impact of olfactory impairment on quality of life and disability. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127, 497–503

Monti-Bloch L, Jennings-White C, Dolberg DS, Berliner DL (1994): The human vomeronasal system. *Psychoneuroendocrinology*, 19, 673–686

Motte S, Communi D, Piroton S, Boeynaems JM (1995): Involvement of multiple receptors in the actions of extracellular ATP: the example of vascular endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 27, 1–7

Munger S, Leinders-Zufall T, Zufall F (2009): Subsystem Organisation of the Mammalian Sense of Smell. *Annual Review Physiol* 71, 115-140

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*, *The Journal of Comparative Neurology* 464, 257–268

Nieuwkoop and Faber (1994) *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*, Garland Publishing Inc, New York 1994

Nörenberg W, and Illes P (2000): Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362, 324–339

Nowycky MC, Mori K, Shepherd GM (1981): GABAergic mechanisms of dendrodendritic synapses in isolated turtle olfactory bulb. *J Neurophysiol* 46, 639-648

Pelosi P (1996): Perireceptor events in olfaction. *J Neurobiol* 30, 3-19

Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB (2001 a): Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol* 172, 1–16

Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ and Luskin MB (2001 b): Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21, 6706–6717

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

Price JL, Powell TP (1970a): An experimental study of the origin and the course of the centrifugal fibres to the olfactory bulb in the rat. *J Anat* 107, 215-237

Price JL, Powell TP (1970b): The afferent connexions of the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band. *J Anat* 107 239–256

Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Narravo M (2006): Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol* 494, 415–434

Ralevic V: Roles of purines and pyrimidines in endothelium. In: Abbracchio MP, Williams M, Purinergic and Pyrimidines in Endothelium. Berlin, Germany: Springer 2001, 101–120

Ralevic und Burnstock (1998): Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50(3), 413-92

Rall W, Shepherd GM, Reese TS, Brightman MW (1966): Dendrodritic synaptic pathway for inhibition in the olfactory bulb. *Exp Neurol* 14, 44-56.

Rauci F, Di Fiore MM, Pinelli C, D'Aniello B, Luongo L, Polese G, Rastogi RK (2006): Proliferative activity in the frog brain: a PCNA-immunohistochemistry analysis. *J Chem Neuroanat* 32, 127-42

Reiss JO, Burd GD (1997): Cellular and molecular interactions in the development of the *Xenopus laevis* olfactory system. *Semin Cell Dev Bio* 8, 171-179

Rice WR (1990): Effects of extracellular ATP on surfactant secretion. *Ann. NY Acad Sci* 603, 64-74

Rice WR, Singleton FM (1986): P2-purinoceptors regulate surfactant secretion from rat isolated alveolar Type II cells. *Br J Pharmacol* 89, 485-491

Rice WR, Singleton FM (1987): P2Y-purinoceptor regulation of surfactant secretion from rat isolated alveolar type II cells is associated with mobilization of intracellular calcium. *Br J Pharmacol* 91, 833–838

Rieger A, Deitmer JW, Lohr C (2007): Axon-glia communication evokes calcium signaling in olfactory ensheathing cells of the developing olfactory bulb. *Glia* 55, 352–359

Robaye B, Boeynaems J-M, Communi D (1997): Slow desensitization of the human P2Y6 receptor. *Eur J Pharmacol* 329, 231–236

Rousse I, Robitaille R (2006): Calcium signaling in Schwann cells at synaptic and extra-synaptic sites: active glial modulation of neuronal activity. *Glia* 54, 691–699

Royet JP, Souchier C, Jourdan F, Ploye H (1988): Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *J Comp Neural* 270, 559-568.

Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro N, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-García Verdugo J et al (2004): Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427, 740–744

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

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

Schwiebert EM, Zsembery A, Geibel JP (2003): Cellular mechanisms and physiology of nucleotide and nucleoside release from cells: current knowledge, novel assays to detect purinergic agonists, future directions. *Curr Top Membr* 54, 31–58

Shepherd GM (1972): Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev* 52, 864-917

Shiple MT, Ennis M (1996): Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol* 30, 123-176

Sim JA, Young MT, Sung HY, North RA, Surprenant A (2004): Reanalysis of P2X7 receptor expression in rodent brain. *J Neurosci* 24, 6307-6314

Simon J, Webb TE, Barnard EA (1997): Distribution of [35S]dATP alpha S binding site in the adult rat neuraxis. *Neuropharmacology* 36, 1243-1251

Soto F, Garcia-Guzman M, Karschin C, Stühmer W (1996): Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 223, 456-460

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

Taupin P (2007): BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev* 53, 198-214

Temmel AF, Quint C, Schickinger-Fischer B, Klimek L, Stoller E, Hummel T (2002): Characteristics of olfactory disorders in relation to major causes of olfactory loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128, 635-641

Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A (2003): Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex* 13, 580-587

Trinh K, Storm DR (2004): Detection of odorants through the main olfactory epithelium and vomeronasal organ of mice. *Nutr Rev* 62, 189-192

Vahlensieck U, Boknik P, Knapp J, Linck B, Müller FU, Neumann J, Herzig S, Schlüter H, Zidek W, Deng MC, Scheld HH, Schmitz W (1996): Negative chronotropic and ionotropic effects exerted by diadenosine hexaphosphate (Ap6A) via A1-adenosine receptors. *Br J Pharmacol* 119, 835–844

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

Vulchanova L, Arvidsson U, Riedl M, Wang J, Buell G, Surprenant A, North R A, Elde R (1996): Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 8063-8067

Webb TE, Kaplan MG, Barnard EA (1996): Identification of 6H1 as a P2Y purinoceptor: P2Y5. *Biochem Biophys Res Commun* 219, 105–110

Wellis DP, Kauer JS (1993): GABA_A and glutamate receptor involvement in dendrodendritic synaptic interactions from salamander olfactory bulb. *J Physiol* 469, 315-339

White EL (1972): Synaptic organization in the olfactory glomerulus of the mouse. *Brain Research* 37, 69–80.

Wong KK, Muller ML, Kuwabara H, Studenski SA, Bohnen NI (2010): Olfactory loss and nigrostriatal dopaminergic denervation in the elderly. *Neurosci Lett* 484, 163-167

Worthington RA, Arumugam TV, Hansen MA, Balcar VJ, Barden JA (1999): Identification and localisation of ATP P2X receptors in rat midbrain. *Electrophoresis* 20, 2077-2080

Yang H, Shi P, Zhang YP, Zhang J (2005): Composition and evolution of the V2r vomeronasal receptor gene repertoire in mice and rats. *Genomics* 86, 306–15

Yu Y, Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Inoue K, Kyaw Nyunt A, Umemura A, Mase M, Yamada K, Shimada S (2008): Cellular localization of P2X₇ receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res* 1194, 45-55

Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH (2006): Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26, 3-11

Zimmermann H (2000): Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362, 299–309

Zimmermann H (2006): Nucleotide signaling in nervous system development: *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 452, 573–588

Zufall F, Leinders-Zufall T (2007): Mammalian pheromone sensing. *Curr Opin Neurobiol* 17, 483-489

Danksagung

Ich hätte diese Arbeit ohne die Hilfe zahlreicher Personen weder beginnen noch zu Ende bringen können. Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Dr. Schild bedanken, der mir die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Arbeit geboten hat. Vielen Dank für die vertrauensvolle Zusammenarbeit!

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinem Betreuer Dr. Ivan Manzini bedanken. Er stand mir während der letzten Jahre immer mit Rat und Tat zur Seite und hat mir aus so mancher Krise geholfen.

Auch bei allen anderen Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Neurophysiologie und Biophysik möchte ich mich bedanken: André, Arnaud, Arwed, Belle, Dirk, Esther, Franziska, Gudrun, Howard, Josko, Lars, Saskia, Sebastian, Stefanie, Stephan, Tsai-Wen und natürlich Thomas Hassenklöver, der mir in meinem täglichen Kampf mit der EDV zur Seite stand.