

---

**Die Ebenen der neuronalen Informationsverarbeitung im *Bulbus olfactorius*  
des Zebrahärlings (*Danio rerio*):  
Aktivitätskartierung strukturabhängiger Repräsentation von Geruchsstoffen  
und Identifizierung molekulargenetischer Marker der einzelnen Verarbeitungsebenen.**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Stefan H. Fuss**

aus Düsseldorf

Köln 2002

---

---

Berichtersteller: Prof. Dr. Sigrun Korsching  
Prof. Dr. Ansgar Büschges

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Mai 2002

---

---

## DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Dr. Sigrun Korsching für die Möglichkeit, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen. Kritische Diskussion, ein starkes Maß an Vertrauen und die Möglichkeit zu kreativer Freiheit haben entscheidend zum Gelingen der Projekte beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Ansgar Büschges danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein ganz besonderes und nicht zu ermessendes „*Tesekürler ederim !*“ gehört **Arzu Çelik**, mit der ich nicht nur in Teilen dieser Arbeit ein Stück weit gegangen bin. Ihre Präsenz, ihr Mut, ihre fachliche und freundschaftliche Hilfe, vor allem aber ihre Liebe, haben mir immer den Weg nach vorne gezeigt. Ich hoffe, dass sie dort auch weiterhin auf mich warten wird.

Dass der Labortag nicht nur Alltag war, ist das große Verdienst von: **Mama Berger, Verena**, dem **jungen Herrn**, seiner **Holzhaftigkeit**, der lasziven **Betty, Cortez, Martin, Katja Bandemer** und **Li Jun**. "Danke", für viele gemeinsame fröhliche und traurige Stunden! **Andreas Rummrich** bin ich dabei für den initialen Anstoß, das *zOMP* mit in die Bemühungen einzubeziehen, besonders verbunden. Auch für seine fachliche Kompetenz und uneingeschränkte Hilfsbereitschaft möchte ich mich bedanken.

Aus der Ferne, aber immer präsent, haben mich bedauert, betreut, ermahnt, gefordert, geprüft, mit mir diskutiert und mir zugehört: Dr. **Anke Friedrich**, Dr. **Thomas Renne**, Dr. **Andrea Krauss** und Prof. Dr. **Thomas Teyke**.

Bei Dr. **Peter Messler** und **Hans Breuer** von der Firma T.I.L.L. Photonics möchte ich mich recht herzlich für die nicht alltägliche Betreuung, den offenen Dialog und einige Dialogboxen bedanken.

Ohne sie wäre alles viel schwieriger gewesen und daher ein tiefempfundenes Wort des Dankes an die Menschen, die konstante Größen darstellen: Herrn **Mehmet Saltürk**, Frau **Christina Sterner**, Herrn **Fritz Schmitz**, Herrn **Günther Jansen**, Frau **Marie-Luise Wirtz**, Frau **Kadriye Canpolat**, Frau **Rita Lange** und ganz besonders Herrn Dr. **Matthias Cramer**.

**Susanne** und **Aline** möchte ich nicht nur für ihre Hilfe und Unterstützung danken, sondern vor allem für ihre Gesellschaft, die anregenden Gespräche und die vergnügliche Zeit neben der Arbeit.

Nicht zuletzt aber am Schluss, möchte ich meiner **Mutter** voller Dankbarkeit eine Antwort auf die Frage: "Wie lang' musste denn noch?" im Folgenden nicht schuldig bleiben ...

---



INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. ZUSAMMENFASSUNGEN</b>	<b>1</b>
1 ABSTRACT.	1
2 ZUSAMMENFASSUNG.	2
<b>II. EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1 GERUCH UND GERUCHSSTOFFE.	5
1.1 Der olfaktorische Reiz – Reiz der Olfaktion.	5
1.2 Geruchsstoffe – physikochemische Vielfalt ohne einheitliche Dimension.	6
1.3 Der Geruchsraum - eine multidimensionale Repräsentation I.	8
2 DAS GERUCHSSYSTEM.	11
2.1 Die funktionelle Architektur des Geruchssystems der Säuger – eine Synopsis.	11
2.2 Die epitheliobulbäre Projektion – Reorganisation und Repräsentationswechsel.	13
2.2.1 Reorganisation.	13
2.2.2 Axonale Zielfindung.	14
2.2.3 Repräsentationswechsel.	16
2.3 Olfaktorische Glomeruli – Basismodule der Verarbeitung von Geruchsinformation.	17
2.4 Neuronale Aktivität im <i>Bulbus olfactorius</i> – eine multidimensionale Repräsentation II.	18
2.5 Besonderheiten und Unterschiede des olfaktorischen Systems der Fische.	19
2.5.1 Geruchssinn und Verhalten.	20
2.5.2 Struktureller Aufbau und Unterschiede.	21
2.5.3 Physiologie der Geruchsantworten.	22
2.5.4 Der Zebraärbübling als olfaktorisches Modellsystem.	24
3 OPTISCHE MESSVERFAHREN.	26
3.1 Methodisches.	26
3.2 Optische Aktivitätsmessungen in der Olfaktionsforschung.	27
3.3 Molekulargenetische Calciumindikatoren.	28
4 UNTERSUCHTE FRAGESTELLUNGEN.	30
<b>III. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>31</b>
1 VERSUCHSTIERE UND HALTUNG.	31
2 INSTRUMENTE.	31
2.1 Präparation.	31
2.2 Optische Messungen.	32
2.3 Physiologie.	32
2.4 Molekularbiologie.	33
2.5 Software und Computer.	34
2.6 Bildaufnahme und Dokumentation.	34
3 METHODEN.	36
3.1 Physiologische Arbeitsmethoden.	36
3.1.1 Anterograde Färbung olfaktorischer Rezeptorzellen mit Aktivitätsfarbstoffen.	36
3.1.2 Präparation des olfaktorischen Systems zur Messung neuronaler Aktivität.	36
3.1.3 Messung neuronaler Aktivität im <i>Bulbus olfactorius</i> .	37
3.1.4 Stimulation mit Geruchsstoffen.	38
3.1.5 Bildtransformationen.	39
<i>Bildjustage.</i>	39
<i>Subtraktionsanalyse.</i>	39
<i>Bestimmung der Antwortfläche.</i>	39
<i>Bestimmung des Differenzindexes.</i>	41
3.1.6 Vorversuche zur Darstellung der Mitralzellen.	42
3.1.7 Retrograde Färbungen des olfaktorischen Bulbus mit Aktivitätsfarbstoffen.	43
3.1.8 Versuch einer Messung neuronaler Aktivität der Mitralzellen.	44
3.1.9 Messung neuronaler Aktivität der olfaktorischen Rezeptorneurone transient transgener und wildtypischer Embryonen.	45

<b>3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....</b>	<b>47</b>
3.2.1 Chemikalien und kommerzielle Verfahren.....	47
3.2.2 Lösungen.....	47
3.2.3 Enzyme.....	47
3.2.4 Nukleinsäuren.....	48
<i>Primer.</i>	48
<i>Vektoren und Plasmide.</i>	50
<i>DNA-Längenstandards.</i>	51
3.2.5 Bakterien.....	51
3.2.6 Antikörper.....	52
3.2.7 Bibliotheken und Bibliotheksfilter.....	52
<i>cDNA-Bibliotheken.</i>	52
<i>Genomische Bibliotheken.</i>	52
3.2.8 Molekularbiologische Standardverfahren.....	53
<i>Verdau mit Restriktionsendonukleasen.</i>	53
<i>Gelelektrophorese.</i>	53
<i>Gelextraktion.</i>	53
<i>Polymerase Kettenreaktion (PCR).</i>	54
<i>Ligation.</i>	54
<i>Dephosphorierung.</i>	54
<i>Aufreinigung von DNA.</i>	54
<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.</i>	55
<i>DNA Sequenzierung.</i>	55
<i>Anlegen von Dauerkulturen.</i>	55
3.2.9 Präparation elektrokompeter Bakterien und Transformation.....	56
3.2.10 Präparation hitzekompeter Bakterien und Transformation.....	56
3.2.11 Identifizierung positiver Transformanden.....	56
3.2.12 Präparative Methoden zur Gewinnung von DNA.....	57
<i>Genomische DNA.</i>	57
<i>Plasmid DNA aus Bakterien.</i>	58
<i>Cosmid- und PAC-DNA aus Bakterien.</i>	58
3.2.13 Gewinnung von cDNA aus Gewebe Gesamt-RNA.....	59
3.2.14 Southern Blot Analyse.....	59
3.2.15 DNA Membrantransfer – Gel Blotting.....	60
3.2.16 Ausplattieren von cDNA-Bibliotheken.....	60
<i>cDNA-Bibliothek des olfaktorische Epithels.</i>	60
<i>cDNA-Bibliothek aus Hirngewebe.</i>	61
<i>cDNA-Bibliothek aus Gewebe des Bulbus olfactorius.</i>	62
<i>Identifizierung positiver Bakterienklone - Homologieklonierung.</i>	62
3.2.17 Herstellung von DIG-dUTP markierten DNA Sonden.....	63
3.2.18 Herstellung von DIG-UTP markierten RNA Sonden.....	63
3.2.19 Filterhybridisierungen und chemolumineszente Detektion.....	63
3.2.20 Herstellung promotorloser Expressionsvektoren.....	64
<i>pACSF-Y – der Basisexpressionsvektor.</i>	64
<i>pACSF-dsRed.</i>	65
<i>pACSF-<math>\tau</math>-Y.</i>	65
<i>pACSF-C.</i>	66
3.2.21 Herstellung eines Konstruktes für die rekombinante Expression des OMP in Bakterien.....	66
3.2.22 Herstellung der Konstrukte für die Expression calciumsensitiver Messproben.....	67
<i>prOMP<sub>1,3</sub>-CaM.</i>	67
<i>prOMP<sub>1,3</sub>-CaMG.</i>	67
<i>prOMP<sub>1,3</sub>-I.</i>	67
<i>prOMP<sub>1,3</sub>-F.</i>	67
<i>prOMP<sub>1,3</sub>-R.</i>	67
3.2.23 Sequenzvergleiche.....	68
<b>3.3 Histologische Arbeitsmethoden.....</b>	<b>68</b>
3.3.1 Immunhistochemie an Zebraabärbling Embryonen.....	68
3.3.2 <i>In situ</i> -Hybridisierung an Totalpräparaten des Zebraabärbling Gehirns.....	69
3.3.3 Vibratomschnitte.....	69
<b>3.4 Herstellung transient transgener Fische.....</b>	<b>70</b>
<b>3.5 Bildaufnahme und Dokumentation.....</b>	<b>70</b>

<b>IV. ERGEBNISSE</b>	<b>73</b>
<b>1 AKTIVITÄTSKARTIERUNG STRUKTURABHÄNGIGER REPRÄSENTATION VON GERUCHSSTOFFEN</b>	<b>73</b>
<b>1.1 Generelle Eigenschaften geruchstoffstimulierter Antwortmuster</b>	<b>74</b>
<b>1.2 Die L-<math>\alpha</math>-Aminosäurekonfiguration als bindendes Strukturmotiv</b>	<b>76</b>
1.2.1 Die Bedeutung der $\alpha$ -Aminogruppe	77
1.2.2 Die Bedeutung der $\alpha$ -Carboxylgruppe	79
1.2.3 Der Einfluss der Stereokonformation	80
1.2.4 Inaktive Aminosäurederivate erregen auch außerhalb der Aminosäureregion keine Signale	80
1.2.5 Inaktive Derivate können Aminosäuresignale beeinflussen	82
<b>1.3 Die Bedeutung der Seitenkette</b>	<b>83</b>
1.3.1 Veränderungen der Kettenlänge	83
<i>Quantitative Analyse der Musterunterschiede – Unterscheidungsvermögen I.</i>	86
<i>Konzentrationsunterschiede kompensieren Kettenlängenunterschiede nicht – Unterscheidungsvermögen II.</i>	88
1.3.2 Der Einfluss funktioneller Gruppen innerhalb der Seitenkette	92
<i>Eine terminale Aminogruppe in der Molekülstruktur rekrutiert neue Geruchsrezeptoren und verhindert die Bindung an Rezeptoren, die durch neutrale Aminosäuren erregbar sind.</i>	92
<i>Eine <math>\beta</math>-Hydroxylgruppe in der Molekülstruktur verhindert die Bindung an einige der Geruchsrezeptoren, die durch neutrale Aminosäuren erregt werden können.</i>	95
<i>Eine Mindestabschätzung des Aminosäure-Geruchsrezeptorrepertoires.</i>	96
1.3.3 Glomeruli mit einem ähnlichen Ligandenspektrum sind räumlich benachbart	97
1.3.4 Die Kreuzadaptationen der Antwortmuster verhalten sich subtraktiv	97
<b>1.4 Die Topographie der Geruchsstoffrepräsentation verschiedener Arten ist konserviert</b>	<b>101</b>
<b>1.5 Darstellung der Mitralzellen und Versuch einer Messung</b>	<b>102</b>
<b>2 IDENTIFIZIERUNG MOLEKULARGENETISCHER MARKER DER UNTERSCHIEDLICHEN VERARBEITUNGSEBENEN</b>	<b>107</b>
<b>2.1 Riechsinneszellen: das olfaktorische Marker Protein (OMP)</b>	<b>108</b>
2.1.1 Klonierung des Gens für das olfaktorische Marker Protein ( <i>zOMP</i> )	108
2.1.2 Das <i>OMP</i> Gen des Zebrafischlings – <i>zOMP</i>	111
2.1.3 Die Expression des <i>zOMP</i> Gens im Zebrafischling	112
2.1.4 Dynamik der Entwicklung <i>zOMP</i> -positiver Riechsinneszellen während der Embryogenese	114
2.1.5 Genomische Organisation des <i>zOMP</i> Genlokus – Southern Analyse	115
<i>Größe der <i>zOMP</i> Genfamilie.</i>	115
<i>Charakterisierung des <i>zOMP</i> Genlokus.</i>	115
2.1.6 Analyse der <i>zOMP</i> 5'-flankierenden Sequenz auf regulatorische Elemente	116
2.1.7 Analyse der <i>zOMP</i> 5'-flankierenden Sequenz auf ihre regulatorische Wirksamkeit	118
2.1.8 Variationen des Expressionsvektors	120
2.1.9 Promotoranalyse	121
2.1.10 Rekombinante Expression des <i>zOMP</i> in Bakterien	123
<b>2.2 Körnerzellen: das <i>dlx2</i> Gen</b>	<b>125</b>
2.2.1 Klonierung der 5'-flankierenden Sequenz des <i>dlx2</i> Gens	126
2.2.2 Promotoranalyse	127
2.2.3 Klonierung der <i>dlx1-dlx2</i> Intergenregion	129
<b>2.3 Mitralzellen: das <i>ztr1</i> Gen</b>	<b>130</b>
2.3.1 Klonierung des <i>ztr1</i> Gens des Zebrafischlings	130
2.3.2 Das <i>ztr1</i> Gen des Zebrafischlings	131
2.3.3 Die Größe der <i>ztr</i> -Genfamilie des Zebrafischlings – Southern Analyse	133
2.3.4 Expression des <i>ztr1</i> Gens im Gehirn adulter Zebrafischlinge	135
2.3.5 Isolierung und Identifizierung genomischer <i>ztr1</i> -Klone	136
<b>2.4 Zusammenfassende Beurteilung</b>	<b>137</b>
<b>3. DIE ANWENDUNG MOLEKULARGENETISCHER CALCIUMINDIKATOREN IM OLFAKTORISCHEN SYSTEM DES ZEBRAFISCHLINGS</b>	<b>139</b>
<b>3.1 Geruchsstoffinduzierte Aktivität in den Riechsinneszellen und im olfaktorischen Bulbus embryonaler Zebrafischlinge</b>	<b>139</b>
<b>3.2 <i>CaMeleon</i></b>	<b>142</b>
<b>3.3 <i>CaMgaroo</i></b>	<b>142</b>
<b>3.4 <i>pericam</i></b>	<b>143</b>
3.4.1 <i>flash-pericam</i>	143
3.4.2 <i>invers-pericam</i>	144
<b>3.5 Zusammenfassende Beurteilung der molekulargenetischen Calciumindikatoren</b>	<b>145</b>

<b>V. DISKUSSION</b>	<b>147</b>
<b>1</b> <b>PHYSIOLOGIE DER GERUCHSANTWORTEN.</b>	<b>148</b>
<b>1.1 Glomeruli und Rezeptoren – die Interpretierbarkeit glomerulärer Signale.</b>	<b>148</b>
<b>1.2 Aminosäure-Geruchsrezeptoren werden nur durch Aminosäuren erregt.</b>	<b>150</b>
<b>1.3 Die Struktur der Seitenkette bestimmt das Repertoire der aktivierten Rezeptoren.</b>	<b>152</b>
1.3.1 Kettenlänge und Antwortstärke.	152
1.3.2 Kettenlängenkodierung im olfaktorischen Bulbus anderer Modellsysteme.	154
1.3.3 Funktionelle Gruppen und selektive Bindung.	155
1.3.4 Das Repertoire der Aminosäure-Geruchsrezeptoren des Zebrafischlings.	156
<b>1.4 Kombinatorische Kodierung durch aktive Glomeruli.</b>	<b>158</b>
<b>1.5 Die laterale Kette und der akzessorische olfaktorische Bulbus.</b>	<b>159</b>
<b>1.6 Unterscheidungsvermögen und Konzentrationskodierung.</b>	<b>161</b>
1.6.1 Unterscheidungsvermögen.	161
1.6.2 Konzentrationskodierung – ein Problem.	163
<b>1.7 Geruchsverarbeitung nach den Riechsinneszellen.</b>	<b>165</b>
1.7.1 Kontrastverstärkung.	165
1.7.2 Zeitliche Synchronisation.	166
<b>1.8 Geruchsverarbeitung nach dem olfaktorischen Bulbus.</b>	<b>168</b>
<b>2</b> <b>SEPARATION DES NEURONALEN NETZWERKES IM <i>BULBUS OLFACTORIUS</i></b>	
<b>DURCH MOLEKULARGENETISCHE MARKER.</b>	<b>169</b>
<b>2.1 Riechsinneszellen und <i>zOMP</i>.</b>	<b>169</b>
<b>2.2 Körnerzellen und <i>dlx2</i>.</b>	<b>173</b>
<b>2.3 Mitralzellen und <i>ztr1</i>.</b>	<b>173</b>
<b>2.4 Zusammenfassende Beurteilung.</b>	<b>175</b>
<b>3</b> <b>DIE ANWENDBARKEIT PROTEINBASIERTER CALCIUMSENSOREN</b>	
<b>IM GERUCHSSYSTEM DES ZEBRAFISCHLINGS.</b>	<b>176</b>
<b>3.1 Calcium und Riechsinneszellen.</b>	<b>177</b>
<b>3.2 Methodische Erwägungen.</b>	<b>178</b>
<b>4</b> <b>SCHLUSSBEMERKUNGEN.</b>	<b>179</b>
<b>VI. LITERATUR</b>	<b>181</b>
<b>VII. ANHANG</b>	<b>197</b>
<b>1</b> <b>SEQUENZVERGLEICHE.</b>	<b>197</b>
<b>1.1 <i>OMP</i>.</b>	<b>197</b>
<b>1.2 <i>ztr1</i>.</b>	<b>198</b>
<b>2</b> <b>DER BASISEXPRESSIONSVEKTOR: pACSF-Y.</b>	<b>204</b>
<b>2.1 Übersicht.</b>	<b>204</b>
<b>2.1 Nukleotidsequenz.</b>	<b>205</b>
<b>3</b> <b>ERKLÄRUNGEN.</b>	<b>207</b>
<b>4</b> <b>TEILPUBLIKATIONEN.</b>	<b>207</b>
<b>5</b> <b>LEBENS LAUF.</b>	<b>208</b>

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 – Das olfaktorische Problem, eine Lösung und ein Vergleich mit anderen Sinnessystemen... 7

Abb. 2 – Die Architektur der synaptische Verschaltung im *Bulbus olfactorius* der Säuger. .... 12

Abb. 3 – Messung neuronaler Aktivität im olfaktorischen System adulter und embryonaler Zebrabärblinge. .... 37

Abb. 4 – Bestimmung des Schwellenkriteriums zur Quantifizierung der Antwortfläche. .... 40

Abb. 5 – Berechnung des Differenz-indexes DI zur Quantifizierung von Musterunterschieden. .... 41

Abb. 6 – Generelle Eigenschaften geruchsstoffstimulierter Aktivitätsmuster im *Bulbus olfactorius*. 75

Abb. 7 – Die Bedeutung der L- $\alpha$ -Aminosäurekonfiguration als aktivierendes Strukturmerkmal. .... 78

Abb. 8 – Alaninol erregt auch außerhalb der Aminosäureregion keine Signale. .... 81

Abb. 9 – Inaktive Derivate können die Signale der Aminosäuren beeinflussen. .... 82

Abb. 10– Der Einfluss der Kettenlänge auf die Aktivitätsmuster neutraler Aminosäuren ..... 84

Abb. 11– Die Antwortfläche als Funktion der Kettenlänge neutraler Aminosäuren. .... 85

Abb. 12– Quantitative Analyse der Musterunterschiede neutraler Aminosäuren. .... 87

Abb. 13– Konzentrationsabhängigkeit der Geruchsantworten dreier aliphatischer Aminosäuren. .... 88

Abb. 14– Konzentrationsunterschiede kompensieren Kettenlängenunterschiede nicht ..... 90

Abb. 15– Der Einfluss funktioneller Gruppen innerhalb der Seitenkette der Aminosäuren. .... 93

Abb. 16– Variabilität der Musterunterschiede basischer und neutraler Aminosäuren. .... 94

Abb. 17– Gedankenexperiment zur Innervation der Glomeruli des Zebrabärblings. .... 98

Abb. 18– Adaptation und Kreuzadaptation der Antwortmuster basischer und neutraler Aminosäuren. .... 100

Abb. 19– Vorversuche zur optischen Ableitung am Bulbus des Goldfisches. .... 101

Abb. 20– Versuche zur Darstellung der Mitralzellen. .... 103

Abb. 21– Versuch einer Messung der Mitralzellaktivität am Bulbus des Goldfisches. .... 104

Abb. 22– *zOMP* Homologieklonierung. .... 109

Abb. 23– Genomische, cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz des *zOMP* Gens ..... 110

Abb. 24– Strukturvergleich des Zebrabärbling OMP (*zOMP*) mit den bekannten OMP Genen. .... 111

Abb. 25– Expression des *zOMP* Gens im adulten und embryonalen Zebrabärbling. .... 113

Abb. 26– Verlauf der Entwicklung *zOMP*-positiver Zellen während der Embryogenese. .... 114

Abb. 27– Southern Analyse und Genomische Organisation des *zOMP* Genlokus. .... 116

Abb. 28– *In vivo* Reporter-genexpression in transient transgenen Zebrabärbling-embryonen. .... 119

Abb. 29– *zOMP* Promotoranalyse. .... 122

Abb. 30– Vergleich der endogenen *zOMP*-Expressivität mit der Expressivität des *prOMP*<sub>1,3</sub>-Y .... 123

Abb. 31– Rekombinante Expression des *zOMP* Proteins in Bakterien. .... 124

Abb. 32– Organisation der *dlx2* cDNA und der 5'-flankierenden genomischen DNA Sequenz. .... 125

Abb. 33– "Southern Analyse" des subklonierten genomischen 11 kb Fragmentes des *dlx 2* Gens. . 126

Abb. 34– *dlx2*-Promotoranalyse. .... 128

Abb. 35– Sequenzvergleich des *zOmp1* mit weiteren Mitgliedern der T-box Genfamilie. .... 132

Abb. 36– Die Größe der *zOmp*-Genfamilie - Southern Analyse. .... 133

Abb. 37– Mögliche Intron-Exon Spliceepunkte des *zOmp1* Gens. .... 134

Abb. 38– *zOmp1* Expression im Gehirn adulter Zebrabärblinge – *In situ* Hybridisierung. .... 135

Abb. 39– Southern Analyse der genomischen PAC-Klone. .... 137

Abb. 40– Calciummessungen im embryonalen Riechepithel und olfaktorischen Bulbus ..... 141

Abb. 41– Calciummessungen an Riechsinneszellen embryonaler Zebrabärblinge - *flash-pericam*. 145

Abb. 42– Modell der Bindung von Aminosäuren an die Geruchsrezeptoren des Zebrabärblings. ... 157

Abb. 43– Der promotorlose Expressionsvektor *pACSF-Y*. .... 204

Tabelle 1 – Übersicht über die verwendeten Aminosäure-Geruchsstoffe und ihre Strukturderivate. 76

Tabelle 2 – Komplexität des Aminosäure-Geruchsrezeptorrepertoires des Zebrabärblings ..... 96



## I. ZUSAMMENFASSUNGEN

### 1 ABSTRACT.

The zebrafish olfactory bulb is chemotopically organised. Behavioral relevant odorant classes elicit activity in glomeruli of defined bulbar subregions with no considerable overlap. Amino acid stimuli exclusively generate patterns of activity within the ventrolateral olfactory bulb. Within that region different amino acids evoke overlapping but unique activity patterns. Olfactory sensory neurons expressing the same odorant receptor converge onto single glomeruli in the olfactory bulb. Thus, glomerular activity reflects the activation of particular odorant receptors. Optical imaging of neuronal activity within the olfactory bulb can visualize at once the contributions by all the different olfactory receptors responsive to a particular odorant. This technique was used to derive estimates about the structural requirements and minimal number of different zebrafish olfactory receptors that respond to a series of naturally occurring amino acids and some structurally related compounds.

The  $\alpha$ -amino as well as the  $\alpha$ -carboxyl group are required for binding of amino acids to the cognate olfactory receptors. In order to activate amino acid responsive receptors the L-configuration of amino acids is also a strict prerequisite. Structural differences of amino acids are encoded in different activity patterns within the olfactory bulb. Long chain stimuli activate patterns of growing intensity and complexity. With increasing chain length successively new active glomeruli, and therefore new olfactory receptors, are recruited into the response. Only few glomeruli are preferentially tuned to short chain stimuli. Response patterns strongly depend on concentration. Pattern differences are pronounced for intermediate stimulus concentrations,  $10^{-4}$  and  $10^{-5}$  M. At these concentrations activity patterns strongly depend on chain length. At low concentrations stimuli approach noise level. At high concentrations signals evoked by stimuli of different chain length tend to become more similar to each other. At  $10^{-4}$  M each amino acid is uniquely represented by a particular response pattern. Differences in concentrations do not compensate for differences in the odorant structure.

Substitutions of the side chain of amino acids are also represented by different response patterns. The introduction of a terminal amino group both recruits additional receptors and prevents binding to some of the receptors that were responsive to the unsubstituted analog. In contrast, the introduction of a  $\beta$ -hydroxyl group excludes the odorants from some of the receptors that are capable of binding the unsubstituted analog. Cross-adaptation studies independently confirm the differential activation of amino acid responsive odorant receptors. Moreover they suggest that glomeruli of the lateral chain of the zebrafish olfactory bulb are innervated by a homogeneous population of olfactory sensory neurons.

In an attempt to genetically dissect the neural network of the olfactory bulb three different genes, the *OMP*, *dlx2* and *tbr1* genes were chosen because of their cell-type specific expression in the olfactory sensory neurons, the granule cells and the mitral cells, respectively. It was aimed to isolate flanking genomic sequences that regulate the selective expression of these genes in specific cell types of the olfactory bulb that can drive reporter

gene expression in the different levels of olfactory information processing of the olfactory bulb.

The zebrafish homolog of the *OMP* gene is – like its mammalian counterpart – specifically expressed in mature olfactory sensory neurons. The 5'-flanking region of the zebrafish *OMP* gene selectively and efficiently drives reporter gene expression in olfactory receptor neurons. The calcium-sensitive variant of the yellow fluorescent protein "invers-pericam" was when expressed under control of the *zOMP* promoter successfully used to monitor odorant responses *in vivo*. For the granule cells, so far no specific expression system could be established. Up to 10 kb of genomic sequence upstream of the *dlx2* gene were not sufficient to mimic the endogenous *dlx2* expression pattern in transient transgenic animals. However, some specificity for neurons could be obtained with this construct. The zebrafish homologue of the *tbr1* gene was cloned as a marker for mitral cells. *In situ* hybridization verified its selective expression in a defined population of bulbar neurons. The distribution of *ztbr1* positive cells in the olfactory bulb, their relatively large size, and their close apposition to the glomeruli makes them most likely to be the mitral cells in zebrafish.

## **2 ZUSAMMENFASSUNG.**

Der olfaktorische Bulbus des Zebrafährblings besitzt eine chemotope Organisation: unterschiedliche verhaltensrelevante Geruchsstoffklassen erregen glomeruläre Aktivität in nichtüberlappenden Bulbusarealen. Aminosäuren erregen Geruchsaktivität ausschließlich in den Glomeruli der ventrolateralen Bulbusregion. Innerhalb dieser Repräsentationsdomäne generieren unterschiedliche Aminosäuren überlappende, jedoch für einen gegebenen Stimulus eindeutige, räumliche Aktivitätsmuster. Rezeptorgleiche Riechsinneszellen konvergieren im Bulbus auf gemeinsame Zielglomeruli. In der Aktivität individueller Glomeruli kann daher die Aktivierung bestimmter Geruchsrezeptoren erkannt werden. Durch optische Ableitungen der gesamten Oberflächenaktivität des Bulbus kann der Beitrag des vollständigen Geruchsrezeptorrepertoires erfasst werden, das für eine bestimmte Aminosäure empfindlich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um offene Fragen der Bindung von Aminosäuren an die Geruchsrezeptoren, des Umfangs des Aminosäure-Geruchsrezeptorrepertoires und der Grundlagen der Kodierung von Aminosäuren im olfaktorischen System des Zebrafährblings zu untersuchen.

Für eine aktivierende Bindung an die Geruchsrezeptoren stellen sowohl die  $\alpha$ -Aminogruppe als auch die  $\alpha$ -Carboxylgruppe der Aminosäuren notwendige Struktur motive dar. Die Geruchsrezeptoren sind stereospezifisch, da nur Aminosäuren in der L-Konfiguration zu Geruchsaktivität in der Aminosäureregion des olfaktorischen Bulbus führen. Strukturelle Unterschiede in der Seitenkette der Aminosäuren werden durch Unterschiede in den Aktivitätsmustern repräsentiert. Mit wachsender Kettenlänge der Aminosäuren werden zunehmend intensivere und umfangreichere Aktivitätsmuster stimuliert. Durch länger-kettige Stimuli werden sukzessive aktive Glomeruli – und daher neue Geruchsrezeptoren – in das Aktivitätsmuster rekrutiert. Nur wenige Glomeruli werden präferentiell durch kurz-kettige Stimuli erregt. Die Erregung der Glomeruli ist von der Konzentration der Stimuli abhängig.

Die Eindeutigkeit eines Repräsentationsmusters ist bei mittleren Konzentrationen ( $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M) besonders ausgeprägt. Mit steigender Stimuluskonzentration werden die Antwortmuster unterschiedlich langer Stimuli einander ähnlicher. Bei  $10^{-4}$  M wird jedoch jede Aminosäure eindeutig repräsentiert und Kettenlängenunterschiede werden nicht vollständig durch Konzentrationsunterschiede kompensiert.

Substitutionsgruppen innerhalb der Seitenkette werden ebenfalls durch eindeutige Aktivitätsmuster repräsentiert. Eine terminale Aminogruppe rekrutiert neue Rezeptoren und verhindert die Bindung an einige der Rezeptoren, die durch neutrale Aminosäuren erregt werden können. Eine  $\beta$ -Hydroxylgruppe verhindert die Bindung der polaren Stimuli an eine Subpopulation der für neutrale Aminosäuren empfindlichen Geruchsrezeptoren. Kreuzadaptation bestätigen die differentielle Aktivierung der Aminosäurerezeptoren und legen die Innervation der Glomeruli durch eine homogene Population von Riechsinneszellen nahe.

In einem weitergehenden experimentellen Ansatz wurde versucht, das neuronale Netzwerk des olfaktorischen Bulbus durch Hilfe zelltypspezifisch exprimierter Gene in seine zellulären Komponenten zu zerlegen. Dabei wurde das *OMP*, das *dlx2* und das *tbr1* Gen aufgrund ihrer jeweiligen selektiven Expression in den Riechsinnes-, Körner- und Mitralzellen ausgewählt. Für jedes dieser Gene sollten regulatorische genomische Sequenzen identifiziert werden, welche die Expression dieser Gene regulieren und für eine gezielte Expression von Strukturgenen in den unterschiedlichen Ebenen der olfaktorischen Informationsverarbeitung genutzt werden können.

Das *zOMP* Gen des Zebrafischs wird – wie die homologen Gene der Säugetiere – spezifisch in den Riechsinneszellen exprimiert. Ein kurzer genomischer Sequenzabschnitt der 5'-flankierenden Region des *zOMP* Gens treibt die Expression von Reporter genen selektiv und effizient in den Riechsinneszellen. Durch Expression des proteinbasierten Calciumindikators *invers-pericam* unter *zOMP*-Promotorkontrolle, konnten Geruchsantworten in den Riechsinneszellen transient transgener Embryonen *in vivo* aufgezeichnet werden. Für die Körnerzellen konnte bisher kein spezifisches Expressionssystem etabliert werden. Bis zu 10 kb der stromaufwärts gelegenen genomischen Sequenz des *dlx2* Gens waren nicht ausreichend, das endogene Expressionsmuster des *dlx2* Gens in transgenen Tieren nachzuahmen. Dennoch konnten mit dem längsten der untersuchten Reporterkonstrukte auch im olfaktorischen Bulbus mit hoher Spezifität Neurone transgen markiert werden. Das *tbr1* Gen des Zebrafischs wurde als Marker für die Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus homologiekloniert. *In situ*-Hybridisierungen bestätigten die exklusive Expression des *ztbr1* Gens in einer definierten Subpopulation der Neurone im olfaktorischen Bulbus. Die Anordnung *ztbr1*-positiver Zellen im Bulbus, ihre relativ großen Durchmesser und ihre Apposition zu den Glomeruli machen es wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Zellen um die Mitralzellen des Zebrafischs handelt.



## II. EINLEITUNG

*„The problem with the term representation is not its ambiguity, since everyone can guess what it means, but the implication that, somehow, the mental image or the neural pattern represent, in mind and in brain, with some degree of fidelity, the object to which the representation refers, as if the structure of the object were replicated in the representation. [...] Moreover, whatever the fidelity may be, neural patterns and the corresponding mental images are as much creations of the brain as they are products of the external reality that prompts their creation. [...] To be sure, just as with the word representation, there is a legitimate notion of pattern, and of correspondence between what is mapped and the map. But the correspondence is not point-to-point, and thus the map need not be faithful. The brain is a creative system. Rather than mirroring the environment around it, as an engineered information-processing device would, each brain constructs maps of that environment using its own parameters and internal design, and thus creates a world unique to the class of brains comparably designed.“*

**A. Damasio**, The feeling of what happens.

### 1 GERUCH UND GERUCHSSTOFFE.

#### 1.1 Der olfaktorische Reiz – Reiz der Olfaktion.

1837 formulierte der Physiologe Johannes Müller das „Gesetz der spezifischen Sinnesenergien“. Darin zeigte er auf, dass die Wahrnehmung einer bestimmten Sinnesmodalität durch das gereizte Sinnessystem und nicht durch die Qualität des Reizes selbst bestimmt wird. So führt die Reizung des optischen Systems, unabhängig von der physikalischen Natur des Stimulus, zu einer visuellen Empfindung. Mechanischer Druck auf den Augapfel ruft Druckphospheme hervor, eine visuelle, keine mechanosensorische Empfindung. Eine zentrale Rolle in seiner Betrachtung erhält daher der „adäquate Reiz“ (Sherrington, 1906). Nur adäquate Reize führen in einem Sinnessystem zu einer sinnvollen Empfindung auf Seiten des „Sensoriums“.

Aus heutiger Sicht mögen Aspekte dieser Überlegungen trivial erscheinen. Dennoch sind grundlegende Fragen zu den molekularen Eigenschaften der adäquaten Reize, welche der Geruchsempfindung zugrundeliegen, weitgehend unbeantwortet. In unserer täglichen Erfahrung sind wir in der Lage, eine immense und qualitative Vielfalt unterschiedlicher Gerüche wahrzunehmen und ähnliche Gerüche voneinander zu unterscheiden. Tatsächlich besitzen keine zwei Duftstoffe einen absolut identischen Geruch (Turin und Yoshii, 2002). Die Zahl der wahrnehmbaren Geruchsstoffe oder der empfundenen Sinneseindrücke scheint nicht durch eine systemische Obergrenze limitiert zu sein (Laurent, 1999). Täglich werden in der Parfüm- und Aromaindustrie synthetische Riechstoffe entwickelt, die zu neuen Geruchsqualitäten führen (Rossiter, 1996). Das wohl populärste Beispiel für einen Duft, der aus synthetischen organischen Komponenten gestaltet wurde, ist das 1921 entwickelte Parfüm „Chanel No 5“. Trotz intensiver empirischer Forschung ist die Voraussage eines Duftes aus

der Molekülstruktur jedoch meist schwierig oder unmöglich (Rossiter, 1996; Turin und Yoshii, 2002). Die Wahrnehmung eines Geruchsstoffes *per se* ist in der Regel nicht von der Erfahrung abhängig (siehe aber Wysocki et al., 1989). Flüchtig aufgenommene Düfte rufen aber häufig komplexe und emotional geprägte Erinnerungen hervor (Herz und Cupchik, 1995). Für den Menschen ist zumindest die bewusste Geruchswahrnehmung ein ästhetischer Sinn und Wohlgeruch eine soziale Anpassung mit vielschichtigen rituellen und kommerziellen Ausprägungen. So ist z.B. der Genuss von Nahrungsmitteln oder das Erlebnis einer Tasse Kaffees neben den Geschmacksempfindungen (süß, sauer, salzig, bitter, umami; Matsunami et al., 2000) überwiegend eine olfaktorische Qualität. Gerade natürliche Aromen bestehen häufig aus komplexen Mischungen flüchtiger Substanzen (Kaffee bis zu 835; Grosch, 1996), die in unterschiedlicher Ausprägung zu der wahrgenommenen Geruchsempfindung beitragen. Durch Mischungen verschiedener Duftstoffe können neuartige Gerüche entstehen, die nicht oder nur geringfügig an die konstituierenden Einzelkomponenten erinnern (Laing und Francis, 1989; Jinks und Laing, 2001). Von den Experten auf dem Gebiet der Geruchsunterscheidung (Parfümeure, Somelliere) wird berichtet, dass sie bis zu 5000 individuelle Geruchsempfindungen voneinander unterscheiden und bewerten können. Über die bewusste Wahrnehmung hinaus, spielen unbewusst aufgenommene Geruchsreize eine bedeutende Rolle im Sozialverhalten von Mensch und Tier. Sie sind an der Steuerung des Reproduktionsverhaltens, der Feind-, Fremd- und Arterkennung (Dulac, 2000), der Kommunikation (Johnston, 1998) und selbst an der Entscheidung darüber, ob wir jemanden sympathisch finden (Wedekind und Furi, 1997), beteiligt.

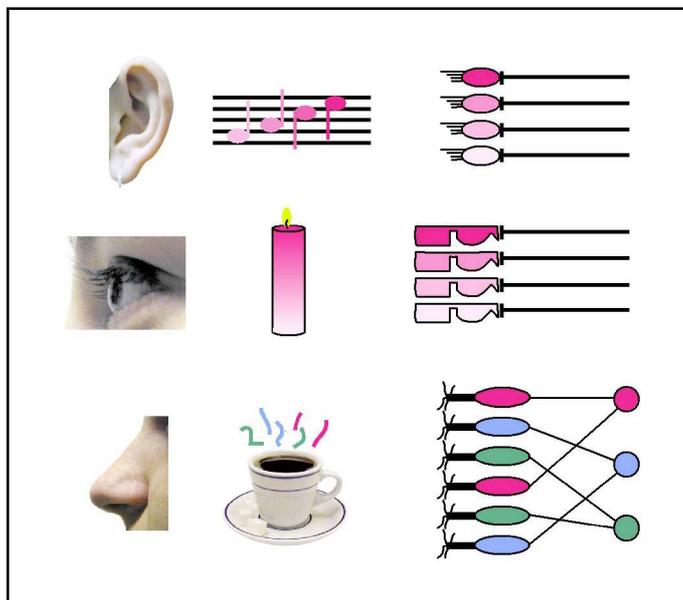
Die hohe Komplexität dieser Phänomene ist eine interessante Herausforderung an die wissenschaftliche Forschung. Prinzipien der Erkennung und Analyse von Geruchsstoffen sowie die Informationsweiterleitung und Gestaltbildung im olfaktorischen System sind bisher nur ansatzweise und für die initialen Prozesse teilverstanden. Das Verständnis der Kodierung, vor allem aber der Dekodierung im Nervensystem übertragener Geruchsinformationen sind Aufgaben der zeitgemäßen Olfaktionsforschung.

### **1.2 Geruchsstoffe – physikochemische Vielfalt ohne einheitliche Dimension.**

Ein grundlegendes Problem unseres Verständnisses der Geruchswahrnehmung beginnt bereits bei den Geruchsstoffen selbst. Riechstoffe sind Stimuli, die durch eine Vielzahl physikochemischer Parameter, wie z.B. ihre Strukturformel, den Dampfdruck, ihre Polarität, die Präsenz funktioneller Gruppen, die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Substanzklasse, ihr NMR- oder Vibrationsspektrum und viele weitere beschrieben werden können. Welche Aspekte der Geruchsstoffe vom olfaktorischen System tatsächlich bewertet werden, ist bisher uneindeutig (Turin, 1996). Für die meisten Sinnessysteme können die adäquaten Stimuli – unserem Naturverständnis entsprechend – durch eine bestimmte physikalische Größe beschrieben werden. So lassen sich Tonhöhen nach Frequenzen, Lichtintensitäten nach Quantenmengen und Spektralfarben nach Wellenlängen entlang einer skalaren Dimension anordnen. Im einfachsten Fall kann die physikalische Kontinuität der Reize auch in dem strukturellen Aufbau eines Sinnessystems wiedererkannt werden (**Abb. 1**). Im Innenohr sind

die Haarsinneszellen der Cochlea so nebeneinander angeordnet, dass ihre Bestfrequenzen ein Kontinuum ergeben, das einen Teil des Frequenzspektrums abdeckt (Hudspeth, 1997). Lichtsinneszellen sind mit Photopigmenten ausgestattet, die jeweils einen Teil des sichtbaren Wellenlängenspektrums überspannen (Nathans, 1999). Räumlich benachbarte Objekte der Außenwelt werden auf benachbarten Bildpunkten der Retina abgebildet. In diesen Beispielen enthält das räumliche Aktivitätsmuster der sensorischen Oberfläche bereits grundlegende Informationen über den Stimulus. Entsprechend bleiben räumliche Beziehungen zwischen den Sinneszellen der sensorischen Oberfläche auch während der Projektion zu höheren Verarbeitungsebenen erhalten. Das neuronale Ordnungs- und/oder Strukturprinzip dieser Systeme spiegelt die physikalische Kontinuität der von ihnen aufgenommenen und verarbeiteten Reize wider.

**Abb. 1 – Das olfaktorische Problem, eine Lösung und ein Vergleich mit anderen Sinnessystemen.**



In einigen Sinnessystemen entspricht der Aufbau der sensorischen Oberfläche einer physikalischen Beschreibung der Reize. Für das auditorische System (oben) können die wahrgenommenen Tonhöhen durch Frequenzen oder Notenwerte beschrieben werden. In der Cochlea bilden die spektralen Empfindlichkeiten benachbarter Haarsinneszellen ein Kontinuum. Im visuellen System (mitte) wird die dreidimensionale Umwelt auf ein zweidimensionales Netzhautbild reduziert. In beiden Fällen werden benachbarte Sinneszellen der sensorischen Oberfläche in benachbarten Projektionsgebieten abgebildet. Olfaktorische Reize (unten) sind divers und können nicht durch eine skalare physikalische Dimension beschrieben werden. Bekannte Düfte können aus einem Gemisch zahlreicher und strukturell diverser Einzelkomponenten bestehen (in diesem Beispiel Kaffeeduft, der aus über 800 flüchtigen Substanzen

besteht). Diesem Problem steht eine Vielzahl, ebenfalls diverser Riechsinneszellen und Geruchsrezeptorproteine gegenüber. In der Riechschleimhaut sind rezeptorgleiche Riechsinneszellen, d.h. Zellen, die die gleiche „spektrale Empfindlichkeit“ besitzen (rot, grün, blau), verstreut angeordnet. Sie konvergieren jedoch auf einen gemeinsamen Zielglomerulus während ihrer Projektion in den olfaktorischen Bulbus. Durch die verstreute Anordnung der sensorischen Neurone wird eine relativ große und gleichmäßig sensitive Oberfläche geschaffen. Die glomeruläre Konvergenz integriert über die detektierten Signale, unabhängig von ihrem Ursprung in der Riechschleimhaut.

Die Diskontinuität und die strukturelle Vielfalt der Geruchsstoffe stellt für das olfaktorische System ein komplexes Erkennungs- und Analyseproblem dar. Ein verwandtes biologisches Problem findet sich im Immunsystem. Der unüberschaubaren Vielfalt potentieller Antigene steht mit den Antikörpern eine entsprechende Vielfalt molekularer Detektoren gegenüber. Durch somatische Rekombination genetischer Elemente werden Bindungseigenschaften modelliert, die diskontinuierlich ‘Epitope’ der präsentierten Antigene erkennen (Tonegawa, 1983). Ein ähnliches Erkennungsprinzip wurde von Gordon Shepherd für das olfaktorische System postuliert, der den Begriff der ‘Odotope’ einführte (Shepherd, 1987). Der Begriff hat die Sichtweise der Geruchsforschung nachhaltig geprägt, doch spricht

aus heutiger Erkenntnis einiges gegen das Odotopkonzept im engeren Sinne. Riechsinneszellen, die durch eine bestimmte Substanzklasse, z.B. geradkettige Aldehyde, erregt werden, zeigen bezüglich der Kettenlänge ein erstaunlich enges Erkennungsspektrum (Zhao et al., 1998). Nach dem Odotopkonzept sollte jedoch das entsprechende „Aldehydotop“ auch unabhängig von der Gesamtgröße des Moleküls erkannt werden. Darüber hinaus können individuelle Riechsinneszellen auch durch strukturell sehr heterogene Geruchsstoffe stimuliert werden (Sato et al., 1994; Duchamp-Viret et al., 1999; Malnic et al., 1999). Die stimulatorische Wirksamkeit einer Substanz lässt sich nicht auf die Präsenz eines isolierten Strukturmerkmals oder einer kleinsten Einheit, wie es das Odotopkonzept fordert, zurück führen. Globale Struktureigenschaften, wie die Abstände zwischen Ladungen im Molekül oder seine Form scheinen von größerer Bedeutung für die Wechselwirkung der Geruchsstoffe mit den Rezeptoren zu sein (Araneda et al., 2000). Im Gegensatz zum Immunsystem, welches nur eine Entscheidung über Fremd und Selbst trifft und letztendlich zu stereotypen Antworten führt, werden die Moleküleigenschaften der Geruchsstoffe jedoch in Qualitäten überführt, die sich in der charakteristischen Empfindung eines bestimmten Geruchs manifestieren. Welche funktionelle Architektur muss ein System aufweisen, das einer solchen Aufgabe gewachsen ist?

### **1.3 Der Geruchsraum - eine multidimensionale Repräsentation I.**

1991 wurde von Linda Buck und Richard Axel die Multigenfamilie der molekularen Geruchsrezeptoren entdeckt (Buck und Axel, 1991). Die Familie umfasst in der Ratte  $\approx 1.000$  Gene, die für heptahelikale, G-Protein-gekoppelte Transmembranrezeptoren kodieren und in den Riechsinneszellen der olfaktorischen Mucosa exprimiert werden. Mittlerweile wurden ähnliche Genfamilien in allen daraufhin untersuchten Spezies (Ratte, Maus, Mensch, Hund, Zebrafisch, Zwergwels, Goldfisch, Medaka, *Drosophila*, *C. elegans*) mit unterschiedlicher Familiengröße identifiziert. Erstaunlicherweise repräsentiert die Genfamilie der Geruchsrezeptoren jeweils die umfangreichste, zusammengehörige Gengruppe des untersuchten Genoms [Mombaerts, 1999,  $\approx 1.000$  für die Ratte (Buck und Axel, 1991), 600 für die Maus (Qasba und Reed, 1998), 400 für Hunde (Parmentier et al., 1992),  $\approx 100$  für Fische (Ngai et al., 1993; Barth et al., 1996; Weth et al., 1996; Korsching et al., 1997),  $\approx 100$  (bis 1.000) für *C. elegans* (Troemel et al., 1995; Bargmann, 1998), 57 für *Drosophila* (Vosshall et al., 2000), 347 für den Menschen (Zozulya et al., 2001)]. Die Identität, zumindest einzelner Vertreter dieser Genfamilien, als Geruchsrezeptorgene wurde mittlerweile mehrfach funktionell bestätigt (Raming et al., 1993; Krautwurst et al., 1998; Zhao et al., 1998; Malnic et al., 1999; Speca et al., 1999; Touhara et al., 1999; Wetzal et al., 1999, 2001; Kajiya et al., 2001).

Es gibt fundierte Hinweise darauf, dass individuelle Riechsinneszellen nur einen oder wenige aller möglichen Geruchsrezeptoren exprimieren (Malnic et al., 1999; Touhara et al., 1999; siehe aber Rawson et al., 1999; Vosshall et al., 2000), also nur einen engen Bereich des „olfaktorischen Spektrums“ abdecken. In der Ratte, deren Rezeptorgenumfang auf  $\approx 1.000$  geschätzt wird, hybridisieren individuelle Rezeptorgensonden entsprechend mit ungefähr

0.1% der insgesamt 50 Millionen Riechsinneszellen (Buck, 1996). Die molekularen Mechanismen der Regulation dieser Spezifität sind bisher nicht verstanden. Durch Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion an individuellen Riechsinneszellen wurde ebenfalls gezeigt, dass jeweils nur eines von zwei Allelen der Geruchsrezeptorgene abgelesen wird (Chess et al., 1994). Ähnlich wie die Immunglobuline sind auch die Geruchsrezeptorgene genomisch geclustert (Glusmann et al., 2000; Hoppe et al., 2000; Dugas und Ngai 2001) und somatische Rekombination wird als ein möglicher Mechanismus der Rezeptorgenwahl während der Differenzierung der Riechsinneszellen diskutiert (Mombaerts, 1999).

Mit den Geruchsrezeptoren steht der Vielfalt der Geruchsstoffe ebenfalls eine entsprechende Vielfalt molekularer Detektoren auf neuronaler Ebene gegenüber. Jedoch ist die Zahl der Geruchsrezeptorgene immer noch weitaus geringer als die Zahl der wahrgenommenen Geruchsstoffe oder möglichen Geruchsempfindungen. Eine Analogie zum Farbsinn bietet sich an. Durch die Beteiligung von lediglich drei spektral unterschiedlich empfindlichen Photopigmenten werden in unserer Wahrnehmung viele verschiedenartige Farbsinneseindrücke hervorgerufen. Ursächlich ist eine neurale Kombination der drei farbelektiven Kanäle, welche die relativen Verhältnisse ihrer Einzelerregungen bewertet (Bartels und Zeki, 2000; siehe aber auch Land, 1983). Es kann ein Farbraum definiert werden, dessen Dimensionen (oder Primärvalenzen) durch die Normspektralwertfunktionen der unterschiedlichen Photorezeptoren aufgespannt werden (CIE Farbsystem, Commission Internationale de l' Eclairage, 1978; zusammengefasst in Richter, 1981).

Für den Geruchssinn könnte ein vergleichbarer Perzeptionsraum durch die Erregungsspektren der Geruchsrezeptoren definiert werden. Durch die Vielzahl der beteiligten Rezeptoren wäre dieser Geruchsraum entsprechend multidimensional. Ein bestimmter Geruchsstoff würde an einem Punkt dieses Geruchsraumes abgebildet und durch den entsprechenden Antwortvektor repräsentiert. Selbst bei der reduktionistischen Annahme, dass jeder Rezeptor in den Riechsinneszellen nur einen von zwei Zuständen vermitteln kann (erregt, nicht erregt), ergäben sich im Hinblick auf den Umfang des Rezeptorrepertoires bereits astronomische Kombinationsmöglichkeiten. Für die 347 Rezeptoren des Menschen würde ein binäres, kombinatorisches System bereits  $2.9 \times 10^{104}$  unterschiedliche Repräsentationen erlauben. Aufgrund der derzeitigen, mangelnden Kenntnis der Erregungsspektren eines genügend umfangreichen Rezeptorrepertoires, sind Einblicke in das Verhältnis von Stimulusstruktur, Rezeptoraktivierung und Geruchsempfindung kaum möglich. Insgesamt sind durch rekombinante Expression, virale Überexpression und Einzelzellaufklärungen mit *post hoc* Identifizierung des Rezeptors bisher nur für 26 Geruchsrezeptoren Liganden identifiziert worden [20 für die Maus (Krautwurst et al., 1998; Malnic et al., 1999; Touhara et al., 1999; Kajiya et al., 2001), 2 für die Ratte (Raming et al., 1993; Zhao et al., 1998), 1 für den Menschen (Wetzel et al., 1999), 1 für den Goldfisch (Specia et al., 1999), 1 für *C. elegans* (Sengupta et al., 1996), 1 für *Drosophila* (Wetzel et al., 2001)]. Diese Ansätze haben trotz ihrer beeindruckenden Ergebnisse zwei gravierende Mängel. Zunächst müssen wirkungsvolle Liganden durch eine Zufallssuche entdeckt werden. Merkwürdigerweise gehören die identifizierten Liganden von bereits 6 der 26 charakterisierten Rezeptoren zu den Aldehyden. Für zwei unterschiedliche Rezeptoren wurde sogar die gleiche, zudem synthetische Substanz (Lyral) als wirkungsvoller Ligand

beschrieben (Raming et al., 1993; Touhara et al., 1999). Effektivere oder physiologisch relevantere Liganden können bei einer Zufallssuche weitgehend unentdeckt bleiben. Bisher liegt nur eine einzige systematische Analyse des Ligandenspektrums eines Geruchsrezeptors vor, welche auch Strukturanaloga untersucht, die durch molekulares Strukturdesign vorhergesagt wurden (Araneda et al., 2001). Zum weiteren scheint es auch praktisch nicht durchführbar zu sein, das gesamte Rezeptorrepertoire eines Organismus mit einer Zufallsmethode zu durchsuchen, um die Primärvalenzen des Geruchsraumes festzulegen.

Die theoretische Betrachtung eines Geruchsraumes erklärt allerdings nicht, wie dieser funktionell im Nervensystem eines Organismus implementiert sein könnte und zur Geruchswahrnehmung verfügbar gemacht wird. Es sei in diesem Zusammenhang noch einmal erwähnt, dass durch Mischungen von Einzelkomponenten neue Geruchsqualitäten entstehen können und dass die Geruchswahrnehmung nicht auf natürlich vorkommende Duftstoffe beschränkt ist. Synthetisch entwickelte Substanzen können ebenfalls wahrgenommen werden und zu neuartigen, bisher unbekanntem Geruchsempfindungen führen. Die Geruchswahrnehmung ist daher ein synthetischer Sinn und es ist bisher nur wenig über das Verhältnis von Stimulusstruktur, der Anzahl und Art durch einen Geruchsstoff aktivierter Rezeptoren und der Psychophysik der Wahrnehmung bekannt.

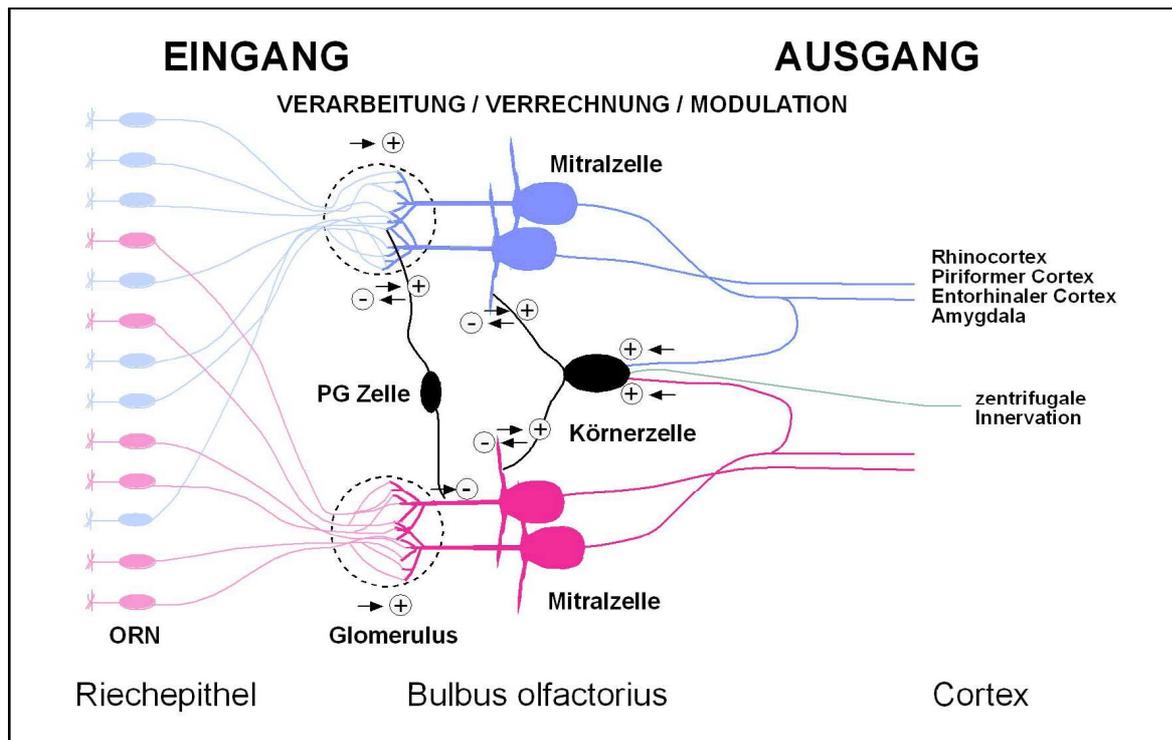
Ein strukturell einfaches, jedoch wirksames Prinzip der Geruchsstofferkennung ist in niederen Organismen, wie dem Nematoden *C. elegans*, verwirklicht. Der Wurm verfügt über insgesamt 32 Chemorezeptorzellen, die in 14 bilateralsymmetrischen Funktionsgruppen zusammengefasst werden. Die Zahl funktioneller Chemorezeptorgene wird jedoch auf etwa 300 geschätzt (Bargmann, 1998). Eine einzelne Chemorezeptorzelle koexprimiert, im Gegensatz zu den Riechsinneszellen der Vertebraten, gleichzeitig viele unterschiedliche Rezeptorgene. Die Verschaltungen im Nervensystem des Wurms sind streng determiniert und die Reizung individueller Chemorezeptorzellen löst stereotype chemotaktische Verhaltensmuster aus [Vermeidung, Attraktion, (Bargmann, 1993)]. Die attraktive oder repulsive Wirkung eines Geruchstoffes wird dadurch bestimmt, in welcher Sinneszelle passende Chemorezeptoren für diesen Geruchsstoff vorkommen. Dieses erstaunliche Phänomen konnte durch zwei Arbeiten direkt gezeigt werden. Eine Punktmutation des Chemorezeptors *odr-10* eliminiert die attraktive Wirkung des Liganden Butandiol (Sengupta et al., 1996). Das Verhalten gegenüber weiteren attraktiven Geruchsstoffen, die durch die gleiche Chemorezeptorzelle detektiert werden, ist jedoch nicht betroffen. Durch ektopische Expression des *odr-10* Rezeptorgens in einer Chemorezeptorzelle, die repulsive Antworten vermittelt, kann die ursprünglich attraktive Wirkung von Butandiol in eine repulsive Wirkung verändert werden (Troemel et al., 1997). Ein solches System, in dem viele Rezeptoren in einer Zelle simultan exprimiert werden, ist jedoch für die Identität einzelner Geruchsstoffe, die von dieser Chemorezeptorzelle detektiert werden, anosmisch. Es kann nicht erkannt werden, welcher spezielle Chemorezeptor einer Zelle aktiviert wurde (siehe aber L'Etoile und Bargmann, 2000; Wes und Bargmann, 2001). Komplexere Geruchssysteme, welche eine qualitative Erkennung der Geruchsstoffe in höherem Maße leisten, besitzen eine andere neuronale Logik und Verschaltung.

## 2 DAS GERUCHSSYSTEM.

### 2.1 Die funktionelle Architektur des Geruchssystems der Säuger – eine Synopsis.

Riechsinneszellen sind primäre Sinneszellen, deren dendritischen Fortsätze den Kontakt mit der Außenwelt vermitteln. Die Dendriten tragen entweder unbewegliche Cilien (Geruchssystem) oder Mikrovilli (vomeronasales System), welche in die Mukusschicht der Riechschleimhaut hineinragen. Die Löslichkeit der oft hydrophoben Geruchsstoffe landlebender Spezies in dem wässrigen Medium der Mukusschicht wird durch geruchsstoffbindende Proteine (*odorant binding protein*; Pelosi, 1996) unterstützt. In der Cilienmembran der olfaktorischen Sinneszellen sind Geruchsrezeptormoleküle und die Proteine der Signaltransduktionskaskade lokalisiert. Die Bindung eines Geruchsstoffes an einen Rezeptor führt zur Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade und nachfolgend zur Depolarisierung und Entladung der Sinneszelle. Alle bekannten Geruchsrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben membrandurchspannenden Domänen (Mombaerts, 1999). Die Transmembrandomänen III, IV und V bilden hypervariable Abschnitte (Buck und Axel, 1991), die an der Ausgestaltung der Bindungstasche der Rezeptormoleküle beteiligt sein könnten (Singer und Sheperd, 1994). Eine riechsinneszellenspezifische  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins,  $G_{olf}$  (Jones und Reed, 1989), aktiviert eine ebenfalls zelltypspezifische Adenylatzyklase Typ III (Bakalyar und Reed, 1990). Durch den Anstieg des intrazellulären cAMP Spiegels werden nukleotidsensitive und calciumpermeable Kanäle der Cilienmembran (*cyclic nucleotide gated channel*, CNG-Kanal) geöffnet. Der resultierende Calciumtransient aktiviert einen calciumabhängigen Chloridkanal (Kurahashi und Yau, 1993, 1994; Frings et al., 2000), der aufgrund des Ionenmilieus in den Riechsinneszellen und der Mukusschicht einen Ausstrom von Chloridionen vermittelt (Reuter et al., 1998). Der depolarisierende Chloridstrom wird als Grundlage des eigentlichen Rezeptorstroms der Riechsinneszellen angesehen. Ein alternativer  $IP_3$ -Signaltransduktionsweg, der selektiv durch bestimmte Geruchsstoffe aktiviert wird, wurde biochemisch in Cilienpräparationen der Ratte ebenfalls nachgewiesen (Boekhoff et al., 1990; diskutiert in Schild und Restrepo, 1998).

Aktionspotentiale werden von unmyelinisierten und unverzweigten Axonen über den *Nervus olfactorius* in den *Bulbus olfactorius* weitergeleitet. Der olfaktorische Bulbus ist eine allocorticale Struktur, dessen Schichtung durch spezialisierte Zelltypen aufgebaut wird. Die eintretenden Axonfaszikel der Geruchsrezeptorzellen verlaufen zunächst in der äußeren Nervenschicht des Bulbus bis zur Höhe ihrer Terminationsorte. Dort treten sie in die darunter liegende glomeruläre Schicht ein und bilden glutamaterge Synapsen mit den apikalen Dendriten der Mitralzellen (**Abb. 2**, bei höheren Vertebraten auch Büschelzellen = *tufted cells*, Mori et al., 1998). Die glomeruläre Schicht ist in zahlreiche anatomisch und physiologisch unterscheidbare Module, die olfaktorischen Glomeruli, gegliedert. Glomeruli sind sphärische Neuropilstrukturen, die bei Säugetieren durch Glia und Periglomeruläre Zellen abgegrenzt werden. Zwischen glomerulärer und Mitralzellschicht erstreckt sich eine externe plexiforme Schicht, die überwiegend durch die Dendriten der Mitralzellen und Verzweigungen lokaler Interneurone aufgebaut wird. Laterale Interaktionen im olfaktorischen Bulbus werden hauptsächlich durch zwei Typen von Interneuronen vermittelt.



**Abb. 2 – Die Architektur der synaptische Verschaltung im *Bulbus olfactorius* der Säuger.**

Vereinfachte Darstellung der funktionellen synaptischen Architektur des olfaktorischen Verarbeitungsschaltkreises im Bulbus der Mammalia. Gezeigt sind die Verhältnisse für zwei spektral unterschiedlich sensitive Kanäle (rot, blau), die jeweils durch die Expression eines Geruchsrezeptortyps charakterisiert werden. Rezeptorgleiche Riechsinneszellen (ORN) konvergieren auf einen gemeinsamen Glomerulus. Die Terminalien der Riechsinneszellaxone bilden erregende glutamaterge Synapsen mit den apikalen Dendriten der Mitralzellen. Periglomeruläre Zellen (PG) verbinden die Riechsinneszellen inhibitorisch über reziproke Synapsen mit den Dendritenschäften benachbarter Mitralzellen. Körnerzellen vermitteln ebenfalls laterale Interaktionen zwischen den Glomeruli. Sie verbinden die basalen Dendriten benachbarter Mitralzellen über reziproke dendro-dendritische Synapsen. Axonkollaterale der Mitralzellen wirken hemmend über die Körnerzellen auf die Mitralzellen zurück. Körnerzellen erhalten auch zentrifugale Innervationen aus den primären Projektionsgebieten des Bulbus (verändert nach Mori et al., 1998).

Periglomeruläre Zellen verbinden Glomeruli über inhibitorische Synapsen mit den Dendritenschäften benachbarter Mitralzellen. Körnerzellen hingegen verbinden die basalen Dendriten benachbarter Mitralzellen durch reziproke Synapsen untereinander (Mori et al., 1998). Die Mitralzellen hemmen sich zusätzlich über eine inhibitorische *feedback*-Schleife selbst. Axonkollaterale der Mitralzellen erregen Körnerzellen, die hemmend auf die Mitralzellen zurückwirken. Die Mitralzellen sind die prinzipiellen Projektionsneurone des *Bulbus olfactorius*. Ihre Axone verlassen den Bulbus über den lateralen olfaktorischen Trakt und projizieren parallel in unterschiedliche Cortexareale. Zu den primären Projektionsgebieten gehören der anteriore und der posteriore piriforme Cortex, der Rhinocortex, der Entorhinale Cortex, der Inselcortex und die Amygdala (Haberly, 1990). Von allen primären Projektionsgebieten gehen zentrifugale Innervationen in den olfaktorischen Bulbus zurück, die auf den Körnerzellen enden und somit inhibitorisch auf die Mitralzellen zurück wirken.

## 2.2 Die epitheliobulbäre Projektion – Reorganisation und Repräsentationswechsel.

In Sinnessystemen werden die Objekte der Umwelt zunächst auf einer sensorischen Oberfläche abgebildet. Häufig werden dort bereits spezifische Aspekte der Reize durch die strukturelle Anordnung der Sinneszellen innerhalb der sensorischen Oberfläche analysiert (siehe **Abb. 1**). Informationen über die aufgenommenen Reize werden daher im Nervensystem z.T. räumlich kodiert. Häufig werden diese Informationen auch höheren Verarbeitungsarealen zur Verfügung gestellt und Nachbarschaftsbeziehungen zwischen den Sinneszellen bleiben während ihrer zentralen Projektion erhalten [z.B. auditorisches System (Scheich, 1991), visuelles System (Roskies et al., 1995)]. Eine solche Organisation scheint im Hinblick auf die Stimulusstruktur für das olfaktorische System wenig sinnvoll zu sein. Im Gegensatz zu visuellen oder auditorischen Reizen, sind natürliche Geruchsreize keine kohärenten Stimuli. In der Regel bestehen sie aus Mischungen verschiedenartiger Komponenten und die einzelnen Duftstoffmoleküle liegen unabhängig voneinander im umgebenden Medium vor. Zusätzlich werden bei landlebenden Vertebraten die Geruchsreize der Riechschleimhaut durch die Atemtätigkeit aktiv präsentiert. Bisher ist nur wenig über die Turbulenz der Luftströmung in der Nase bekannt (Kauer und White, 2001). Eine homogene Durchmischung der eingeatmeten Duftstoffmoleküle ist jedoch wahrscheinlich. Daher würde eine gleichmäßige Verteilung unterschiedlich empfindlicher Riechsinneszellen über die gesamte Sinnesoberfläche die höchste Sensitivität und größte Genauigkeit des System gewährleisten. Nachbarschaftsbeziehungen zwischen Sinneszellen im Riechepithel wären bei einer solchen Organisation für die Erkennung bestimmter Stimulusparameter irrelevant.

### 2.2.1 Reorganisation.

Während der primären Projektion im olfaktorischen System kommt es zu einer drastischen Reorganisation der Riechsinneszellaxone im olfaktorischen Bulbus. Retrograde Färbestudien am Bulbus ergaben, dass Riechsinneszellen, die einen bestimmten Glomerulus innervieren, weit verstreut im Riechepithel angeordnet sind (Jastreboff et al., 1984; Astic und Saucier, 1986). Die jeweils markierten Zellen sind auf einen Teilbereich der sensorischen Oberfläche beschränkt, innerhalb dieser Region jedoch zufällig verteilt. *In situ*-Hybridisierungen mit Rezeptorgensonden ergaben, dass Riechsinneszellen, die das gleiche Geruchsrezeptorgen exprimieren (rezeptorgleich sind), ebenfalls ausschließlich in einer von vier nichtüberlappenden Teilzonen der Riechschleimhaut lokalisiert sind (Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993; Sullivan et al., 1995, 1996). Innerhalb einer Expressionszone sind rezeptorgleiche Neurone stochastisch verteilt (siehe aber: Strotmann et al., 1996; Kubick et al., 1997). Zusammengefasst gaben diese Befunde den ersten Anhaltspunkt für eine Konvergenz rezeptorgleicher Sinneszellen auf einen gemeinsamen Glomerulus. Durch die insgesamt sehr hohe Konvergenz von Riechsinneszellen auf einen Glomerulus [bis zu 25.000 Sinneszellen/Glomerulus (Hildebrand und Shepherd, 1997)] und die hohen Expressionsraten der Geruchsrezeptorgene war es möglich, die Transkripte der Rezeptorgene auch im olfaktorischen Bulbus durch *In situ*-Hybridisierungen nachzuweisen (Ressler et al., 1994;

Vassar et al., 1994). Transkripte für ein bestimmtes Geruchsrezeptorgen können im Bulbus in ein oder zwei Projektionsorten gefunden werden, die morphologisch einzelnen Glomeruli entsprechen [*Drosophila* (Vosshall et al., 2000), Ratte (Vassar et al., 1994), Maus (Ressler et al., 1994)]. Durch Kartierung der Position von Glomeruli, die mit unterschiedlichen Rezeptorgensonden hybridisieren, wurden zwei bemerkenswerte Entdeckungen gemacht. Die relative Lage unterschiedlich typisierter Glomeruli zueinander ist interindividuell konstant. Zusätzlich wird jeder Geruchsrezeptor in einem olfaktorischen Bulbus zweimal repräsentiert. Die korrespondierenden Glomeruli eines Paares sind spiegelbildlich zueinander auf der medialen und lateralen Oberfläche eines Bulbus angeordnet. In transgenen Mauslinien, bei denen ein Reporterorgan zusammen mit einem bestimmten Geruchsrezeptorgen abgelesen wird, konnte die Projektion rezeptorgleicher Zellen direkt beobachtet werden. (Mombaerts et al., 1996). Die Befunde bestätigten die Konvergenz rezeptorgleicher Neurone auf zwei spiegelsymmetrische Glomeruli. Die Axone dieser Zellen wachsen zielstrebig und ohne zu mäandrieren auf einen der beiden Zielglomeruli zu.

Das Verhältnis zwischen Rezeptorgen (ungefähr 1.000) und Glomeruli (ungefähr 1.800) entspricht keiner exakten Verdoppelung, wie es die Spiegelsymmetrie zunächst vermuten lässt. Für die Rezeptoren der MOR 37 Genfamilie der Maus wird daher auch nur jeweils ein Zielglomerulus im Bulbus gefunden. Erstaunlicherweise liegen alle Glomeruli dieser Rezeptorgenfamilie auf der dorsalen Spiegelachse des Bulbus (Strotmann et al., 1999). Die Position bestimmter Glomeruli und deren Anzahl ist interindividuell einheitlich, jedoch nicht hundertprozentig exakt. Die Variabilität der Lage zweier identifizierbarer Glomeruli zueinander liegt in einem Bereich von 3 bis 4 Glomerulusdurchmessern (Royal und Key, 1999; Strotmann et al., 2000; Schaefer et al., 2001).

Für das pheromonsensitive Vomeronasalorgan, dessen Projektionen in den posterio-dorsal gelegenen akzessorischen olfaktorischen Bulbus (AOB) münden, wurde eine andere Art der Verschaltung zwischen der Sinnesoberfläche und den Glomeruli gefunden. Rezeptorgleiche vomeronasale Neurone projizieren in unterschiedliche Glomeruli (Belluscio et al., 1999; Rodriguez et al., 1999) und individuelle Glomeruli werden durch unterschiedliche Populationen rezeptorgleicher Neuronen innerviert (Belluscio et al., 1999). Das vomeronasale System besitzt demnach eine deutlich andere Verschaltungslogik und Kodierungsstrategie. Inwieweit die gemischte Innervation mit der Analyse von Pheromonstimuli, die häufig definierte Mischungen von Einzelkomponenten darstellen, zusammenhängt und inwiefern Aspekte der Informationsverarbeitung durch die Art der Verschaltung bereits determiniert sind, ist eine interessante, jedoch bisher unbeantwortete Frage.

### **2.2.2 Axonale Zielfindung.**

Die spezifische Projektion rezeptorgleicher Zellen auf einen Zielglomerulus wirft die Frage nach dem Mechanismus der axonalen Zielfindung auf. Untersuchungen an transgenen Mauslinien haben gezeigt, dass der Geruchsrezeptor selbst an der Zielfindung der Rezeptorzellaxone beteiligt und für die exakte Position des Zielglomerulus innerhalb des Bulbus instruktiv ist (Mombaerts et al., 1996; Wang et al., 1998). Die genomische Deletion

(*knock out*) des P2 Rezeptorgens der Maus verhindert die Konvergenz der P2-Axone auf den Zielglomerulus. Die Axone verbleiben in der äußeren Nervenschicht des Bulbus ohne zu faszikulieren, in die glomeruläre Schicht einzutreten oder praesynaptische glomeruläre Strukturen auszubilden (Mombaerts et al., 1996).

Der rekombinante Austausch eines Rezeptorgens durch ein anderes beeinflusst die Zielfindung der betroffenen Zellen ebenfalls (Wang et al., 1998). Zellen, die beispielsweise den P3-Geruchsrezeptor der Maus unter Kontrolle des P2-Rezeptorgenlokus exprimieren, bilden einen ektopischen Glomerulus, der an den P3-Glomerulus angrenzt, jedoch weit vom ursprünglichen P2-Glomerulus entfernt liegt. Die Identität des tatsächlich exprimierten Rezeptors ist demnach maßgebend für die Position eines Glomerulus innerhalb des olfaktorischen Bulbus. Der Rezeptor bestimmt dabei überwiegend die Position eines Glomerulus entlang der anterior-posterioren Achse des Bulbus. Die dorsoventrale Lage hingegen wird durch die epitheliale Expressionszone des Rezeptorgens beeinflusst (Wang et al., 1998). Dieser Befund ist konsistent mit retrograden Färbungen und immunhistochemischen Studien, die eine Korrelation der vier Expressionszonen der Riechschleimhaut mit einer dorsoventralen Zonierung der Bulbusoberfläche berichten (Schwob und Gottlieb, 1986; Schoenfeldt et al., 1994; Nagao et al., 2000).

Die Bedeutung des Geruchsrezeptorproteins für die axonalen Zielfindung lässt rezeptorvermittelte neuronale Aktivität in den Riechsinneszellen als eine mögliche Grundlage dieses Phänomens vermuten. In drei unabhängigen Studien wurde daher der Einfluss neuronaler Aktivität während der embryonalen Etablierung des glomerulären Musters untersucht (Zheng et al., 2000; Lin et al., 2000; Zhao und Reed, 2001). Durch *knock out* einer Untereinheit des CNG-Kanals wurde geruchsinduzierte Aktivität in den Riechsinneszellen transgener Mäuse ausgeschaltet. Die Struktur des Bulbus sowie die Topographie des glomerulären Musters war jedoch auch in den anosmischen Mäusen normal ausgebildet.

Für die Verschaltungsbildung retino-thalamischer Projektionen wurde der Einfluss zeitlich korrelierter Spontanaktivität benachbarter retinaler Ganglienzellen auf die Konsolidierung synaptischer Verbindungen gezeigt (Katz und Shatz, 1996). Rezeptorgleiche Riechsinneszellen sind innerhalb des sensorischen Epithels zwar weit verstreut angeordnet, sie könnten jedoch durch Geruchstimuli synchronisiert werden. Das Gen für die Untereinheit des CNG-Kanals ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. Daher liegen in Weibchen, die für die Mutation heterozygot sind, sowohl inaktive als auch aktive Riechsinneszellen gemeinsam vor. Nur in einer Studie wurde von dieser Besonderheit Gebrauch gemacht und es konnte gezeigt werden, dass inaktive Zellen von aktiven massiv verdrängt werden (Zhao und Reed, 2001). Wie bei der retinalen Projektion in den Thalamus, ist neuronale Aktivität (ggf. geruchssynchronisiert) für das Überleben der Riechsinneszellen und die Beständigkeit ihrer synaptischen Verbindungen von entscheidender Bedeutung. Die glomeruläre Zielfindung *per se* scheint jedoch nicht von geruchstimulierter Nervenzellaktivität abhängig zu sein.

Es wird auch vermutet, dass die Geruchsrezeptorproteine in der Axonmembran vorkommen und Angriffspunkte für Zelladhäsions- und Wegfindungsmoleküle oder für homophile Interaktionen zwischen rezeptorgleichen Axonen darstellen könnten (Singer et al., 1995). Bisher konnte jedoch die Präsenz der Geruchsrezeptorproteine auf den Riechsinneszellaxonen nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Darüber hinaus konnte auch kein Einfluss der postsynaptischen Neurone auf die Ausbildung des praesynaptischen glomerulären Musters gefunden werden (Bulfone et al., 1998). Auch bei vollständiger Abwesenheit bulbärer Inter- oder Projektionsneurone aggregieren Rezeptorzellaxone in distinkte praesynaptische Glomerulusstrukturen mit einer unveränderten topographischen Anordnung des Musters. Riechsinneszellen besitzen eine kurze Lebensdauer und werden ständig ersetzt (Graziadei und Graziadei, 1979). Es ist auch denkbar, dass die Axone neugeborener Riechsinneszellen bereits etablierten Verbindungen rezeptorgleicher Neuronen oder bestimmten Pionierneuronen folgen. Durch transiente Ablation fast der gesamten Population der P2-Neurone adulter Mäuse konnte jedoch kein Hinweis auf die Notwendigkeit von Pionierneuronen für die Reetablierung der Verbindung zwischen Riechepithel und olfaktorischem Bulbus gefunden werden (Gogos et al., 2000).

### **2.2.3 Repräsentationswechsel.**

Die Riechsinneszellen sind durch die Wahl eines bestimmten Geruchsrezeptors determiniert (Malnic et al., 1999; Touhara et al., 1999). Die kurze Lebensdauer dieser Zellen [90 Tage, (MacKay-Sim und Kittel, 1991), aber auch 30 Tage, (Moulton, 1974; Graziadei und Graziadei, 1979)] macht einen Rezeptorwechsel während dieser Zeitspanne unwahrscheinlich. Welche Riechsinneszellen auf einen Geruchsreiz reagieren, wird durch den jeweils exprimierten Geruchsrezeptor und sein Ligandenspektrum bestimmt. Im Riechepithel sind rezeptorgleiche Zellen innerhalb einer Expressionszone zufällig verteilt. Entsprechend stimulieren Geruchsstoffe in der Riechschleimhaut ein unzusammenhängendes punktuierendes Erregungsmuster (Ma und Shepherd, 2000). Geruchsinformation wird in der Riechschleimhaut daher nicht räumlich, sondern typologisch kodiert. Die Projektion rezeptorgleicher Riechsinneszellen auf einzelne Glomeruli führt jedoch zu einer Umstrukturierung des Systems und nachfolgend zu einer räumlich organisierten Repräsentation der Geruchsrezeptoren auf der Bulbusoberfläche. Individuellen Rezeptortypen entsprechen im Bulbus topographisch angeordnete Glomeruli, deren Position interindividuell invariant ist (Vassar et al., 1994; Ressler et al., 1994; Mombaerts et al., 1996). Jeder Geruchsrezeptor wird zweimal in einem Bulbus, d.h. viermal im gesamten System abgebildet. Die funktionelle Relevanz dieser Verdopplung ist bisher nicht bekannt. Die typologische Kodierung von Geruchsstoffen im Riechepithel wird also in eine räumliche Kodierung auf der Bulbusoberfläche übersetzt. Entsprechend werden im Bulbus Geruchsantworten in geruchsstoffspezifischen und räumlich umschriebenen Arealen gefunden (Lancet et al., 1982; Guthrie et al., 1993; Johnson et al., 1998; Yang et al., 1998; Johnson et al., 1999; Rubin und Katz, 1999; Johnson und Leon, 2000, 2000; Meister und Bonhoeffer, 2001). Die Frage, welcher Geruchsrezeptor aktiviert wurde, wird in die Frage, welcher Glomerulus aktiviert wurde, übersetzt.

Ob die räumlich strukturierte glomeruläre Repräsentationskarte des olfaktorischen Bulbus auch in höheren Ebenen der olfaktorischen Informationsverarbeitung erhalten bleibt und in welchem Umfang, ist bisher wenig erforscht. Erste Hinweise sprechen für eine Reduktion des Repräsentationsumfangs und eine, im Vergleich zu den scharf voneinander

abgegrenzten Glomeruli, diffusere Organisation ihrer Projektionsfelder (Horowitz et al., 1999; Zou et al., 2001). Beispielsweise nehmen postsynaptische Neuronen des Piriformen Cortex, die Eingang aus einem Glomeruluspaar erhalten, 5% dieses Areal ein (Zou et al., 2001). Würde die exakte glomeruläre Aufteilung erhalten bleiben, sollte bei 1.000 Rezeptoren und ungefähr 2.000 Glomeruli jedoch lediglich eine Größe des Projektionsfeldes von 0.1 bis 0.05% erwartet werden. Zusätzlich wurde beobachtet, dass nicht alle Glomeruli mit den gleichen primären kortikalen Projektionsgebieten verschaltet sind.

### 2.3 Olfaktorische Glomeruli – Basismodule der Verarbeitung von Geruchsinformation.

Olfaktorische Glomeruli bilden die strukturellen Einheiten des *Bulbus olfactorius* und gehören zu den markantesten anatomischen Modulen im Zentralnervensystem (Leise, 1990). Glomeruli sind sphärische Neuropilstrukturen von 50 bis 200 µm Durchmesser, die aus praeterminalen Axonen und Axonterminalien der Riechsinneszellen sowie den dendritischen Fortsätzen von Mitral-, Büschel- und Periglomerulären Zellen aufgebaut werden (**Abb. 2**). Bei der Ratte konvergieren auf einen Glomerulus ca. 25.000 Riechsinneszellen, die auf ungefähr 20 Mitralzellen verschaltet werden (Hildebrand und Shepherd, 1997). Nach außen hin werden sie durch Gliazellen und Periglomeruläre Zellen voneinander abgegrenzt. Glomeruli werden bei so diversen Tiergruppen, wie Arthropoden, Mollusken und Vertebraten gefunden und sind evolutiv höchstwahrscheinlich konvergent entstanden. Die Anzahl der Glomeruli innerhalb eines Bulbus ist artspezifisch und für eine Art konstant [ $\approx$  1.900 für Kaninchen (Allison und Warwick, 1949), aber auch 6.300 (Royet et al., 1998), 5.000 für Hunde (Hildebrand und Shepherd, 1997), 1.800 für die Maus (Royet et al., 1988) und die Ratte (Buck und Axel, 1991), aber auch 4.200 (Royet et al., 1998), 80 identifizierbare Glomeruli und zusätzlich diffuse glomeruläre Plexi für den Zebraabärbling (Baier und Korsching 1994), 46 für *Drosophila* (Vosshall et al., 2000)]. Die Unterschiede in der Zahl der Glomeruli hängen direkt mit den olfaktorischen Leistungen der respektiven Spezies zusammen, die klassischerweise in mikro- und makrosmate Gruppen zusammengefasst werden.

Neben der deutlichen morphologischen Abgrenzung voneinander bilden die Glomeruli auch funktionelle Einheiten. Jede Riechsinneszelle ist mit genau einem Glomerulus verschaltet und rezeptorgleiche Neurone konvergieren auf den gleichen Glomerulus. Jeder Glomerulus wird ausschließlich von Riechsinneszellen, die den gleichen Rezeptor exprimieren, innerviert. Elektrophysiologisch wurde gefunden, dass Glomeruli, ebenso wie Riechsinneszellen, ein definiertes Antwortspektrum gegenüber Geruchsstoffen aufweisen (Leveteau und MacLeod, 1966). Benachbarte Glomeruli sind lateral durch inhibitorische Interneurone miteinander vernetzt. Inhibition tritt vor allem zwischen zwei Mitralzellen auf, die unterschiedliche Glomeruli innervieren (Buonviso und Chaput, 1990). Durch Aktivitätsmarkierungen mit der 2-Desoxyglukosemethode während der Stimulation mit Geruchsstoffen werden Glomeruli individuell markiert (Lancet et al., 1982; Guthrie et al., 1993; Johnson et al., 1998). Die Färbung innerhalb eines Glomerulus ist homogen und gibt keinen Anhalt für eine funktionelle Subkompartimentierung. Eng benachbarte Glomeruli antworten unabhängig

voneinander auf Geruchsreize, jedoch weisen benachbarte Glomeruli häufig ein verwandtes Ligandenspektrum auf (Johnson et al., 1998; Johnson und Leon, 2000). Auch durch optische Aktivitätsmessungen in Echtzeit können die Glomeruli der Vertebraten als homogen antwortende Einheiten mit einem individuell unabhängigen Antwortverhalten erkannt werden (Friedrich und Korsching, 1998; Rubin und Katz, 1999; Meister und Bonhoeffer, 2001).

Zusammengenommen sprechen die hier aufgelisteten Befunde dafür, dass Glomeruli die Basismodule der olfaktorischen Informationsverarbeitung darstellen. Aufgrund ihrer funktionellen Anatomie, besonders wegen ihrer einheitlichen Größe, der lateralen Inhibition durch benachbarte Module und der *feedback* Inhibition sind sie mit kortikalen Kolumnen verglichen worden (Leise et al., 1990; Xu et al., 2000). Aufgrund der einheitlichen und übersichtlichen Organisation dieser Grundmodule, generieren Geruchsreize im olfaktorischen Bulbus räumliche Antwortmuster, die aus stimulusspezifischen Kombinationen aktivierter Glomeruli aufgebaut werden.

### **2.4 Neuronale Aktivität im *Bulbus olfactorius* – eine multidimensionale Repräsentation II.**

In den frühen elektrophysiologischen Untersuchungen der Aktivität der Bulbusoberfläche konnten im unstimulierten Bulbus langsame Potentialschwankungen abgeleitet werden, die während der Stimulation mit Geruchsstoffen durch starke rhythmische Oszillationen abgelöst wurden (Adrian, 1950). Elektrophysiologische Ableitungen individueller Glomeruli zeigten allerdings, dass spezifische Geruchsaktivität an distinkte Glomeruli gebunden ist (Levateau und MacLeod, 1966). Die Glomeruli zeigten ein individuelles Antwortverhalten gegenüber unterschiedlichen Geruchsreizen. Die Mehrzahl der abgeleiteten Glomeruli konnte durch verschiedene der untersuchten Substanzen gereizt werden. Ebenso wurden durch einen bestimmten Geruchsstoff mehrere der untersuchten Glomeruli gleichermaßen stimuliert. Erst durch den Einsatz unterschiedlicher optischer Verfahren zur Aktivitätsmessung konnten tiefere Einblicke in die räumliche und auch zeitliche Repräsentation von Geruchsstoffen im *Bulbus olfactorius* gewonnen werden.

Geruchsstoffe erregen ein interindividuell reproduzierbares, räumlich definiertes Muster stimulusspezifischer Aktivität. Die Grundeinheit dieser Muster ist die Aktivität einzelner Glomeruli und glomerulusassoziierter Inter- und Projektionsneurone (Johnson und Leon, 1999). Die Antwortmuster sind in hohem Maße von der Struktur der Stimuli abhängig. Bestimmte Substanzklassen, wie z.B. Aldehyde oder Fettsäuren, werden in umschriebenen Repräsentationsdomänen abgebildet (Imamura et al., 1992; Friedrich und Korsching, 1998; Johnson und Leon, 1998; 1999; Uchida, 2000). Die Antwortmuster unterschiedlicher Stimuli sind oft überlappend, repräsentieren einen Stimulus jedoch eindeutig. Kleine Veränderungen der Stimulusstruktur können bereits profunde Änderungen des Antwortmusters hervorrufen (Johnson und Leon, 1998). Strukturell verwandte Substanzen erregen in der Regel ähnlichere Aktivitätsmuster als verschiedenartige Geruchsstoffe. Unterschiede in der Stimuluskonzentration werden ebenfalls durch verschiedenartige Aktivitätsmuster repräsentiert (Friedrich und Korsching 1997; Rubin und Katz, 1999; Johnson und Leon, 2000). Die invariante Position der Glomeruli kann in der Spiegelbildlichkeit der Antwortmuster zwischen

den Bulbi (Belluscio und Katz, 2001) und innerhalb der Bulbi erkannt werden (Meister und Bonhoeffer, 2001).

Die wenigsten dieser Arbeiten unterscheiden jedoch klar zwischen den Eingangs- und Ausgangssignalen der Glomeruli (**Abb. 2**; siehe aber Friedrich und Korsching, 1997, 1998). Der unterschiedliche Beitrag der Riechsinneszellaxone, der Inter- und der Projektionsneurone an der beobachteten Gesamtaktivität wird nicht berücksichtigt. Mitralzellen weisen jedoch ein engeres Ligandenspektrum als die innervierenden Riechsinneszellen auf und besitzen ein deutliches inhibitorisches Stimulumfeld (Yokoi et al., 1995).

Die Untersuchung der Funktion des komplexen bulbären Netzwerkes ist eine interessante Herausforderung. Zur Zeit werden zwei unterschiedliche funktionelle Bedeutungen der synaptischen Verschaltung im olfaktorischen Bulbus diskutiert. Traditionell wird von einer Erhöhung des Stimuluskontrastes zwischen verwandten Geruchsstoffen ausgegangen (Yokoi et al., 1995). Für diese Sichtweise sprechen vor allem die räumliche Nachbarschaft von Glomeruli mit ähnlichen Erregungsspektren und die laterale Inhibition umgebender Mitralzellen. Die beobachteten rhythmischen Feldpotentialschwankungen, die sich aus der inhibitorischen Verschaltung ergeben und von der Bulbusoberfläche abgeleitet werden können, werden als Epiphänomen gewertet. Alternativ wird diskutiert, dass das inhibitorische Netzwerk einen Einfluss auf die zeitliche Synchronisation von Mitralzellantworten besitzt (Wehr und Laurent, 1996; Laurent, 1999; Friedrich und Laurent, 2001). Mitralzellen feuern Aktionspotentiale in Phase mit den Oszillationen und Aspekte der Geruchsinformation könnten zeitlich kodiert werden. Die zeitliche Bindung (Singer, 1999) der Projektionsneurone soll vor allem Bedeutung für das Auslesen von Geruchsinformation in höheren Verarbeitungsebenen besitzen. Die Bedeutung rhythmischer Aktivität für die Geruchsunterscheidung wurde im Antennallobus der Honigbiene gezeigt. Durch Blockade inhibitorischer Synapsen durch GABA<sub>A</sub>-Rezeptorblocker wurden die Oszillationen ausgeschaltet. Gleichzeitig konnten strukturell ähnliche Geruchsstoffe von diesen Tieren nicht mehr unterschieden werden, wohingegen die Unterscheidungsfähigkeit gegenüber strukturell sehr verschiedenen Geruchsstoffen nicht beeinträchtigt war (Stopfer et al., 1997).

## **2.5 Besonderheiten und Unterschiede des olfaktorischen Systems der Fische.**

Die aquatische Lebensweise der Fische macht eine Trennung zwischen Geruchs- und Geschmackssinn schwierig. Bei landlebenden Tieren sind Geruchsstoffe in der Regel flüchtige, hydrophobe Substanzen, Geschmackstimuli hingegen wasserlöslich. In der aquatischen Umwelt sind auch Geruchsstoffe zwangsläufig wasserlösliche, meist niedermolekulare Substanzen. Ob eine Substanz vom olfaktorischen oder gustatorischen System detektiert wird, ist daher durch reine Verhaltensbeobachtungen nicht immer leicht zu bestimmen. Bei Fischen besteht zwischen beiden Systemen eine weite Übereinstimmung der detektierten Stimuli (zusammengefasst in Hara, 1993, 1994). Grundsätzlich liegen die Schwellenkonzentrationen der Stimuli für den Geruchssinn jedoch niedriger als für das gustatorische System. Für den Geruchssinn der Fische sind vier verhaltensrelevante Geruchsstoffklassen bekannt: Aminosäuren, Gallensäuren, Steroidhormone und

Prostaglandine. Darüber hinaus wurde die stimulatorische Wirkung der Nukleotide auf das Geruchssystem gezeigt. Über die Verhaltensrelevanz der Nukleotide ist jedoch nichts eindeutig bekannt.

### **2.5.1 Geruchssinn und Verhalten.**

Der Geruchssinn der Fische ist mit unterschiedlichen Verhaltensweisen, wie Futtersuche, Reproduktionsverhalten, Migration, Art- und Feinderkennung assoziiert. Untersuchungen an vielen verschiedenen Fischarten haben gezeigt, dass Aminosäuren eine bedeutende Rolle bei allen diesen Verhaltensweisen spielen (Laberge und Hara, 2001).

Die schwierigste Trennung zwischen Geruch und Geschmack ist für das Fressverhalten zu machen. Verhaltensbefunde sind dabei nur schwer über unterschiedliche Fischarten zu generalisieren. Informationen über das Vorkommen einer Nahrungsquelle und deren Lokalisation werden überwiegend durch den Geruchssinn wahrgenommen. Futterassoziierte Erregung, Futtersuch- und Fressverhalten können durch Aminosäurestimuli ausgelöst werden (Sörensen et al., 1991; Laberge und Hara, 2001). Diese Verhaltensantworten werden durch Sektion des lateralen olfaktorischen Traktes selektiv ausgeschaltet (Stacey und Kyle, 1983). Übereinstimmend mit diesem Befund führen Aminosäurestimuli bei den meisten Knochenfischen zu Aktivität im lateralen Bulbus (Hara und Zhang, 1996; Friedrich und Korsching, 1997; Hanson et al., 1998; Nikonov und Caprio, 2001), dessen zentripetalen Projektionen über den lateralen Trakt in das Vorderhirn einmünden. Die Initiation der konsummatorischen Phase während der Nahrungsaufnahme wird überwiegend durch Reizung des gustatorischen Systems ausgelöst (Hara, 1994), wobei wiederum Aminosäuren die relevantesten Stimuli darstellen. Auch in anosmischen Zwergwelsen können Aspekte der generellen Futtererregung durch Aminosäuren stimuliert werden, wodurch die enge Verbindung zwischen Geruchs- und Geschmackssystem der Fische besonders deutlich wird (Caprio et al., 1993).

Bei Fischen werden sowohl allgemeine Geruchsstoffe als auch Pheromone durch ein gemeinsames Riechepithel erkannt. Für die Pheromonkommunikation während des Paarungsverhaltens sind vor allem die Fischhormone 4-Pregnen-17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol-3-one (17,20 $\beta$ P) und Prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) bekannt (Sorensen und Stacey, 1999). Der Spiegel an 17,20 $\beta$ P steigt beim Weibchen während der Oozytenreifung stark an, wird über die Kiemen in das Medium freigesetzt und wirkt als praeovulatorisches Pheromon. Es wird vom Männchen olfaktorisch detektiert und induziert dort die Spermienreifung. PGF2 $\alpha$  wird vom Weibchen während der Folikelfreisetzung abgegeben und wirkt als postovulatorisches Pheromon. Es synchronisiert die sexuelle Erregung der Geschlechtspartner und löst das Abbläichen aus. Interessanterweise gibt es auch für das Sexualverhalten Beispiele für eine Stimulation durch Aminosäuren. Geschlechtsreife Bitterlinge umwerben mit Aminosäuren gefüllte Dialyseschläuche (Kawabata et al., 1992). Die Spermienfreisetzung kann in diesen Tieren durch einen Lichtstimulus induziert werden.

Schreckstoffe sind ebenfalls Pheromone, die durch Verletzungen der Hautoberfläche aus speziellen Drüsen freigesetzt werden. Sie werden durch das Geruchssystem

wahrgenommen und rufen artspezifische Alarmreaktionen hervor (Smith, 1999). Schreckstoffe besitzen eine breite Interspezieswirksamkeit. Durch die Schreckstoffe mancher Arten werden nicht nur Mitglieder der eigenen oder fremden Art gewarnt, sondern auch sekundäre Räuber angelockt, wodurch die Fressgefahr ebenfalls vermindert wird. Schreckreaktionen können mit weiteren Stimuli, wie z.B. allgemeinen Geruchsstoffen oder visuellen Reizen, durch Lernen assoziiert werden (Hall und Suboski, 1995).

Ebenso bedeutend ist die Rolle der Geruchserkennung für migrierende Fischarten, wie etwa den Lachsen. Neben pheromonalen Reizen und intrinsischen Verhaltensweisen werden überwiegend Geruchsinformationen zum Auffinden der Heimatgewässer während der Laichphase genutzt (Hasler und Scholz, 1983). Die Prägung auf den Geruch des Laichgebietes während der frühen Individualentwicklung ist dabei ausschlaggebend. Es gibt Hinweise darauf, dass die Empfindlichkeit des peripheren Geruchssystems selbst während der Prägung verändert wird und nicht allein durch zentrale Mechanismen, wie z.B. Gedächtnisbildung, zu erklären ist (Nevitt et al., 1994; Dittmann et al., 1997).

Die Bedeutung der Gallensäuren als Geruchsstoffe ist bisher nicht besonders gut verstanden. Es wird vermutet, dass sie bei Neunaugen eine funktionelle Relevanz während der Wanderung besitzen (Li et al., 1995) oder der asexuellen Erkennung von Artgenossen dienen (Laberge und Hara, 2001).

## **2.5.2 Struktureller Aufbau und Unterschiede.**

Der strukturelle Aufbau des olfaktorischen Systems ist innerhalb verschiedener Wirbeltierklassen stark konserviert. Bei Fischen sind die paarigen Riechsinnesgruben zwischen Oberlippe und Auge in die cranialen Strukturen eingebettet. Die Riechepithelien sind rosettenartig aufgebaut und bestehen bei adulten Tieren aus einer wechselnden Anzahl radialer Lamellen, die um eine zentrale Raphe angeordnet sind. Der Querschnitt des Epithels ist oval bis kreisrund. Riechsinneszellen sind ausschließlich in den zentralen Querschnitten des Epithels angeordnet. Die äußeren nicht-sensorischen Bereiche sind dem respiratorischen Epithel der Säuger vergleichbar und mit zahlreichen cilientragenden Strudelzellen besetzt, die einen gerichteten Wasserstrom entlang der Lamellen generieren. Die Riechsinnesgruben besitzen eine Einström- und Ausströmöffnung, durch die, während des Schwimmens, ein Flüssigkeitsstrom durch das Geruchsepithel erzeugt wird. Die Anzahl der Riechsinneszellen im gesamten Epithel wird auf durchschnittlich 100.000 (Barth et al., 1996; Hildebrand und Shepherd, 1997) geschätzt, die Anzahl der Geruchsrezeptoren auf ungefähr 100 (Ngai et al., 1993; Barth et al., 1996; Weth et al., 1996). Eine Besonderheit des Riechepithels der Fische ist, dass sowohl cilierte als auch mikrovilläre Riechsinneszellen nebeneinander im gleichen Epithel vorkommen. Während die ersten bei Säugetieren typisch für das Geruchssystem sind, kommen letztere ausschließlich im pheromonsensitiven vomeronasalen Organ vor. Ein separates Organ für die Detektion von Pheromonen existiert bei Fischen nicht (Laberge und Hara, 2001). Sowohl allgemeine Geruchsstoffe als auch Pheromone generieren Aktivität im gleichen Riechepithel (Andersen und Doving, 1991; Fujita et al., 1991; Sörensen et al., 1995) und in Glomeruli des olfaktorischen Bulbus (Friedrich und Korsching, 1998; Hanson et al.,

1998). Der Bulbus selbst ist weniger deutlich geschichtet (Byrd und Brunjes, 1995) als der der Säugetiere. Insgesamt können drei bis vier morphologische Schichten erkannt werden. Die äußere Nervenschicht wird durch Axone der Riechsinneszellen gebildet, die in der darunterliegenden glomerulären Schicht terminieren. Die Glomeruli werden nicht, wie bei höheren Vertebraten, durch Astroglia oder Periglomeruläre Zellen voneinander abgegrenzt. Periglomeruläre Zellen wurden für Fische bisher nicht beschrieben. Ihre Funktion wird wahrscheinlich von den Körnerzellen, die bei Fischen auch synaptische Kontakte mit den distalen Dendriten und Somata der Mitralzellen machen, übernommen (Laberge und Hara, 2001). Die Durchmesser der Glomeruli sind weniger einheitlich als die der Säuger und können bis zu 10-fache Größenunterschiede aufweisen (Baier und Korsching, 1994). Neben distinkten Glomeruli kommen im Bulbus der Fische auch diffus organisierte Plexi vor, deren glomeruläre Struktur morphologisch schlecht aufgelöst werden kann. Eine deutlich ausgebildete Mitralzellschicht und externe plexiforme Schicht sind anatomisch nicht immer erkennbar. Interneurone, überwiegend Körnerzellen, füllen die gesamte innere Zellmasse des Bulbus aus. Die Ausgangsneurone des Bulbus der Knochenfische sind Mitralzellen und *ruffed cells* (Zippel, 1998, 1999; Laberge und Hara, 2001). Die Anzahl der Mitralzellen liegt bei etwa 1.000 (Zebraäbrbling, diese Arbeit). Individuelle Mitralzellen innervieren, wie bei den meisten niederen Vertebraten, mehrere Glomeruli gleichzeitig (Dryer und Graziadei, 1994). Die Funktion dieser Verschaltung, die Ähnlichkeit mit dem akzessorischen olfaktorischen Bulbus der Mammalia besitzt, ist bisher nicht bekannt. Projizierende Axone verlassen den Bulbus über zwei separate Faserbündel, den lateralen (LOT) und medialen (MOT) olfaktorischen Trakt. Jeder Trakt enthält Mitralzellaxone aus der entsprechenden Bulbushälfte, die mit der Erkennung bestimmter Geruchsstoffklassen assoziiert ist (Hamdani et al., 2001). Entsprechend können geruchsassozierte Verhaltensweisen durch Sektion eines Traktes selektiv ausgeschaltet werden (Hara, 1994; Laberge und Hara, 2001; Hamdani et al., 2001). Eine große Zahl der bulbofugalen Fasern wechseln über unterschiedliche Kommissuren auf die contralaterale Hemisphäre. Die Fasern des LOT projizieren überwiegend in den dorsalen Abschnitt des posterioren Telencephalons, wohingegen MOT-Fasern in das ventrale und dorsale Vorderhirn, preoptische Areale und das Diencephalon ziehen (Laberge und Hara, 2001).

### **2.5.3 Physiologie der Geruchsantworten.**

Pheromon- und Geruchsstimuli werden bei Fischen durch das gleiche Riechepithel detektiert. Entsprechend kommen sowohl cilierte als auch mikrovilläre Zellen nebeneinander vor. Trotz zahlreicher Bemühungen konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden, welche Substanzklassen von welchem Zelltyp (mikrovillär oder ciliert) erkannt werden. EOG-Aufzeichnungen von Abschnitten des Riechepithels, in denen verstärkt mikrovilläre Riechsinneszellen vorkommen, sprechen für die Erkennung von Aminosäuren durch mikrovilläre Zellen, wohingegen Gallensäuren durch cilierte Rezeptorneurone erkannt werden (Thommesen, 1983). Vergleichbare Arbeiten am Zwergwels (Erickson und Caprio, 1984) und Untersuchungen an anderen Fischarten kommen jedoch zu gegensätzlichen

Befunden. So wurde das Auftreten von Aminosäureantworten im Bulbus des Goldfischs mit der Regeneration ciliiertes Riechsinneszellen in Ablationsexperimenten zeitlich korreliert (Zippel et al., 1993), wohingegen Pheromonantworten mit mikrovillären Riechsinneszellen assoziiert werden konnten (Zippel et al., 1997). Auch Aktivitätsmarkierungen einzelner Rezeptorneurone des Zebraärbings sind nicht unbedingt eindeutig, da der benutzte Marker ( $\alpha$ -Agmatin) selbst stimulierend auf die Riechsinneszellen wirkt und sowohl ciliierte als auch mikrovilläre Zellen markiert werden (Michel et al., 1999). Einzelzellableitungen isolierter Riechsinneszellen der Forelle zeigten ebenfalls, dass beide Zelltypen durch Aminosäuren erregbar sind (Sato und Suzuki, 2001). Durch retrograde Färbungen von definierten Koordinaten des Bulbus werden ebenfalls beide Zelltypen markiert (Morita und Finger, 1998). Unter den Zellen, die in den dorsalen und lateralen Bulbus des Zwergwelses projizieren, ist der Anteil an mikrovillären Zellen deutlich höher, wohingegen ciliierte Zellen überwiegend in den ventralen und medialen olfaktorischen Bulbus projizieren.

Im *Bulbus olfactorius* verschiedener Fischarten konnte eine topographische Verteilung der Repräsentation fischrelevanter Geruchsstoffklassen aufgedeckt werden. Pheromonsubstanzen wie 17,20 $\beta$ P und PGF2 $\alpha$  aktivieren einzelne Glomeruli der mittventralen Oberfläche (Friedrich und Korsching, 1998; Hanson et al., 1998). Allgemeine Geruchsstoffe hingegen stimulieren ausgedehnte Antwortmuster, die auf der Aktivierung vieler Glomeruli beruhen. Unterschiedliche Vertreter einer Substanzklasse (z.B. Aminosäuren) aktivieren individuelle, jedoch überlappende Aktivitätsmuster. Drei biologisch relevante Geruchsstoffklassen werden in verschiedenen Subkompartimenten des Bulbus repräsentiert: Gallensäuren im anteriomedialen, Nukleotide im posteriolateralen und Aminosäuren im anteriolateralen Bulbus (Friedrich und Korsching, 1997, 1998; Hanson et al., 1998; Hara und Zhang, 1998; Nikonov und Caprio, 2001). Diese Befunde sind in guter Übereinstimmung mit frühen Arbeiten, die eine unabhängige Erkennung dieser Substanzen durch unterschiedliche Geruchsrezeptoren nachweisen konnten (Thommessen, 1982, 1983; Chang und Caprio, 1996; Hara und Zhang, 1996; Michel und Derbidge, 1997).

Bisher wurden für eine Reihe von Fischarten putative Geruchsrezeptoren isoliert [Medaka (Yasuoka, 1999), Zwergwels (Ngai et al., 1993), Kugelfish (Asano-Miyoshi et al., 2000), Goldfisch (Cao et al., 1998; Speca et al., 1999), Zebraärbing (Byrd et al., 1996; Weth et al., 1996), Lachs (Wickens et al., 2001)]. Lediglich für den Goldfisch wurde bisher ein Geruchsrezeptor funktionell charakterisiert, der durch die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin stimuliert werden kann. Interessanterweise besitzt dieser Rezeptor eine starke Sequenzhomologie zu den V2-Rezeptoren (Speca et al., 1999), die bei Säugern im vomeronasalen Epithel gefunden werden und dort in mikrovillären Riechsinneszellen vorkommen (Dulac, 2000). Übereinstimmend damit wurde berichtet, dass der CNG-Kanal, der bei Säugern ebenfalls typisch für ciliierte Riechsinneszellen ist, nicht an den aminosäureinduzierten Geruchsantworten beteiligt ist (Michel, 1999).

Die Zahl der Geruchsrezeptoren, die an der Erkennung verschiedener Geruchsstoffe beteiligt sind, wurde durch Kreuzadaptation abgeschätzt. Für die Aminosäure-Geruchsrezeptoren wurden klassischerweise vier Kategorien gebildet, die entweder ein basisches, azidisches, neutral kurzkettiges oder neutral langkettiges Bindungsverhalten zeigen (Caprio und Byrd, 1984; Ohno et al., 1984).

### **2.5.4 Der Zebrafisch als olfaktorisches Modellsystem.**

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) besitzt für die Untersuchung des Geruchssinnes gegenüber den Säugetieren klare Vorteile, die ihn als Modellsystem besonders geeignet machen. Die funktionelle Architektur des olfaktorischen Nervensystems ist dem höheren Vertebraten grundsätzlich vergleichbar (Baier und Korsching, 1994; Byrd und Brunjes, 1995). Die Komplexität des Systems ist gegenüber dem der Säuger jedoch deutlich reduziert. Die Geruchsrezeptorgenfamilie des Zebrafisches wird auf ungefähr 100 Mitglieder geschätzt (Barth et al., 1996; Weth et al., 1996). Im Vergleich zu den  $\approx 1.000$  Geruchsrezeptoren von Ratte und Maus liegt das Rezeptorgenrepertoire somit eine ganze Größenordnung niedriger. Die Zahl der Glomeruli entspricht etwa der Zahl der Geruchsrezeptorgene (Baier und Korsching, 1994). Im Zebrafischbulbus können etwa 80 distinkte Glomeruli sowie diffuse glomeruläre Plexi erkannt werden. Von den 80 großen Glomeruli können ungefähr 20 aufgrund ihrer Größe, ihrer Position oder ihrer Form individuell angesprochen werden. Bei den ungefähr 100.000 Riechsinneszellen adulter Zebrafische (Barth et al., 1996; S. Berger, unpublizierte Beobachtung) ergibt sich somit eine glomeruläre Konvergenz von etwa 1.000 sensorischen Neuronen auf einen Glomerulus. Inwieweit die zum Teil 10-fachen Größenunterschiede einzelner Glomeruli mit der Zahl konvergierender Neurone zusammenhängen ist nicht bekannt. Die Projektion rezeptorgleicher Zellen auf einen Glomerulus konnte für den Zebrafisch bisher nicht experimentell gezeigt werden. Durch retrograde Färbungen an identifizierbaren Einzelglomeruli ist aber bekannt, dass sensorische Neurone, die mit einem Glomerulus verschaltet sind, in einem ringförmigen Muster im Riechepithel angeordnet sind (Lieberoth, 1999). Die Radien dieser Ringe variieren für verschiedene Glomeruli und sind von der Lage des Glomerulus im Bulbus abhängig. Übereinstimmend mit der glomerulären Konvergenz rezeptorgleicher Neurone, werden auch für unterschiedliche Geruchsrezeptorgene ringförmige Expressionsmuster gefunden (Weth et al., 1996). Der Radius einer solchen Expressionsdomäne ist typisch für einen betrachteten Geruchsrezeptor. Für zwei identifizierbare Glomeruli konnten die relevanten Geruchsstoffe, in beiden Fällen Pheromone, bestimmt werden (Friedrich und Korsching, 1998). Die selektive Aktivierung eines einzelnen Glomerulus durch einen Geruchsreiz stellt bisher die deutlichste Evidenz für die glomeruläre Konvergenz rezeptorgleicher Riechsinneszellen beim Zebrafisch dar. Geruchsantworten werden auch im Bulbus des Zebrafisches strukturabhängig repräsentiert. Bisher wurden vier unterschiedliche Regionen beschrieben, die jeweils für eine bestimmte Geruchsstoffklasse empfindlich sind (Friedrich und Korsching, 1997, 1998). Allerdings sind für ca. 50% der Glomeruli bisher keine relevanten Geruchsstoffe bekannt.

Neben der beschriebenen strukturellen Reduktion besitzt das olfaktorische System des Zebrafisches auch rein praktische Vorteile gegenüber dem Säugetiermodell. Das Bulbusgewebe ist relativ transparent und somit für optische Ableitungen geruchsstimulierter neuronaler Aktivität besonders geeignet. Aufgrund der geringen Abmessungen kann vom gesamten Bulbus abgeleitet und das vollständige Repertoire aller, auf einen Stimulus antwortenden Glomeruli simultan erfasst werden. Im Gegensatz dazu, kann bei Mäusen mit dem gleichen Verfahren lediglich 20% der Bulbusoberfläche vermessen werden (Meister und

Bonhoeffer, 2001; Fried et al., 2002). Da Fische zu den poikilothermen Tieren gehören, besitzen physiologische Präparate eine deutlich höhere Lebensdauer und bedürfen einer wesentlich weniger aufwendigen Lebenserhaltung. Die biologisch relevanten Geruchsstimuli sind wasserlöslich und können im Gegensatz zu den volatilen Geruchsstoffen landlebender Spezies wesentlich einfacher quantifiziert und appliziert werden.

In den letzten Jahren wurden auch erhebliche Fortschritte in der Anwendung molekulargenetischer Techniken beim Zebrafisch gemacht. Viele Standardverfahren, inklusive transient transgener Techniken, sind weitgehend etabliert (siehe z.B. Deterich et al., 1999). Der Anwendung rekombinanter Methoden wurde allerdings erst in jüngster Zeit durch die Identifizierung embryonaler Stammzellen der Weg bereitet (Ma et al., 2001). Ein breites Interesse galt dem Zebrafisch bisher vor allem als entwicklungsbiologisches Modellsystem, speziell der Charakterisierung spezifischer Mutanten und der Expression entwicklungsrelevanter Gene während der Ontogenese (Development, zebrafish issue, ).

Im olfaktorischen System des Zebrafisches sind, mit Ausnahme der Geruchsrezeptorgene und des CNG-Kanals (Barth et al., 1996; Weth et al., 1996), nur wenige zelltypspezifische Gene bekannt. Molekulargenetische Marker für definierte Zellpopulationen wurden bisher nicht gezielt gesucht. Durch die Betrachtung des Expressionsmusters von bereits identifizierten Genen konnten jedoch auch solche erkannt werden, die im olfaktorischen System vorkommen. Für olfaktorische Sinneszellen wurden so die Rekombinase aktivierenden Gene 1 und 2 (*rag1*, *rag2*; Jessen 1999, 2001) beschrieben. Für Körner und Mitralzellen ist in Übereinstimmung mit dem Mausmodell die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren und Zelladhäsionsmoleküle erkannt worden (siehe z.B. Akimenko et al., 1994).

Bisher wurde von der teilweise sehr spezifischen Expression dieser Gene (siehe Çelik, 2001) in der Olfaktionsforschung beim Zebrafisch kaum praktischer Gebrauch gemacht. Ein vielversprechender methodischer Ansatz ist die Zerlegung des olfaktorischen Verarbeitungsschaltkreises durch den Einsatz spezifischer Promotoren, welche die Expression von Reportergenen oder funktionellen Konstrukten in bestimmten Zellpopulationen des bulbären Netzwerks treiben. Bisher gibt es speziell für das Geruchssystem nur wenige, jedoch verheißungsvolle Beispiele für die Anwendung genspezifischer Promotoren. Die flankierenden genomischen Sequenzen der Gene *rag1* und *rag2* enthalten regulatorische Motive, die Reportergene in Immunzellen und olfaktorischen Sinneszellen treiben (Jessen et al., 1999, 2001). Auch für das Geruchsrezeptorgen *ZOR9a* (Mori et al., 2000; = *DROR 2.1*, Dugas und Ngai, 2001) konnte eine stromaufwärts liegende genomische Sequenz identifiziert werden, die spezifische Expression in einer Teilpopulation von Riechsinneszellen treibt (Mori et al., 2000; Graef, 2001). Die konsequente Weiterentwicklung dieser Ansätze und deren funktionelle Anwendung würde die Bedeutung des Zebrafisches als olfaktorisches Modellsystem weiter verstärken.

### **3 OPTISCHE MESSVERFAHREN.**

Der besondere Vorteil optischer Messungen neuronaler Aktivität besteht darin, dass Signale von einem großflächigen Gehirnareal gleichzeitig aufgezeichnet werden können. Im Unterschied zu elektrophysiologischen Ableitungen, die auf einen oder wenige grob gerasterte Ableitorte beschränkt sind, können Aktivitätsereignisse lückenlos und je nach Verfahren in Echtzeit gemessen werden. Im Gegensatz zu aktivitätsmarkierenden Verfahren, wie z.B. der Desoxyglukosemethode (z.B. Lancet et al., 1982) oder Antikörperfärbungen gegen aktivitätsabhängige Genexpression [*immediate early genes*, *c-fos*, *b-jun*, z.B. (Guthrie et al., 1993)] können unterschiedliche Stimuli wiederholt in einer Präparation angewendet werden. Das gleiche gilt auch für nichtinvasive bildgebende Verfahren, wie fMRI (*functional magnetic resonance imaging*) oder die Positronen Emissions Tomographie (PET). Allerdings sind diese Verfahren für viele Fragestellungen durch ihr relativ grobes räumliches Auflösungsvermögen ( $> 2$  mm) eingeschränkt (Korsching, 2001). Optische Ableitungen erlauben es hingegen, das Verhalten von Einzelzellen oder von Aktivitätsverteilungen in einem gesamten Gewebe aufzuzeichnen.

#### **3.1 Methodisches.**

Prinzipiell können zwei Grundarten optischer Ableittechniken unterschieden werden, intrinsische und farbstoffunterstützte Verfahren. Bei intrinsischen optischen Ableitungen wird entweder die Rate der Blutzirkulation im Gewebe, die Änderung des Sauerstoffgehaltes im Blut oder eine aktivitätsabhängige Veränderung der Lichtstreuung gemessen (Lieke et al., 1989). Im Vergleich zu farbstoffunterstützten Verfahren werden mit intrinsischen optischen Verfahren wesentlich kleinere Signalstärken mit einer schlechteren zeitlichen und meist auch räumlichen Auflösung aufgezeichnet.

Die z.Zt. populärsten aktivitätsabhängigen Farbstoffe können in zwei Gruppen, die ionen- und die spannungsabhängigen Farbstoffe, eingeteilt werden. Dabei sind bisher die calciumabhängigen Farbstoffe von besonderem allgemeinen Interesse, da Calciumsignale in vielen physiologischen Prozessen eine Rolle spielen. Für spezielle Anwendungen sind jedoch eine breite Palette spezifischer Farbstoffe entwickelt worden, die kalium-, chlorid- oder natriumabhängig sind. Spannungssensoren sind Membranfarbstoffe, die mit einfachen mikroskopischen Techniken insgesamt nur sehr niedrige Signalstärken ergeben (Zochowski et al., 2000). Das Signal/Rauschverhältnis muss daher für die beabsichtigten Messungen entsprechend hoch sein. Für die hier untersuchten Fragestellungen, die Aktivität individueller Glomeruli im olfaktorischen Bulbus des Zebrafischlings, war die Anwendung potentialabhängiger Farbstoffe nicht geeignet. Potentialänderungen treten entlang einer gesamten Nervenzelle, einschließlich des Axons auf. Im olfaktorischen Bulbus verlaufen die Nervenfasern der Riechsinneszellen in der äußeren Schicht des Bulbus und treten erst später in die glomeruläre Schicht ein. Durch die gleichzeitige Aufnahme der Aktivität der passierenden Faserbündeln werden die Signale der tiefer gelegenen Glomeruli maskiert (Friedrich und Korsching, 1998). Im Gegensatz dazu, treten Calciumänderungen in den

Riechsinneszellaxonen ausschließlich an den synaptischen Endigungen auf. Entsprechend sind auch Calciumsignale auf die unmittelbaren praesynaptischen Strukturen, bestenfalls individuelle Glomeruli, beschränkt. In der vorliegenden Untersuchung wurde überwiegend der Farbstoff Calcium Green<sup>TM</sup>-1 verwendet, der in früheren Arbeiten bereits erfolgreich im Geruchssystem des Zebrafisches eingesetzt wurde (Friedrich und Korsching, 1997).

Darüber hinaus wurden im Verlaufe dieser Dissertation neuartige, genetisch kodierte Calciumindikatoren berichtet, die auf einer Modifikation des Aequorea-GFP beruhen (siehe II.3.3) und von mir auf ihre Anwendbarkeit im olfaktorischen System des Zebrafisches hin überprüft wurden.

### 3.2 Optische Aktivitätsmessungen in der Olfaktionsforschung.

Elektrophysiologische Arbeiten am olfaktorischen System wiesen bereits früh auf eine räumliche Verteilung geruchsstoffinduzierter Aktivität innerhalb des Systems hin (siehe z.B. Adrian, 1953; Levetau und MacLeod, 1966; Moulton, 1976). Die Beziehungen zwischen den aufgezeichneten Antwortprofilen und der Struktur der verwendeten Stimuli waren jedoch schwierig zu interpretieren. Einblicke in die kombinatorische Natur des olfaktorischen *Codes* wurden erst durch den Einsatz aktivitätsmarkierender und optischer Verfahren, welche die Aufzeichnung von Geruchsaktivität in Raum und Zeit erlauben, möglich.

Pionierarbeiten wurden dabei von John Kauer am olfaktorischen Bulbus des Salamanders geleistet (Kauer, 1988). Aufgrund der besonderen anatomischen Struktur des Salamanderbulbus und der Verwendung spannungsabhängiger Farbstoffe konnten Geruchsantworten jedoch nicht mit der Aktivität einzelner Glomeruli korreliert werden (Cinelli et al., 1995). Die beobachteten Aktivitätsmuster waren zwar stimuluspezifisch, jedoch großflächig und stellten Summenpotentiale aus der Erregung von Riechsinneszellaxonen, Projektions- und Interneuronen dar. Durch selektive Markierung der Riechsinneszellen und deren axonalen Fortsätze konnte der modulare Aufbau der Geruchsaktivität im Bulbus auch mit optischen Verfahren untersucht werden (Friedrich und Korsching, 1997, 1998; Wachowiak und Cohen, 2001; Fried et al., 2002). Auch durch Messungen intrinsischer Signale kann geruchsassozierte Aktivität in einzelnen Glomeruli erkannt werden (Rubin und Katz, 1999; Uchida et al., 2000; Meister und Bonhoeffer, 2001). Im Vergleich zu Calciummessungen, werden bei Reizung mit dem gleichen Geruchsstoff, durch intrinsische Ableitungen wesentlich weniger aktive Glomeruli beobachtet. Dieser Unterschied zwischen den Verfahren muss nicht ausschließlich mit der geringeren Sensitivität intrinsischer Verfahren zusammenhängen. Durch die Blockade der synaptischen Übertragung zwischen Riechsinneszellen und Mitralzellen gibt es Hinweise darauf, dass die intrinsischen Signale überwiegend postsynaptischen Ursprungs sind (Markus Meister, pers. Mitteilung). Ein entsprechender Vergleich der Eingangs- und Ausgangssignale der Glomeruli wäre für ein Verständnis der Funktion des bulbären Netzwerkes besonders interessant. Ebenso würde eine Zuordnung der Geruchsrezeptoren zu den Glomeruli und deren Antwortprofilen helfen, den Geruchsraum eines Organismus besser verstehen zu lernen. Durch den Beitrag vieler

unabhängiger Arbeitsgruppen und unterschiedlicher methodischer Ansätze scheint dieses Verständnis für das Mausmodell bisher am weitesten fortgeschritten zu sein.

Optische Aktivitätsmessungen wurden in der Geruchsforschung allerdings nicht nur zur Kartierung des olfaktorischen *Codes* im Bulbus eingesetzt. Einige interessante Anwendungen, die die Bandbreite der Methode illustrieren sollen, sind im folgenden exemplarisch aufgelistet. So konnten durch Calciummessungen im Riechepithel die Antwortprofile einzelner Riechsinneszellen *in situ* untersucht werden (Ma und Shepherd, 2000). An dissoziierten Riechsinneszellen wurden zunächst die Ligandenspektren von Einzelzellen und anschließend die Geruchsrezeptoren dieser Zellen durch Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion bestimmt (Malnic et al., 1999). Die Ausbreitung von Calciumsignalen während der Stimulation mit Geruchsstoffen wurde in den Riechsinneszellen ebenfalls optisch untersucht (Leinders-Zufall et al., 1997, 1998). Calciumsignale treten zuerst in den Cilien auf und gehen zeitlich versetzt auf den Dendritenknopf und das Soma der Sinneszellen über. Der zeitliche Verlauf der Calciumerregung ist deutlich von elektrischen Erregungsprofilen, die durch elektrophysiologische Messung der Nervenzellaktivität bestimmt wurden, verschieden. Calciumsignale dauern wesentlich länger an als elektrische Signale (Leinders-Zufall et al., 1998). Üblicherweise antworten Riechsinneszellen auf einen Geruchstimulus innerhalb von etwa 150 - 500 ms mit *bursts* von Aktionspotentialen und adaptieren rasch innerhalb einer Zeitspanne von 2 bis 4 s, wohingegen die Calciumsignale zwischen 5 und 20 s persistieren (Duchamp-Viret et al., 1999, 2000; Leinders-Zufall, 1998). Durch retrogrades Färben der Riechsinneszellen mit calciumsensitiven Farbstoffen wurde das Antwortprofil von Riechsinneszellen ermittelt, die eine bestimmte Bulbusregion innervieren (Bozza und Kauer, 1998). Es konnten deutliche Unterschiede in den Profilen gefunden werden. Zellen, die den dorsolateralen Bulbus innervieren, besitzen wesentlich breitere Ligandenspektren als solche, die in den dorsomedialen Bulbus projizieren. Im olfaktorischen Bulbus der Vertebraten und den analogen Strukturen der Insekten und Landschnecken treten rhythmische Oszillationen auf, die durch Geruchstimulation moduliert werden können (Adrian, 1950; Delaney und Hall, 1996; Gelperin und Tank, 1990; Kay und Laurent, 1999; Friedrich und Laurent, 2001; Vickers et al., 2001). Auch zur Ableitung solcher Signale, die neben der rhythmischen Änderung zusätzlich entlang einer Achse durch das Gewebe propagieren, wurden optische Verfahren eingesetzt (Delaney et al., 1994; Lam et al., 2000). Eine sehr junge Anwendung ist die optische Messung des Ligandenspektrums rekombinant exprimierter Geruchsrezeptoren in Kulturzellen (Krautwurst et al., 1998; Touhara et al., 1999; Kajiya et al., 2001). Diese Studien haben das Verständnis der Bindung von Geruchsstoffliganden an die Geruchsrezeptoren ebenfalls deutlich vorangetrieben.

### **3.3 Molekulargenetische Calciumindikatoren.**

Die in dieser Studie verwendeten molekulargenetischen Calciumindikatoren basieren auf dem *green fluorescent protein* (GFP), das aus der marinen Tiefseemeduse *Aequorea aequorea* isoliert wurde (Prascher et al., 1992). Die Anwendung von GFP in der funktionellen

Anatomie, Entwicklungsbiologie und Molekulargenetik hat seit dem Bekanntwerden des Proteins einen rapiden Verlauf genommen (zusammengefasst in Tsien, 1998). Im Gegensatz zu herkömmlichen oder enzymatischen Farbstoffen besitzt es den Vorteil, dass es *in vivo* angewendet und beobachtet werden kann. Durch geeignete Expressionssysteme kann es spezifisch in bestimmten Zellen oder Geweben exprimiert werden. Modifikationen und Fusionen mit Signalsequenzen erlauben eine Expression in subzellulären Kompartimenten. Fusionen mit bekannten Proteinen können helfen, die subzelluläre Lokalisation oder das zeitliche Expressionsprofil eines Proteins aufzuklären. Mittlerweile ist eine umfangreiche Familie modifizierter und funktioneller GFP-Varianten mit unterschiedlichen spektralen und biochemischen Eigenschaften entwickelt worden (Tsien, 1998). Unmittelbar haben sich physiologisch interessante Anwendungen ergeben, bei denen spezielle GFP-Modifikationen spezifische Reaktionsschritte in Signaltransduktionswegen signalisieren. Zur aktiven Messung der Calciumkonzentration wurden Modifikationen entwickelt, die eine Fusion des GFP mit einem calciumsensitiven Element (Calmodulin) und einem Calmodulinbindemotiv (M13 der Myosinkinase) darstellen (Miyawaki et al., 1997). Zwei unterschiedliche mechanistische Richtungen werden verfolgt. Die erste, die in den *Cameleon* Indikatoren verwirklicht wurde, basiert auf einem Fluoreszenzresonanz Energietransfer (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET, Förster Transfer), bei dem zwei spektral unterschiedliche fluoreszierende Proteine eingesetzt werden. Die Emissionsenergie des kürzerwellig fluoreszierenden Moleküls wird, bei genügend geringem Abstand zwischen den Molekülen, auf das längerwellige übertragen. Dadurch kommt es zu einer Verlagerung der Emissionswellenlänge. Mit einer solchen Messprobe konnte beispielsweise die aktivitätsabhängige Änderung des internen Calciumniveaus in kontrahierenden pharyngealen Muskeln von *C.elegans* gemessen werden (Kerr et al., 2000). Der Einsatz solcher Indikatoren bietet aber auch die Möglichkeit stationäre Präparate und subzelluläre Kompartimente zu untersuchen (siehe z.B. Yu und Hinkle, 2000). Das *yellow Cameleon*, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, besteht aus dem cyanen und dem gelben fluoreszierenden Protein (CFP = *cyan fluorescent protein*, YFP = *yellow fluorescent protein*). Das CFP ist an Calmodulin, das YFP an M13 fusionsgebunden. Eine Erhöhung des freien Calciums führt zu einer Bindung des Calmodulins an den M13 Rest, was eine engere räumliche Nachbarschaft der beiden Moleküle, die für einen Resonanztransfer ausreichend ist, zur Folge hat. Das Verhältnis der Fluoreszenzemission verschiebt sich dadurch von cyan nach gelb. Dieser Effekt kann entweder sukzessive durch Filterwechsel oder simultan durch einen Strahlteiler aufgezeichnet werden. Anschließend wird das Verhältnis durch einfache Division kongruenter, jedoch spektral unterschiedlicher Bilder bestimmt.

Bei den monomolekularen Varianten *Camgaroo* (Baird et al., 1999) und *pericam* (Nagai et al., 2001) wird die Fluoreszenz des Proteins, durch die Integration des Calmodulin-M13-Komplexes in das Protein aufgrund der daraus resultierenden Änderungen der Tertiärstruktur, zerstört. Durch Calciumbindung an das Calmodulin und die nachfolgende Strukturänderung wird eine, dem nativen Protein ähnliche, Tertiärstruktur erreicht und die Fluoreszenz des Proteins reetabliert. Das *Camgaroo* basiert auf dem EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) und enthält den Calmodulin-M13 Komplex innerhalb des Moleküls. Die *pericams* sind Variationen des EYFP, die zuvor zirkulär permutiert wurden und die M13- und

Calmodulininfusionen an den Sequenzenden tragen (Nagai et al., 2001). Durch weitere Veränderungen der Sequenz konnten drei interessante Modifikationen erarbeitet werden. Das *flash-pericam* ist dem *Camgaroo* verwandt, besitzt jedoch deutlich bessere Calciumbindungseigenschaften. *Invers-pericam* ist eine Variante, deren Fluoreszenzintensität mit zunehmender Calciumkonzentration abnimmt, wohingegen *ratiometric-pericam* die ratiometrische Messung bei zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen erlaubt.

#### **4      UNTERSUCHTE FRAGESTELLUNGEN.**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Kodierung von strukturell sehr ähnlichen Geruchsstoffen im olfaktorischen Bulbus des Zebrafährblings untersucht werden. Die Untersuchung der Repräsentationsmuster strukturverwandter Stimuli erlaubt es, Aussagen über die Spezifität der zugrundeliegenden Geruchsrezeptoren zu treffen. Bisher waren verschiedene Substanzklassen bekannt, die in räumlich separierten Bulbusarealen Geruchsantworten hervorrufen. Für eine Klasse, die Aminosäuren, sollte betrachtet werden, welche Aspekte der Molekülstruktur für die Bindung an die Aminosäure-Geruchsrezeptoren zwingend notwendig sind. Zum weiteren wurde untersucht, wie bestimmte Modifikationen der Molekülstruktur Einfluss auf die Repräsentation und damit letztendlich auf die Unterscheidbarkeit von Geruchsstoffen nehmen. Dabei wurden einfach beschreibbare Molekülveränderungen, wie der Zuwachs der Kettenlänge unverzweigter aliphatischer Aminosäuren und komplexere Veränderungen der Molekülstruktur durch endständige Substitutionsgruppen oder polare Hydroxylgruppen gewählt. Der Einfluss der Konzentration der Stimuli auf die Unterscheidbarkeit zweier Repräsentationsmuster und das Auflösungsvermögen des olfaktorischen Systems sollten ebenfalls untersucht werden. Die optische Ableitung von Calciumsignalen im olfaktorischen Bulbus besitzt bei der verfolgten Fragestellungen den besonderen Vorteil, dass der Beitrag aller antwortenden Riechsinneszellen gleichzeitig betrachtet werden kann. Unter der Prämisse, dass jede Riechsinneszelle nur einen Geruchsrezeptor exprimiert, kann auch der Beitrag aller, für diese Substanzen empfindlichen Geruchsrezeptoren erkannt werden. Individuelle Glomeruli und Geruchsrezeptoren können in den bulbären Antwortmustern des Zebrafährblings nicht benannt werden. Der Vergleich unterschiedlicher Antwortmuster untereinander erlaubt jedoch eine Kategorisierung verschiedenartiger Antwortprofile.

In weitergehenden Untersuchungen sollte ein *in vivo* Messsystem etabliert werden, das auch auf nachgeschaltete Neurone des olfaktorischen Verarbeitungsschaltkreises ausgedehnt werden kann. Die letztgenannten sind schwierig durch Farbstoffe in *in vivo* Präparationen zu markieren. Der beabsichtigte Einsatz neuartiger calciumsensitiver Proteine machte zunächst die Etablierung eines transgenen Expressionssystems, vorzugsweise mit einer hohen zellulären Spezifität notwendig. Es wurde versucht, zelltypspezifische Promotoren zu identifizieren, die unterschiedliche Zellpopulationen des Verarbeitungsschaltkreises spezifisch markieren. In einem weiteren Schritt wurden dann unterschiedliche, genetisch kodierte Messproben auf ihre Funktionsfähigkeit im olfaktorischen Nervensystem des Zebrafährblings untersucht.

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1 VERSUCHSTIERE UND HALTUNG.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an embryonalen und adulten Zebrabärblingen, (*Danio rerio*, Cyprinidae, Cypriniformes, Osteichthyes) durchgeführt. Verwendet wurden die wildtypischen Inzuchtstämme AB (Oregon), Tü (Tübingen) und AB/Tü Hybride aus laboreigener Zucht sowie Wildtypen aus lokalen Aquarienfachgeschäften. Die Versuchstiere wurden in 12 l Becken einer automatischen Aquarienanlage (Aquarienbau Schwarz, Göttingen) unter einem 14/10 h hell/dunkel-Regime bei 28°C gehalten und täglich zweimal mit Trockenfutter (Sera, Heinsberg) und zusätzlich mit Nauplien von *Artemia salina* (Brustmann, Oestrich Winkel) gefüttert.

Embryonen wurden durch Standardzucht gewonnen (Westerfield, 1995). Elternfische (>3 Monate) wurden in speziellen Ablaihbekken mit Netzboden gepaart und über Nacht gehalten. Die Fische beginnen bei Einsetzen der Hellphase mit der Paarung und die befruchteten Eier können aus Auffangbecken abgesammelt werden. Für Injektionsversuche, die Embryonen im Einzell-Stadium voraussetzten (20 - 40 min nach der Ablage), wurden Elternfische zum zeitlich kontrollierten Ablaihen in 2.5 l Becken mit Trennwänden über Nacht separiert und erst nach Einsetzen der Hellphase durch Entfernen der Trennwand vereinigt. Die Tiere beginnen spontan mit der Paarung und die Eier können unmittelbar nach der Befruchtung abgesammelt werden. Ein Pool von Elternfischen wurde in der Regel in 1 - 2 wöchigen Intervallen gepaart. Die Aufzucht der Embryonen erfolgte nach den Anleitungen in Westerfield (1995). Gefüttert wurde mit Jungfutter (Sera) oder Artemienlarven.

In Vorversuchen wurden juvenile Goldfische (*Carassius auratus*, Cyprinidae, Cypriniformes, Osteichthyes) aus lokalen Aquarienfachgeschäften verwendet.

#### 2 INSTRUMENTE.

##### 2.1 Präparation.

Insektennadeln:	0.1 mm, 0.2 mm (Fine Science Tools, Heidelberg)
Irisscheren:	Diverse (Fine Science Tools; Faulhaber, Frittlingen)
Kaltlichtleuchten:	Visilux 150HL (Visitool, Maulbronn)
Modellbaubohrer:	Micromot 40 (E) (Proxxon, Niersbach)
Pipettenspitzen:	GELoader Tips (Eppendorf, Hamburg)
Präparierpinzetten:	Dumont #5 (Fine Science Tools)
Polyethylenschlauch:	verschiedene Durchmesser (Fischer Scientific, Aachen)
Stereomikroskope:	SMZ-1B (Nikon, Düsseldorf) Stemi DRC (Zeiss, Göttingen) GSZ 2 (Askania, Heidelberg)
Polymer:	Sylgard (Dow Corning, Midland, USA)
Wolframnadeln:	0.5 mm, Wolframdraht, elektrolytisch geschärft (Restbestände)

### 2.2 Optische Messungen.

Computer:	PC (konventionell) mit Frame Grabber Einsteckkarte S/N 381KL0041 CD Brenner TEAC CD-R56S4 (TEAC) CD recordable (Diverse)
Digitalkamera:	Imago, 12bit CCD Kamera, wassergekühlt (T.I.L.L. Photonics, Martinsried)
Fluoreszenzmikroskop:	Axiovert S100 TV (Zeiss) mit: Objektive: Plan NEOFLUAR 10x, NA 0.3 (Zeiss) Plan NEOFLUAR 20x, NA 0.5 (Zeiss) Plan NEOFLUAR, 40x, NA 0.75 (Zeiss) Plan NEOFLUAR, 63x, NA 1.25 (Zeiss) Plan NEOFLUAR, 100x, NA 1.3 (Zeiss) LD Plan APOFLUAR, 32x LD, NA 0.4, Ph 2 (Zeiss) Okulare: 10x (Zeiss) Filtersätze: (Farbteiler - Emission): DCLP410 - LP440 DCLP500 - LP515 Q565LP - HQ610/75 DCLP460 - Multispec (s.u) C-Mount Adapter, 0.63x (Zeiss) UV Auflichtkondensator für Axiovert S100 TV (T.I.L.L. Photonics)
Monochromatorsystem:	Polychrom II (T.I.L.L. Photonics)
Spektraler Bildteiler:	MultiSpec Micro Imager MSMI-02V-HE (Optical Insights, Santa Fe, NM, USA) mit: Filtersatz: (Farbteiler - Emission 1 - Emission 2): Dichroic 505, EM480/30, EM535/40
Stereomikroskop:	(Zeiss)

### 2.3 Physiologie.

Ableitkammern:	siehe Abbildung 3B (Eigenbau)
Elektrodenpuller:	P-97 Flaming / Brown Micropipette Puller (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA)
Glaskapillaren:	GD-1 (Narishige, Tokyo, Japan) GB100-TF10 (Science Products, Hochheim) GB100F-10 (Science Products)
Kolbenspritze:	Cell Tram Oil (Eppendorf)
Mikromanipulatoren:	M3 (Märzhäuser, Wetzlar) MM33 (Märzhäuser) mit: Steuereinrichtung MS314 (Märzhäuser)
Reizgenerator:	Isolated Pulse Stimulator Model 2100 (A-M Systems, Carlsborg, WA, USA)
Peristaltische Pumpen:	Peristaltic Pump P1 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Schläuche:	Polyethylen, diverse Durchmesser (Fisher Scientific)
Schlauchklemmen:	Diverse (Restbestände)
Ventil:	6-Port 2-Kanal Injektionsventil für HPLC, 1/16" (Knauer, Berlin) mit: Steuergerät für Injektionsventil (Knauer) Fernsteuerung für Injektionsventil (Eigenbau)

## **2.4 Molekularbiologie.**

Dot-Blot Apparaturen:	Minifold (Schleicher und Schuell, Kleene) BioDot Apparat (BioRad, München)
Druckinjektor:	PV830 Pneumatic Pico Pump (WPI, Berlin)
Elektrophoresekammern:	Subcell GT (BioRad) Mini Subcell GT (BioRad) Wide Mini Subcell GT (BioRad) Eigenbauten der Universitätswerkstatt (Köln)
Elektroporator:	Gene Pulser (BioRad) mit: Pulse Controller (BioRad) Capacitance Extender (BioRad)
Entwicklermaschine:	Curix 60 (Agfa)
Feinwaagen:	Sartorius Laboratory (Sartorius, Heidelberg) Sartorius Universal (Sartorius) Sartorius Handy (Sartorius)
Fluorometer:	Lumineszenz Spectrometer LS-5B (Perkin Elmer, Weiterstadt)
Geldokumentation:	Chemi Doc (BioRad) mit: QuantityOne v4.2.1 Steuersoftware (BioRad) The Imager System (Appligene, Heidelberg) mit: UV Tisch UVT2020 (Herolab, Wiesloch) VP Thermoprinter (Seikosha, Hamburg)
Heizblöcke:	Dri-Block DB-3 (Techne) Thermomixer comfort (Eppendorf)
Heißluftöfen:	Certomat H (B.Braun, Melsungen) Hybridiser HB 1D (Techne) Polymax Inkubator (Heidolph, Schwabach) mit: Schütteltisch Polymax 1040 (Heidolph)
Konzentrator:	SpeedVac concentrator (Savant) mit: Vakuumpumpe, RD4 (Vacubrand, Wertheim) Kühlfalle, MCI (UniEquip, Martinsried)
Magnetrührer:	IKA Combimag RCH (IK) IKAMAG REO (IK) IK Ret (IK)
Motivatoren:	Royal Professional (Saeco) CR30, 4 Speaker, 2Way Power System (Telefunken)
Netzgeräte:	Power Pac 300 (BioRad) El.phor.-Powerpack P24 (Biometra, Göttingen) El.phor.-Powerpack P21 (Biometra) 2301 Macrodrive (LKB Bromma)
PCR-Geräte:	T Gradient (Biometra) Gene Amp 2400 (Perkin Elmer)
Reinstwasseranlage:	Seradest BETA 75 (USF Seral, Ransbach Baumbach)
Röntgenfilmkassetten:	IEL6040C mit Verstärkerfolien (Rigo, Augsburg)
Röntgenfilme:	XLS-I (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) X-OMAT AR (Eastman Kodak) X-OMAT LS (Eastman Kodak)

Schütteltisch:	Certomat R (B.Braun, Melsungen) IKA Vibrax-VXR (IK)
Schüttler:	Vortex - Genie Model K550-93 (Bender und Hohbein, Zürich Schweiz) Vortex - Genie 2 (Bender und Hohbein)
Spektralphotometer:	DU-52 (Beckmann)
UV-Gerät:	UV Stratalinker (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
Wasserbäder:	Thermomix BU (B.Braun) mit: Frigomix U (B.Braun) Thermomixer M (B.Braun)
Vibrator:	Pelco 101 Vibratom Series 1000 Sectioning System (TPI, St. Louis, MW, USA)
Wasserstrahlpumpen:	Diverse
Zentrifugen:	Sigma 4K10 (B. Braun) 5415D (Eppendorf) 5417 R Kühlzentrifuge (Eppendorf) Sorvall RC-5B, Refrigerated Superspeed Centrifuge (DuPont, Bad Homburg) Biofuge 13 (Heraeus)

### **2.5 Software und Computer.**

Software:	TILLvisION v2.3, v3.3 (T.I.L.L. Photonics) QuantityOne v4.2.1 Geldokumentation und Analysesoftware (BioRad) Photoshop 5.0 (Adobe, <a href="http://www.adobe.com">www.adobe.com</a> ) Freehand 9 (Macromedia, <a href="http://www.macromedia.com">www.macromedia.com</a> ) ScionImage (Scion, Public Domain, <a href="http://www.scion.com">www.scion.com</a> ) Excel, versch. Versionen (Microsoft, <a href="http://www.microsoft.com">www.microsoft.com</a> ) Word, versch. Versionen (Microsoft) NIH Image (NIH, Public Domain, <a href="http://www.nih.gov">www.nih.gov</a> ) DNASIS v2.1 (Hitachi, San Bruno, CA, USA) Metamorph v4.5r3 (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, USA) AutoDeblur v6 (Auto Quant Imaging Inc., Watervliet, NY, USA)
Computer:	PC Computer, konventionell Macintosh Power PC 8500 (Apple, <a href="http://www.apple.com">www.apple.com</a> ) Macintosh Power PC G3 (Apple) Macintosh Power PC G4 (Apple) Macintosh Quadra 700 (Apple) Macintosh Power Book 170 (Apple) iMac (Apple)

### **2.6 Bildaufnahme und Dokumentation.**

Digitalkamera:	CoolPix 900, Digital Photokamera (Nikon) mit: Viking Flash, SmartCard 64 MB (Viking Components) Kartenlesegerät SanDisk ImageMate (SanDisk)
Konfokalmikroskop:	Leica TCS SP2 Konfokalmikroskop (Leica, Bensheim)

Fluoreszenzmikroskop: Axioplan 2 Imaging (Zeiss) mit:

Filtersatz (Exzitation - Farbteiler - Emission):  
BP485 - FT510 - BP515-565  
Beleuchtungseinheit AttoArc2, HBO 100W (Zeiss)  
PlanNEOFLUAR 10x, NA 0.3 (Zeiss)  
Uniblitz Model VMM-DI Shutter Timer  
(Vincent Associates, Rochester, NY, USA)  
Digitalkamera Quantix (Photometrics)  
Metamorph v4.5r3 (Universal Imaging Corporation)

Stereomikroskop:

Fluoreszenz Stereomikroskop SMZ-U (Nikon) mit:

Filtersätze (Exzitation, Farbteiler, Emission):  
1) GFP Block: 470/40 - DM500 - BA540/40  
2) G-2A-Block: 535/40 - DM565 - BA590LP  
3) DAPI-Block: 360/40 - DM400 - BA420LP  
Lampengehäuse HMX-3B-100W, Sockel S100WB (Nikon)

### 3 METHODEN.

#### 3.1 Physiologische Arbeitsmethoden.

##### 3.1.1 Anterograde Färbung olfaktorischer Rezeptorzellen mit Aktivitätsfarbstoffen.

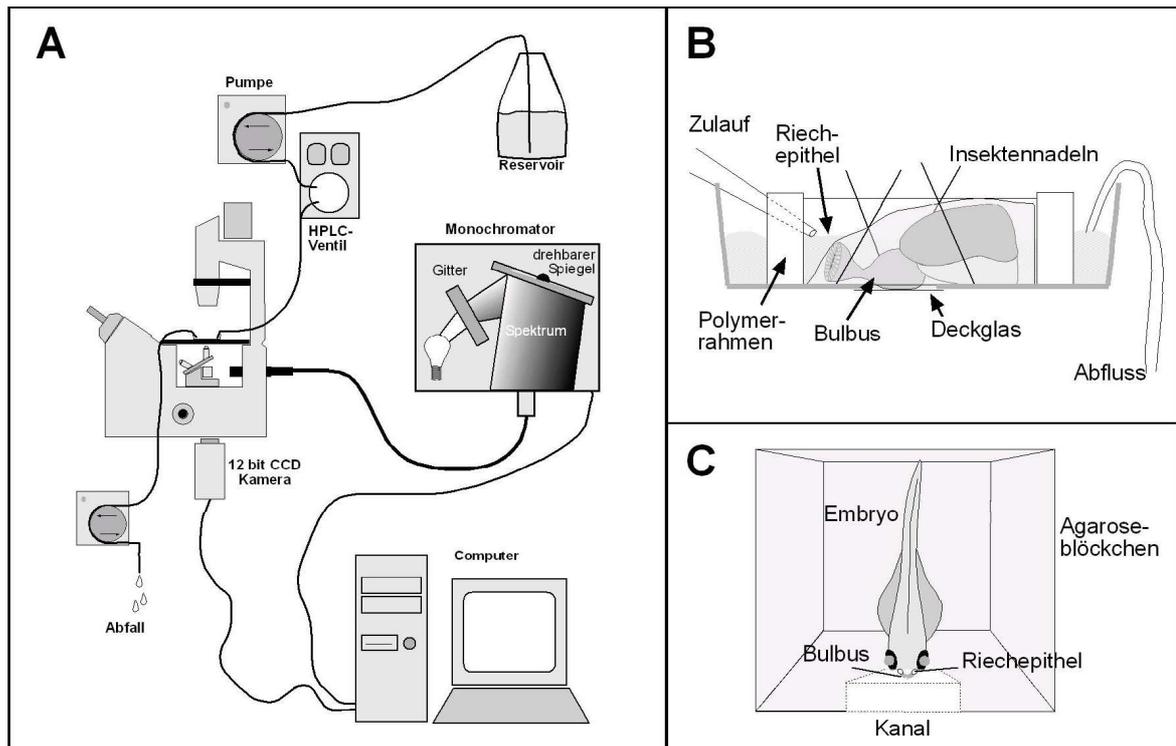
Adulte Tiere wurden mit 0.01% Tricain (3-Aminobenzoessäureethylester, Sigma; (w/v) in Aquarienwasser) immobilisiert und in feuchte Kosmetiktücher (Kimwipes Lite 200, Kleenex) eingehüllt. 1 - 1.5 µl des calciumsensitiven Farbstoffs Calcium Green™-1 dextran (MW 10.000, Molecular Probes, Leiden, Niederlande; 12% in 1.5 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, Sigma, Steinheim) wurden mit Hilfe feiner Pipettenspitzen (GELoader tips, Eppendorf) in eine, zumeist die linke, Nasenöffnung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden beide Nasenöffnungen mit Aquarienwasser gespült und die Fische in 2.5 l Becken mit frischem Aquarienwasser zurückgesetzt. Die Tiere erholten sich zumeist spontan aus der Muskellähmung, bzw. wurden durch unterstützendes Anströmen der Kiemen mit einer 2 ml Einmalpipette aufgeweckt. Während der 3 - 6 tägigen Färbepériode wurden die Fische in abgedunkelten Becken gehalten und täglich gefüttert. Durch die Behandlung mit Triton X-100 werden die Zilien der olfaktorischen Rezeptorneurone zur Erleichterung der Farbstoffaufnahme zerstört, regenerieren jedoch innerhalb von 48 h vollständig (Friedrich und Korsching, 1997). Die Calcium Green™-1-Fluoreszenz ist 48 h nach der Farbstoffapplikation im olfaktorischen Bulbus erkennbar und bleibt während der nächsten vier Tage stabil.

Der spannungsabhängige Farbstoff di-8-ANEPPQ (Molecular Probes) wurde in Stammkonzentrationen von 30 mM in DMSO/Pluronic® F-127 (Molecular Probes; 3:1 v/w) angesetzt und in Verdünnungen von 1:300 bis 1:500 (in Wasser) in gleichartiger Weise appliziert, jedoch nach Beendigung der fünfminütigen Inkubationszeit nicht wieder aus dem Riechepithel herausgewaschen.

##### 3.1.2 Präparation des olfaktorischen Systems zur Messung neuronaler Aktivität.

Zur Darstellung des olfaktorischen Bulbus wurden die Tiere nach Ende der Färbepériode (3 bis 6 Tage) rasch dekapitiert und die abgetrennten Köpfe in gekühlte ACSF (artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit: 131 mM NaCl, 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM KCl, 1.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glukose, ständige Begasung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>), pH 7.4, (Mathieson und Maler, 1988); 4°C) überführt. Durch zwei laterale Scherenschnitte, ausgehend von den Mundwinkeln und zwischen Nasenöffnung und Auge nach caudal ziehend, wurden die ventralen Anteile des Kopfes abgetrennt. Der dorsale Anteil wurde im Bereich der Kiemen mit Insektennadeln (Fine Science Tools) in der Präparierschale (mit Sylgard (Dow Corning) ausgegossene Petrischale) befestigt und das Gaumendach durch vorsichtige Scherenschnitte und mit Hilfe feiner Präparierpinzetten bis zum vollständigen Freiliegen der *Bulbi olfactorii* abgetragen. Die verbleibenden lateralen Knochen des Schädels wurden so getrimmt, dass die Bulbi bei ventraler Auflage des Präparates sanft an ein Deckgläschen angeedrückt werden, das den Boden der Ableitkammer bildet (**Abb. 3B**). Der

aus Sylgard-Polymer gefertigte Rahmen der Ableitkammer entsprach in etwa der Größe des Fischkopfes und erlaubte die Fixierung des Präparates. Durch kreuzweise in den Polymerrahmen eingesteckte Insektennadeln (0.1 mm) wurde ein sanfter Druck auf das Explantat ausgeübt und dieses luftblasen- und spielraumfrei fixiert. Die gekühlte Badlösung wurde mehrfach ausgetauscht und das Präparat anschließend durch ruhen lassen langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Messung wurde die Ableitkammer auf den Kreuztisch des Messmikroskops montiert und das Präparat an einen kontinuierlichen Perfusionsfluss (ACSF, Carbogen begast) angeschlossen (**Abb. 3A**).



**Abb. 3 – Messung neuronaler Aktivität im olfaktorischen System adulter und embryonaler Zebrafärblinge.**

- A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur optischen Aktivitätsmessung.
- B) Explantat zur Messung neuronaler Aktivität im *Bulbus olfactorius* adulter Zebrafärblinge.
- C) Agaroseeinbettung von Embryonen zur Messung neuronaler Aktivität im Riechepithel und Bulbus. Der Agaroseblock liegt mit der Unterseite auf dem Deckglas einer Ableitkammer auf.

### 3.1.3 Messung neuronaler Aktivität im *Bulbus olfactorius*.

Das Explantat wurde mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert S 100 TV, Zeiss) von ventral mit 10x, bzw. 20x Objektiven (PlanNEOFLUAR, Zeiss) betrachtet (**Abb. 3A**). Calcium Green™-1-Fluoreszenz wurde mit einem computergesteuerten Monochromatorsystem (Polychrom II, T.I.L.L. Photonics) bei 470 nm Wellenlänge angeregt. Die Anregungswellenlänge entspricht nicht exakt dem Exzitationsmaximum des Farbstoffes (495 nm), stellt aber bei dem verwendeten dichroitischen Spiegel (DCLP500) und Emissionsfilter (LP515) einen guten Kompromiss zwischen Anregungseffizienz und Hintergrundfluoreszenz dar. Fluoreszenzbilder wurden mit einer wassergekühlten 12 bit CCD

Kamera (Imago, T.I.L.L. Photonics) aufgenommen, mit 15 MHz analog/digital gewandelt und über eine Framegrabberkarte in einen konventionellen Computer eingelesen. Die Steuerung des Monochromators und der Bildaufnahme erfolgte mit der TILLvisION Software (T.I.L.L. Photonics). Aufnahmen wurden mit einer Bildrate von 2 Hz, unmittelbar vor und während der Stimulation mit Geruchsstoffen durchgeführt. Die Belichtungszeiten wurden so eingestellt, dass die mittleren Fluoreszenzintensitäten im oberen Drittel der dynamischen Bandbreite der Kamera lagen (entspricht Grauwerten zwischen 2.500 und 3.000), jedoch das Maximum (Grauwert von 4096 = 12 bit) auch während der Geruchsstimulation nicht erreichten.

Die Berechnung der  $\Delta F/F$  Bilder erfolgte *post hoc* mit entsprechenden Programmroutinen. Der Verlauf der Bleichkurve während einer Messung wurde entweder in unabhängigen, unstimulierten Serien ermittelt oder aus unstimulierten Bulbusarealen einer stimulierten Serie abgeleitet und zur Berechnung der Bleichkorrektur eingesetzt. Die Bestimmung der Bleichkurve aus einer unstimulierten Serie besitzt den Vorteil, dass sie das unterschiedliche Bleichverhalten verschiedener Fluoreszenzintensitäten und räumlicher Farbstoffverteilungen mitberücksichtigt. Der exakte Zeitverlauf der Bleichkurve einer stimulierten Serie wird jedoch durch die Bestimmung aus unstimulierten Anteilen der jeweiligen Serie genauer beschrieben. Zur Berechnung von  $\Delta F/F$  ( $= (F_t - F_0) / F_0$ , mit  $F_t$  = Fluoreszenz zum Zeitpunkt  $t$ ,  $F_0$  = Grundfluoreszenz vor der Stimulation) wurde ein Mittelwertbild aus fünf Einzelaufnahmen des Praestimulusintervalls als  $F_0$  eingesetzt. Die Routine ist als Makro in spätere Softwareversionen implementiert worden.

### 3.1.4 Stimulation mit Geruchsstoffen.

Geruchsstoffe (Tabelle 1, Fluka, Steinheim) wurden als Vorratslösungen in einer Konzentration von  $10^{-2}$  M angesetzt, bei  $-20$  °C aufbewahrt und in vierwöchigen Intervallen erneuert. Arbeitskonzentrationen wurden unmittelbar vor dem jeweiligen Experiment in ACSF eingestellt. Die Substanzen Alaninol, Putreszin, 2-Aminopropan und 2-Aminopentan wurden nicht als Vorratslösungen aufbewahrt und jeweils frisch vor der Verwendung angesetzt.

Zur Stimulation wurden die Geruchsstofflösungen über ein HPLC-Ventil (Knauer) in einen konstanten ACSF-Trägerstrom interkaliert (**Abb. 3A**). Die Flussrate betrug zwischen 1.5 und 2.5 ml/min und war während eines gegebenen Versuches konstant. Wie aus Zeitverläufen mit fluoreszenten Probestimuli (Rhodamindextran) abgeschätzt werden konnte, erreichten die Stimuli am Explantat eine Konzentration von 70% der eingesetzten Konzentration. Im Folgenden wird jeweils die injizierte Stimuluskonzentration angegeben. Sofern keine Konzentrationsangaben gemacht werden, wurden Standardkonzentrationen von  $10^{-4}$  M verwendet. Zwischen zwei Stimuluspräsentationen wurden Ruheintervalle von mindestens 3 min eingehalten um Adaptations- und Desensibilisierungseffekte zu vermeiden.

In Adaptationsversuchen wurde die neutrale Trägerlösung gegen eine aminosäurehaltige Adaptationslösung ausgetauscht. Der adaptierende Stimulus, jeweils eine Aminosäure, wurde in einer Konzentration von  $10^{-4}$  M in ACSF angesetzt. Der Wechsel der Lösung erfolgte durch Umschalten eines 3-Wegehahns in etwa 50 cm Entfernung zur

Präparation. Während der Adaptationszeit wurden Aufnahmen in 30 s Intervallen aufgezeichnet. Nach dem Wechsel der Lösung stieg die Fluoreszenz im olfaktorischen Bulbus zunächst stark an, erreichte ein Maximum nach ca. 60 s und fiel während der nächsten drei min langsam ab. Nach 10 min konnte die Adaptation als vollständig angesehen werden. Geruchsstoffe wurden in der gleichen Konzentration eingesetzt wie die zur Adaptation eingesetzte Aminosäure ( $10^{-4}$  M) und wurden vor, während und nach der Adaptation präsentiert. Die Readaptation wurde durch erneuten Wechsel auf reine ACSF-Trägerlösung erzielt. Nach weiteren 10 min waren die Muster der evozierten Geruchsantworten von praeadaptiven Signalen ununterscheidbar.

### **3.1.5 Bildtransformationen.**

#### ***Bildjustage.***

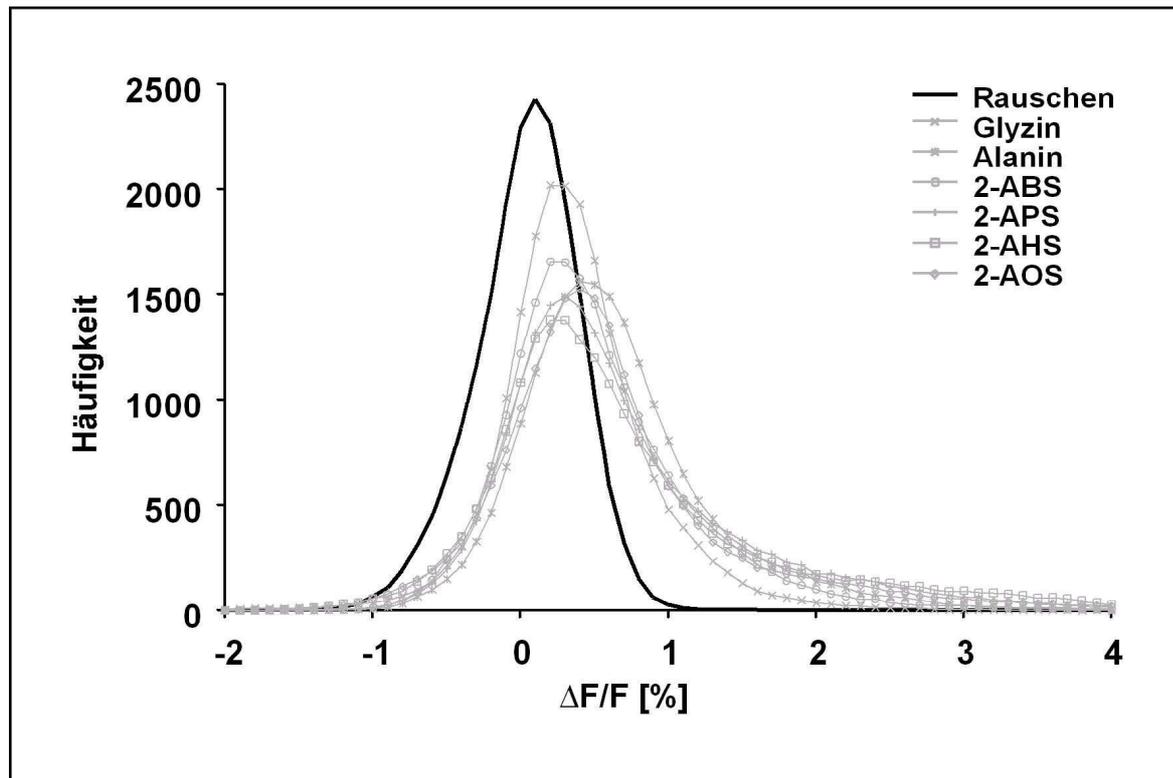
Zur Berechnung von Mittelwertbildern aus Stimuluswiederholungen und für quantitative Bildvergleiche innerhalb einer Präparation wurden Einzelbilder zunächst aufeinander justiert. Dazu wurden in jedem Bild die Koordinaten von mindestens 3 charakteristischen und identifizierbaren Bildpunkten bestimmt und die Einzelbilder um den entsprechenden Differenzbetrag in Bezug auf ein Referenzbild verschoben.

#### ***Subtraktionsanalyse.***

Zur qualitativen Darstellung der selektiven Aktivierung von Einzelfoki wurden die Antwortmuster von Stimuluspaaren miteinander verglichen. Die Antwortbilder von 4 Stimuluswiederholungen wurden aufeinander justiert und gemittelt. Anschließend wurden die Mittelwertbilder des angestrebten Vergleichs in allen Kombinationen pixelweise voneinander subtrahiert. Negative Werte wurden einheitlich auf 0 gesetzt (*clipped difference*) und die Differenzbilder falschfarbenkodiert. Die Berechnung wurde jeweils in beide Richtungen durchgeführt. Bildpunkte, die selektiv in einem der stimulierten Antwortmuster aktiviert wurden, treten als Differenzfoki in den subtrahierten Differenzbildern hervor.

#### ***Bestimmung der Antwortfläche.***

Es wurde nach einem quantitativen Maß gesucht, welches das Auftreten eines signifikanten Signals vor dem Hintergrundrauschen beschreibt und einen Vergleich der Gesamtintensität verschiedener Antwortmuster zulässt. Signifikanztests nach Kolmogorof-Smirnoff und der  $\chi^2$ -Test erwiesen sich bei dem betrachteten Stichprobenumfang von 20.000 Pixelwerten/Bild als zu sensitiv (die Intensitätsverteilungen zweier unstimulierter Rauschbilder waren bereits hochsignifikant voneinander verschieden). Daher wurde die Ausdehnung der antwortenden Oberfläche oberhalb eines Schwellenwertes zur Quantifizierung herangezogen. Das Schwellenkriterium, oberhalb dessen ein Signal als verlässlich anzusprechen ist, wurde in einer Rauschanalyse ermittelt. Dazu wurden in 200 x 100 Pixel umfassenden Bildausschnitten unstimulierter Serien ( $n = 7$ ) die Intensitätsverteilungen bestimmt, übereinander gemittelt und die Kenngrößen der Intensitätsverteilung des Rauschens erfasst (**Abb. 4**).



**Abb. 4 – Bestimmung des Schwellenkriteriums zur Quantifizierung der Antwortfläche**

Häufigkeitsverteilungen der  $\Delta F/F$ -Werte in einem 200 x 100 Pixel Bildausschnitt des Hintergrundrauschens und stimulusinduzierter Signale für sechs Aminosäuren. Der Verteilungsmittelwert des Rauschens beträgt 0.04%, die Standardabweichung 0.365%. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte aus 7 Messungen in 7 Präparaten.

Der Gesamtmittelwert (MW) des Bildrauschens lag bei  $0.04\% \pm 0.36\%$  Standardabweichung ( $\sigma$ ). Entsprechend berechnen sich die Mittelwerte mit zwei-, bzw. dreifacher Standardabweichung zu 0.77 und 1.13%. Da der  $MW \pm 2\sigma$  bereits 96% aller Werte und  $MW \pm 3\sigma$  schon 99.7% aller Werte enthält, beträgt der Restfehler oberhalb dieser Werte jeweils 2%, bzw. 0.15%, da nur einseitig verglichen wurde. Bei einem Schwellenkriterium von 1%  $\Delta F/F$  werden in unstimulierten Bildausschnitten entsprechend zwischen  $\ll 2\%$  und  $> 0.15\%$  aller gezählten Pixel irrtümlich positiv gewertet. Ein Vergleich mit den auftretenden Intensitätsverteilungen stimulierter Antwortmuster für sechs Aminosäuren ist in **Abbildung 4** enthalten.

Zur Bestimmung der Antwortfläche wurde die gesamte Ausdehnung des Signals in einen 200 x 100 Pixel umfassenden Bildausschnitt eingefasst. In manchen Präparaten musste die Bildfläche zuvor um einen konstanten Betrag rotiert werden um durch den rechtwinkligen Bildausschnitt eingefasst werden zu können. Für ein bestimmtes Präparat wurden identische Bildausschnitte gewählt, bei Präparatverschiebung während eines Experimentes wurden die Einzelserien vorher anhand markanter Bildpunkte aufeinander justiert. Die Pixelwerte des Bildausschnittes wurden in Excel (Microsoft) überführt und die Anzahl aller Pixel oberhalb des Schwellenkriteriums von 1%  $\Delta F/F$  bestimmt. Aufgrund der starken Unterschiede in den Signalintensitäten verschiedener Präparate, wurden die Werte eines konkreten Vergleichs (z.B. Carbonsäure und Aminosäure einer bestimmten Kettenlänge) auf einen für diesen

Vergleich festgelegten Referenzwert (z.B. das Aminosäuresignal der entsprechenden Kettenlänge oder den Mittelwert aller Antworten) normiert (nAF = normierte Antwortfläche). Die normierten Werte konnten anschließend über verschiedene Präparate gemittelt werden.

**Bestimmung des Differenzindex DI zur quantitativen Bewertung der Musterunterschiede zweier Signale.**

Die räumlichen Musterunterschiede der Antworten zweier Stimuli sollten ebenfalls quantitativ bewertet werden. In Antwortbildern wurde nach dem oben angegebenen Verfahren zunächst ein 200 x 100 Pixel umfassender Bildausschnitt ausgewählt. Um Unabhängigkeit von der Signalstärke verschiedener Einzelfoki zu gewinnen, wurden die Pixelwerte der Auswahlfläche zunächst einer Z-Transformation nach der Vorschrift:

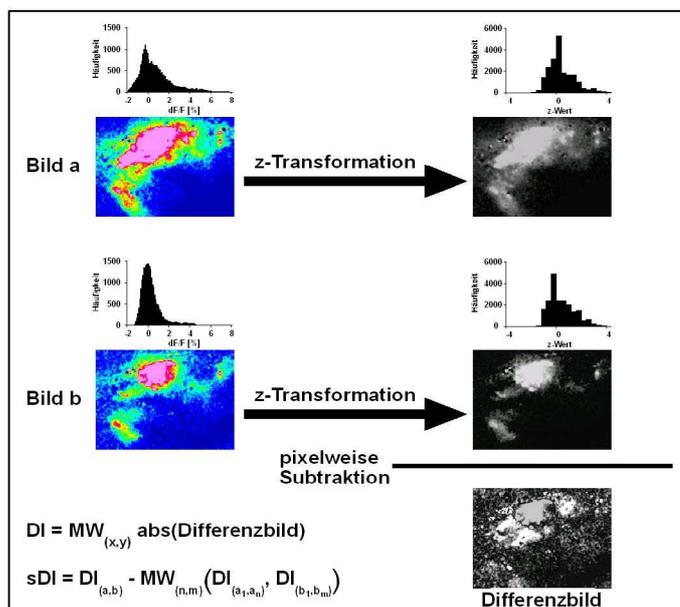
$$zI_{(x,y)} = (I_{(x,y)} - MW_{I(x,y)}) / \sigma_{I(x,y)} \quad x = 1-200, y = 1 - 100$$

(mit  $zI_{(x,y)}$  = Z-Wert des Pixels x, y;  $I_{(x,y)}$  = Intensitätswert des Pixels x, y,  $MW_{I(x,y)}$  = Mittelwert und  $\sigma_{I(x,y)}$  = Standardabweichung aller x \* y Pixelwerte)

unterworfen. Das Ergebnis der Z-Transformation ist eine Normierung der Pixelwerte des Bildausschnitts auf einen Mittelwert von 0 mit einer Standardabweichung von 1 (Abb. 5). Ein Unterschiedsmaß wurde definiert als Differenzindex (DI, nach Kent und Mozell, 1992; Johnson et al., 1998):

$$DI(a,b) := \frac{\sum_{x=1-200, y=1-100} abs(zIa_{(x,y)} - zIb_{(x,y)})}{x * y}$$

(mit  $DI(a,b)$  = Differenzindex des Vergleichs zwischen Bild a und b,  $abs$  = Absolutbetrag,  $zIa_{(x,y)}$  = z-Wert des Pixels (x,y) in Bild a,  $zIb_{(x,y)}$  = z-Wert des Pixels (x,y) in Bild b).



**Abb. 5 – Berechnung des Differenzindex DI zur Quantifizierung von Musterunterschieden.**

Zur quantitativen Beschreibung von Unterschieden in den Antwortmustern zweier Stimuli wurden Differenzindizes (DI) berechnet. Die zu vergleichenden Bilder (a und b) wurden durch eine Z-Transformation auf Mittelwert = 0 und Standardabweichung = 1 normiert. Anschließend wurden die transformierten Bilder pixelweise voneinander subtrahiert und der Mittelwert der Absolutbeträge der Pixeldifferenzen gebildet. Dieser Wert ist ein Maß für die Unterschiedlichkeit zweier Bilder und beträgt  $DI = 0$  für identische Bilder und  $DI \approx 1$  für reines Rauschen. Der spezifische Differenzindex (sDI) berücksichtigt die Variabilität von Stimuluswiederholungen.

Der Differenzindex (DI) beschreibt also den Mittelwert der Absolutbeträge aller Pixeldifferenzen identischer Bildpunkte zweier Z-normierter Bilder. Dieser Wert ist ein Maß für die Unterschiedlichkeit zweier gleichgroßer Bilder und beträgt  $DI = 0$  für zwei identische Bilder und  $DI \approx 1$  für den Vergleich reiner Rauschbilder. Zur vereinfachten Darstellung wurde der spezifische Differenzindex sDI verwendet, der die Variabilität wiederholter Messungen eines Stimulus mitbewertet:

$$\mathbf{sDI(a,b)} := \mathbf{DI(a,b)} - \mathbf{MW(DI(a_1,a_n), DI(b_1,b_m))}$$

(mit  $sDI(a,b)$  = spezifischer DI des Vergleichs zwischen Bild a und Bild b,  $DI(a,b)$  = Differenzindex des Vergleichs zwischen a und b,  $DI(a_1,a_n)$  = Differenzindizes aller möglichen Bildpaarungen bei n Stimuluswiederholungen von Stimulus a, MW = Mittelwert).

### **3.1.6 Vorversuche zur Darstellung der Mitralzellen.**

Mitralzellen sind die prinzipiellen Ausgangsneurone des olfaktorischen Bulbus. Ihre Axone verlassen den Bulbus über den lateralen und medialen olfaktorischen Trakt und münden in das dorsale Telencephalon ein. In Vorversuchen wurden unterschiedliche Verfahren getestet, Mitralzellen und deren intrabulbären Verbindungen darzustellen und für physiologische Untersuchungen zugänglich zu machen. Verschiedene Farbstoffe und Applikationsmethoden kamen dabei zur Anwendung. Dünn ausgezogene Glasfasern (Lichtleiter einer Kaltlichtleuchte) wurden mit dem lipophilen Farbstoff DiI (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyaninperchlorat, Molecular Probes) beschichtet und in frisch präparierten Gehirnen für mehrere Stunden in die Trakte inseriert ( $n = 5$ ). Das Präparat wurde anschließend sanft fixiert (0.5% PFA in PBS) und über Nacht zur Farbstoffausbreitung entlang der Mitralzellaxone bei  $30^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Es konnten recht große Somata ( $\approx 15 \mu\text{m}$ ) und in Einzelfällen dendritische Fortsätze beobachtet werden. Die Methode wies jedoch eine recht hohe und diffuse Hintergrundfluoreszenz durch unspezifische Ausbreitung des Farbstoffs im gesamten Bulbusgewebe auf. Die relative Dicke der Nadeln und schwierige Handhabbarkeit während der Insertion waren die limitierenden Faktoren dieses Ansatzes. Darüber hinaus waren die langen Tracingzeiten und die Fixierung zum Gewebeerhalt unvereinbar mit einer Nutzenanwendung in physiologischen Präparaten. Es wurde daher versucht, die Präparate durch Kühlen über Nacht in physiologischer Lösung (ACSF) lebendig zu erhalten. Die Kühlung des Präparates hatte einen nur mäßigen Erfolg bezüglich des Gewebeerhaltes, wirkte jedoch der Farbstoffausbreitung massiv entgegen.

In einer Abwandlung der Methode wurde DiI-Lösung (5 mg/ml in DMSO) über eine Mikropipette entweder durch Druckapplikation (Cell Tram oil, Eppendorf) oder iontophoretisch (Isolated Pulse Stimulator, A-M Systems) in die Trakte appliziert. Das Verfahren führte eindeutig zu besseren Ergebnissen bezüglich der unspezifischen Hintergrundfärbung und wurde bei den Vorversuchen mit aktivitätsabhängigen Farbstoffen wieder aufgegriffen.

Zur Darstellung der zellulären Architektur und der Gesamtzahl der Mitralzellen sowie ihrer Beziehungen zu den Glomeruli, wurde versucht bulbäre Afferenzen und Efferenzen simultan zu färben ( $n = 5$ ). In Gehirnexplantaten wurde der olfaktorische Nerv in einen, auf den Durchmesser des Nerven getrimmten, dünn ausgezogenen Polyethylenschlauch eingesaugt. Die Trakte sind durch die Myelinisierung der Fasern deutlich in unbehandelten Präparaten erkennbar. Mit hakenförmigen Wolframnadeln wurden sie zunächst von umgebendem Gewebe freipräpariert und ebenfalls in Polyethylenschläuche eingesaugt. In einigen Fällen wurde versucht, durch die Applikation einiger Tropfen Gewebeklebers (Cyanakrylat, Krazy Glue) eine bessere Dichtung zu erzielen. Die Schlauchkapillaren wurden am Rande der Präparierschale mit Knetmasse befestigt und das Explantat mit ACSF bedeckt. Der Inhalt der Kapillaren wurde vorsichtig gegen Cobalt-, bzw. Nickelchloridlösung (1% in ACSF) ausgetauscht und das Präparat über Nacht zur Ausbreitung der Ionen bei 4°C aufbewahrt. Vor der Entwicklung wurden die Saugkapillaren rasch entfernt, sodass keine Lösung in die Präparierschale gelangen konnte. Anschließend wurde das Präparat durch Zugabe einiger Tropfen gesättigter Dithiooxamidlösung (Sigma, 70% Ethanol über Niederschlag) entwickelt. Nickelionen komplexieren blau, Cobaltionen orange. Leider zeigte sich, dass die Ausbreitung der Ionen nicht selektiv auf die Fasern beschränkt war. Das Gewebe wies einen hohen Grad an Hintergrundfärbung auf und war letztendlich für eine Analyse unbrauchbar.

In einer Abwandlung dieser Methode wurde versucht, die Trakte über Saugkapillaren mit Neurobiotin (Vector, Burlingame, CA, USA; 0.1% in H<sub>2</sub>O) zu füllen und in den Bulbus zurück zu verfolgen ( $n = 5$ ). Nach Ende der Inkubationsperiode wurde mit Streptavidin-gekoppelter Meerrettichperoxidase (Vector) inkubiert und mit 0.05% Diaminobenzidin, 0.1% NiCl<sub>2</sub>, 0.1% CoCl<sub>2</sub> durch Zugabe von 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entwickelt. Es wurden ähnlich schlechte Ergebnisse erzielt, wie mit der Nickel / Cobalt-Methode. In einem Fall konnten jedoch Somata der Mitralzellen und dendritische Fortsätze dargestellt werden.

### 3.1.7 Retrograde Färbungen des olfaktorischen Bulbus mit Aktivitätsfarbstoffen.

Keines der oben erwähnten Verfahren führte zu verlässlichen Färbungen der Mitralzellen, die in physiologischen Präparaten zur Anwendung geeignet gewesen wären. Iontophoretische Applikation und Druckapplikation der Farbstoffe über Mikrokapillaren in die Trakte ergaben im Vergleich die besten Ergebnisse. Daher wurde versucht, an lebenden und immobilisierten Tieren, ein Verfahren zu entwickeln, diese Methode auch für physiologische Anwendungen nutzbar zu machen.

Zunächst wurde mit Zebraabärblingen, später mit Goldfischen gearbeitet. Goldfische besitzen im Gegensatz zum Zebraabärbling einen wesentlich längeren olfaktorischen Trakt. Die *Bulbi olfactorii* sind anatomisch weiter rostral gelegen als beim Zebraabärbling und grenzen nicht direkt an das Vorderhirn an. Die Trakte erscheinen als verbindendes Band zwischen den Bulbi und dem Telencephalon und sind von der Dorsalseite her leicht zugänglich. Die Tiere wurden mit 0.01% Tricain wie unter III.3.1.1 beschrieben immobilisiert und in eine, mit feuchten Schwämmen ausgekleidete Kammer überführt und

fixiert. Zur Unterstützung der Tiere während des Eingriffs, wurde kontinuierlich frisch belüftetes Aquarienwasser mit 0.005% Tricain über eine Pipettenspitze oral zugeführt. Durch Scherenschnitte wurde die dorsale Kopfhaut im Bereich des Frontale entfernt und der Knochen mit einem feinen Modellbaubohrer (Proxxon) ausgedünnt. Mit feinen Pinzetten konnte dann das Frontale entweder abgehoben oder zur Seite geklappt werden. Nach Resektion des Fettgewebes war eine Aufsicht auf das Telencephalon und die anterioren Bulbusabschnitte (Zebrafisch), bzw. die olfaktorischen Trakte (Goldfisch) möglich.

Farbstoffe (Calcium Green-1 dextran, 12% in 1.5 M NaCl; di-8-ANEPPQ, Verdünnung 1:100 der 30 mM Stammlösung) wurden iontophoretisch oder durch Druckinjektion mit einer Kolbenspritze (Cell Tram oil, Eppendorf) so lange über eine Mikrokapillare in die Trakte perfundiert bis eine deutliche Fluoreszenz erkennbar wurde. Während der Perfusionszeit wurde die Wunde in regelmäßigen Abständen mit gekühlter und sterilfiltrierter ACSF gespült. Nach Beendigung der Applikation wurde der Knochen zurückgelegt und die craniale Öffnung mit einem Tropfen Gewebekleber versiegelt. Die Tiere erwachten in frischem Wasser spontan aus der Betäubung und wurden vor der Messung für mindestens zwei Tage in abgedunkelten Becken gehalten. Die Farbstofffluoreszenz war hauptsächlich in den Trakten und im posterioren *Bulbus olfactorius* detektierbar. Morphologische Feinstrukturen konnten im olfaktorischen Bulbus nicht aufgelöst werden.

### **3.1.8 Versuch einer Messung neuronaler Aktivität der Mitralzellen.**

Von den retrograd gefärbten Tieren wurden, wie unter **III.3.1.1** beschrieben, reduzierte Präparationen zur physiologischen Untersuchung angefertigt und in analoger Weise vermessen. Das di-8-ANEPPQ Signal wurde mit 450 nm Wellenlänge angeregt. Die Präparate waren durch eine dichtsitzende Polyethylen-Saugelektrode über den olfaktorischen Nerven elektrisch stimulierbar (Isolated Puls Stimulator, AM Systems). Die beobachteten Signale waren deutlich calciumabhängig. Austausch der Badlösung gegen calciumfreien Ringer führte zu einem Verlust der Erregbarkeit. Antworten auf Geruchsstoffstimuli konnten in diesen Präparaten nicht evoziert werden.

Aufgrund der Fluoreszenzverteilung im Bulbus und des Fehlens lokalisierter Signale musste davon ausgegangen werden, dass die Farbstoffaufnahme nicht selektiv in den Axonen der Mitralzellen stattgefunden hat. Vielmehr konnte von einer Aufnahme des Farbstoffs durch das gesamte Bulbusgewebe ausgegangen werden, die keine Abschätzung des Anteils der unterschiedlicher Zelltypen (Riechsinneszellen, Mitral- und Körnerzellen) zuließ. Die Zielsetzung dieser Versuche war ein selektiver Vergleich zwischen den Antwortmustern der olfaktorischen Eingangsseite (der Rezeptorneurone) und der Ausgangsseite (Mitralzellen) der Glomeruli. Daher wird eine selektive Färbung der Mitralzellen benötigt. Da alle bisher versuchten Methoden nicht annähernd zufriedenstellend waren, wurde zu einem molekularbiologischen Ansatz gewechselt.

### 3.1.9 Messung neuronaler Aktivität der olfaktorischen Rezeptorneurone transient transgener und wildtypischer Embryonen.

Da bisher keine physiologischen Hinweise darauf vorliegen, ab welchem Stadium der Individualentwicklung das olfaktorische System funktionell entwickelt ist und der Einsatz der genetisch exprimierten Calciumsensoren im Rahmen dieser Arbeit erst etabliert werden sollte, wurden zunächst embryonale Kontrollpopulationen mit Calcium Green™-1 dextran behandelt. Die Handhabung dieser Messprobe ist etabliert und hilft den Zeitpunkt des Auftretens der ersten Geruchsantworten abzuschätzen. Die Kenntnis dieses Zeitpunktes ist für die Bewertung der Funktion der genetischen Messproben in den ersten Tagen der Embryonalentwicklung unerlässlich. Calcium Green™-1 dextran (10.000 MW, 20 mM in 130 mM KCl; (Zimprich et al., 1998)) wurde in Embryonen im 2-128 Zellstadien injiziert und die Tiere zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten (24, 48 und 72 hpf) untersucht.

Transient transgene Fische wurden durch Injektion verschiedener Reporterkonstrukte, wie in Abschnitt III.3.4 beschrieben, hergestellt. Die Konstrukte prOMP<sub>1,3</sub>-CaMG, prOMP<sub>1,3</sub>-CaME, prOMP<sub>1,3</sub>-I, prOMP<sub>1,3</sub>-F und prOMP<sub>1,3</sub>-R (zur Klonierung dieser Konstrukte siehe III.3.2.22) wurden in Konzentrationen von 50 ng/μl (in 5 mM Tris-HCl, 0.25% Phenolrot, Invitrogen Life Technologies) in Einzell-Stadien injiziert. Plasmidinjizierte Embryonen wurden unmittelbar vor dem Versuch auf transient transgene Fische mit einem Fluoreszenz Stereomikroskop (SMZ-U, Nikon) durchsucht und die Anzahl reporter-genexprimierender Riechsinneszellen bestimmt.

Individuelle Embryonen wurden in 2% Agarose (Seakam® Gold agarose, FMC BioProducts, Rockland, MN, USA) eingebettet und die erstarrte Agarose so getrimmt, dass eine optimale Aufsicht auf die olfaktorischen Plakoden und den olfaktorischen Bulbus gegeben war (**Abb. 3C**). Die Agaroseblöckchen wurden dann in Ableitkammern mit Deckglasboden überführt und mit zusätzlicher Agarose in die Ableitkammer eingegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde ein keilförmiger Kanal, dessen Spitze in Richtung auf das olfaktorische Epithel wies, herausgelöst und das olfaktorische Epithel von Agarose befreit. Die Ableitkammer wurde auf ein inverses Mikroskop montiert und mit frischem Embryonalmedium (Westerfield, 1995) kontinuierlich perfundiert. Geruchsstoffe und depolarisierende Lösungen (150 mM KCl, oder 100 mM NH<sub>4</sub>Cl in Embryonalmedium) wurden entweder durch ein HPLC-Injektionsventil in den Flüssigkeitsstrom interkaliert oder durch vorsichtiges Pipettieren in die Badlösung appliziert.

Optische Messungen wurden, wie für adulte Fische beschrieben, durchgeführt. Exzitationswellenlängen für die unterschiedlichen Indikatoren waren wie folgt: prOMP<sub>1,3</sub>-CaME: 450 nm, prOMP<sub>1,3</sub>-I: 475 nm, prOMP<sub>1,3</sub>-F: 470 nm, prOMP<sub>1,3</sub>-R: 410 und 475 nm simultan. Die Messung erfolgte mit Ausnahme des CaMeleons, wie in III.3.1.3 beschrieben. Die Fluoreszenz der *Cameleon* exprimierenden Embryonen wurde durch ein MultiSpec Micro Imager Modul (Optical Insights) betrachtet, das auf der Emissionsseite zwei spektral unterschiedliche Halbbilder erzeugt. Ein Halbbild entspricht der Fluoreszenzemission der CFP-Komponente des *Cameleons*, das zweite der YFP-Komponente (zur Funktionsweise der molekularen Calciumindikatoren siehe auch II.3.3). Angeregt wurde mit 450 nm Wellenlänge. Die spektralen Halbbilder wurden *post hoc* mit einer Makroroutine für TILLVISION

(freundliche Unterstützung durch Dr. Peter Messler und Hans Breuer, T.I.L.L. Photonics) zunächst aufeinander justiert und dann als Einzelsequenzen abgespeichert. Aus den Einzelsequenzen wiederum wurden die Verhältnisse der Fluoreszenzmissionen der beiden Farbstoffkomponenten ( $\text{Ratio}_{\text{YFP/CFP}}$ ) berechnet. Die Belichtungszeiten waren für die jeweiligen Indikatoren unterschiedlich und betragen 40 bis 200 ms.

## **3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden.**

### **3.2.1 Chemikalien und kommerzielle Verfahren.**

Sofern nicht näher bezeichnet, wurden Grob- und Feinchemikalien von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Aldrich (Deisenhofen), Merck Eurolab (Darmstadt), Fluka (Steinheim), AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Mallinckrodt Baker (Deventer, Holland) bezogen. Für gelelektrophoretische Standardauftrennungen und die überwiegende Anzahl der Blotting Gele wurde die Agarose der Firma Eurobio (Les Ulis Cedex, Belgien) verwendet. Für genomische Southern-Blots wurde die LE Agarose der Firma Promega (Madison, WI, USA) benutzt. Kommerzielle molekularbiologische *Kits* für die Aufreinigung von Plasmid DNA und PCR-Produkten, Gelextraktion und RNA Isolation wurden von den Firmen QIAGEN (Hilden), Sigma (Deisenhofen) und Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) bezogen.

### **3.2.2 Lösungen.**

Standardlösungen für die Molekularbiologie wurden nach dem Laborhandbuch „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) hergestellt. Die Rezepte aller gängigen Lösungen und Medien wie: LB-Medium, LB-Agar, SOB-Medium, SOC-Medium, Antibiotika (Ampizilin: amp, Tetrazyklin: tet, Kanamyzin: kan), IPTG, X-Gal, TAE-Laufpuffer, TBE-Laufpuffer, PBS, TE-Puffer, 10x Ladepuffer, SSC, SDS, EDTA finden sich dort. Nicht gelistete Lösungen sind bei den entsprechenden Verfahrensbeschreibungen vermerkt. Als Lösungsmittel wurde deionisiertes und autoklaviertes Wasser aus einer Seral Wasseraufbereitungsanlage (USF Seral) verwendet. Prozentangaben bezeichnen (w/v).

### **3.2.3 Enzyme.**

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt a.M.) und Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), T4 DNA Ligase, Rapid DNA Ligation Kit, T4 DNA Polymerase, Taq Polymerase, Expand High Fidelity Polymerase, Klenow Enzym, T7, T3 und SP6 RNA Polymerasen von der Firma Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Alkalische Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase, Tested user friendly) von USB (Cleveland, OH, USA), HiFi Taq Polymerase, Platinum Taq Polymerase, Superscript II Reverse Transkriptase von Invitrogen Life Technologies, Prime RNase Inhibitor von 5Prime -> 3Prime (Boulder, CO, USA), Collagenase Typ 1 von Worthington Biochemical Corporation (Freehold, NJ, USA), RNase A und Proteinase K von Sigma (Deisenhofen), RNase freie DNase von Promega (Mannheim), Advantage KlenTaq Polymerase Mix von Clontech (Heidelberg) bezogen.

**3.2.4 Nukleinsäuren.*****Primer.***

Synthetische Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech (www.mwgdna.com), Sigma-Ark (www.sigma-ark.com) oder Invitrogen Life Technologies (www.lifetech.com) bezogen und als Vorratslösungen in Konzentrationen von 100 mM bei -20°C aufbewahrt. Arbeitskonzentrationen wurden auf 10 mM eingestellt und bei -20°C gelagert. Die Aliquots wurden mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren.

Im Einzelnen wurden die folgenden Primer benutzt:

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz, 5' -&gt; 3'</b>	<b>Tm [°C]</b>	<b>Anwendung</b>
ACSF-0:	AGTG TTCAGGTTCTAGAGCTATG	58.9	K
ACSF-1:	GACTCCAAGGACTCACCAGGG	63.7	K
ACSF-2:	CTCCAGTGATTGGGATCCGCC	63.7	K
ACSF-4:	GTAAAACCACCATCTGCCATTG	60.6	K
OMP-0:	CAAGGACACACAGTAGACGC	59.4	S
OMP-(-0):	GACGCATCATCTCCGTCAGC	61.4	S
OMP-1:	TGGACCCC(AGCT)GACCT(GC)ACCAAC(CT)T(AGCT)ATG	68.8	K
OMP-2:	AA(AG)TACAT(AGCT)AC(CT)TT(AGCT)C(GT)AGTAT(CT)TT(AGCT)GC	58.2	K
OMP-3:	GGAACAGACTGACCAGAAGAG	59.8	S
OMP-4:	CAGAAAAGCAGCCAAATTTGAG	56.5	S
prOMPnco:	CATGCCATGGTGTGTTTTTTTAACTT	58.9	M, K
prOMPndeco:	GGAATTCATATGGTGTGTTTTTTTAACTTACCG	63.3	M, K
prOMP(-1):	GCTTCCAAAATCACCCCGGTG	61.8	S
prOMP(-2):	CAGGCTATTCTCACCCGGTC	61.4	S
dlx2-nco:	CTCCAGCCATGGTTTTTCATACCGCAAAGCAC	72.6	M, K, S
tau-nco:	CATGCCATGGCCGCTGCTCACCG	71.3	M, K, S
tau-ndeco:	GGAATTCATATGGCTGAGCCCCGCCAG	71	M, K, S
IRES-ndeco:	GGAATTCATATGTGTGGCCATATTATCATCG	68.8	M, K
IRES-nco:	CATGCCATGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCG	72.6	M, K
dsRed-ndeco:	CGGAATTCATATGGTGCGCTCCTCCAAGAACG	72	M, K, S
dsRed-not:	GCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGG	59.7	M, K, A
dsRed-upstr:	GATCTCGAACTCGTGGCCGTTT	66.7	S, A
EYFP-ndeco:	GGAATTCATATGGTGAGCAAGGGCGAG	71.1	M, K,
EYFP-not(nde):	GGAATTCATATGCCTCTACAAATGTGGTATG	68.8	M, K
EYFP-upstr:	CACGCTGAACTTGTGGCCGTTTAC	67.3	S, A

M13-Fwd:	GTAAAACGACGGCCAGT	52.8	S, A
M13-Rev:	GGAAACAGCTATGACCATG	54.5	S, A
T3:	AATTAACCCTCACTAAAGGG	53.2	S, A
T3-high:	GCGCAATTAACCCCTCACTAAAGGG	65.6	S, A
T7:	GTAATACGACTCACTATAGGGC	58.4	S, A
T7-hi:	GCGTAATACGACTCACTATAGGGC	62.7	S, A
T7-high:	GCGCGTAATACGACTCACTATAGGGC	69.3	S, A, K
T7 T-Vector:	CGACTCACTATAGGGCGAATTGGG	67.3	S, A
T7-pcDNA:	AATACGACTCACTATAGGGAG	45	S, K
T7 pSPORT1:	TACGACTCACTATAGGGAAAGCTGG	65.9	S, K, A
T7 RACE:	ATAGGGAAAGCTGGTACGCCTGC	67	K
SP6:	CTATTTAGGTGACACTATAGAATAC	56.4	S, A
SP6 T-Vector:	TGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAG	68.9	S, A
SP6-pcDNA:	ATTTAGGTGACACTATAGAATAG	56.3	S, A, K
B338 T3:	GGATCCATTAACCCTCACTAAAGGGAAGAGCTATGACGTCGCAT	74.1	M
B338 T7:	GGAAGCTCTAATACGACTACATATAGGGAAAGCTGGTACGCCTGCA	75	M
SV40:	CAAATGTGGTATGGCTGA	50	S, A
Ther:	GATTAGCGGTGACAGCAATG	47	A
Thin:	CCGGCGCGCACTGGATGCG	57	A
Ther-inv:	CATTGCTGTCACCGCATATC	47	K
Thin-inv:	CGCATCCAGTGC GCGCCGG	57	K
ztxbr-deg:	CKNGGYTGRYATYTRTG	56.3	K
ztxbr-upw:	GGCAGTCACTGCAATGAACTGG	64.9	K
AB-OMPkpn-1	CGGGGTACCCCTGATGTCCAGCTGACGGAG	78	M, K
AB-OMPkpn-2	CGGGGTACCCCGGACTCAAGCCGTCTTCAAAGG	78.8	M, K
pQE-Reverse	GTTCTGAGGTCATTACTGG	57.1	S, A
pQE-III/IV	CGGATAACAATTCACACAG	55.9	S, A
Adapterprimer	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT	67	P

K: Klonierung, S: Sequenzierung, A: Analytische PCR, M: Motiveinbau,  
P: präparative PCR

Die Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotide ( $T_m$ ) wurden von den Herstellerangaben übernommen. Bei Oligonukleotiden, die zu einem Motiveinbau verwendet wurden, wurde die Schmelztemperatur des bindenden Motivs nach der Faustformel:  $T_m [^\circ\text{C}] = (2 \times (A, T)) + (4 \times (G, C))$  berechnet und die Schmelztemperatur in der Polymerase Kettenreaktion auf  $2^\circ\text{C}$  unterhalb dieses Wertes eingestellt.

### *Vektoren und Plasmide.*

Die folgenden Vektoren und Plasmide wurden verwendet, ihre Besonderheiten, Anwendungen und Herkunft sind kurz charakterisiert:

- pBluescript II KS (+): genereller Kloniervektor, 2.96 kb, Ampizillinresistenz, blau/weiß-Selektion, GenBank #: X52327, Stratagene.
- pGEM-T: Kloniervektor für PCR-Produkte, 3'-Thymidin Überhänge, 3 kb, Ampizillinresistenz, blau/weiß-Selektion, Promega.
- pSPORT1: Vektor in den die cDNA-Bibliotheken des Riechepithels (Korsching, 1995) und des Gehirns (Korsching, unveröffentlicht) einkloniert wurden, 4.1 kb, Ampizillinresistenz, blau/weiß-Selektion, GenBank #: U12390, Invitrogen Life Technologies.
- pEYFP-1: promotorloser Expressionsvektor, 4.2 kb, Kanamycinresistenz, enthält das *enhanced yellow fluorescent protein* (EYFP), Clontech.
- pDsRed1-N1: Expressionsvektor für N-terminale Fusionsproteine mit DsRed, 4.7 kb, Kanamycinresistenz, CMV Promotor, enthält das rote fluoreszierende Protein aus *Discosoma* sp. (DsRed), Clontech.
- pIRES2-EGFP: Expressionsvektor, 5.3 kb, Kanamycinresistenz, CMV Promotor, enthält das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) und eine *internal ribosomal entry site* (IRES), Clontech.
- pcDNA3: Expressionsvektor, 5.4 kb, Ampizillinresistenz, CMV Promotor, Invitrogen Life Technologies.
- pQE30, 31, 32: rekombinante Expressionsvektoren, 2.7 kb IPTG-induzierbarer lac Promotor, Kanamycinresistenz, QIAGEN.
- YELLOWcam2.1: enthält den Calciumsensor „yellow Cameleon 2.1“, in pcDNA3 einkloniert, Insertgröße: 1.95 kb, durch Roger Y. Tsien (UCSD, San Diego, USA) zur Verfügung gestellt (Miyawaki et al., 1997).
- SVQST Cam2-3: enthält den Calciumsensor „Camgaroo“, in pcDNA3 einkloniert, Insertgröße: 1.2 kb, durch Roger Y. Tsien (UCSD, San Diego, USA) zur Verfügung gestellt.
- YP3.1HH1-1: enthält den Calciumsensor „flash-pericam“, in pcDNA3 einkloniert, Insertgröße: 1.2 kb, durch Atsushi Miyawaki (Brain Science Institute, RIKEN, Saitama, Japan) zur Verfügung gestellt (Miyawaki et al., 2001).
- YP3.2TF0-17: enthält den Calciumsensor „inverse-pericam“, in pcDNA3 einkloniert, Insertgröße: 1.2 kb, durch Atsushi Miyawaki (Brain Science Institute, RIKEN, Saitama, Japan) zur Verfügung gestellt (Miyawaki et al., 2001).
- YP3.2DF0-17: enthält den Calciumsensor „ratiometric-pericam“, in pcDNA3 einkloniert, Insertgröße: 1.2 kb, durch Atsushi Miyawaki (Brain Science Institute, RIKEN, Saitama, Japan) zur Verfügung gestellt (Miyawaki et al., 2001).

- Lawrist7: Cosmidvektor, 5.38 kb nach der Klonierung (8 kb vor Klonierung), Kanamycinresistenz, durch RZPD (Berlin) zur Verfügung gestellt.
- ICRFc70B1662Q2: genomischer Cosmidklon, enthält den *zOMP* Genlokus, in Lawrist 7 inkloniert, Insertgröße: 40 kb, durch RZPD (Berlin) zur Verfügung gestellt.
- BUSMP706N2039Q4: genomischer PAC-Klon, enthält den *dlx2* und *dlx1* Genlokus, in pCYPAC6 inkloniert, Insertgröße: 120 kb, Kanamycinresistenz, durch RZPD (Berlin) zur Verfügung gestellt.
- BUSMP706H02207Q2: genomischer PAC-Klon, hybridisiert mit *ztbr1*, in pCYPAC6 inkloniert, Insertgröße: 120 kb, Kanamycinresistenz, durch RZPD (Berlin) zur Verfügung gestellt.
- BUSMP706O09174Q2: genomischer PAC-Klon, hybridisiert mit *ztbr1* (alternativer Klon zu BUSMP706H02207Q2), in pCYPAC6 inkloniert, Insertgröße: 120 kb, Kanamycinresistenz, durch RZPD (Berlin) zur Verfügung gestellt.
- BUSNP706N08248Q2: genomischer PAC-Klon, hybridisiert mit *ztbr1*, in pCYPAC6 inkloniert, Insertgröße: 120 kb, Kanamycinresistenz, durch RZPD (Berlin) zur Verfügung gestellt.
- BUSMP706L15147Q2: genomischer PAC-Klon, falsch positiver Klon in pCYPAC6 inkloniert, Insertgröße 120 kb, Kanamycinresistenz, durch RZPD (Berlin) zur Verfügung gestellt.

***DNA-Längenstandards.***

Verwendet wurden die DNA-Längenstandards X und XV der Firma Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) und der peqGOLD Leiter-Mix von PeqLab (Erlangen) mit den respektiven Bandengrößen (bp): **BM X:** 75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1.018, 1.636, 2.036, 3.054, 4.072, 5.090, 6.108, 7.126, 8.144, 9.162, 10.180, 11.198, 12.216; **BM XV:** 7.601, 8.113, 9.688, 10.086, 11.205, 11.848, 12.379, 13.282, 14.183, 15.258, 15.262, 16.710, 18.780, 19.944, 20.323, 22.010, 24.918, 26.718, 29.027, 32.745, 38.412, 48.502; **peqGOLD:** 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.031, 1.200, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 5.000, 6.000, 8.000, 10.000; mit 40 ng/10 µl bei 2 kb.

**3.2.5 Bakterien.**

- DH5α: supE44, Dlac, U169, f80, lacZDM15, hsdR17, recA1, 'endA1, gyrA96, thi-1, relA1, (Gibco BRL).
- DH10β: F mcrA, (mrr-hsdRMS-mcrBC), 80dlacZDM15, lacX74, deoR, recA1, araD139 (ara, leu)7697 galU galK1-rpsL nupG, (Gibco BRL).
- XL1 blue MRF': (mcrA)183, (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F', proAB, lacIqZ(M15, Tn10 (Tetr))], (Stratagene).
- SG 13009 [pRep 4]: Nal<sup>S</sup>, Str<sup>S</sup>, Rif<sup>S</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>-</sup>, Gal<sup>-</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecQA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup> (Qiagen).

### 3.2.6 Antikörper.

$\alpha$ -ZNS2, polyklonales Maus IgG1 $\kappa$  (M. Westerfield, Eugene, OR, USA), 1:500.

$\alpha$ -GFP, monoklonales Kaninchen IgG (Torrey Pines Biolabs Inc., Houston, TX, USA), 1: 1.000.

$\alpha$ -DIG-AP, Schaf, Fab-Fragment (Roche Molecular Biochemicals), 1:750.

$\alpha$ -Maus IgG, monoklonales Ziege IgG, Alexa Fluor 594 gekoppelt (Molecular Probes), 1:200.

$\alpha$ -Kaninchen IgG, monoklonales Ziege IgG, Alexa Fluor 488 gekoppelt (Molecular Probes), 1:200.

### 3.2.7 Bibliotheken und Bibliotheksfilter.

#### *cDNA-Bibliotheken.*

In dieser Arbeit wurden drei cDNA-Bibliotheken unterschiedlicher Herkunft verwendet. Jede der Bibliotheken wurde wie in Abschnitt III.3.2.16 beschrieben auf Membranfilter für die Hybridisierung ausplattiert.

Verwendet wurde:

- 1) eine positionale „full-length“ cDNA-Bibliothek des olfaktorischen Epithels des Zebrafisches, hergestellt von Sigrun Korsching (Korsching, 1995), über *Not* I- und *Sal* I-Adapter in das pSPORT1-Vektorsystem (Invitrogen Life Technologies) inkloniert.
- 2) eine positionale „full-length“ cDNA-Bibliothek des Gehirngewebes des Zebrafisches, hergestellt von Sigrun Korsching (unveröffentlicht), über *Not* I- und *Sal* I-Adapter in das pSPORT1-Vektorsystem (Invitrogen Life Technologies) inkloniert.
- 3) eine ungerichtete cDNA-Bibliothek aus Bulbusgewebe des Zebrafisches, cDNA hergestellt von Verena Oehlmann (Oehlmann, 2001), die durch PCR amplifiziert und in den Vektor pGEM-T (Promega) inkloniert wurde.

#### *Genomische Bibliotheken.*

Zur Identifizierung genomischer Klone wurden Koloniefilter zweier genomischer Bibliotheken des Zebrafisches vom Ressourcencentrum der Primärdatenbanken (RZPD, Berlin, [www.rzpd.de](http://www.rzpd.de)) bezogen.

Verwendet wurde:

- 1) eine Cosmid-Bibliothek, Library No.: 70, hergestellt von Dr. C. Burgtorf ([carola.burgtorf@embl-heidelberg.de](mailto:carola.burgtorf@embl-heidelberg.de)), aus *Danio rerio*, AB Inzuchtstamm (aus Tübingen), inkloniert in den Vektor Lawrist 7 mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 44 kb, und einem Umfang von 4 Genomäquivalenten, Dauerkultur in DH5 $\alpha$  MCR (Gibco, BRL), Kanamycinresistenz.
- 2) eine PAC-Bibliothek, Library No.: 706, hergestellt von Chris Tsuyoshi Amemiya ([camemiya@bu.edu](mailto:camemiya@bu.edu)), aus *Danio rerio*, unspezifizierter Stamm, inkloniert in den Vektor pCYPAC6 mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 120 kb und einem

Umfang von 3 Genomäquivalenten. Dauerkultur in DH10 $\beta$  (Gibco BRL), Kanamycinresistenz.

Hybridisierungen der genomischen Bibliotheksfilter wurden mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP markierten Sonden von Arzu Çelik (Çelik, 2001) durchgeführt.

### **3.2.8 Molekularbiologische Standardverfahren.**

Viele der molekularbiologischen Standardverfahren wie Restriktionsverdau, Ligation, Gelelektrophorese, Entfernen von einzelsträngigen DNA-Überhängen (blunten), orientieren sich am Laborhandbuch „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989). Im Folgenden wird eine kurze Übersicht wichtiger Eckparameter verschiedener Standardtechniken angegeben.

#### ***Verdau mit Restriktionsendonukleasen.***

Unabhängig vom jeweils verwendeten Reaktionsvolumen wurden DNA Konzentrationen von < 100 ng/ $\mu$ l eingestellt. Der Gehalt an Enzymlösung wurde wegen des Glycerinanteils < 10% gehalten. In der Regel wurden 5-fache Überverdäue in den mitgelieferten Reaktionspuffern und Zusätzen (BSA, Triton) nach Herstellerangaben durchgeführt. Verwendet wurden die Restriktionsenzyme der Firmen New England Biolabs (Frankfurt a.M.) und Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg).

#### ***Gelelektrophorese.***

Standardauftrennungen wurden in 1%-igen Agarosegelen in TAE- oder TBE-Laufpuffer mit 5 - 8 V/cm durchgeführt. Hochmolekulare DNA (genomische DNA, Cosmid- und PAC-DNA) wurde in 0.5% - 0.7% Agarose Gelen in TAE-Laufpuffer mit 1 - 2 V / cm aufgetrennt. Die DNA wurde durch Zusatz eines entsprechenden Volumens 10x Ladepuffer aufgetragen. Ethidiumbromid zur Visualisierung der Nukleinsäuren wurde den Agarosegelen direkt in einer Konzentration von 1  $\mu$ l Stammlösung/50 ml zugesetzt. RNA wurde vor der Auftrennung mit 50% Formamid für 5 min bei 100°C denaturiert. Die Beurteilung und Dokumentation der Gele erfolgte an unterschiedlichen Transilluminatoren (Heraeus, BioRad).

#### ***Gelextraktion.***

Durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen fragmentierte Banden von Plasmid DNA wurden im präparativen Maßstab aus Agarosegelen wiedergewonnen. Der Verdauungsansatz wurde in 0.5 - 1%-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschte Gelbande bei reduzierter UV-Beleuchtung (Handlampe oder 70%) aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Die Extraktion aus dem Gel erfolgte mit kommerziellen Produkten (QIAquick Gelextraktion kit, QIAex Gel extraktion kit II, Qiagen)

### ***Polymerase Kettenreaktion (PCR).***

PCR-Bedingungen wurden nach Bedarf für die jeweilige Reaktion optimiert. Ein Standardansatz, der für unkomplizierte Reaktionen genutzt wurde ist der Folgende: Matritze: 10 bis 50 ng in 1 µl, Primermix: jeweils 0.5 µM final, dNTP: jeweils 0.2 mM final, Taq-Polymerase: Taq Polymerase (Roche Molecular Biochemicals) oder Hauspräparation (Oehlmann) 1 - 2 U final, 1x Reaktionspuffer, MgCl<sub>2</sub>: 1.25 mM final, H<sub>2</sub>O ad 20 µl. Standardreaktionsbedingungen waren: 2 min 94°C; 30x : 30 s 94°C, 30 s T<sub>ann</sub>, 1 min + 3 s / Zyklus 72°C; 7 min Elongation bei 72°C. T<sub>ann</sub> wurde 2°C unter der niedrigsten Primerschmelztemperatur T<sub>m</sub> des jeweils benutzten Primerpaares gehalten. In der Regel wurden 10% des Reaktionsansatzes gelelektrophoretisch analysiert.

### ***Ligation.***

In Standardligationen zur Umklonierung wurde die zu ligierende DNA mit Vektor (ca. 50 ng) im Molverhältnis von 3 : 1 (Insert : Vektor) in Gesamtreaktionsvolumina von 10 µl (oder 20 µl) mit 1 µl (2 µl) 10x Ligationspuffer (Roche Molecular Biochemicals) und 1 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl, Roche Molecular Biochemicals) gemischt, 5 min bei 37°C und anschließend ü.N. bei 16°C im gegengekühlten Wasserbad oder PCR Gerät inkubiert. Kritische Ligationen (wenig Insert, mehrfach erfolglos) wurden ü.N. mit 5 min 37°C, 45 min 16°C im PCR Gerät gezykelt. Die Ligation nicht überhängender DNA-Enden (blunt ends) wurde bei Raumtemperatur ü.N. oder 20°C im Wasserbad oder PCR Gerät durchgeführt.

Die Ligation von PCR Produkten in den pGEM-T Vektor wurde ebenfalls im Molverhältnis 3 : 1 (PCR Produkt : Vektor) angesetzt. In den Reaktionsansatz von 10 µl Gesamtvolumen wurden 1 µl pGEM-T (50 ng/µl), 5 µl 2x Puffer (Promega), bis zu 3 µl PCR Produkt und 1 µl T4 DNA Ligase (Promega) eingesetzt.

### ***Dephosphorierung.***

Sofern Klonierungsvektoren nur durch ein Restriktionsenzym zur späteren Ligation und Aufnahme des Inserts vorbereitet wurden oder Vektoren mit zwei Enzymen geschnitten wurden, die keine überhängenden Enden erzeugen, mussten die 3'-Enden der Schnittstellen zur Vermeidung intramolekularer Ligationen dephosphoriert werden. Vektor DNA wurde nach den Herstellerangaben mit Shrimp Alkaline Phosphatase (Tested user friendly, USB) in den mitgelieferten Reaktionspuffern behandelt.

### ***Aufreinigung von DNA.***

DNA wurde nach der Behandlung mit DNA-modifizierenden Enzymen, aus PCR-Reaktionen und Ligationsansätzen mit den folgenden Verfahren aufgereinigt:

- 1) High Pure PCR Purification Kit (Roche Molecular Biochemicals) nach den Herstellerangaben.
- 2) PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Herstellerangaben.

- 3) Phenol/Chloroform-Extraktion: Reaktionsansätze unter 200 µl Gesamtvolumen wurden auf mindestens 200 µl Endvolumen mit TE Puffer aufgefüllt und mit einem gleichen Volumen PCI (25 Phenol/24 Chloroform/1 Isoamylalkohol, Sigma) versetzt, bis zur Emulsion geschüttelt oder über Kopf rotiert, zur Phasentrennung kurz zentrifugiert, die Oberphase abgenommen und diese erneut mit 200 µl PCI versetzt, gemischt und getrennt. Nach der zweiten Extraktion wurde nach dem gleichen Verfahren zweimal mit 100% Chloroform gewaschen und die abgenommene Oberphase mit dem dreifachen Volumen 100 EtOH auf Eis gefällt (10 min) und bei 4°C für 20 min zentrifugiert, zweimal mit 70% EtOH gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert. Die pelletierte DNA wurde kurz an der Luft getrocknet und mit dem gewünschten Volumen Tris-HCl (10 mM) resuspendiert.

#### ***Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.***

In der Regel wurden DNA und RNA Mengen aus einem analytischen Agarosegel gegen den Mengenstandard abgeschätzt. Sofern eine exakte Kenntnis der Konzentration erforderlich war, wurde mit dem Fluoreszenz-Spektrophotometer LSB5 (Perkin Elmer) bestimmt. Dazu wurden Verdünnungen der Messproben ( $\approx 1:200$ , in TE-Puffer) 1:1 mit 1:200 PicoGreen (in TE-Puffer, Molecular Probes) vermischt und die Fluoreszenz der Probe bei 520 nm Wellenlänge (480 nm Anregung) und einer Spaltbreite von 10 nm bestimmt. Die Konzentration in der Messküvette wurde nach der Formel:  $[\text{ng}/\mu\text{l}] = 0.001 \times \text{Fluoreszenz} + 0.001$ , bewertet.

#### ***DNA Sequenzierung.***

Plasmid DNA wurde mit dem ABI PRISM® dGTP BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sequenziert. Dazu wurden 0.2 - 0.5 µg Plasmid DNA in einem 10 µl Gesamtvolumen mit 2 µl BDMix (BigDye, ABI) und 3.5 - 5 pmol Sequenzierprimer versetzt. Die Sequenzierungsreaktion (Sanger et. al., 1977) wurde nach dem Schema: 5 min 96°C, 25x (30" 96°C, 15" 52°C, 4' 60°C) durchgeführt. Anschließend wurde das Volumen des Reaktionsansatzes auf 100 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt, mit 10 µl 3M Natriumacetat (pH 5.2) und 300 µl 100% EtOH gemischt, 10 min auf Eis gefällt, 20 min zentrifugiert, mit 70% EtOH gewaschen, luftgetrocknet und bei -20°C eingefroren. Die Analyse der Sequenzierungsreaktion erfolgte im zentralen Sequenzierlabor des Instituts für Genetik mit einem ABI PRISM® 377 Sequencer (Applied Biosystems) durch exzellente Expertise von Rita Lange.

#### ***Anlegen von Dauerkulturen.***

Dauerkulturen zur langfristigen Lagerung von Bakterienklonen wurden aus 800 µl Übernachtkultur durch Zusatz von 200 µl Glycerin und Einfrieren in flüssigem Stickstoff angelegt. Die Dauerkulturen wurden bei -70°C aufbewahrt. Zur erneuten Anzucht wurde ein wenig der gefrorenen Kultur mit einer sterilen Pipettenspitze in LB<sub>Antibiotikum</sub>-Medium überführt und ü.N. unter Schütteln bei 37°C kultiviert.

### 3.2.9 Präparation elektrokompetenter Bakterien und Transformation.

*E. coli* des Stammes XL1 Blue MRF' (Stratagene) wurden ü.N. in LB<sub>tet</sub>-Flüssigkultur aus einer Individualkolonie angezogen und 1 ml zum Animpfen eines 1 l Kulturansatzes verwendet. Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 - 0.8 bei 37°C kräftig geschüttelt und anschließend für 15 - 30 min auf Eis abgekühlt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis oder gekühlt durchgeführt. Die Zellen wurden durch 10 minütiges Zentrifugieren (4°C, 4000 g) wiederholt pelletiert und jeweils 1x in 1 l eiskaltem H<sub>2</sub>O, 1 x in 500 ml H<sub>2</sub>O, 1 x in 20 ml 10% Glycerin (in H<sub>2</sub>O) und final in 2 - 3 ml 10% Glycerin resuspendiert. Aliquots von 50 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Die erzielten Transformationseffizienzen lagen zwischen 10<sup>7</sup> und 10<sup>9</sup> cfu/µg Plasmid (Transformation mit pBluescript II KS).

Zur Transformation wurden die Zellen 10 min auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt, 1 min auf Eis aufbewahrt, in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2 mm Elektrodenabstand) überführt und mit 1.8 kV, 200 Ω, 25 µF elektrotransformiert. Zeitkonstanten lagen in einem Bereich zwischen 4.8 und 3.9 ms. Unmittelbar nach dem Puls wurde mit 950 µl vorgewärmtem LB-Medium (oder SOC-Medium) versetzt und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. In der Regel wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf LB<sub>Antibiotikum</sub>-Agarplatten ausgestrichen.

### 3.2.10 Präparation hitzekompetenter Bakterien und Transformation.

Bakterien wurden wie unter III.3.2.9 beschrieben kultiviert und zentrifugiert. Je 50 ml des Kulturansatzes wurden in 10 ml eiskaltem 0.1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und 5 min auf Eis gelagert, erneut zentrifugiert, in 2 ml 80 mM CaCl<sub>2</sub>/15% Glycerin aufgenommen und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Aliquots von 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt. Die Transformationseffizienzen lagen bei 10<sup>5</sup> bis 10<sup>7</sup> cfu/µg Plasmid (Transformation mit pBluescript II KS).

Zur Transformation wurden die Zellen 10 min auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA versetzt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Hitzeschockbehandlung wurde für 90 s bei 42 im Wasserbad oder Thermomixer durchgeführt, die Zellen danach kurz auf Eis zurückgekühlt und mit 800 µl SOC-Medium versetzt, bei 37°C eine Stunde unter Schütteln kultiviert und ausgestrichen.

### 3.2.11 Identifizierung positiver Transformanden.

Zur Identifizierung erfolgreich transformierter Klone, kamen die folgenden Verfahren zur Anwendung:

- 1) Verdau mit Restriktionsendonukleasen und analytische Gelelektrophorese von Plasmidpräparationen aus 1.5 ml Übernachtskulturen individueller Bakterienkolonien des Transformationsansatzes.

- 2) Kolonie-PCR aus Bakteriensuspension mit vektor- oder insertspezifischen Primern. Individuelle Bakterienkolonien wurden zuvor für mindestens zwei Stunden (oder ü.N.) in 100 µl LB<sub>Antibiotikum</sub>-Medium kultiviert und 2 bis 5 µl der Kultur in die Polymerase Kettenreaktion eingesetzt.
- 3) Filterabzüge von Kulturplatten, Bakterien „Dot-Blots“, oder auf Nylonmembranen aufgetupfte und über Nacht kultivierte Bakterienkolonien wurden durch Hybridisierung der Membranen mit geeigneten DIG-dUTP-markierten DNA-Sonden auf die Identität des Inserts überprüft.

### **3.2.12 Präparative Methoden zur Gewinnung von DNA.**

#### ***Genomische DNA.***

Hochmolekulare genomische DNA wurde aus individuellen adulten Fischen gewonnen. Die Tiere wurden rasch dekapitiert und innere Organe, die reich an endogenen DNasen sind, entfernt. Anschließend wurde das Gewebe in vorgekühlten Mörsern in flüssigem Stickstoff eingefroren und pulverisiert. Das gefrorene Pulver wurde in 10 ml Schraubdeckelröhrchen überführt und zunächst auf Trockeneistemperatur und anschließend durch Zugabe von Lysepuffer auf Raumtemperatur erwärmt.

Zur Lyse wurden 5 ml Lyse-Puffer (100mM Tris-HCl, pH8.5, 5mM EDTA, 0.2% SDS, 200mM NaCl) und final 150 µg / ml Proteinase K zugesetzt und über Nacht bei 55°C unter leichtem Wippen inkubiert. Ungelöste Rückstände wurden abzentrifugiert und der Überstand zweimal mit Phenol und im Anschluß zweimal mit Chloroform extrahiert. Dazu wurden die Phasen vorsichtig durch manuelle Überkopfrotation emulgiert und zur Phasentrennung sanft zentrifugiert. Aus dem letzten Extraktionsschritt wurde die DNA durch Zugabe des gleichen Volumens 100% Isopropanol und leichtes Schwenken gefällt, auf einer Pipettenspitze aufgewickelt und zum Waschen in 70% EtOH überführt und anschließend leicht getrocknet. Zum vollständigen Auflösen der DNA wurden 1 ml TE-Puffer zugesetzt und über Nacht bei 60°C inkubiert.

Genomische DNA der Maus wurde aus Lebergewebe gewonnen. Mäuse wurden über Trockeneis getötet, die Leber entnommen, in flüssigem Stickstoff gemörsert und das erhaltene Pulver in 50 ml Schraubdeckelröhrchen überführt und mit 5 ml PBS und 1 ml Proteinase K (10 mg/ml) versetzt. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 13 ml Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 200 mM NaCl; pH 9.0) und 1 ml 20% SDS bei 50°C ü.N. auf einem Schütteltisch. Anschließend wurde mit 20 ml PCI (Sigma) versetzt und für 60 min in einem Überkopfrator zur Abtrennung der Proteine emulgiert, zur Phasentrennung kurz zentrifugiert (5 min, 2000 rpm) und die wässrige Phase in ein frisches Gefäß überführt. Proteine wurden durch zusätzliche Zentrifugation für 30 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und die DNA durch Zugabe des 4-fachen Volumens 100% Isopropanol gefällt, zweimal mit 70% EtOH gewaschen und ü.N. in 1 ml TE resuspendiert.

### ***Plasmid DNA aus Bakterien.***

Plasmid DNA aus Bakterien wurde entweder mit Hilfe unterschiedlicher kommerzieller Verfahren (Mini und Maxi Maßstab: Qiagen, Sigma, Invitrogen Life Technologies) entsprechend den Herstellerangaben gewonnen oder wie folgt präpariert: Individuelle Bakterienkolonien wurden in 3 ml LB<sub>Antibiotikum</sub>-Medium über Nacht bei 37°C inkubiert, 1.5 - 2 ml der Übernachtskultur 1' bei 8.000 rpm in Eppendorf-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert und anschließend in 200 µl Resuspensionspuffer (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 2 mg/ml Lysozym) gelöst. Die Bakterien wurden durch Zugabe von 400 µl Lysepuffer (0.2 N NaOH, 1% SDS) 5' bei Raumtemperatur aufgeschlossen und anschließend durch Zugabe von 250 µl 5 M Kaliumacetat (pH 4.8) neutralisiert. Bakterienreste wurden 10' bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, die Plasmid DNA durch Zugabe von 600 µl Isopropanol 10' - 15' auf Eis gefällt und im Anschluss durch Zentrifugation (15' bei 13.000 rpm) pelletiert. Die gefällte DNA wurde mindestens einmal mit 70% EtOH gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

### ***Cosmid- und PAC-DNA aus Bakterien.***

Zur Gewinnung von Cosmid- und PAC-DNA wurden unterschiedliche Verfahren eingesetzt. Die Verwendung des Qiagen Large Konstrukt Kits nach Herstellerangaben erzielte sehr saubere, jedoch quantitativ geringe Ergebnisse (100 µg DNA/l Bakterienkultur). Für Cosmid-DNA wurde das folgende Verfahren angewendet: 1 Liter Übernachtskultur wurde für 15 min bei 5.600g zentrifugiert (RC5B Zentrifuge, GS-3 Rotor, bei 4°C), in 25 ml 50 mM Glukose, 20 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8) resuspendiert und mit 2.5 mg/ml Lysozym vermischt. Zur alkalischen Lyse wurden 50 ml 0.2 M NaOH, 1% SDS zugesetzt, vorsichtig gemischt und nach 90 s auf Eis mit 37.5 ml 3 M Kaliumacetat, 5 M Eisessig (pH 4.8) neutralisiert, vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis aufbewahrt. Ausgefällte Proteine wurden durch Zentrifugation (30 min 12.000g, bei 4°C) abgetrennt, der Überstand filtriert, die DNA durch Zugabe von 0.6 Volumina Isopropanol gefällt, durch Zentrifugation für 20 min pelletiert (12.000g, bei 4°C) und in 500 µl TE-Puffer resuspendiert. Zur weiteren Aufreinigung wurde 30 bis 60 min mit 10 µg/ml RNase A (DNase frei, Sigma) bei 37°C behandelt. Anschließend wurde mit dem gleichen Volumen 13% Polyethylenglykol (8.000), 1.6 M NaCl versetzt, 5 min auf Eis inkubiert, erneut zentrifugiert (10 min 13.000g, bei 4°C) und in 400 µl TE-Puffer resuspendiert. Es folgten zweimalige Extraktion mit Phenol/Chloroform (50/50), einmaliges Extrahieren mit Chloroform, Einstellen des Volumens auf 400 µl und Präzipitation der DNA durch 100 µl 10 M Ammoniumacetat und 2 Volumina 100% EtOH für 30 min bei Raumtemperatur. Die gefällte DNA wurde für 5 min zentrifugiert, mit 300 µl 70% EtOH gewaschen, an der Luft getrocknet und in 200 µl TE-Puffer ü.N. bei 4°C resuspendiert. Dieses Verfahren führte in der Regel zu quantitativ besseren Ausbeuten, war jedoch sehr empfindlich für Degradation der DNA und insgesamt sehr aufwendig. Gute Ergebnisse ließen sich auch mit Präparationen im Mini Maßstab erzielen. Dazu wurden 2 ml Übernachtskultur in Eppendorf-Reaktionsgefäßen pelletiert, mit 0.3 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 100 mg/ml RNase A resuspendiert, mit 0.3 ml 0.2 N NaOH, 1% SDS

aufgeschlossen und mit 0.3 ml 3 M Kaliumacetat neutralisiert. Die Proteine wurden durch 10 minütiges Zentrifugieren abgetrennt und die DNA aus den Überständen durch Zugabe des gleichen Volumens 100% Isopropanol ausgefällt, zweimal mit 70% EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in einem gewünschten Volumen 10 mM Tris-HCl (pH 8.8) aufgenommen. Das Verfahren ließ sich bedingt auf größere Volumina der Einzelansätze ausdehnen und war für die meisten Anwendungen zufriedenstellend. Für einen analytischen Verdau (Southern) wurden ungefähr 3 Präparationen, für einen präparativen Verdau (Subklonierung) ungefähr 20 Präparationen benötigt. Im Bedarfsfall wurde mit Phenol/Chloroform weiter aufgereinigt.

### **3.2.13 Gewinnung von cDNA aus Gewebe Gesamt-RNA.**

Zur Gewinnung von cDNA aus olfaktorischen Epithelien wurden die Riechgewebe von insgesamt 3 Fischen in calciumfreier Ringerlösung präpariert und gemeinsam prozessiert. Die Epithelien wurden in 350 µl Papainlösung (1 mg/ml in calciumfreier Ringerlösung) für 50 min bei Raumtemperatur verdaut und anschließend mit einer 1 ml Eppendorf Pipette mechanisch trituriert. Das dissoziierte Gewebe wurde kurz zentrifugiert (5.000 rpm, 30 s), der Überstand verworfen und die Gewebepellets in 350 µl RLT<sup>+</sup> (Qiagen) aufgenommen. Die Zellen wurden auf QIAshredder-Säulen (Qiagen) aufgeschlossen (13.000 rpm, 2 min) und der Durchfluss mit 350 µl 70% EtOH zur Fällung der Nukleinsäuren versetzt und gemischt. Das Gemisch wurde zur Aufreinigung und Konzentrierung auf RNeasy-Säulen (Qiagen) geladen, kurz zentrifugiert (10.000 rpm, 15 s), einmal mit 700 µl RW1 (Qiagen), zweimal mit 500 µl RPE (Qiagen) gewaschen und mit 30 µl DEPC-Wasser eluiert (10.000 rpm, 1 min). Kontaminierende genomische DNA wurde durch Behandlung mit 4.7 U RNase-freier DNase (Promega) für 30 min bei 37°C verdaut.

In die reverse Transkription wurden 8 µl DNase behandelte RNA eingesetzt, mit 15 µl DEPC-Wasser und 2,3 µl pdN<sub>6</sub> (Hexanukleotidprimer, 100 ng/µl, Roche Molecular Biochemicals) versetzt, 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend für mindestens 2 min auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde mit 9 µl RT-Puffer (5x zu Superscript II, Invitrogen Life Technologies), 2,3 µl dNTP (10 mM, Amersham Pharmacia Biotech) und 4,5 µl Dithiothreitol (0.1 M) versetzt und 10 min bei 25°C und 2 min bei 42°C inkubiert. Zum Reaktionsstart wurden 2,3 µl (460 U) Reverse Transkriptase (Superscript II, Invitrogen Life Technologies) zupipettiert und der Ansatz zunächst 50 min bei 42°C und anschließend 15 min bei 70°C inkubiert. Die cDNA wurde unmittelbar in eine weitere PCR-Reaktion eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt.

### **3.2.14 Southern Blot Analyse.**

Jeweils 10 µg genomische DNA wurden mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen (50 U Enzym / Ansatz; NEB oder Amersham) über Nacht bei 37°C verdaut. Die Vollständigkeit des Verdau wurde durch gelektrophoretische Auftrennung eines Zehntels des Ansatzes überprüft und im Bedarfsfall für 2 bis 4 Stunden durch Zugabe von weiterem

Restriktionsenzym nachverdaut. Die Ansätze wurden anschließend zweimal mit PCI und zweimal mit Chloroform extrahiert, durch Zusatz des dreifachen Volumens 100% EtOH gefällt, mit 70% EtOH gewaschen und in 10 µl TE Puffer aufgenommen. Die Ansätze wurden in 0.5% bis 0.7% Agarosegelen in TAE Laufpuffer bei 2 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt, dokumentiert, auf Nylonmembranen übertragen (s. u.) und hybridisiert.

### **3.2.15 DNA Membrantransfer – Gel Blotting.**

DNA wurde zur Hybridisierung (Southern Hybridisierung, Identifizierung von Kandidatenbanden in Restriktionsspaltungen und PCR) nach gelektrophoretischer Auftrennung auf Nylonmembranen überführt. Dazu wurden die Agarosegele für 5 min in ausreichend (ca. 3 bis 4 Gelvolumina) 0.25 M HCl depuriniert, zweimal für 15 min in 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl denaturiert und anschließend zweimal in 1 M Ammoniumacetat für den Transfer äquilibriert. Die DNA wurde im absteigenden Blotting Verfahren transferiert. Auf einen saugfähigen Stapel von Papierhandtüchern wurden zwei Schichten Filterpapier und darauf die Zielfolienmembran (Hybond N, Amersham Pharmacia Biotech; Nylon Membrane positively charged, Roche Molecular Biochemicals) aufgelegt. Das Gel wurde auf der Membran orientiert und überstehende Gelanteile zur Transferseite hin durch Parafilm versiegelt um einen vertikalen Transfer zu gewährleisten. Auf das Agarosegel wurden zwei passend zugeschnittenen Schichten Filterpapier aufgelegt und dieses durch einer Filterpapierbrücke mit dem höher gelegenen Transferpufferreservoir (1 M Ammoniumacetat) verbunden. Die Brücke und das Reservoir wurden zum Schutz gegen Austrocknen mit Frischhaltefolie abgedeckt. Der DNA Transfer wurde über Nacht durchgeführt und die DNA anschließend durch UV-Bestrahlung kovalent an die Membran gebunden.

### **3.2.16 Ausplattieren von cDNA-Bibliotheken.**

In dieser Arbeit wurden drei cDNA-Bibliotheken zur Isolierung individueller cDNA-Klone verwendet (siehe II.3.2.7), die zu Hybridisierungszwecken ausplattiert wurden. Jede der drei Bibliotheken wurde identischen Plattierungsverfahren unterzogen, Abweichungen sind jeweils vermerkt.

#### ***cDNA-Bibliothek des olfaktorische Epithels.***

Elektrokompetente Bakterien des Stamms XL1-blue (MRF', Stratagene) wurden mit 1:10, 1:100 und 1:1.000 Verdünnungen der bereitgestellten Plasmid DNA transformiert und 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Jeweils 100 µl der Verdünnungen 1:10 bis 1:10.000 wurden auf LB<sub>amp/tet</sub> Agarplatten ausplattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert. Die Reste der Transformationsansätze wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Zur Aussaat auf die späteren „Master-Filter“ wurde eine Dichte von 50.000 Kolonien / Filter angestrebt. Die Kolonienzahl der Übernachtkulturplatten wurde ausgezählt und die ideale

Verdünnung berechnet. Für den Transformationsansatz 1:100 wurde ein Titer von 6.000 Kolonien/ $\mu$ l ermittelt und entsprechend 10  $\mu$ l des Ansatzes/„Master-Filter“ eingesetzt. 120  $\mu$ l des Ansatzes wurden in einem Gesamtvolumen von 120 ml LB-Medium verdünnt und auf 12 Nylonmembranen (Hybond-N RPN 132N, Amersham Pharmacia Biotech) ausplattiert. Die Membranfilter wurden vor der Aussaat mindestens 20 min in LB-Medium angefeuchtet und 10 ml der Bakteriensuspension wurde mit Hilfe einer Glasfritte (Filterdurchmesser) unter leichtem Vakuum gleichmäßig auf die Membranen aufgesogen. Fertige Filter wurden mit der Bakterienseite nach oben auf LB<sub>amp/tet</sub>-Agarschalen luftblasenfrei aufgelegt und bis zu einer Koloniegröße von ca. 0.5 bis 1 mm bei 37°C inkubiert.

Zur Erstellung von Replikatfiltern wurden frische Membranen in LB-Medium angefeuchtet, deckend auf die Master-Filter aufgelegt und zwischen jeweils zwei Lagen Whatman's Filterpapier und Glasplatten eingeschlossen. Durch sanften Druck mit dem Fuß wurden die Bakterienkolonien von den Master- auf die Replikatfilter übertragen. Beide Filter wurden durch Lochmuster (sterile Kanüle) eindeutig markiert und beide Filter erneut auf LB-Agarplatten ü.N. bei 37°C zum Auswachsen der Bakterienkolonien inkubiert. Die Prozedur wurde zur Errstellung eines zweiten Satzes von Replikatfiltern wiederholt. Die Bakterien auf den Replikatfiltern wurden 10 bis 20 min auf getränkten Whatman Filtern mit 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl alkalisch lysiert und anschließend schwimmend für 60 min auf 50 mM Natriumphosphatpuffer neutralisiert. Bakteriendebris wurde durch Abwischen mit nassen Kosmetiktüchern entfernt, die Filter mit 100 ml frischem Phosphatpuffer abgespült, leicht auf Filterpapier getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung auf dem Filter kovalent fixiert. Die Repliken wurden bis zur Verwendung in der Hybridisierungsreaktion zwischen Filterpapier bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Masterfilter wurden zur dauerhaften Aufbewahrung und späteren Isolation positiver Bakterienkolonien zunächst 30 - 60 min auf LB/Glyzerin (LB<sub>amp/tet</sub>, 25% Glyzerin) angefeuchtet und anschließend auf LB/Glyzerin getränktem Filterpapier zwischen Alufolie und Millimeterfolie eingepackt. Die Koordinaten der Lochmarkierungen wurden auf die Millimeterfolie und eine Kopie dieser Folie übertragen und die Filter anschließend bei -70°C dauerhaft eingefroren. Auf den Replikatfiltern detektierte Hybridisierungssignale konnten zunächst auf die Millimeterfolie übertragen und letztendlich exakt von den Masterfiltern ausgeschnitten und angezogen werden.

#### ***cDNA-Bibliothek aus Hirngewebe.***

Die Bibliothek lag transformationsfertig, in den Vektor pSPORT1 inkloniert, vor und wurde zunächst auf Filtern amplifiziert. 1  $\mu$ l Plasmid DNA wurde transformiert und jeweils 40  $\mu$ l der Bakteriensuspension in 10 ml LB-Medium wie beschrieben auf Membranfilter aufgesaugt und ü.N. angezogen. Der Vorteil dieser Amplifikationsmethode gegenüber einer Flüssigkultur besteht darin, dass individuelle Klone auf den Filtern in etwa gleichmäßig große Kolonien bilden. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Kolonien eines Filters gesammelt, pelletiert und die Plasmid DNA präpariert (MIDI-Maßstab, Qiagen). Insgesamt wurden 23 Aliquots parallel prozessiert. Teile der Plasmidpräparationen wurden 1:100 und 1:500 für PCR Zwecke verdünnt.

Zur Ausplattierung der Bibliothek wurde jedes Aliquot zunächst 1:100 verdünnt und jeweils 10 µl aller Verdünnungen vereinigt. Drei Probetransformationen zur Ermittlung des Titers wurden mit XL1-blue MRF' Bakterien (Stratagene) durchgeführt und der optimaler Verdünnungsfaktor zu 1:25.000 für den unverdünnten Ansatz ermittelt (auch hier wurde auf 50.000 Kolonien/Masterfilter gezielt). Insgesamt wurden 10 Filtersätze nach dem oben angegebenen Verfahren hergestellt und zur Hybridisierung eingesetzt.

### ***cDNA-Bibliothek aus Gewebe des *Bulbus olfactorius*.***

Ein adapterligierter cDNA Pool (SMART cDNA Library Construction Kit, Clontech) wurde von Verena Oehlmann (Oehlmann, 2001) zur Verfügung gestellt. Der Pool wurde zunächst mit Adapterprimern durch Polymerase Kettenreaktion amplifiziert. In 100 µl Gesamtvolumen wurden 10 µl 10x KlenTaqPCR Puffer (Clontech), 2 µl dNTP-Mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, jeweils 10mM; Amersham Pharmacia Biotech), 4 µl Adapterprimer (10 µM) 2 µl cDNA-Matritze, 2 µl 50x Advantage KlenTaq Polymerase Mix (Clontech) vermischt und nach dem folgenden Protokoll amplifiziert: 1' bei 95°C, 42x (15" 95°C, 30" 65°C, 6' 68°C). Die optimale Zyklenzahl wurde durch Entnahme von Aliquots in Abständen von 3 Zyklen, beginnend mit dem 15. Zyklus und anschließende gelektrophoretische Auftrennung bestimmt. Das Produkt des 27sten Zyklus wies die gewünschten Eigenschaften (geringer Hintergrund, kein niedrigmolekularer Schmier, diskrete Banden, Bandbreite der Produkte von 500 bis 4.000 bp) auf und wurde in den den T-Vektor (Promega) ligiert, transformiert und auf Filter ausplattiert. Bakterienkolonien wurden gesammelt, die Plasmid DNA isoliert (MIDI) und im Anschluss zur Herstellung von 10 Filtersätzen nach den oben angegebenen Verfahren und Maßgaben verwendet.

### ***Identifizierung positiver Bakterienklone - Homologieklonierung.***

Die hergestellten Filterabzüge wurden zur Homologieklonierung und Identifizierung von cDNA-Klonen mit entsprechenden [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP-markierten Sonden radioaktiv hybridisiert (radioaktive Hybridisierung durch Arzu Çelik). Hybridisierende Filterorte wurden auf die zu jedem Filter gehörenden Milimeterfolien übertragen und die entsprechenden Filterorte von den gefrorenen Bakterienfiltern in der Kälte ausgeschnitten (ca 5 mm<sup>2</sup> Stückchen). Die ausgeschnittenen Filterstücke wurden sofort in 200 µl LB-Medium für 1 Stunde bei 37°C kultiviert, anschließend in unterschiedlichen Verdünnungen auf LB-Agar ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Von jedem Filterort wurden geeignete Platten (Kolonienzahl nicht zu dicht) ausgesucht und diese auf Nylonmembranen abgezogen. Wie im Falle der Bibliotheksfilter wurde die Orientierung der Membran zur Platte mit einem Lochmuster (Kanüle) markiert. Die Filterabzüge wurden mit der Bakterienseite nach oben auf LB-Agarplatten luftblasenfrei aufgelegt und zusammen mit den Bakterienplatten ü.N. bei 37°C kultiviert. Die Filter wurden entsprechend den Filterabzügen für die Bibliotheken behandelt und erneut mit einer DIG-markierten Sonde (siehe **III.3.2.17**) hybridisiert und nach **III.3.2.19** detektiert. Positiv hybridisierende Bakterienkolonien konnten durch Auflegen der Kulturplatten auf die Röntgenfilme bestimmt werden.

### 3.2.17 Herstellung von DIG-dUTP markierten DNA Sonden.

Zur Herstellung von Sonden für die Filterhybridisierung wurde DNA durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP nach dem „random priming“-Verfahren markiert (DIG DNA labelling kit, Roche Molecular Biochemicals). Dazu wurde 1 µg DNA-Matrize in 15 µl Gesamtvolumen im kochenden Wasserbad für 10 min hitzedenaturiert und auf Eis abgekühlt. Dem Ansatz wurden 2 µl Hexanukleotidmix (1.56 mg/ml Zufallshexanukleotide), 2 µl dNTP-Markierungslösung (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0.65 mM dTTP, 0.35 mM alkalilabiles DIG-dUTP) zugegeben und die Reaktion durch 1 µl DNA Polymerase I (Klenow Fragment, 2 U / µl) initiiert. Die Markierung erfolgte ü.N. und wurde durch die Zugabe von 2 µl EDTA (200 mM, pH 8) beendet. Die Sonden wurden ohne weitere Aufreinigung für die Hybridisierungsreaktion benutzt.

### 3.2.18 Herstellung von DIG-UTP markierten RNA Sonden.

RNA Sonden zur *In situ*-Hybridisierung wurden aus Plasmid DNA durch *in vitro*-Transkription mit Digoxigenin-11-dUTP markiert. Plasmid DNA wurde auf der 3'-Seite des zu generierenden Transkriptes durch Verdau mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (Vermeidung von 3' Überhängen) linearisiert, mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit EtOH gefällt. Die DNA wurde in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) aufgenommen und 1 µg DNA in einem Endvolumen von 20 µl mit 2 µl NTP Markierungslösung (DIG RNA labelling mix, Roche Molecular Biochemicals, 10 mM ATP, 10 mM GTP, 10 mM CTP, 6.5 mM UTP, 3.5 mM DIG-UTP; in Tris-HCl, pH 7.5), 2 µl 10x Transkriptionspuffer (400 mM Tris-HCl, pH 8.0, 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Dithioerythritol, 20 mM Spermidin, 100 mM NaCl, 1 U/ml RNase Inhibitor) und 2 µl RNA Polymerase (SP6, T7 oder T3, Roche Molecular Biochemicals) gemischt und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde 2 µl EDTA (0.2 M, pH 8.0) zugesetzt und die synthetisierte RNA durch 2.5 µl 4 M LiCl und 75 µl 100% EtOH (-20°C) für 30 min bei -70°C gefällt und anschließend für 15 min bei 4°C zentrifugiert (13.000g). Das Pellet wurde mit 50 µl 70% EtOH (-20°C) gewaschen, erneut zentrifugiert, getrocknet, in 100 µl DEPC behandeltem Wasser aufgenommen und bei -70°C aufbewahrt.

### 3.2.19 Filterhybridisierungen und chemolumineszente Detektion.

Es wurden drei Arten von Filtern hybridisiert: 1) Bakterienabzüge, 2) gedotete und ü.N. auf einer Membran angezogenen Bakterienkolonien und 3) Filter, die durch DNA Transfer im Blotting-Verfahren hergestellt wurden (**III.3.2.15**).

Filter wurden in Rollgläsern im Hybridisierungssofen (Techne) mit 10 ml (große Gläser, 4 ml für kleine Gläser) ULTRAhyb™ (Ambion, Austin, TX, USA) bei 42°C (hoch stringent) oder 37°C (niedrig stringent) für mindestens 2 Stunden prähybridisiert. Ungefähr 4 µl Sonde (je nach Effizienz) wurde für 10 min im kochenden Wasserbad hitzedenaturiert, zur

Prähybridisierungslösung zugegeben und ü.N. hybridisiert. Es folgte zweimaliges Waschen für 5 min mit 2x SSC, 0.1% SDS und zweimaliges Waschen für 15 min mit 0.1x SSC, 0.1% SDS, jeweils bei der Hybridisierungstemperatur. Bei Raumtemperatur wurde mit Waschpuffer (100 mM MABS, 0.3% Tween 20) für 1 min äquilibriert und anschließend für 30 - 60 min in Blockierungslösung (1% Blockierungsreagenz (Roche Molecular Biochemicals) in 100 mM MABS) inkubiert. Zur Detektion wurde zunächst mit  $\alpha$ -DIG-AP Antikörper (1: 20.000 in Blockierungslösung, Roche Molecular Biochemicals) für 30 - 60 min inkubiert, zweimal mit Waschpuffer für 15 min gewaschen und 1 min in Detektionspuffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl; pH 9.5) äquilibriert. Die Detektion erfolgte durch das chemolumineszente Substrat der alkalischen Phosphatase CDP-Star™ (2-Chlor-5-(4Methoxy Spiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor)Tricyclo[3.3.1.1.3,7]Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat), 1:100 in Detektionspuffer, Roche Molecular Biochemicals) durch luftblasenfreies Beträufeln der Membran und Inkubation für 5 min. Im Anschluss wurde überschüssiges Substrat auf Filterpapier abgetropft, die Membran feucht in Plastikbeutel eingeschweißt und auf Röntgenfilm (Kodak Eastman) oder im Chemilumineszenzdetektor (ChemiDoc, Biorad) exponiert. Die Membranen können durch zweimalige Behandlung mit 0.2 M NaOH, 0.1% SDS für 20 min bei 37°C von der Sonde befreit und wiederverwendet werden. Die Sonden wurden ebenfalls wiederverwendet und zwischenzeitlich bei 4°C aufbewahrt. In einigen Fällen erfolgte die Entwicklungsreaktion der alkalischen Phosphatase colorimetrisch durch NBT und BCIP (Roche Molecular Biochemicals). Dazu wurden 4.5  $\mu$ l NBT-Lösung und 3.5  $\mu$ l BCIP in 1 ml Detektionspuffer suspendiert und die Membran in der Substratlösung bis zur gewünschten Farbreaktion (blauer Niederschlag) inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch einfaches Waschen mit Wasser beendet.

### 3.2.20 Herstellung promotorloser Expressionsvektoren.

Zur funktionellen Analyse der regulatorischen Effizienz unterschiedlicher genomischer Sequenzabschnitte wurden promotorlose Expressionsvektoren benötigt. Folgende Anforderungen wurden an diese Vektoren gestellt: 1) sie sollten über *in vivo* Reportergene (GFP und Derivate) verfügen, 2) es sollten unterschiedliche und unterscheidbare Varianten bezüglich der Reportergene vorliegen, 3) um als ubiquitärer Basisvektor zu dienen, sollte ein Wechsel des Reportergens durch Umklonieren problemlos sein, 4) sie sollten über geeignete Schnittstellen flankierend zum Translationsstart verfügen, um die Reporterstrukturen so exakt wie möglich an die genomische Organisation anzupassen 5) sie sollten zur Selektion eine Resistenz gegen Antibiotika und 6) ein Polyadenylierungssignal besitzen.

#### *pACSF-Y – der Basisexpressionsvektor.*

Zunächst wurde die *Not* I-Schnittstelle an Position 671 innerhalb des Polylinkers des Vektors pBluescript II KS (Stratagene) durch *Not* I-Verdau, Entfernen der Überhänge und Religation zerstört. Der Vektor wurde zur Aufnahme des Reportergenfragmentes zunächst mit *Kpn* I-Restriktionsenzym aufgeschnitten, Überhänge mit T4 DNA Polymerase I entfernt und

aufgereinigt, anschließend wurde mit *Apa* I-Enzym erneut verdaut und aufgereinigt. Das Reporterfragment (EYFP) wurde aus dem Vektor pEYFP1 (Clontech) durch Verdau mit *Afl* II, Entfernen der Überhänge und anschließendem Restriktionsverdau mit *Nco* I fragmentiert. Ein EYFP-SV40 PolyA Signal-enthaltendes 962 bp Fragment wurde aus dem Agarosegel isoliert. Der Vektor pGEM-T wurde mit *Nde* I-Enzym geschnitten, die Überhänge entfernt, mit *Nco* I erneut verdaut und mit dem Reporterfragment ligiert. Durch erneutes Schneiden mit *Sac* I, Entfernen der Überhänge und Verdau mit *Apa* I-Enzym wurde das Fragment in den vorbereiteten pBluescript II KS (*Apa* I, blunt) umkloniert. Der so erhaltene promotorfreie Expressionsvektor – pACSF-Y – beinhaltet das „enhanced yellow fluorescent protein“ (EYFP), das SV40 Polyadenylierungssignal, einen Großteil des pBluescript Polylinkers, einmalige Schnittstellen für *Nco* I- und *Not* I-Restriktionsendonukleasen, ist durch das  $\beta$ -Lactamasegen ampizilinresistent und hat eine Größe von 3.957 bp. Die *Not* I-Schnittstelle erlaubt zusammen mit geeigneten Schnittstellen des Polylinkers einen Austausch des Reportergens. Die Nukleinsäuresequenz und eine Karte der Organisation des Vektors ist im Anhang angegeben.

#### ***pACSF-dsRed.***

Die rot fluoreszierende Variante wurde durch Austausch des EYFP gegen DsRed erzielt. Der offene Leserahmen des DsRed wurde aus dem Vektor pDsRed1-N1 (Clontech) durch PCR mit dsRed-not und dsRed-ndeco Primern amplifiziert. Der Primer dsRed-not bindet flankierend zu der *Not* I-Schnittstelle am 3'-Ende des DsRed Gens, der Primer dsRed-ndeco führt zu einem Motivwechsel an der *Nco* I Schnittstelle (CCATGG) flankierend zum Translationsstartkodon gegen eine *Nde* I-Schnittstelle (CATATG). Der Motivwechsel war durch eine interne *Nco* I-Schnittstelle im offenen Leserahmen des DsRed notwendig. Oberhalb der *Nde* I-Restriktionsstelle führt der Primer zusätzlich eine *Eco* RI-Schnittstelle ein. Nach Verdau mit *Eco* RI- und *Not* I-Restriktionsendonukleasen wurde das Fragment in den Vektor pACSF-Y über identische Schnittstellen umkloniert. pACSF-Y wurde dazu durch Ausschneiden des EYFP über *Eco* RI und *Not* I und anschließende Gelextraktion des Vektorrahmens vorbereitet.

#### ***pACSF- $\tau$ -Y.***

pACSF- $\tau$ -Y enthält zusätzlich einen Sequenzabschnitt des Gens für das mikrotubulibindenden Protein tau. Das tau-Protein erleichtert den Transport von Reportergenen entlang von Axonstrukturen in die Projektionsgebiete. Ein für die ersten 236 bp des Leserahmens kodierendes effektives Fragment (Mombaerts et al., 1996) wurde durch PCR aus genomischer DNA von I7-tau-GFP Mäusen (Mombaerts, unveröffentlicht) mit tau-nco und tau-ndeco Primern amplifiziert. Der tau-ndeco Primer erzeugt wie im Falle von DsRed einen Motivwechsel von der am Translationsstart gelegenen *Nco* I- zu einer *Nde* I Schnittstelle. Der Primer tau-nco führt einen Motivwechsel der *Not* I-Schnittstelle an Position 236 des tau-Leserahmens gegen eine *Nco* I-Schnittstelle durch. Nach Verdau mit *Eco* RI und *Nco* I des PCR Produktes wurde dieses in identische Schnittstellen des Vektors pACSF-Y oberhalb des EYFP Leserahmens einkloniert.

### *pACSF-C.*

pACSF-C enthält das CFP, die zyan fluoreszierende Variante des GFP. CFP wurde nach Verdau mit *Sph* I und Entfernen der Überhänge mit *Nco* I-Restriktionsenzym aus dem Vektor YELLOWcam2.1 ausgeschnitten und in den Vektor pACSF-Y umklontiert. pACSF-Y wurde durch Verdau mit *Not* I, Entfernen der Überhänge, Verdau mit *Nco* I und anschließender Gelextraktion des Vektorrahmens vorbereitet.

### **3.2.21 Herstellung eines Konstruktes für die rekombinante Expression des OMP in Bakterien.**

Zur rekombinanten Expression des olfaktorischen Marker Proteins in *E.coli* wurde ein 402 bp großes Fragment des offenen Leserahmens mit dem AB-OMP<sub>kpn1</sub> und AB-OMP<sub>kpn2</sub> Primerpaar aus dem OMP Klon 8.1.3, der die OMP cDNA enthält, amplifiziert. Die Primer führen an den Enden des Amplifikationsproduktes Schnittstellen für das *Kpn* I-Restriktionsenzym ein. Die Gesamtgröße des erzielten Produktes beträgt 420 bp. Die PCR Bedingungen waren: 5' 96°C, 10x (1' 96°C, 1'30" 55°C, 1'+3"/Zyklus 72°C), 30x (1' 96°C, 1'30" 68°C, 1'+3"/Zyklus 72°C), 10' 72°C. Der PCR-Ansatz wurde mit *Kpn* I-Restriktionsendonuklease verdaut und in die *Kpn* I-Schnittstelle jedes der drei pQE-Vektoren (pQE30, pQE31, pQE32) einkloniert. Die Schnittstelle für *Kpn* I liegt im Polylinker dieser Vektoren. Die einzelnen Vektortypen unterscheiden sich durch unterschiedliche Leseraster. Die benutzten Primer waren so gewählt, dass ein korrektes Leseraster nach der Klonierung in den pQE30-Vektor vorliegen sollte. Erfolgreich ligierte und transformierte Klone wurden mit pQE-Reverse und pQE-III/IV Primern sequenziert um das jeweils vorliegende Leseraster zu überprüfen. Die identifizierten Klone 1E12 und 2C4 wurden weiterverwendet. Zunächst wurde versucht, die rekombinante Expression des Proteins in *E.coli* des Stammes XL1-blue MRF' zu induzieren, später wurde der Stamm SG13009 verwendet. Die Expression wurde in Bakteriensuspension der Klone 1E12 und 2C4 bei einer Bakteriendichte von OD = 0.6 durch Zugabe von 1 mM, 2 mM oder 10 mM IPTG (final) induziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Aliquots des Kulturansatzes entnommen und durch denaturierende SDS Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde jeweils 1 ml der Bakteriensuspension durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 200 µl 1x Laemmli Puffer (2.5% SDS, 75 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM Dithiothreitol, 0.005% Bromphenolblau) versetzt und für 5 min im Wasserbad bei 100°C gekocht. Anschließend wurde zentrifugiert und 20 µl der Probe auf ein Polyacrylamidgel (15% Gel: 5 ml 30% Acrylamidmischung (Sigma), 2.3 ml H<sub>2</sub>O, 2.5 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1 ml 10% SDS, 0.1 ml 10% Ammoniumpersulfat, 4 µl TEMED (Sigma)) bei 150 V aufgetrennt (Laufpuffer: 3.03 g/l Tris, 14,4g/l Glyzin, 1% SDS, pH 8.3). Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant blue (Roth) für 1 - 2 Stunden zuerst eingefärbt und überschüssiger Farbstoff mit 10% Methanol/10% Essigsäure ausgewaschen.

### 3.2.22 Herstellung der Konstrukte für die Expression calciumsensitiver Messproben.

#### ***prOMP<sub>1.3</sub>-CaM.***

Der Vektor prOMP<sub>1.3</sub>-CaME enthält das „yellow Cameleon 2.1“ unter *zOMP*-Promotorkontrolle im pACSF Vektorrahmen. Zur Konstruktion wurde die Cameleon 2.1 Sequenz aus dem Vektor YELLOWcam2.1 mit T7-pcDNA und SP6-pcDNA Primern durch PCR amplifiziert. Die PCR-Bedingungen waren: 2' 94°C, 30x (30" 94°C, 45" 54°C, 1' + 3"/Zyklus 72°C), 7' 72°C. Das 2 kb große Produkt wurde mit *Nco* I und *Not* I Restriktionsendonukleasen verdaut und aufgereinigt. Der Vektor prOMP<sub>1.3</sub>-Y wurde ebenfalls mit *Nco* I und *Not* I Restriktionsenzymen geschnitten, der prOMP<sub>1.3</sub> Vektorrahmen (ohne EYFP) aus einem präparativen Agarosegel isoliert und mit dem vorbereiteten CaMeleon ligiert. Der Klonierungserfolg wurde durch Sequenzieren über die Klonierungsschnittstellen und analytischen Restriktionsverdau mit *Nco* I und *Not* I Enzym verifiziert.

#### ***prOMP<sub>1.3</sub>-CaMG.***

Der CaMgaroo Calciumsensor wurde aus dem Vektors SVQST Cam 2-3 mit *Nco* I und *Not* I Restriktionsverdau herausgeschnitten, die 1.2 kb Bande aus einem präparativen Agarosegel isoliert und ebenfalls in den *Not* I und *Nco* I geschnittenen prOMP<sub>1.3</sub> Vektorrahmen ligiert. Der Klonierungserfolg wurde durch Sequenzieren über die Klonierungsschnittstellen und durch analytischen Verdau mit *Sph* I und *Nco* I verifiziert.

#### ***prOMP<sub>1.3</sub>-I.***

Enthält das "invers pericam" unter *zOMP*-Promotorkontrolle. Zur Klonierung wurde der Vektor YP3.2TF0-17 zunächst mit *Eco* RI Restriktionsenzym aufgeschnitten, die Überhänge entfernt und anschließend mit *Nco* I aus dem Vektor isoliert und über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt. Der prOMP<sub>1.3</sub> Vektorrahmen wurde durch Verdau mit *Not* I Restriktionsendonuklease, Entfernen der Überhänge und anschließendem *Nco* I Restriktionsverdau zur Ligation vorbereitet. Der Klonierungserfolg wurde durch Sequenzieren der *Nco* I Klonierungsschnittstelle verifiziert.

#### ***prOMP<sub>1.3</sub>-F.***

Enthält das "flash pericam" unter *zOMP*-Promotorkontrolle. Die Klonierung erfolgte wie bei prOMP<sub>1.3</sub>-I, jedoch durch Verdau des Vektors YP3.1HH1-1.

#### ***prOMP<sub>1.3</sub>-R.***

Enthält das "ratiometric pericam" unter *zOMP*-Promotorkontrolle. Aufgrund einer fehlenden *Nco* I Restriktionsschnittstelle wurde durch PCR mit Peri-nco und SP6-pcDNA Primern ein *Nco* I Motiv flankierend zum Translationsstart eingefügt. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 2' 94°C, 6x (30" 94°C, 45" 52°C, 1' 72°C), 25x (30" 94°C, 45" 64°C, 1' +3"/Zyklus 72°C), 7' 72°C. Das Produkt wurde mit *Nco* I und *Not* I Restriktionsendonukleasen verdaut und in prOMP<sub>1.3</sub> (*Not* I/*Nco* I) inkloniert.

### **3.2.23 Sequenzvergleiche.**

Datenbanksuchen in den Sequenzdatenbanken mit der Routine BLAST wurde unter [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) oder [www.ebi.ac.uk/blastall/](http://www.ebi.ac.uk/blastall/) durchgeführt. Sequenzvergleiche wurden durch das Wisconsin Package der Genetics Computer Group (GCG) durch die Subroutinen ClustalW, Pileup, Distances und Growtree generiert. Für die Bestimmung der Homologien zwischen unterschiedlichen Familienmitgliedern einer Gengruppe (*OMP*, *tbr*) wurde das Programm ClustalW unter [www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw) benutzt. Promotormotive wurden mit dem Public Domain Programm MatInspector ([www.gsf.de](http://www.gsf.de)) und unter den Internetadressen [www.fruitfly.org](http://www.fruitfly.org) und [www.genomic.sanger.ac.uk](http://www.genomic.sanger.ac.uk) gesucht. Für kleinere Sequenzvergleiche, Desktopklonierungen, Identifizierung von Restriktionsschnittstellen, Primerdesign, Dot-Plot, Translationen von DNA Sequenzen in Proteinsequenzen und Strukturvorhersagen wurde das Programm DNASIS v.2.1 (Hitachi) verwendet. Elektronische PCR wurde mit Amplify v1.2 (University of Wisconsin, Madison, WI, USA) durchgeführt und Plasmidkarten mit Mac Plasmap v1.82 (University of Utah, Salt Lake City, UT, USA) erstellt.

### **3.3 Histologische Arbeitsmethoden.**

#### **3.3.1 Immunhistochemie an Zebrafisch Embryonen.**

Antikörperfärbungen wurden zur Detektion von GFP in Embryonen des Zebrafischs zu zwei Zwecken eingesetzt. Es sollte geklärt werden, ob calciumsensitive Varianten, welche nicht durch ihre Eigenfluoreszenz detektierbar waren von Riechsinneszellen dieser Tiere exprimiert werden. Zum anderen diente die Immunhistochemie der Verstärkung vor allem axonaler GFP Signale zur Verwendung in immunhistochemischen Doppelfärbungen mit dem  $\alpha$ -ZNS2 Antikörper, der das Gesamtmuster der nasalen Projektionen in den olfaktorischen Bulbus darstellt.

Embryonen wurden ü.N. mit 4% Paraformaldehyd, 0.1% Glutaraldehyd (in PBS) bei 4°C fixiert, anschließend gründlich (4 x 5 min) in PBST (0.3% Tween 20 in PBS, pH: 7.4) gewaschen, mit H<sub>2</sub>O gespült (5 min) und für 7 min bei -20°C in Aceton permeabilisiert. Im Anschluss wurde erneut mit H<sub>2</sub>O gewaschen, einmal mit PBSDT (1% DMSO in PBST) äquilibriert und für mindestens 100 min in PBSDT, 10% Ziegennormalserum blockiert. Mit Primärantikörper (1:1000,  $\alpha$ -GFP, Kaninchen IgG, Torrey Pines Biolabs Inc., Houston, TX, USA) wurde ü.N. in PBSDT, 1% Ziegennormalserum bei 4°C inkubiert, anschließend zweimal 1 min und mehrfach über Tag mit PBSDT, 1% Ziegennormalserum, 0.1 M NaCl und zuletzt in PBSDT, 1% Ziegennormalserum gewaschen. Der Sekundärantikörper (1: 200, Alexa 488,  $\alpha$ -Kaninchen Fab, Molecular Probes) wurde ü.N. bei 4°C angewendet und anschließend zweimal 1 min und 5 x über Tag mit PBSDT, 0.1% Ziegennormalserum, 0.1 M NaCl gewaschen. Die Präparate wurden unter dem Fluoreszenzstereomikroskop oder Konfokalmikroskop bewertet und bei 4°C aufbewahrt.

### 3.3.2 *In situ*-Hybridisierung an Totalpräparaten des Zebrafisch Gehirns.

An Totalpräparaten des Zebrafisch Gehirns wurden nicht-radioaktive *In situ*-Hybridisierungen mit DIG-UTP-markierten RNA Sonden durchgeführt. Die Gehirne wurden in eiskaltem PBSM (10 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS) präpariert, gewaschen und die Hirnhäute durch Behandlung mit Proteinase K (15 µg / ml in PBSM) für 10 min bei 37°C verdaut. Anschließend wurde mit PBSM gewaschen und für 5 min bei Raumtemperatur mit 85% PFA/GA (4% Paraformaldehyd, 0.1% Glutaraldehyd), 15% gesättigte Pikrinsäure fixiert. Die Präparate wurden in PBS gewaschen und die Membranen durch Behandlung mit PBSTx (0.15% Triton X-100 in PBS) bei Raumtemperatur perforiert. Durch eine aufsteigende (5 min 10%, 5 min 25%, 5 min 50%, 3 x 10 min absolut) und absteigende (5 min 25%, 5 min 10%) Methanolreihe wurden die Membranen weiter aufgeschlossen, anschließend mit PBSTw (0.05% Tween-20 in PBS) zweimal gewaschen, erneut mit Proteinase K (10 µg / ml in PBSTw) bei 37° für 15 min behandelt und mit PBSTw gewaschen. Gehirne wurden dann bei 4°C für 5 min in 4% Paraformaldehyd, 0.1% Glutaraldehyd nachfixiert, zweimal mit PBSTw für 5 min gewaschen und in 2 ml Reaktionsgefäßen für 2 Stunden bei 60°C in Hybridisierungslösung (50% Formamid, 5x SSC, 0.2% Tween-20, 0.5% CHAPS, 100 µg / ml Torula RNA, 100 µg / ml Heparin) prähybridisiert. Im Anschluss wurde ü.N. bei 60°C mit 1 ng/µl Digoxigenin-markierter Sonde in Hybridisierungslösung hybridisiert.

Posthybridisierungswaschungen wurden durch zweimaligen Austausch der Hybridisierungslösung und zweimaliges Waschen mit Hybridisierungslösung für jeweils 30 min bei 60°C durchgeführt. Anschließend wurde für 20 min bei 60°C mit 1:1 Hybridisierungslösung, MaBSTw (1 M Maleinsäurepuffer, 0.05% Tween 20) gewaschen, die Präparate in Kulturschalen überführt, 3x mit MaBSTw gespült und 2x 30 min mit MaBSTw gewaschen, 1 Stunde in 2% Blockierungsreagenz (Roche Molecular Biochemicals, in MaBSTw) und 2 Stunden bei 4°C in 2% Blockierungsreagenz, 20% hitzebehandeltem Ziegennormalserum (30 min bei 56°C) in MaBSTw blockiert. Die Antikörperbindung (α-DIG-AP, 1:2000, Roche Molecular Biochemicals) erfolgte ü.N. bei 4°C in der gleichen Lösung. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Spülen mit MaBSTw und stündlichem Austausch gegen frisches MaBSTw über Tag ausgewaschen. Die Entwicklungsreaktion erfolgte nach Praeinkubation in Reaktionspuffer (0.1 M Tris-HCl, pH 9.5, 0.05% Tween 20) für 2x 10 min durch Zugabe von 4.5 µl NBT und 3.5 µl BCIP auf 1 ml Reaktionspuffer. Die Reaktion wurde durch Waschen mit PBSTw beendet und die Präparate bei 4°C ü.N. in PFA postfixiert.

### 3.3.3 Vibratonschnitte.

Gehirne des Zebrafisch wurden nach der *In situ*-Hybridisierung zur eindeutigeren Quantifizierung gefärbter Neurone mit dem Vibratom geschnitten. Dazu wurden die Präparate in 15% Gelatine in Schnappdeckeln eingebettet und ü.N. mit 4% Paraformaldehyd fixiert, aus dem Halterahmen befreit und für 3 Tage weiterfixiert. Anschließend wurde gründlich in PBS gewaschen und getrimmte Gelatineblöcke mit Sekundenkleber auf dem Objekthalter fixiert.

Von den Präparaten wurden mit dem Vibratom (tpi) 50 µm dicke vollständige Schnittserien angefertigt, die Schnitte auf Objektträgern gesammelt, kurz angetrocknet und in Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA, USA) montiert.

### **3.4 Herstellung transient transgener Fische.**

Fischeier wurden unmittelbar nach der Besamung aus den Laichbecken abgesammelt und von Verunreinigungen, durch Waschen in E3-Medium (Westerfield, 1995), befreit. Unter einem Stereomikroskop (Nikon) wurde durch Mikrokapillaren linearisierte Plasmid-DNA in einer Konzentration von 50 ng/µl durch Druckinjektion (Pneumatic Pico Pump, WPI, Berlin) in die erste Blastomere der furchenden Eier injiziert. Es wurde ungefähr ein Viertel des Blastomerenvolumens injiziert. Gelegentlich wurde das Plasmid auch unmittelbar unterhalb der Blastomere in den Dotter deponiert. Mit Beginn der ersten Furchung wurden die Eier dieses Geleges nicht mehr verwendet. Überschüssige Embryonen wurden zur Bestimmung der Mortalitätsrate eines Geleges ebenfalls aufgezogen. Injizierte Embryonen wurden im Laufe des Tages erneut mit E3-Medium gewaschen, tote Embryonen entfernt und im Brutschrank bei 28°C in Petrischalen zu 50 - 100 Individuen bebrütet. Die Expression der Reportergene wurde unter einem Fluoreszenzstereomikroskop (SMZU, Nikon) bewertet. Zur Bestimmung der Expressivität (Anzahl positiver Zellen/olfaktorischer Placode) und der Entwicklung der Expression in individueller Embryonen wurden sie mit feinen Pinzetten ab dem 2. Entwicklungstag vorsichtig dechorioniert und in 96-Lochplatten transferiert. Während des Beobachtungszeitraumes bis 120 hpf wurden die Tiere in diesen Platten belassen und anschließend zur weiteren Aufzucht in 2,5 l Aquarien überführt. Die weitere Aufzucht erfolgte wie in Westerfield (1995) beschrieben.

Zur Geschlechtsreife herangewachsene und mit Reporterplasmid injizierte Tiere wurden zur Etablierung transgener Linien miteinander verpaart. Die Nachkommen wurden auf die Expression des Reporters hin durchsucht oder zur Extraktion genomischer DNA verwendet und durch PCR auf die Präsenz des Reportergens hin untersucht.

### **3.5 Bildaufnahme und Dokumentation.**

Zur Bildaufnahme und Dokumentation von Präparaten aus immunhistochemischen Färbungen und *In situ*-Hybridisierungen sowie von reporter-genexprimierenden Embryonen wurden die folgenden Geräte und Verfahren verwendet:

Totalpräparate und Vibratomschnitte wurden unter dem Stereomikroskop mit Auflichtbeleuchtung oder Auflichtfluoreszenz betrachtet und über einen 100/0 - 20/80 Strahlteiler und Phototubus auf einer handelsüblichen Digital-Photokamera (CoolPix 900, Nikon) dokumentiert. Die integrierte Smart Card (Viking) wurde entweder über eine parallele Schnittstelle in konventionelle PC-Computer oder über ein Kartenlesegerät (SanDisk) in Macintoshcomputer eingelesen und gespeichert. Die anschließende Bildverarbeitung

(Kontrast, Helligkeit, Erzeugen von Bildausschnitten, Tonwertkorrektur) wurde mit Adobe Photoshop (verschiedene Versionen) durchgeführt.

Dünnschnitte und transgene Embryonen wurden mit dem inversen Mikroskop Axiovert S100 TV (Zeiss) und dem Monochromator- und Bildaufnahmesystem der Firma T.I.L.L. Photonics dokumentiert, zur Darstellung 16/8 bit konvertiert, in RGB gewandelt und als TIFF-Bilder ausgegeben.

Zur Rekonstruktion transgener Embryonen wurden Schichtaufnahmen (2  $\mu\text{m}$  Abstand) mit einem automatisierten Photomikroskop (Axioskop II, Zeiss) und Quantix Kamerasystem (Photometrix) unter Metamorph (Universal Imaging Co.) Softwarekontrolle aufgenommen und die Bildstapel mit der gleichen Software (2D Projektionen, 3D Rekonstruktionen) weiterbearbeitet oder mit dem Softwaremodul AutoDeblur (Auto Quant Imaging Inc.) einer Dekonvolutionsroutine (blind deconvolution) unterzogen. Alternativ wurden konfokale optische Schnittserien mit einem Leica TCLSM angefertigt.



## IV. ERGEBNISSE

### 1 AKTIVITÄTSKARTIERUNG STRUKTURABHÄNGIGER REPRÄSENTATION VON GERUCHSSTOFFEN.

Geruchsstoffe werden auf der Oberfläche des olfaktorischen Bulbus in einer chemotopen Aktivitätskarte abgebildet (Xu et al., 2000; Korsching, 2001). Im Zebrafisch entsprechen die Repräsentationsdomänen unterschiedlicher Geruchsstoffklassen (Friedrich und Korsching, 1997, 1998) bestimmten Bulbusabschnitten, die durch ihre Glomerulusstruktur morphologisch voneinander abgegrenzt werden können (Baier und Korsching, 1994). Innerhalb einer Repräsentationsdomäne sind die Geruchsantworten individueller Vertreter der jeweiligen Substanzklasse weiter organisiert. Geruchsstoffe rufen substanzspezifische, zum Teil überlappende, glomeruläre Antwortmuster hervor. Aminosäuren stimulieren multifokale (multiglomeruläre) Aktivitätsmuster innerhalb der lateralen Kette des anterolateralen Bulbus, wohingegen Gallensäuren, Nukleotide und Steroide andere Bulbusregionen reizen, die nicht oder nur geringfügig mit der Aminosäure-region überlappen (Friedrich und Korsching, 1998).

Trotz des wachsenden Fortschrittes unserer Kenntnis der Repräsentation von Geruchsstoffen im olfaktorischen System, ist bisher nur wenig über die Feinstruktur und den tatsächlichen Informationsgehalt geruchsstimulierter Aktivitätsmuster bekannt. Aufgrund der Projektion rezeptorgleicher Neurone in gemeinsame Zielglomeruli, repräsentiert das Antwortverhalten eines Glomerulus auch das Antwort- und Ligandenspektrum des jeweiligen Geruchsrezeptors. Mechanismen der Geruchsrezeptor-Liganden Wechselwirkung sind jedoch weitgehend unerforscht. Im Falle der Aminosäure-Geruchsrezeptoren des Zebrafisches war bisher nicht bekannt, welche Merkmale der Molekülstruktur der Aminosäuren effektiv erkannt und in glomeruläre Signale überführt werden. Theoretisch wäre eine kombinatorische Erkennung isolierter Strukturmerkmale der Aminosäuren durch viele Rezeptoren, wie es das Odor-Konzept beschreibt, denkbar (Shepherd, 1987). Die Zahl und die Bindungseigenschaften der Rezeptoren, die an der Aminosäurererkennung beteiligt sind, wurden bisher nur relativ grob klassifiziert (Caprio und Byrd, 1984; Friedrich und Korsching, 1997; Michel und Derbidge, 1997; Lipschitz und Michel, 1999, Speca et al., 1999). Klassisch wurden die Rezeptoren in vier unabhängige Kategorien eingeteilt, die an der Erkennung basischer, saurer und kurz- oder langkettiger neutraler Aminosäuren beteiligt sind.

Aminosäurestimuli stellen aufgrund ihrer relativ einfachen chemischen Struktur und der Verfügbarkeit interessanter Strukturanaloga eine geeignete Substanzklasse zur Untersuchung der modularen Feinstruktur von Geruchsstoffrepräsentationen im Bulbus dar. Durch eine systematische Analyse des Antwortverhaltens individueller Glomeruli sollte auf die Eigenschaften der zugrundeliegenden Geruchsrezeptoren zurückgeschlossen werden. Der Vorteil optischer Ableitungen von der Oberfläche des olfaktorischen Bulbus gegenüber elektrophysiologischen Ansätzen (z.B. Hara, 1976; 1977; Caprio und Byrd, 1984; Michel und Derbidge, 1997) besteht darin, dass das unterschiedliche Antwortverhalten rezeptorgleicher Zellpopulationen (d.h. Glomeruli) individuell, gleichzeitig und vollständig aufgezeichnet werden kann. Unterschiede der bulbären Antwortmuster zweier Stimuli reflektieren das selektive Ligandenspektrum der Glomeruli und der zugrundeliegenden Geruchsrezeptoren.

### **1.1 Generelle Eigenschaften geruchstoffstimulierter Antwortmuster.**

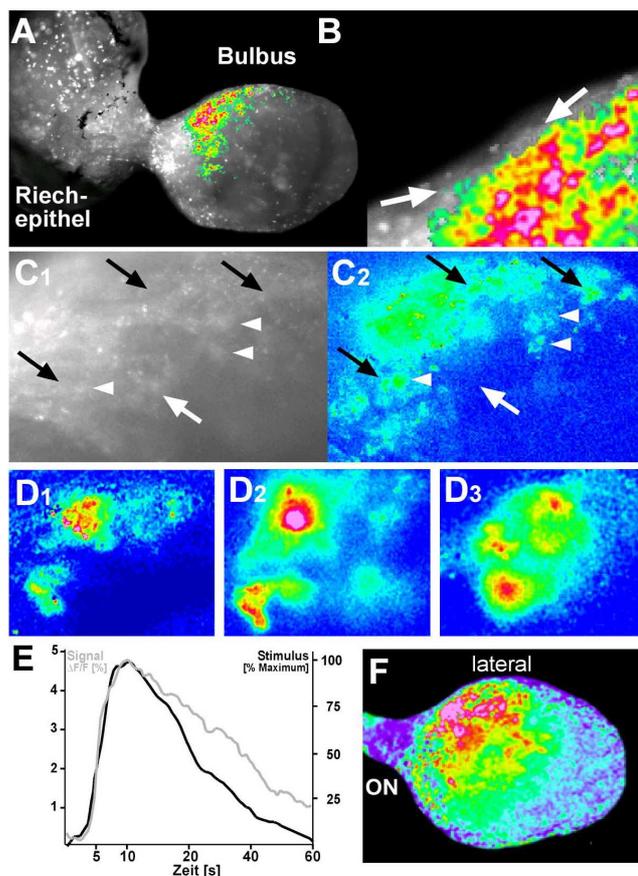
Die Stimulation des Riechepithels mit allen untersuchten L- $\alpha$ -Aminosäuren (**Tabelle 1**) führte zu messbaren Veränderungen des Calciumniveaus im olfaktorischen Bulbus. Fluoreszenzänderungen wurden ausschließlich innerhalb der glomerulären Schicht, nicht jedoch in der olfaktorischen Nervenschicht beobachtet (**Abb. 6A, B**). Da selektiv olfaktorische Sinneszellen über das Riechepithel mit dem Calciumindikator angefärbt wurden, gehen die beobachteten Fluoreszenzsignale auf die distalen Fortsätze und synaptischen Terminalien der Riechsinnzellen zurück. Die maximale Stärke der calciumabhängigen Fluoreszenzänderungen war präparat- und färbungsabhängig und lag in einem Bereich zwischen 2% und 8%  $\Delta F/F$ . Aminosäureinduzierte Signale konnten ausschließlich in der ventrolateralen anterioren Bulbusregion (**Abb. 6A**) detektiert werden und bestätigten die Beobachtungen von Friedrich und Korsching (1997). Die aufgezeichneten Antwortmuster waren aus bis zu 100 rundlichen Einzelfoki relativ einheitlicher Größe (ca. 10  $\mu\text{m}$  Durchmesser) zusammengesetzt, die ein individuelles Antwortverhalten gegenüber unterschiedlichen Stimuli aufwiesen. Der zeitliche Verlauf der induzierten Signale folgte grundsätzlich dem Stimulusverlauf (**Abb. 6E**). Der Signalanstieg verlief steil und war gegenüber dem Stimulusverlauf um etwa 500 ms versetzt (Grenze des zeitlichen Auflösungsvermögens bei 2 Hz Bildrate). Der Abfall des Signals hingegen war gegenüber dem Stimulusverlauf zeitlich verzögert und Ruhewerte wurden ungefähr 50 - 60 s nach der Stimuluspitze erreicht.

Zeitabhängige Veränderungen des Antwortmusters während einer Stimulation (siehe z.B. Wehr und Laurent, 1996; Laurent, 1997) konnten mit den verwendeten Belichtungszeiten und Bildraten nicht aufgezeichnet werden. Die beobachtbaren zeitlichen Veränderungen entsprachen einem intensitätsabhängigen Aufbau und Abfall der Antwortmuster. Aktivitätsfoki, die maximale Intensitäten im Gesamtmuster einnahmen, erreichten die Detektionsschwellenwerte zu einem früheren Zeitpunkt der Stimulation und persistierten länger als Foki mittlerer und schwacher Intensität. Eine Verlagerung des Musterschwerpunktes zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Stimulation trat nicht auf.

Die glomeruläre Feinstruktur des Bulbus konnte durch den Farbstoff Calcium Green<sup>TM</sup>-1 dextran morphologisch nur schlecht aufgelöst werden (**Abb. 6 C**; siehe auch Friedrich, 1997). Die Farbstoff-Fluoreszenz wurde ausschließlich in den Bulbi ipsilateral zum gefärbten Riechepithel erkannt. Die gefärbten Bulbi besaßen eine bis zu 50-fach intensivere Grundfluoreszenz als unbehandelte Bulbi. Anteriore Bulbusabschnitte waren intensiver, laterale und mediale Bereiche in etwa gleich stark gefärbt. Eine etwas stärkere Grundfluoreszenz konnte in Bereichen mit dichterem Glomerulusstruktur [laterale Kette, anteriores *Cluster* (Baier und Korsching, 1994)] beobachtet werden. Überraschenderweise konnte vor allem in solchen Präparaten, die keine morphologischen Einzelheiten erkennen ließen, eine ausgeprägte Signalstruktur mit deutlich voneinander abgegrenzten Einzelfoki im Antwortmuster aufgezeichnet werden. Gelegentlich wurden Präparate erhalten, in denen individuelle Glomeruli durch eine starke Grundfluoreszenz deutlich sichtbar waren. Diese Präparate waren jedoch nicht oder nur wenige Male stimulierbar. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelte es sich hierbei um absterbende Fasern, bei denen es zu einem

Calciumeinstrom und damit einhergehenden starken Farbstoff-Fluoreszenzen kam. Auch in gelegentlich erhaltenen Präparaten, in denen einige der ungefähr 10 µm großen Einzelglomeruli der lateralen Kette erkennbar waren (**Abb. 6C**), entsprang der überwiegende Anteil der Aktivitätsfoki homogen gefärbten und strukturlos erscheinenden Bulbusbereichen. Die Berechnung der  $\Delta F/F$ -Bilder ist sehr sensitiv gegenüber Verschiebungen relativ zum Referenzbild F. Besonders die Verschiebung eines hellen Bildpunktes in einen dunkleren Bildbereich führt zu artifiziellen  $\Delta F/F$  Signalen. Das Auftreten von Aktivitätszentren in homogen gefärbten Bereichen, die weniger sensitiv für solche Artefakte sind, ist daher ein guter Hinweis auf die Authentizität der Geruchsantworten.

**Abb. 6 – Generelle Eigenschaften geruchsstoffstimulierter Aktivitätsmuster im *Bulbus olfactorius*.**



**A.** Calcium Green<sup>TM</sup>-1 Färbung und Signalausbreitung im *Bulbus olfactorius* (ventrale Ansicht). Links ist das gefärbte Riechepithel, rechts der Bulbus dargestellt. Aminosäuresignale (Alanin, 10<sup>-2</sup> M) treten ausschließlich im lateralen Bulbus (oberer Bulbusrand) auf. Die überlagerte Fluoreszenzänderung ( $\Delta F/F > 1\%$ ) ist falschfarbenkodiert dargestellt. **B.** Detailansicht aus A. In der äußeren olfaktorischen Nervenschicht (*Pfeile*) treten keine Calciumsignale auf. **C.** Vergleich zwischen der Farbstoff-Fluoreszenz (C1) und geruchsstoffstimulierten Fluoreszenzänderungen,  $\Delta F/F$  (C2). An drei morphologisch erkennbaren Glomeruli treten deutliche Fluoreszenzsignale auf (*Pfeilköpfe*). Zusätzlich sind Glomeruli morphologisch erkennbar, die nicht auf den Stimulus (Alanin, 10<sup>-4</sup> M) reagieren (*weiße Pfeile*). Deutliche Aktivitätsfoki können aber auch in gleichmäßig gefärbten Bereichen auftreten (*schwarze Pfeile*). **D.** Interindividueller Vergleich der stimulierten Antwortmuster aus drei Präparaten. Es können sowohl ähnliche (D1, D2) als auch unterschiedliche Antwortmuster (D3 mit D1, D2) in individuellen Präparaten aufgezeichnet werden. Alaninstimulation, 10<sup>-4</sup> M.  $\Delta F/F$ : -0.5 (blau) - 4% (rot). **E.** Zeitverlauf des Stimulus (schwarz) und des Signals (grau). Das Signal steigt mit dem Stimulus, persistiert jedoch länger. **F.** Stimulation mit Forskolin. Forskolin (10<sup>-5</sup> M) erregt Aktivität im anteriolateralen Quadranten des Bulbus (links: anterior, oben: lateral,  $\Delta F/F$ : -0.5 (blau) - 3.5 % (rot).

Innerhalb einer Präparation riefen repetitive Stimulationen mit der gleichen Aminosäure ununterscheidbare Antwortmuster hervor (**Abb. 7A**). Im Vergleich zwischen verschiedenen Präparaten wurden durch Reizung mit einem identischen Stimulus sowohl sehr ähnliche als auch sehr unterschiedliche Antwortmuster erhalten (**Abb. 6D**). Diese Varianz kann nur zum Teil durch Unterschiede in der Präparation und der Orientierung des Bulbus in der Ableitkammer erklärt werden und besitzt wahrscheinlich auch biologische Ursachen. Eine entsprechende Variabilität, sowohl der Gesamtzahl als auch der exakten Position identifizierter Glomeruli der Maus wurde in mehreren unabhängigen Studien gezeigt (Royal und Key, 1999; Strotmann et al., 2000; Schaefer et al., 2001). Trotz der, zum Teil erheblichen, Musterunterschiede konnten Gemeinsamkeiten und einheitliche Veränderungen der Muster gegenüber bestimmten Stimulusparametern (Kettenlänge, funktionelle Gruppen) beobachtet werden.

Im olfaktorischen System der Ratte ist die Beteiligung sowohl des cAMP- als auch des IP<sub>3</sub>-Signaltransduktionsweges an den Geruchsantworten gezeigt worden (zusammengefasst und diskutiert in Schild und Restrepo, 1998), die hier grob charakterisiert wurden. Forskolin (10<sup>-5</sup> M), ein membrangängiger Aktivator der Adenylatzyklase, erregt ausgedehnte Aktivität im olfaktorischen Bulbus (**Abb. 6F**, n = 3). Die Erregung ist auf den anterio-lateralen Quadranten beschränkt. Dieser Quadrant entspricht der Aminosäureregion und der Position einiger distinkter Glomeruli der mitt-ventralen Oberfläche des Bulbus. Die Gallensäureregion im medialen Bulbus und die Nukleotidregion im posterio-lateralen Bulbus wurden durch Forskolin nicht stimuliert. Der Aktivator der Phospholipase C, PMA (10<sup>-4</sup> M), besaß keine stimulierende Wirkung auf das Geruchssystem des Zebrafährblings (n = 3, nicht gezeigt).

Individuelle Präparate konnten über einen Zeitraum von 1 bis 8 Stunden untersucht werden. Im Verlauf eines Experimentes nahm die Antwortstärke jedoch entsprechend ab. Dieses Verhalten war größtenteils durch ein Ausbleichen des Farbstoffs bedingt, da mit zunehmender Dauer des Experimentes längere Belichtungszeiten erforderlich waren, um vergleichbare Grundfluoreszenzen aufzunehmen. Die Experimente wurden abgebrochen, wenn die Belichtungszeiten in etwa das Doppelte des ursprünglichen Wertes annahmen oder erkennbare Veränderungen des Präparates oder der Antwortmuster auftraten.

## 1.2 Die L- $\alpha$ -Aminosäurekonfiguration als bindendes Strukturmotiv.

Aminosäuren können chemisch durch ein chirales Zentrum, das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom, beschrieben werden, welches asymmetrisch von einem  $\alpha$ -Wasserstoffatom, einer  $\alpha$ -Aminogruppe, einer  $\alpha$ -Carboxylgruppe und einem variablen Rest (oder Seitenkette) umgeben ist. Wasserstoffatom, Amino- und Carboxylgruppe bilden das Grundmotiv der Aminosäuren, die Seitenkette bestimmt ihre Identität. Durch den Vergleich mit Strukturanaloga wurde zunächst die Bedeutung einzelner Gruppen des Grundmotivs für die Bindung an einen Aminosäure-Geruchsrezeptor untersucht (**Tabelle 1**). Mit Ausnahme des  $\alpha$ -Wasserstoffs wurden die Bindungen des  $\alpha$ -Kohlenstoffatoms durch Austausch, Eliminierung oder Verschiebung verändert. Bewertet wurde das Vermögen dieser Derivate, Geruchsantworten in der Aminosäureregion des olfaktorischen Bulbus auszulösen.

**Tabelle 1 – Übersicht über die verwendeten Aminosäure-Geruchsstoffe und ihre Strukturderivate.**

Kettenlänge	Aminosäuren					Derivate			
	D-versch.	unverzweigt	L-Aminosäuren			Amine	Diamin	Aminoalkohol	Carbonsäuren
			$\beta$ -OH	$\beta$ -NH <sub>2</sub>	$\gamma$ -NH <sub>2</sub>	n-NH <sub>2</sub>			
2		Glyzin							Ethansäure
3	Alanin	Alanin	Serin				2-Amino-propan	Alaninol	Propansäure
4	Methionin	2-Amino-buttersäure (2-ABS)	Threonin	3-Amino-buttersäure (3-ABS)	4-Amino-buttersäure (4-ABS)		1,4-Diaminobutan (Putreszin)		Butansäure
5		2-Amino-pentansäure (2-APS)				Ornithin	2-amino-pentan		Pentansäure
6	Lysin	2-Amino-hexansäure (2-AHS)				Lysin			Hexansäure
8		2-Amino-octansäure (2-AOS)							Octansäure

Liste der untersuchten Aminosäuren und Strukturanaloga nach Kettenlänge und funktioneller Gruppe geordnet: Die Kettenlänge in Spalte 1 bezieht sich auf die Anzahl der Kohlenstoffatome im Grundgerüst der Moleküle. In Spalte 2 sind D-Aminosäuren und in Spalten 3 - 7 L-Aminosäuren aufgelistet. Die Spalten 8 - 11 enthalten unterschiedliche Derivate. Strukturunterschiede sind in den Spaltenüberschriften charakterisiert.

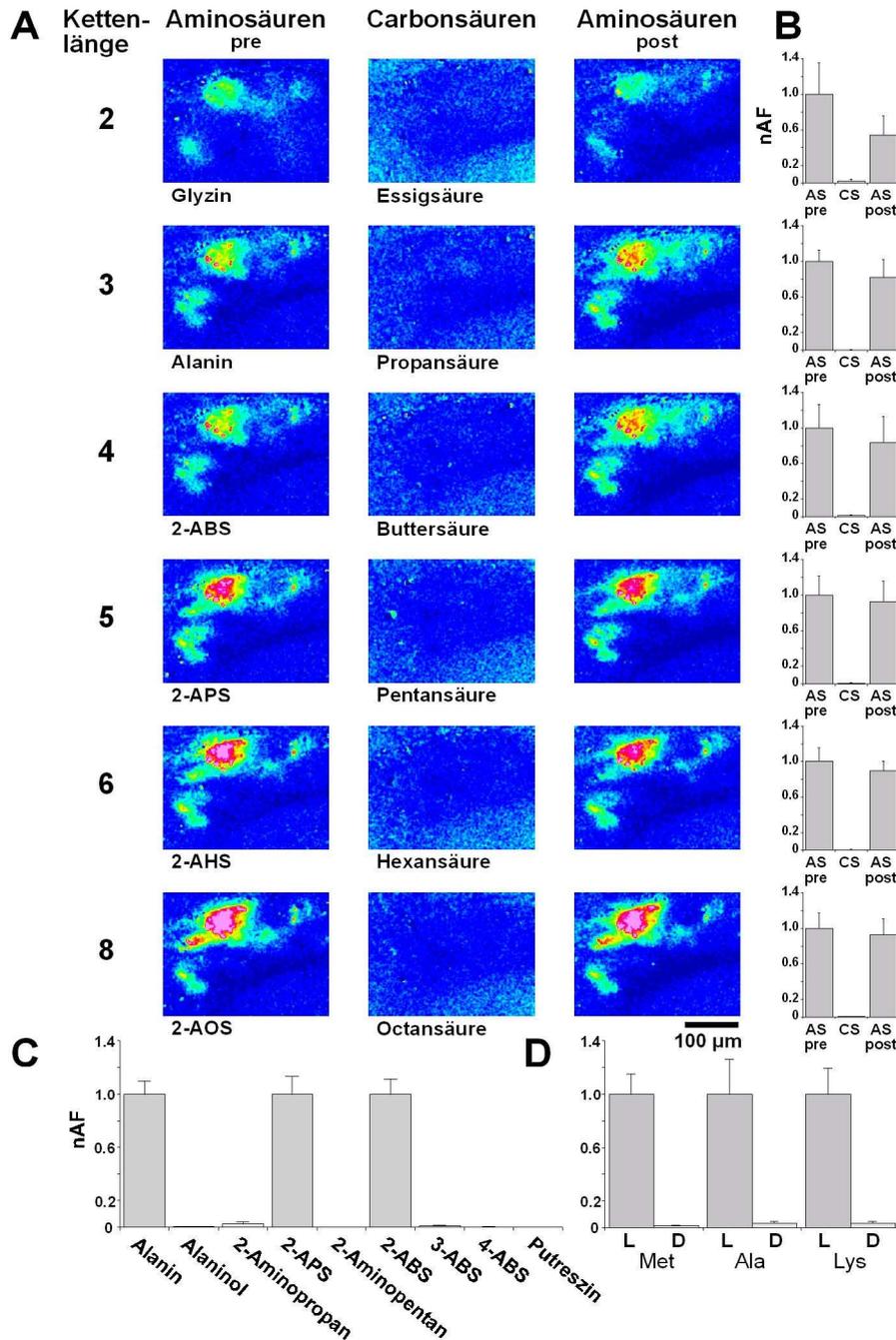
### 1.2.1 Die Bedeutung der $\alpha$ -Aminogruppe.

Carbonsäuren unterscheiden sich chemisch von den Aminosäuren durch das Fehlen der  $\alpha$ -Aminogruppe. Für eine Reihe landlebender Wirbeltiere stellen die Carbonsäuren intensiv riechende Substanzen dar, die physiologisch und in Verhaltenstests leicht voneinander unterschieden werden können (Mori et al., 1992; Laska und Teubner, 1998; Johnson et al., 1999; Rubin und Katz, 1999; Meister und Bonhoeffer, 2001). Eine homologe Reihe aliphatischer Fettsäuren mit Kettenlängen von 2 (Essigsäure) bis 8 (Octansäure) Kohlenstoffatomen im Grundgerüst wurde mit ihren analogen Aminosäuren verglichen.

Keine der sechs untersuchten Carbonsäuren (Essigsäure, Propansäure, Buttersäure, Pentansäure, Hexansäure und Octansäure) rief in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-5}$  bis  $10^{-2}$  M Geruchsantworten im lateralen olfaktorischen Bulbus hervor (**Abb. 7A**). Im Gegensatz dazu, führten alle korrespondierenden Aminosäuren, mit Schwellenkonzentrationen von  $10^{-6}$  bis  $10^{-4}$  M, zu deutlichen Reizantworten (für eine Analyse der aminosäureinduzierten Signale siehe **IV.1.3.1**). Die Stimulation mit Aminosäuren war sowohl vor als auch nach der Applikation der Carbonsäuren effektiv und die respektiven Antwortmuster unterschieden sich nicht voneinander (**Abb. 7A, B**). Eine funktionelle Beeinträchtigung des Präparates durch die Präsentation der Carbonsäuren kann daher ausgeschlossen werden. Das Fehlen carbonsäureinduzierter Signale muss vielmehr durch die fehlende stimulatorische Wirksamkeit dieser Substanzen erklärt werden. Riechsinneszellen, die Aminosäure-Geruchsrezeptoren exprimieren und in den ventrolateralen Bulbus projizieren, werden durch Fettsäuren nicht erregt.

Zur Quantifizierung dieser Befunde wurde die Ausdehnung der Stimulusantworten auf der Bulbusoberfläche (= Antwortfläche) bestimmt. Bewertet wurden Signale, die einen Schwellenwert von 1%  $\Delta F/F$  überschreiten. Durch den Schwellenwert ist sichergestellt, dass nur Signale, die signifikant vom Hintergrundrauschen verschieden sind, bewertet werden (siehe **III.3.1.5**). Die Antwortflächen aminosäurestimulierter Signale variierten für die jeweils untersuchten Stimuli (Kettenlänge von 2, 3, 4, 5, 6 oder 8) vor und nach der Applikation von Carbonsäuren nicht wesentlich voneinander (**Abb. 7B**,  $p > 0.1$ , für alle Aminosäuren prae/post-Vergleiche, Student's t-Test). Das Fehlen carbonsäureinduzierter Antworten wird durch den quantitativen Vergleich mit den Aminosäuren besonders deutlich [nAF (normierte Antwortfläche) der Carbonsäure:  $0.02 \pm 0.02$  (MW  $\pm$  SEM, Kettenlänge = 2),  $0.004 \pm 0.001$  (3),  $0.1 \pm 0.009$  (4),  $0.007 \pm 0.007$  (5),  $0.005 \pm 0.002$  (6),  $0.001 \pm 0.0008$  (8)]. Insgesamt wurden 4 Präsentationen pro Stimulus (Aminosäure prae, Aminosäure post, Carbonsäure), die in 3 unterschiedlichen Präparaten aufgezeichnet wurden, in die Analyse einbezogen.

Da Aminosäuren räumlich ausgedehnte Antworten hervorrufen (s.u.) besteht die Gefahr, dass durch Carbonsäuren stimulierte Einzelglomeruli durch die Normierung auf das Aminosäuresignal unterbewertet und nicht erkannt werden. Der Schwellenwert von 1%  $\Delta F/F$  wurde jedoch auch absolut durch die Carbonsäuren kaum erreicht. Durchschnittlich wurden mit allen Carbonsäuren 17 Pixel des 20.000 Pixel umfassenden Bildausschnittes über 1% stimuliert. Das entspricht 0.086% aller Pixel des Ausschnittes und liegt innerhalb der Fehlertoleranz des Schwellenkriteriums von mindestens 0.15%. Durch die Aminosäuren hingegen wurden im Durchschnitt 2441 Pixel (= 12.2% aller Pixel) über 1% erregt.



**Abb. 7 – Die Bedeutung der L- $\alpha$ -Aminosäurekonfiguration als aktivierendes Strukturmerkmal.**

**A.** Vergleich zwischen Carbonsäuren unterschiedlicher Kettenlänge und ihren analogen Aminosäuren ( $10^{-4}$  M). Nur die anterolaterale Bulbusregion ist gezeigt.  $\Delta F/F$ -Werte sind falschfarbenkodiert dargestellt, -0.5 (blau) - 4% (rot). Aminosäuren erregen Signale im anterolateralen Bulbus vor (linke Spalte) und nach (rechte Spalte) der Applikation von Carbonsäuren (mitte); Carbonsäuren sind nicht effektiv. **B.** Quantifizierung der normierten Antwortflächen (nAF) für Stimulationen mit Amino- und Carbonsäuren (jeweils  $10^{-4}$  M). Die Kettenlängen entsprechen der Darstellung in A. Die Anzahl der Bildpunkte oberhalb des Schwellenwertes von 1%  $\Delta F/F$  wurde jeweils auf den Wert der ersten Aminosäurepräsentation (AS pre) gleicher Kettenlänge normiert (nAF der Stimulation mit Aminosäuren vor (AS pre) und nach (AS post) der Applikation von Carbonsäuren (CS)). Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus jeweils 4 Applikationen (3 Präparate). **C.** Quantifizierung der normierten Antwortfläche (nAF) nach Stimulation mit Aminosäuren und unterschiedlichen Derivaten. Keines der untersuchten Derivate erregt Antworten im lateralen Bulbus. Die Antwortflächen wurden auf die Antwortstärke der Aminosäure gleicher Kettenlänge normiert (Mittelwerte und Standardfehler von 22 (Alanin), 5 (Alaninol), 7 (2-Aminopropan), 4 (2-APS), 2 (2-Aminopentan), 8 (2-ABS), 2 (Putreszin), 3 (3-ABS) und 3 (4-ABS) Präsentationen aus 2 bis 5 Präparaten). **D.** Quantifizierung der Antwortfläche (nAF) nach Stimulation mit L- und D-Aminosäuren, normiert auf die jeweilige L-Aminosäure (Mittelwerte und Standardfehler von jeweils 8 Präsentationen aus 4 Präparaten).

Das Fehlen carbonsäureinduzierter Signale wird auch durch die jeweiligen Differenzindizes (DI, siehe **III.3.1.5**) für wiederholte Carbonsäure- und Aminosäurestimulationen erhärtet. Mit einem durchschnittlichen DI-Wert von  $1.16 \pm 0.21$  (MW $\pm$ SEM, 1 Paarung/Kettenlänge) werden für die Carbonsäuren Werte erzielt, die für reines Hintergrundrauschen erwartet werden. Im Gegensatz dazu beträgt der durchschnittliche DI-Wert aller prae/post-Vergleiche der aminosäurestimulierten Antwortmuster  $0.36 \pm 0.02$  (MW $\pm$ SEM).

Die  $\alpha$ -Aminogruppe stellt das unterscheidende Strukturmerkmal des Vergleichs zwischen Amino- und Carbonsäuren dar. Im Gegensatz zu den Aminosäuren konnte durch keine der Carbonsäuren nachweisbare Aktivität im lateralen olfaktorischen Bulbus stimuliert werden. Die Befunde legen nahe, dass die  $\alpha$ -Aminogruppe an der Wechselwirkung mit den Aminosäure-Geruchsrezeptoren und deren Aktivierung direkt beteiligt ist.

Eine weitere Versuchsreihe, bei der die Aminogruppe entlang der Seitenkette auf das  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kohlenstoffatom verschoben wurde, ergab, dass die exakte Position der Aminogruppe am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom ebenso von entscheidender Bedeutung ist. Die Substanzen 3-Aminobuttersäure ( $n = 3$ ) und 4-Aminobuttersäure (der Neurotransmitter GABA,  $n = 3$ ) besaßen ebenfalls keine stimulatorische Wirksamkeit. Im Gegensatz zu dem entsprechenden Referenzstimulus, 2-Aminobuttersäure (nAF := 1, Pixel: 19.7%, DI: 0.28), riefen 3-Aminobuttersäure (nAF:  $0.016 \pm 0.01$ , Pixel: 0.17%, DI, 1.21) und 4-Aminobuttersäure (nAF:  $0.004 \pm 0.002$ , Pixel: 0.051%, DI: 1.24) keine messbaren Fluoreszenzsignale hervor (**Abb. 7C**).

Um eine aktivierende Wechselwirkung mit den Aminosäure-Geruchsrezeptoren einzugehen, ist daher die Präsenz einer freien Aminogruppe am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom der Liganden zwingend notwendig.

## 1.2.2 Die Bedeutung der $\alpha$ -Carboxylgruppe.

Durch einen Vergleich der Aminosäuren Alanin und 2-Aminopentansäure mit ihren analogen Aminoalkanen wurde die Bedeutung der  $\alpha$ -Carboxylgruppe in ähnlicher Weise untersucht (**Abb. 7C**). Sowohl 2-Aminopropan ( $n = 7$ ; nAF:  $0.02 \pm 0.01$ , Pixel: 0.59%, DI: 1.19) als auch 2-Aminopentan ( $n = 2$ ; nAF: 0.001, Pixel: 0.35%, DI: 1.02) waren im Gegensatz zu den respektiven Referenzstimuli Alanin und 2-Aminopentansäure nicht effektiv. Das natürlich vorkommende Diamin Putreszin, welches als geruchlicher Begleiter von Verrottungsprozessen auftritt und daher für den Fisch verhaltensrelevant sein könnte, rief ebenfalls keine Geruchsantworten hervor ( $n = 2$ ; nAF: 0.001, Pixel: 0.03%, DI: 1.2). Alaninol, ein Aminoalkohol bei dem die geladene Carboxylgruppe durch eine polare Hydroxylgruppe ausgetauscht ist, zeigte ebenfalls kein Vermögen, Signale im lateralen Bulbus hervorzurufen ( $n = 5$ ; nAF:  $0.004 \pm 0.002$ , Pixel: 0.93%, DI: 1.2).

Jede der untersuchten strukturellen Veränderungen der  $\alpha$ -Carboxylgruppe eines Aminosäuremoleküls führte zu einem vollständigen Verlust der stimulatorischen Wirksamkeit. Dadurch wird nahegelegt, dass die  $\alpha$ -Carboxylgruppe ebenfalls an einer bindenden Wechselwirkung mit den Aminosäure-Geruchsrezeptoren beteiligt ist. Sie stellt eine weitere Mindestanforderung der Aminosäure-Geruchsrezeptoren an einen wirksamen Liganden dar.

### **1.2.3 Der Einfluss der Stereokonformation.**

Die  $\alpha$ -Amino- und die  $\alpha$ -Carboxylgruppe wurden bisher als bindende Strukturmerkmale der Aminosäuren erkannt. Ob über diese funktionellen Gruppen hinaus weitere Molekülaspekte der Aminosäuren von maßgeblicher Bedeutung für die Erkennung durch die Geruchsrezeptoren sind, sollte durch eine Betrachtung der Stereokonformation der Liganden aufgeklärt werden. Die D-Enantiomere dreier Aminosäuren, die unterschiedlichen Subklassen angehören (basisch: Lysin, kurzkettig neutral: Alanin, langkettig neutral: Methionin) wurden im Vergleich mit ihren L-Strukturisomeren untersucht (**Abb. 7D**).

Jede L-Aminosäure rief bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M robuste Antwortmuster im lateralen Bulbus hervor. Alle korrespondierenden D-Isomere wirkten bei gleicher Konzentration nicht stimulatorisch ( $n = 8/\text{Aminosäure}$  aus 4 Präparaten; L-Methionin: nAF := 1, DI: 0.30; D-Methionin: nAF: 0.01, DI: 0.91; L-Alanin: nAF := 1, DI: 0.39; D-Alanin: nAF: 0.03, DI: 0.84; L-Lysin: nAF := 1, DI: 0.38; D-Lysin: nAF: 0.03, DI: 0.97). Auch bei einer Stimuluskonzentration von  $10^{-2}$  M konnten durch die drei D-Aminosäuren keine detektierbaren Antwortmuster hervorgerufen werden ( $n = 3/\text{Aminosäure}$ ).

Die Stereokonformation der Aminosäuren beeinflusst die stimulatorische Wirksamkeit ebenfalls. Daraus wird ersichtlich, dass die relative Anordnung der rezeptorbindenden  $\alpha$ -Amino- und  $\alpha$ -Carboxylgruppe nicht willkürlich sein darf und dass beide Gruppen nicht unabhängig voneinander im Molekül erkannt werden. Darüber hinaus legt der Einfluss der Stereokonformation auch eine Beteiligung weiterer Molekülaspekte der Aminosäuren an der Wechselwirkung mit den Aminosäure-Geruchsrezeptoren nahe. Ob diese Wechselwirkungen bindenden Charakter besitzen oder durch die Konformation der Bindungstasche der Rezeptoren im Sinne einer sterischen Hinderung bestimmt werden, bleibt an dieser Stelle offen.

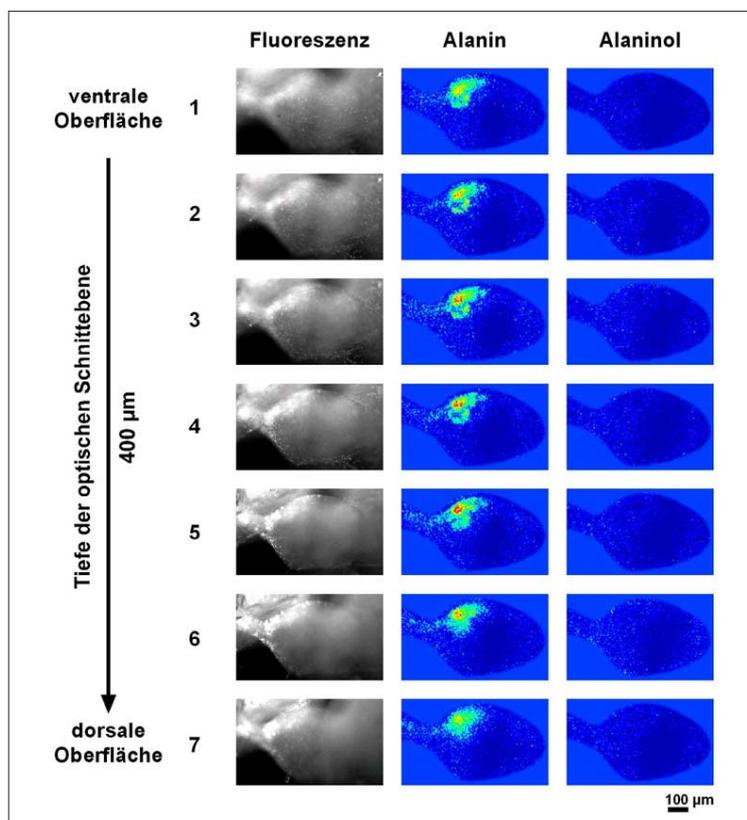
Von den Aminosäure-Geruchsrezeptoren wird das gesamte Grundmotiv der Aminosäuren, d.h. das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom mit  $\alpha$ -Amino- und  $\alpha$ -Carboxylgruppe in der L-Konformation, erkannt. Hinweise auf eine isolierte Erkennung der einzelnen Struktur motive durch weitgehend unspezifische Rezeptoren ergaben sich nicht. Aminosäuren werden von relativ spezifischen Rezeptoren zunächst als Vertreter dieser Substanzklasse erkannt. Über die Rezeptorbindung der  $\alpha$ -ständigen Gruppen hinaus werden weitere Molekülaspekte von den Rezeptoren detektiert (siehe auch **IV.1.3**).

### **1.2.4 Inaktive Aminosäurederivate erregen auch außerhalb der Aminosäureregion keine Signale.**

Wie vorhergehend gezeigt werden konnte, rufen Aminosäurederivate mit Veränderungen des Grundmotivs (Carbonsäuren, Aminoalkane, Aminoalkohole, Diamine,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und D-Aminosäuren) in der aminosäurerepräsentierenden ventrolateralen Bulbusregion keine Geruchssignale hervor. Ein Fehlen von Signalen in der Aminosäureregion kann jedoch eine Bindung an weitere Geruchsrezeptorklassen und eine Repräsentation dieser Substanzklassen in anderen Bulbusarealen nicht grundsätzlich ausschließen. Daher wurden optische Ableitungen von der gesamten ventralen Oberfläche während der Stimulation mit

diesen Derivaten durchgeführt. Auch unter diesen Bedingungen konnte keine Veränderung des Calciumniveaus im olfaktorischen Bulbus durch Carbonsäuren, Aminoalkane, 3-Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäure, Putreszin, Alaninol und Aminosäuren in der D-Konformation evoziert werden.

Aminosäuresignale treten im ersten Drittel entlang der ventro-dorsalen Achse des Bulbus auf. In Ableitungen des gesamten Bulbus wurden auch Messungen in unterschiedlichen optischen Schnittebenen entlang dieser Achse durchgeführt. Wie die **Abbildung 8** für einen Vergleich zwischen Alanin und Alaninol exemplarisch zeigt, ist das Alaninsignal in allen Fokusebenen, unabhängig von der Schichttiefe, deutlich erkennbar. Sowohl in den extrem ventralfokussierten (Schnitt 1) als auch in den extrem dorsalfokussierten (Schnitte 6 bis 8) optischen Schnitten ist eine zunehmende Unschärfe des Musters zu erkennen. In keiner der optischen Schnittebenen konnten jedoch alaninolinduzierte Signale aufgezeichnet werden (**Abb. 8**). Dieses Ergebnis war von der Konzentration unabhängig ( $10^{-4}$  M,  $10^{-2}$  M). Jedes inaktive Derivat wurden mindestens einmal auf diese Weise untersucht. In keinem Fall konnten aktive Glomeruli erkannt werden.



**Abb. 8 – Alaninol erregt auch außerhalb der Aminosäureregion keine Signale.**

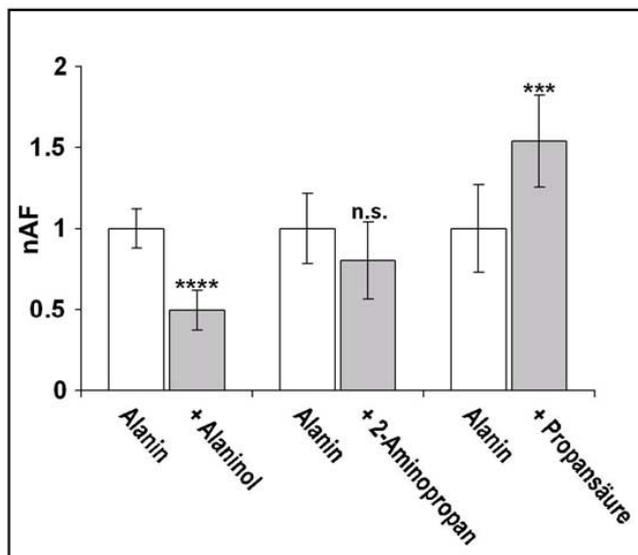
Optische Ableitungen des gesamten olfaktorischen Bulbus in unterschiedlichen optischen Schnittebenen entlang der dorsoventralen Achse des Bulbus (oben: auf die ventrale Bulbusoberfläche fokussiert, unten: auf die dorsale Bulbusoberfläche fokussiert, dazwischen: intermediäre optische Schnittebenen). Links: Calcium Green™-1 Fluoreszenz, mitte: Stimulation mit Alanin ( $10^{-2}$  M), rechts: Stimulation mit Alaninol ( $10^{-2}$  M). Alanin erregt Aktivität im ventrolateralen Bulbus, die in allen Fokusebenen erkennbar ist. Das Signal ist in der 2. und 3. optischen Schnittebene am schärfsten aufgezeichnet, wohingegen die Unschärfe in weiter dorsal und ventral gelegenen Fokusebenen zunimmt. Alaninol induziert auch außerhalb der Aminosäureregion keine detektierbare Antworten, unabhängig von der betrachteten Fokusebene.

Streng genommen, kann mit diesem Test jedoch nicht nachgewiesen werden, ob Signale, die in Glomeruli der dorsalen Oberfläche entstehen, durch eine ventrale Betrachtung des Präparates überhaupt erkannt werden können. Bisher sind keine Geruchsstoffe bekannt, die in dorsal gelegenen Glomeruli Aktivität hervorrufen. Daher war ein direkter Test dieser Bedingungen nicht durchführbar. Ob die hier verwendeten Substanzklassen zu den bisher unbekanntem "dorsalen Geruchsstoffen" gehören, wurde nicht weiter durch Aktivitätsmessungen von der dorsalen Bulbusoberfläche untersucht.

### 1.2.5 Inaktive Derivate können Aminosäuresignale beeinflussen.

Antworten auf L- $\alpha$ -Aminosäuren konnten wiederholt vor und nach der Gabe von D-Enantiomeren ausgelöst werden. Die Aminosäuren waren auch vor und nach der Applikation von Carbonsäuren, Aminen und anderen Strukturanaloga effektiv und die aufgezeichneten Antworten waren sowohl in ihrer Gesamtstärke (**Abb. 7B**) als auch in den stimulierten Mustern grundsätzlich gleich (**Abb. 7A** und DI-Werte der prae/post-Vergleiche). Die unveränderten Aminosäureantworten geben einen verlässlichen Hinweis darauf, dass die inaktiven Derivate keine toxischen Effekte auf die Präparate ausübten, die zu einem grundsätzlichen Verlust oder zu nachhaltigen Veränderungen der Antwortfähigkeit geführt haben.

Die gleichzeitige Applikation von Aminosäuren und einigen ihrer Derivate (**Abb. 9**) ergab jedoch einen interessanten Seitenaspekt. In einer solchen Mischung wurden identische Konzentrationen beider Komponenten eingestellt ( $10^{-4}$  M). Die Koapplikation von Alanin und Alaninol ergab eine signifikante Reduktion der Antwortstärke. Im Vergleich zu reiner Alaninstimulation wurde die Antwortfläche auf 50% ihres Wertes reduziert ( $p = 0.0001$ , Student's t-Test,  $n = 9$  Präsentationen aus 2 Präparaten). Durch simultane Applikation von Alanin und Propionsäure wurde die Antwortfläche gegenüber reiner Alaninstimulation auf 154% verstärkt ( $p < 0.005$ ,  $n = 7$  Präsentationen aus 2 Präparaten). Die gleichzeitige Stimulation mit Alanin und 2-Aminopropan führte nicht zu einer signifikanten Veränderung des Signals ( $p = 0.112$ , Student's t-Test,  $n = 8$  Präsentationen aus 2 Präparaten).



**Abb. 9 – Inaktive Derivate können die Signale der Aminosäuren beeinflussen.**

Quantifizierung der Antwortfläche für den Vergleich zwischen der Stimulation mit Alanin ( $10^{-4}$  M) und der gleichzeitigen Applikation von Alanin mit Alaninol (+Alaninol), 2-Aminopropan (+2-Aminopropan) oder Propionsäure (+Propionsäure; jeweils  $10^{-4}$  M). Die Antwortfläche (nAF) wurde auf das jeweilige Alaninsignal normiert. Durch die gleichzeitige Applikation von Alanin und Alaninol wird die Antwortfläche gegenüber reiner Alaninstimulation signifikant reduziert (Student's t-Test,  $p = 0.0001$ ). Propionsäure verstärkt das Alaninsignal ( $p < 0.005$ ), 2-Aminopropan beeinflusst die Alaninantwort nicht signifikant (n.s.,  $p = 0.112$ ). Die Werte entsprechen den Mittelwerten und Standardfehlern von 9 (+Alaninol), 8 (+2-Aminopropan) und 7 (+Propionsäure) Präsentationen in 2 Präparaten.

Obwohl sie sich *per se* als Geruchsstimulus unwirksam erwiesen, verändern einige der Aminosäurederivate das Antwortverhalten der Riechsinneszellen gegenüber wirksamen Geruchsstoffen. Für Alaninol konnte eine inhibitorische, für Propionsäure eine kostimulierende Wirkung aufgezeigt werden. Möglicherweise wird durch Alaninol eine nichtaktivierende Teilbindung an die Rezeptoren erreicht und Alaninol kompetiert mit Alanin um freie Bindungsstellen der Rezeptoren. Der modulatorische Einfluss von Propionsäure ist schwieriger zu interpretieren und könnte durch eine stärkere Protonierung der Aminogruppe des Alanins und eine effektivere Bindung des Alanins an den Rezeptor bedingt sein.

### 1.3 Die Bedeutung der Seitenkette.

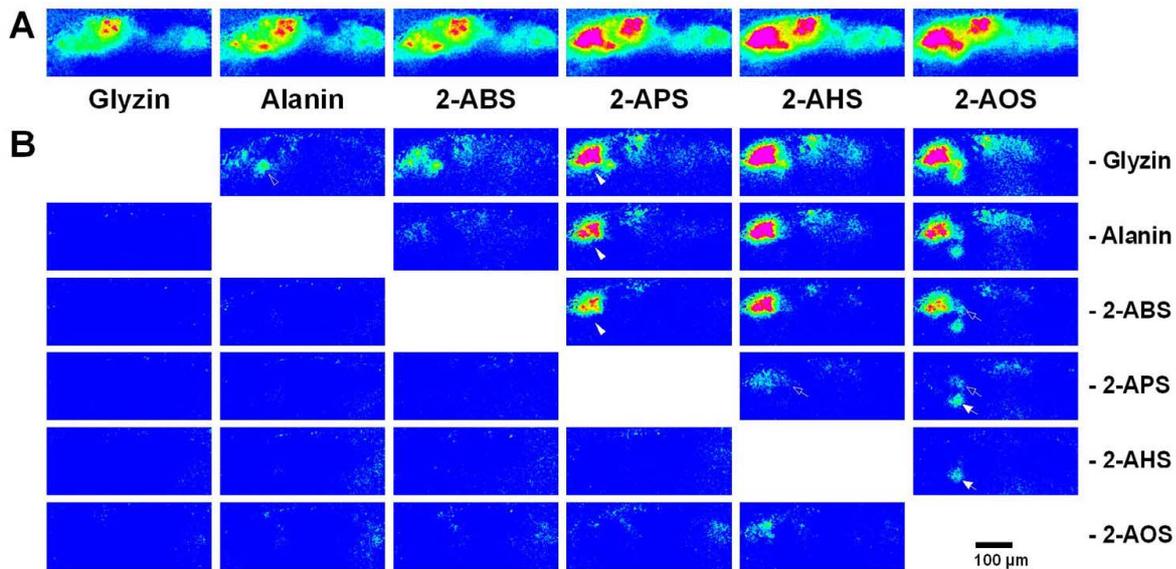
Strukturelle Veränderungen der Seitenkette von Aminosäuren führten, im Gegensatz zu den Variationen des Grundmotivs, nicht zu einem Gesamtverlust der stimulatorischen Wirksamkeit, sondern manifestierten sich überwiegend in einer Veränderung der induzierten Antwortmuster (siehe auch Friedrich und Korsching, 1997). Da nicht sehr gut verstanden ist, nach welchem Prinzip und in welchem Ausmaß Informationen über die Identität der Geruchsstoffe im olfaktorischen System kodiert und geordnet werden, sollte hier zunächst der Einfluss einfacher und leicht beschreibbarer Veränderungen in der Molekülstruktur der Geruchsstoffe untersucht werden.

#### 1.3.1 Veränderungen der Kettenlänge.

Eine einfache strukturelle Veränderung im obigen Sinne wird durch Unterschiede in der Kettenlänge aliphatischer unverzweigter neutraler Aminosäuren beschrieben. Daher wurden die Antwortmuster einer homologen Reihe von Aminosäuren mit Kettenlängen von 2 (Glyzin) bis 8 (2-Aminooctansäure) Kohlenstoffen im Grundgerüst untersucht.

Bereits die kurzkettige Aminosäure Glyzin generiert komplexe, multiglomeruläre Aktivitätsmuster im lateralen olfaktorischen Bulbus. Nach der Stimulation mit Glyzin kann Aktivität in durchschnittlich  $23 \pm 1$  (MW $\pm$ SEM, n = 8 Präparate) individuellen Glomeruli nachgewiesen werden. Der Schwerpunkt des durch Glyzin stimulierten Aktivitätsmusters liegt in der Mitte der lateralen Bulbusregion. Mit zunehmender Kettenlänge der Stimuli wurden zunehmend komplexere Antwortmuster und eine Verlagerung des Schwerpunktes der Aktivitätsmuster nach rostral beobachtet (**Abb. 10A**, **Abb. 7A**). Durch langkettige Aminosäuren können Glomeruli, die bereits durch kurzkettige Aminosäuren stimulierbar sind, stärker erregt werden. Darüber hinaus werden mit wachsender Kettenlänge zusätzlich aktive Glomeruli in das Antwortmuster rekrutiert. Glomeruli mit einer Präferenz für kurzkettige Stimuli waren seltene Ausnahmereischeinungen (belegt in **Abb. 13d**). Die stimulatorische Wirkung war interessanterweise nicht auf die physiologisch vorkommenden, proteinogenen Aminosäuren Glyzin und Alanin beschränkt. Wesentlich stärkere Antworten wurden durch die nicht-proteinogenen Aminosäuren 2-Aminobuttersäure bis 2-Aminooctansäure erhalten.

Für den direkten Vergleich zweier Antwortmuster und zur Darstellung der Reiz-Antwort Charakteristika individueller Glomeruli wurden Differenzbilder durch pixelweise Subtraktion der Antwortmuster zweier Stimuli berechnet (**Abb. 10B**). In diesen Differenzbildern sind individuelle Aktivitätsfoki erkennbar, sofern die zugrundeliegenden Glomeruli differentiell auf die betrachteten Stimuli reagieren. In der Subtraktionsanalyse verschieden langkettiger Aminosäuren treten Differenzsignale nur in solchen Vergleichen auf, bei denen die Muster kurzkettiger von den Antworten langkettiger Aminosäuren subtrahiert werden (**Abb. 10B**, Dreieck oberhalb der Diagonalen). In der inversen Berechnung – Subtraktion der Muster langkettiger von den Antworten kurzkettiger Aminosäuren (**Abb. 10B**, Dreieck unterhalb der Diagonalen) – können hingegen keine deutlichen Differenzsignale erkannt werden.



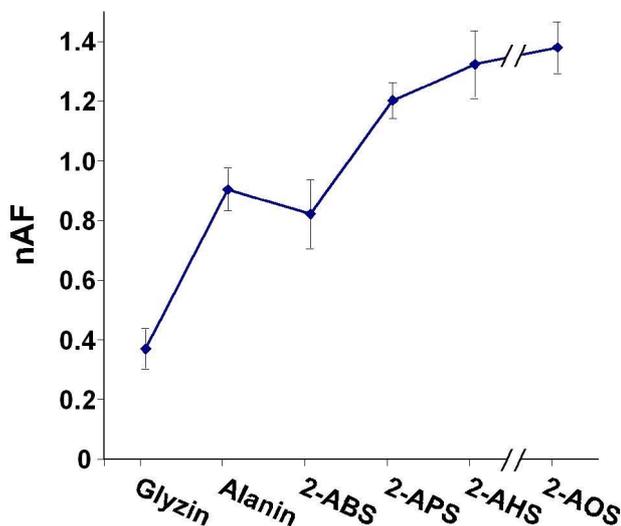
**Abb. 10 – Der Einfluss der Kettenlänge auf die Aktivitätsmuster aliphatischer unverzweigter neutraler Aminosäuren – Subtraktionsanalyse.**

**A.** Stimulation mit einer homologen Reihe unverzweigter neutraler Aminosäuren zunehmender Kettenlänge [von 2 (Glyzin) bis 8 (2-Aminooctansäure)]. Die Darstellung entspricht Mittelwertbildern aus jeweils 4 Präsentationen ( $\Delta F/F$ -Werte von -0.5% (blau) bis 3% (rot)). Mit zunehmender Kettenlänge der Stimuli werden aktive Glomeruli rekrutiert und bereits aktivierte Glomeruli stärker erregt. **B.** Subtraktionsanalyse der Kettenlängenabhängigkeit aminosäureinduzierter Antwortmuster. Die Antwortmuster der Aminosäuren aus A wurden voneinander subtrahiert und die entsprechenden Differenzbilder in der Matrix angeordnet. In dem Dreieck oberhalb der Diagonalen wurden die Signale kürzerer Aminosäuren von den Antworten längerer Kettenlängen subtrahiert. Das Dreieck unterhalb der Diagonalen entspricht der umgekehrten Berechnung. Nur positive Differenzwerte sind dargestellt ( $\Delta F/F$ -Differenzwerte: 0 - 2.5%). Differenzfoki treten auf, sofern der entsprechende Glomerulus selektiv auf eine Aminosäure des Vergleichs reagiert. Sie sind ausschließlich in dem Dreieck oberhalb der Diagonalen sichtbar. Glomeruli, die präferentiell durch kürzere Aminosäuren erregt werden, treten nicht in Erscheinung. Das durch Alanin induzierte Muster weist gegenüber Glyzin bereits deutliche Differenzen auf (*offener Pfeilkopf*), die im Vergleich 2-ABS minus Glyzin deutlicher hervortreten. Der Zuwachs um eine Methylgruppe zwischen 2-ABS und 2-APS aktiviert eine eng benachbarte Gruppe selektiv antwortender Glomeruli (*Pfeilkopf*), die in jedem Vergleich sichtbar sind, bei denen die Signale von 2-ABS oder von kürzeren Aminosäuren subtrahiert wurden. Der Übergang zwischen 2-APS und 2-AHS wird ebenfalls durch den Zuwachs um einen weiteren Glomerulus repräsentiert (*offener Pfeil*), der im 2-AOS minus 2-APS Vergleich deutlicher hervortritt. 2-AOS aktiviert einen Differenzglomerulus (*Pfeil*), der selektiv für die längste der untersuchten Aminosäuren ist.

Jeder Zuwachs der Kettenlänge, mit Ausnahme des Übergangs zwischen Alanin und 2-Aminobuttersäure, wird durch die zusätzliche Aktivierung neu auftretender Glomeruli begleitet. Alanin aktiviert im Vergleich zu Glyzin drei zusätzliche, mittelgroße Einzelfoki, die im Vergleich zwischen 2-Aminobuttersäure und Glyzin deutlicher hervortreten. Durch den Zuwachs um eine weitere Methylgruppe wird ab 2-Aminopentansäure eine 75 µm große Gruppe eng benachbarter Glomeruli selektiv erregt. Diese Differenzgruppe ist für alle länger-kettigen Aminosäuren ab 2-Aminopentansäure typisch und in den entsprechenden Differenzen sichtbar. Am Übergang zwischen 2-Aminopentansäure und 2-Aminohexansäure treten erneut zwei Glomeruli auf, die in der Differenz 2-Aminooctansäure minus 2-Aminopentansäure deutlicher erkennbar sind. Sogar durch die längste der untersuchten aliphatischen Aminosäuren, 2-Aminooctansäure, wird ein für diese Kettenlänge spezifischer Glomerulus in das Antwortmuster rekrutiert.

Die Anzahl der jeweils rekrutierten Glomeruli war bei einem Vergleich zwischen verschiedenen Präparaten nicht konstant. Daher wurden die Antwortflächen der Stimuli oberhalb eines Schwellenwertes von 1%  $\Delta F/F$  für die einzelnen Präparate bestimmt, auf den

Mittelwert der Antwortflächen aller Substanzen des Vergleichs normiert und anschließend über die untersuchten Präparate gemittelt (Abb. 11, n = 16 Präsentationen/Stimulus aus 9 Präparaten). Im Trend steigt die Ausdehnung der antwortenden Oberfläche mit zunehmender Kettenlänge der Stimuli von 40% (Glyzin) auf 135% (2-Aminooctansäure) an. Der Zuwachs der Antwortfläche mit der Kettenlänge kann gut mit dem in der Subtraktionsanalyse (Abb. 10) beschriebenen Verhalten korreliert werden. Alanin aktiviert gegenüber Glyzin drei zusätzliche Glomerulusgruppen, die durch einen starken Zuwachs der Antwortfläche beschrieben werden. Alanin und 2-Aminobuttersäure liegen in etwa auf dem gleichen Niveau, zusätzlich rekrutierte Glomeruli wurden in der Differenzanalyse ebenfalls nicht erkannt. Die ab 2-Aminopentansäure rekrutierte Gruppe benachbarter Glomeruli wird erneut durch einen starken Zuwachs der Antwortfläche beschrieben, die jedoch im weiteren Verlauf weniger stark zunimmt. Dieser Kurvenverlauf geht mit der geringen Größe und der geringen Anzahl zuwachsender Differenzglomeruli einher, die an den Übergängen zwischen 2-Aminopentansäure und 2-Aminohexansäure sowie zwischen 2-Aminohexansäure und 2-Aminooctansäure beobachtet wurden.



**Abb. 11 – Die Antwortfläche als Funktion der Kettenlänge neutraler Aminosäuren.**

Quantifizierung der Antwortfläche einer homologen Reihe unverzweigter neutraler Aminosäuren als Funktion der Kettenlänge [von 2 (Glyzin) bis 8 (2-Aminooctansäure)]. Die Antwortfläche (nAF) oberhalb des Schwellenwertes von 1%  $\Delta F/F$  wurde auf den Gesamtmittelwert aller Substanzen des Vergleichs normiert und über unterschiedliche Präparate gemittelt. Mit wachsender Kettenlänge der Stimuli nimmt die Antwortfläche mit Ausnahme des Übergangs zwischen Alanin und 2-Aminobuttersäure zu. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von 16 Präsentationen aus 9 Präparaten.

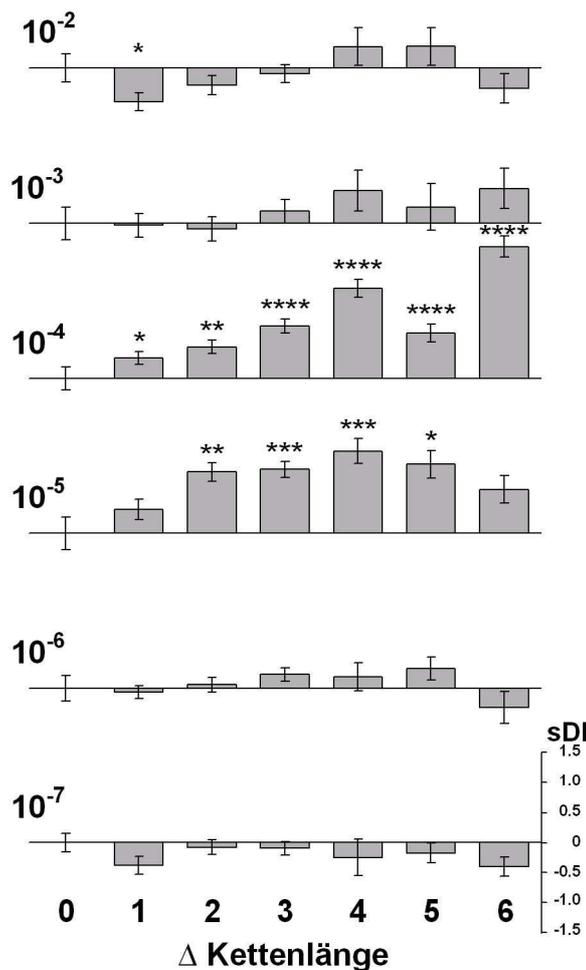
Mit zunehmender Kettenlänge der Aminosäuren werden zusätzliche Glomeruli und daher auch neurekrutierte Geruchsrezeptoren in die Repräsentation der Stimuli einbezogen. Die Aminosäure-Geruchsrezeptoren stellen daher eine Mindestanforderung an die Molekülgröße der jeweils erkannten Aminosäuren. Langkettige Reste, die über diese Mindestlänge hinausgehen, stören die Wechselwirkung mit den Rezeptoren innerhalb des betrachteten Kettenlängenbereiches nicht. Die einzelnen Rezeptoren zeigen ein, in der Kettenlängendimension, nach oben offenes Ligandenspektrum. Insgesamt können aus dem selektiven Antwortverhalten der Glomeruli gegenüber neutralen Aminosäuren fünf unterschiedliche Kategorien von Geruchsrezeptoren erkannt werden, die durch ihre Minimalanforderung an die Länge des erkannten Aminosäuremoleküls gekennzeichnet sind (Tabelle 2). Die Basiskategorie bilden die glyzinempfindlichen Rezeptoren, die auch durch jeden der länger-kettigen Stimuli aktiviert werden. Mit Ausnahme des Alanin/2-Aminobuttersäure-Übergangs wird für jeden Kettenlängenunterschied eine neue Kategorie von Geruchsrezeptoren in die Repräsentation der geradkettigen aliphatischen Aminosäuren einbezogen.

***Quantitative Analyse der Musterunterschiede – Unterscheidungsvermögen I.***

Das bisher benutzte Maß, die Antwortfläche, beurteilt nicht, ob Unterschiede durch stärkere Aktivierung unterschwelliger Glomeruli oder durch zusätzliche Aktivierung weiterer Glomeruli auftreten. Räumliche (d.h. qualitative) Musterunterschiede werden durch die Antwortfläche ebenfalls nicht bewertet. Um auch ein quantitatives Maß für strukturelle Musterunterschiede zu erhalten, wurden Differenzindizes (DI) für Stimuluspaare ermittelt, welche die räumliche Anordnung der verglichenen Signale mitbewerten. Zusätzlich werden die Signalstärken in der DI-Berechnung normiert. Die Normierung macht das Maß von den absoluten Antwortstärken unabhängig und bewertet die relativen Erregungen der einzelnen Bildpunkte zueinander. Dadurch stellt der Differenzindex ein genaueres Maß, auch für Unterschiede des Informationsgehaltes der Muster, dar und eignet sich besonders bei der Beurteilung von Konzentrationsunterschieden. DI-Werte wurden für alle betrachteten Stimuluspaarungen zunächst innerhalb einer Präparation bestimmt und anschließend über verschiedene Tiere gemittelt. Die Variabilität von Stimuluswiederholungen innerhalb einer Präparation wurde durch repetitive Stimulationen ebenfalls bestimmt, von den DI-Werten für konkrete Stimuluspaarungen subtrahiert und das Ergebnis als spezifischer Differenzindex (sDI) dargestellt.

Zunächst wurde der Einfluss wachsender Kettenlängenabstände auf die Unterschiedlichkeit der Repräsentationsmuster untersucht. Für sechs Konzentrationen ( $10^{-7}$  M bis  $10^{-2}$  M) wurden die DI-Werte aller 16 Stimuluspaarungen, die bei einer Konzentration gebildet werden können, berechnet und als Funktion des Kettenlängenabstandes ( $\Delta_{\text{Kettenlänge}}$ ) dargestellt. Die jeweiligen Kettenlängenabstände enthalten Werte unterschiedlicher Substanzpaarungen, da z.B. ein Kettenlängenabstand von 2 sowohl in dem Substanzpaar Alanin/2-Aminopentansäure als auch in dem Vergleich zwischen 2-Aminohexansäure und 2-Aminooctansäure auftritt. Die Paarungen gleicher Abstände wurden zu einer Klasse zusammengefasst.

Hohe DI-Werte – starke Musterunterschiede – treten vor allem bei den mittleren Konzentrationen  $10^{-4}$  M und  $10^{-5}$  M auf (**Abb. 12**). Bei diesen Konzentrationen sind die sDI-Werte von der Variabilität der Stimuluswiederholungen ( $\Delta_{\text{Kettenlänge}} = 0$ ) signifikant verschieden (Mann-Whitney U-Test). Bei Stimuluskonzentrationen von  $10^{-4}$  M nimmt die Unterschiedlichkeit der Antwortmuster mit wachsenden Strukturunterschieden der Aminosäuren zu. Größere Kettenlängendifferenzen führen insgesamt zu stärkeren Unähnlichkeiten der Muster, geringe Strukturunterschiede ( $\Delta_{\text{Kettenlänge}} = 1$ ) können jedoch bereits signifikante Repräsentationsunterschiede hervorrufen. Die Kettenlängendifferenz von  $\Delta_{\text{Kettenlänge}} = 5$  weicht dabei von einem stetigen Wachstum der Musterunterschiede mit dem Kettenlängenabstand ab. Diese Differenz wird alleine durch die Paarung Alanin/2-Aminooctansäure repräsentiert. 2-Aminooctansäure erreichte jedoch bei einer Verdünnung von  $10^{-2}$  M die Löslichkeitsgrenze in Wasser. Konzentrationseinstellungen für 2-Aminooctansäure können daher leicht fehlerhaft sein. Bei Konzentrationen von  $10^{-5}$  M nimmt die Eindeutigkeit der Repräsentation ebenfalls mit wachsendem Kettenlängenunterschied zunächst zu, jedoch für die Abstände 5 und 6 wieder leicht ab. In diesem Fall repräsentieren die Abstände den Vergleich zwischen 2-Aminooctansäure mit Alanin und Glyzin.



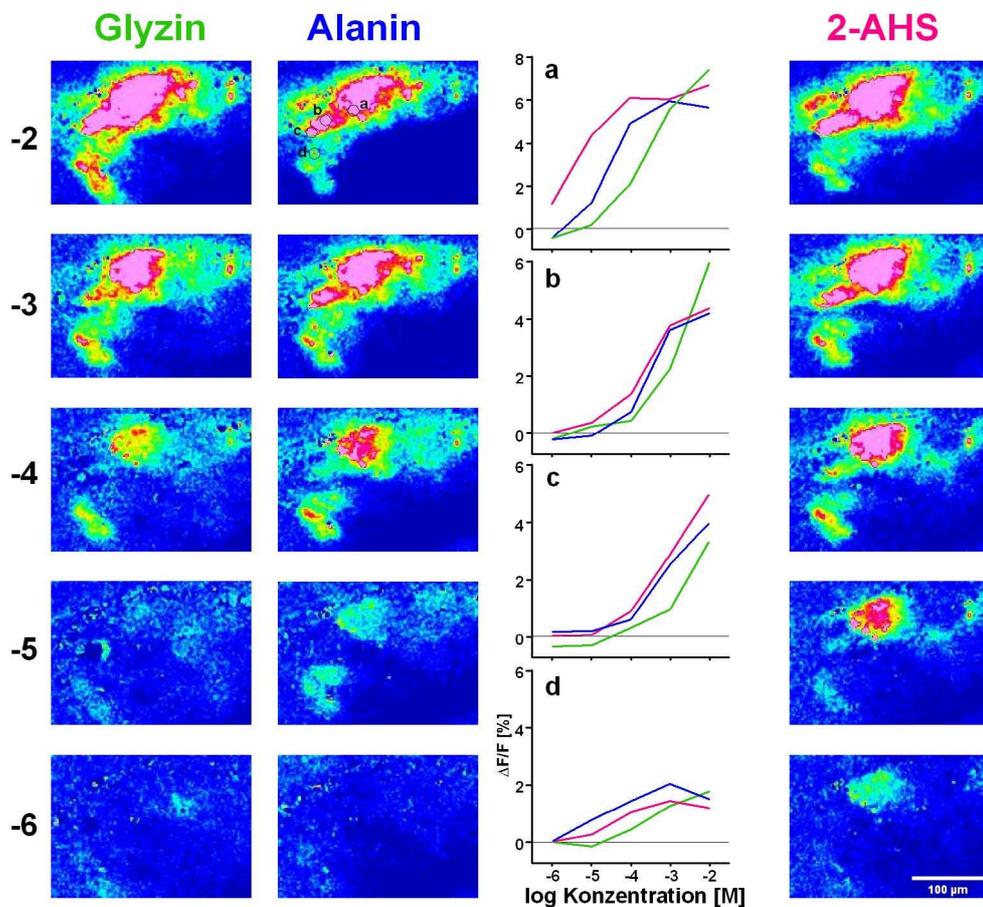
**Abb. 12 – Quantitative Analyse der Musterunterschiede unverzweigter neutraler Aminosäuren als Funktion des Kettenlängenabstandes und der Konzentration.**

Spezifischer Differenzindex ( $sDI = DI_{\text{Kettenlängenpaar}} - DI_{\text{Stimuluswiederholung}}$ ) als Funktion des Kettenlängenabstandes ( $\Delta_{\text{Kettenlänge}} = 0 - 6$ ) und der Konzentration ( $10^{-7}$  bis  $10^{-2}$  M). Die molaren Konzentrationen sind jeweils links neben den entsprechenden Balkendiagrammen angegeben. Die sDI-Skala am rechten unteren Rand ist für alle Balkendiagramme gültig. Eine bestimmte Kettenlängendifferenz repräsentiert Werte unterschiedlicher Substanzpaarungen, z.B.  $\Delta_{\text{Kettenlänge}} = 4$  enthält Daten der Vergleiche zwischen Glyzin und 2-AHS sowie zwischen 2-ABS und 2-AOS. Die sDI-Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus: 24 ( $\Delta_{\text{Kettenlänge}} = 0$ ), 68 (1,2), 67 (3), 18 (4), 17 (5, 6) Vergleichen für  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  M sowie 90 (0), 244 (1, 2), 199 (3), 106 (4), 61 (5, 6) Vergleichen für  $10^{-7}$  M. Die Unterscheidungs-fähigkeit des Geruchsystems für Kettenlängen-unterschiede ist von der Konzentration der Stimuli abhängig. Bei mittleren Konzentrationen von  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  M treten besonders starke Musterunterschiede auch für kleine Kettenlängen-differenzen auf. Mit wachsender Kettenlängen-differenz steigen auch die sDI-Werte bei diesen Konzentrationen an. Die Sternchen indizieren das jeweilige Signifikanzniveau für den Vergleich der Musterunterschiede eines bestimmten Ketten-längenabstandes mit dem sDI-Wert für Stimulus-wiederholungen ( $\Delta_{\text{Kettenlänge}} = 0$ ; Mann-Whitney U-Test, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.005$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ).

Bei niedrigen ( $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  M) und hohen ( $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  M) Stimuluskonzentrationen ist die Kettenlängenunterscheidungsfähigkeit des olfaktorischen Systems gegenüber der Unterscheidungsfähigkeit bei mittleren Konzentrationen beeinträchtigt. Niedrige Konzentrationen rufen nur schwache Antworten hervor und die Muster nähern sich für die kurzkettigen Substanzen bei  $10^{-6}$  M dem Bildrauschen an (Abb. 13). Entsprechend nehmen die sDI-Werte ab, da sowohl die DI-Werte für Stimuluspaarungen als auch für Stimuluswiederholungen stark zunehmen. Bei hohen Konzentrationen werden die Muster verschiedener Substanzen einander ähnlicher (Abb. 13). Eine wachsende Zahl von Geruchsrezeptoren verlässt den Arbeitsbereich und geht in den Sättigungszustand über (Abb. 13 a, b und d). Entsprechend werden niedrige DI-Werte für Substanzpaarungen und Stimuluswiederholungen erhalten, die ebenfalls zu einem niedrigen sDI-Wert, d.h zu einer schlechteren Unterscheidungsfähigkeit des Geruchssystems, führen.

Die quantitative Analyse der Musterunterschiede vermittelt einen Eindruck von der Eindeutigkeit der Aminosäurerepräsentation im olfaktorischen Bulbus und der Unterscheidungsfähigkeit des Geruchssystems für strukturell eng verwandte Substanzen innerhalb unterschiedlicher Konzentrationsbereiche. Dabei weist das System bei Konzentrationen von  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  M eine herausragende Unterscheidungsfähigkeit auf. Größere Unterschiede in der Molekülstruktur werden durch das Geruchssystem besser aufgelöst. Bereits geringe Substanzunterschiede können jedoch zu signifikanten Repräsentationsunterschieden führen.

Die Untersuchung der Musterunterschiede bei einer bestimmten Konzentration lässt jedoch offen, ob Strukturunterschiede der Stimuli, die zu unterschiedlichen Repräsentationen führen, durch Konzentrationsunterschiede kompensiert werden könnten.



**Abb. 13 – Konzentrationsabhängigkeit der Geruchsantworten dreier aliphatischer Aminosäuren.**

Von oben nach unten: abnehmende Stimuluskonzentration (als log Konzentration [M]). Die respektiven Antwortmuster der drei Aminosäuren Glyzin, Alanin und 2-Aminohexansäure sind falschfarbenkodiert dargestellt,  $\Delta F/F$ : -0.5 (blau) - 3.5% (rot). Die Dosis-Wirkungskurven für die Glomeruli a - d (dargestellt in Alanin,  $10^{-2}$  M) sind für alle drei Aminosäuren gezeigt (grün: Glyzin, blau: Alanin, rot: 2-AHS). Der Glomerulus c erreicht für keinen der drei Stimuli die Sättigung, wohingegen die Glomeruli a, b und c für alle drei Aminosäuren sättigen. Glomerulus d bevorzugt Alanin gegenüber 2-AHS. Gleiche Präparation wie in Abb. 7.

***Konzentrationsunterschiede kompensieren Kettenlängenunterschiede nicht – Unterscheidungsvermögen II.***

Bei der bisherigen Betrachtung wurde nicht untersucht, wie sich Konzentrations- und Kettenlängenunterschiede der Aminosäuren wechselseitig auf die Antwortmuster und die Eindeutigkeit einer Repräsentation auswirken. Eine Betrachtung der Dosis-Wirkungskurven der Aminosäuren (Abb. 13) zeigt jedoch, dass die Repräsentationsmuster in starkem Maße von der Konzentration der Stimuli abhängig sind. Die Antwortmuster sind bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M für alle Aminosäuren voneinander verschieden (Abb. 10B, Abb. 11, Abb. 12), jedoch ist nicht auszuschließen, dass strukturbedingte Repräsentationsunterschiede durch unterschiedliche Konzentrationen ausgeglichen werden könnten. Die Differenzanalyse (Abb. 10B) hat gezeigt, dass bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M die kurzkettigen Aminosäuren Teilmuster langkettiger Aminosäuren stimulieren. Daher kommen

bei dieser Überlegung vor allem die Vergleiche von kurzkettigen, hochkonzentrierten mit langkettigen Stimuli bei niedrigeren Konzentrationen in Betracht. Beispielsweise könnte Glyzin bei höheren Konzentrationen ein von 2-Aminobuttersäure bei niedrigen Konzentrationen ununterscheidbares Muster hervorrufen. Diese Frage wurde durch zwei Betrachtungen, eine anschauliche und eine quantitative, untersucht. Zunächst wurden die Dosis-Wirkungskurven individueller Glomeruli für alle sechs neutralen Aminosäuren in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-7}$  bis  $10^{-2}$  M ermittelt. In einem weitergehenden Ansatz wurde die Unterscheidungsfähigkeit des olfaktorischen Systems durch einen Vergleich der Repräsentationsmuster individueller Aminosäurestimuli bei  $10^{-4}$  M mit benachbarten Substanzen bei unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt.

Keine der untersuchten sechs Aminosäuren war in der Lage, detektierbare glomeruläre Antworten bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  M hervorzurufen (nicht gezeigt). Mit wachsender Konzentration steigen die Gesamtintensitäten der Geruchssignale aller Aminosäuren an und die Komplexität der Antwortmuster nimmt stark zu (**Abb. 13**). Die Detektionsschwellenwerte wurden bei niedrigeren Konzentrationen durch die langkettigen Stimuli zuerst erreicht. Nach Stimulation mit 2-Aminohexansäure ist bereits bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M ein deutliches Geruchssignal detektierbar, während ein vergleichbar starkes Signal durch Alanin erst zwischen  $10^{-6}$  und  $10^{-5}$  M, durch Glyzin erst zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-4}$  M erreicht wird. Bei  $10^{-2}$  M weisen die Muster untereinander eine starke Ähnlichkeit auf, die in der Betrachtung der Kettenlängenunterscheidungsfähigkeit (**Abb. 12**) bereits quantitativ erfasst wurde.

Die Dosis-Wirkungskurven individueller Glomeruli (repräsentativ für 3 Substanzen und 4 Glomeruli in **Abb. 13** a-d dargestellt), zeigen einen sigmoidalen Verlauf, der 2 bis 3 logarithmische Einheiten der Stimuluskonzentration überspannt. Individuelle Glomeruli unterscheiden klar zwischen den unterschiedlichen Aminosäuren mit Unterschieden in der halbmaximalen Aktivierung ( $K_i$ ) von 5- bis 50-facher Konzentration. Verschiedene Glomeruli weisen bis zu 10-fache Unterschiede in den  $K_i$ -Werten gegenüber identischen Stimuli auf. Viele der Dosis-Wirkungskurven haben bei  $10^{-2}$  M den Sättigungszustand erreicht. Einige Glomeruli erreichen die Sättigung jedoch nicht (**Abb. 13** c, Alanin in b). In **Abbildung 13 d** ist das Verhalten eines Glomerulus gezeigt, der durch Alanin stärker erregt wird als durch Glyzin oder 2-Aminohexansäure. Dies ist eines der wenigen Beispiele für einen Glomerulus, der kurzkettige gegenüber langkettigen Stimuli bevorzugt.

Bereits durch diese vier willkürlich ausgewählten Dosis-Wirkungskurven können für jede Kombination von Konzentration und Substanz eindeutige Repräsentationen beschrieben werden. Durch die Betrachtung weiterer Glomeruli werden diese Repräsentationen zunehmend komplex und die Beschreibungen eindeutiger. Um das Antwortverhalten aller beteiligten Glomeruli zu bewerten und die vorangestellte, argumentative Überlegung zu erhärten, wurde die gemeinsame Wirkung von Konzentrations- und Kettenlängenunterschieden auf die Eindeutigkeit der Repräsentationen untersucht.

Für jede der sechs Aminosäuren wurden die Musterunterschiede als sDI-Werte, ausgehend von einem Referenzstimulus bei  $10^{-4}$  M, für schrittweise Unterschiede in der Kettenlänge und Konzentration bestimmt. Der Referenzstimulus wurde mit benachbarten Substanzen ( $\pm 2$  Methylgruppen Kettenlängenunterschied) und Konzentrationen ( $\pm 100$ -facher Konzentrationsunterschied) verglichen und die erhaltenen sDI-Werte in eine Umfeldmatrix

eingetragen (Abb. 14). Der Wert an der Position 0/0 ( $\Delta_{\text{Kettenlänge}}/\Delta_{\text{Konzentration}}$ ) repräsentiert die Schwankungen der Stimuluswiederholungen des Referenzwertes. Die 5x5 Umfeldmatrix ist nur für den 2-Aminobuttersäurevergleich vollständig, da z.B.  $\Delta_{\text{Kettenlänge}} = -2$  für Alanin nicht gegeben ist.

Gezeigt sind die Struktur-Konzentrationsbeziehungen der Repräsentationen dreier benachbarter Aminosäuren (Alanin, 2-Aminobuttersäure und 2-Aminopentansäure, Abb. 14). Für das 2-Aminobuttersäuremuster sind alle Umfeldvergleiche signifikant vom Referenzwert verschieden (Mann-Whitney U-Test). Einige ausgewählte Kombinationen von Kettenlängen- und Konzentrationsunterschieden weisen jedoch auf eine stärkere Ähnlichkeit zwischen den Antwortmustern hin. Die grösste Ähnlichkeit wird bei einem Kettenlängenabstand von -2 und einem Konzentrationsunterschied von +1 (= Glyzin bei  $10^{-3}$  M) erreicht. Deutlich ist auch der Einfluss der niedrigeren Schwellenkonzentrationen langkettiger Aminosäuren erkennbar. Die Matrix erscheint entlang der Diagonalen von links oben nach rechts unten zweigeteilt. Kurzkettige Aminosäuren erreichen erst bei höheren Konzentrationen den Detektionsschwellenwert, entsprechend liegen unterhalb der Diagonalen stärkere Unähnlichkeiten vor, wohingegen durch vergleichbare Konzentrationen langkettiger Stimuli bereits Muster erregt und somit relative Ähnlichkeiten erhalten werden.

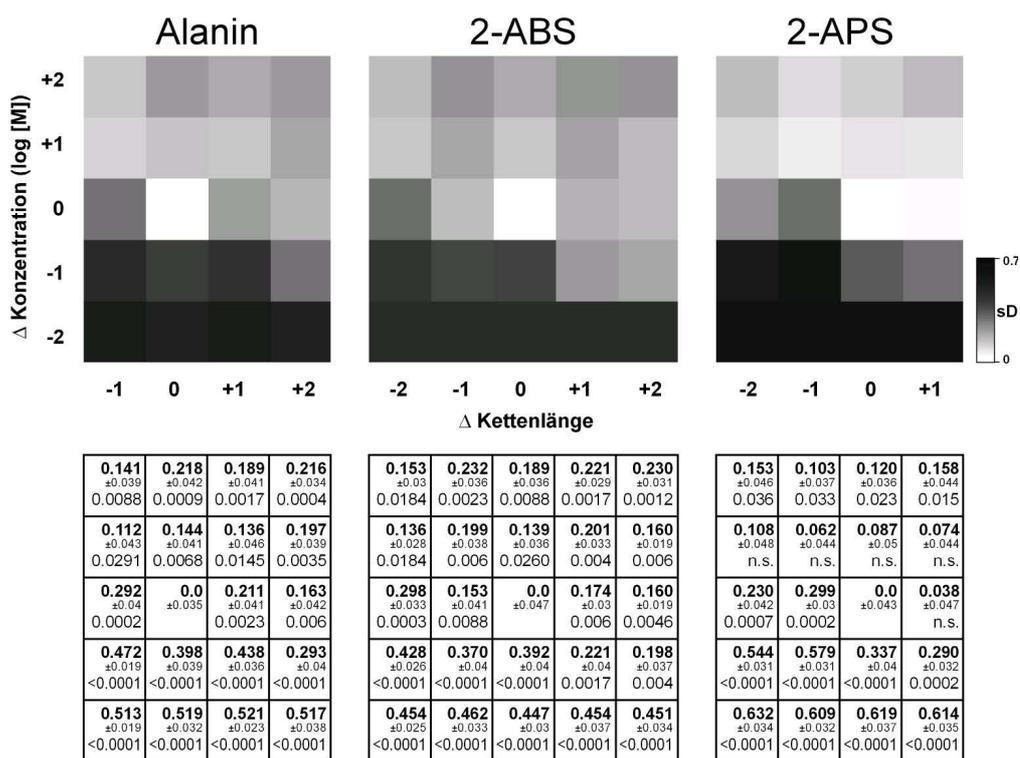


Abb. 14 – Konzentrationsunterschiede kompensieren Kettenlängenunterschiede nicht – Umfeldmatrix.

Quantitative Analyse der Musterunterschiede ausgehend von einem Referenzstimulus (links: Alanin, mitte: 2-ABS, rechts: 2-APS) bei  $10^{-4}$  M für schrittweise Unterschiede in der Kettenlänge und Konzentration. In die Umfeldmatrix (oben,  $\Delta_{\text{Kettenlänge}} = -2$  bis  $+2$ ,  $\Delta_{\text{Konzentration}} = 10^{-2}$  bis 100-fach) sind die sDI-Werte der Mustervergleiche als Grauwert eingetragen (sDI-Skala: 0 - 0.7). Die Matrix ist für Alanin und 2-APS nicht vollständig, da z.B.  $\Delta_{\text{Kettenlänge}} = -2$  für Alanin nicht möglich ist. In der unteren Reihe sind die numerischen Werte der Umfeldmatrix dargestellt (oben: sDI-Mittelwert, mitte: Standardfehler, unten: Signifikanzniveau, Mann-Whitney U-Test). Die Matrix enthält Daten von 6 Präsentationen/Stimulus aus 3 Präparaten [14 Substanzpaarungen/Eintrag, 17 Paarungen für die Variabilität des Referenzstimulus;  $p > 0.05$  sind als nicht signifikant (n.s.) gewertet worden]. Der zweidimensionale Vergleich zeigt, dass in den meisten Fällen kettenlängenbedingte Repräsentationsunterschiede nicht durch Konzentrationsunterschiede ausgeglichen werden können und umgekehrt.

Für die Stimuli 2-Aminobuttersäure und Alanin waren alle Umfeldvergleiche signifikant vom Referenzwert verschieden, für 2-Aminopentansäure der überwiegende Teil. Die Alaninmatrix, obwohl unvollständig, weist die gleichen grundsätzlichen Charakteristika und Tendenzen auf, wie sie für 2-Aminobuttersäure gefunden wurden. Die grösste Ähnlichkeit des Alaninmusters wird auch hier durch den Vergleich mit Glyzin bei  $10^{-3}$  M erreicht. Auch für 2-Aminopentansäure liegen bessere Übereinstimmungen auf der Diagonalen zu kürzeren Kettenlängen und höheren Konzentrationen hin. Allerdings weist gerade diese Matrix auch auf eine starke Ähnlichkeit des 2-Aminopentansäuremusters zu dem der Nachbarsubstanz 2-Aminohexansäure hin. Ein Verhalten, das auch in der Differenzanalyse (**Abb. 10B**) und dem Verlauf der Antwortfläche (**Abb. 11**) erkannt wurde. Durch 2-Aminohexansäure werden gegenüber 2-Aminopentansäure lediglich zwei kleine Glomeruli vor dem Hintergrund eines bereits sehr umfangreichen Gesamtmusters in die Repräsentation rekrutiert. Der Anteil dieser Differenz am Gesamtmuster ist nur gering und äussert sich in niedrigen sDI-Werten für diesen Vergleich. Auch die Beziehungen zwischen Alanin und 2-Aminobuttersäure weisen in der Differenzanalyse und der Beurteilung der Antwortfläche keine bemerkenswerten Unterschiede auf. Dennoch wird für diesen Vergleich in der Umfeldmatrix (**Abb. 14**) ein größerer sDI-Wert erhalten als für den 2-Aminopentansäure/2-Aminohexansäure-Vergleich. Ursächlich scheinen hier die gegenüber 2-Aminopentansäure und 2-Aminohexansäure weniger umfangreichen Gesamtmuster von Alanin und 2-Aminobuttersäure zu sein, welche mehr unstimulierte Bildanteile enthalten, die sich in größeren DI-Werten manifestieren.

Das periphere olfaktorische System des Zebraärbings ist in der Lage, kleine Unterschiede in der Stimulusstruktur zu erkennen und zu repräsentieren. Diese Fähigkeit ist über einen weiten Konzentrationsbereich erstaunlich leistungsfähig. Bei extrem hohen ( $10^{-2}$  M) und extrem niedrigen ( $10^{-6}$  M) Konzentrationen der verglichenen Stimuli werden die Grenzen der Unterscheidungsfähigkeit erreicht, jedoch können innerhalb dieses Bereiches unterschiedlich langkettige Aminosäuren gut voneinander unterschieden werden. Das Antwortmuster, welches eine Aminosäure bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M im olfaktorischen Bulbus hervorruft, ist von den Mustern strukturell benachbarter Substanzen, unabhängig von der Konzentration der Nachbarsubstanzen, verschieden. Einige Kombinationen von Kettenlängen- und Konzentrationsunterschieden weisen eine stärkere Ähnlichkeit der Repräsentationsmuster auf. Eine vollständige Identität der Muster wird jedoch nicht erreicht. Strukturunterschiede können daher von Konzentrationsunterschieden nicht vollständig kompensiert werden.

Es ist unklar, wie die Repräsentationsunterschiede für unterschiedlich langkettige Aminosäuren, die im olfaktorischen Bulbus auftreten, vom Zebraärbing bewertet werden, ob sie den nachgeschalteten Verarbeitungsebenen zur Verfügung stehen und sich in Unterschieden in der Geruchswahrnehmung manifestieren. Es wäre interessant zu sehen, wie gut die hier gefundenen und auf den sDI-Werten beruhenden Struktur-Antwortbeziehungen mit Verhaltenstests zur Unterscheidungsfähigkeit für diese Substanzen übereinstimmen.

### **1.3.2 Der Einfluss funktioneller Gruppen innerhalb der Seitenkette.**

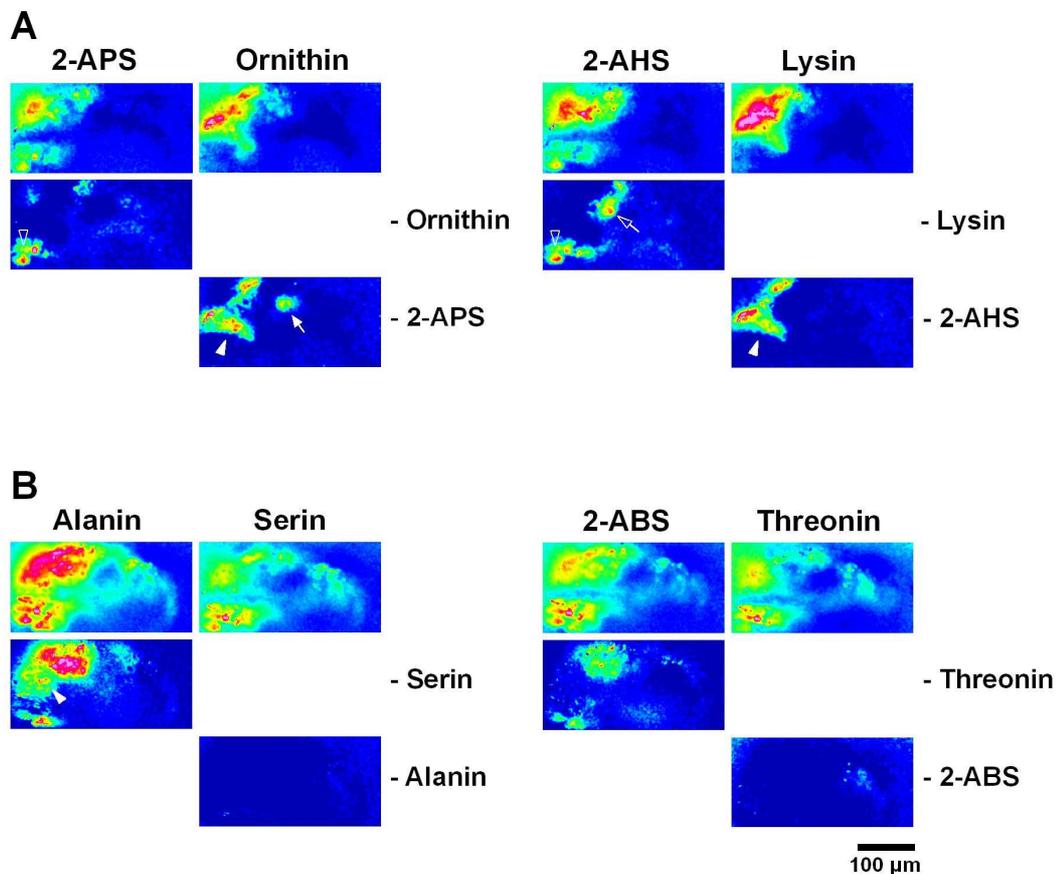
Bisher wurde der Einfluss relativ einfacher Unterschiede in der Molekülstruktur der Seitenkette – der Zuwachs der Kettenlänge – auf die induzierten Antwortmuster betrachtet. Diese Veränderungen sind unpolar, nicht geladen und innerhalb der Molekülstruktur eindimensional. Aus der Kettenlängenbetrachtung in **IV.1.3.1** konnten Minimalanforderungen der Geruchsrezeptoren an die Geruchsstoffe aufgedeckt werden. Komplexere Änderungen in der Molekülstruktur werden durch die Einführung weiterer funktioneller Gruppen innerhalb der Seitenkette erreicht. Die Untersuchung des Einflusses funktioneller Gruppen innerhalb der Seitenkette könnte weiteres Licht auf die Gestaltung der Bindungstasche einzelner Rezeptoren, deren Anforderungen an die Liganden und die sterischen Toleranzen der Rezeptormoleküle werfen. Auch in diesem Falle sollten die Muster substituierter Derivate mit denen unsubstituierter Aminosäuren direkt verglichen und das Antwortverhalten einzelner Glomeruli kategorisiert werden. Durch Wiederholung des Vergleichs bei einer weiteren Kettenlänge wurde untersucht, ob Befunde, die bei einer bestimmten Kettenlänge gefunden werden generalisiert werden können oder weitere Rezeptorkategorien konstituieren. Der Einfluss einer geladenen terminalen Aminogruppe wurde in den Substanzpaaren Ornithin und 2-Aminopentansäure sowie Lysin und 2-Aminohexansäure mit den respektiven Kettenlängen von 5 und 6 Kohlenstoffatomen untersucht. Der Einfluss einer polaren Hydroxylgruppe in  $\beta$ -Position wurde in den Paaren Serin und Alanin sowie Threonin und 2-Aminobuttersäure bei Kettenlängen von 3 und 4 analysiert.

***Eine terminale Aminogruppe in der Molekülstruktur rekrutiert neue Geruchsrezeptoren und verhindert die Bindung an einige der Rezeptoren, die durch neutrale Aminosäuren erregbar sind.***

Die Aktivitätsmuster der basischen Aminosäuren Ornithin und Lysin wurden mit denen ihrer unsubstituierten geradkettigen Analoga 2-Aminopentansäure und 2-Aminohexansäure verglichen. Ornithin und Lysin erregten erwartungsgemäß Signale in der ventrolateralen Bulbusregion [für Lysin siehe auch Friedrich und Korsching (1997)]. Die induzierten Antwortmuster der basischen Aminosäuren waren einander qualitativ ähnlich, unterschieden sich jedoch deutlich von denen der unsubstituierten neutralen Aminosäuren. Der Schwerpunkt durch basische Aminosäuren hervorgerufener Muster lag im mittleren Drittel der Aminosäureregion und wurde durch relativ viele, eng benachbarte Glomeruli gebildet. Die Muster neutraler Aminosäuren hingegen ließen zwei räumlich separierte Aktivitätszentren erkennen, von denen eines weit in den anteriomedialen Bulbus hineinreichte (**Abb. 15A**, **Abb. 16**, **Abb. 17**). Einige Anteile der Muster basischer und neutraler Aminosäuren überlappten stark miteinander. Die basischen Aminosäuren erregten insgesamt mehr Einzelfoki und erreichten größere Signalstärken als die neutralen.

Die selektive Aktivierung von Glomeruli durch jeweils eine der Aminosäureklassen sollte wieder durch eine Subtraktionsanalyse erkannt werden. Die gefundenen Beziehungen waren komplex und die auftretenden Differenzsignale waren entweder spezifisch für ein bestimmtes Strukturmerkmal oder eine Kombination verschiedener Strukturmerkmale (**Abb. 15A**, **Tabelle 2**). Einige Glomeruli werden durch neutrale und basische Aminosäuren

gleichermaßen erregt. Zusätzlich wurden selektiv aktivierte Glomeruli in beiden Differenzrichtungen aufgedeckt, d.h. einige Glomeruli werden bevorzugt durch basische, andere durch neutrale Aminosäuren erregt.

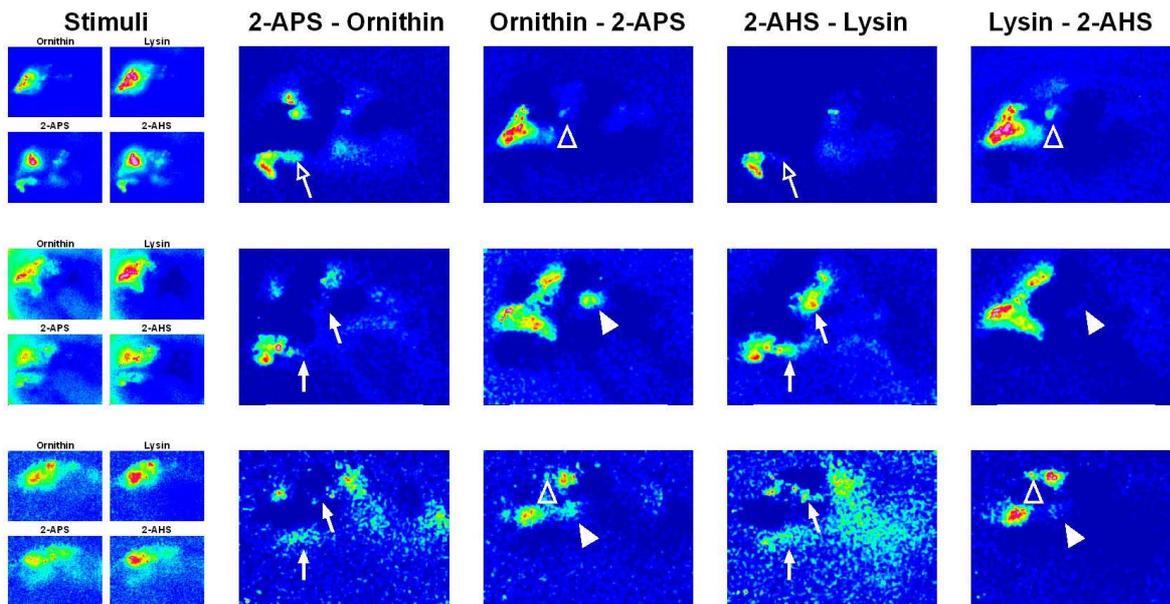


**Abb. 15 – Der Einfluss funktioneller Gruppen innerhalb der Seitenkette der Aminosäuren.**

**A.** Die Antwortmuster zweier basischer Aminosäuren unterschiedlicher Kettenlänge (links: Ornithin, Kettenlänge = 5; rechts: Lysin, Kettenlänge = 6) im Vergleich mit ihren unsubstituierten, neutralen Strukturanaloga (2-APS und 2-AHS). Obere Reihe: Stimulation mit 2-APS, Ornithin, 2-AHS und Lysin (jeweils  $10^{-4}$  M,  $\Delta F/F$ : -0.5% (blau) - 7% (rot)), untere Reihen: Subtraktionsanalyse der Antwortmuster ( $\Delta F/F$ -Differenzwerte: 0 - 5%). In den subtrahierten Differenzbildern können unterschiedliche Antwortkategorien erkannt werden: einige Glomeruli erkennen eine terminale Aminogruppe unabhängig von der Kettenlänge (*Pfeilkopf*), wohingegen andere die Aminogruppe nur im Kontext einer bestimmten Kettenlänge erkennen (*Pfeil*); einige Glomeruli werden selektiv durch neutrale Aminosäuren erregt, d.h. sie tolerieren die zusätzliche Aminogruppe nicht. Diese spalten sich weiter in Glomeruli mit einem kettenlängenunabhängigen (*offener Pfeilkopf*) oder kettenlängenabhängigen (*offener Pfeil*) Antwortprofil auf. Glomeruli, die sowohl durch basische als auch durch neutrale Aminosäuren erregt werden (d.h. eine terminale Aminogruppe tolerieren) sind in der oberen Reihe sichtbar; sie treten in den Differenzbildern nicht auf. **B.** Die Antwortmuster zweier polarer Aminosäuren unterschiedlicher Kettenlänge (links: Serin, Kettenlänge = 3, rechts Threonin, Kettenlänge = 4) im Vergleich mit ihren unsubstituierten, neutralen Analoga (gleiches Präparat wie in A). Obere Reihe: Stimulation mit Alanin, Serin, 2-ABS, Lysin (jeweils  $10^{-4}$  M,  $\Delta F/F$ : -0.5 - 7%), untere Reihen: Subtraktionsanalyse ( $\Delta F/F$ -Differenzwerte: 0 - 5%). Einige Glomeruli, die durch neutrale Aminosäuren erregbar sind, tolerieren die Präsenz einer polaren Hydroxylgruppe nicht (Alanin minus Serin, 2-ABS minus Threonin). Einige dieser Glomeruli zeigen ein kettenlängenabhängiges Antwortverhalten (*Pfeilkopf*). Glomeruli, die selektiv durch polare Aminosäuren erregt werden, treten nicht auf (Serin minus Alanin, Threonin minus 2-ABS).

Die neutralen Aminosäuren 2-Aminopentansäure und 2-Aminohexansäure werden gemeinsam durch eine anteriomedial gelegene Gruppe von Glomeruli repräsentiert. An diese Gruppe schließt sich in dem Vergleich 2-Aminohexansäure minus Lysin eine weitere selektive Gruppe direkt an. Diese ist auch in dem Differenzpaar 2-Aminopentansäure minus Lysin sichtbar, nicht jedoch in den Paaren 2-Aminohexansäure minus Ornithin und

2-Aminohexansäure minus 2-Aminopentansäure (nicht gezeigt, **Tabelle 2**). Diese Glomeruli werden daher von allen untersuchten Substanzen mit Ausnahme von Lysin erregt. Zusätzlich wird durch den Kettenlängenvergleich der subtrahierten Muster eine mitt-laterale Differenzgruppe sichtbar, von denen die untere (mediale) für 2-Aminohexansäure typisch ist. In der inversen Betrachtung, Ornithin minus 2-Aminopentansäure, treten drei räumlich separierte Einzelgruppen in Erscheinung. Durch ihr Kettenlängenverhalten werden diese Gruppen weiter aufgespalten. Eine isoliert liegende Glomerulusgruppe ist typisch für die basischen und die langkettige, neutrale Aminosäure 2-Aminohexansäure. Entsprechend tritt sie in den Differenzen Ornithin, Lysin oder 2-Aminohexansäure minus 2-Aminopentansäure, 2-Aminobuttersäure oder Alanin auf (nicht gezeigt, **Tabelle 2**). Die anterior gelegene relativ weit ausgedehnte, hakenförmige Differenzgruppe ist typisch für die basischen Aminosäuren und apparent in allen basisch minus neutralen Vergleichen. Die hier beschriebenen und weitere Antwortverhalten einzelner Glomeruli können entsprechend kategorisiert werden (**Tabelle 2**). Die beobachteten Musterunterschiede und Antwortkategorien konnten in mehreren Präparaten bestätigt werden (**Abb. 16, Abb. 17**). Gezeigt sind zwei Präparate, die sehr ähnliche Antwortmuster und Differenzen aufweisen, sowie ein Präparat mit einer deutlich unterschiedlichen Struktur der Muster, jedoch gleichsinnigem Differenzverhalten (**Abb. 16**).



**Abb. 16 – Variabilität der Musterunterschiede basischer und neutraler Aminosäuren.**

Vergleich der Differenzmuster aus der Subtraktionsanalyse basischer und neutraler Aminosäuren für 3 Präparate (oben: wie Abb. 17, mitte: wie Abb. 15, unten: zusätzliches Präparat). Die respektiven Antwortmuster für Ornithin, Lysin, 2-APS und 2-AHS (jeweils  $10^{-4}$  M) sind in der linken Spalte dargestellt. In den Spalten 2 - 5 sind die Differenzbilder für die Subtraktionen 2-APS minus Ornithin, Ornithin minus 2-APS, 2-AHS minus Lysin und Lysin minus 2-AHS gezeigt. Im Vergleich verschiedener Präparate untereinander können sowohl Gemeinsamkeiten des selektiven Verhaltens individueller Glomeruli gegenüber bestimmten Strukturmerkmalen als auch Unterschiede erkannt werden. Ornithin erregt gegenüber der neutralen Aminosäure 2-APS einen zusätzlichen Glomerulus, der in dem entsprechenden Vergleich Lysin minus 2-AHS nicht erkannt werden kann (*Pfeilkopf*). Die längerkettige neutrale Aminosäure 2-AHS erregt zusätzliche Glomeruli, welche die terminale Aminogruppe nicht tolerieren, jedoch spezifisch für die respektive Kettenlänge sind (*Pfeil*). Trotz der starken generellen Musterähnlichkeit zwischen den beiden oberen Präparaten, kann in dem oberen Präparat ein Glomerulus mit gegensinnigem Kettenlängenverhalten erkannt werden (*offener Pfeil*). Konsistent können auch Glomeruli, die eine basische langkettige Aminosäure (Lysin) bevorzugen, in unterschiedlichen Präparaten beobachtet werden (*offener Pfeilkopf*).

Einige Glomeruli werden ausschließlich durch basische Aminosäuren, unabhängig von der Kettenlänge, stimuliert. Die Rezeptoren, die in diese Glomeruli projizieren, erkennen die Aminogruppe als zusätzliches Strukturmerkmal im Kontext einer Aminosäure. Die terminale Aminogruppe ist in diesem Fall also ein notwendiges Strukturmotiv. Eine weitere Gruppe erkennt die Aminogruppe ausschließlich im Kontext einer bestimmten Kettenlänge. Einige Rezeptoren tolerieren die Anwesenheit einer Aminogruppe nicht (siehe neutral minus basische Vergleiche). Diese spalten sich wiederum in solche auf, die für eine bestimmte Kettenlänge spezifisch sind und andere, die unabhängig von der Kettenlänge sind. Einige Glomeruli werden durch neutrale und basische Aminosäuren gleichermaßen erregt, d.h. sie tolerieren die Präsenz der funktionellen Gruppe, ein notwendiges Strukturmerkmal ist sie jedoch nicht. In allen Einzelkategorien (toleriert, nicht toleriert, notwendig) wurde Kettenlängenabhängigkeit beobachtet. Das legt die Beteiligung von mindestens sechs Aminosäure-Geruchsrezeptoren an der Erkennung basischer und neutraler Aminosäuren nahe. Für die Erkennung von Kettenlängenunterschieden neutraler Aminosäuren wurden bereits fünf Rezeptortypen kategorisiert. Durch einen Vergleich beider Gruppen könnten die einzelnen Kategorien weiter aufgespalten oder zusammengefasst werden. Durch den Vergleich mit den polaren Aminosäuren, s.u., werden die Rezeptorkategorien, die hier für die Erkennung basischer und neutraler Aminosäuren beobachtet wurden, weiter aufgespalten (**Tabelle 2**).

*Eine  $\beta$ -Hydroxylgruppe in der Molekülstruktur verhindert die Bindung an einige der Geruchsrezeptoren, die durch neutrale Aminosäuren erregt werden können.*

Der Einfluss einer Hydroxylgruppe in  $\beta$ -Position wurde durch den Vergleich der polaren Aminosäuren Serin und Threonin mit den neutralen Aminosäuren Alanin und 2-Aminobuttersäure untersucht. Antworten auf die Stimulation mit Serin und Threonin traten wie erwartet in der Aminosäureregion des ventrolateralen Bulbus auf [für Serin siehe auch Friedrich und Korsching (1997)]. In diesem Vergleich waren die Signale der neutralen Aminosäuren deutlich stärker und die Antwortmuster aus mehr aktiven Glomeruli zusammengesetzt als die der polaren (**Abb. 15B**). Durch die Subtraktionsanalyse konnten umfangreiche Glomerulusgruppen gefunden werden, die spezifisch durch die neutralen Aminosäuren erregt werden. Einige dieser Differenzglomeruli zeigten wiederum eine Abhängigkeit von der Kettenlänge der Stimuli. Einige Glomeruli werden durch neutrale und polare Aminosäuren gleichermaßen erregt, weisen jedoch ebenfalls eine Kettenlängenabhängigkeit des Antwortverhaltens auf. Glomeruli, die selektiv durch die polaren Aminosäuren Serin oder Threonin aktiviert werden, konnten interessanterweise nicht gefunden werden ( $n = 6$ ). Das Repertoire der Geruchsrezeptoren mit einem polaren Ligandenspektrum erscheint daher weniger umfangreich und nur eine Teilgruppe der Rezeptoren zu sein, die auch an der Erkennung neutraler Aminosäuren beteiligt sind. Durch den Vergleich des Antwortverhaltens gegenüber polaren und neutralen Stimuli konnten drei neuartige Antwortkategorien aufgedeckt werden: Glomeruli (Rezeptoren), welche die Anwesenheit einer Hydroxylgruppe unabhängig von der Kettenlänge tolerieren, solche, die sie tolerieren und ein individuelles Kettenlängenverhalten zeigen und Glomeruli, die eine Hydroxylgruppe in der Molekülstruktur nicht tolerieren.

Durch einen Kreuzvergleich mit dem Antwortverhalten einzelner Glomeruli gegenüber den basischen Aminosäuren konnten so insgesamt fünf gemischte Antwortkategorien erkannt werden (**Tabelle 2**). Ein deutliches Beispiel für eine solche gemischte Kategorie ist in **Abbildung 15A** dokumentiert (2-Aminopentansäure minus Ornithin). Diese Glomeruli tolerieren eine terminale Aminogruppe nicht, da sie entsprechend als Differenz auftreten, tolerieren jedoch die polare Aminosäure Serin (**Abb. 15B**).

***Eine Mindestabschätzung des Aminosäure-Geruchsrezeptorrepertoires.***

Durch die Subtraktionsanalyse der Antwortmuster unterschiedlicher Aminosäureklassen konnte eine Mindestabschätzung des aminosäuredetektierenden Geruchsrezeptorrepertoires des Zebrafischblinds vorgenommen werden (**Tabelle 2**). Eindeutig konnten durch die vorliegenden Versuche mindestens 10 Antwortkategorien der Glomeruli, die jeweils unterschiedlichen Geruchsrezeptoren entsprechen, gefunden werden. Diese Abschätzung ist deshalb eine Mindestabschätzung, da nur die basischen und polaren Kategorien innerhalb eines Präparates miteinander kreuzverglichen werden konnten. Kategorien, die sich aus dem Kettenlängenvergleich ergaben (**Tabelle 2**), könnten theoretisch durch ihr selektives Verhalten gegenüber basischen und polaren Aminosäuren weiter aufgespalten werden. Leider liegen keine kompletten Serien für alle Vergleichsmöglichkeiten innerhalb eines Präparates vor, wodurch eine gemeinsame Betrachtung des Antwortverhaltens gegenüber der Kettenlänge neutraler Aminosäuren sowie dem Verhalten gegenüber basischen und polaren Aminosäuren nicht möglich ist. Eine Kettenlängenabhängigkeit innerhalb der basischen und polaren Kategorien konnte jedoch beobachtet werden (**Abb. 15**). Darüber hinaus sind weitere Kategorisierungen durch ein differentielles Antwortverhalten der Glomeruli gegenüber Substitutionen denkbar, die hier nicht untersucht wurden. Mit mindestens 10 der auf ungefähr 100 geschätzten Geruchsrezeptoren des Zebrafischblinds ist jedoch bereits ein umfangreicher Anteil des Gesamtrepertoires an der Erkennung und Kodierung von Aminosäuren beteiligt.

	Kettenlänge						
	2	3	4	5	6	8	
1	e	t	t	t	t	t	<b>Tabelle 2 – Komplexität des Aminosäure-Geruchsrezeptorrepertoires des Zebrafischblinds – Antwortkategorien.</b> Liste der Geruchsrezeptor-Antwortkategorien, die in dem selektiven Antwortverhalten der Glomeruli erkannt werden konnten. In der Kettenlängenbetrachtung (oben) wurden Geruchsrezeptoren erkannt, die ab einer bestimmten Kettenlänge neutraler Aminosäuren aktiviert werden. Eine bestimmte Mindestkettenlänge ist zur Aktivierung erforderlich ( <i>e</i> ). Längere neutrale Seitenketten werden jedoch toleriert ( <i>t</i> ), wohingegen kürzere Seitenketten nicht zu einer Aktivierung der Rezeptoren führen ( <i>n</i> ). Insgesamt können fünf unterschiedliche Kategorien gebildet werden. Gegenüber Substitutionen der Seitenkette mit polaren und basischen funktionellen Gruppen (unten) treten Rezeptoren in Erscheinung, welche die Präsenz eines bestimmten Strukturmerkmals tolerieren ( <i>t</i> ), es nicht tolerieren ( <i>n</i> ) oder zur Aktivierung erfordern ( <i>e</i> ). Nicht alle möglichen Kombinationen sind verwirklicht. Die fünf erkannten Kategorien könnten durch ihr selektives Kettenlängenverhalten weiter aufgespalten werden (siehe <b>Abb. 15</b> ). Jedoch sind auch hier nicht alle denkbaren (5 x 5) Kombinationen möglich; beispielsweise könnte die Kategorie 4 durch die Kategorien 7, 8 und 10 weiter aufgespalten werden, sie ist jedoch mit den Kategorien 6 und 9 ( $\beta$ -OH Gruppe wird toleriert) nicht vereinbar. Die Gesamtzahl der hier aufgelisteten Antwortkategorien repräsentiert eine Mindestabschätzung des Aminosäure-Geruchsrezeptorrepertoires des Zebrafischblinds. Mindestens 10 unterschiedliche Rezeptoren sind an der Erkennung der Aminosäuren beteiligt.
2	n	e	t	t	t	t	
3	n	n	n	e	t	t	
4	n	n	n	n	e	t	
5	n	n	n	n	n	e	
6	nNH <sub>2</sub> $\beta$ -OH						
	t	t					
7	t	n					
8	e	n					
9	n	t					
10	n	n					

weise könnte die Kategorie 4 durch die Kategorien 7, 8 und 10 weiter aufgespalten werden, sie ist jedoch mit den Kategorien 6 und 9 ( $\beta$ -OH Gruppe wird toleriert) nicht vereinbar. Die Gesamtzahl der hier aufgelisteten Antwortkategorien repräsentiert eine Mindestabschätzung des Aminosäure-Geruchsrezeptorrepertoires des Zebrafischblinds. Mindestens 10 unterschiedliche Rezeptoren sind an der Erkennung der Aminosäuren beteiligt.

### 1.3.3 Glomeruli mit einem ähnlichen Ligandenspektrum sind räumlich benachbart.

In den dargestellten Subtraktionsanalysen kann ein interessanter Seitenaspekt der räumlichen Repräsentation von Strukturmerkmalen auf der Bulbusoberfläche erkannt werden. Glomeruli, die ein selektives Antwortverhalten zeigen, d.h. spezifisch für eine bestimmte Kombination von Strukturmerkmalen der Aminosäuren sind, liegen auf der Bulbusoberfläche innerhalb räumlich eng benachbarter Areale. Eine solche Organisation der Glomeruli konnte für alle untersuchten Vergleiche, Einfluss der Kettenlänge, basische oder polare Merkmale, gefunden werden. Erinnert sei z.B. an die Gruppe der Glomeruli, die spezifisch ab einer Kettenlänge von 5 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette (2-Aminopentansäure) aktiviert wird (**Abb. 10A, B**). Glomeruli, die spezifisch für neutrale Aminosäuren gegenüber basischen sind, bilden ein Cluster im anterioren Bulbus (**Abb. 15A**). Für Aminosäuren mit längeren Seitenketten wurde in diesem Vergleich zusätzlich eine posteriomedial gelegene Gruppe sichtbar. Kurzkettige, basische Aminosäuren werden in drei, langkettige in zwei Gruppen eng benachbarter Glomeruli auf der Bulbusoberfläche abgebildet. Auch Glomeruli, welche eine polare Seitenkette nicht tolerieren, zeichnen sich, im Vergleich mit den neutralempfindlichen Glomeruli, durch ein zusammenhängendes Differenzmuster aus (**Abb. 15B**).

Die räumliche Organisation glomerulärer Antworten auf der Bulbusoberfläche scheint daher nicht zufällig zu sein, sondern ist nach chemischen Strukturmerkmalen angeordnet (chemotop). Über die grundsätzliche chemotope Organisation des Bulbus hinaus, der in Repräsentationsdomänen für unterschiedliche Substanzklassen (Aminosäuren, Gallensäuren, Nukleotide und Steroide) geordnet ist, gilt ein ähnliches Organisationsprinzip auch innerhalb der Repräsentationsdomänen und für vergleichsweise kleine Strukturunterschiede der Geruchsstoffe.

### 1.3.4 Die Kreuzadaptationen der Antwortmuster verhalten sich subtraktiv.

Die bisher dargestellten Differenzanalysen bewerten, ob ein bestimmter Glomerulus selektiv durch einen bestimmten Geruchsstoff im Vergleich zu einem anderen aktiviert wird. Das selektive Antwortverhalten der Glomeruli lässt auf die Bindungseigenschaften der zugrundeliegenden Rezeptoren zurück schließen und entsprechende Antwortkategorien wurden dargestellt (**Tabelle 2**). In allen Fällen wurden jedoch einige Glomeruli durch beide Geruchsstoffe des Vergleichspaares gleichermaßen erregt. Diese Glomeruli sind in den Differenzbildern unsichtbar, da sie in beiden Differenzrichtungen subtrahiert werden. Es geht aus der Differenzanalyse nicht hervor, ob diese unspezifischen Glomeruli von einer einheitlichen Population unspezifischer oder einer gemischten Populationen spezifischer Riechsinneszellen innerviert werden. Für den Zebraäbrbling wurde die 1:1 Projektion rezeptorgleicher Riechsinneszellen in einen Glomerulus bisher nicht direkt gezeigt. Darüber hinaus weist die laterale Kette aufgrund ihrer mikroglomerulären Struktur Ähnlichkeiten zum akzessorischen olfaktorischen Bulbus der Säuger auf. Typisch für die glomeruläre Verschaltung im akzessorischen olfaktorischen Bulbus ist jedoch eine gemischte Innervation einzelner Glomeruli durch unterschiedliche rezeptorgleiche Zellpopulationen (Belluscio et al., 1999).

Abb. 17 – Gedankenexperiment zur Innervation der Glomeruli des Zebrafährblings.

	ORN	Glomerulus	Stimulus		Subtraktionsanalyse		Adaptation	
			A	B	A-B	B-A	B-adaptiert	A-adaptiert
A			+	-	+	-	+	-
			+	+	-	-	+	+
B			-	+	-	+	-	+

Zwei Riechsinneszellpopulationen, welche unterschiedliche Geruchsrezeptoren exprimieren (hellgrau, dunkelgrau) und jeweils für einen der Stimuli A oder B empfindlich sind, innervieren jeweils einen Glomerulus (oben, unten). Zusätzlich wird ein weiterer Glomerulus von beiden Zelltypen simultan innerviert (mitte). Entsprechend wird dieser gemischt innervierte Glomerulus sowohl durch Geruchsstoff A als auch durch Substanz B erregt (linke Spalte). In

der Subtraktionsanalyse würde dieser Glomerulus nicht erkannt werden, da er in beiden Differenzrichtungen (A minus B und B minus A) subtrahiert wird (mittlere Spalte). Für den Fall, dass die Ligandenspektren der beiden Rezeptoren nicht überlappen, sollten gemischt innervierte Glomeruli in einem Adaptationsexperiment erkannt werden können (rechte Spalte). Sofern Glomeruli der lateralen Kette des Zebrafährblings eine solche Mischinnervation erhalten, sollten Unterschiede zwischen den gerechneten Differenzen und den adaptierten Antwortmustern auftreten.

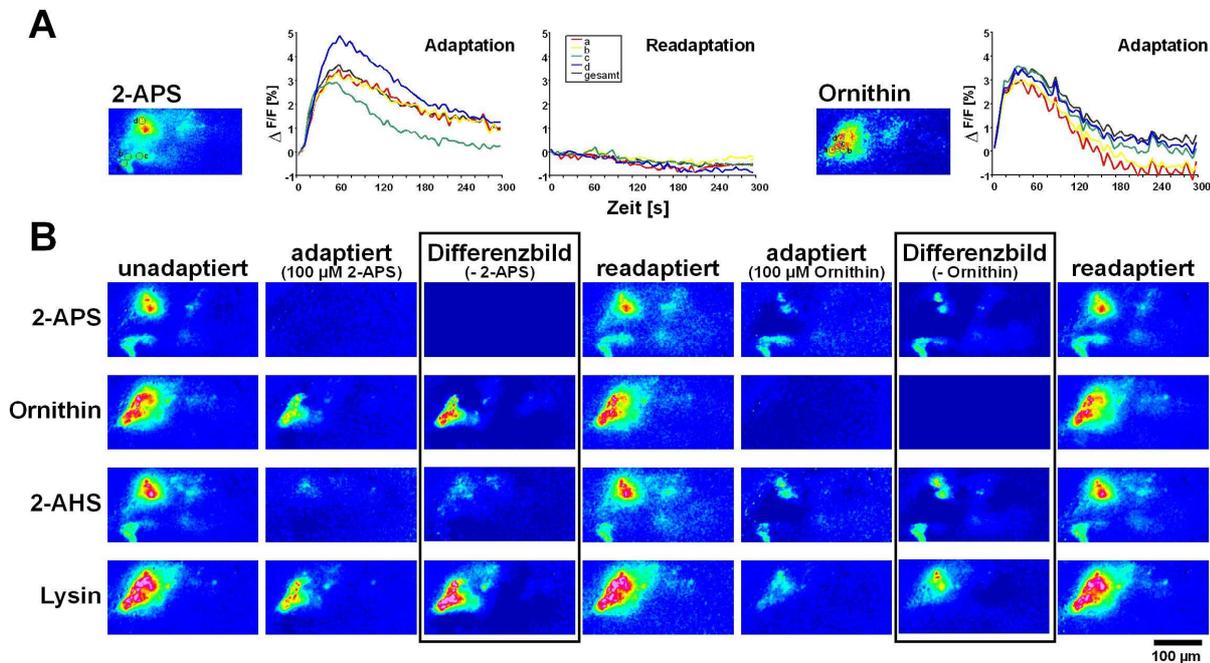
Würden die Glomeruli der lateralen Kette des Zebrafährblings einen ähnlich gemischten Eingang erhalten, wie die Glomeruli des akzessorischen Bulbus der Maus, könnten durch die Subtraktionsanalyse Rezeptoren falsch bewertet werden. Für den Fall, dass die Ligandenspektren der Rezeptoren, die einen Glomerulus gemeinsam innervieren nicht überlappen, jedoch unabhängig voneinander jeweils eine der miteinander verglichenen Aminosäuren erkennen, würden diese Glomeruli in der Subtraktionsanalyse nicht auftreten. Die Schlussfolgerung, dass beide Aminosäuren erkannt werden, ist dann für den entsprechenden Glomerulus, jedoch nicht mehr für die Geruchsrezeptoren gültig. Unterschiede sollten jedoch im Vergleich mit Kreuzadaptation erkennbar werden (Abb. 17). Die Adaptation würde sich dann nur auf einen Rezeptortyp auswirken. Im Falle einer Mischinnervation der Glomeruli durch Rezeptoren mit nicht überlappendem Ligandenspektrum sollten sich demnach Unterschiede zwischen den gerechneten Bilddifferenzen und den kreuzadaptierten Antwortmustern ergeben. In den Antwortmustern kreuzadaptierter Präparate sollten zusätzliche Differenzfoki auftreten, die in den gerechneten Differenzen nicht in Erscheinung treten. Monospezifische Glomeruli und solche Glomeruli, die von Rezeptoren mit überlappenden Ligandenspektren innerviert werden, können allerdings auch in einem Kreuzadaptationsexperiment nicht weiter separiert werden.

Zur Adaptation wurde die Perfusionslösung des Präparates gegen eine stimulushaltige ACSF (jeweils eine Aminosäure,  $10^{-4}$  M) ausgetauscht. Durch den Wechsel der Lösung wurde, wie erwartet, zunächst Aktivität im olfaktorischen Bulbus ausgelöst (Abb. 18A). Das durch die Adaptationslösung erregte Aktivitätsmuster war von der Erregung, die durch einzelne Pulse eines identischen Stimulus ausgelöst werden konnte, nicht zu unterscheiden (vergleiche Abb. 18A mit B). Die Aktivierung durch die Adaptationslösung verlief jedoch langsamer als durch einzelne Stimuluspulse, erreichte ein breitgipfliges Maximum nach ca. 60 s und fiel innerhalb der nächsten 180 s kontinuierlich auf den Ruhewert ab (Abb. 18A). In den dargestellten Kinetiken wird der Ruhewert nicht von allen Glomeruli erreicht. Das beobachtbare Restsignal entspricht allerdings nicht unbedingt neuronaler Aktivität. Während der relativ langen Aufzeichnungsperiode (bis zu 10 min) treten leichte Präparatverschiebungen und Konvulsionen des Bulbusgewebes auf. Die Berechnung von  $\Delta F/F$  ist

sehr sensitiv gegenüber solchen Bildverschiebungen. Die Justage des Referenzbildes ( $F_0$  aus  $\Delta F/F$ ) ist für die Berechnung mit späten Perioden der Bildserie nicht mehr exakt und führt zu artifiziellen „Signalen“. Das Muster der Bewegungsartefakte ist jedoch von tatsächlichen Geruchsantworten deutlich verschieden. Der verlangsamte Signalanstieg könnte durch die Strömungseigenschaften innerhalb des Schlauchsystems bedingt sein. Der Wechsel der Trägerlösung wurde an einem Mehrwegehahn in einiger Entfernung (50 cm) von der Präparation durchgeführt. Die Stimulusfront wird nicht rechtwinkling durch das Schlauchsystem übertragen und erfährt an der Präparatseite einen rampenförmigen Anstieg. Die erreichten Maximalwerte der Erregung waren für einfache Stimuluspulse und die Adaptation identisch. Durch Wechsel der Trägerlösung zu stimulusfreier ACSF wurde die Readaptation des Präparates eingeleitet. Calciumsignale im Sinne einer „off-Antwort“ wurden während dieser Phase nicht beobachtet (**Abb. 18A**). Stark negative Fluoreszenzänderungen, die eine unvollständige Adaptation anzeigen würden, sind ebenfalls nicht markant. Ein leichter Abfall der Fluoreszenz um etwa 0.5 bis 0.75% tritt jedoch nach ungefähr 60 s auf. Durch wiederholte Applikation des adaptierenden Stimulus während der Readaptationsphase wurde die Dauer der vollständigen Readaptation bestimmt. Fünf Minuten nach Einleiten der Readaptation waren die induzierten Signale von praeadaptiven nicht mehr zu unterscheiden (DI-Werte der prae/post Vergleiche, s.u.). Zur Sicherheit wurde das verwendete Zeitregime auf eine jeweils 10 minütige Adaptations- und Readaptationsdauer ausgedehnt.

Für die Vergleichsgruppe der basischen und neutralen Aminosäuren sind die Ergebnisse in **Abbildung 18B** dargestellt. Die unadaptierten Aktivitätsmuster zu Beginn des Versuchs entsprechen den in Abschnitt **IV.1.3.2** beschriebenen Charakteristika. Die Signale basischer Aminosäuren sind insgesamt stärker und weisen mehr Einzelfoki auf als die Antwortmuster neutraler Aminosäuren. Neutrale Aminosäuren rufen Muster hervor, die weiter in mediale Bulbusregionen hineinreichen. Im 2-Aminopentansäure-adaptierten Zustand waren die Präparate erwartungsgemäß unempfindlich für weitere Stimulationen mit 2-Aminopentansäure, wodurch die Vollständigkeit der Adaptation ebenfalls gut belegt wird. Durch eine Stimulation mit den übrigen drei Aminosäuren (2-Aminohexansäure, Ornithin, Lysin) wurden gegenüber den respektiven, unadaptierten Antworten reduzierte Teilmuster beobachtet. Diese Teilmuster entsprechen mit sehr hoher Genauigkeit (bis hin zum Rauschen) den Differenzbildern der Subtraktionsanalyse (**Abb. 18B**, umrandet), sofern der adaptierende Stimulus als Subtrahend eingesetzt wird. Nach erfolgter Readaptation der Präparate sind die entsprechenden Signale von praeadaptiven Signalen ununterscheidbar (die Differenzindizes der respektiven Prae-/Postadaptationsvergleiche betragen: 2-Aminopentansäure-Adaptation: 2-Aminopentansäure: 0.29, 2-Aminohexansäure: 0.21, Ornithin: 0.2, Lysin 0.13; Ornithin-Adaptation: 2-Aminopentansäure: 0.25, 2-Aminohexansäure: 0.23, Ornithin: 0.19, Lysin: 0.14). Während der Adaptation mit der basischen Aminosäure Ornithin wurden entsprechend durch Ornithin keine und durch die anderen Aminosäuren der Vergleichsgruppe Teilmuster erhalten. Auch hier entsprechen die erhaltenen adaptierten Teilmuster den jeweiligen Differenzbildern (Ornithin als Subtrahend). Ähnlich wie in **Abbildung 14A** kann auch in diesem Präparat die für neutrale Aminosäuren typische, bogenförmige anteriomediale Glomerulusgruppe erkannt werden. Darüber hinaus sind zwei ca 20  $\mu\text{m}$  große Einzelfoki im mitt-medialen Bildausschnitt erkennbar, die durch alle Substanzen mit Ausnahme von

Ornithin erregt werden. Durch weitere Differenzbetrachtungen konnte bestimmt werden, dass diese Glomeruli selektiv für langkettige neutrale Aminosäuren ab 2-Aminopentansäure und die ebenfalls langkettige basische Aminosäure Lysin sind. Durch polare Aminosäuren werden sie nicht erregt (**Tabelle 2**) und konstituieren damit eine zusätzliche Antwortkategorie, die im vorigen Abschnitt nicht dargestellt wurde.



**Abb. 18 – Adaptation und Kreuzadaptation der Antwortmuster basischer und neutraler Aminosäuren.**

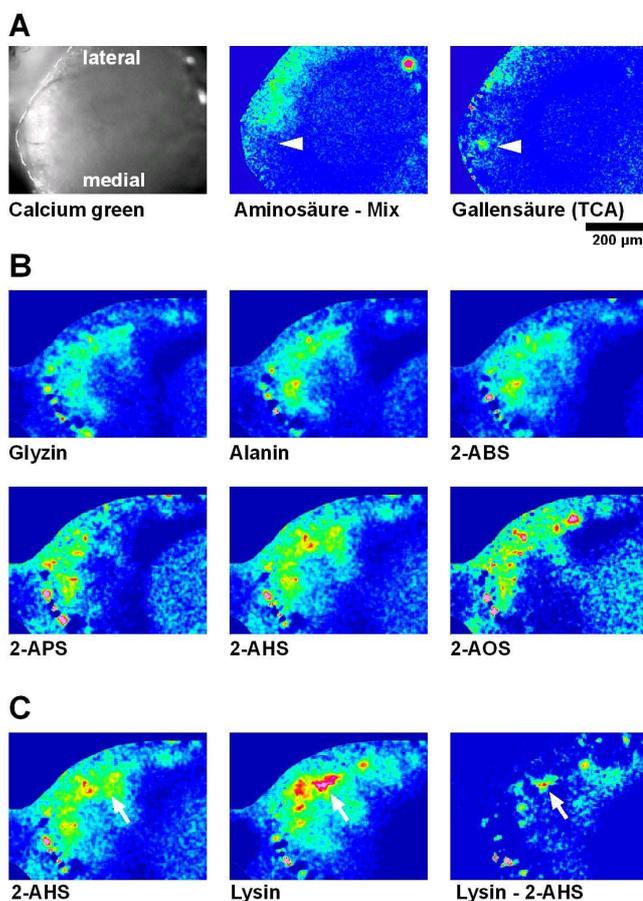
Adaptation und Kreuzadaptation der Aminosäureantworten mit 2-Aminopentansäure und Ornithin. **A.** Zeitverlauf der Adaptation und Readaptation mit 2-Aminopentansäure (links) und der Adaptation mit Ornithin (rechts). Durch die zur Adaptation eingesetzte Aminosäure werden zunächst Antworten im olfaktorischen Bulbus stimuliert. Die Intensitäten und die Antwortmuster (Bilder links neben den Zeitverläufen) sind von einfachen Stimulationen mit dem gleichen Stimulus nicht zu unterscheiden (vergleiche mit den unadaptierten Antwortmustern in B). Die Geruchssignale steigen während der ersten 60 s stark an und fallen während der folgenden 2 min wieder ab. Die Zeitverläufe für 4 individuelle Glomeruli (in dem jeweiligen Stimulusbild markiert) und das Gesamtsignal sind gezeigt. **B.** Adaptation mit 2-Aminopentansäure und Ornithin (jeweils  $10^{-4}$  M) und Vergleich mit den gerechneten Differenzen aus der Subtraktionsanalyse (von oben nach unten: Stimulation mit 2-Aminopentansäure, Ornithin, 2-Aminohexansäure, Lysin (jeweils  $10^{-4}$  M), links: Stimulus, daneben: unadaptiertes Antwortmuster, 2-Aminopentansäure-adaptiertes Antwortmuster, gerechnetes Differenzbild (*eingerahmt*, Stimulus minus 2-Aminopentansäure), readaptiertes Antwortmuster, Ornithin-adaptiertes Antwortmuster, gerechnetes Differenzbild (*eingerahmt*, Stimulus minus Ornithin) und readaptiertes Antwortmuster). Wie erwartet kann durch den adaptierenden Stimulus keine Geruchsantwort ausgelöst werden. Alle anderen Aminosäuren stimulieren im adaptierten Präparat Teilmuster ihrer unadaptierten Antwortmuster. Die Readaptation ist vollständig und die readaptierten Antwortmuster sind von praeadaptiven nicht zu unterscheiden (DI-Werte der prea-/post-Adaptationsmuster) Die adaptierten Teilmuster entsprechen den gerechneten Differenzen der Subtraktionsanalyse sofern der adaptierende Stimulus als Subtrahend eingesetzt wird.

Für die polare Vergleichsgruppe konnten die Befunde der Subtraktionsanalyse ebenfalls durch die Adaptationsversuche bestätigt werden ( $n = 3$ , nicht gezeigt). Während der Adaptation mit der polaren Aminosäure Serin wurden durch Stimulationen mit neutralen Aminosäuren Teilmuster erhalten, wohingegen durch Adaptation mit Alanin sämtliche Serinantworten unterdrückt werden konnten. Die adaptierten Teilmuster entsprachen den gerechneten Differenzen exakt. Zusätzlich aktivierte Glomeruli im Vergleich zur Subtraktionsanalyse ebenfalls nicht gefunden werden.

Die exakte Übereinstimmung adaptierter Antwortmuster mit den gerechneten Differenzbildern legt zwei Schlussfolgerungen nahe. Zum einen sind die in der Subtraktionsanalyse beobachteten Musterunterschiede für das olfaktorische System relevant und treten auch unter physiologischen Bedingungen auf. Es ist bemerkenswert, dass Verarbeitungsmechanismen in solch komplexen Analysesystemen zumindest in Teilprozessen einfachen mathematischen Beziehungen gehorchen. Zum anderen konnte durch den Vergleich der adaptierten Muster mit den gerechneten Differenzen kein Hinweis auf eine Mischinnervation der Glomeruli durch Rezeptorzellen mit basischen, neutralen oder polaren Antwortspektren gefunden werden. Auch unter der Annahme, dass ähnliche Rezeptoren ausschließlich eng benachbarte Glomeruli innervieren (Tsuboi et al., 1999), konnte innerhalb der Substanzklassen (basisch, polar) kein Hinweis darauf gefunden werden, dass z.B. Rezeptoren mit einem basischen Grundspektrum, jedoch unterschiedlicher Kettenlängenpräferenz einen Glomerulus gemeinsam innervieren (siehe Ornithin/Lysin- oder Serin/Threonin-Vergleiche).

#### 1.4 Die Topographie der Geruchsstoffrepräsentation verschiedener Arten ist konserviert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Goldfische aufgrund ihrer anatomischen Besonderheiten zur Darstellung der Projektionsneurone des Bulbus eingesetzt. In sehr vorläufigen Untersuchungen wurden auch Teilaspekte der Geruchsstoffrepräsentation am Goldfisch betrachtet. Die wichtigsten Befunde seien hier kurz dargestellt.



**Abb. 19 – Vorversuche zur optischen Ableitung am Bulbus des Goldfischs.**

Optische Ableitung am Bulbus des Goldfischs während der Stimulation mit Aminosäuren und der Gallensäure TCA. **A.** Aminosäuren erregen Aktivität im lateralen, TCA im zentromedialen Bulbus (links: Calcium Green™-1 Fluoreszenz, mitte: Stimulation mit einer Mischung unterschiedlicher Aminosäuren (Lysin, Methionin, 2-Aminopentansäure, jeweils  $10^{-4}$  M); rechts: Stimulation mit der Gallensäure TCA ( $10^{-4}$  M). TCA erregt einen Fokus (*Pfeilkopf*) außerhalb der Aminosäure-region. **B.** Stimulation mit Aminosäuren unterschiedlicher Kettenlänge (Glyzin bis 2-AOS, jeweils  $10^{-4}$  M). Nur der anterolaterale Bulbus ist gezeigt. Alle sechs Aminosäuren erregen Aktivität im lateralen Bulbus. Durch länger-kettige Aminosäuren werden tendentiell stärkere und umfangreichere Antworten ausgelöst. Im Vergleich zum Zebabärbling ist der Zuwachs der Antwortstärke (ΔF/F: -0.5 (blau) - 1.5% (rot)). **C.** Vergleich des Antwortmusters der basischen Aminosäure Lysin (mitte) mit dem 2-AHS-Signal (links). In der Subtraktionsanalyse (rechts: Lysin minus 2-AHS) können Glomeruli erkannt werden, die selektiv durch die basische Aminosäure erregt werden (*Pfeil*). In der inversen Berechnung können keine selektiv aktivierten Glomeruli erkannt werden (nicht gezeigt, ΔF/F: wie B).

Die glomeruläre Architektur des olfaktorischen Bulbus ist beim Goldfisch ähnlich gegliedert, wie beim Zebraärbliings (Baier und Korsching, 1994). Unterschiedliche Geruchsstoffklassen, hier wurden die Gallensäure Taurocholsäure (TCA) und Aminosäuren verwendet, werden auch im olfaktorischen System des Goldfisches in verschiedenen Bulbusregionen abgebildet. Nach der Stimulation mit Aminosäuren konnte Aktivität im anterolateralen Bulbus des Goldfisches aufgezeichnet werden ( $n = 4$ , **Abb. 19A, B**), wohingegen TCA einen eng umschriebenen Aktivitätsfokus im anteromedialen Bulbus stimulierte (**Abb. 19A**). Auch im olfaktorischen Bulbus des Goldfisches konnten Geruchssignale durch unterschiedlich langkettige Aminosäuren (Glyzin bis 2-AOS, **Abb. 19B**) ausgelöst werden. Tendentiell wurden auch hier durch länger-kettige Stimuli intensivere und z.T. umfangreichere Antwortmuster stimuliert als durch kurz-kettige Aminosäuren. Im Vergleich zum Zebraärbliing waren die kettenlängen-abhängigen Unterschiede der Antwortmuster jedoch nicht so deutlich ausgeprägt (Subtraktionsanalyse nicht gezeigt). Durch die basische Aminosäure Lysin konnte ein von den neutralen Aminosäuren verschiedenes Antwortmuster erregt werden (**Abb. 19C**). Durch Lysin wurden gegenüber 2-Aminohexansäure mehrere Glomeruli selektiv aktiviert. In der inversen Betrachtung (2-Aminohexansäure minus Lysin) konnten jedoch, im Unterschied zum Zebraärbliing, keine selektiv antwortenden Glomeruli erkannt werden (nicht gezeigt).

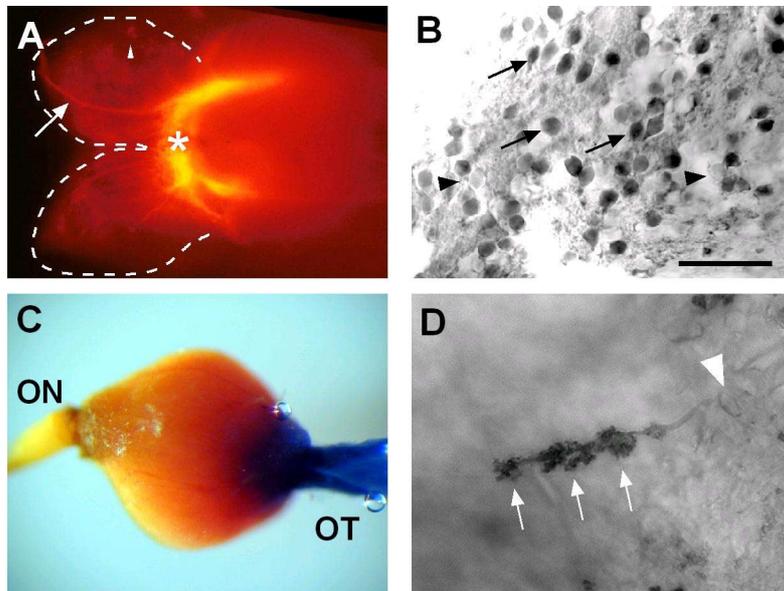
Die Aktivitätsmuster, die im Bulbus des Goldfisches erhalten wurden (**Abb. 19**), waren nicht so deutlich strukturiert wie die des Zebraärbliings. Die Antwortstärken und die beobachtbaren Musterunterschiede gegenüber unterschiedlichen Aminosäurestimuli waren klein und die Signale waren anfälliger für Artefakte. Wahrscheinlich waren diese Differenzen jedoch durch methodische Unterschiede bedingt. Die Färbung des Goldfischbulbus mit dem Farbstoff Calcium Green<sup>TM</sup>-1 dextran war nicht sehr effektiv. Darüber hinaus erscheint das Gewebe des Goldfischbulbus dichter als das des Zebraärbliings, wodurch eine stärkere Lichtstreuung bedingt ist, die teilweise für die schlechtere Auflösung und die geringeren Intensitäten der Goldfischsignale verantwortlich sein könnte. Zusätzlich wurde wegen der Größe des Goldfischbulbus mit einer niedrigeren optischen Vergrößerung gearbeitet. Das verwendete Objektiv erlaubt jedoch eine schlechtere Auflösung und besitzt eine geringere Lichtstärke, was sich ebenfalls auf die Prägnanz der Antwortmuster ausgewirkt haben könnte.

Obwohl die hier beschriebenen Untersuchungen am Goldfisch sehr vorläufig und wenig umfangreich sind, erscheint es bemerkenswert, dass grundsätzliche Gemeinsamkeiten in der Repräsentation der Aminosäuren bei Goldfisch und Zebraärbliing vorliegen.

### 1.5 Darstellung der Mitralzellen und Versuch einer Messung.

Mitralzellen sind die prinzipiellen Ausgangsneurone des olfaktorischen Bulbus. Die an den Synapsen der Riechsinneszellen eintreffende Aktivität wird auf die apikalen Dendriten dieser Zellen umgeschaltet. Bei niederen Vertebraten innervieren die Verzweigungen der Mitralzellendendriten gleichzeitig unterschiedliche Glomeruli (Dryer und Graziadei, 1994; Laberge und Hara, 2001). Benachbarte Mitralzellen werden durch Körnerzellen inhibitorisch miteinander vernetzt. Die Darstellung und selektive Ableitung der Mitralzellen wäre sehr

interessant, um die Funktion der synaptischen Verschaltung im olfaktorischen Bulbus und deren Beitrag zur Geruchsstofferkennung und Unterscheidung zu verstehen. Die gleichzeitige Untersuchung der Eingangs- und Ausgangssignale identifizierter Glomeruli mit bekanntem Ligandenspektrum und die Kenntnis des Antwortverhaltens benachbarter Glomeruli wären dabei besonders hilfreich.



**Abb. 20 – Versuche zur Darstellung der Mitralzellen.**

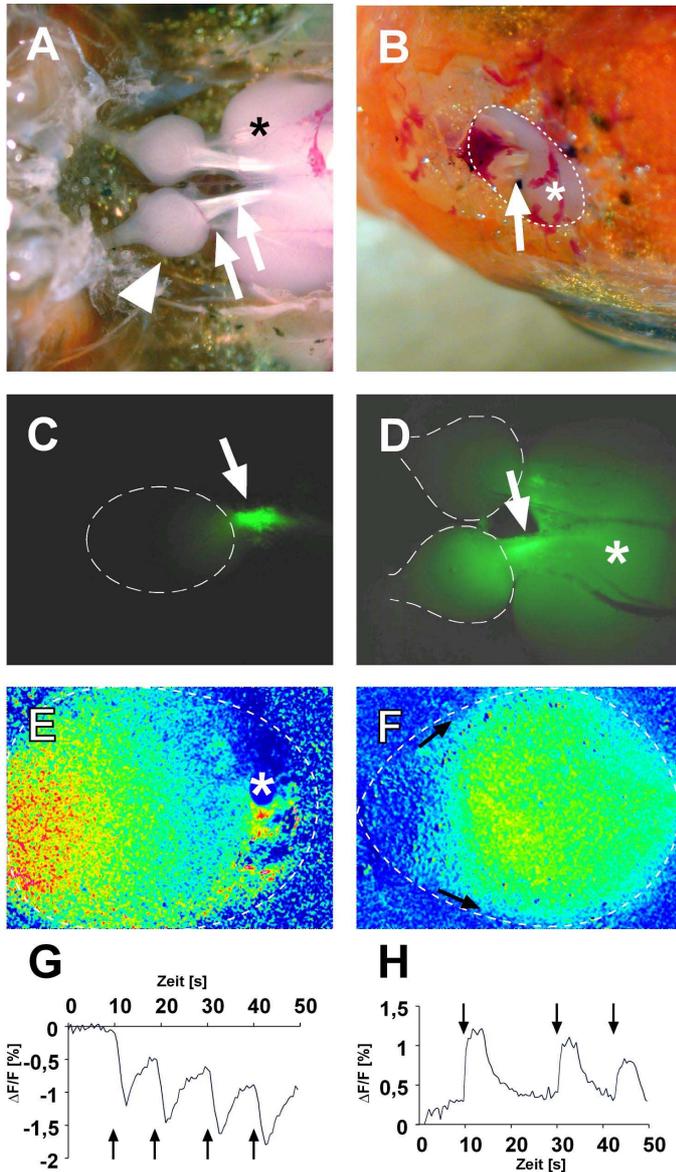
**A.** DiI-Färbung des olfaktorischen Traktes. DiI-beschichtete Glasnadeln wurden in das Telencephalon am Eintritt des medialen olfaktorischen Traktes inseriert (*Sternchen*) und bulbofugale Fasern retrograd gefärbt. Die gestrichelte Linie umschreibt die Konturlinie der Bulbi. Somata individueller Mitralzellen sind wegen des hohen Hintergrundes nur schlecht sichtbar (*Pfeilkopf*). Im oberen Bulbus wurden auch Fasern des Terminalnerven (*Pfeil*) angefärbt. **B.** Biotin-Backfill. Mitralzellen wurde über die Trakte retrograd mit 1% Biotin markiert. Entwicklung mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase, Diaminobenzidin, Nickel-verstärkt.

Zahlreiche, gefärbte (*Pfeile*) und ungefärbte (*Pfeilköpfe*) Zellen sind erkennbar. Die angefärbten Zellen besitzen einen Zelldurchmesser von ungefähr 7  $\mu\text{m}$  (Kalibrationsmarke: 50  $\mu\text{m}$ ). **C.** Doppelmarkierung mit Schwermetallionen. Der olfaktorische Nerv (ON) wurde mit Chobaltchlorid, die freipräparierten Trakte (OT) mit Nickelchlorid angefärbt. Dithiooxamidentwicklung. Morphologische Strukturen können nicht aufgelöst werden, da die Ionen nicht selektiv von den Fasern aufgenommen wurden. **D.** Rekonstruktion einer Mitralzelle aus dem Versuch in B (kollabiertes Mittelwertbild unterschiedlicher Fokusebenen). Deutlich ist der Dendritenbaum einer Mitralzelle erkennbar. Das Soma der Zelle (*Pfeilkopf*) erscheint durch die Rekonstruktion unterschiedlicher optischer Schnittebenen weniger stark angefärbt. Am dem Dendritenbaum sind mehrere büschelartige Verzweigungen (*Pfeile*) erkennbar, die in unterschiedliche Glomeruli hineinragen könnten (Maßstab wie in B.).

Durch die Verwendung DiI-beschichteter Glasnadeln, die in einen der olfaktorischen Trakte des Zebrafärbchens inseriert wurden, konnten gelegentlich Zellen dargestellt werden, die bulbofugal projizieren (**Abb. 20A**). In der Mehrzahl der Fälle war jedoch der Fluoreszenzhintergrund zu hoch, um morphologische Details der gefärbten Neurone erkennen zu können. Eine Markierung der Projektionsneurone durch Anfärben der olfaktorischen Trakte mit Biotin oder Schwermetallionen war für den Zebrafärbchling trotz intensiver Bemühungen nicht erfolgreich. Nach der Entwicklung der Präparate waren lediglich die Ansätze der, in die Mikrokapillaren aufgenommenen Fasertrakte bräunlich angefärbt. Somata konnten auch in aufgeschnittenen Bulbi nicht erkannt werden. In einer reduzierten Präparation des Goldfisches konnte durch retrograde Markierung der olfaktorischen Trakte mit Biotin eine umfangreiche Zellpopulation nach intensiver Signalverstärkung dargestellt werden. Die Somata dieser Zellen besaßen einen Durchmesser von ungefähr 7  $\mu\text{m}$  und einen reich verzweigten Dendritenbaum (**Abb. 20B, D**). Durch Doppelfärbungsexperimente mit Schwermetallionen, die über den olfaktorischen Nerven und den olfaktorischen Trakt simultan appliziert wurden, konnten weder das glomeruläre Muster noch Zellkörper gefärbter Projektionsneurone erkannt werden (**Abb. 20C**), da die Schwermetallionen nicht selektiv über

die Fasern aufgenommen wurden. Eine Isolierung der freipräparierten Trakte in einem durch Vaseline abgedichteten Kompartiment und Applikation von Lucifer Yellow oder Carboxyfluoreszein führte ebenfalls nicht zu brauchbaren Ergebnissen.

Diese Vorversuche dienten der initialen Darstellung der Mitralzellen. Letztendlich sollte jedoch eine Färbemethode entwickelt werden, die auch für physiologische Experimente geeignet ist. Nach der über Nacht Ausbreitung der *Tracer* waren die Präparate auch bei 4°C Kühlung am nächsten Tag nicht gut erhalten und das Nervengewebe disintegrierte leicht.



**Abb. 21 – Versuch einer Messung der Mitralzellaktivität am Bulbus des Goldfisches.**

**A.** Präparation des olfaktorischen Systems des Goldfisches (Ansicht von ventral). Der Bulbus (*Pfeilkopf*) ist zwischen den Riechepithelien (links) und dem Telencephalon (*Sternchen*) aufgehängt. Die olfaktorischen Trakte (*Pfeil*) erscheinen als verbindendes Band zwischen Bulbus und Vorderhirn. **B.** Die Trakte (*Pfeil*) sind durch ein Fenster im Cranium (*gestrichelte Linie*) auch von der Dorsalseite zugänglich und können mit Farbstoffen angefärbt werden (anterior: links, *Sternchen*: Telencephalon). **C.** Retrograde Färbung des Bulbus mit di-8-ANEPPQ. Die Farbstoffaufnahme ist auf die Einstichstelle und den Trakt (*Pfeil*) beschränkt (*gestrichelte Linie*: Lage des Bulbus). **D.** Retrograde Färbung des Bulbus (*gestrichelte Linie*) mit Calcium Green™-1 dextran. Die Farbstoffaufnahme ist unspezifisch und nicht auf die Trakte (*Pfeil*) beschränkt, sondern kann auch im angrenzenden Telencephalon (*Sternchen*) erkannt werden. **E.** Elektrische Stimulation des olfaktorischen Nerven eines di-8-ANEPPQ-gefärbten Präparates (anterior: links, lateral: unten; 450 nm Anregungswellenlänge;  $\Delta F/F$ : 0.5 (blau) bis -2.0% (rot)). Das elektrisch stimulierte Muster erscheint strukturlos, Glomeruli können nicht erkannt werden (*Sternchen*: überblendeter Bereich = Eintritt des stark fluoreszierenden Traktes in den posterioren Bulbus; *gestrichelte Linie*: Konturlinie des Bulbus). **F.** Elektrische Stimulation des olfaktorischen Nerven eines Calcium Green™-1 gefärbten Präparates (470 nm Anregungswellenlänge, Orientierung wie in E.,  $\Delta F/F$ : -0.5 bis 2%). Auch in diesem Präparat kann in dem elektrisch stimulierten Antwortmuster keine glomeruläre Struktur erkannt werden. Die äußere olfaktorische Nervenschicht (*Pfeile*)

ist frei von Fluoreszenzsignalen (*gestrichelte Linie*: Konturlinie des Bulbus). **G.** Kinetik der Fluoreszenzänderung des di-8 ANEPPQ gefärbten Präparates in E. Bei 450 nm Anregung können in den gefärbten Bulbi wiederholt transiente Fluoreszenzänderungen durch kurze Stimuluspulse (*Pfeile*) erhalten werden. **H.** Kinetik der Fluoreszenzänderung des Calcium Green™-1 gefärbten Präparates in F (*Pfeile*: Stimuluspulse).

Daher wurde versucht die Mitralzellen über die olfaktorischen Trakte *in vivo* anzufärben. Goldfische besitzen im Vergleich zum Zebraquarienfisch wesentlich längere olfaktorische Trakte, welche die pedunkulierten *Bulbi olfactorii* mit dem Telencephalon verbinden (**Abb. 21A**). Daher können sie beim Goldfisch, im Gegensatz zum Zebraquarienfisch,

durch eine dorsale Präparation als verbindendes Band zwischen Bulbus und Telencephalon dargestellt werden (**Abb. 21B**). Es wurde versucht Aktivitätsfarbstoffe in die Trakte einzubringen. Da nicht unbedingt erwartet werden konnte, dass Calcium Green<sup>TM</sup>-1 dextran durch die myelinisierten Fasern aufgenommen wird, wurde auch der spannungsabhängige Membranfarbstoff di-8-ANEPPQ verwendet. Die Tiere überlebten den Eingriff gut und wurden nach einer Färbedauer von ca. 3 Tagen präpariert. Die Aufnahme von di-8-ANEPPQ war auf die Trakte und das angrenzende Bulbusgewebe beschränkt (**Abb. 21C**), wohingegen die Calcium Green<sup>TM</sup>-1 Fluoreszenz im gesamten Bulbus und weiten Teilen des angrenzenden Telencephalons erkennbar war (**Abb. 21D**). Eine morphologische Strukturierung des Bulbus konnte in beiden Fällen nicht erkannt werden. Durch elektrische Stimulation des olfaktorischen Nerven über dicht sitzende Polyethylensaugel Elektroden konnten Fluoreszenzsignale im Bulbus in beiden Präparationsarten stimuliert werden. Unter beiden Bedingungen breiteten sich Signale entlang der antero-posterioren Achse des Bulbus aus. Im Falle von di-8-ANEPPQ erstreckte sich das Signal auf die gesamte Fläche der anterioren 2/3 des olfaktorischen Bulbus (n = 3, **Abb. 21D**). Das Fluoreszenzsignal in Calcium Green<sup>TM</sup>-1 gefärbten Bulbi war auf die inneren Bulbuschichten beschränkt (n = 3, **Abb. 21E**). Die äussere olfaktorische Nervenschicht zeigte keine Fluoreszenzänderungen. In beiden Fällen konnte keine weitere Strukturierung der Fluoreszenzsignale beobachtet werden. Glomeruläre Gruppen oder Einzelfoki waren nicht erkennbar. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Farbstoffe jeweils durch das gesamte Gewebe und nicht selektiv durch bulbofugal projizierende Zellpopulationen aufgenommen wurde. Da jedoch in den Calcium Green<sup>TM</sup>-1 gefärbten Präparaten keine Signale in der olfaktorischen Nervenschicht auftraten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um authentische Calciumsignale und nicht um Artefakte handelte. Durch Austausch der Badlösung gegen calciumfreie ACSF konnten die Calciumsignale unterdrückt, jedoch nicht durch erneuten Austausch gegen calciumhaltige Saline reetabliert werden (nicht gezeigt). Mit keiner Färbemethode konnten Geruchsantworten durch Stimulation des Riechepithelien mit Aminosäuren oder depolarisierenden Kaliumpulsen (100 mM) beobachtet werden (n = 3, jeweils).

Keiner der hier beschriebenen Färbeversuche führte zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Eine selektive Färbung der Mitralzellpopulation durch Aktivitätsfarbstoffe erwies sich vor allem *in vivo* als schwierig und konnte nicht erreicht werden. Im Verlaufe dieser Dissertation wurden neuartige, genetisch kodierte Calciumindikatoren berichtet (Miyawaki et al., 1997, 1999; Nagai et al., 2001), die eine Variation des *green fluorescent protein* (GFP) darstellen und in Kulturzellen erfolgreich angewendet wurden. Diese Calciumindikatoren sind Proteine, die in lebenden Zellen exprimiert werden können. Bezogen auf das geschilderte Problem wären diese Indikatoren ideal, sofern geeignete regulatorische Elemente zur Hand wären, die eine selektive Expression dieser Proteine in den gewünschten Zellpopulationen steuern. Der Zebrafisch hat sich in den letzten Jahren zu einem entwicklungsbiologischen Modellsystem entwickelt, das auch molekulargenetisch manipulierbar ist. Leider ist die Zahl der bekannten endogenen Promotoren des Zebrafisches noch gering und viele der bisher berichteten Untersuchungen verwendeten allgemeine oder heterologe Promotoren. Spezifische Promotoren für Zelltypen des

olfaktorischen Systems waren zu dem Zeitpunkt als die im folgenden dargestellten Untersuchungen begannen, nicht bekannt. Mittlerweile wurde die gezielte Expression von Reportergenen in der Gesamtpopulation der olfaktorischen Rezeptorzellen durch die Promotoren der Gene *rag1* und *rag2* (Jessen et al., 1999, 2001), sowie die selektive Markierung individueller Riechsinneszellen durch Geruchsrezeptor-genpromotoren (Mori et al, 2000) berichtet. Im folgenden wurde ein Versuch unternommen, endogene und spezifische Promotoren für die drei Hauptverarbeitungsebenen des olfaktorischen Systems des Zebrafisches zu identifizieren und in Verbindung mit den erwähnten Calciumindikatoren als physiologisches Messsystem zu etablieren. Der Vorteil eines solchen Expressionssystems wäre die homogene Markierung jeweils einer gesamten Zellpopulation. Schwierigkeiten, die sich durch konventionelle Färbemethoden ergeben (Inhomogenität der Farbstoffaufnahme, schlechte Reproduzierbarkeit, schwierige Präparation) könnten überwunden werden. Die Initiierung eines solchen Vorhabens erschien, wenn auch schwierig und langwierig, verheißungsvoll. In Analogie zum Mausmodell wurden aus einer Vielzahl möglicher Kandidaten drei Gene ausgewählt, deren Expression jeweils für die Mitralzellen, die Körnerzellen oder die Riechsinneszellen spezifisch ist. Es wurde versucht, für jedes dieser Gene ein spezifisches regulatorisches Element zu identifizieren, das die endogene Expression dieser Gene nachahmt und die gezielte Expression eines Reportergens in einem der drei Zelltypen ermöglicht.

Für die Mitralzellen wurde das *tbr1* Gen, für die Körnerzellen das *dlx2* Gen und das *OMP* Gen für die sensorischen Neurone ausgewählt. Das *dlx2* Gen war für den Zebrafisch bereits kloniert und ein entsprechender cDNA-Klon wurde durch M. Westerfield (University of Oregon, Eugene, OR, USA) zur Verfügung gestellt. Die beiden anderen Kandidaten mussten zuvor für den Zebrafisch homologiekloniert werden. Anschließend sollten calciumsensitive GFP Varianten, die durch R. Tsien (UCSD, La Jolla, CA, USA) und A. Miyawaki (RIKEN Brain Science Institute, Sakano, Japan) bereitgestellt wurden, zelltypspezifisch exprimiert und als Messproben im Geruchssystem des Zebrafisches etabliert werden.

## 2 IDENTIFIZIERUNG MOLEKULARGENETISCHER MARKER DER UNTERSCHIEDLICHEN VERARBEITUNGSEBENEN

Das Geruchssystem des Zebrafischs kann als modellhaft für das der Vertebraten angesehen werden (Korsching et al., 1997), jedoch fehlt in diesem Modell bisher der tiefere Einblick in die Gliederung und Funktion des olfaktorischen Verarbeitungsschaltkreises. Eine gegenüber höheren Vertebraten deutliche Reduktion des Geruchsrezeptorgenrepertoires ist die Grundlage für ein übersichtlich strukturiertes glomeruläres Muster auf der Eingangsseite des olfaktorischen Bulbus (**Abb.2**). Die erkannte Stereotypie dieses Musters (Baier und Korsching, 1994) besitzt klare Vorteile für anatomische, physiologische und entwicklungsbiologische Untersuchungen dieses Verarbeitungsniveaus (von Campenhausen, 1994; Friedrich und Korsching 1997, 1998; Dynes und Ngai, 1998; Lieberoth, 1999). Der weitere strukturelle Aufbau des *Bulbus olfactorius* ist jedoch weniger klar gegliedert als bei den Säugetieren. Eine Abgrenzung individueller Glomeruli durch Periglomeruläre Zellen oder Glia fehlt. Über die olfaktorische Nervenschicht und die glomeruläre Schicht hinaus ist morphologisch oder histochemisch keine eindeutige Gliederung tieferer Bulbuschichten zu erkennen. Die Mitralzellschicht und eine externe plexiforme Schicht sind nicht prominent. Eine anatomisch homogen erscheinende Zellpopulation füllt die innere Zellmasse des Bulbus aus. Der funktionellen Untersuchung nachgeschalteter olfaktorischer Verarbeitungsniveaus muss daher zunächst die eindeutige Identifizierung dieser Ebenen vorangehen. Von entscheidendem Vorteil wäre ein System, welches die Gesamtheit einheitlicher Zellpopulationen – der Riechsinnes-, Mitral- oder Körnerzellen – markiert und ansprechbar macht. Eine selektive Markierung der Mitralzellpopulation durch neuroanatomische Verfahren hat sich vor allem *in vivo* als schwierig und unzureichend herausgestellt. Eine Adressierung der Körnerzellen erscheint aufgrund ihrer lokalen, intrabulbären Verschaltungen noch schwieriger durchführbar.

Ein Ausweg wurde in einem molekulargenetischen Ansatz gesucht, der die zelltypspezifische Expression von Reportergenen, speziell von genetisch kodierten Messproben, ermöglicht. Eine selektive Markierung der unterschiedlichen Verarbeitungsniveaus wäre unter der Voraussetzung möglich, dass regulatorische, genetische Elemente gefunden werden, die spezifisch für eine bestimmte Zellpopulation sind. Ein solches System besäße den Vorteil, dass Reportergene in lebenden Tieren exprimiert werden könnten, wodurch sich schwierige *in vivo* Präparationen oder lange Tracingzeiten erübrigen würden. Das Problem inhomogener oder unvollständiger Färbungen wäre ebenfalls überwunden. Darüber hinaus würde es ein solches System erlauben, dynamische Prozesse des Wachstums und der Verschaltungsbildung im olfaktorischen System in Echtzeit zu beobachten.

Im Folgenden sollte versucht werden, solche regulatorischen Elemente für die drei Hauptverarbeitungsebenen des olfaktorischen Systems zu identifizieren und anzuwenden. Zunächst mussten für die Riechsinneszellen, die Mitral- und die Körnerzellen des Zebrafischs genetische Marker identifiziert werden, die jeweils für eine dieser Zellpopulationen spezifisch sind, anschließend wurde versucht, aus den stromaufwärts gelegenen genomischen DNA Sequenzen Promotoren zu isolieren, welche einen regulatorischen Einfluss auf die Expression dieser Gene ausüben.

## **2.1 Riechsinneszellen: das olfaktorische Marker Protein (OMP).**

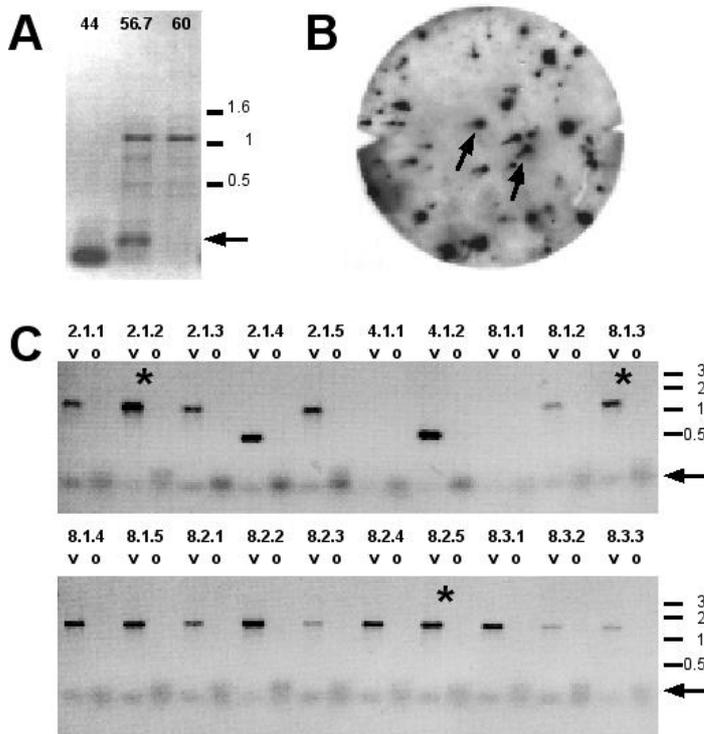
Das olfaktorische Marker Protein (OMP) ist ein etablierter Marker reifer olfaktorischer Rezeptorneurone (Margolis, 1980). Das Protein kommt sowohl in ciliierten als auch in mikrovillären Riechsinneszellen vor, besitzt ein Molekulargewicht von 19 kDa, eine cytosolische Lokalisation und ist eines der abundantesten Proteine dieser Zellen. Das *OMP* Gen besitzt keine Introns und ist phylogenetisch stark konserviert. Homologe des Gens konnten in so diversen Spezies, wie Maus, Mensch, Frosch und Fisch gefunden werden (Danciger et al., 1989; Buiakova et al., 1994; Rössler et al., 1998, Yasuoka et al., 1999). Für eine Fischart, den Medaka (*Oryzias latipes*), liegen bisher nur zwei partielle Sequenzen vor (Yasuoka et al., 1999). Funktionell konnte für das OMP eine Beteiligung an der Geruchserkennung demonstriert werden (Buiakova et al., 1996; Youngentob und Magolis, 1999; Ivic et al., 2000; Youngentob et al., 2001). Die Struktur des Promotors ist für Maus und Mensch gut bekannt (Buiakova et al., 1994). Regulatorische Motive sind in den ersten 500 Basen stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes präsent und treiben die gezielte Expression von Reporter genen in den Riechsinneszellen. Das *OMP* Gen und eine entsprechende regulatorische Sequenz sollten für den Zebraärbliug homologiekloniert werden.

### **2.1.1 Klonierung des Gens für das olfaktorische Marker Protein (zOMP).**

Mit degenerierten Oligonukleotiden (OMP1, OMP2), die flankierend zu einer hochkonservierten Region der bekannten *OMP* Gensequenzen binden (**Abb. 23**), wurden Sequenzabschnitte aus cDNA des olfaktorischen Epithels und des olfaktorischen Bulbus durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. In der Reaktion mit epithelialer cDNA als Vorlage konnten unter allen Schmelztemperaturbedingungen, 44°C, 56.7°C und 60°C, nach 30 Reaktionszyklen (**Abb. 22A**) und in dem Ansatz mit Bulbus cDNA bei 60°C nach 40 Zyklen Bandenmuster erzeugt werden. Aus Gehirn cDNA konnten mit den verwendeten Primern keine Amplifikationsprodukte gewonnen werden. Die Produkte dieser Reaktionen wurden unmittelbar im Anschluss an die PCR in den Vektor pGEM-T einkloniert, in Bakterien transformiert und jeweils 12 bis 17 individuelle Bakterienkolonien in 96-Lochplatten aufgezogen. Zur Identifizierung der klonierten Fragmentgrößen wurde eine PCR aus Bakteriensuspension mit vektorspezifischen Primern durchgeführt. Insgesamt wurden 12 individuelle Bakterienklone mit Insertgrößen zwischen 300 und 1500 bp (inkl. der flankierenden Primerbindestellen) sequenziert. Zwei dieser Klone (E56-B4 und E56-E3, amplifiziert aus epithelialer cDNA bei 56.7°C T<sub>m</sub>) zeigten in Datenbanksuchen (NCBI Blast, [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) Homologie zu *OMP*. Die Klone E56-B4 und E56-E3 waren voneinander ununterscheidbar und besaßen die erwartete, von dem Primerpaar flankierte Fragmentgröße von 170 bp.

Mit einer [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP-markierten Sonde dieses 170 bp Fragmentes wurden insgesamt 4 Filtersätze der ausplattierten cDNA-Bibliothek des Riechepithels nach vollständigen *zOMP*-cDNA-Klonen durchsucht [radioaktive Hybridisierung durch A. Çelik (Çelik, 2001)]. Die

Hybridisierung ergab eine Häufigkeit von 0.07% positiver Klone, die gut mit der Erwartung für eine abundante mRNA in diesem Gewebe übereinstimmt (**Abb. 22B**). Die 5 Kolonien mit den stärksten Hybridisierungssignalen wurden von den Dauerfiltern ausgeschnitten und ausplattiert. Filterabzüge der Bakterienkulturen wurden erneut hybridisiert. Aus diesem *rescreen* wurden 18 Kandidaten isoliert, durch analytische PCR mit Vektorprimern und OMP-Primern vorselektiert (**Abb. 22C**) und insgesamt wurden 6 Klone von 5 unterschiedlichen Filterabschnitten sequenziert. Vier dieser Klone zeigten Homologie zu *OMP* (Klone: 2.1.2, 8.1.3, 8.2.5 und 8.3.5).



**Abb. 22 – *zOMP* Homologieklonierung.**

**A.** Polymerase Kettenreaktion mit OMP1 und OMP2 Primern und cDNA des Riechepithels als Matritze. Unter allen Schmelztemperaturbedingungen (44, 56.7 und 60°C) wurden Amplifikationsprodukte erhalten. Bei 44 und 56.7°C ist eine 170 bp Bande sichtbar, die der erwarteten *OMP* Fragmentgröße entspricht. **B.** Hybridisierung der ausplattierten cDNA-Bibliothek des olfaktorischen Epithels mit einer [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP-markierten Sonde des 170 bp Fragmentes aus A (Filter 6.1). Mehrere hybridisierende Bakterienkolonien (*Pfeile*) können erkannt werden. Die kometschweifartigen Fortsätze der hybridisierenden Kolonien stammen aus dem Transfer auf die Replikatfilter. **C.** Kolonie-PCR aus Bakteriensuspension. *Rescreen* der positiven Bakterienkolonien aus B (v: PCR mit Vektorprimern, o: PCR mit OMP1 und OMP2 Primern). Die Bande in v entspricht der Insertgröße des cDNA-Klons. Aus einigen Klone kann ein 170 bp Fragment mit den OMP Primern amplifiziert werden. Einige Klone zeigen diese Bande nicht (siehe z.B. 4.1.2). Die Klone 2.1.2, 8.1.3 und 8.2.5 (*Sternchen*) konnten durch Sequenzierung bestätigt werden. Der Klon 8.3.5 ist nicht gezeigt.

Mit neugestalteten Oligonukleotiden, die in  $\approx 300$  bp Abständen an die *zOMP*-cDNA binden, wurden jeweils beide DNA-Stränge durchsequenziert (**Abb. 23**). Im Vergleich untereinander waren die Sequenzen der vier cDNA-Klone identisch, wiesen jedoch unterschiedliche Längen der polyA-Sequenzen auf. Das weist darauf hin, dass die Klone von unterschiedlichen mRNA Molekülen abstammen. Die 5'-Enden der Klone waren hingegen identisch, was wiederum darauf hinweist, dass die 5'-untranslatierten Sequenzen (*untranslated region*, UTR) in diesen cDNA-Klonen vollständig erhalten sind. Während der cDNA-Synthese wird die mRNA in 3' -> 5' Richtung von der reversen Transkriptase abgelesen. Ein vorzeitiger Abbruch der reversen Transkription sollte zufällig erfolgen und hätte bei unabhängigen cDNA-Klonen unterschiedliche Längen der 5'-Enden ergeben müssen. Da zwischen den identifizierten Klone keine Unterschiede bestanden, wurde im Folgenden überwiegend mit dem Klon 2.1.2 weitergearbeitet.

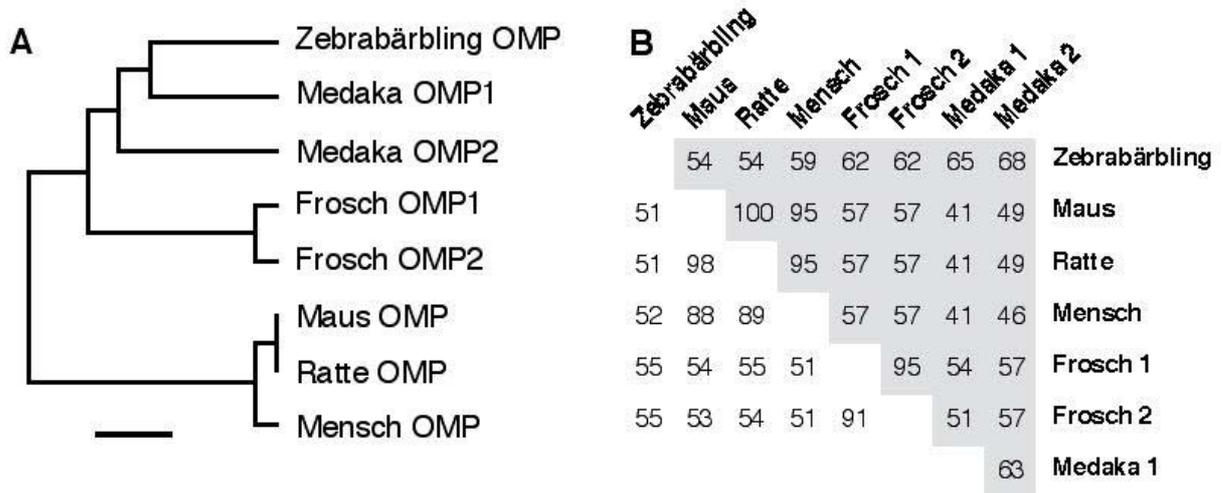
gaattcctataactaacatgcaaaagatatagccctttttacagtaatttgttgttttat	-1260
gctaatttgattaacttcacaataaaaattctgaatgaaagtgataagaatgtaatttact	-1200
gtgaaaaaattaaggtaacatgttgtgaaaatcagatTTTTTTgtgtatgtgtgtgtg	-1140
tattcctcccaagtcgttgaactttgaatttatttgttgtagttagtttaccagaaaa	-1080
caaaaacaatcatcagaaaataataacctggctggtagattttatttctctctttaac	-1020
ttgatataataataataataaaaattattattaataatattaataataataataata	-960
caataacaacaacaacaacaacaacaacaatttattttattcaataaactttaaaat	-900
atttaactaaatattttaattaaatttaattgataacaaacattttaaagatgttgttgatt	-840
acctttaaactttaataatttagttattttattaaaatattatattttaataaagtcagc	-780
tattctcaccctgcaatatttagcttaaggatctgaggatgaattttttcataaatac	-720
atttcagtttctatgctgaagacaattcagaaaatgttgagatggccaaatgtaatgagc	-660
cagtatagcatggaattgggtgatagtagaaaactcagaagcttctgtaccttttatgt	-600
catcaggaagacctgccccattttacagcaaaaacgaaataagtcagatttttgatttaag	-540
attactaccacaaaactgtttctttcagcggatttaacttgcacaagatttaattgtcca	-480
cttttaagactaccaatacatgctggaaaataaacacagtaaatTTTgatttcacatgga	-420
ctttaaaagcatcattttccagaatgttaaagacctctgtgggtgtaggacaccgggggt	-360
gattttggaagctgtaaaactgcagaactacatctctttcattcagtcgggtcctctggg	-300
acacaacagagattagatttcaagtacacctctgcggtgatgttcaaagtagtgcaggt	-240
ccattatctgagctcaggtacatgctgagacactgactgcaggtcagacctcaattcag	-180
ttcacctccgagcaaccctatcgttagttaaacgtgaacaaacacacatgtagcaaac	-120
ccagaagtctcaaattcccccttgcaagtgcagcaggagcaacaaatatctaaacaaaaaac	-60
ccctctgtgaataagtgtctttcagagcacaaggctcattgcagctgcagaaaaacC	1
AAGGACACACAGTAGACGCAAGAAGAAGAAAAAACAAACAAAAAACGGTAAGTTAAAAA	61
M S L E L T F N P D V Q L T E M M	
ACAACAAC <b>ATGT</b> CTCTGGAGTTGACGTTCAATCCTGATGTCCAGCTGACGGAGATGATG	121
R L R V Q S L Q Q R G Q K R Q D G E R L	
CGTCTGCGCTTCAGTCTCTACAACAACGAGGACAGAAACGTC AAGACGGAGAGCGTCTC	181
L K S N E H V Y S L D F S E Q A L H F T	
CTCAAGTCCAACGAGCACGCTCTACAGTCTGGACTTCTCCGAACAGGCCTTGCATTTACC	241
R W N I R I S S P G R L N I I A T S Q L	
CGCTGGAACATTCGCATTTCCAGCCC GGGACGCCTAACATCATCGCCACTTCCAGCTC	301
W T P D L T H L M T R Q L L E P T G L F	
<u>TGGACGCCGACCTCACACACCTGATGACCCGGCAGCTCCTGGAACCCACCGGACTCTTC</u>	361
W R S A D D E N I Q C Y E A D A Q E F G	
<u>TGGAGGAGCGCAGACGACGAGAACATCCAGTGTATGAGGCCGACGCACAGGAGTTTGGT</u>	421
E R I A E L A K V R K V M Y F L F A F E	
<u>GAAAGGATAGCAGAGCTGGCCAAAGTGC GAAAGTGTATGATTTTCTGTTGCGCCTTTGAA</u>	481
D G L S P E S V E C S I E F Q T S K *	
GACGGCTTGAGTCCGGAGAGCGTGAATGCTCCATTTGAATTCAGACCTCCAAGTGAGAG	541
AAAATGAAGGTTACAACGGCTCTCTTTCTGGTCAGTCTGTTCCAGCTTAATGTAGTTGAAT	601
ATTTTAGAAAATTATTGCAAAATTGGTCAAATTATGACCAAGTTGTCTAAGTAAGCTGA	661
ATTTGATTTGATTGTTTCAAATCATACTAATAAATATAAAATACCAAGCTAATAATAC	721
ACGAATTAATTAATAATGGGTTCTTAAAGACTTATGAAATTAGATATAATGAGGTCTTTA	781
AAGTTGCATTTCTTAAAGTTTGACCAGATTATTTATTTGATTTTCAAATTTGGCTGC	841
TTTCTGAATTTGACGAGACTTTAAGGGAGTTATAACGCAATTTAAATTAACTAATAAC	901
TCAGGAATAAATTGAAATGTGTTTGTAAATACTTATATAAACAGAATTGGTAATGTTAAG	961
ATGGTCTTGGGCGTTTTTAGCTTTTTAGCTGCTTTTGTGACTTTGTGATGAACATAACC	1021
TACTGTAAATGCAGTTAAAGTTAAATGTGTTCTAATATGTATAAAATTAATTTAAG	1081
TTATAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1141

Abb. 23 – Genomische, cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz des zOMP Gens des Zebrabärblings.

Die Ziffern am rechten Rand bezeichnen die Nummerierung der Nukleotidsequenz, die Nukleotidposition 1 entspricht dem putativen Transkriptionsstartpunkt der mRNA. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist im Einbuchstabencode angegeben. Das Startkodon der Translation ist in Fettdruck, das Stopkodon durch ein Sternchen markiert. Die Nukleotidsequenz der cDNA ist in Großbuchstaben, genomische Sequenzen sind in Minuskeln dargestellt. Grau unterlegte Sequenzmotive repräsentieren relevante Restriktionsschnittstellen. Die gepunktete Linie korrespondiert mit einem hochkonservierten Sequenzmotiv der bekannten OMP Gene und wird von den Bindungsstellen der Oligonukleotide OMP1 und OMP2 flankiert (*unterstrichen*). Die doppelt unterstrichene Linie verweist auf das putative Polyadenylierungssignal (ATTAAG). NCBI GenBank #: AF457189 (cDNA) und AF457190 (genomische Sequenz).

2.1.2 Das *OMP* Gen des Zebrabärblings – *zOMP*.

Die cDNA des *OMP* Gens des Zebrabärblings (*zOMP*, **Abb. 23**, veröffentlicht unter NCBI GenBank #: AF457189) umfasst 1088 Basenpaare, enthält einen vollständigen offenen Leserahmen sowie die vollständigen 5'- und 3'- untranslatierten Regionen. Der offene Leserahmen umfasst 465 bp und kodiert für ein abgeleitetes Protein von 155 Aminosäuren (**Abb. 23**) mit einem abgeschätzten Molekulargewicht von 14 kD. Das putative Startkodon für die Translation (ATG) beginnt bei Position 71 der cDNA-Sequenz. Die flankierende Nukleotidsequenz weicht von der Kozak-Konsensussequenz (Kozak, 1999) für die Initiation der Translation an Position +4 ab. Dort findet sich anstelle der Base Guanin ein Thyminrest. Die Position -3 (Adenin) stimmt überein. Das putative Stop-Kodon (TGA) beginnt bei der Nukleotidposition 536, an die sich eine 3'-untranslatierte Sequenz von 550 bp anschließt. Das erste Adenin der polyA-Sequenz wird bei Position 1088 gefunden. Das kanonische Polyadenylierungssignal (AATAAA) konnte lediglich in ungewöhnlichen Positionen, 120 und 3 Nukleotide vor der Schnittstelle der polyA-Sequenz, gefunden werden. Der erwartete Abstand zum Beginn der polyA-Sequenz liegt in einem Bereich von 10 bis 30 Nukleotiden (Zhao et al., 1999). Innerhalb dieser Distanz konnte das vergleichbar aktive Motiv ATTAAA (**Abb. 23**) gefunden werden. In Datenbanksuchen des Zebrafish-Genom-Projektes konnte eine genomische Sequenz identifiziert werden, die ab Nukleotidposition 610 vollständig mit der Sequenz der *zOMP*-cDNA übereinstimmt ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/trace.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/trace.cgi), Sequenz: ti 15656855, oder <http://trace.ensembl.org>, Sequenz: zfishG-a1690c10.p1c). Die Schnittstelle für den Beginn der Polyadenylierung konnte so auf das erste Adenin der polyA-Sequenz an Position 1089 festgelegt werden.



**Abb. 24 – Strukturvergleich des Zebrabärbling OMP (*zOMP*) mit den bekannten OMP Genen.**

**A.** Phylogenetischer Stammbaum. Der Sequenzvergleich (Kimura Protein Distance, UPGMA Algorithmus) der abgeleiteten Aminosäuresequenz basiert auf dem Fragment aus 37 Aminosäuren (gepunktete Linie in **Abb. 23**) der OMP Sequenzen von Medaka, Frosch, Maus, Ratte und Mensch. Das Zebrabärbling OMP ist näher mit dem OMP des Medakas und des Krallenfrosches als mit dem der Säuger verwandt. Die Kalibrationsmarke entspricht einer evolutiven Distanz von 10% Aminosäureaustausch. **B.** Direkter Vergleich der Aminosäuresequenzübereinstimmung der vollständigen Proteinsequenz (weißes Dreieck) und des 37 Aminosäurenfragmentes (graues Dreieck) mit dem Programm ClustalW (Blosom distance matrix). Die Einträge entsprechen einer Sequenzübereinstimmung in %. Die Proteinsequenz des *zOMP* liegt zwischen den Sequenzen für Medaka OMP1 und OMP2. Je nach dem verwendeten Algorithmus wird eine stärkere Ähnlichkeit des *zOMP* zu Medaka OMP1 (in A) oder OMP2 (in B) erhalten.

Ein Sequenzvergleich der vollständigen abgeleiteten Aminosäuresequenz der kodierenden Region des *zOMP* Gens mit den bekannten *OMP* Genen reicht von 55% bis 51% für den Vergleich mit Frosch, Mensch, Ratte und Maus (**Abb. 24 B**). Gegenwärtig sind lediglich für eine weitere Fischart, den Medaka, zwei unvollständige Sequenzen bekannt. Innerhalb dieses 37 Aminosäuren umfassenden Fragmentes weist ein Sequenzvergleich auf eine stärkere Homologie des *zOMP* zu Medaka (68%, 65%) als zu Frosch (62%), Mensch (59%) und Nagetieren (54%) hin.

Eine Vorhersage struktureller Aminosäuresequenzmotive zeigt keine stark ausgeprägten hydrophoben Bereiche auf (Kyte Doolittle-Hydrophobizitätstest, DNASIS v2.0, nicht gezeigt), in guter Übereinstimmung mit einer cytosolischen und nicht-membranständigen Lokalisation des *OMP* bei anderen Arten. Nach dem Chou, Fasman und Rose Modell weist die Sekundärstruktur des Proteins überwiegend helikale und zahlreiche Kurvenabschnitte auf, während Faltblattstrukturen selten sind.

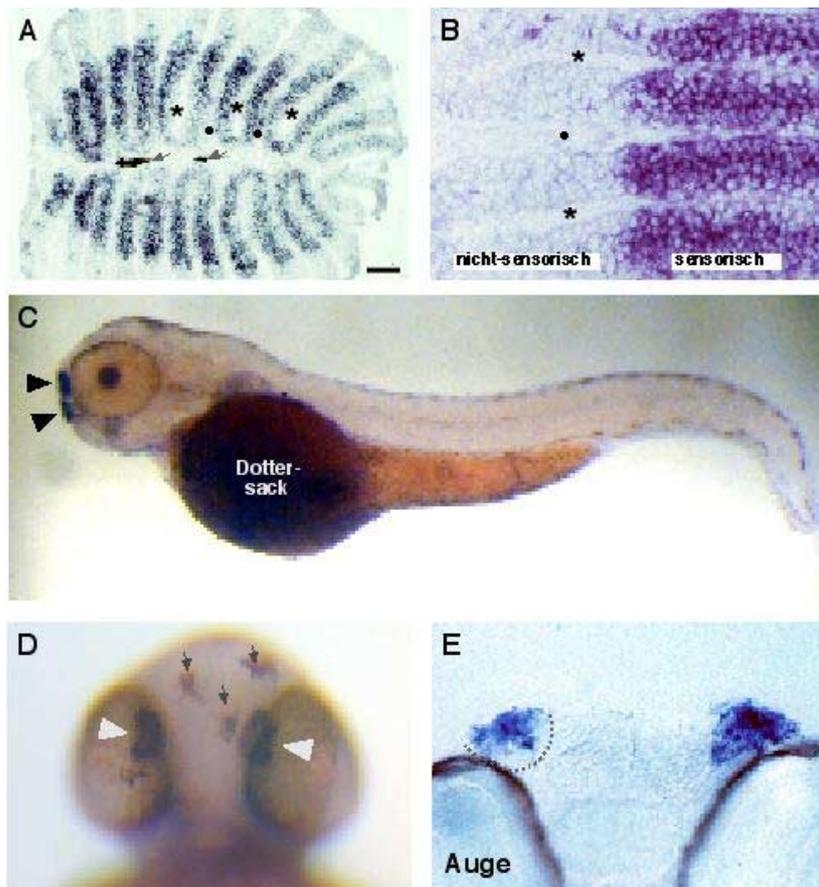
### 2.1.3 Die Expression des *zOMP* Gens im Zebraärbling.

Das *OMP* Gen wurde wegen seiner exklusiven Expression in reifen Riechsinneszellen als Marker für diesen Zelltyp ausgewählt. Die Spezifität der *zOMP* Expression im Zebraärbling wurde durch *In situ*-Hybridisierung mit DIG-UTP-markierten *antisense* RNA-Sonden an embryonalen Totalpräparaten und Gefrierschnitten durch adulte Riechepithelien überprüft.

In Embryonen des Zebraärblings sind *zOMP* positive Zellen nur innerhalb einer deutlich gefärbten, paarigen Ringstruktur im Bereich der olfaktorischen Plakoden erkennbar (**Abb. 25C, D**). Darüber hinaus sind in den Totalpräparaten der Embryonen, mit Ausnahme einer unspezifischen Färbung des Dottersacks, keine weiteren Hybridisierungssignale detektierbar. Eine Färbung des Dottersacks konnte auch mit *sense* Sonden der *zOMP*-cDNA beobachtet werden und tritt häufig bei *In situ*-Hybridisierungen an Totalpräparaten von Zebraärblingembryonen auf (A. Çelik, persönliche Mitteilung). Demnach wird auch das *zOMP* des Zebraärblings, wie die homologen *OMP* Gene anderer Vertebraten, selektiv in den Riechepithelien exprimiert. An horizontalen Längsschnitten durch den Embryo können in beiden olfaktorischen Plakoden deutliche Zellprofile erkannt werden, die überwiegend in den apikalen Zellschichten der embryonalen Riechgewebe lokalisiert sind (**Abb. 25E**). Die basal liegenden Zellen sowie der olfaktorische Nerv und der olfaktorische Bulbus weisen keine Hybridisierungssignale auf.

An Gefrierschnitten durch das adulte Riechepithel kann eine deutliche Zonierung der detektierten *zOMP*-Transkripte erkannt werden (**Abb. 25A**). *zOMP*-positive Zellen treten ausschliesslich in den zentralen Querschnitten der olfaktorischen Rosette auf. Die Ausdehnung *zOMP*-positiver Zellen in radialer Richtung entspricht der Ausdehnung des sensorischen Bereiches, in dem die Riechsinneszellen lokalisiert sind. Der äußere, nicht-sensorische Bereich des Epithels hingegen ist frei von *zOMP*-exprimierenden Zellen (**Abb. 25A, B**). Die beobachtete Lokalisation *zOMP*-exprimierender Zellen ist deckungsgleich mit der Verteilung olfaktorischer Sinneszellen, die durch retrograde Färbestudien (Baier et al.,

1994; Lieberoth, 1999), *In situ*-Hybridisierungen mit Rezeptorgensonden (Barth et al., 1996; Weth et al., 1996) und mit Sonden gegen den ebenfalls rezeptorneuronenspezifischen CNG-Kanal (Berger, 1998) erkannt wurde. Innerhalb der Lamellen sind die *zOMP*-positiven Zellen vor allem in den apikalen, lumennahen Bereichen anzutreffen. Dort dominiert der Anteil an gefärbten Zellen; nicht markierte Zellen können jedoch auch erkannt werden. Von den positiven Zellen erscheinen nur die Somata gefärbt, Dendritenstrukturen und Axone sind nicht erkennbar. Das Signal ist überwiegend cytoplasmatisch und einzelne Zellen sind wegen der hohen Dichte nicht immer gut voneinander abgrenzbar.



**Abb. 25 – Expression des *zOMP* Gens im adulten und embryonalen Zebrafärbling.**

*In situ*-Hybridisierung mit einer DIG-UTP-markierten *antisense* Sonde der *zOMP*-cDNA. **A.** Gefrierschnitt durch das olfaktorische Epithel eines adulten Zebrafärblings. *zOMP*-positive Zellen (blau) sind im Zentrum der olfaktorischen Rosette erkennbar. Der äußere (nicht-sensorische) Bereich ist frei von *zOMP* exprimierenden Zellen (*Sternchen*: Lumen zwischen zwei Lamellen, *Punkte*: Basallamina einer Lamelle, die Mittelraphe verläuft horizontal, *Pfeile*: Melanophoren). **B.** Detailansicht des Gefrierschnittes aus **A** an der Grenze zwischen dem zentralen, sensorischen (rechts) und dem äußeren, nicht-sensorischen (links) Bereich des Riechepithels (Markierung wie in **A**). **C.** *In situ*-Hybridisierung an einem Totalpräparat eines 72 h alten Zebrafärblingembryos. Hybridisierungssignale sind ausschließlich in den olfaktorischen Plakoden (*Pfeilköpfe*) erkennbar. Die Färbung des Dottersacks ist unspezifisch und

kann auch mit *sense* und „nicht-*zOMP*“ *antisense* Sonden beobachtet werden. **D.** Frontalansicht des Embryos aus **C**. Deutlich sind die ringförmigen embryonalen Riechepithelien erkennbar (*Pfeilköpfe*). Die Pfeile verweisen auf Melanophoren der Epidermis. **E.** Horizontaler Gefrierschnitt durch einen 96 h alten Zebrafärblingembryo auf der Höhe der olfaktorischen Plakoden. Nur der anteriore Abschnitt ist gezeigt. *zOMP*-positive Zellen sind in den apikalen Bereichen der embryonalen Riechepithelien (*gepunktete Linie*) sichtbar. Der Längenstandard in **A** entspricht: 100  $\mu\text{m}$  in **C**, 50  $\mu\text{m}$  in **A** und **D**, 25  $\mu\text{m}$  in **B** und **E**.

Deutlich weniger positive Zellen konnten in den basalen Abschnitten der Lamellen gefunden werden, in denen überwiegend Vorläuferzellen und unreife Neurone lokalisiert sind (Sicard et al., 1998). Ein ebenfalls deutlich ausgesparter Abschnitt liegt in den inneren Kurven der Lamellen, nahe der Mittelraphe (**Abb. 25A**). In diesen Bereichen wurde eine hohe Proliferationsaktivität durch BrdU-Markierungen erkannt (Berger, 1998). Die Proliferationsaktivität in den Lamellenkurven wurde als Grundlage einer epithelialen Wachstumszone diskutiert und weist auf einen hohen Anteil unreifer, nicht ausdifferenzierter Zellen hin, die keine *zOMP* Expression zeigen.

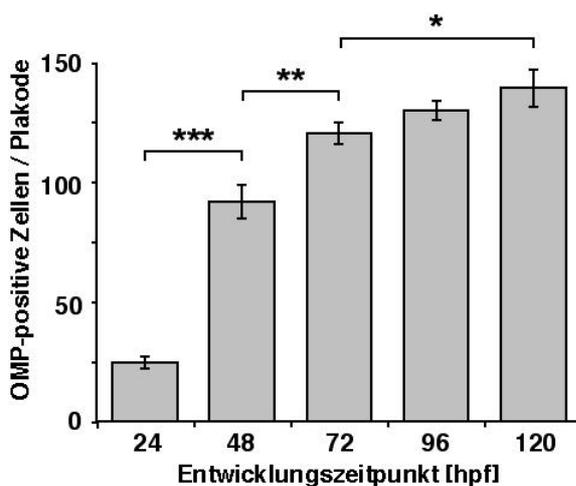
Zusammenfassend weist die Expression des *zOMP* im Zebraärbling eine gute Übereinstimmung mit den Expressionsmustern der bekannten *OMP* Gene in anderen Systemen auf. Die Spezifität der Lokalisation und die Verteilung *zOMP*-positiver Zellen innerhalb des olfaktorischen Epithels macht es sehr wahrscheinlich, dass auch das *zOMP* einen verlässlichen Marker für reife Riechsinneszellen beim Zebraärblings darstellt.

**2.1.4 Dynamik der Entwicklung *zOMP*-positiver Riechsinneszellen während der Embryogenese.**

An vollständigen Serien horizontaler Gefrierschnitte durch den Zebraärblingembryo wurde die Dynamik der Entwicklung reifer Riechsinneszellen während der ersten 5 Tage der Individualentwicklung durch Auszählen *zOMP*-exprimierender Zellen bestimmt. Eine deutliche Abgrenzung positiver Zellen wird mit zunehmendem Alter der Fische und wachsender Zellzahl schwieriger und war nur für die ersten 5 Tage verlässlich durchführbar.

Bereits zum ersten Untersuchungszeitpunkt sind in 24 h alten Embryonen *zOMP*-positive Neuronen erkennbar. Das Auftreten reifer Riechsinneszellen bei 20 hpf wurde auch durch elektronenmikroskopische Studien (Hansen und Zeiske, 1993) und durch *In situ*-Hybridisierungen mit Geruchsrezeptorgensonden (Byrd et al., 1995; Barth et al., 1996) belegt. Im Mittel konnten bei 24 hpf  $25 \pm 2.5$  *zOMP*-exprimierende Zellen gezählt werden (Abb. 26). Während der nächsten 24 Stunden steigt die Anzahl positiver Zellen mit  $92 \pm 7$  Neuronen auf das dreieinhalbfache dieses Wertes an. Im weiteren Verlauf nimmt die Wachstumsrate ab, bleibt aber stetig. Nach 72 hpf konnten  $120 \pm 5$ , im Folgenden  $130 \pm 4$  (bei 96 hpf) und  $140 \pm 8$  Zellen bei 120 hpf erkannt werden.

Insgesamt verläuft der Entwicklungsprozess reifer Riechsinneszellen während der ersten 24 Stunden am dynamischsten, danach ist der Zuwach stetig, jedoch mit einer verlangsamten Wachstumsrate. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für die Expression mancher Geruchsrezeptorgene durch *In situ*-Hybridisierungen mit Geruchsrezeptorgensonden beobachtet (Argo und Korsching, unveröffentlichte Beobachtungen; Whitlock und Westerfield, 1998).



**Abb. 26 – Verlauf der Entwicklung *zOMP*-positiver Zellen während der Embryogenese.**

Bestimmung der Anzahl reifer Riechsinneszellen durch *zOMP* *In situ*-Hybridisierung an Gefrierschnittserien zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24, 48, 72, 96 und 120 hpf) der Embryonalentwicklung. Die Wachstumsrate ist während der ersten 48 Stunden am höchsten. Danach nimmt die Zahl reifer Riechsinneszellen weiter stetig zu. Die dargestellten Zellzahlen repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen (Maximum-, Minimumwerte für 96 hpf) aus 8 (24 hpf), 10 (48 hpf), 6 (72 hpf), 2 (96 hpf) und 10 (120 hpf) Plakoden. Sternchen: Signifikanzniveau (unabhängiger Student's t-Test), \*\*\*:  $p < 0.0001$ , \*\*:  $p < 0.005$ , \*:  $p < 0.03$ .

### 2.1.5 Genomische Organisation des *zOMP* Genlokus – Southern Analyse.

In der genomischen Southern Analyse wurden zwei Fragestellungen gemeinsam untersucht. Zum einen sollte die Größe der *zOMP* Genfamilie bestimmt werden, zum anderen wurde die genomische Organisation des *zOMP* Genlokus durch den Verdau mit Restriktionsendonukleasen im Hinblick auf die spätere Subklonierung eines 5'-flankierenden Fragmentes untersucht.

#### *Größe der zOMP Genfamilie.*

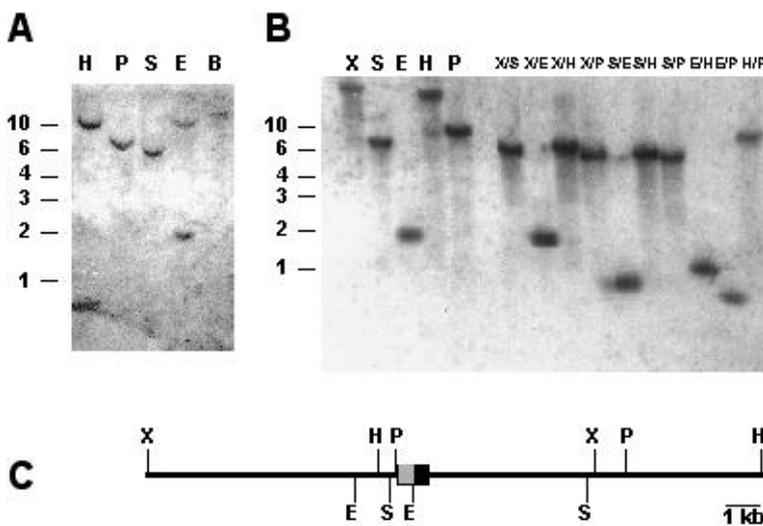
Genomische Southern-Blots wurden mit einer DIG-dUTP markierten DNA-Sonde, die der vollständigen Länge der *zOMP*-cDNA entspricht, unter niedrig- und hochstringenten Temperaturbedingungen hybridisiert. In beiden Fällen konnte keine Kreuzhybridisierung mit zusätzlichen Genen detektiert werden (**Abb. 27A**). In den Laufspuren mit *Hind* III, *Pst* I, *Sac* I und *Bam* HI verdauter DNA konnte jeweils nur eine hybridisierende Bande erkannt werden. In *Eco* RI-verdauter genomischer DNA wurden zwei Banden detektiert, die auf eine interne *Eco* RI Schnittstelle zurückzuführen sind, die in der cDNA an Position 519 der Nukleotidsequenz erkannt werden konnte (**Abb. 23**). Es wurde kein geschlechtsspezifischer Unterschied des Hybridisierungsmusters zwischen männlichen und weiblichen Tieren gefunden (nicht gezeigt).

Im Genom des Zebrafisch liegt demnach nur ein *OMP* Gen ohne weitere Familienmitglieder vor. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit dem Vorkommen eines *OMP* Gens in der Ratte (Danciger et al., 1989), unterscheidet sich jedoch von den Befunden für den Medaka und den Krallenfrosch (*Xenopus laevis*), bei denen Familiengrößen von 2 und 4 Mitgliedern gefunden wurden (Yasuoka et al., 1999; Rössler et al., 1998).

#### *Charakterisierung des zOMP Genlokus.*

Die genomische Organisation des *zOMP* Genlokus wurde an extrahierter genomischer DNA und dem genomischen Cosmidklon ICRFc70B1662Q2 untersucht. Der Cosmidklon wurde durch radioaktive Hybridisierung einer genomischen Zebrafisch Bibliothek (RZPD, Berlin) mit der [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP-markierten 170 bp Sonde aus **IV.2.1.1** identifiziert [radioaktive Hybridisierung durch A. Çelik (Çelik, 2001)]. Der Cosmidklon wurde sowohl mit einer DIG-dUTP-markierten Sonde des vollständigen *zOMP* Transkriptes als auch einer verkürzten 5'-Sonde, die der *zOMP*-cDNA ausgehend vom Transkriptionsstart bis zur internen *Eco* RI Schnittstelle entspricht, hybridisiert (**Abb. 27B**). Durch Kombination der im genomischen Southern-Blot gewonnenen Daten mit der Southern-Analyse des Cosmidklons konnte die genomische Umgebung des *zOMP* Gens gut kartiert werden (**Abb. 27C**). Die hybridisierenden Fragmentgrößen, die durch identische Restriktionsendonukleasen in beiden Ansätzen erhalten wurden, waren gleich. Das lässt zwei Schlussfolgerungen zu. Zum einen enthält der Cosmidklon tatsächlich das *zOMP* Gen, zum anderen enthält dieser Klon in beiden Richtungen ausreichend viel (bis zu 10 kb) von der genomischen Umgebung des *zOMP* Gens. Es wäre durch die zufallsbedingte Konstruktion der genomischen Bibliothek auch denkbar

gewesen, dass das *zOMP* Gen unmittelbar an den Cosmidvektor pLawrist7 angrenzend einkloniert wurde. Vektoranteile unmittelbar stromaufwärts des *zOMP* Gens hätten den Cosmidklon für die spätere Subklonierung einer 5'-gelegenen genomischen Sequenz ungeeignet gemacht. Durch Verwendung der 5'-Sonde konnte die Orientierung der erhaltenen Fragmente identifiziert werden (Abb. 27B, C). Die letzte identifizierbare Schnittstelle, die stromaufwärts ein Fragment mittlerer Größe erzeugt, ist die *Eco* RI Schnittstelle bei 1.3 kb oberhalb des Transkriptionsstartes. Das hybridisierende Fragment entspricht der unteren, 1.8 kb Bande des *Eco* RI-Verdau in dem genomischen Southern-Blot (Abb. 27A). Die nächste identifizierbare Schnittstelle, *Xho* I, liegt bereits 7 kb vor dem *zOMP* Gen und erzeugt damit ein für die weitere Subklonierung unnötig großes Fragment. Da im *zOMP* Gen eine interne *Eco* RI Schnittstelle repräsentiert ist, wurde das gesamte 1.8 kb umfassende *Eco* RI/*Eco* RI Fragment aus einem präparativen Verdau der Cosmid-DNA ausgeschnitten und in den Vektor pBluescript II KS subkloniert.



**Abb. 27 – Southern Analyse und Genomische Organisation des *zOMP* Genlokus.**

**A.** Genomischer Southern Blot. Genomische DNA des Zebra-  
bärlings wurde durch *Hind* III (H),  
*Pst* I (P), *Sac* I (S), *Eco* RI (E) und  
*Bam* HI (B) Restriktions-  
endonukleasen fragmentiert und mit  
einer DIG-dUTP-markierten DNA-  
Sonde aus der vollständigen *zOMP*-  
cDNA hybridisiert. Die Länge der  
DNA-Fragmente ist auf der linken  
Seite in Kilobasen (kb) angegeben.  
Mit Ausnahme der *Eco* RI-Laufspur  
ist jeweils nur eine hybridisierende  
Bande zu erkennen. Das Auftreten  
von zwei hybridisierenden Banden in

der *Eco* RI verdauten DNA resultiert aus einer internen *Eco* RI Schnittstelle in der *zOMP* cDNA-Sequenz (siehe Abb. 23 und C). **B.** Cosmid Southern Blot. Cosmid DNA des *zOMP*-positiven Cosmidklons wurde mit *Xho* I (X), *Sac* I (S), *Eco* RI (E), *Hind* III (H) und *Pst* I (P) Restriktionsendonukleasen verdaut (links: Einzelverdau, rechts: Doppelverdau) und mit einer DIG-dUTP-markierten 5' Sonde der *zOMP*-cDNA hybridisiert. Die hybridisierenden Banden in den Laufspuren gleicher Restriktionsenzyme entsprechen Fragmenten in A. In der *Eco* RI-Laufspur ist nur die 1.8 kb Bande ersichtlich (untere Bande in A). Dieses Fragment enthält überwiegend Abschnitte, die 5' oberhalb der *zOMP*-kodierenden Sequenz liegen. **C.** Genomische Organisation des *zOMP* Genlokus. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Xho* I (X), *Sac* I (S), *Eco* RI (E), *Hind* III (H) und *Pst* I (P) wurden aus den entsprechenden Southern Blots (z.B. A oder B) kartiert. Die cDNA ist als Kasten dargestellt, das graue Segment entspricht dem offenen Leserahmen des *zOMP*.

### 2.1.6 Analyse der *zOMP* 5'-flankierenden Sequenz auf regulatorische Elemente.

Das subklonierte genomische Fragment wurde von beiden Enden mit Vektorprimern und neugestalteten Oligonukleotiden (OMP-(-0), prOMP-(-1), prOMP-(-2)) vollständig sequenziert (veröffentlicht unter GenBank #: AF457190). Die Sequenzanalyse ergab, dass das Fragment, wie erwartet, die ersten 518 bp der *zOMP*-cDNA-Sequenz bis zur internen *Eco* RI Schnittstelle und weitere 1.3 kb stromaufwärts gelegene, genomische Sequenz enthält. Die Sequenz wurde intensiv auf das Vorkommen bekannter regulatorischer Motive hin untersucht.

Wie bei den *OMP* Genen anderer Spezies (Buiakova et al., 1994), konnten keine TATA-Box oder CAAT-Box Motive relativ zum putativen Transkriptionsstart gefunden werden. Durch Studien der *OMP* Promotorsequenz der Maus und des Menschen (Buiakova, 1994) sowie weiterer riechsinneszellspezifischer Gene (Jones und Reed, 1989; Bakalyar und Reed, 1990; Dhallan et al., 1990) wurden die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren Olf-1 und NF-1 (= NF-I) als kritisch für die Regulation der Expression dieser Gene in den Riechsinneszellen erkannt. Die 5'-flankierende genomische Sequenz des *zOMP* Gens weist jedoch keine zu den Olf-1- und NF-1-Bindungsstellen homologen Sequenzmotive auf. In den Promotorregionen von Maus und Mensch wurden proximale und distale Olf-1 Bindungsstellen gefunden und die Bedeutung dieser Wiederholung für die regulatorische Funktion ebenfalls gezeigt (Buiakova, 1994). Eine solche Konfiguration sollte unabhängig vom tatsächlichen Sequenzmotiv durch eine Sequenzanalyse erkannt werden können. In einem Vergleich der 1.3 kb Sequenz oberhalb des putativen Transkriptionsstarts mit sich selbst konnte kein wiederkehrendes Motiv von 8 bis 10 Basen Länge gefunden werden. Zwei alternative Betrachtungen wurden angestrengt. Olf-1 Bindemotive sind für die Maus in den regulatorischen Sequenzen unterschiedlicher Gene, die spezifisch für olfaktorische Sinneszellen sind, gefunden worden. Sie kommen auch verstärkt in den Genclustern olfaktorischer Rezeptorgene (Glusmann et al., 2000) vor. Daher wurde zunächst ein Sequenzvergleich der *zOMP* 5'-Sequenz mit der 560 bp Promotorsequenz des Zebrafährbling Geruchsrezeptors 9A (Mori et al., 2000; entspricht 2.1 in Dugas und Ngai, 2001) wiederholt. Auch in diesem Vergleich wurde kein übereinstimmendes Sequenzmotiv erkannt. Das Public Domain Programm MatInspector (v2.1, [www.gsf.de](http://www.gsf.de)) erlaubt die Suche nach bekannten Transkriptionsfaktorbindungsstellen, Suchmodelle können jedoch auch durch das Modul ConsInspector 3.0 trainiert werden. Eine einfache Suche mit dem MatInspector Programm wies sowohl die Olf-1 als auch die NF-1 Bindesequenz als nicht vorhanden aus. Daher wurde das Modul ConsInspector, ausgehend von der besten Übereinstimmung mit dem Olf-1 oder NF-1 Motiv trainiert. In die Analyse wurden die *zOMP* 5'-Region sowie alle bekannten Intergenregionen des Zebrafährbling-Geruchsrezeptorgenclusters (Dugas und Ngai, 2001) einbezogen. Die erkannten Sequenzabschnitte wurden in das Suchmodell zusätzlich aufgenommen und der Sequenzpool mit dem modifizierten Modell erneut durchsucht. Nach insgesamt 20 Iterationen konnte sowohl in den Intergenregionen als auch in der *zOMP* 5'-Sequenz kein konserviertes Motiv, das über die Sequenz TCCC hinausgeht, erkannt werden.

Zusammenfassend konnte in der *zOMP* stromaufwärts gelegenen genomischen Sequenz keines, der für olfaktorische Sinneszellen anderer Arten bekannten, Transkriptionsfaktorbindemotive gefunden werden. Olf-1 und NF-1 Bindungsstellen wurden auch in den putativen Promotorsequenzen der Geruchsrezeptorgene des Zebrafährblings nicht gefunden (Mori et al., 2000; Dugas und Ngai, 2001). Das lässt zwei unterschiedliche Schlussfolgerungen zu. Entweder wird die selektive Expression dieser Gene in den Riechsinneszellen des Zebrafährblings grundsätzlich anders reguliert und die Transkriptionsfaktoren Olf-1 und NF-1 kommen nicht vor, oder sie kommen vor, erkennen aber eine modifizierte Bindesequenz. Im Vergleich der *zOMP* 5'-Sequenz mit den Geruchsrezeptorintergensequenzen wurden jedoch keine Übereinstimmungen gefunden, die auf ein zebrafährblingspezifisches Motiv hinweist.

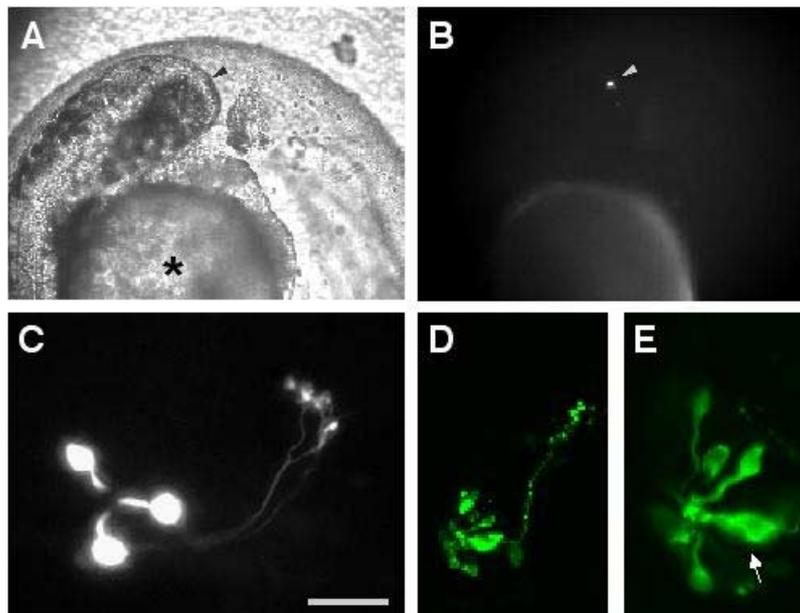
**2.1.7 Analyse der *zOMP* 5'-flankierenden Sequenz auf ihre regulatorische Wirksamkeit.**

Trotz der Abwesenheit der bekannten regulatorischen Sequenzmotive, sollte das Vermögen der 5'-flankierenden Sequenz des *zOMP* Gens, die Expression eines Reportergens in den Riechsinneszellen zu treiben, experimentell geprüft werden. Ausgehend vom Translationsstart wurde ein 1.4 kb stromaufwärts reichendes genomisches Fragment, welches auch 71 Basen des 5'-UTRs der cDNA enthält, durch eine PCR mit prOMP-*nco* und T7hi Primern reamplifiziert und in den promotorlosen Expressionsvektor pACSF-Y inkloniert. Durch die PCR wurde flankierend zum Translationsstartkodon (ATG) eine *Nco* I-Restriktionsschnittstelle (CCATGG) eingeführt. Über diese Schnittstelle konnte die 5'-Sequenz passgenau, d.h. ohne Rasterverschiebung, in den Expressionsvektor eingefügt werden. In dem erhaltenen Konstrukt übernimmt der offene Leserahmen des EYFP-Reportergen (*enhanced yellow fluorescent protein*) die exakte Position des offenen Leserahmens des *zOMP*. Die resultierende Mutation am Translationsstart (ACCATGG statt AACATGT) verändert gleichzeitig die Sequenz in eine effektivere Kozak-Konsensussequenz für die Initiation der Translation. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Sequenzierung über die Schnittstellen hinweg verifiziert. Der positive Klon 446-2 wurde erhalten und zur Injektion und für weitere Umklonierungen verwendet. Zur Vereinfachung wird er im Folgenden als prOMP<sub>1,3</sub>-Y bezeichnet. Variationen dieses Expressionskonstruktes, die das rot fluoreszierende Protein DsRed (prOMP<sub>1,3</sub>-dsRed) oder die zyan Variante des GFP (prOMP<sub>1,3</sub>-Cy) enthalten, wurden auf ähnliche Weise konstruiert.

Das Expressionskonstrukt prOMP<sub>1,3</sub>-Y wurde oberhalb der inklonierten putativen regulatorischen Sequenz mit dem *Eco* RI Restriktionsenzym linearisiert, in Zebrafärbling-embryonen im Einzell-Stadium injiziert und zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten auf die Expression des EYFP-Reportergens mit einem Fluoreszenzstereomikroskop untersucht. Fluoreszierende Zellen konnten selektiv in den olfaktorischen Plakoden der Embryonen erkannt werden (**Abb 28B**). Das übrige Gewebe des Embryos war hingegen frei von Fluoreszenzsignalen. Bereits zum ersten Untersuchungszeitpunkt, bei 24 hpf, sind EYFP-exprimierende Zellen in den olfaktorischen Plakoden beobachtbar (**Abb. 29B**). Die Expression des Reportergens folgt dem Zeitverlauf des Auftretens endogener *zOMP* Expression in den Riechsinneszellen.

Bei näherer Betrachtung der fluoreszierenden Zellen kann die charakteristische Morphologie sowohl ciliierter als auch mikrovillärer olfaktorischer Sinneszellen eindeutig erkannt werden (**Abb. 28C, D, E**). Die ciliierten Zellen besitzen rundliche Somata von 5 µm Durchmesser, die ringförmig in der Plakode angeordnet sind. Längliche, dünn ausgezogene Dendriten weisen in das Zentrum der Plakode in Richtung auf die embryonale Nasenöffnung (**Abb. 28C**). Mikrovilläre Zellen mit einem flaschenförmigen Profil, die sich gegenüber den cilierten Neuronen durch einen kürzeren und dickeren Dendriten auszeichnen, werden von cilierten Riechsinneszellen umgeben (**Abb. 28D**). Mikrovilläre Zellen wurden jedoch insgesamt weniger häufig beobachtet als cilierte Neurone. In beiden Zelltypen konnten von den Zellen ausgehende Axone erkannt werden, die in einer charakteristischen Schleife zunächst nach mediofrontal verlaufen und dann gebündelt in den embryonalen *Bulbus olfactorius* eintreten. Ihre Terminalien enden in unterschiedlichen Zielgebieten innerhalb des

Bulbus (**Abb. 28C, D**), die individuellen Glomeruli oder glomerulären Entwicklungsfeldern entsprechen (für eine Analyse der Entwicklung der Glomeruli des Zebrafisches während der Embryogenese siehe: von Campenhausen, 1994; Dynes und Ngai, 1998; Lieberoth, 1999). Individuelle Axone weisen an den distalen Enden Verzweigungen auf, die auf ein relativ enges Feld von 2 - 5  $\mu\text{m}$  Ausdehnung beschränkt bleiben. Die Axone der Riechsinneszellen projizieren direkt und ohne im olfaktorischen Bulbus zu mäandrieren in die jeweiligen Terminationsgebiete. Zellen mit einem rundlichen, dendritenlosen Profil, die Pionierneuronen entsprechen könnten (Whitlock und Westerfield, 1998), wurden nicht mit dem Reporter gen markiert.



**Abb. 28 – In vivo Reporter-genexpression in transient transgenen Zebrafisch-embryonen.**

**A.** Durchlichtaufnahme eines 48 h Embryo (\*: Dottersack). **B.** Fluoreszenzaufnahme des Embryos in A. Deutlich ist eine hell fluoreszierende Riechsinneszelle (*Pfeilkopf*) erkennbar. **C.** Detailansicht einer olfaktorischen Plakode und des embryonalen olfaktorischen Bulbus (72 h Embryo). Drei Riechsinneszellen zeigen EYFP Reporter genfluoreszenz. Die charakteristische Morphologie ciliierter Neurone sowie projizierende Axone sind sichtbar. **D.** Konfokale Rekonstruktion einer olfaktorischen Plakode (72 h Embryo). Die EYFP-

exprimierenden Zellen wurden durch eine  $\alpha$ -GFP-Antikörperfärbung dargestellt. Durch den Antikörper können deutlich mehr positive Zellen erkannt werden als durch die Reporter genfluoreszenz. **E.** Projektion ausgewählter Ebenen der Konfokalen Rekonstruktion in D. Eine mikrovilläre Riechsinneszelle (Pfeil) ist von mehreren cilierten Neuronen umgeben. Die Kalibrationsmarke entspricht: 200  $\mu\text{m}$  in A und B, 100  $\mu\text{m}$  in D und 25  $\mu\text{m}$  in C und E.

Die Intensitäten der beobachteten Reporter genfluoreszenzen waren nicht einheitlich. Neben stark fluoreszierenden, wurden auch mäßig und schwach leuchtende Zellen beobachtet. In immunhistochemischen Färbungen gegen das Reporter gen mit einem  $\alpha$ -GFP Antikörper konnten wesentlich mehr positive Zellen identifiziert werden als durch die reine Reporter genfluoreszenz (**Abb. 28D**, siehe auch **IV.3.4.1**). Nach der  $\alpha$ -GFP-Antikörperfärbung konnten durchschnittlich doppelt so viele positive Zellen gezählt werden wie durch die Reporter genfluoreszenz erkannt wurden. Über die Expression des Reporter gens in den Riechsinneszellen hinaus konnte auch gelegentlich ektopische Fluoreszenz durch Missexpression des EYFP-Reporter gens in Zellen außerhalb der Plakoden beobachtet werden.

Das Auftreten ektopischer Expression war jedoch nicht reproduzierbar und von Gelege zu Gelege verschieden. Das Ausmaß der ektopischen Expression war allerdings in gewissem Maße von der Konzentration der injizierten Plasmid-DNA abhängig. Höhere DNA Konzentrationen (100  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) resultierten in einer größeren Anzahl ektopisch exprimierender Zellen. Jedoch war auch dieser Befund nicht konsistent reproduzierbar. In einigen Populationen konnten auch durch hohe Konzentrationen injizierter Plasmid-DNA keine

Missexpression beobachtet werden. Die ektopisch exprimierenden Zellen besaßen jedoch eine Gemeinsamkeit. Es wurden grundsätzlich epidermale Zellen der gesamten Körperoberfläche, vor allem aber des Amnions beobachtet. Fluoreszierende Zellen in subepidermalen Geweben konnten nicht erkannt werden. Durch Injektion des promotorlosen Expressionsvektors pACSF-Y (50 ng/μl, Negativkontrolle, n = 248 Embryonen), konnte keine Reporterexpression induziert werden. In hohen Dosen (100 ng/μl) wurde durch den Expressionsvektor pACSF-Y vor allem Fluoreszenz in den Muskelzellen der Myomeren hervorgerufen. Im Gegensatz dazu wurden durch die Injektion hoher Plasmidkonzentrationen des Reporterkonstruktes prOMP<sub>1,3</sub>-Y in keinem Fall Muskelzellen fluoreszent markiert.

### 2.1.8 Variationen des Expressionsvektors

Zusätzlich zu dem Expressionskonstrukt prOMP<sub>1,3</sub>-Y, welches auf dem Basisexpressionsvektor pACSF-Y aufbaut und das EYFP-Reporter gen enthält, wurden unterschiedliche Variationen des Expressionsvektors untersucht. In einer Variante, dem Konstrukt prOMP<sub>1,3</sub>-τ-Y wurde ein zusätzlicher Sequenzabschnitt, der für ein Fragment des tau-Proteins kodiert, mit dem EYFP-Reporter gen fusioniert. Das mikrotubuli-assoziierte Protein tau wird in neuronalen Zellen exprimiert und in den axonalen Mikrotubuli reifer Neuronen (Binder et al., 1985) und den Neuriten von Kulturzellen (Drubin et al., 1986) gefunden. Das hier verwendete 236 bp umfassende Fragment wurde erfolgreich in transgenen Mauslinien eingesetzt, um hochmolekulare Reporterproteine (lacZ) in die Axonterminalien von Riechsinneszellen zu dirigieren (Mombaerts et al., 1996). Wie die oben beschriebenen Experimente jedoch zeigen, war die Fusion des EYFP-Proteins mit dem mikrotubuli-bindenden Protein nicht notwendig, um auch die Axone der Riechsinneszellen fluoreszent zu markieren. Die Verwendung des prOMP<sub>1,3</sub>-τ-Y Expressionkonstruktes ergab gegenüber dem prOMP<sub>1,3</sub>-Y Konstrukt keine gesteigerte Markierung der Riechsinneszellaxone (nicht gezeigt). Die Unterschiede zwischen dem hier verwendeten Konstrukt und den lacZ-Daten (Mombaerts et al., 1996) kann in der unterschiedlichen Größe der verwendeten Reporterproteine begründet sein. Das EYFP ist ein im Vergleich zum lacZ relativ kleines Protein, das sich durch Diffusion entlang der Axone ausbreiten kann, wohingegen das relativ große lacZ-Protein aktiv entlang der Neurotubuli transportiert werden muss, um eine effiziente Markierung zu gewährleisten.

Zusätzlich wurde für spätere Doppelmarkierungsversuche ein Expressionsvektor, der das DsRed-Reporter gen enthält, konstruiert. DsRed ist ein geeignetes Reporterprotein, da es im Vergleich mit dem EYFP oder GFP unter den längerwelligen Fluoreszenzbedingungen ein besseres Signal-Rauschverhältnis aufweist und weniger Autofluoreszenz des Gewebes auftritt. Jedoch besaß das prOMP<sub>1,3</sub>-dsRed eine geringere Effizienz als das vergleichbare prOMP<sub>1,3</sub>-Y Konstrukt. Die Lokalisation und die Intensität der Markierung waren vergleichbar, jedoch wurde ein wesentlich geringerer Prozentsatz von Embryonen durch das prOMP<sub>1,3</sub>-dsRed Expressionskonstrukt transgen markiert. Im Vergleich zu der Penetranz des prOMP<sub>1,3</sub>-Y Konstruktes, die bis zu 50% betrug, konnten maximal 30% der injizierten Embryonen mit dem prOMP<sub>1,3</sub>-dsRed markiert werden. Die Unterschiede zwischen den

beiden Expressionskonstrukten könnten in der jeweiligen Klonierung begründet sein. Aufgrund einer internen *Nco* I-Restriktionsschnittstelle im offenen Leserahmen des DsRed wurde eine *Nde* I-Schnittstelle flankierend zum Translationsstartpunkt zur Klonierung verwendet. Die *Nde* I-Schnittstelle weist jedoch eine schlechtere Übereinstimmung mit der Kozak-Konsensussequenz für die Translation auf. Die beobachtete, geringere Effektivität des prOMP<sub>1.3</sub>-dsRed Konstruktes könnte daher auf einer verminderten Translationsrate beruhen. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Expression des DsRed-Reporterproteins, wie aus der Literatur bekannt (Finley et al., 2001), zeitlich später als die des EYFP auftritt.

### 2.1.9 Promotoranalyse.

Das Expressionskonstrukt prOMP<sub>1.3</sub>-Y wurde auf die Präsenz regulatorischer Abschnitte und die Größe des zur Expression in den Riechsinneszellen notwendigen Minimalpromotors hin genauer untersucht. Durch Restriktionsverdau des Konstruktes an Schnittstellen, die auf dem 1.3 kb Fragment kartiert wurden (*Sac* I, *Hind* III; **Abb. 23**, **Abb. 27**), konnten Fragmentkürzungen von der 5'-Seite her mit den Konstruktängen 0.3 kb und 0.6 kb erhalten werden (**Abb. 29A**). Die drei Konstrukte prOMP<sub>1.3</sub>-Y, prOMP<sub>0.6</sub>-Y und prOMP<sub>0.3</sub>-Y wurden in Embryonen des Zebrafischarbärlings im Einzell-Stadium injiziert und zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten (24, 48, 72, 96 und 120 hpf) untersucht. Zu jedem Zeitpunkt wurde die Häufigkeit des Auftretens von Embryonen mit fluoreszenten Riechsinneszellen (Penetranz) sowie die Anzahl der markierten Riechsinneszellen in den positiven Plakoden (Expressivität) bewertet. Insgesamt wurden für diese Analyse 2548 Embryonen (prOMP<sub>0.3</sub>-Y: 915, prOMP<sub>0.6</sub>-Y: 819, prOMP<sub>1.3</sub>-Y: 814) injiziert, von denen 20% die ersten 24 hpf überlebten. Die relativ hohe Sterblichkeit ist nur zum Teil auf die Injektion zurückzuführen, da in unbehandelten Kontrollpopulationen in etwa gleich viele Embryonen verstarben. Der Anteil an missgestalteten Embryonen war in plasmidininjizierten Populationen jedoch insgesamt höher. Erkennbar missgebildete Tiere wurden von der Analyse ausgeschlossen, sodass insgesamt bei dem 24 hpf Beobachtungszeitpunkt 182, 155 und 145 Embryonen (für prOMP<sub>0.3</sub>-Y, prOMP<sub>0.6</sub>-Y und prOMP<sub>1.3</sub>-Y respektive) in die Wertung aufgenommen wurden. Über den Beobachtungszeitraum von 5 Tagen verstarben noch einmal 40 bis 52% aller Fische. Die Sterberaten waren für die drei Konstrukte gleichartig.

Durch jedes der drei Konstrukte konnte zu allen Beobachtungszeitpunkten die Expression des Reportergens in olfaktorischen Riechsinneszellen induziert werden. Grundsätzlich wurde durch längere Konstrukte eine stärkere Penetranz sowie eine höhere Expressivität erreicht als durch kürzere (**Abb. 29B, C**). Maximalwerte der Penetranz lagen bei 43%, 35% und 15% für die respektiven Konstrukte prOMP<sub>1.3</sub>-Y, prOMP<sub>0.6</sub>-Y und prOMP<sub>0.3</sub>-Y. Bei 24 hpf war die Penetranz für die beiden langen Konstrukte prOMP<sub>0.6</sub>-Y und prOMP<sub>1.3</sub>-Y in etwa gleich (18%), jedoch deutlich höher als für prOMP<sub>0.3</sub>-Y (5.5%, **Abb. 29B**). Im weiteren Entwicklungsverlauf wurden die Unterschiede zwischen den Konstrukten deutlicher. Zunächst stieg der Prozentsatz positiver Fische, der durch jedes der Konstrukte erhalten wurde, an, erreichte ein Maximum zwischen 48 und 72 hpf für die kürzeren Konstrukte und fiel danach wieder leicht ab. Nach 5 Tagen konnte eine klare Aufspaltung der Gruppen

erkannt werden. Dabei wurde für das prOMP<sub>1.3</sub>-Y-Konstrukt eine Penetranz von 43% erhalten, wohingegen lediglich 28% durch prOMP<sub>0.6</sub>-Y und 7% durch prOMP<sub>0.3</sub>-Y erreicht wurden.

Die Anzahl positiver Zellen innerhalb der markierten Plakoden stieg für die längeren Konstrukte prOMP<sub>1.3</sub>-Y und prOMP<sub>0.6</sub>-Y mit der Entwicklung stetig an und erreichte Maximalwerte bei 96 hpf, wohingegen sie für prOMP<sub>0.3</sub>-Y mit durchschnittlich 1.5 positiven Zellen über den Beobachtungszeitraum in etwa konstant blieb (Abb 29C). Bei 24 hpf war die Expressivität der prOMP<sub>1.3</sub>-Y- und prOMP<sub>0.6</sub>-Y-Konstrukte voneinander ununterscheidbar. Im Verlaufe der Entwicklung wurde jedoch auch hier eine Aufspaltung der Expressivitätswerte für die drei unterschiedlich langen Konstrukte immer deutlicher. Insgesamt wurden durch prOMP<sub>1.3</sub>-Y mehr positive Zellen erhalten (3.7 Zellen, bei 96 hpf) als durch das mittlere (2.5 Zellen, bei 48 hpf) und das kürzeste (1.8 Zellen, bei 48 hpf) Expressionskonstrukt.

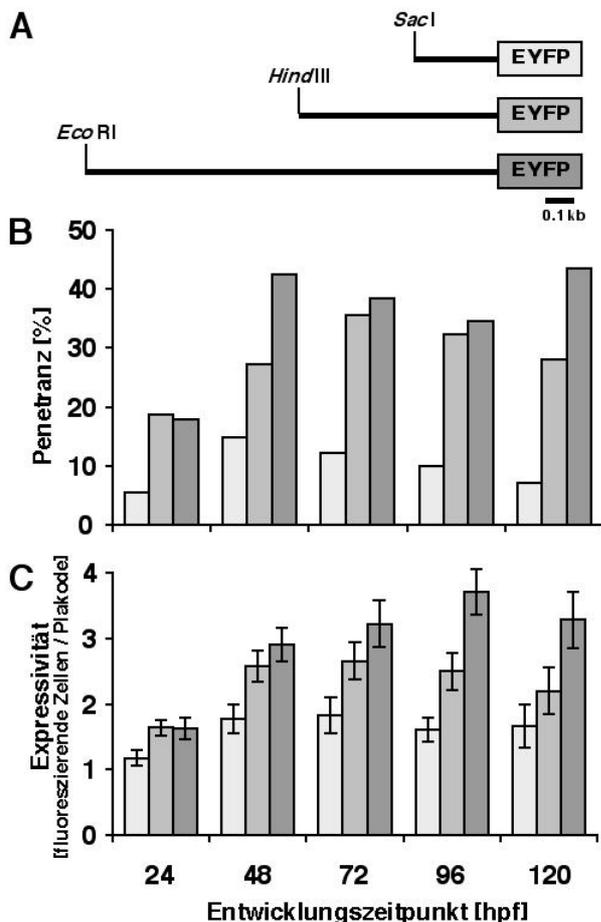
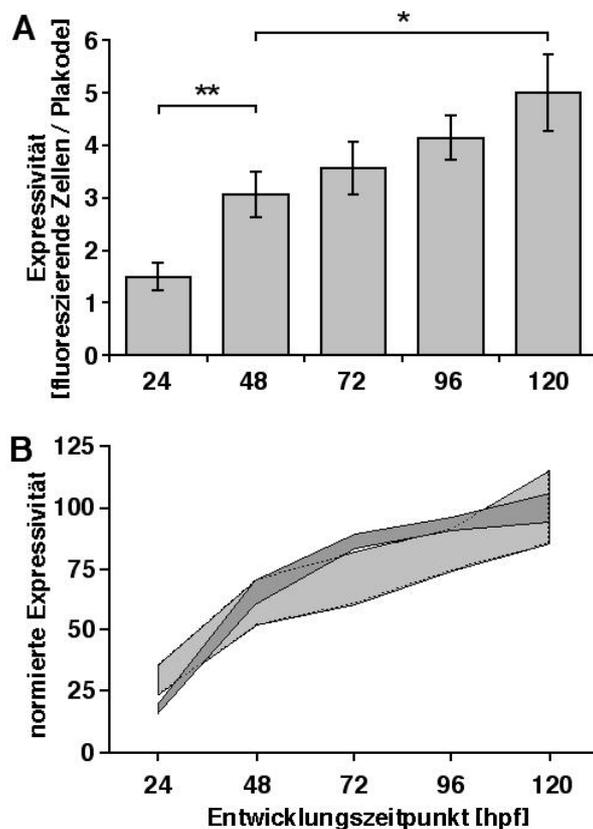


Abb. 29 – zOMP Promotoranalyse.

Penetranz und Expressivität dreier Expressionskonstrukte, die unterschiedlich lange zOMP-Promotorsequenzen enthalten. **A.** Unilaterale Fragmentkürzungen des prOMP<sub>1.3</sub>-Y Reporter-genkonstruktes von der 5'-Seite her. Drei unterschiedlich lange Promotorkonstrukte wurden untersucht (0.3 kb, 0.6 kb und 1.3 kb Promotorregion). Die Fragmentkürzungen wurden durch Restriktionsverdau an Schnittstellen, die auf dem 1.3 kb Fragment kartiert wurden (*Hind* III, *Sac* I), erzielt. Für die Analyse wurden 915 (0.3 kb), 819 (0.6 kb) und 814 (1.3 kb) Embryonen mit den Reporterkonstrukten injiziert. **B.** Häufigkeit des Auftretens reporter-genexprimierender Embryonen (Penetranz) für die drei Konstrukte aus A (die Graustufe der Balken entspricht der Darstellung in A). Die Penetranz steigt während der ersten 48 hpf und fällt danach ab, da reporter-genexprimierende Embryonen etwas häufiger verstarben als negative. Es ist eine klare Trennung der Penetranz für die drei unterschiedlichen Konstrukte erkennbar. Die stärkste Penetranz wird durch das prOMP<sub>1.3</sub>-Y Konstrukt erhalten. **C.** Anzahl der positiven Riechsinneszellen / Plakode (Expressivität). Die Mittelwerte und Standardfehler sind angegeben. Mit zunehmender Konstruktlänge steigt die Expressivität während der ersten fünf Tage der Embryonalentwicklung an. Auch hier wird durch das prOMP<sub>1.3</sub>-Y Konstrukt die höchste Expressivität erreicht.

Die dargestellten Verläufe geben das Gesamtverhalten der betrachteten Populationen wieder. Da auch während des Beobachtungszeitraumes immer wieder Fische verstarben, sind diese Werte jedoch nicht repräsentativ für den Entwicklungsverlauf der Reporter-gen-expression innerhalb eines Organismus. Beispielsweise konnten Maximalwerte von 17 positiven Zellen pro Plakode beobachtet werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde der Verlauf der Expressivität individueller Fische der prOMP<sub>1.3</sub>-Y Population, die das 120 hpf Stadium erreichten, erneut ausgewertet (Abb. 30A). In dieser Population, die nicht durch selektive Sterblichkeit beeinflusst wird, ist eine kontinuierliche Zunahme der Expressivität erkennbar. Ein starker Zuwachs ist zwischen 24 und 48 hpf deutlich. Danach steigt die Anzahl positiver Zellen stetig, jedoch etwas langsamer an. Der Verlauf stimmt zeitlich gut mit dem

Wachstumsverlauf der endogenen *zOMP*-Expression in den olfaktorischen Plakoden (Abb. 26) überein, der in IV.2.1.4 beschrieben wurde (Abb. 30B). Es wird aus diesem Vergleich auch deutlich, dass nur ein relativ geringer Prozentsatz, maximal 7% bei 24 hpf, durchschnittlich jedoch 3% der *zOMP*-positiven Zellen auch das Transgen exprimieren.



**Abb. 30 – Vergleich der endogenen *zOMP*-Expressivität mit der Expressivität des *prOMP<sub>1.3</sub>-Y* Transgens.**

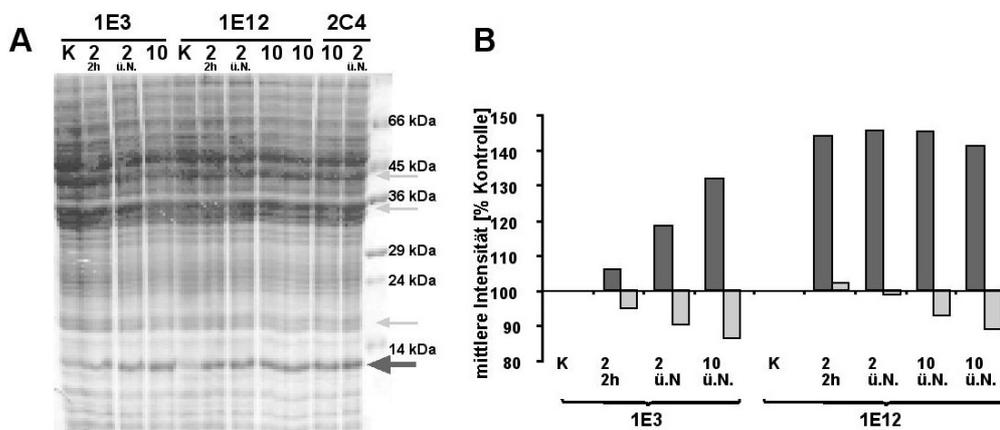
**A.** Expressivität des *prOMP<sub>1.3</sub>-Y* Transgens während der ersten fünf Tage der Embryonalentwicklung. Eine Population von 14 positiven Embryonen, die den 120 hpf Entwicklungszeitpunkt erreichten wurde auf die Anzahl reporter-genexprimierender Zellen untersucht. Die Mittelwerte und Standardfehler sind dargestellt. Die Signifikanz des Anstiegs wurde durch einen Student's t-Test überprüft (Sternchen: Signifikanzniveau, \*:  $p < 0.03$ , \*\*:  $p < 0.005$ ). Im Verlaufe der Entwicklung nimmt die Expressivität des Transgens kontinuierlich zu. **B.** Vergleich der Expressivität des *prOMP<sub>1.3</sub>-Y* Transgens mit der endogenen *zOMP* Expressivität. Die Werte aus A und Abb. 26 wurden auf den jeweiligen Maximalwert normiert und die Konfidenzintervalle dargestellt (hellgrau: Transgen, dunkelgrau: endogener Promotor). Die Expressivität des Transgens folgt zeitlich der endogenen *zOMP* Expression. Im Durchschnitt exprimieren 3% der *zOMP*-positiven Zellen das Transgen.

Das *zOMP* Gen stellt auch für den Zebrafärbling einen verlässlichen Marker reifer sensorischer Neuronen im olfaktorischen Epithel dar. Damit erfüllt es die Anforderungen, die durch die Absicht, zelltypspezifisch exprimierte Gene zu isolieren, an das *zOMP* geknüpft wurden. Das Expressionsmuster dieses Gens ist riechsinneszellenspezifisch. Eine relativ kurze, genomische Sequenz von 0.3 kb oberhalb des *zOMP*-Transkriptionsstartes treibt bereits die Reporter-genexpression selektiv und effektiv in den Riechsinneszellen. Durch zusätzliche 1 kb der stromaufwärts gelegenen Sequenz konnten sowohl die Penetranz als auch die Expressivität in den Riechsinneszellen transient transgener Embryonen gesteigert werden. Damit steht mit dem isolierten *zOMP*-Promotor ein wirkungsvolles Werkzeug zur Verfügung, das die Expression eines Strukturgens selektiv in die Riechsinneszellen des Zebrafärblings steuert.

### 2.1.10 Rekombinante Expression des *zOMP* in Bakterien.

Da das *zOMP* als verlässlicher Marker für Riechsinneszellen erkannt wurde, wäre ein unkomplizierter Nachweis dieser Zellen durch das *zOMP* in histochemischen Verfahren wünschenswert. *zOMP*-positive Zellen konnten durch *In situ*-Hybridisierungen dargestellt werden. Diese sind jedoch nicht immer einfach durchführbar und die RNA-Sonden sind

anfällig für Degradationen. Darüber hinaus ist eine *In situ*-Hybridisierung technisch nicht immer mit immunhistochemischen Färbungen oder anderen Doppelmarkierungen vereinbar. Diese Probleme könnten teilweise durch einen zOMP-spezifischen Antikörper überwunden werden. Ein Antikörper gegen das OMP der Ratte ist verfügbar, jedoch wird mit diesem Immuneserum im Riechepithel des Zebrafischblings eine hohe Hintergrundfärbung erhalten (Çelik, 2001). Zwei alternative Strategien können zur Herstellung eines zOMP-spezifischen Antikörpers verfolgt werden. Zum einen können direkt synthetische Oligopeptide aus der bekannten zOMP-Proteinsequenz zur Immunisierung eingesetzt werden. Es ist bei diesem Verfahren jedoch nicht immer einfach, geeignete Sequenzmotive zu identifizieren. Zusätzlich könnte die Faltung der kurzen Oligopeptide von der des nativen Proteins stark abweichen. Daher wurde versucht, das zOMP rekombinant in Bakterien zu exprimieren. Dieses rekombinante Protein könnte dann zur Immunisierung und Antikörpergewinnung eingesetzt werden.



**Abb. 31 – Rekombinante Expression des zOMP Proteins in Bakterien.**

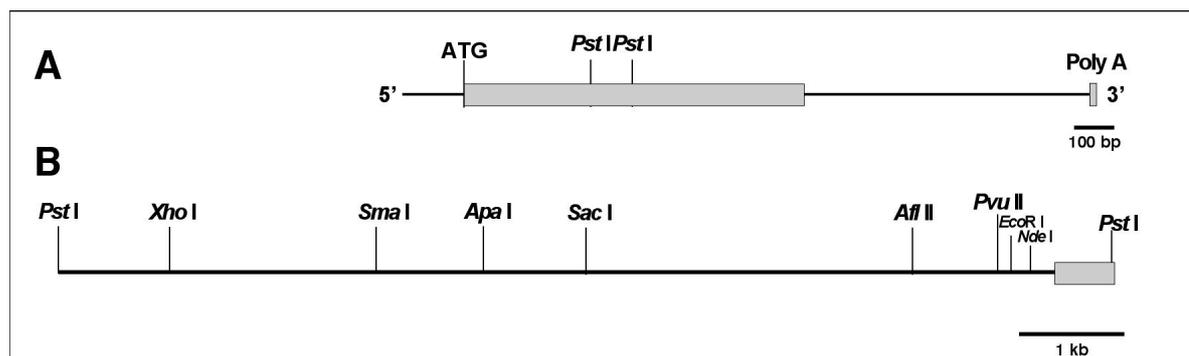
**A.** SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese des extrahierten Gesamtproteins der drei positiven Transformantenklone 1E3, 1E12 und 2C4 (K: Kontrolle, nicht induziert; 2: Induktion mit 2 µM IPTG [nach 2 h (2h) oder über Nacht (ü.N.); 10: Induktion mit 10 µM IPTG über Nacht]. Durch IPTG wird eine Bande knapp unterhalb des 14 kDa Proteinstandards induziert (*dunkelgrauer Pfeil*). **B.** Quantifizierung der Induktion für die erwartete zOMP Bande (*dunkelgrauer Pfeil*) und der Mittelwerte für drei Kontrollbanden (*hellgraue Pfeile* in A) für die Klone 1E3 und 1E12 aus A. Die Werte wurden jeweils auf die uninduzierte Kontrolle (K) normiert.

Ein 420 bp Fragment der kodierenden Region der *zOMP*-cDNA wurde mit AB-OMPkpn-1 und AB-OMPkpn-2 Primern amplifiziert und über identische Schnittstellen und unter Wahrung des Leserasters in den Expressionsvektor pQE-30 inkloniert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Sequenzierung über die Schnittstellen hinweg verifiziert. Die Expression des rekombinanten Proteins kann durch Induktion des lacZ-Promotors des pQE-Vektors mit IPTG ausgelöst werden. Zunächst wurde mit dem Bakterienstamm XL1-blue MRF' gearbeitet. In diesem System konnte nach Induktion mit IPTG keine spezifische Bande im SDS-PAGE Gel erkannt werden (nicht gezeigt). Es ist jedoch bekannt, dass XL1-blue Zellen häufig eine basale Expression lacZ-Promotor kontrollierter Transkripte zeigen. Daher wurde auf den Bakterienstamm SG13009 gewechselt, der eine hohe Kopienzahl des lacZ-Repressorgens [pREP4] trägt, welches eine "Leck"-Expression in diesen Zellen unterdrückt. Durch Inkubation der Bakteriensuspension mit IPTG konnte eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von etwas weniger als 14 kDa nach 2 h Inkubationszeit

induziert werden (**Abb. 31A**). Die Klone 1E12 und 2C4 zeigten eine deutliche Induktion, der Klon 1E3 wies bereits eine basale Expression dieser Proteinbande auf. Das Auftreten einer Bande mit einem apparenten Laufverhalten von etwas weniger als 14 kDa stimmt gut mit der erwarteten Molekülmasse des zOMP, die auf 14 kDa berechnet wurde, überein. Versuche die induzierte Bande aus dem Gesamtprotein zu extrahieren sind bisher sowohl unter nativen wie auch unter denaturierenden Bedingungen ohne Erfolg geblieben. Die entsprechenden Konstrukte liegen jedoch vor und können zur Isolierung des rekombinanten Proteins und zur späteren Immunisierung eingesetzt werden.

### 3.2 Körnerzellen: das *dlx2* Gen

Das *dlx2* Gen gehört zur Familie der *distal-less*-Homeoboxgene und ist in die Entwicklung des Gesichtsschädels und des Vorderhirns involviert (Eisenstat et al., 1999; Kraus und Lufkin, 1999). Darüber hinaus ist es in die Entwicklung und die Migration kortikaler Interneurone aus dem basalen Telencephalon über die subventrikuläre Zone in Zielgebiete des Neocortex eingebunden. Im olfaktorischen System wird das *dlx2* Gen in den GABAergen Körnerzellen des *Bulbus olfactorius* exprimiert (Bulfone et al., 1993). Auch diese Zellen folgen einem Migrationsstrom (*rostral migratory stream*) aus der subventrikulären Zone in den olfaktorischen Bulbus. Die olfaktorischen Bulbi *dlx2*-nullmutanter Mäuse besitzen entsprechend keine Körnerzellen (Bulfone et al., 1998). Das Homologe Gen des Zebrafischarbärlings wurde bereits von Akimenko (Akimenko et al., 1994) beschrieben und ein cDNA-Klon (**Abb. 32A**) von M. Westerfield (University of Oregon, Eugene, OR, USA) zur Verfügung gestellt. Im olfaktorischen System des Zebrafischarbärlings wurden, wie bei den Säugetieren, die Transkripte des *dlx2* Gens überwiegend in der inneren Zellmasse des olfaktorischen Bulbus, dem Ort der Körnerzellen, detektiert (Çelik, 2001).



**Abb. 32 – Organisation der *dlx2* cDNA und der 5'-flankierenden genomischen DNA Sequenz.**

**A.** Organisation der *dlx2* cDNA (*grauer Kasten*: proteinkodierende Sequenz). Für die Southern-Analyse des subklonierten genomischen Fragmentes wurde eine DIG-dUTP-markierte DNA-Sonde hergestellt, die der cDNA vom Transkriptionsstartpunkt bis zur ersten internen *Pst* I Restriktionsschnittstelle entspricht. **B.** Organisation der 5'-flankierenden genomischen Sequenz des *dlx2* Gens, subkloniertes genomisches Fragment. Jeweils die erste Restriktionsschnittstelle, ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt ist eingezeichnet.

2.2.1 Klonierung der 5'-flankierenden Sequenz des *dlx2* Gens.

In einem ähnlichen Ansatz wie er für das *zOMP* Gen des Zebrafischlarvens verfolgt wurde, sollte nach einer regulatorischen genomischen Sequenz, welche die *dlx2*-Expression steuert, gesucht werden. Da die cDNA bereits vorlag, konnte unmittelbar mit der Hybridisierung einer genomischen PAC-Bibliothek (PAC = *phage artificial chromosome*, artifizielles Phagenchromosom) begonnen werden (Çelik, 2001). Die Hybridisierung von 2.4 (4/5 von 3) Genomäquivalenten ergab einen stark hybridisierenden und 10 mäßig hybridisierende Klone. Der stark hybridisierende Klon BUSMP706N2039Q4 wurde vom RZPD (Berlin) erhalten und durch Verdau mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen und cDNA Sonden unterschiedlicher Länge kartiert (Çelik, 2001). Die Restriktionsanalyse des PAC-Klons ergab, dass er ein Insert von 115 kb beinhaltet. Mit einer 5'-Sonde, die der Länge der cDNA vom Transkriptionsstart bis zur ersten internen *Pst* I- Schnittstelle bei Position 450 der Nukleotidsequenz des *dlx2* entspricht (Abb. 32A), konnte die Orientierung der erkannten Schnittstellen, deren Fragmentgrößen von 300 bp bis 48 kb reichten (nicht gezeigt), kartiert werden (Abb. 32B).

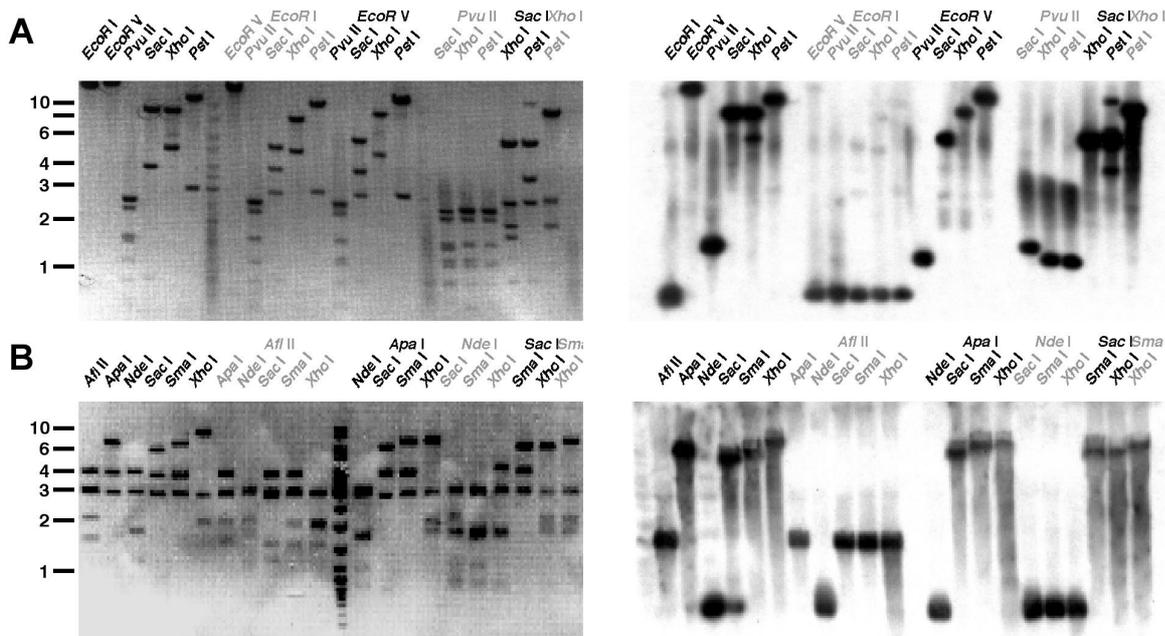


Abb. 33 – "Southern Analyse" des subklonierten genomischen 11 kb Fragmentes des *dlx 2* Gens.

Das subklonierte genomische 11 kb Fragment stromaufwärts der *Pst* I Schnittstelle des *dlx2* Gens wurde mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen fragmentiert und mit einer DIG-dUTP-markierten DNA-Sonde (5'-*Pst* I-fragment) hybridisiert. **A.** Banden- (links) und Hybridisierungsmuster (rechts) der Einzel- und Doppelrestriktionsspaltungen. **B.** Doppel- und Dreifachrestriktionsspaltungen (Vorverdau aller Spuren mit *Pst* I). Die hybridisierenden Fragmente, welche das 5'-Ende des *dlx2* Gens enthalten, sind entweder sehr klein (unter 1kb) oder sehr groß (über 6 kb).

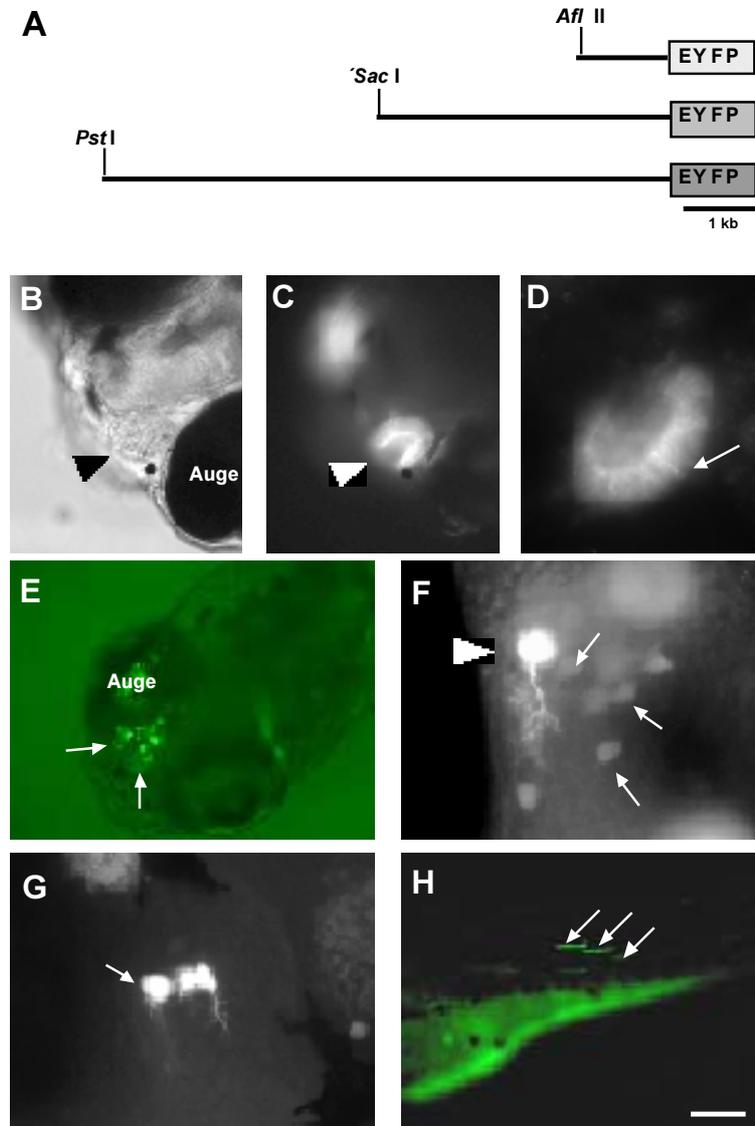
Ein 11 kb *Pst* I-Fragment wurde in der PAC-Southern Analyse erkannt und erfolgreich in den Vektor pBluescript II KS subkloniert. Eine Sequenzanalyse ergab, dass das subklonierte Fragment die erwarteten 450 bp des *dlx2* Gens, die dem 5'-UTR und der kodierenden Sequenz bis zur ersten internen *Pst* I-Restriktionsschnittstelle entsprechen, und zusätzliche 10.5 kb der stromaufwärts gelegenen genomischen Sequenz enthält. Das

subklonierte Fragment wurde erneut durch eine Batterie von Restriktionsendonukleasen fragmentiert und mit der 5'-Sonde hybridisiert, um kürzere Fragmente zu identifizieren, die sich für eine Subklonierung in den Expressionsvektor pACSF-Y eignen (Abb. 33). Die erhaltenen Fragmente erschienen mit  $\approx 1$  kb zu kurz oder mit  $> 7$  kb zu lang zu sein (Abb. 32B). Ein Kompromiss wurde mit einem *Sac I/Pst I* Fragment von 5.5 kb Länge gefunden. Dazu wurde der genomische Subklon zunächst durch Verdau mit dem *Sac I* Restriktionsenzym, Ausschneiden der Sequenzen oberhalb der *Sac I* Schnittstelle und anschließenden Ringschluss verkürzt. Aus dem verkürzten Vektor wurde ein 5.5 kb Fragment durch PCR mit *dlx2-nco* und T7-hi Primern amplifiziert. Durch die PCR wurde zur Umklonierung in den pACSF-Y Expressionsvektor ebenfalls ein *Nco I* Motiv (CCATGG) flankierend zum Translationsstartkodon eingefügt. Das Amplifikat wurde mit *Nco I* und *Sac I* Restriktionsendonukleasen verdaut und über identische Schnittstellen in den pACSF-Y Vektor inkloniert und so das *prdlx2<sub>5,5</sub>-Y*-Konstrukt erhalten. Auch für das *dlx2* Reporterkonstrukt wurden unterschiedliche Fragmentlängen hergestellt, die auf ihre körnerzellspezifische Expression untersucht wurden. Zur Herstellung des längeren Konstruktes *prdlx2<sub>9,5</sub>-Y*, wurde ein zuvor aus dem genomischen Subklon ausgeschnittenes 4 kb *Sac I* Fragment erneut isoliert und in die *Sac I* Schnittstelle des Konstruktes *prdlx2<sub>5,5</sub>-Y* eingefügt. Die richtige Orientierung des eingesetzten Fragmentes wurde durch Sequenzierung überprüft. Durch Verdau des Konstruktes *prdlx2<sub>5,5</sub>-Y* mit *Afl II* und *Sac I* Restriktionsenzymen wurde das kürzere Reporterkonstrukt *prdlx2<sub>1,3</sub>-Y* erhalten, das 1.3 kb genomische Sequenz enthält.

### 2.2.2 Promotoranalyse

Die Fähigkeit der stromaufwärts gelegenen genomischen Sequenz des *dlx2* Gens, die spezifische Expression eines Reportergens in den Körnerzellen zu treiben, wurde durch die drei Expressionskonstrukte *prdlx2<sub>1,3</sub>-Y*, *prdlx2<sub>5,5</sub>-Y* und *prdlx2<sub>9,5</sub>-Y* (Abb. 34A), die unterschiedlich lange 5'-flankierende Sequenzen des *dlx2* Gens tragen, untersucht. Die Konstrukte wurden durch Verdau mit geeigneten Restriktionsendonukleasen linearisiert und in Zebrafischembryonen im Einzell-Stadium injiziert. Die Expression des EYFP-Reportergens wurde beginnend bei 24 hpf in Tagesabständen überprüft. Das kürzeste Konstrukt *prdlx2<sub>1,3</sub>-Y* führte in insgesamt 1542 untersuchten Embryonen nicht zu einer spezifischen Reporterexpression (nicht gezeigt). Das mittlere Konstrukt *prdlx2<sub>5,5</sub>-Y* führte überraschenderweise zu einer Expression des Reportergens in den olfaktorischen Epithelien der plasmidininjizierten Embryonen (Abb. 34C, D). Die Penetranz dieses Expressionsmusters lag mit 32% aller injizierten Embryonen unerwartet hoch (1212 injizierte Embryonen, von denen 128 den 4hpf Entwicklungszeitpunkt überlebten). Die Fluoreszenzintensität einzelner Zellen des Riechepithels war geringer als die, die für den zOMP-Promotor beobachtet werden konnte, jedoch war der Anteil EYFP-positiver Zellen innerhalb des Epithels sehr hoch. Unter den exprimierenden Zellen konnten Riechsinneszellen aufgrund ihrer eindeutigen Morphologie deutlich identifiziert werden (Abb. 34D). Projizierende Axone der Riechsinneszellen konnten jedoch nicht beobachtet werden. Durch die hohe Dichte der exprimierenden Zellen konnte auch nicht eindeutig beurteilt werden, welche Zelltypen des embryonalen

Riechepithels das Reportertransgen ebenfalls exprimieren. Vor dem hohen Hintergrund der Gesamtfluoreszenz konnten nicht-fluoreszierende Zellen nur schwer oder überhaupt nicht identifiziert werden. Über die beschriebene Expression in den olfaktorischen Plakoden hinaus konnte keine weitere Reporterexpression in anderen Geweben der *prdlx2<sub>5,5</sub>-Y*-injizierten Embryonen beobachtet werden.



**Abb. 34 – *dlx2*-Promotoranalyse.**

Analyse unterschiedlich langer *dlx2*-Promotorkonstrukte. **A.** Drei Expressionskonstrukte, *prdlx2<sub>1,3</sub>-Y*, *prdlx2<sub>5,5</sub>-Y* und *prdlx2<sub>9,5</sub>-Y* mit den respektiven genomischen Fragmentlängen von 1.3 (*Afl II*), 5.5 (*Sac I*) und 9.5 (*Pst I*)kb wurden untersucht. **B.** Durchlicht- und **C.** Fluoreszenzaufnahme eines *prdlx2<sub>5,5</sub>-Y* injizierten 96 hpf Embryos. Die olfaktorischen Plakoden (*Pfeilkopf*) zeigen eine starke Expression des EYFP-Reportergens. Nur die vordere Plakode ist im Fokus abgebildet. **D.** Stärkere Vergrößerung einer Plakode aus **C.** Deutlich können auch Riechsinneszellen an ihrer charakteristischen Morphologie erkannt werden (*Pfeil*). **E.** EYFP-Reporterexpression eines *prdlx2<sub>9,5</sub>-Y*-injizierten 72 hpf Embryo. Zahlreiche Reporterexpression exprimierende Neurone können in den embryonalen olfaktorischen Bulbi (*Pfeile*) erkannt werden. **F.** Fluoreszenzaufnahme des olfaktorischen Bulbus eines 72 hpf *prdlx2<sub>1,3</sub>-Y*-injizierten Embryo. Neben zahlreichen lokalen Interneuronen (*Pfeile*) ist eine Zelle erkennbar (*Pfeilkopf*), die die Morphologie einer Mitralzelle aufweist. **G.** Eine Gruppe von Mitralzellen, die mit dem *prdlx2<sub>9,5</sub>-Y* Konstrukt markiert wurde. Interneurone sind nicht erkennbar. **H.** Ektopische Expression in Muskelzellen in der Schwanzregion eines 72 hpf alten Embryos nach Injektion mit *prdlx2<sub>9,5</sub>-Y*. In den Bildern **F**, **G** und **H** wurde das Reportertransgen mit einem  $\alpha$ -GFP-Antikörper und Alexa Fluor-488 visualisiert.

Durch die Injektion des längsten der drei Konstrukte, *prdlx2<sub>9,5</sub>-Y*, wurde Reporterexpression in zahlreichen Neuronen des gesamten Embryos induziert. Insgesamt 1056 Embryonen wurden injiziert, von denen 382 den 24 hpf Beobachtungszeitpunkt überlebten. Von diesen Embryonen zeigten insgesamt 78 (= 20%) eine Expression des Reportergens. Das Expressionsmuster des Transgens individueller Embryonen war jedoch sehr divers. Zahlreiche positive Zellen wurden entlang des gesamten Körpers beobachtet. Trotz der Heterogenität der beobachteten Expressionsmuster, wurden überwiegend Neurone durch das Expressionskonstrukt markiert. Gelegentlich konnte auch eine Expression in den Muskelzellen der Körperwand erkannt werden (**Abb. 34H**). Verstärkt wurden jedoch positive Neurone im embryonalen Vorderhirn angetroffen (**Abb. 34E, F, G**). Es konnten in individuellen Embryonen zwischen 2 und 14 positive Neurone erkannt werden. Sofern

Expression im olfaktorischen Bulbus beobachtet wurde, waren die Zellkörper der markierten Zellen von rundlichem Querschnitt, wiesen Dendritenstrukturen auf und besaßen in der Regel keine axonalen Fortsätze, die den olfaktorischen Bulbus verließen (**Abb. 34F**). Daher wird die Vermutung nahegelegt, dass es sich zumindest bei einigen der markierten Zellen um lokale Interneurone im embryonalen Vorderhirn und Bulbus handelte. Zusätzlich konnten auch Zellen erkannt werden, die einen langen, reich verzweigten Dendriten trugen und die Morphologie von Mitralzellen aufwiesen (**Abb. 34F, G**).

### 2.2.3 Klonierung der *dlx1-dlx2* Intergenregion

Für zwei Mitglieder der *dlx*-Genfamilie wurde die Beteiligung von hochkonservierten Enhancerelementen an der Regulation ihrer zelltypspezifischen Expression gezeigt (Zerucha et al., 2000). Die *Dlx* Gene sind genomisch in Paaren angeordnet und für das Paar *dlx4/dlx6* des Zebrafischblings (entspricht dem *Dlx5/Dlx6* Paar der Maus), konnte eine konservierte genomische Sequenz innerhalb der Intergenregion, die eine hohe Interspezieswirksamkeit besitzt, identifiziert werden. Auch für das *dlx2* Gen des Zebrafischblings wurde eine paarige Anordnung mit dem *dlx1* Gen nachgewiesen. Diese Ähnlichkeit der Anordnung des *dlx1/dlx2* Genpaares im Zebrafischbling macht eine vergleichbare Expressionsregulation für dieses Genpaar wahrscheinlich. Die Bedeutung der *dlx1/dlx2* Intergenregion (*dlx1/2-i*) für die Spezifität der Reportergenexpression sollte hier entsprechend untersucht werden.

Zunächst wurde versucht die *dlx1/2-i* durch PCR mit Primern, die spezifisch an die 3'-untranslatierten Abschnitte des *dlx1* und des *dlx2* Gens binden, zu amplifizieren. Da keine spezifischen Banden amplifiziert werden konnten, wurde der PAC-Klon in einer Southern Analyse mit einer DIG-dUTP-markierten DNA-Sonde des 3'-UTRs der *dlx2* cDNA (*Eco* RI Fragment) untersucht. In der Analyse konnte ein 7.5 kb großes *Eco* RV Fragment identifiziert werden, das den gesamten Intergenbereich überspannen könnte. Das Fragment wurde in den Vektor pBluescript II KS subkloniert und Transformandenklone mit den erwarteten Insertgrößen sequenziert. Die Klone *dlx1/2-i-D4* und *dlx1/2-i-D10* zeigten jeweils an den Sequenzenden Homologie zu den 3'-untranslatierten Abschnitten, sowohl des *dlx1* als auch des *dlx2* Gens. Daher beinhalten beide Klone jeweils ein kurzes Stück der respektiven 3'-Enden der *dlx* Gene und die gesamten *dlx1/dlx2*-Intergenregion.

In einem weiteren Schritt sollte die gesamte Intergenregion hinter das EYFP-Reportergen der Expressionsvektoren *prdlx2<sub>5,5</sub>-Y* und *prdlx2<sub>9,5</sub>-Y* eingefügt werden. Die Position der *dlx1/2-i* Sequenz in den beabsichtigten Konstrukten würde dann deren natürlich vorkommende Organisation im Genom des Zebrafischblings widerspiegeln. Allerdings erwies es sich bisher als unmöglich die zusätzlichen 7.5 kb *dlx1/2-i* in die jeweiligen Expressionskonstrukte zu integrieren. Eine mögliche Erklärung für die Klonierungsschwierigkeiten kann in der bereits umfangreichen Größe der jeweiligen Konstrukte und einer Ausschlussgröße des pBluescript Vektors für zusätzliche DNA-Abschnitte liegen. Es könnte versucht werden, die regulatorische Funktion der Intergenregion mit einem *dlx2* Minimalpromotor zu untersuchen.

In einer zusammenfassenden Beurteilung scheint das *dlx2* Gen des Zebrafischlings trotz der bisher erfolglos gebliebenen Versuche, eine spezifische Expression von Reportergenen in den Körnerzellen zu erreichen, ein geeignetes Gen für dieses Vorhaben zu sein. Von den untersuchten Promotorkonstrukten kann das *prdlx2<sub>9,5</sub>-Y* als das effektivste angesehen werden. Das erzielte Expressionsmuster war zwar divers, häufig ektopisch, nicht reproduzierbar und die Gesamtzahl der markierten Zellen gering, jedoch wurden gelegentlich mit geringer Dichte Inter- und Projektionsneurone im olfaktorischen Bulbus transgen markiert. Diese neuronenspezifische Expression macht daher bereits eine Vielzahl potentieller Anwendungsmöglichkeiten denkbar.

### **2.3 Mitralzellen: das *ztbr1* Gen**

Die T-box Gene bilden eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die durch eine hochkonservierte DNA bindende Domäne, die T-box, charakterisiert sind (Papaioannou und Silver, 1998). Die Mitglieder dieser Familie sind in vielschichtiger Weise in Entwicklungsvorgänge eingebunden und übernehmen wichtige regulatorische Funktionen während der Gastrulation (Wilkinson et al., 1990), der Mesodermentwicklung (Chapman und Papaioannou, 1998), der Entwicklung der Gliedmassen (Gibson-Bron et al., 1998; Logan et al., 1998) und der Hirnentwicklung (Bulfone et al., 1995, 1998). Eine Untergruppe der T-box-Familie bilden die *Tbr* Gene (= *T-box brain*), die überwiegend in Neuronen exprimiert werden. Für das Mausmodell wurden bisher drei Vertreter der *Tbr*-Genfamilie im olfaktorischen System identifiziert. Die Gene *Tbr1* und *Tbr2* (Eomesodermin) werden in den Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus und in Zellen des angrenzenden Telencephalons exprimiert. Das *Tbr3* Gen wurde hingegen ausschließlich in den Mitralzellen des *Bulbus olfactorius* gefunden (A. Bulfone, pers. Mitteilung). Aufgrund der selektiven Expression dieser Gene in den Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus, wurde versucht, *Tbr*-homologe Gene des Zebrafischlings zu klonieren.

#### **2.3.1 Klonierung des *ztbr1* Gens des Zebrafischlings**

Zur Homologieklonierung des *ztbr1*, bzw. *ztbr3* Gens des Zebrafischlings wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Zunächst wurde versucht, homologe Sequenzabschnitte aus cDNA des Riechepithels, des olfaktorischen Bulbus oder des gesamten Gehirns mit degenerierten Oligonukleotiden, die an konservierte Bereiche der *Tbr1* Gene von Maus und Mensch binden zu isolieren. Dazu wurden Polymerase-Kettenreaktionen mit allen möglichen Kombinationen der Primer ACSF-0, ACSF-1, ACSF-2 und ACSF-4 durchgeführt. Amplifikate der erwarteten Fragmentgrößen wurden lediglich aus der cDNA des Bulbusgewebes und des Gehirns, nicht jedoch aus cDNA des Riechepithels erhalten. Nach Ligation der Produkte in den Vektor pGEM-T und einer Vorauswahl von Klonen mit den erwarteten Insertgrößen durch einen analytischen Restriktionsverdau wurden insgesamt 9 Klone durch Sequenzierung auf ihre Homologie zu den *Tbr* Genen überprüft. Es konnten jedoch keine Klone identifiziert werden, die *Tbr*-homologe Sequenzen enthielten.

Alternativ zu dem obigen Ansatz wurde zunächst eine ausplattierte cDNA-Bibliothek des Hirngewebes mit einer [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dUTP-markierten Sonde, die aus einem 3'-Fragment der cDNA des *Tbr3* Gens der Maus (von A. Bulfone freundlicherweise zur Verfügung gestellt) hergestellt wurde, hybridisiert. Die Hybridisierung von 500.000 Kolonien der Zebrabärbling cDNA-Bibliothek ergab insgesamt eine Ausbeute von 39 hybridisierenden Kolonien, von denen 12 stark hybridisierten. Im *Rescreen* der rekultivierten Filterabschnitte konnten 5 dieser 12 Klone verifiziert werden. Von insgesamt 27 Einzelkolonien zeigten zwei Sequenzhomologien zu den *Tbr* Genen von Mensch und Maus. Die beste Sequenzübereinstimmung der erhaltenen Zebrabärblingsequenzen wurde dabei zu den *Tbr1* Genen gefunden (**Abb. 35A, B**). Beide Klone, obwohl sie von unterschiedlichen Ursprungskolonien der cDNA-Bibliothek stammen, zeigen eine 100%-ige Sequenzhomologie untereinander und kodieren für eine 5' trunkierte Proteinsequenz des *ztbr1* Gens (**Abb 35A**).

Aufgrund der exklusiveren Expression des *Tbr3* Gens der Maus in den Mitralzellen (A. Bulfone, persönliche Mitteilung) wurde zusätzlich versucht, auch das *Tbr3*-homologe Gen des Zebrabärblings zu isolieren. Dazu wurden erneut 200.000 Klone der ausplattierten cDNA-Bibliothek des Bulbusgewebes mit der *Tbr3* 3'-Sonde hybridisiert und 9 stark hybridisierende Bakterienkolonien weiter untersucht. Im *Rescreen* wurden 8 Klone zunächst positiv bewertet, von denen jedoch keiner Übereinstimmungen zu den *Tbr* Genen zeigte.

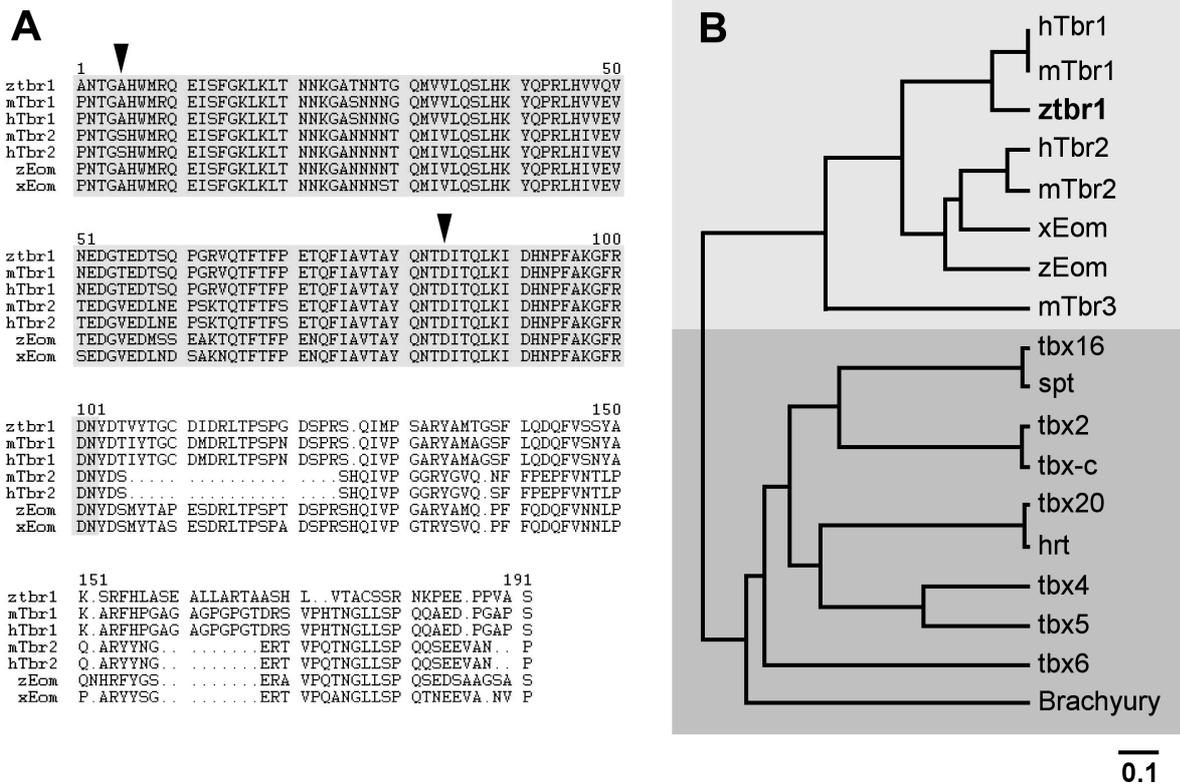
Im weiteren wurde versucht, die fehlenden 5'-Sequenzabschnitte der partiellen cDNA-Klone des *ztbr1* Gens zu erhalten. Dazu wurden die cDNA-Bibliotheken des Gehirns und des olfaktorischen Bulbus erneut, sowohl mit einer 240 bp umfassenden DNA-Sonde der *ztbr1*-cDNA (*Bss* HII/*Eco* RV-Fragment, indiziert in **Abb. 35A**) als auch einer Sonde, die der gesamten Länge der *ztbr1*-cDNA entspricht, hybridisiert. Insgesamt wurden  $4 \times 10^5$  Kolonien hybridisiert, von denen keine im *Rescreen* oder nach der Sequenzierung bestätigt werden konnte. Daher wurde in einem RACE-Verfahren (*rapid amplification of cDNA ends*) versucht, die fehlenden 5'-Sequenzabschnitte durch PCR aus den cDNA-Pools des olfaktorischen Bulbus und des Gehirns mit einem Primer, der spezifisch an das 5'-Ende des partiellen *ztbr1*-Klons bindet und stromaufwärts weist, zu amplifizieren. Insgesamt wurden 14 Klone unterschiedlicher Länge erhalten und sequenziert, von denen 8 homolog zu *ztbr1* waren. Keiner dieser 8 RACE-amplifizierten Sequenzabschnitte ging jedoch über die Länge des bereits vorliegenden partiellen *ztbr1*-Klons hinaus. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass in den cDNA-Bibliotheken keine oder nur sehr wenige vollständige *ztbr1*-Sequenzen vorliegen, die in der RACE-PCR als Matritze hätten dienen können.

### 2.3.2 Das *ztbr1* Gen des Zebrabärblings.

Es konnten zwei partielle cDNA-Klone des *ztbr1* Gens isoliert werden, die eine ungefähre Länge von 2.2 kb besitzen. Die cDNA wurde von beiden Seiten ansequenziert und ergab, dass beide Klone über polyA-Sequenzen an den 3'-Enden verfügen und somit in der 3'-Richtung vollständig sind. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des *ztbr1* zeigt starke Homologien zu den *Tbr1* Genen von Maus und Mensch und ist phylogenetisch weiter von den

anderen Mitgliedern der *Tbr*-Genfamilie entfernt (**Abb. 35B**). Das *ztbr1* ist jedoch den *Tbr* Genen anderer Spezies näher verwandt als den übrigen T-box Genen des Zebrabärblings.

Unabhängig von den hier beschriebenen Versuchen das *Tbr1*-homologe Gen des Zebrabärblings zu isolieren, wurden die Sequenzen der *tbr1* und *tbr2* (Eomesodermin) Gene des Zebrabärblings veröffentlicht (Mione et al., 2001). Interessanterweise konnten auch von Mione et al. (2001) nur unvollständige cDNA-Klone des *tbr1* Gens isoliert werden. Die veröffentlichte Sequenz, die der längsten von drei unterschiedlich langen Fragmenten der gleichen cDNA entspricht, ragt in der 5'-Richtung lediglich um 151 bp über den in dieser Arbeit isolierten *ztbr1* cDNA-Klon hinaus. Es ist bemerkenswert, dass trotz unterschiedlicher Verfahren und cDNA-Bibliotheken durch die Arbeiten von Mione et al., (2001) kein vollständiger oder substanziell längerer Klon identifiziert werden konnte.



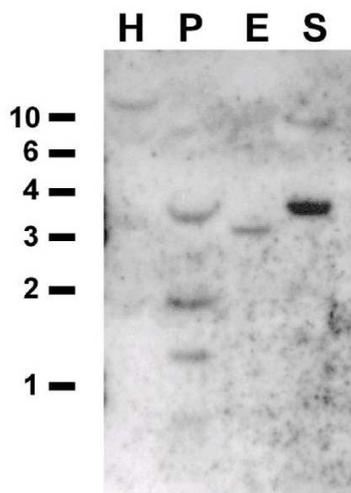
**Abb. 35 – Sequenzvergleich des *ztbr1* mit weiteren Mitgliedern der T-box Genfamilie.**

**A.** Sequenzvergleich der ersten 187 Aminosäuren der abgeleiteten Proteinsequenz des *ztbr1* mit den Proteinsequenzen der *Tbr* Gene von Maus, Mensch, Krallenfrosch und Zebrabärbling. Die grau unterlegte Sequenz entspricht der T-box, die Pfeile geben den Bereich der Proteinsequenz an, der von der im Southern Blot verwendeten DNA-Sonde überspannt wird. Der direkte Vergleich weist auf eine stärkere Ähnlichkeit des *ztbr1* zu den *Tbr1* Genen von Mensch und Maus hin. **B.** Phylogenetischer Stammbaum der T-box Gene. Der Vergleich basiert auf den abgeleiteten vollständigen Aminosäuresequenzen der *Tbr* Gene von Mensch, Maus, Krallenfrosch und Zebrabärbling (hellgrau) und aller bekannten T-box Gene des Zebrabärblings (dunkelgrau). Das *ztbr1* zeigt die größte Verwandtschaft mit dem *Tbr1* von Mensch (hTbr1) und Maus (mTbr1). Die Sequenzähnlichkeiten zu den Vertretern der *Tbr* Gene anderer Spezies sind ausgeprägter als die Übereinstimmungen mit anderen T-box Genen des Zebrabärblings. (hTbr2: *Homo sapiens* Tbr2, mTbr2, *Mus musculus* Tbr2, xEom: *Xenopus laevis* Eomesodermin, zEOM: *Danio rerio* Eomesodermin, tbx2: *Danio rerio* T-box Transkriptionsfaktor tbx2, tbx4: *Danio rerio* T-box Transkriptionsfaktor tbx4, tbx5: *Danio rerio* T-box Transkriptionsfaktor tbx5, tbx6: *Danio rerio* T-box6, tbx16: *Danio rerio* T-box containing protein, tbx20: *Danio rerio* T-box Transkriptionsfaktor tbx20, hrt: *Danio rerio* H15-related T-box transcription factor (tbx20), tbxT-box transcription factor, hrt: Zebrabärbling Transkriptionsfaktor hrT, spt: Zebrabärbling *spade tail*, tbx-c: *Danio rerio* T-box protein (tbx-c), spt: *Danio rerio* spadetail (spt), Brachyury: *Danio rerio* Brachyury protein homolog (T-box protein ZFT). Der Stammbaum basiert auf der Kimura Protein Distance Matrix und dem UPMGA Algorithmus, die Kalibrationsmarke entspricht 10% Aminosäureaustausch.

### 2.3.3 Die Größe der *ztb*-Genfamilie des Zebrabärblings – Southern Analyse.

Die Größe der *ztbr*-Genfamilie des Zebrabärblings sollte durch eine Southern Analyse bestimmt werden. Die Kenntnis des Genfamilienumfanges wäre hinsichtlich der Versuche, weitere Mitglieder der *ztbr*-Genfamilie zu isolieren, hilfreich. So wurde vor allem versucht, auch das *Tbr3*-homologe Gen des Zebrabärblings zu isolieren, da es bei der Maus eine wesentlich exklusivere Expression in den Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus besitzt. Durch die Southern Analyse könnte abgeschätzt werden, ob und wie viele weitere Mitglieder die *ztbr*-Genfamilie des Zebrabärblings umfasst.

Genomische DNA des Zebrabärblings wurde mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen fragmentiert und unter niedrig- und hochstringenten Bedingungen mit einer DIG-dUTP-markierten, 240 bp umfassenden Sonde, die einem Teil der T-box des *ztbr1* Gens entspricht (dargestellt in **Abb. 35A**), hybridisiert (**Abb. 36**). In den Laufspuren mit *Hind* III, *Eco* RI und *Sac* I verdauter genomischer DNA treten jeweils zwei und in der Laufspur mit *Pst* I verdauter DNA vier hybridisierende Banden auf. Die Verdopplung der hybridisierenden Banden in dem *Pst* I Restriktionsverdau könnte auf das Vorkommen einer *Pst* I Restriktionsschnittstelle zurückgeführt werden, die innerhalb der zur Sondenherstellung verwendeten Sequenz erkannt wurde. Die Southern Blot Analyse weist daher auf das Vorkommen von mindestens zwei unterschiedlichen Mitgliedern der *ztbr*-Genfamilie beim Zebrabärbling hin. Da das *Tbr2*-homologe Gen, das Eomesodermin, bereits identifiziert wurde (Mione et al., 2001), erscheint das Vorkommen eines *Tbr3*-Homologs beim Zebrabärbling zunächst unwahrscheinlich. Es kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass ein *Tbr3*-verwandtes Gen auch beim Zebrabärbling vorkommt, jedoch mit der verwendeten Sonde unter den gewählten Hybridisierungsbedingungen nicht erkannt wurde.



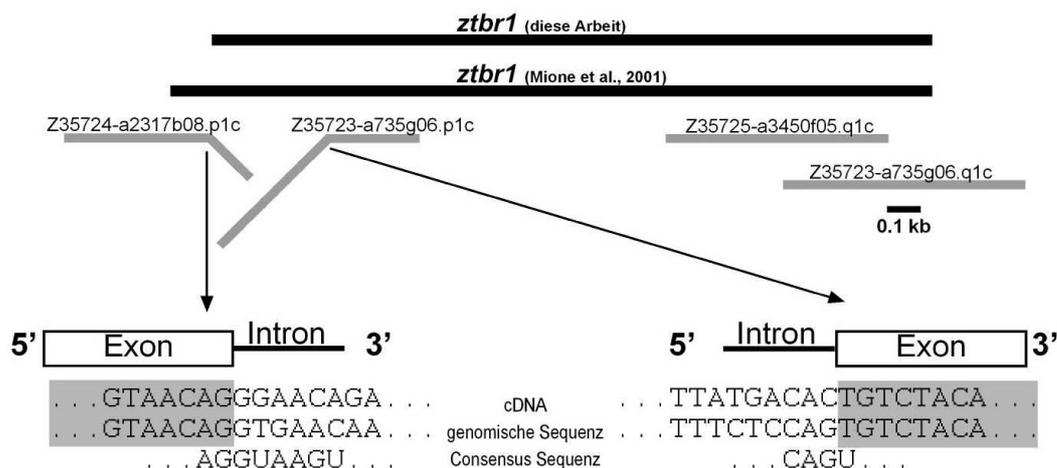
**Abb. 36 – Die Größe der *ztbr*-Genfamilie - Southern Analyse.**

Genomischer Southern Blot. Genomische DNA des Zebrabärblings wurde mit *Hind* III (H), *Pst* I (P), *Eco* RI (E) und *Sac* I (S) Restriktionsendonukleasen verdaut und mit einer 240 bp umfassenden DIG-dUTP-markierten DNA Sonde aus der T-box der *ztbr1*-cDNA hybridisiert. In den Laufspuren mit *Hind* III, *Eco* RI und *Sac* I verdauter DNA sind jeweils 2, in der Laufspur des *Pst* I Restriktionsverdau hingegen 4 hybridisierende Banden erkennbar. Die Ergebnisse weisen auf das Vorkommen von mindestens zwei unterschiedlichen Mitgliedern der *Tbr*-Genfamilie beim Zebrabärbling hin. Am linken Bildrand sind die Fragmentgrößen in kb angegeben.

Soweit möglich, wurden Aspekte der genomischen Organisation des *ztbr1*-Gens untersucht. Das Genom des Zebrabärblings wird durch ein Genomprojekt vollständig sequenziert. Die bekannten genomischen Sequenzen sind in einer Datenbank unter [www.ncbi.nlm.nih.gov/traces](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/traces) einsehbar. Unter der Voraussetzung, dass die in einer Datenbanksuche erzielten genomischen Sequenzen über die zur cDNA-Suchsequenz homologen Abschnitte hinausgehen, können Aussagen über die Intron-Exonstruktur der

jeweiligen Gene gemacht werden. Durch einen Vergleich der vollständigen *ztbr1* Sequenz (Mione et al., 2001) mit der genomischen Datenbank des *Zebrafish Genom Projects* konnten insgesamt 4 genomische Sequenzen, die Homologie zu *ztbr1* zeigen, gefunden werden (Abb. 37). Eine dieser genomischen Sequenzen ist auf ihrer gesamten Länge mit einem Abschnitt der *ztbr1*-cDNA-Sequenz identisch, eine weitere besitzt eine 100%-ige Homologie zum 3'-UTR der cDNA und ragt um zusätzliche 300 bp über das 3'-Ende der cDNA in genomische Abschnitte hinein. Für zwei genomische Sequenzen konnten nur partielle Homologien jeweils eines zusammenhängenden Sequenzabschnittes mit der cDNA gefunden werden. Ein Abschnitt der Sequenz Z35724-a2317b08.p1c ist zu den ersten 120 bp der *ztbr1*-Sequenz von Mione et al. (2001) homolog. In der 5'-Richtung findet sich ein zusätzlicher Sequenzabschnitt, der für einen offenen Leserahmen von 46 Aminosäuren kodiert, welcher kontinuierlich an das Leseraster der *ztbr1* Proteinsequenz anschließt. In der 3'-Richtung zeigen die restlichen 163 Nukleotide der genomischen Sequenz keine weitere Homologie zur *ztbr1*-cDNA. Flankierend zu diesem Bruchpunkt konnten Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz eines 5'-Exon Splicesignals gefunden werden (Abb. 37). Für die Sequenz Z35723-a735g06.p1c wurde erst beginnend ab der Nukleotidposition 458 eine 100%-ige Sequenzübereinstimmung zur cDNA bestimmt. Hier weist der Bruchpunkt erwartungsgemäß Übereinstimmung mit der Konsensussequenz für ein 3'-Splicesignal auf (Abb. 37). Das *ztbr1* Gen weist daher höchstwahrscheinlich mindestens zwei Intronstrukturen auf, für die entweder der Beginn oder das Ende identifiziert werden konnte. Darüber hinaus sind zusätzliche Introns denkbar, die aufgrund der noch wenig umfangreichen genomischen Sequenzdatenbank nicht erkannt werden konnten.

Bei einem Versuch die genomische Sequenz des *ztbr1* in der 5'-Richtung zu komplettieren konnten sowohl mit der ermittelten 5'-anschließenden genomischen Sequenz als auch mit den 5'-UTRs und den 5'-Enden der proteinkodierenden Sequenzen der *Tbr* Gene von Mensch und Maus keine weiteren Sequenzübereinstimmungen mit der genomischen Zebrafisch Datenbank gefunden werden.



**Abb. 37 – Mögliche Intron-Exon Splicepunkte des *ztbr1* Gens.**

Vergleich der cDNA-Sequenz des *ztbr1* mit der Lage bekannter genomischer Sequenzabschnitte des *Zebrafish Genome Projects*. Die Fragmentklone der *ztbr1* cDNA (*schwarz*) umfassen 2.2 kb. An diese Sequenz können insgesamt 4 genomische Sequenzen (*grau*) angepasst werden. Die Beschriftungen geben die Identitäten der genomischen Sequenzen in der genomischen Datenbank an (EMBL trace). Es können durch diesen Vergleich zwei putative Exon-Intron-Übergänge vorhergesagt werden. Die Bruchpunkte zwischen cDNA und genomischer Sequenz weisen Übereinstimmungen mit den Konsensussequenzen (Stryer, 1988) für 5'-Donor- (*links*) und 3'-Akzeptorstellen (*rechts*) der Intron-Splicesignale auf.

### 2.3.4 Expression des *tbr1* Gens im Gehirn adulter Zebrabärblinge.

Das *ztbr1* Gen wurde in der Absicht, einen mitralzellspezifischen Marker zu identifizieren, homologiekloniert. Das Expressionsmuster des *ztbr1* wurde daher durch *In situ*-Hybridisierungen an Totalpräparaten des Gehirns adulter Zebrabärblinge überprüft.

Mit einer DIG-UTP markierten *antisense* RNA-Sonde, die der vollständigen Länge der *ztbr1*-cDNA entspricht, wurden spezifisch und reproduzierbar distinkte Zellen im olfaktorischen Bulbus und im angrenzenden Telencephalon markiert. Außerhalb des Vorderhirns konnte keine *ztbr1*-Expression beobachtet werden (Abb. 38A). Im Telencephalon ist die *ztbr1*-Expression überwiegend auf die dorsalen Abschnitte beschränkt und ist in anteriomedial nach posteriolateral verlaufenden Bändern des anterioren Abschnittes des Vorderhirns besonders stark (Abb. 38A).

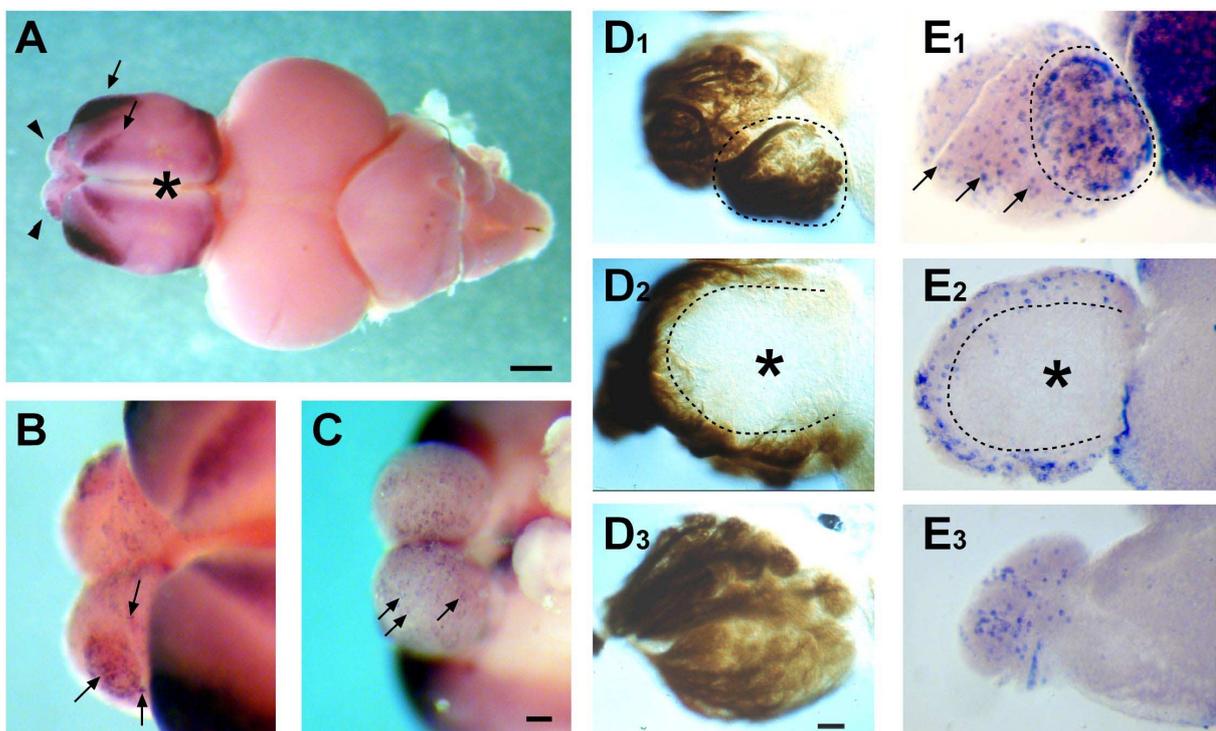


Abb. 38 – *ztbr1* Expression im Gehirn adulter Zebrabärblinge – *In situ* Hybridisierung.

Analyse des Expressionsmusters des *ztbr1* Gens im Gehirn adulter Zebrabärblinge durch *In situ*-Hybridisierung. Die DIG-UTP-markierte *antisense* RNA-Sonde entspricht der gesamten Länge der *ztbr1*-cDNA, NBT/BCIP Entwicklung. **A.** Gesamtübersicht der *ztbr1* Expression, Totalpräparat des Gehirns, dorsale Ansicht. Nur im Vorderhirn (*Sternchen*) ist eine deutliche Färbung detektierbar. Die *ztbr1*-Expression ist im olfaktorischen Bulbus (*Pfeilköpfe*) und im angrenzenden Telencephalon (*Sternchen*) besonders deutlich. Im Telencephalon treten zwei diagonal verlaufende Expressionsbänder auf (*Pfeile*) **B.** Detailansicht des olfaktorischen Bulbus aus **A.**, dorsale und **C.** ventrale Betrachtung. Im olfaktorischen Bulbus wird das *ztbr1* in einer distinkten Neuronenpopulation exprimiert (*Pfeile*). Gelegentlich können Orte mit einer höheren Expressionsdichte erkannt werden (zwischen den Pfeilen in **B**). **D.**, **E.** Vergleich zwischen der Anordnung der Glomeruli (**D**) und der *ztbr1* Expression (**E**) in unterschiedlichen horizontalen Schnittebenen (1: dorsal, 2: intermediär, 3: ventral). Das glomeruläre Muster (**D**) wurde mit einer  $\alpha$ -zns2-Antikörperfärbung dargestellt (von A. Çelik zur Verfügung gestellt). Die Anordnung *ztbr1*-exprimierender Zellen im olfaktorischen Bulbus folgt der Anordnung der Glomeruli. **D**<sub>1</sub>, **E**<sub>1</sub>. Bereiche mit hoher Glomerulusdichte (*gestrichelte Linie*), wie z.B. das dorsale Cluster, weisen eine größere Dichte *ztbr1*-positiver Neurone auf. Deutlich können einzelne Zellen erkannt werden (*Pfeile*). **D**<sub>2</sub>, **E**<sub>2</sub>. Auf intermediären Bulbusschnitten sind sowohl die Glomeruli als auch die Mitralzellen auf einen äußeren Kranz beschränkt, *gestrichelte Linie*: Abgrenzung der glomerulären Schicht nach innen, *Sternchen*: innere Zellmasse. **D**<sub>3</sub>, **E**<sub>3</sub>. Auf der Ventralseite sind sowohl die Glomeruli als auch die Mitralzellen gleichmäßig verteilt. Der Maßstab entspricht 500  $\mu$ m in **A**, 100  $\mu$ m in **B** und **C**, 50  $\mu$ m in **D** und **E**.

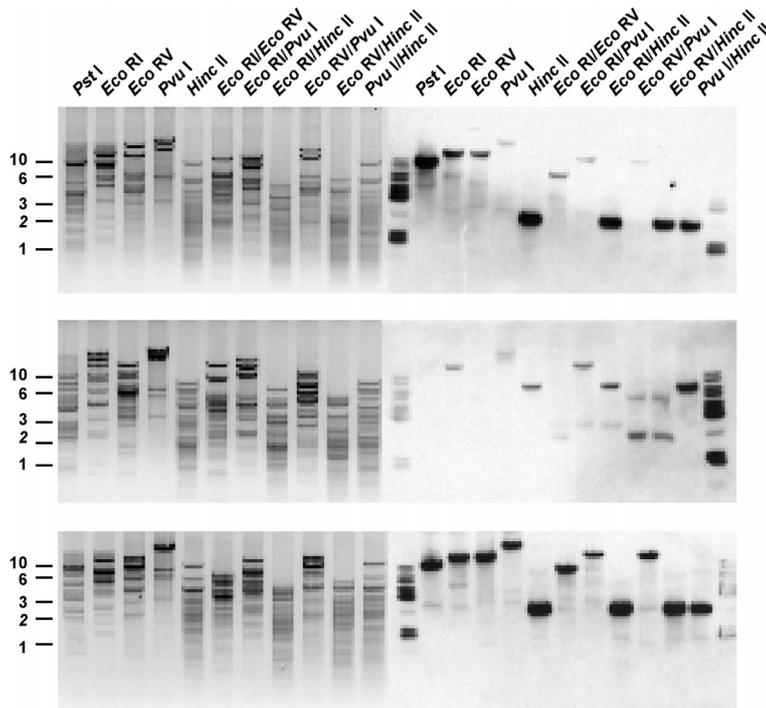
Im olfaktorischen Bulbus ist die Expression auf eine Teilpopulation von Zellen innerhalb und unterhalb der glomerulären Schicht beschränkt (**Abb. 38B, C, E**). Die Anzahl positiver Zellen wurde an vollständigen Vibratonschnittserien durch den olfaktorischen Bulbus bestimmt und liegt bei durchschnittlich  $1.263 \pm 150$  Zellen/Bulbus ( $n = 4$ ). In den dorsalen Abschnitten des olfaktorischen Bulbus fällt eine deutliche Gruppierung *ztbr1*-positiver Zellen im Bereich des dorsalen glomerulären Clusters auf (**Abb. 38D, E**). Auf intermediären Schnitten entlang der dorsoventralen Bulbusachse ist die Expression auf einen Kranz von Zellen, der den Bulbus umgibt, eingeschränkt, wohingegen auf der Ventralseite des olfaktorischen Bulbus *ztbr1*-positive Zellen nur spärlich sind und in einer verstreuten Anordnung angetroffen werden.

Die *ztbr1*-positiven Zellen sind im Bulbusgewebe überwiegend innerhalb bis unterhalb der glomerulären Schicht lokalisiert. Die Verteilung der *ztbr1*-exprimierenden Zellen ist mit der Anordnung des glomerulären Muster identisch. Bereiche mit sehr dichter Glomerulusstruktur, wie z.B. das dorsale Cluster, weisen eine höhere Dichte *ztbr1*-positiver Zellen auf (**Abb. 38D<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>**). Die geringere Anzahl positiver Zellen auf der Ventralseite korreliert hingegen gut mit der relativ geringen Anzahl und spärlichen Anordnung ventraler Glomeruli (**Abb. 38D<sub>3</sub>, E<sub>3</sub>**). In den intermediären Abschnitten umgeben Glomeruli den gesamten Bulbus. Entsprechend werden auch *ztbr1*-positive Neurone in dieser Schicht gefunden (**Abb. 38D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>**). Die Lokalisation der *ztbr1*-exprimierenden Zellen, deren Dichte und Apposition zu den Glomeruli macht es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei den markierten Zellen, wie z.B. bei der Maus, um die Mitralzellen handelt.

### **2.3.5 Isolierung und Identifizierung genomischer *ztbr1*-Klone.**

Auch für das *ztbr1* Gen sollten flankierende genomische Sequenzen gefunden und auf ihre Promotoraktivität hin untersucht werden. Dazu wurde wie für das *zOMP* zunächst eine genomische Bibliothek mit einer 5'-Sonde der *ztbr1*-cDNA hybridisiert. Die Hybridisierung der genomischen PAC-Bibliothek ergab insgesamt 4 stark hybridisierende Klone, die vom RZPD bezogen wurden. Im *Rescreen* konnten 3 der erhaltenen Klone zunächst bestätigt werden und wurden daher durch eine PAC Southern Analyse weiter untersucht (**Abb. 39**). Da nur eine begrenzte Information über die genomische Organisation des *ztbr1* Gens erhalten werden konnte (**Abb. 37**), jedoch von einer komplizierten Intron-Exonstruktur ausgegangen werden muss, wurden die PAC-Klone, in der Absicht ein genomisches 5'-Fragment des Gens zu identifizieren, erneut mit einer 5'-Sonde der *ztbr1*-cDNA hybridisiert. Die Bandenmuster des Restriktionsverdau waren für jeden der drei PAC-Klone verschieden voneinander, was die Klone als eigenständige genomische Fragmente ausweist (**Abb. 39**). Die Muster der hybridisierenden Banden waren jedoch für zwei der drei PAC-Klone identisch. Daher ist davon auszugehen, dass beide Klone zwar das gleiche Gen, jedoch unterschiedliche flankierende genomische Abschnitte enthalten. Die hybridisierenden Restriktionsfragmente besaßen Grössen von 2 bis 15 kb. Es wurde versucht, unterschiedliche Fragmente aus präparativen Restriktionsspaltungen der PAC-DNA zu isolieren und in den Vektor pBluescript II KS zu subklonieren. Trotz umfangreicher Bemühungen war es nicht möglich,

ein hybridisierendes 7.5 kb *Eco* RI/*Eco* RV Fragment, ein 11 kb *Eco* RV Fragment oder ein 12 kb *Eco* RI Fragment zu subklonieren. Lediglich ein 2 kb *Hinc* II Fragment des PAC-Klons 4 konnte erfolgreich subkloniert und sequenziert werden. Erstaunlicherweise zeigte die ermittelte Nukleotidsequenz nur eine mäßige Übereinstimmung mit der *Tbr*-Genfamilie und entsprach keinem der bekannten T-Box Gene des Zebrafärblings oder der Maus vollständig. Die größte Übereinstimmung des subklonierten *Hinc* II Fragmentes wurde mit dem *tbr2* (Eomesodermin) Gen des Zebrafärblings gefunden.



**Abb. 39 – Southern Analyse der genomischen PAC-Klone.**

Southern Analyse der genomischen *zbr1*-postiven PAC-Klone. PAC-DNA der Klone 1 (oben), 3 (mitte) und 4 (unten) wurde mit unterschiedlichen Kombinationen von Restriktionsendonukleasen fragmentiert und mit einer DIG-dUTP-markierten 5'-Sonde der *tbr1*-cDNA hybridisiert. Am linken Bildrand ist die Fragmentgröße in kb angegeben. Die Bandenmuster der Restriktionsspaltungen (links) sind für jeden der drei Klone unterschiedlich.

Die Hybridisierungsmuster (rechts) sind für die Klone 1 (oben) und 4 (unten) identisch, jedoch verschieden von Klon 2 (mitte).

## 2.4 Zusammenfassende Beurteilung.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Absicht verfolgt, die drei Hauptebenen des neuronalen Verarbeitungsschaltkreises im *Bulbus olfactorius* durch das Expressionsmuster zelltypspezifischer Gene darzustellen und mögliche regulatorische Sequenzen dieser Gene zu isolieren, um einen experimentellen Zugang zu diesen Ebenen zu erzielen. Bisher ist dieses Vorhaben für die Ebene der Riechsinneszellen mit dem *zOMP* Gen und dem entsprechenden *zOMP*-Promotor am weitesten fortgeschritten.

Die spezifische Expression bestimmter Gene eignet sich grundsätzlich hervorragend, um in komplexen neuronalen Strukturen bestimmte Zelltypen individuell anzusprechen. Sowohl die Riechsinneszellen als auch die Interneurone und die Mitralzellen konnten in der vorgelegten Arbeit durch das Expressionsmuster eines zelltypspezifischen Gens dargestellt werden. Die Erfahrung mit dem *zOMP*-Promotor lehrt, dass u.U. recht einfache Konstrukte eine hohe Spezifität der Expression von Strukturgenen in der respektiven Zellpopulation erzielen können. Allerdings zeigen die Untersuchungen der Gene *dlx2* und *zbr1* auch, welche methodischen Probleme auftreten können. So zeigte die Untersuchung des *dlx2*, dass wirksame regulatorische Sequenzen nicht unbedingt in den 5'-flankierenden genomischen

Abschnitte liegen müssen und wesentlich kompliziertere Organisationen aufweisen können. Die Untersuchung des *ztbr1* hat gezeigt, dass bereits die Identifizierung eines positiven genomischen Klons besondere Probleme bereiten kann. Vor allem bei umfangreichen Genfamilien oder strukturell stark verwandten Genen mit hochkonservierten Sequenzmotiven kann es daher leicht zu Verwechslungen kommen.

Wie die im folgenden Abschnitt dargestellte funktionelle Anwendung des *zOMP*-Promotors jedoch zeigt, ist die weitere Verfolgung solcher Ansätze und die Komplettierung der hier begonnenen Bemühungen verheissungsvoll, da zelltypspezifische Promotoren ein fruchtbares experimentelles Werkzeug an der Schnittstelle zwischen Molekularbiologie und Physiologie darstellen.

### 3. DIE ANWENDUNG MOLEKULARGENETISCHER CALCIUMINDIKATOREN IM OLFAKTORISCHEN SYSTEM DES ZEBRABÄRBLINGS.

Die Messung neuronaler Aktivität einzelner Neurone und neuronaler Gewebe durch Calciumindikatoren ist im Laufe der letzten Jahre zu einem Standardverfahren mit einer breiten Anwendbarkeit auf unterschiedliche biologische Probleme entwickelt worden. Etwa zur gleichen Zeit hat die Anwendung genetisch kodierter *in vivo*-Farbstoffe, wie z.B. des *green fluorescent protein* (GFP) ebenfalls einen Durchbruch in der modernen Neuroanatomie, der Entwicklungsbiologie und Biochemie erzielt. In jüngster Zeit hat eine logische Verbindung der beiden Ansätze ein Interesse an der Entwicklung neuartiger Calciumindikatoren geschaffen, die auf Variationen des GFP-Moleküls aufbauen. Diese proteinbasierten Messproben besitzen gegenüber herkömmlichen calciumabhängigen Farbstoffen den Vorteil, dass sie durch die Wahl eines geeigneten Expressionssystems auch in schwer zugänglichen Geweben, spezifischen Zellpopulationen oder subzellulären Kompartimenten *in vivo* exprimiert werden könnten. Dabei sind bisher zwei Typen genetischer Calciumindikatoren aufgrund ihres Funktionsmechanismus grundsätzlich zu unterscheiden. Das von Roger Tsien (Miyawaki et al., 1997, 1999) entwickelte *CaMeleon* besteht aus zwei spektral unterschiedlichen GFP-Varianten (z.B. aus dem zyanen und dem gelben fluoreszierenden Protein), in denen durch Calciumbindung und Strukturveränderung des Komplexes ein Resonanztransfer des erregenden Photons ermöglicht wird. Die Calciumindikatoren *CaMgaroo* (Miyawaki et al., 1997) und die zirkular permutierten Variationen *pericam* (Nagai et al., 2001) basieren auf dem *enhanced yellow fluorescent protein* (EYFP). In diesen Messproben führen calciumabhängige Veränderungen der Tertiärstruktur zu Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften des EYFP.

Der Einsatz proteinbasierter Calciumindikatoren im olfaktorischen System wäre vor allem für die schwer zugänglichen Mitral- und Körnerzellen des olfaktorischen Bulbus interessant. Es kann jedoch nicht *a priori* davon ausgegangen werden, dass jede der oben angesprochenen Messproben im Zebrafischmodell, speziell im olfaktorischen System effektiv ist. Daher sollte zunächst die generelle Anwendbarkeit dieser Indikatoren für *in vivo* Calciummessungen beim Zebrafisch untersucht werden. Mit dem *zOMP*-Promotor wurde ein effektives molekulargenetisches Werkzeug zur gezielten Expression von Reportergenen in den Riechsinneszellen entwickelt. Damit steht ein adäquates Testsystem für die Expression und die Untersuchung der genetischen Calciumindikatoren zur Verfügung.

#### 3.1 Geruchsstoffinduzierte Aktivität in den Riechsinneszellen und im olfaktorischen Bulbus embryonaler Zebrafische.

Ein geeigneter und zudem einfacher experimenteller Ansatz, die proteinbasierten Calciumindikatoren im lebenden Gewebe des olfaktorischen Systems des Zebrafisches zu untersuchen, ist die Verwendung transient transgener Embryonen. Der Vorteil transient transgener Tiere für die hier untersuchte Fragestellung liegt in der mosaikalen Expression des

Transgens. Durch die geringe Dichte reportergenexprimierender Riechsinneszellen kann in den embryonalen olfaktorischen Plakoden eine gute Einzelzellauflösung erreicht werden. Daher können individuelle Neuronen angesprochen und wiederholt mit unterschiedlichen Stimuli gereizt werden. Ein weiterer methodischer Vorteil ist die unkomplizierte und rasche Herstellung der transient transgenen Embryonen. Im Gegensatz dazu würde die Etablierung einer transgenen Linie aufgrund der 3 - 5 monatigen Populationszeiten ein wesentlich langwierigeres Verfahren zur Charakterisierung mehrerer Konstrukte darstellen.

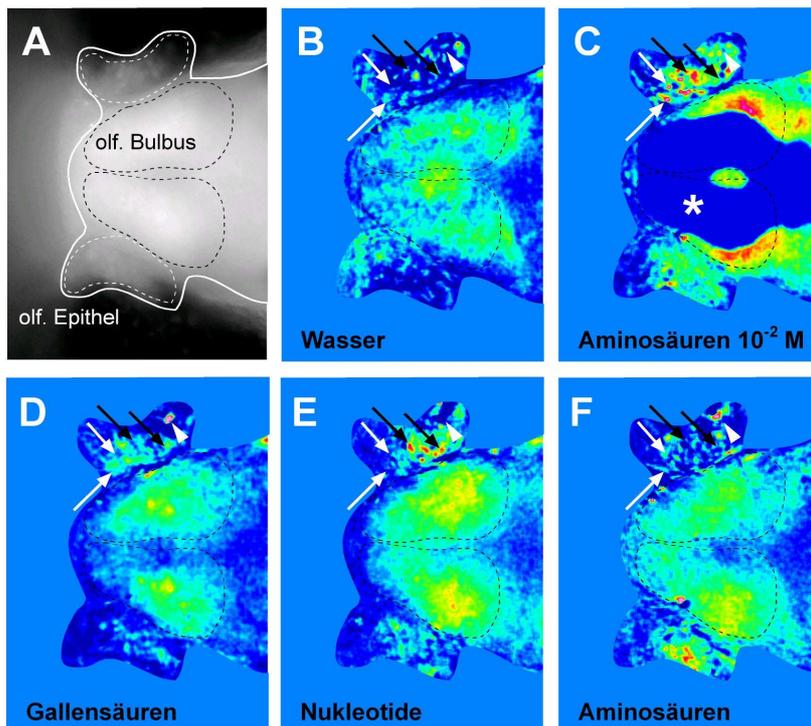
Bisher liegt jedoch keine funktionelle Analyse des Geruchssystems embryonaler Zebrafische vor. Es war nicht bekannt, ab welchem Entwicklungszeitpunkt das Geruchssystem funktionell entwickelt ist und ab welchem ontogenetischen Stadium die ersten Geruchsantworten für die bekannten Geruchsstoffe auftreten. Lediglich für die Geruchsrezeptoren war bekannt, dass die ersten Rezeptorgene bereits bei 18 hpf exprimiert werden (Barth et al., 1996). Im Folgenden wird die Expression weiterer Geruchsrezeptorgene zu unterschiedlichen Zeitpunkten angeschaltet. Ab 24 hpf wurden *zOMP*-positive Zellen, die als ausdifferenziert angesehen werden können, im Riechepithel erkannt (**Abb. 26**). Zum gleichen Zeitpunkt können auch die axonalen Projektionen dieser Zellen im olfaktorischen Bulbus identifiziert werden. Welche Geruchsstoffe zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt von dem jeweils vorliegenden Geruchsrezeptorrepertoire erkannt werden, war zunächst unklar. Um die Effektivität der genetischen Calciumindikatoren richtig einschätzen zu können, war es daher notwendig, zuvor das Aktivitätsprofil von Fischen während der frühen Ontogenese zu untersuchen. Dazu wurde der calciumsensitive Farbstoff Calcium green<sup>TM</sup>-1 dextran in frühe Blastomeren frisch befruchteter Eizellen injiziert. Das Auftreten von Geruchsantworten wurde ab dem zweiten Tag nach der Befruchtung untersucht.

Calcium green-1 dextran-injizierte Embryonen zeigten eine starke Farbstoff-Fluoreszenz in allen Körpergeweben. Besonders das Hirngewebe fluoreszierte wegen seiner kompakten Struktur besonders hell. Auch in den olfaktorischen Plakoden und im olfaktorischen Bulbus kann die Fluoreszenz des Farbstoffs erkannt werden (**Abb. 40A**). Da sehr frühe Embryonalstadien mit dem Farbstoff markiert wurden, ist die Farbstoffaufnahme nicht auf bestimmte Gewebe oder auf Einzelzellen beschränkt.

Bereits zu einem Entwicklungszeitpunkt von 48 hpf konnten in den Riechsinneszellen der olfaktorischen Plakoden durch Aminosäuren, Nukleotide und Gallensäuren Calciumsignale stimuliert werden (**Abb. 40C, D, E, F**). Alle drei Geruchsstoffklassen wirkten erregend auf die Riechsinneszellen und den olfaktorischen Bulbus. In den Riechepithelien konnte eine, wenn auch durch die Projektion stark überlappend erscheinende, räumliche Verteilung der jeweils antwortenden Sinneszellen in Abhängigkeit von der Geruchsstoffklasse beobachtet werden. Aminosäuren erregten Signale in der gesamten Ausdehnung der Plakode (**Abb. 40C, F**), wohingegen durch Gallensäuren überwiegend weiter anterior gelegene (**Abb. 40D**) und durch Nukleotide weiter posterior gelegene Zellen (**Abb. 40E**) stimuliert wurden. Zellen, die durch eine Substanzklasse, z.B. Nukleotide, erregbar waren, waren in der Regel unempfindlich für die Stimulation mit anderen Geruchsstoffklassen (**Abb. 40**).

Die Stimulation mit jeder der drei Substanzklassen erregte auch starke Calciumsignale in den olfaktorischen Bulbi. Im Gegensatz zu der in Abschnitt **IV.1** beschriebenen substanzklassenspezifischen Repräsentation von Geruchsstoffen, entsprachen die unter den

hier verwendeten Färbebedingungen aufgezeichneten Bulbussignale jedoch keiner funktionellen Subkompartimentierung des Bulbus. Unabhängig von der verwendeten Geruchsstoffklasse wurden Calciumsignale im gesamten olfaktorischen Bulbus beobachtet (Abb. 40). Durch die Markierung von Blastomeren sehr früher Embryonalstadien werden entsprechend alle Zelltypen des olfaktorischen Bulbus mit dem Farbstoff markiert. Die hier beobachteten Aktivitätsveränderungen spiegeln demnach die Aktivität im gesamten neuronalen Netzwerk des embryonalen *Bulbus olfactorius* wider, die erwartungsgemäß weitreichender und weniger lokalisiert sind, als die praesynaptische Aktivität der Riechsinneszellen in den Glomeruli.



**Abb. 40 – Calciummessungen im embryonalen Riechepithel und olfaktorischen Bulbus .**

A. Fluoreszenzaufnahme eines Calcium green<sup>TM</sup>-1 injizierten 48 hpf Embryos. Die Farbstoff-Fluoreszenz ist in allen Geweben zu erkennen. Der olfaktorische Bulbus (*schwarze Kontur*) ist besonders stark gefärbt. Die Konturlinie der Maske aus B-F ist wiederholt (*weisse Linie*). B. Kontrollstimulation mit Wasser als Blindprobe. In den olfaktorischen Bulbi tritt eine mäßig starke Hintergrundaktivität auf. C. Stimulation mit einer Mischung unterschiedlicher Aminosäuren ( $10^{-2}$  M). Die Aminosäuren stimulieren einzelne Zellen des Riechepithels (*weiße Pfeile*), die nicht durch andere Geruchsstoffe erregt werden (*Sternchen*: überblendeter Bereich). D. Stimulation mit unterschiedlichen Gallensäuren ( $10^{-4}$ M). *Pfeilkopf*: selektiv durch Gallensäure aktivierte Zelle. E. Stimulation mit Nucleotiden ( $10^{-4}$  M), *schwarze Pfeile*: selektiv durch Nucleotide erregbare Zellen. F. Stimulation mit Aminosäuren ( $10^{-4}$  M). Für jede Geruchsstoffklasse sind Zellen erkennbar, die selektiv durch diese Klasse erregt werden. Die Calciumänderungen im olfaktorischen Bulbus weisen keine substanzspezifischen Muster auf, da alle Zelltypen mit dem Farbstoff angefärbt wurden.

Bereits zu einem sehr frühen Entwicklungszeitpunkt sind im embryonalen Riechepithel und olfaktorischen Bulbus geruchsstoffinduzierte Calciumänderungen messbar. Die Aktivität in den olfaktorischen Plakoden kann mit individuellen Riechsinneszellen korreliert werden, wohingegen die Aktivität im olfaktorischen Bulbus diffus ist und im gesamten Bulbusgewebe auftritt. Für die im Folgenden beschriebenen Experimente ist es jedoch eine entscheidende Voraussetzung, dass die Riechsinneszellen früher Zebrafischembryonen bereits durch die bekannten Geruchsstoffe stimuliert werden können. Es ist daher wahrscheinlich, dass bei der mosaichen Expression genetischer Calciumindikatoren unter Kontrolle des *zOMP*-Promotors gelegentlich Zellen markiert werden können, die durch die verwendeten Geruchsstoffklassen aktivierbar sind. Daher erscheint eine funktionelle Charakterisierung der genetisch kodierten Calciumindikatoren durch die Verwendung transient transgener Embryonen des Zebrafischembryos möglich zu sein.

### 3.2 *CaMeleon*.

Die für das *CaMeleon* kodierende Sequenz wurde in einen Expressionsvektor unter *zOMP*-Promotorkontrolle inkloniert. Die Expression des *CaMeleon*-Reporterkonstruktes lag etwas unterhalb der für *prOMP*<sub>1,3</sub>-Y beobachteten Häufigkeiten (vergleiche **Abb. 29**). Zum 96 hpf Zeitpunkt konnte in 17.7% (= 40 von 225) der injizierten (n = 1031) und überlebenden Embryonen Fluoreszenz in Riechsinneszellen nachgewiesen werden. Durchschnittlich wurden zu diesem Zeitpunkt 2 markierte Zellen pro positiver Plakode erkannt.

Die Fluoreszenz des Cameleons wurde bei 450 nm Wellenlänge angeregt und die Emission oberhalb von 480 und 535 nm Wellenlänge simultan aufgezeichnet. Die spektralen Halbbilder wurden anschließend aufeinander justiert und das Verhältnis der Fluoreszenz-emissionen der CFP- und YFP-Komponente des *CaMeleons* während der Stimulation mit Geruchsstoffmischungen berechnet. Im Falle eines Anstiegs des intrazellulären Calciummillieus wird ein Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses  $R_{YFP/CFP}$  erwartet, da durch die calciumbedingte Strukturänderung, die Erregung von CFP auf das YFP übergeht. In keinem der untersuchten Embryonen konnten jedoch geruchsstoffinduzierte Calciumsignale mit der *CaMeleon*-Messprobe aufgezeichnet werden (n = 27). Auch die Stimulation durch depolarisierenden Kalium- oder Ammoniumpulsen oder durch elektrische Reizung des Riechepithels führten nicht zu messbaren Veränderungen des Erregungsverhältnisses (nicht gezeigt).

### 3.3 *CaMgaroo*.

In Embryonen, die mit dem *prOMP*<sub>1,3</sub>-CamG Reporterkonstrukt injiziert wurden, konnten keine fluoreszierenden Riechsinneszellen erkannt werden. Insgesamt wurden 2163 Embryonen mit dem Konstrukt injiziert, von denen 26% den 24 hpf Entwicklungszeitpunkt überlebten. Im Falle des *CaMgaroo* ist jedoch unklar, worauf die fehlende Fluoreszenz zurückzuführen ist. Eine mögliche Erklärung könnte in einer schwachen Grundfluoreszenz des *CaMgaroo* liegen, die mit den relativ niedrigen basalen Calciumkonzentrationen unstimulierter Neurone zusammenhängen kann. Da das Transgen in den Riechepithelien der Embryonen nur mosaisch und nicht mit 100%-iger Penetranz exprimiert wird, konnten keine *CaMgaroo*-positiven Embryonen selektioniert und weiter untersucht werden. Es ist jedoch auch denkbar, dass es zu Fehlern in den Expressionskonstrukten während der Klonierung oder zu Faltungsproblemen des *CaMgaroo*s in den Neuronen des Zebrafisches gekommen ist (siehe aber auch Abschnitt **IV3.4.1**, *flash-pericam*)

In einem Kontrollversuch wurden HEK293 Zellen mit dem *CaMgaroo*-Reporter gen transfiziert. Auch in den Kulturzellen, die mit dem Ursprungskonstrukt SVQST Cam2-3 (durch R. Tsien zur Verfügung gestellt) transfiziert wurden und in denen das Reporter gen unter Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert wird, konnte keine Grundfluoreszenz des *CaMgaroo* erkannt werden (mit freundlicher Unterstützung durch A. Çelik). Die Stimulation der HEK293-Zellen mit 100 mM Acetylcholin, das in diesen Zellen zu Calciumtransienten führt (Krautwurst et al., 1998), ergab ebenfalls keine detektierbaren Fluoreszenzsignale (nicht gezeigt).

### 3.4 *pericam*.

#### 3.4.1 *flash-pericam*.

*Flash-pericam* ist in seinen funktionellen Eigenschaften dem *CaMgaroo* grundsätzlich vergleichbar. Steigende Calciumkonzentrationen werden ebenfalls durch einen Anstieg der Fluoreszenz signalisiert und das Signal wird nur bei einer Wellenlänge aufgezeichnet. Allerdings konnte von den 368 überlebenden Embryonen, die mit dem prOMP<sub>1,3</sub>-F Konstrukt injiziert wurden, lediglich in vier Embryonen eine schwache Fluoreszenz in den Riechsinneszellen detektiert werden.

Wie im Falle des *CaMgaroo* war zunächst unklar, ob das *flash-pericam*-Reporterogen nicht exprimiert wird oder aufgrund einer schwachen Fluoreszenz, die durch eine niedrige Calciumkonzentration in den Riechsinneszellen bedingt ist, nicht erkannt werden kann. Die Expression des *flash-pericam*-Proteins sollte daher durch eine Antikörperfärbung gegen das GFP-Epitop in den Plasmid-injizierten Embryonen untersucht werden. Da nicht davon ausgegangen werden konnte, dass die gegenüber GFP veränderte Molekülstruktur des *flash-pericam* durch den  $\alpha$ -GFP-Antikörper erkannt wird, wurden zwei Kontrollansätze mituntersucht. Zum einen wurden unbehandelte Embryonen als Negativkontrolle, zum anderen wurden *invers-pericam*-positive Embryonen (siehe IV.3.4.2) als Positivkontrolle in Parallelansätzen geführt, da sich das *invers-pericam* nur geringfügig von *flash-pericam* unterscheidet, jedoch leichter erkannt werden kann. Erwartungsgemäß konnte in keinem der 20 unbehandelten Embryonen der Negativkontrolle Immunoreaktivität gegen GFP beobachtet werden. In der *invers-pericam*-Kontrollpopulation konnten hingegen eindeutig olfaktorische Sinneszellen durch die Fluoreszenz der  $\alpha$ -GFP-Antikörperbehandlung erkannt werden. Nach der immunhistochemischen Färbung wurden in der untersuchten Population weit mehr fluoreszierende Zellen erkannt als durch die Eigenfluoreszenz des *invers-pericams*. Die beobachteten Häufigkeiten GFP-positiver Zellen entsprachen einer Verdoppelung gegenüber der Zahl an Riechsinneszellen, die durch die Fluoreszenz des Transgens erkannt werden konnte. Vor der immunhistochemischen Färbung wurden 27 *invers-pericam*-positive Zellen in 21 Embryonen gezählt, was einem mittleren Verhältnis von 1.28 entspricht. Die Immunoreaktivität wurde hingegen in doppelt so vielen Zellen erkannt (36 Zellen in 16 Präparaten, durchschnittlich 2.25). In den 27 untersuchten Embryonen, die mit dem *flash-pericam*-Konstrukt injiziert wurden und in denen keine Eigenfluoreszenz erkannt werden konnte, war nach der  $\alpha$ -GFP-Antikörperfärbung eine starke Immunoreaktivität gegen GFP in insgesamt 10 Riechsinneszellen aus 5 Embryonen detektierbar. Aus diesen Ergebnissen können zwei Schlüsse gezogen werden. Zum einen ist der  $\alpha$ -GFP-Antikörper in der Lage das entsprechende Epitop auch in den permutierten Varianten *invers-pericam* und *flash-pericam* zu erkennen. Zum anderen zeigt es deutlich, dass eine basale Expression des *flash-pericam*-Reportergens auch in prOMP<sub>1,3</sub>-F-injizierten Embryonen stattfindet. Darüber hinaus findet auch eine Translation des *flash-pericams* in den Riechsinneszellen korrekt statt. Die Fluoreszenz des *flash-pericams* ist jedoch in den unstimulierten Neuronen nur schwach und kann schlecht detektiert werden. Eine funktionelle Untersuchung dieser Probe in den transient transgenen Embryonen erschien daher schwierig, vor allem, da nicht eindeutig beurteilt

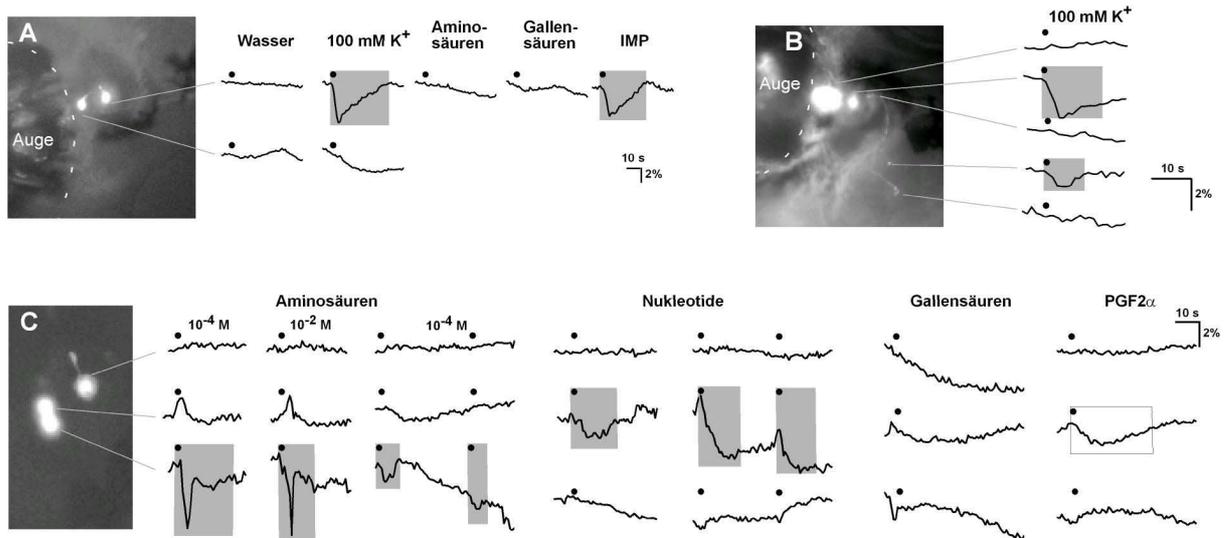
werden konnte, welche Individuen einer plasmidininjizierten Population für ein Experiment herangezogen werden können. Gegenwärtig wird versucht stabile transgene Linien für dieses Konstrukt zu erhalten, bei der am Ende davon ausgegangen werden kann, dass alle Individuen einer Generation das Transgen exprimieren. In dieser Linie wären die oben geschilderten Probleme überwunden.

### 3.4.2 *invers-pericam*.

Das *invers-pericam* besitzt gegenüber den bereits beschriebenen Calciumindikatoren *CaMgaroo* und *flash-pericam* den entscheidenden Vorteil, dass es im calciumfreien Milieu, seine stärkste Fluoreszenz besitzt (Nagai et al., 2001). Mit steigender Calciumkonzentration wird ein Abfall der Fluoreszenzintensität erwartet. Dadurch können Embryonen, die das *invers-pericam* exprimieren leichter erkannt und für ein Experiment selektioniert werden. Die Expressionsraten des *invers-pericams* unter *zOMP*-Promotorkontrolle waren denen des *prOMP<sub>1,3</sub>-Y* Reporterkonstruktes vergleichbar. Die durchschnittliche Penetranz bei 24 hpf betrug 20% und die Anzahl fluoreszierender Zellen betrug durchschnittlich 1.5 pro positiver Plakode.

Durch den *invers-pericam* Calciumindikator konnte Aktivität in den Riechsinneszellen nachgewiesen werden. Zellen, die das *invers-pericam* exprimieren, antworteten auf depolarisierende Kaliumpulse (100 mM) mit einem transienten Abfall der Fluoreszenzintensität (**Abb. 41A, B**). Der initiale Fluoreszenzabfall verläuft rasch (< 3 s) und wird von einem deutlich langsameren Anstieg (15 - 30 s) auf den Ruhewert gefolgt. Individuelle Neurone konnten wiederholt und in gleichsinniger Weise mit einem depolarisierenden Stimulus gereizt werden (**Abb. 41A, B**). Die Aktivität der Riechsinneszellen konnte auch in den Terminalien der projizierenden Axone, nicht jedoch in den proximalen Axonabschnitten erkannt werden (**Abb. 41B**). Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit den Befunden, welche durch die Verwendung herkömmlicher calciumsensitiver Farbstoffe gewonnen wurden. Auch mit den herkömmlichen Farbstoffen können entlang des Axons keine Calciumsignale beobachtet werden, da vermutlich keine calciumpermeablen Kanäle in der Axonmembran der Riechsinneszellen vorkommen.

Es konnten auch wiederholt *invers-pericam*-positive Riechsinneszellen gefunden werden, die durch Geruchsstoffe stimuliert werden konnten (**Abb. 41A, C**). Die Kinetiken geruchsstimulierter Signale waren den Kinetiken depolarisierender Kaliumpulse vergleichbar. Zellen, die durch eine Substanzklasse, z.B. durch Aminosäuren, Nukleotide oder Gallensäuren, gereizt werden konnten, zeigten keine Kreuzempfindlichkeit für eine weitere Geruchsstoffklasse (**Abb. 41C**). Antwortende Riechsinneszellen konnten wiederholt und in gleichartiger Weise durch einen bestimmten Geruchsreiz stimuliert werden, wodurch eine funktionelle Beeinträchtigung oder Erschöpfung der Zellen oder des *invers-pericam* durch den stimulatorischen Geruchsreiz ausgeschlossen werden kann. Riechsinneszellen, die alleine durch die untersuchten Pheromone PGF2 $\alpha$  oder 17,20- $\beta$ P stimuliert werden können, wurden bisher nicht beobachtet (**Abb. 41C**).



**Abb. 41– Calciummessungen an Riechsinneszellen embryonaler Zebrafärblinge - *flash-pericam*.**

Expression des *invers-pericam* in den Riechsinneszellen und Fluoreszenzverhalten während der Stimulation mit Geruchsstoffen. **A.** 96 hpf Embryo mit zwei *flash-pericam* positiven Neuronen (links). Nur die Zelle rechts im Bild antwortet auf einen depolarisierenden Kaliumimpuls mit einem transienten Abfall der Fluoreszenzintensität (*grau unterlegt*). Zusätzlich ist diese Zelle durch IMP, ein Nukleotid, stimulierbar, nicht jedoch durch Amino- oder Gallensäuren. **B.** Gleicher Embryo wie in A, jedoch diesmal in der Fokusebene der Axone. Deutlich sind zwei projizierende Fasern und Terminalienfelder erkennbar. Wie in A ist nur die Riechsinneszelle rechts im Bild durch einen Kaliumimpuls reizbar. Zeitgleich tritt auch ein Abfall der Fluoreszenzintensität in dem entsprechenden Terminalienfeld, nicht jedoch entlang des Axons oder in dem Terminalienfeld der nicht-stimulierbaren Zelle auf. **C.** Stimulation mit unterschiedlichen Geruchsstoffen. Eine der drei *invers-pericam* positiven Zellen ist wiederholt durch eine Mischung von Aminosäuren unterschiedlicher Konzentration stimulierbar (links, *untere Spur*), nicht jedoch durch Nukleotide, Gallensäuren oder PGF2 $\alpha$ . Eine weitere Zelle ist selektiv durch Nukleotide reizbar (*mittlere Spur*), wohingegen das Neuron am oberen Bildrand durch keinen der untersuchten Geruchsstoffe gereizt werden konnte (*obere Spur*). Beachte das Signal der nukleotidempfindlichen Zelle gegenüber PGF2 $\alpha$  (*schwarzer Rahmen*).

### 3.5 Zusammenfassende Beurteilung der molekulargenetischen Calciumindikatoren.

Unter den hier untersuchten molekulargenetischen Calciumindikatoren (*CaMeleon*, *CaMgaroo*, *flash-* und *invers-pericam*) konnte vorläufig nur das *invers-pericam* als effektiv erkannt werden. Riechsinneszellen embryonaler Zebrafärblinge, die das *invers-pericam* exprimieren, konnten durch unterschiedliche Geruchsstoffe stimuliert und Veränderungen des Calciumniveaus in diesen Zellen durch negative Fluoreszenzänderungen des Reporterproteins aufgezeichnet werden. Mit dem *CaMeleon* konnten hingegen keine Calciumsignale aufgezeichnet werden. Die Messproben *CaMgaroo* und *flash-pericam* konnten, im Gegensatz zu *CaMgaroo* und *invers-pericam*, nicht in den transient transgenen Embryonen *in vivo* nachgewiesen werden, was eine funktionelle Prüfung dieser Indikatoren zunächst undurchführbar machte. Eine endgültige Beurteilung dieser Messproben kann jedoch erst nach einer funktionellen Untersuchung stabiler transgener Linien mit Sicherheit erfolgen. Die hier dargestellten Untersuchungen weisen die grundsätzliche Anwendbarkeit des *invers-pericam* Calciumindikators in Neuronen des Zebrafärblings, speziell in den Riechsinneszellen nach. Mit der Identifizierung geeigneter Promotoren für die nachgeschalteten zellulären Ebenen des neuronalen Verarbeitungsschaltkreises im *Bulbus olfactorius* des Zebrafärblings, könnten so in naher Zukunft interessante Einblicke in die funktionelle Logik der frühen Informationsverarbeitung im olfaktorischen System möglich sein.



## V. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Fragestellungen unter dem gemeinsamen Aspekt der Signalausbreitung im olfaktorischen System des Zebrabärblings behandelt. Funktionell kann das Geruchssystem auf der Höhe des *Bulbus olfactorius* in drei Verarbeitungsebenen unterteilt werden (**Abb. 2**). Auf der ersten Ebene projizieren sensorische Neurone aus dem peripheren Riechepithel in das neuronale Netzwerk des olfaktorischen Bulbus. Ihre Aktivität bestimmt die Eingangssignale des *Bulbus olfactorius* und die Aktivität des weiteren olfaktorischen Verarbeitungsschaltkreises. Die strukturellen und funktionellen Grundmodule der Informationsverarbeitung im olfaktorischen Bulbus sind die Glomeruli, die innerhalb und untereinander durch Interneurone verschaltet sind. Die Interneurone modulieren die Geruchssignale während der Weiterleitung auf die Mitralzellen. Sie erhalten sowohl direkte, erregende Eingänge von den basalen Dendriten der Mitralzellen als auch rückwirkende Innervationen durch Axonkollaterale der Mitralzellen. Die Mitralzellen selbst stellen die Ausgangsseite des neuronalen Bulbusnetzwerkes dar. Sie leiten die im olfaktorischen Bulbus prozessierten Signale in höhere cortikale Areale der Geruchsverarbeitung weiter. Um ein tieferes Verständnis der Funktion dieser Verschaltung, vor allem aber der lateralen Verarbeitung von Geruchsinformation im olfaktorischen Bulbus zu gewinnen, erscheint es methodisch sinnvoll, die einzelnen Ebenen dieses Systems zunächst getrennt zu untersuchen und anschließend im Vergleich miteinander zu betrachten.

Durch eine Untersuchung der Riechsinneszellen wurde daher zunächst eine detaillierte Analyse der Kodierung und Repräsentation einer bestimmten Klasse von Geruchsstoffen (Aminosäuren) auf der Eingangsseite des olfaktorischen Systems erarbeitet. Zusätzlich zu der bereits bekannten, funktionellen Organisation des olfaktorischen Bulbus in Repräsentationsdomänen für unterschiedliche Geruchsstoffklassen und der grundsätzlichen Verarbeitung von Aminosäuren im lateralen Bulbus (Friedrich und Korsching, 1998), sind Geruchsantworten auch innerhalb der aminosäurerepräsentierenden Region weiter organisiert (siehe auch Friedrich und Korsching, 1997). Bestimmte Stimulusparameter, wie die Kettenlänge der Aminosäuren, die Präsenz funktioneller Gruppen und die Konzentration der Stimuli beeinflussen das glomeruläre Aktivitätsmuster im olfaktorischen Bulbus in markanter Weise. Aus den Veränderungen der Repräsentationsmuster, die mit systematischen Strukturänderungen der Stimuli einhergehen, konnten die Antwortprofile einzelner Glomeruli kategorisiert und somit Prinzipien der Repräsentation von Aminosäuren im olfaktorischen Bulbus erkannt werden. Diese Beobachtungen tragen dazu bei, die Logik der Kodierung von Geruchsstoffen im olfaktorischen System besser zu verstehen und vermitteln einen Eindruck davon, welche Parameter der Stimuli für das Geruchssystem tatsächlich relevant sind.

Zum weiteren wurde in dieser Dissertation versucht, auch die nachgeschalteten Verarbeitungsebenen, die Körner- und die Mitralzellen, für vergleichbare physiologische Untersuchungen zugänglich zu machen. Dieses Vorhaben erforderte zunächst die Etablierung der Anwendung neuartiger calciumabhängiger Indikatoren, die durch molekulargenetische Methoden in die anatomisch schwer zugänglichen Zielzellen eingebracht werden können. Eine grundlegende methodische Voraussetzung für die Anwendung der proteinbasierten

Calciumindikatoren *in vivo* war die vorhergehende Identifizierung gewebe- und zelltypspezifischer Promotoren, die eine gezielte Genexpression in den unterschiedlichen Zelltypen des olfaktorischen Bulbus erlauben. Dieses Vorhaben konnte in der vorliegenden Arbeit zum Teil erreicht werden. Auf der Ebene der Riechsinneszellen konnte so die Anwendbarkeit eines bestimmten molekulargenetischen Calciumindikators, des *invers-pericam* (Nagai et al., 2001), im olfaktorischen System des Zebrafischs gezeigt werden. Zusätzlich wurden Expressionskonstrukte zur Adressierung der Interneurone untersucht, die jedoch lediglich eine gewisse Spezifität für Neuronen, sowohl im olfaktorischen Bulbus als auch in anderen Geweben des Zebrafischs aufwiesen. Für die Ausgangsseite des bulbären Netzwerkes konnte ein spezifisch in den Mitralzellen exprimiertes Gen identifiziert werden, welches die Grundlage zur Isolierung eines mitralzellspezifischen Promotors legt.

### **1      PHYSIOLOGIE DER GERUCHSANTWORTEN.**

#### **1.1    Glomeruli und Rezeptoren – die Interpretierbarkeit glomerulärer Signale.**

Die nicht-topologische Art der Verschaltung zwischen sensorischer Oberfläche und Gehirn stellt im Vergleich zu anderen Sinnessystemen eine Besonderheit des olfaktorischen Systems dar. Alle Riechsinneszellen, die durch die Expression eines bestimmten Geruchsrezeptors determiniert sind, konvergieren auf die gleichen glomerulären Verarbeitungsmodule im olfaktorischen Bulbus (Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994; Mombaerts et al., 1996; Strotmann et al., 2000). Durch diese Art der sensorischen Projektion wird die allein typologische und nicht-räumliche Kodierung von Geruchsinformation durch die Riechsinneszellen in einen ebenfalls typologischen, aber auch räumlich strukturierten, glomerulären *Code* auf der Bulbusoberfläche übersetzt. Individuelle Glomeruli integrieren über die gesamte Population innervierender rezeptorgleicher Riechsinneszellen und verstärken so die Signale einzelner Zellen. Diese ungewöhnliche Organisation erlaubt eine ungewöhnliche Betrachtung experimenteller Daten, die unterschiedliche praktische Vorteile besitzt. Durch eine Betrachtung des Antwortverhaltens einzelner Glomeruli kann auf die Eigenschaften des Geruchsrezeptors, der von der jeweiligen innervierenden Zellpopulation exprimiert wird, zurückgeschlossen werden. Auch unabhängig von der Kenntnis, welcher spezielle Geruchsrezeptor mit einem Glomerulus assoziiert ist, können Glomeruli – und somit die Geruchsrezeptoren – als individuelle Einheiten angesprochen werden. Darüber hinaus kann, durch die Betrachtung der gesamten Bulbusoberfläche, in den Geruchsantworten der Glomeruli das vollständige, auf einen bestimmten Stimulus antwortende Rezeptorrepertoire erkannt werden. So kann, durch eine Untersuchung glomerulärer Antwortprofile, eine Aussage über die Mindestanzahl der Rezeptoren, die an der Erkennung eines Geruchsstoffes beteiligt sind, gemacht werden. Zusätzlich können Aspekte der Ligandenselektivität dieser Rezeptoren und strukturelle Eigenschaften ihrer Bindungstasche abgeleitet werden.

Die folgenden Einschränkungen sind jedoch zu bedenken. Innerhalb des *Bulbus olfactorius* bestehen intensive laterale Verschaltungen zwischen den Glomeruli (Mori et al. 1998) und die Ligandenspektren und Antwortigenschaften glomerulärer Module könnten von

denen der Geruchsrezeptoren verschieden sein. In den meisten vergleichbaren Untersuchungen glomerulärer Aktivität durch aktivitätsmarkierende Verfahren oder optische Ableitungen wurden die unterschiedlichen Beiträge der Riechsinneszellen, der Inter- und Projektionsneurone am Gesamtsignal nicht berücksichtigt (Johnson et al., 1998; Rubin und Katz, 1999; Sachse et al., 1999; Johnson und Leon, 2000; Uchida et al., 2000, Meister und Bonhoeffer, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch die Riechsinneszellen selektiv über das Riechepithel mit einem Aktivitätsfarbstoff markiert (siehe auch Friedrich und Korsching, 1997, 1998; Wachowiak und Cohen, 2001; Fried et al., 2002). Das bedeutet, dass die abgeleiteten glomerulären Signale alleine durch die praesynaptische Aktivität der innervierenden Riechsinneszellaxone bestimmt werden.

Eine praesynaptische Modulation dieser Signale kann jedoch ebenfalls nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. So wurde bereits gezeigt, dass Riechsinneszellen D2-Dopamin-Rezeptoren exprimieren (Koster et al., 1999) und die synaptische Übertragung von den Riechsinnes- auf die Mitralzellen durch praesynaptische Dopaminwirkung geschwächt wird (Hsia et al., 1999; Berkowicz und Trombley, 2000). In Übereinstimmung mit einer dopaminergen Modulation der Riechsinneszellaxone durch Periglomeruläre Zellen wird eine starke Immunoreaktivität gegen Tyrosinhydroxylase, einem Schlüsselenzym der Dopaminbiosynthese, in der glomerulären Schicht des olfaktorischen Bulbus gefunden (Halasz et al., 1977). Im Zebrafisch sind bisher keine Periglomerulären Zellen beschrieben worden. Eine entsprechende Immunoreaktivität gegen Tyrosinhydroxylase ist jedoch ebenfalls in der glomerulären und der angrenzenden Mitralzell-/inneren plexiformen Schicht zu finden (Byrd und Brunjes, 1995). Ebenso konnte eine praesynaptische Depression der Transmitterausschüttung an der Riechsinneszellsynapse durch GABAerge Periglomeruläre Zellen gezeigt werden (Keller et al., 1998; Aroniadou-Anderjaska et al., 2000). Zusätzlich wird ein modulatorischer Einfluss auf die Riechsinneszellen durch die peptidergen Transmitter GnRH und FMRF-Amid vermutet (Eisthen et al., 2000; Pinelli et al., 2000). Die Eingangssignale der Glomeruli werden also durch eine praesynaptische Wirkung modulatorischer Neurotransmitter aktiv reguliert. Alle diese praesynaptischen modulatorischen Einflüsse sind in den aufgezeichneten Signalen der Riechsinneszellterminalien enthalten und könnten die gemessenen glomerulären Antwortigenschaften von denen isolierter Riechsinneszellen oder rekombinant exprimierter Rezeptoren verschieden machen. Auf der anderen Seite reflektieren die hier aufgezeichneten Signale das systemrelevante Verhalten der Riechsinneszellen in ihrem natürlichen Kontext. Für die Interpretation der Ligandenspezifität von Geruchsrezeptoren aus den glomerulären Daten ist jedoch entsprechende Vorsicht geboten.

Eine weitere interpretatorische Schwierigkeit besteht darin, dass für das untersuchte Modellsystem, den Zebrafisch, die Konvergenz rezeptorgleicher Riechsinneszellen auf gemeinsame Zielglomeruli bisher nicht direkt gezeigt wurde. Die Detektion von Geruchsrezeptorgentranskripten durch *In situ*-Hybridisierungen, wie es im olfaktorischen Bulbus der Säuger möglich ist (Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994), scheinen aufgrund der, im Vergleich zu den Nagetieren, niedrigen glomerulären Konvergenzrate olfaktorischer Neurone beim Zebrafisch nicht durchführbar (Weth, 2001). Bei einer Mischinnervation der Glomeruli durch unterschiedliche rezeptorgleiche Riechsinneszellen würden sich für die

Glomeruli breitere Ligandenspektren ergeben als für individuelle Geruchsrezeptoren. In den dargestellten Subtraktionsanalysen kann nicht erkannt werden, ob das Antwortverhalten eines Glomerulus, der durch mehrere strukturell unterschiedliche Stimuli erregbar ist, durch eine Mischinnervation mehrerer engbandiger oder durch die Innervation eines breitbandigen Typs von Riechsinneszellen bedingt ist. (siehe **Abb. 17**).

Unterschiedliche Evidenzen stützen jedoch die Annahme, dass auch die Glomeruli des Zebrafischs durch eine einheitliche Population von Riechsinneszellen innerviert werden. Zum einen erregen Geruchsstoffe wie PGF $2\alpha$  und 17,20BP Aktivität in jeweils einem einzigen Glomerulus (Friedrich und Korsching, 1998). Riechsinneszellen, die Rezeptoren für PGF $2\alpha$  oder 17,20BP exprimieren, projizieren daher nicht verstreut in den olfaktorischen Bulbus, sondern spezifisch in jeweils einen einzigen Glomerulus. Zum anderen sind sowohl rezeptorgleiche Neurone als auch die Neurone, welche mit einem Glomerulus verschaltet sind, in überlappenden konzentrischen Domänen im Riechepithel angeordnet (Weth et al., 1996; Lieberoth, 1999). Die Durchmesser dieser Ringe variieren sowohl mit dem respektiven Geruchsrezeptor als auch dem innervierten Glomerulus. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit Kreuzadaptationsexperimente durchgeführt und mit den Ergebnissen der Subtraktionsanalyse verglichen. Für den Fall, dass einzelne Glomeruli durch Sinneszellen mit nicht oder nur teilweise überlappenden Ligandenspektren innerviert werden, sollten Unterschiede zwischen den adaptierten Antwortmustern und den gerechneten Differenzen auftreten (**Abb. 17**). Es konnte jedoch mit den untersuchten Stimuli keine Unterschiede der Antworten breitbandiger Glomeruli zwischen Subtraktionsanalyse und Kreuzadaptation gefunden werden. Hinweise auf eine partielle Adaptation breitbandiger Glomeruli ergaben sich im Vergleich zu den gerechneten Differenzen nicht.

Da glomeruläre Aktivität, unabhängig von der Art der Verschaltung, immer auf die Aktivierung einzelner Geruchsrezeptoren zurückzuführen ist, kann durch einen Vergleich des glomerulären Antwortverhaltens gegenüber unterschiedlichen Stimuli, eine zutreffende Mindestabschätzung des antwortenden Rezeptorrepertoires oder eine Abschätzung der Mindestanforderungen der Rezeptoren an ihre Liganden getroffen werden.

### **1.2 Aminosäure-Geruchsrezeptoren werden nur durch Aminosäuren erregt.**

Im Vergleich mit ausgewählten Strukturderivaten der Aminosäuren wurde erkannt, dass nur  $\alpha$ -Aminosäuren Aktivität im lateralen olfaktorischen Bulbus stimulieren. Darüber hinaus wurde erkannt, dass nur die L-Enantiomere eine stimulatorische Wirksamkeit besitzen, wohingegen durch D-Aminosäuren auch bei hohen Konzentrationen keine Signale evoziert werden konnten. Die Geruchsrezeptoren, die an der Aminosäurerkennung beteiligt sind, erkennen daher sowohl die  $\alpha$ -Amino- als auch die  $\alpha$ -Carboxylgruppe der Aminosäuren als notwendiges Strukturmotiv. Der Einfluss der Stereokonformation legt nahe, dass die beiden Gruppen nicht unabhängig voneinander erkannt werden und dass weitere Strukturmerkmale der Aminosäuren mit den Geruchsrezeptoren wechselwirken. In der Bindungstasche der Aminosäure-Geruchsrezeptoren sind daher mindestens drei Bindungsstellen an einer Wechselwirkung mit den Aminosäuren beteiligt (s.u. und **Abb. 42**), von denen zwei die

geladenen Amino- und Carboxylgruppen erkennen. Für die Carboxylgruppe konnte erkannt werden, dass die Substitution der geladenen Gruppe durch eine polare Gruppe (Alaninol) eine Aktivierung der Rezeptoren verhindert. Die Ergebnisse der Koapplikation von Alaninol und Alanin weisen jedoch darauf hin, dass auch Alaninol teilweise an die Rezeptoren bindet und mit Alanin um freie Bindungsstellen kompetiert.

Die hier gefundenen strukturellen Anforderungen, die die Aminosäure-Geruchsrezeptoren an die Liganden stellen, stimmen grundsätzlich gut mit Elektroolfaktogramm-Aufzeichnungen (EOG) und Untersuchungen der elektrischen Aktivität der Bulbusoberfläche bei verschiedenen Fischarten überein [*Salmo salar* (Sutterlin und Sutterlin, 1971), *Ictalurus catus* (Suzuki und Tucker, 1971), *Salvelinus alpinus* (Belghaug und Doving, 1977), *Cyprinus carpio* (Goh und Tamura, 1978), *Oncorhynchus mykiss* (Hara, 1976, 1977)]. So wurde in der umfangreichsten dieser Studien auch für die Regenbogenforelle, *Oncorhynchus mykiss*, erkannt, dass  $\alpha$ -Amino- und  $\alpha$ -Carboxylgruppe der Aminosäuren in gleichartiger Weise kritisch für die Aktivierung der Geruchsrezeptoren sind (Hara, 1976, 1977). Für den Zwergwels, *Ictalurus punctatus*, die Regenbogenforelle und den Zebraäbrbling wurde allerdings auch gezeigt, dass eine Maskierung der  $\alpha$ -Carboxylgruppe durch eine Esterbindung nicht zu einem vollständigen Verlust der stimulatorischen Wirksamkeit führt (Hara, 1976, 1977, 1982; Lipschitz und Michel, 1999).

Unterschiede zu den Beobachtungen an anderen Fischarten bestehen vor allem in der Wirksamkeit von D-Aminosäuren. Bei Zwergwels und Regenbogenforelle wurden elektrische Geruchssignale auch durch die Stimulation mit D-Enantiomeren erhalten (Caprio und Byrd, 1984; Hara, 1982). Zumindest bei der Forelle wurden diese Befunde durch Summenableitungen am olfaktorischen Bulbus gewonnen, wohingegen die Arbeiten am Zwergwels EOG-Aufzeichnungen darstellen. Es ist daher auch denkbar, dass D-Enantiomere in der Riechschleimhaut des Zwergwelses elektrische Aktivität in nicht-neuronalen Zellen generieren. Solche Beobachtungen wurden am Zwergwels für Gallensäuren gemacht. Gallensäuren generieren Aktivität in EOG-Aufzeichnungen, nicht jedoch im olfaktorischen Bulbus (Byrd und Caprio, 1982; Erickson und Caprio, 1984). Nicht-neuronale Komponenten in EOG-Ableitungen wurden auch für weitere Spezies, einschließlich des Zebraäbrblings, berichtet (Getchell, 1974; Okano und Takagi, 1974; Michel und Lubomudrov, 1995). In Übereinstimmung mit den hier dargestellten Befunden, konnte aber beim Zebraäbrbling auch im EOG keine signifikante Erregung durch eine D-Aminosäure (D-Arginin) aufgezeichnet werden (Lippschitz und Michel, 1999).

Starke EOG-Antworten wurden in der Studie von Lippschitz und Michel (1999) jedoch, entgegen den hier berichteten Beobachtungen, durch Argininanaloge erhalten, die in der Struktur des Aminosäuregrundmotives variierten. Durch Kreuzadaptationsexperimente wurde allerdings erkannt, dass diese Signale überwiegend von Riechsinneszellen stammen, die nicht durch Arginin erregt werden. Andersherum trat in Riechsinneszellen, die durch Arginin erregbar sind, keine Kreuzadaptation durch diese Analoga auf. Da durch die Argininanaloge auch einzelne Riechsinneszellen aktivitätsmarkiert werden konnten, ist die gemessene elektrische Aktivität in diesem Fall höchstwahrscheinlich auf einen neuronalen Ursprung zurückzuführen. Dieser Befund macht das Vorkommen weiterer Geruchsrezeptoren, die das basische Guanidin-Motiv des Argininmoleküls erkennen, wahrscheinlich. Die

wirksamen Argininanaloga (Lipschitz und Michel, 1999) wurden hier nicht untersucht. Es wäre jedoch interessant zu sehen, in welcher Bulbusregion Glomeruli durch diese Stimuli aktiviert werden, da davon ausgegangen werden kann, dass sie durch eine weitere, hier nicht erfasste Klasse von Geruchsrezeptoren innerviert werden.

Im olfaktorischen Bulbus des Zebrafisches konnten durch D-Aminosäuren keine Glomeruli bis zu einer Konzentration von  $10^{-2}$  M aktiviert werden (siehe aber auch Friedrich und Korsching, 1997). Wie bereits erwähnt, legt die Stereoselektivität der Aminosäure-Geruchsrezeptoren die Beteiligung weiterer struktureller Merkmale der Aminosäuren an der Erkennung durch die Geruchsrezeptoren nahe. Die Bedeutung des  $\alpha$ -Wasserstoffs für die Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung wurde hier jedoch nicht untersucht. In vergleichbaren Studien wurde die Bedeutung des  $\alpha$ -Wasserstoffs für die Interaktion mit den Aminosäure-Geruchsrezeptoren jedoch erkannt (Hara, 1976, 1977).

Im Gegensatz zu der grundsätzlichen Bedeutung der  $\alpha$ -Amino- und  $\alpha$ -Carboxylgruppe und ihrer Notwendigkeit für die Stimulation der Rezeptoren, führten Unterschiede in der Seitenkette der Aminosäuren zu Veränderungen des Antwortmusters und damit zu wechselnden Rezeptorpopulationen, die durch die jeweiligen Aminosäuren stimulierbar sind (s.u.). Zusammenfassend können die Bedingungen, die die Aminosäure-Geruchsrezeptoren an einen wirksamen Liganden stellen, wie folgt beschrieben werden:

- Nur  $\alpha$ -Aminosäuren wirken stimulatorisch.
- Nur L-Enantiomere wirken stimulatorisch.
- Die stimulatorische Wirksamkeit ist nicht auf physiologisch vorkommende L- $\alpha$ -Aminosäuren beschränkt (siehe z.B. 2-Aminooctansäure).
- Ionisierbare  $\alpha$ -Amino- und  $\alpha$ -Carboxylgruppen sind notwendige Struktur motive für eine Wechselwirkung mit den Rezeptoren.
- Der  $\beta$ -Wasserstoff sollte frei sein (siehe Threonin und Serin).
- Die Struktur der Seitenkette bestimmt die Effektivität der Aminosäuren (s.u.).
- Einige Geruchsrezeptoren besitzen mindestens eine weitere, unpolare, Bindungsstelle (siehe Kettenlängenvergleiche).
- Einige Geruchsrezeptoren besitzen mindestens eine weitere, geladene Bindungsstelle (siehe Ornithin und Lysin).
- Strukturmerkmale der Seitengruppen werden zumindest teilweise durch sterische Wechselwirkungen erkannt (siehe Threonin und Serin).

### **1.3 Die Struktur der Seitenkette bestimmt das Repertoire der aktivierten Rezeptoren.**

#### **1.3.1 Kettenlänge und Antwortstärke.**

Durch die aliphatische Verlängerung der Seitenkette unverzweigter Aminosäuren wurden zunehmend aktive Glomeruli rekrutiert. Daraus kann, allen oben angesprochenen Einschränkungen zum Trotz, zwingend geschlossen werden, dass zusätzliche Geruchsrezeptoren aktiviert wurden, die nicht durch kürzere Moleküle stimulierbar sind.

Insgesamt konnten für den Kettenlängenbereich von 2 bis 8 Kohlenstoffatomen im Grundgerüst 5 unterschiedliche Antwortkategorien gebildet werden. Die Basiskategorie bilden die glyzinempfindlichen Rezeptoren, die durch alle längerkettigen Aminosäuren erregt werden. Durch Glyzin wird Aktivität in durchschnittlich 25 Glomeruli stimuliert, was jedoch nicht zwangsläufig bedeuten muss, dass der Zebraäbrbling insgesamt 25 unterschiedliche Glyzinrezeptoren besitzt. Mit großer Sicherheit kommen jedoch mehrere individuelle Glyzinrezeptoren vor, da Unterschiede in der Ligandenselektivität glyzinempfindlicher Glomeruli beobachtet werden konnten.

Aus dem selektiven Kettenlängenverhalten können weitere Einblicke in die Struktur der Bindungstasche der Rezeptoren gewonnen werden. Würde die Spezifität der Rezeptoren, über die erkannten Bindungsstellen für geladene Gruppen hinaus, alleine durch sterische Wechselwirkungen bestimmt, sollten längerkettige Moleküle eine zunehmend schlechtere stimulatorische Wirksamkeit besitzen. Das genaue Gegenteil ist jedoch der Fall. Mit Ausnahme des Kettenlängenzuwachses zwischen Alanin und 2-Aminobuttersäure, nimmt die stimulatorische Wirksamkeit der Aminosäuren mit der Kettenlänge zu. Das legt für die Geruchsrezeptoren, die selektiv durch längerkettige Moleküle erregt werden, die Beteiligung einer zusätzlichen, aktiven Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor an der Aminosäureerkennung nahe.

Die Geruchsrezeptoren sind Transmembranrezeptoren mit sieben membrandurchspannenden Domänen. Die Bindungstasche wird innerhalb der hydrophoben Transmembrandomänen vermutet (Buck und Axel, 1991; Singer und Shepherd, 1994; Floriano et al., 2000). Mit zunehmender Kettenlänge nimmt auch die Hydrophobizität der Aminosäuren zu. Der Anstieg der Hydrophobizität der Aminosäuren mit der Kettenlänge [ausgedrückt als  $\log P$  (Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient)] verläuft gleichsinnig mit dem Anstieg der Antwortfläche. Die Relevanz der Hydrophobizität für die Interaktion mit den Rezeptoren ist von Luca Turin (Turin und Yoshii, 2002) vorgeschlagen worden und ist ebenfalls gut mit Daten, die in der Maus und der Ratte gewonnen wurden, vereinbar (Malnic et al., 1999; Johnson und Leon, 2000; Turin und Yoshii, 2002). Die hier dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch einige der Aminosäure-Geruchsrezeptoren des Zebraäbrblings eine zusätzliche hydrophobe Wechselwirkung mit den Aminosäuren eingehen.

Abweichend von dem hier berichteten Kettenlängenverhalten wurde für das Geruchssystem der Regenbogenforelle eine glockenförmige Funktion der Beziehung zwischen Kettenlänge und Signalstärke in bulbären EEG-Aufzeichnungen gefunden (Hara, 1977). Maximale Antwortstärken wurden bei der Forelle durch Alanin und 2-Aminobuttersäure erreicht. Für längerkettige Aminosäuren nahm die Effektivität stark ab. Es ist nicht eindeutig, ob den beobachteten Unterschieden biologische oder methodische Ursachen zugrunde liegen. Die Empfindlichkeit der Riechsinneszellen gegenüber Geruchsstoffen ist pH-abhängig (Hara, 1982). Einige Untersuchungen am Geruchssystem der Fische verwendeten jedoch ungepuffertes künstliches Frischwasser und die unterschiedlichen pK-Werte der Stimuli könnten so zu fehlerhaften Resultaten führen. Eine Veränderung des pH-Wertes bei einer  $10^{-4}$  M Verdünnung, wie sie für die hier angeführten Vergleiche verwendet wurde, trat in der stark carbonatgepufferten ACSF nicht auf. Ein Einfluss des pH-Wertes auf die Antwortmuster kann in der hier vorliegenden Studie daher ausgeschlossen werden.

### **1.3.2 Kettenlängenkodierung im olfaktorischen Bulbus anderer Modellsysteme.**

Es ist eine interessante Frage, inwiefern bestimmte strukturelle Merkmale der Geruchsstoffe, die durch gängige chemische Dimensionen beschreibbar sind, überhaupt relevante Größen für die inherente Logik des Geruchssystems darstellen. Am Beispiel der Kettenlänge unterschiedlicher Geruchsstoffklassen ist gut belegt, wie diese im Geruchssystem anderer Modellorganismen repräsentiert wird.

Der hier dargestellte Zuwachs aktiver Glomeruli und die Verlagerung des Schwerpunktes der Aktivitätsmuster mit der Molekülgröße weist Ähnlichkeiten mit dem Geruchssystem der Nagetiere auf. Die beste Übereinstimmung besteht mit Daten für Carbonsäuren unterschiedlicher Länge, die durch Desoxyglukosemarkierungen an der Ratte gewonnen wurden (Johnson et al., 1999). Auch in der Ratte wird eine Zunahme aktivierter Glomeruli mit der Kettenlänge der Carbonsäuren und zusätzlich eine Verlagerung des Aktivitätsschwerpunktes von posteriomedial nach anteriolateral beobachtet (Johnson et al., 1999; Meister und Bonhoeffer, 2001). In einer weiteren Arbeit, in der strukturell wenig verwandte, jedoch ähnlich lange Strukturisomere untersucht wurden, schlossen die Autoren, dass zumindest in einer Teilregion des olfaktorischen Bulbus der Ratte Information über die Moleküllänge der Stimuli, unabhängig vom Grad der Verzweigung oder der Präsenz funktioneller Gruppen kodiert wird (Johnson und Leon, 2000). Auch bei der Honigbiene besitzen einige Glomeruli Kettenlängenprofile, die unabhängig von der erregenden Substanzklasse sind (Sachse et al., 1999).

In Untersuchungen des glomerulären Erregungsmusters bei Nagern und Insekten durch optische Ableitungen der Gesamtaktivität wurden jedoch auch Unterschiede zu den hier dargestellten Befunden beobachtet (Rubin und Katz, 1999; Sachse et al., 1999; Uchida et al., 2000; Meister und Bonhoeffer, 2001). In den angesprochenen Studien wurde mit zunehmender Kettenlänge der Stimuli (Aldehyde, Carbonsäuren, Alkanole, Alkohole) zwar eine Verlagerung aktiver Glomeruli aufgezeichnet, nicht jedoch eine sukzessive Zunahme der Anzahl der antwortenden Glomeruli. Für individuelle Glomeruli wurde, im Gegensatz zum Zebrabärbling, ein glockenförmiges Antwortprofil über die Kettenlänge gezeigt. Auch für den viral überexprimierten Geruchsrezeptor I7 der Ratte wurde ein glockenförmiges Antwortprofil berichtet (Zhao et al., 1998; Araneda et al., 2000). Der I7-Rezeptor besitzt eine relativ hohe Spezifität für den Liganden Octanal und die Erregbarkeit des Rezeptors nimmt für kürzere und längere Aldehyde rasch ab. Es muss jedoch kritisch erwähnt werden, dass mit Ausnahme der Desoxyglukosestudie im olfaktorischen Bulbus der Ratte, die erstaunlicherweise die größte Gemeinsamkeit mit den Zebrabärblingdaten aufweist, bei einer Reizung in Luft nicht auf die effektive Konzentration der Stimuli geachtet wurde. Die Dampfdrücke der Stimuli, z.B. geradkettiger Aldehyde, nehmen mit zunehmender Kettenlänge stark ab (Sachse et al., 1999). Keine der angeführten Untersuchungen glomerulärer Aktivität oder des I7-Rezeptors nimmt Rücksicht auf das Dampfdruckverhalten der Geruchsstoffe oder korrigiert für diesen Faktor. Daher sind diese Befunde mit den hier dargestellten Ergebnissen nur bedingt vergleichbar. In einer Studie an der Maus, bei der, wie im Zebrabärblingexperiment, selektiv praesynaptische Aktivität der Riechsinneszellen gemessen wurde, konnte nach Korrektur des Dampfdruckverhaltens unterschiedlich langkettiger Aldehyde, ebenfalls eine Zunahme

aktivierter Glomeruli erkannt werden (Fried et al., 2002). Derartige Probleme bei der Einstellung der Konzentration bestehen für die wasserlöslichen Stimuli, wie z.B. die hier verwendeten Aminosäuren, nicht. Es ist daher in diesem Zusammenhang bemerkenswert, dass auch für dissoziierte Riechsinneszellen der Maus, die in wässriger Lösung stimuliert wurden, eine kontinuierliche Zunahme der Antwortstärke für Carbonsäuren in Abhängigkeit von der Kettenlänge beobachtet wurde (Malnic et al., 1999; Sato et al., 1994).

### 1.3.3 Funktionelle Gruppen und selektive Bindung.

Die Präsenz weiterer funktioneller Gruppen in der Seitenkette beeinflusst die Bindung der Aminosäuren an die Geruchsrezeptoren ebenfalls in starkem Maße. Polare Gruppen schließen die respektiven Aminosäuren von der Bindung an eine Teilpopulation der Geruchsrezeptoren, die durch neutrale Aminosäuren erregbar sind, aus. Im Vergleich mit den neutralen Aminosäuren konnten keine Glomeruli gefunden werden, die spezifisch durch die polaren Aminosäuren Serin und Threonin aktiviert werden. Einige Geruchsrezeptoren, die durch die neutralen Aminosäureanaloga erregt werden, tolerieren jedoch die Präsenz einer polaren Gruppe in der Molekülstruktur. Einen bindenden Charakter besitzt diese Wechselwirkung mit den Geruchsrezeptormolekülen aber nicht (**Abb. 42**). Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass einige der Rezeptoren, die unterschiedlich langkettige neutrale Aminosäuren erkennen, sterische Toleranzen für bestimmte Substitutionsgruppen der Liganden besitzen. Das Fehlen spezifischer Rezeptoren für polare Aminosäuren bedeutet jedoch nicht, dass solche Substanzen von dem olfaktorischen System nicht oder schlechter erkannt und bewertet werden können. Bei einer Geruchskodierung durch unterschiedliche Kombinationen aktiver Glomeruli ist das Fehlen einzelner Glomeruli ebenso bedeutungsvoll und aussagekräftig wie ihre Präsenz (siehe **V.1.4** und Korsching, 2001).

Im Falle der basischen Substitutionsgruppe wurden gegenüber neutralen Aminosäuren qualitative Unterschiede in den Antwortmustern erkannt, die das Vorkommen von mindestens drei unterschiedlichen Geruchsrezeptoren nahelegen. Durch die zusätzliche funktionelle Gruppe werden einige Rezeptoren neu rekrutiert, wohingegen andere, die durch neutrale Aminosäuren erregbar sind, nicht mehr mit den basischen Stimuli interagieren können. Darüber hinaus wurden auch unspezifische Rezeptoren beobachtet, die die Präsenz der Aminogruppe tolerieren und gleichermaßen durch neutrale und basische Aminosäuren erregt werden. In allen Fällen – die terminale Aminogruppe wird toleriert, wird nicht toleriert, ist erforderlich – wurden Kettenlängenabhängigkeiten beobachtet. Das Vorkommen von Glomeruli, die selektiv durch basische Aminosäuren aktiviert werden, lässt vermuten, dass zumindest einige Aminosäure-Geruchsrezeptoren des Zebrabärblings eine zusätzliche geladene Wechselwirkung mit den Liganden eingehen (**Abb. 42**).

Qualitativ ähnliche Beobachtungen – die Veränderung des glomerulären Antwortmusters durch kleine strukturelle Unterschiede der Stimuli – wurden auch am olfaktorischen Bulbus der Nagetiere und am Antennallobus der Insekten gemacht (Johnson et al., 1998; Johnson und Leon, 1999; Sachse et al., 1999; Uchida et al., 2000). Zusätzlich werden sie durch Untersuchungen dissoziierter Riechsinneszellen, die ebenfalls eine massive

Veränderung des Antwortverhaltens gegenüber molekularen Merkmalen der Stimuli zeigen, gestützt (Sato et al., 1994; Malnic et al., 1999).

### **1.3.4 Das Repertoire der Aminosäure-Geruchsrezeptoren des Zebraärbhlings.**

Insgesamt konnte durch das selektive Antwortverhalten einzelner Glomeruli eine Beteiligung von mindestens 10 unterschiedlichen Geruchsrezeptoren an der Erkennung und Kodierung von Aminosäuren im Geruchssystem des Zebraärbhlings funktionell nachgewiesen werden (**Tabelle 2**). Damit werden frühere Abschätzungen, die durch Kreuzadaptationsstudien und EOG-Aufzeichnungen gewonnen wurden und die Rezeptoren in basische, azidische, sowie lang- und kurzkettige neutrale Antwortkategorien zusammenfassen, weit übertroffen (Caprio und Byrd, 1984; Friedrich und Korsching, 1997). Ein Kreuzvergleich der Antwortmuster war nur zwischen den polaren und basischen Aminosäuren, nicht jedoch zwischen diesen und den unterschiedlich langkettigen Aminosäuren möglich. Die dargestellten 10 Antwortkategorien könnten jedoch durch eine gemeinsame Betrachtung aller untersuchten Parameter (Kettenlänge, basische und polare Substitution) noch weiter aufgespalten werden und zusätzliche Geruchsrezeptorkategorien konstituieren. Darüber hinaus sind weitere Aufspaltungen der beobachteten Rezeptorkategorien durch Vergleiche mit zusätzlichen Strukturanaloga denkbar, die hier nicht untersucht wurden. Insgesamt ist der Anteil von 10, der auf 100 geschätzten Geruchsrezeptoren des Zebraärbhlings (Barth et al., 1996; Weth et al., 1996), sehr hoch und unterstreicht die Relevanz, die die Aminosäuren als Geruchsstoffklasse für den Zebraärbbling besitzen. Der Grad der Repräsentation, die diese Geruchsstoffe einnehmen könnte bedeuten, dass die individuelle Erkennung bestimmter Aminosäuren für den Fisch relevanter ist als die grundsätzliche Erkennung der Aminosäuren als reine Substanzklasse.

Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass die hier betrachteten Rezeptoren nicht zu der Gruppe der klassischen Geruchsrezeptoren gehören, die im allgemeinen Geruchssystem in den ciliierten Riechsinneszellen vorkommen. Der einzige bisher funktionell charakterisierte Geruchsrezeptor eines Fisches ist der Rezeptor 5.24 des Goldfisches, der durch basische Aminosäuren erregbar ist (Specia et al., 1999). Dieser Rezeptor besitzt jedoch eine große Ähnlichkeit mit den V2-Rezeptoren des pheromonsensitiven Vomeronasalsystems, die zu den calciumsensitiven Rezeptoren (Brown et al., 1993), den metabotropen Glutamaterezeptoren (Nakanishi, 1992) und den T1-Geschmacksrezeptoren (Hoon et al., 1999) homolog sind. Die Gruppe der V2-Rezeptoren, die sich durch eine mächtige N-terminale Extrazellulärdomäne auszeichnen, wurde bisher für den Zebraärbbling noch nicht veröffentlicht. Jedoch konnte ein Homolog des Rezeptors 5.24 und weitere Rezeptoren des V2R-Typs auch im Zebraärbblingengenom gefunden werden (John Ngai, Linda Buck, pers. Mitteilung). Für den Goldfisch wurde der Umfang der V2-Rezeptorgenfamilie durch Southern-Analysen auf ungefähr 30 Mitglieder abgeschätzt (Cao et al., 1998). Die Expressionsmuster dieser Rezeptoren sind durch eine ungewöhnliche starke Abundanz rezeptorgleicher Sinneszellen im Riechepithel geprägt (Cao et al., 1998; Specia et al., 1999). Die beobachteten Expressionshäufigkeiten dieser Rezeptoren legen den Verdacht einer Koexpression unterschiedlicher Rezeptoren in einer Sinneszelle

nahe (Specia et al., 1999; Lippschitz und Michel, 1999). Für die V2-Rezeptoren des Vomeronasalorgans wurde die Koexpression unterschiedlicher Rezeptoren in individuellen VNO-Neuronen bereits nachgewiesen (Martini et al., 2001). Sollte eine solche Koexpression in den hier untersuchten Riechsinneszellen auftreten, so wären die abgeleiteten Ligandenspektren der einzelnen Rezeptoren unter Umständen als zu breitbandig beurteilt worden. Die Antworteigenschaften würden dann zwar für die Glomeruli, nicht jedoch für die zugrundeliegenden Rezeptoren gelten.

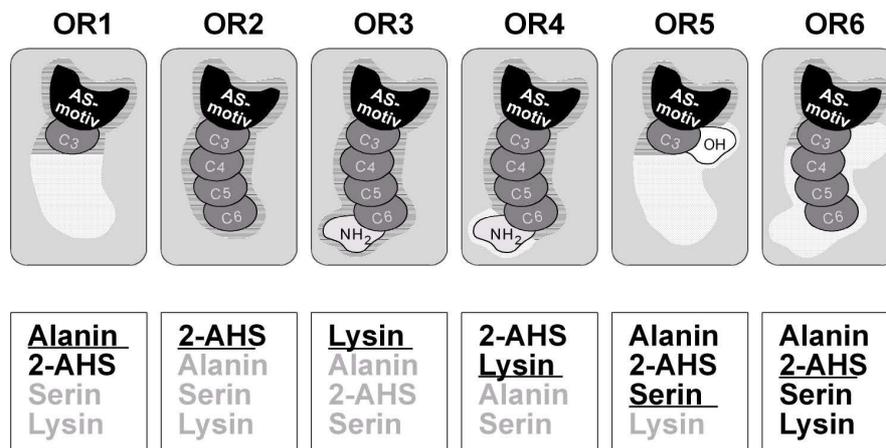


Abb. 42 – Modell der Bindung von Aminosäuren an die Geruchsrezeptoren des Zebrafischs.

Beispiele zur Wechselwirkung zwischen den Aminosäuren und den Geruchsrezeptoren (OR1 bis OR6, *graue Rechtecke*), die in den Antwortkategorien der Subtraktionsanalyse erkannt wurden. In der unteren Reihe sind Aminosäuren aufgelistet, die entweder wirksame Liganden (*schwarz*) für den jeweiligen Geruchsrezeptor darstellen oder keine aktivierende Wechselwirkung mit dem Rezeptor eingehen können (*grau*). Die Vertreter für vier unterschiedliche Aminosäureklassen sind gezeigt (kurzkettig-neutral: Alanin, langkettig-neutral: 2-Amino-hexansäure, basisch: Lysin und polar: Serin). Der im Rezeptormodell skizzierte Ligand ist jeweils *unterstrichen*. Kanonische Bindungsstellen der Rezeptoren sind *gestrichelt*, fakultative Interaktionen (nicht notwendig, jedoch nicht störend) sind *weiss* dargestellt. Die kanonische Bindungsstelle für das Aminosäure-Grundmotiv (*schwarz*) kommt in allen Aminosäure-Geruchsrezeptoren vor. Die Mindestanforderungen, die einzelnen Rezeptoren an die Länge der Seitenkette (*grau*) stellen, sind unterschiedlich (vergleiche OR1 mit OR2). Längere Seitenketten, die über die zur Aktivierung erforderliche Mindestlänge hinausgehen, werden jedoch toleriert (OR1). Die terminale Aminogruppe (*hellgrau*) ist notwendig für die Aktivierung von OR3, aber fakultativ für die Interaktion mit OR4 und OR6. Die  $\beta$ -Hydroxygruppe ist nicht an einer bindenden Wechselwirkung beteiligt, wird jedoch von OR5 und OR6 toleriert.

Auf der Grundlage der hier gefundenen Beziehungen zwischen der Struktur der Geruchsstoffe und den Antworten der Glomeruli, werden die abgeleiteten Eigenschaften der Geruchsrezeptoren zusammenfassend durch das Modell in **Abbildung 42** beschrieben. Aminosäure-Geruchsrezeptoren besitzen ohne Ausnahme kanonische Bindungsstellen für das Aminosäuregrundmotiv, d.h. die  $\alpha$ -Amino und  $\alpha$ -Carboxylgruppe in L-Konfiguration. Darüber hinaus existieren mehrere Geruchsrezeptortypen, die sich durch ein selektives Kettenlängenverhalten auszeichnen und hydrophobe Wechselwirkungen mit den Liganden eingehen können. Einige Rezeptoren erfordern die Präsenz einer weiteren geladenen Gruppe, wie etwa einer terminalen Aminogruppe, um aktiviert zu werden. Wieder andere Rezeptoren tolerieren diese Gruppe, ohne eine direkte Bindung mit ihr einzugehen. Die  $\beta$ -Hydroxygruppe der polaren Aminosäuren ist in keinem Fall an einer bindenden Wechselwirkung mit den Rezeptoren beteiligt, wird aber von einigen Rezeptoren toleriert. Es kommen auch Rezeptoren mit einem sehr breiten Ligandenspektrum vor, die durch alle der untersuchten Aminosäureklassen (neutral, kurz-, langkettig, polar, basisch) erregt werden können.

Die hier abgeleitete Art der Erkennung von Aminosäuremolekülen durch die Geruchsrezeptoren widerspricht den Vorgaben eines Odotop-Konzeptes, das auf der Erkennung kleiner molekularer Einheiten oder isolierter Molekülaspekte beruht (Shepherd, 1987). Die von einem Geruchsrezeptortyp gleichzeitig erkannten Strukturmerkmale der Aminosäuren sind über das gesamte Molekül verteilt und können weit voneinander entfernt angeordnet sein. Daher erscheint eine ganzheitliche Erkennung der Aminosäuremoleküle durch die Rezeptoren wahrscheinlicher als eine separierte Erkennung von Molekülaspekten. Es kommen zwar Rezeptoren vor, die nur einen Ausschnitt des angebotenen Gesamtmoleküls erkennen, z.B. die glyzinempfindlichen Rezeptoren, die auch durch 2-Aminooctansäure erregt werden, jedoch gibt es keine Rezeptoren, die z.B. nur die Seitenkette oder den "Octansäure-Aspekt" erkennen. Die Information über bestimmte Moleküleigenschaften, wie z.B. geladene Substitutionsgruppen, werden daher höchstwahrscheinlich durch die Gesamtheit des aktivierten Geruchsrezeptorrepertoires kodiert.

Ein interessanter, jedoch experimentell bisher nicht untersuchter, alternativer Mechanismus der Wechselwirkung zwischen Geruchsrezeptor und Ligand, ist die Erkennung des Vibrationspektrums der Ligandenmoleküle durch die Geruchsrezeptoren (Wright, 1977; Turin, 1996). Das Potential dieses gedanklichen Ansatzes ist es, dass er eine Beschreibung der strukturell diversen Geruchsstoffe durch eine einheitliche skalare Größe ermöglicht, die zu einem besseren Verständnis der Geruchswahrnehmung und der Grundlage der Geruchskodierung beitragen könnte.

### **1.4 Kombinatorische Kodierung durch aktive Glomeruli.**

Die Kodierung von Geruchsstoffen im olfaktorischen System auf der Ebene des olfaktorischen Bulbus wird in seiner einfachsten Form häufig so verstanden, dass Riechsinneszellen einen bestimmten Rezeptor exprimieren, der das Antwortverhalten dieser Zellen bestimmt. Ein Geruchsstoff stimuliert einige rezeptorgleiche Neuronenpopulationen, deren Erregung in neuronale Aktivität der Glomeruli übersetzt wird. Die Information über einen bestimmten Geruchsstoff wird im olfaktorischen Bulbus in einer charakteristischen Kombination aktiver Glomeruli kodiert.

Zwei Beobachtungen sprechen jedoch dagegen, dass der kombinatorische olfaktorische *Code* im Bulbus nur durch relativ einfache Mechanismen aufgebaut wird. Zum einen wird auch für das allgemeine Geruchssystem gefunden, dass individuelle Riechsinneszellen durchaus mehr als einen einzigen Rezeptortyp exprimieren. Für die Ratte wurde z.B. beobachtet, dass eine Teilpopulation von Zellen, die den Geruchsrezeptor HGL-SL2 exprimieren, zusätzlich auch den Rezeptor I9 exprimieren (Rawson et al., 2000). Zellen, die lediglich den I9 Rezeptor exprimieren, konnten hingegen nicht gefunden werden. Für die Fruchtfliege wurde gezeigt, dass der Rezeptor OR83b simultan in allen Riechsinneszellen exprimiert wird (Vosshall et al., 2000; einer umfangreichen Teilpopulation: M. de Bruyne, G. Misenboeck, pers. Mitteilungen). Zusätzlich exprimiert jede Sinneszelle einen weiteren der insgesamt 46 adult vorkommenden Rezeptoren. Bisher ist nicht bekannt, welchen Umfang eine überlappende Expression verschiedener Rezeptoren im Riechepithel der Vertebraten einnimmt.

Eine weitere wichtige Beobachtung, die bei der einfachen Vorstellung vom Aufbau des olfaktorischen *Codes* nicht ausreichend berücksichtigt wird, ist die Tatsache, dass Geruchsstoffe nicht nur erregend auf die Sinneszellen wirken können. Inhibitorische Signale wurden in Riechsinneszellen von Insekten, Krebsen, Amphibien, Fischen und Ratten beobachtet (Kurahashi et al., 1994; Kang und Caprio, 1995; Cromarty und Derby, 1998; Sanhueza et al., 2000; de Bruyne et al., 2001; Yamada und Nakatani, 2001). Daher könnte die Art und Weise, wie die spezifische Erregung einzelner Glomeruli und damit die Gesamtheit des glomerulären Erregungsmusters im olfaktorischen Bulbus zustande kommt, eine andere Grundlage besitzen als im oben angesprochenen einfachen Modell. Im Falle der polaren Aminosäuren wurde beispielsweise beobachtet, dass bestimmte Glomeruli nicht durch diese Substanzen erregt werden. Daraus wurde auf bestimmte Bindungseigenschaften der Geruchsrezeptoren geschlossen. Das Fehlen einiger Glomeruli könnte jedoch auch eine inhibitorische Grundlage besitzen. Es ist möglich, dass inhibitorischen Antworten der Riechsinneszellen – d.h. eine Verringerung der spontanen Aktionspotentialfrequenz – nicht unbedingt in den hier aufgezeichneten Calciumänderungen der Axonterminalien erkannt werden können. Die spontanen Aktionspotentialfrequenzen unstimulierter Riechsinneszellen sind niedrig (1 - 10 Hz, Kang und Caprio, 1995). Entsprechend sind auch die erwartbaren negativen Calciumänderungen in den synaptischen Endigungen, die während der Inhibition dieser Zellen auftreten, nur gering und finden wahrscheinlich langsam statt. Durch elektrophysiologische Einzelzelleitungen beim Zwergwels wurde jedoch demonstriert, dass Riechsinneszellen auch auf Aminosäuren überwiegend inhibitorisch reagieren (Kang und Caprio, 1995). Individuelle Riechsinneszellen, die durch eine Aminosäure erregt werden, können durch eine andere inhibiert werden. Daraus wurde geschlossen, dass diese Zellen unterschiedliche Rezeptoren exprimieren, die mit verschiedenen Signaltransduktionskaskaden verknüpft sind. Für die Fruchtfliege wurde ebenfalls gezeigt, dass Riechsinneszellen, die durch einen Geruchsstoff erregt werden, durch einen anderen inhibiert werden können (de Bruyne et al., 2001). Würden beispielsweise die Riechsinneszellen, die mit den „fehlenden Glomeruli“ der Antwortmuster polarer Aminosäuren verschaltet sind, durch diese Aminosäuren inhibiert, wäre die Bewertung der entsprechenden Geruchsrezeptoren fehlerhaft.

Die Eindeutigkeit der Repräsentation einzelner Stimuli wäre jedoch nicht beeinträchtigt. Bei einer kombinatorischen Kodierung der Geruchsstoffe durch aktive Glomeruli (Korsching, 2001) ist das Fehlen einzelner Glomeruli in einem Aktivitätsmuster genauso bedeutungsvoll wie die Aktivierung zusätzlicher Glomeruli, da ebenfalls eigenständige Repräsentationen gebildet werden können, die einen bestimmten Stimulus eindeutig beschreiben.

### **1.5 Die laterale Kette und der akzessorische olfaktorische Bulbus.**

Aminosäure-Geruchsantworten werden beim Zebraquariabärbling ausschließlich in den Glomeruli der lateralen Kette (Baier und Korsching., 1994) repräsentiert. Die funktionelle Architektur der lateralen Kette weist jedoch deutliche Unterschiede zu den übrigen Bulbusarealen auf. Die Glomeruli der lateralen Kette sind deutlich kleiner (bis zu 10x) und

mit  $\approx 120$  Mikroglomeruli wesentlich zahlreicher als die des übrigen Bulbus (Baier und Korsching, 1994; Friedrich und Korsching, 1997). Morphologisch sind sie diffus organisiert und schlecht voneinander abgegrenzt. Diese morphologischen Besonderheiten weisen zusammen mit den im Folgenden aufgeführten Befunden auf eine starke Ähnlichkeit der lateralen Kette mit dem akzessorischen olfaktorischen Bulbus der Nager hin. Der AOB ist, wie die laterale Kette, durch eine diffusere Glomerulusstruktur geprägt, die sich deutlich vom allgemeinen olfaktorischen Bulbus unterscheidet (Belluscio et al., 1999; Rodriguez et al., 1999). Die Glomeruli des AOB sind ebenfalls wesentlich kleiner als die Glomeruli des übrigen Bulbus. Typisch für die Glomeruli des AOB ist eine Innervation durch mikrovilläre Chemorezeptorzellen, die VNO-Neurone (Dulac, 2000). Fische besitzen hingegen kein separates vomeronasales Organ und mikrovilläre Sinneszellen kommen zusammen mit cilierten Zellen im gleichen Riechepithel vor (Laberge und Hara, 2001). Durch retrograde Markierung der Zellen, die in den dorsalen und lateralen Bulbus projizieren, können beim Zwergwels überwiegend mikrovilläre Riechsinneszellen erkannt werden (Morita und Finger, 1999). Das Auftreten von Aminosäuresignalen in der lateralen Kette und im lateralen Bulbus des Zwergwelses (Nikonov und Caprio, 2001) legt daher eine Erkennung der Aminosäuren durch mikrovilläre Neurone nahe. Zusätzlich entspricht der einzige bisher funktionell charakterisierte Aminosäure-Geruchsrezeptor des Goldfisches den V2-Chemorezeptoren, die für mikrovilläre Zellen typisch sind (Specia et al., 1999; Dulac, 2000). Auch durch Aktivitätsmarkierungen einzelner Riechsinneszellen, werden beim Zebrabärbling nach der Reizung mit Aminosäurestimuli zahlreiche mikrovilläre Riechsinneszellen markiert (Michel et al., 1999; Lippschitz und Michel, 1999). Weitere Gemeinsamkeiten zwischen lateraler Kette und AOB bestehen in der Verteilung bestimmter G-Protein-Untereinheiten, die jeweils für eines der Systeme typisch sind. Die  $\alpha$ -Untereinheit  $G_{olf}$  wird bei Säugern in cilierten Riechsinneszellen des allgemeinen Riechepithels exprimiert und kann im olfaktorischen Bulbus des Zebrabärblings mit Ausnahme der lateralen Kette gefunden werden (Linda Buck, pers. Mitteilung). Im lateralen Bulbus wird hingegen die Untereinheit  $G_o$  gefunden, die in der apikalen Teilpopulation der VNO-Neurone vorkommt (Halpern, et al., 1995; Dulac, 2000). Darüber hinaus wurde für die axonale Zielfindung der VNO-Neurone in den AOB die Beteiligung bestimmter Rezeptorprotein-Tyrosinkinasen (EphA6, ephrin-A5) gezeigt (Knöll et al., 2001). Paraloge dieser Proteine werden im Bulbus des Zebrabärblings ausschließlich auf den Axonen der Riechsinneszellen gefunden, die in die laterale Kette projizieren. Die bulbofugal projizierenden Efferenzen verlassen den olfaktorischen Bulbus über zwei separate Trakte (LOT, lateraler und MOT, medialer olfaktorischer Trakt), die entsprechend dem Hauptbulbus oder dem lateralen Bulbus entspringen und mit unterschiedlichen primären Projektionsgebieten verschaltet sind (Laberge und Hara, 2001). Bei den Säugetieren verlassen alle Fasern den Hauptbulbus gemeinsam über den LOT. Die Projektionen des AOB sind ebenfalls unabhängig von den Projektionen des Bulbus und innervieren andere cortikale Areale.

Zusammengenommen bieten diese Befunde einen Hinweis auf die funktionelle Gleichartigkeit von AOB und lateraler Kette. Eine direkte Demonstration der Verschaltung mikrovillärer Zellen mit dem lateralen Bulbus des Zebrabärblings steht allerdings noch aus, da durch retrograde Färbungen von der lateralen Kette sowohl mikrovilläre als auch cilierte

Riechsinneszellen markiert wurden (Lieberoth, 1999). Durch die Applikation des retrograden Tracers werden allerdings auch vorbeiziehende Faserbündel markiert, deren Färbung zu dem Anteil der ciliierten Zellen beitragen könnte. Die grundlegende funktionelle Architektur der lateralen Kette ist jedoch ebenfalls von entscheidender Bedeutung für die Interpretation der gewonnenen Aktivitätsmuster. Im AOB innervieren rezeptorgleiche Neuronenpopulationen unterschiedliche Glomeruli (Belluscio et al., 1999; Rodriguez et al., 1999) und es könnte sein, dass individuelle Glomeruli durch unterschiedliche rezeptorgleiche Neuronentypen innerviert werden (Belluscio et al., 1999; siehe aber Rodriguez et al., 1999). Zusätzlich wurde gezeigt, dass individuelle VNO Neurone der G<sub>o</sub>-positiven Schichten des VNO, im Unterschied zum allgemeinen Riechepithel, mehrere V2-Rezeptoren simultan exprimieren (Martini et al., 2001). Würde eine solche Verschaltung und Rezeptorexpression in der lateralen Kette des Zebrafischbestehen, könnten bei der Betrachtung glomerulärer Antwortprofile ebenfalls irrtümlich breitbandige Ligandenspektren der Rezeptoren abgeleitet werden. Für die basischen und polaren Aminosäuren kann eine Mischinnervation der Glomeruli durch Riechsinneszellen mit nichtüberlappenden molekularen rezeptiven Bandbreiten jedoch ausgeschlossen werden, da eine vollständige Adaptation auch für diese breitbandigen Glomeruli beobachtet wurde. Für die kettenlängensensitiven Geruchsrezeptoren neutraler Aminosäuren kann diese Aussage jedoch bisher nicht gemacht werden, da sie nicht experimentell geprüft wurde.

## **1.6 Unterscheidungsvermögen und Konzentrationskodierung.**

### **1.6.1 Unterscheidungsvermögen.**

Durch eine quantitative Analyse der Musterunterschiede glomerulärer Eingangssignale wurde die Eindeutigkeit bulbärer Repräsentationen strukturell ähnlicher Aminosäuren untersucht. Gleichzeitig wurde betrachtet, inwieweit Konzentrationsunterschiede nahe verwandter Stimuli zu Ähnlichkeiten zwischen diesen Mustern führen. Für die meisten Kreuzvergleiche wurden starke Unterschiede der Muster gefunden, die weit über der Variabilität repetitiver Stimuluspräsentationen lagen. Auf der Ebene praesynaptischer glomerulärer Aktivität können daher sehr ähnliche Stimuli, die sich nur um ein bis zwei Methylgruppen voneinander unterscheiden, über einen weiten Konzentrationsbereich voneinander unterschieden werden.

Mit zunehmender Konzentration gleichen sich die Repräsentationsmuster auch strukturell wenig verwandter Stimuli einander an, da eine zunehmende Anzahl an Rezeptoren in den Sättigungszustand übergeht. Für individuelle Glomeruli wurden sigmoidale Dosis-Wirkungskurven gefunden, die einen Konzentrationsbereich von 2 – 3 logarithmischen Einheiten überspannen. Damit besitzen die Glomeruli einen relativ breiten Arbeitsbereich. Für die olfaktorischen Glomeruli von Maus, Ratte und Schildkröte wurden ähnlich breite Arbeitsbereiche gefunden (Wachowiak et al., 2000; Meister und Bonhoeffer, 2001; Wachowiak und Cohen, 2001; Fried et al., 2002). Für die Bandbreiten der Aktionspotentialfrequenzen isolierter Riechsinneszellen von Amphibien und Mäusen wurden

jedoch wesentlich engere Dosis-Wirkungskurven gefunden (Firestein et al., 1993; Trotier et al., 1994; Reisert und Matthews, 2001). In diesen elektrophysiologischen Studien saturieren die Aktionspotentialfrequenzen über einen Bereich von 3 - 10-facher Konzentration. Leider liegen für den Zebrafisch bisher keine elektrophysiologischen Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit des Antwortverhaltens isolierter Riechsinneszellen vor, die mit den breitbandigen Dosis-Wirkungskurven der Glomeruli verglichen werden könnten. Daher bleibt für den Zebrafisch offen, ob die Dosis-Wirkungskurven der Glomeruli das Verhalten von Einzelzellen widerspiegeln. Die Befunde, die an der Maus gewonnen wurden, deuten allerdings auf einen systemischen Effekt als Grundlage der dynamischen Bandbreiten der Glomeruli hin. Die Glomeruli integrieren über die gesamte Population der innervierenden Riechsinneszellen. Die größeren Arbeitsbereiche der Glomeruli könnten durch eine zunehmend rekrutierte Zahl antwortender Riechsinneszellen zustandekommen, die zwar den gleichen Rezeptor, jedoch unterschiedliche Schwellenkonzentrationen besitzen (Firestein et al., 1993; Malnic et al., 1999; Ma und Shepherd, 2000). Eine konzentrationsabhängige Zunahme der antwortenden Zellen könnte auch durch eine effektivere Ausbreitung hochkonzentrierter Stimuli im Riechepithel bedingt sein. Geruchsstimuli passieren das Riechepithel in der Regel sehr rasch und werden nur kurz exponiert. Höher konzentrierte Stimuli könnten daher einen größeren Ausschnitt des komplex gefalteten Riechepithels erreichen und erregen.

Interessanterweise, und im Kontrast zu den Aktionspotentialfrequenzen, weisen sowohl die Rezeptorströme als auch die Calciumkonzentrationen isolierter Riechsinneszellen der Maus, wie die Glomeruli, einen Arbeitsbereich von 2 - 3 logarithmischen Einheiten der Konzentration auf (Reisert und Matthews, 2001). Bei der Übertragung von den Rezeptorströmen zu den Aktionspotentialen scheint demnach zunächst eine Reduktion des dynamischen Umfangs einzutreten.

Die Steigungen der Dosis-Wirkungskurven individueller Glomeruli waren identisch für unterschiedliche Stimuli und die Steigungen unterschiedlicher Glomeruli waren mehr oder weniger identisch für einen Geruchsstoff. Diese Beobachtungen decken sich gut mit intrinsischen Messungen glomerulärer Aktivität bei der Ratte, in der identische Steigungen der Dosis-Wirkungskurven für alle Glomeruli, jedoch verschiedene  $K_i$ -Werte für unterschiedliche Riechstoffe gefunden wurden (Meister und Bonhoeffer, 2001; Fried et al. 2002). Sie kontrastieren jedoch Befunde, die durch Calciummessungen in der Maus gewonnen wurden, bei der unterschiedliche Steigungen der Dosis-Wirkungskurven individueller Glomeruli gegenüber unterschiedlichen Geruchsstoffen erkannt wurden (Wachowiak und Cohen, 2001). Möglicherweise waren jedoch in der intrinsischen Studie und in der hier vorliegenden Arbeit die verwendeten Geruchsstoffe untereinander zu ähnlich (homologe Reihen), um Unterschiede zwischen den Dosis-Wirkungskurven einzelner Glomeruli für unterschiedliche Substanzen erkennen zu können.

Die Beobachtungen an der Maus machen es wahrscheinlich, dass die effektiven Eingangssignale der Glomeruli eine wesentlich größere dynamische Bandbreite besitzen als die Signale individueller Riechsinneszellen. Damit ist denkbar, dass die hohe Sensitivität des Geruchssystems für Konzentrationsunterschiede teilweise erst durch eine systemische Verschaltung und durch die Integration über eine umfangreiche Population von Sinneszellen

erreicht wird. Es sollte jedoch auch bedacht werden, dass die hier verwendeten Konzentrationen den Bereich natürlich vorkommender Stimuluskonzentrationen weit übertreffen. Die Schwellenkonzentrationen für die Erkennung einzelner Aminosäuren liegen bei den meisten Fischarten zwischen  $10^{-9}$  bis  $10^{-7}$  M (Hara, 1982), also weit unterhalb der Detektionsschwelle für Calciummessungen praesynaptischer Aktivität im olfaktorischen Bulbus des Zebraäbrblings.

### 1.6.2 Konzentrationskodierung – ein Problem.

Durch höhere Konzentrationen wurden zunehmend neue Glomeruli aktiviert, wie aus der Betrachtung der Dosis-Wirkungskurven einzelner Glomeruli bereits hervorgeht. Dieser Zuwachs aktiver Glomeruli ist drastisch und manifestiert sich letztendlich in eigenständigen Antwortmustern für identische Stimuli unterschiedlicher Konzentration. Ähnliche Beobachtungen wurden auch am Antennallobus der Insekten und dem olfaktorischen Bulbus der Nager gemacht (Rubin und Katz, 1999; Sachse et al., 1999; Johnson und Leon, 2000; Meister und Bonhoeffer, 2001), stehen aber im Gegensatz zu Befunden, die an der Schildkröte erhoben wurden (Wachowiak et al., 2000). Im *Bulbus olfactorius* der Schildkröte verändern sich die relativen Erregungen der Glomeruli zueinander nur geringfügig mit zunehmender Konzentration, die Gesamtstärke der Signale und die Zahl der überschwellig antwortenden Glomeruli nimmt jedoch zu. Eine Zunahme der antwortenden Riechsinneszellen mit der Konzentration wurde auch an isolierten Riechsinneszellen und im Gewebeverband beobachtet (Malnic et al., 1999; Ma und Shepherd, 2000). Die konzentrationsabhängige Veränderung der Antwortmuster beim Zebraäbrbling ist, im Gegensatz zur Schildkröte und in Übereinstimmung mit Maus und Ratte, sowohl absolut als auch relativ. Konzentrationsabhängige Unterschiede in den Antwortmustern sind auch nach der Normierung der Signale auf das jeweilige Maximum markant und stellen eigenständige Repräsentationen für unterschiedliche Konzentrationen des gleichen Geruchsstoffs dar.

Diese uneindeutigen Befunde werfen die Frage nach dem grundsätzlichen Mechanismus der Intensitätskodierung von Geruchsstoffen auf. Es ist eine tägliche Erfahrung, dass ein Geruchsstoff trotz unterschiedlicher Intensität in der Regel qualitativ gleichartig wahrgenommen wird. Diese Erfahrung scheint der markanten Veränderung des glomerulären Aktivitätsmusters im olfaktorischen Bulbus zu widersprechen. Das Rätsel der Konzentrationskodierung im olfaktorischen System ist bisher nicht ganz gelöst. Auf der Ebene der Riechsinneszellen führen stärkere Konzentrationen zu höheren Aktionspotentialfrequenzen, kürzeren Latenzzeiten bis zum Beginn einer Erregung und kürzeren *Bursts* (Duchamp-Viret et al., 2000). Auf der Seite des Riechsinneszelleingangs in die Glomeruli werden mit steigender Konzentration eines Geruchsstoffes jedoch qualitative Unterschiede in den glomerulären Antwortmustern registriert. Welche Folgen besäße eine solche Intensitätskodierung für die Geruchswahrnehmung? Sofern die absolute glomeruläre Aktivitätskarte maßgebend für die Qualität der Geruchswahrnehmung ist, sollte sich auch der Geruchseindruck mit zunehmender Konzentration eines Duftstoffes massiv ändern. In der Tat kann ein solcher Effekt für einige Riechstoffe beobachtet werden (Rossiter, 1996). Für die Mehrzahl der Geruchsstoffe trifft das

jedoch nicht zu und ist im Hinblick auf die profunden konzentrationsabhängigen Musterunterschiede, die in dieser und anderen Arbeiten berichtet werden, bemerkenswert. Für den Zebrabärbling liegen bisher keine Verhaltensstudien des Geruchssystems vor, die mit den hier gewonnenen Daten verglichen werden könnten. Daher kann nicht beurteilt werden, ob beispielsweise die Aminosäure Alanin bei verschiedenen Konzentrationen vom Zebrabärbling unterschiedlich wahrgenommen wird, oder ob ein bestimmter Geruchsstoff über unterschiedliche Konzentrationen generalisiert werden kann.

Aufgrund fehlender Verhaltens- oder psychophysischer Studien, die mit physiologischen Untersuchungen einer Spezies verglichen werden könnten, ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob die absoluten Erregungen einzelner Rezeptorkanäle oder deren Erregungsverhältnisse für die Wahrnehmung einer Geruchsqualität bedeutsam sind. Das letztgenannte Szenario erinnert stark an die Vorgänge beim Farbsehen. Für das visuelle System wurde durch das Studium des Farbraums erkannt, dass die Erregungsverhältnisse der drei unterschiedlichen Zapfentypen ausschlaggebend für den jeweiligen Farbsinneseindruck sind (Barthels und Zeki, 2000). Für die glomeruläre Aktivität des Zebrabärblings sind jedoch sowohl die absoluten Erregungsmuster als auch die relativen Verhältnisse der Erregungen bei unterschiedlichen Konzentrationen voneinander verschieden. Auch in der DI-Wertberechnung wurde über die Einzelerregungen unterschiedlicher Merkmalskanäle (Glomeruli) normiert. Trotzdem werden deutliche, qualitative Unterschiede in den Repräsentationsmustern unterschiedlicher Konzentrationen des gleichen Stimulus gefunden.

Für postsynaptische glomeruläre Signale wurde durch elektrophysiologische, aktivitätsmarkierende oder nichtinvasive bildgebende Verfahren beobachtet, dass die Antwortstärken, im Gegensatz zu den beschriebenen praesynaptischen Signalen, kaum von der Stimuluskonzentration abhängen (Chalansonnet und Chaput, 1998; Johnson et al., 2000; Yang et al., 2000). Die Gleichartigkeit der Mitralzellantworten über einen weiten Konzentrationsbereich (Chalansonnet und Chaput, 1998) und die Konstanz der Wahrnehmung suggerieren, dass die qualitativen Veränderungen des praesynaptischen Aktivitätsmusters nicht auf die Mitralzellen übertragen werden. Konzentrationsinformation könnte eventuell durch eine Übertragung der zeitlichen Veränderungen von Riechsinneszellantworten kodiert werden (Duchamp-Viret et al., 2000; siehe jedoch unten). Zusätzlich wird angenommen, dass Informationen über die Schärfe eines Geruches unabhängig vom olfaktorischen System über eine nasale Reizung des Trigeminalnerven übertragen wird (Cometto-Muniz et al., 1998).

Es sollte jedoch auch hier noch einmal kritisch erwähnt werden, dass die jeweils benutzten Stimuluskonzentrationen sehr hoch sind und physiologisch relevante und natürlich vorkommende Konzentrationsbereiche weit überschreiten. Für Aminosäuren liegen die Detektionsschwellenwerte der Fische zwischen  $10^{-9}$  und  $10^{-7}$  M (Hara, 1982). Auch für die landlebenden Spezies liegen effektive Geruchsstoffkonzentrationen im Bereich weniger ppm und können bereits zu profunden Geruchseindrücken führen (Rossiter, 1996; Turin und Yoshii, 2002). Aller Wahrscheinlichkeit nach ist der tatsächliche olfaktorische *Code* wesentlich spärlicher und besteht aus wesentlich weniger aktiven Glomeruli als in den umfangreichen Aktivitätsmustern unphysiologisch hoher Geruchsstoffkonzentrationen erkannt wird.

## 1.7 Geruchsverarbeitung nach den Riechsinneszellen.

### 1.7.1 Kontrastverstärkung.

Für den Zebraquariabärbling und für die meisten anderen Spezies (siehe aber Rubin und Katz, 2001; Linster et al., 2001) ist bisher nicht gut untersucht, ob und in welchem Umfang Unterschiede in den glomerulären Erregungsmustern in allen weiteren olfaktorischen Verarbeitungsebenen bis hin zur Wahrnehmung erhalten bleiben. Verhaltensstudien zur Geruchswahrnehmung sind am Zebraquariabärbling bisher nicht durchgeführt worden. Es wäre allerdings sehr aufschlussreich, die in dieser Studie erarbeiteten Ähnlichkeitsprofile der Repräsentation nahe verwandter Stimuli unterschiedlicher Konzentration mit Verhaltensdaten zur Unterscheidungsfähigkeit zu vergleichen, um die Signifikanz glomerulärer Antwortmuster besser interpretieren zu können. Sicherlich werden nicht alle, in den Riechsinneszellantworten erkannten Parameter an die Mitralzellen übertragen. So wird beispielsweise Information über die Konzentration der Geruchsstoffe in den Riechsinneszellen auch durch zeitliche Veränderungen der Spikefrequenz kodiert, die hier nicht erfasst wurden. Die Integration durch die synaptische Verschaltung rezeptorgleicher Neurone in einem Glomerulus macht eine exakte Übertragung solcher zeitlicher Parameter allerdings unwahrscheinlich (Chalansonnet und Chaput, 1998; Duchamp-Viret et al., 2000).

Glomeruli sind intensiv über Interneurone miteinander vernetzt (Mori et al., 1998). In der einfachsten Erklärung der Funktion dieses Netzwerkes wird angenommen, dass es einer Kontrastverstärkung der Repräsentationen sehr ähnlicher Geruchsstoffe dient. Riechsinneszellen, die sehr ähnliche Geruchsrezeptoren mit starker Sequenzhomologie exprimieren, projizieren in benachbarte Glomeruli (Tsuboi et al., 1999). Es wird angenommen, dass sehr ähnliche Geruchsrezeptoren auch sehr verwandte Ligandenspektren besitzen. Übereinstimmend mit dieser Idee, besitzen eng benachbarte Glomeruli auch sehr ähnliche molekulare rezeptive Bandbreiten (Meister und Bonhoeffer, 2001). Eine solche Organisation wird auch im olfaktorischen Bulbus des Zebraquariabärblings deutlich. Glomeruläre Gruppen mit verwandten Antwortprofilen, z.B. Glomeruli, die basische Aminosäuren bevorzugen oder ab einer bestimmten Kettenlänge auf neutrale Aminosäuren antworten, liegen eng benachbart und sind deutlich von Glomerulusgruppen mit anderen generellen Antwortprofilen separiert. Die räumliche Nachbarschaft von Glomeruli mit einem ähnlichen Ligandenprofil macht deshalb eine bevorzugte laterale Interaktion gerade zwischen diesen Glomeruli wahrscheinlich. Für die Projektionsneurone des Kaninchens wurde gezeigt, dass Mitralzellen relativ enge rezeptive Bandbreiten besitzen und entlang der Kettenlängendimension auf Stimuli mit Kettenlängendifferenzen von 2 bis 3 beschränkt sind (Imamura et al., 1992). Stimuli mit einer kürzeren oder längeren Kohlenstoffkette üben einen inhibitorischen Einfluss auf diese Zellen aus (Imamura et al., 1992; Katoh et al., 1993; Yokoi et al., 1995). Diese Zentrum-Umfeld-Anordnung erinnert an die Organisation rezeptiver Felder, wie sie in der frühen visuellen Wahrnehmung vorkommen (Lee, 1996; Meister, 1996). Alternativ zur Kontrastverstärkung wird vorgeschlagen, dass die opponente Organisation der molekularen rezeptiven Felder einer Dekorrelation benachbarter Glomeruli dienen könnte, wodurch eine bessere Trennung

einzelner Merkmalskanäle und letztendlich eine nichtredundante Repräsentation auf der Ebene der Mitralzellen erreicht würde (Meister und Bonhoeffer, 2001).

Die im Vergleich mit den Riechsinneszellen deutlich engeren rezeptiven Bandbreiten der Mitralzellen könnten auch ein Grund für die offensichtlichen Diskrepanzen zwischen intrinsischen und farbstoffunterstützten optischen Ableitungen glomerulärer Aktivität sein (Rubin und Katz, 1999; Uchida, 2000; Meister und Bonhoeffer, 2001; Wachowiak und Cohen, 2001; Fried et al., 2002). Durch intrinsische Messungen werden wesentlich weniger aktive Glomeruli erkannt als durch farbstoffunterstützte optische Verfahren. Durch Blockade der synaptischen Übertragung von den Riechsinneszellen auf postsynaptische Neurone werden bis zu 70% der Antwortstärken intrinsischer Signale eliminiert (M. Meister, pers. Mitteilung). Daher könnten die Signale intrinsischer Aktivitätsmessungen möglicherweise die eingeschränkten Bandbreiten postsynaptischer Signale repräsentieren. Neben diesen Unterschieden des Ursprungs der gemessenen Aktivität in beiden Verfahren bestehen auch markante Unterschiede in der Sensitivität. Die Signalstärken intrinsischer Verfahren liegen weit unterhalb der Intensitäten farbstoffunterstützter Messungen.

### **1.7.2 Zeitliche Synchronisation.**

Eine weitere, häufig kontrovers diskutierte Funktion der lateralen inhibitorischen Verschaltung im olfaktorischen Bulbus kann auch in einer zeitlichen Synchronisation von Mitralzellantworten bestehen. Im olfaktorischen Bulbus der Vertebraten und den homologen Strukturen der Invertebraten treten periodische Schwankungen lokaler Feldpotentiale auf (Adrian, 1950; Delaney und Hall, 1996; Gelperin und Tank, 1990; Kay und Laurent, 1999; Friedrich und Laurent, 2001; Vickers et al., 2001). Diese Oszillationen spiegeln die Gesamtaktivität des inhibitorischen Netzwerkes, hauptsächlich jedoch die Aktivität der Körnerzellen wider. In einer umfangreichen Studie an den Mitralzellen des Zebrafisches (Friedrich und Laurent, 2001) konnte, wie auch für andere Tierarten, eine zeitliche Synchronisation antwortender Mitralzellen untereinander und mit den Feldpotentialschwankungen gezeigt werden (Delaney und Hall, 1996; Wehr und Laurent, 1996; Kashiwadani et al., 1999). Im Zebrafisch ist die Spikewahrscheinlichkeit der Mitralzellen mit einem bestimmten Phasenwinkel der spontanen Bulbusoszillationen korreliert (Friedrich und Laurent, 2001). Eine vergleichbare Synchronisation der Aktionspotentiale der Riechsinneszellen besteht hingegen nicht. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Synchronisation der Mitralzellen durch die Verschaltung im synaptischen Netzwerk des Bulbus generiert wird. Der direkte Zusammenhang der Synchronisation der Mitralzellantworten mit der inhibitorischen Verschaltung im olfaktorischen Bulbus des Zebrafisches wurde jedoch nicht pharmakologisch untersucht. Er wird aber durch vergleichbare Untersuchungen an der Heuschrecke und der Honigbiene gestützt (Wehr und Laurent, 1996; Stopfer et al., 1997). Die Synchronisation der bulbofugal projizierenden Neurone soll eine funktionelle Relevanz für den Eingang der Mitralzellaktivität in cortikale olfaktorische Areale besitzen, in denen ebenfalls Oszillationen im gleichen Frequenzbereich abgeleitet werden können (Laurent, 1999; Haberly, 2001). Die korrelierte Aktivität der

Mitralzellen könnte dort im Sinne einer zeitlichen Bindung (Singer, 1999) fungieren und auch für plastische Veränderungen der nachgeschalteten Pyramidenzellen des olfaktorischen Cortex essentiell sein.

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen schnellen Feldpotentialschwankungen wurde auch gezeigt, dass Mitralzellen, die einen Glomerulus innervieren, durch langsame Oszillationen (2 Hz) synchronisiert werden (Schoppa und Westbrook, 2001). Als Ursache dieser Oszillationen wird eine kompartimentierte Ausschüttung von Glutamat innerhalb eines Glomerulus aus den primären Dendriten der Mitralzellen angesehen. Als funktionelle Bedeutung dieses Effektes wird eine korrelierte Signalverstärkung derjenigen Mitralzellen angenommen, die einen Glomerulus gemeinsam innervieren. Durch die Ausschüttung von Glutamat werden EPSPs an der Mitralzellmembran drastisch verstärkt. Das könnte die Übertragung von den Riechsinneszellen auf die Mitralzellen dahingehend verbessern, dass auch unterschwellig erregte Mitralzellen, die den gleichen Glomerulus innervieren, rekrutiert werden (Schoppa und Westbrook, 2001). Ein solcher Mechanismus würde die Konzentrationsempfindlichkeit der Mitralzellen dämpfen und könnte für die beobachtete Invarianz der Mitralzellantworten gegenüber Konzentrationsunterschieden (Chalansonet und Chaput, 1998) mit verantwortlich sein. Darüber hinaus wurde aber auch eine Synchronisation solcher Mitralzellen, die mit unterschiedlichen Glomeruli verschaltet sind, im olfaktorischen Bulbus des Kaninchens nachgewiesen (Kashiwadani et al., 1999). Die Grundlage der Synchronisation benachbarter Glomeruli beruht wahrscheinlich auf der direkten synaptischen Verschaltung dieser Glomeruli durch Interneurone, da nicht die Antwortprofile aller Mitralzellen zeitlich miteinander korreliert sind. In der Zebrabärblingstudie waren jedoch alle der 50 untersuchten Mitralzellen an eine bestimmte Phase der lokalen Feldpotentialschwankungen gebunden (Friedrich und Laurent, 2001). Zusätzlich gibt es auch Hinweise darauf, dass Mitralzellen, die an unterschiedlichen longitudinalen Koordinaten des olfaktorischen Bulbus liegen, mit unterschiedlichen Phasenwinkeln der Oszillationen korreliert sind (R. Friedrich, pers. Mitteilung). Durch ein solches Prinzip könnte zusätzlich Information über den räumlichen Ursprung einer Erregung zeitlich kodiert werden, was für nachgeschaltete Neurone, die über viele unterschiedliche Eingänge integrieren relevant sein könnte.

Genauso bemerkenswert wie die Synchronisation der Mitralzellen ist eine konsistente zeitliche Veränderung der Antwortcharakteristik eines ganzen Ensembles von Mitralzellen, die ebenfalls im olfaktorischen Bulbus des Zebrabärblings beobachtet wurde (Friedrich und Laurent, 2001). Aminosäurestimuli führten zu einer charakteristischen und stimulus-spezifischen zeitabhängigen Veränderung des Ensemblecodes in 50 untersuchten Mitralzellen. Die Autoren schlossen daraus, dass die robusten und für einen bestimmten Geruchsstoff invarianten Veränderungen, die in den Zeitintervallen unmittelbar nach einem Stimulus auftreten, zu einer zunehmend eindeutigeren Beschreibung der Stimuli führen. Sie sind von der weiter oben angesprochenen Idee einer Dekorrelation der Mitralzellen (Meister und Bonhoeffer, 2001), wie sie in der frühen visuellen Wahrnehmung stattfindet, grundsätzlich verschieden, da neue Merkmale durch zusätzliche Antwortqualitäten kodiert werden (Friedrich und Laurent, 2001).

Es wäre daher sehr aufschlussreich, die Aktivitätskarten der Eingangs- und Ausgangsaktivität im olfaktorischen Bulbus miteinander zu vergleichen, da so Aspekte der Funktion des synaptischen Bulbusnetzwerkes verstanden werden könnten. Optische Ableitverfahren zur Messung der postsynaptischen Erregung müssen jedoch erst noch entwickelt werden. Bisher liegt nur eine Studie vor, in der postsynaptische Glomerulusstrukturen selektiv mit einem Aktivitätsfarbstoff angefärbt wurden (Delaney et al., 2001). Jedoch ist die dort verwendete Färbeprozedur durch herkömmliche neuroanatomische Verfahren mit einer massiven Beeinträchtigung des Bulbusgewebes verbunden und letztlich auf einige wenige Glomeruli beschränkt. Die Ensembleaktivität vieler (aller) Glomeruli kann mit solchen Methoden nicht gemessen werden. Methodisch bemerkenswert an der Studie von Delaney et al. (2001) ist jedoch die Tatsache, dass auch in den Calciumsignalen der Mitralzellendriten postsynaptische Potentiale erkannt werden konnten, die durch Stimulation des olfaktorischen Traktes oder direkt durch Körnerzellen bedingt waren. Es wird allerdings bei der Betrachtung dendritischer Mitralzellaktivität immer noch die Frage offen bleiben, inwieweit diese Signale tatsächlich in weitergeleitete Nervenzellaktivität übersetzt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde begonnen, einen Ansatz zu verwirklichen, der es erlauben würde, Zugang zu den einzelnen Ebenen der Signalverarbeitung im *Bulbus olfactorius* zu erhalten und den Ensemblecode postsynaptischer Zellen zu visualisieren.

### **1.8 Geruchsverarbeitung nach dem olfaktorischen Bulbus.**

Vom olfaktorischen Bulbus wird Geruchsinformation parallel in unterschiedliche Cortexareale weitergeleitet. Wenig ist bisher über die Gestaltbildung der Geruchswahrnehmung in höheren olfaktorischen Arealen bekannt. Der anteriore olfaktorische Cortex (früher olfaktorischer Nukleus genannt) wird als neuronales Substrat für die Gestaltbildung angesehen (Haberly, 2001), wohingegen der anteriore Piriforme Cortex eher mit der Geruchserkennung, der Erinnerung und dem erfahrungsbedingten Erlernen von Geruchseindrücken befasst sein soll (Schoenbaum und Eichenbaum, 1995; Haberly, 2001). Der anteriore olfaktorische Cortex unterscheidet sich von den übrigen olfaktorischen Cortexarealen dadurch, dass er als einziger unimodalen Eingang nur aus dem *Bulbus olfactorius* erhält, wohingegen der Piriforme Cortex multimodale Eingänge unterschiedlicher sensorischer Qualitäten erhält (Haberly, 2001). Für die Wiedererkennung komplexer Geruchsinformation im Piriformen Cortex wurde aufgrund neuroanatomischer und elektrophysiologischer Befunde ein autoassoziatives Netzwerk vorgeschlagen, das diesen komplexen Operationen zugrundeliegen könnte (Haberly, 2001). Die Logik dieses Netzwerkes geht davon aus, dass die Mächtigkeit des Geruchsraumes reduziert wird und Information über einen Geruch in einem räumlich zeitlichen Aktivierungsschema unterschiedlicher Pyramidenzellen gespeichert und abgerufen werden kann. Individuelle Pyramidenzellen können innerhalb dieses Netzwerkes in die Repräsentation verschiedener Gerüche eingebunden sein. Diese Annahmen werden durch jüngste neuroanatomische Studien gestützt, die auf eine massive Reduktion der glomerulären Merkmalskanäle hindeuten (Zou et al., 2001). So nimmt im Piriformen Cortex das Projektionsareal eines einzelnen Glomerulus

bis zu 5% des gesamten Volumens ein. Bei einer 1:1 Projektion aller Glomeruli auf distinkte Projektionsareale würde jedoch bei einem vollständigen Erhalt separierter Merkmalskanäle nur ein Areal von 0.1% des Gesamtvolumens erwartet. In Übereinstimmung damit, wurde durch Selbst- und Kreuzadaptationsstudien erkannt, dass die Pyramidenzellen des Piriformen Cortex multiglomeruläre Eingänge erhalten (zusammengefasst in Wilson, 2001). Es wurden vier unterschiedliche Kategorien von Pyramidenzellen gefunden, die entweder durch den ipsi- oder den contralateralen Bulbus, durch beide Bulbi gleichermaßen oder nur durch beide Bulbi gemeinsam erregt werden. Es ist jedoch noch ein weiter Weg bis zum vollständigen Verständnis der Operationen im neuronalen Netzwerk des olfaktorischen Bulbus und bewusster olfaktorischer Wahrnehmungsprozesse.

## **2 SEPARATION DES NEURONALEN NETZWERKES IM *BULBUS OLFACTORIUS* DURCH MOLEKULARGENETISCHE MARKER.**

Wie vorhergehend bereits angesprochen, ist es eine interessante Herausforderung, die Verarbeitungsebenen des neuronalen Netzwerkes im olfaktorischen Bulbus in seinen Einzelkomponenten anzusprechen und zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde damit begonnen, durch molekulargenetische Methoden Zugriff auf die Ebene der Riechsinneszellen sowie die Ebenen der Projektions- und Interneurone zu nehmen.

### **2.1 Riechsinneszellen und *zOMP*.**

Im Falle der Riechsinneszellen konnte das homologe Gen des Olfaktorischen Marker Proteins für den Zebrafärbung, das *zOMP*, kloniert werden. Die Expression des *zOMP* Gens ist auch für den Zebrafärbung ein verlässlicher Marker reifer sensorischer Neuronen im Riechepithel. Das Expressionsmuster des *zOMP* ist deckungsgleich mit der epithelialen Anordnung sensorischer Neurone, die durch *In situ*-Hybridisierungen mit Geruchsrezeptorgensonden, mit Sonden gegen den CNG-Kanal und durch retrograde Färbestudien erkannt wurde (Baier et al., 1993; Baier und Korsching, 1994; Barth et al., 1996; Weth et al., 1996; Byrd et al., 1997; Lieberoth, 1999). Innerhalb einzelner Lamellen der olfaktorischen Rosette sind *zOMP*-positive Zellen häufiger in den mittleren und apikalen Schichten anzutreffen, wohingegen basale Anteile überwiegend frei von *zOMP* exprimierenden Zellen sind. Diese Expressionsverteilung deckt sich gut mit der Vorstellung, dass Riechsinneszellen von neuronalen Vorläuferzellen, den horizontalen Basalzellen, gebildet werden, die überwiegend in den basalen Abschnitten lokalisiert sind (MacKay-Sim und Kittel, 1991). Das Fehlen von *zOMP* Expression in basalen Bereichen gibt einen guten Hinweis darauf, dass auch im Zebrafärbung nur reife Neuronen nach Abschluss ihrer basal-apikalen Wanderung das *zOMP* exprimieren. Ebenso wurden auch in Bereichen mit starker Proliferationsaktivität, wie sie in den inneren Kurven der Lamellen und an der epithelialen Wachstumszone zwischen dem sensorischen und nicht-sensorischen Bereich auftreten (Berger, 1999), kaum *zOMP* positive Zellen beobachtet. Detaillierte Zellmorphologien konnten durch die Färbung der *In situ*-

Hybridisierung jedoch nicht aufgelöst werden. Da mit Ausnahme der basalen Bereiche alle Lamellenschichten, einschließlich extrem apikaler Abschnitte, angefärbt wurden, kann aber davon ausgegangen werden, dass, analog zu der Expression des *OMP* bei den Mammalia (Johnson et al., 1993), sowohl cilierte als auch mikrovilläre Riechsinneszellen das *zOMP* exprimieren. Entsprechend werden auch unter Kontrolle des *zOMP*-Promotors Reportergene sowohl in cilierten als auch in mikrovillären Neuronen exprimiert. In Embryonen des Zebrafisches, die eine simultane Betrachtung aller Gewebe erlauben, konnte außer in den embryonalen Riechepithelien keine weitere Färbung für *zOMP* beobachtet werden. Das *zOMP* Gen wird daher, wie bei anderen Spezies auch, selektiv in den Geweben des Riechepithels exprimiert.

Das *zOMP* Gen besitzt keine weiteren Familienmitglieder. In genomischen Southern-Analysen konnten auch unter niedrigstringenten Bedingungen keine weiteren hybridisierenden Gene gefunden werden. Es ist bemerkenswert, dass der Zebrafisch, der sich durch eine Verdopplung des Genoms auszeichnet (Postlethwait et al., 2000) nur über eine Kopie des *zOMP* Gens verfügt. Die Genduplikation wird jedoch eher auf zahlreiche unabhängige Duplikationsereignisse als auf eine ancestrale Verdopplung des gesamten Genoms zurückgeführt (Robinson-Rechavi et al., 2001). Da sie jedoch die Regel bei den meisten Euteleostei darstellt, könnten so die zwei *OMP* Paraloge erklärt werden, die aus dem Medakagenom isoliert wurden (Yasuoka et al., 1999). Möglicherweise liegt das *OMP* Gen beim Medaka in einem duplizierten Genomabschnitt. Beim afrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) wurden sogar insgesamt 4 *OMP* Gene gefunden, die in zwei Subfamilien segregieren und in unterschiedlichen Kompartimenten des Riechepithels exprimiert werden (Rössler et al., 1998). Das könnte wiederum damit zusammenhängen, dass Amphibien über spezialisierte Riechepithelien oder Kompartimente für die Geruchswahrnehmung in aquatischer und terrestrischer Umwelt verfügen. Das Vorkommen eines einzigen *zOMP* Gens beim Zebrafisch ist jedoch in guter Übereinstimmung mit dem Vorkommen jeweils eines *OMP* Gens bei der Ratte, der Maus und dem Menschen (Buiakova et al., 1994; Danziger et al., 1989).

Das *OMP* ist eines der abundantesten Proteine in den Riechsinneszellen und kann bis zu 1% aller cytoplasmatischen Proteine der Riechsinneszellen (Margolis, 1988) und bis zu 1% des Gesamtproteins des olfaktorischen Bulbus (Margolis, 1972) ausmachen. Dennoch ist über die Funktion des *OMP* in den Riechsinneszellen trotz intensiver Forschung bisher nicht sehr viel bekannt. In *OMP*-nullmutanten Mäusen konnte lediglich eine leichte Veränderung der Kinetiken von EOG-Profilen beobachtet werden (Buiakova et al., 1996). Der Wildtyp kann durch virale Überexpression des *OMP* in nullmutanten Mäusen wiederhergestellt werden, weshalb die Autoren auf eine Funktion des *OMP* in der olfaktorischen Signaltransduktionskaskade der Riechsinneszellen schlossen (Ivic et al., 2000). Auf der Einzelzellebene wurde die physiologische Funktion des *OMP* bisher nicht untersucht. Systemisch konnte eine Beeinträchtigung der Geruchswahrnehmung in den nullmutanten Mäusen gefunden werden. Homozygote *OMP*-negative Tiere zeigen in Verhaltenstests eine 50 bis 100-fach höhere Detektionsschwelle als Wildtypen (Youngentob und Margolis, 1999) und sind in ihrer Unterscheidungsfähigkeit für ähnliche Geruchsstoffe beeinträchtigt (Youngentob et al., 2001).

Bereits relativ kurze genomische Sequenzabschnitte von 300 bp oberhalb des *zOMP* Gens bewirken eine spezifische Expression von Reportergenen in den Riechsinneszellen des Zebrabärblings. Für weiterreichende genomische Abschnitte wurde jedoch eine verbesserte regulatorische Wirksamkeit, sowohl in der Penetranz als auch in der Expressivität beobachtet. Das legt das Vorkommen regulatorischer Elemente, welche die Expression des *zOMP* steuern innerhalb der ersten 1.4 kb oberhalb des Translationsstartes nahe. Eine vergleichbare Abhängigkeit der Effektivität des *OMP*-Promotors von der Länge der stromaufwärts gelegenen Sequenz wurde auch für die Maus gezeigt (Margolis, 1993). Die *OMP*-Promotoren der Maus und des Menschen besitzen konservierte Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Olf-1 und NF-1, die entscheidend für die Regulation der *OMP*-Genexpression sind (Buiakova et al., 1994). In der genomischen Sequenz des *zOMP*-Promotors konnten trotz intensiver Suche keine Transkriptionsfaktorbindungsstellen für die Regulatoren Olf-1 und NF-1 gefunden werden. In den *OMP*-Promotoren der Maus und des Menschen wurde darüber hinaus eine konservierte Tandemanordnung des Olf-1-Bindungsmotivs erkannt (Buiakova et al., 1994), die ebenfalls nicht im *zOMP*-Promotor identifiziert werden konnte. Entweder sind die Olf-1 und NF-1 Motive im Zebrabärblingen genom bis zur Unkenntlichkeit verändert oder das *zOMP* wird gänzlich anders reguliert. Keiner der beiden Transkriptionsfaktoren, die auch bei der Genregulation in nicht-olfaktorischen Geweben eine Rolle spielen (siehe z.B. Degtarev und Foster, 1999; Devireddy und Jones, 2000; Dowell und Cooke, 2001) wurde bisher für den Zebrabärbling kloniert. Die Olf-1 Bindungsstelle kommt auch in den Promotoren anderer riechsinneszellenspezifischer Gene und in den Intergenregionen der Rezeptorgencluster vor (Bakalyar und Reed, 1990; Jones und Reed, 1990; Dhalan et al., 1990; Glusman et al., 2000). Mit Ausnahme eines 140.7 kb umfassenden genomischen Rezeptorgenclusters sind bisher keine flankierenden genomischen Sequenzen dieser Gene für den Zebrabärbling bekannt (Dugas und Ngai, 2001). Es konnten aber keine übereinstimmenden Sequenzmotive zwischen dem *zOMP*-Promotor und den genomischen Sequenzen der Geruchsrezeptorintergenregionen gefunden werden.

Genomische Insertionen von Reportergenen in den *OMP* Genloкус stellen bei Mäusen wichtige Werkzeuge in der Olfaktionsforschung dar, da so eine gezielte Expression in allen Riechsinneszellen und VNO-Neuronen erreicht werden kann (siehe z.B. Mombaerts et al., 1996). Durch geeignete Kreuzungen mit weiteren Mutanten können interessante Aspekte der Verschaltung von Riechsinneszellen untersucht werden. Auch beim Zebrabärbling wurden durch Expression eines Reportergens unter *zOMP*-Promotorkontrolle mikrovilläre und cilierte Neurone markiert, weshalb auf eine konservierte Funktion des *OMP*-Gens im Zebrabärbling geschlossen werden kann. Die Tatsache, dass beide Zelltypen markiert werden, die in unterschiedlichen apikal-basalen Schichten des Riechepithels lokalisiert sind, stimmt gut mit der Expressionsverteilung des *zOMP* in den mittleren bis apikalen Schichten des Riechepithels überein. Die Axone der transgenexprimierenden Neurone terminieren in glomerulären Entwicklungsfeldern des embryonalen Vorderhirns, die im Verlauf der Ontogenese zunächst in unterschiedliche Glomerulusgruppen separieren und sich dann weiter aufspalten (Dynes und Ngai, 1998; Lieberoth, 1999). Die Verbindung der Neurone mit den Glomeruli ist direkt und weist auf eine gezielte axonale Wegfindung der Riechsinneszellaxone hin. Fluoreszierende Axone wurden im gesamten embryonalen *Bulbus olfactorius* und allen

glomerulären Entwicklungsfeldern angetroffen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Wirksamkeit des *zOMP*-Promotors nicht auf eine spezielle Subpopulation von Zellen beschränkt ist. Die mittleren Expressionsraten des Transgens lagen während der ersten 5 Tage der Embryonalentwicklung bei durchschnittlich 3% aller *zOMP* positiven Neurone, die in der *In situ*-Hybridisierung erkannt werden konnten. Eine ektopische Expression des Reportergens war in den untersuchten transient transgenen Embryonen bei moderater Plasmidkonzentration gering. Über die Riechsinneszellen hinaus wurden auch im olfaktorischen System keine weiteren Zelltypen fluoreszent markiert. Die Expression des Reportergens war stark, wie es die hohen Transkriptionsraten des endogenen *zOMP* erhoffen ließen.

Insgesamt wurden die Erwartungen, die an den *zOMP*-Promotor geknüpft wurden, gut erfüllt. Die erhaltenen Konstrukte sind einfach, die Expressionsraten hoch und die Expressionsmuster spezifisch. Es werden auch in transient transgenen Embryonen ausreichend viele Zellen markiert und die Penetranz war mit bis zu 50% sehr gut. Stabile transgene Linien wurden bisher noch nicht erhalten. Die durchschnittliche Erfolgsrate, potentielle Gründerfische zu erhalten, liegt bei etwa 5% aller erfolgreich injizierten und überlebenden Embryonen (Culp et al., 1991; Higashijima et al., 1997). In dieser Arbeit wurden insgesamt > 5.000 Embryonen injiziert, allerdings war es aus unterschiedlichen Gründen nicht immer möglich, Embryonen bis zur Geschlechtsreife aufzuziehen. Zum einen bestanden generelle Probleme bei der Aufzucht von Embryonen, die zum Teil durch unvorteilhafte Wasserparameter bedingt waren. Zum anderen wurden zunächst adulte Fische aus laboreigenen und bisher häufig ingezüchteten Populationen verwendet, deren normale Reproduktionsrate bereits weit unter dem Durchschnitt lag. Die Reproduktionsrate und die Qualität der Eier sind zusätzlich von einer kontinuierlichen Kreuzung der Elternfische abhängig (Westerfield et al., 1995). Diese Bedingungen waren zu Beginn der Arbeiten nicht gegeben, da erst zu einem späteren Zeitpunkt eine relativ junge Brutpopulation aufgebaut wurde. Durch eine regelmäßige Paarung konnte die Qualität der Eier und damit die Überlebensraten gesteigert werden. Zusätzlich wurden viele Transgen positive Tiere weiterverwendet, täglich beobachtet oder zur Dokumentation fixiert. Daher liegt der Effektivanteil der tatsächlichen Population bei ungefähr 1%. Lediglich für das Konstrukt *prOMP-dsRed-IRES-EYFP* konnte bisher ein potentieller Gründerfisch identifiziert werden (Çelik, 2001). Die Nutzen einer stabilen Reporterlinie, die ein fluoreszentes Protein in allen Riechsinneszellen exprimiert und in der auch die Glomeruli *in vivo* dargestellt werden, sind vielfältig. Sie eignet sich zum Studium der Verschaltungsbildung und der Glomerulusformation während der Embryogenese oder zur Identifizierung der Riechsinneszellen nach Dissoziation für eine Verwendung in Zellkulturen. Eine stabile transgene Linie könnte auch in Mutagenese-*Screens* zur Identifizierung olfaktionsspezifischer Mutanten eingesetzt werden.

Der *zOMP*-Promotor ist ein wirkungsvolles molekulares Werkzeug, das es ermöglicht, Strukturgene selektiv und mit hoher Effizienz in den Riechsinneszellen des Zebrafisches zu exprimieren. Neuartige Konstrukte können wegen der unkomplizierten Handhabbarkeit der Promotorsequenz leicht hergestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde damit begonnen, genetisch kodierte Calciumindikatoren in die Riechsinneszellen einzuschleusen. Darüber hinaus sind zahlreiche weitere Anwendungen, wie die Überexpression regulatorischer Gene

während der Entwicklung oder Verschaltungsbildung oder die Störung solcher Gene durch Dominant-Negative Interferenz (Çelik, 2001) oder RNAi denkbar.

## 2.2 Körnerzellen und *dlx2*.

Das *dlx2* Gen des Zebrafisches wurde in dieser Studie als potentieller Marker für die Körnerzellen im olfaktorischen Bulbus verwendet. In *In situ*-Hybridisierungsstudien wurde die selektive Expression dieses Gens in den Körnerzellen des olfaktorischen Bulbus klar erkannt (Çelik, 2001). Bisher konnte jedoch für das *dlx2* Gen und somit für die Interneurone kein spezifischer Promotor isoliert werden. Durch eines der verwendeten Konstrukte, das eine sehr umfangreiche, 9.5 kb große, stromaufwärts gelegene Sequenz des *dlx2* Gens enthält, wurde eine Expression des Reportergens mit einiger Spezifität in Neuronen des gesamten Körpers erhalten.

Für andere Mitglieder der *dlx* Genfamilie wurde das Vorkommen eines interspezies-wirksamen *Enhancers* in der Region zwischen den Genen *dlx4* und *dlx6* gezeigt, der eine regulatorische Wirkung auf die zell- und gewebespezifische Expression beider Mitglieder des Genpaares besitzt (Zerucha et al., 2000). Eine körnerzellspezifische Expression könnte daher durch die Einbeziehung der *dlx1/dlx2* Intergenregion in das Expressionskonstrukt weiter verstärkt werden. Bisher war jedoch jeder Versuch, die identifizierte und subklonierte *dlx1/dlx2* Intergenregion in eines der Konstrukte zu integrieren, nicht erfolgreich. Im Falle der großen Konstrukte könnte das mit einer Überschreitung der Aufnahmefähigkeit des Vektorrückgrates zusammenhängen. Das Konstrukt *prdlx2<sub>9,5</sub>-Y* besitzt bereits eine Gesamtgröße von rund 13 kb, wodurch die Aufnahme weiterer DNA-Abschnitte erschwert oder unmöglich sein könnte. Für die kleineren Konstrukte sollte das jedoch nicht zutreffen. In der angesprochenen Studie von Zerucha et al. (2000) wurde die Funktion des intergenischen *Enhancers* mit einem Fremdpromotor ( $\beta$ -Globin Promotor) untersucht. Wünschenswert für das hier untersuchte Problem wäre ein Konstrukt, welches den *dlx2* Minimalpromotor zusammen mit der intergenischen Enhancersequenz enthält.

Trotz der Schwierigkeiten und der apparenten unspezifischen Wirkung, könnte auch das bereits vorliegende *prdlx2<sub>9,5</sub>-Y* Konstrukt genutzt werden. Mit diesem Konstrukt wurden auch im olfaktorischen Bulbus mit guter Regelmäßigkeit Neurone fluoreszent markiert. In einigen Fällen konnten aufgrund der Zellmorphologie Mitralzellen und axonlose, lokale Interneurone erkannt werden. Eine transgene Linie konnte bisher nicht etabliert werden, daher ist ungewiss, welches Ausmaß eine Expression in solchen Tieren annehmen würde. Durch die Verwendung transient exprimierender Embryonen könnte das Konstrukt *prdlx2<sub>9,5</sub>-Y* jedoch zur Untersuchung einzelner Neurone im *Bulbus olfactorius* eingesetzt werden.

## 2.3 Mitralzellen und *ztbr1*.

Für die Mitralzellen wurde ein zelltypspezifisches Genfragment des *ztbr1* Gens isoliert. Trotz intensiver Bemühungen und unterschiedlicher methodischer Ansätze konnte in

den zur Verfügung stehenden cDNA-Bibliotheken kein vollständiger cDNA-Klon gefunden werden. Interessanterweise wurde während der hier beschriebenen Arbeiten von einer unabhängigen Gruppe ebenfalls das *Tbr1*-homologe Gen des Zebrafisches publiziert (Mione et al., 2001). Es ist bemerkenswert, dass auch in der Studie von Mione et al. (2001) nur eine partielle cDNA-Sequenz gefunden werden konnte. Lediglich einer der publizierten cDNA-Klone ist in der 5'-Richtung um 150 bp länger als das hier beschriebene Fragment.

Die Schwierigkeiten, das *ztbr1* Gen des Zebrafisches in vollständiger Länge zu isolieren, könnte mit Problemen der reversen Transkriptase während der Herstellung der cDNA-Bibliothek zusammen hängen. Probleme mit der reversen Transkription treten vor allem bei langen oder seltenen Transkripten sowie bei GC-reichen Sequenzen auf (Hu und Zuckermann, 1995). Ein vorzeitiger Abbruch der reversen Transkription durch Faltungen der Sekundärstruktur wurde für einige mRNA-Sequenzen berichtet (z.B. Zhang et al., 2001). Der hier gefundene cDNA-Klon besitzt bereits ein *Insert* von 2.5 kb Länge. Probleme der reversen Transkriptase, die auf eine maximale Transkriptlänge *in vitro* beschränkt sein könnte (Hu und Zuckermann, 1995), sind daher für das *ztbr1* ebenfalls denkbar.

Wie die *Tbr1* Homologe anderer Spezies (Ueno et al., 2000), besitzt das *ztbr1* Gen eine komplexe genomische Intron-Exonstruktur, wie aus einem Vergleich der cDNA-Sequenz mit einer genomischen Datenbank erkannt werden konnte. Diese Struktur macht es schwierig, den Transkriptionsstartpunkt des Gens zu bestimmen. Die Kenntnis des Transkriptionsstartpunktes ist jedoch für die Herstellung putativer *ztbr1*-Promotorkonstrukte von essentieller Bedeutung. In den genomischen PAC-Bibliotheken konnten bisher keine Klone, die das *ztbr1* Gen enthalten, verifiziert werden. Sequenzhomologien der untersuchten PAC-Klone bestanden sowohl zu den *Tbr2* und *Tbr1* Genen. Da die Sequenz der genomischen Klone mit keinem der beiden *tbr*-Gene des Zebrafisches (Mione et al., 2001) vollständig übereinstimmt, kann davon ausgegangen werden, dass ein weiteres Mitglied der *ztbr*-Genfamilie isoliert wurde. Die sehr spezifische Expression des *ztbr1* Gens in den Mitralzellen des Zebrafisches lässt die Suche nach dem entsprechenden Promotor und seine spätere Anwendung trotz der hier beschriebenen Probleme weiterhin vielversprechend erscheinen.

Die Expression des *ztbr1* Gens ist, wie das Maushomolog, im olfaktorischen Bulbus auf eine definierte Zellpopulation beschränkt (Bulfone et al., 1998). Die Expression der *ztbr1* Transkripte im Telencephalon und Bulbus des Zebrafisches, sowie in Teilen des Diencephalons legen eine konservierte Funktion dieses Gens in der Regulation der Hirnentwicklung (Hevner et al., 2001) beim Zebrafisch nahe. Die Größe der Zellkörper, sowie die glomerulusassoziierte Verteilung der *ztbr1* exprimierenden Zellen macht es wahrscheinlich, dass es sich, wie bei der Maus, um Mitralzellen handelt. Die Anzahl *ztbr1*-positiver Zellen wurde auf ungefähr 1.200/Bulbus bestimmt. Diese Zahl übertrifft die Abschätzung des Umfangs der Mitralzellpopulation durch W. Michel, die durch Neurotransmitterfärbungen auf 300 - 500 abgeschätzt wurde, weit (unpubliziert, zitiert in Friedrich und Laurent, 2001). Möglicherweise können die Unterschiede durch eine geringere Sensitivität der Neurotransmitterfärbungen erklärt werden. Es kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass zusätzliche Neuronen des Bulbus (z.B. *ruffed cells*) das *ztbr1* exprimieren, die in der Neurotransmitterfärbung von W. Michel nicht angefärbt wurden.

Die Schichtung des olfaktorischen Bulbus ist beim Zebrafisch nicht so hoch organisiert wie bei den Säugetieren (Byrd und Brunjes, 1995). Die *zobr1*-positiven Zellen waren überwiegend in der glomerulären Schicht oder direkt unterhalb, zwischen glomerulärer und innerer Zellschicht, zu finden. Die Verteilung der Mitralzellen im Bulbus des Zebrafisches wurde auch durch elektronen- und lichtmikroskopische Studien sowie durch Antikörperfärbungen gegen Neurotransmitter untersucht und in übereinstimmenden Bulbuschichten gefunden (Byrd und Brunjes, 1995; W. Michel,  $\alpha$ -Aspartat Immunhistochemie, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Somata dieser Zellen besitzen, im Gegensatz zu ihrer charakteristischen Mitralform bei den Säugern, beim Zebrafisch rundlich ovale Profile. Bei niederen Invertebraten innervieren Mitralzellen gleichzeitig mehrere Glomeruli (Dryer und Graziadei, 1994; Friedrich und Laurent, 2001). Aus den in vorhergehenden Teilen dargestellten Überlegungen kann eine Ähnlichkeit des lateralen Bulbus des Zebrafisches mit dem AOB der Säuger angenommen werden. Es ist jedoch den bisher publizierten Arbeiten nicht eindeutig zu entnehmen, ob das Prinzip der multiglomerulären dendritischen Innervation einzelner Mitralzellen auch in den Bulbusarealen außerhalb des lateralen Bulbus gilt. Für den AOB der Säuger deuten vorläufige Ergebnisse darauf hin, dass individuelle Mitralzellen solche Glomeruli simultan innervieren, die mit rezeptorgleichen VNO-Neuronen verschaltet sind (Peter Mombaerts, pers. Mitteilung).

#### **2.4 Zusammenfassende Beurteilung.**

Die dargestellten Anstrengungen wurden unternommen, um das komplexe bulbäre Netzwerk molekulargenetisch in seine funktionellen Einzelkomponenten zu zerlegen. Teile dieser Absicht konnten in der vorliegenden Dissertation verwirklicht werden und die generelle Durchführbarkeit einer genetischen Separation der einzelnen Verarbeitungsebenen wurde für die Riechsinneszellen gezeigt. Die neuroanatomische Darstellung und Identifizierbarkeit der Mitral- und Körnerzellen birgt bereits ein wertvolles experimentelles Potential. Zusammen mit der weiter unten beschriebenen Anwendung proteinbasierter Calciumindikatoren, zur Aktivitätsmessung in den Riechsinneszellen des Zebrafisches, weisen die beschriebenen Teilergebnisse in eine fruchtbare Richtung mit einer breiten Palette möglicher Anwendungen. Mit der Identifizierung des *zOMP*-Promotors wurde ein wertvolles Werkzeug bereitgestellt, das eine breite Anwendbarkeit besitzt (siehe z.B. Çelik, 2001; Graef, 2001). Die Erfahrungen mit dem *zOMP* Gen lehrt aber auch, dass zusätzliche Anstrengungen die richtigen Promotorkonstrukte für das *dlx2* und das *zobr1* Gen zu erhalten, methodisch vielversprechend sind. Dabei liegt die weitere experimentelle Strategie für ein *dlx2*-Reporterkonstrukt klar auf der Hand. Es ist sehr wahrscheinlich, dass ein intergenischer *enhancer* zusammen mit einem Minimalpromotor des *dlx2* Gens zu der gewünschten körnerzellspezifischen Expression führen wird. Für das *zobr1* muss zunächst noch ein positiver genomischer Klon identifiziert und dann das entsprechende 5'-Ende des Gens im Genom des Zebrafisches gefunden werden. Methodische Probleme bereiten hier vor allem die komplexe genomische Organisation dieses Gens sowie die vermutlich auch im Zebrafisch hohe Zahl weiterer T-box Gene mit denen es je nach Sonde leicht zu Kreuzhybridisierungen kommen kann.

**3 DIE ANWENDBARKEIT PROTEINBASIERTER CALCIUMSENSOREN IM GERUCHSSYSTEM DES ZEBRABÄRBLINGS.**

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche, auf Modifikationen des GFP basierende Calciumsensoren auf ihre Anwendbarkeit im olfaktorischen System des Zebrafischarbais untersucht. Der Indikator *CaMeleon* erwies sich als eine gut sichtbare Reporterprobe, mit der jedoch keine Aktivitätssignale in den Riechsinneszellen aufgezeichnet werden konnten. Bisher liegen nur wenige Studien vor, in denen das *CaMeleon* erfolgreich angewendet wurde (z.B. Kerr et al., 2000; Yu und Hinkle, 2000). Die relativ schlechten Calciumbindungseigenschaften und die geringe dynamische Bandbreite der Fluoreszenzänderungen (Miyawaki et al., 1997) könnten Ursachen für das Ausbleiben von messbaren Veränderungen des *CaMeleons* in den Riechsinneszellen des Zebrafischarbais darstellen. Das *CaMeleon* wurde erfolgreich in HeLa Kulturzellen angewendet, die mit Calciumtransienten von 2 - 3  $\mu\text{M}$  auf eine Stimulation mit Histamin antworten (Miyawaki et al., 1997). Diese Calciumkonzentrationen liegen weit oberhalb der Werte, die für geruchsstimulierte Calciumtransienten von Riechsinneszellen erwartet werden (400 - 600 nM, Bozza und Kauer, 1998). In der Studie von Kerr et al. (2000) wurden Calciumänderungen des gesamten Pharynxmuskels von *C. elegans* während der Kontraktion mit *CaMeleon* gemessen. Dabei wurde über die auftretenden Veränderungen des gesamten Gewebes gemittelt. Dieser methodische Unterschied könnte ebenfalls für die, im Gegensatz zu den Riechsinneszellen des Zebrafischarbais, erfolgreiche Anwendung des *CaMeleons* bei *C. elegans* verantwortlich sein. Die Calciumbindungseigenschaften des *CaMeleons* wurden konsequent weiterentwickelt und führten zu weiteren FRET-basierten Calciumindikatoren, die hier nicht untersucht wurden (z.B. Truong et al., 2001). Mit großer Wahrscheinlichkeit ist das hier verwendete *CaMeleon* für die relativ geringen somatischen Calciumänderungen der Riechsinneszellen nicht sensitiv genug. Eine Untersuchung transgener Zebrafischarbaislinien, die das *CaMeleon* in allen Riechsinneszellen exprimieren, wäre jedoch auf der Ebene des olfaktorischen Bulbus nach wie vor interessant, da in den Glomeruli die synaptischen Aktivitäten einer großen Population von Riechsinneszellen gemeinsam betrachtet werden könnten und daher stärkere Signale als auf der Einzelzellebene denkbar sind.

Die Calciumindikatoren *CaMgaroo* und *flash-pericam* konnten in den transient transgenen Embryonen nicht durch ihre Eigenfluoreszenz erkannt werden, obwohl zumindest das *flash-pericam* Protein durch einen  $\alpha$ -GFP-Antikörper in den Riechsinneszellen plasmidinjizierter Embryonen nachgewiesen werden konnte. Der Kd-Wert des *CaMgaroo*s liegt mit 7  $\mu\text{M}$  ebenfalls sehr hoch (Baird et al., 1999). Daher stellen die geringen Calciumkonzentrationen unstimulierter Riechsinneszellen und die damit verbundene geringe Farbstoff-Fluoreszenz des *CaMgaroo*s eine mögliche Ursache für die schlechte Sichtbarkeit dar. Im Falle des *flash-pericams* sollte dieses Argument jedoch nicht unbedingt zutreffend sein, da der Kd-Wert des *flash-pericam* mit 0.7 (Nagai et al., 2001) bereits relativ niedrig liegt. Klonierfehler während der Herstellung der Konstrukte können wegen des positiven Nachweises von *flash-pericam* durch die  $\alpha$ -GFP-Immunhistochemie ebenfalls ausgeschlossen werden.

Durch das *invers-pericam* war es allerdings möglich, Calciumänderungen in den Riechsinneszellen des Zebrafischlings zu detektieren. Das *invers-pericam* besitzt seine stärkste Fluoreszenz bei niedrigen Calciumkonzentrationen. Diese Eigenschaft macht es für die Anwendung in transient transgenen Embryonen besonders geeignet, da *invers-pericam*-positive Zellen leicht erkannt werden können. Riechsinneszellen konnten durch depolarisierende Stimuli gereizt und die Veränderungen des Calciummilieus konnten erwartungsgemäß als ein Abfall der Fluoreszenzintensität aufgezeichnet werden (Nagai et al., 2001). Darüber hinaus war es auch möglich, spezifische Antworten auf Geruchsstoffe mit dem *invers-pericam* abzuleiten. Individuelle Riechsinneszellen konnten wiederholt mit dem gleichen Stimulus gereizt werden. Die beobachteten Fluoreszenzänderungen lagen in einer Größenordnung von 2 bis 5% und sind damit relativ robust. Interessanterweise konnten auch die Fluoreszenzänderungen einzelner Axone gemessen werden. Diese Eigenschaft macht den *invers-pericam* Calciumindikator auch für die Untersuchung glomerulärer Repräsentationen von Geruchsstoffen im olfaktorischen Bulbus des Zebrafischlings, oder für Untersuchungen der Variabilität des Antwortverhaltens einzelner Fasern, die den gleichen Glomerulus innervieren, anwendbar.

### 3.1 Calcium und Riechsinneszellen.

Die Kenntnis der intrazellulären Calciumkonzentration ist eine wichtige Voraussetzung für die Funktion und die Abschätzung der erwartbaren Signalstärken durch die Calciumindikatoren in den Riechsinneszellen. Durch Laser Scanning Calciumimagingverfahren wurde die Kinetik der Calciumströme in den zellulären Kompartimenten der Riechsinneszellen des Salamanders bestimmt. In den Cilien wurde eine Ruhekonzentration von 40 nM ermittelt (Leinders-Zufall et al., 1997). Das Zeitprofil der Calciumaktivierung in den Cilien verläuft rapide und wird mit einer Verzögerung von 300 ms auf den Dendriten und das Soma übertragen. Ruhekonzentrationen werden in den Cilien nach ca. 5 s erreicht. Die Verzögerung der Calciumausbreitung zwischen Dendrit und Soma sind in der selben zeitlichen Größenordnung wie die Latenzen bis zum Beginn geruchsstoffinduzierter Aktionspotentiale, die in elektrophysiologischen Untersuchungen der Antwortcharakteristik einzelner Riechsinneszellen erkannt wurden (Duchamp-Viret et al., 1999). Für die hier beschriebenen Experimente sind die somatischen Calciumkonzentrationen jedoch weitaus relevanter, da die gemessenen Calciumänderungen über das gesamte Soma der Riechsinneszellen integriert wurde. Die somatischen Ruhekonzentrationen liegen ebenfalls bei 40 bis 68 nM (Leinders-Zufall et al., 1997; Bozza und Kauer, 1998). Während einer Geruchsantwort werden Spitzenkonzentrationen des freien Calciums von ungefähr 400 bis 600 nM in isolierten Riechsinneszellen der Maus erreicht (Bozza und Kauer, 1998).

Lägen vergleichbare Verhältnisse beim Zebrafischling vor, ergäben sich die folgenden Implikationen für die Anwendung der unterschiedlichen Calciumindikatoren. Die  $K_d$ -Werte von *CaMeleon* und *CaMgaroo* liegen in Zellkultursystemen bei 7  $\mu$ M. Die maximalen Fluoreszenzänderungen betragen 2- bis 7-fach. Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass mit diesen Messproben in lebenden Riechsinneszellen robuste Signale an Einzelzellen

aufgezeichnet werden können. Die  $K_d$ -Werte der *pericam* Familie liegen wesentlich niedriger. Mit  $0.7 \mu\text{M}$  für *flash-pericam*,  $1.7 \mu\text{M}$  für *ratio-metric-pericam* und  $0.2 \mu\text{M}$  für das erfolgreich angewendete *invers-pericam*, werden zunehmend  $K_d$ -Werte erreicht, die dem herkömmlichen Farbstoff Calcium green<sup>TM</sup>-1 vergleichbar sind ( $K_d$ -Wert von  $0.19 \mu\text{M}$ , Haugland, 1996). Die Fluoreszenzänderungen der *pericams* betragen zwischen 7- und 10-fach. Konsistent mit den unterschiedlichen Eigenschaften der untersuchten Calcium-indikatoren und der erwarteten freien Calciumkonzentration, die während einer Riechsinneszellantwort auftritt, konnten nur durch *invers-pericam* verlässliche Signale aufgezeichnet werden.

Das beobachtete Zeitprofil des Fluoreszenzverlaufes des *invers-pericam* während einer Riechsinneszellantwort passt gut mit dem Zeitverlauf der freien Calciumkonzentration zusammen. Die intrazelluläre Calciumkonzentration steigt während einer Geruchsantwort rasch an (Leinders-Zufall et al., 1997) und kann auch bis zu einigen Minuten nach dem Geruchsstimulus persistieren (Reisert und Matthews, 2001). In Übereinstimmung damit wurde auch für die *invers-pericam*-Fluoreszenz ein rascher Abfall und ein deutlich verlangsamter Wiederanstieg der Fluoreszenz beobachtet.

### **3.2 Methodische Erwägungen.**

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschliesslich calciumsensitive Messproben verwendet. Calciumsignale werden an den Dendriten, den Somata und den Axonterminalien von Neuronen erwartet. Ein entscheidender interpretatorischer Nachteil ist es jedoch, dass aus den somatischen oder dendritischen Calciumänderungen nicht auf die effektiven Ausgangssignale der untersuchten Zellen geschlossen werden kann. Für die Riechsinneszellen der Maus wurde beispielsweise gezeigt, dass die somatischen Calciumtransienten während einer Geruchsantwort nicht die gleiche Dynamik wie die Aktionspotentiale besitzen gefunden (Firestein et al., 1993; Trotier et al., 1994; Reisert und Matthews, 2001). Im Falle der dargestellten glomerulären Signale im olfaktorischen Bulbus besteht diese interpretatorische Einschränkung jedoch nicht, da die synaptische Aktivität der Axonterminalien der Riechsinneszellen direkt untersucht wurde. Die hier begonnenen Untersuchungen sollten aber letztendlich auch auf nachgeschaltete Ebenen der Informationsverarbeitung ausgedehnt werden. Besonders interessant wäre der direkte Vergleich der Erregungskarten glomerulärer Eingangs- und Ausgangssignale. Durch die Verwendung calciumsensitiver Farbstoffe oder Proteine kann jedoch die Ausgangsaktivität der Mitral- und Körnerzellen nicht direkt erfasst werden. Diese Probleme könnten durch die Verwendung spannungssensitiver oder synaptischer Aktivitätsindikatoren überwunden werden. Es besteht bereits eine Palette unterschiedlicher GFP-basierter Messproben, welche mit dem synaptischen Vesikelzyklus verbunden sind und synaptische Aktivität von Neuronen signalisieren (Miesenböck et al., 1998; Yuste et al., 2000). Durch die Anwendung solcher Indikatoren könnten auch die lokalen dendritischen Signale der Körnerzellen im olfaktorischen Bulbus untersucht und das Ausgangssignal dieser Zellen erkannt werden. Spannungsabhängige genetisch kodierte Farbstoffe sind bisher noch nicht verfügbar, stellen jedoch ein intensiv bearbeitetes Feld der gegenwärtigen Forschung dar.

---

#### 4 SCHLUSSBEMERKUNGEN.

Der Zebraärbling ist ein geeignetes und einfaches Modellsystem zur Untersuchung unterschiedlicher Fragestellung in der Olfaktionsforschung. Die, im Vergleich zu höheren Vertebraten, reduzierte Komplexität des Systems bietet eine experimentelle Übersichtlichkeit, die entscheidende praktische Vorteile besitzt. Die hier durchgeführten Calciummessungen am olfaktorischen Bulbus hätten in der Vollständigkeit des überschauten Repertoires an Glomeruli und Rezeptoren nicht in gleichartiger Weise an der Maus durchgeführt werden können, da jeweils nur Ausschnitte der bulbären Oberfläche angeschaut werden können (Fried et al., 2002). Ein entscheidender Nachteil des Zebraärblingsystems ist es jedoch, dass viele individuelle Glomeruli aufgrund fehlender Marker oder Landmarken nicht angesprochen werden können. Besonders in der lateralen Kette, in der die Aminosäureantworten auftreten, können einzelne Glomeruli nicht erkannt werden. Es ist jedoch für eine weiterreichende Interpretation und ein tieferes Verständnis des Kodierungsprinzips im Geruchssystem eine entscheidende Voraussetzung, auch Kenntnis über die Identität einzelner Rezeptoren und Glomeruli und deren Ligandenspektrum zu erlangen. Dies scheint für die Aminosäuren – die grundsätzlich wegen ihrer großen Zahl an verfügbaren Strukturderivaten sehr geeignete Geruchsstoffe darstellen – und die Glomeruli der aminosäurekodierenden Region im Bulbus des Zebraärblings auf lange Sicht nicht möglich zu sein. Rekombinante transgene Techniken, wie sie bei der Maus verwendet werden, sind derzeit im Zebraärbling nicht allgemein etabliert. Die hier angewendeten transient transgenen Techniken zeigen jedoch, dass das System auch durch relativ einfache Techniken manipulierbar ist. Es konnten nicht alle der angestrebten Ziele erreicht werden, jedoch konnten einzelne Bausteine für jedes dieser Ziele geformt und zu einem nicht zu visionären Bild zusammengesetzt werden. Mit einiger Anstrengung und der konsequenten Weiterverfolgung der eröffneten Ansätze ist zu erwarten, dass mit hoher Effizienz und Selektivität Zelltypen im olfaktorischen Bulbus angesprochen und für weitere Untersuchungen manipuliert werden können. Diese Möglichkeiten würden die Signifikanz des Zebraärblings als olfaktorisches Modellsystem weiter verstärken. Eine ernstzunehmende Lücke und damit zwingende Notwendigkeit besteht in der Durchführung gezielter Verhaltensuntersuchungen zur Geruchswahrnehmung des Zebraärblings, um physiologische Befunde auf der Ebene des Gesamtsystems interpretierbar zu machen. Diese Wissenslücke ist das Skotom, welches einen Blick auf das olfaktorische Gesamtsystem unmöglich macht. Denn letztendlich ist auch das Gehirn des Zebraärblings eine evolutive Anpassung an Lebensbedingungen und Erfahrungen und ... *thus creates a world unique to the class of brains comparably designed.*



## VI. LITERATUR

- Adrian ED (1950) The electrical activity of the mammalian olfactory bulb. *Electroencephalog Clin Neurophysiol*, **2**:377.
- Adrian ED (1953) Sensory messages and sensation. The response of the olfactory organ to different smells. *Acta Physiol Scand*, **29**:5-14.
- Akimenko MA, Ekker M, Wegner J, Lin W, Westerfield M (1994) Combinatorial expression of three zebrafish genes related to distal-less: part of a homeobox gene code for the head. *J Neurosci*, **14**:3475-3486.
- Allison AC, Warwick RT (1949) Quantitative observations on the olfactory system of the rabbit. *Brain*, **72**:186-197.
- Andersen O, Doving KB (1991) Gonadotropin releasing hormone (GnRH) - a novel olfactory stimulant in fish. *Neuroreport*, **2**:458-460.
- Araneda RC, Kini AD, Firestein S (2000) The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nat Neurosci*, **3**:1248-1255.
- Aroniadou-Anderjaska V, Zhou FM, Priest CA, Ennis M, Shipley MT (2000) Tonic and synaptically evoked presynaptic inhibition of sensory input to the rat olfactory bulb via GABA(B) heteroreceptors. *J Neurophysiol*, **84**:1194-1203.
- Asano-Miyoshi M, Suda T, Yasuoka A, Osima S, Yamashita S, Abe K, Emori Y (2000) Random expression of main and vomeronasal olfactory receptor genes in immature and mature olfactory epithelia of *Fugu rubripes*. *J Biochem (Tokyo)*, **127**:915-924.
- Astic L, Saucier D (1986) Anatomical mapping of the neuroepithelial projection to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res Bull*, **16**:445-454.
- Baier H, Korsching S (1994) Olfactory glomeruli in the zebrafish form an invariant pattern and are identifiable across animals. *J Neurosci*, **14**:219-230.
- Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (1999) Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**:11241-11246.
- Bakalyar HA, Reed RR (1990) Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science*, **250**:1403-1406.
- Bargmann CI (1993) Genetic and cellular analysis of behavior in *C. elegans*. *Annu Rev Neurosci*, **16**:47-71.
- Bargmann CI (1998) Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science*, **282**:2028-2033.
- Bartels A, Zeki S (2000) The architecture of the colour centre in the human visual brain: new results and a review. *Eur J Neurosci*, **12**:172-193.
- Barth AL, Justice NJ, Ngai J (1996) Asynchronous onset of odorant receptor expression in the developing zebrafish olfactory system. *Neuron*, **16**:23-34.
- Belghaug R, Doving KB (1977) Odour threshold determined by studies of the induced waves in the olfactory bulb of the char (*Salmo alpinus*). *Comp Biochem Physiol A*, **57**:327-330.
- Belluscio L, Katz LC (2001) Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs. *J Neurosci*, **21**:2113-2122.
- Belluscio L, Koentges G, Axel R, Dulac C (1999) A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. *Cell*, **97**:209-220.
- Berger S (1998) Neuronale und nichtneuronale Proliferationszonen im Riechepithel des Zebraäbblings (*Danio rerio*). *Diplomarbeit* an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, Köln.

- Berkowicz DA, Trombley PQ (2000) Dopaminergic modulation at the olfactory nerve synapse. *Brain Res*, **855**:90-99.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol*, **101**:1371-1378.
- Boekhoff I, Tareilus E, Strotmann J, Breer H (1990) Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *Embo J*, **9**:2453-2458.
- Bozza TC, Kauer JS (1998) Odorant response properties of convergent olfactory receptor neurons. *J Neurosci*, **18**:4560-4569.
- Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC (1993) Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*, **366**:575-580.
- Buck L, Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, **65**:175-187.
- Buck LB (1996) Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu Rev Neurosci*, **19**:517-544.
- Buiakova OI, Baker H, Scott JW, Farbman A, Kream R, Grillo M, Franzen L, Richman M, Davis LM, Abbondanzo S, Stewart CL, Margolis FL (1996) Olfactory marker protein (OMP) gene deletion causes altered physiological activity of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**:9858-9863.
- Buiakova OI, Krishna NS, Getchell TV, Margolis FL (1994) Human and rodent OMP genes: conservation of structural and regulatory motifs and cellular localization. *Genomics*, **20**:452-462.
- Bulfone A, Kim HJ, Puelles L, Porteus MH, Grippo JF, Rubenstein JL (1993) The mouse Dlx-2 (Tes-1) gene is expressed in spatially restricted domains of the forebrain, face and limbs in midgestation mouse embryos. *Mech Dev*, **40**:129-140.
- Bulfone A, Puelles L, Porteus MH, Frohman MA, Martin GR, Rubenstein JL (1993) Spatially restricted expression of Dlx-1, Dlx-2 (Tes-1), Gbx-2, and Wnt-3 in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries. *J Neurosci*, **13**:3155-3172.
- Bulfone A, Smiga SM, Shimamura K, Peterson A, Puelles L, Rubenstein JL (1995) T-brain-1: a homolog of Brachyury whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex. *Neuron*, **15**:63-78.
- Bulfone A, Wang F, Hevner R, Anderson S, Cutforth T, Chen S, Meneses J, Pedersen R, Axel R, Rubenstein JL (1998) An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons. *Neuron*, **21**:1273-1282.
- Buonviso N, Chaput MA (1990) Response similarity to odors in olfactory bulb output cells presumed to be connected to the same glomerulus: electrophysiological study using simultaneous single-unit recordings. *J Neurophysiol*, **63**:447-454.
- Byrd CA, Brunjes PC (1995) Organization of the olfactory system in the adult zebrafish: histological, immunohistochemical, and quantitative analysis. *J Comp Neurol*, **358**:247-259.
- Byrd RP, Jr., Caprio J (1982) Comparison of olfactory receptor (EOG) and bulbar (EEG) responses to amino acids in the catfish, *Ictalurus punctatus*. *Brain Res*, **249**:73-80.
- Campenhausen H von (1994) Die Entwicklung der olfaktorischen Rezeptorneurone und ihrer Projektionen im Zebraabärbling, *Danio rerio*. *Diplomarbeit* am Fachbereich Biologie der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Cao Y, Oh BC, Stryer L (1998) Cloning and localization of two multigene receptor families in goldfish olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**:11987-11992.
- Caprio J, Brand JG, Teeter JH, Valentincic T, Kalinoski DL, Kohbara J, Kumazawa T, Wegert S (1993) The taste system of the channel catfish: from biophysics to behavior. *Trends Neurosci*, **16**:192-197.

- Caprio J, Byrd RP, Jr. (1984) Electrophysiological evidence for acidic, basic, and neutral amino acid olfactory receptor sites in the catfish. *J Gen Physiol*, **84**:403-422.
- Çelik A (2001) Restricted and complementary expression patterns of Eph receptors and ephrin ligands define potential interaction sites in the embryonic and adult olfactory system of zebrafish, *Danio rerio*. *Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, Köln*.
- Chalansonnet M, Chaput MA (1998) Olfactory bulb output cell temporal response patterns to increasing odor concentrations in freely breathing rats. *Chem Senses*, **23**:1-9.
- Chang Q, Caprio J (1996) Electrophysiological evidence for the broad distribution of specific odorant receptor molecules across the olfactory organ of the channel catfish. *Chem Senses*, **21**:519-527.
- Chapman DL, Garvey N, Hancock S, Alexiou M, Agulnik SI, Gibson-Brown JJ, Cebra-Thomas J, Bollag RJ, Silver LM, Papaioannou VE (1996) Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn*, **206**:379-390.
- Chess A, Simon I, Cedar H, Axel R (1994) Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell*, **78**:823-834.
- Cinelli AR, Hamilton KA, Kauer JS (1995) Salamander olfactory bulb neuronal activity observed by video rate, voltage-sensitive dye imaging. III. Spatial and temporal properties of responses evoked by odorant stimulation. *J Neurophysiol*, **73**:2053-2071.
- Cometto-Muniz JE, Cain WS, Abraham MH (1998) Nasal pungency and odor of homologous aldehydes and carboxylic acids. *Exp Brain Res*, **118**:180-188.
- Cromarty SI, Derby CD (1998) Inhibitory receptor binding events among the components of complex mixtures contribute to mixture suppression in responses of olfactory receptor neurons of spiny lobsters. *J Comp Physiol [A]*, **183**:699-707.
- Culp P, Nüsslein-Volhard C, Hopkins N (1991) High-frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafish eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**:7953-7957.
- Damasio AR (1999) The feeling of what happens. Body and emotion in the making of consciousness. Harcourt, San Diego.
- Danciger E, Mettling C, Vidal M, Morris R, Margolis F (1989) Olfactory marker protein gene: its structure and olfactory neuron-specific expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**:8565-8569.
- de Bruyne M, Foster K, Carlson JR (2001) Odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron*, **30**:537-552.
- Degterev A, Foster JA (1999) The role of NF-1 factors in regulation of elastin gene transcription. *Matrix Biol*, **18**:295-307.
- Delaney K, Davison I, Denk W (2001) Odour-evoked  $[Ca^{2+}]$  transients in mitral cell dendrites of frog olfactory glomeruli. *Eur J Neurosci*, **13**:1658-1672.
- Delaney KR, Gelperin A, Fee MS, Flores JA, Gervais R, Tank DW, Kleinfeld D (1994) Waves and stimulus-modulated dynamics in an oscillating olfactory network. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**:669-673.
- Delaney KR, Hall BJ (1996) An *in vitro* preparation of frog nose and brain for the study of odour-evoked oscillatory activity. *J Neurosci Methods*, **68**:193-202.
- Detrich WH, Westerfield M, Zon L (1999) The zebrafish: genetics and genomics. Academic Press, San Diego.
- Devireddy LR, Jones CJ (2000) Olf-1, a neuron-specific transcription factor, can activate the herpes simplex virus type 1-infected cell protein 0 promoter. *J Biol Chem*, **275**:77-81.
- Dhallan RS, Yau KW, Schrader KA, Reed RR (1990) Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature*, **347**:184-187.
- Dittman AH, Quinn TP, Nevitt GA, Hacker B, Storm DR (1997) Sensitization of olfactory guanylyl cyclases to a specific imprinted odorant in coho salmon. *Neuron*, **19**:381-389.

- Dowell P, Cooke DW (2002) Olf-1/Early B Cell Factor is a regulator of glut4 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **277**:1712-1718.
- Drubin D, Kobayashi S, Kirschner M (1986) Association of tau protein with microtubules in living cells. *Ann NY Acad Sci*, **466**:257-268.
- Dryer L, Graziadei PP (1994) Mitral cell dendrites: a comparative approach. *Anat Embryol (Berl)*, **189**:91-106.
- Duchamp-Viret P, Chaput MA, Duchamp A (1999) Odor response properties of rat olfactory receptor neurons. *Science*, **284**:2171-2174.
- Duchamp-Viret P, Duchamp A, Chaput MA (2000) Peripheral odor coding in the rat and frog: quality and intensity specification. *J Neurosci*, **20**:2383-2390.
- Dugas JC, Ngai J (2001) Analysis and characterization of an odorant receptor gene cluster in the zebrafish genome. *Genomics*, **71**:53-65.
- Dulac C (2000) Sensory coding of pheromone signals in mammals. *Curr Opin Neurobiol*, **10**:511-518.
- Dynes JL, Ngai J (1998) Pathfinding of olfactory neuron axons to stereotyped glomerular targets revealed by dynamic imaging in living zebrafish embryos. *Neuron*, **20**:1081-1091.
- Eisenstat DD, Liu JK, Mione M, Zhong W, Yu G, Anderson SA, Ghattas I, Puellas L, Rubenstein JL (1999) DLX-1, DLX-2, and DLX-5 expression define distinct stages of basal forebrain differentiation. *J Comp Neurol*, **414**:217-237.
- Eisthen HL, Delay RJ, Wirsig-Wiechmann CR, Dionne VE (2000) Neuromodulatory effects of gonadotropin releasing hormone on olfactory receptor neurons. *J Neurosci*, **20**:3947-3955.
- Erickson JR, Caprio J (1984) The spatial distribution of ciliated and microvillous olfactory receptor neurons in the channel catfish is not matched by a differential specificity to amino acids and bile salt stimuli. *Chem Senses*, **9**:127-141.
- Finley KR, Davidson AE, Ekker SC (2001) Three-color imaging using fluorescent proteins in living zebrafish embryos. *Bio Techniques*, **31**:66-72.
- Firestein S, Picco C, Menini A (1993) The relation between stimulus and response in olfactory receptor cells of the tiger salamander. *J Physiol*, **468**:1-10.
- Floriano WB, Vaidehi N, Goddard WA, 3rd, Singer MS, Shepherd GM (2000) Molecular mechanisms underlying differential odor responses of a mouse olfactory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**:10712-10716.
- Fried HU, Fuss SH, Korsching SI (2002) Selective imaging of presynaptic activity in the mouse olfactory bulb shows concentration- and structure dependence of odor responses in identified glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(5):3222-3227.
- Friedrich RW (1997) Analyse der neuronalen Repräsentation von Geruchsinformation im olfaktorischen System des Zebraärlblings (*Danio rerio*). *Dissertation* an der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Friedrich RW, Korsching SI (1997) Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging. *Neuron*, **18**:737-752.
- Friedrich RW, Korsching SI (1998) Chemotopic, combinatorial, and noncombinatorial odorant representations in the olfactory bulb revealed using a voltage-sensitive axon tracer. *J Neurosci*, **18**:9977-9988.
- Friedrich RW, Laurent G (2001) Dynamic optimization of odor representations by slow temporal patterning of mitral cell activity. *Science*, **291**:889-894.
- Frings S, Reuter D, Kleene SJ (2000) Neuronal Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels - homing in on an elusive channel species. *Prog Neurobiol*, **60**:247-289.
- Fujita I, Sorensen PW, Stacey NE, Hara TJ (1991) The olfactory system, not the terminal nerve, functions as the primary chemosensory pathway mediating responses to sex pheromones in male goldfish. *Brain Behav Evol*, **38**:313-321.

- Fuss SH, Korsching SI (2001) Odorant feature detection: activity mapping of structure response relationships in the zebrafish olfactory bulb. *J Neurosci*, **21**:8396-8407.
- Gelperin A, Tank DW (1990) Odour-modulated collective network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature*, **345**:437-440.
- Getchell TV (1974) Electrogenic sources of slow voltage transients recorded from frog olfactory epithelium. *J Neurophysiol*, **37**:1115-1130.
- Gibson-Brown JJ, Agulnik SI, Chapman DL, Alexiou M, Garvey N, Silver LM, Papaioannou VE (1996) Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech Dev*, **56**:93-101.
- Glusman G, Sosinsky A, Ben-Asher E, Avidan N, Sonkin D, Bahar A, Rosenthal A, Clifton S, Roe B, Ferraz C, Demaille J, Lancet D (2000) Sequence, structure, and evolution of a complete human olfactory receptor gene cluster. *Genomics*, **63**:227-245.
- Gogos JA, Osborne J, Nemes A, Mendelsohn M, Axel R (2000) Genetic ablation and restoration of the olfactory topographic map. *Cell*, **103**:609-620.
- Goh Y, Tamura T (1978) The electrical responses of the olfactory tract to amino acids in carp. *Bull Jpn Soc Sci Fish*, **44**:341-344.
- Graef M (2001) Charakterisierung der Promotoraktivität der proximalen *upstream*-Region des olfaktorischen Rezeptorgens *DROR2.1* des Zebrafischblümlings, *Danio rerio*. Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, Köln.
- Graziadei GA, Graziadei PP (1979) Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol*, **8**:197-213.
- Grosch W (1996) Warum riecht Kaffee so gut? *Chemie in unserer Zeit*, **3**:126-133.
- Guthrie KM, Anderson AJ, Leon M, Gall C (1993) Odor-induced increases in c-fos mRNA expression reveal an anatomical "unit" for odor processing in olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**:3329-3333.
- Haberly LB (1990) Comparative aspects of olfactory cortex. In: Cerebral Cortex., editiert von: Jones EG, Peters A; Plenum Press, New York. pp 137-166.
- Haberly LB (2001) Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry. *Chem Senses*, **26**:551-576.
- Halasz N, Ljungdahl A, Hokfelt T, Johansson O, Goldstein M, Park D, Biberfeld P (1977) Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. I. Immunohistochemical localization of monoamine synthesizing enzymes. Support for intrabulbar, periglomerular dopamine neurons. *Brain Res*, **126**:455-474.
- Hall D, Suboski MD (1995) Visual and olfactory stimuli in learned release of alarm reactions by zebra danio fish (*Brachydanio rerio*). *Neurobiol Learn Mem*, **63**:229-240.
- Halpern M, Shapiro LS, Jia C (1995) Differential localization of G proteins in the opossum vomeronasal system. *Brain Res*, **677**:157-161.
- Hamdani el H, Alexander G, Doving KB (2001) Projection of sensory neurons with microvilli to the lateral olfactory tract indicates their participation in feeding behaviour in crucian carp. *Chem Senses*, **26**:1139-1144.
- Hamdani el H, Kasumyan A, Doving KB (2001) Is feeding behaviour in crucian carp mediated by the lateral olfactory tract? *Chem Senses*, **26**:1133-1138.
- Hansen A, Zeiske E (1993) Development of the olfactory organ in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Comp Neurol*, **333**:289-300.
- Hanson LR, Sorensen PW, Cohen Y (1998) Sex pheromones and amino acids evoke distinctly different spatial patterns of electrical activity in the goldfish olfactory bulb. *Ann N Y Acad Sci*, **855**:521-524.

- Hara TJ (1976) Structure-activity relationships of amino acids in fish olfaction. *Comp Biochem Physiol A*, **54**:31-36.
- Hara TJ (1977) Further studies on the structure-activity relationships of amino acids in fish olfaction. *Comp Biochem Physiol A*, **56**:559-565.
- Hara TJ (1982) Structure-activity relationships of amino acids as olfactory stimuli. In: Chemoreception in fishes., editiert von: Hara TJ; Elsevier, Amsterdam.
- Hara TJ (1993) Role of olfaction in fish behaviour. In: Behaviour of teleost fishes. 2nd Edition, editiert von: Pitcher TJ; Chapman & Hall, London. pp 171-199.
- Hara TJ (1994) Olfaction and gustation in fish: an overview. *Acta Physiol Scand*, **152**:207-217.
- Hara TJ, Zhang C (1996) Spatial projections to the olfactory bulb of functionally distinct and randomly distributed primary neurons in salmonid fishes. *Neurosci Res*, **26**:65-74.
- Hara TJ, Zhang C (1998) Topographic bulbar projections and dual neural pathways of the primary olfactory neurons in salmonid fishes. *Neuroscience*, **82**:301-313.
- Hasler AD, Scholz AT (1983) Olfactory imprinting and homing in salmon. Investigations into the mechanism of the imprinting process. Springer Verlag, Berlin.
- Haugland RP (1996) Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 6th Edition. Molecular Probes, Eugene, USA.
- Herz RS, Cupchik GC (1995) The emotional distinctiveness of odor-evoked memories. *Chem Senses*, **20**:517-528.
- Hevner RF, Shi L, Justice N, Hsueh Y, Sheng M, Smiga SM, Bulfone A, Goffinet AM, Campagnoni AT, Rubenstein JL (2001) Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron*, **29**:353-366.
- Higashijima S, Okamoto H, Ueno N, Hotta Y, Eguchi G (1997) High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles of the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Dev Biol*, **192**:289-299.
- Hildebrand JG, Shepherd GM (1997) Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annu Rev Neurosci*, **20**:595-631.
- Hoon MA, Adler E, Lindemeier J, Battey JF, Ryba NJ, Zuker CS (1999) Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*, **96**:541-551.
- Hoppe R, Weimer M, Beck A, Breer H, Strotmann J (2000) Sequence analyses of the olfactory receptor gene cluster mOR37 on mouse chromosome 4. *Genomics*, **66**:284-295.
- Horowitz LF, Montmayeur JP, Echelard Y, Buck LB (1999) A genetic approach to trace neural circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**:3194-3199.
- Hsia AY, Vincent JD, Lledo PM (1999) Dopamine depresses synaptic inputs into the olfactory bulb. *J Neurophysiol*, **82**:1082-1085.
- Hu X, Zuckerman KS (1995) Isolation of full-length cDNA clones encoding the common  $\beta$ -subunit of GM-CSF, IL-3, and IL-5 receptors by RT-PCR. *Focus*, **17**:21-24.
- Hudspeth AJ (1997) How hearing happens. *Neuron*, **19**:947-950.
- Imamura K, Mataga N, Mori K (1992) Coding of odor molecules by mitral/tufted cells in rabbit olfactory bulb. I. Aliphatic compounds. *J Neurophysiol*, **68**:1986-2002.
- Ivic L, Pyrski MM, Margolis JW, Richards LJ, Firestein S, Margolis FL (2000) Adenoviral vector-mediated rescue of the OMP-null phenotype in vivo. *Nat Neurosci*, **3**:1113-1120.
- Jastreboff PJ, Pedersen PE, Greer CA, Stewart WB, Kauer JS, Benson TE, Shepherd GM (1984) Specific olfactory receptor populations projecting to identified glomeruli in the rat olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**:5250-5254.
- Jessen JR, Jessen TN, Vogel SS, Lin S (2001) Concurrent expression of recombination activating genes 1 and 2 in zebrafish olfactory sensory neurons. *Genesis*, **29**:156-162.

- Jessen JR, Willett CE, Lin S (1999) Artificial chromosome transgenesis reveals long-distance negative regulation of *rag1* in zebrafish. *Nat Genet*, **23**:15-16.
- Jinks A, Laing DG (2001) The analysis of odor mixtures by humans: evidence for a configurational process. *Physiol Behav*, **72**:51-63.
- Johnson BA, Leon M (2000) Odorant molecular length: one aspect of the olfactory code. *J Comp Neurol*, **426**:330-338.
- 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**:496-509.
- Johnson BA, Woo CC, Hingco EE, Pham KL, Leon M (1999) Multidimensional chemotopic responses to n-aliphatic acid odorants in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*, **409**:529-548.
- Johnson BA, Woo CC, Leon M (1998) Spatial coding of odorant features in the glomerular layer of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*, **393**:457-471.
- Johnson EW, Eller PM, Jafek BW (1993) An immuno-electron microscopic comparison of olfactory marker protein localization in the supranuclear regions of the rat olfactory epithelium and vomeronasal organ neuroepithelium. *Acta Otolaryngol*, **113**:766-771.
- Johnston RE (1998) Pheromones, the vomeronasal system, and communication. From hormonal responses to individual recognition. *Ann N Y Acad Sci*, **855**:333-348.
- Jones DT, Reed RR (1989) Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science*, **244**:790-795.
- Kajiya K, Inaki K, Tanaka M, Haga T, Kataoka H, Touhara K (2001) Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *J Neurosci*, **21**:6018-6025.
- Kang J, Caprio J (1995) In vivo responses of single olfactory receptor neurons in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Neurophysiol*, **73**:172-177.
- Kashiwadani H, Sasaki YF, Uchida N, Mori K (1999) Synchronized oscillatory discharges of mitral/tufted cells with different molecular receptive ranges in the rabbit olfactory bulb. *J Neurophysiol*, **82**:1786-1792.
- Katoh K, Koshimoto H, Tani A, Mori K (1993) Coding of odor molecules by mitral/tufted cells in rabbit olfactory bulb. II. Aromatic compounds. *J Neurophysiol*, **70**:2161-2175.
- Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science*, **274**:1133-1138.
- Kauer JS (1988) Real-time imaging of evoked activity in local circuits of the salamander olfactory bulb. *Nature*, **331**:166-168.
- Kauer JS, White J (2001) Imaging and coding in the olfactory system. *Annu Rev Neurosci*, **24**:963-979.
- Kawabata K, Tsubaki K, Zazaki T, Inida S (1992) Sexual behavior induced by amino acids in the rose bitterling *Rhodeus ocelatus ocelatus*. *Nippon Sussan Gakasshi*, **58**:839-844.
- Kay LM, Laurent G (1999) Odor- and context-dependent modulation of mitral cell activity in behaving rats. *Nat Neurosci*, **2**:1003-1009.
- Keller A, Yagodin S, Aroniadou-Anderjaska V, Zimmer LA, Ennis M, Sheppard NF, Jr., Shipley MT (1998) Functional organization of rat olfactory bulb glomeruli revealed by optical imaging. *J Neurosci*, **18**:2602-2612.
- Kent PF, Mozell MM (1992) The recording of odorant-induced mucosal activity patterns with a voltage-sensitive dye. *J Neurophysiol*, **68**:1804-1819.
- Kerr R, Lev-Ram V, Baird G, Vincent P, Tsien RY, Schafer WR (2000) Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron*, **26**:583-594.
- Knöll B, Zarbalis K, Wurst W, Drescher U (2001) A role for the EphA family in the topographic targeting of vomeronasal axons. *Development*, **128**:895-906.

- Korsching S (1995) Molekulare Grundlagen der Kodierung im Geruchssinn des Zebrafisch. *Habilitationsschrift* an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Korsching SI (2001) Odor maps in the brain: spatial aspects of odor representation in sensory surface and olfactory bulb. *Cell Mol Life Sci*, **58**:520-530.
- Korsching SI, Argo S, Campenhausen H, Friedrich RW, Rummrich A, Weth F (1997) Olfaction in zebrafish: what does a tiny teleost tell us? *Sem Cell Dev Biol*, **8**:181-187.
- Koster NL, Norman AB, Richtand NM, Nickell WT, Puche AC, Pixley SK, Shipley MT (1999) Olfactory receptor neurons express D2 dopamine receptors. *J Comp Neurol*, **411**:666-673.
- Kozak M (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, **234**:187-208.
- Kraus P, Lufkin T (1999) Mammalian Dlx homeobox gene control of craniofacial and inner ear morphogenesis. *J Cell Biochem, Suppl*:133-140.
- Krautwurst D, Yau KW, Reed RR (1998) Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell*, **95**:917-926.
- Kubick S, Strotmann J, Andreini I, Breer H (1997) Subfamily of olfactory receptors characterized by unique structural features and expression patterns. *J Neurochem*, **69**:465-475.
- Kurahashi T, Lowe G, Gold GH (1994) Suppression of odorant responses by odorants in olfactory receptor cells. *Science*, **265**:118-120.
- Kurahashi T, Yau KW (1993) Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature*, **363**:71-74.
- Kurahashi T, Yau KW (1994) Olfactory transduction. Tale of an unusual chloride current. *Curr Biol*, **4**:256-258.
- L'Etoile ND, Bargmann CI (2000) Olfaction and odor discrimination are mediated by the *C. elegans* guanylyl cyclase ODR-1. *Neuron*, **25**:575-586.
- Laberge F, Hara TJ (2001) Neurobiology of fish olfaction: a review. *Brain Res Brain Res Rev*, **36**:46-59.
- Laing DG, Francis GW (1989) The capacity of humans to identify odors in mixtures. *Physiol Behav*, **46**:809-814.
- Lam YW, Cohen LB, Wachowiak M, Zochowski MR (2000) Odors elicit three different oscillations in the turtle olfactory bulb. *J Neurosci*, **20**:749-762.
- Lancet D, Greer CA, Kauer JS, Shepherd GM (1982) Mapping of odor-related neuronal activity in the olfactory bulb by high-resolution 2-deoxyglucose autoradiography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**:670-674.
- Land EH (1983) Recent advances in retinex theory and some implications for cortical computations: color vision and the natural image. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**:5163-5169.
- Laska M, Teubner P (1998) Odor structure-activity relationships of carboxylic acids correspond between squirrel monkeys and humans. *Am J Physiol*, **274**:R1639-1645.
- Laurent G (1997) Olfactory processing: maps, time and codes. *Curr Opin Neurobiol*, **7**:547-553.
- Laurent G (1999) A systems perspective on early olfactory coding. *Science*, **286**:723-728.
- Laurent G, MacLeod K, Stopfer M, Wehr M (1998) Spatiotemporal structure of olfactory inputs to the mushroom bodies. *Learn Mem*, **5**:124-132.
- Lee BB (1996) Receptive field structure in the primate retina. *Vision Res*, **36**:631-644.
- Leinders-Zufall T, Greer CA, Shepherd GM, Zufall F (1998) Imaging odor-induced calcium transients in single olfactory cilia: specificity of activation and role in transduction. *J Neurosci*, **18**:5630-5639.
- Leinders-Zufall T, Rand MN, Shepherd GM, Greer CA, Zufall F (1997) Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics. *J Neurosci*, **17**:4136-4148.

- Leise EM (1990) Modular construction of nervous systems: a basic principle of design for invertebrates and vertebrates. *Brain Res Brain Res Rev*, **15**:1-23.
- Leveteau J, MacLeod P (1966) Olfactory discrimination in the rabbit olfactory glomerulus. *Science*, **153**:175-176.
- Li W, Sorensen PW, Gallaher DD (1995) The olfactory system of migratory adult sea lamprey (*Petromyzon marinus*) is specifically and acutely sensitive to unique bile acids released by conspecific larvae. *J Gen Physiol*, **105**:569-587.
- Lieberoth B (1999) Die Konnektivität der olfaktorischen Rezeptorneurone des Zebrafährblings, *Danio rerio*. *Diplomarbeit* im Fach Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, Köln.
- Lieke EE, Frostig RD, Arieli A, Ts'o DY, Hildesheim R, Grinvald A (1989) Optical imaging of cortical activity: real-time imaging using extrinsic dye-signals and high resolution imaging based on slow intrinsic-signals. *Annu Rev Physiol*, **51**:543-559.
- Lin DM, Wang F, Lowe G, Gold GH, Axel R, Ngai J, Brunet L (2000) Formation of precise connections in the olfactory bulb occurs in the absence of odorant-evoked neuronal activity. *Neuron*, **26**:69-80.
- Linster C, Johnson BA, Yue E, Morse A, Xu Z, Hingco EE, Choi Y, Choi M, Messiha A, Leon M (2001) Perceptual correlates of neural representations evoked by odorant enantiomers. *J Neurosci*, **15**:9837-9843.
- Lipschitz DL, Michel WC (1999) Physiological evidence for the discrimination of L-arginine from structural analogues by the zebrafish olfactory system. *J Neurophysiol*, **82**:3160-3167.
- Logan M, Simon HG, Tabin C (1998) Differential regulation of T-box and homeobox transcription factors suggests roles in controlling chick limb-type identity. *Development*, **125**:2825-2835.
- Ma C, Fan L, Ganassin R, Bols N, Collodi P (2001) Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**:2461-2466.
- Ma M, Shepherd GM (2000) Functional mosaic organization of mouse olfactory receptor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**:12869-12874.
- Mackay-Sim A, Kittel P (1991) Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: a quantitative autoradiographic study. *J Neurosci*, **11**:979-984.
- Mackay-Sim A, Kittel PW (1991) On the life span of olfactory receptor neurons. *Eur J Neurosci*, **3**:209-215.
- Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, **96**:713-723.
- Margolis FL (1972) A brain protein unique to the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**:1221-1224.
- Margolis FL (1980) A marker protein for the olfactory chemoreceptor neuron. In: *Proteins of the nervous system*. 2nd Edition, editiert von: Bradshaw RA, Schneider DM; Raven, New York. pp 59-84.
- Margolis FL (1988) Molecular cloning of olfactory-specific gene products. In: *Molecular neurobiology of the olfactory system.*, editiert von: Margolis FL, Getchell TV; Plenum Press, New York. pp 237-265.
- Margolis FL (1993) Regulation of olfactory neuron gene expression. *Cytotechnology*, **11**:17-22.
- Martini S, Silvotti L, Shirazi A, Ryba NJ, Tirindelli R (2001) Co-expression of putative pheromone receptors in the sensory neurons of the vomeronasal organ. *J Neurosci*, **21**:843-848.
- Mathieson WB, Maler L (1988) Morphological and electrophysiological properties of a novel in vitro preparation: the electrosensory lateral line lobe brain slice. *J Comp Physiol [A]*, **163**:489-506.
- Matsunami H, Montmayeur JP, Buck LB (2000) A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature*, **404**:601-604.
- Meister M (1996) Multineuronal codes in retinal signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**:609-614.
- Meister M, Bonhoeffer T (2001) Tuning and topography in an odor map on the rat olfactory bulb. *J Neurosci*, **21**:1351-1360.

- Michel WC (1999) Cyclic nucleotide-gated channel activation is not required for activity-dependent labeling of zebrafish olfactory receptor neurons by amino acids. *Biol Signals Recept*, **8**:338-347.
- Michel WC, Derbidge DS (1997) Evidence of distinct amino acid and bile salt receptors in the olfactory system of the zebrafish, *Danio rerio*. *Brain Res*, **764**:179-187.
- Michel WC, Lubomudrov LM (1995) Specificity and sensitivity of the olfactory organ of the zebrafish, *Danio rerio*. *J Comp Physiol [A]*, **177**:191-199.
- Michel WC, Steullet P, Cate HS, Burns CJ, Zhainazarov AB, Derby CD (1999) High-resolution functional labeling of vertebrate and invertebrate olfactory receptor neurons using agmatine, a channel-permeant cation. *J Neurosci Methods*, **90**:143-156.
- Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, **394**:192-195.
- Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R, Tsien RY (1999) Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**:2135-2140.
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, **388**:882-887.
- Mombaerts P (1999) Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science*, **286**:707-711.
- Mombaerts P (1999) Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. *Annu Rev Neurosci*, **22**:487-509.
- Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, **87**:675-686.
- Mori K, Mataga N, Imamura K (1992) Differential specificities of single mitral cells in rabbit olfactory bulb for a homologous series of fatty acid odor molecules. *J Neurophysiol*, **67**:786-789.
- Mori K, Nagao H, Sasaki YF (1998) Computation of molecular information in mammalian olfactory systems. *Network*, **9**:R79-102.
- Mori T, Sakai M, Matsuoka I, Kurihara K (2000) Analysis of promoter activity of 5'-upstream regions of zebrafish olfactory receptor genes. *Biol Pharm Bull*, **23**:165-173.
- Morita Y, Finger TE (1998) Differential projections of ciliated and microvillous olfactory receptor cells in the catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Comp Neurol*, **398**:539-550.
- Moulton DG (1974) Dynamics of cell populations in the olfactory epithelium. *Ann N Y Acad Sci*, **237**:52-61.
- Moulton DG (1976) Spatial patterning of response to odors in the peripheral olfactory system. *Physiol Rev*, **56**:578-593.
- Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A (2001) Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca<sup>2+</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**:3197-3202.
- Nagao H, Yoshihara Y, Mitsui S, Fujisawa H, Mori K (2000) Two mirror-image sensory maps with domain organization in the mouse main olfactory bulb. *Neuroreport*, **11**:3023-3027.
- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, **258**:597-603.
- Nathans J (1999) The evolution and physiology of human color vision: insights from molecular genetic studies of visual pigments. *Neuron*, **24**:299-312.
- Nevitt GA, Dittman AH, Quinn TP, Moody WJ, Jr. (1994) Evidence for a peripheral olfactory memory in imprinted salmon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**:4288-4292.
- Ngai J, Dowling MM, Buck L, Axel R, Chess A (1993) The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. *Cell*, **72**:657-666.
- Nikonov AA, Caprio J (2001) Electrophysiological evidence for a chemotopy of biologically relevant odors in the olfactory bulb of the channel catfish. *J Neurophysiol*, **86**:1869-1876.

- Oehlmann VD (2001) Identifizierung differentiell exprimierter Transkripte im olfaktorischen Bulbus von *Danio rerio*. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, Köln.
- Ohno T, Yoshii K, Kurihara K (1984) Multiple receptor types for amino acids in the carp olfactory cells revealed by quantitative cross-adaptation method. *Brain Res*, **310**:13-21.
- Okano M, Takagi SF (1974) Secretion and electrogenesis of the supporting cell in the olfactory epithelium. *J Physiol*, **242**:353-370.
- Papaoiannou VE, Silver LM (1998) The T-box gene family. *Bioessays*, **20**:9-19.
- Parmentier M, Libert F, Schurmans S, Schiffmann S, Lefort A, Eggerickx D, Ledent C, Mollereau C, Gerard C, Perret J, et al. (1992) Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells. *Nature*, **355**:453-455.
- Pelosi P (1996) Perireceptor events in olfaction. *J Neurobiol*, **30**:3-19.
- Pinelli C, D'Aniello B, Sordino P, Meyer DL, Fiorentino M, Rastogi RK (2000) Comparative immunocytochemical study of FMRFamide neuronal system in the brain of *Danio rerio* and *Acipenser ruthenus* during development. *Brain Res Dev Brain Res*, **119**:195-208.
- Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Kelly PD, Chu F, Huang H, Hill-Force A, Talbot WS (2000) Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res*, **10**:1890-1902.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, **111**:229-233.
- Qasba P, Reed RR (1998) Tissue and zonal-specific expression of an olfactory receptor transgene. *J Neurosci*, **18**:227-236.
- Raming K, Krieger J, Strotmann J, Boekhoff I, Kubick S, Baumstark C, Breer H (1993) Cloning and expression of odorant receptors. *Nature*, **361**:353-356.
- Rawson NE, Eberwine J, Dotson R, Jackson J, Ulrich P, Restrepo D (2000) Expression of mRNAs encoding for two different olfactory receptors in a subset of olfactory receptor neurons. *J Neurochem*, **75**:185-195.
- Reisert J, Matthews HR (2001) Simultaneous recording of receptor current and intraciliary Ca<sup>2+</sup> concentration in salamander olfactory receptor cells. *J Physiol*, **535**:637-645.
- Reisert J, Matthews HR (2001) Response properties of isolated mouse olfactory receptor cells. *J Physiol*, **530**:113-122.
- Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB (1993) A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell*, **73**:597-609.
- Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB (1994) Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell*, **79**:1245-1255.
- Reuter D, Zierold K, Schroder WH, Frings S (1998) A depolarizing chloride current contributes to chemoelectrical transduction in olfactory sensory neurons in situ. *J Neurosci*, **18**:6623-6630.
- Richter M (1981) Einführung in die Farbmatrik. 2nd Edition. de Gruyter, Berlin, New York.
- Robinson-Rechavi M, Marchand O, Escriva H, Laudet V (2001) An ancestral whole-genome duplication may not have been responsible for the abundance of duplicated fish genes. *Curr Biol*, **11**:R458-459.
- Rodriguez I, Feinstein P, Mombaerts P (1999) Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system. *Cell*, **97**:199-208.
- Roskies A, Friedman GC, O'Leary DD (1995) Mechanisms and molecules controlling the development of retinal maps. *Perspect Dev Neurobiol*, **3**:63-75.
- Rossiter KJ (1996) Structure-odor relationships. *Chemical Reviews*, **96**:3201-3240.
- Rössler P, Mezler M, Breer H (1998) Two olfactory marker proteins in *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol*, **395**:273-280.

- Royal SJ, Key B (1999) Development of P2 olfactory glomeruli in P2-internal ribosome entry site-tau-LacZ transgenic mice. *J Neurosci*, **19**:9856-9864.
- Royet J, Distel H, Hudson R, Gervais R (1998) A re-estimation of the number of glomeruli and mitral cells in the olfactory bulb of rabbit. *Brain Res*, **788**:35-42.
- Royet JP, Souchier C, Jourdan F, Ploye H (1988) Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *J Comp Neurol*, **270**:559-568.
- Rubin BD, Katz LC (1999) Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron*, **23**:499-511.
- Rubin BD, Katz LC (2001) Spatial coding of enantiomers in the rat olfactory bulb. *Nat Neurosci*, **4**:355-356.
- Sachse S, Rappert A, Galizia CG (1999) The spatial representation of chemical structures in the antennal lobe of honeybees: steps towards the olfactory code. *Eur J Neurosci*, **11**:3970-3982.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**:5463-5467.
- Sanhueza M, Schmachtenberg O, Bacigalupo J (2000) Excitation, inhibition, and suppression by odors in isolated toad and rat olfactory receptor neurons. *Am J Physiol Cell Physiol*, **279**:C31-39.
- Sato K, Suzuki N (2001) Whole-cell response characteristics of ciliated and microvillous olfactory receptor neurons to amino acids, pheromone candidates and urine in rainbow trout. *Chem Senses*, **26**:1145-1156.
- Sato T, Hirono J, Tonoike M, Takebayashi M (1994) Tuning specificities to aliphatic odorants in mouse olfactory receptor neurons and their local distribution. *J Neurophysiol*, **72**:2980-2989.
- Schaefer ML, Finger TE, Restrepo D (2001) Variability of position of the P2 glomerulus within a map of the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol*, **436**:351-362.
- Scheich H (1991) Auditory cortex: comparative aspects of maps and plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, **1**:236-247.
- Schild D, Restrepo D (1998) Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol Rev*, **78**:429-466.
- Schoenbaum G, Eichenbaum H (1995) Information coding in the rodent prefrontal cortex. I. Single-neuron activity in orbitofrontal cortex compared with that in pyriform cortex. *J Neurophysiol*, **74**:733-750.
- Schoenfeld TA, Clancy AN, Forbes WB, Macrides F (1994) The spatial organization of the peripheral olfactory system of the hamster. Part I: Receptor neuron projections to the main olfactory bulb. *Brain Res Bull*, **34**:183-210.
- Schwob JE, Gottlieb DI (1986) The primary olfactory projection has two chemically distinct zones. *J Neurosci*, **6**:3393-3404.
- Sengupta P, Chou JH, Bargmann CI (1996) odr-10 encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. *Cell*, **84**:899-909.
- Shepherd GM (1987) A molecular vocabulary for olfaction. *Ann N Y Acad Sci*, **510**:98-103.
- Sherrington CS (1906) The integrative action of the nervous system. C. Scribner's Sons, New York.
- Sicard G, Feron F, Andrieu JL, Holley A, Mackay-Sim A (1998) Generation of neurons from a nonneuronal precursor in adult olfactory epithelium in vitro. *Ann N Y Acad Sci*, **855**:223-225.
- Singer MS, Shepherd GM (1994) Molecular modeling of ligand-receptor interactions in the OR5 olfactory receptor. *Neuroreport*, **5**:1297-1300.
- Singer MS, Shepherd GM, Greer CA (1995) Olfactory receptors guide axons. *Nature*, **377**:19-20.

- Singer W (1999) Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations? *Neuron*, **24**:49-65, 111-125.
- Smith RJF (1999) What good is smelly stuff in the skin? Cross function and cross taxa effects in fish "alarm substances". In: Advances in chemical signals in vertebrates., editiert von: Johnston RE, Müller-Schwarze D, Sorensen PW; Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- Sörensen PW, Hara TJ, Stacey NE (1991) Sex pheromones selectively stimulate the medial olfactory tracts of male goldfish. *Brain Res*, **558**:343-347.
- Sorensen PW, Scott AP, Stacey NE, Bowdin L (1995) Sulfated 17,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one functions as a potent and specific olfactory stimulant with pheromonal actions in the goldfish. *Gen Comp Endocrinol*, **100**:128-142.
- Sorensen PW, Stacey NE (1999) Evolution and specialization of fish hormonal pheromones. In: Advances in chemical signals in vertebrates., editiert von: Johnston RE, Müller-Schwarze D, Sorensen PW; Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. pp 15-47.
- Specia DJ, Lin DM, Sorensen PW, Isacoff EY, Ngai J, Dittman AH (1999) Functional identification of a goldfish odorant receptor. *Neuron*, **23**:487-498.
- Stacey NE, Kyle AL (1983) Effects of olfactory tract lesions on sexual and feeding behavior in the goldfish. *Physiol Behav*, **30**:621-628.
- Stopfer M, Bhagavan S, Smith BH, Laurent G (1997) Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature*, **390**:70-74.
- Strotmann J, Conzelmann S, Beck A, Feinstein P, Breer H, Mombaerts P (2000) Local permutations in the glomerular array of the mouse olfactory bulb. *J Neurosci*, **20**:6927-6938.
- Strotmann J, Hoppe R, Conzelmann S, Feinstein P, Mombaerts P, Breer H (1999) Small subfamily of olfactory receptor genes: structural features, expression pattern and genomic organization. *Gene*, **236**:281-291.
- Strotmann J, Konzelmann S, Breer H (1996) Lamina segregation of odorant receptor expression in the olfactory epithelium. *Cell Tissue Res*, **284**:347-354.
- Stryer L (1988) Biochemistry. 3rd Edition. W.H. Freeman and Company, New York.
- Sullivan SL, Adamson MC, Ressler KJ, Kozak CA, Buck LB (1996) The chromosomal distribution of mouse odorant receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**:884-888.
- Sullivan SL, Bohm S, Ressler KJ, Horowitz LF, Buck LB (1995) Target-independent pattern specification in the olfactory epithelium. *Neuron*, **15**:779-789.
- Sutterlin AM, Sutterlin N (1971) Electrical responses of the olfactory epithelium of atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Fish Res Board Can*, **28**:
- Suzuki N, Tucker D (1971) Amino acids as olfactory stimuli in freshwater catfish, *Ictalurus catus* (Linn.). *Comp Biochem Physiol A*, **40**:399-404.
- Thommesen G (1982) Specificity and distribution of receptor cells in the olfactory mucosa of the char (*Salmo alpinus*). *Acta Physiol Scand*, **115**:47-56.
- Thommesen G (1983) Morphology, distribution, and specificity of olfactory receptor cells in salmonid fishes. *Acta Physiol Scand*, **117**:241-249.
- Tonegawa S (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, **302**:575-581.
- Touhara K, Sengoku S, Inaki K, Tsuboi A, Hirono J, Sato T, Sakano H, Haga T (1999) Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**:4040-4045.
- Troemel ER, Chou JH, Dwyer ND, Colbert HA, Bargmann CI (1995) Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell*, **83**:207-218.
- Troemel ER, Kimmel BE, Bargmann CI (1997) Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*. *Cell*, **91**:161-169.
- Trotier D (1994) Intensity coding in olfactory receptor cells. *Semin Cell Biol*, **5**:47-54.

- Truong K, Sawano A, Mizuno H, Hama H, Tong KI, Mal TK, Miyawaki A, Ikura M (2001) FRET-based in vivo  $Ca^{2+}$  imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. *Nat Struct Biol*, **8**:1069-1073.
- Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, **67**:509-544.
- Tsuboi A, Yoshihara S, Yamazaki N, Kasai H, Asai-Tsuboi H, Komatsu M, Serizawa S, Ishii T, Matsuda Y, Nagawa F, Sakano H (1999) Olfactory neurons expressing closely linked and homologous odorant receptor genes tend to project their axons to neighboring glomeruli on the olfactory bulb. *J Neurosci*, **19**:8409-8418.
- Turin L (1996) A spectroscopic mechanism for primary olfactory reception. *Chem Senses*, **21**:773-791.
- Turin L, Yoshii F (2002) Structure-odor relations: a modern perspective. In: Handbook of olfaction and gustation. 2nd Edition, editiert von: Doty RL; Marcel Dekker, New York. *im Druck*.
- Uchida N, Takahashi YK, Tanifuji M, Mori K (2000) Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nat Neurosci*, **3**:1035-1043.
- Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nunez JM, Vosshall LB, Axel R (1994) Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*, **79**:981-991.
- Vassar R, Ngai J, Axel R (1993) Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell*, **74**:309-318.
- Vickers NJ, Christensen TA, Baker TC, Hildebrand JG (2001) Odour-plume dynamics influence the brain's olfactory code. *Nature*, **410**:466-470.
- Vosshall LB, Wong AM, Axel R (2000) An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell*, **102**:147-159.
- Wachowiak M, Cohen LB (1999) Presynaptic inhibition of primary olfactory afferents mediated by different mechanisms in lobster and turtle. *J Neurosci*, **19**:8808-8817.
- Wachowiak M, Cohen LB (2001) Representation of odorants by receptor neuron input to the mouse olfactory bulb. *Neuron*, **32**:723-735.
- Wachowiak M, Zochowski M, Cohen LB, Falk CX (2000) The spatial representation of odors by olfactory receptor neuron input to the olfactory bulb is concentration invariant. *Biol Bull*, **199**:162-163.
- Wang F, Nemes A, Mendelsohn M, Axel R (1998) Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell*, **93**:47-60.
- Wedekind C, Furi S (1997) Body odour preferences in men and women: do they aim for specific MHC combinations or simply heterozygosity? *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **264**:1471-1479.
- Wehr M, Laurent G (1996) Odour encoding by temporal sequences of firing in oscillating neural assemblies. *Nature*, **384**:162-166.
- Wes PD, Bargmann CI (2001) *C. elegans* odour discrimination requires asymmetric diversity in olfactory neurons. *Nature*, **410**:698-701.
- Westerfield M (1995) The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 3rd Edition. University of Oregon Press, Eugene.
- Weth F (2001) Molekulare Aspekte der funktionellen Architektur des Geruchssystems beim Zebrafärbli, *Danio rerio*. *Dissertation* an der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Weth F, Nadler W, Korsching S (1996) Nested expression domains for odorant receptors in zebrafish olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**:13321-13326.
- Wetzel CH, Behrendt HJ, Gisselmann G, Stortkuhl KF, Hovemann B, Hatt H (2001) Functional expression and characterization of a *Drosophila* odorant receptor in a heterologous cell system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**:9377-9380.
- Wetzel CH, Oles M, Wellerdieck C, Kuczkowiak M, Gisselmann G, Hatt H (1999) Specificity and sensitivity of a human olfactory receptor functionally expressed in human embryonic kidney 293 cells and *Xenopus Laevis* oocytes. *J Neurosci*, **19**:7426-7433.

- Whitlock KE, Westerfield M (1998) A transient population of neurons pioneers the olfactory pathway in the zebrafish. *J Neurosci*, **18**:8919-8927.
- Wickens A, May D, Rand-Weaver M (2001) Molecular characterisation of a putative Atlantic salmon (*Salmo salar*) odorant receptor. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **129**:653-660.
- Wilkinson DG, Bhatt S, Herrmann BG (1990) Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature*, **343**:657-659.
- Wilson DA (2001) Receptive fields in the rat piriform cortex. *Chem Senses*, **26**:577-584.
- Wright RH (1977) Odor and molecular vibration: neural coding of olfactory information. *J Theor Biol*, **64**:473-502.
- Wysocki CJ, Dorries KM, Beauchamp GK (1989) Ability to perceive androstenone can be acquired by ostensibly anosmic people. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**:7976-7978.
- Xu F, Greer CA, Shepherd GM (2000) Odor maps in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, **422**:489-495.
- Xu F, Kida I, Hyder F, Shulman RG (2000) Assessment and discrimination of odor stimuli in rat olfactory bulb by functional MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**:10601-10606.
- Yamada H, Nakatani K (2001) Odorant-induced hyperpolarization and suppression of cAMP-activated current in newt olfactory receptor neurons. *Chem Senses*, **26**:25-34.
- Yang X, Renken R, Hyder F, Siddeek M, Greer CA, Shepherd GM, Shulman RG (1998) Dynamic mapping at the laminar level of odor-elicited responses in rat olfactory bulb by functional MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**:7715-7720.
- Yasuoka A, Endo K, Asano-Miyoshi M, Abe K, Emori Y (1999) Two subfamilies of olfactory receptor genes in medaka fish, *Oryzias latipes*: genomic organization and differential expression in olfactory epithelium. *J Biochem (Tokyo)*, **126**:866-873.
- Yokoi M, Mori K, Nakanishi S (1995) Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**:3371-3375.
- Youngentob SL, Margolis FL (1999) OMP gene deletion causes an elevation in behavioral threshold sensitivity. *Neuroreport*, **10**:15-19.
- Youngentob SL, Margolis FL, Youngentob LM (2001) OMP gene deletion results in an alteration in odorant quality perception. *Behav Neurosci*, **115**:626-631.
- Yu R, Hinkle PM (2000) Rapid turnover of calcium in the endoplasmic reticulum during signaling. Studies withameleon calcium indicators. *J Biol Chem*, **275**:23648-23653.
- Yuste R, Miller RB, Holthoff K, Zhang S, Miesenböck G (2000) Synapto-pHluorins: chimeras between pH-sensitive mutants of green fluorescent proteins and synaptic vesicle membrane proteins as reporters of neurotransmitter release. *Methods Enzymol*, **327**:522-546.
- Zebrafish issue. (1996) *Development*, **123**:1-481.
- Zerucha T, Stuhmer T, Hatch G, Park BK, Long Q, Yu G, Gambarotta A, Schultz JR, Rubenstein JL, Ekker M (2000) A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between Dlx genes in the embryonic forebrain. *J Neurosci*, **20**:709-721.
- Zhang YJ, Pan HY, Gao SJ (2001) Reverse transcription slippage over the mRNA secondary structure of the LIP1 gene. *Biotechniques*, **31**:1286.
- Zhao H, Ivic L, Otaki JM, Hashimoto M, Mikoshiba K, Firestein S (1998) Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science*, **279**:237-242.
- Zhao H, Reed RR (2001) X inactivation of the OCNC1 channel gene reveals a role for activity-dependent competition in the olfactory system. *Cell*, **104**:651-660.
- Zhao J, Hyman L, Moore C (1999) Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**:405-445.
- Zheng C, Feinstein P, Bozza T, Rodriguez I, Mombaerts P (2000) Peripheral olfactory projections are differentially affected in mice deficient in a cyclic nucleotide-gated channel subunit. *Neuron*, **26**:81-91.

- Zimprich F, Ashworth R, Bolsover S (1998) Real-time measurements of calcium dynamics in neurons developing in situ within zebrafish embryos. *Pflügers Arch*, **436**:489-493.
- Zippel HP (1998) Mitral cells and ruffed cells. Two physiologically different types of relay neurons in the olfactory bulb of goldfish. *Ann N Y Acad Sci*, **855**:533-534.
- Zippel HP, Lago-Schaaf T, Caprio J (1993) Ciliated olfactory receptor neurons in goldfish (*Carassius auratus*) partially survive nerve axotomy, rapidly regenerate and respond to amino acids. *J Comp Physiol [A]*, **173**:537-547.
- Zippel HP, Reschke C, Korff V (1999) Simultaneous recordings from two physiologically different types of relay neurons, mitral cells and ruffed cells, in the olfactory bulb of goldfish. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **45**:327-337.
- Zippel HP, Sorensen PW, Hansen A (1997) High correlation between microvillous olfactory receptor cell abundance and sensitivity to pheromones in olfactory nerve-sectioned goldfish. *J Comp Physiol [A]*, **180**:39-52.
- Zochowski M, Wachowiak M, Falk CX, Cohen LB, Lam YW, Antic S, Zecevic D (2000) Imaging membrane potential with voltage-sensitive dyes. *Biol Bull*, **198**:1-21.
- Zou Z, Horowitz LF, Montmayeur JP, Snapper S, Buck LB (2001) Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex. *Nature*, **414**:173-179.
- Zozulya S, Echeverri F, Nguyen T (2001) The human olfactory receptor repertoire. *Genome Biol*, **2**:0018.

## VII. ANHANG

## 1 SEQUENZVERGLEICHE

## 1.1 OMP.

Vergleich der 37 (40) Aminosäuren der abgeleiteten Proteinsequenzen der bekannten OMP Gene von Mensch, Maus, Krallenfrosch, Medaka und Zebrafisch. Grundlage des phylogenetischen Stammbaums in **Abb. 24A** und der Sequenzübereinstimmungen in **Abb. 24B**.

- zebOMP: *Danio rerio*, olfactory marker protein.  
 medOMP1: *Oryzias latipes*, olfactory marker protein 1, Yasuoka et al., 1999.  
 medOMP2: *Oryzias latipes*, olfactory marker protein 2, Yasuoka et al., 1999.  
 musOMP: *Mus musculus*, olfactory marker protein (Omp), GenBank: NM011010.  
 ratOMP: *Rattus norvegicus*, olfactory marker protein (Omp), GenBank: NM012616.  
 humOMP: *Homo sapiens*, olfactory marker protein (OMP), GenBank: NM006189.  
 xlOMP1: *Xenopus laevis*, olfactory marker protein 1, XOMP1, GenBank: AJ010978.  
 xlOMP2: *Xenopus laevis*, olfactory marker protein 2, XOMP2, GenBank: AJ010979.

	1				40
zebOMP	TRQ	LLEPTGL	F	WRSAD	DEN. . . IQCYEADA QEFGERIAEL
medOMP1	TRQ	LLEPIGT	F	WRNAEDPEE	SPLKCLEADM QEFGERIAEL
medOMP2	TRQ	LLEPAGV	F	WRGRADAAD	TLAHCYEADA VEFGERIAEL
musOMP	TRQ	LLDPAAI	F	WRKEDSDA. . .	MDWNEADA LEFGERLSDL
ratOMP	TRQ	LLDPAAI	F	WRKEDSDA. . .	MDWNEADA LEFGERLSDL
humOMP	TRQ	LLDPTAI	F	WRKEDSDA. . .	IDWNEADA LEFGERLSDL
xlOMP1	TRQ	LLEPSAV	F	YKKDANDE. . .	VECNEADA QEFGERIAEL
xlOMP2	TRQ	LLEPSAV	F	YKKDAKDK. . .	VECNEADA QEFGERIAEL

Vergleich der vollständigen abgeleiteten Proteinsequenzen der OMP Gene von Mensch, Maus, Krallenfrosch und Zebrafisch. Grundlage der **Abb. 24B**.

	1				50
musOMP	MAEDG	PQKQQ	LEMP	LVLDQD	LTQQMRLRVE SLKQRGEKKQ DGEKLIRPAE
ratOMP	MAEDG	PQKQQ	LDMP	LVLDQD	LTKQMRLRVE SLKQRGEKKQ DGEKLLRPAE
humOMP	MAEDR	PQQPQ	LDMP	LVLDQD	LTRQMRLRVE SLKQRGEKKQ DGEKLLQPAE
xlOMP1	~~~~M	ASETSE	MELP	FIEDTQ	LTKCMRIRVQ TLQQKNAKPQ EGEMLLRANE
xlOMP2	~~~~M	APETSE	MELP	FNEDTQ	LTKCMRIRVQ TLQQKNGKPQ EGEMLLRAND
zebOMP	~~~~~	MS	LELT	FNPDVQ	LTEMMRLRVQ SLQQRGQKRQ DGERLLKSNE
	51				100
musOMP	SVYRL	DFIQQ	QKLQ	FDHWNV	VLDKPGKVTI TGTSQNWTPD LTNLMTRQLL
ratOMP	SVYRL	DFIQQ	QKLQ	FDHWNV	VLDKPGKVTI TGTSQNWTPD LTNLMTRQLL
humOMP	SVYRL	NFTQQ	QRLQ	FERWNV	VLDKPGKVTI TGTSQNWTPD LTNLMTRQLL
xlOMP1	YIYRV	DF.SK	QKL	RFLWVKV	HLKSPGKVM I TGTSQHWTPD LTNLMTRQLL
xlOMP2	YIYRL	DF.PK	QKL	RFLWVKV	HLKTPGKVM I TGTSQHWTPD LTNLMTRQLL
zebOMP	HVYSL	DF.SE	QALH	FTRWNI	RISSPGRLNI IATSQLWTPD LTHLMTRQLL
	101				150
musOMP	DPAAI	FWRKE	DSDAM	DWNEA	DALEFGERLS DLAKIRKVMY FLITFEGEVE
ratOMP	DPAAI	FWRKE	DSDAM	DWNEA	DALEFGERLS DLAKIRKVMY FLITFEGEVE
humOMP	DPTAI	FWRKE	DSDAI	DWNEA	DALEFGERLS DLAKIRKVMY FLVTFEGEVE
xlOMP1	EPSAV	FYKGD	ANDE	VECNEA	DAQEFGERIA ELAKIRKVMY FVITFLDGAD
xlOMP2	EPSAV	FYKGD	AKDK	VECNEA	DAQEFGERIA ELAKIRKVMY FVFTFLDGAD
zebOMP	EPTGL	FWRSA	DDENI	QCIEA	DAQEFGERIA ELAKVRKVMY FLFAFEDGLS

	151	165
musOMP	PANLKASVVF	NQL*~
ratOMP	PANLKASVVF	NQL*~
humOMP	PANLKASVVF	NQL*~
xLOMP1	PATIECSIGF	RA*~~
xLOMP2	PSTVEYSIGF	RG*~~
zebOMP	PESVECSIEF	QTSK*

1.2 *ztbr*.

Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen des *ztbr1* mit den Genen der *Tbr*-Genfamilie von Mensch, Maus, Krallenfrosch und Zebrabärbling sowie mit den bekannten Proteinsequenzen weiterer T-box Gene des Zebrabärblings. Grundlage des phylogenetischen Stammbaums in **Abb. 35B**.

- ztbr1: *tbr1* des Zebrabärblings, *Danio rerio*, GenBank: AF287006.
- mtbr1: *Tbr1* der Maus *Mus musculus*, GenBank: NM009322.
- mtbr2: *Tbr2* der Maus, GenBank: AB032373.
- mtbr3: *Tbr3* der Maus, (A.Bulfone, pers. Mitteilung).
- htbr1: *Tbr1* des Menschen, *Homo sapiens*, GenBank: NM006593.
- htbr2: *Tbr2* des Menschen, GenBank: AB031038.
- zeom: Eomesodermin (*tbr2*) des Zebrabärblings, GenBank: AF329830.
- xeom: Eomesodermin (*Tbr2*) des Krallenfrosches, *Xenopus laevis*, GenBank: U75996.
- ztbx2: *Danio rerio*, T-box transcription factor *tbx2*, GenBank: AF179405.
- ztbx4: *Danio rerio*, T-box transcription factor *tbx4*, GenBank: AF179406.
- ztbx5: *Danio rerio*, T-box transcription factor *tbx5*, GenBank: AF179407.
- ztbx6: *Danio rerio*, T-box6 (*tbx6*), GenBank: U80951.
- ztbx16: *Danio rerio*, T-box containing protein (*tbx16*), GenBank: AF044977.
- ztbx20: *Danio rerio*, T-box transcription factor (*tbx20*), GenBank: AF253325.
- zhrt: *Danio rerio*, H15-related T-box transcription factor *hrT*, GenBank: AF239664.
- ztbxc: *Danio rerio*, T-box protein (*tbx-c*), GenBank: AF136946.
- zspt: *Danio rerio*, spadetail (*spt*), GenBank: AF077225.
- zbrach: Brachyury protein homolog (T-box protein ZFT), SwissProt: Q07998.

	1				50
htbr1	~	~	~	~	~
mtbr1	~	~	~	~	~
ztbr1	~	~	~	~	~
htbr2	~	~	~	~	~
mtbr2	~	~	~MQLG	EQLL.VSSVN	LPGAHFYPLE
zeom	~	~	~MQLG	EQLL.VSSVN	LPGAHFYSLE
xeom	MVPGAWHSL	FTTSSASEKE	ENRSQRMQLG	ESILPGASVN	LPKT.FYNLS
mtbr3	~	~	~	EQLLNSSTPN	LPHT.FYPLT
ztbx16	~	~	~	~	~
zspt	~	~	~	~	~
ztbx2	~	~	~	~	~
ztbxc	~	~	~	~	~
ztbx20	~	~	~	~	~
zhrt	~	~	~	~	~
ztbx4	~	~	~	~	~
ztbx5	~	~	~	~	~
ztbx6	~	~	~	~	~
zbrach	~	~	~	~	~

	51				100
htbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
mtbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
htbr2	SARGGSGGSA	GH.....	..LPSAAPS	QKLDLGKASK	KFSGSLSC
mtbr2	SARGGGGGGG	GGGGGGGGSV	SLLPGAAPS	QRLDLKASK	KFPGSLPC
zeom	SSSESTNNSP	GSTQIDFQ..	.....	...DMDRTDS	EOSSG..AKK
xeom	GDPSSAVHSP	.SLEFSVG..	.....	...HKGQQHK	KYSSG..SSR
mtbr3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx16	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zspt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbxc	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx20	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zhrt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx5	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx6	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zbrach	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

	101				150
htbr1	~~~~MQLEHC	LSPSIMLSKK	FLNV...SSS	YPHSGGSELV	LHDHPIISTT
mtbr1	~~~~MQLEHC	LSPSIMLSKK	FLNV...SSS	YPHSGGSELV	LHDHPIISTT
ztbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
htbr2	VSGEPAAAASA	GAPAAMLSDT	DAGDAFASAA	AVAKPGPPDG	RKGSPC..GE
mtbr2	GSMAEPAGAGA	GAPAAMLSDA	DAGDTFGSTS	AVAKPGPPDG	RKGSPC..AE
zeom	FLMDDADSE.	.....SFT	.....GTKA	AAAAATAAPDA	RKSSPVIGAD
xeom	GLQLDSPREA	GSSSTMLSET	.....GEGF	SVAKTLPDNV	RKGSPC..SAE
mtbr3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx16	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zspt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbxc	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx20	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zhrt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx5	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx6	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zbrach	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

	151				200
htbr1	DNLERSPLK	KITRGMNOS	DTDNFPDSKD	SPGDVORSKL	SPVLDGVSEL
mtbr1	DNLERSPLE	KITRGMNOS	DTDNFPDSKD	SPGDVORSKL	SPVLDGVSEL
ztbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
htbr2	EELPSAAAAA	AAAAAAAAAAT	ARYSMDSL..	SSVRYYLOSP	GPO...GS.
mtbr2	EELPS.....	...AATAAAT	ARYSMDSL..	SSERYYLPS	GPQ...GS.
zeom	DEL.....	.....SST	RRYNIDDL..	GTDRYFISS.	...SQPSS.
xeom	EEL.....	..NTAVPTSA	PRYLDGSLQA	ASERYYLOPO	GOOLOQTTT.
mtbr3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	GIVEPGCGDM
ztbx16	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zspt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbxc	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx20	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zhrt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx5	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx6	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zbrach	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

	201				250
htbr1	RHSF.DGSAA	DRYLLSQSSQ	QSAATAPSA	MFPYPGQHG	AHPAFSIGSP
mtbr1	RHSF.DGSAA	DRYLLSQSSQ	QSAATAPSA	MFPYPSQHG	AHPAFSIGSP
ztbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
htbr2	ELAA.PCSLF	PYQAAAGAPH	GPVYPAPNGA	RYP...YGS	MLPPGGFPAA
mtbr2	ELAA.PCSLF	OYPAAAGAAH	GPVYPASNGA	RYP...YGS	MLPPGGFPAA
zeom	DVAN.PCSLF	PY...G.GQT	GSVYSGSNGS	RYSSSLHYGS	VLPPAGFSSA
xeom	ELGS.PCSIF	PY...APPQH	SAVYPAGGAA	RYPP...YGS	MLPPAGFSPP
mtbr3	LTGTEPMPSD	EGRGPGADQQ	HREFFYPEPGA	QDPTDRRAGS	SLGTPYSGGA
ztbx16	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zspt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx2	~~~~~	~~~~MRDPVF	TGTAMAYHPF	HAHRPTDFPM	SAFLAAAQPS
ztbxc	~~~~~	~~~~~	~~~~MAYHPF	HAHRPTDFPM	SAFLAAAQPS
ztbx20	~~~~~	~~~~MEYTSS	PKPOLSSRAN	AFSIAALMSS	GKTKDKESEE
zhrt	~~~~~	~~~~MEYTSS	PKPOLSSRAN	AFSIAALMSS	GKTKDKESEE
ztbx4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx5	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx6	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zbrach	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

251	htbr1	SRYMAHHPVI	TNGAYNSLLS	NSSPOGYPTA	GYPYPOQYGH	SYOGAPFYQF
	mtbr1	SRYMAHHPVI	TNGAYNSLLS	NSSPOGYPTA	GYPYPOQYGH	SYOGAPFYQF
	ztbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	htbr2	ACPPGQAQFG	PGAGAGSGAG	GINGGGGGPG	TYOYSQG.AP	LYGYPGAAA
	mtbr2	VCPPARAQFG	PAAGSGSGAG	SSGGGAGGPG	AYPYGQG.SP	LYGYPAGTSA
	zeom	VC.ASRSQFG	.....	.....G	GYQFGQPGC	LYSPYP....
	xeom	VC.PSRPOYS	.....	.....S	GYQYSQAPGT	MYSYP....P
	mtbr3	LVPAAAPGRFL	GSFAYPPRAQ	VAGFPG..PG	EFFPPPAGAE	GYPVPDGYPA
	ztbx16	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~MQ	AIRDLKHNFS
	zspt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~MQ	AIRDLKHNFS
	ztbx2	FFPALTLPFG	ALTKPIPDHT	LAGAAEAGLH	PALSHHHQAA	HLRSLK...S
	ztbxc	FFPALTLPFG	ALTKPIPDHT	LAGAAEAGLH	PALSHHHQAA	HLRSLK...S
	ztbx20	NTIKPLEQFV	EKSSCHPNLG	DLPPLETHSD	FS..SGGGTG	SGAPLCTEPL
	zhrt	NTIKPLEQFV	EKSSCHPNLG	DLPPLETHSD	FS..SGGGTG	SGAPLCTEPL
	ztbx4	~~~~~	~~~~~MLQ	EKASVVADEG	MTVAQSGGRP	ELADSSSHLG
	ztbx5	~~~~~M	ADSEDTFRLQ	NSPS...DSE	PKDLQNEGK.	...SDKQNAA
	ztbx6	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~MNLANNYG
	zbrach	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	MSASSPDQRL

	htbr1	SSTQPLG...	.....VP.G	.....KAQVY	LCNRPLWLKF	HRHOTEMIIT
	mtbr1	SSTQPLG...	.....VP.G	.....KAQVY	LCNRPLWLKF	HRHOTEMIIT
	ztbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	htbr2	AGSCGGL...	..GGLGVP.S	SG..FRAHVY	LCNRPLWLKF	HRHOTEMIIT
	mtbr2	AGSCGGL...	..GGLGVP.G	SG..FRAHVY	LCNRPLWLKF	HRHOTEMIIT
	zeom	.GPGSSL...	..SSMPIP.G	SGSARAQVY	LCNRPLWLKF	HRHOTEMIIT
	xeom	AGTGSGL...	..SALGLP.G	GGAGVRAQVY	LCNRPLWLKF	HRHOTEMIIT
	mtbr3	PDPRAGLYPG	PREDYALPAG	LEVSGKLRVA	LSNHLLWSKF	NOHOTEMIIT
	ztbx16	LPPPPSMPGA	GDSYHQ...G	N.....IRMT	LEDPELWRSF	HEIGTEMIIT
	zspt	LPPPPSMPGA	GDSYHQ...G	N.....IRMT	LEDPELWRSF	HEIGTEMIIT
	ztbx2	LEPEEEV...	.....E...D	D.....PKVT	LEAKDLWDQF	HKLGTEMVIT
	ztbxc	LEPEEEV...	.....E...D	D.....PKVT	LEAKDLWDQF	HKLGTEMVIT
	ztbx20	IPTTPGVP..	...SEE..KA	K.....ISCS	LETKELWDKF	HELGTEMIIT
	zhrt	IPTTPGVP..	...SEE..MA	K.....ISCS	LETKELWDKF	HELGTEMIIT
	ztbx4	LPTTPSNPQN	NEPDQS..IE	N.....IKVV	LHDRELWKKL	HEAGTEMIIT
	ztbx5	VSKSPSS.OT	TYIQOG..ME	G.....IKVY	LHERELWTKF	HEVGTEMIIT
	ztbx6	YYPQDCRTQY	SRMNSA..EA	ELTSLPVHVS	LQDRELWDKF	SSIGTEMLIT
	zbrach	DHLLSAVESE	FQKGSE..KG	DASERDIKLS	LEDAELWTKF	KELTNEMIVT

	htbr1	KQGRRMFPFL	SFNIISGLDPT	AHYNIFVDVI	LADPNHWRFO	GGK..WVPCG
	mtbr1	KQGRRMFPFL	SFNIISGLDPT	AHYNIFVDVI	LADPNHWRFO	GGK..WVPCG
	ztbr1	~~~~~	~~~~~SGLDPT	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	htbr2	KQGRRMFPFL	SFNINGLNPT	AHYNVFVEV	LADPNHWRFO	GGK..WVTCG
	mtbr2	KQGRRMFPFL	SFNINGLNPT	AHYNVFVEV	LADPNHWRFO	GGK..WVTCG
	zeom	KQGRRMFPFL	SFNIITGLNLT	AHYNVFVEIV	LADPNHWRFO	GGK..WVTCG
	xeom	KQGRRMFPFL	SFNIITGLNPT	AHYNVFVEV	LADPNHWRFO	GGK..WVTCG
	mtbr3	KQGRRMFPFL	SFTVAGLEPT	SHYRMFVDV	LVDQHHWRYQ	SGK..WVQCG
	ztbx16	KPGRRMFPHC	KISLSGLVPY	AKYILLVDMV	PEDGLRYKW.	.NKDKWEVAG
	zspt	KPGRRMFPHC	KISLSGLVPY	AKYILLVDMV	PEDGLRYKW.	.NKDKWEVAG
	ztbx2	KSGRRMFPPF	KVRINGLDKK	AKYILLMDIV	AADDCRYKF.	.HNSRWMVAG
	ztbxc	KSGRRMFPPF	KVRINGLDKK	AKYILLMDIV	AADDCRYKF.	.HNSRWMVAG
	ztbx20	KSGRRMFPTI	RVSFSGVDPD	AKYIVPMDIV	PVDNKRYRYA	YHRSSWLAVG
	zhrt	KSGRRMFPTI	RVSFSGVDPD	AKYIVLMDIV	PVDNKRYRYA	YHRSSWLAVG
	ztbx4	KAGRRMFPSY	KVKVTGMNPK	TKYILLTDIV	PADDHRYKFC	DNK..WMVAG
	ztbx5	KAGRRMFPSF	KVKVTGLNPK	TKYILLMDV	PADDHRYKFA	DNK..WSVTG
	ztbx6	KSGRRMFPSC	KVTVTGLNPK	VKYVVIMDMV	PFDNHKYKW.	.NKDCWEVNG
	zbrach	KTGRRMFVPL	RASVTGLDPN	AMYSVLLDFV	AADNNRWKYV	..NGEWVPGG

	htbr1	KADTNVOGNR	VYMHDPSPNT	GAHWMRQEIS	FGKLKLTNNK	GASNNNGQMV
	mtbr1	KADTNVOGNR	VYMHDPSPNT	GAHWMRQEIS	FGKLKLTNNK	GASNNNGQMV
	ztbr1	KADTNVTGNR	VYMHDPSPNT	GAHWMRQEIS	FGKLKLTNNK	GATNNTGQMV
	htbr2	KADNNMOGNIK	MYVHPESPNT	GSHWMRQEIS	FGKLKLTNNK	GANNNTQMI
	mtbr2	KADNNMOGNIK	MYVHPESPNT	GSHWMRQEIS	FGKLKLTNNK	GANNNTQMI
	zeom	KADNNMOGNIK	VYVHPESPNT	GAHWMRQEIS	FGKLKLTNNK	GANNNTQMI
	xeom	KADNNMOGNIK	VYVHPESPNT	GAHWMRQEIS	FGKLKLTNNK	GANNNTQMI
	mtbr3	KAEGSMFGR	LYVHPDSPNT	GAHWMRQEV	FGKLKLTNNK	GANNNTQMI
	ztbx16	KAEPQPPY.R	TYLHPDSPAP	GSHWMKQPV	FLKLKLTNN.	..ALDQHGHI
	zspt	KAEPQPPY.R	TYLHPDSPAP	GSHWMKQPV	FLKLKLTNN.	..ALDQHGHI
	ztbx2	KADPEMPK.R	MYIHPDSPAT	GEQWMAKPVA	FHKLKLTNN.	..ISDKHGFT
	ztbxc	KADPEMPK.R	MYIHPDSPAT	GEQWMAKPVA	FHKLKLTNN.	..ISDKHGFT
	ztbx20	KADPPLPA.R	LYVHPDSPFT	GEQLSKQMV	FEKVKLTNN.	..ELDQHGHI
	zhrt	KADPPLPA.R	LYVHPDSPFT	GEQLLKQMV	FEKVKLTNN.	..ELDQHGHI
	ztbx4	KAEPAMPG.R	LYVHPDSPAT	GAHWMRQLVS	FQKLKLTNN.	..HLDPFQHI
	ztbx5	KAEPAMPG.R	LYVHPDSPAT	GAHWMRQLVS	FQKLKLTNN.	..HLDPFQHI
	ztbx6	SSDPHLPN.R	FFIHPDSPAP	GQKWMQYPI	FHKLKLTNN.	..TLNSNGLV
	zbrach	KPEPQSPS.C	VYIHPDSPNF	GAHWMKAPVS	FQKVKLSNK.	...LNGGGQI

	451				500
htbr1	VLQSLHKYQP	RLHVVEVNED	GTEDTSQPGR	V.OTFTFPET	QFIAVTAYQN
mtbr1	VLQSLHKYQP	RLHVVEVNED	GTEDTSQPGR	V.OTFTFPET	QFIAVTAYQN
ztbr1	VLQSLHKYQP	RLHVVEVNED	GTEDTSQPGR	V.OTFTFPET	QFIAVTAYQN
htbr2	VLQSLHKYQP	RLHIVEVTED	GVEDLNEPSK	T.OTFTFSET	QFIAVTAYQN
mtbr2	VLQSLHKYQP	RLHIVEVTED	GVEDLNEPSK	T.OTFTFSET	QFIAVTAYQN
zeom	VLQSLHKYQP	RLHIVEVTED	GVEDMSSEAK	T.OTFTFPEN	QFIAVTAYQN
xeom	VLQSLHKYQP	RLHIVEVSED	GVEDLNDSEAK	N.OTFTFPEN	QFIAVTAYQN
mtbr3	VLQSLHKYQP	RLHIVEVNDG	EPEAACASASN	T.HVFTFOET	QFIAVTAYQN
ztbx16	ILHSMHRYHP	RFHIVQADD.	...LYSVRWS	VFOTFTFPET	SFTAVTAYQN
zspt	ILHSMHRYHP	RFHIVQADD.	...LYSVRWS	VFOTFTFPET	SFTAVTAYQN
ztbx2	ILNSMHKYQP	RFHIVRAND.	...ILKLPYS	TFRTYVFPET	DFIAVTAYQN
ztbxc	ILNSMHKYQP	RFHIVRAND.	...ILKLPYS	TFRTYVFPET	DFIAVTAYQN
ztbx20	ILNSMHKYQP	RVHIIKKKDH	TASLLNLKSE	EFRTFVFTET	VFTCRTAYQN
zhrt	ILNSMHKYQP	RVHIIKKKDH	TASLLNLKSE	EFRTFVFTET	VFTAVTAYQN
ztbx4	ILNSMHKYQP	RLHIVKADEN	NA..FGSKNT	AYCTHVHET	AFISVTSYQN
ztbx5	ILNSMHKYQP	RLHIVKADEN	NG..FGSKNT	AFCTHVHET	AFIAVTSYQN
ztbx6	ILNSMHKYQP	RLHIVQSPDP	CTPH...NPG	AYLRFVFPET	AFIAVTAYQN
zbrach	MLNSLHKYEP	RIHIVKVGGI	QKMISSQS..	.....FPET	QFIAVTAYQN

	501				550
htbr1	TDITQLKIDH	NPFAKGFRDN	YDTIYTGCDM	DRLTPSPNDS	PRS.QIVPGA
mtbr1	TDITQLKIDH	NPFAKGFRDN	YDTIYTGCDM	DRLTPSPNDS	PRS.QIVPGA
ztbr1	TDITQLKIDH	NPFAKGFRDN	YDTIYTGCDI	DRLTPSPGDS	PRS.QIMPSPA
htbr2	TDITQLKIDH	NPFAKGFRDN	YDS.....	.....	..SHQIVPGG
mtbr2	TDITQLKIDH	NPFAKGFRDN	YDS.....	.....	..SHQIVPGG
zeom	TDITQLKIDH	NPFAKGFRDN	YDSMYTAPES	DRLTPSPDTS	PRSHQIVPGA
xeom	TDITQLKIDH	NPFAKGFRDN	YDSMYTASES	DRLTPSPADS	PRSHQIVPGT
mtbr3	AEITQLKIDN	NPFAKGFREN	FESMYASVD.	...TSVPSP	GPNCQLLGGD
ztbx16	TKITKLKIDH	NPFAKGFRDE	GTNSKRRA..	NRNLPDPE..	.RVAKKMSKE
zspt	TKITKLKIDH	NPFAKGFRDE	GTNSKRRA..	NRNLPDPE..	.RVAKKMSKD
ztbx2	DKITQLKIDN	NPFAKGFRDT	G.NGRREK..	RKQLTLPS..	LRMYEDQCKV
ztbxc	DKITQLKIDN	NPFAKGFRDT	G.NGRREK..	RKQLTLPS..	LRMYEDQCKV
ztbx20	QLITRLKIDS	NPFAKGFRDS	SRLTDIER..	ES.VESLI..	HKHSYARSPI
zhrt	QLITRLKIDS	NPFAKGFRDS	SRLTDIER..	ES.VESLI..	HKHSYARSPI
ztbx4	HKITQLKIEN	NPFAKGFGRS	DEG.DL.R..	VSRLQG.K..	EYPVISKNMV
ztbx5	HKITQLKIEN	NPFAKGFGRS	DDM.ELHR..	MSRMQSTK..	EYPPVSRSTV
ztbx6	QEITKLKIDN	NPFAKGFRDN	GLNRKRFR..	DKGTQEMQDT	DROVKLDLTA
zbrach	EEITALKIKH	NPFAKAFLLDA	KERSDHKEVP	DHSTDNQQSG	YSQLGGWFLP

	551				600
htbr1	RYAMAGSFLO	DOFVSNYAKA	.RFHPGAGAG	PGPGTDRSVP	HTNGLLSPOO
mtbr1	RYAMAGSFLO	DOFVSNYAKA	.RFHPGAGAG	PGPGTDRSVP	HTNGLLSPOO
ztbr1	RYAMTGSFLO	DOFVSSYAKS	.RFHPGVGG.	.APGTDRSVP	LSNGLLSPOO
htbr2	RYGVQ.SFFF	EPFVNTLPOA	.RYNG....	.....ERTVP	QTNGLLSPOO
mtbr2	RYGVQ.NFFF	EPFVNTLPOA	.RYNG....	.....ERTVP	QTNGLLSPOO
zeom	RYAMQ.PFFQ	DOFVNNLPQX	HRFYGS....	.....ERAVP	QTNGLLSPOS
xeom	RYSVQ.PFFQ	DOFVNNLPPA	.RYSG....	.....ERTVP	QANGLLSPOT
mtbr3	PFSPLLS...	...NQYPVP	SREFYDLPQO	PKDMISQPYW	LGTPREHSYE
ztbx16	STHGSPR...	DVQPSSCEAL	DDEHAGRKEL	EVKAERY..S	P.WGGACDR.
zspt	SEHGSPQ...	DVQPSSCEAL	DDEHAGRKEL	EVKAERY..S	P.WGGACDR.
ztbx2	DRDGADS...	DA..SSSEPT	TGRDAGHSPG	PVSSPLR..F	N.RGSRDDKT
ztbxc	DRDGADS...	DA..SSSEPT	TGRDAGHSPG	PVSSPLR..F	N.RGSRDDKT
ztbx20	RTYAGDE...	ETLGE....	.GHSAHSRGS	AFTASDN..L	S.LSSVWTTT
zhrt	RTYAGDE...	ETLGE....	.GHSAHSRGS	AFTASDN..L	S.LSSVWTTT
ztbx4	RQRLISS...	HGHLG....	.KLSAGVLSS	HPOVLSH..Y	Q.YDSGVPLP
ztbx5	RQRVGSS...	QSPFSG....	.DVOG..LPA	TGAISSO..Y	S.CENSV...
ztbx6	NECAAGM...	SQMVEDVDVS	VSSSVDCRDT	QNSSSVS..L	NPFI SAFTNP
zbrach	SNGPMGP...	SSSPPQFNGA	PVHSSGSYCE	RYSSLRNHRA	APYPSHYSHR

	601				650
htbr1	AED.PGAPSP	QRWFVTP...	..ANNRLDFA	ASAYD..TAT	DFAGNAATLL
mtbr1	AED.PGAPSP	QRWFVTP...	..ANNRLDFA	ASAYD..TAT	DFAGNAATLL
ztbr1	TEE.TTVASP	QRWFVTP...	..ANNRLDFA	ASAYDAAAAA	DFAGNAATLL
htbr2	SEEVAN..PP	QRWLVTVPVQO	.PGTNKLDI.	.SSYE....S	EY..TSSTLL
mtbr2	SEEVAN..PP	QRWLVTVPVQO	.PVTNKLDI.	.GSYE....S	EY..TSSTLL
zeom	EDSAAGSASA	QRWFVGPVQO	SGGTTKLDL.	..SYD....S	EY..SASSLL
xeom	NEEVA.NVPP	QRWFVTPVQO	A.AANKLDM.	.GAYE....T	DY..SSGSL
mtbr3	AEFRAVSMKP	TLLPSAPGPT	VPYYRGQDVL	APGAGWPVAP	QYPPKMS PAG
ztbx16	..DSGHALRP	ESPLGSDHRD	VFSSEQLVPG	....QN.TYO	PY..RFHEYG
zspt	..DSGHALRP	ESPLGSDHRD	VYSSEQLVPG	....QN.TYO	PY..RFHEYG
ztbx2	CTDSEHEM..	.....DHQN	DRCGGSSSPA	....PK.PSS	PFRSRSEDWG
ztbxc	CTDSEHEM..	.....DHQN	DRCGGSSSPA	....PE.PSS	PFRSRSEDWG
ztbx20	SGFSGFQHPQ	SLSAIDTSTA	SLASPLPHPI	QGSPL....	PYSRLGMPLT
zhrt	SGFSGFQHPQ	SLSAIGTSTA	SLASPLPHPI	QGSPL....	PYSRLGMPLT
ztbx4	NSDSQEALSN	SFTSSREPSL	LYHC.FKHR.	.DNPRH.LEL	GCKRPYLDTT
ztbx5	SSTSQDLLPQ	S.SSYHEHTQ	DYHC.IKRKV	EDECPA.GEH	PYKPKYVESS
ztbx6	SSTAGAAAHO	THTLLSLSNR	HFSSPRESNL	NSVCAALPVS	QLSTGHTSFS
zbrach	STTTNNYMDN	SSGSLASHDS	..WSALQIPN	SSGMGTLAHT	TNTTNTSNTSQY

	651				700
htbr1	SYAAAGVKAL	PLQAAGCTGR	PLG....YYA	DP.....SG	WGARSPPQYC
mtbr1	SYAAAGVKAL	PLQAAGCTGR	PLG....YYA	DP.....SG	WGARSPPQYC
ztbr1	SYAAAGVKAL	PLPGAGCSNR	PLG....YYG	EP.....G	VGHRTPPQYC
htbr2	PY...GIKSL	PLQ....TSH	ALG....YYP	DPTFPAM.AG	WGGRGS.YO.
mtbr2	PY...GIKSL	PLQ....TSH	ALG....YYP	DPTFPAM.AG	WGGRGS.YO.
zeom	PY...GIKPL	PLQ....SPH	ALG....YYP	DSAFASMAAG	WSSR.SSYQ.
xeom	TY...GIKSL	PIQ....TSH	PMA....YYP	DAAFASM.AG	WGSRGSTYQ.
mtbr3	WFRP...MRTL	PMDPGLGSSE	EOGSSPSLWP	EVTSLQPESS	DSGLGEG.DT
ztbx16	.....KS	PSPS...SSS	SVGGSSACG.	...SAGRPSF	ESRV.LDV.A
zspt	.....KS	PSPS...SSS	SVGGSSACG.	...SAGRPSF	ESRV.LDV.A
ztbx2	REKPIAEKKD	DYPD...SRK	TSDSIFSIR.	...NLEKDKL	ESRSRKDTDS
ztbxc	REKPIAEKKD	DYPD...SRK	TSDSIFSIR.	...NLEKDKL	ESRSRKDTDS
ztbx20	PSALASSMOA	TGPT...FPS	FHMPTYHHY.	...FQQGPYA	AIQGLRHSST
zhrt	PSALASSMOA	TGPT...FPS	FHMPTYHHY.	...FQQGPYA	AIQGLRHSST
ztbx4	SSAVSEEHYF	RSP....PS	YDSPL...L.	...S...HPYC	N.EALGSREA
ztbx5	SS...EDDHY	R.P....LS	YSQSL..GL.	...SGGAPYR	P.ES.SQRQA
ztbx6	RLNPQETHHN	SRPKIQLOPP	HPSLQCHDL.	...DVRLLPL	PKLSRVQLSE
zbrach	PSLWSVAGTT	LTPSGSASGS	ITGGLTSQFL	RGSSMSYSGL	TSSLPVSSPS

	701				750
htbr1	GTKSGSVLPC	WPNSAAAAAR	MAGANPYLG.	EAEGLAAER	SPLPPGAAED
mtbr1	GAKSGSVLPC	WPNSAAAAAR	MAGANPYLG.	EAEGLAAER	SPLAP.AAED
ztbr1	.SKSSSVLSC	WPNSVSGSRT	TASSYLVPG	EDGDPIAPER	SPL..GGADE
htbr2	.RKMAAGLP.	WTSRTPPTVF	SEDO....L	S.KEKVKEEI	G.....S
mtbr2	.RKMAAGLP.	WTSRMSPPVF	PEDO....L	A.KEKVKEEI	S.....S
zeom	.RKMTTGLP.	WSRPSPPPAY	TDDL....L	SSKDKLQDEN	S.....T
xeom	.RKMTTSLP.	WSSRSSPSGF	SEDL....L	.PKDKVKEEM	S.....S
mtbr3	KRRRISPYPS	SGDSSSPAGA	PSPFDKETEG	QFYNYFPN*~	~~~~~
ztbx16	TVPDTS..	..SKPSSAP.	..EFSLPPHP	SAGH.....	.....QEYAG
zspt	TVPDTS..	..SKPSSAP.	..EFSLPPHP	SAGH.....	.....QEYAG
ztbx2	SKKDTENSGI	SGSKDSFSPL	MVQTESPSHF	GAGHLQSLAL	SGLHSQQFFN
ztbxc	SKKDTENSGI	SGSKDSFSPL	MVQTESPSHF	GAGHLQSLAL	SGLHSQQFFN
ztbx20	VMTPFV*~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zhrt	VMTPFV*~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx4	CMYGGLEGE	GGAVGTDDL	APSLNCMWA	SVQYPRYGM	OTVEAMOYO.
ztbx5	CMY.....	.ASAPQPPEP	VPSLEDISWP	GVPP...YSV	POMERLPHYQ
ztbx6	SALRNLEMSP	LSDCANPRPL	TNILNRSCFR	ASTPSGKLLP	NPPQPEQFLR
zbrach	SMYDPGLSEV	GVGDAQFESS	IARLTASWAP	VAQSY*~	~~~~~

	751				800
htbr1	AKPKDLSOSS	WIETPSSIKS	IDSSDSGIYE	QA.KRRRISP	ADTPVSESSS
mtbr1	AKPKDLSOSS	WIETPSSIKS	IDSSDSGIYE	QA.KRRRISP	ADTPVSESSS
ztbr1	SKPKDLSOSS	WIETPSSIKS	IDSSDSGIFE	QA.KRRRISP	SATPVSETSS
htbr2	S.....	WIETPSSIKS	LDSNDSGVYT	SACKRRRLSP	S.NSSNENSP
mtbr2	S.....	WIETPSSIKS	LDSNDSGVYN	SACKRRRLSP	S.TPSNGNSP
zeom	AAPTAASGTP	WMEAPPVLKS	VDSGDTSGYS	MACKRRRVSP	G.GSSTDASP
xeom	S.....	WVETPSSIKS	LDSNDSGVYT	GACKRRRLSP	S.TSSNENSP
mtbr3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx16	VLNMAI..TO	A.KPGMLGTH	P.LYSHYSTE	QSLGOWSGAA	ASQ.....
zspt	VLNMAI..TO	A.KPGMLGTH	P.LYSHYSTE	QSLGOWSGAA	ASQ.....
ztbx2	PLNTGQ..PL	LFHPGQFAMA	PGAFSAMGMG	HLLASVSGAG	GLENGLSAQ
ztbxc	PLNTGQ..PL	LFHPGQFAMA	PGAFSAMGMG	HLLASVSGAG	GLENGLSAQ
ztbx20	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zhrt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx4	PFTAHF..NS	T.....ASA	ASMVSHH.SP	S..MORPHPT	PPD...LVTF
ztbx5	HFAHF..AS	ROMPEAHGMY	ASSVSHOCSP	SGGIQSPSAG	LOGNEYLYAH
ztbx6	GSEREIYPAV	QEYTDQQFTL	NSQTEHRPHM	RPLTEY*~	~~~~~
zbrach	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

	801				850
htbr1	PLKSEVLAQR	DCEKNCAKDI	SGYYGFYSHS	*~	~~~~~
mtbr1	PLKSEVLAQR	DCEKNCAKDI	GGYYGFYSHS	*~	~~~~~
ztbr1	PLKSEMLTPR	ECEKNCSKDI	.GYYKFYPHS	*~	~~~~~
htbr2	SIKCGDINAE	EYSKDTSKGM	GGYYAFYTSP	*~	~~~~~
mtbr2	PIKCEDINTE	EYSKDTSKGM	GAYYAFYTSP	*~	~~~~~
zeom	TIKCEDLSSE	EYNKESHKAM	G.YYAFYTSP	*~	~~~~~
xeom	PIKCEDIGTE	DY.KDATKGL	G.YYSFYSSS	*~	~~~~~
mtbr3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx16	...YPPPPPP	HHHLPTEYSN	QAVHHGYHHG	NVGESWSQYPL	FSYSCW*~
zspt	...YPPPPPP	HHHLPTEYSS	QAVHHGYHHG	NVGESWSQYPL	FSYSCW*~
ztbx2	GTGSTPSPFP	FHLSQHMLAS	Q....GIPMP	TFGGLFPYP.	YTYMAAAAAA
ztbxc	GTGSTPSPFP	FHLSQHMLAS	Q....GIPMP	TFGGLFPYP.	YTYMAAAAAA
ztbx20	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zhrt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx4	TTQRVLPPTP	.SSASTSPSG	SGHHDRAHSS	LFHRKAGSPL	RSQRDFTGYS
ztbx5	GLQRTL..SP	.HQYHTVHSV	SIMHDWNEAS	*~	~~~~~
ztbx6	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zbrach	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

	851				900
htbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
mtbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
htbr2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
mtbr2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zeom	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
xeom	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
mtbr3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx16	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zspt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx2	ASALPASSST	ASSLSRNPFL	SSSTRPRLRF	NPYQLPVSIP	QSTNLLTTGL
ztbxc	ASALPASSST	ASSLSRNPFL	SSSTRPRLRF	NPYQLPVSIP	QSTNLLTTGL
ztbx20	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zhrt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx4	THSPTSTREP	AYQYQTGLSS	VGPHWTDS*~	~~~~~	~~~~~
ztbx5	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx6	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zbrach	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

	901				950
htbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
mtbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
htbr2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
mtbr2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zeom	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
xeom	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
mtbr3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx16	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zspt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx2	PSGLNPSSSES	SKCGSREASP	VPDHKSGASQ	RNGSPKTTMK	ESINELONIQ
ztbxc	PSGLNPSSSES	SKCGSREASP	VPDHKSGASQ	RNGSPKTTMK	ESINELSKYS
ztbx20	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zhrt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx5	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
ztbx6	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
zbrach	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

	951	970
htbr1	~~~~~	~~~~~
mtbr1	~~~~~	~~~~~
ztbr1	~~~~~	~~~~~
htbr2	~~~~~	~~~~~
mtbr2	~~~~~	~~~~~
zeom	~~~~~	~~~~~
xeom	~~~~~	~~~~~
mtbr3	~~~~~	~~~~~
ztbx16	~~~~~	~~~~~
zspt	~~~~~	~~~~~
ztbx2	RLVSGLESQR	ETSSPRDSPK
ztbxc	E....TSKR	PREPAGDFVT
ztbx20	~~~~~	~~~~~
zhrt	~~~~~	~~~~~
ztbx4	~~~~~	~~~~~
ztbx5	~~~~~	~~~~~
ztbx6	~~~~~	~~~~~
zbrach	~~~~~	~~~~~

## 2 DER BASISEXPRESSIONSVEKTOR: pACSF-Y

### 2.1 Übersicht.

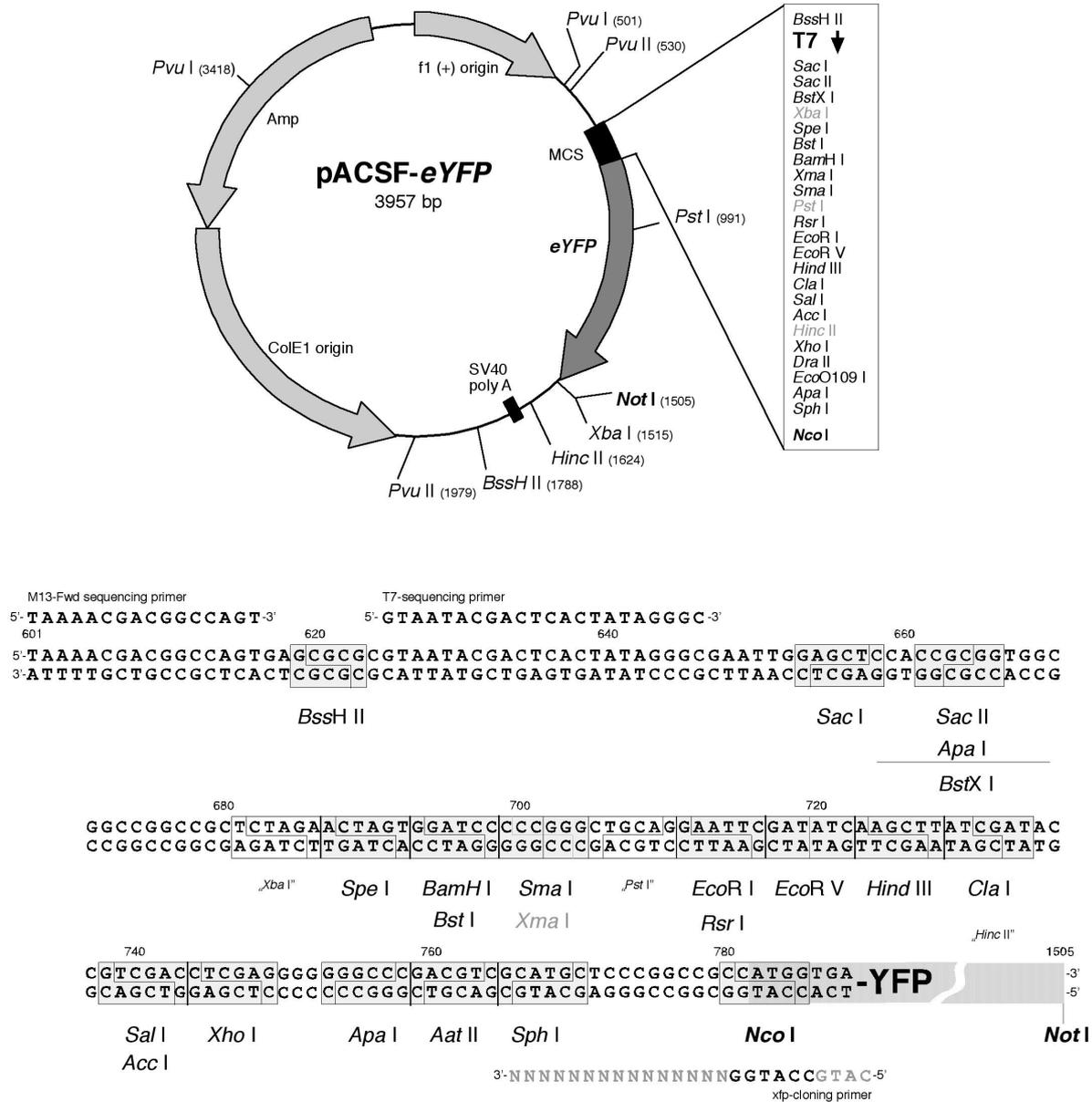


Abb. 43 – Der promotorlose Expressionsvektor pACSF-Y.

Der obere Teil stellt den strukturellen Aufbau des promotorlosen Expressionsvektors pACSF-Y dar. Die relevanten Restriktionsschnittstellen sind mit der Angabe ihrer Position in der Nukleotidsequenz (siehe VII.2.2) eingezeichnet. Grau dargestellte Restriktionsschnittstellen kommen mehrfach in der Sequenz vor. Das Reportergen eYFP kann durch über die *Nco I* und *Not I* Restriktionsschnittstellen (**fett**) umkloniert und ausgetauscht werden. *eYFP*: enhanced yellow fluorescent protein, *Amp*: Beta Lactamase Gen, Ampizilin-resistenz, *SV40 poly A*: Tandemwiederholung des SV40 Polyadenylierungssignals (AATAAA), *MCS*: multiple Klonierungsschnittstelle (Polylinker). Im unteren Teil ist die multiple Klonierungsschnittstelle mit den darin enthaltenen Restriktionsschnittstellen dargestellt. Relevante Primerbindungsstellen für die M13- und T7-Vektorprimer sind ebenfalls angegeben.

## 2.2 Nukleotidsequenz.

Nukleotidsequenz des promotorlosen Expressionsvektors pACSF-Y (Desktop-klonierung, enthält die eYFP-Nukleotidsequenz). Die Nummerierung ist am linken Bildrand angegeben und korrespondiert zu den Angaben in **VII.2.1**.

```

1   CTAAATTGTA AGCGTTAATA TTTTGTAAAA ATTCGCGTTA AATTTTTGTT
51  AAATCAGCTC ATTTTTTAAC CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT
101 AAATCAAAAAG AATAGACCGA GATAGGGTTG AGTGTGTGTC CAGTTTGGAA
151 CAAGAGTCCA CTATTAAAGA ACGTGGACTC CAACGTCAAA GGGCGAAAAA
201 CCGTCTATCA GGGCGATGGC CCACTACGTG AACCATCACC CTAATCAAGT
251 TTTTGTGGGT CGAGGTGCCG TAAAGCACTA AATCGGAACC CTAAAGGGAG
301 CCCCCGATTT AGAGCTTGAC GGGGAAAAGCC GGCGAACGTG GCGAGAAAGG
351 AAGGGAAGAA AGCGAAAGGA GCGGGCGCTA GGGCGCTGGC AAGTGTAGCG
401 GTCACGCTGC GCGTAACCAC CACACCCGCC GCGCTTAATG CGCCGCTACA
451 GGGCGCGTCC CATTGCGCCAT TCAGGCTGCG CAACTGTTGG GAAGGGCGAT
501 CGGTGCGGGC CTCTTCGCTA TTACGCCAGC TGGCGAAAGG GGGATGTGCT
551 GCAAGGCGAT TAAGTTGGGT AACGCCAGGG TTTTCCCAGT CACGACGTTG
601 TAAAACGACG GCCAGTGAGC GCGCGTAATA CGACTCACTA TAGGGCGAAT
651 TGGAGCTCCA CCGCGGTGGC GGCCGGCCGC TCTAGAACTA GTGGATCCCC
701 CGGGCTGCAG GAATTCGATA TCAAGCTTAT CGATACCGTC GACCTCGAGG
751 GGGGGCCCCG CGTCGCATGC TCCCGGCCGC CATGGTGAGC AAGGGCGAGG
801 AGCTGTTTAC CGGGGTGGTG CCCATCCTGG TCGAGCTGGA CGGCGACGTA
851 AACGGCCACA AGTTCAGCGT GTCCGGCGAG GCGGAGGGCG ATGCCACCTA
901 CGGCAAGCTG ACCCTGAAGT TCATCTGCAC CACCGGCAAG CTGCCCCGTG
951 CCTGGCCCAC CCTCGTGACC ACCTTCGGCT ACGGCCTGCA GTGCTTCGCC
1001 CGTACCCCG ACCACATGAA GCAGCACGAC TTCTTCAAGT CCGCCATGCC
1051 CGAAGGCTAC GTCCAGGAGC GCACCATCTT CTTCAAGGAC GACGGCAACT
1101 ACAAGACCCG CGCCGAGGTG AAGTTCGAGG GCGACACCCT GGTGAACCCG
1151 ATCGAGCTGA AGGGCATCGA CTTCAAGGAG GACGGCAACA TCCTGGGGCA
1201 CAAGCTGGAG TACAACCTACA ACAGCCACAA CGTCTATATC ATGGCCGACA
1251 AGCAGAAGAA CGGCATCAAG GTGAACTTCA AGATCCGCCA CAACATCGAG
1301 GACGGCAGCG TGCAGCTCGC CGACCACTAC CAGCAGAACA CCCCATCGG
1351 CGACGGCCCC GTGCTGCTGC CCGACAACCA CTACCTGAGC TACCAGTCCG
1401 CCCTGAGCAA AGACCCCAAC GAGAAGCGCG ATCACATGGT CCTGCTGGAG
1451 TTCGTGACCG CCGCCGGGAT CACTCTCGGC ATGGACGAGC TGTACAAGTA
1501 AAGCGGCCCG GACTCTAGAT CATAATCAGC CATACCACAT TTGTAGAGGT
1551 TTTACTTGCT TTAAAAAACC TCCCACACCT CCCCCTGAAC CTGAAACATA
1601 AAATGAATGC AATTGTTGTT GTTAACTTGT TTATTGCAGC TTATAATGGT
1651 TACAAAATAAA GCAATAGCAT CACAAATTTT ACAAATAAAG CATTTTTTTT
1701 ACTGCATTCT AGTTGTGGTT TGTCCAAACT CATCAATGTA TCTTAATATG
1751 GGAGACCAGC TTTTGTTCCT TTTAGTGAGG GTTAAATTGCG CGCTTGGCGT
1801 AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA ATTGTTATCC GCTCACAATT
1851 CCACACAACA TACGAGCCCG AAGCATAAAG TGTAAGCCTT GGGGTGCCTA
1901 ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCCGCTTTCC

```

1951 AGTCGGGAAA CCTGTCGTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG  
 2001 GGGAGAGGCG GTTTGCGTAT TGGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA  
 2051 CTCGCTGCGC TCGGTCGTTC GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA  
 2101 AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC AGGAAAGAAC  
 2151 ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA AGGCCGCGTT  
 2201 GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC  
 2251 GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG  
 2301 GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTT CGACCCTGCC  
 2351 GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT  
 2401 CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC  
 2451 AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC GCTGCGCCTT  
 2501 ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC  
 2551 CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC  
 2601 GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAAG  
 2651 GACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA  
 2701 GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA CCACCGCTGG TAGCGGTGGT  
 2751 TTTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG GATCTCAAGA  
 2801 AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAAC  
 2851 CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG  
 2901 ATCCTTTTAA ATTAATAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA  
 2951 GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT  
 3001 CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG TTGCCTGACT CCCCCTCGTG  
 3051 TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT  
 3101 GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC  
 3151 AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC  
 3201 TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC  
 3251 AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT  
 3301 CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC CCAACGATCA  
 3351 AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT  
 3401 CGGTCCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCGAGT TTATCACTCA  
 3451 TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA  
 3501 TGCTTTTCTG TGACTGGTGA GACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG  
 3551 TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG  
 3601 CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA ACGTTCTTCG  
 3651 GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA GTTCGATGTA  
 3701 ACCCACTCGT GCACCCAAC TATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG  
 3751 TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAA ATGCCGCAA AAAGGGAATA  
 3801 AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA  
 3851 TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT  
 3901 GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT CGCGCACATT TCCCCGAAAA  
 3951 GTGCCAC

### 3 ERKLÄRUNGEN.

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

Köln, den 29. Januar 2002

*Stefan H. Fuss*

### 4 TEILPUBLIKATIONEN.

**Fuss SH**, Korsching SI (2001) Odorant feature detection: activity mapping of structure response relationships in the zebrafish olfactory bulb. *J Neurosci*, **21**:8396-8407.

Çelik A, **Fuss SH**, Korsching SI (2002) Selective targeting of zebrafish olfactory sensory neurons by the endogeneous OMP promoter, *Eur J Neurosci*, **15**(5):798-806.

5 LEBENS LAUF.

CURRICULUM VITAE

**Stefan Herbert Fuss**  
Universität zu Köln  
Institut für Genetik  
Zülpicher Str. 47  
50674 Köln  
Tel.: ++49 221 470 4844  
Fax: ++49 221 470 5172  
E-mail: [stefan.fuss@uni-koeln.de](mailto:stefan.fuss@uni-koeln.de)

---

**PERSÖNLICHE DATEN**

Geburtsdatum: 10. Januar 1966  
Geburtsort: Düsseldorf  
Eltern: Helga Fuss, geb. Beckmann (22.04.41),  
Herbert Ludwig Fuss (01.07.37 – 22.11.85)  
Familienstand: ledig

**AUSBILDUNG**

Aug. 1997 – Dez. 2001: Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Genetik der Universität zu Köln.  
Feb. 1996 – Feb. 1997: Diplomarbeit am Institut für Zoologie III der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz.  
1992: Vordiplom.  
Apr. 1990 – Feb. 1996: Studium der Biologie an der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz.  
Apr. 1987 – Jun. 1987: Unteroffiziersausbildung an der Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr, München.  
Jan. 1987 – März 1987: Besuch der Krankenpflegeschule des Bundeswehrkrankenhauses Hamm.  
Sep. 1985: Abitur.  
Sep. 1976 – Sep. 1985: Besuch des Städt. Gymnasium an der Rückertstr. Düsseldorf.

**BERUFLICHE TÄTIGKEIT**

Aug. 1997 – jetzt: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik, Universität zu Köln.  
1992 – Jul. 1997: Wissenschaftlicher Mitarbeiter / Hilfskraft, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz.  
Jan. 1986 – Dez. 1989: Soldat auf Zeit, SaZ 04, Deutsche Bundeswehr.

**WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN**

**Fuss S** (1997) Identifizierung und Charakterisierung des serotonergen Neurons CV1 der Weinbergschnecke *Helix pomatia*. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz, unter Anleitung von Prof. Dr. Thomas Teyke.

**Fuss S** (2002) Die Ebenen der neuronalen Informationsverarbeitung im Bulbus olfactorius des Zebrafisches (*Danio rerio*): Aktivitätskartierung strukturabhängiger Repräsentation von Geruchsstoffen und Identifizierung molekulargenetischer Marker der einzelnen Verarbeitungsebenen. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, unter Anleitung von Prof. Dr. Sigrun I. Korsching.

---

## PUBLIKATIONEN

**Fuss SH**, Korsching SI (2001) Odorant feature detection: activity mapping of structure response relationships in the zebrafish olfactory bulb. *J Neurosci*, **21**:8396-8407.

Çelik A, **Fuss SH**, Korsching SI (2002) Selective targeting of zebrafish olfactory sensory neurons using an endogenous olfactory marker protein promoter, *Eur J Neurosci*, **15**(5):798-806.

Fried HU, **Fuss SH**, Korsching SI (2002) Selective imaging of presynaptic activity in the mouse olfactory bulb shows concentration- and structure dependence of odor responses in identified glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(5):3222-3227.

## KONGRESSBEITRÄGE

**Fuss SH**, Celik A, Korsching SI (2001) Levels of odorant information processing in the zebrafish olfactory bulb.

Proceedings of the 4<sup>th</sup> Meeting of the German Neuroscience Society 2001; Volume II, 28<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference, edited by Norbert Elsner and Georg W. Kreutzberg, Thieme Verlag, 474.

**Fuss SH**, Celik A, Korsching SI (2000) Cell type-specific genetic markers in the zebrafish olfactory system. *Europ J Neurosci*, Volume 12, Supplement 11: 223.07.

**Fuss SH**, Korsching SI (1999) Activity mapping of structure response relationships in the zebrafish olfactory bulb.

Proceedings of the 1<sup>st</sup> Göttingen Conference of the German Neuroscience Society 1999; Volume II, 27<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference, edited by Norbert Elsner and Ulf Eysel, Thieme Verlag, 374.

Korsching SI, Argo S, Berger S, Celik A, **Fuss SH** (1999) How are spatial features of olfactory receptor neuron wiring and odorant receptor gene expression established during development?

Proceedings of the 1<sup>st</sup> Göttingen Conference of the German Neuroscience Society 1999; Volume II, 27<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference, edited by Norbert Elsner and Ulf Eysel, Thieme Verlag, 374.

Korsching SI, Friedrich RW, **Fuss SH**, Weth F (1998) Spatial representations of physiological and not so physiological odors in the zebrafish olfactory bulb.

XIII ECRO congress, Siena, Italy.

**Fuss S**, Ozolina L, Peschel M, Teyke T (1997) Serotonergic modulation of the tentacle musculature in *Helix* – cellular origin, biochemical mechanisms and functional aspects.

Symposiumsbeitrag zu den Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Mainz, editiert von D. Zissler, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p. 6.

**Fuss S**, Teyke T (1996) Serotonergic neuron CV1 is implicated in modulation of tentacle muscle contractions in the snail, *Helix pomatia*.

Proceedings of the 24<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference, Volume II, edited by Norbert Elsner and Hans-Ulrich Schnitzler, Thieme Verlag.