
**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

I. ZUSAMMENFASSUNGEN	1
1 ABSTRACT.	1
2 ZUSAMMENFASSUNG.	2
II. EINLEITUNG	5
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 Zebraäbbling 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
III. MATERIAL UND METHODEN	31
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 Differenzindex.</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

3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	47
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-τ-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_{1,3}-CaM.</i>	67
<i>prOMP_{1,3}-CaMG.</i>	67
<i>prOMP_{1,3}-I.</i>	67
<i>prOMP_{1,3}-F.</i>	67
<i>prOMP_{1,3}-R.</i>	67
3.2.23 Sequenzvergleiche.....	68
3.3 Histologische Arbeitsmethoden.....	68
3.3.1 Immunhistochemie an Zebraärbling Embryonen.....	68
3.3.2 <i>In situ</i> -Hybridisierung an Totalpräparaten des Zebraärbling Gehirns.....	69
3.3.3 Vibratomschnitte.....	69
3.4 Herstellung transient transgener Fische.....	70
3.5 Bildaufnahme und Dokumentation.....	70

IV. ERGEBNISSE	73
1 AKTIVITÄTSKARTIERUNG STRUKTURABHÄNGIGER REPRÄSENTATION VON GERUCHSSTOFFEN.	73
1.1 Generelle Eigenschaften geruchstoffstimulierter Antwortmuster.	74
1.2 Die L-α-Aminosäurekonfiguration als bindendes Strukturmotiv.	76
1.2.1 Die Bedeutung der α -Aminogruppe	77
1.2.2 Die Bedeutung der α -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
1.3 Die Bedeutung der Seitenkette.	83
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 β-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
1.4 Die Topographie der Geruchsstoffrepräsentation verschiedener Arten ist konserviert.	101
1.5 Darstellung der Mitralzellen und Versuch einer Messung.	102
2 IDENTIFIZIERUNG MOLEKULARGENETISCHER MARKER DER UNTERSCHIEDLICHEN VERARBEITUNGSEBENEN.	107
2.1 Riechsinneszellen: das olfaktorische Marker Protein (OMP).	108
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
2.2 Körnerzellen: das <i>dlx2</i> Gen	125
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
2.3 Mitralzellen: das <i>ztr1</i> Gen.	130
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
2.4 Zusammenfassende Beurteilung.	137
3. DIE ANWENDUNG MOLEKULARGENETISCHER CALCIUMINDIKATOREN IM OLFAKTORISCHEN SYSTEM DES ZEBRAFISCHLINGS.	139
3.1 Geruchsstoffinduzierte Aktivität in den Riechsinneszellen und im olfaktorischen Bulbus embryonaler Zebrafischlinge.	139
3.2 <i>CaMeleon</i>.	142
3.3 <i>CaMgaroo</i>.	142
3.4 <i>pericam</i>.	143
3.4.1 <i>flash-pericam</i>	143
3.4.2 <i>invers-pericam</i>	144
3.5 Zusammenfassende Beurteilung der molekulargenetischen Calciumindikatoren.	145

V. DISKUSSION	147
1 PHYSIOLOGIE DER GERUCHSANTWORTEN.	148
1.1 Glomeruli und Rezeptoren – die Interpretierbarkeit glomerulärer Signale.	148
1.2 Aminosäure-Geruchsrezeptoren werden nur durch Aminosäuren erregt.	150
1.3 Die Struktur der Seitenkette bestimmt das Repertoire der aktivierten Rezeptoren.	152
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 Zebrafischblings.	156
1.4 Kombinatorische Kodierung durch aktive Glomeruli.	158
1.5 Die laterale Kette und der akzessorische olfaktorische Bulbus.	159
1.6 Unterscheidungsvermögen und Konzentrationskodierung.	161
1.6.1 Unterscheidungsvermögen.	161
1.6.2 Konzentrationskodierung – ein Problem.	163
1.7 Geruchsverarbeitung nach den Riechsinneszellen.	165
1.7.1 Kontrastverstärkung.	165
1.7.2 Zeitliche Synchronisation.	166
1.8 Geruchsverarbeitung nach dem olfaktorischen Bulbus.	168
2 SEPARATION DES NEURONALEN NETZWERKES IM <i>BULBUS OLFACTORIUS</i>	
DURCH MOLEKULARGENETISCHE MARKER.	169
2.1 Riechsinneszellen und <i>zOMP</i>.	169
2.2 Körnerzellen und <i>dlx2</i>.	173
2.3 Mitralzellen und <i>ztbr1</i>.	173
2.4 Zusammenfassende Beurteilung.	175
3 DIE ANWENDBARKEIT PROTEINBASIERTER CALCIUMSENSOREN	
IM GERUCHSSYSTEM DES ZEBRAFISCHBLINGS.	176
3.1 Calcium und Riechsinneszellen.	177
3.2 Methodische Erwägungen.	178
4 SCHLUSSBEMERKUNGEN.	179
VI. LITERATUR	181
VII. ANHANG	197
1 SEQUENZVERGLEICHE.	197
1.1 <i>OMP</i>.	197
1.2 <i>ztbr</i>.	198
2 DER BASISEXPRESSIONSVEKTOR: pACSF-Y.	204
2.1 Übersicht.	204
2.1 Nukleotidsequenz.	205
3 ERKLÄRUNGEN.	207
4 TEILPUBLIKATIONEN.	207
5 LEBENS LAUF.	208

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- α -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*_{1,3}-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 *zibr1* mit weiteren Mitgliedern der T-box Genfamilie. 132

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

Abb. 37– Mögliche Intron-Exon Spliceepunkte des *zibr1* Gens. 134

Abb. 38– *zibr1* 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 α -amino as well as the α -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 β -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 α -Aminogruppe als auch die α -Carboxylgruppe der Aminosäuren notwendige Strukturmodule 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 β -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.

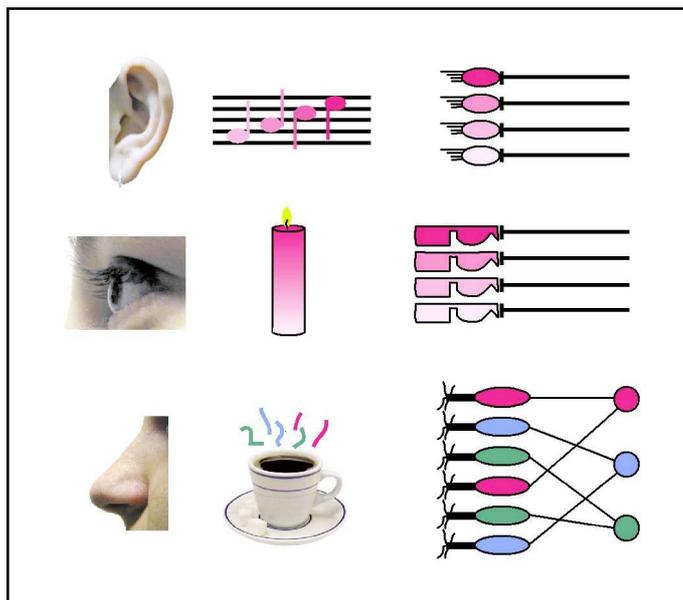
Die hohe Komplexität dieser Phänomene ist eine interessante Herausforderung an die wissenschaftliche Forschung. Prinzipien der Erkennung und Analyse von Geruchsstoffen sowie die Informationsweiterleitung und Gestaltbildung im olfaktorischen System sind bisher nur ansatzweise und für die initialen Prozesse 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 ≈ 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, ≈ 1.000 für die Ratte (Buck und Axel, 1991), 600 für die Maus (Qasba und Reed, 1998), 400 für Hunde (Parmentier et al., 1992), ≈ 100 für Fische (Ngai et al., 1993; Barth et al., 1996; Weth et al., 1996; Korsching et al., 1997), ≈ 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 ≈ 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 Einzeleregungen 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 2.9×10^{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 Einzelzelleableitungen 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 (Lyril) 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 Geruchsstoffes 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 α -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.

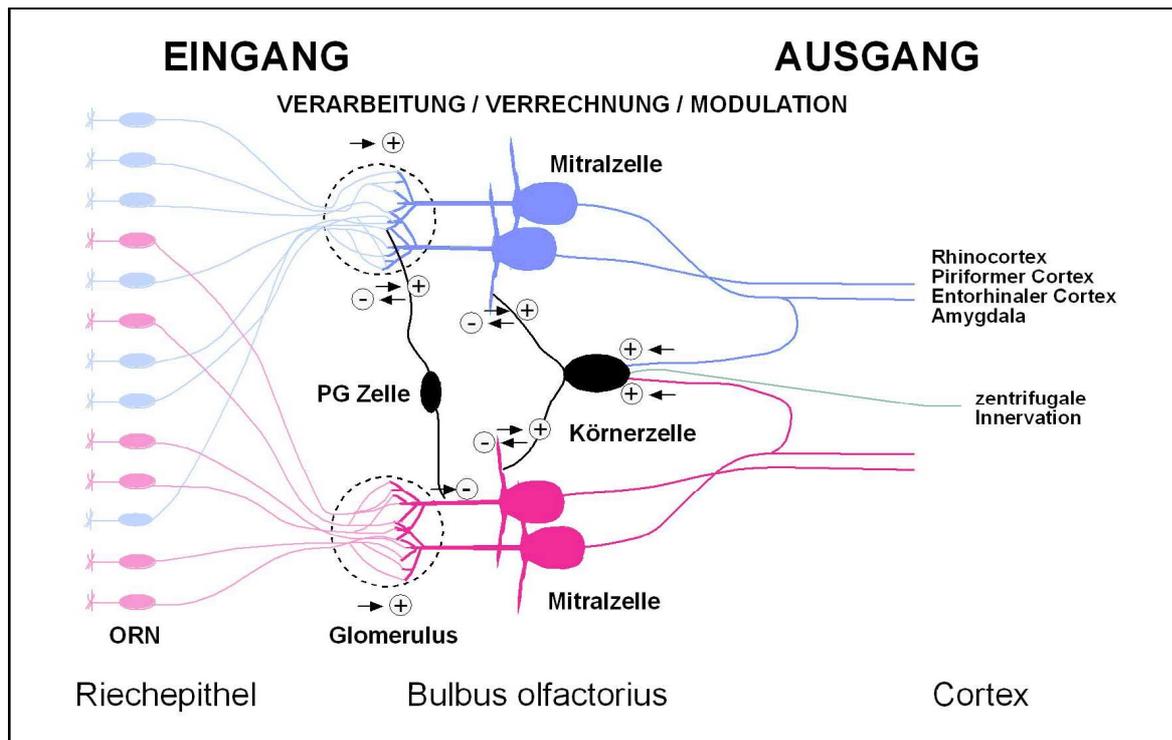


Abb. 2 – Die Architektur der synaptische Verschaltung im *Bulbus olfactorius* der Säuger.

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 Reportergen 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 Rezeptorgenen (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 Zebrabärbling (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_A-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 α ,20 β -diol-3-one (17,20 β P) und Prostaglandin F2 α (PGF2 α) bekannt (Sorensen und Stacey, 1999). Der Spiegel an 17,20 β 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 α wird vom Weibchen während der Folikelfreisetzung abgegeben und wirkt als postovulatorisches Pheromon. Es synchronisiert die sexuelle Erregung der Geschlechtspartner und löst das Abbläuen 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 (Zebraabärbling, 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 cilierter 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 (α -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 β P und PGF2 α 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 ≈ 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 GreenTM-1 verwendet, der in früheren Arbeiten bereits erfolgreich im Geruchssystem des Zebraärbhlings 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 Zebraärbhlings 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 Zebrafisch 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 Zebrafisch 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 Zebrafisch 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)

MATERIAL UND METHODEN

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, www.adobe.com) Freehand 9 (Macromedia, www.macromedia.com) ScionImage (Scion, Public Domain, www.scion.com) Excel, versch. Versionen (Microsoft, www.microsoft.com) Word, versch. Versionen (Microsoft) NIH Image (NIH, Public Domain, www.nih.gov) 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, www.apple.com) 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 Fotokamera (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 NaHCO₃, 2 mM KCl, 1.25 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 10 mM Glukose, ständige Begasung mit Carbogen (95% O₂/5% CO₂), 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**).

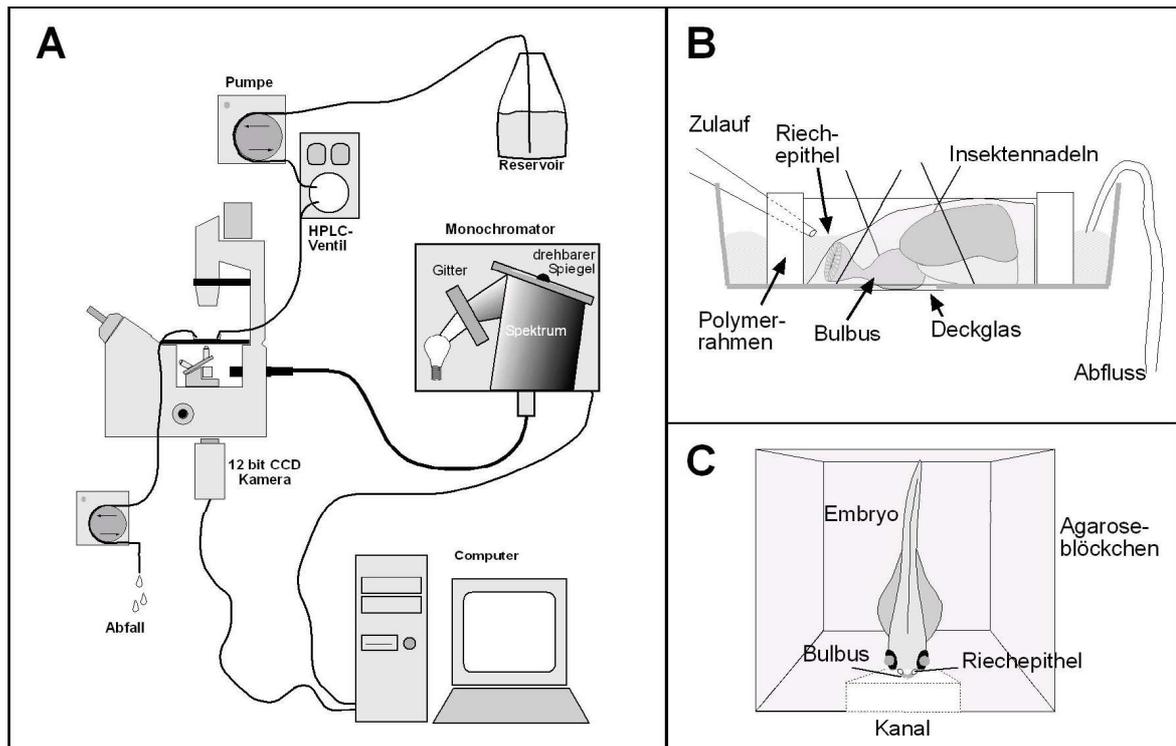


Abb. 3 – Messung neuronaler Aktivität im olfaktorischen System adulter und embryonaler Zebrafärblinge.

- 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 χ^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**).

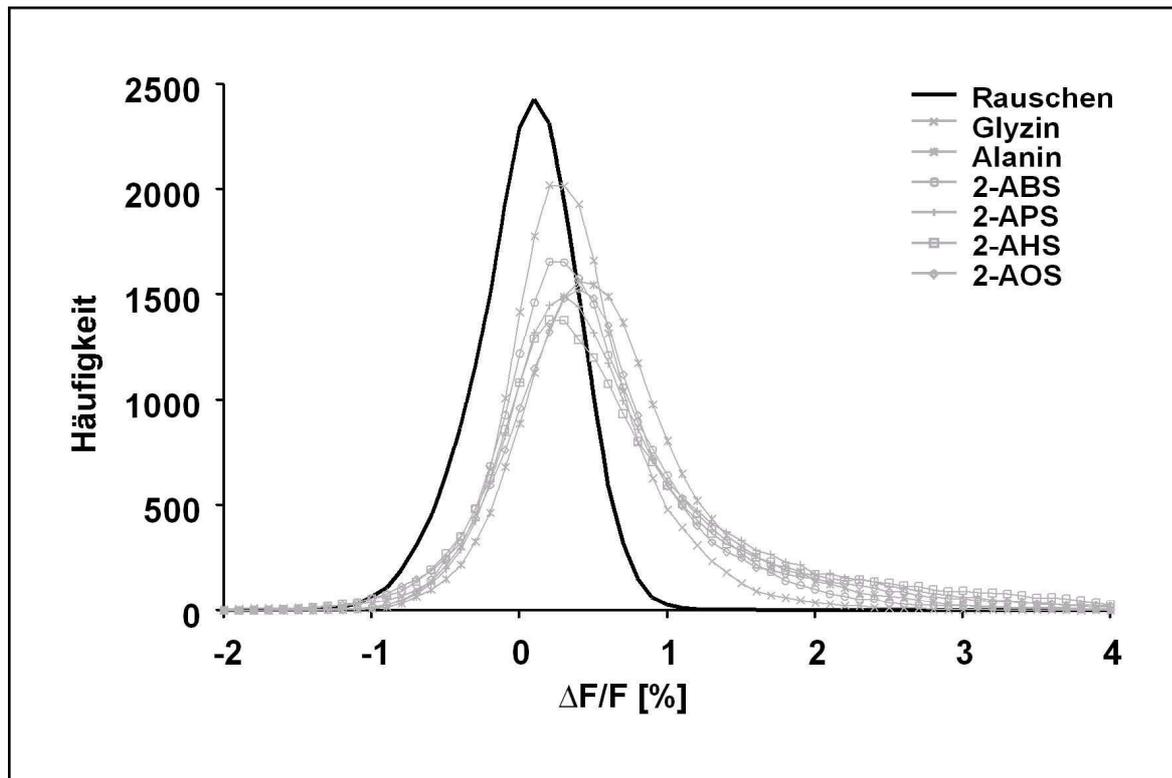


Abb. 4 – Bestimmung des Schwellenkriteriums zur Quantifizierung der Antwortfläche

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 (σ). 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).

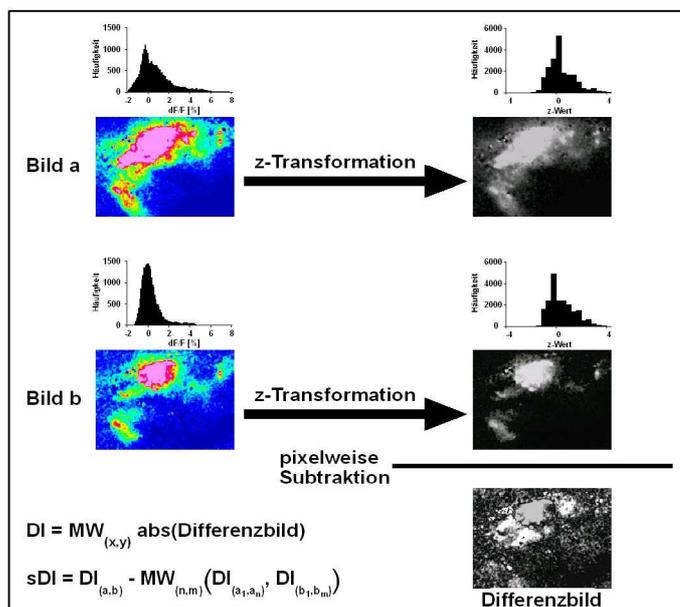


Abb. 5 – Berechnung des Differenzindex DI zur Quantifizierung von Musterunterschieden.

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:

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

(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°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, Crazy 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 H₂O) 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% NiCl₂, 0.1% CoCl₂ durch Zugabe von 0.03% H₂O₂ 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 (Zebraabräbling), 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_{1,3}-CaMG, prOMP_{1,3}-CaME, prOMP_{1,3}-I, prOMP_{1,3}-F und prOMP_{1,3}-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 NH₄Cl 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_{1,3}-CaME: 450 nm, prOMP_{1,3}-I: 475 nm, prOMP_{1,3}-F: 470 nm, prOMP_{1,3}-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:

Bezeichnung	Sequenz, 5' -> 3'	Tm [°C]	Anwendung
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	CGGATAACAATTTACACAG	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°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 einkloniert, Insertgröße: 40 kb, durch RZPD (Berlin) zur Verfügung gestellt.
- BUSMP706N2039Q4: genomischer PAC-Klon, enthält den *dlx2* und *dlx1* Genlokus, in pCYPAC6 einkloniert, Insertgröße: 120 kb, Kanamycinresistenz, durch RZPD (Berlin) zur Verfügung gestellt.
- BUSMP706H02207Q2: genomischer PAC-Klon, hybridisiert mit *ztbr1*, in pCYPAC6 einkloniert, Insertgröße: 120 kb, Kanamycinresistenz, durch RZPD (Berlin) zur Verfügung gestellt.
- BUSMP706O09174Q2: genomischer PAC-Klon, hybridisiert mit *ztbr1* (alternativer Klon zu BUSMP706H02207Q2), in pCYPAC6 einkloniert, Insertgröße: 120 kb, Kanamycinresistenz, durch RZPD (Berlin) zur Verfügung gestellt.
- BUSNP706N08248Q2: genomischer PAC-Klon, hybridisiert mit *ztbr1*, in pCYPAC6 einkloniert, Insertgröße: 120 kb, Kanamycinresistenz, durch RZPD (Berlin) zur Verfügung gestellt.
- BUSMP706L15147Q2: genomischer PAC-Klon, falsch positiver Klon in pCYPAC6 einkloniert, 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^S, Str^S, Rif^S, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecQA⁺, Uvr⁺, Lon⁺ (Qiagen).

3.2.6 Antikörper.

α -ZNS2, polyklonales Maus IgG1 κ (M. Westerfield, Eugene, OR, USA), 1:500.

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

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

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

α -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) einkloniert.
- 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) einkloniert.
- 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) einkloniert wurde.

Genomische Bibliotheken.

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

Verwendet wurde:

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

Umfang von 3 Genomäquivalenten. Dauerkultur in DH10 β (Gibco BRL), Kanamycinresistenz.

Hybridisierungen der genomischen Bibliotheksfilter wurden mit [α -³²P]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/ μ 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 μ 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, MgCl₂: 1.25 mM final, H₂O ad 20 µl. Standardreaktionsbedingungen waren: 2 min 94°C; 30x : 30 s 94°C, 30 s T_{ann}, 1 min + 3 s / Zyklus 72°C; 7 min Elongation bei 72°C. T_{ann} wurde 2°C unter der niedrigsten Primerschmelztemperatur T_m 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 H₂O 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_{Antibiotikum}-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_{tet}-Flüssigkultur aus einer Individualkolonie angezogen und 1 ml zum Animpfen eines 1 l Kulturansatzes verwendet. Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ 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 H₂O, 1 x in 500 ml H₂O, 1 x in 20 ml 10% Glycerin (in H₂O) 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 10⁷ und 10⁹ 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_{Antibiotikum}-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 CaCl₂ resuspendiert und 5 min auf Eis gelagert, erneut zentrifugiert, in 2 ml 80 mM CaCl₂/15% 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 10⁵ bis 10⁷ 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_{Antibiotikum}-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_{Antibiotikum}-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⁺ (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 pdN₆ (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 gelelektrophoretische 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_{amp/tet} 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 Übernachtskulturplatten wurde ausgezählt und die ideale

Verdünnung berechnet. Für den Transformationsansatz 1:100 wurde ein Titer von 6.000 Kolonien/ μ l ermittelt und entsprechend 10 μ l des Ansatzes/„Master-Filter“ eingesetzt. 120 μ 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_{amp/tet}-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_{amp/tet}, 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 μ l Plasmid DNA wurde transformiert und jeweils 40 μ 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 [α -³²P]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 mm² 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 MgCl₂, 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 α -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 μ l NBT-Lösung und 3.5 μ 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 β -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- τ -Y.

pACSF- τ -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 umkloniert. 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-OMPkpn1 und AB-OMPkpn2 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 H₂O, 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_{1.3}-CaM.

Der Vektor prOMP_{1.3}-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_{1.3}-Y wurde ebenfalls mit *Nco* I und *Not* I Restriktionsenzymen geschnitten, der prOMP_{1.3} 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_{1.3}-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_{1.3} Vektorrahmen ligiert. Der Klonierungserfolg wurde durch Sequenzieren über die Klonierungsschnittstellen und durch analytischen Verdau mit *Sph* I und *Nco* I verifiziert.

prOMP_{1.3}-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_{1.3} 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_{1.3}-F.

Enthält das "flash pericam" unter *zOMP*-Promotorkontrolle. Die Klonierung erfolgte wie bei prOMP_{1.3}-I, jedoch durch Verdau des Vektors YP3.1HH1-1.

prOMP_{1.3}-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_{1.3} (*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 oder 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 benutzt. Promotormotive wurden mit dem Public Domain Programm MatInspector (www.gsf.de) und unter den Internetadressen www.fruitfly.org und 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 α -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 H₂O gespült (5 min) und für 7 min bei -20°C in Aceton permeabilisiert. Im Anschluss wurde erneut mit H₂O gewaschen, einmal mit PBSDT (1% DMSO in PBST) äquilibriert und für mindestens 100 min in PBSDT, 10% Ziegennormalserum blockiert. Mit Primärantikörper (1:1000, α -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, α -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 MgCl₂ 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 Vibratomechnitte.

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-gen-exprimierenden 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 µm 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 Aminosäureerkennung 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.

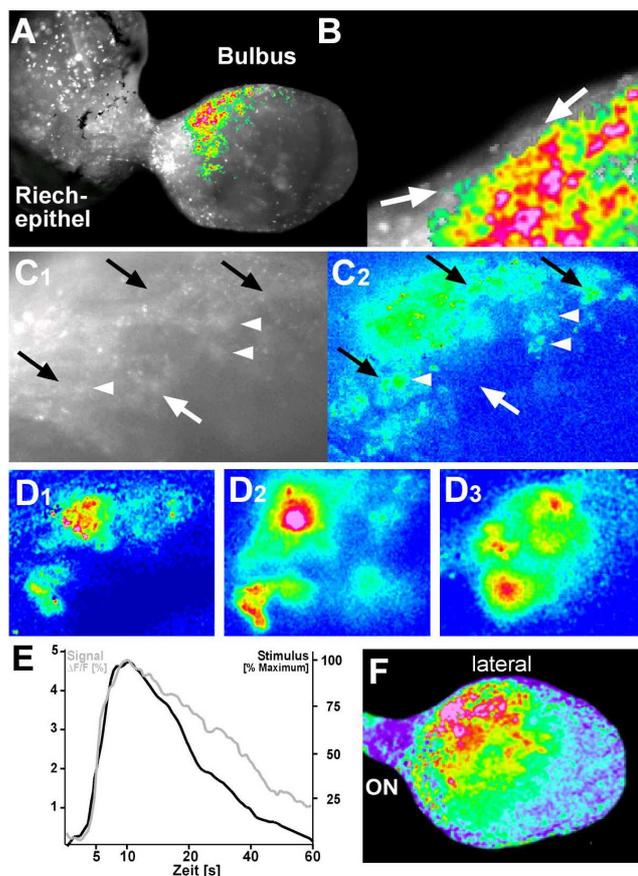
Die Stimulation des Riechepithels mit allen untersuchten L- α -Aminosäuren (**Tabelle 1**) führte zu messbaren Veränderungen des Calciumniveaus im olfaktorischen Bulbus. Fluoreszenzänderungen wurden ausschließlich innerhalb der glomerulären Schicht, nicht jedoch in der olfaktorischen Nervenschicht beobachtet (**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 μm 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 GreenTM-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 GreenTM-1 Färbung und Signalausbreitung im *Bulbus olfactorius* (ventrale Ansicht). Links ist das gefärbte Riechepithel, rechts der Bulbus dargestellt. Aminosäuresignale (Alanin, 10⁻² 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, 10⁻⁴ 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, 10⁻⁴ 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 (10⁻⁵ 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 IP₃-Signaltransduktionsweges an den Geruchsantworten gezeigt worden (zusammengefasst und diskutiert in Schild und Restrepo, 1998), die hier grob charakterisiert wurden. Forskolin (10⁻⁵ 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 (10⁻⁴ M), besaß keine stimulierende Wirkung auf das Geruchssystem des Zebrafisches (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- α -Aminosäurekonfiguration als bindendes Strukturmotiv.

Aminosäuren können chemisch durch ein chirales Zentrum, das α -Kohlenstoffatom, beschrieben werden, welches asymmetrisch von einem α -Wasserstoffatom, einer α -Aminogruppe, einer α -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 α -Wasserstoffs wurden die Bindungen des α -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			n-NH ₂	Amine	Diamin	Aminoalkohol	Carbonsäuren
		β -OH	β -NH ₂	γ -NH ₂						
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 Struktur-analoga 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 α -Aminogruppe.

Carbonsäuren unterscheiden sich chemisch von den Aminosäuren durch das Fehlen der α -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 ± 0.02 (MW \pm SEM, Kettenlänge = 2), 0.004 ± 0.001 (3), 0.1 ± 0.009 (4), 0.007 ± 0.007 (5), 0.005 ± 0.002 (6), 0.001 ± 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.

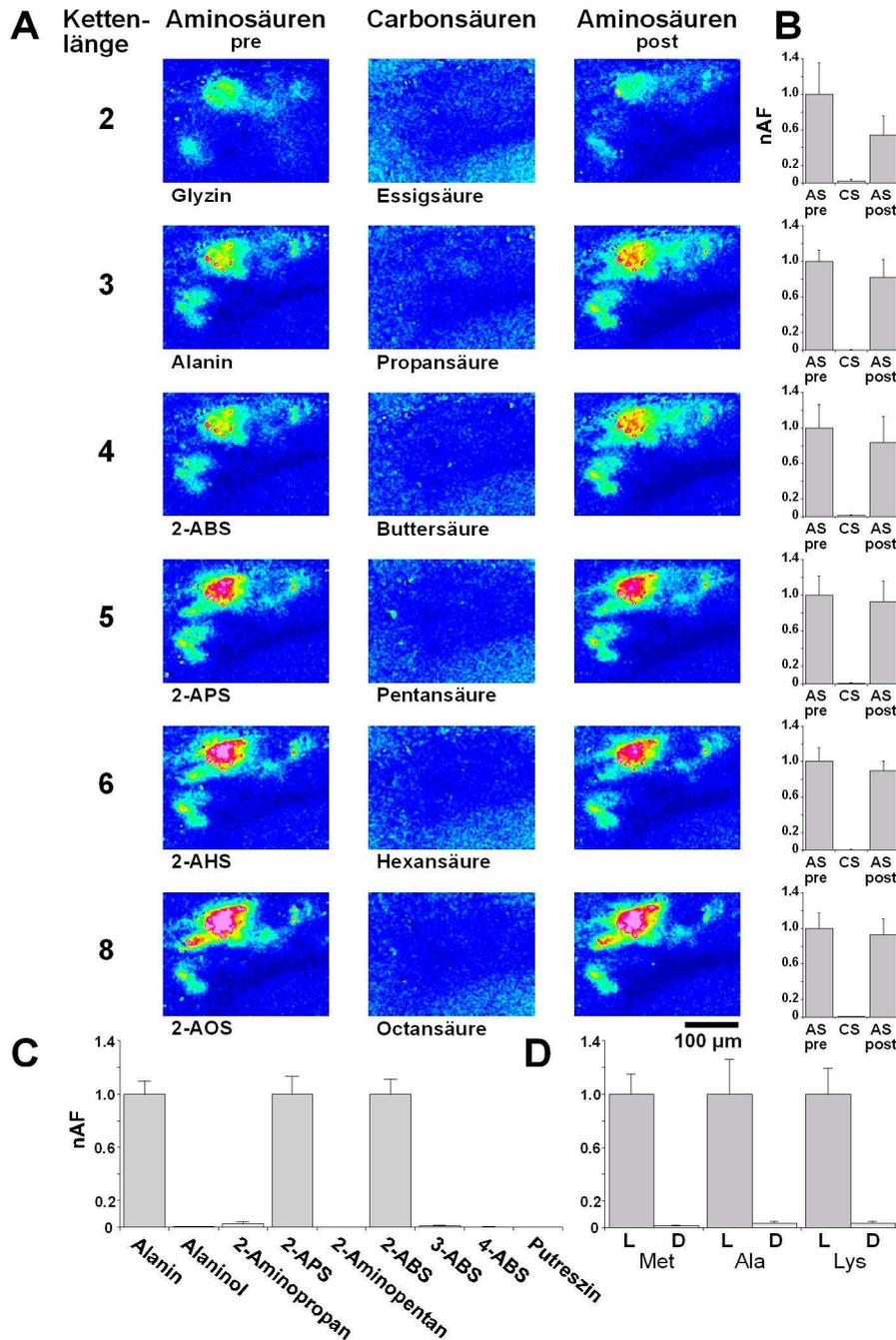


Abb. 7 – Die Bedeutung der L- α -Aminosäurekonfiguration als aktivierendes Strukturmerkmal.

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 ± 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 ± 0.02 (MW \pm SEM).

Die α -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 α -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 β - und γ -Kohlenstoffatom verschoben wurde, ergab, dass die exakte Position der Aminogruppe am α -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 ± 0.01 , Pixel: 0.17%, DI, 1.21) und 4-Aminobuttersäure (nAF: 0.004 ± 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 α -Kohlenstoffatom der Liganden zwingend notwendig.

1.2.2 Die Bedeutung der α -Carboxylgruppe.

Durch einen Vergleich der Aminosäuren Alanin und 2-Aminopentansäure mit ihren analogen Aminoalkanen wurde die Bedeutung der α -Carboxylgruppe in ähnlicher Weise untersucht (**Abb. 7C**). Sowohl 2-Aminopropan ($n = 7$; nAF: 0.02 ± 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 ± 0.002 , Pixel: 0.93%, DI: 1.2).

Jede der untersuchten strukturellen Veränderungen der α -Carboxylgruppe eines Aminosäuremoleküls führte zu einem vollständigen Verlust der stimulatorischen Wirksamkeit. Dadurch wird nahegelegt, dass die α -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 α -Amino- und die α -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 α -Amino- und α -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 α -Kohlenstoffatom mit α -Amino- und α -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 α -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, β -, γ - 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.

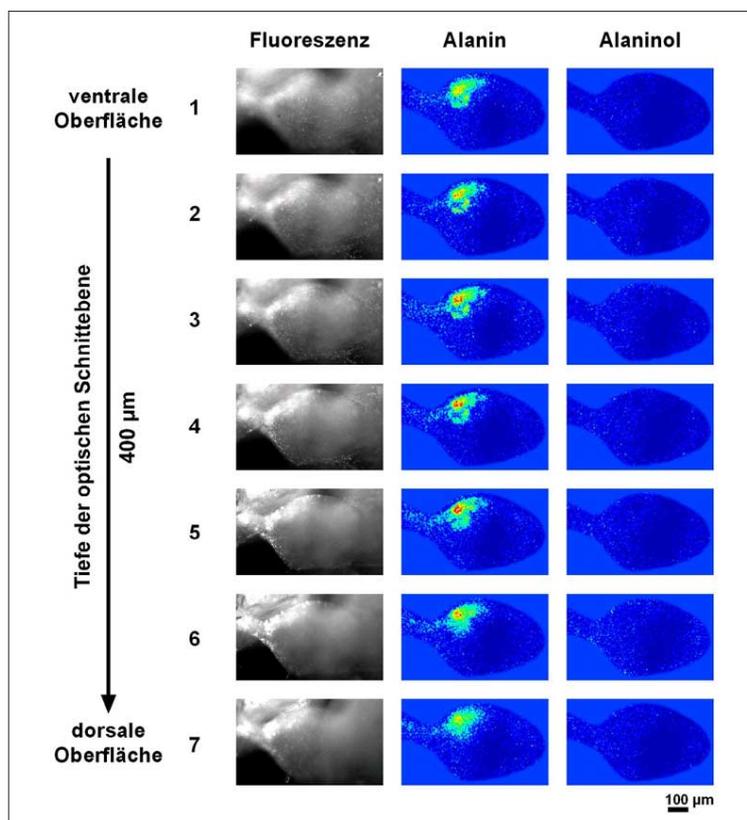


Abb. 8 – Alaninol erregt auch außerhalb der Aminosäureregion keine Signale.

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 GreenTM-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- α -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).

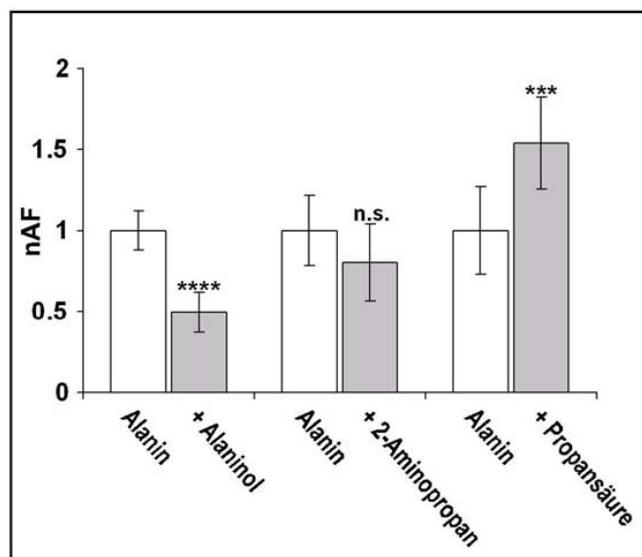


Abb. 9 – Inaktive Derivate können die Signale der Aminosäuren beeinflussen.

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 ± 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.

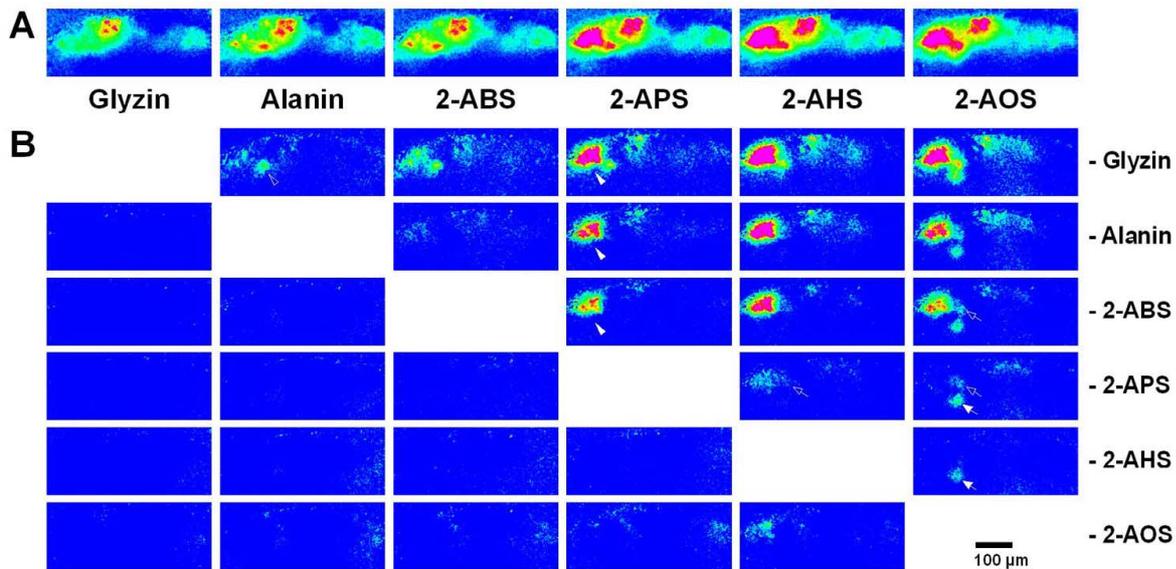


Abb. 10 – Der Einfluss der Kettenlänge auf die Aktivitätsmuster aliphatischer unverzweigter neutraler Aminosäuren – Subtraktionsanalyse.

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.

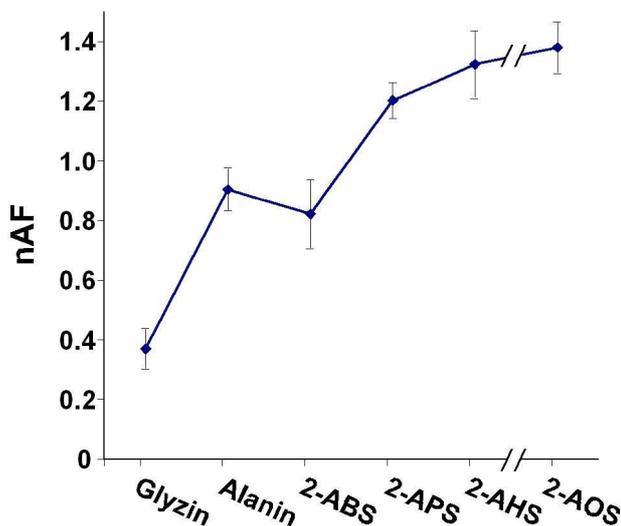


Abb. 11 – Die Antwortfläche als Funktion der Kettenlänge neutraler Aminosäuren.

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.

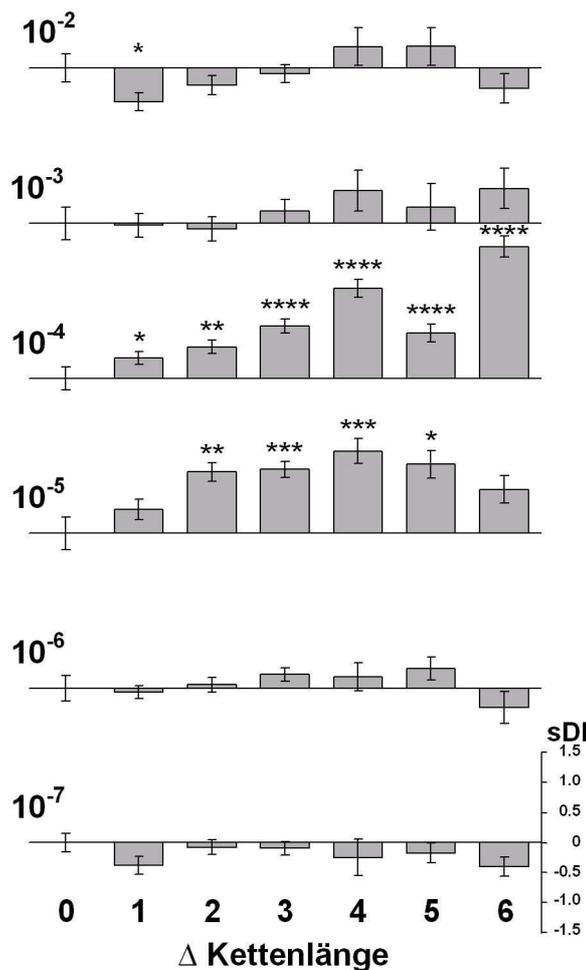


Abb. 12 – Quantitative Analyse der Musterunterschiede unverzweigter neutraler Aminosäuren als Funktion des Kettenlängenabstandes und der Konzentration.

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 Kettenlängenunterschiede ist von der Konzentration der Stimuli abhängig. Bei mittleren Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} M treten besonders starke Musterunterschiede auch für kleine Kettenlängendifferenzen auf. Mit wachsender Kettenlängendifferenz steigen auch die sDI-Werte bei diesen Konzentrationen an. Die Sternchen indizieren das jeweilige Signifikanzniveau für den Vergleich der Musterunterschiede eines bestimmten Kettenlängenabstandes mit dem sDI-Wert für Stimuluswiederholungen ($\Delta_{\text{Kettenlänge}} = 0$; 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.

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 (± 2 Methylgruppen Kettenlängenunterschied) und Konzentrationen (± 100 -facher Konzentrationsunterschied) verglichen und die erhaltenen sDI-Werte in eine Umfeldmatrix

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 Zebraärblings 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 Zebraärbling 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.

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

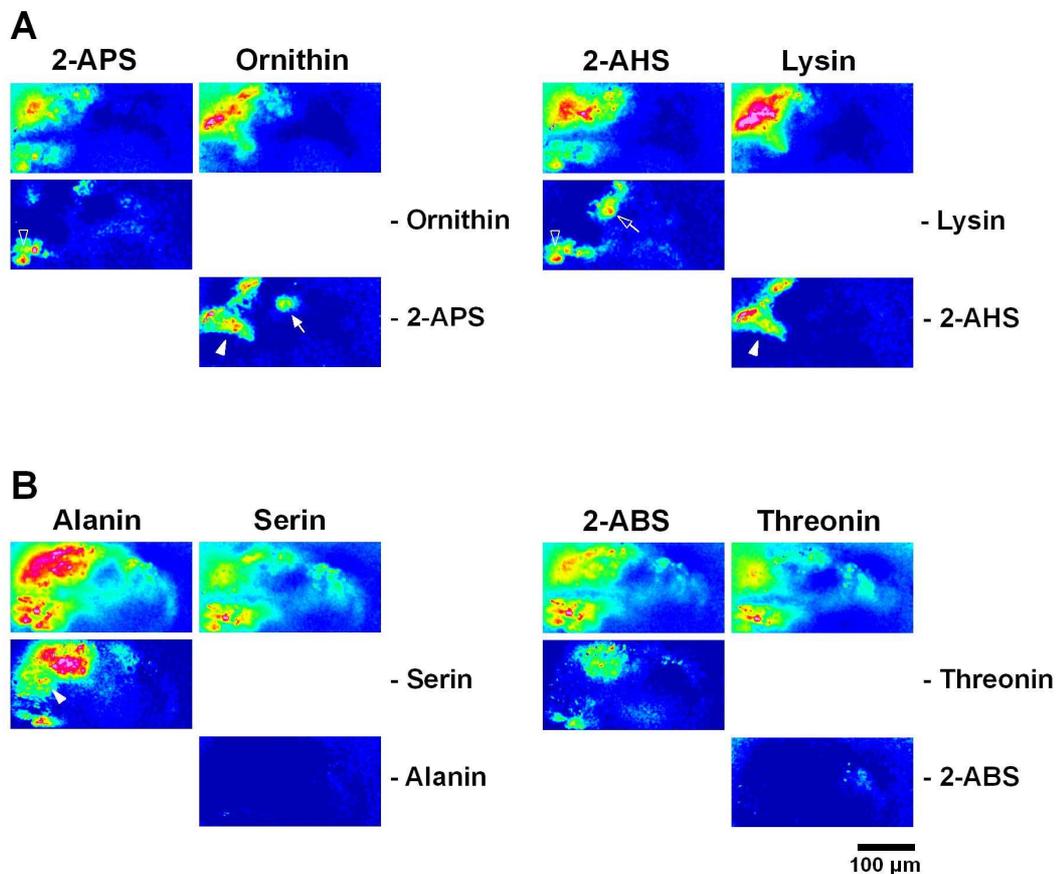


Abb. 15 – Der Einfluss funktioneller Gruppen innerhalb der Seitenkette der Aminosäuren.

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

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 β -Hydroxylgruppe in der Molekülstruktur verhindert die Bindung an einige der Geruchsrezeptoren, die durch neutrale Aminosäuren erregt werden können.

Der Einfluss einer Hydroxylgruppe in β -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.

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. Erinnerung 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).

Die glomeruläre Architektur des olfaktorischen Bulbus ist beim Goldfisch ähnlich gegliedert, wie beim Zebraärbling (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 Zebraärbling 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 Zebraärbling, 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 Zebraärblings. 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 GreenTM-1 dextran war nicht sehr effektiv. Darüber hinaus erscheint das Gewebe des Goldfischbulbus dichter als das des Zebraärblings, 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 Zebraärbling 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

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 Reportergenen in den Riechsinneszellen. Das *OMP* Gen und eine entsprechende regulatorische Sequenz sollten für den Zebrafisch 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 GehirncDNA 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_m) zeigten in Datenbanksuchen (NCBI Blast, 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 [α -³²P]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

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.,

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/ μ l, Negativkontrolle, n = 248 Embryonen), konnte keine Reporterexpression induziert werden. In hohen Dosen (100 ng/ μ l) 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_{1,3}-Y in keinem Fall Muskelzellen fluoreszent markiert.

2.1.8 Variationen des Expressionsvektors

Zusätzlich zu dem Expressionskonstrukt prOMP_{1,3}-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_{1,3}- 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_{1,3}- τ -Y Expressionkonstruktes ergab gegenüber dem prOMP_{1,3}-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_{1,3}-DsRed eine geringere Effizienz als das vergleichbare prOMP_{1,3}-Y Konstrukt. Die Lokalisation und die Intensität der Markierung waren vergleichbar, jedoch wurde ein wesentlich geringerer Prozentsatz von Embryonen durch das prOMP_{1,3}-DsRed Expressionskonstrukt transgen markiert. Im Vergleich zu der Penetranz des prOMP_{1,3}-Y Konstruktes, die bis zu 50% betrug, konnten maximal 30% der injizierten Embryonen mit dem prOMP_{1,3}-DsRed markiert werden. Die Unterschiede zwischen den

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.

3.2 *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*_{1,3}-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 $R_{\text{YFP/CFP}}$ 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*_{1,3}-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 Zebrabärblings 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).

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 Antworteigenschaften glomerulärer Module könnten von

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 Glomerulstrukturen 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 Zebrafärbling, das *zOMP*, kloniert werden. Die Expression des *zOMP* Gens ist auch für den Zebrafärbling 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 Geruchsrezeptorsonden, 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 Zebrafärbling 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*-

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 Zebrafischs 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_{9,5}-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 (β -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_{9,5}-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_{9,5}-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 Zebrabärblings 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 Zebrabärblings 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 Zebrabärblings (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 Zebrabärblings 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 Zebrabärblings, sowie in Teilen des Diencephalons legen eine konservierte Funktion dieses Gens in der Regulation der Hirnentwicklung (Hevner et al., 2001) beim Zebrabärbling 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 Umfanges 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 Zebrafärbliug nicht so hoch organisiert wie bei den Säugetieren (Byrd und Brunjes, 1995). Die *ztbr1*-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 Zebrafärbliugs wurde auch durch elektronen- und lichtmikroskopische Studien sowie durch Antikörperfärbungen gegen Neurotransmitter untersucht und in übereinstimmenden Bulbusseichten gefunden (Byrd und Brunjes, 1995; W. Michel, α -Aspartat Immunhistochemie, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Somata dieser Zellen besitzen, im Gegensatz zu ihrer charakteristischen Mitralform bei den Säugern, beim Zebrafärbliug 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 Zebrafärbliugs 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 Zebrafärbliugs, 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 *ztbr1* 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 *ztbr1* muss zunächst noch ein positiver genomischer Klon identifiziert und dann das entsprechende 5'-Ende des Gens im Genom des Zebrafärbliugs gefunden werden. Methodische Probleme bereiten hier vor allem die komplexe genomische Organisation dieses Gens sowie die vermutlich auch im Zebrafärbliug 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 Zebrafisch 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 Zebrafisch darstellen. Das *CaMeleon* wurde erfolgreich in HeLa Kulturzellen angewendet, die mit Calciumtransienten von 2 - 3 μM 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 Zebrafisch, 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 Zebrafischlinien, 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 α -GFP-Antikörper in den Riechsinneszellen plasmidinjizierter Embryonen nachgewiesen werden konnte. Der Kd-Wert des *CaMgaroo*s liegt mit 7 μM 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 α -GFP-Immunhistochemie ebenfalls ausgeschlossen werden.

Durch das *invers-pericam* war es allerdings möglich, Calciumänderungen in den Riechsinneszellen des Zebrafärbings 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 Zebrafärbings, 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 Zebrafärbing 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 μ 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 *ratiometric-pericam* und $0.2 \mu\text{M}$ für das erfolgreich angewendete *invers-pericam*, werden zunehmend K_d -Werte erreicht, die dem herkömmlichen Farbstoff Calcium greenTM-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 Calciumindikatoren 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 verlangsamer 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.*

- Korsching S (1995) Molekulare Grundlagen der Kodierung im Geruchssinn des Zebraquarblings. *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.

LITERATUR

- 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 Zebrafisch, *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, Hinkley PM (2000) Rapid turnover of calcium in the endoplasmic reticulum during signaling. Studies with cameleon 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 Zebraquarienfisch. 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	TRQLLEPTGL	FWRSADDEN.	..IQCYEADA	QEFGERIAEL
medOMP1	TRQLLEPIGT	FWRNAEDPEE	SPLKCLEADM	QEFGERIAEL
medOMP2	TRQLLEPAGV	FWRGRADAAD	TLAHCYEADA	VEFGERIAEL
musOMP	TRQLLDPAAI	FWRKEDSDA.	..MDWNEADA	LEFGERLSDL
ratOMP	TRQLLDPAAI	FWRKEDSDA.	..MDWNEADA	LEFGERLSDL
humOMP	TRQLLDPTAI	FWRKEDSDA.	..IDWNEADA	LEFGERLSDL
xlOMP1	TRQLLEPSAV	FYKKDANDE.	..VECNEADA	QEFGERIAEL
xlOMP2	TRQLLEPSAV	FYKKDAKDK.	..VECNEADA	QEFGERIAEL

Vergleich der vollständigen abgeleiteten Proteinsequenzen der OMP Gene von Mensch, Maus, Krallenfrosch und Zebraquarienfisch. Grundlage der **Abb. 24B**.

	1				50
musOMP	MAEDGPQKQQ	LEMPVLVDQD	LTQQMRLRVE	SLKQRGEKKQ	DGEKLIRPAE
ratOMP	MAEDGPQKQQ	LDMPVLVDQD	LTKQMRLRVE	SLKQRGEKKQ	DGEKLLRPAE
humOMP	MAEDRPQQPQ	LDMPVLVDQD	LTRQMRLRVE	SLKQRGEKKQ	DGEKLLQPPE
xlOMP1	~~~MASETSE	MELPFIEDTQ	LTKCMRIRVQ	TLQQKNAKPQ	EGEMLLRANE
xlOMP2	~~~MAPETSE	MELPFNEDTQ	LTKCMRIRVQ	TLQQKNGKPQ	EGEMLLRAND
zebOMP	~~~~~MS	LELTFNPDVQ	LTEMMRLRVQ	SLQQRGQKRQ	DGERLLKSNE
	51				100
musOMP	SVYRLDFIQQ	QKLQFDHWNV	VLDKPGKVTI	TGTSQNWTPD	LTNLMTRQLL
ratOMP	SVYRLDFIQQ	QKLQFDHWNV	VLDKPGKVTI	TGTSQNWTPD	LTNLMTRQLL
humOMP	SVYRLNFTQQ	QRLQFERWNV	VLDKPGKVTI	TGTSQNWTPD	LTNLMTRQLL
xlOMP1	YIYRVDF.SK	QKLRFLLWVKV	HLKSPGKVMV	TGTSQHWTPD	LTNLMTRQLL
xlOMP2	YIYRLDF.PK	QKLRFLLWVKV	HLKTPGKVMV	TGTSQHWTPD	LTNLMTRQLL
zebOMP	HVYSLDF.SE	QALHFTRWNI	RISSPGRLNI	IATSQLWTPD	LTHLMTRQLL
	101				150
musOMP	DPAAI FWRKE	DSDAMDWNEA	DALEFGERLS	DLAKIRKVMY	FLITFGEQVE
ratOMP	DPAAI FWRKE	DSDAMDWNEA	DALEFGERLS	DLAKIRKVMY	FLITFGEQVE
humOMP	DPTAI FWRKE	DSDAIDWNEA	DALEFGERLS	DLAKIRKVMY	FLVTFGEQVE
xlOMP1	EPSAVFYKQD	ANDEVECNEA	DAQEFGERIA	ELAKIRKVMY	FVITFLDGAD
xlOMP2	EPSAVFYKQD	AKDKVECNEA	DAQEFGERIA	ELAKIRKVMY	FVFTFLDGAD
zebOMP	EPTGLFWRSA	DDENIQCYEA	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 ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
zeom  ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
xeom  MVPGAWHSLL FTTSSASEKE ENRSQRMQLG EQLL.VSSVN LPGAHFYPLE
mtbr3 ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
ztbx16 ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
zspt  ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
ztbx2 ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
ztbxc ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
ztbx20 ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
zhrt  ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
ztbx4 ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
ztbx5 ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
ztbx6 ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
zbrach ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~ ~~~~~~
  
```

```

51                                          100
htbr1 ~~~~~
mtbr1 ~~~~~
ztbr1 ~~~~~
htbr2 SARGGSGGSA GH..... ..LPSAAPSP QKLDLGKASK KFGSLSCEA
mtbr2 SARGGGGGGG GGGGGGGGSV SLLPGAAPSP QRLDLKASK KFGSLPCQA
zeom SSSESTNNSP GSTQIDFQ.. ..... .DMDRTDS EOSSG..AKK
xeom GDPSSAVHSP .SLEFSVG.. ..... .HKGQQHK KYSSG..SSR
mtbr3 ~~~~~
ztbx16 ~~~~~
zspt ~~~~~
ztbx2 ~~~~~
ztbx4 ~~~~~
ztbx5 ~~~~~
ztbx6 ~~~~~
zbrach ~~~~~

```

```

101                                          150
htbr1 ~~~~MQL EHC LSPSIMLSKK FLNV...SSS YPHSGGSELV LHDHPIISTT
mtbr1 ~~~~MQL EHC LSPSIMLSKK FLNV...SSS YPHSGGSELV LHDHPIISTT
ztbr1 ~~~~~
htbr2 VSGEPAASA GAPAAMLSDT DAGDAFASAA AVAKPGPPDG RKGSPC..GE
mtbr2 GLMDDADSE. GAPAAMLSDA DAGDTFGSTS AVAKPGPPDG RKGSPC..AE
zeom FLMDDADSE. ....SFT .....GTGA AAAAATAAPDA RKSSPVIGAD
xeom GLQLDSPREA GSSSTMLSET .....GEGF SVAKTLPDNV RKGSP..SAE
mtbr3 ~~~~~
ztbx16 ~~~~~
zspt ~~~~~
ztbx2 ~~~~~
ztbx4 ~~~~~
ztbx5 ~~~~~
ztbx6 ~~~~~
zbrach ~~~~~

```

```

151                                          200
htbr1 DNLERSSPLK KITRGM TNOS DTDNFPDSK SPGDVORSKL SPVLDGVSEL
mtbr1 DNLERSSPLE KITRGM TNOS DTDNFPDSK SPGDVORSKL SPVLDGVSEL
ztbr1 ~~~~~
htbr2 EELPSAAAAA AAAAAAAAAA ARYSMDSL.. SSVRYYLOSP GPO...GS.
mtbr2 EELPS..... ..AATAAA ARYSMDSL.. SSERYYLPS GPQ...GS.
zeom DEL..... ..SST RRYNIDDL.. GTDRYFISS. ....SQSS.
xeom EEL..... ..NTAVPTSA PRYLDGSLQA ASERYYLOPO GOOLOOTT.
mtbr3 ~~~~~M GIVEPGCGDM
ztbx16 ~~~~~
zspt ~~~~~
ztbx2 ~~~~~
ztbx4 ~~~~~
ztbx5 ~~~~~
ztbx6 ~~~~~
zbrach ~~~~~

```

```

201                                          250
htbr1 RHSF.DGSAA DRYLLSQSSO PQSAATAPSA MFPYPGQHG P AHPAFSIGSP
mtbr1 RHSF.DGSAA DRYLLSQSSO PQSAATAPSA MFPYPSQHG P AHPAFSIGSP
ztbr1 ~~~~~
htbr2 ELAA.PCSLF PYQAAAGAPH GPVYPAPNGA RYP...YGS MLPPGGFPAA
mtbr2 ELAA.PCSLF QYPAAAGAAH GPVYPASNGA RYP...YGS MLPPGGFPAA
zeom DVAN.PCSLF PY...G.GOT GSVYSGSNGS RYSSSLHYGS VLPPAGFSSA
xeom ELGS.PCSIF PY...APPQH SAVYPAGGAA RYPP...YGS MLPPAGFSPP
mtbr3 LTGT EPMPSD EGRGPGADQQ HRFYYPEPGA QDPTDRRAGS SLGTPYSGGA
ztbx16 ~~~~~
zspt ~~~~~
ztbx2 ~~~~~MRDPVF TGTAMAYHPF HAHRPTDFPM SAFLAAAQPS
ztbx4 ~~~~~MAYHPF HAHRPTDFPM SAFLAAAQPS
ztbx5 ~~~~~MEYTSS PKPOLSSRAN AF SIAALMSS GKTKDKESEE
ztbx6 ~~~~~MEYTSS PKPOLSSRAN AF SIAALMSS GKTKDKESEE
zbrach ~~~~~

```

251				300	
htbr1	SRMAHHPVI	TNGAYNSLLS	NSSPOGYPTA	GYPYPOQYGH	SYOGAPFYQF
mtbr1	SRMAHHPVI	TNGAYNSLLS	NSSPOGYPTA	GYPYPOQYGH	SYOGAPFYQF
ztbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
htbr2	ACPPGRAQFG	PGAGAGSGAG	GINGGGGGPG	TYOYSQG.AP	LYGYPGAAA
mtbr2	VCPPARAQFG	PAAGSGSGAG	SSGGGAGGPG	AYPYQOG.SP	LYGYPAGTSA
zeom	VC.ASRSQFGG	GYQFGQPGC	LYSPY....
xeom	VC.PSRPOYSS	GYQYSQAPGT	MYSYP...P
mtbr3	LVPAAPGRFL	GSFAYPPRAQ	VAGFPG..PG	EFFPPPAGAE	GYPVPDGYPA
ztbx16	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~MQ	AIRDLKHNFS
zspt	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~MQ	AIRDLKHNFS
ztbx2	FFPALTLPPG	ALTKPIPDHT	LAGAAEAGLH	PALSHHHQAA	HLRSLK...S
ztbxc	FFPALTLPPG	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.	...SDKQNA
ztbx6	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~MNLANNYG
zbrach	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	MSASSPDQRL

	301			350	
htbr1	SSTQPLG...VP.GKAQVY	LCNRPLWLKF	HRHQTEMIIT
mtbr1	SSTQPLG...VP.GKAQVY	LCNRPLWLKF	HRHQTEMIIT
ztbr1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
htbr2	AGSCGGL... .	..GGLGVP.S	SG..FRAHVY	LCNRPLWLKF	HRHQTEMIIT
mtbr2	AGSCGGL... .	..GGLGVP.G	SG..FRAHVY	LCNRPLWLKF	HRHQTEMIIT
zeom	.GPSSSL... .	..SSMPIP.G	SGSARAQVY	LCNRPLWLKF	HRHQTEMIIT
xeom	AGTGSGL... .	..SALGLP.G	GGAGVRAQVY	LCNRPLWLKF	HRHQTEMIIT
mtbr3	PDPRAGLYPG	PREDYALPAG	LEVSGKLRVA	LSNHLLWSKF	NHQTEMIIT
ztbx16	LPPPPSMPGA	GDSYHQ...G	N.....IRMT	LEDPELWRSF	HEIGTEMIIT
zspt	LPPPPSMPGA	GDSYHQ...G	N.....IRMT	LEDPELWRSF	HEIGTEMIIT
ztbx2	LEPEEEV...E...D	D.....PKVT	LEAKDLWDQF	HKLGTMEVIT
ztbxc	LEPEEEV...E...D	D.....PKVT	LEAKDLWDQF	HKLGTMEVIT
ztbx20	IPTTPGVP..SEE...KA	K.....ISCS	LETKELWDKF	HELGTMEIIT
zhrt	IPTTPGVP..SEE...MA	K.....ISCS	LETKELWDKF	HELGTMEIIT
ztbx4	LPTTPSNPQN	NEPDQS..IE	N.....IKVV	LHDRELWKKL	HEAGTEMIIT
ztbx5	VSKSPSS.QT	TYIOQG..ME	G.....IKVY	LHERELWTKF	HEVGTEMIIT
ztbx6	YYPQDCRTQY	SRMNSA..EA	ELTSPLVHVS	LDRELWDKF	SSIGTEMLIT
zbrach	DHLLSAVESE	FQKGSE..KG	DASERDIKLS	LEDAELWTKF	KELTNEMIVT

	351			400	
htbr1	KQRRMFPPFL	SFNISGLDPT	AHYNIFVDVI	LADPNHWRFO	GGK..WVPCG
mtbr1	KQRRMFPPFL	SFNISGLDPT	AHYNIFVDVI	LADPNHWRFO	GGK..WVPCG
ztbr1	~~~~~	~~~~~SGLDPT	AHYNIFVDVI	LADPNHWRFO	GGK..WVPCG
htbr2	KQRRMFPPFL	SFNINGLNPT	AHYNVFEVV	LADPNHWRFO	GGK..WVTCTG
mtbr2	KQRRMFPPFL	SFNINGLNPT	AHYNVFEVV	LADPNHWRFO	GGK..WVTCTG
zeom	KQRRMFPPFL	SFNITGLNLT	AHYNVFEIV	LADPNHWRFO	GGK..WVTCTG
xeom	KQRRMFPPFL	SFNITGLNPT	AHYNVFEVV	LADPNHWRFO	GGK..WVTCTG
mtbr3	KQRRMFPPFL	SFTVAGLEPT	SHYRMFVDVY	LVDQHWRFO	SGK..WVQCG
ztbx16	KPGRMFPPHC	KISLSGLVPY	AKYILLVDMV	PEDGLRYKW.	.NKDKWEVAG
zspt	KPGRMFPPHC	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	KAGRMPFSPY	KVKVTGMNPK	TKYILLTDIV	PADDHRYKFC	DNK..WMVAG
ztbx5	KAGRMPFSF	KVKVTGLNPK	TKYILLMDVY	PADDHRYKFA	DNK..WSVTG
ztbx6	KSGRRMFPCS	KVTVTGLNPK	VKYVVIMDMV	PFDNHKYKW.	.NKDCWEVNG
zbrach	KTGRRMFVPL	RASVTGLDPN	AMYSVLLDFV	AADNRRWKYV	..NGEWVPGG

	401			450	
htbr1	KADTNVOGNR	VYMHPDSPNT	GAHWMRQEIS	FGKLKLTNKK	GASNNNGQMV
mtbr1	KADTNVOGNR	VYMHPDSPNT	GAHWMRQEIS	FGKLKLTNKK	GASNNNGQMV
ztbr1	KADTNVTGNR	VYMHPDSPNT	GAHWMRQEIS	FGKLKLTNKK	GATNNTGQMV
htbr2	KADNNMOGNG	MYVHPESPNT	GSHWMRQEIS	FGKLKLTNKK	GANNNTQMI
mtbr2	KADNNMOGNG	MYVHPESPNT	GSHWMRQEIS	FGKLKLTNKK	GANNNTQMI
zeom	KADNNMOGNG	VYVHPESPNT	GAHWMRQEIS	FGKLKLTNKK	GANNNTQMI
xeom	KADNNMOGNG	VYVHPESPNT	GAHWMRQEIS	FGKLKLTNKK	GANNNTQMI
mtbr3	KAEGRMFPGR	LYVHPDSPNT	GAHWMRQEVY	FGKLKLTNKK	GANNNTQMI
ztbx16	KAEPQPPY.R	TYLHPDSPAP	GSHWMKQPVY	FLKLKLTNN.	..ALDQHGHI
zspt	KAEPQPPY.R	TYLHPDSPAP	GSHWMKQPVY	FLKLKLTNN.	..ALDQHGHI
ztbx2	KADPEMPK.R	MYIHPDSPAT	GEQWMAKPVY	FHKLKLTNN.	..ISDKHGFT
ztbxc	KADPEMPK.R	MYIHPDSPAT	GEQWMAKPVY	FHKLKLTNN.	..ISDKHGFT
ztbx20	KADPPLPA.R	LYVHPDSPPT	GEQLSKQMVY	FEKVKLTNN.	..ELDQHGHI
zhrt	KADPPLPA.R	LYVHPDSPPT	GEQLLKQMVY	FEKVKLTNN.	..ELDQHGHI
ztbx4	KAEPAMPG.R	LYVHPDSPAT	GAHWMRQLVS	FQKLKLTNN.	..HLDPFGHI
ztbx5	KAEPAMPG.R	LYVHPDSPAT	GAHWMRQLVS	FQKLKLTNN.	..HLDPFGHI
ztbx6	SSDPPLPN.R	FFIHPDSPAP	GQKWMQYPIS	FHKLKLTNN.	..TLNSNGLV
zbrach	KPEPQSPS.C	VYIHPDSPNF	GAHWMKAPVS	FQKVKLSNK.	..LNGGGQI

451					500
htbr1	VLOSLHXYQP	RLHVVEVNED	GTEDTSOPGR	V.OTFTFPET	QFIAVTAYQN
mtbr1	VLOSLHXYQP	RLHVVEVNED	GTEDTSOPGR	V.OTFTFPET	QFIAVTAYQN
ztbr1	VLOSLHXYQP	RLHVVEVNED	GTEDTSOPGR	V.OTFTFPET	QFIAVTAYQN
htbr2	VLOSLHXYQP	RLHIVEVTED	GVEDLNESPK	T.OTFTFSET	QFIAVTAYQN
mtbr2	VLOSLHXYQP	RLHIVEVTED	GVEDLNESPK	T.OTFTFSET	QFIAVTAYQN
zeom	VLOSLHXYQP	RLHIVEVTED	GVEDMSSEAK	T.OTFTFPEN	QFIAVTAYQN
xeom	VLOSLHXYQP	RLHIVEVSED	GVEDLNDSAK	N.OTFTFPEN	QFIAVTAYQN
mtbr3	VLOSLHXYQP	RLHIVEVNDG	EPEAACASAN	T.HVFTFOET	QFIAVTAYQN
ztbx16	ILHSMHRYHP	RFHIVQADD.	...LYSVRWS	VFOTFTFPET	SFTAVTAYQN
zspt	ILHSMHRYHP	RFHIVQADD.	...LYSVRWS	VFOTFTFPET	SFTAVTAYQN
ztbx2	ILNSMHXYQP	RFHIVRAND.	...ILKLPYS	TFRTYVFPEP	DFIAVTAYQN
ztbxc	ILNSMHXYQP	RFHIVRAND.	...ILKLPYS	TFRTYVFPEP	DFIAVTAYQN
ztbx20	ILNSMHXYQP	RVHIKKKKDH	TASLLNLKSE	EFRTFVFTEP	VFTCRTAYQN
zhrt	ILNSMHXYQP	RVHIKKKKDH	TASLLNLKSE	EFRTFVFTEP	VFTAVTAYQN
ztbx4	ILNSMHXYQP	RLHIVKADEN	NA..FGSKNT	AYCTHVFHET	AFISVTYSQN
ztbx5	ILNSMHXYQP	RLHIVKADEN	NG..FGSKNT	AFCTHVFPET	AFIAVTSYQN
ztbx6	ILNSMHXYQP	RLHIVQSPDP	CTPH...NPG	AYLRFTHPEP	AFIAVTAYQN
zbrach	MLNSLHXYEP	RIHIVKVGGI	QKMISSQS..FPET	QFIAVTAYQN

501					550
htbr1	TDITOLKIDH	NPFAKGFRDN	YDTIYTGCDM	DRLTPSPNDS	PRS.QIVPGA
mtbr1	TDITOLKIDH	NPFAKGFRDN	YDTIYTGCDM	DRLTPSPNDS	PRS.QIVPGA
ztbr1	TDITOLKIDH	NPFAKGFRDN	YDTVYTGCDI	DRLTPSPGDS	PRS.QIMPSP
htbr2	TDITOLKIDH	NPFAKGFRDN	YDS.....SHQIVPGG
mtbr2	TDITOLKIDH	NPFAKGFRDN	YDS.....SHQIVPGG
zeom	TDITOLKIDH	NPFAKGFRDN	YDSMYTAPES	DRLTPSPPTS	PRSHQIVPGA
xeom	TDITOLKIDH	NPFAKGFRDN	YDSMYTASES	DRLTPSPADS	PRSHQIVPGT
mtbr3	AEITOLKIDN	NPFAKGFREN	FESMYASVD.	...TSVPSPPP	GPNCOLLGGD
ztbx16	TKITKLIKIDH	NPFAKGFRDE	GTNSKRRA..	NRNLPDPE..	.RVAKKMSKE
zspt	TKITKLIKIDH	NPFAKGFRDE	GTNSKRRA..	NRNLPDPE..	.RVAKKMSKD
ztbx2	DKITOLKIDN	NPFAKGFRDT	G.NGRREK..	RKQTLPLS..	LRMYEDQCKV
ztbxc	DKITOLKIDN	NPFAKGFRDT	G.NGRREK..	RKQTLPLS..	LRMYEDQCKV
ztbx20	QLITRLKIDS	NPFAKGFRDS	SRLTDIER..	ES.VESLI..	HKHSYARSPI
zhrt	QLITRLKIDS	NPFAKGFRDS	SRLTDIER..	ES.VESLI..	HKHSYARSPI
ztbx4	HKITOLKIEN	NPFAKGFRRS	DEG.DL.R..	VSRLQK.K.	EYPVVISKNMV
ztbx5	HKITOLKIEN	NPFAKGFRRS	DDM.ELHR..	MSRMQSTK..	EYPVVSRSTV
ztbx6	QEITKLIKIDN	NPFAKGFRDN	GLNRKRFR..	DKGTQEMQDT	DROVKLDLTA
zbrach	EEITALKIKH	NPFAKAFLDA	KERSDHKEVP	DHSTDNQOQSG	YSQLGGWFLP

551					600
htbr1	RYAMAGSFLO	DOFVSNYAKA	.RFHFGAGAG	PGPGTDRSVP	HTNGLLSPQO
mtbr1	RYAMAGSFLO	DOFVSNYAKA	.RFHFGAGAG	PGPGTDRSVP	HTNGLLSPQO
ztbr1	RYAMTGSFLO	DOFVSSYAKS	.RFHFGVGG.	.APGTDERSVP	LSNLSLLSPQO
htbr2	RYGVQ.SFFP	EPFVNTLPOA	.RYNG....ERTVP	QTNGLLSPQO
mtbr2	RYGVQ.NFFP	EPFVNTLPOA	.RYNG....ERTVP	QTNGLLSPQO
zeom	RYAMQ.PFFQ	DOFVNNLPQX	HFRYGS....ERAVP	QTNGLLSPQS
xeom	RYSVQ.PFFQ	DOFVNNLPPA	.RYSG....ERTVP	QANGLLSPQT
mtbr3	PFSPLLS...	...NQYPVP	SREFYDLPGQ	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...	ETLGEE....	.GHSAHSRGS	AFTASDN..L	S.LSSWVTTT
zhrt	RTYAGDE...	ETLGEE....	.GHSAHSRGS	AFTASDN..L	S.LSSWVTTT
ztbx4	RORLISS...	HGHLG....	.KLSAGVLSS	HPOVLSH..Y	Q.YDSGVPLP
ztbx5	RORVGSS...	QSPFSG....	.DVOG..LPA	TGAISSO..Y	S.CENSV...
ztbx6	NECAAGM...	SQMVEDVDVS	VSSSVDCRDT	QNSSVS..L	NPFI SAFTNP
zbrach	SNGPMGP...	SSSPPQFNGA	PVHSSGSYCE	RYSSLRNHRA	APYP SHYSHR

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	QRWLVTVPQO	.PGTNKLDI.	.SSYE.....S	EY..TSSTLL
mtbr2	SEEVAN..PP	QRWLVTVPQO	.PVTNKLDI.	.GSYE.....S	EY..TSSTLL
zeom	EDSAAGSASA	QRWFVGPVQO	SGGTTKLDL.	..SYD....S	EY..SASSLL
xeom	NEEVA.NVPP	QRWFVTPVQO	A.AANKLDM.	.GAYE...T	DY..SSGSLL
mtbr3	AEFRAVSMKP	TLLPSAPGPT	VPYYRGQDVL	APGAGWPVAP	QYPKMSPPAG
ztbx16	..DSGHALRP	ESPLGSDHRD	VFSSEQLVPGQN.TYO	PY..RFHEYG
zspt	..DSGHALRP	ESPLGSDHRD	VYSSEQLVPGQN.TYO	PY..RFHEYG
ztbx2	CTDSEHEM..DHQN	DRCGGSSSPAPK.PSS	PFRSRSEDWG
ztbxc	CTDSEHEM..DHQN	DRCGGSSSPAPE.PSS	PFRSRSEDWG
ztbx20	SGFSGFQHPO	SLSAIDTSTA	SLASPLPHPI	QGSPL.....	PYSRLGMLPT
zhrt	SGFSGFQHPO	SLSAIGTSTA	SLASPLPHPI	QGSPL.....	PYSRLGMLPT
ztbx4	NSDSQEALSN	SFTSSREPSL	LYHC.FKHR.	.DNPRH.LEL	GCKRPLYLTT
ztbx5	SSTSQDQLLQ	S.SSYHEHTQ	DYHC.IKRKV	EDECPA.GEH	PYKPKYVSSS
ztbx6	SSAGGAAAHQ	THTLLSLSNR	HFSSPRESNL	NSVCAALPVS	QLSTGHTSFS
zbrach	STTTNMYMDN	SSGSLASHDS	..WSALQIPN	SSGMGTLAHT	TNNTSNTSQY

651 htbr1 SYAAAGVKAL PLQAAGCTGR PLG....YYA DP.....SG WGARSPPOYC
mtbr1 SYAAAGVKAL PLQAAGCTGR PLG....YYA DP.....SG WGARSPPOYC
ztbr1 SYAAAGVKAL PLPGAGCSNR PLG....YYG EP.....G VGHRTPPQOYC
htbr2 PY...GIKSL PLQ....TSH ALG....YYP DPTFPAM.AG WGGRG.S.YO.
mtbr2 PY...GIKSL PLQ....TSH ALG....YYP DPTFPAM.AG WGGRG.YO.
zeom PY...GIKSL PLQ....SPH ALG....YYP DSAFASMAAG WSSR.SSYQ.
xeom TY...GIKSL PIQ....TSH PMA....YYP DAAFASM.AG WGSRGSTYO.
mtbr3 WFRP...MRTL PMDPGLGSSE EOGSSPSLWP EVTSLQPESS DSGLGEG.DT
ztbx16KS PSPS...SSS SVGGSSACG. ...SAGRPSF ESRV.LDV.A
zsptKS 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 FHMPRYHHY. ...FQOQPYA AIOGLRHSST
zhrt PSALASSMOA TGPT...FPS FHMPRYHHY. ...FQOQPYA AIOGLRHSST
ztbx4 SSAVSEEHYF RSP....PS YDSPL...L. ...S...HPYC N.EALGSREA
ztbx5 SS...EDDHYR R.P....LS YSQSL..GL. ...SGGAPYR P.E.S.SORQA
ztbx6 RLNPQETHHN SRPKIQLOPP HPSLQCHDL. ...DVRLPLP PKLSRVQLSE
zbrach PSLWSVAGTT LTPSGSASGS ITGGLTSQFL RGSSMSYSGL TSSLPVSSPS

701 htbr1 GTKSGSVLPC WPNSAAAAAR MAGANPYLG. EEAEGLAAR SPLPPGAAED
mtbr1 GAKSGSVLPC WPNSAAAAAR MAGANPYLG. EEAEGLAAR SPLAP.AAED
ztbr1 .SKSSSVLSC WPSNSVGSRT TASSYLVPGL EDGDPIAPER SPL..GGADE
htbr2 .RKMAAGLP. WTSRTPSTVF SEDQ....L S.KEKVKEEI G.....S
mtbr2 .RKMAAGLP. WTSRMSPPVF PEDQ....L A.KEKVKEEI S.....S
zeom .RKMTTGLP. WSPPRSPPAY TDDL....L SSKDKLQDEN S.....T
xeom .RKMTTSLP. WSSRSSPSGF SEDL....L .PKDKVKEEM S.....S
mtbr3 KRRRISPYPS SGDSSSPAGA PSPFDKETEG QFYNYFPN*~ ~~~~~
ztbx16 TVPDTDSS.. .SKPSSAP. ..EFLSLPHPH SAGH..... ..QEYAG
zspt TVPDTDSS.. .SKPSSAP. ..EFLSLPHPH SAGH..... ..QEYAG
ztbx2 SKKDTENSGI SGSKDSFSPL MVQTESPSHF GAGHLQSLAL SGLHSQQFFN
ztbxc SKKDTENSGI SGSKDSFSPL MVQTESPSHF GAGHLQSLAL SGLHSQQFFN
ztbx20 VMTPFV*~ ~~~~~
zhrt VMTPFV*~ ~~~~~
ztbx4 CMYGGLEGEG GGAVGTDDL P APSLNCNMWA SVQPYPRYGM OTVEAMOYO.
ztbx5 CMY..... .ASAPQPPPE VPSLEDISWP GVFP...YSV POMERLPHYQH
ztbx6 SALRNLEMSP LSDCANPRPL TNILNRSCFR ASTPSGKLLP NPPQPEQFLR
zbrach SMYDPGLSEV GVGDAQFESS IARLTASWAP VAQSY*~ ~~~~~

751 htbr1 AKPKDLSDSS WIETPSSIKS IDSSDSGIYE QA.KRRRISP ADTPVSESSS
mtbr1 AKPKDLSDSS WIETPSSIKS IDSSDSGIYE QA.KRRRISP ADTPVSESSS
ztbr1 SKPKDLSESS WIETPSSIKS IDSSDSGIFE QA.KRRRISP SATPVSETSS
htbr2 S..... WIETPSSIKS LDSNDSGYVT SACKRRRLSP S.NSSNENSP
mtbr2 S..... WIETPSSIKS LDSNDSGYVN SACKRRRLSP S.TPSNGNSP
zeom AAPTAASTGP WMEAPPVLKS VDSGDTSGYS MACKRRRVSP G.GSSTDASP
xeom S..... WVETPSSIKS LDSNDSGYVT GACKRRRLSP S.TSSNENSP
mtbr3
ztbx16 VLNMAI..TO A.KPGMLGTH P.LYSHYTE QSLGOWSGAA ASQ.....
zspt VLNMAI..TO A.KPGMLGTH P.LYSHYTE QSLGOWSGAA ASQ.....
ztbx2 PLNTGQ..PL LFHPGQFAMA PGAFSAMGMG HLLASVSGAG GLENGSLSAQ
ztbxc PLNTGQ..PL LFHPGQFAMA PGAFSAMGMG HLLASVSGAG GLENGSLSAQ
ztbx20
zhrt
ztbx4 PFTAHF..NS T.....ASA ASMVSHH.SP S..MORPHPT PPD...LVTF
ztbx5 HFSAHF..AS ROMPEAHGMY ASSVSHOCSP SGGIQSPSAG LQGNLYLVAH
ztbx6 GSEREIYPAV QEYTDQOFTL NSQTEHRPHM RPLTEY*~ ~~~~~
zbrach

801 htbr1 PLKSEVLAQR DCEKNCAKDI SGYYGFYSHS *~ ~~~~~
mtbr1 PLKSEVLAQR DCEKNCAKDI GGYGFYSHS *~ ~~~~~
ztbr1 PLKSEMLTPR ECEKNCSKDI .GYKIFYPHS *~ ~~~~~
htbr2 SIKCGDINAE EYKDTSKGM GGYAFYFTSP *~ ~~~~~
mtbr2 PIKCEDINTE EYKDTSKGM GAYYAFYFTSP *~ ~~~~~
zeom TIKCEDLSSE EYNKESHKAM G.YYAFYFTSP *~ ~~~~~
xeom PIKCEDIGTE DY.KDATKGL G.YYFYSSS *~ ~~~~~
mtbr3
ztbx16 ...YPPPPPP HHHLPTEYSN QAVHHGYHHG NVGEWSQYPL FSYSCW*~ ~~~~~
zspt ...YPPPPPP HHHLPTEYSS QAVHHGYHHG NVGDWSQYPL 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 BASEXPRESSIONSVEKTOR: pACSF-Y

2.1 Übersicht.

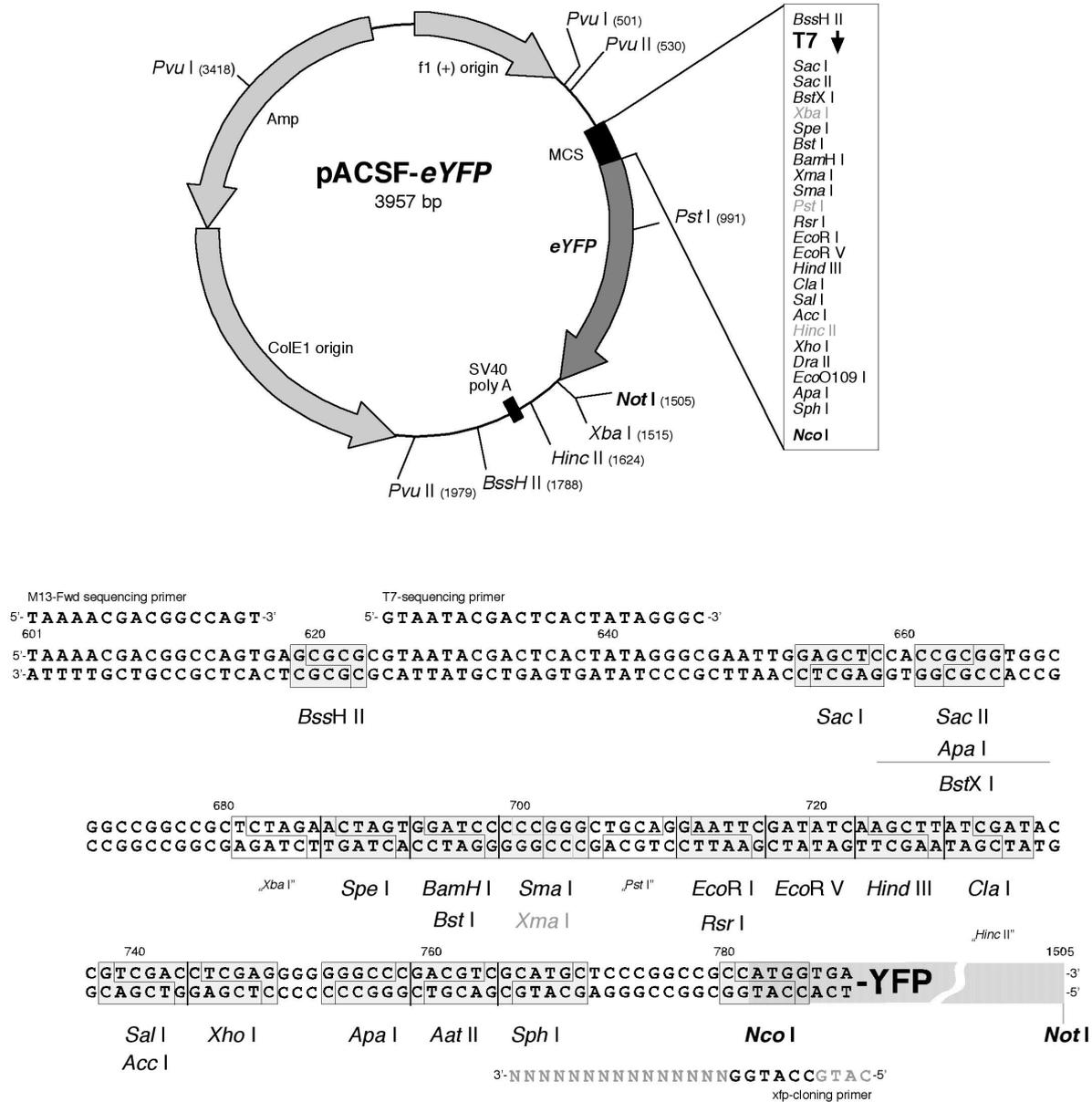


Abb. 43 – Der promotorlose Expressionsvektor pACSF-Y.

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 CCCCAGATTT 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 CTGCCCCGTGC
951 CCTGGCCCAC CCTCGTGACC ACCTTCGGCT ACGGCCTGCA GTGCTTCGCC
1001 CGTACCCCG ACCACATGAA GCAGCACGAC TTCTTCAAGT CCGCCATGCC
1051 CGAAGGCTAC GTCCAGGAGC GCACCATCTT CTTCAAGGAC GACGGCAACT
1101 ACAAGACCCG CGCCGAGGTG AAGTTCGAGG GCGACACCCT GGTGAACCGC
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 CATTTTTTTTC
1701 ACTGCATTCT AGTTGTGGTT TGTCCAAACT CATCAATGTA TCTTAATATG
1751 GGAGACCAGC TTTTGTTCCT TTTAGTGAGG GTTAAATTGCG CGCTTGGCGT
1801 AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA ATTGTTATCC GCTCACAATT
1851 CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG TGTAAGCCTT GGGGTGCCTA
1901 ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCCGCTTTC

```

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 TCTCCTGTTC 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 AGTTC'TTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAAG
 2651 GACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGAAAAA
 2701 GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA CCACCGCTGG TAGCGGTGGT
 2751 TTTTTTGT'TT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG GATCTCAAGA
 2801 AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAAC
 2851 CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG
 2901 ATCCTTTTAA ATTAAAAATG 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 GCAATAAAC
 3151 AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC
 3201 TCCATCCAGT CTATTAAT'TG 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 GGCCGCAGTG TTATCACTCA
 3451 TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA
 3501 TGCTTTTCTG TGACTGGTGA G'ACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG
 3551 TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG
 3601 CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA ACGTTCTTCG
 3651 GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA GTTCGATGTA
 3701 ACCCACTCGT GCACCCAAC'T GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG
 3751 TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA 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 endogenous 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

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 4th Meeting of the German Neuroscience Society 2001; Volume II, 28th 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 1st Göttingen Conference of the German Neuroscience Society 1999; Volume II, 27th 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 1st Göttingen Conference of the German Neuroscience Society 1999; Volume II, 27th 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 24th Göttingen Neurobiology Conference, Volume II, edited by Norbert Elsner and Hans-Ulrich Schnitzler, Thieme Verlag.