

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

Zur Kodierung der Konzentration von Odoranzien
in Zellen des Bulbus olfactorius von larvalen
Xenopus-laevis-Fröschen

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

vorgelegt von
Johannes Röttger
aus Hildesheim

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. D. Schild

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. T. Moser

3. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S.1
1.1 Allgemeines zum Geruchssinn.....	S.1
1.2 Der Aufbau des olfaktorischen Systems.....	S.1
1.3 Molekulare Mechanismen der Geruchswahrnehmung.....	S.6
1.3.1 Der cAMP-Transduktionsweg.....	S.6
1.3.2 Der IP ₃ -Transduktionsweg.....	S.7
1.3.3 Transmitter im Bulb.....	S.8
1.4 Intention der Arbeit.....	S.9
2. Material und Methoden	S.10
2.1 Das Versuchstier.....	S.10
2.1.1 <i>Xenopus laevis</i>	S.10
2.1.2 Präparation und Gewebeschnitt.....	S.11
2.1.3 Inkubation des Gewebeschnitts mit Fura-II.....	S.12
2.2 Der Versuchsaufbau.....	S.13
2.3 Chemikalien.....	S.15
2.4 Calcium-Imaging.....	S.16
2.5 Die Versuchsdurchführung.....	S.18
2.6 Die Auswertung.....	S.19
3. Ergebnisse	S.20
3.1 Neuronale Kodierung von Odoranzienkonzentrationen im Bulbus olfactorius.....	S.20
3.1.1 Die Aminosäure Arginin als Duftstoff.....	S.20
3.1.2 Abhängigkeit der Reaktionsintensität der einzelnen Zellen von der applizierten Konzentration.....	S.26
3.1.3 Darstellung der Ergebnisse am Beispiel von vier Zellen.....	S.28
3.2 Die Aminosäure Methionin als Duftstoff.....	S.33
3.3 Die Aminosäure Histidin als Duftstoff.....	S.39

4. Diskussion.....	S.41
4.1 Diskussion der Dosis-Wirkungskurven.....	S.45
4.2 Diskussion der Reaktionsintensität.....	S.48
4.3 Schlussfolgerungen.....	S.50
4.4 Ausblick.....	S.52
5. Zusammenfassung.....	S.53
6. Literaturverzeichnis.....	S.54

1. Einleitung

1.1 Allgemeines zum Geruchssinn

Der Geruchssinn ist heute für den Menschen im Vergleich zu anderen Sinnen in den Hintergrund geraten. Die Orientierung im Raum erfolgt zu 80 – 90 % visuell. Trotzdem spielt die Fähigkeit zu riechen eine wichtige Rolle, um unsere Umgebung wahrzunehmen. Meist im Unterbewusstsein werden die Informationen, die unser Gehirn über die Nase erreichen, verarbeitet und bereiten uns so auf die verschiedensten Situationen vor. Diese Botschaften können Gefahr signalisieren beim Geruch von Gas oder Rauch, bis hin zum Auslösen verstärkter Salivation beim Wahrnehmen bevorzugter Speisen.

Bei Tieren wie auch beim Menschen werden durch das Geruchssystem mütterliche Instinkte und emotionale Reize hervorgerufen. Zudem ist das Geruchssystem sowohl für Raubtiere als auch für Beutetiere wichtig, d.h. die einen erkennen durch olfaktorische Wahrnehmung die Beute, die anderen den Feind. Grundsätzlich spielt der Geruchssinn für die Auswahl der Nahrung eine entscheidende Rolle (Shipley und Ennis 1996; Lledo et al. 2005).

Das olfaktorische System stellt eine Verbindung zwischen der Außenwelt und dem Gehirn dar. Es hat die Aufgabe, umgebende Moleküle aufzunehmen, den spezifischen Rezeptoren zuzuführen und die dadurch gewonnenen Informationen so umzuwandeln, dass sie im Gehirn verarbeitet werden können. Erst durch diese Umwandlungen sind Lebewesen imstande, auf externe Reize zu reagieren und ihr Verhalten anzupassen (Lledo et al. 2005).

1.2 Aufbau des olfaktorischen Systems

Um ihrer Aufgabe nachgehen zu können, sind die Nasenhöhlen mit einer speziellen Rienschleimhaut ausgekleidet. Im adulten *Xenopus laevis* kann man die Haupt- von der Nebenhöhle und vom Vomero-Nasal-Organ (VNO) unterscheiden. Die

Haupthöhle dient der Aufnahme von Stoffen aus der Luft, die Nebenhöhle von Stoffen aus dem Wasser. Das VNO wird der Aufnahme von Pheromonen zugeordnet, welche bei der Partnerwahl von Bedeutung sind. Dies ist für die Maus gezeigt worden (Leinders-Zufall et al. 2000), für *Xenopus laevis* allerdings noch nicht.

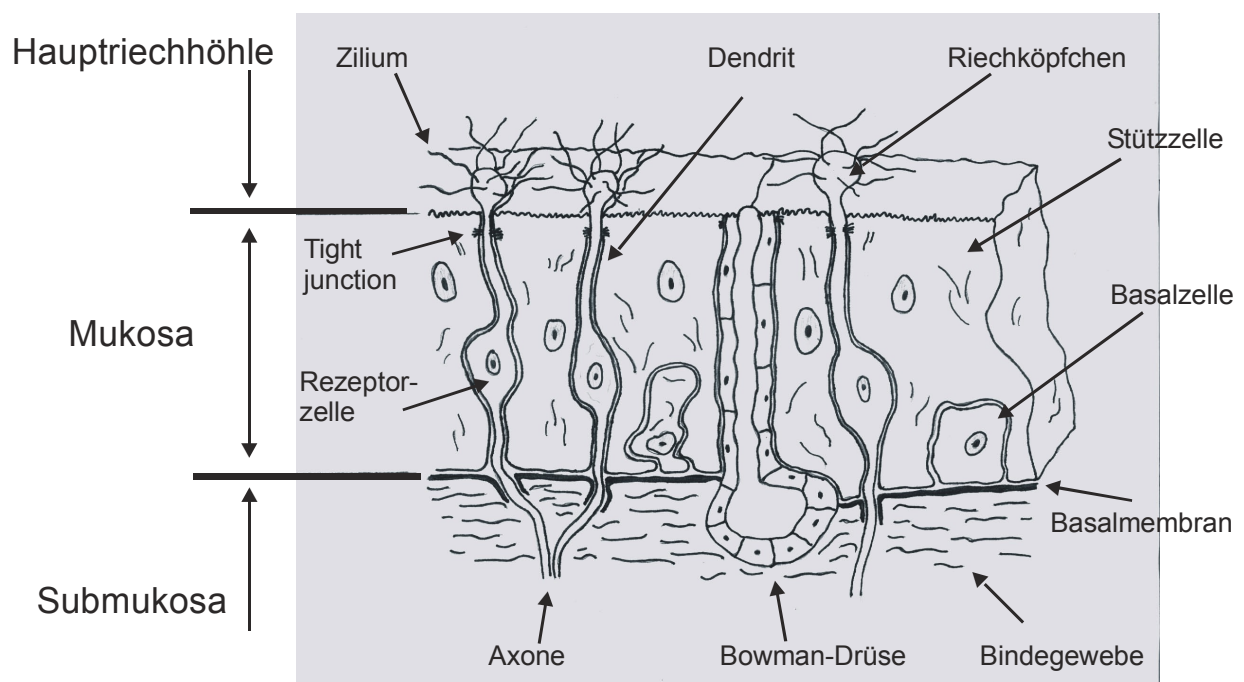
Bevor ein Duftstoff, der einen chemischen Reiz darstellt, als neurale Information zentral im Gehirn wahrgenommen wird, muss diese neue Information beim Empfänger mehrere Stationen durchlaufen. Diese bestehen aus bipolaren olfaktorischen Rezeptorzellen (ORN), welche primäre Sinneszellen darstellen, und dem Bulbus olfactorius, in dem die primären Neurone durch Synapsen in den Glomeruli auf Mitralzellen umgeschaltet werden. Alle Abschnitte spielen bei der Bearbeitung von Informationen eine wichtige Rolle (Lledo et al. 2005). Mitralzellen leiten die Informationen in höhere Zentren und in andere Hirnsysteme weiter. Zu diesen gehören der Nucleus olfactorius anterior, der piriforme Kortex, die Tuberculi olfactorii, der entorhinale Kortex und Kerne der Corpora amygdaloidea (Shipley und Ennis 1996). Auf dem Weg dorthin beeinflussen unter anderem Körnerzellen im Bulbus olfactorius die Signale der Mitralzellen. Diese Interneurone modulieren mit ihren Dendriten in bidirektionaler Richtung die Aktivität der Projektionsneurone.

Olfaktorische Rezeptorzellen haben an ihrem apikalen Ende ein Riechköpfchen, welches mit Zilien oder Mikrovilli besetzt ist. Diese haben Rezeptoren und stellen den Kontakt zu den Geruchsmolekülen her, es kommt zur olfaktorischen Transduktion (Schild und Restrepo 1998). Der aufgenommene Reiz wird zum olfaktorischen Bulb geleitet und endet vorerst in den dort befindlichen Glomeruli.

Nach Detektion von Odoranzien kommt es in den primären Sinneszellen im Bereich der Zilien durch Ionenströme zu Potentialveränderungen. Diese breiten sich entlang des Dendriten bis zum Soma aus und lösen über spannungsabhängige Natriumkanäle bei ca. -50 mV ein Aktionspotential aus (Schild 1989). Dieses läuft dann über die Axone der ORN zum Bulbus olfactorius, in dem es weiter verarbeitet wird. Die Informationen werden durch die Frequenz der eintreffenden Potentiale kodiert; je stärker der Reiz, desto höher die Frequenz der generierten Aktionspotentiale.

Neben den oben beschriebenen Rezeptorzellen finden sich in der Riechschleimhaut Stütz- und Basalzellen (siehe Abbildung 1-1 und 1-2 folgend). Zusammen stellen sie das olfaktorische Epithel dar. Die Stützzellen produzieren Schleim (zusammen mit den Bowman-Drüsen) und Enzyme. In Versuchen hat sich gezeigt, dass der von Stützzellen produzierte Schleim der Nasenhöhlen bei Vertebraten wie auch bei Nichtvertebraten wichtige Proteine wie UDP-Glukuronyltransferase (UGT) oder P450-Enzyme enthält (Okano und Takagi 1974; Getchell 1986; Lazard et al. 1991). Diese bindenden Proteine nehmen Duftstoffe auf und transportieren diese zu den Rezeptoren (Vogt und Riddiford 1981). Außerdem ermöglichen die Stützzellen erst durch ihre elektrisch-isolierende Wirkung die Funktion der Rezeptorzellen (Okano und Takagi 1974, Getchell 1986, Lazard et al. 1991). Die Rezeptorzellen haben durch verschiedene externe Einflüsse eine durchschnittliche Lebenszeit von 30-60 Tagen (Graziadei und Monti Graziadei, 1979).

Die kleinen rundlichen Basalzellen sind hauptsächlich für die Regeneration von olfaktorischen Rezeptorzellen, aber auch für Stützzellen, verantwortlich. Aufgrund der oben erwähnten kurzen Lebenszeit der Rezeptorzellen ist ein hoher Zellumsatz gegeben (Buck 2000).



▲ **Abbildung 1-1:** Aufbau des olfaktorischen Epithels. Die Rezeptorzellen sind von Stützzellen umgeben, die Riechknöpfchen reichen mit ihren Zilien apikal in die Hauptriechhöhle hinein. Dazwischen findet sich eine Bowman-Drüse, die Schleim produziert.

Allgemein ist der oben beschriebene Schleim für molekulare Abläufe bei der Wahrnehmung von Gerüchen wichtig (Getchell et al. 1984; Getchell 1986; Gold 1999; Schild und Restrepo 1998). Genauere Untersuchung zu oben genanntem Schleim und dessen Funktion erbrachte bei Vertebraten und Insekten folgende Erkenntnisse: Obwohl die Molekül-bindenden Proteine auch in den Schleimhäuten der Vertebraten vorkommen (Pelosi et al. 1982; Pevsner et al. 1985; Pevsner et al. 1990), erwies sich die primäre Annahme, sie seien mit denen der Insekten homolog, als falsch. Es zeigte sich, dass die olfaktorischen Bindeproteine (OBP's) der Vertebraten kleiner sind und neben der Nasenschleimhaut auch in der Schleimhaut des respiratorischen Trakts zu finden sind. Weiter wurde an Salamanderzellen gezeigt, dass sich der Schleim mit den olfaktorischen Bindeproteinen (OBP) zwar verstärkend auswirkt, nicht aber essentiell für die Geruchswahrnehmung ist (Firestein et al. 1990). Seine Aufgabe ist die Konzentration der Odoranzien, ihre Präsentation gegenüber den Rezeptoren sowie die Unterstützung bei ihrer späteren Deaktivierung.

Die Abbildung 1-2 zeigt den Bulbus olfactorius mit den verschiedenen dort vorkommenden Zellen. Es findet sich eine laminäre Organisation des Bulbus olfactorius (Ramon y Cajal 1890; Golgi 1875). Der Aufbau des Bulbus olfactorius beginnt mit der Bündelung der Axone der Rezeptorzellen zu den olfaktorischen Nerven. Es folgen die glomeruläre Schicht, die externe plexiforme Schicht, die Mitralzellschicht, die interne plexiforme Schicht und die Körnerzellschicht.

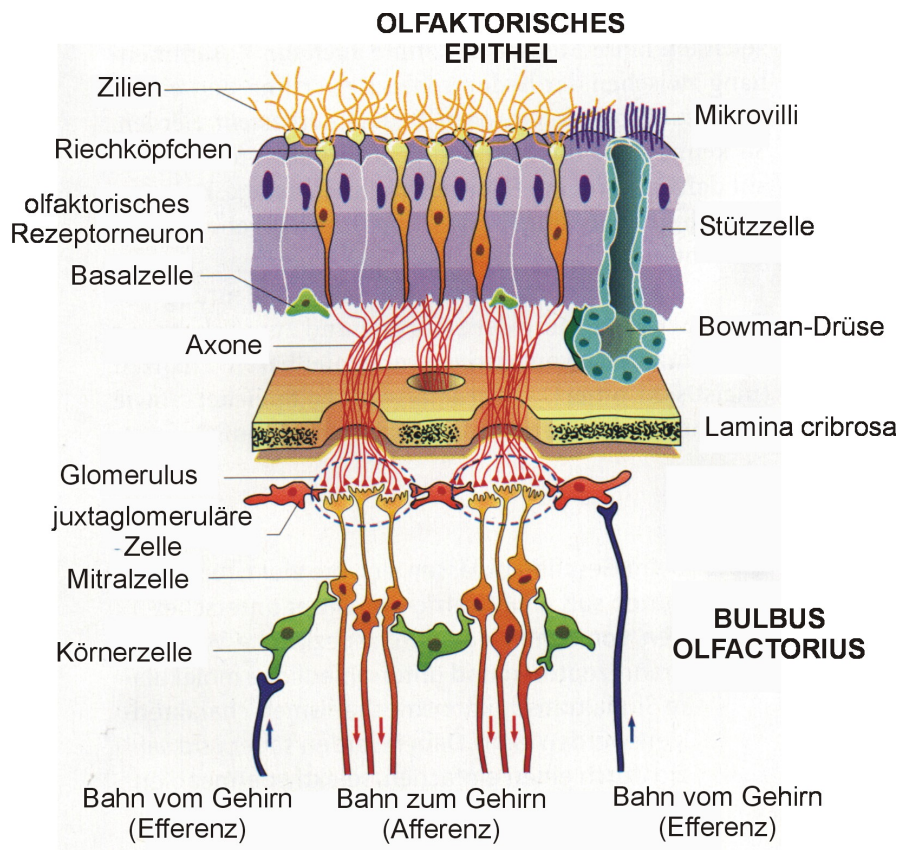


Abbildung 1-2: Überblick über den Aufbau des olfaktorischen Systems. Der obere Teil zeigt das olfaktorische Epithel, der untere Teil den Bulbus olfactorius (modifiziert nach Schmidt (1995; S. 358))

In den Glomeruli des Bulbus olfactorius vereinen sich Axone vieler Rezeptorzellen, so dass es auf dieser Ebene bereits eine Konvergenz gibt. Die in einem Glomerulus zusammenlaufenden Axone vermitteln die Informationen des gleichen Rezeptorproteins (Mori et al. 1999). Jene Informationen werden auf dieser Stufe durch die sie umgebenden periglomerulären Zellen beeinflusst. Nach den Glomeruli findet sich die externe plexiforme Schicht. Die zellarme Schicht besteht aus den Dendriten der Mitralzellen, der Büschelzellen und Körnerzellen.

Mitralzellen haben ihren Namen aufgrund ihrer dreieckigen Form, welche der Mitra (aus dem Griechischen für "Stirnbinde", die traditionelle Bischofsmütze) ähnelt. Ihr Primärdendrit empfängt Informationen der Rezeptorzellen, die beiden Sekundärdendriten stehen in Verbindung zu Körnerzellen.

Die interne plexiforme Schicht enthält ähnlich der externen plexiformen Schicht kaum Zellen, dafür aber Axone der Mitral- und Büschelzellen und Körnerzellendriten.

Die Körnerzellschicht beinhaltet die axonlosen Körnerzellen. Diese Interneurone stehen mit ihren Dendriten in bidirektionaler Verbindung zu den Sekundärdendriten der Mitral- und Büschelzellen. Sie haben als Aufgabe die Modifikation von Informationen, nicht aber deren Weitergabe (Shiplely und Ennis 1996).

Der Mensch kann mit seinen $30 \cdot 10^6$ olfaktorischen Sinneszellen ca. 10^4 Düfte unterscheiden. Bei Tieren ist die Fähigkeit zu riechen sehr unterschiedlich ausgeprägt, häufig ist sie jedoch leistungsfähiger als die des Menschen. Das Geruchssystem beim Homo sapiens ist in den Hintergrund geraten. Das lässt sich daran zeigen, dass der Mensch, um einen Geruch wahrzunehmen, für den er sehr empfindlich ist (z.B. Skatol), eine Molekülkonzentration von $10^7/\text{cm}^3$ benötigt, während bei Hunden die Reizschwelle bei 10^2 bis 10^3 Moleküle / cm^3 liegt (Schmidt et al. 1995).

1.3 Molekulare Mechanismen der Geruchswahrnehmung

1.3.1 Der cAMP-Transduktionsweg

Auf den Zilien der Rezeptorzellen befinden sich die Rezeptoren für die Geruchsmoleküle. Durch die Bindung an einen dieser Rezeptoren wird ein G-Protein aktiviert. Dieses ist auf der Zytosolseite membranständig und besteht im inaktivierten Zustand aus den drei Einheiten α , β und μ . In dieser Phase ist es an die α -Untereinheit Guanosin-Diphosphat (GDP) gebunden. Durch die Bindung des olfaktorischen Moleküls mit dem Rezeptor wird das GDP durch Guanosin-Triphosphat (GTP) ersetzt. Daraufhin kommt es zur Dissoziation vom Rezeptor-Molekül-Komplex, und parallel dazu trennen sich β - und μ -Einheit von der α -Untereinheit. Diese bindet nun, das GTP noch immer tragend, an die Adenylatcyclase, die dadurch beginnt, aus ATP cAMP zu produzieren. Dies geschieht solange, bis das GTP zu GDP hydrolysiert wird und den Prozess damit

zünftig beendet. Anschließend reorganisiert sich das G-Protein wieder: α -, β - sowie μ -Untereinheit reassoziieren und sind für den nächsten Durchlauf bereit (Schild und Restrepo 1998).

Das cAMP öffnet einen lokal vorhandenen unspezifischen Kationenkanal, was einen Natriumeinstrom, einen Kaliumausstrom, vor allem aber einen Kalziueinstrom zur Folge hat. Eine Diesterase spaltet das cAMP permanent zum inaktiven 5'-AMP, wodurch dieser Prozess limitiert ist. Das Kalzium seinerseits ist für die Öffnung eines kalziumregulierten Chloridkanals verantwortlich. Der resultierende Chloridausstrom intensiviert die Depolarisation über der Membran (Schild und Restrepo 1998).

1.3.2 Der IP_3 -Transduktionsweg

Ein weiterer Transduktionsweg zur Auslösung eines Aktionspotentials läuft über die Phospholipase C. Nach Bindung des Geruchsmoleküls kommt es am Rezeptor zur Aktivierung eines G-Proteins. Dieses aktiviert die in der Plasmamembran vorkommende Phospholipase C, die aus dem dort ebenfalls vorkommenden Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) freies Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol bildet. Diacylglycerol verbleibt in der Zellmembran und phosphoryliert Proteinkinase C. Das ins Zytosol diffundierende IP_3 öffnet dann einen Ca^{2+} -Kanal des endoplasmatischen Retikulums sowie einen unspezifischen Kationenkanal, so dass es zu einer Erhöhung des Kalziums im Zytosol (Schild 1993; Okada et al. 1994; Schild et al. 1995) und in Folge zu einer Potentialverschiebung kommt. Kalzium kann hier als *third messenger* angesehen werden, da es selbst zu einer kalziumgetriggerten Öffnung weiterer Kationenkanäle führt (Schild und Restrepo 1998).

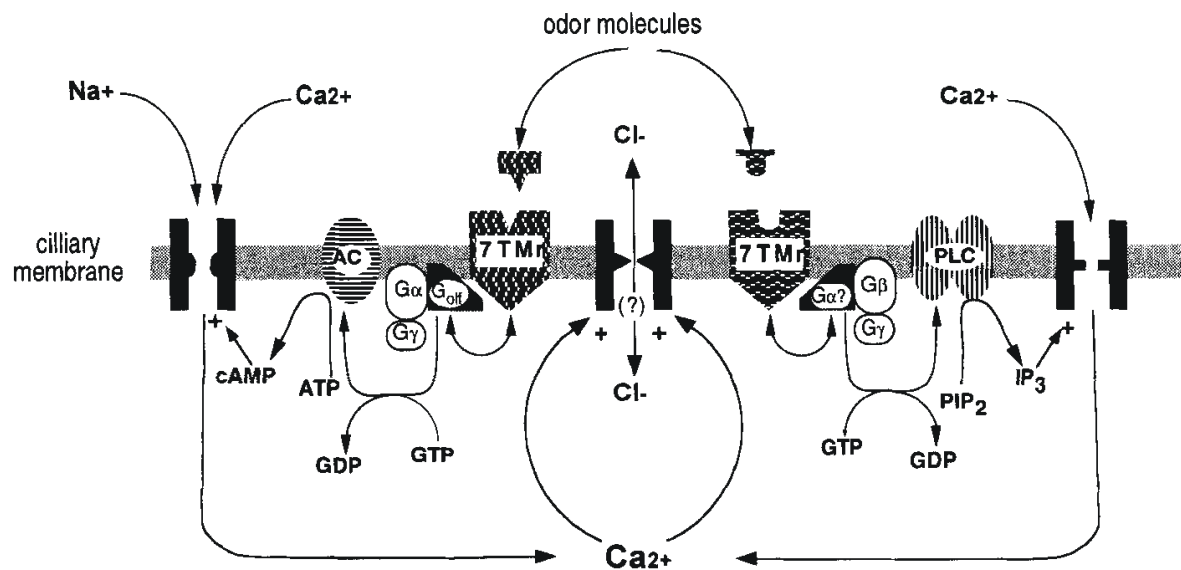


Abbildung 1-3: Rezeptor-Transduktionsweg von cAMP und IP₃. Die Bindung eines Liganden an die Sieben-Helix-Rezeptoren aktiviert zugehörige G-Proteine, die entweder die Adenylatcyclase anregt, cAMP zu produzieren, oder aber Phospholipase C anregt, IP₃ zu generieren. Diese sekundären Botenstoffe öffnen Kanäle, über die Ca²⁺ und z.T. Na⁺ in das Zilium einfließen können. Das führt zu einer Depolarisation der Zellwand und in der Folge zu Aktionspotentialen (modifiziert nach Shipley und Ennis 1996)

1.3.3 Transmitter im Bulb

Es gibt zahlreiche Neurotransmitter, die Zellinteraktionen vermitteln. Nachfolgend seien einige Beispiele genannt:

Der von Rezeptorzellen erfasste Reiz wird innerhalb der sich anschließenden Synapsen per Glutamat in den Glomeruli weitergegeben (Aroniadou-Anderjaska et al., 1997; Berkowicz et al., 1994; Ennis et al., 1996). Außerdem stehen die Rezeptorzellen, ebenfalls über glutamaterge Synapsen, mit juxtaglomerulären Interneuronen in Verbindung (Bardoni et al., 1996; Keller et al., 1998; Kosaka et al., 1997; Pinching und Powell, 1971). Weiter konnte nachgewiesen werden, dass Mitralzellen Körnerzellen durch Glutamat erregen (Isaacson und Strowbridge, 1998; Trombley und Westbrook, 1990; Trombley und Shepherd, 1993). Andersherum sind die Körnerzellen in der Lage, Mitralzellen mittels GABA zu hemmen (Nowycky et al., 1981). Und Mitralzellen können sich durch Glutamat selbst modulieren (Trombley und Westbrook, 1992).

1.4 Intention der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung von neuronalen Antworten im olfaktorischen Bulb des larvalen *Xenopus laevis* auf die Stimulation mit Aminosäuren verschiedener Konzentrationen. Da in vielen Arbeiten bereits nachgewiesen werden konnte, dass die larvalen Stadien des südafrikanischen Krallenfrosches hervorragend auf Aminosäuren als olfaktorische Reize reagieren, galt es jetzt, bei unterschiedlichen Konzentrationen die individuellen Reaktionen zu beobachten.

Eine Fragestellung befasste sich mit der Bestimmung der minimal nötigen Konzentration einer Aminosäure, die gerade noch in der Lage ist, eine assoziierte Zellreaktion im olfaktorischen Bulb auszulösen.

Der zweite Teil der Arbeit sollte klären, inwiefern es einen Zusammenhang zwischen der Konzentration applizierter Aminosäuren und der Reaktion der Nervenzellen im Gehirn von *Xenopus laevis* gibt. Es galt herauszufinden, ob eine Kodierung im Sinne der Intensität der Reaktion der Zellen und/oder im Sinne der räumlichen Aufteilung der reagierenden Zellen stattfindet, und diese dann genauer zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Das Versuchstier

2.1.1 *Xenopus laevis*

Bei dem Versuchstier handelt es sich um die Larve des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Diese Amphibien kommen heutzutage weltweit vor, finden sich aber besonders häufig in tropischen Süßwasserseen, zum Beispiel in Süd- und Ostafrika. Die allesfressenden Tiere gehören zu der Klasse der Lurche und halten sich fast ausschließlich in trüben Gewässern auf (Tinsley et al. 1996). Entsprechend gut ausgebildet ist der Geruchssinn, wohingegen der visuelle Sinn verhältnismäßig schlecht ausgeprägt ist (Kramer 1933).

Bei der Larve von *Xenopus laevis* kann man das olfaktorische System in eine Haupthöhle und das Vomeronasalorgan (VNO) unterteilen. Im Laufe der weiteren Entwicklung zum adulten Tier hingegen lässt sich das olfaktorische System in drei verschiedene Teile separieren (Hansen et al 1998). Unterschieden werden dann neben dem VNO, auch Jacobsonsches Organ genannt, die jetzt aufgeteilte lateral gelegene Wassernase und die medial gelegene Luftnase (Föske 1934; Altner 1962), wobei Wasser- und Luftnase unterschiedliche Rezeptoren aufweisen. In der Wassernase werden XOR1-Rezeptoren exprimiert. Diese sind für die Detektion wasserlöslicher Geruchsstoffe verantwortlich. Im Gegensatz dazu finden sich in der Luftnase XOR2-Rezeptoren, die volatile Geruchsstoffe detektieren (Freitag et al. 1995). Bei der Larve sind die XOR1- und XOR2-Rezeptoren noch zusammen in der Haupthöhle.

Es wurde in früheren Studien nachgewiesen, dass das Gehirn im Laufe der Entwicklung einer Larve einem großen Wandel unterworfen ist. Die XOR1-Rezeptoren werden während der Entwicklung erst ab Stadium 32 (Mezler et al. 1999; Nieuwkoop und Faber 1994), die XOR2-Rezeptoren erst ab Stadium 49 exprimiert (Freitag et al.

1995; Mezler et al. 1999). Um sicher zu gehen, dass die physiologischen Bedingungen optimal und alle wichtigen Rezeptoren ausgebildet sind, beschränkten sich die Untersuchungen auf Tiere in den Stadien 50 bis 54 (Einteilung nach Nieuwkoop und Faber 1994).

Die Axone der olfaktorischen Rezeptorzellen der oben beschriebenen drei Regionen projizieren in verschiedene Bereiche des Bulbs, eine Aufteilung bleibt entsprechend auch in übergeordneten Hirnarealen erhalten (Shipley und Ennis 1996). Während das Vomeronasalorgan in den akzessorischen Bulb projiziert, enden die Axone aus der lateralen Nasenhöhle im ventralen Bulbus principalis (Hofmann und Meyer 1991; Franceschini et al. 1992; Meyer et al. 1996), Axone aus der medialen Nasenhöhle im dorsalen Bulbus principalis (Key und Giorgi 1986).

2.1.2 Präparation und Gewebeschnitt

Vor Beginn der Präparation wurden die Tiere in Eiswasser drei Minuten lang anästhesiert. Durch ein Binokular vergrößert erfolgte im Anschluss die Fixierung der Kaulquappe unter Zuhilfenahme zweier Präparationsnadeln. Danach fand die Tötung der Tiere durch Dekapitation statt. Weiter wurde mit einem Skalpell ein Block aus dem Tier herausgeschnitten, der die olfaktorischen Mukosae, die olfaktorischen Nerven und den anterioren Teil des Gehirns beinhaltet.

Nach der Fixierung dieses Gewebblocks auf dem Vibratom-Objektträger mittels Sekundenkleber wurde dieser in das Vibratom (VT 1000, Leica, Bensheim, Deutschland) eingeschraubt. Dort befand sich das Gewebe innerhalb einer isotonen Nährlösung (Bpyr [in mMol]: NaCl, 98; KCl, 2; CaCl₂, 1; MgCl₂, 2; Glukose, 5; Pyruvat-Na, 5; HEPES, 10). Im darauf folgenden Schritt wurden die oberen Gewebeschichten des Gehirns durch das Vibratom abgetrennt. Dies geschah nach ventral bis auf die Zellebene, auf der die olfaktorischen Nerven in den Bulb eintraten, ohne die Mukosae oder die olfaktorischen Nervenstränge zu verletzen, und in kaudaler Richtung bis ca. zur Hälfte des Gehirns. Im optimalen Fall waren die akzessorischen Bulbi sowie linker und rechter Ventrikel freigelegt, was zur

Orientierung der Schnitthöhe beitrug. In den folgenden Abbildungen 2-1 und 2-2 sind entsprechende Übersichten dargestellt.

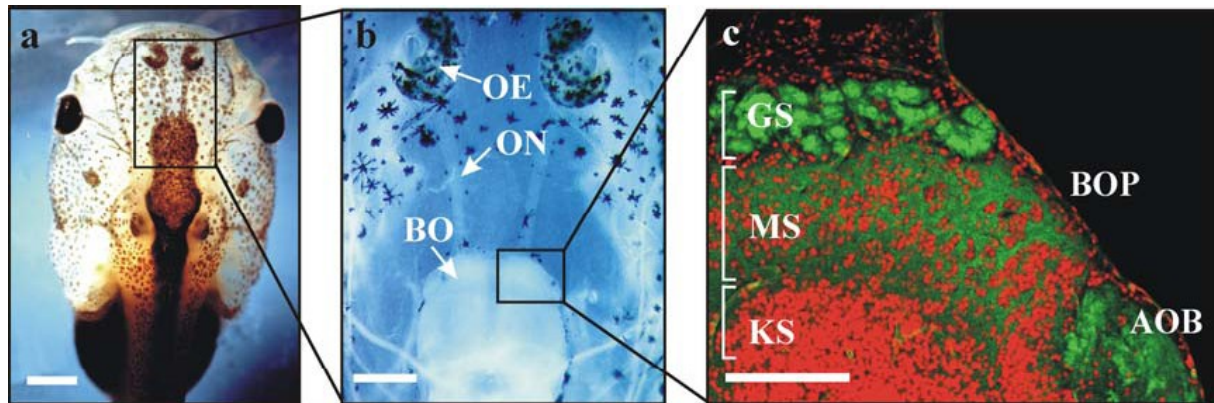


Abbildung 2-1: Übersicht von *Xenopus laevis*. a) *Xenopus-laevis*-Larve b) Zoom auf präparierte Larve, hier entspricht OE = olfaktorisches Epithel, ON = olfaktorischer Nerv, BO = Bulbus olfactorius c) Bulbus olfactorius mit unterschiedlichen Zellregionen: GS = glomeruläre Schicht, BOP = Bulbus olfactorius principalis, AOB = akzessorischer olfaktorischer Bulbus, MS = Mitralzellschicht, KS = Körnerzellschicht. Abbildung mit freundlicher Genehmigung aus Czesnik et al 2003, Seite 114.

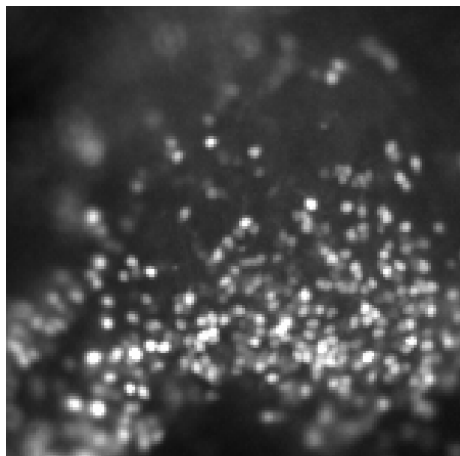


Abbildung 2-2: Fluoreszierende Zellen nach Inkubation mit Fura-II. In der Mitte des unteren Bildrandes ist der Ventrikel zu erkennen.

2.1.3 Inkubation des Gewebeschnitts mit Fura-II

Der so vorbereitete Gewebeschnitt wurde im Anschluss in einer Lösung mit „Fura-II AM cell permeant“ (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) und Bpyr bei völliger Dunkelheit und Raumtemperatur für eine Stunde auf einem Flachbettagitator inkubiert. Abgesehen von Fura-II AM wurden nur Chemikalien von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) verwendet.

Das tiefgefroren gelagerte Fura-II AM muss vor der Benutzung noch vorbereitet werden. Dazu sind zuerst 5µl Dimethylsulfoxid (DMSO, C₂H₆OS) dem Fura-II

hinzuzufügen. Parallel dazu wurden 445µl Bpyr mit 50µl Pluronic-Acid 2% gemischt und damit der erste Mix aufgelöst und die so entstandenen 500µl in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Diese Lösung kam dann für 15 Minuten in ein Ultraschallbad. Durch die Verbindung mit dem organischen Lösungsmittel DMSO erreicht man eine erhöhte Löslichkeit des Fura-II AM.

2.2 Der Versuchsaufbau

Um den Gewebeschnitt unter dem Mikroskop betrachten zu können, ist eine Fixierung des Materials in einem Objektschälchen nötig. Dazu wurde das Präparat mittels 5%iger Agarose (mit niedrigem Schmelzpunkt; Amresco, Agarose Typ2, no. 210-815) fixiert. Diese wurde dafür in einer handelsüblichen Mikrowelle erhitzt und damit verflüssigt. Nachdem eine kleine Menge der verflüssigten Agarose in das Objektschälchen pipettiert worden war, konnte das Präparat während des Abkühlungsprozesses dort eingebracht werden. Die Mukosae und der Bulb waren nicht von der Agarose bedeckt, eine Fixierung aber sichergestellt. Das so vorbereitete Objektschälchen wurde, um ein Austrocknen zu verhindern, mit Bpyr aufgefüllt. Außerdem waren so konstante Werte für den pH und die umgebenden Elektrolyte gewährleistet.

Für die Messungen wurde das Objektschälchen unter einem Mikroskop (Axioskop 2, Zeiss, Göttingen, Deutschland) eingebracht, dessen Optik mit einer CCD-Kamera (16 Bits/Pixel, Micromax; Visitron, München, Deutschland) verbunden war. Parallel dazu wurden zwei Zulaufe und eine Absaugung über dem Gewebe positioniert.

Der erste Zulauf diente der Applikation von Aminosäuren. Über einen Trichter und eine dort angebrachte Zulaufkanüle („funnel-drug-applicator“, Schild 1985) konnten die Odoranzien mit einem konstanten Fluss von 250µl/min direkt über der linken, respektive rechten Mukosa appliziert werden (Abbildung 2-3).

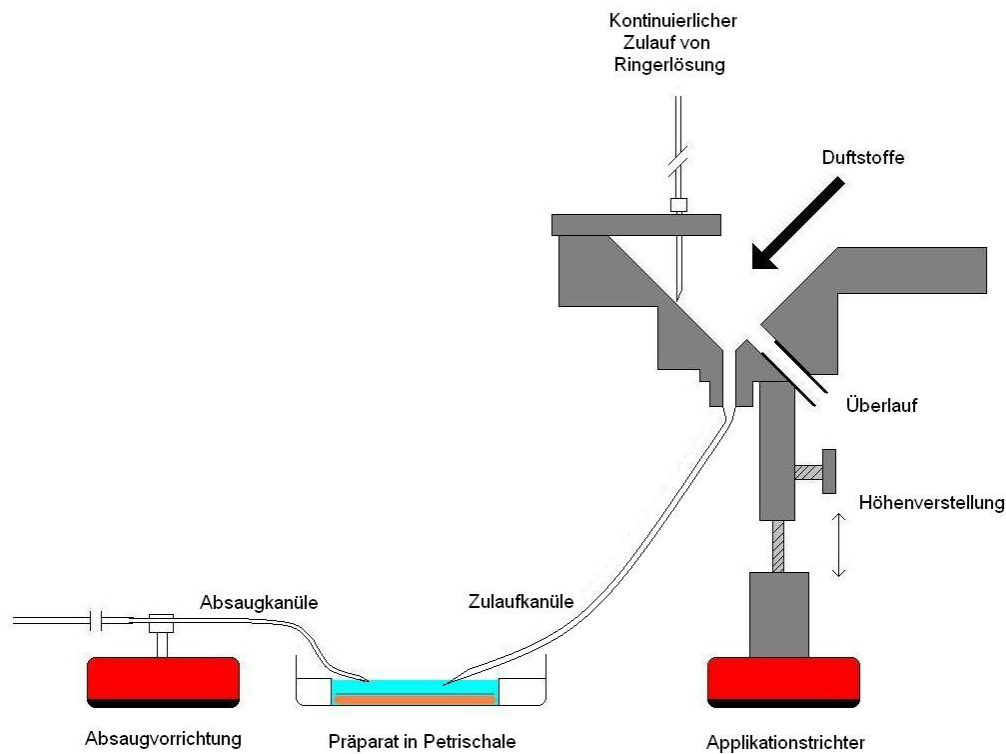


Abbildung 2-3: Der Versuchsaufbau. Die über den Badzulauf zugeführte Lösung läuft durch die Zulaufkanüle zur Messkammer (Petrischale). Überschüssige Lösung wird über den Überlauf abgeleitet. Dadurch wird ein konstantes Volumen V und eine konstante Fließgeschwindigkeit erreicht. Skizze mit freundlicher Genehmigung von Gutermann 2006, Seite 25.

Um einen direkten Kontakt der Aminosäuren mit dem olfaktorischen Bulb und dadurch eventuell ausgelöste Reaktionen zu verhindern, wurde ein permanenter Bpyr-Fluss nach kranial über dem Gewebe sichergestellt. Dies gelang, indem ein zusätzlicher Zulauf ($550\mu\text{l}/\text{min}$) kaudal des Bulbes und eine Absaugung auf Höhe der Mukosa, auf der kontralateralen Seite zur Zulaufkanüle, positioniert wurde (Abbildung 2-4). Vor Beginn der ersten Versuche fand jedes Mal eine circa zehnminütige Spülung mit Bpyr nach dem oben geschilderten Schema ohne jegliche Applikationen von Aminosäuren statt.

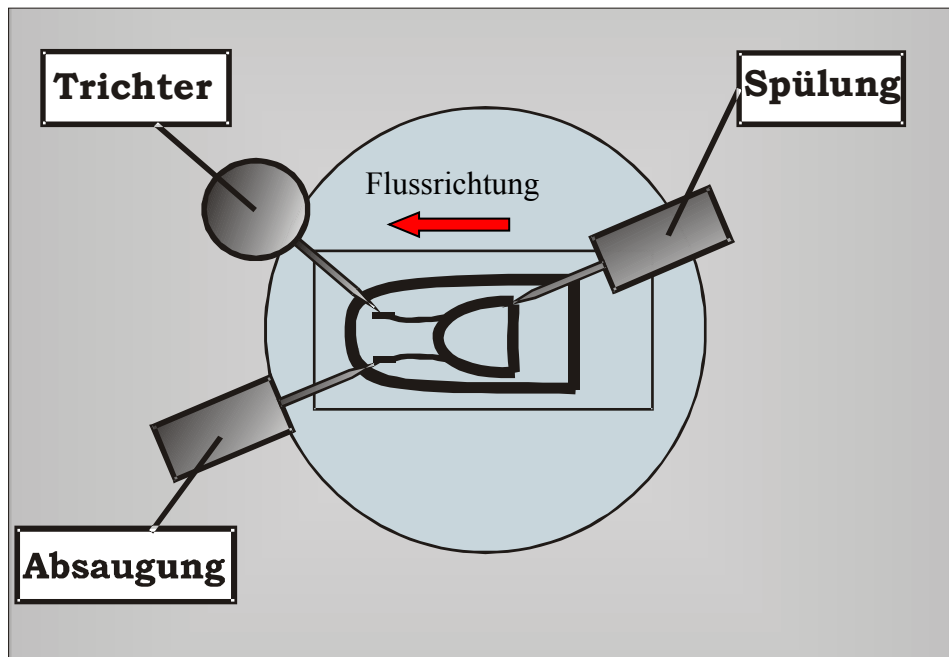
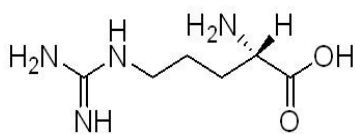


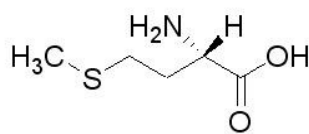
Abbildung 2-4: Übersicht über den Versuchsaufbau mit den Positionierungen des Applikationstrichters, der Spülung und der Absaugung.

2.3 Chemikalien

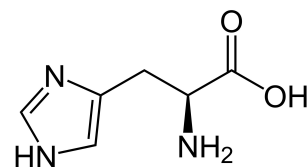
Zur Reizauslösung wurden die Aminosäuren Arginin, Methionin und Histidin eingesetzt (Sigma, Aldrich), alle drei als L-Enantiomere (Abbildung 2-5). Diese wurden im Labor in den Konzentrationen 1 nmol, 10 nmol, 100 nmol, 1 μ mol, 10 μ mol, 100 μ mol und 1 mmol hergestellt und kurzfristig gekühlt, bzw. längerfristig gefroren gelagert.



a)



b)



c)

Abbildung 2-5: Strukturformeln der verwendeten Aminosäuren a) Arginin, b) Methionin und c) Histidin.

Als Basisinfusion und Nährlösung, in der sich der Gewebeschnitt während der Versuche befand, wurde Bpyr verwendet.

Als Farbstoff wurde das bereits erwähnte Fura-II AM ($C_{44}H_{47}N_3O_{24}$) verwendet (Abbildung 2-6). Fura-II ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit Kalzium Chelatkomplexe bildet und darüber Konzentrationsbestimmungen zulässt.

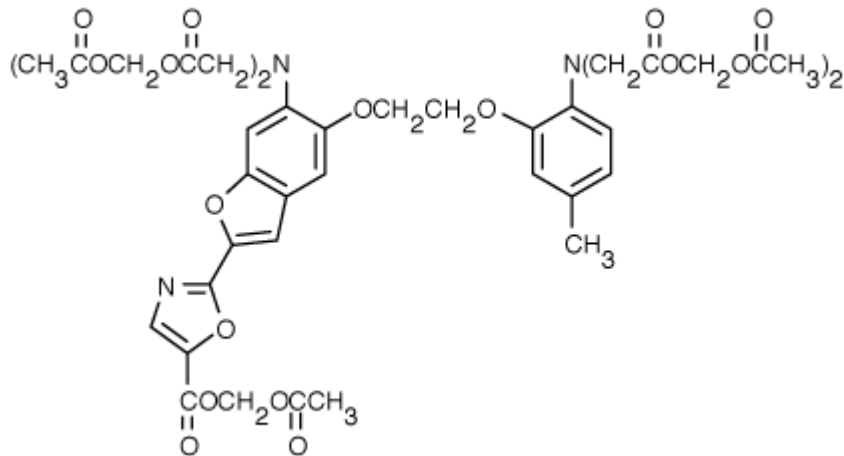


Abbildung 2-6: Strukturformel von Fura-II ($C_{44}H_{47}N_3O_{24}$) (Invitrogen GmbH, Darmstadt)

In der Strukturformel von Fura-II ist eine Stilbengruppe vorhanden. Die Stilbengruppe ist in diesem Molekül der Chromophor, also für die Farbgebung zuständig (Abbildung 2-7).

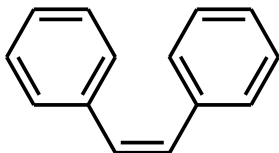


Abbildung 2-7: Strukturformel für Stilben ($C_{14}H_{12}$)

2.4 Calcium-Imaging

Zwischen der Fluoreszenzintensität und der Ca^{2+} -Konzentration besteht ein enger Zusammenhang (Grynkiewicz et al. 1985). Regt man zum Beispiel eine mit Fura-II inkubierte Zelle mit Licht der Wellenlängen 340 oder 380 nm an, so fluoresziert der Farbstoff mit einer Wellenlänge von ca. 510 nm im sichtbaren Bereich mit der Intensität F_{340} bzw. F_{380} . Die Emissionsrate bei dieser Wellenlänge ist direkt

proportional zur Konzentration der intrazellulären Kalziumionen. Die Fluoreszenzintensität kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$F_{340} = c * d * K * f([Ca^{2+}])$$

Da aber "c" (Konzentration des Farbstoffes), "d" (Dicke der Zelle) und "K" (Konstante in Bezug auf die Messapparatur) unbekannt sind, ist es so noch nicht möglich, die Kalziumkonzentration über die Intensität des Fluoreszenzlichtes zu berechnen.

Die Fluoreszenzintensität ändert sich mit der Kalziumkonzentration und mit der Wellenlänge des Anregungslichtes. Es kommt bei einem Kalzium-Konzentrationsanstieg zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität F_{340} und einem Abfall von F_{380} (grüne Pfeile). Daraus ergeben sich zwei der oben genannten Formeln, einmal für F_{340} und einmal für F_{380} (Abbildung 2-8).

Da man postulieren kann, dass sich in dem Zeitraum der Stimulation (ca. 500ms) weder die Konzentration des Farbstoffs (c), noch die Dicke der Zelle (d) oder die Konstante (K) wesentlich geändert haben, kann man die Formeln entsprechend kürzen.

$$F_{340} = c * d * K * f([Ca^{2+}]) / F_{380} = c * d * K * f([Ca^{2+}])$$

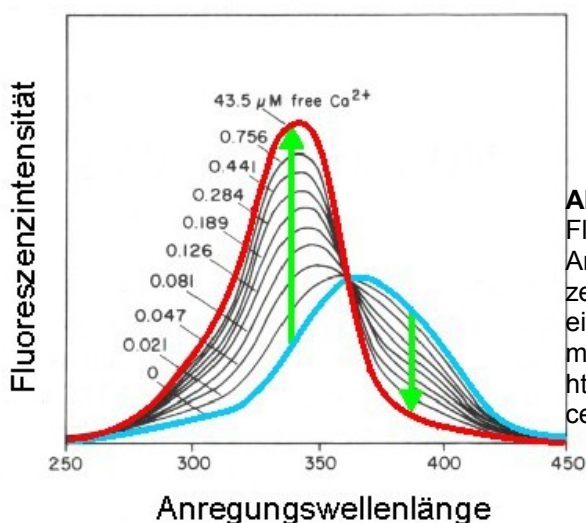


Abbildung 2-8:

Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge bei Fura-II. Die grünen Pfeile zeigen eine Zunahme der Intensität bei 340nm und eine Abnahme bei 380nm. (Molecular Probes, modifiziert nach S. Frings, Heidelberg, <http://www.sinnesphysiologie.de/methoden/fluocellfur.htm>)

Der Quotient wird standardmäßig als "R" bezeichnet, aus dem englischen "ratio". Dieser ist nur von der Kalziumkonzentration abhängig.

$$R = F_{340} / F_{380} = f' ([Ca^{2+}])$$

2.5 Die Versuchsdurchführung

Im Versuchsssetup wurde das Gewebe in der Petrischale bei jeder Messung mit Licht der Wellenlänge 380 nm angeregt. Dieses wurde von einem Monochromator erzeugt, gefiltert und dann durch ein computergesteuertes Spiegelsystem in das Mikroskop umgeleitet. Der Gewebeschnitt war dem Licht für jede Einzelaufnahme zwischen 200 und 500 ms ausgesetzt. Insgesamt dauerte die Erfassung der Aufnahmen jeweils ca. 100 Sekunden.

Durch das Aneinanderreihen und Abspielen der einzelnen Bilder wurden die Fluoreszenzänderungen der Zellen deutlich. Da mit der Wellenlänge von 580 nm gearbeitet wurde, kam es im Falle einer Zellreaktion zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität. Zur besseren Darstellbarkeit sind die Werte für das df/f (%) bei den Graphen und Diagrammen immer positiv abgebildet. Verläufe einzelner Zellen wurden im Gegensatz dazu weiterhin unverändert gezeigt. In den so gewonnenen Bilddaten konnten Änderungen der Kalziumkonzentration anhand von Änderungen der Helligkeit einzelner Zellen beobachtet werden. Die dafür verwendete Software „WinView“ wurde von Visitron Systems, Puchheim hergestellt.

Während der Messungen wurde eine Menge von 200 μ l der untersuchten Aminosäure ungefähr im Zeitraum von der 8. bis zur 12. Sekunde in den Badzulauf pipettiert und automatisch über die Zulaufkanüle appliziert. Zwischen den einzelnen Messungen bzw. Applikationen wurden Pausen von mindestens 3 Minuten eingehalten, während derer ein konstanter Fluss mit Bpyr über dem Gewebeschnitt die Odoranzien wegspülte und die Zellen sich regenerieren konnten.

2.6 Die Auswertung

Die so gewonnenen Daten wurden mit der Software WinView[®] (WinView/32, Roper Scientific), Excel[®] (Microsoft Excel 2000) sowie Matlab[®] (The MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) ausgewertet. Durch die graphische Darstellung der Versuche war eine Auszählung der Zellen, die Fluoreszenzintensitätsänderungen (also Zellreaktionen) zeigten, möglich, sowie die Erfassung der Zelllokalisationen. Auf Grund der Lokalisation jeder einzelnen reagierenden Zellen war eine Zuordnung möglich, um welchen Zelltypus es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt. Zum einen um periventriculär gelegene Körnerzellen, zum anderen um die anterior davon angeordneten Mitralzellen. Mit dem Programm Matlab[®] wurden die reizkorrelierten Reaktionen gezählt und weiter untersucht. Die so gewonnenen Daten wurden mit Matlab[®] und Excel[®] in Graphen dargestellt und statistisch ausgewertet.

Mit Matlab[®] konnten auch die Daten für die Fluoreszenzintensität df/f (%) für jede einzelne untersuchte Zelle berechnet werden. Eine Berechnung der Fluoreszenzintensitätsänderung ermöglichte es, Kalzium-Konzentrationsänderungen (keine absoluten Konzentrationen) dieser Zellen in Abhängigkeit von der Zeit darzustellen. So konnten einzelne Zellreaktionen in Abhängigkeit von der applizierten Konzentration verglichen werden.

3. Ergebnisse

3.1 Neuronale Kodierung von Odoranzienkonzentrationen im Bulbus olfactorius

3.1.1 Die Aminosäure Arginin als Duftstoff

Der erste Teil der Ergebnisse beruht auf Versuchen, bei denen die Aminosäure Arginin in den Geruchsstoffkonzentrationen von 1 nMol bis 100 µMol appliziert wurde. Die einzelnen Konzentrationen wurden bis zu drei Mal nacheinander appliziert (APP: A1, A2, A3), wobei zwischen den Applikationen eine Zeit von mindestens zwei Minuten abgewartet wurde. Die Tabelle 1 zeigt die Anzahl an Zellen an, die direkt nach Applikation von Arginin, also reizkorreliert, reagiert haben. Beispielsweise haben bei Versuch 2 bei einer Konzentration von 10 nMol bei der zweiten Applikation 3 Zellen reizkorreliert reagiert.

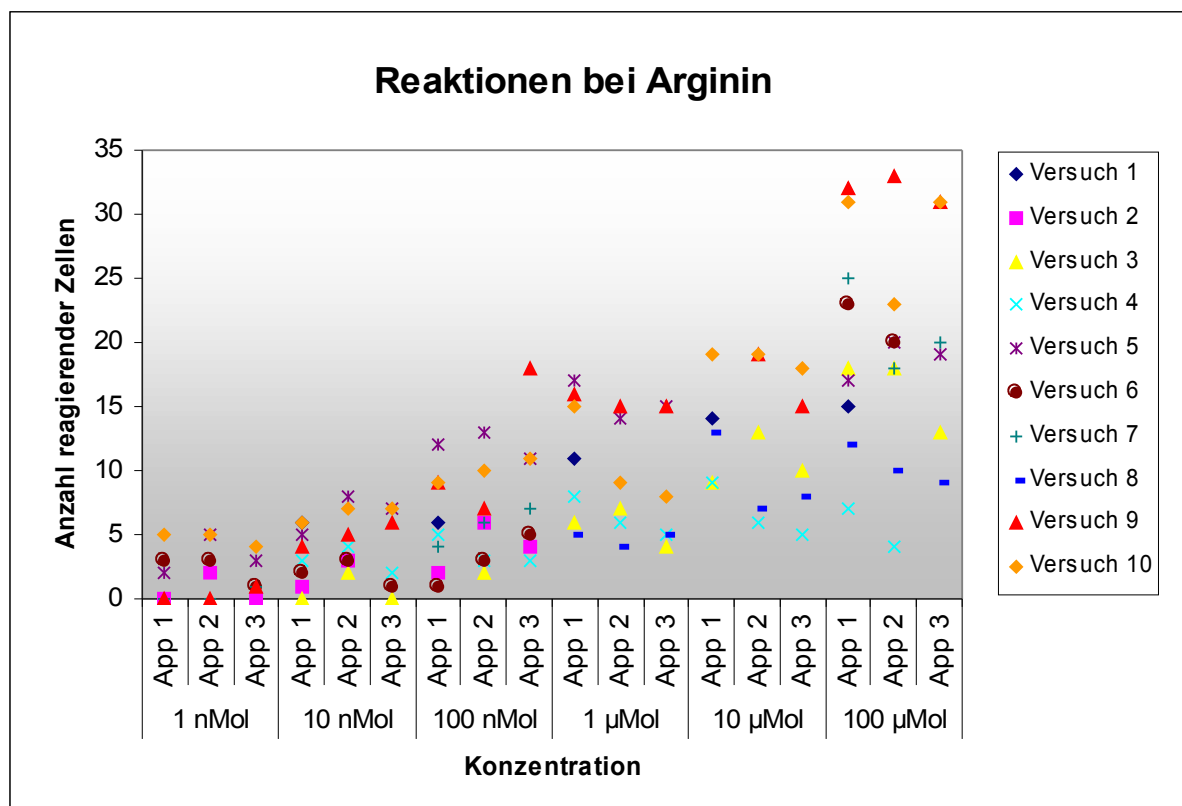
Aus Qualitätsgründen wurden Versuche mit optischen Störungen von der Auswertung ausgeschlossen, um einer Verfälschung der Daten vorzubeugen. Dies konnte aber erst nach Beendigung der gesamten Versuchsreihe festgestellt werden, so dass Wiederholungen einzelner Applikationen nicht mehr möglich waren.

Arginin	1 nMol			10 nMol			100 nMol			1 µMol			10 µMol			100 µMol		
	APP	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2
Versuch 1	X	X	X	6	X	X	6	X	X	11	X	X	14	X	X	15	X	X
Versuch 2	0	2	0	1	3	X	2	6	4	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Versuch 3	X	X	X	0	2	0	X	2	X	6	7	4	9	13	10	18	18	13
Versuch 4	X	X	X	3	4	2	5	3	3	8	6	5	9	6	5	7	4	X
Versuch 5	2	5	3	5	8	7	12	13	11	17	14	15	X	X	X	17	20	19
Versuch 6	3	3	1	2	3	1	1	3	5	X	X	X	X	X	X	23	20	X
Versuch 7	0	0	1	X	X	X	4	6	7	X	X	X	X	X	X	25	18	20
Versuch 8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	5	4	5	13	7	8	12	10	9
Versuch 9	0	0	1	4	5	6	9	7	18	16	15	15	X	19	15	32	33	31
Versuch 10	5	5	4	6	7	7	9	10	11	15	9	8	19	19	18	31	23	31

Tabelle 3-1: Die Tabelle zeigt 10 Versuche mit Arginin, bei denen Konzentrationen von 1 nMol bis 100 µMol (in logarithmischen Schritten) appliziert wurden. Die einzelnen Konzentrationen wurden pro Versuch bis zu 3 Mal appliziert (APP: A1, A2, A3). Die Zahlenwerte geben die Anzahl der Zellen an, die reizkorreliert, also direkt nach Applikation, reagiert haben. Ein "X" steht dafür, dass dort keine Applikation durchgeführt bzw. ausgewertet wurde.

Betrachtet man die Zahlenwerte in Tabelle 3-1, so fällt zwar eine klare Tendenz dahingehend auf, dass bei höheren Konzentrationen mehr Zellen reizkorreliert reagierten, aber es zeigten sich durchaus auch Unterschiede bei den drei Applikationen einer Konzentrationsstufe. Hier konnten in Ausnahmefällen, trotz identischer Konzentrationen, die verabreicht wurden, doppelt so viele Zellreaktionen beobachtet werden (z.B. Versuch 9 bei 100 nMol, Applikation 1 und 3 im Vergleich).

Graph 3-1 stellt die Daten der Tabelle 3-1 dar. Es ist deutlich zu erkennen, dass im Bereich der niedrigsten Konzentration von 1 nMol nur wenige Zellen reagieren, häufiger auch eine Zellantwort ausbleibt. Je höher die applizierte Konzentration ist, desto mehr Zellen reagieren auf den Duftstoff. Gleichzeitig wächst auch die Bandbreite bezüglich der Anzahl an reagierenden Zellen innerhalb einer Konzentrationsstufe. Hier schwanken die Ergebnisse zwischen 33 und 4 Zellen, die Reaktionen aufwiesen. Dies liegt daran, dass der im Versuch beobachtete Ausschnitt



Graph 3-1: Der Graph zeigt die 10 Versuche der Tabelle 3-1 mit Arginin, bei denen Konzentrationen von 1 nMol bis 100 µMol appliziert wurden. Die einzelnen Konzentrationen wurden pro Versuch bis zu 3 Mal appliziert (App1, App2, App3). Die Zahlenwerte geben die Anzahl der Zellen an, die reizkorreliert reagiert haben.

im Mikroskop verschieden groß und bei jedem Versuchstier individuell optimal ausgewählt wurde. Das hat zur Folge, dass die absolute Anzahl an Zellen, die während der einzelnen Versuchsreihen beobachtet und ausgewertet wurden, sehr unterschiedlich sein konnte. Innerhalb eines Versuchs blieb der Ausschnitt, die sogenannte "region of interest", aber immer gleich. Für die Auswertung bedeutete dies, dass nicht der absolute Zuwachs an Zellreaktionen ausschlaggebend war, sondern der relative Zuwachs im Vergleich zu den Reaktionen bei minimaler Konzentration.

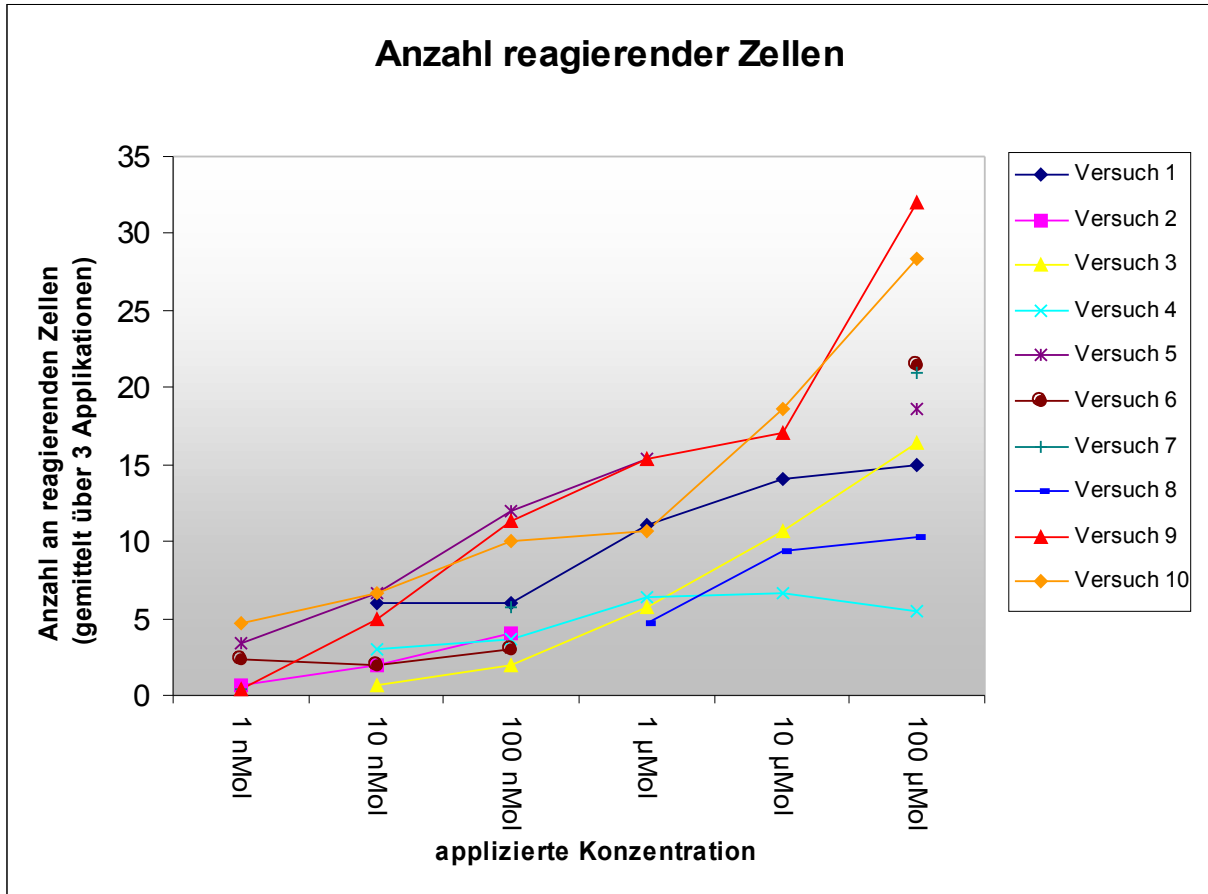
Um eine bessere Übersichtlichkeit zu erreichen, wurden für die (maximal) drei Applikationen pro Versuch und Konzentration Mittelwerte bestimmt. Die entsprechenden Zahlenwerte wurden in Tabelle 3-2 dargestellt.

Arginin	1 nMol	10 nMol	100 nMol	1 µMol	10 µMol	100 µMol
Versuch 1	X	6	6	11	14	15
Versuch 2	0,67	2	4	X	X	X
Versuch 3	X	0,67	2	5,67	10,67	16,33
Versuch 4	X	3	3,67	6,33	6,67	5,50
Versuch 5	3,33	6,67	12	15,33	X	18,67
Versuch 6	2,33	2	3	X	X	21,50
Versuch 7	0,33	X	5,67	X	X	21
Versuch 8	X	X	X	4,67	9,33	10,33
Versuch 9	0,33	5	11,33	15,33	17	32
Versuch 10	4,67	6,67	10	10,67	18,67	28,33

Tabelle 3-2: Die Tabelle zeigt die 10 Versuche mit Arginin, bei denen Konzentrationen von 1 nMol bis 100 µMol appliziert wurden. Im Unterschied zu Tabelle 1 sind hier Durchschnittswerte für die einzelnen Konzentrationsstufen angegeben. Die Zahlenwerte geben die durchschnittliche Anzahl der Zellen an, die reizkorreliert auf einen applizierten Duftstoff reagiert haben. Ein "X" steht für keine durchgeführte Applikation, bzw. Auswertung.

Hier und auch im folgenden Graphen 3-2, zeigt sich deutlich der Zuwachs an Zellen mit Reaktionen im Verlauf des Konzentrationsanstieges. Bei den Versuchen 3, 6, 7, 9 und 10 kommt es bis zur Applikation der Höchstkonzentration von 100 µMol zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl an Zellen, die reizkorreliert reagieren. Zum Teil zeigen sich größere Zuwächse von 10 µMol auf 100 µMol.

Dahingegen finden sich bei den Versuchen 1, 4, 5 und 8 Kurven, die im Bereich der Höchstkonzentration abflachen, einer Sättigungskurve folgend. Der Versuch 2 kann hier keiner der Gruppen zugeordnet werden, da nur die niedrigen Konzentrationen getestet wurden.



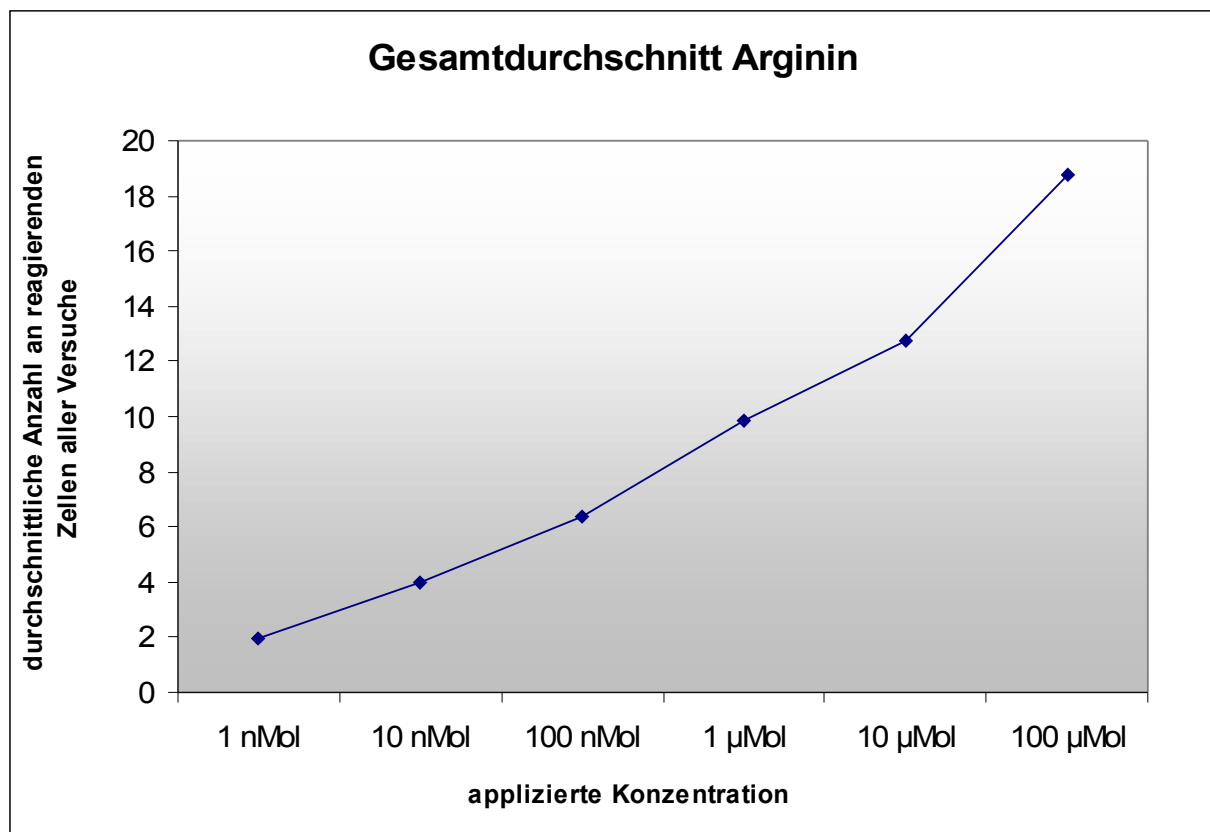
Graph 3-2: Der Graph zeigt die 10 Versuche mit Arginin, bei denen Konzentrationen von 1 nMol bis 100 µMol appliziert wurden. Im Unterschied zu Graph 1 sind hier Durchschnittswerte angegeben. Die Zahlenwerte geben die durchschnittliche Anzahl der Zellen an, die reizkorreliert reagiert haben.

Tabelle 3-3 zeigt den Durchschnitt der ermittelten Daten aus den zehn Versuchen (für die sechs Konzentrationen). Eindeutig ist hierbei zu erkennen, dass mit der Applikation höherer Konzentrationen auch die Anzahl derer Zellen steigt, die reizkorreliert reagiert haben. Prozentual ausgedrückt zeigt sich, dass im Vergleich zu der Anzahl an Zellantworten bei der niedrigsten Konzentration 1 nMol die Anzahl an Reaktionen bei 100 µMol um circa 900 % steigt. Die Daten der Tabelle 3-3 sind in Graph 3-3 dargestellt.

Arginin	1 nMol	10 nMol	100 nMol	1 µMol	10 µMol	100 µMol
---------	--------	---------	----------	--------	---------	----------

Mittelwert	1,94	4	6,41	9,86	12,72	18,74
prozentual	100 %	206,18 %	330,41 %	508,24 %	655,67 %	965,97 %

Tabelle 3-3: Die Tabelle zeigt den Durchschnittswert aus den oben dargestellten 10 Versuche mit Arginin, bei denen Konzentrationen von 1 nMol bis 100 µMol appliziert wurden. Die Zahlenwerte geben die durchschnittliche Anzahl der Zellen an, die reizkorreliert reagiert haben (absolut). Darunter sind die Werte prozentual angegeben, bezogen auf die absolute Anzahl bei 1 nMol (1,94 = 100%).



Graph 3-3: Der Graph zeigt den Durchschnittswert reizkorreliert reagierender Zellen aus den 10 Versuche mit Arginin (entsprechend der Tabelle 3-3).

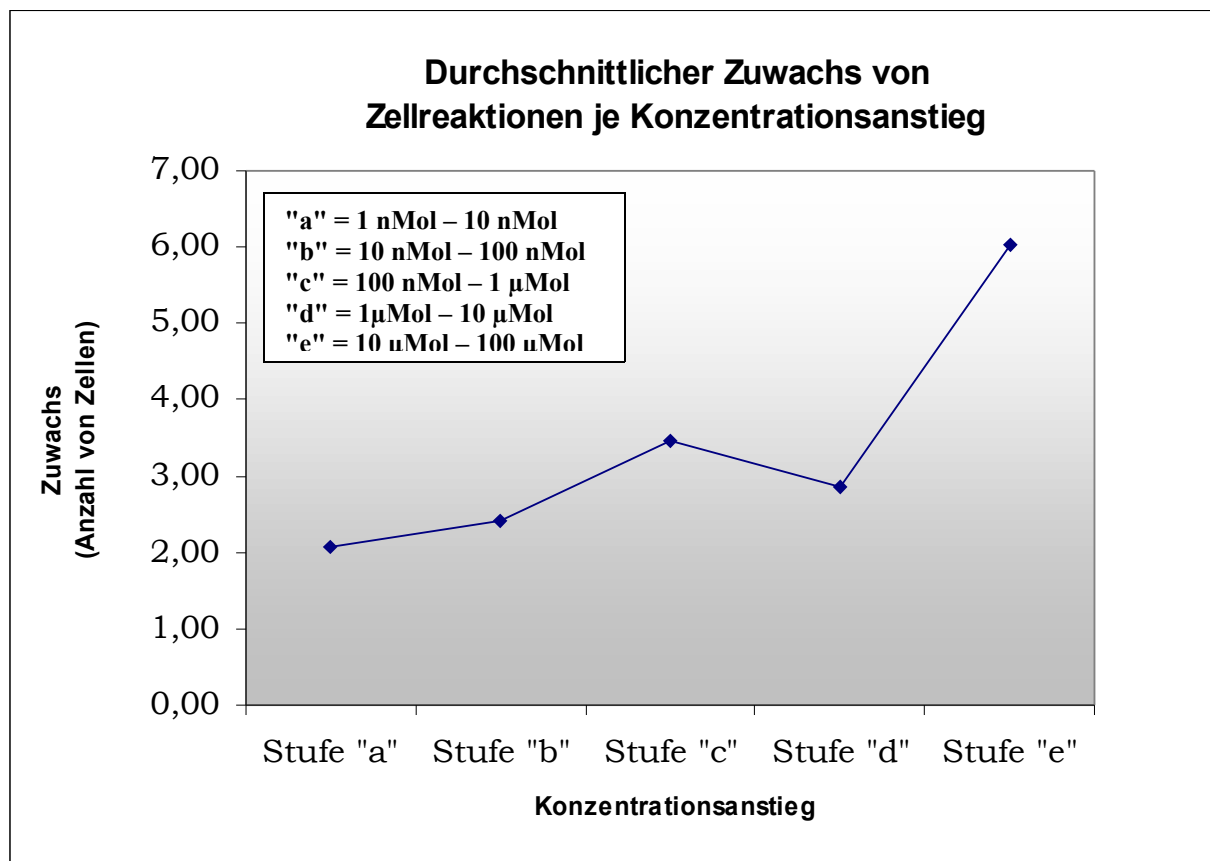
Im Vergleich zu den oben dargestellten absoluten Werten wurde ein weiteres Augenmerk auf den Zuwachs der reagierenden Zellen gelegt, also wie viel mehr Zellen bei der nächst höheren Konzentration reagiert haben. Die einzelnen Konzentrationsstufen waren so besser zu vergleichen. Hierzu wurden fünf Konzentrationsstufen definiert, je eine von 1 nMol zu 10 nMol, von 10 nMol zu 100 nMol, von 100 nMol zu 1 µMol, von 1 µMol zu 10 µMol und von 10 µMol zu 100 µMol. Diese wurden aufsteigend mit den Buchstaben "a" bis "e" bezeichnet.

In der Tabelle 3-4 sind eben diese Konzentrationsstufen als Abszisse des Graphen 3-4 ausgewiesen, auf ihr sind die Werte des absoluten Zuwachses aufgetragen. Tabelle 3-4 zeigt zusätzlich den prozentualen Zuwachs. Hierbei entspricht der absolute Zuwachs der tatsächlich höheren Anzahl reagierender Zellen, wie zum Beispiel bei Stufe "a" 2,06 Zellen. Dies spiegelt wider, dass bei der Applikation von 1 nMol im Durchschnitt 1,94 Zellen, bei 10 nMol im Durchschnitt 4 Zellen reagiert haben (siehe Tabelle 3-3). Folglich kam es bei der oben definierten Stufe "a" zu einem absoluten Zuwachs von 2,06 Zellen, prozentual zu einem Zuwachs von 106,18% (bezogen auf 1,94 reagierende Zellen bei 1nMol, siehe Tabelle 3-3, wobei 1,94 Zellen hier 100% entsprechen).

In der Tabelle 3-4 ist zu sehen, dass der absolute und prozentuale Zuwachs bei den Konzentrationsstufen "a", "b" und "c" eine Zunahme erfährt, es also nicht zu einer linearen Steigerung kommt. Dies wird bei der Stufe "d" durch eine geringere Zunahme unterbrochen, diese ist kleiner als bei "c", aber noch immer größer als "b". Anzunehmen wäre hier möglicher Weise eine Art Sättigung der Rezeptoren durch Arginin. Es zeigt sich aber, dass es bei der letzten Stufe "e", von 10 µMol zu 100 µMol, doch noch mal zu einem Anstieg kommt (siehe Tabelle 3-4 und Graph 3-4).

Konzentrationsstufen	Stufe "a"	Stufe "b"	Stufe "c"	Stufe "d"	Stufe "e"
Zuwachs absolut	2,06	2,41	3,45	2,86	6,02
Zuwachs prozentual*	106,18 %	124,23 %	177,83 %	147,43 %	310,3 %

Tabelle 3-4: Die Tabelle zeigt fünf "Konzentrationsstufen". In Anlehnung an Tabelle 3-3 beschreiben diese die Anzahl an reagierenden Zellen, die mehr reagiert haben, wenn die nächst höhere Konzentration appliziert wurde. Beispiel: Im Vergleich zu 1 nMol haben durchschnittlich 2,06 Zellen mehr reagiert, als wenn 10 nMol appliziert wurde. Dies entspricht einem prozentualen Zuwachs von 106,18% (bezogen auf 1,94 Zellen bei 1 nMol, siehe Tabelle 3-3).



Graph 3-4: Der Graph zeigt die fünf Konzentrationsstufen "a" bis "e" in Anlehnung an Tabelle 3-3 und Tabelle 3-4.

3.1.2 Abhängigkeit der Reaktionsintensität der einzelnen Zellen von der applizierten Konzentration

Eine ebenfalls behandelte Fragestellung bezog sich auf die Intensität der Zellreaktionen. Bei der Auswertung der Versuche konnte die Intensität der Reaktionen einer jeden Zelle bestimmt werden. Wie in Abschnitt 2 der vorliegenden Arbeit beschrieben, erfolgte die Inkubation der Versuchstiere mit dem Farbstoff Fura-II AM, die Intensität der Reaktion beschreibt der Wert df/f (%) (siehe Abschnitt 2.4).

Die dargestellten Versuche (V1 bis V10 in Tabelle 3-5) wurden bezüglich der Reaktionsintensität, respektive der Fluoreszenzintensität, untersucht. Für jede reizkorreliert reagierende Zelle wurde das niedrigste df/f (%), also die stärkste Intensitätsabnahme der Fluoreszenz bestimmt. Für jeden Versuch und jede Konzentrationsstufe (1 nMol bis 100 µMol) ergab sich so je untersuchter Zelle ein

Intensitätswert df/f (%). Dieser wurde in Tabelle 3-5 zusammengefasst. Zur besseren Übersicht sind hier allerdings die durchschnittlichen Werte für jede Konzentration, nicht der Wert einer jeden einzelnen Zelle, angegeben worden.

Ein "X" steht dafür, dass keine Applikation bei dieser Konzentration durchgeführt wurde oder aber diese nicht verwertbar war.

df/f	Versuch										Av
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	
1nMol	X	4,75	X	1,29	4,44	6,09	X	2,08	0,7	X	3,23
10 nMol	5,65	6,96	X	5,59	3,69	5,58	2,44	X	4,15	4,35	4,8
100 nMol	5,72	6,62	10,58	6,14	4,36	4,89	2,71	3,79	4,2	3,91	5,29
1 µMol	5,29	8,45	11,22	6,77	4,66	X	2,9	X	X	7,88	6,74
10 µMol	7,65	X	16,28	7	5,06	X	3,67	X	X	8,76	8,07
100 µMol	9,69	7,72	10,64	12,68	10,33	13,42	3,58	6,44	X	7,28	9,09

Tabelle 3-5: Die Tabelle zeigt die durchschnittliche Reaktionsintensität df/f (%) bei Arginin. Bei 10 Versuchen (V1 bis V10) wurde die Reaktionsintensität jeder reizkorrelierten Zellreaktion bestimmt und pro Versuch und Konzentration ein Durchschnittswert ermittelt. Ein "X" steht für nicht applizierte Konzentrationen im jeweiligen Versuch, bzw. konnte eine Auswertung nicht erfolgen. "Av" entspricht dem Gesamtdurchschnittswert der jeweiligen Konzentration. Zur besseren Darstellbarkeit sind die eigentlich negativen Werte für das df/f (%) mit (-1) multipliziert und somit positiv abgebildet.

Beim Auswerten der Tabelle 3-5 fällt auf, dass mit steigenden Konzentrationen grundsätzlich auch das df/f (%), also die Intensität der Reaktionen, zunimmt. Bei genauerer Beobachtung zeigt sich aber auch, dass in mehreren Versuchen (V2, V3, V7 und V10) das Maximum der Intensität nicht bei der höchsten Konzentration (100 µMol) der applizierten Odoranzien zu finden ist, sondern kurz davor bei 10 µMol, respektive 1 µMol bei V2. Fasst man alle Versuche in Bezug auf das df/f (%) wie in Tabelle 3-5 unter "Av" zusammen, erhält man einen Durchschnittswert, der in Diagramm 3-1 auf folgender Seite dargestellt ist.

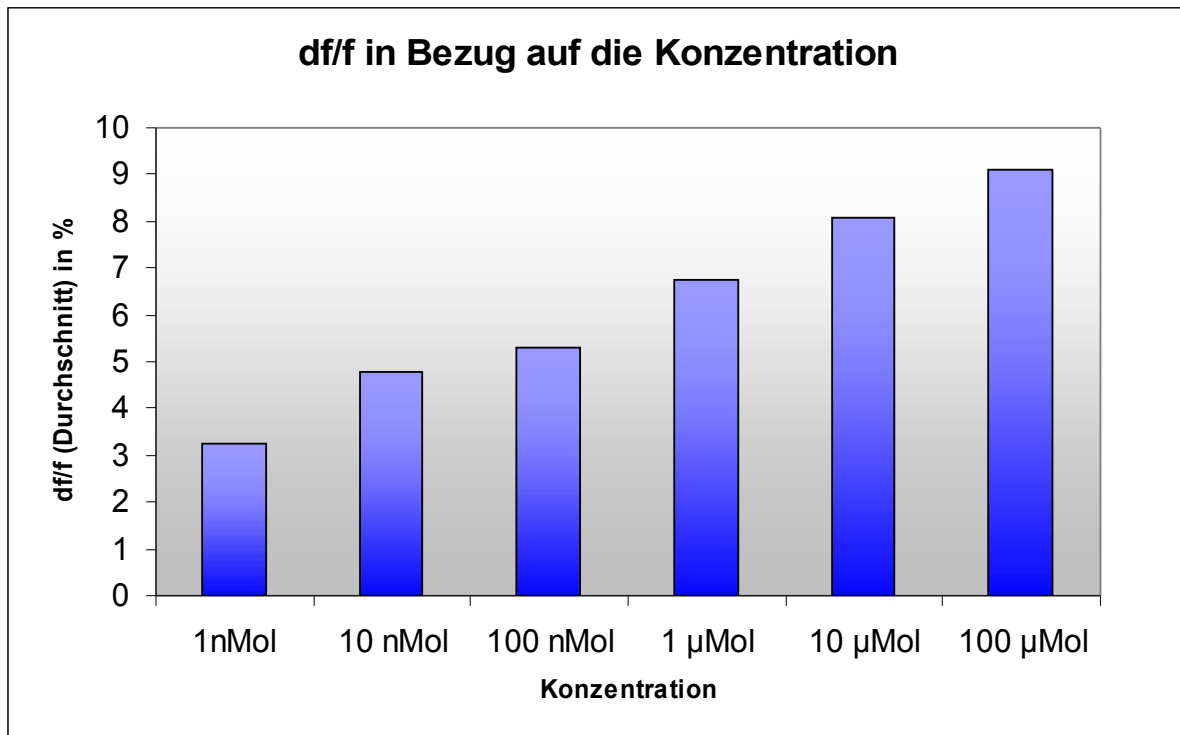


Diagramm 3-1: Das Diagramm zeigt die durchschnittliche Reaktionsintensität df/f (%) von 10 Versuchen bei der Applikation von Arginin. Es wurde die Reaktionsintensität jeder einzelnen reizkorrelierten Zellreaktion bestimmt und über alle Versuche in Bezug auf die applizierten Konzentrationen gemittelt. Zur besseren Darstellbarkeit sind die eigentlich negativen Werte für das df/f (%) mit (-1) multipliziert und somit positiv abgebildet.

3.1.3 Darstellung der Ergebnisse am Beispiel von vier Zellen

Als Beispiel für die durchgeführten Untersuchungen werden folgend vier exemplarische Zellen dargestellt (Zelle A bis D). Am oberen linken Seitenrand findet sich ein Diagramm, das die Reaktionsintensität, das df/f (%), für die jeweils dargestellte Zelle zeigt, abhängig von der applizierten Konzentration. Auch hier sind die Werte des df/f (%) zur besseren Darstellbarkeit positiv. Darunter sind bis zu sechs Graphen, die die einzelne Reaktion, also den Verlauf der Fluoreszenzintensität, bei den applizierten Konzentrationen zeigen. Es handelt sich jeweils um eine Applikation, nicht um eine Mittelung mehrerer Ergebnisse.

Ein roter Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt der Odoranzien und belegt durch die zeitliche Korrelation den Zusammenhang zwischen Reaktion und Geruchsstoff. Die Wiederholbarkeit der Ergebnisse läßt theoretisch mögliche Spontanreaktionen der Zellen zu eben diesem Zeitpunkt unwahrscheinlich erscheinen.

3.1.3 Zelle A

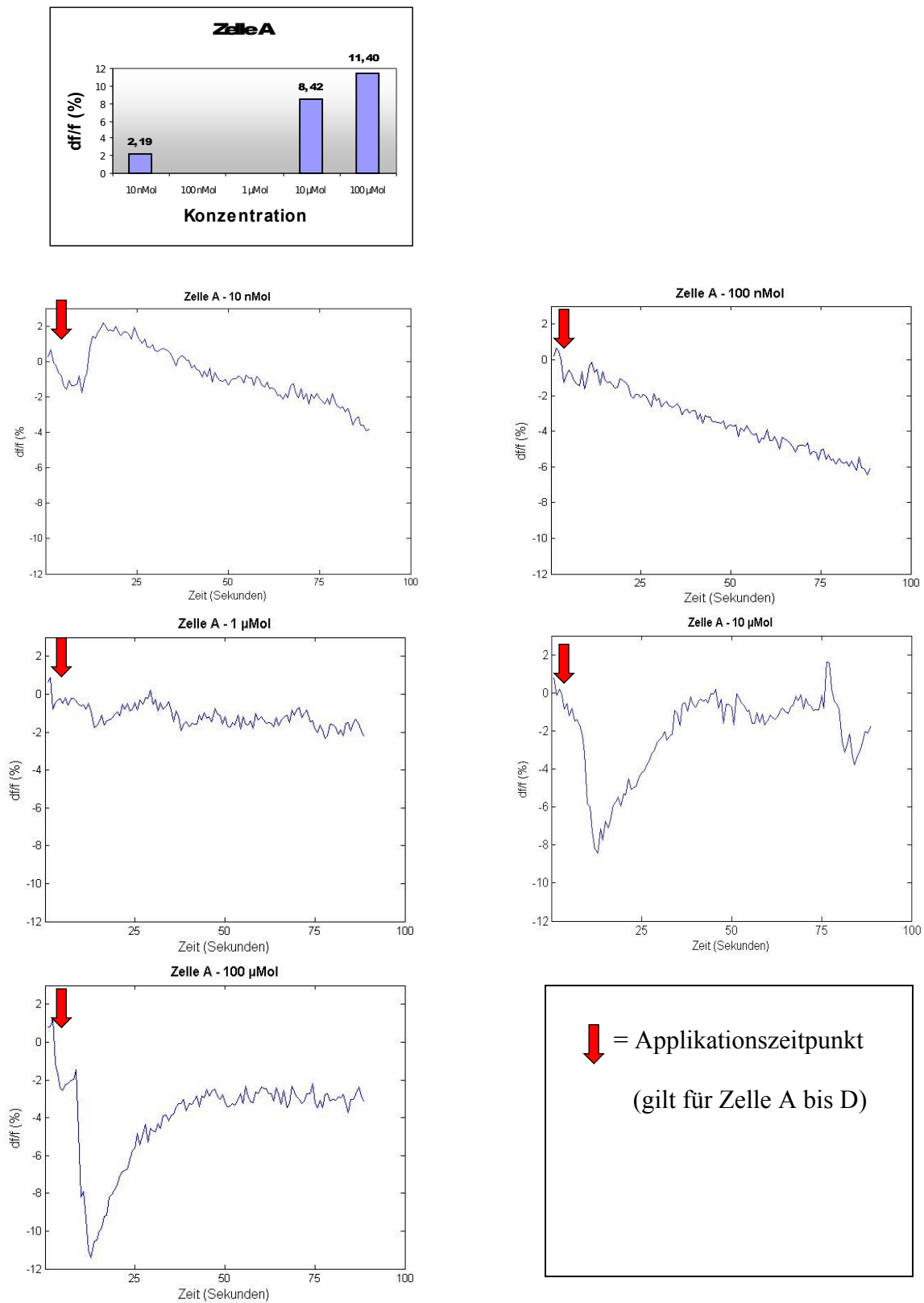
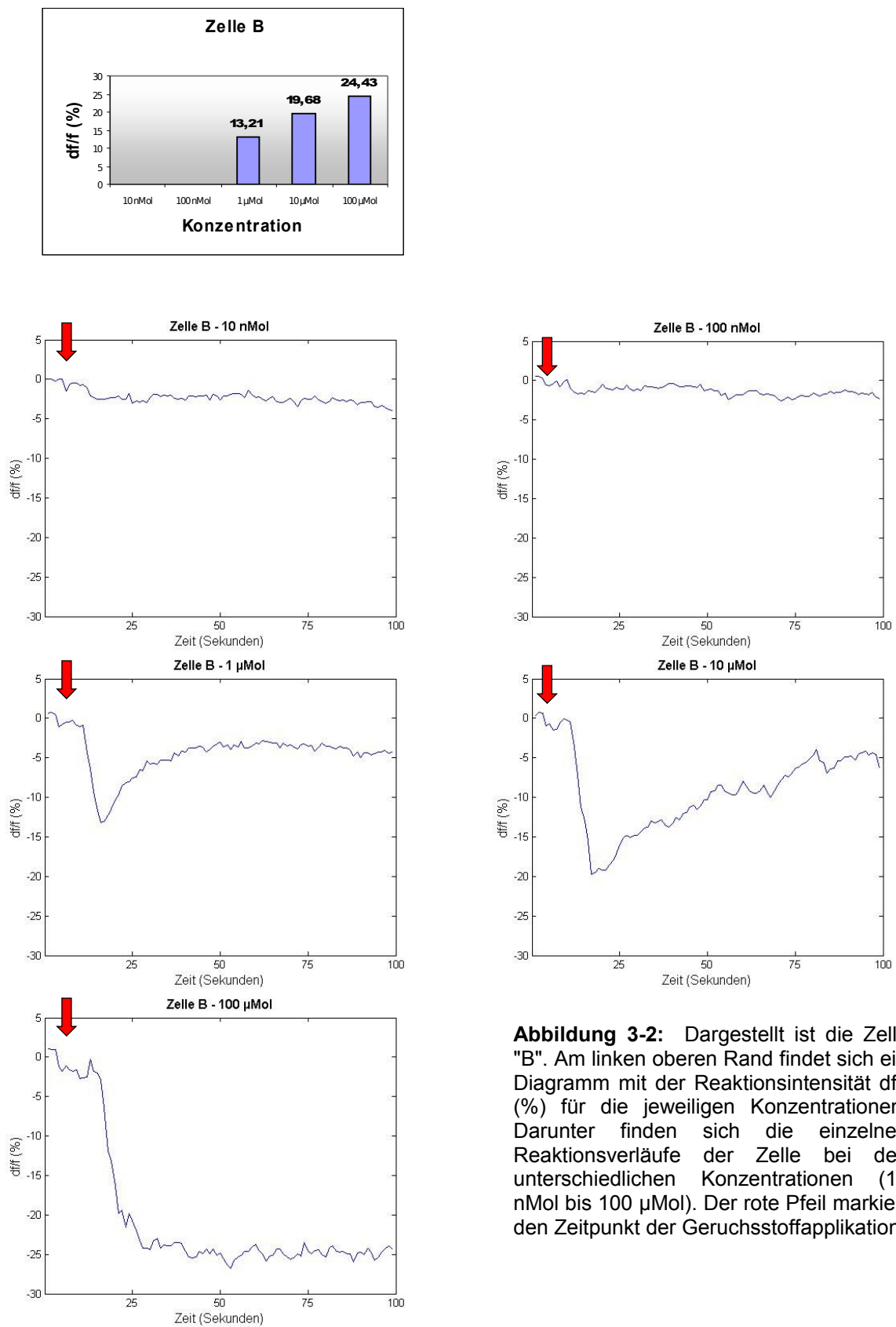


Abbildung 3-1: Dargestellt ist die Zelle "A". Am linken oberen Rand findet sich ein Diagramm mit der Reaktionsintensität df/f (%) für die jeweiligen Konzentrationen. Darunter finden sich die einzelnen Reaktionsverläufe der Zelle bei den unterschiedlichen Konzentrationen (10 nMol bis 100 µMol). Der rote Pfeil markiert den Zeitpunkt der Geruchsstoffapplikation.

3.1.3 Zelle B



3.1.3 Zelle C

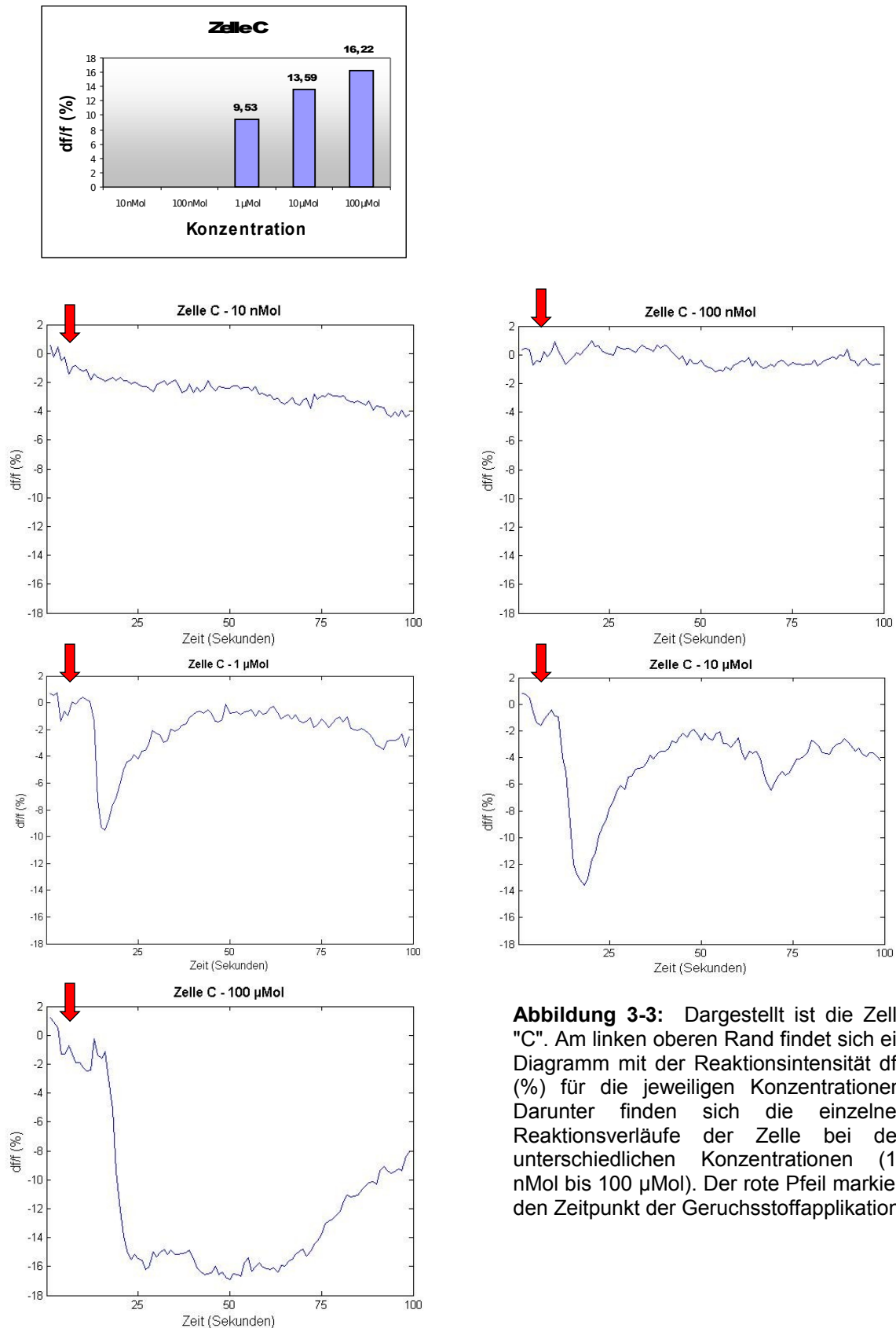
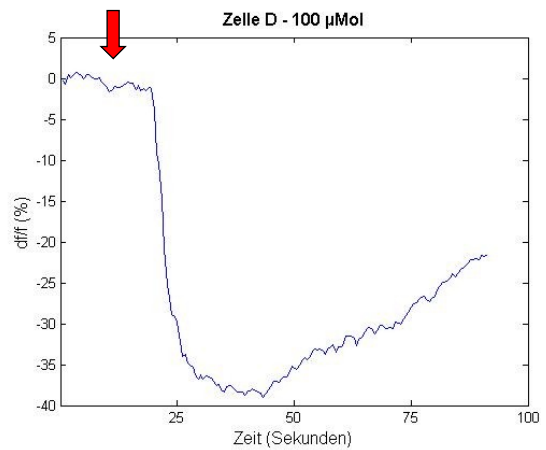
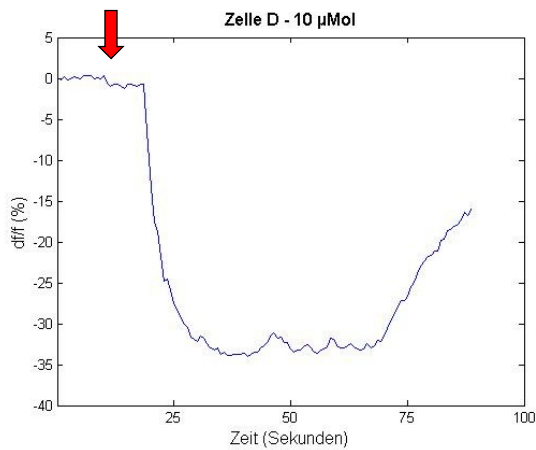
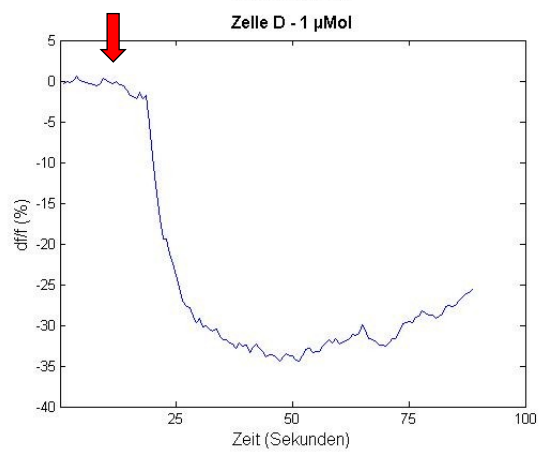
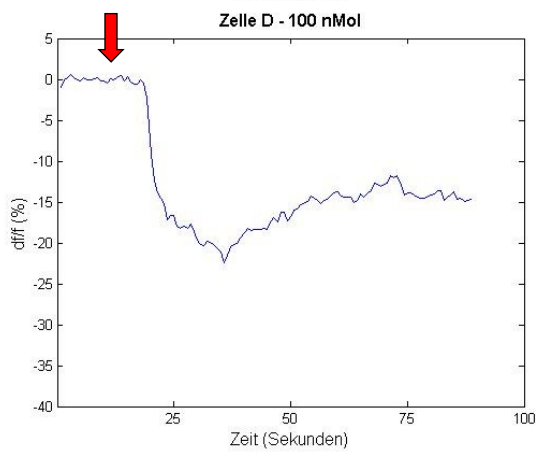
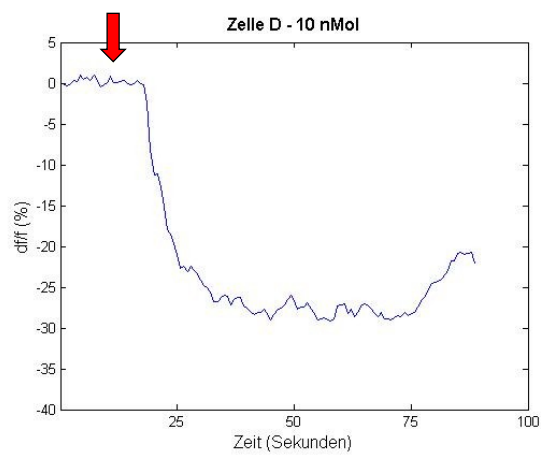
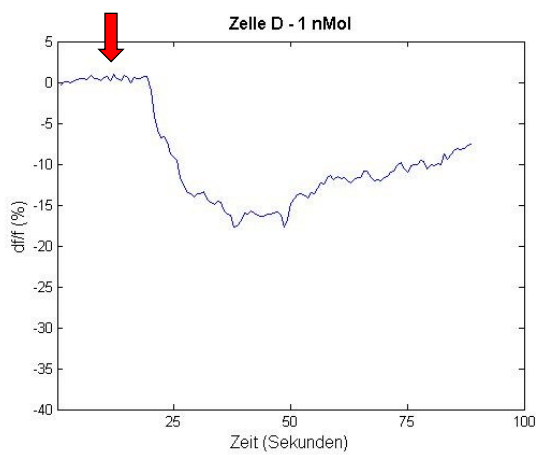
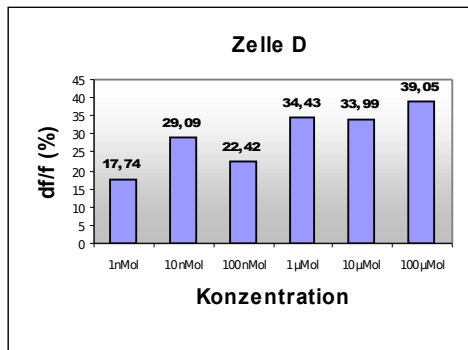


Abbildung 3-3: Dargestellt ist die Zelle "C". Am linken oberen Rand findet sich ein Diagramm mit der Reaktionsintensität df/f (%) für die jeweiligen Konzentrationen. Darunter finden sich die einzelnen Reaktionsverläufe der Zelle bei den unterschiedlichen Konzentrationen (10 nMol bis 100 μ Mol). Der rote Pfeil markiert den Zeitpunkt der Geruchsstoffapplikation.

3.1.3 Zelle D



▲ **Abbildung 3-4:** Dargestellt ist die Zelle "D". Am linken oberen Rand findet sich ein Diagramm mit der Reaktionsintensität df/f (%) für die jeweiligen Konzentrationen. Darunter finden sich die einzelnen Reaktionsverläufe der Zelle bei den unterschiedlichen Konzentrationen (1 nMol bis 100 μ Mol). Der rote Pfeil markiert den Zeitpunkt der Geruchsstoffapplikation.

3.2 Die Aminosäure Methionin als Duftstoff

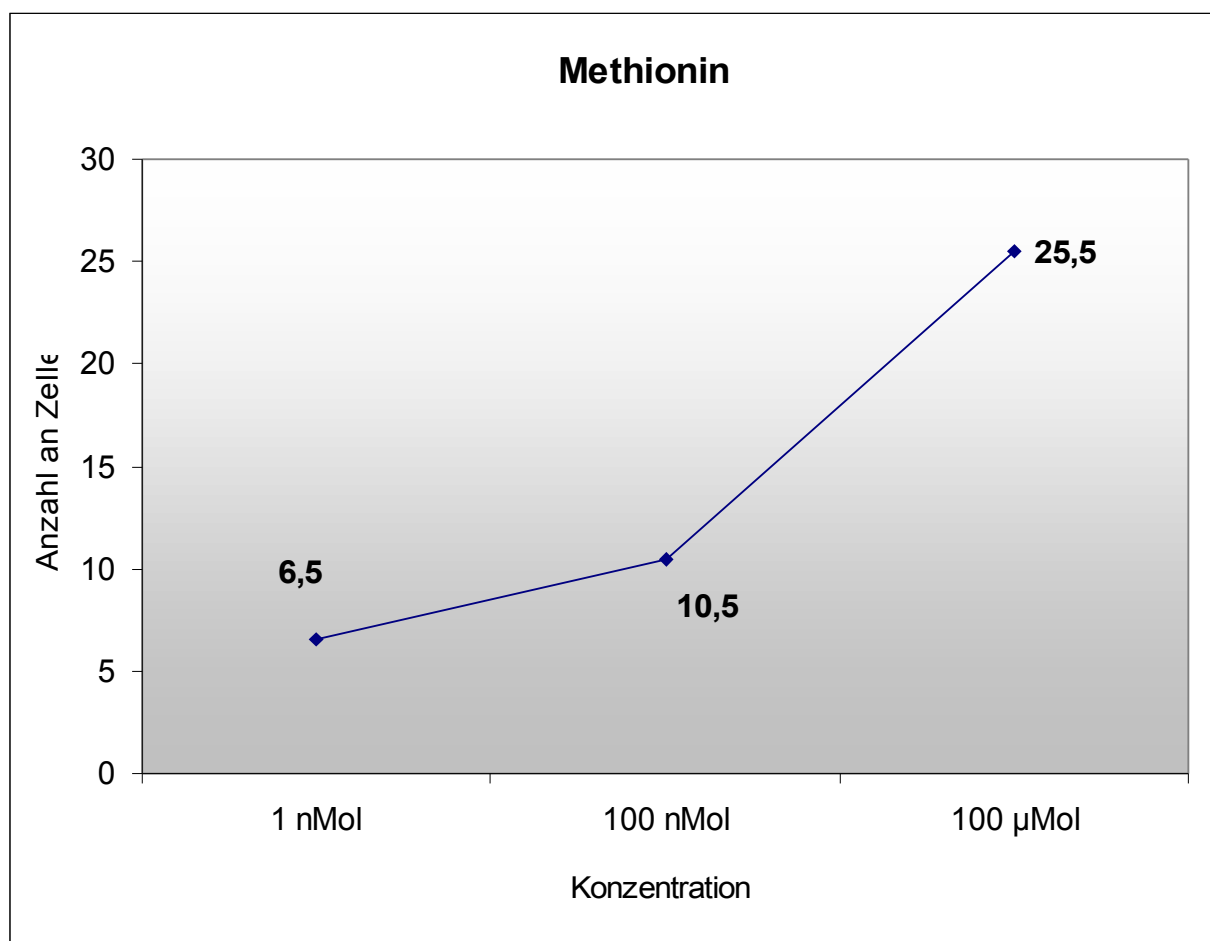
Neben der hauptsächlich untersuchten Aminosäure Arginin wurden auch die Aminosäuren Methionin und Histidin als Odoranzien getestet. Dies erfolgte allerdings vergleichsweise mit wenigen Präparationen, so dass eine statistische Auswertung nur eingeschränkt möglich ist, wohl aber eine Einschätzung, ob die bereits ermittelten Daten für Arginin für andere Aminosäuren ebenfalls gelten könnten.

Exemplarisch für fünf ausgewertete Versuche mit Methionin zeigt die Tabelle 3-6 eine einzelne Präparation (Versuch 11), bei der die Konzentrationen 1 nMol, 100 nMol und 100 μ Mol je zwei Mal appliziert wurden (A1 und A2). Die Zahlenwerte entsprechen der Anzahl an Zellen, die reizkorreliert mit einem Abfall der Fluoreszenzintensität reagiert haben. Gut zu erkennen ist, dass die Anzahl an Zellreaktionen mit der Konzentration von Methionin parallel ansteigt. Dies zeigte sich bei beiden Applikationen eindeutig. Weiter sieht man, dass die Reaktionen reproduzierbar sind, bei 1 nMol und 100 μ Mol ist die Anzahl an Zellreaktionen bei den beiden Applikationen A1 und A2 fast identisch, lediglich bei 100 nMol divergieren sie.

Methionin	1 nMol		100 nMol		100 μ Mol	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2
Versuch 11	6	7	16	5	26	25
Av	6,5		10,5		25,5	

Tabelle 3-6: Gezeigt wird der Versuch 11. Appliziert wurde die Aminosäure Methionin je zwei Mal (A1 und A2) in den Konzentrationen 1 nMol, 100 nMol und 100 μ Mol. Die angegebenen Werte entsprechen der Anzahl an Zellen, die reizkorreliert mit einem Abfall der Fluoreszenzintensität reagiert haben. "Av" beschreibt den Durchschnitt der zwei Applikationen (je Konzentration).

Wie auch schon bei den Untersuchungen von Arginin wurde für Methionin ein Mittelwert "Av" errechnet und in Tabelle 3-6 und Graph 3-5 dargestellt. Hier spiegelt das Ergebnis für Methionin das für Arginin (Graph 3-3) wider. Zum einen finden sich Reaktionen, die eindeutig schon bei der Applikation der niedrigsten Konzentration 1 nMol nachzuweisen sind, zum anderen zeigt sich bei Methionin ebenfalls eine Zunahme an Zellreaktionen mit steigender Konzentration (der applizierten Odoranzien).



Graph 3-5: Der Graph zeigt den Versuch 11, bei dem Methionin appliziert wurde. Die Werte sind Durchschnittswerte "Av" der Anzahl an Zellen, die bei den zwei Applikationen je Konzentration reizkorreliert mit einem Abfall der Fluoreszenzintensität reagiert haben. Je höher die applizierte Geruchsstoffkonzentration, desto mehr Zellen reagieren.

Weiter wurde für den exemplarischen "Versuch 11" mit Methionin die Reaktionsintensität df/f (%) bestimmt. Tabelle 3-7 zeigt das df/f (%) für die drei verwendeten Konzentrationen bei den zwei Applikationen A1 und A2 (wie bereits oben erklärt mit positiven Zahlenwerten). Die Zahlenwerte entsprechen einem

Mittelwert aus der Fluoreszenzintensität df/f (%) jener Zellen, die reizkorreliert bei der jeweiligen Applikation reagiert haben (siehe Tabelle 3-6). Ähnlich wie bei Tabelle 3-6 zeigt sich bei der Gegenüberstellung der beiden Applikationen eine Vergleichbarkeit der Werte. Um eine Tendenz der Ergebnisse darstellen zu können, wurde für die Applikationen A1 und A2 wiederum der Mittelwert errechnet, der als Durchschnitt "Av" bezeichnet und in Tabelle 3-7 aufgeführt wurde.

df/f (%)	A1	A2	Av
1 nMol	4,29	3,86	4,08
100 nMol	4,75	6,01	5,38
100 μ Mol	13,22	12,29	12,76

Tabelle 3-7: Gezeigt wird der Versuch 11, bei der die Aminosäure Methionin je zwei Mal (A1 und A2) in den Konzentrationen 1 nMol, 100 nMol und 100 μ Mol appliziert wurde. Die Anzahl der reagierenden Zellen ist in Tabelle 3-6 dargestellt. Die hier angegebenen Werte entsprechen der durchschnittlichen Reaktionsintensität df/f (%) dieser reizkorreliert reagierenden Zellen (siehe Tabelle 3-6). "Av" beschreibt wiederum den Durchschnitt der Fluoreszenzintensität der zwei Applikationen. Zur besseren Darstellbarkeit sind die eigentlich negativen Werte für das df/f (%) mit (-1) multipliziert und somit positiv abgebildet.

Der in Tabelle 3-7 ermittelte durchschnittliche Wert "Av" für das df/f (%) wurde in Diagramm 3-2 dargestellt. Es zeigt sich klar, dass mit zunehmender Geruchsstoffkonzentration nicht nur die Anzahl an reizkorrelierten Zellreaktionen ansteigt, sondern auch die Intensitätsänderung der einzelnen Zellreaktionen (Fluoreszenz). In die Berechnung für die Fluoreszenzintensität in Tabelle 3-7 sind entsprechend der Tabelle 3-6 insgesamt 85 Zellen eingeschlossen worden.

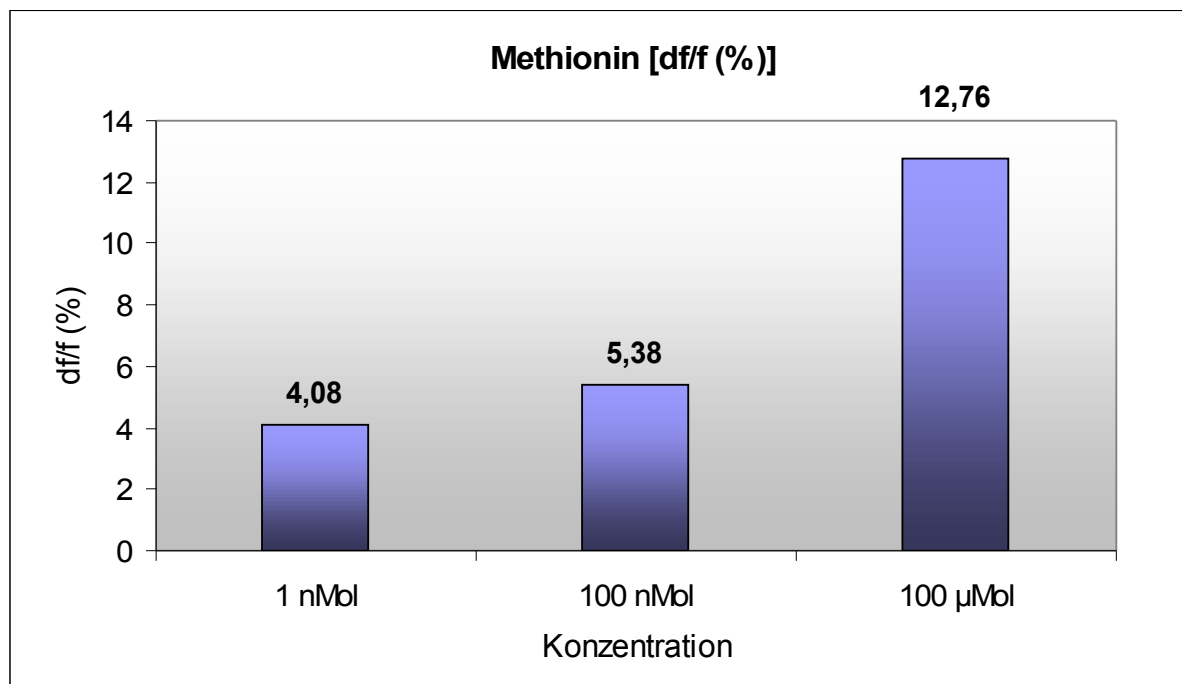


Diagramm 3-2: Gezeigt wird die durchschnittliche Reaktionsintensität df/f (%) aus Tabelle 3-7 für die drei applizierten Konzentrationen 1 nMol, 100 nMol und 100 µMol. Mit steigender Odoranzienkonzentration nimmt auch die Stärke der Fluoreszenzintensitätsänderung der einzelnen Zellreaktion zu. Zur besseren Darstellbarkeit sind die eigentlich negativen Werte für das df/f (%) mit (-1) multipliziert und somit positiv abgebildet.

Aus den untersuchten Zellen, die in Tabelle 3-6 mit korrelierter Reaktion auf das applizierte Methionin reagiert haben, wurde exemplarisch eine Zelle (als "E" bezeichnet) ausgewählt und dargestellt. In Tabelle 3-8 ist, vergleichbar mit Tabelle 3-7, die Reaktionsintensität dieser "Zelle E" als df/f (%) dargestellt.

Zelle E	A1	A 2
1 nMol	0	0
100 nMol	6,93	8,30
100 µMol	16,13	14,14

Tabelle 3-8: Die Tabelle zeigt die Reaktionsintensität df/f (%) einer einzelnen "Zelle E" des "Versuches 11". Entsprechend sind zwei Applikationen (A1 und A2) bei drei Konzentrationen dargestellt. Es zeigt sich eine Zunahme der Fluoreszenzintensitätsänderung mit steigender Odoranzienkonzentration. Bei 1 nMol finden sich keine Reaktionen der Zelle "E". Zur besseren Darstellbarkeit sind die eigentlich negativen Werte für das df/f (%) mit (-1) multipliziert und somit positiv abgebildet.

Hier war zu sehen, dass die untersuchte Zelle bei einer Konzentration von 1 nMol keine Reaktion auf den applizierten Geruchsstoff zeigte, bei den höheren Konzentrationen 100 nMol und 100 µMol aber eindeutig reizkorreliert mit einem Kalziumanstieg, respektive einem Abfall der Fluoreszenzintensität, reagierte.

Ebenfalls zu erkennen ist der Abfall der Fluoreszenzintensität df/f (%) mit höheren Konzentrationen (hier positiv dargestellt). Vergleichend war die Fluoreszenzintensität bei beiden Applikationen (A1 und A2) auf einer Konzentrationsstufe sehr ähnlich. Dargestellt ist dies im Diagramm 3-3.

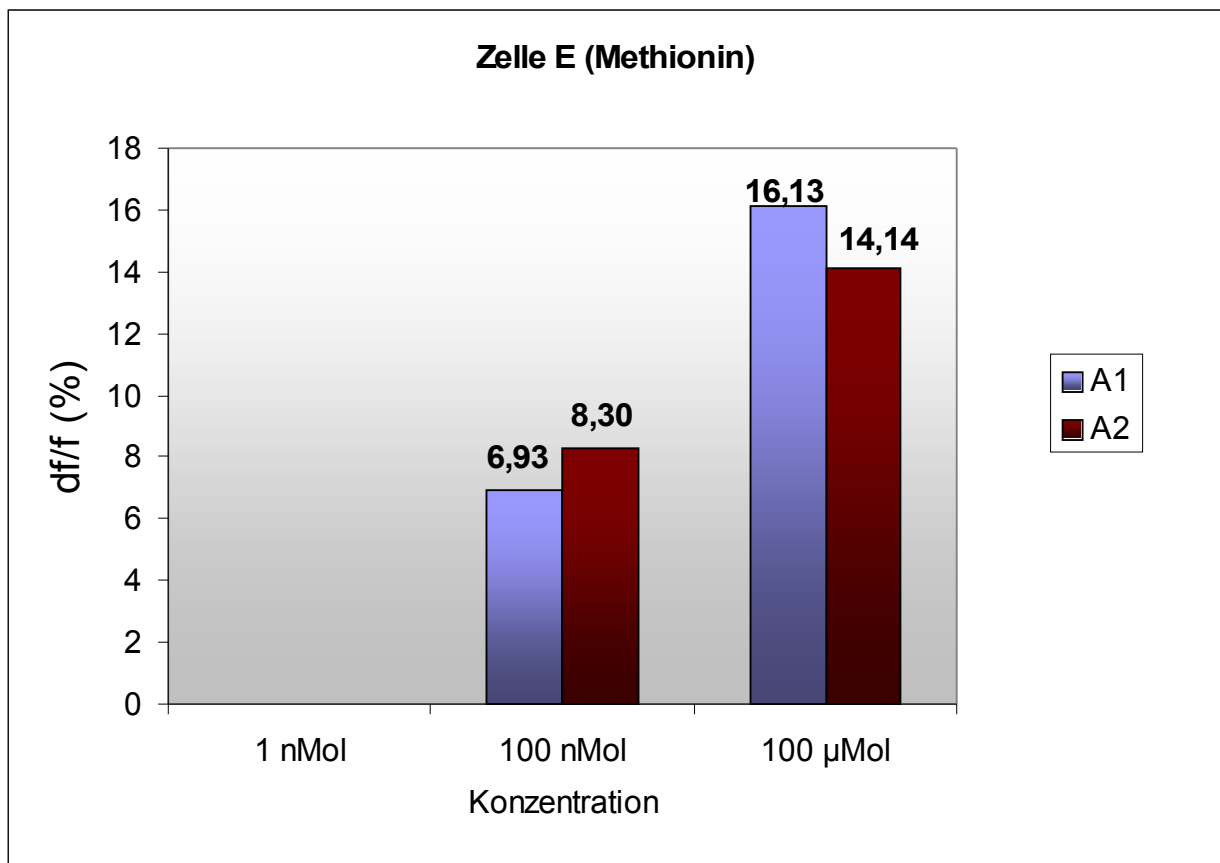


Diagramm 3-3: Das Diagramm zeigt die Fluoreszenzintensität df/f (%) einer einzelnen "Zelle E" des "Versuches 11". Nebeneinander aufgetragen sind die zwei Applikationen (A1 und A2) bei den Konzentrationen 1 nMol, 100 nMol und 100 µMol. Bei 1 nMol zeigte sich bei beiden Applikationen keine Reaktion. Zur besseren Darstellbarkeit sind die eigentlich negativen Werte für das df/f (%) mit (-1) multipliziert und somit positiv abgebildet.

Die einzelnen Reaktionen der "Zelle E" sind im folgenden Graphen 3-6 dargestellt. Es wurden jeweils zwei Mal die Konzentrationen 1 nMol, 100 nMol und 100 µMol appliziert. Gut zu erkennen ist, dass bei der niedrigsten Konzentration 1 nMol trotz zweimaliger Applikation keine sicheren reizkorrelierten Reaktionen nachzuweisen sind. Bei 100 nMol finden sich bei beiden Applikationen deutliche Zellantworten und bei 100 µMol ebenfalls. Wie bereits beschrieben und weiter oben dargestellt, zeigt sich hier ebenfalls gut, dass die Intensität der Reaktion df/f (%) mit der Höhe der applizierten Odoranzienkonzentration korreliert.



Graph 3-6: Der Graph zeigt die "Zelle E" des "Versuches 11". Dargestellt sind die Verläufe der Fluoreszenzintensität dieser einzelnen Zelle bei den Konzentrationen 1 nMol, 100 nMol und 100 µMol, die jeweils zwei Mal (A1 und A2) appliziert wurden. Die Verläufe A1 und A2 bei 1 nMol (dunkelblau und rosa) zeigen keine Reaktion, bei 100 nMol (gelb und hellblau) finden sich Reaktionen bis zu einem df/f (%) um -8 und bei 100 µMol (rot und grün) Reaktionen mit einem df/f (%) um -15. Der rote Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt.

3.3 Die Aminosäure Histidin als Duftstoff

Als dritte Aminosäure wurde Histidin verwendet. Auch hier gilt, wie bei Methionin, dass die Ergebnisse nur als Ausblick zu werten sind, da die Anzahl der Versuche mit dieser Aminosäure nur gering war. Es wurden zwei Larven von *Xenopus laevis* mit Histidin getestet. Ziel war es, eine Einschätzung zu schaffen, ob die Ergebnisse von Arginin und Methionin auch auf weitere Aminosäuren anzuwenden sein könnten.

Zu diesem Zweck wurde exemplarisch ein Versuch ausgewählt und aus diesem "Versuch 12" werden zwei Zellen zur näheren Betrachtung nachfolgend dargestellt (Zelle "F" roter Graph und Zelle "G" grüner Graph). Es zeigte sich, wie bereits schon bei Arginin und Methionin, dass die Zellen ab einer Konzentration von (in diesem Fall erst) 10 nMol reizkorreliert reagieren. Bei 1 nMol findet sich keine Reaktion der Zelle "G" und bei der Zelle "F" findet sich erst am Ende der Messung ein nicht-reizkorrelierter Abfall der Fluoreszenzintensität, was aufgrund der zeitlichen Latenz nicht als Reaktion auf den Geruchsstoff zu werten ist (siehe Abbildung 3-5).

Beide Zellen reagieren aber zeitgleich und reizkorreliert ab einer Konzentration von 10 nMol. Der rote Pfeil zeigt wieder den Zeitpunkt der Aminosäureapplikation an. Interessanterweise zeigt sich hier die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität df/f (%) von der applizierten Odoranzienkonzentration anders als in den vorangegangenen Versuchen mit den Aminosäuren Arginin und Methionin. Fand sich dort noch eine Korrelation vom Anstieg der Odoranzienkonzentration und der Abnahme der Fluoreszenzintensität, zeigen sich bei den dargestellten Zellen bei Histidin nahezu identische Werte für das df/f (%), unabhängig von der Konzentration. Auszunehmen davon sind die Applikationen bei 1 nMol, wo keine Reaktion stattfinden und 100 nMol, wo die Intensität mit einem df/f von ca. -4 % anders als bei 10 nMol, 1 μ Mol, 10 μ Mol und 100 μ Mol ausfällt.

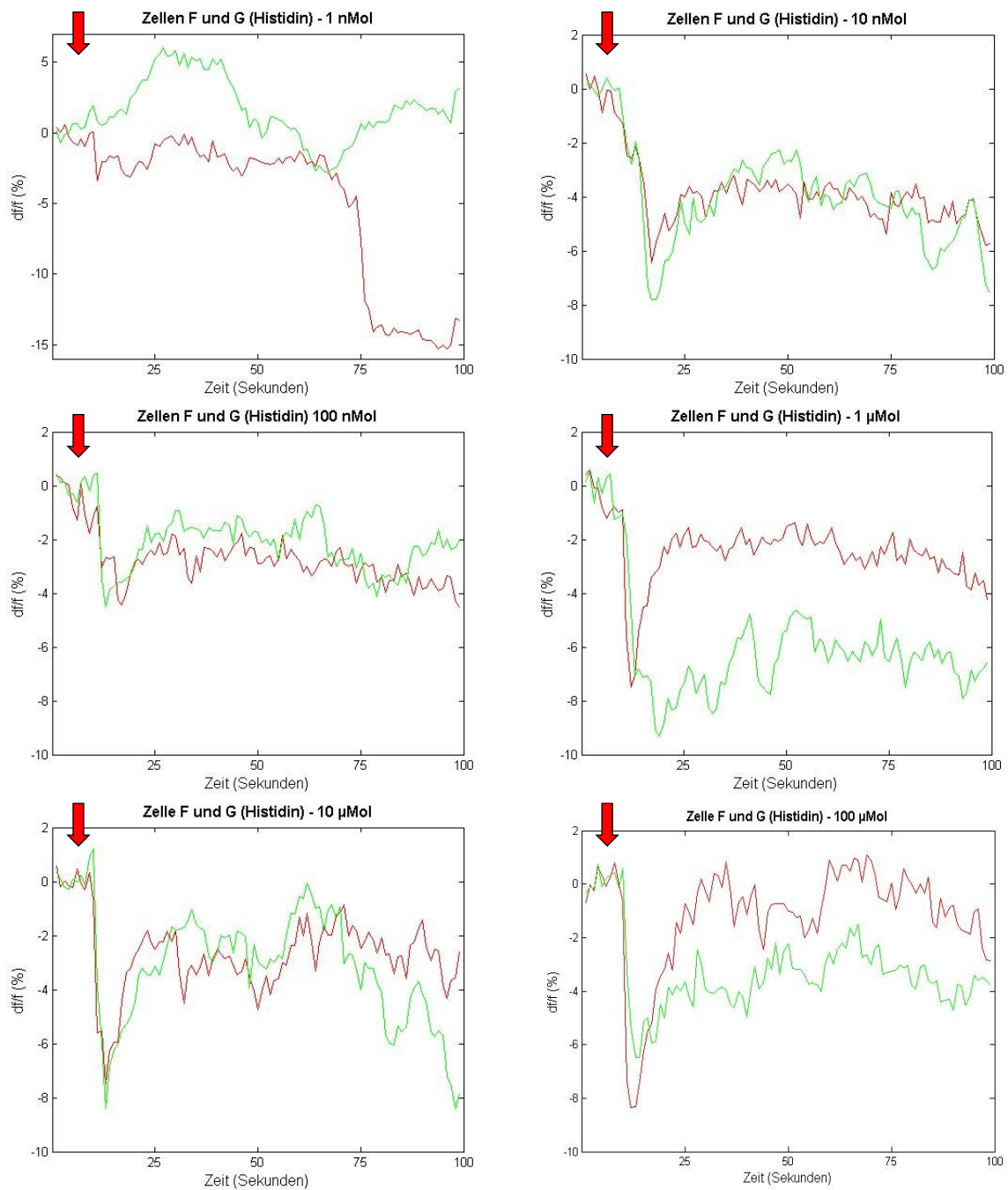


Abbildung 3-5: Dargestellt sind die Zellen "F" (rot) und "G" (grün) mit ihren einzelnen Reaktionsverläufen bei den unterschiedlichen Konzentrationen (1 nMol bis 100 μMol). Der rote Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht die Kodierung von Odoranzienkonzentrationen in Zellen des Bulbus olfactorius von Larven des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Schon seit vielen Jahren nutzt man die guten Eigenschaften von *Xenopus laevis* als Forschungstier in der Sinnes- und Neurophysiologie und bereits 1975 zeigte sich die besondere Bedeutung der Reizmodalität "Geruchssinn" zum Beuteerwerb bei dieser Anurenart (Hemmer und Köhler 1975). Damals wurde unter anderem die Aminosäure Histidin als Geruchsstoff verwendet und zeigte sich für Reaktionsauslösungen sehr geeignet. In den letzten Jahren wurden sehr viele Untersuchungen in unserem und anderen Laboren zum Geruchssinn durchgeführt. Zum Beispiel zeigte sich für *Xenopus laevis* die Leitfähigkeit von Kationen in olfaktorischen Rezeptorzellen (Schild 1993), es konnten Stromflüsse über den Rezeptorzellen nach Stimulation mit Geruchsstoffen gemessen werden (Zhainazarov und Ache 1995), und die Wassernase von *Xenopus laevis* reagiert neben wasserlöslichen auch auf flüchtige Geruchsstoffe (Iida and Kashiwayanagi, 1999). Weitere Testreihen bestätigten erneut, dass Aminosäuren geeignete Geruchsstimulanzien sind (Kruzhalov 1995). In der neueren Vergangenheit wurden modulatorische Eigenschaften von Noradrenalin auf Kalziumströme untersucht (Czesnik et al. 2001) und wie Geruchsstoffe durch Mitralzellen repräsentiert werden (Czesnik et al. 2003). Weiter konnte gezeigt werden, dass bei Mitralzellen Kalziumströme und Aktionspotentiale in enger Verbindung stehen, und dass vergleichend dazu bei Körnerzellen diese Verbindung nicht besteht. Entsprechend geeignet erscheint das Calcium-Imaging für Untersuchungen von Mitralzellen (Lin et al. 2007).

Aminosäuren stellen adäquate Reize für Amphibien (Mezler et al. 2001) und Fische (Kang und Caprio 1995, 1997) dar. In unserem Labor kristallisierten sich einige Aminosäuren heraus, welche besonders geeignet schienen (Manzini und Schild 2004, Gutermann 2006).

Hauptsächlich wurde in der vorliegenden Arbeit Arginin, aber auch Methionin und Histidin untersucht. Arginin schien die zuverlässigste Aminosäure zur Reizauslösung darzustellen. Sie ist eine basische Aminosäure mit dem höchsten Masseanteil an Stickstoff von allen proteinogenen Aminosäuren.

Xenopus laevis hat sich bereits in vielen Untersuchungen als ein sehr geeignetes Tier für die neurophysiologische Forschung erwiesen, da es unkompliziert zu halten und zu züchten ist, vor allem aber aufgrund der optimalen Untersuchungsmöglichkeiten bei gut erreichbarbarem neuronalem Gewebe.

Die durch die Versuchsreihe dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse geben Aufschluss über die Kodierung von Konzentrationen auf Ebene des Bulbus olfactorius, hauptsächlich Mitral- und Körnerzellen. Ähnliche Untersuchungen, ebenfalls mit den Aminosäuren Arginin und Methionin, nicht aber mit Histidin, wurden in unserem Labor auf Rezeptorzellebene im Riechepithel durchgeführt (Gutermann 2006).

Die genauere Untersuchung der Konzentrationskodierung erfolgte mittels Dosis-Wirkungskurven, die in der Regel Konzentrationsbereiche von 1 nMol bis 100 µMol in 10er Potenzschritten abbildeten. Hier konnte gezeigt werden, dass sich die Reaktionen auf die drei Aminosäuren bzgl. der Konzentration grundsätzlich gleich verhalten. Innerhalb der Untersuchungsreihen gab es allerdings auch Schwankungen, einige Zellen reagierten schon bei der niedrigsten Konzentration von 1 nMol, andere erst sehr viel später im Mikromolarbereich. Weiter ergaben die Versuche, dass sich mit zunehmender Konzentration auch die Anzahl der reagierenden Zellen erhöht.

Neben der Darstellung von Dosis-Wirkungskurven von Zellen auf Ebene des Bulbus olfactorius zielte die Arbeit auf weitere Fragen ab. Zum einen sollte geklärt werden, wo die Mindestkonzentration zur Reizauslösung liegt, zum anderen wurden die Reaktionen der einzelnen Zellen genauer untersucht. Hier kam der Vorteil der Calcium-Imaging-Technik voll zur Geltung, man konnte einerseits einen ganzen Zellverband beobachten und dabei die räumliche Aufteilung der reagierenden Zellen

begutachten, andererseits war es möglich, mit Hilfe der Auswertungssoftware einzelne Zellen bezüglich der Reaktionsintensität, korrelierend mit dem intrazellulären Kalziumanstieg, zu beurteilen.

Anders als in einer Arbeit aus unserem Labor auf Rezeptorzellebene wurden in der vorliegenden Arbeit auf Ebene der Mitral- und Körnerzellen im olfaktorischen Bulb reproduzierbare Reaktionen bereits bei 1 nMol gefunden. Dies erstaunte vorerst, kam eine Reaktion auf vorgeschalteter Ebene, also den Rezeptoren, doch erst bei höheren Konzentrationen ab 200 nMol vor (Gutermann 2006). In dem Zusammenhang klärte sich auch die Frage nach der Mindestkonzentration, die, wenn auch längst nicht bei jedem Versuch darstellbar, so aber doch bei einigen Versuchen sicher reproduzierbare reizkorrelierte Reaktionen bei 1 nMol auszulösen vermochte.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse wurden im Ergebnisteil dargestellt und werden, wie auch die verwendete Calcium-Imaging-Technik, im Folgenden diskutiert.

So lang die Geschichte der Forschung im Bereich der Geruchswahrnehmung ist, so vielfältig sind auch die Methoden, sie zu entschlüsseln. Die spezielle Präparation ist besonders für die hier untersuchten Fragenstellungen geeignet, da der Verbund von signalerfassenden Rezeptorzellen und den hier untersuchten Mitral- und Körnerzellen im Bulbus olfactorius voll - und die entsprechenden physiologischen Vorgänge nahezu uneingeschränkt - erhalten blieben. Durch diese quasi optimale Präparation wurde eine horizontale Ebene erstellt, die mittel Mikroskop bestens zu erfassen war. Hier zeigt sich auch der Vorteil des untersuchten Tieres, da keine knöchernen Strukturen die Präparation oder die spätere Sicht auf die "Region of interest" erschwert. Vorzüge hat die Calcium-Imaging-Technik auch deswegen, weil sie die Möglichkeiten verbindet, neben der räumlichen Kodierung auch einzelne Zellen und deren individuellen Antwortreaktionen zu bewerten.

Ein Nachteil der Methode besteht darin, dass in der geschaffenen horizontalen Ebene nur die Zellen der oberen Schichten beobachtet werden können, während Zellverbände darunter nicht erfaßt werden. In früheren Untersuchungen wurden auch einzelne Zellen aus dem Zellverband gelöst und untersucht, was aber Nachteile mit

sich bringt. Eine solche Einzelzelluntersuchung, bei der mittels enzymatischer Trennung Zellen separiert wurden, zeigte sich für Rezeptorzellen am Hummer "Panulirus argus" (Anderson und Ache 1985) und für Stäbchenzellen der Retina vom Frosch "Rana catesbeiana", die mit Papain enzymatisch getrennt wurden (Shen et al. 1995), als schädigend. Weiter ist die Zeit, in der die Zellen vital sind und untersucht werden können, im Zellverband deutlich länger, was für Untersuchungen mit mehreren Odoranzien bzw. Konzentrationen von entscheidendem Vorteil ist (Manzini et al. 2002a und Manzini et al. 2002b). Bleiben die Zellen nicht in ihrem natürlichen Zellverband, kommt es weiter bei Rezeptorzellen des *Xenopus laevis* zu morphologischen Veränderungen, nämlich zur Verkürzung von Dendriten und zum Verlust der längsovalen Form (Schild, 1989).

Es zeigte sich sogar, dass Antworten auf Odoranzien, in Abhängigkeit von der Präparationsmethode, anders ausfallen können. So fanden sich bei vorangegangenen Arbeiten mit isolierten olfaktorischen Rezeptorzellen vom *Xenopus laevis* unter Verwendung der Patch-Clamp-Technik exzitatorische und inhibitorische Antworten in ungefähr gleicher Menge (Vogler und Schild 1999). Vergleichend dazu fanden sich, ebenfalls unter Verwendung der Patch-Clamp-Technik, bei einer Schnittpräparation nur exzitatorische Zellreaktionen (Manzini et al. 2002a). Verantwortlich hierfür könnte zum Beispiel die Unterbindung von Zellinteraktionen bei der Präparation der Einzelzellen sein.

Im Vergleich zur Patch-Clamp-Technik besteht bei der in dieser Arbeit vorgenommenen Schnittpräparation der Vorteil, nicht nur eine einzelne Zelle zu untersuchen, sondern einen ganzen Zellverband beurteilen zu können.

Zusammenfassend zeigte sich die verwendete Präparation gemeinsam mit der Calcium-Imaging-Technik und in Verbindung mit einer CCD-Kamera als sehr gut geeignete Methode, um die vorangegangenen Fragestellungen zu klären.

4.1 Diskussion der Dosis-Wirkungskurven

In Abschnitt 3.1.1 werden die Ergebnisse für die Aminosäure Arginin dargestellt. Trotz Schwankungen innerhalb der Versuchsreihen konnte eine unverkennbare Zunahme der Anzahl an reagierenden Zellen, hier Mitral- und Körnerzellen, korrelierend mit dem Anstieg der applizierten Konzentration festgestellt werden.

Eine Korrelation von Konzentration und Reaktion fand sich auch auf ganz anderer Ebene. Bei der Honigbiene und der Motte fand sich mit steigender Geruchsstoffkonzentration eine Zunahme von rekrutierten Glomeruli (Sachse und Galizia, 2003; Carlsson und Hansson, 2003). Außerdem zeigt sich, dass schon eine Minimalkonzentration von 1 nMol ausreicht, um eine Reaktion auslösen zu können, worauf später noch eingegangen wird.

Bei niedrigen Konzentrationen räumlich gut differenzierbare Zellreaktionen waren bei hohen Konzentrationen teilweise optisch in einander übergegangen. Bei höheren Konzentrationen reagierten nicht nur mehr Zellen, sondern die Reaktion an sich schien auch stärker ausgeprägt, und es gab zum Teil eine Änderungen des Reaktionsmusters. Man konnte auch feststellen, dass bei der Applikation in niedriger Konzentration innerhalb eines Versuchs ein bestimmtes Muster an Zellen reagiert und bei zunehmender Konzentration zusätzlich weitere Zellen rekrutiert werden.

Im Bulbus olfactorius des Zebrafisches konnte auf Ebene der Glomeruli Ähnliches gezeigt werden. Mit ansteigender Konzentration der applizierten Aminosäure erhöhte sich auch die Anzahl der rekrutierten Glomeruli, wobei das Aktivitätsmuster – zumindest in den niedrigeren Konzentrationen - in seinen Grundzügen gleich blieb. Das weist darauf hin, dass Konzentrationen in Glomeruli dadurch kodiert werden, dass sie Informationen von olfaktorischen Rezeptoren mit verschiedenen Affinitäten zu dem dargebotenen Reiz erhalten (Friedrich und Korsching 1997).

Eine weitere Parallele von *Xenopus laevis* und dem Zebrafisch betrifft die niedrigste Konzentration, mit der es noch möglich war, eine reizkorrelierte Reaktion auszulösen. Hier zeigte sich beim Zebrafisch ein Grenzwert auf Ebene der Glomeruli zwischen 10 und 100 nMol für Methionin (Friedrich und Korsching 1997, Michel und Lubomudrov 1995). Wie in Abschnitt 3.1.1 dargestellt, konnten beim *Xenopus laevis*

Reaktionen von Mitral- und Körnerzellen bereits bei 1 nMol mit Arginin nachgewiesen werden, wenn auch nur bei einer relativ geringen Anzahl von Zellen. Dies ließ sich allerdings auch mit Methionin und Histidin wiederholen.

Bei Versuchen auf Ebene der Rezeptorzellen bei *Xenopus laevis* aus unserem Labor (Gutermann 2006) zeigte sich eine Reaktionsschwelle bei besonders sensiblen Zellen von ca 200 nMol mit Arginin, also ebenfalls sehr niedrige Konzentrationen. Trotzdem stellt sich die Frage, warum ein nachgeschaltetes System sensibler reagieren kann als die Rezeptorzelle. Dies könnte verschiedene Ursachen haben, technische wie morphologische. Zum einen ist der Versuchsaufbau nicht 100%ig gleich. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Fura-II AM als Kalziumindikatorfarbstoff gearbeitet, während die Dissertation von Gutermann Fluo 4 verwendet. Weiter ist das optische System zur Aufnahme unterschiedlich. Gutermann nutzt ein Laserscan-Mikroskop, während für diese Arbeit eine CCD-Kamera und Licht der Wellenlänge 380 nm zur Anregung der Gewebeschnitte zur Anwendung kamen. Eine weitere - morphologische - Erklärung könnte die Konvergenz der vielen Rezeptorzellen auf deutlich weniger Glomeruli sein. Einzelne, auf Ebene der Rezeptorzellen so nicht erfaßte Aktionspotentiale laufen über die Axone zu den Glomeruli und lösen dort dann summiert eine stärkere Reaktion aus, die wiederum im Calcium-Imaging darstellbar wird.

Forschungen an Goldfischen mittels Elektro-Olfaktogramm zeigten Schwellenkonzentrationen von ebenfalls 1 nMol (für Katecholamine) an Rezeptorzellen (Hubbard et al. 2003). Bei Aminosäuren wurden tendenziell etwas höhere Schwellen bei vergleichbaren Studien gefunden, so zum Beispiel im Bereich von 100 nMol bis 1 µMol bei Fischen (Hara 1994, Sorensen und Caprio 1998).

Untersuchungen bezüglich der Dosis-Wirkungskurve beim Salamander (*Ambystoma tigrinum*, östlicher Tigersalamander) ergaben, dass mit zunehmender Geruchsstoffkonzentration größere Gehirnareale reagierten. Das Grundmuster der Gehirnareale blieb aber über den Konzentrationsverlauf prinzipiell gleich, es "dehnte sich nur aus" (Cinelli et al. 1995). Bei höheren Konzentrationen sank die Latenz und stieg die Stärke und Dauer der Zellantworten im Bulbus olfactorius. Am deutlichsten

war dies bei vergleichenden Messungen im niedrigen Konzentrationsbereich. Es zeigte sich, dass mit steigender Stimulusintensität nicht nur ein Größenzuwachs der Regionen zu verzeichnen war, die bereits bei niedrigen Konzentrationen reagiert hatten, sondern auch andere, zusätzliche Regionen auf den Reiz ansprachen.

Bei der höchsten gestesteten Konzentration war die depolarisierende Antwort an manchen Stellen verstärkt, an anderen aber auch vermindert (Cinelli et al. 1995), was auf einen Sättigungseffekt schließen lässt.

Beim Zebrafisch wie auch beim Salamander zeigte sich, dass niedrigere Konzentrationen eine genauere Differenzierung der Aktivitätsmuster erlaubten. So wurde die Beurteilung von aminosäurenspezifischen Mustern weniger durch Überlagerungen beeinträchtigt als bei höheren Konzentrationen (Cinelli et al. 1995, Friedrich und Korsching 1997). Weiter schien es möglich, dass eine bestimmte Aminosäure bei einer definierten Konzentration das gleiche Aktivitätsmuster von Glomeruli erzeugt wie eine andere Aminosäure bei einer anderen Konzentration. Dem gegenüber zeigten entsprechende Test beim Zebrafisch, dass jedes Aktivitätsmuster einzigartig ist. Dies lässt vermuten, dass Gerüche über ein breites Spektrum von Konzentrationen individuell kodiert werden und, dass glomeruläre Aktivitätsmuster zum einen den individuellen Stimulus (z.B. eine Aminosäure), zum anderen die applizierte Konzentration widerspiegeln könnten (Friedrich und Korsching 1997).

Gleiches fand auch eine weitere Arbeitsgruppe heraus: Das Geruchssystem nutzt zum Kodieren von Geruchsstoffen unterschiedliche Rezeptorkombinationen, die auf den dargebotenen Reiz reagieren. So entstehen individuelle Muster, die einem Geruchsstoff zugeordnet werden können. Gleiches scheint auch für die Konzentration zu gelten, da bei einer leichten Änderung der Konzentration dieser "spezifische Code" eines Geruchsstoffes ebenfalls einer Veränderung unterworfen ist (Malnic et al. 1999). Die Änderung des spezifischen Musters kann so stark sein, dass quasi ein ganz neues Muster, wie bei einem völlig anderen Geruchsstoff, entsteht. Die Muster sind also nicht über das ganze Konzentrationsspektrum gleichbleibend (Johnson und Leon 2000; Carlsson und Hansson 2003).

Dies korreliert mit der menschlichen Wahrnehmung von Mercaptanen. Man weiß zum Beispiel aus der Wein- und Kaffeeindustrie, dass diese in hohen Konzentrationen unangenehm nach faulen Eiern riechen, in niedrigen Konzentrationen erinnern sie aber an schwarze Johannisbeere oder auch Röstkaffee, was darauf schließen lässt, dass andere Gehirnareale angesprochen werden (Amann 2002).

4.2 Diskussion der Reaktionsintensität

Der zweite Teil der Arbeit untersuchte die Intensität einzelner Zellreaktionen. Mit den beschriebenen Methoden zur Datenerhebung und Auswertung war es möglich, einzelne Zellen zu untersuchen und den Verlauf der intrazellulären Kalziumtransienten zu verfolgen.

In Abschnitt 3.1.2 zeigen die Tabelle 5 und der Graph 5 den Verlauf von 10 Zellen. Die hier gezeigte Veränderung des df/f (%) nimmt im Wesentlichen bei höherer Odoranzienkonzentration zu, es wird also ein stärkerer Kalziumanstieg, respektive eine stärkere Reaktion, ausgelöst. Das ist erklärlich, da mit höheren Odoranzienkonzentrationen mehr und auch andere Rezeptoren angesprochen werden, was sich wiederum in einer veränderten Reaktion auf Ebene der Glomeruli zeigt (Malnic et al. 1999). Letztlich finden sich diese Steigerungen auch in den Zielregionen, den hier untersuchten Zellen wieder. Zeitlich längere und bezüglich der Amplitude stärkere Reaktionen bei zunehmender Konzentration der applizierten Geruchsstoffe konnten auch in ähnlichen Untersuchung auf Ebene von Glomeruli der Honigbiene gefunden werden (Sachse und Galizia 2003).

Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse sind diese aber nicht ganz homogen. Mit Zunahme der applizierten Konzentration war die Veränderung der Reaktionsintensität nicht linear. Es fanden sich drei unterschiedliche Intensitätsverläufe:

1) Es gibt Versuche, bei denen die Reaktionsintensität df/f (%) trotz zunehmender Konzentration vorerst gleich blieb und erst bei der höchsten applizierten Konzentration (100 μMol) sprunghaft ansteigt, wie zum Beispiel bei Versuch 5 (V5).

2) Weiter fanden sich Verläufe, bei denen die Reaktionsintensität mit der zunehmenden Konzentration, die appliziert wurde, kontinuierlich steigt, wie zum Beispiel Versuch 4 (V4).

3) Mehrfach zeigten sich aber auch die höchsten Werte für die Reaktionsintensität bei submaximaler Konzentration, also nicht bei 100 μMol , sondern bereits bei 1 μMol oder 10 μMol , wie zum Beispiel bei Versuch 2, 3 und 10 (V2, V3, V10). Hier scheint es, als wäre bereits vorab eine Sättigung eingetreten. Dies ist grundsätzlich vorstellbar, ist das df/f (%) doch ein Abbild der intrazellulären Kalziumkonzentration und damit nicht unendlich steigerbar.

Vier Beispiele von einzelnen Zellen zeigen in 3.1.3 (Zellen A, B, C und D) den genauen Verlauf der Reaktionsintensität df/f (%). Deutlich zu erkennen ist, dass die Zellen reizkorreliert mit einem Kalziumanstieg reagieren, die Zellen untereinander aber sehr unterschiedlich antworten. Zelle B und C ähneln sich am meisten, sie zeigen bei den niedrigsten Konzentration noch keine, ab 1 μMol dann aber eine deutliche Reaktion, die im Verlauf an Intensität zunimmt und bei der Maximalkonzentration zusätzlich noch ihren Charakter verändert.

Für die Aminosäuren Methionin, Arginin und Lysin konnte bei *Xenopus laevis* auf Ebene der Rezeptorzellen ebenfalls ein Anstieg der Reaktionsintensität mit zunehmender Konzentration nachgewiesen werden. Mehrfach ergab sich dort auch, wie oben beschrieben, eine Abschwächung der Fluoreszenzintensität bei den höchsten applizierten Odoranzienkonzentrationen, so dass eine Art Sättigungen anzunehmen ist (Gutermann 2006).

Die hier diskutierten Ergebnisse gelten zwar primär für die Aminosäure Arginin, wie aber auch schon weiter oben beschrieben, lassen sich die gleichen Resultate bei den Aminosäuren Histidin und Methionin reproduzieren. Bei der Diskussion der Reaktionsintensität sind die Ergebnisse, verglichen mit der Diskussion der Dosis-Wirkungskurve, allerdings mit Einschränkungen zu betrachten, da die Fallzahlen für die Aminosäuren Histidin und Methionin gering sind und die Ergebnisse nur als Ausblick gelten können.

4.3 Schlussfolgerungen

Wie in vielen vorangegangenen Untersuchungen bestätigte sich auch in der vorliegenden Arbeit, dass Aminosäuren für die Kaulquappe *Xenopus laevis* einen adäquaten Reiz darstellen. Die benutzten Aminosäuren, Arginin allen voran, zeigten sich besonders geeignet, da auf den applizierten Reiz viele Zellen reproduzierbar reagierten und entsprechend untersucht werden konnten. Es wurde deutlich, dass mit zunehmender Konzentration bei einer größeren Anzahl von Zellen eine Reaktion hervorgerufen werden kann - den dargestellten Dosis-Wirkungskurven entsprechend. Dies stimmt mit unseren Erwartungen überein, da ähnliche Ergebnisse bei *Xenopus laevis* auf Ebene der Rezeptorzellen schon nachgewiesen wurden (Gutermann 2006). Weitere Studien bei Fischen und Salamandern zeigten ebenfalls eine konzentrationskorrelierte Zunahme der Zellen mit Reaktionen (Cinelli et al. 1995; Friedrich und Korsching 1997).

Beim Betrachten der einzelnen Zelle war das Augenmerk auf die jeweilige Reaktionsintensität df/f (%) gelegt. Auch hier kam es bei Erhöhung der Konzentration zu einer Zunahme der individuellen Reaktionsstärke in der Form, dass die Amplitude des Kalziumtransienten größer war und die Reaktion zeitlich länger anhielt. Auch diese Ergebnisse passen zu anderen Resultaten bezüglich der Reaktionsintensität und -dauer, so zum Beispiel zu Forschungen an Glomeruli der Honigbiene (Sachse und Galizia 2003).

Die vorliegenden Ergebnisse zu der Schwellenkonzentration sind interessant und müssen genauer betrachtet werden. Untersuchungen in unserem Labor an *Xenopus laevis* auf Ebene der Rezeptorzellen zeigten als Schwellenkonzentrationen für Aminosäuren (hier Arginin, Methionin und Lysin) Konzentrationen, die größtenteils zwischen 10 μMol und 100 μMol , minimal bei 200 nMol liegen (Gutermann 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden aber eindeutig und reproduzierbar auch Reaktionen schon bei 1 nMol gemessen. Dies lässt sich nur dadurch erklären, dass sich durch die Konvergenz, also das Zusammenlaufen vieler Rezeptorzellen auf deutlich weniger nachgeschaltete Zellen bzw. Glomeruli, ausreichend viele Aktionspotentiale summieren. Waren diese einzeln bei Gutermann noch nicht darstellbar, kommen sie zusammen auf nachgeschalteter Ebene jetzt zur Darstellung.

Grundsätzlich ist bekannt, dass die wasserlöslichen Aminosäuren potente Reize darstellen und sehr niedrige Konzentrationen zur Reizauslösung nötig sind. Im Vergleich zu Aminosäuren reagierten Goldfische zum Beispiel noch empfindlicher auf Katecholamine, hier waren zur Wahrnehmung von Reizauslösung bei Rezeptorzellen im Elektro-Olfaktogramm Konzentrationen von nur 1 nMol erforderlich (Hubbard et al. 2003), was den vorliegenden Ergebnissen bei Arginin entspricht. Grundsätzlich scheint die Schwellenkonzentration bei *Xenopus laevis* ähnlich der bei anderen Wasserlebewesen zu sein. Die Schwellenkonzentration für Aminosäuren bei Fischen fand sich ebenfalls zwischen 100 nMol und 1µMol (Hara 1994, Sorensen und Caprio 1998). Zu beachten ist beim Vergleich dieser Daten, dass es sich zum Teil nicht um die gleichen Tierarten handelt, außerdem werden unterschiedliche Techniken zur Datenerhebung genutzt. Dies ist besonders im Vergleich zu der Dissertation von Gutermann zu beachten, da hier ein anderer Farbstoff und ein anderes Aufnahmesystem benutzt wird.

Wenn auch die diskutierten Ergebnisse reproduzierbar und mit bereits vorliegenden Untersuchungen vergleichbar sind, so darf man Schwachstellen und mögliche Fehlerquellen nicht außer Acht lassen. Kritisch zu betrachten ist sicherlich, dass die Qualität der Präparate über die Untersuchungszeit nachlässt. Dies liegt zum einen in Folge einer Tierpräparation in der Natur der Sache (Schädigung durch Präparation, mangelnde Versorgung der Zellen, etc.), zum anderen aber auch an den teils hohen Intensitäten der optischen Anregung der Zellen. Auch ist die optische Auflösung durch die verwendete CCD-Kamera im Vergleich zum Laser-Scan-Mikroskop verhältnismäßig gering. Bereits minimale Bewegungen der Gewebeschnitte lassen außerdem die aufgezeichneten Bilder unscharf werden. Zuletzt darf nicht vergessen werden, dass es sich um Auswertungen und Berechnungen handelt, die ausschließlich auf optischen Informationen beruhen. Anders als bei der Patch-Clamp-Technik konnten Reaktionen einzelner Zellen nie durch tatsächlich direkt abgeleitete Ströme gemessen und nachgewiesen werden.

4.4 Ausblick

Die Ergebnisse bestätigen Aminosäuren als adäquaten Reiz für *Xenopus laevis*. Da selbst die niedrigste getestete Konzentration (1 nMol) noch reproduzierbar Reaktionen auszulösen vermochte, wären weitere Tests in diesem Konzentrationsbereich und noch unter diesem Wert von Interesse. Gerade mit der Frage nach Konzentrationsschwellen wäre in zukünftigen Forschungen an der Larve des afrikanischen Krallenfrosches auch die Testung weiterer natürlicher Reize, wie Katecholamine, von Interesse. Ist die Sensibilität auf bestimmte Reizstoffe eventuell korrelierend mit ihrer Relevanz für das Überleben? Ist damit zu erklären, warum Katecholamine eine niedrigere Konzentrationsschwelle zu haben scheinen, als es Aminosäuren haben, da diese Stress und Gefahr signalisieren und demzufolge prioritär sind?

Wie in vielen vorangegangenen Untersuchungen zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit, dass der Geruchssinn ein sehr komplexes und noch längst nicht vollständig verstandenes System ist. In den vergangenen Jahren sind zwar große Fortschritte auf dem Gebiet der Geruchsforschung gemacht worden, durch die verschiedenen Ebenen der komplexen Informationsbearbeitung im Gehirn und der zahlreichen unterschiedlichen technischen Möglichkeiten sie zu untersuchen, bleiben aber noch unzählige Fragen offen.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Kodierung von Konzentrationen von Geruchsstoffen bei der Kaulquappe des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Mittels Calcium-Imaging wurden Zellen, die mit dem Farbstoff Fura-II-AM inkubiert und verschiedenen Aminosäuren ausgesetzt wurden, untersucht. Vorrangig wurde Arginin verwendet, daneben aber auch Methionin und Histidin. Von diesen Aminosäuren ist bekannt, dass sie einen adäquaten Reiz für *Xenopus laevis* darstellen. Appliziert wurden diese Geruchsstoffe in Konzentrationen von 1 nMol bis 100 µMol in 10er-Potenzschritten. Weiter war bei den Analysen entscheidend, dass der natürliche Zellverband im Präparat erhalten blieb und so eventuelle Interaktionen benachbarter Zellen weitgehend unbeeinflusst blieben. Bei den durchgeführten Untersuchungen konnte Folgendes gezeigt werden:

- 1) Bei Betrachtung von ganzen Zellverbänden während der Geruchsstoffapplikation zeigte sich, dass mit Zunahme der Konzentration der Aminosäure die Anzahl der im Zellverband reagierenden Zellen ebenfalls zunahm.
- 2) Bei Betrachtung einzelner Zellen konnte der jeweilige Reaktionsverlauf in Form eines intrazellulären Kalziumanstiegs begutachtet werden. Dies gelang indirekt über den kalziumbindenden Farbstoff Fura-II-AM. Hier ergab sich eine Abnahme der Reaktionsintensität df/f (%) parallel zur Zunahme der Aminosäurenkonzentration.
- 3) Es konnten mit 1nMol reproduzierbare Reaktionen ausgelöst werden. Eventuell liegt die Schwellenkonzentration, die zur Auslösung eines Aktionspotentials gerade noch ausreicht, sogar noch niedriger. Im Vergleich zu anderen Arbeiten bei *Xenopus laevis* wie auch zu anderen Spezies ist dies extrem niedrig, was an der Konvergenz vorgeschalteter Rezeptorzellen, aber auch anderen Zellinteraktionen liegen könnte.

- 4) Die beschriebenen Ergebnisse zeigten sich für alle drei untersuchten Aminosäuren.

6. Literaturverzeichnis

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

Amann R: Der Badische Winzer. Badischer Landwirtschafts-Verlag, Freiburg 2002

Anderson PA, Ache BW (1985): Voltage- and current-clamp recordings of the receptor potential in olfactory receptor cells in situ. *Brain Res*, 338, 273-280

Aroniadou-Anderjaska V, Ennis M, Shipley MT (1997): Glomerular synaptic responses to olfactory nerve input in rat olfactory bulb slices. *Neuroscience*, 79, 425-434

Bardoni R, Magherini PC, Belluzi O (1996): Excitatory synapses in the glomerular triad of frog olfactory bulb in vitro. *Neuroreport*, 7, 1851-1855

Berkowicz DA, Trombley PQ, Shepherd GM (1994): Evidence for glutamate as the olfactory receptor cell neurotransmitter. *J Neurophysiol*, 71, 2557-2561

Buck LB: Smell and Taste: The Chemical Sense. In: *Principles of Neural Science*, Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, 4. ed., McGraw-Hill New York 2000, 625-645

Carlsson MA, Hansson BS (2003): Dose-response characteristics of glomerular activity in the moth antennal lobe. *Chem Senses*, 28(4), 269-78

Cinelli AR, Neff SR, Kauer JS (1995): Salamander olfactory bulb neuronal activity observed by video rate, voltage-sensitive dye imaging. I. Characterization of the recording system. *J Neurophysiol*, 73(5), 2017-32

Czesnik D, Nezlin L, Rabba J, Müller B, Schild D (2001): Noradrenergic modulation of calcium currents and synaptic transmission in the olfactory bulb of *Xenopus laevis* tadpoles. *Eur J Neurosci*, 13(6), 1093-100

Czesnik D, Rössler W, Kirchner F, Gennerich A, Schild D (2003): Neuronal representation of odourants in the olfactory bulb of *Xenopus laevis* tadpoles. *Eur J Neurosci*, 17, 113-118

Ennis M, Zimmer LA, Shipley MT (1996): Olfactory nerve stimulation activates rat mitral cells via NMDA and non-NMDA receptors in vitro. *Neuroreport*, 7, 989-992

Firestein S, Shepherd GM, Werblin FS (1990): Time course of the membrane current underlying sensory transduction in salamander olfactory receptor neurons. *J Physiol Lond*, 430, 135-58

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

Franceschini V, Giorgi PP, Ciani F (1992): Primary olfactory terminations in the forebrain of amphibia: a comparative study with soybean agglutinin. *J Hirnforsch*, 33(6), 627-35

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(5), 737-52

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

Getchell TV, Margolis FL, Getchell ML (1984): Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction. *Prog Neurobiol*, 23, 317-345

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

Golgi, C (1875): I recenti studi sull'istologia del sistema nervoso centrale, *Rivista critica. Rivista Sperimentale di Freniatria e Medicina Legale*, 1, 121-130 (first part); 60-274 (second part).

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

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260(6), 3440-50

Gutermann B: Charakterisierung spezifischer Duftstoffantworten olfaktorischer Rezeptorneurone von *Xenopus-laevis*-Larven. Med. Diss. Göttingen 2006

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

Hara TJ (1994): Olfaction and gustation in fish: an overview. *Acta Physiol Scand*, 152, 207-217

Hemmer H, Köhler S (1975): Rhythmische Änderungen der Reaktion auf verschiedene olfaktorische Reize beim Krallenfrosch (*Xenopus laevis*). *Experientia*, 31(4), 449-450

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

Hubbard PC, Barata EN, Canario AV (2003): Olfactory sensitivity to catecholamines and their metabolites in the goldfish. *Chem Senses*, 28, 207-218

Iida A, Kashiwayanagi M (1999): Responses of *Xenopus laevis* water nose to water-soluble and volatile odorants. *J Gen Physiol*, 114, 85-92

Isaacson JS, Strowbridge BW (1998): Olfactory reciprocal synapses: Dendritic signalling in the CNS. *Neuron*, 20, 749-761

Johnson BA, Leon M (2000): Modular representations of odorants in the glomerular layer of the rat olfactory bulb and the effects of stimulus concentration. *J Comp Neurol*, 422(4), 496-509

Kang J, Caprio J (1995): In vivo responses of single olfactory receptor neurons in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Neurophysiol*, 73, 172-177

Kang J, Caprio J (1997): In vivo responses of single olfactory receptor neurons of channel catfish to binary mixtures of amino acids. *J Neurophysiol*, 77, 1-8

Keller A, Yagodin S, Aroniadou-Anderjaska V, Zimmer LA, Ennis M, Sheppard NF, Shipley MT (1998): Functional organization of rat olfactory bulb glomeruli revealed by optical imaging. *J Neurosci*, 18, 2602-2612

Key B, Giorgi PP (1986): Selective binding of soybean agglutinin to the olfactory system of *Xenopus*. *Neuroscience*, 18(2), 507-15

Kosaka K, Toida K, Margolis FL, Kosaka T (1997): Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. II. Prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals. *Neuroscience*, 76, 775-786

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

Kruzhalov NB (1995): The submerged electro-olfactogram of the clawed toad *Xenopus laevis*. *Zh Evol Biokhim Fiziol*, 31(5-6), 685-9

Lazard D, Zupko K, Poria Y, Nef P, Lazarovits J, Horn S, Khen M, Lancet D (1991): Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase. *Nature*, 349, 790-793

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 (6788), 792-6

Lin BJ, Chen TW, Schild D (2007): Cell type-specific relationships between spiking and [Ca²⁺]_i in neurons of the *Xenopus* tadpole olfactory bulb. *J Physiol*, 582(Pt 1), 163-75

Lledo PM, Gheusi G, Vincent JD (2005): Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev*, 85(1), 281-317

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

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

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

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

Meyer DL, Jadhao AG, Bhargava S, Kicliter E (1996): Bulbar representation of the 'water-nose' during *Xenopus* ontogeny. *Neurosci Lett*, 220(2), 109-12

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

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

Michel WC, Lubomudrov LM (1995): Specificity and sensitivity of the olfactory organ of the zebrafish, *Danio rerio*. *J Comp Physiol A*, 177(2), 191-9

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

Nieuwkoop PD, Faber J: Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). North Holland Company, Amsterdam 1994

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

Okada Y, Teeter JH, Restrepo D (1994): Inositol 1,4,5-trisphosphate-gated conductance in isolated rat olfactory neurons. *J Neurophysiol*, 71, 595-602

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

Pelosi P, Baldaccini NE, Pisanelli AM (1982): Identification of a specific olfactory receptor for 2-isobutyl-3-methoxypyrazine. *Biochem J*, 201(1), 245-8

Pevsner J, Trifiletti RR, Strittmatter SM, Snyder SH (1985): Isolation and characterization of an olfactory receptor protein for odorant pyrazines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82(9), 3050-4

Pevsner J, Hou V, Snowman AM, Snyder SH (1990): Odorant-binding protein. Characterization of ligand binding. *J Biol Chem*, 265(11), 6118-25

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

Ramón y Cajal P (1890): Origen y terminacion de las fibras nerviosas olfatorias. *Gac sanitaria de Barcelona*

Sachse S, Galizia CG (2003): The coding of odour-intensity in the honeybee antennal lobe: local computation optimizes odour representation. *Eur J Neurosci*, 18(8), 2119-32

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

Schild D (1989): Whole-cell currents in olfactory receptor cells of *Xenopus laevis*. *Exp Brain Res*, 78, 223-232

Schild D (1993): Ciliary cation conductances in olfactory receptor cells of the clawed toad *Xenopus laevis*. *EXS*, 66, 165-71

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

Schild D, Lischka FW, Restrepo D (1995): InsP₃ causes an increase in apical [Ca²⁺]_i by activating two distinct current components in vertebrate olfactory receptor cells. *J Neurophysiol*, 73, 862-866

Schmidt RF: Neuro- und Sinnesphysiologie. 2. Auflage; Springer Verlag, Berlin 1995

Shen J, Watanabe SI, Kaneko A (1995): Cell dissociation with papain reduces the density of cGMP-activated channels of retinal rod. *Jpn J Physiol*, 45(1), 151-164

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

Sorensen PW, Caprio J: Chemoreception. In: *The Physiology of Fishes*, 2. Auflage; CRC Press, New York 1998, 375-405

Tinsley RC, Loumont C, Kobel HR: Geographical Distribution and Ecology. In: *The Biology of Xenopus*, Clarendon Press Oxford, England 1996, 35-59

Trombley PQ, Shepherd GM (1993): Synaptic transmission and modulation in the olfactory bulb. *Curr Opin Neurobiol*, 3, 540-547

Trombley PQ, Westbrook GL (1990): Excitatory synaptic transmission in cultures of rat olfactory bulb. *J Neurophysiol*, 64, 598-606

Trombley PQ, Westbrook GL (1992): L-AP4 inhibits calcium currents and synaptic transmission via a G-protein-coupled glutamate receptor. *J Neurosci*, 12, 2043-2050

Vogler C, Schild D (1999): Inhibitory and excitatory responses of olfactory receptor neurons of xenopus laevis tadpoles to stimulation with amino acids. *J Exp Biol*, 202 (Pt 8), 997-1003

Vogt RG, Riddiford LM (1981): Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293, 161-163

Zhainazarov AB, Ache BW (1995): Odor-induced currents in Xenopus olfactory receptor cells measured with perforated-patch recording. *J Neurophysiol* , 74, 479-483

Lebenslauf

Ich, Johannes Röttger, wurde am 04.01.1980 als drittes Kind des Kardiologen Dr. med. Ulrich Wilhelm Herbert Röttger und der Diplom-Sozialpädagogin Anna Auguste Gabriele Röttger, geb. Harnischfeger, in Hildesheim geboren. Von 1986 bis 1990 besuchte ich die örtliche Grundschule im Ort Itzum, im Anschluss folgte von 1990 bis 1992 der Besuch der Orientierungsstufe Ost in Hildesheim und von 1992 bis 1999 das Scharnhorst-Gymnasium, wo ich das Abitur ablegte. Im damaligen Städtischen Krankenhaus in Hildesheim absolvierte ich meinen Zivildienst im OP-Bereich und begann im Herbst 2000 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen. Dieses schloss ich Ende 2006 erfolgreich ab und arbeite seit Januar 2007 im Klinikum Hildesheim in der Inneren Medizin.