

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

**Physiologische und morphologische Charakterisierung des
dopaminergen Systems in der olfaktorischen Peripherie von
Xenopus-laevis-Larven**

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

vorgelegt von

Valentin Alexander Schriever

aus Langen

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

- | | | |
|-----|------------------------|--|
| I. | Berichterstatter: | Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. D. Schild |
| II. | Berichterstatter/ -in: | Prof. Dr. med. M. Sommer |

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie und Physiologie des olfaktorischen Systems.....	1
1.1.1 Das olfaktorische Epithel.....	3
1.1.2 Olfaktorische Rezeptorneurone.....	4
1.1.3 Stützzellen.....	4
1.1.4 Basalzellen.....	5
1.2 Transduktion und Transformation der olfaktorischen Information.....	5
1.2.1 Die cAMP-vermittelte Signalkaskade.....	6
1.3 Nervus olfactorius.....	7
1.4 Bulbus olfactorius.....	8
1.5 Modulation der peripheren Geruchsverarbeitung.....	8
1.6 Das dopaminerge System.....	9
1.7 Olfaktorische Dysfunktionen bei neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen.....	11
1.7.1 Medikamentöse Behandlung dopaminerger Störungen.....	11
1.8 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Das Versuchstier <i>Xenopus laevis</i>	14
2.1.1 Das olfaktorische System von <i>Xenopus laevis</i>	15
2.1.2 Haltung und Aufzucht.....	17
2.2 Kalzium-Imaging.....	17
2.2.1 Kalzium-sensitiver Farbstoff.....	18
2.2.2 Konfokale Lasermikroskopie.....	19
2.3 Chemikalien.....	21
2.3.1 Zusammensetzung der Ringer _{XL} -Lösung.....	21
2.3.2 Duftstoffe.....	21

2.3.3 Drogen.....	23
2.4 Versuchsvorbereitungen.....	24
2.4.1 Herstellung der Fluoreszenzfarbstofflösung.....	24
2.4.2 Gewebepräparation.....	24
2.5 Versuchsaufbau.....	26
2.6 Auswertung der Kalzium-Imaging-Experimente.....	28
2.7 Immunhistochemie.....	29
2.7.1 Anfertigung von Schnitten.....	29
2.7.2 Durchführung der Färbungen.....	30
2.7.3 Doppelfärbung.....	31
2.7.4 Färbung der Olfaktorischen Ensheathing Glia.....	31
2.7.5 Auswertung der immunihistochemischen Färbungen.....	32
3 Ergebnisse.....	33
3.1 Antwort der ORN auf Aminosäuren.....	33
3.2 Dopamin moduliert die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN.....	35
3.3 Dopaminrezeptor-Spezifisierung.....	41
3.3.1 Quinpirol moduliert die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN.....	41
3.3.2 Sulpirid antagonisiert den dopaminergen Effekt.....	42
3.4 Erweiterte Dopamin-Experimente.....	44
3.5 Antipsychotika modulieren die Antwort der ORN.....	47
3.5.1 Modulatorische Effekte von Chlorpromazin auf die ORN.....	47
3.5.2 Modulatorische Effekte von Haloperidol auf die ORN.....	49
3.5.3 Modulatorische Effekte von Sulpirid auf die ORN.....	50
3.6 Ergebnisse der Messung des Grundkalziums der ORN.....	55
3.7 Immunhistochemische Färbungen der olfaktorischen Mukosa.....	58
3.7.1 Färbung des Dopamin-D2-Rezeptors im olfaktorischen Epithel.....	58
3.7.2 Färbungen gegen die Tyrosinhydroxylase in der olfaktorischen Mukosa.....	60

3.8 Immunhistochemische Färbungen des Nervus olfactorius.....	61
3.8.1 Färbungen des Dopamin-D2-Rezeptors im Nervus olfactorius.....	62
3.8.2 Färbungen gegen die Tyrosinhydroxylase im Nervus olfactorius.....	63
3.8.3 Spezifizierung der Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen.....	64
3.9 Dopamin-D2-Rezeptor Subtypen.....	66
4 Diskussion.....	67
4.1 Bisherige Arbeiten über das dopaminerge System in der olfaktorischen Peripherie.....	67
4.2 Dopaminerge Modulation.....	68
4.3 Dopaminrezeptor-Spezifizierung.....	69
4.4 Dopamin vermindert die Sensitivität der ORN.....	70
4.5 Einfluss der Antipsychotika auf das olfaktorische System.....	71
4.6 Wirkung der Antipsychotika auf das Ruhekalzium.....	73
4.7 Dopamin-D2-Rezeptor-Lokalisation.....	75
4.8 Tyrosinhydroxylase-positive Zellen in der olfaktorischen Peripherie.....	76
5 Zusammenfassung.....	78
6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	79
7 Abkürzungsverzeichnis.....	81
8 Literaturverzeichnis.....	82

1 Einleitung

Welche Rolle der Geruchssinn in unserem alltäglichen Leben spielt, wird selten bewusst wahrgenommen (Frasnelli und Hummel, 2005; Hummel und Nordin, 2005). So sind ca. 5% der hiesigen Bevölkerung anosmisch (Damm et al., 2004; Landis et al., 2004). Im Vergleich dazu sind nur ca. 0,2 % der Bevölkerung blind. Somit könnte der Eindruck entstehen, dass der Geruchssinn für den Menschen wenig Bedeutung hat. Für viele Tiere ist der Geruchssinn lebensnotwendig. Viele Jahre wurde der Geruchssinn als niederer Sinn betrachtet (von Skramlik, 1926). Aus diesem Grund wurde die Erforschung des Geruchssinns lange gemieden. Erst in letzter Zeit wurde die Bedeutung dieses Sinnes erkannt. So ist das olfaktorische System einer der wenigen Orte, an denen sich auch beim Erwachsenen aus Stammzellen neue Neurone bilden (Whitman und Greer 2009). Dieser Aspekt ist für die Forschung von großem Interesse, da durch das olfaktorische System somit viel über die Neurogenese gelernt werden kann. Des Weiteren zeigen die olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) viele neuronale Eigenschaften (Borgmann-Winter et al., 2009). Dadurch manifestieren sich zentralnervöse Erkrankungen häufig auch in der olfaktorischen Peripherie (Haehner et al., 2007).

Die folgende Einleitung soll zum Verständnis dieser Dissertation eine kurze Übersicht über die Anatomie und Physiologie des olfaktorischen Systems geben.

1.1 Anatomie und Physiologie des olfaktorischen Systems

In den folgenden Abschnitten wird das olfaktorische System der Vertebraten beschrieben. Auf die Besonderheiten des olfaktorischen Systems von *Xenopus laevis* wird in späteren Abschnitten gesondert eingegangen.

Anatomisch besteht das olfaktorische System aus dem olfaktorischen Epithel, dem Nervus olfactorius, dem Bulbus olfactorius und kortikalen Regionen (Abb. 1-1). In Abbildung 1-1 ist das olfaktorische System schematisch dargestellt. Es sind das olfaktorische Epithel mit seinen Zellen, der Nervus olfactorius und die Strukturen des Bulbus olfactorius abgebildet. Besonders auf das olfaktorische Epithel und seine verschiedenen Zellen wird im Verlauf genauer eingegangen. Im olfaktorischen Epithel wird ein Geruchsstoff detektiert und die Information über den Nervus olfactorius zum Bulbus olfactorius geleitet. Hier wird die Information umgeschaltet und an höhere Zentren des Zentralnervensystems weitergeleitet, in denen dann eine weitere Verarbeitung der olfaktorischen Information stattfindet.

Neben diesem olfaktorischen System existiert noch das Vomeronasalorgan, welches zumindest in den meisten Tierspezies nachgewiesen werden konnte (Keverne, 1999). Es detektiert Pheromone und trägt unter anderem zur Fortpflanzung der jeweiligen Art bei. Ob beim Menschen ein funktionstüchtiges Vomeronasalorgan existiert, bleibt weiter umstritten (Monti-Bloch et al., 1994; Leinders-Zufall et al., 2000; Brennan, 2001; Meredith, 2001; Witt und Hummel, 2006).

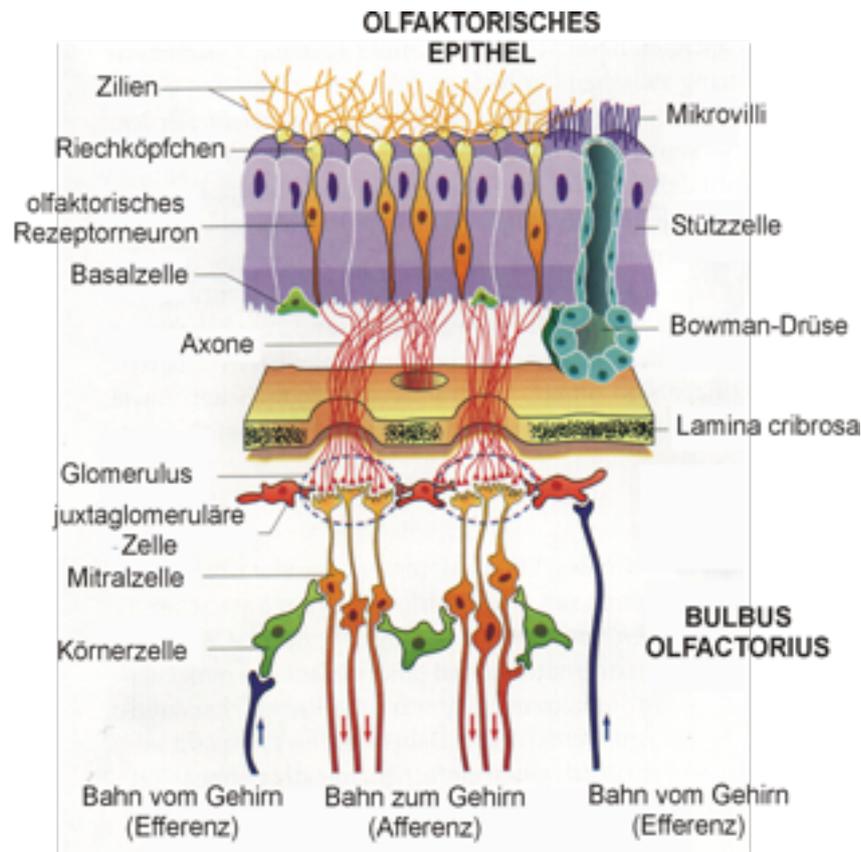


Abb. 1-1 Schematische Darstellung des olfaktorischen Systems

Die Abbildung zeigt die Bestandteile des olfaktorischen Systems. In der Peripherie liegt das olfaktorische Epithel mit den ORN. Die Axone der ORN ziehen durch die Lamina cribrosa und bilden den Nervus olfactorius. Im Bulbus olfactorius wird die olfaktorische Information auf die Mitralzellen verschaltet und an das Gehirn gesendet (modifiziert nach Hatt, 2000, S. 322).

1.1.1 Das olfaktorische Epithel

Das olfaktorische Epithel ist in der Peripherie des olfaktorischen Systems gelegen. Hier findet die Detektion der Geruchsstoffe statt. Im olfaktorischen Epithel befinden sich verschiedene Zelltypen, ORN, die olfaktorischen Vorläuferzellen (Basalzellen) und die Stützzellen. Im Folgenden werden diese Zellen genauer beschrieben.

Das olfaktorische Epithel ist laminär gegliedert (Abb. 1-1). Basal liegen die olfaktorischen Vorläuferzellen (Basalzellen), in der mittleren Schicht die ORN und apikal

sind die Somata der Stützzellen lokalisiert. Das olfaktorische Epithel wird von einer Schleimschicht, dem Mukus bedeckt, welcher von den Bowman-Drüsen produziert wird. Dieser Mukus spielt eine wichtige Rolle in der Geruchswahrnehmung (Hajjar et al., 2006). Des Weiteren enthält er verschiedene Proteine, die zum Schutz der Zellen des olfaktorischen Epithels beitragen (Debat et al., 2007).

1.1.2 Olfaktorische Rezeptorneurone

Die ORN sind bipolare Neurone mit einer Somagröße zwischen 7-21 μ m (Schild und Restrepo, 1998). Wie der Abb. 1-1 entnommen werden kann, liegen die Zellkörper der ORN in der mittleren Schicht des olfaktorischen Epithels. Basal besitzen die ORN ein Axon. Nach Durchtritt durch die Basalmembran des olfaktorischen Epithels bilden die Axonbündel der ORN den ersten Hirnnerven (Nervus olfactorius) (Harkema et al., 2006). Die ORN besitzen einen Dendriten, der sich apikal in ein Riechköpfchen aufweitet und sich bis in den Mukus erstreckt. Das Riechköpfchen ist mit fünf bis 40 Zilien besetzt (Weiß, 1986; Hatt, 2004). An diesen Zilien findet die Odoranzidetektion statt (Schild und Restrepo, 1998), da hier die olfaktorischen Rezeptoren lokalisiert sind.

1.1.3 Stützzellen

Die Stützzellen liegen zwischen den ORN im olfaktorischen Epithel. Dadurch werden die ORN physikalisch und chemisch voneinander getrennt (Breipohl et al., 1974). Die Stützzellen des olfaktorischen Epithels haben Eigenschaften von Mikroglia wie auch von Makroglia (Okano und Takagi, 1974; Getchell TV, 1977). Zu den Funktionen der Stützzellen gehört die Regulation der extrazellulären Ionenzusammensetzung (Breipohl et al., 1974; Getchell ML und Getchell TV, 1992) wie die Phagozytose von Fremdkörpern und abgestorbenen Zellen (Suzuki et al., 1996). Eine weitere Aufgabe der Stützzellen ist

die Sekretion von Schleim (Getchell ML und Mellert, 1991 Hansen et al.; 1998). Es wird eine Beteiligung der Stützzellen an der intraepithelialen Signalverarbeitung vermutet (Hassenklöver et al., 2008).

1.1.4 Basalzellen

Das olfaktorische Epithel ist auf Grund seiner exponierten Lage anfällig für Schädigungen, wie z.B. chemische Noxen oder auch Infektionen durch Viren oder Bakterien. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass eine Regeneration der geschädigten Zellen sichergestellt ist. Diese Aufgabe kommt den Basalzellen zu. Die Basalzellen sind die Stammzellen des olfaktorischen Epithels. Sie sind an der Lamina propria des olfaktorischen Epithels basal lokalisiert und nehmen eine runde bis kegelförmige Gestalt an (Calof et al., 2002). Aus den Basalzellen werden sowohl ORN wie auch Stützzellen gebildet. Die Lebenszeit von ORN beträgt durchschnittlich 30-60 Tage (Buck, 1996). Aus diesem Grund spielen die Basalzellen eine wichtige Rolle in der Erhaltung des olfaktorischen Epithels und seiner Funktion (Ronnett und Moon, 2002).

1.2 Transduktion und Transformation der olfaktorischen Information

Damit ein Geruchsstoff wahrgenommen werden kann, muss eine Interaktion zwischen Geruchsstoff und olfaktorischem Rezeptor an den Zilien der ORN stattfinden. Diese Rezeptoren gehören zur Klasse der Siebentransmembran-Rezeptoren (Ronnett und Moon, 2002). Die Genfamilie der olfaktorischen Rezeptoren stellt die größte bekannte Genfamilie dar. Die Maus besitzt zwischen 1000 und 1300 Rezeptorgene (Zhang und Firestein, 2002). Der Mensch besitzt etwa 1000 Rezeptorgene, von denen jedoch 3/5 Pseudogene sind. Somit kann der Mensch etwa 300-350 olfaktorische Rezeptoren exprimieren (Sharon et al., 1999; Fuchs et al., 2002). Die olfaktorischen Rezeptoren

werden in zwei Klassen eingeteilt. Klasse-I-Rezeptoren werden von Fischen, und Amphibien exprimiert (daher der Name „fish-like receptors“). Klasse-II-Rezeptoren werden überwiegend von Tetrapoden exprimiert. Jedes ORN exprimiert nur einen Rezeptortyp (Ressler et al., 1993; Malnic et al., 1999; Serizawa et al., 2004).

Die olfaktorischen Rezeptoren sind intrazellulär an ein G-Protein gekoppelt. Bei der Bindung eines Geruchsstoffes beugt der olfaktorische Rezeptor eine Konformationsänderung. Dabei wird das G-Protein aktiviert und eine intrazelluläre Signalkaskade über einen sekundären Botenstoff (second messenger) ausgelöst. Für ORN ist die Signaltransduktion über den sekundären Botenstoff zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) am besten beschrieben (Pace et al., 1985; Belluscio et al., 1998; Gold, 1999; Wong et al., 2000). Ein weiterer beschriebener Transduktionsweg in ORN ist die Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃)-Signalkaskade (Schild und Restrepo, 1998; Holy et al., 2000). Hierbei wirken IP₃ und Diacylglycerol als sekundäre Botenstoffe und führen über weitere Schritte zur Öffnung von Ionenkanälen (Schild und Restrepo, 1998; Spehr et al., 2002). Durch diese Mechanismen entsteht in den ORN ein Rezeptorpotential. Die Stärke des Reizes wird durch die Höhe des Rezeptorpotentials vermittelt. Am Übergang zwischen Soma und Axon wird das Rezeptorpotential in Aktionspotentiale umgewandelt und in dieser Form an den Bulbus olfactorius weitergeleitet (Hatt, 2004; Rawson und Yee, 2006).

1.2.1 Die cAMP-vermittelte Signalkaskade

Die Kopplung des olfaktorischen Rezeptors an das G_{olf}-Protein führt bei Odoranzienbindung zur Bildung von cAMP aus ATP durch die Adenylatcyclase (Schild und Restrepo, 1998). Das gebildete cAMP bindet an CNG-Ionenkanäle, die sich dadurch öffnen (Dhallan et al., 1990). Durch die Öffnung der Kanäle steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration, was zu einer Depolarisation der Zelle führt. Die Depolarisation wird durch einen Chloridausstrom über Kalzium-aktivierte Chloridkanäle verstärkt

(Schild und Restrepo, 1998). Abb. 1-2 zeigt eine schematische Darstellung dieses Mechanismus. Es ist der Abbildung zu entnehmen, wie die Bindung eines Duftstoffes über das G-Protein zur Öffnung der CNG-Kanäle und damit zum Einstrom von Natrium- und Kalziumionen führt.

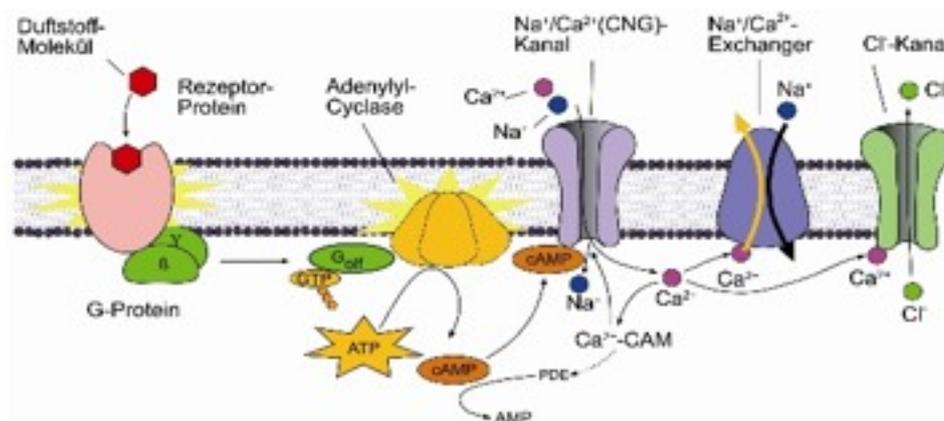


Abb. 1-2 Schematische Darstellung des cAMP-assoziierten Transduktionsvorganges in einem olfaktorischen Rezeptorneuron (modifiziert nach Witt und Hansen 2008, S. 19).

1.3 Nervus olfactorius

Der Nervus olfactorius besteht im Wesentlichen aus den Axonen der ORN. Diese Axone werden von Gliazellen, den *olfactory ensheathing glia* (OEG) ummantelt. Die Axone werden dadurch voneinander isoliert, was für die Signalübertragung nötig ist.

Die OEG haben sowohl Eigenschaften von peripheren Schwannzellen wie auch von Astrozyten des Zentralnervensystems (Chuah und West, 2002; Wewetzer et al., 2002; Barnett, 2004). Ihre Aufgabe im Nervus olfactorius besteht darin, die Ionenkonzentrationen in der Extrazellulärsubstanz um die Axone möglichst ausgeglichen zu halten. Eine weitere Aufgabe besteht darin, die Axone der

heranwachsenden ORN vom olfaktorischen Epithel zum Bulbus olfactorius zu führen (Franssen et al., 2007). Sie sezernieren bestimmte Faktoren, die für das Wachstum von Nervenzellen nötig sind (Chuah und West, 2002).

1.4 Bulbus olfactorius

Die gebündelten Axone der ORN erreichen als Nervus olfactorius den Bulbus olfactorius, welcher sich in den Bulbus olfactorius principalis und in den Bulbus olfactorius accessorius aufteilt. Der Bulbus olfactorius accessorius ist vor allem für die Verschaltung der ORN aus dem Vomeronasalorgan zuständig. Der Bulbus olfactorius gliedert sich in die beim ZNS üblichen sechs Schichten, von rostral nach kaudal: Nervenschicht, glomeruläre Schicht, externe plexiforme Schicht, Mitralzellschicht, interne plexiforme Schicht und Körnerzellschicht.

In der glomerulären Schicht liegen die Glomeruli, in denen die ORN auf das zweite Neuron, die Mitralzellen, umgeschaltet werden. Mehrere ORN, die den gleichen Rezeptor exprimieren, konvergieren auf eine Mitralzelle. So entsteht im Bulbus olfactorius eine chemotope Ordnung (Friedrich und Korsching, 1997; Friedrich und Korsching, 1998). In den weiter kaudal gelegenen Schichten wird die Geruchsinformation bereits moduliert, bevor sie an höhere Zentren des Zentralnervensystems weitergeleitet wird. Die Amygdala ist eines dieser Zentren, was erklärt, warum Geruch mit Emotion in Verbindung steht. Für eine detaillierte Beschreibung der zentralen Geruchsverarbeitung siehe Gottfried (2006).

1.5 Modulation der peripheren Geruchsverarbeitung

Wie oben beschrieben findet im Bulbus olfactorius und in höheren zerebralen Zentren eine komplexe Verarbeitung der Geruchsinformation statt. Die Modulation dieser Information beginnt jedoch schon im olfaktorischen Epithel. Es konnte gezeigt werden,

dass verschiedene Neurotransmitter, Neuromodulatoren und Hormone die Transduktion und Transformation der ORN beeinflussen. So beeinflussen zum Beispiel das Hormon GnRH (Eisthen et al., 2000; Park und Eisthen, 2003), Dopamin (Vargas und Lucero, 1999; Hegg und Lucero, 2004) und Cannabinoide (Czesnik et al., 2007; Breunig et al., 2010a; Breunig et al., 2010b) die Informationsverarbeitung in den ORN.

Hegg und Lucero (2004) haben den Einfluss von Dopamin auf die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN in Mäusen untersucht. Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe der Kalzium-Imaging-Methode angestellt. Sie konnten zeigen, dass unter dem Einfluss von $50\mu\text{M}$ Dopamin der Kalziumanstieg in den ORN auf einen Reiz hin deutlich verringert war. Dieser Effekt war nach dem Entfernen der Droge wieder reversibel. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Effekt wahrscheinlich auf der Blockade des L-typ-Kalziumkanals beruht, da der dopaminerge Effekt durch den Kalziumkanalblocker Nifedipin aufgehoben werden konnte. Weiter konnte der dopaminerge Effekt durch den Dopamin-D2-Rezeptor-Antagonisten Sulpirid aufgehoben werden. Hegg und Lucero kamen deswegen zu dem Schluss, dass der dopaminerge Effekt in ORN der Maus über den Dopamin-D2-Rezeptor vermittelt wird.

1.6 Das dopaminerge System

Dopamin ist ein Neurotransmitter und Neuromodulator. Es gehört zu den biogenen Aminen. Der Ausgangsstoff der Dopaminsynthese ist die Aminosäure L-Tyrosin, aus der auch die biogenen Amine Adrenalin und Noradrenalin synthetisiert werden. Ein wichtiges Enzym der Synthese ist die Tyrosinhydroxylase (TH), die L-Tyrosin in L-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) umwandelt. Dopamin spielt im Zentralnervensystem eine wichtige Rolle. Im Zentralnervensystem sind vor allem zwei Regionen besonders reich an dopaminergen Neuronen - die Substantia nigra und die Area tegmentalis ventralis. Deswegen wird hier von zwei zentralen Dopaminsystemen gesprochen. Zum einen handelt es sich dabei um das mesolimbische Dopaminsystem, das eine hohe

Aktivität bei Emotionen wie Lust und Freude zeigt (Bertolucci-D'Angio et al., 1990). Die Dopaminausschüttung im mesolimbischen System kann durch Stoffe wie Ethanol, Nikotin oder Morphin gesteigert werden, was zur Suchtentstehung beiträgt (Herz, 1998; Shearman et al., 2008; Soderpalm et al., 2009). Das zweite ist das nigrostriatale Dopaminsystem, welches maßgeblich die extrapyramidale Motorik beeinflusst. Dies wird deutlich, wenn es beim Morbus Parkinson zu einem Untergang der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra kommt. Auch im olfaktorischen System hat Dopamin einen Effekt. So konnte gezeigt werden, dass im olfaktorischen Bulb dopaminerge Neurone lokalisiert sind (Hoogland und Huisman, 1999; Boyd und Delaney, 2002), welche auch bei Morbus Parkinson verändert sind (Huisman et al., 2004; Huisman et al., 2008). Dopamin bindet an den Zielzellen an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die Dopaminrezeptoren werden in zwei Klassen eingeteilt. Die Dopamin-D1-artigen Rezeptoren: Dazu gehören der Dopamin-D1- und -D5-Rezeptor, welche mit einem stimulatorischen G-Protein gekoppelt sind. Die Dopamin-D2-artigen Rezeptoren: Dazu zählen die Dopamin-D2-, -D3- und -D4-Rezeptoren, welche mit einem inhibitorischen G-Protein gekoppelt sind.

Welche Wirkung Dopamin an der Zielzelle hat, kommt auf die Eigenschaften der Zielzelle an, welcher Dopaminrezeptor exprimiert und dadurch welches G-Protein aktiviert wird.

1.7 Olfaktorische Dysfunktionen bei neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen

Wie wichtig das olfaktorische System für das alltägliche Leben ist, wird oft erst bemerkt, wenn es nicht mehr richtig funktioniert. So nimmt mit dem Alter die Fähigkeit ab, zwischen Gerüchen zu differenzieren. Auch die Schwelle, bei der ein Geruch wahrgenommen wird, steigt an (Corso, 1971; Doty, 1991).

Nicht nur physiologische Vorgänge wie das Altern, sondern auch pathologische Vorgänge tragen zu einer Alteration des olfaktorischen Systems bei. So wird bei Morbus Parkinson eine Beeinträchtigung der Geruchswahrnehmung beschrieben, noch bevor die typische Parkinsonsymptomatik (Tremor, Rigor, Akinese) auftritt (Berendse et al., 2001; Sommer et al., 2004; Doty, 2007). Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Amylotrophe Lateralsklerose, Morbus Alzheimer oder Epilepsie werden Defizite der Geruchswahrnehmung oder Verarbeitung beschrieben (Abraham und Mathai, 1983; Sajjadian et al., 1994; Thompson et al., 1998). Auch neuropsychiatrische Erkrankungen wie Schizophrenie oder Depression gehen mit olfaktorischen Symptomen einher (Atanasova et al., 2008).

Die meisten der genannten Erkrankungen sind mit einer Beeinträchtigung des dopaminergen Systems verbunden. Es könnte also sein, dass Dopamin auch einen Einfluss auf die Funktion des olfaktorischen Systems hat.

1.7.1 Medikamentöse Behandlung dopaminerger Störungen

Nach der Dopaminhypothese werden Schizophrenien maßgeblich durch eine Störung des dopaminergen Systems verursacht (Toda und Abi-Dargham, 2007). Deswegen werden zur Behandlung der Schizophrenie Antipsychotika eingesetzt.

Antipsychotika können in verschiedene Klassen eingeteilt werden: in die Phenothiazine mit der Leitsubstanz Chlorpromazin, die Butyrophenone mit der Leitsubstanz

Haloperidol und die atypischen Antipsychotika. Allen diesen Medikamenten ist gemein, dass sie antagonistisch am Dopamin-D2-Rezeptor wirken. Zusätzlich haben die verschiedenen Klassen unterschiedliche Wirkungen auf andere Neurotransmittersysteme wie auf das serotonerge oder das histaminerge System. Dadurch entstehen positive Eigenschaften aber auch viele unerwünschte Wirkungen dieser Medikamente. So wird berichtet, dass die Behandlung mit Antipsychotika unter bestimmten Umständen selber die Fähigkeit der Odoranzienwahrnehmung, Diskrimination und Identifikation vermindert (Kruger et al., 2008).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Dissertation wurde das dopaminerge System in der olfaktorischen Peripherie von *Xenopus-laevis*-Larven untersucht. Hierfür wurden sowohl anatomische als auch physiologische Untersuchungen durchgeführt. Es wurden dabei folgende Fragestellungen untersucht:

- 1) Welchen Effekt hat Dopamin auf die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN und über welchen Rezeptor wird dieser Effekt vermittelt?
- 2) Welchen Effekt haben Antipsychotika auf die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN?
- 3) Welche Zellen exprimieren in der olfaktorischen Peripherie den Dopamin-D2-Rezeptor und welche Zellen stellen eine Dopaminquelle in der olfaktorischen Peripherie dar?

Um diese Fragestellungen zu untersuchen, wurden die im Folgenden beschriebenen Experimente durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Das Versuchstier *Xenopus laevis*

Der afrikanische Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) zählt zur Klasse der Amphibia, der Ordnung Anura (Froschlurche) und der Familie der Pipidae (Zungenlose). Er ist ursprünglich in Afrika südlich der Sahara beheimatet. Da der Krallenfrosch ein beliebtes Labortier ist, wurde er vom Menschen auf anderen Kontinenten eingeführt. Mittlerweile kommt *Xenopus laevis* auch in den südlichen USA und Mitteleuropa vor. In diesen Gebieten verdrängt er zum Teil die heimischen Frosch- oder Lurcharten. Die Larve wie das adulte Tier leben ausschließlich im Wasser und kommen nur zum Atmen an die Oberfläche. In der Natur lebt der adulte *Xenopus laevis* sowohl in stehenden als auch in fließenden Gewässern. Er ist ein Omnivor, der sich zum Teil auch kannibalisch ernährt. Sein Futter findet *Xenopus laevis* durch seinen gut ausgeprägten Geruchssinn (Kramer, 1933; Avila und Frye, 1978; Niewkoop und Faber, 1994; Tinsley et al., 1996). Die Larve von *Xenopus laevis* ernährt sich im Gegensatz zum adulten Tier von Algen. *Xenopus laevis* ist ein in Laboren häufig genutztes Versuchstier, da die Haltung und Aufzucht unkompliziert sind. Da *Xenopus laevis* poikilotherm ist, vereinfacht dies den Versuchsaufbau. Alle Versuche konnten so bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Für die Untersuchung des olfaktorischen Systems eignet sich die Larve von *Xenopus laevis* besonders, da die Knochen noch nicht vollständig verkalkt sind. Es ist so möglich, eine Gewebepreparation zu erstellen, die die olfaktorische Mukosa, den Nervus olfactorius und den Bulbus olfactorius enthält. Bei anderen Labortieren oder auch beim adulten Frosch ist dies nicht so einfach, da die olfaktorische Mukosa durch eine knöcherne Struktur, die Lamina cribrosa, vom Bulbus olfactorius getrennt ist.

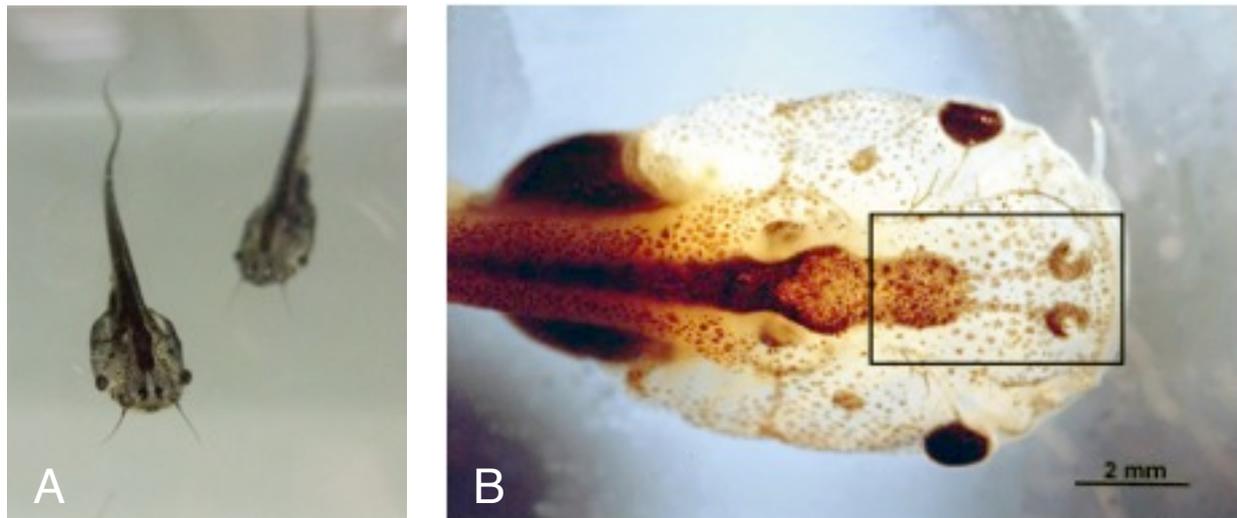


Abb. 2-1 Xenopus-laevis-Larve, Stadium 54

A) Die Abbildung zeigt Xenopus-laevis-Larven des Stadiums 54. B) Das schwarze Rechteck umrandet das olfaktorische System mit der olfaktorischen Mukosa, dem olfaktorischen Nerv und dem olfaktorischen Bulbus.

2.1.1 Das olfaktorische System von *Xenopus laevis*

Das olfaktorische System der Larve von *Xenopus laevis* ist wie das schon beschriebene olfaktorische System der Vertebraten aufgebaut. Es gibt allerdings einige Besonderheiten im olfaktorischen System von *Xenopus laevis*. Die paarig angelegte Nase setzt sich aus zwei Kammern zusammen. In der einen Kammer ist das Vomeronasalorgan gelegen und in der anderen Kammer finden sich das olfaktorische Epithel mit den oben beschriebenen ORN (Föske, 1934). Da die Larve von *Xenopus laevis* ausschließlich im Wasser lebt, exprimieren die ORN olfaktorische Rezeptoren der Klasse I schon ab Stadium 32. Olfaktorische Rezeptoren der Klasse II werden dagegen erst ab dem Entwicklungsstadium 49 exprimiert (Klein und Graziadei, 1983; Freitag et al., 1995; Mezler et al., 1999). Somit exprimiert die Larve von *Xenopus laevis* zwei unterschiedliche Rezeptorklassen. Der Aufbau der olfaktorischen Mukosa ist wie auch bei anderen Vertebraten laminär gegliedert. Abbildung 2-2 zeigt eine Färbung des

olfaktorischen Epithels von *Xenopus laevis*. Die laminäre Struktur ist gut zu erkennen. Basal liegen die Basalzellen (blau), apikal sind die Somata der Stützzellen (grün) lokalisiert, deren Fortsätze bis zur Basalmembran reichen. In der mittleren Schicht liegen die Somata der ORN (pink). Die Dendriten der ORN reichen bis zur Oberfläche des olfaktorischen Epithels, wo die Dendriten in die Riechköpfchen übergehen.

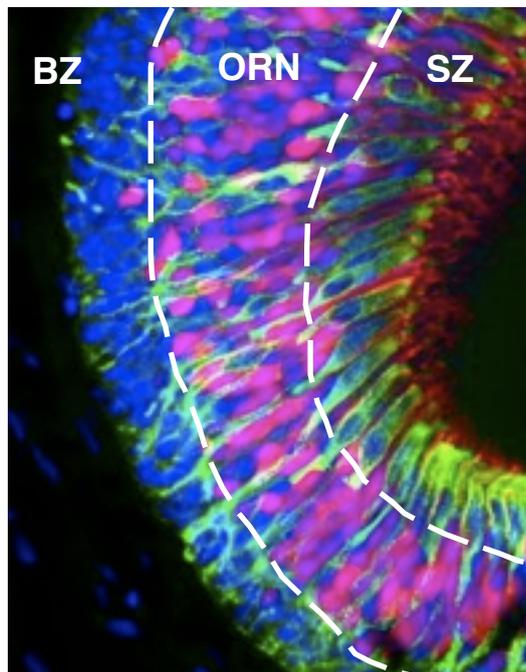


Abb. 2-2 Die olfaktorische Mukosa der *Xenopus laevis*-Larve

Auf der Abbildung ist die laminäre Struktur der Mukosa gut zu erkennen. BZ: Basalzellschicht, ORN: Rezeptorneuronenschicht, SZ: Stützzellschicht. Grün: Stützzellen; blau: Zellkerne; pink: ORN (modifiziert nach Hassenklöver et al., 2009, S. 2024).

2.1.2 Haltung und Aufzucht

Die adulten Frösche (Nasco, CA, USA) werden in Aquarien bei 20 Grad Celsius gehalten und zwei Mal pro Woche mit Pondsticks (Tetra Pond, Melle) gefüttert.

Vor der Paarung wurde den Tieren das Hormon Choriongonadotropin injiziert. Zur Paarung wurden die Tiere in ein abgedunkeltes Becken gesetzt und von Störfaktoren wie Lärm abgeschirmt.

Nach dem Laichen wurden die Larven in 30 Liter große Durchflussbecken, bei einer Temperatur von ca. 20 Grad Celsius gesetzt. Die Larven wurden mit Algenfutter (Mikrozell-Algenfutter 30410, Dohse Aquaristik, Bonn) gefüttert.

Für die Experimente wurden Larven in den Stadien 52-54 (Niewkoop und Faber, 1994) verwendet.

2.2 Kalzium-Imaging

Die physiologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Kalzium-Imaging-Methode durchgeführt. Die Kalzium-Imaging-Methode erlaubt es, Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration mit Hilfe eines Indikators zu bestimmen. Es kann dabei die räumliche wie auch die zeitliche Veränderung der Kalziumkonzentration bestimmt werden.

Die Kalzium-Imaging-Methode ist hilfreich, um verschiedene Prozesse in Nervenzellen zu messen. Wenn Nervenzellen erregt sind, also depolarisieren, steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration an. Durch die Messung der Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration kann also eine Aussage über die Aktivität der Zelle gemacht werden.

Das Prinzip der Methode beruht auf der fluoreszierenden Eigenschaft eines Indikators. Der Indikator wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, wodurch das Molekül auf eine höhere Energieebene gelangt. Durch Emission von Licht einer anderen

Wellenlänge gelangt das Molekül wieder auf ein energetisch niedrigeres Niveau. Wenn der Indikator nun Kalzium gebunden hat, ändern sich seine spektralen Eigenschaften. Das Molekül emittiert nun Licht, welches von einem Detektor gemessen werden kann.

2.2.1 Kalzium-sensitiver Farbstoff

Für die Kalzium-Imaging-Experimente wurde der Farbstoff Fluo-4 (Abb. 2-3), ein Acetoxymethyl (AM)-Ester (Molecular Probes, Leiden, Niederlande), verwendet.

Fluo-4 ist ein lipophiles Molekül und kann somit durch die Plasmamembran in die Zelle gelangen. In der Zelle wird durch Esterasen die Estergruppe abgespalten. Dadurch wird das Molekül polar und kann die Plasmamembran nicht mehr passieren. Durch die Abspaltung der Estergruppe verschiebt sich auch die Verteilung von Fluo-4 zwischen Extra- und Intrazellularraum, sodass Fluo-4 im Intrazellularraum akkumuliert. Auf Grund dieses Effekts müssen nur geringe Konzentrationen des Farbstoffs verwendet werden (Deitmer und Schild, 2000).

Fluo-4 ist schlecht löslich. Um die Löslichkeit zu verbessern, wird der Farbstoff mit Pluronic F-127 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) und DMSO (Sigma, Deisenhofen) gemischt.

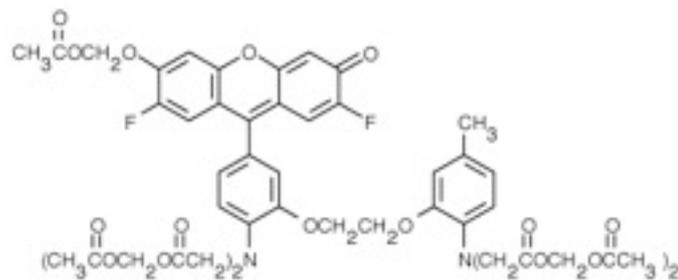


Abb. 2-3 Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-4

Die Abbildung zeigt die Strukturformel des Acetoxymethylesters, entsprechend den Herstellerangaben von Molecular Probes, Leiden, Niederlande; Summenformel: $C_{51}H_{50}F_2N_2O_{23}$; MW: 1096.95.

2.2.2 Konfokale Lasermikroskopie

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde das Laserrastermikroskop LSM510 (Zeiss LSM510/ Axiovert 100, Jena) verwendet. Der Vorteil der Konfokalen gegenüber der Hellfeldmikroskopie liegt in dem hohen optischen Kontrast und der Möglichkeit optische Schnitte zu erstellen. Dies wird durch den optischen Strahlengang, der in Abbildung 2-4 schematisch dargestellt ist, und im Folgenden genauer beschrieben werden soll, ermöglicht. Das von der Laserquelle ausgehende Licht, wird von einem dichromatischen Spiegel auf zwei Scanspiegel umgelenkt. Diese Scanspiegel können unabhängig voneinander bewegt werden, wodurch das Präparat in x- und y-Richtung zeilenförmig gescannt werden kann. Wenn das Licht auf das Präparat trifft, wird die Fluorophore angeregt und emittiert Licht. Dieses Licht wird von dem Objektiv gebündelt und gelangt durch den dichromatischen Spiegel auf die Lochblende (Pinhole) und wird anschließend von einem Photomultiplier erfasst. Durch die Lochblende gelangt nur Licht aus einer Fokusebene. Licht aus anderen Ebenen oder Streulicht wird damit ausgeblendet und nicht vom Detektor erfasst. Durch den

Durchmesser der Lochblende wird die Dicke des optischen Schnittes festgelegt. Es können so optische Schnitte dünner als $2\mu\text{m}$ erzeugt werden.

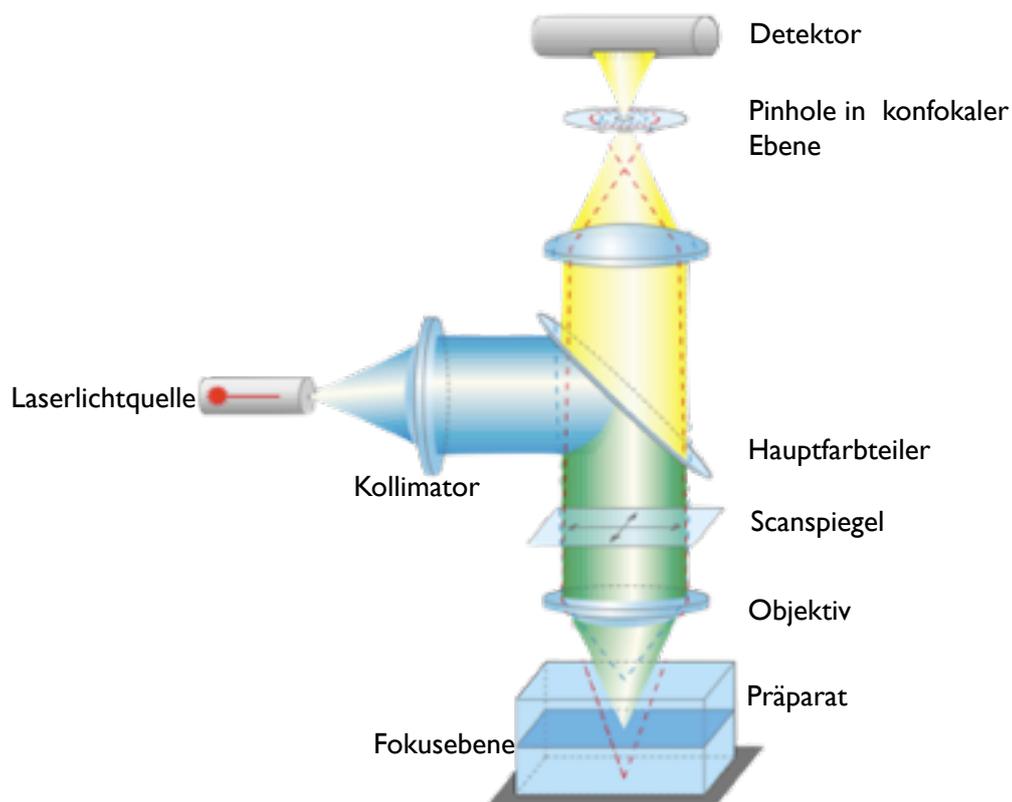


Abb. 2-4 Schematische Abbildung des Strahlengangs im konfokalen Laser Scanning Mikroscope

(modifiziert nach Zeiss-Broschüre, 2003) Detaillierte Beschreibung siehe Text.

2.3 Chemikalien

2.3.1 Zusammensetzung der Ringer_{XL}-Lösung

Während der Experimente wurde das Gewebe immer von einer Lösung der folgenden Zusammensetzung umspült:

Inhaltsstoffe	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	Glucose	Na-Pyruvat	Hepes
Konzentration in mM	98	2	1	2	5	5	10

Tab. 2-1 Zusammensetzung der Ringer_{XL}-Lösung

Die Lösung wurde aus bidestiliertem Wasser hergestellt. Der pH-Wert wurde mit 1N NaOH auf 7,8 und die Osmolarität auf 230 mOsmol eingestellt.

Alle Chemikalien außer Na-Pyruvat, welches von Sigma (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gekauft wurde, wurden von Merck (Merck, Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2.3.2 Duftstoffe

Als Duftstoffe wurden ein Aminosäuremix aus 19 Aminosäuren oder einzelne Aminosäuren verwendet.

Der Aminosäuremix hatte folgende Zusammensetzung:

Aminosäure	Menge in 10ml Ringer _{XL} = 10mM Stammlösung	Aminosäure	Menge in 10ml Ringer _{XL} = 10mM Stammlösung
L- Glycin	0,0075 g	L- Methionin	0,0149 g
L- Alanin	0,0089 g	L- Prolin	0,0155 g
L- Serin	0,0105 g	L- Arginin	0,0210 g
L- Threonin	0,0119 g	L- Lysin	0,0183 g
L- Cystein	0,0121 g	L- Histidin	0,0210 g
L- Asparagin	0,0132 g	L- Glutamat	0,0147 g
L- Glutamin	0,0146 g	L- Aspartat	0,0133 g
L- Valin	0,0117 g	L- Tryptophan	0,0204 g
L- Leucin	0,0131 g	L- Phenylalanin	0,0165 g
L- Isoleucin	0,0131 g		

Tab. 2-2 Zusammensetzung des Aminosäuremix

Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung des Aminosäuremix. Die Aminosäuren wurden in der aufgeführten Konzentration in 10ml Ringer_{XL} gelöst.

Als einzelne Aminosäuren wurden L-Arginin, L-Methionin und L-Lysin verwendet, da diese Aminosäuren bei der Larve von *Xenopus laevis* besonders gute Reaktionen zeigen (Manzini und Schild, 2004).

Die Duftstoffe wurden in Stammlösungen von 10mM angesetzt, in Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -20 Grad Celsius gelagert.

Für die Modulationsexperimente wurde eine Konzentration des Aminosäuremix von 100 μ M verwendet.

Für die erweiterten Dopaminexperimente wurden einzelne Aminosäuren auf die Konzentrationen 100 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M und 1 μ M verdünnt.

Alle Aminosäuren wurden von Sigma (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

2.3.3 Drogen

Die Substanzen Dopamin, Haloperidol, Chlorpromazin, Quinpirol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und Sulpiride (Tocris, Bristol, UK) wurden gelöst und als Stammlösung bei -20 Grad Celsius gelagert. Die verwendeten Konzentrationen und Lösungsmittel können Tabelle 2-3 entnommen werden. Am Tag des Experiments wurden die Lösungen mit Ringer_{XL} auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Dopamin ist lichtempfindlich und kam nicht mehr als nötig mit Licht in Kontakt.

Drogen	Konzentration der Stammlösung	Lösungsmittel	Verwendete Konzentrationen
Chlorpromazin	10mM	Ringer _{XL}	10 μ M
Dopamin	50mM	Ringer _{XL}	10 μ M, 25 μ M, 50 μ M
Haloperidol	100mM	DMSO	10 μ M
Quinpirol	25mM	Ringer _{XL}	10 μ M, 25 μ M, 50 μ M
Sulpirid	100mM	DMSO	100 μ M

Tab. 2-3 Drogen

Die Tabelle zeigt die Lösungsmittel und die Konzentrationen der Stammlösungen der verwendeten Drogen

2.4 Versuchsvorbereitungen

2.4.1 Herstellung der Fluoreszenzfarbstofflösung

50 μ l Pluronic F-127 wurden in 450 μ l Ringerlösung gegeben und anschließend mit 5 μ l Fluo-4 AM in DMSO vermischt und 15 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Danach wurden 10 μ l MK-571 (Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland) und 490 μ l RingerXL dazugegeben, sodass am Ende die Konzentration des Farbstoffes und des Blockers MK-571 50 μ M betragen.

Durch die Multi-Drug-Resistance-Transporter wird ein Teil des Farbstoffes wieder aus der Zelle transportiert. MK-571 blockiert die Multi-Drug-Resistance-Transporter. Dadurch kann der Transport des Farbstoffes aus den Zellen verringert und eine bessere Anfärbung der Zellen erreicht werden (Manzini und Schild, 2003b; Manzini et al., 2008).

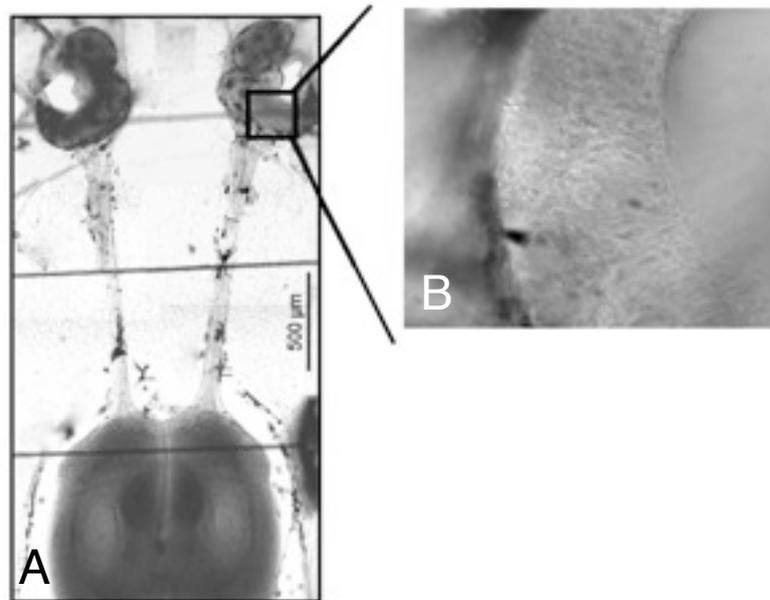
2.4.2 Gewebepreparation

Kaulquappen der Stadien 52-54 (Niewkoop und Faber, 1994) wurden in Eiswasser anästhesiert. Anschließend wurde das Tier durch einen Schnitt auf Höhe der Medulla Oblongata getötet. Mit einem Skalpell wurde ein Gewebeblock herausgetrennt, der die olfaktorischen Mukosen, den Nervus olfactorius, sowie den Bulbus olfactorius enthält (Abb. 2-1). Der Gewebeblock wurde durch einen Cyanacrylat-Klebstoff (Roti-Coll 1, Carl-Roth GmbH, Karlsruhe) auf die Arbeitsplatte eines Vibratoms geklebt (VT 1000 S oder VT 1200 S, Leica, Bensheim). Während des Schneidens wurde der Gewebeblock mit Ringerlösung umspült.

Zuerst wurde mit dem Vibratom die dorsale Gewebeschicht abgetragen, um die olfaktorischen Mukosen zugänglich zu machen. Mit dem zweiten Schnitt wurde eine 130-170 μ m dicke Schicht aus dem Block geschnitten. Diese Schicht, die die

olfaktorischen Mukosen enthält, wurde mit einer Pasteur-Pipette in eine modifizierte Falcon-3001-Petrischale (d = 35mm; Becton Dickinson and Company, Plymouth, UK) überführt. Anschließend wurde der Gewebeschnitt mit Fluo-4/AM gefärbt. Der Gewebeschnitt wurde dafür 35 Minuten bei Raumtemperatur in 200µl Fluo-4/AM Lösung inkubiert. Danach wurde der Gewebeschnitt drei Mal in Ringerlösung gespült, um Rückstände der Fluoreszenzlösung zu entfernen.

Der Gewebeschnitt wurde mit Hilfe eines Netzes in der Petrischale fixiert. Der Rahmen des Netzes bestand aus einem Platindraht, der genau in die Einsenkung der Petrischale passte. Zwischen dem Rahmen wurden Nylonfäden gespannt. Der Abstand der Nylonfäden wurde so gewählt, dass das Netz den Gewebeschnitt gut fixierte (Abb. 2-5). Die Abbildung zeigt den fixierten Gewebeschnitt mit den Bestandteilen des olfaktorischen Systems- Epithel, Nerv und Bulb. Auf der rechten Seite der Abbildung ist ein vergrößerter Ausschnitt des olfaktorischen Epithels im Durchlichtmodus gezeigt.

**Abb. 2-5 Gewebeschnitt unter dem Mikroskop**

A) Die Abbildung zeigt den durch das Netz fixierten Gewebeschnitt im Durchlichtmodus des Mikroskops. Zu sehen sind die olfaktorischen Mukosen, die olfaktorischen Nerven und die olfaktorischen Bulbi. Abbildung B) ist ein vergrößerter Ausschnitt der olfaktorischen Mukosa.

2.5 Versuchsaufbau

Mit der Kalzium-Imaging-Methode wurde die Modulation der olfaktorischen Rezeptorneurone auf einen Aminosäurereiz durch verschiedene Drogen untersucht. Das Gewebe wurde wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben präpariert und in der Petrischale auf den Objektisch des LSM510 gelegt. Für das LSM510 wurden folgende Einstellungen verwendet. Als Lichtquelle wurde ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488nm verwendet. Die Intensität des Lasers wurde auf 0,7-2% eingestellt (0,175- 0,5 mW). Die Emission des Farbstoffs Fluo-4 ist oberhalb einer Wellenlänge von 505nm gut detektierbar. Dementsprechend wurden Filter eingestellt, die Licht einer Wellenlänge

oberhalb 505nm durchlassen, das somit zum Detektor gelangt. Bei den Messungen wurden Zeitserien mit einer Bilderzahl zwischen 80 und 110 Bildern aufgenommen. Die Aufnahmegeschwindigkeit lag bei 0,76 bzw. 0,98 Sekunden pro Bild.

Das Gewebe wurde mit Ringer_{XL}-Lösung umspült. Es wurde die Methode nach Schild (1985) verwendet (Abb. 2-6). Dafür wurde ein Trichter über die Mukosa geführt. Dieser Trichter garantierte einen konstanten und gleichmäßigen Fluss der Ringerlösung. Durch eine Saugvorrichtung wurde die Menge der Lösung in der Petrischale konstant gehalten. Über den Trichter wurden auch die Duftstoffe und Chemikalien appliziert. Der gleichmäßige Fluss der Lösungen ist wichtig, da die ORN durch Druckänderungen beim Wechseln der Lösungen oder beim Applizieren der Duftstoffe gereizt werden können und so Messfehler entstehen.

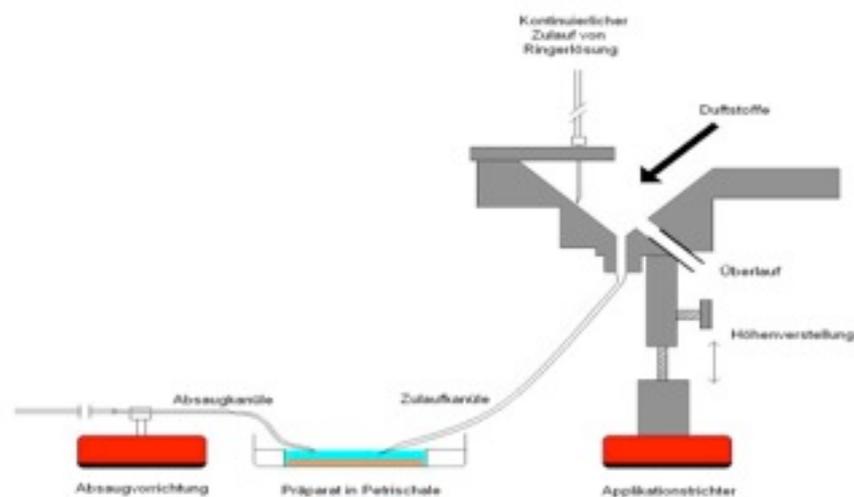


Abb. 2-6 Darstellung des Applikationssystems für Odoranzien und Badlösungen nach Schild 1985, S. 73; Die Lösungen und Duftstoffe (Pfeil) wurden über den Trichter und eine Kanüle in die Petrischale geleitet. Die Absaugvorrichtung sorgt dafür, dass der Flüssigkeitspegel in der Petrischale nicht überläuft.

Bei den vorliegenden Experimenten wurde untersucht, ob sich die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN durch Drogen, die auf das dopaminerge System wirken, modulieren lässt.

Um die Antworten der ORN vergleichen zu können, wurden die Duftstoffe von Bild 10 der Zeitserie bis zum Ende des Bildes 17 appliziert.

Nachdem sichergestellt war, dass die Neurone der Mukosa auf einen Duftstoff reagieren, wurde über den Trichter (Abb. 2-6) eine Droge eingewaschen (washin). Anschließend wurde in verschiedenen Zeitabständen die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN unter Einfluss der Droge gemessen. Danach wurde der Zulauf wieder auf Ringer_{XL}-Lösung umgestellt und erneut die odoranzien-induzierte Antwort der ORN gemessen (washout). Nach diesem Protokoll wurden die Experimente mit den Drogen Dopamin, Haloperidol, Chlorpromazin, Sulpirid und Quinpirol durchgeführt. Leicht modifiziert wurde dieses Protokoll für eine Untersuchung, in der Dopamin durch einen Antagonisten geblockt werden sollte. Hier wurde nach dem Einwaschen der Droge Dopamin anstelle des washout eine Lösung, die sowohl Dopamin wie auch Sulpirid enthielt, eingewaschen.

Die Drogen Chlorpromazin, Haloperidol und Sulpirid wurden auf einen möglichen Effekt auf die Ruheaktivität bzw. das Grundkalzium der ORN getestet. Hierfür wurden die Drogen wie nach dem vorhergehenden Protokoll eingewaschen und es wurden Zeitserien von 250 bzw. 300 Bildern mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 0,3 Hz gemacht. Nachdem der Zufluss der Lösung von der Droge auf Ringer_{XL}-Lösung umgestellt wurde, wurde erneut eine Zeitserie aufgenommen.

2.6 Auswertung der Kalzium-Imaging-Experimente:

Ausgewertet wurden die Daten mit Matlab (MathWorks, Natick, MA). Die Fluoreszenzänderung $\Delta F/F$ wurde für die einzelnen ORN mit der Formel $\Delta F/F = (F1 - F2)/F2$ berechnet, wobei F1 die über alle Pixel, einer ausgewählten Region gemittelte

Fluoreszenz darstellt. F2 ist die Grundfluoreszenz dieser Region vor der Odoranzienapplikation. Diese wurde durch Mittelung der ersten acht Bilder einer Zeitserie berechnet.

2.7 Immunhistochemie

Um das dopaminerge System im olfaktorischen System bei der Larve von *Xenopus laevis* genauer beschreiben zu können, wurden immunhistochemische Versuche durchgeführt. Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen des Dopamin-D2-Rezeptors und des Enzyms Tyrosinhydroxylase angefertigt. Bei dem Dopamin-D2-Rezeptor-Antikörper handelt es sich um einen polyklonalen Kaninchen-Anti-Mensch Antikörper (Millipore). Der Tyrosinhydroxylase-Antikörper ist ein polyklonaler Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper (Chemicon).

2.7.1 Anfertigung von Schnitten

Es wurden Kaulquappen der Stadien 52-54 verwendet. Die Tiere wurden anästhesiert und es wurde wie in Abschnitt 2.4.2 ein Gewebeblock herauspräpariert.

Kryostatschnitte

Der Gewebeblock wurde für eine Stunde in 4% Formaldehyd gelagert. Anschließend wurde der Gewebeblock in eine 30% Saccharose 0,1M PBS Lösung über Nacht gelegt. Aus dem Gewebeblock wurden mit Hilfe eines Kryostats 10 μ m dicke Schnitte bei -23 °C hergestellt und auf einen beschichteten Objektträger überführt.

Agaroseschnitte

Der Gewebekblock wurde für eine Stunde in 4% Formaldehyd gelagert, in PBS gewaschen und anschließend in 5% Agarose eingebettet (Sigma Aldrich). Sobald die Agarose fest war, wurden aus dem Block 70-100 μ m dicke Schnitte mit dem Vibratom angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte in PBS überführt. Nach der Durchführung der Färbung wurden die Schnitte auf einem Objektträger platziert.

2.7.2 Durchführung der Färbungen

Die Schnitte wurden dreimal in PBS und anschließend zweimal für je 10 Minuten in 0,1M PBS mit 0,2% Triton-X (PBST) gewaschen. Dann wurden die Schnitte mit 0,1M PBST+2%NGS (normal goat serum Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Germany) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit dem Antikörper in einer Konzentration von 1:500 für den Dopaminrezeptor und 1:500 für Tyrosinhydroxylase in PBST+2%NGS zwei Stunden bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte fünfmal 10 Minuten in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit dem sekundären anti-Maus-Antikörper Alexa 488 (1:250) in 0,1 PBS+2% NGS für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut dreimal in PBS gewaschen bevor die Kerne mit Propidium-Iodid in einer Konzentration von 25 μ l/ml für 15 Minuten gefärbt wurden und erneut fünfmal mit PBS gewaschen wurden.

Die Schnitte wurden mit Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako, Hamburg, Deutschland) beschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Vor der Betrachtung unter dem Mikroskop wurden die Schnitte mindestens zwei Stunden trocknen gelassen.

2.7.3 Doppelfärbung

Es wurden Doppelfärbungen des Dopamin-D2-Rezeptors und der Tyrosinhydroxylase durchgeführt, um ein genaueres Bild der dopaminergen Zellen in ihrer Lage zu den Dopamin-D2-Rezeptor exprimierenden Zellen zu bekommen.

Hierfür wurde das zuvor beschriebene Protokoll verändert. Zuerst wurden die Schnitte mit dem Antikörper des Dopamin-D2-Rezeptors und dem sekundären anti-Maus-Antikörper Alexa 488 wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte für drei Stunden mit dem Antikörper des Enzyms Tyrosinhydroxylase bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit 0,1M PBS gewaschen und mit dem sekundären anti-Maus-Antikörper Alexa 546 inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 0,1M PBS wurden die Schnitte mit Dako Fluorescent Mounting Medium beschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Um sicher zugehen, dass der sekundäre anti-Maus-Antikörper Alexa 546 nicht an den primären Antikörper des Dopamin-D2-Rezeptors bindet, wurde ein Kontrollversuch durchgeführt. Bei diesem Experiment wurde das gleiche Protokoll verwendet. Jedoch wurde der Inkubationsschritt mit dem primären Antikörper des Enzyms Tyrosinhydroxylase ausgelassen. Somit sollte der sekundäre anti-Maus-Antikörper Alexa 546 keine passenden Stellen für eine Bindung haben und die Schnitte nicht anfärben.

2.7.4 Färbung der Olfaktorischen Ensheathing Glia

Um die EOG im Nervus olfactorius sichtbar zu machen, wurden Agaroseschnitte verwendet. Die Gewebeschnitte wurden für sieben Stunden in Propidium-Iodid (25 μ l/ml) inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe wie oben beschrieben mit einem Antikörper gegen die Tyrosinhydroxylase gefärbt (Lohr et al., 2005; Hartl et al., 2007).

2.7.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Schnitte wurden unter dem in Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Laserscan Mikroskop LSM510 analysiert. Es wurden der Argon Laser bei der Wellenlänge 488nm und der Helium-Neon-Laser bei der Wellenlänge 543nm verwendet. Die Filter wurden so eingestellt, dass eine Zweikanalmessung durchgeführt werden konnte. In dem einen Kanal wurde das Licht im Wellenlängenbereich von 505-530nm - also das Licht, das der Farbstoff Alexa 488 emittiert - und im anderen Kanal das Licht in einem Wellenlängenbereich über 585nm - also das Licht, das der Farbstoff Alexa546 emittiert - detektiert.

3 Ergebnisse

3.1 Antwort der ORN auf Aminosäuren

Ziel dieser Arbeit war es, das dopaminerge System in der olfaktorischen Peripherie bei *Xenopus laevis* und einen möglichen Effekt von Dopamin auf die Antwort der ORN zu untersuchen.

Voraussetzung hierfür ist eine reproduzierbare Antwort der ORN auf einen Reiz, in diesem Fall auf einen Aminosäurereiz.

Die Versuchsdurchführung und Odoranzienapplikation wurde im Abschnitt "Material und Methoden" (S. 26) beschrieben.

Abb. 3-1 zeigt eine mit Fluo-4 gefärbte olfaktorische Mukosa. Die Abb. 3-1a-c stammen aus einer Zeitserie, in der die odoranzien-induzierte Antwort der ORN gemessen wurde. Bei Bild 10 wurde wie in Abschnitt 2.5 beschrieben der Duftstoff appliziert. Die Kalziumkonzentration ist durch die Farbe kodiert. Eine Farbänderung bedeutet eine Änderung der Kalziumkonzentration. Die Bilder wurden nach null Sekunden, 18,62 Sekunden und 58,8 Sekunden aufgenommen. Die Zellen in b zeigen eine deutliche Farbänderung im Vergleich zu a, was einem Anstieg der Kalziumkonzentration entspricht. In c, nach 58,8 Sekunden, sind die Intensitäten wieder auf den Ausgangswert zurückgegangen.

Abb. 3-1c zeigt die Fluoreszenzintensitäten $\Delta F/F$ der vier markierten ORN über die Zeit. Nach der Applikation des Duftstoffes ist ein schneller Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten, der wieder auf den Ausgangswert zurückkehrt (schwarze Kurve). Diese Antwort der ORN ist reproduzierbar. Die rote Kurve zeigt die Fluoreszenz bei der Wiederholung des Experiments. Es ist gut zu sehen, dass jedes ORN eine individuelle aber hoch reproduzierbare Antwort zeigt.

Wenn sichergestellt war, dass die ORN eines Gewebeschnittes reproduzierbar auf den Duftstoff reagieren, wurden die oben beschriebenen Experimente durchgeführt.

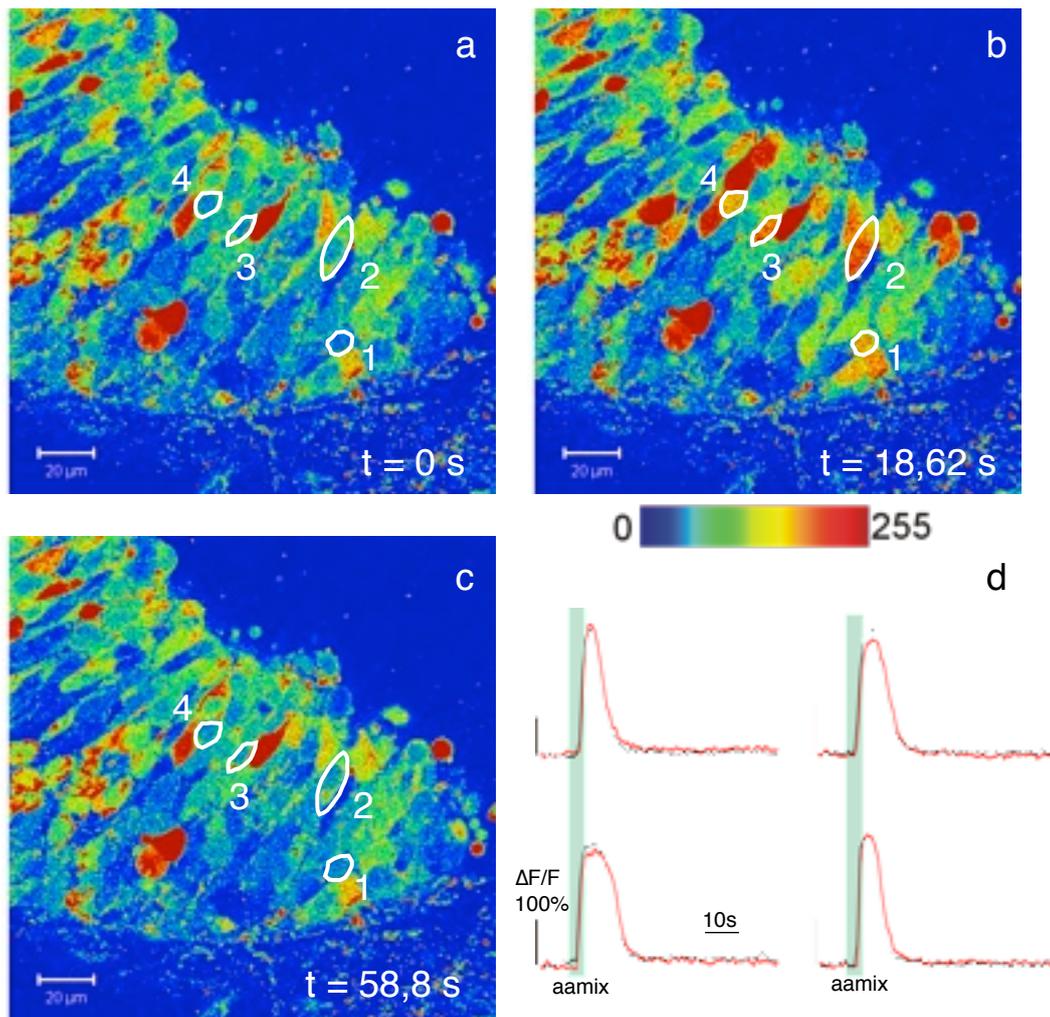


Abb. 3-1 Odoranzien-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ Antwort olfaktorischer Rezeptorneurone
Mit Fluo-4 gefärbte olfaktorische Mukosa.

a,b,c) Zeitserie einer Odoranzien-induzierten Antwort der ORN. a) vor Applikation der Aminosäure bei 0 Sekunden der Zeitserie, b) am Maximum der Reaktion nach Applikation der Aminosäuren bei 18,62 Sekunden der Zeitserie, c) nach Rückkehr auf das Ausgangsniveau bei 58,8 Sekunden der Zeitserie
d) zeigt die Fluoreszenzintensitäten der im Gewebeschnitt markierten ORN über die Zeit.

3.2 Dopamin moduliert die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN

In dem folgenden Experiment wurde untersucht, ob Dopamin einen Einfluss auf die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN hat. Die Messungen wurden wie in Abschnitt 2.5 beschrieben durchgeführt. Es konnten verschiedene Veränderungen der Odoranzien-induzierten Antwort der ORN unter dem Einfluss von Dopamin beobachtet werden. Abb. 3-2 zeigt die Fluoreszenzintensitäten der ORN auf einen Aminosäurereiz, unter Kontrollbedingungen (schwarze Kurve), unter dem Einfluss von $10\mu\text{M}$ Dopamin (rote Kurve) und nach Auswaschen der Droge - wieder unter Kontrollbedingungen (grüne Kurve). Unter Kontrollbedingungen reagieren die Zellen auf den Aminosäurereiz mit einem schnellen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Die rote Kurve in der Abbildung zeigt, dass die intrazelluläre Kalziumkonzentration der ORN unter dem Einfluss von Dopamin auf einen Aminosäurereiz wesentlich später ansteigt. Weiter ist zu sehen, dass die Amplitude der Kurve im Vergleich zur Kontrolle verringert ist. Es konnte beobachtet werden, dass die Zellen unter dem Einfluss von Dopamin wesentlich später auf den Reiz reagierten. Auch ist der Anstieg der Fluoreszenz flacher und die Amplitude ist verkleinert. Es kam vor, dass die Zellen unter dem Einfluss von Dopamin gar nicht mehr auf den Aminosäurereiz reagierten. Selten wurde unter dem Einfluss von Dopamin eine vergrößerte Amplitude beobachtet. Bei einer Konzentration von $50\mu\text{M}$ Dopamin wurde vereinzelt auch eine verlängerte Antwort der ORN gemessen. Bei diesem Effekt kehrte die Fluoreszenz erst später wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Diese Effekte konnten nach 15 minütigem Einwaschen der Dopaminlösung beobachtet werden und waren nach 15 minütigem Auswaschen der Lösung zum Großteil reversibel.

Für diese Experimente wurden verschiedene Dopamin Konzentrationen (Tab. 2-3) verwendet. Insgesamt reagierten 124 ORN aus 16 Gewebeschnitten auf den Aminosäurereiz. Von den 124 ORN zeigten 94 ORN (75,8%) eine veränderte Antwort auf den Aminosäurereiz unter dem Einfluss von Dopamin.

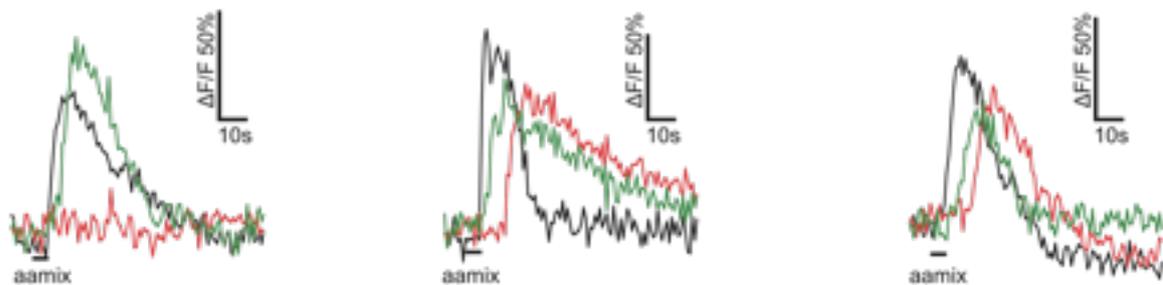


Abb. 3-2 Dopamin (10 μ M) moduliert die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN

Schwarzer Graph: Antwort der ORN unter Kontrollbedingungen. Roter Graph: Antwort der ORN nach 15 Minuten Einwaschen einer 10 μ M Dopaminlösung. Durch die Dopaminlösung reagierten die ORN verzögert und mit einer verringerten Amplitude. Grüner Graph: Antwort der ORN 15 Minuten nach Auswaschen der Droge (wieder unter Kontrollbedingungen).

Tab. 3-1 ist zu entnehmen, wie viele Zellen durch die verwendeten Dopaminkonzentrationen moduliert wurden. Hier ist zu erkennen, dass der Prozentsatz, der durch Dopamin modulierten ORN zwischen 63 - 86 % liegt. Bei einer Dopaminkonzentration von 25 μ M wurden 86% der auf den Aminosäurereiz reagierenden Zellen moduliert. Bei einer 10 μ M Dopaminlösung wurden 84% und bei einer 50 μ M Lösung 63% moduliert. Es kann kein Zusammenhang zwischen der verwendeten Konzentration und der Häufigkeit eines modulatorischen Effektes beobachtet werden.

Abb. 3-3 zeigt die genaue Verteilung der modulatorischen Effekte, die unter dem Dopamin Einfluss für die unterschiedlichen Dopaminkonzentrationen gemessen wurden. Hier ist gut zu sehen, dass bei den drei verwendeten Konzentrationen die gleichen Effekte beobachtet werden konnten. So sind bei allen drei Konzentrationen die

folgenden Effekte in absteigender Häufigkeit beobachtet worden: Reduktion der Amplitude, Abflachung des Fluoreszenzanstieges, Verzögerung der Antwort. Wie schon Tab. 3-1 entnommen werden kann, wurden durch geringere Dopaminkonzentrationen mehr Zellen beeinflusst als mit einer Konzentration von $50\mu\text{M}$ Dopamin. Dagegen tritt unter der hohen Dopaminkonzentration eine Verlängerung der Odoranzien-induzierten Antwort auf, die bei den niedrigeren Konzentrationen nicht beobachtet werden konnte. Wie oben beschrieben, konnte unter dem Einfluss von Dopamin eine Reduktion der Amplitude beobachtet werden. Bei einer Dopaminkonzentration von $10\mu\text{M}$ wurde die Amplitude um $29,12 \pm 43,44\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) reduziert. Eine Dopaminkonzentration von $25\mu\text{M}$ brachte eine Reduktion der Amplitude um $46,85 \pm 47,89\%$ und $50\mu\text{M}$ Dopamin reduzierte die Amplitude um $17,50 \pm 29,95\%$ (Abb. 3-4a). Abbildung 3-4a zeigt die prozentuale Reduktion der Amplitude der ORN auf einen Aminosäurereiz für die drei verwendeten Konzentrationen.

Unter dem Einfluss von Dopamin reagierten die ORN verzögert und erreichten dadurch das Maximum der Amplitude später. Abb. 3-4b gibt die Verzögerung der ORN für die verwendeten Dopaminkonzentrationen wieder. Bei einer Dopaminkonzentration von $25\mu\text{M}$ reagierten die ORN am spätesten. Hier wurde im Mittel eine Verzögerung von $27,52 \pm 21,83\text{sek}$ gemessen. $10\mu\text{M}$ Dopamin bewirkte eine Verzögerung von $9,20 \pm 12,73\text{sek}$ und bei $50\mu\text{M}$ Dopamin reagierten die ORN durchschnittlich $2,95 \pm 4,07\text{sek}$ später.

Die modulatorischen Effekte, die unter dem Einfluss von Dopamin beobachtet werden konnten, waren zum Großteil nach Auswaschen der Droge reversibel. So konnte eine Reversibilität der Effekte bei $10\mu\text{M}$ Dopamin zwischen 0 und 71% beobachten werden. Für die Dopaminkonzentrationen $25\mu\text{M}$ und $50\mu\text{M}$ lagen die Werte zwischen 36 und 100% bzw. 54 und 100%.

	Alle Konzentrationen		10µM	
	Prozent der reagierenden Zellen		Prozent der reagierenden Zellen	
Gewebeschnitte	16		8	
auf Aminosäure reagierende Zellen	124	100	50	100
modulierte Zellen	94	76	42	84
nicht modulierte Zellen	30	24	8	16
	25µM		50µM	
Gewebeschnitte	3		5	
auf Aminosäure reagierende Zellen	22	100	52	100
modulierte Zellen	19	86	33	63
nicht modulierte Zellen	3	14	19	37

Tab. 3-1 Anzahl der durchgeführten Messungen mit Dopamin

Der Tabelle ist zu entnehmen, wie viele Messungen mit der jeweiligen Dopaminkonzentration durchgeführt wurden. Weiter führt die Tabelle auf, wie häufig die Odoranzien-induzierten Antwort der ORN durch Dopamin, für alle Konzentrationen wie auch für jede Konzentration einzeln, moduliert wurde.

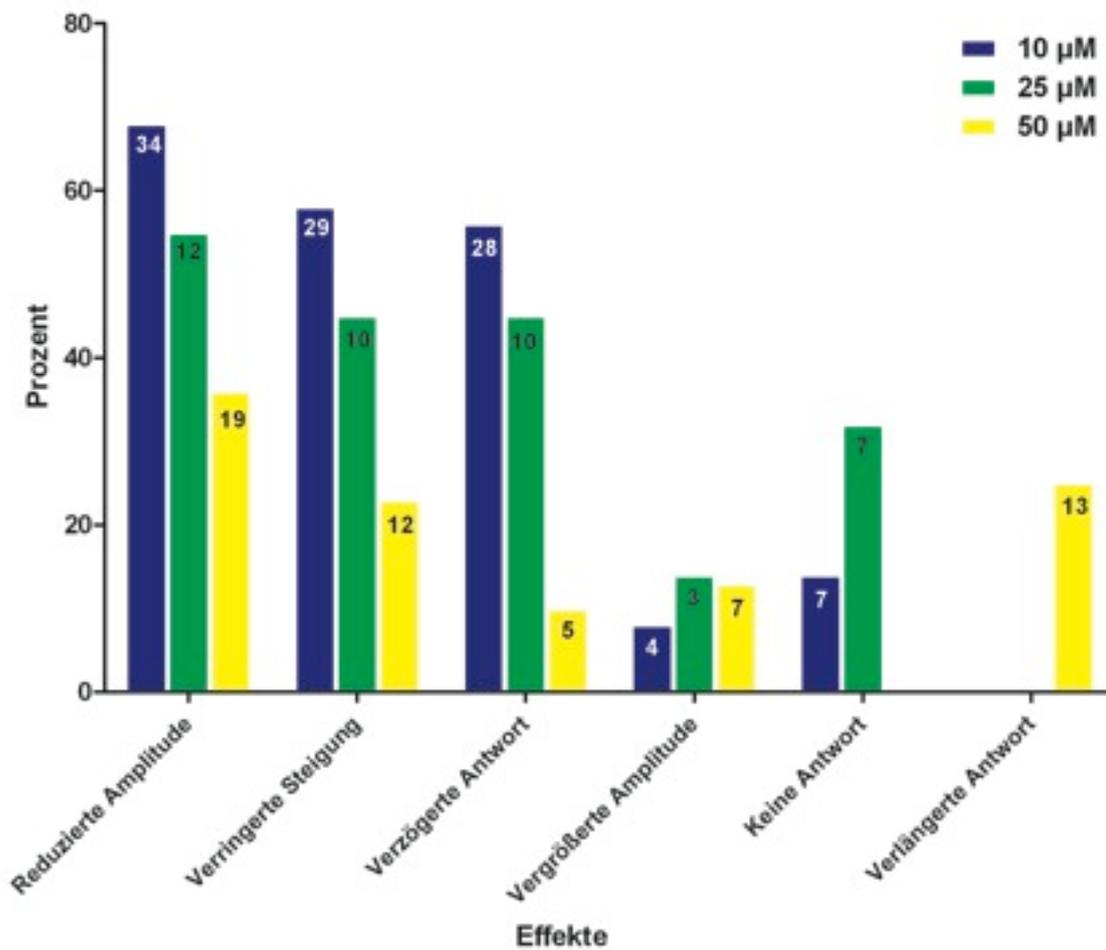


Abb. 3-3 Effekte der dopaminergen Modulation

Der Graph zeigt die Häufigkeit der beobachteten dopaminergen Effekte. Die Gesamthöhe eines Balkens gibt die Prozente der ORN an, die diesen Effekt zeigten. Die Zahl in den Balken gibt die absolute Anzahl der Zellen an, die diesen Effekt zeigten. Die verwendete Dopaminkonzentration ist durch die Farbe gekennzeichnet: blauer Balken: 10µM, grüner Balken: 25µM und gelber Balken: 50µM.

Die meisten ORN zeigten unter dem Einfluss von Dopamin eine Reduktion der Amplitude sowie eine verspätete Antwort mit verringerter Steigung. Eine verlängerte Antwort konnte nur bei einer Dopaminkonzentration von 50µM beobachtet werden

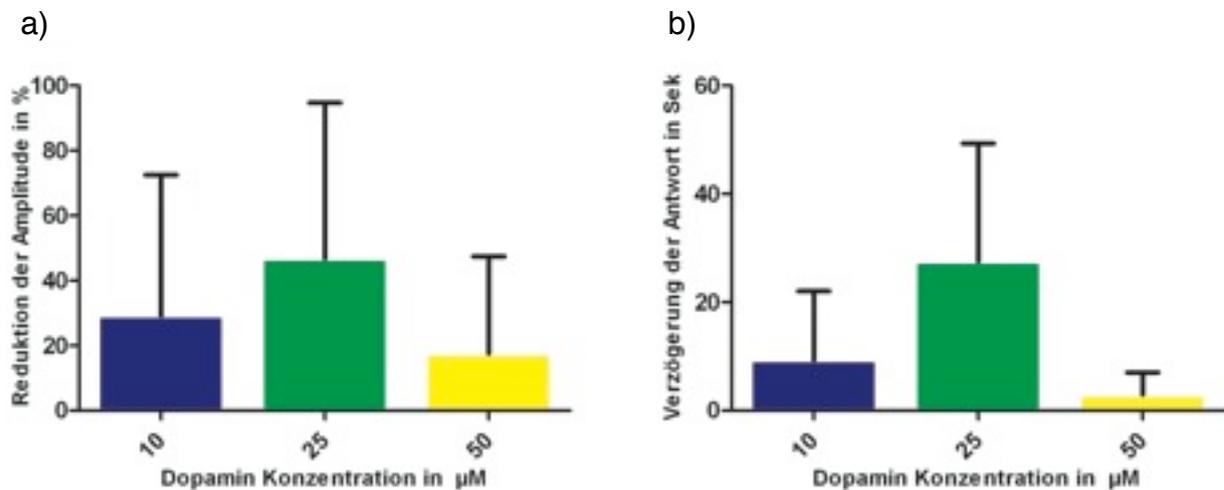


Abb. 3-4 Dopamin verzögert und verringert die Antwort der ORN

Den Graphen ist zu entnehmen, dass die ORN verzögert und reduziert auf einen Aminosäurereiz unter dem Einfluss von Dopamin reagierten. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen. Die verwendete Dopaminkonzentration ist durch die Farbe gekennzeichnet: blauer Balken: $10\mu\text{M}$, grüner Balken: $25\mu\text{M}$ und gelber Balken: $50\mu\text{M}$. a) Prozentuale Reduktion der Amplitude durch Dopamin. Es ist zu erkennen, dass alle drei Dopaminkonzentrationen die Amplitude der ORN auf den Aminosäurereiz verringern. b) Der Graph gibt die Verzögerung der Antwort der ORN unter dem Einfluss von Dopamin in Sekunden wieder. Bei einer Dopaminkonzentration von $25\mu\text{M}$ konnte die größte Verzögerung beobachtet werden.

3.3 Dopaminrezeptor-Spezifisierung

3.3.1 Quinpirol moduliert die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN

Im vorhergehenden Abschnitt wurde der modulatorische Einfluss von Dopamin auf die Reiz-induzierten Antworten der ORN beschrieben. Um zu sehen, ob die beschriebenen Beobachtungen über den Dopamin-D2-Rezeptor vermittelt wurden, wurden weitere Experimente durchgeführt. Das Protokoll wurde beibehalten, anstelle von Dopamin wurde Quinpirol (10 μ M, 25 μ M und 50 μ M) verwendet. Quinpirol ist ein spezifischer Agonist des Dopamin-D2-Rezeptors.

Abbildung 3-5 zeigt die Odoranzien-induzierten Antworten von zwei ORN. Die schwarze Kurve gibt die Antwort unter Kontrollbedingung wieder. Die rote Kurve repräsentiert die Antwort der ORN auf einen Reiz unter dem Einfluss von 25 μ M Quinpirol. Die grüne Kurve gibt die Antwort der ORN nach Auswaschen von Quinpirol, also unter Kontrollbedingungen wieder. Unter dem Einfluss von Quinpirol reagieren die Zellen später auf den Aminosäurereiz. Weiter ist zu beobachten, dass die rote Kurve eine verringerte Amplitude und einen flacheren Anstieg aufweist. Es konnten die gleichen Effekte auf die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN wie unter dem Einfluss von Dopamin beobachtet werden. Der modulatorische Einfluss von Quinpirol war nach einer kürzeren Einwaschzeit als bei Dopamin schon nach fünf Minuten zu beobachten. Die Modulationen waren stärker ausgeprägt und nach Auswaschen von Quinpirol gut reversibel. 32 von 59 Zellen (54%) in 14 Gewebeschnitten zeigten einen typischen dopaminergen Effekt.



Abb. 3-5 Quinpirol (25 μ M) moduliert die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN
Schwarzer Graph: Antwort der ORN unter Kontrollbedingungen. roter Graph: Antwort der ORN nach 5 Minuten Einwaschen einer 25 μ M Quinpirollösung. Die ORN reagierten unter dem Einfluss von Quinpirol stark verzögert und mit geringerer Amplitude. grüner Graph: Antwort der ORN 15 Minuten nach Auswaschen der Droge (wieder unter Kontrollbedingungen).

3.3.2 Sulpirid antagonisiert den dopaminergen Effekt

Die Vermutung, dass der beschriebene Dopamineffekt über Dopamin-D2-Rezeptoren vermittelt ist, wurde durch das folgende Experiment bestätigt.

Die Experimente wurden wie in Abschnitt 2.5 beschrieben durchgeführt. Es wurde die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN auf einen Aminosäurereiz unter Kontrollbedingungen und unter 25 μ M Dopamin gemessen. Wenn eine dopaminerge Modulation der Odoranzien-induzierten Antwort beobachtet werden konnte, wurde der Zulauf auf eine 25 μ M Dopamin + 100 μ M Sulpiridlösung umgestellt. Sulpirid ist ein spezifischer Antagonist des Dopamin-D2-Rezeptors.

Abbildung 3-6 zeigt die Odoranzien-induzierten Antworten der ORN unter Kontrollbedingungen (schwarze Kurve), unter dem Einfluss von 25 μ M Dopamin (rote Kurve) und unter dem Einfluss von 25 μ M Dopamin + 100 μ M Sulpirid. Die rote Kurve

zeigt die schon zuvor beschriebenen modulatorischen Effekte von Dopamin. Die Amplitude ist im Vergleich zur Kontrollantwort reduziert. Weiter reagieren die Zellen später und mit einem langsameren intrazellulären Kalziumanstieg auf den Reiz. Die grüne Kurve ist der Kontrollantwort wieder zu vergleichen. Die Amplitude erreicht sogar zum Teil höhere Werte als in der Kontrollantwort. Auch reagieren die Zellen wieder früher als unter alleinigem Einfluss von Dopamin, jedoch verbleibt eine leichte Verzögerung gegenüber der Kontrollantwort.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass der dopaminerge Effekt durch den spezifischen Dopamin-D2-Rezeptor-Antagonist Sulpirid aufgehoben werden kann und der dopaminerge Effekt im olfaktorischen Epithel über Dopamin-D2-Rezeptoren vermittelt wird.

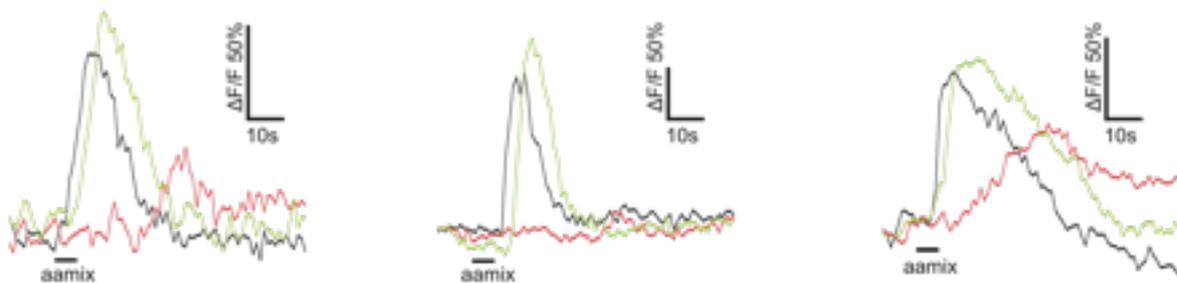


Abb. 3-6 Sulpirid antagonisiert den Dopamineffekt

Schwarzer Graph: Antwort der ORN unter Kontrollbedingungen. roter Graph: Antwort der ORN nach 15 Minuten Einwaschen einer $25\mu\text{M}$ Dopaminlösung. Es ist ein deutlicher Effekt auf die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN unter dem Einfluss von Dopamin zu erkennen. Die Amplitude ist stark vermindert und das intrazelluläre Kalzium steigt später an. grüner Graph: Antwort der ORN auf den Aminosäurereiz unter dem Einfluss einer $25\mu\text{M}$ Dopamin + $100\mu\text{M}$ Sulpiridlösung. Die grüne Kurve nähert sich der schwarzen Kontrollkurve wieder an. Der Dopamineffekt kann somit durch Sulpirid aufgehoben werden.

3.4 Erweiterte Dopamin-Experimente

In den folgenden Experimenten wurde die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN bei unterschiedlicher Reizstärke gemessen. Als Reiz wurden einzelne Aminosäuren verwendet. Es wurde mit einer Aminosäurekonzentration von $100\mu\text{M}$ angefangen, die schrittweise gesenkt wurde. Abbildung 3-7 zeigt die Kalziumtransienten auf den Aminosäurereiz Methionin. Die rote Kurve zeigt den Kalziumtransienten der ORN bei einer Methioninkonzentration von $100\mu\text{M}$ in a) ($50\mu\text{M}$ in b)). Die violette Kurve gibt die Antwort der ORN bei einer Konzentration von $50\mu\text{M}$ in a) ($20\mu\text{M}$ in b)) und die blaue Kurve bei einer Konzentration von $20\mu\text{M}$ in a) ($10\mu\text{M}$ in b)) wieder. Es ist zu erkennen, dass die Amplitude mit Verringerung der Reizstärke abnimmt. Bei einer höheren Aminosäurekonzentration konnte somit eine größere Amplitude erreicht werden.

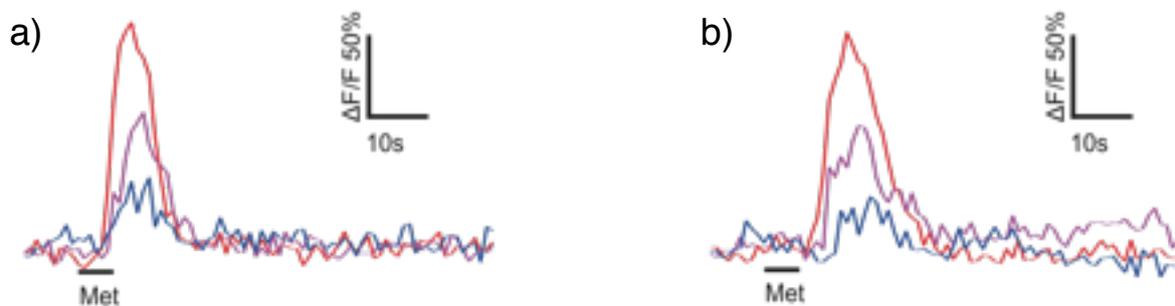


Abb. 3-7 Die intrazelluläre Kalziumkonzentration ist abhängig von der Reizstärke.

a) und b) zeigen den Kalziumtransienten der ORN auf einen Aminosäurereiz (Methionin). Die rote Kurve entspricht einer verwendeten Methioninkonzentration von $100\mu\text{M}$ in a) ($50\mu\text{M}$ in b), die violette Kurve einer Konzentration von $50\mu\text{M}$ in a) ($20\mu\text{M}$ in b) und die blaue Kurve einer Konzentration von $20\mu\text{M}$ in a) ($10\mu\text{M}$ in b).

Bei dem folgenden Experiment wurde diese Eigenschaft der ORN genutzt. Es wurde erneut die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN auf einen Aminosäurereiz gemessen. Die Aminosäurekonzentration wurde so weit gesenkt, dass die ORN nur noch eine geringe Reaktion auf den Reiz zeigten. Dann wurde eine $10\mu\text{M}$ Dopaminlösung eingewaschen und die reizinduzierte Antwort der ORN bei einer höheren Aminosäurekonzentration gemessen. Abbildung 3-8 zeigt den Kalziumtransienten von zwei ORN. Die schwarze Kurve zeigt die Reaktion bei einer Aminosäurekonzentration von a) $5\mu\text{M}$ und b) $100\mu\text{M}$. Die violette Kurve gibt die Reaktion bei einer verringerten Aminosäurekonzentration (a) $1\mu\text{M}$ und b) $20\mu\text{M}$) wieder. Die rote Kurve zeigt die Reaktion der ORN bei anfänglicher Aminosäurekonzentration, jedoch unter dem Einfluss einer $10\mu\text{M}$ Dopaminlösung. Es ist zu erkennen, dass die rote und die violette Kurve einen ähnlichen Verlauf haben, obwohl bei der violetten Kurve eine fünfmal höhere Aminosäurekonzentration verwendet wurde. Die grüne Kurve repräsentiert die Reaktion der ORN nach Auswaschen der Dopaminlösung. Es ist zu sehen, dass die Amplitude sich wieder an die Amplitude der schwarzen Kurve annähert. Es konnte gezeigt werden, dass unter der Einwirkung von Dopamin eine höhere Aminosäurekonzentration verwendet werden muss, um die gleiche Amplitude zu bekommen wie unter Kontrollbedingungen. Dieser Effekt konnte durch Auswaschen der Dopaminlösung rückgängig gemacht werden. Es wurden 11 Gewebeschnitte mit diesem Protokoll gemessen. Insgesamt reagierten 26 Zellen auf die Aminosäure Methionin, 22 (85%) ORN konnten durch Dopamin moduliert werden und zeigten die oben beschriebenen Effekte.

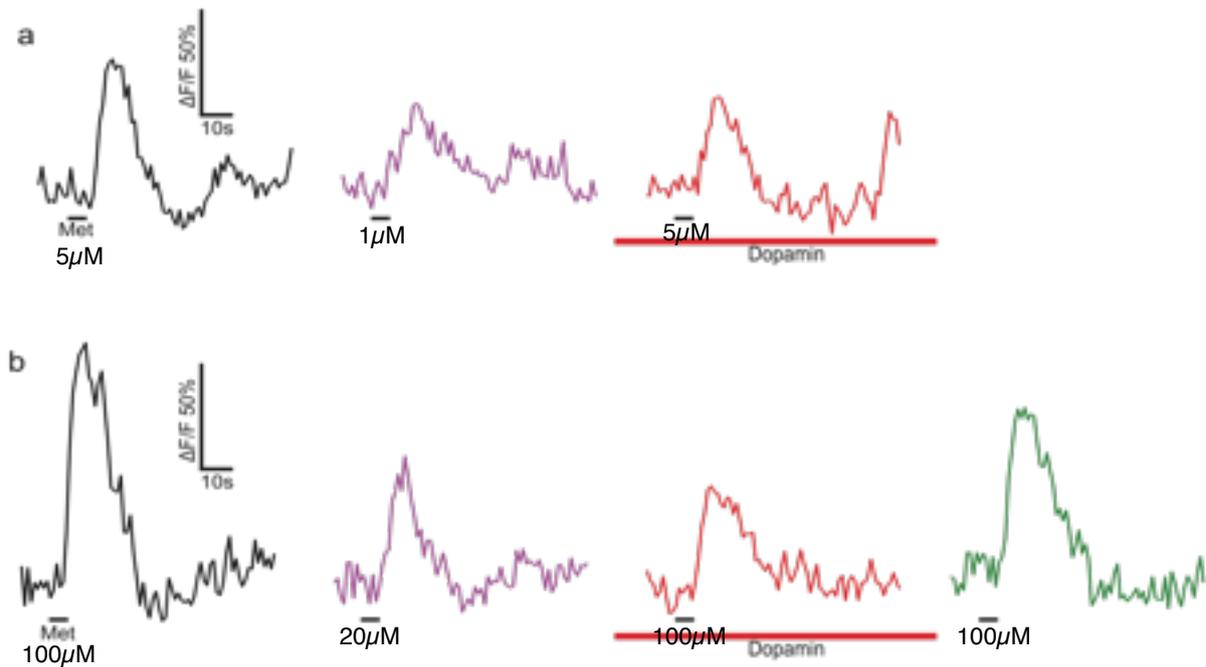


Abb. 3-8 Dopamin reduziert die reizinduzierte Antwort der ORN

Schwarzer Kurve: Antwort der ORN auf a) 5 μM b) 100 μM Methionin; violette Kurve: Antwort der ORN auf a) 1 μM b) 20 μM Methionin; rote Kurve: a) Antwort des ORN auf 5 μM Methionin nach 10 Minuten Einwaschen einer 10 μM Dopaminlösung; b) Antwort des ORN auf 100 μM Methionin nach 2 Minuten Einwaschen einer 10 μM Dopaminlösung. Grüne Kurve: Kontrollantwort auf 100 μM Methionin nach 10 Minuten washout.

3.5 Antipsychotika modulieren die Antwort der ORN

Nachdem beobachtet worden war, dass die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN durch Dopamin moduliert werden konnte und dass diese Modulation wahrscheinlich über den Dopamin-D2-Rezeptor vermittelt wird, wurden die oben beschriebenen Modulationsexperimente durch Antipsychotika durchgeführt (S.26). Für diese Experimente wurden die folgenden Antipsychotika verwendet: Chlorpromazin, Haloperidol und Sulpirid. Antipsychotika werden zur Behandlung von psychiatrischen Erkrankungen eingesetzt. Bei den verwendeten Antipsychotika handelt es sich um Dopamin-D2-Rezeptor-Antagonisten. Jedoch haben sie unterschiedliche Affinitäten zu anderen Rezeptoren.

Wie auch schon bei Dopamin, konnte durch die Antipsychotika eine Modulation der Odoranzien-induzierten Antwort der ORN beobachtet werden.

3.5.1 Modulatorische Effekte von Chlorpromazin auf die ORN

Bei dem vorliegenden Experiment wurde untersucht, ob Chlorpromazin einen modulatorischen Effekt auf die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN hat. Hierfür wurden die Antworten der ORN auf einen Aminosäurereiz unter dem Einfluss von $10\mu\text{M}$ Chlorpromazin gemessen. Abb. 3-9 zeigt die Kalziumtransienten von drei Zellen auf den Duftreiz. Die schwarze Kurve stellt die Kontrollantwort auf den Aminosäurereiz dar. Die rote Kurve zeigt die Antwort unter dem Einfluss von Chlorpromazin auf den Reiz. Es ist zu erkennen, dass die Antwort verlängert ist, die Intensität also erst später auf die Grundfluoreszenz zurück geht. Bei zwei ORN ist die Amplitude im Vergleich zur Kontrolle vergrößert. Bei einem ORN ist die Amplitude im Vergleich zur Kontrolle dagegen verringert. Die grüne Kurve gibt die Antwort der ORN nach Auswaschen von Chlorpromazin wieder.

Es reagierten 71 ORN auf den Aminosäurereiz in sieben Gewebeschnitten. Von diesen 71 ORN zeigten 52 unter dem Einfluss von $10\mu\text{M}$ Chlorpromazin eine modulierte

Antwort auf den Aminosäurereiz. Unter dem Einfluss von Chlorpromazin konnten mehrere Effekte auf die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN gemessen werden. Tabelle 3-2 und Abbildung 3-12 geben eine nähere Beschreibung dieser Effekte. Nach Auswaschen der Droge waren die modulatorischen Effekte zwischen 10% und 100% reversibel.

Wie oben beschrieben wurde eine Veränderung der Amplitude unter dem Einfluss von Chlorpromazin beobachtet. Im Durchschnitt verringerte sich die Antwort der ORN um $7,07 \pm 30,70\%$ (Abb. 3-13a). Um die Verlängerung der Antwort zu quantifizieren, wurde das Zeitintervall zwischen Maximum des Kalziumtransienten und dem Punkt, an dem der Wert auf 50% des Maximums zurückgegangen war, gemessen. Es wurde beobachtet, dass dieses Zeitintervall unter dem Einfluss von Chlorpromazin um $46,46 \pm 54,84\%$ verlängert war (Abb. 3-13b).

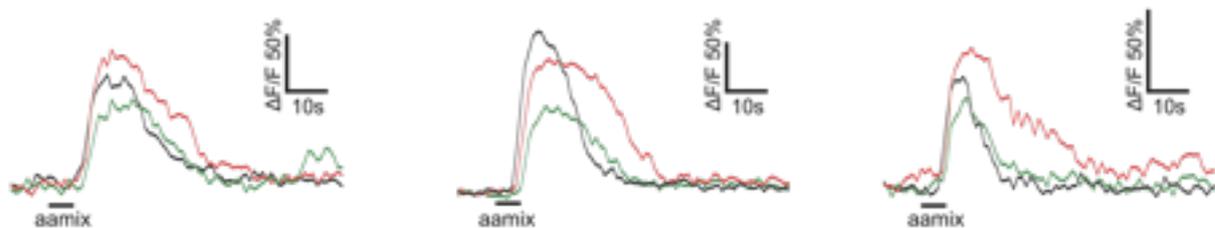


Abb. 3-9 Chlorpromazin ($10\mu\text{M}$) moduliert die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN

Schwarzer Graph: Antwort der ORN unter Kontrollbedingungen. Roter Graph: Antwort der ORN nach 10 Minuten Einwaschen einer $10\mu\text{M}$ Chlorpromazininlösung. Durch die Chlorpromazininlösung verlängert sich die Antwort auf den Reiz. Grüner Graph: Antwort der ORN 15 Minuten nach Auswaschen der Droge (wieder unter Kontrollbedingungen).

3.5.2 Modulatorische Effekte von Haloperidol auf die ORN

Nach dem gleichen Protokoll wurde untersucht, ob Haloperidol einen modulatorischen Effekt auf die Odoranzien-induzierten Antworten der ORN hat. Abbildung 3-10 zeigt die Antworten der ORN auf den Duftreiz. Die schwarze Kurve gibt die Kontrollantwort wieder. Die rote Kurve zeigt die Antwort der ORN auf den Reiz unter dem Einfluss von 10 μ M Haloperidol. Die grüne Kurve gibt die Antwort der ORN nach Auswaschen der Droge wieder. Unter dem Einfluss von Haloperidol wird die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN moduliert. Es können ähnliche Effekte wie bei den vorhergehenden Untersuchungen mit Chlorpromazin beobachtet werden. Die Antworten sind verlängert. Die rote Kurve kehrt erst später wieder auf die Grundfluoreszenz zurück. Die Effekte waren zum Teil nach Auswaschen der Droge reversibel. Die Werte hierfür lagen zwischen 0 und 84%. Es reagierten 69 ORN auf den Aminosäurereiz in neun Gewebeschnitten. 66 der 69 ORN zeigten eine modulierte Antwort unter dem Einfluss von 10 μ M Haloperidol. Im Durchschnitt reduzierte Haloperidol die Antwort der ORN auf einen Aminosäurereiz um $4,64 \pm 39,34\%$ (Abb. 3-13-a). Weiter kehrten die ORN erst später auf den oben beschriebenen Wert von 50% des Maximums zurück. Es konnte dadurch eine Verlängerung der Antwort um $55,24 \pm 57,36\%$ beobachtet werden (Abb. 3-13b).

Für eine genauere Beschreibung der Effekte siehe Tabelle 3-2 und Abbildung 3-12.

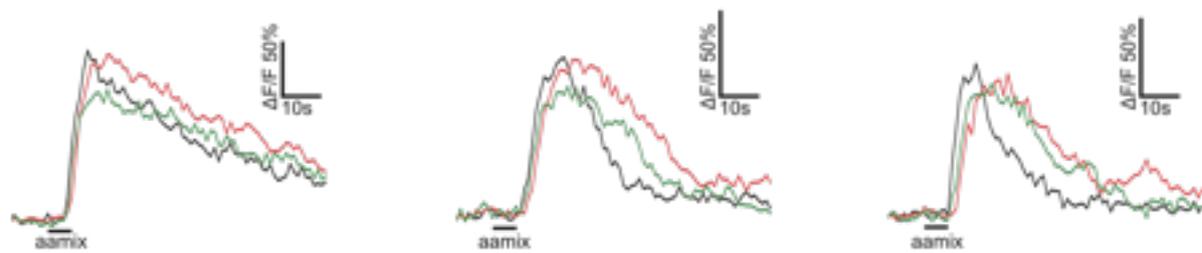


Abb. 3-10 Haloperidol (10 μ M) moduliert die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN

Schwarzer Graph: Antwort der ORN unter Kontrollbedingungen. Roter Graph: Antwort der ORN nach 10 Minuten Einwaschen einer 10 μ M Haloperidollösung. Durch die Haloperidollösung verlängert sich die Antwort auf den Reiz. Grüner Graph: Antwort der ORN 15 Minuten nach Auswaschen der Droge (wieder unter Kontrollbedingungen).

3.5.3 Modulatorische Effekte von Sulpirid auf die ORN

Auch Sulpirid zeigte ähnliche modulierende Effekte auf die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN wie die anderen Antipsychotika. So konnte auch eine Verlängerung der Antwort und eine vergrößerte Amplitude beobachtet werden. Die Effekte waren jedoch nicht so stark ausgeprägt und traten seltener auf als bei den anderen Antipsychotika. Abbildung 3-11 zeigt den Kalziumtransienten von drei ORN auf den Aminosäurereiz. Die schwarze Kurve gibt die Antwort unter Kontrollbedingungen wieder. Die rote Kurve zeigt die Antwort der ORN auf den Reiz unter dem Einfluss von 100 μ M Sulpirid. Es ist zu erkennen, dass die Amplitude in einem ORN erhöht dagegen aber auch in einem anderen ORN verringert ist. Weiter geht die Fluoreszenz erst später wieder auf den Grundwert zurück. Die grüne Kurve gibt die Antwort der ORN nach Auswaschen der Droge an. Es ist zu erkennen, dass einige Effekte nach Auswaschen von Sulpirid reversibel waren. Bei 13 bis 86% der ORN waren die modulatorischen

Effekte reversibel. Es reagierten 34 ORN in vier Gewebeschnitten auf den Aminosäurereiz. Bei 22 der 34 ORN konnte die Antwort durch Sulpirid moduliert werden. Tabelle 3-2 und Abbildung 3-12 geben eine genauere Beschreibung der modulatorischen Effekte von Sulpirid auf die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN. Im Durchschnitt verringerte sich die Antwort der ORN auf einen Aminosäurereiz um $4,43 \pm 27,89\%$ (Abb. 3-13a). Auch konnte unter dem Einfluss von Sulpirid eine Verlängerung der Antwort beobachtet werden. Jedoch war die Verlängerung um $4,34 \pm 47,66\%$ der Antwort im Vergleich zu den anderen Drogen gering (Abb. 3-13b).

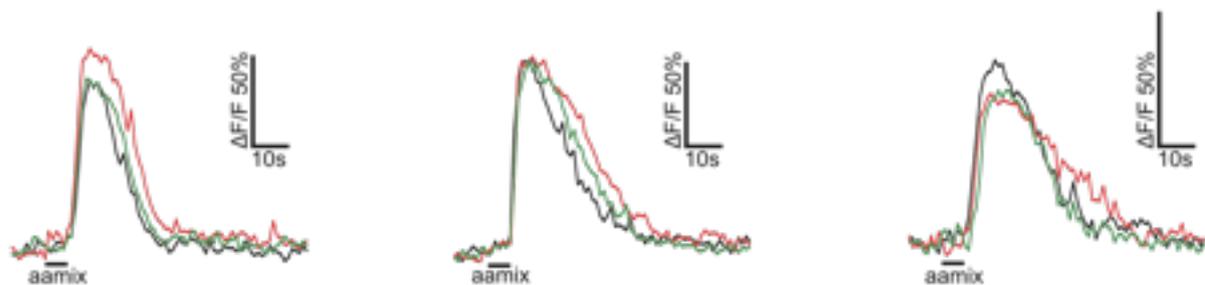


Abb. 3-11 Sulpirid ($100\mu\text{M}$) hat einen geringen Effekt auf die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN

Schwarzer Graph: Antwort der ORN unter Kontrollbedingungen. Roter Graph: Antwort der ORN nach 10 Minuten Einwaschen einer $100\mu\text{M}$ Sulpiridlösung. Bei 65% der ORN konnte die Odoranzien-induzierte Antwort durch $100\mu\text{M}$ Sulpirid moduliert werden. Die Amplitude wurde leicht erhöht und die Antwort auf den Reiz wurde verlängert. Grüner Graph: Antwort der ORN 15 Minuten nach Auswaschen der Droge (wieder unter Kontrollbedingungen).

Die Effekte der Antipsychotika waren zwar im Vergleich zueinander sehr ähnlich, jedoch unterscheidet sich die Häufigkeit, mit der diese Effekte beobachtet werden konnten. Tab. 3-2 zeigt, wie viele Zellen durch die unterschiedlichen Antipsychotika moduliert werden konnten. Es ist zu erkennen, dass durch Haloperidol prozentual die meisten Zellen moduliert wurden (96%). Haloperidol hat den stärksten modulatorischen Effekt auf die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN. Durch Chlorpromazin wurden 73% der ORN moduliert. Es ist der Tabelle zu entnehmen, dass Sulpirid den geringsten Effekt auf die Odoranzien-induzierte Antwort hat.

Abb. 3-12 zeigt die genaue Verteilung der modulierenden Effekte der Antipsychotika und die Häufigkeit dieser Effekte.

	Chlorpromazin 10μM		Haloperidol 10μM	
	Prozent der reagierenden Zellen		Prozent der reagierenden Zellen	
Gewebeschnitte	7		9	
auf Aminosäure reagierende Zellen	71	100	69	100
modulierte Zellen	52	73	66	96
nicht modulierte Zellen	19	27	5	4
	Sulpirid 100μM			
Gewebeschnitte	4			
auf Aminosäure reagierende Zellen	34	100		
modulierte Zellen	22	65		
nicht modulierte Zellen	12	35		

Tab. 3-2 Anzahl der durchgeführten Messungen mit Antipsychotika

Der Tabelle ist zu entnehmen, wie viele Messungen mit der jeweiligen Droge durchgeführt wurden. Weiter führt die Tabelle auf, wie häufig die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN durch das jeweilige Antipsychotikum moduliert wurde.

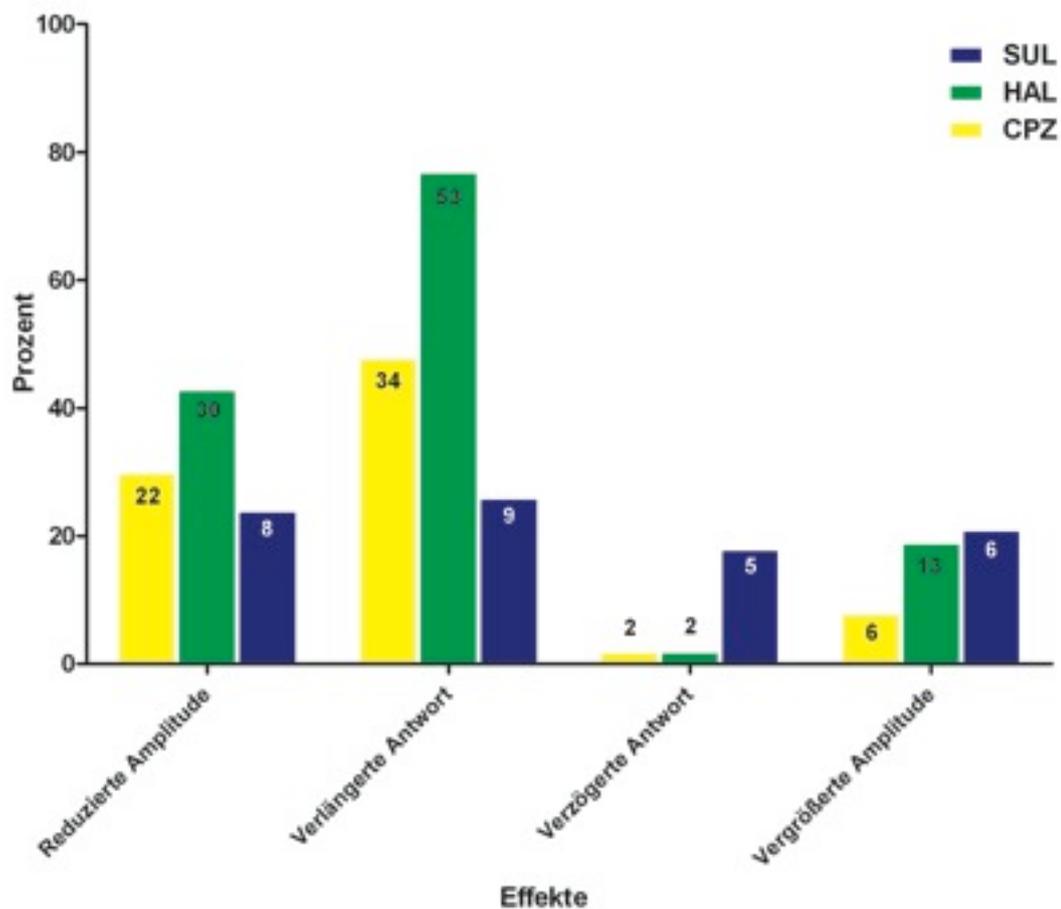


Abb. 3-12 Effekte der Modulation durch Antipsychotika

Der Graph zeigt die Häufigkeit der Effekte, die unter dem Einfluss der drei verwendeten Antipsychotika beobachtet werden konnten. Die Gesamthöhe eines Balkens gibt die Prozente der ORN an, die diesen Effekt zeigten. Die Zahl in den Balken gibt die absolute Anzahl der Zellen an, die diesen Effekt zeigten.

CPZ: Chlorpromazin; HAL: Haloperidol; SUL: Sulpirid

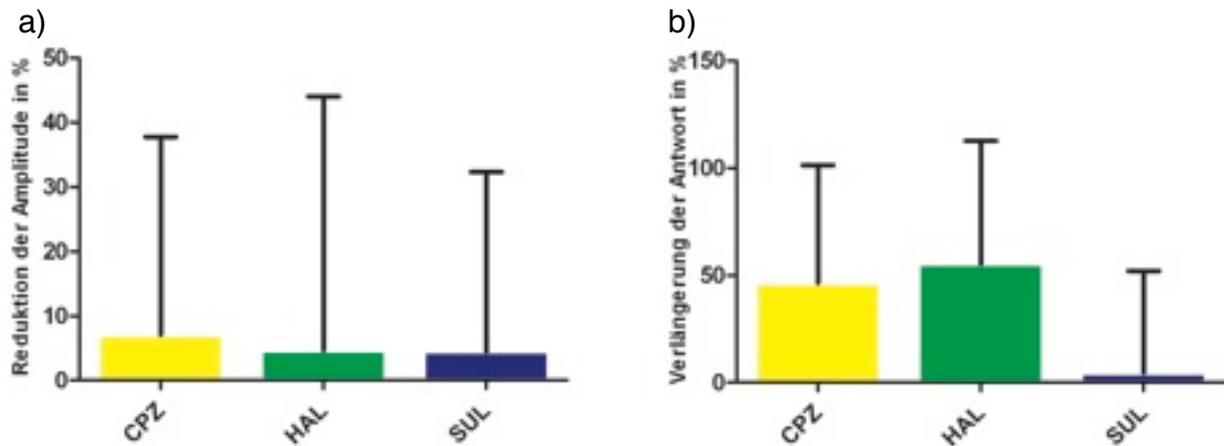


Abb. 3-13 Antipsychotika reduzieren und verlängern die Antwort der ORN

Den Graphen ist zu entnehmen, dass die Antwort der ORN auf einen Aminosäurereiz reduziert und verlängert wird. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichung. CPZ: Chlorpromazin, HAL: Haloperidol, SUL: Sulpirid. a) Prozentuale Reduktion der Amplitude durch Antipsychotika. Es ist zu erkennen, dass alle drei Antipsychotika eine Reduktion der Antwort hervorrufen. Jedoch ist diese Reduktion sehr gering. b) Der Graph gibt die Verlängerung der Antwort unter dem Einfluss der Antipsychotika wieder. CPZ und HAL verursachen eine starke Verlängerung der ORN. Unter SUL konnte dagegen nur eine sehr geringe Verlängerung beobachtet werden.

3.6 Ergebnisse der Messung des Grundkalziums der ORN

Um den Mechanismus der Antipsychotika und Dopamin auf die ORN genauer zu untersuchen, wurden die intrazelluläre Kalziumkonzentration in Ruhe verfolgt. Hierfür wurden die Drogen wie zuvor eingewaschen und es wurden Zeitserien mit 250 bzw. 300 Bildern bei einer Bilderfrequenz von 0,3 Hz gemacht. Abbildung 3-14 zeigt die Intensitätswerte der ORN unter dem Einfluss von $10\mu\text{M}$ Chlorpromazin. Die schwarze Kurve wurde unter Einwaschen der Droge aufgenommen. Die grüne Kurve repräsentiert die Intensitätswerte während die Droge ausgewaschen wurde. Es ist ein

deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität beim Einwaschen von Chlorpromazin zu sehen. Weiter ist zu beobachten, dass die Intensität schwankend ansteigt. Sowohl die Schwankungen der Intensitätswerte wie auch der Anstieg der Fluoreszenz waren nach Auswaschen von Chlorpromazin reversibel.

Die gleichen Effekte zeigte das Experiment mit einer $10\mu\text{M}$ Haloperidollösung (Daten nicht gezeigt).

Das gleiche Experiment wurde mit einer $100\mu\text{M}$ Sulpiridelösung durchgeführt. Auch hier waren diese Schwankungen der Intensitätswerte zu beobachten. Jedoch stieg die Fluoreszenzintensität, also die intrazelluläre Kalziumkonzentration, nicht an. Ob die Schwankung der Kalziumkonzentration durch Sulpirid hervorgerufen wurde, kann daraus nicht abschließend geklärt werden. Es wurden jeweils drei Gewebeschnitte auf die Wirkung von Haloperidol bzw. Sulpirid und vier Gewebeschnitte auf die Wirkung von Chlorpromazin auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in Ruhe gemessen.

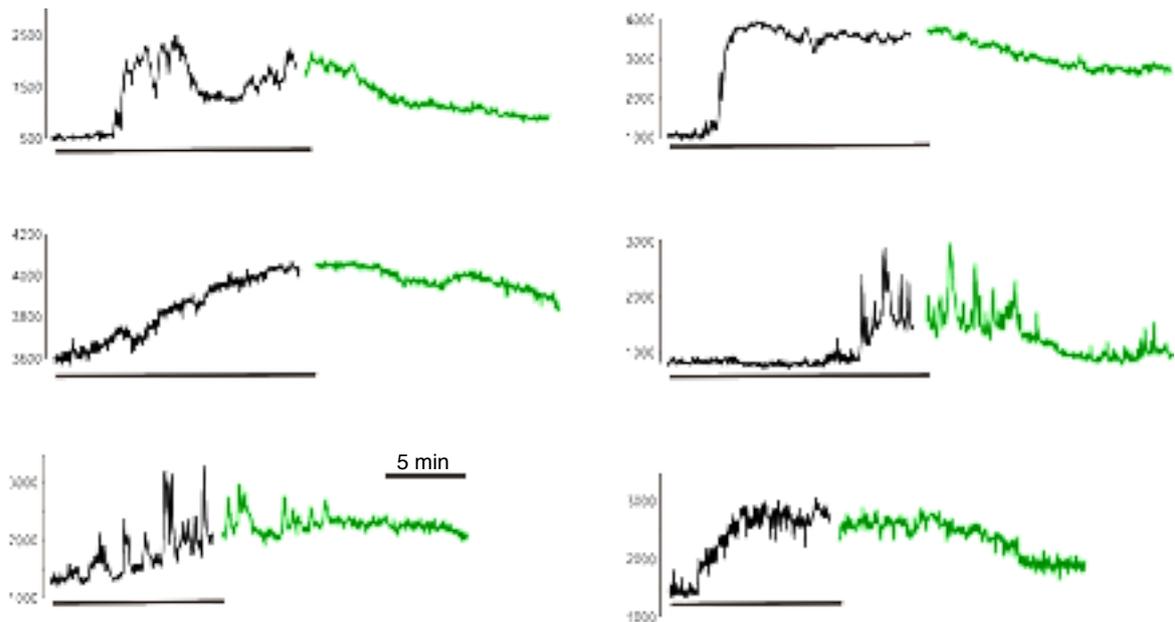


Abb. 3-14 Ruhekalziumkonzentration unter Einfluss von 10 μ M Chlorpromazin

Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration in ORN. Schwarzer Balken: Einwaschzeit der 10 μ M Chlorpromazinlösung. Grüne Kurve: Auswaschen der Chlorpromazinlösung.

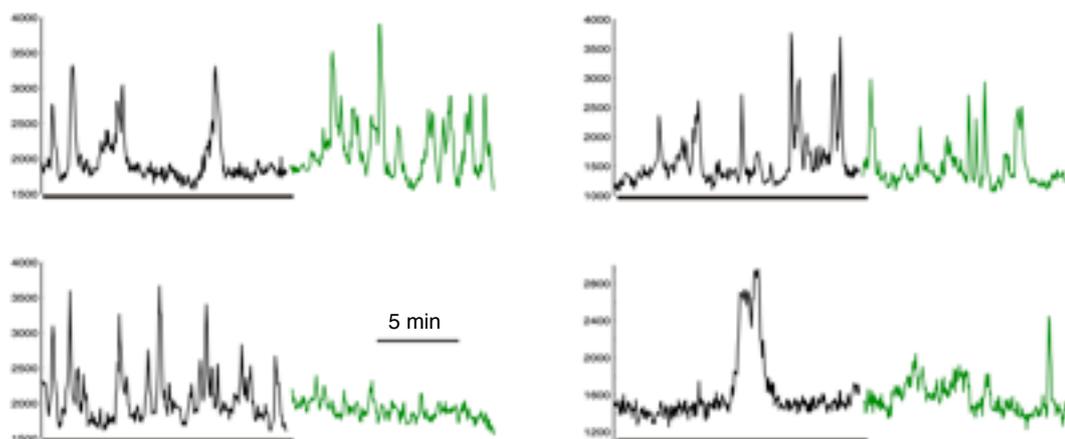


Abb. 3-15 Ruhekalziumkonzentration unter Einfluss von 100 μ M Sulpirid

Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration in ORN. Schwarzer Balken: Einwaschzeit der 100 μ M Sulpiridlösung. Grüne Kurve: Auswaschen der Sulpiridlösung.

3.7 Immunhistochemische Färbungen der olfaktorischen Mukosa

3.7.1 Färbung des Dopamin-D2-Rezeptors im olfaktorischen Epithel

Um die Lokalisation des dopaminergen Systems zu untersuchen, wurden die in Abschnitt 2.7 beschriebenen immunhistochemischen Färbungen durchgeführt.

Abb. 3-16 zeigt eine Färbung der olfaktorischen Mukosa von *Xenopus laevis*, mit einem Antikörper gegen den Dopamin-D2-Rezeptor (grün). Die Zellkerne wurden mit Propidium-Iodid gefärbt (rot). Es ist zu erkennen, dass der Antikörper punktartige Strukturen färbt, die sich über die gesamte Mukosa erstrecken, jedoch basal etwas stärker ausgeprägt sind.

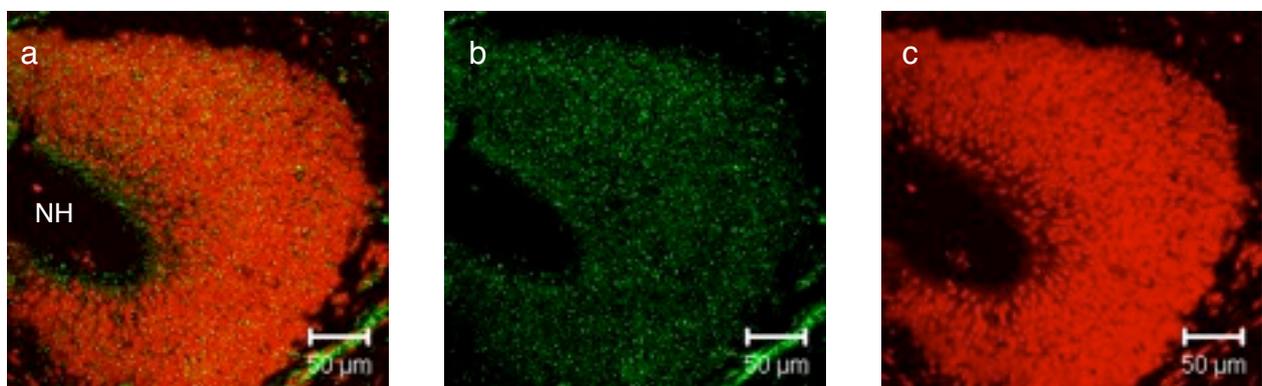


Abb. 3-16 Dopamin-D2-Rezeptoren in der olfaktorischen Mukosa

Die Abbildung zeigt Färbungen gegen den Dopamin-D2-Rezeptor (grün) in der olfaktorischen Mukosa. Die Kerne wurden durch Propidium-Iodid markiert (rot). Es sind punktartige Strukturen durch Antikörper gegen den Dopamin-D2-Rezeptor gefärbt, die sich basal verdichten. NH: Nasenhöhle

Abb. 3-17 zeigt Färbungen des apikalen Abschnittes der olfaktorischen Mukosa. Die Färbungen wurden nach dem gleichen Protokoll wie die vorherigen Färbungen durchgeführt. Durch den Antikörper gegen den Dopamin-D2-Rezeptor wurden dendritenartige Strukturen gefärbt (grün). Weiterhin ist zu erkennen, dass die olfaktorischen Riechköpfchen Dopamin-D2-Rezeptoren exprimieren.

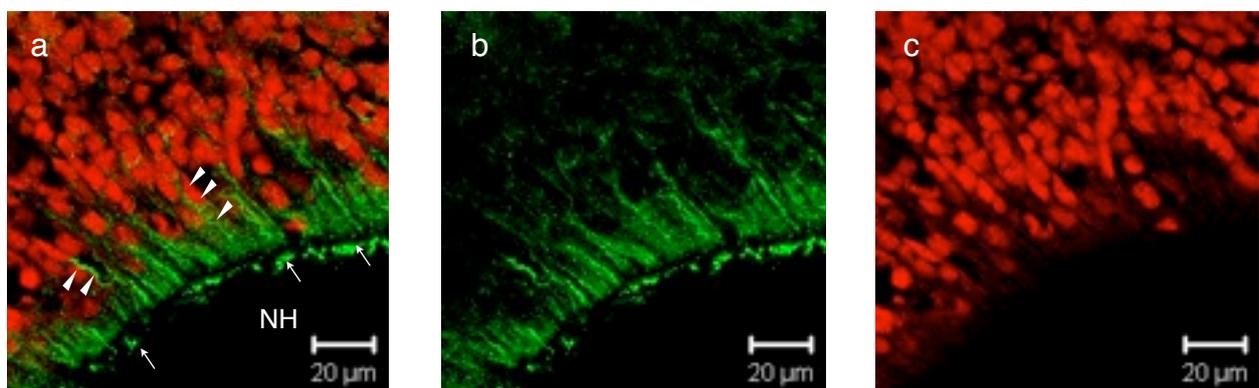


Abb. 3-17 Dendriten exprimieren Dopamin-D2-Rezeptoren

Der Antikörper gegen den Dopamin-D2-Rezeptor (grün) färbt im apikalen Teil der olfaktorischen Mukosa Dendriten (Pfeilspitzen) und die Riechköpfchen (Pfeile) an. Die Zellkerne wurden mit Propidium-Iodid markiert. NH: Nasenhöhle

3.7.2 Färbungen gegen die Tyrosinhydroxylase in der olfaktorischen Mukosa

Um die Quelle des Dopamins in der Peripherie des olfaktorischen Systems zu bestimmen, wurden immunhistochemische Färbungen gegen das Synthesenzym Tyrosinhydroxylase durchgeführt.

Abb. 3-18 zeigt die Färbungen der olfaktorischen Mukosa mit dem Antikörper gegen die Tyrosinhydroxylase (grün). Die Zellkerne wurden mit Propidium-Iodid gefärbt (rot). Abb. 3-18a-c gibt eine Übersicht eines großen Bereiches der olfaktorischen Mukosa. Abb. 3-18d-f zeigt einen basalen Ausschnitt der Mukosa. Verteilt über die olfaktorische Mukosa sind Tyrosinhydroxylase-positive Zellen zu erkennen. Diese Zellen konnten in allen Schichten der Mukosa beobachtet werden, allerdings ist eine Häufung basal zu erkennen. Einige dieser Zellen scheinen Fortsätze zu haben (Abb. 3-18 a,b Pfeilspitzen). Es kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, um welchen Zelltyp es sich dabei handelt. Es könnte sich jedoch um immature ORN handeln. Im Bereich der Lamina propria nimmt die Zahl der Tyrosinhydroxylase-positive Zellen deutlich zu. Dort werden die Axone der ORN zum Nervus olfactorius gebündelt und durch die *olfactory ensheathing glia* (OEG) ummantelt.

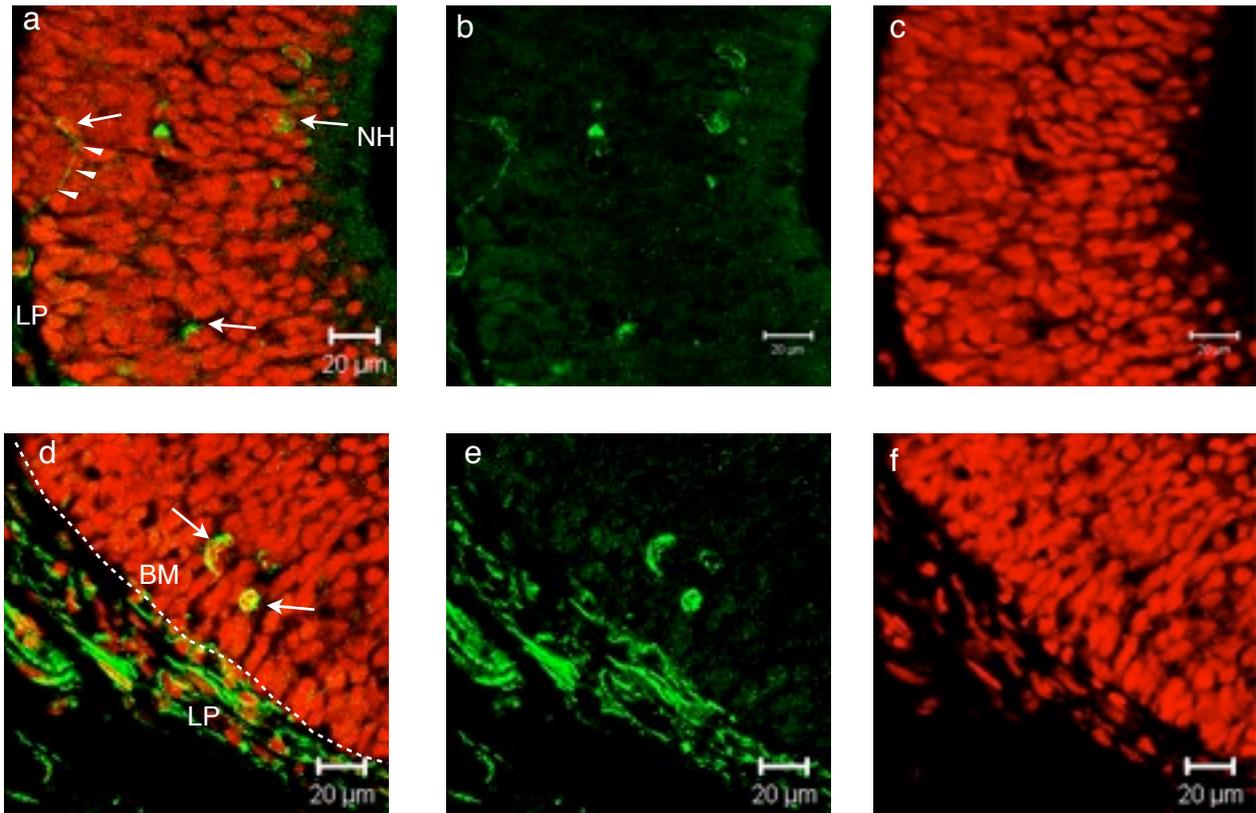


Abb. 3-18 Tyrosinhydroxylase-positive Zellen in der olfaktorischen Mukosa

Die Abbildung zeigt Färbungen der Tyrosinhydroxylase (grün). A,b,c zeigt einen medialen d,e,f einen basalen Ausschnitt der olfaktorischen Mukosa.

Tyrosinhydroxylase-positive Zellen sind über die olfaktorische Mukosa verteilt (Pfeil). Einige Zellen scheinen Fortsätze zu haben (Pfeilspitzen). Die Zellkerne wurden durch Propidium-Iodid markiert (rot). In der Lamina propria häufen sich die Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen. Hierbei handelt es sich um OEG.

LP: Lamina propria; NH: Nasenhöhle; BM: Basalmembran

3.8 Immunhistochemische Färbungen des Nervus olfactorius

Im Folgenden wurden immunhistochemische Färbungen des Nervus olfactorius durchgeführt. Es wurden Antikörper gegen den Dopamin-D2-Rezeptor und gegen das Enzym Tyrosinhydroxylase verwendet.

3.8.1 Färbungen des Dopamin-D2-Rezeptors im Nervus olfactorius

Abb. 3-19 zeigt den Nervus olfactorius gefärbt mit dem Antikörper gegen den Dopamin-D2-Rezeptor (grün) und Propidium-Iodid (rot), welches die Zellkerne markiert. Abb. 3-20 zeigt den Nervus olfactorius und den Bulbus olfactorius in der gleichen Färbung. Auf beiden Abbildungen ist gut zu erkennen, dass durch den Antikörper gegen den Dopamin-D2-Rezeptor punkrtartige Strukturen im Nervus olfactorius angefärbt werden. Es sind weiter faserartige Strukturen angefärbt, die mit Eintritt in die glomeruläre Schicht des Bulbus olfactorius enden (Abb. 3-20). In Abb. 3-20 a,b ist zu erkennen, dass Faserbündel des Nervus olfactorius lateral an der glomerulären Schicht vorbei ziehen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Axone, die zum akzessorischen Bulbus olfactorius ziehen. Weder in Abb. 3-19 noch in Abb. 3-20 werden im Nervus olfactorius Somata durch den Antikörper gegen den Dopamin-D2-Rezeptor angefärbt.

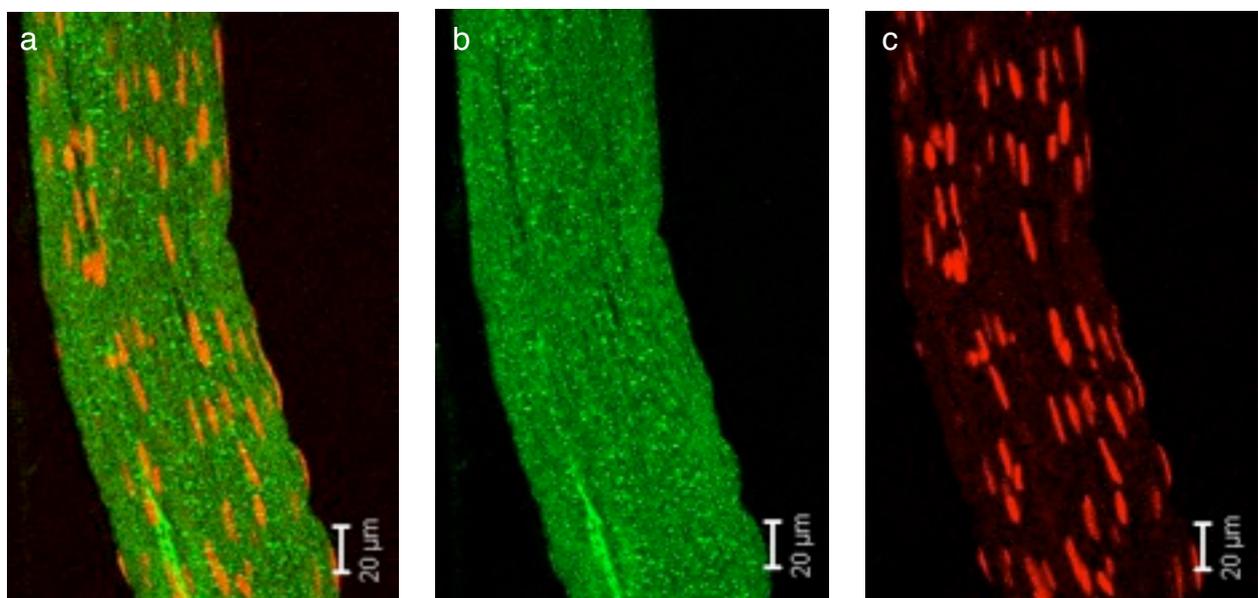


Abb. 3-19 Dopamin-D2-Rezeptoren im Nervus olfactorius

Die Abbildung zeigt den Nervus olfactorius gefärbt durch den Antikörper gegen den Dopamin-D2-Rezeptor (grün). Es sind faserartige Strukturen durch den Antikörper gefärbt. Die Zellkerne wurden mit Propidium-Iodid markiert (rot).

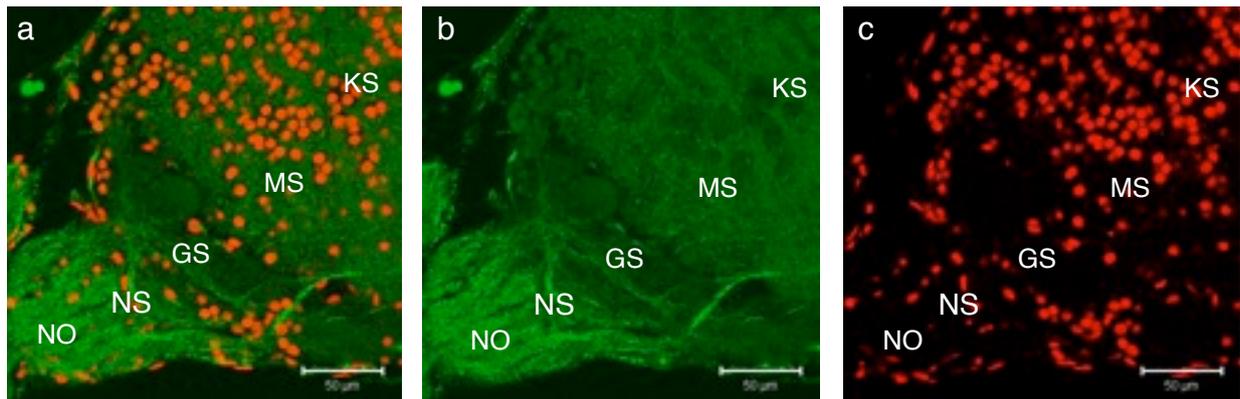


Abb. 3-20 Dopamin-D2-Rezeptoren am Übergang zum Bulbus olfactorius

Die Färbungen zeigen den Übergang vom Nervus olfactorius zum Bulbus olfactorius. Der Antikörper gegen den Dopamin-D2-Rezeptor (grün) färbt den Nervus olfactorius an. Die Färbung des Nerven endet mit Beginn der glomerulären Schicht. Lateral ziehen die Nervenfasern an der glomerulären Schicht vorbei zum akzessorischen Bulbus olfactorius. Die Zellkerne wurden mit Propidium-Iodid markiert (rot).

NO: Nervus olfactorius; NS: Nervenschicht; GS: glomeruläre Schicht; MS: Mitralzellschicht; KS: Körnerzellschicht.

3.8.2 Färbungen gegen die Tyrosinhydroxylase im Nervus olfactorius

Abbildung 3-21 zeigt eine Doppelfärbung des Dopamin-D2-Rezeptors (grün) und der Tyrosinhydroxylase (rot) im Nervus olfactorius. Wie schon in Abb. 3-19 und 3-20 sind punkt- und faserartigen Strukturen durch den Antikörper gegen den Dopamin-D2-Rezeptor markiert. Der Antikörper gegen die Tyrosinhydroxylase (rot) färbt faserartige Strukturen. Hierbei könnte es sich um Somata mit Fortsätzen handeln. Die beiden Antikörper färben verschiedene Strukturen im Nervus olfactorius an. Abb. 3-21 a zeigt deutlich, dass die Färbungen nicht wesentlich überlappen.

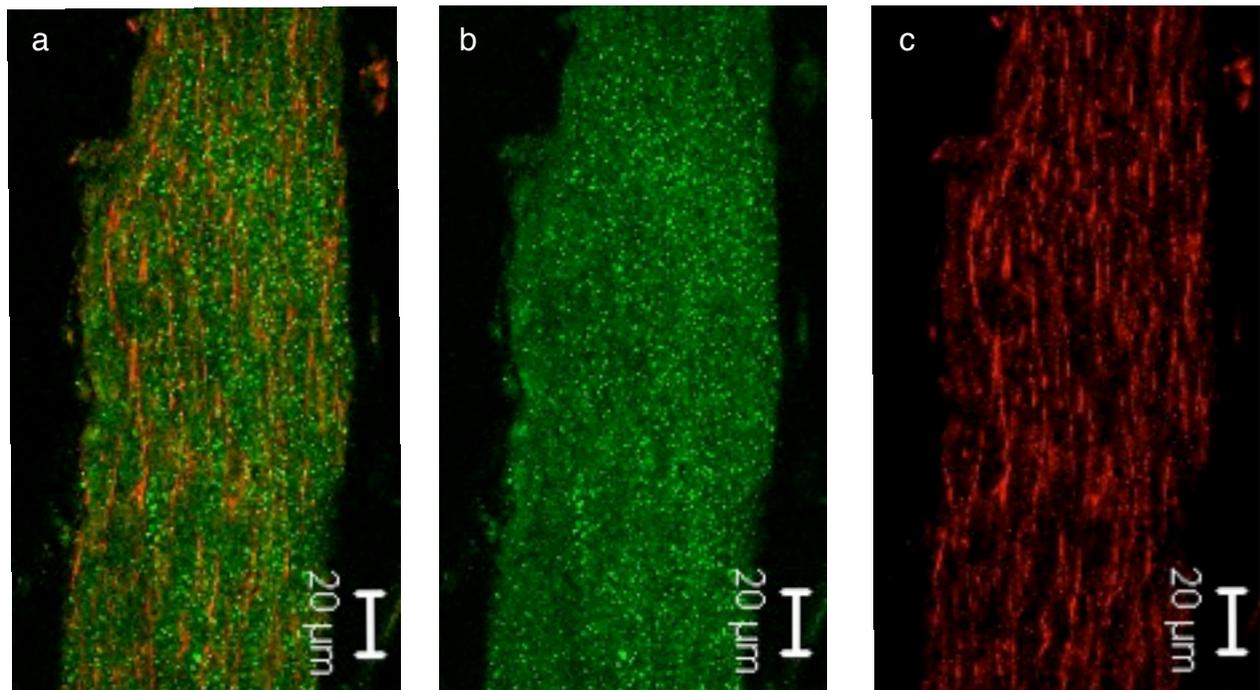


Abb. 3-21 Dopamin-D2-Rezeptoren und Tyrosinhydroxylase im Nervus olfactorius

Die Abbildung zeigt den Nervus olfactorius gefärbt gegen den Dopamin-D2-Rezeptor (grün) und das Enzym Tyrosinhydroxylase (rot). Die beiden Färbungen überlappen nicht (3-25 a). Durch den Antikörper gegen die Tyrosinhydroxylase werden Zellsomata mit Fortsätzen im Nervus olfactorius gefärbt.

3.8.3 Spezifizierung der Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen

Um die durch den Antikörper gegen die Tyrosinhydroxylase gefärbten Strukturen genauer zu bestimmen, wurden weitere immunhistochemische Färbungen durchgeführt (Abschnitt 2.7.4). Abb. 3-22 zeigt eine Doppelfärbung. Durch Propidium-Iodid wurden die Zellkerne der OEG im Nervus olfactorius angefärbt (rot). Daneben sind aber auch die Fortsätze der OEG durch Propidium-Iodid (rot) gefärbt. Der Antikörper gegen die Tyrosinhydroxylase färbt deutlich Zellsomata und deren Fortsätze an (grün). Abb. 3-22 (d-f) ist ein vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 3-22 (a-c).

Hier wird deutlich, dass die Färbungen sehr gut übereinstimmen. Demnach sind OEG Tyrosinhydroxylase-positive Zellen.

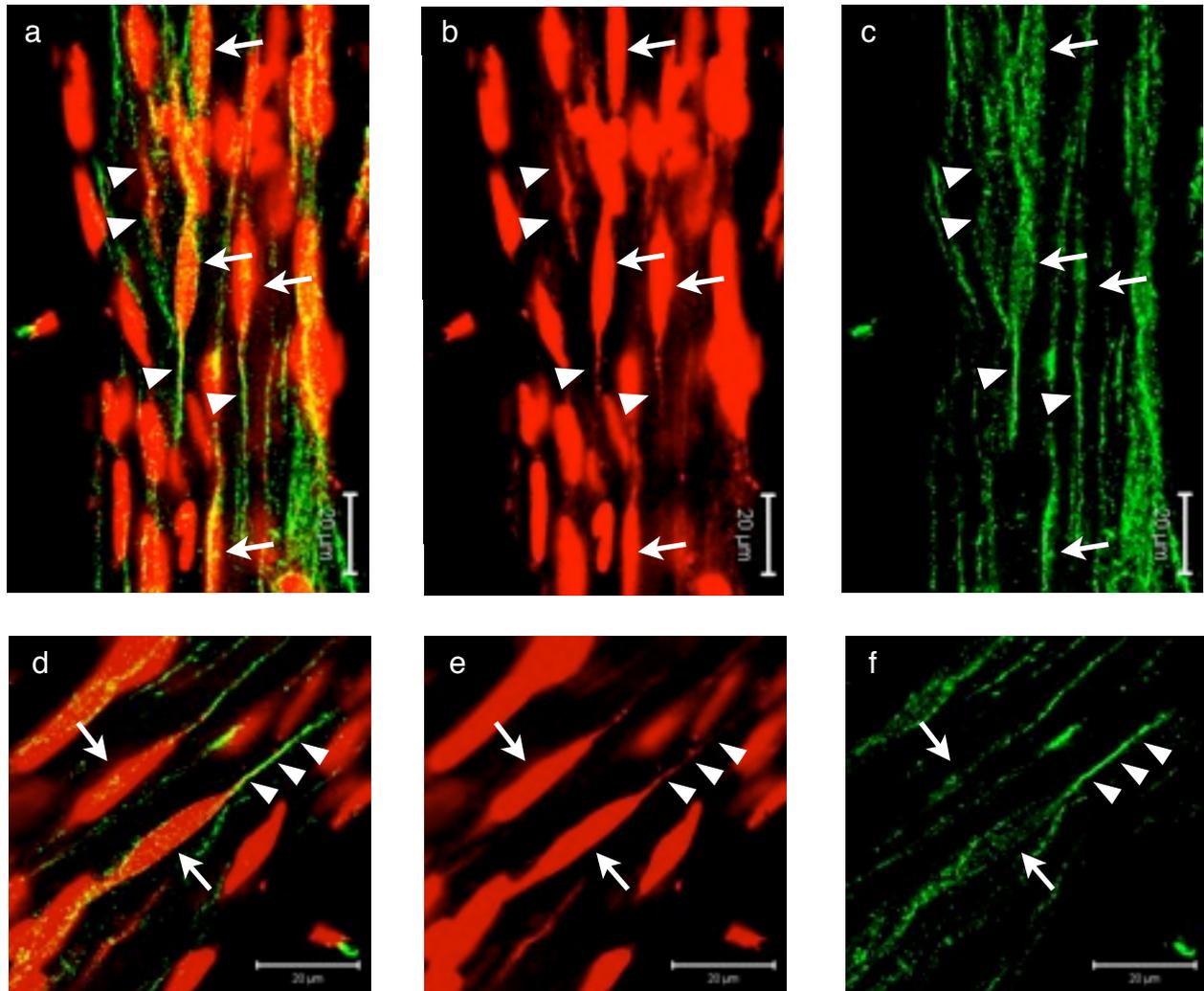


Abb. 3-22 Olfactory ensheathing glia exprimieren Tyrosinhydroxylase

Die Abbildung zeigt Färbungen der OEG im Nervus olfactorius durch Propidium-Iodid (rot). Die Somata (Pfeil) wie auch die Fortsätze (Pfeilspitze) sind gefärbt. Der Antikörper gegen die Tyrosinhydroxylase (grün) färbt ebenfalls die OEG. d-f ist ein vergrößerter Ausschnitt aus a-c.

3.9 Dopamin-D2-Rezeptor Subtypen

Die Ergebnisse dieser Dissertation werden von den Untersuchungen von E. Breunig unterstützt. In diesen Untersuchungen wurde die mRNA der beiden Dopamin-D2-Rezeptor Subtypen, D2A und D2B, in der olfaktorischen Mukosa von *Xenopus-laevis*-Larven nachgewiesen.

Hierfür wurde die mRNA der Dopamin-D2-Rezeptoren mit Hilfe der PCR nachgewiesen. Für eine detaillierte Beschreibung siehe Breunig (2009).

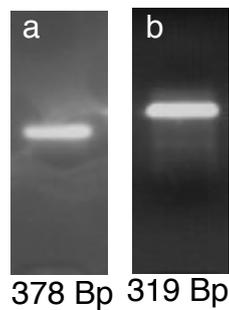


Abb. 3-23 Dopaminrezeptoren im olfaktorischen Epithel

PCR-Produkte der Dopamin-D2-Rezeptor Subtypen a) D2A und b) D2B im OE nach Auftrennung durch Gelelektrophorese. Die PCR-Produkte wurden durch Ethidium Bromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

4 Diskussion

4.1 Bisherige Arbeiten über das dopaminerge System in der olfaktorischen Peripherie

In mehreren Publikationen wurde gezeigt, dass Dopamin eine Rolle in der Reizverarbeitung und in der Entwicklung des olfaktorischen Systems spielt.

So konnten Hubbard und Kollegen mit Hilfe des Elektroolfaktogramms zeigen, dass Katecholamine eine Potentialänderung im olfaktorischen Epithel bewirkten (Hubbard et al., 2003).

Vargas zeigte 1999 durch die Patch-clamp Technik, dass Dopamin in kultivierten ORN der Ratte die Ströme über die Zellmembran beeinflusst (Vargas und Lucero, 1999). 2004 zeigten weiter Untersuchungen an Gewebeschnitten der olfaktorischen Mukosa der Maus, dass Dopamin die Reiz-induzierte Antwort der ORN reduziert (Hegg und Lucero, 2004). Auf diese Arbeit wird im Verlauf noch genauer eingegangen.

Im olfaktorischen System spielt Dopamin bei der Entwicklung und Regeneration der ORN eine Rolle. So kann Dopamin sowohl Apoptose wie auch die Differenzierung der Zellen in einer Zellkultur von ORN bewirken (Coronas et al., 1997a). Ähnliche Ergebnisse konnten von Féron et al in vitro gezeigt werden (Féron et al., 1999).

Obwohl es mehrere Untersuchungen zur Lokalisation dopaminerger Zellen (Verney et al., 1996; Sasaki et al., 2004; Izvolskaia et al., 2006) und Dopaminrezeptoren (Coronas et al., 1997b; Koster et al., 1999; Borgmann-Winter et al., 2009) in der olfaktorischen Peripherie gibt, bleibt die genaue Lokalisation bis heute zum größten Teil unbekannt.

In diesem Kontext wurde diese Dissertation durchgeführt, um die bestehenden Ergebnisse auf diesem Gebiet zu erweitern.

4.2 Dopaminerge Modulation

Dass Aminosäuren ein potenter Reiz für ORN von *Xenopus laevis* sind konnte in mehreren Veröffentlichungen gezeigt werden (Manzini et al., 2002a; Manzini et al., 2002b; Manzini und Schild, 2003a; Manzini und Schild, 2004; Schild und Manzini, 2004). In Abb. 3-1 wird dies mit Hilfe der Kalzium-Imaging-Methode verdeutlicht. In den genannten Arbeiten wurden neben einem Aminosäuremix auch einzelne Aminosäuren als Reiz für die ORN verwendet. Die Auswahl der in dieser Dissertation verwendeten Aminosäuren basiert auf den Ergebnissen von Manzini und Kollegen. Diese Ergebnisse dienten als Grundlage für die Modulationsexperimente dieser Arbeit.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Dopamin einen Effekt auf die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN von *Xenopus laevis* hat. Dieser Effekt wird über den Dopamin-D2-Rezeptor vermittelt.

Abb. 3-2 zeigt die Effekte, die Dopamin auf die Reizverarbeitung der ORN hat. Es ist deutlich zu sehen, dass unter dem Einfluss von Dopamin die Amplitude der Reiz-induzierten Antwort wesentlich geringer ist. Weiter verzögert Dopamin die Antwort der ORN. Für die Untersuchungen wurden drei verschiedene Dopaminkonzentrationen verwendet (10 μ M, 25 μ M und 50 μ M). Dass die beobachteten Effekte durch Dopamin verursacht wurden und nicht durch einen unphysiologischen Vorgang der Zelle, der z.B. durch die Präparation zustande kommt, konnte bewiesen werden, da die Effekte nach dem Auswaschen des Dopamins reversibel waren. Ein Grund dafür, dass die Reversibilität der Effekte eine große Spannbreite zwischen 0% und 100% zeigten kann sein, dass die verwendeten Dopaminkonzentrationen schädigend auf die Zellen wirken. Dopamin kann zur Apoptose der ORN führen (Coronas et al., 1997a). Es konnte kein Zusammenhang zwischen der verwendeten Dopaminkonzentration und der Anzahl der modulierten Zellen gefunden werden.

Hegg und Lucero haben gezeigt, dass Dopamin die Odoranzien-induzierte und kaliuminduzierte Antwort der ORN in Gewebeschnitten des olfaktorischen Epithels der Ratte reduziert (Hegg und Lucero, 2004). Die Ergebnisse dieser Veröffentlichung stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. In dieser Veröffentlichung wurde jedoch nur der reduzierende Effekt von Dopamin auf die Reiz-induzierte Antwort beschrieben. Bei *Xenopus laevis* konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Dopamin noch andere Effekte auf die ORN hat. Besonders deutlich ist die verzögerte Antwort der ORN zu beobachten. Wie dieser Effekt zustande kommt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Eine Möglichkeit ist die Öffnung von Kaliumkanälen, die die Zelle hyperpolarisieren und so einer Depolarisierung durch den Geruchsstoff entgegenwirken (Missale et al., 1998).

Auch konnte eine dopaminerge Modulation der Reiz-induzierten Antworten der ORN in dieser Arbeit schon bei einer Dopaminkonzentration von $10\mu\text{M}$ beobachtet werden. In der Veröffentlichung von Hegg und Lucero wurde der Effekt erst bei einer Konzentration von $50\mu\text{M}$ beobachtet.

4.3 Dopaminrezeptor-Spezifisierung

Um zu untersuchen, ob die dopaminergen Effekte über den Dopamin-D2-Rezeptor vermittelt werden, wurden die oben beschriebenen Experimente durchgeführt (Abschnitt 2.5). Es wurde untersucht, ob der Dopamin-D2-Rezeptor-Agonist Quinpirol die gleiche Wirkung auf die Reiz-induzierte Antwort der ORN hat. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob sich die dopaminerge Modulation der Antworten durch den Dopamin-D2-Rezeptor-Antagonist Sulpirid aufheben lassen. Wie Abb. 3-5 zu entnehmen ist, zeigte der potente und spezifische Dopamin-D2-Rezeptor-Agonist Quinpirol die gleichen Effekte wie Dopamin. Im Vergleich zu den Dopaminversuchen traten die Effekte hier schon nach kürzerer Einwaschzeit auf. Auch hier waren die Effekte sehr gut reversibel.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass der spezifische Dopamin-D2-Rezeptor-Antagonist Sulpirid die dopaminergen Effekte aufhob. Diese beiden Untersuchungen deuten darauf hin, dass die in Abschnitt 3.2 beobachteten Effekte über den Dopamin-D2-Rezeptor vermittelt werden. Gestützt werden diese Ergebnisse durch die Untersuchungen von Koster (Koster et al., 1999). Hier wurde gezeigt, dass im olfaktorischen Epithel nur der Dopamin-D2-Rezeptor exprimiert wird. Auch bei der Kaulquappe von *Xenopus laevis* konnte die mRNA des Dopamin-D2-Rezeptors nachgewiesen werden. (Abb. 3-23).

4.4 Dopamin vermindert die Sensitivität der ORN

Breunig und Kollegen zeigten, dass die Antwort der ORN mit zunehmender Reizstärke steigt (Breunig et al., 2010b). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Kalziumtransient der ORN auf einen Aminosäurereiz mit steigender Konzentration der Aminosäure zunimmt (Abb. 3-7).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Dopamin die Sensitivität der ORN vermindert.

Abbildung 3-8 zeigt, dass unter dem Einfluss von $10\mu\text{M}$ Dopamin eine fünffach höhere Aminosäurekonzentration, d.h. die fünffache Reizstärke, verwendet werden muss, um die gleiche Reaktion der ORN zu erreichen. Die Applikation einer dopaminergen Lösung kommt einer Verminderung der Reizstärke gleich.

Verhaltensexperimente zeigten, dass der Dopamin-D2-Rezeptor-Agonist Quinpirol einen dosisabhängigen Effekt auf die Wahrnehmung eines Geruchsstoff bei Ratten hat (Doty und Risser, 1989). Bei diesen Untersuchungen wurde beobachtet, dass die Ratten unter dem Einfluss von Quinpirol den Duftstoff erst bei höheren Konzentrationen wahrnehmen als Tiere der Kontrollgruppe. Eine andere Studie beschreibt den Effekt von Quinpirol auf die wahrgenommene Intensität eines Geruchsstoffs in Ratten (Wei et al., 2006). In dieser Studie wird beschrieben, dass Quinpirol einen dosisabhängigen

Einfluss auf die Wahrnehmung des Geruchsstoffs hat. Es wird jedoch in dieser Veröffentlichung davon ausgegangen, dass der Effekt im olfaktorischen Bulb oder höheren olfaktorischen Verarbeitungszentren vermittelt wird. Ob Dopamin einen Einfluss auf die ORN in der olfaktorischen Mukosa hat, wurde nicht untersucht.

Die Ergebnisse dieser Dissertation lassen darauf schließen, dass diese Effekte schon in der olfaktorischen Mukosa und nicht erst in höheren Verarbeitungszentren des ZNS verursacht werden.

Lucero und Kollegen haben gezeigt, dass Dopamin in dem Mukus, der das olfaktorische Epithel bedeckt, vorhanden ist (Lucero und Squires, 1998). Des Weiteren wird berichtet, dass Dopamin die ORN durch Desensitivierung vor schädlichen Reizen schützen soll (Lucero und Squires, 1998). Diese Arbeit unterstützt den letztgenannten Punkt, da gezeigt werden konnte, dass Dopamin die Sensitivität der ORN vermindert, sodass ein wesentlich stärkerer Reiz verwendet werden muss, um den gleichen Anstieg an intrazellulärem Kalzium zu bekommen. Das könnte die Zellen bei schädigenden, starken Reizen vor einer Kalziumüberladung und dadurch vor einer Zellschädigung schützen.

4.5 Einfluss der Antipsychotika auf das olfaktorische System

In mehreren Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass Medikamente das Riechvermögen beeinflussen. So kann der Kalziumkanalblocker Nifedipine Anosmie verursachen (Kharoubi, 2003). Doty veröffentlichte 2004 eine Liste mit Medikamenten, die einen Einfluss auf das Riechvermögen haben (Doty und Bromley, 2004). Auch die Antipsychotika haben einen Einfluss auf die Riechwahrnehmung und Verarbeitung (Doty und Bromley, 2004; Kruger et al., 2008). Da Dopamin auf die ORN einen Effekt hat, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Antipsychotika auch eine Wirkung auf die Reizverarbeitung der ORN haben, oder ob sie nur, wie bisher angenommen, die zentrale Geruchsverarbeitung beeinflussen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Antipsychotika, Chlorpromazin, Haloperidol und Sulpirid einen Effekt auf die Reiz-induzierte Antwort der ORN haben. Die Effekte der Antipsychotika Haloperidol und Chlorpromazin waren sehr ähnlich. Die ORN zeigten unter dem Einfluss dieser Antipsychotika eine deutliche Verlängerung der Odoranzien-induzierten Antwort. Ein weiterer beobachteter Effekt war eine Reduzierung der Amplitude. Letztere Beobachtung ist widersprüchlich mit den oben beschriebenen dopaminergen Effekten, da Antipsychotika antagonistisch am Dopamin-D2-Rezeptor wirken. Die Reversibilität war bei diesem Effekt sehr gering (4-10%), deshalb kann davon ausgegangen werden, dass diese Beobachtung nicht spezifisch durch einen Rezeptor verursacht wurde. Es ist möglich, dass die Drogen bei den verwendeten Konzentrationen schädigend auf die Zellen wirken. Alle anderen beobachteten Effekte waren nach dem Auswaschen der Drogen sehr gut reversibel.

Ob die Effekte der Antipsychotika durch den Dopamin-D2-Rezeptor vermittelt wurden, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Antipsychotika haben Einfluss auf viele Neurotransmittersysteme. Die Drogen sind Liganden an mehreren Rezeptoren. Es konnte auch in mehreren Untersuchungen gezeigt werden, dass ORN eine Vielzahl von Rezeptoren exprimieren. So wurde beschrieben, dass ORN zum Beispiel Dopamin, Serotonin, NMDA oder CB1-Rezeptoren exprimieren (Koster et al., 1999; Czesnik et al., 2007; Borgmann-Winter et al., 2009). Weitere Untersuchungen zeigen, dass Acetylcholin einen Effekt auf die Spikerate der ORN in Ruhe hat (Bouvet et al., 1987). Auch Adrenalin hat einen Effekt auf die Signalverarbeitung der ORN (Kawai, 1999). Dadurch ist wahrscheinlich, dass auch muskarinerge bzw. nikotinerge Rezeptoren und adrenerge Rezeptoren in der olfaktorischen Mukosa vorhanden sind. Somit besteht auch die Möglichkeit, dass die verwendeten Antipsychotika über andere Rezeptoren als den Dopamin-D2-Rezeptor, z.B. einen Serotonin- oder Cholinergenrezeptor, wirken.

Die Effekte von Sulpirid auf die Reiz-induzierte Antwort der ORN unterscheiden sich von denen der anderen Antipsychotika. Zwar konnten die gleichen Effekte beobachtet werden, jedoch waren diese Effekte nicht so stark ausgeprägt und die Anzahl der

modulierten ORN war geringer. Im Gegensatz zu den anderen Antipsychotika zeigten die ORN unter dem Einfluss von Sulpirid häufiger eine vergrößerte Amplitude. Sulpirid ist ein spezifischer Dopamin-D2-Rezeptor-Antagonist. Diese Ergebnisse tragen zu der Vermutung bei, dass die Effekte der Antipsychotika Chlorpromazin und Haloperidol nicht ausschließlich über den Dopamin-D2-Rezeptor vermittelt werden, sondern andere Mechanismen beteiligt sein können, da Sulpirid ein spezifischer Antagonist am Dopamin-D2-Rezeptor ist.

4.6 Wirkung der Antipsychotika auf das Ruhekalzium

In Abschnitt 3.6 wird der Effekt der Antipsychotika auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in Ruhe beschrieben. Unter dem Einfluss von Chlorpromazin steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration stark an. Der Kalziumanstieg ist unterschiedlich zwischen den Zellen. Die Amplitude, die Steigung aber auch die Latenz sind zwischen den Zellen unterschiedlich (Abb. 3-14). Viele Zellen zeigen einen schwankenden Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Sulpirid, als spezifischer Antagonist am Dopamin-D2-Rezeptor veränderte im Gegensatz zu den anderen Antipsychotika die intrazelluläre Kalziumkonzentration nicht. Somit kann auch hier davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt nicht über den Dopamin-D2-Rezeptor vermittelt wird.

Kim und Kollegen zeigten, dass Antipsychotika die intrazelluläre Kalziumkonzentration in HN33 Zellen erhöhen (Kim et al., 2006). Die Messungen wurden jedoch mit einer sehr niedrigen Frequenz durchgeführt, sodass ein möglicher schwankender Anstieg nicht beobachtet werden konnte.

Über welchen Mechanismus die beobachteten Effekte der Antipsychotika vermittelt wurden, konnte mit dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die Ergebnisse von Kim et al. zeigen, dass der antipsychotikavermittelte intrazelluläre Kalziumanstieg über den L-

Typ-Kalziumkanal vermittelt wird (Kim et al., 2006). Hegg und Lucero beschrieben, dass der dopaminerge Effekt auf die ORN über den L-Typ-Kalziumkanal vermittelt wird (Hegg und Lucero, 2004). So scheint es, dass der L-Typ-Kalziumkanal eine wichtige Rolle spielt. Wobei die bisherigen Veröffentlichungen und die Ergebnisse dieser Arbeit eher darauf schließen lassen, dass die Beeinflussung des L-Typ-Kalziumkanals durch Antipsychotika nicht über den Dopamin-D2-Rezeptor vermittelt wird. Jedoch sind weitere Untersuchungen nötig, um die genauen Mechanismen dieser Effekte zu klären.

In der Literatur sind noch weitere Einflüsse der Antipsychotika auf zellulärer Ebene beschrieben. Es ist bekannt, dass Antipsychotika wie Haloperidol auf verschiedene Kaliumkanäle wirken. So inhibieren Antipsychotika den Kalzium-aktivierten Kaliumkanal (Wu et al., 2000). Dieser ist in den ORN für die Repolarisation mitverantwortlich. Wu und Kollegen haben die Beeinflussung der Kalzium-abhängigen Kaliumkanäle als Dopamin unabhängig beschrieben (Wu et al., 2000). Weiter beschrieben Wu und Kollegen, dass Antipsychotika unabhängig von Dopaminrezeptoren Pituitary GH3 Neurone depolarisieren (Wu et al., 2000). Auch wirken Antipsychotika als Calmodulinantagonisten (Roufogalis et al., 1983). Calmodulin spielt in der Regulierung der intrazellulären Kalziumkonzentration eine Rolle. So ist der Kalzium-Calmodulin-Komplex wichtig für die Adaptation der ORN (Zufall und Leinders-Zufall, 2000).

Diese Eigenschaften der Antipsychotika könnten eine Erklärung für die modulatorischen Effekte der Antipsychotika auf die Reiz-induzierten Antworten der ORN wie auch für die Effekte auf das Ruhekalzium der ORN sein.

4.7 Dopamin-D2-Rezeptor-Lokalisation

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbungen konnte das dopaminerge System in der olfaktorischen Peripherie von *Xenopus laevis* genauer beschrieben werden.

Durch den Antikörper gegen den Dopamin-D2-Rezeptor wurden in der olfaktorischen Mukosa von *Xenopus laevis* verschiedene Strukturen angefärbt. So wird die gesamte Mukosa punktiert durch den Antikörper gefärbt. Dies deutet darauf hin, dass Dopamin-D2-Rezeptoren von verschiedenen Zelltypen im olfaktorischen Epithel exprimiert werden. Von der Lokalisation in der Mukosa, könnte es sich hierbei um Basalzellen und ORN handeln. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Féron et al. überein (Féron et al., 1999). Féron et al. hat die Expression von Dopamin-D2-Rezeptoren sowohl in Basalzellen wie auch in ORN beschrieben. Weitere Veröffentlichungen bestätigen die Expression von Dopamin-D2-Rezeptoren in ORN (Coronas et al., 1997b; Koster et al., 1999; Borgmann-Winter et al., 2009). Wie zuvor beschrieben, wurden punktierte Strukturen im olfaktorischen Epithel gefärbt. Weiter wird die Intensität der Färbung am Übergang zum Nervus olfactorius wesentlich stärker. Diese beiden Beobachtungen lassen darauf schließen, dass Dopamin-D2-Rezeptoren an den Axonen der ORN lokalisiert sind. Diese Überlegung stimmt mit den Ergebnissen von Coronas et al. überein (Coronas et al., 1997b). Dass Dopamin-D2-Rezeptoren an Axonen von ORN lokalisiert sind, konnte durch die Färbungen des Nervus olfactorius bestätigt werden. Hier konnte eine deutliche faserartige Struktur im Nervus olfactorius beobachtet werden.

Weiter wurden in manchen Färbungen dendritenartige Strukturen durch den Dopamin-D2-Rezeptor Antikörper gefärbt. Es ist beschrieben, dass Dopamin-D2-Rezeptoren an Dendriten der ORN exprimiert werden (Féron et al., 1999). In meinen Untersuchungen waren diese Strukturen nicht in jeder Färbung sichtbar. Jedoch wenn diese Strukturen gefärbt wurden, war eine deutliche Färbung zu erkennen. Dies deutet auf eine entwicklungsabhängige Expression des Dopamin-D2-Rezeptors an Dendriten der ORN hin. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese Vermutung zu bestätigen.

4.8 Tyrosinhydroxylase-positive Zellen in der olfaktorischen Peripherie

Der Antikörper gegen die Tyrosinhydroxylase färbte in der olfaktorischen Mukosa Zellen verteilt über die gesamte Mukosa. Einige dieser Zellen scheinen Fortsätze zu haben. Damit konnte gezeigt werden, dass es in der olfaktorischen Mukosa von *Xenopus laevis* dopaminerge Zellen gibt. Um welche Zellen es sich dabei handelt, konnte mit dieser Arbeit nicht geklärt werden. Bisherige Veröffentlichungen beschrieben, dass die Tyrosinhydroxylase wahrscheinlich von Neuronen exprimiert wird (Izvol'skaia et al., 2006) bzw. dass sie von immaturren ORN exprimiert wird (Sasaki et al., 2004).

Auf Grund der Lokalisation der gefärbten Zellen ist es wahrscheinlich, dass es sich auch bei den Untersuchungen dieser Arbeit um neuronale Zellen handelt.

Die Färbungen durch den Antikörper gegen die Tyrosinhydroxylase färbten im Nervus olfactorius Zellsomata mit Fortsätzen. Durch Propidium-Iodid lassen sich die *olfactory ensheathing glia* (OEG) im Nervus olfactorius anfärben (Lohr et al., 2005; Hartl et al., 2007). Durch diese Methode konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass OEG Tyrosinhydroxylase-positiv sind und damit eine Dopaminquelle im olfaktorischen System darstellen.

Wie in der Einleitung beschrieben, fördern OEG das Wachstum von Neuronen, durch die Produktion verschiedener Wachstumsfaktoren (Chuah und West, 2002). Dass Dopamin in der Entwicklung der ORN eine wichtige Rolle spielt, kann mehreren Veröffentlichungen entnommen werden (Coronas et al., 1997a; Féron et al., 1999). Es wird weiter beschrieben, dass den ORN durch Dopamin signalisiert wird, wann sie den Bulbus olfactorius erreicht haben. Ein ähnliches Signal soll den Dendriten der ORN bei Erreichen der Mukosaoberfläche vermittelt werden. Somit wird vermutet, dass Dopamin die Rolle eines Wachstumsfaktors im olfaktorischen System übernimmt (Mackay-Sim, 2003).

Ob Dopamin das Wachstum der ORN in vivo beeinflusst, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Jedoch trägt die Tatsache, dass OEG Tyrosinhydroxylase-positiv sind, zu der Annahme bei, dass Dopamin ein Signalstoff für das Aussprossen der Axone der ORN aus der olfaktorischen Mukosa zum Bulbus olfactorius ist. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Rolle des dopaminergen Systems bei der Entwicklung und ständigen Regeneration der olfaktorischen Peripherie besser zu verstehen.

5 Zusammenfassung

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass Dopamin über den Dopamin-D2-Rezeptor die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN moduliert. Die Antwort der ORN auf einen Aminosäurereiz wurde durch Dopamin wesentlich reduziert und die Zellen reagierten später. Es konnte gezeigt werden, dass der Dopamin-D2-Rezeptor in der olfaktorischen Peripherie exprimiert wird. Es müssen jedoch noch weitere z.B. elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden, um die genaue Lokalisation der Dopamin-D2-Rezeptoren zu bestimmen. Weiter konnte eine Quelle für Dopamin in der olfaktorischen Peripherie gezeigt werden. Um welche Zellen es sich dabei im olfaktorischen Epithel handelt, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Im Nervus olfactorius dagegen stellen die *olfactory ensheathing glia* eine Dopaminquelle dar.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Antipsychotika einen modulatorischen Effekt auf die Antwort der ORN wie auch auf die ORN in Ruhe haben. Über welche Mechanismen dieser Effekt vermittelt wird, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1-1**, S. 3 Schematische Darstellung des olfaktorischen Systems
- Abbildung 1-2**, S. 7 Schematische Darstellung des cAMP-assoziierten Transduktionsvorganges in einem olfaktorischen Rezeptorneuron
- Abbildung 2-1**, S. 15 Xenopus-laevis-Larve, Stadium 54
- Abbildung 2-2**, S. 16 Die olfaktorische Mukosa der Xenopus-laevis-Larve
- Abbildung 2-3**, S. 19 Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-4
- Abbildung 2-4**, S. 20 Schematische Abbildung des Strahlengangs im konfokalen Laser Scanning Mikroskope
- Abbildung 2-5**, S. 26 Gewebeschnitt unter dem Mikroskop
- Abbildung 2-6**, S. 27 Darstellung des Applikationssystems für Odoranzien und Badlösungen
- Abbildung 3-1**, S. 34 Odoranzien-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ Antwort olfaktorischer Rezeptorneurone
- Abbildung 3-2**, S. 36 Dopamin ($10\mu M$) moduliert die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN
- Abbildung 3-3**, S. 39 Effekte der dopaminergen Modulation
- Abbildung 3-4**, S. 40 Dopamin verzögert und verringert die Antwort der ORN
- Abbildung 3-5**, S. 42 Quinpirol ($25\mu M$) moduliert die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN
- Abbildung 3-6**, S. 43 Sulpirid antagonisiert den Dopamineffekt
- Abbildung 3-7**, S. 44 Die intrazelluläre Kalziumkonzentration ist abhängig von der Reizstärke.
- Abbildung 3-8**, S. 46 Dopamin reduziert die reizinduzierte Antwort der ORN
- Abbildung 3-9**, S. 48 Chlorpromazin ($10\mu M$) moduliert die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN

-
- Abbildung 3-10**, S. 50 Haloperidol ($10\mu\text{M}$) moduliert die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN
- Abbildung 3-11**, S. 51 Sulpirid ($100\mu\text{M}$) hat einen geringen Effekt auf die Odoranzien-induzierte Antwort der ORN
- Abbildung 3-12**, S. 54 Effekte der Modulation durch Antipsychotika
- Abbildung 3-13**, S. 55 Antipsychotika reduzieren und verlängern die Antwort der ORN
- Abbildung 3-14**, S. 57 Ruhekalziumkonzentration unter Einfluss von $10\mu\text{M}$ Chlorpromazin
- Abbildung 3-15**, S. 57 Ruhekalziumkonzentration unter Einfluss von $100\mu\text{M}$ Sulpirid
- Abbildung 3-16**, S. 58 Dopamin-D2-Rezeptoren in der olfaktorischen Mukosa
- Abbildung 3-17**, S. 59 Dendriten exprimieren Dopamin-D2-Rezeptoren
- Abbildung 3-18**, S. 61 Tyrosinhydroxylase-positive Zellen in der olfaktorischen Mukosa
- Abbildung 3-19**, S. 62 Dopamin-D2-Rezeptoren im Nervus olfactorius
- Abbildung 3-20**, S. 63 Dopamin-D2-Rezeptoren am Übergang zum Bulbus olfactorius
- Abbildung 3-21**, S. 64 Dopamin-D2-Rezeptoren und Tyrosinhydroxylase im Nervus olfactorius
- Abbildung 3-22**, S. 65 Olfactory ensheathing glia exprimieren Tyrosinhydroxylase
- Abbildung 3-23**, S. 66 Dopaminrezeptoren im olfaktorischen Epithel
- Tabelle 2-1**, S. 21 Zusammensetzung der Ringer_{XL}-Lösung
- Tabelle 2-2**, S. 22 Zusammensetzung des Aminosäuremix
- Tabelle 2-3**, S. 23 Drogen
- Tabelle 3-1**, S. 38 Anzahl der durchgeführten Messungen mit Dopamin
- Tabelle 3-2**, S. 53 Anzahl der durchgeführten Messungen mit Antipsychotika

7 Abkürzungsverzeichnis

aamix	Aminosäuremix
Abb.	Abbildung
AM	Acetoxymethyl
ATP	Adenosintriphosphat
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläre Kalziumkonzentration
cAMP	Adenosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GnRH	Gonadotropin releasing Hormone
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
LSM	Laser Scanning Microscope
Met	Methionin
mRNA	Messenger RNA
NGS	normal goat serum
OEG	olfactory ensheathing glia
OR	Olfaktorische Rezeptoren
ORN	Olfaktorische Rezeptorneurone
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphat buffered saline with triton
RNA	Ribonukleinsäure
TH	Tyrosinhydroxylase
ZNS	Zentralnervensystem

8 Literaturverzeichnis

- Abraham A, Mathai KV (1983): The effect of right temporal lobe lesions on matching of smells. *Neuropsychologia* 21: 277-281.
- Atanasova B, Graux J, El Hage W, Hommet C, Camus V, Belzung C (2008): Olfaction: a potential cognitive marker of psychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 1315-1325.
- Avila VL, Frye PG (1978): Feeding behavior of the African Clawed frog (*Xenopus laevis* Daudin): effect of prey type. *J Herpetol* 12: 391-396
- Barnett SC (2004): Olfactory ensheathing cells: unique glial cell types? *J Neurotrauma* 21: 375-382.
- Belluscio L, Gold GH, Names A, Axel R (1998): Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron* 20: 69-81.
- Berendse HW, Booij J, Francot CM, Bergmans PL, Hijman R, Stoof JC, Wolters EC (2001): Subclinical dopaminergic dysfunction in asymptomatic Parkinson's disease patients' relatives with a decreased sense of smell. *Ann Neurol* 50: 34-41.
- Bertolucci-D'Angio M, Serrano A, Driscoll P, Scatton B (1990): Involvement of mesocorticolimbic dopaminergic systems in emotional states. *Prog Brain Res* 85: 405-416; discussion 416-407.
- Borgmann-Winter KE, Rawson NE, Wang HY, Wang H, Macdonald ML, Ozdener MH, Yee KK, Gomez G, Xu J, Bryant B, et al. (2009): Human olfactory epithelial cells generated in vitro express diverse neuronal characteristics. *Neuroscience* 158: 642-653.
- Bouvet JF, Delaleu JC, Holley A (1987): Olfactory receptor cell function is affected by trigeminal nerve activity. *Neurosci Lett* 77: 181-186.
- Boyd JD, Delaney KR (2002): Tyrosine hydroxylase-immunoreactive interneurons in the olfactory bulb of the frogs *Rana pipiens* and *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol* 454: 42-57.

-
- Breipohl W, Laugwitz HJ, Bornfeld N (1974): Topological relations between the dendrites of olfactory sensory cells and sustentacular cells in different vertebrates. An ultrastructural study. *J Anat* 117: 89-94.
- Brennan PA(2001): The vomeronasal system. *Cell Mol Life Sci* 58: 546-555.
- Breunig E (2009): Transduction in Olfactory Receptor Neurons of *Xenopus laevis* Larvae: Pharmacological Blockage with FM1-43 and Endocannabinoid Modulation. Diss. rer. nat. Göttingen 2009.
- Breunig E, Czesnik D, Piscitelli F, Di Marzo V, Manzini I, Schild D (2010a): Endocannabinoid modulation in the olfactory epithelium. *Results Probl Cell Differ* 52: 139-145.
- Breunig E, Manzini I, Piscitelli F, Gutermann B, Di Marzo V, Schild D, Czesnik D (2010b): The endocannabinoid 2-arachidonoyl-glycerol controls odor sensitivity in larvae of *Xenopus laevis*. *J Neurosci* 30: 8965-8973.
- Buck LB (1996): Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu Rev Neurosci* 19: 517-544.
- Calof AL, Bonnin A, Crocker C, Kawauchi S, Murray RC, Shou J, Wu HH (2002): Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage. *Microsc Res Tech* 58: 176-188.
- Chuah MI, West AK (2002): Cellular and molecular biology of ensheathing cells. *Microsc Res Tech* 58: 216-227.
- Coronas V, Féron F, Hen R, Sicard G, Jourdan F, Moyse E (1997a): In vitro induction of apoptosis or differentiation by dopamine in an immortalized olfactory neuronal cell line. *J Neurochem* 69: 1870-1881.
- Coronas V, Srivastava LK, Liang JJ, Jourdan F, Moyse E (1997b): Identification and localization of dopamine receptor subtypes in rat olfactory mucosa and bulb: a combined in situ hybridization and ligand binding radioautographic approach. *J Chem Neuroanat* 12: 243-257.
- Corso JF (1971): Sensory processes and age effects in normal adults. *J Gerontol* 26: 90-105.

-
- Czesnik D, Schild D, Kuduz J, Manzini I (2007): Cannabinoid action in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2967-2972.
- Damm M, Temmel A, Welge-Lussen A, Eckel HE, Kreft MP, Klussmann JP, Gudziol H, Huttenbrink KB, Hummel T (2004): [Olfactory dysfunctions. Epidemiology and therapy in Germany, Austria and Switzerland]. *HNO* 52: 112-120.
- Debat H, Eloit C, Blon F, Sarazin B, Henry C, Huet JC, Trotier D, Pernollet JC (2007): Identification of human olfactory cleft mucus proteins using proteomic analysis. *J Proteome Res* 6: 1985-1996.
- Deitmer WD, Schild D: Ca²⁺ und pH: Ionenmessungen in Zellen und Geweben (Labor im Fokus). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 2000
- Dhallan RS, Yau KW, Schrader KA, Reed RR (1990): Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* 347: 184-187.
- Doty RL (1991): Olfactory capacities in aging and Alzheimer's disease. Psychophysical and anatomic considerations. *Ann N Y Acad Sci* 640: 20-27.
- Doty RL (2007): Olfaction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 13: 225-228.
- Doty RL, Bromley SM (2004): Effects of drugs on olfaction and taste. *Otolaryngol Clin North Am* 37: 1229-1254.
- Doty RL, Risser JM (1989): Influence of the D-2 dopamine receptor agonist quinpirole on the odor detection performance of rats before and after spiperone administration. *Psychopharmacology (Berl)* 98: 310-315.
- Eisthen HL, Delay RJ, Wirsig-Wiechmann CR, Dionne VE (2000): Neuromodulatory effects of gonadotropin releasing hormone on olfactory receptor neurons. *J Neurosci* 20: 3947-3955.
- Féron F, Vincent A, Mackay-Sim A (1999): Dopamine promotes differentiation of olfactory neuron in vitro. *Brain Res* 845: 252-259.
- Föske, H (1934): Das Geruchsorgan von *Xenopus laevis*. *Z Anat Entwicklungsgesch* 103: 519-550

-
- Franssen EH, de Bree FM, Verhaagen J (2007): Olfactory ensheathing glia: their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord. *Brain Res Rev* 56: 236-258.
- Frasnelli J, Hummel T (2005): Olfactory dysfunction and daily life. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 262: 231-235.
- Freitag J, Krieger J, Strotmann J, Breer H (1995): Two classes of olfactory receptors in *Xenopus laevis*. *Neuron* 15: 1383-1392.
- Friedrich RW, Korsching SI (1997): Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging. *Neuron* 18: 737-752.
- Friedrich RW, Korsching SI (1998): Chemotopic, combinatorial, and noncombinatorial odorant representations in the olfactory bulb revealed using a voltage-sensitive axon tracer. *J Neurosci* 18: 9977-9988.
- Fuchs T, Malecova B, Linhart C, Sharan R, Khen M, Herwig R, Shmulevich D, Elkon R, Steinfath M, O'Brien JK, et al. (2002): DEFOG: a practical scheme for deciphering families of genes. *Genomics* 80: 295-302.
- Getchell ML, Getchell TV (1992): Fine structural aspects of secretion and extrinsic innervation in the olfactory mucosa. *Microsc Res Tech* 23: 111-127.
- Getchell ML, Mellert TK: Olfactory mucus secretion. In: Smell and taste in health and disease. Getchell, TV, Doty RL et al. editors. Raven Press. New York 1991, 83-95.
- Getchell TV (1977): Analysis of intracellular recordings from salamander olfactory epithelium. *Brain Res* 123: 275-286.
- Gold GH (1999): Controversial issues in vertebrate olfactory transduction. *Annu Rev Physiol* 61: 857-871.
- Gottfried JA (2006): Smell: central nervous processing. *Adv Otorhinolaryngol* 63: 44-69.
- Haehner A, Hummel T, Hummel C, Sommer U, Junghanns S, Reichmann H (2007): Olfactory loss may be a first sign of idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* 22: 839-842.

-
- Hajjar E, Perahia D, Debat H, Nespoulous C, Robert CH (2006): Odorant binding and conformational dynamics in the odorant-binding protein. *J Biol Chem* 281: 29929-29937.
- 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.
- Harkema JR, Carey SA, Wagner JG (2006): The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol Pathol* 34: 252-269.
- Hartl S, Heil JE, Hirsekorn A, Lohr C (2007): A novel neurotransmitter-independent communication pathway between axons and glial cells. *Eur J Neurosci* 25: 945-956.
- 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.
- Hatt H: Geschmack und Geruch. In: Physiologie des Menschen; hrsg. Schmidt RF, Thews G, Lang F u.a; Springer Verlag, Berlin 2000, 322
- Hatt H (2004): Molecular and cellular basis of human olfaction. *Chem Biodivers* 1: 1857-1869.
- Hegg CC, Lucero MT (2004): Dopamine reduces odor- and elevated-K(+)-induced calcium responses in mouse olfactory receptor neurons in situ. *J Neurophysiol* 91: 1492-1499.
- Herz A (1998): Opioid reward mechanisms: a key role in drug abuse? *Can J Physiol Pharmacol* 76: 252-258.
- Holy TE, Dulac C, Meister M (2000): Responses of vomeronasal neurons to natural stimuli. *Science* 289: 1569-1572.

-
- Hoogland PV, Huisman E (1999): Tyrosine hydroxylase immunoreactive structures in the aged human olfactory bulb and olfactory peduncle. *J Chem Neuroanat* 17: 153-161.
- Hubbard PC, Barata EN, Canario AV (2003): Olfactory sensitivity to catecholamines and their metabolites in the goldfish. *Chem Senses* 28: 207-218.
- Huisman E, Uylings HB, Hoogland PV (2004): A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 19: 687-692.
- Huisman E, Uylings HB, Hoogland PV (2008): Gender-related changes in increase of dopaminergic neurons in the olfactory bulb of Parkinson's disease patients. *Mov Disord* 23: 1407-1413.
- Hummel T, Nordin S (2005): Olfactory disorders and their consequences for quality of life. *Acta Otolaryngol* 125: 116-121.
- Izvol'skaia M, Duittoz AH, Tillet Y, Ugrumov MV (2006): Tyrosine hydroxylase expression in the olfactory/respiratory epithelium in early sheep fetuses (*Ovis aries*). *Brain Res* 1083: 29-38.
- Kawai F (1999): Simulation analysis of effects of adrenaline on spike generation in olfactory receptor cells. *Chem Senses* 24: 701-704.
- Keverne EB (1999): The vomeronasal organ. *Science* 286: 716-720.
- Kharoubi S (2003) [Drug induced anosmia with nifedipine]. *Presse Med* 32: 1269-1272.
- Kim HS, Yumkham S, Choi JH, Kim EK, Kim YS, Ryu SH, Suh PG (2006): Haloperidol induces calcium ion influx via L-type calcium channels in hippocampal HN33 cells and renders the neurons more susceptible to oxidative stress. *Mol Cells* 22: 51-57.
- 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
- Koster NL, Norman AB, Richtand NM, Nickell WT, Puche AC, Pixley SK, Shipley MT (1999): Olfactory receptor neurons express D2 dopamine receptors. *J Comp Neurol* 411: 666-673.

-
- Kramer M (1933) Untersuchungen über die Sinnesleistungen und das Orientierungsverhalten von *Xenopus laevis* Daudin. *Zool Jahrb Abt Allg Zool Physiol* 52: 629-676
- Kruger S, Haehner A, Thiem C, Hummel T (2008): Neuroleptic-induced parkinsonism is associated with olfactory dysfunction. *J Neurol* 255: 1574-1579.
- Landis BN, Konnerth CG, Hummel T (2004): A study on the frequency of olfactory dysfunction. *Laryngoscope* 114: 1764-1769.
- Leinders-Zufall T, Lane AP, Puche AC, Ma W, Novotny MV, Shipley MT, Zufall F (2000): Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature* 405: 792-796.
- Lohr C, Heil JE, Deitmer JW (2005): Blockage of voltage-gated calcium signaling impairs migration of glial cells in vivo. *Glia* 50: 198-211.
- Lucero MT, Squires A (1998): Catecholamine concentrations in rat nasal mucus are modulated by trigeminal stimulation of the nasal cavity. *Brain Res* 807: 234-236.
- Mackay-Sim A : Neurogenesis in the Adult Olfactory Neuroepithelium. In: Handbook of olfaction and gustation. Doty RL (ed), 2. ed., Informa Healthcare New York 2003, 93-113
- Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB (1999): Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96: 713-723.
- Manzini I, Schild D (2003a): cAMP-independent olfactory transduction of amino acids in *Xenopus laevis* tadpoles. *J Physiol* 551: 115-123.
- Manzini I, Schild D (2003b): Multidrug resistance transporters in the olfactory receptor neurons of *Xenopus laevis* tadpoles. *J Physiol* 546: 375-385.
- Manzini I, Schild D (2004): Classes and narrowing selectivity of olfactory receptor neurons of *Xenopus laevis* tadpoles. *J Gen Physiol* 123: 99-107.
- Manzini I, Peters F, Schild D (2002a): Odorant responses of *Xenopus laevis* tadpole olfactory neurons: a comparison between preparations. *J Neurosci Methods* 121: 159-167.

-
- Manzini I, Rossler W, Schild D (2002b): cAMP-independent responses of olfactory neurons in *Xenopus laevis* tadpoles and their projection onto olfactory bulb neurons. *J Physiol* 545: 475-484.
- Manzini I, Schweer TS, Schild D (2008): Improved fluorescent (calcium indicator) dye uptake in brain slices by blocking multidrug resistance transporters. *J Neurosci Methods* 167: 140-147.
- Meredith M (2001): Human vomeronasal organ function: a critical review of best and worst cases. *Chem Senses* 26: 433-445.
- Mezler M, Konzelmann S, Freitag J, Rossler P, Breer H (1999): Expression of olfactory receptors during development in *Xenopus laevis*. *J Exp Biol* 202: 365-376
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998): Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78: 189-225.
- Monti-Bloch L, Jennings-White C, Dolberg DS, Berliner DL (1994): The human vomeronasal system. *Psychoneuroendocrinology* 19: 673-686.
- Niewkoop PD, Faber J: Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North Holland Company, Amsterdam 1994
- Okano M, Takagi SF (1974): Secretion and electrogenesis of the supporting cell in the olfactory epithelium. *J Physiol* 242: 353-370.
- Pace U, Hanski E, Salomon Y, Lancet D (1985): Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature* 316: 255-258.
- Park D, Eisthen HL (2003): Gonadotropin releasing hormone (GnRH) modulates odorant responses in the peripheral olfactory system of axolotls. *J Neurophysiol* 90: 731-738.
- Rawson NE, Yee KK (2006): Transduction and coding. *Adv Otorhinolaryngol* 63: 23-43.
- Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB (1993): A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 73: 597-609.
- Ronnett GV, Moon C (2002): G proteins and olfactory signal transduction. *Annu Rev Physiol* 64: 189-222.

-
- Roufogalis BD, Minocherhomjee AM, Al-Jobore A (1983): Pharmacological antagonism of calmodulin. *Can J Biochem Cell Biol* 61: 927-933.
- Sajjadian A, Doty RL, Gutnick D, Chirurugi RJ, Savak M, Perl D (1994): Olfactory dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegeneration* 3:153-157
- Sasaki H, Berlin R, Baker H (2004): Transient expression of tyrosine hydroxylase promoter/reporter gene constructs in the olfactory epithelium of transgenic mice. *J Neurocytol* 33: 681-692.
- Schild D (1985): A computer-controlled device for the application of odours to aquatic animals. *J Electrophysiol Techn* 12: 71-79
- Schild D, Manzini I (2004): Cascades of response vectors of olfactory receptor neurons in *Xenopus laevis* tadpoles. *Eur J Neurosci* 20: 2111-2123.
- Schild D, Restrepo D (1998): Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol Rev* 78: 429-466.
- Serizawa S, Miyamichi K, Sakano H (2004): One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. *Trends Genet* 20: 648-653.
- Sharon D, Glusman G, Pilpel Y, Khen M, Gruetzner F, Haaf T, Lancet D (1999): Primate evolution of an olfactory receptor cluster: diversification by gene conversion and recent emergence of pseudogenes. *Genomics* 61: 24-36.
- Shearman E, Fallon S, Sershen H, Lajtha A (2008): Nicotine-induced monoamine neurotransmitter changes in the brain of young rats. *Brain Res Bull* 76: 626-639.
- Soderpalm B, Lof E, Ericson M (2009): Mechanistic studies of ethanol's interaction with the mesolimbic dopamine reward system. *Pharmacopsychiatry* 42: 87-94.
- Sommer U, Hummel T, Cormann K, Mueller A, Frasnelli J, Kropp J, Reichmann H (2004): Detection of presymptomatic Parkinson's disease: combining smell tests, transcranial sonography, and SPECT. *Mov Disord* 19: 1196-1202.
- Spehr M, Hatt H, Wetzel CH (2002): Arachidonic acid plays a role in rat vomeronasal signal transduction. *J Neurosci* 22: 8429-8437.
- Suzuki Y, Takeda M, Farbman AI (1996): Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bulbectomy. *J Comp Neurol* 376: 509-517.

-
- Thompson MD, Knee K, Golden CJ (1998): Olfaction in persons with Alzheimer's disease. *Neuropsychol Rev* 8: 11-23.
- Tinsley RC, Loumont C, Kobel HR: Geographical Distribution and Ecology. In: *The Biology of Xenopus*, Clarendon Press Oxford 464, England 1996, 35-59
- Toda M, Abi-Dargham A (2007): Dopamine hypothesis of schizophrenia: making sense of it all. *Curr Psychiatry Rep* 9: 329-336.
- Vargas G, Lucero MT (1999): Dopamine modulates inwardly rectifying hyperpolarization-activated current (I_h) in cultured rat olfactory receptor neurons. *J Neurophysiol* 81: 149-158.
- Verney C, el Amraoui A, Zecevic N (1996): Comigration of tyrosine hydroxylase- and gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the nasal area of human embryos. *Brain Res Dev Brain Res* 97: 251-259.
- von Skramlik E: *Handbuch der Physiologie der niederen Sinne*. Georg Thieme; Leipzig, Berlin 1926
- Wei CJ, Linster C, Cleland TA (2006): Dopamine D(2) receptor activation modulates perceived odor intensity. *Behav Neurosci* 120: 393-400.
- Weiß G (1986): Die Struktur des Geruchsorgans und des Telencephalons beim südafrikanischen Krallenfrosch, *Xenopus laevis* (Daudin), und ihre Veränderungen während der Metamorphose. Diss. rer. nat. Regensburg 1986.
- Wewetzer K, Verdu E, Angelov DN, Navarro X (2002): Olfactory ensheathing glia and Schwann cells: two of a kind? *Cell Tissue Res* 309: 337-345.
- Whitman MC, Greer CA (2009): Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol* 89: 162-175.
- Witt M, Hansen A: Strukturelle und funktionelle Grundlagen des Riechens. In: *Riech- und Schmeckstörungen*; hrsg. Hummel T, Welge-Lüssen A u.a.; Thieme Verlag, Stuttgart 2008, 11-26
- Witt M, Hummel T (2006): Vomeronasal versus olfactory epithelium: is there a cellular basis for human vomeronasal perception? *Int Rev Cytol* 248: 209-259.

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

Wu SN, Jan CR, Li HF, Chiang HT (2000): Characterization of inhibition by risperidone of the inwardly rectifying K(+) current in pituitary GH(3) cells. *Neuropsychopharmacology* 23: 676-689.

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

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

Zufall F, Leinders-Zufall T (2000): The cellular and molecular basis of odor adaptation. *Chem Senses* 25: 473-481.