

**Odorantrezeptoren in
Axonen olfaktorischer Sinneszellen -
in vitro Studien an Explantatkulturen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät Naturwissenschaften

Universität Hohenheim

Institut für Physiologie

vorgelegt von

Georg Luxenhofer

aus Mussenhausen

2008

Prodekan: Prof. Dr. Stephan C. Bischoff
1. berichtende Person: Prof. Dr. Heinz Breer
2. berichtende Person: Prof. Dr. Harald Rösner
Eingereicht am: 18.08.2008
Mündliche Prüfung am: 14.11.2008

Die vorliegende Arbeit wurde am 18.08.2008 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung der Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbständig gemäß der Promotionsordnung angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Georg Luxenhofer

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
II	Material und Methoden	4
2.1	Material	4
2.1.1	Allgemeine Laborgeräte	4
2.1.2	Präparierbesteck	5
2.1.3	Verbrauchsmaterial	5
2.1.4	Allgemeine Reagenzien	5
2.1.5	Reagenzien für Zellkultur	7
2.1.6	Spezialreagenzien.....	8
2.1.7	Enzyme	8
2.1.8	Verwendete Kits	8
2.1.9	Verwendete Plasmide	8
2.1.10	Verwendete Primer	9
2.1.11	Antikörper und Seren	9
2.1.12	Duftstoffe	10
2.1.13	Versuchstiere	10
2.1.14	Software	10
2.1.15	Lösungen	11
2.1.16	Kulturmedien und Puffer	13
2.2	Methoden.....	16
2.2.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	16
2.2.2	Klonierung des Expressionsvektors mOR256-17-EGFP	23
2.2.3	Klonierung des Expressionsvektors mOR256-17-RDY-EGFP	24
2.2.4	Präparation von Gewebexplantaten	24
2.2.5	Beschichtung der Glasbodenschälchen	26
2.2.6	Transfektion von DNA in olfaktorische Explantate	27
2.2.7	Immuncytochemische Nachweise an <i>in vitro</i> Kulturen	27
2.2.8	Bestimmung der maximalen Axonlänge	28

2.2.9	Ca ²⁺ -Imaging	29
2.2.10	Acyl-Carrier-Protein (ACP) Markierung	30
2.2.11	Mikroskopische Analysen und Bildbearbeitung	30
III	Ergebnisse	32
3.1	Optimierung der Kulturbedingungen zur Maximierung axonalen Wachstums	32
3.1.1	Bildung von axonalem Netzwerk auf Polylysin/Laminin Substrat	32
3.1.2	Einschichtige Zellpopulation in olfaktorischen Explantaten	33
3.1.3	Olfaktorische Stammzellen in einschichtigen Explantaten	36
3.1.4	Reduzierung der einschichtigen Explantate	38
3.2	Generierung von reifen Sinnesneuronen <i>in vitro</i>	39
3.3	Erhöhte Differenzierungsrate durch Retinsäure	41
3.4	Genexpression von Odorantrezeptoren <i>in vitro</i>	43
3.5	Ungebündeltes Wachstum OR-spezifischer Axone	45
3.6	Kokulturen von Explantaten des OE und OB	45
3.6.1	Repulsion olfaktorischer Axone durch OB Neuriten	45
3.6.2	Generelles repulsives Verhalten gegenüber OB Gewebe	47
3.6.3	Einwachsen weniger olfaktorischer Axone in OB Explantat	48
3.6.4	Reorientierung einwachsender Axone innerhalb des OB Explantats	50
3.6.5	Reduktion der Repulsion in späteren embryonalen Stadien	51
3.7	Axonales Wachstum auf vorkultiviertem OB Gewebe	53
3.7.1	Attraktion olfaktorischer Axone nach Vorkultivierung des OB	53
3.7.2	Erhöhte axonale Wachstumsrate durch lösliche OB Komponenten	54
3.7.3	Weitreichende Attraktion aller olfaktorischer Axone in OB Vorkultur	55
3.7.4	Differentielle Reaktion der olfaktorischen Axone vor OB Explantat	57
3.8	Funktionelle Ausbildung von Neuronen <i>in vitro</i>	58
3.8.1	OB Vorkultur ermöglicht langes ciliäres Wachstum	58
3.8.2	Forskolin und Duftstoff aktivierte Zellen in OE Explantaten	59
3.9	Zellulärer Transport von OR Proteinen	61
3.9.1	Transfektion von mOR256-17-EGFP in olfaktorische Sinnesneurone	62
3.9.2	Odorantrezeptor Protein in den Cilien olfaktorischer Neurone	63

3.9.3	Intrazellulärer Transport unbeeinflusst nach Rezeptor Transfektion	63
3.9.4	Präsenz des Odorantrezeptor Proteins in wachsenden Axonen	65
3.9.5	Vesikulärer Transport von mOR256-17-EGFP	65
3.9.6	Markierung des OR Proteins in der Plasmamembran	66
3.9.7	Lokalisation des OR Proteins nach Einwuchs in den OB	69
3.9.8	Mutation des G-Protein Bindemotivs stört Rezeptor Lokalisation	70
IV	Diskussion	72
V	Zusammenfassung	77
VI	Summary	79
VII	Literaturverzeichnis	81
VIII	Abkürzungsverzeichnis	89
IX	Danksagung	90

Einleitung

Die Wahrnehmung von Duftstoffen wird durch eine Vielzahl olfaktorischer Sinnesneurone (OSN) im olfaktorischen Epithel (OE) der Nasenhöhle ermöglicht. Durch die Expression eines einzigen Odorant Rezeptors (OR) aus einem Repertoire von ca. 1200 möglichen Genen können OSN bestimmte Duftstoffe detektieren (Chess et al., 1994; Malnic et al., 1999). Eine Subpopulation von OSN, die einen bestimmten OR besitzt, liegt nicht gleichmäßig im Riechepithel verteilt vor, sondern ist auf eine definierte Zone beschränkt, die sich rostro-caudal erstreckt und ca. 25-30% der dorso-ventralen Ausdehnung des OE einnimmt (Vassar et al., 1993; Ressler et al., 1993; Miyamichi et al., 2005). Die innerhalb einer Zone verstreut liegenden OR-spezifischen OSN senden ein Axon in 1-3 diskrete Glomeruli im olfaktorischen Bulbus (OB) (Vassar et al., 1994; Ressler et al., 1994; Mombaerts et al., 1996). Diese werden ausschließlich von Axonen einer OSN Subpopulation innerviert (Wang et al., 1998; Strotmann et al., 2000) und verschalten dort auf Sekundärneurone, die Mitral- und Tufted-Zellen (Shepherd 1994). Diese Konvergenz führt zur Entstehung eines konservierten Verteilungsmusters von OR spezifischen Glomeruli auf der Oberfläche des OB (Wang et al., 1998; Meister und Bonhoeffer 2001; Belluscio und Katz 2001). Das Zustandekommen und die Aufrechterhaltung dieses hochkomplexen Projektionsmusters erfordern einzigartige Mechanismen der Wegfindung, die von axonalen Ausläufern der Sinneszellen eingesetzt werden müssen. Im Laufe der embryonalen Entwicklung wachsen die ersten vom OE stammenden olfaktorischen Axone durch das nasale Mesenchym auf das Vorderhirn zu (Doucette 1989; Whitesides, III und LaMantia 1996), sind jedoch mit Ausnahme einiger weniger Pionieraxone nicht dazu in der Lage, sofort in den sich entwickelnden OB einzuwachsen (Gong und Shipley 1995; Renzi et al., 2000; Conzelmann et al., 2001). Stattdessen umwachsen die olfaktorischen Axone gemeinsam mit speziellen Gliazellen den OB und umhüllen ihn so (Doucette 1989; Gong und Shipley 1996). In dieser sogenannten olfaktorischen Nervenschicht (ONS) kann nach der Entstehung eine äußere und eine innere Lage unterschieden werden, wobei die innere Lage direkt dem olfaktorischen Bulbus aufliegt (Au et al., 2002). Nach einer bis zu 4 Tage andauernden Warteperiode dringen die olfaktorischen Axone in das OB Gewebe ein und bilden erste präglomeruläre Strukturen (Treloar et al., 1996; Treloar et al., 1999). Die molekularen und funktionellen Hintergründe dieser Warteperiode im olfaktorischen System sind noch weitgehend unbekannt. Die

anschließende funktionelle Etablierung der einzelnen Glomeruli findet in der perinatalen Phase statt (Royal und Key 1999; Potter et al., 2001; Yu et al., 2004; Zou et al., 2004) und wird unter anderem von der Aktivität der Neurone gesteuert (Zheng et al., 2000; Zhao und Reed 2001; Zou et al., 2004; Biju et al., 2008). Bei der lebenslang andauernden Regeneration der OSN wird das entstandene topographische Muster durch die neu einwachsenden Axone erhalten (Graziadei und Graziadei 1979b; Gogos et al., 2000; Cummings et al., 2000). Diese wachsen dabei durch das nasale Mesenchym innerhalb des olfaktorischen Nervs in Richtung OB, allerdings zunächst nicht gemeinsam mit Axonen der Sinneszellen, die den gleichen OR besitzen (Key und Akeson 1993). Erst nach Kontakt mit der ONS, die den OB umhüllt, findet eine Reorientierung und Sortierung der OR-spezifischen Axone statt (Key und Akeson 1993; Riddle et al., 1993; Royal und Key 1999; St John und Key 2001), die anschließend gemeinsam in die Richtung des Zielglomerulus wachsen. Dieses Wachstum findet zunächst außerhalb des OB in der äußeren Lage der ONS statt, während das Einwachsen in die glomeruläre Schicht des OB erst unmittelbar vor dem Ziel erfolgt (Treloar et al., 2002; Au et al., 2002; Akins und Greer 2006b). Kurz zuvor kann zusätzlich die Entstehung OR-spezifischer Bündel beobachtet werden (Akins und Greer 2006a).

Die molekularen Mechanismen, die diesen komplexen Prozessen zugrunde liegen, sind größtenteils noch nicht verstanden. Kürzlich durchgeführte Studien konnten zeigen, dass das Ausschalten klassischer Wegfindungsmoleküle zu einer gestörten Verteilung der Glomeruli in der dorsomedialen und ventrolateralen Achse führt (Schwartz et al., 2000; Cutforth et al., 2003; Cho et al., 2007; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2008). Weiterhin scheint die Konzentration von cAMP in Sinneszellen ein relevanter Faktor zu sein; es konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung des cAMP Spiegels eine Verlagerung der Glomeruli bewirkt (Imai et al., 2006; Chesler et al., 2007; Zou et al., 2007; Col et al., 2007). Außerdem ist bekannt, dass die präzise Verdrahtung teilweise vom OR Protein selbst abhängt, da kleine Veränderungen in der Aminosäuresequenz eine neue Verteilung der Glomeruli verursacht (Feinstein und Mombaerts 2004). Da das OR Protein in den axonalen Ausläufern der olfaktorischen Sinneszellen vorhanden ist (Barnea et al., 2004; Strotmann et al., 2004), wurde postuliert, dass es homotypische Interaktionen vermitteln könnte und so direkt an der Zielfindung OR-spezifischer Axone beteiligt sein könnte. Anhand dieser Studien konnte jedoch nicht geklärt werden, ob das Rezeptorprotein tatsächlich in einer subzellulären Verteilung vorkommt, die zur Ausführung dieser Aufgaben in auswachsenden Axonen notwendig wäre.

Somit wird deutlich, dass die korrekte Verschaltung der olfaktorischen Axone eine Folge von spezifischen Reaktionen auf eine Vielzahl von Molekülen darstellt, ausgehend von dem initialen Auswachsen der Neuriten bis hin zur Etablierung der synaptischen Kontakte. Um etwas über die molekularen Mechanismen, die zu dieser präzisen Verschaltung führen zu erfahren, ist es notwendig, die Auswirkungen spezieller Faktoren auf wachsende Axone getrennt von einander näher analysieren zu können. Weiterhin muss das System einer direkten Untersuchung zugänglich sein, damit der Ablauf zellulärer Prozesse, die zur korrekten Weg- und Zielfindung führen, analysiert werden kann. Um olfaktorische Axone direkt untersuchen zu können, wäre ein *in vitro* System ein ideales Werkzeug. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, ein Explantat Kultursystem so zu etablieren, dass elementare Prozesse der Ausdifferenzierung, des axonalen Wachstums und der Wegfindung nachgestellt werden können. Durch die Verwendung von Geweben aus transgenen Mauslinien, in dem OSN und deren Axone durch intrinsische GFP Fluoreszenz visualisiert werden können, sollte erreicht werden, die komplexen Prozesse kontinuierlich zu verfolgen.

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Absorptions-Photometer	Biophotometer, Eppendorf
Autoklav	3850 ELC, Systec Labor-Systemtechnik
Bakterien-Inkubationsschüttler	G 24, New Brunswick Scientific
CO ₂ -Inkubatoren	B 5060 CK-CO ₂ , Haereus CB210, WTB Binder
Elektroporationsgerät	GenePulser II, BioRad
Geldokumentation	LFT Labortechnik
Kaltlichtquelle	KL1000T, Schott
Konfokales Mikroskop	LSM 510 Meta, Carl Zeiss Jena
LSM Inkubator	CTI Controller 3100, Pecon
Peltier Thermocycler	PTC-200, MJ Research
Peristaltikpumpe	Ismatec
pH-Meter	φ32, Beckman
Pipettierhilfen	Pipettus-akku, Hirschmann Laborgeräte Gilson
Pipettenstopfer	Eigenbau
Reinluftbank	BDK, Luft und Reinraumtechnik GmbH
Sequenzierautomat	ABI 310, PE Biosystems
Speed-Vac-Konzentrator	Savant
Stereomikroskop	Wild Heerbrugg
Thermomixer	5437, Eppendorf
Tischzentrifuge	5417, Eppendorf
Vibratom	VT1000S, Leica
Vortex Genie 2	Mo Bio Laboratories Inc.

2.1.2 Präparierbesteck

Vanna-Schere 3 mm Klinge	Allgaier instruments
große Schere	FST # 91460-11
Gewebepinzette	FST # 11022-14
Pinzetten (Dumont #5)	FST # 11251-10
Lanzetten	FST # 26007-004 und -005
Lanzettenhalter	FST # 26016-12

Die Lanzetten wurden durch einen Öl-Schleifstein (FST #29008-22) geschärft (#004) bzw. abgerundet (#005), so dass Gewebe abgeschnitten bzw. abgeschabt werden konnte.

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Glasbodenschälchen	World Precision Instruments
Pasteurpipetten 210 mm	Hirschmann Laborgeräte
Glaspipetten 5 ml und 10 ml	Hirschmann Laborgeräte
Deckgläschen	Assistent
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Greiner
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner
Rasierklingen	Wilkinson
Schraubröhrchen, steril	Nunc
Elektroporationsküvetten	GenePulser 0,4 mm, BioRad

2.1.4 Allgemeine Reagenzien

3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin (IBMX)	Sigma
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid (X-Gal)	Peqlab
Agar	Roth
Agarose	Genaxxon
Agarose (Low-melting)	FMC Bioproducts

Ampicillin	Roth
Borsäure	Merck
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid	Sigma
Digitonin	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	Sigma
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Fischgelatine	Sigma
Glukose	Fluka
Glyzerin	Sigma
Hefeextrakt	Merck
HEPES	Roth
IPTG	Fermentas
Kaliumchlorid	Sigma
Kalium- <i>di</i> -hydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Fluka
Kanamycin	Sigma
LB-Medium	Roth
Lichrosolv-Wasser	Merck
Lysinmonohydrochlorid	Fluka
Magnesiumchlorid	Fluka
Magnesiumsulfat	Sigma
Methanol	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Sigma
Natriumperiodat	Serva

Natriumpyruvat	Sigma
Natriumtetraborat	Merck
Paraformaldehyd (16%)	EMS
PIPES	Sigma
Polyvinylalkohol 4-88	Sigma
Propylgallat	Sigma
Tris-Base	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trypton	Life Technologies
Tween20	Merck
Xylencyanol FF	Sigma

2.1.5 Reagenzien für Zellkultur

Aktivkohle, Dextran beschichtet	Sigma
all-trans-Retinsäure (RS)	Sigma
B27 serum-freies Supplement (50 x)	Gibco
B27 serum-freies Supplement ohne Vitamin A (50 x)	Gibco
fötale Kälberserum (FCS)	Gibco
Gentamicin 10 mg/ml	Gibco
HBSS ⁻ (ohne Mg ²⁺ , Ca ²⁺)	Gibco
HEPES (1 M)	Gibco
Laminin (natural mouse)	Invitrogen
Leibowitz 15 Medium (L15)	Gibco
L-Glutamin (200 x)	Gibco
Methylzellulose	Sigma
Neurobasal A	Gibco
Polylysin	Sigma

2.1.6 Spezialreagenzien

Rhod-2 AM	Molecular Probes
CoenzymA-Alexa647	Covalys
Forskolin	Fluka
Pluronic F127	BASF
MK571	Calbiochem

2.1.7 Enzyme

EcoRI	NEB
BamHI	NEB
T4 Ligase	Promega
DNA Polymerase MasterTaq	Eppendorf
DNA Polymerase Taq CORE-Kit	Qbiogene
DNA Polymerase Pwo	Promega
DNA Polymerase Pfu-Turbo	Stratagene
ACP-Synthase	Covalys

2.1.8 Verwendete Kits

GeneClean II	Qbiogen
Sephaglas Flexiprep Kit	Amersham
Midi-Präp Kit	Qiagen
Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Applied Biosystems
pGem-T Kit	Promega

2.1.9 Verwendete Plasmide

pEGFP-N1	Invitrogen
pBSKII(-)	Stratagene
pGEM-T	Promega
ACPs-mOR256-17-EGFP	H. Pick, EPFL Lausanne

2.1.10 Verwendete Primer

T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Sp6	GATTTAGGTGACACTATAG
mOR256-17 EcoRI fw	GCGAATTCGATGGAGGTGGACAGC
mOR256-17 BamHI kst rev	GGGATCCCGGCTGGCTCCTCTTC
256-17 RDY fw	GTGGTGATGGCATTTCGTGACTATGTGGCAGTTTGTC
256-17 RDY rev	GACAAACTGCCACATAGTCACGAAATGCCATCACCAC

2.1.11 Antikörper und Seren

Primäre Antikörper

mouse-anti-GBC-3	J. Schwob, Boston
mouse-anti- β III Tubulin	Sigma
rabbit-anti-ACIII	Santa Cruz
guineapig-anti-Cytokeratin 14 (CK14)	Santa Cruz
mouse-anti-GAP43 (Klon NM4)	H. Rösner, Hohenheim
rat-anti-NCAM (Klon H28)	H. Hildebrand, Hohenheim

Sekundäre Antikörper

donkey-anti-rabbit Cy5	Molecular Probes
donkey-anti-rat Cy3	Molecular Probes
donkey-anti-mouse Cy5	Molecular Probes
donkey-anti-mouse Cy3	Molecular Probes
donkey-anti-guineapig Cy3	Molecular Probes

Seren

normal goat Serum (NGS)	Dianova
normal donkey Serum (NDS)	Dianova

2.1.12 Duftstoffe

Benzaldehyd	Sigma
Heptanal	Sigma
(+)-Carvone	Fluka

2.1.13 Versuchstiere

Alle verwendeten Mauslinien wurden aus dem Institut für Physiologie der Universität Hohenheim bezogen.

Bezeichnung	Transgen
CD1 (Swiss)	Wildtyp
C57	Wildtyp
M55	OMP-GFP
RF2	mOR256-17-IRES-tauGFP

2.1.14 Software

Bearbeiten von Bildern	Powerpoint, Microsoft LSM 5 Image Examiner, Carl Zeiss
Bild-Aquise	AIM 510, Carl Zeiss
Erstellen von Abbildungen	Powerpoint, Microsoft
Erstellen von Diagrammen und Statistiken	Excel, Microsoft
Erstellen von Plasmidkarten	Vector NTI 10, Invitrogen
Erstellen von Primersequenzen	Vector NTI 10, Invitrogen
Sequenzanalyse	Bioedit, Ibis Biosciences BlastN, NCBI

2.1.15 Lösungen

6 x DNA-Probenpuffer:

0,5% Bromphenolblau

0,5% Xylencyanol

30% Glycerin

TAE Puffer:

40 mM Tris-Acetate

1 mM EDTA

Boratpuffer:

50 mM Borsäure

15 mM Natriumtetraborat

PBS:

137 mM Natriumchlorid

2,7 mM Kaliumchlorid

2 mM Kalium-*di*-hydrogenphosphat

10 mM *di*-Natriumhydrogenphosphat

auf pH 7,4 einstellen

PHEM:

60 mM PIPES

25 mM HEPES

10 mM EGTA

2 mM Magnesiumchlorid

mit Kaliumhydroxid auf pH 6,9 einstellen

PLP Fixierungslösung:

0,1 M Lysinmonohydrochlorid

1% Paraformaldehyd

10 mM Natriumperiodat

Lösung vor Gebrauch frisch ansetzen

Mowiol:

Mowiol diente zum Eindeckeln von Präparaten und wurde wie folgt hergestellt: 12 g Glycerin und 4,8 g Polyvinylalkohol 4-88 wurden in 12 ml Wasser kräftig verrührt und anschließend mit 24 ml 0,2 M Tris (pH 8,5) versetzt. Anschließend wurde das Gemisch für 16 – 20 h bei 53°C gerührt. Ungelöste Partikel wurden bei 5000*g für 20 min abzentrifugiert. Nach Zugabe von 0,1% Propylgallat als Antibleichmittel wurde das Gemisch bei -20°C aufbewahrt.

Methylzellulose (2% w/v):

Zur Herstellung einer 2%igen Methylzelluloselösung wurden 200 mg Methylzellulose zu 3,5 ml 80-90°C heißem destilliertem H₂O gegeben und mit dem Vortexer 30 s lang gemischt. Das Gemisch wurde anschließend schubweise und unter stetem Schütteln mit 6,5 ml eiskaltem destilliertem H₂O versetzt und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert.

CD-B27 (50x):

Zur Herstellung von „Charcoal depleted“ (CD) B27 wurden 200 µl 50x B27 serum-freies Supplement zunächst mit 4 mg dextran-beschichteter Aktivkohle (2% w/v) versetzt und in einem Überkopfschüttler bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 2000*g wurde der Überstand abgenommen und sofort zur Herstellung von CD-KM verwendet.

2.1.16 Kulturmedien und Puffer

Ringer:

138 mM Natriumchlorid
5 mM Kaliumchlorid
2 mM Calciumchlorid
1 mM Magnesiumchlorid
10 mM HEPES
10 mM Glucose
1 mM Natrium-Pyruvat
0,1% BSA

KCl-Ringer:

113 mM Natriumchlorid
30 mM Kaliumchlorid
2 mM Calciumchlorid
1 mM Magnesiumchlorid
10 mM HEPES
10 mM Glucose
1 mM Natrium-Pyruvat
0,1% BSA

LB-Medium:

1% Trypton
1% Natriumchlorid
0,5% Hefeextrakt

LB-Agar:

1,5% Agar
in LB-Medium

SOC:

2% Trypton
0,5% Hefeextrakt
10 mM Natriumchlorid
2,5 mM Kaliumchlorid
10 mM Magnesiumchlorid
10 mM Magnesiumsulfat
20 mM Glucose

Kulturmedium (KM):

0,4% (w/v) Methylzellulose
1 x B27 serum-freies Supplement
0,8 mM L-Glutamin
10 mM HEPES
5 µg/ml Gentamicin
in Neurobasal A

KM^{RA-MZ}:

1 x B27 serumfreies Supplement ohne Vitamin A
0,8 mM L-Glutamin
10 mM HEPES
5 µg/ml Gentamicin
in Neurobasal A

CD-KM:

0,4% (w/v) Methylzellulose
1 x CD-B27
0,8 mM L-Glutamin
10 mM HEPES
5 µg/ml Gentamicin
in Neurobasal A

NB27:

0,8 mM L-Glutamine
1 x B27 serum-freies Supplement
in Neurobasal A

OBKM:

OBKM stellt ein konditioniertes Medium mit den löslichen Faktoren von Explantaten des olfaktorischen Bulbus dar. Zur Herstellung von OBKM wurden 1 vol frisches KM mit 1 vol abzentrifugiertem Kulturüberstand von bereits kultivierten OB Explantaten vermischt und sofort verwendet. Das Kulturmedium der 1-2 Wochen alten OB Explantate wurde 3 Tage zuvor erneuert.

ACP-Färbemedium:

#1: 0,5 µl CoenzymA-Alexa647
1,0 µl 1 M Magnesiumchlorid
2,5 µl ACP-Synthase
96 µl KM^{RA-MZ} + 0,5% BSA

#2: 0,5 µl CoenzymA-Alexa647
1,0 µl 1 M Magnesiumchlorid
2,5 µl ACP-Synthase
96 µl KM

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Agarose Gelelektrophorese

Diese Methode wurde zur Analyse von DNA Fragmenten verwendet. Dazu wurden 5/6 vol DNA Lösung mit 1/6 vol 6 x Probenpuffer versetzt und die DNA Fragmente mit einem 1% Agarosegel in 1 x TAE Puffer bei 100 bis 200 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA wurde dem Agarosegel 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Anschließend wurde die DNA in einer Gel-Dokumentationseinheit mit UV Licht (302 nm) analysiert.

Qualitative und quantitative Analyse von DNA

Die Konzentration von gelösten Nukleinsäuren kann durch eine photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden (Sambrook et al., 1989). Die Extinktion von 1 OD₂₆₀ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wird über den Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm (OD₂₆₀/OD₂₈₀) ermittelt. Bei einer reinen DNA/RNA Lösung liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,2. Niedrigere Werte deuten auf eine Kontamination durch Proteine oder organische Lösungsmittel hin.

Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen mit Hilfe der "Polymerase-Kettenreaktion" (PCR)

Die Amplifikation von DNA durch PCR erfolgt mit Hilfe von Oligonukleotiden mit spezifischen Eigenschaften: Die Spezifität der Reaktion wird durch die Homologie der Primer zur jeweiligen Zielsequenz der DNA sowie über den GC-Gehalt der Primer bestimmt. Primer dürfen weder ausgeprägte Sekundärstrukturen bilden noch sollten sie mit sich selbst oder mit dem jeweiligen gemeinsam verwendeten Primer zur Dimerisierung neigen. Typischerweise werden synthetische Oligonukleotide mit einer Länge von 17 bis 18 bp und einem GC-Gehalt von ca. 50% eingesetzt. Zur Einführung von Restriktionsschnittstellen können entsprechende Nukleotidsequenzen zusätzlich zur genspezifischen Sequenz an die Primer angehängt werden. Die Reaktionsansätze setzen sich wie folgt zusammen:

- 1 x Reaktionspuffer (mit $MgCl_2$)
- 0,2 mM dNTP
- 0,4 μ M sense Primer
- 0,4 μ M antisense Primer
- 1 Unit DNA Polymerase

Die Temperaturprogramme variierten je nach verwendeter DNA Polymerase und sind untenstehend aufgelistet.

Eppendorf Mastertaq und Taq CORE-Kit von Qbiogen

Schritt	Zeit	Temp.
1: Denaturierung	5 min	94°C
2: Zyklische Denaturierung	30 s	94°C
3: Zyklisches Annealing	30 s	55°C
4: Zyklische Elongation	60 s	72°C
5: Finale Elongation	5 min	72°C
6: Abkühlen	unendlich	8°C

29x

PWO Polymerase

Schritt	Zeit	Temp.
1: Denaturierung	60 s	94°C
2: Zyklische Denaturierung	30 s	94°C
3: Zyklisches Annealing	30 s	60°C
4: Zyklische Elongation	2 min	72°C
5: Zyklische Denaturierung	30 s	94°C
6: Zyklisches Annealing	30 s	60°C
7: Zyklische Elongation	2 min + 5 s/Zyklus	72°C
8: Finale Elongation	5 min	72°C
9: Abkühlen	unendlich	8°C

9x

24x

Aufreinigung von DNA Fragmenten

Zur Aufreinigung von DNA Fragmenten bestimmter Größe wurden diese zunächst mit Hilfe eines 1% Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechende Bande mit einem gereinigten Skalpell ausgeschnitten und mit GeneClean II den Anweisungen des Herstellers folgend aufgereinigt. Die Elution erfolgte in bidest H₂O.

Das A-Tailing

Ein A-Tailing dient dem Anhängen von Adenin-Überhängen an PCR-Fragmente zur Verbesserung der Insertionsfrequenz bei der Ligation in den pGEM-T Vektor. Dazu wurde das aufgereinigte PCR-Amplifikat in einem 50 µl Ansatz in 1 x PCR Reaktionspuffer mit 2,5 µl 2 mM dATP und 0,5 Units Taq-Polymerase 20 min auf 72°C erhitzt und erneut mit dem GeneClean II Kit aufgereinigt.

Ligation

Unter Ligation versteht man die Verknüpfung von dsDNA Fragmenten mit komplementären Einzelstrangnukleotidüberhängen. Die Ligationsansätze (10 µl) setzten sich wie folgt zusammen:

- 1 x T4 DNA Ligasepuffer
- 100-200 ng geschnittener Vektor
- 100-200 ng geschnittenes Insert
- 1 Unit T4 DNA Ligase

Der Ansatz wurde auf Eis lagernd pipettiert und bei 14-16°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde zu der Ligation 1 µl 10 mM ATP zugegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach einem Inaktivierungsschritt bei 65°C für 10 min wurde die Ligation bis zur Transformation auf Eis aufbewahrt.

Herstellung elektrokompenter *E. coli* XL1blue

Die kompetenten Bakterienzellen wurden in Anlehnung an die von Hanahan entwickelte Methode hergestellt (Hanahan 1983). Dazu wurden 5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur (drei bis fünf Bakterienkolonien in 50 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C und 200 rpm im Warmluftschüttler) zu 500 ml LB-Medium in einen 1000 ml Schikanekolben gegeben und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD600 von 0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt, auf vier 250 ml Gefäße aufgeteilt und 15 min in der Zentrifuge bei 4000*g zentrifugiert. Danach wurden sie zweimal in eiskaltem, autoklaviertem, zweifach destilliertem Wasser (bidest) und einmal mit eiskaltem 1 mM HEPES gewaschen, vereinigt und in 2 ml 1 mM HEPES mit 10% Glycerin aufgenommen. Aliquote zu je 100 µl der kompetenten Bakterien wurden direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Transformation in *E.coli* XL1blue

Für die Transformation der Ampicillin- oder Kanamycin-Resistenz tragenden rekombinanten Vektoren wurden kompetente *E. coli* eingesetzt. Dafür wurden 3 µl des Ligationsansatzes mit 100 µl kompetenten Bakterien versetzt und 1 min auf Eis inkubiert. Zur Transformation wurden die Bakterien in eine eiskalte Metallküvette (Elektrodenabstand 0,2 cm) gegeben und für 4,3 bis 4,5 ms einer Spannung von 2 kV bei 200 Ohm und 25 µF ausgesetzt. Unmittelbar anschließend wurden die Bakterien für 45 min - 1 h bei 37°C in 1 ml SOC zum Aufbau der Resistenz kultiviert. 200 µl der Transformation wurden auf selektiven LB -Platten (LB-Medium mit 1,5% Agar und 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert. Zur blau-weiß-Selektion rekombinanter Kolonien wurden die Agar-Platten 2 h vor dem Ausplattieren mit 70 µl 100 mM IPTG in H₂O und 70 µl 2% X-Gal in DMSO beschichtet. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37°C über Nacht.

Einzelkolonie-PCR

Diese Methode wurde zur Selektionierung positiver Transformanten verwendet. Als positive Transformanten werden diejenigen *E. coli* Kolonien bezeichnet, welche ein Plasmid aufgenommen haben, welches das integrierte DNA Fragment in der korrekten Orientierung enthält. Zur Überprüfung wurde eine PCR durchgeführt, deren Reaktionsmix zunächst ohne DNA Template angesetzt wird. Als DNA Template dienen die Plasmide einer einzelnen Kolonie einer Transformation (siehe oben). Sense- und Antisense Primer wurden so gewählt, dass jeweils ein Primer spezifisch mit dem Vektor, der andere spezifisch mit dem integrierten DNA Fragment hybridisiert. Der Reaktionsmix (50 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

- 1 x MasterTaq Buffer
- 0,2 mM dNTP
- 0,4 µM Sense Primer
- 0,4 µM Antisense Primer
- 1 Unit MasterTaq Polymerase

Die getesteten Bakterienkolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und auf einer Kontrollplatte mit selektivem LB-Agar ausgestrichen. Der Zahnstocher mit den verbleibenden Bakterien wurde anschließend in den eiskalten PCR Reaktionsansatz getaucht und 1 min auf Eis inkubiert. Nach dem Entfernen des Zahnstochers wurde das Reaktionsgefäß in den Thermocyclerblock gestellt und das folgende Temperaturprogramm „Colony“ gestartet.

Schritt	Zeit	Temp.
1: Denaturierung	5 min	94°C
2: Zyklische Denaturierung	30 s	94°C
3: Zyklisches Annealing	30 s	55°C
4: Zyklische Elongation	60 s	72°C
5: Finale Elongation	5 min	72°C
6: Abkühlen	unendlich	8°C

29x

Mittels Agarose Gelelektrophorese wurde überprüft, ob ein PCR Fragment der korrekten Größe amplifiziert werden konnte. Positive Kolonien wurden anschließend von der Kontrollplatte in 3-5 ml selektivem LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Isolierung und Aufreinigung von rekombinanter Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde eine alkalische Lyse mit auf SDS basierender Fällung von genomischer DNA und Protein mit anschließender Sephaglasaufreinigung gewählt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Flexiprep Kit für Mini-Präparationen der Firma Amersham.

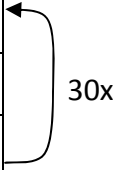
Sequenzieren klonierter DNA (nach Sanger)

Die nicht-radioaktiven Multi-Color-CE-DNA-Sequenzierungen wurden mit Hilfe des Dye-Terminator-Sequencing-Kits durchgeführt und mit einem automatischen Sequencer (ABI 310, Perkin Elmer) ausgelesen. Das „cycle Sequencing“ erfolgte in einem Volumen von 10 µl. Die Reaktion beinhaltete 400 ng Plasmid-DNA, 0,32 pmol Primer, 2 µl 5 x Sequenzierpuffer

(PE Applied Biosystems) und 0,5 µl BigDye- Terminator Ready Reaction Mix (PE Applied Biosystems). Der Ansatz wurde im Thermo-Cycler mit folgendem Profil inkubiert:

Programm Abi Prism, 30 Zyklen

Schritt	Zeit	Temp.
1: Denaturierung	30 s	96°C
2: Zyklische Denaturierung	10 s	96°C
3: Zyklisches Annealing	5 s	50°C
4: Zyklische Elongation	40 s	60°C
5: Abkühlen	unendlich	8°C



Durch Zugabe von 5 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 5 µl 125 mM EDTA (pH 8) und 150 µl 100%igem Ethanol wurde die Reaktion 15 min bei Raumtemperatur gefällt und bei 4°C und 3000*g in einer Tischzentrifuge für 30 min zentrifugiert. Anschließend wurde das DNA Pellet in 150 µl 70%igem Ethanol gewaschen und nochmals bei 4°C bei 1700*g zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Entfernen des Überstandes im Speed-Vac Konzentrator getrocknet und in 25 µl Lichrosolv Wasser bei 65°C für 2 min gelöst. 5 µl dieser Lösung wurden in weiteren 20 µl Lichrosolv Wasser verdünnt, in 0,5 µl Sequenzier-Gefäße (Sample Tubes, PE Applied Biosystems) überführt, mit Septen verschlossen (PE Applied Biosystems) und zur automatischen Sequenzierung gegeben. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte durch manuelle Kontrolle der ausgelesenen Sequenz in Bioedit.

Sequenzanalysen

Zur Identifizierung der klonierten Fragmente wurden die ermittelten Sequenzen mit Hilfe des Programms BlastN mit den in der Datenbank der NCBI zugänglichen Nukleotidsequenzen verglichen. Die Ähnlichkeit von Sequenzen zeichnen sich durch einen hohen HSP (high-scoring segment pair)-Wert zu den bekannten Sequenzen für olfaktorische Rezeptoren aus. Dieser HSP-Wert wird anhand des BLAST (basic local alignment search tool)-Algorithmus (Altschul et al., 1990) berechnet.

„Site-directed“ Mutagenese von DNA

Zur Generierung von Punktmutationen in der kodierenden Sequenz eines Gens wurde das „Quick change mutagenesis kit“ von Stratagene benutzt. Das Prinzip beruht darauf, dass eine PCR mit zwei komplementären Primern, die jeweils mittig die zu ändernden Nukleotidsequenzen besitzen, durchgeführt wird. Somit wird mit Ausnahme der Nukleotidsequenzen der Primer das gesamte zirkuläre Plasmid von der DNA-Polymerase synthetisiert. Das Originalplasmid, welches die Mutation nicht trägt, wird anschließend mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Dieses Enzym benötigt zur Restriktion eine methylierte Erkennungsstelle. Da eine *in vitro* DNA Polymerisation nicht-methylierte DNA produziert, bleibt der neu synthetisierte Strang unverdaut. Dieser wird anschließend in kompetente Bakterien transformiert und vermehrt.

2.2.2 Klonierung des Expressionsvektors mOR256-17-EGFP

Ausgehend von dem Plasmid mOR256-17-ETG (von R. Frei zur Verfügung gestellt) wurden mit Hilfe der PWO Polymerase in einer PCR mit den Primern mOR256-17 EcoRI fw (sense) und mOR256-17 BamHI kst rev (antisense) zusätzliche Restriktionsschnittstellen 5' und 3' an die kodierende Sequenz von mOR256-17 angebracht. Zusätzlich wurde das Stopcodon durch den antisense Primer entfernt, so dass eine fortführende Translation ermöglicht wurde. Nach Aufreinigung des amplifizierten DNA Fragments wurde ein A-Tailing durchgeführt und das DNA Fragment anschließend in den pGem-T Vektor ligiert. Nach Transformation in elektrokompetente *E. coli* XL1 blue wurde eine Einzelkolonie PCR mit den Primern T7 und Sp6 durchgeführt, um Kolonien mit korrektem Insert zu identifizieren. Positive Kolonien wurden in LB-Medium angeimpft und das Plasmid aufgereinigt. Anschließend wurde das mOR256-17 DNA Fragment mittels EcoRI und BamHI wieder ausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen verdauten Vektor pEGFP-N1 nach Aufreinigung ligiert. Nach Transformation in *E. coli* und Vereinzeln in Einzelkolonien auf LB-Agar Platten wurden diese mittels Einzelkolonie PCR durch Verwendung der Primer mOR256-17 EcoRI fw und pEGFP-rev auf die Anwesenheit von korrekt ligiertem Plasmid getestet. Eine positive Kolonie wurde gepickt und in selektivem LB-Medium vermehrt. Die Sequenz des entstandenen Expressionsvektors mOR256-17-EGFP wurde nach Aufreinigung durch Sequenzierung

verifiziert. Nach Bestätigung der korrekten Nukleotidsequenz wurden 0,1 ml der entsprechenden *E. coli* Kultur in 50 ml selektivem LB-Medium angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Die Aufreinigung des Expressionsvektors erfolgte anschließend mit dem Plasmid Midi Kit von Qiagen.

2.2.3 Klonierung des Expressionsvektors mOR256-17-RDY-EGFP

Zur Herstellung des Plasmids mOR256-17-RDY-EGFP wurde die kodierende Sequenz des mOR256-17 zunächst mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI aus dem Plasmid mOR256-17-EGFP herausgeschnitten und das entsprechende DNA Fragment mittels Agarose Gelelektrophorese und GeneClean II aufgereinigt. Ebenso wurde das Plasmid pBSKII geschnitten und aufgereinigt. Nach Ligation, Transformation und Aufreinigung des pBSKII-mOR256-17 wurde eine „site directed“ Mutagenese wie oben beschrieben mit den Primern 256-17 RDY fw und 256-17 RDY rev durchgeführt. Mittels DNA Sequenzierung konnte der erfolgreiche Nukleotidaustausch im mOR256-17 RDY DNA Insert verifiziert werden. Mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI wurde mOR256-17-RDY anschließend wieder ausgeschnitten und in den entsprechend verdauten pEGFP-N1 Expressionsvektor ligiert. Nach Transformation und Aufreinigung des Plasmids wurde die Korrektheit des Expressionsvektors mOR256-17-RDY-EGFP mittels DNA Sequenzierung bestätigt. Nach Bestätigung der korrekten Nukleotidsequenz wurden 0,1 ml der entsprechenden *E. coli* Kultur in 50 ml selektivem LB-Medium angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Die Aufreinigung des Expressionsvektors erfolgte anschließend mit dem Plasmid Midi Kit von Qiagen.

2.2.4 Präparation von Gewebeexplantaten

Um Mausembryonen eines definierten Embryonalstadiums zu erhalten, wurde ein Männchen mit Weibchen des jeweiligen Mausstammes für ein bis zwei Stunden in einem Käfig verpaart. Das Auftreten eines vaginalen Schleimpfropfens diente als Hinweis für eine erfolgte Befruchtung. Dieser Tag wurde als Embryonalstadium (E) 0 bezeichnet.

Um embryonale Explantate zu gewinnen wurde die schwangere Maus am entsprechenden Tag des Embryonalstadiums mittels zervikaler Dislokation getötet. Der Unterleib des Tieres

wurde anschließend mit 70% Ethanol grob desinfiziert, bevor die Bauchhaut mithilfe einer Schere geöffnet wurde und vom Bauchfell (Peritoneum) abgezogen wurde. Das Bauchfell wurde wiederum mit 70% Ethanol besprüht und mit frischem Präparationsbesteck so weit geöffnet, dass die paarigen Cornua uteri mit den darin enthaltenen Embryonen aus dem Unterleib der Maus gezogen werden konnten. Die Cornua uteri wurde dann von den Eileitern und dem Uteruskörper (Corpus uteri) getrennt und in eine mit kaltem L15 Medium gefüllte Petrischale überführt. Dort wurden die Embryonen aus der Cornua uteri und dem Amnion präpariert und dekapitiert. Die Embryoköpfe wurden dann in eine frische Petrischale mit kaltem L15 Medium überführt. Alle weiteren Schritte wurden unter der Sterilbank mithilfe eines Stereomikroskops durchgeführt.

Herstellung von Explantaten des olfaktorischen Epithels

Zur Präparation von olfaktorischen Epithelexplantaten wurde zunächst der Unterkiefer (Mandibula) vom restlichen Schädel abgetrennt. Anschließend wurde das nasale Septum zusammen mit den Turbinalen durch rostro-caudale Schnitte komplett aus dem Schädel herausgeschnitten, ohne das olfaktorische Epithel zu verletzen. Um Zugang zur nasalen Höhle zu gewinnen, wurde zunächst das ventral gelegene Gaumendach (Os palatinum) entfernt. Ausgehend von der ventralen Öffnung wurden mit einer spitz geschliffenen Lanzette die Turbinalen rechts und links vom Septum entfernt. Das Septum wurde anschließend in einen schwarzen Mikroskopiernapf überführt und das olfaktorische Epithel mithilfe einer runden, stumpf geschliffenen Lanzette abgeschabt. Durch Überstreichen des OE mit nur leichtem Druck der runden Lanzette wurde sichergestellt, dass das basal gelegene nasale Mesenchym dabei nicht angeschnitten wurde und somit eine Kontamination durch mesenchymale Zellen minimiert wurde. Abgeschabte OE Fragmente wurden durch visuelle Kontrolle selektiert und in einen frischen, mit NB27 gefülltem Mikroskopiernapf überführt. Dort wurden die OE Explantate mittels einer Lanzette in ca. 100 -200 µm große Stücke zerkleinert und bis zur Ausplattierung aufbewahrt.

Herstellung von Explantaten des olfaktorischen Bulbus

Um Explantate des olfaktorischen Bulbus zu gewinnen, wurde ebenfalls zunächst der Unterkiefer vom Embryokopf entfernt. Anschließend wurde die noch weiche Schädeldecke entlang der Mittellinie von posterior nach anterior aufgeschnitten und das Gehirn zusammen mit dem rostral anhängenden OB frei gelegt. Das Vorderhirn wurde an der gut sichtbaren Grenze zum OB abgeschnitten und entfernt. Die beiden Bulben wurden anschließend vorsichtig mit einer scharfen Lanzette von der sich entwickelnden cribriformen Platte abgelöst und in einen Mikroskopiernapf überführt. In diesem mit NB27 gefüllten Napf wurden jeweils ein OB Stück in 6-8 Fragmente zerkleinert und in Glasbodenschälchen ausgesät.

Um coronale Schnittexplantate des olfaktorischen Bulbus herzustellen, wurde der Embryoschädel wie oben beschrieben geöffnet, jedoch das gesamte Vorderhirn mit Cortex und anhängenden Bulben aus der Kopfhöhle entfernt. Das Gehirn wurde dann in einen mit 40-45°C warmen low-melting Agarose (5% w/v in HBSS⁻) gefüllten Plastiknapf gegeben. Nach dem Aushärten wurde der Agaroseblock zugeschnitten und mittels eines Acylatklebers (Uhu, Bühl/Baden, Deutschland) derart auf dem Probenhalter befestigt, so dass sich die Bulben nach oben orientierten. Der Probenhalter wurde anschließend in der mit kaltem HBSS⁻ gefüllten Pufferschale eines Vibratoms (VT1000S, Leica) befestigt, die während des Schneidevorganges durch Eis ständig gekühlt wurde. Mittels einer vibrierenden Rasierklinge (Frequenz 60 Hz, Vorschub 0,15- 0,20 mm/s) wurden 75 µm dicke, coronale Schnitte des OB angefertigt. Nach jedem Schneidevorgang wurden die Präparate aus der Pufferschale mithilfe eines Pinsels entfernt, von der Agarose befreit und in einem mit HBSS⁻ gefüllten Napf gesammelt.

2.2.5 Beschichtung der Glasbodenschälchen (GBS)

Sterile Glasbodenschälchen (WPI, 35 mm Durchmesser) wurden zunächst mit 200 µl einer 0,1% Polylysin Lösung für mindestens 3 h bei RT beschichtet. Anschließend wurde das Polylysin abgesaugt und die Schale mit 1 ml dest. H₂O gewaschen. Nach Absaugen des dest. H₂O wurde die Schale offen unter einer Sterilbank getrocknet. Polylysin beschichtete GBS wurden zusätzlich mit 200 µl einer Lamininlösung (10 µg/ml in HBSS⁻) überschichtet und für

3-4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Laminin abgesaugt und die Schale einmal mit 1 ml HBSS⁻ und einmal mit 200 µl NB27 gewaschen. Zuletzt wurde die Polylysin und Laminin beschichtete Fläche mit 150 µl Kulturmedium befüllt, bei 37°C bereitgestellt und am gleichen Tag verwendet.

2.2.6 Transfektion von DNA in olfaktorische Explantate

Zur Transfektion von Expressionsvektoren in Zellen des olfaktorischen Epithels wurden OE Explantate wie oben beschrieben hergestellt und 50 -100 Explantate in NB27 Medium gesammelt. Die Explantate wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 20 µg DNA (Endvolumen 200 µl) für 10 min bis 2 h bei 37°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann in eine Elektroporationsküvette gegeben und mittels eines Elektroporationsgeräts transfiziert. Im Anschluß wurden die Explantate in einen mit 2 ml NB27 Medium gefüllten Mikroskopiernapf gegeben. Intakte Explantate wurden mittels eines Stereomikroskops isoliert und wiederum in 2 ml frisches NB27 Medium gegeben. Die OE Explantate wurden dann in beschichtete GBS ausgesät und kultiviert.

2.2.7 Immuncytochemische Nachweise an *in vitro* Kulturen

Die Durchführung des immuncytochemischen Nachweises von spezifischen Proteinen wurde stets dem gleichen Ablauf folgend durchgeführt: Den initialen Waschschritten (2 x 5 min) folgte die Fixierung des Gewebes. Nach Auswaschen des Fixans (2 x 5 min) wurde das Gewebe optional permeabilisiert und geblockt, bevor die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte. Nach 3 Waschritten á 5 min wurde der sekundäre Antikörper inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten á 5 min wurden die Proben mit Mowiol überlagert und ein Deckglas (18 x 18 mm) zum Schutz über die Explantate platziert. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten in der Kulturschale, wobei 1-3 ml Waschpuffer, 200 µl Fixans und 100 µl Antikörperlösung verwendet wurden. Die Inkubationsschritte erfolgten mit geschlossenem Deckel und in dunkler Umgebung um eine Austrocknen und Ausbleichen zu vermeiden. Die Details der Inkubation bei Fixierung, Blockierung und Antikörperapplikation sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Bedingungen von Fixierung, Blockierung und Antikörperapplikation bei immuncytochemischen Untersuchungen

	Fixierung	Blockpuffer (BP)	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	Waschpuffer
GBC-3	1% PLP 10 min RT	2,25% Fischgelatine 0,1% TritonX100 20 min RT	mo- α -GBC-3; 1: 100 in BP über Nacht 4°C	dk- α -mo Cy3; 1:1000 in BP 1 h RT	PBS+ 0,05% Tween20
CK14	Methanol 5 min -20°C	-	gp- α -CK14; 1: 100 in 10% NDS 2 h RT	dk- α -gp Cy3; 1:1000 in 10%NDS 1 h RT	PBS
ACIII	4% PFA über Nacht 4°C	0,3% TritonX100 20 min RT	rb- α -ACIII; 1: 500 in 10% NDS 3 h 4°C + 2 h RT	dk- α -rb Cy5; 1:1000 in 10% NDS 1 h RT	PBS
GAP43	4% PFA 15 min RT	5% NDS, 4% BSA 0,02% Digitonin 45 min RT	mo- α -GAP43; 1: 100 in 10% NDS/NGS 2% BSA 2 h RT	dk- α -mo Cy5; 1:1000 10% NDS/NGS 2% BSA 45 min RT	PBS
βIII Tubulin	3,7% PFA 8 min RT	10% NGS, 4% BSA 0,02% Digitonin 30 min RT	mo- α - β III Tubulin 1:1000 10% NDS 2% BSA 2 h RT	dk- α -mo Cy5; 1:1000 in 10% NDS 1h RT	PHEM
NCAM	Methanol 5 min -20 °C	-	rt- α -NCAM; 1: 50 0,3 % TritonX100 10%NDS 1 h RT	dk- α -rt Cy3; 1:1000 10% NDS	PHEM

2.2.8 Bestimmung der maximalen Axonlänge

Zur Bestimmung des axonalen Wachstums wurden OE Explantat Kulturen mittels NCAM Immunfluoreszenz durch konfokale Laserscanning Mikroskopie digitalisiert und jedes Explantat und dessen axonale Ausläufer gleichmäßig in 30° große Sektoren unterteilt. Blind für die Kulturbedingungen wurde anschließend für jeden Sektor das Axon ermittelt, welches die größte Entfernung zum Explantat aufwies. Die Entfernung zwischen Axonende und Explantatrand wurde mit Hilfe der Software LSM Image Examiner ermittelt. Sektoren, die aufgrund eines nahegelegenen zweiten Explantats gestörtes oder nicht korrelierbares Axonwachstum aufwiesen, wurden nicht berücksichtigt. Mittelwert, Standardabweichung und einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) wurden mit Excel berechnet und graphisch aufgearbeitet.

2.2.9 Ca²⁺-Imaging

Aufbau der Messapparatur

Glasbodenschälchen, die für Ca²⁺-Imaging Experimente von OE Explantaten eingesetzt wurden, wurden vor der Laminin-Beschichtung mit einer ovalen Kammer (1,7 x 0,9 cm) aus Butyl-Methyl-Methacrylat (A. Muck, MPI Jena) ausgestattet. Die Kammer adhärierte wasserdicht auf die Glasoberfläche und erlaubte somit einen gleichmäßigen Flüssigkeitsstrom über die ovale Kulturfläche. Nach standardmäßiger Lamininbeschichtung konnten OE Explantate innerhalb der ovalen Kammer wie beschrieben kultiviert werden. Zur Ca²⁺-Messung wurde mit Knetmasse jeweils ein zu- und ableitender Schlauch (Durchmesser 1 mm, Novodirect) an den Rand des Glasbodenschälchens befestigt, so dass die Schläuche an den schmalen Enden der ovalen Kammer Flüssigkeit ein- bzw. ableiteten. Zu – und Ablauf wurden über eine Peristaltikpumpe geleitet, so dass ein konstanter Flüssigkeitsstrom in der ovalen Kammer erzeugt wurde. Der Zulauf wurde durch einen Vorratsbehälter mit Ringerlösung versorgt, wobei vor die Pumpe eine 5-Kanalverteilerleiste zwischengeschaltet wurde, so dass verschiedene Lösungen in den Flüssigkeitsstrom eingeleitet werden konnten.

Messung

Zur Visualisierung intrazellulärer Ca²⁺- Konzentrationen wurde der Farbstoff Rhod-2AM benutzt. Dazu wurden die kultivierten OE Explantate zunächst 5 min mit 1 ml Ringerlösung gewaschen und anschließend für 30 -60 min mit 500 µl Rhod-2 Färbelösung bei RT inkubiert. Die Rhod-2 Färbelösung wurde direkt vor Anwendung aus einer 4,6 mM Rhod-2AM Stocklösung (in 20% Pluronic F-127 in DMSO) durch 1000-fache Verdünnung in Ringer hergestellt. Nach zweimaligem Waschen mit 200-500 µl Ringer wurde das Glasbodenschälchen in den Mikroskoptisch eingespannt und der Zu- und Ablauf angebracht. Nach weiteren 15 min Inkubation in Ringer bei RT wurde mit der Messung begonnen. Während der Messung waren die Explantate einem konstanten Flüssigkeitsstrom von 50 µl Ringer pro Sekunde ausgesetzt. In diesen Flüssigkeitsstrom wurden mit Hilfe der Verteilerleiste die Duftstoff- und Kontrolllösungen eingeleitet. Als Duftstofflösungen wurden Benzaldehyd, Heptanal und (+)-Carvone verwendet, die jeweils ausgehend von einer

100 mM Stocklösung in DMSO in einer Konzentration von 100 μ M in Ringer verdünnt eingesetzt wurden. Zur Aktivierung der Adenylatcyclase III wurde Forskolin verwendet, wobei zusätzlich der Abbau von produziertem cAMP durch Inhibierung der Phosphodiesterase durch IBMX gehemmt wurde. 20 mM Forskolin und 0,5 mM IBMX wurden als Stocklösungen in DMSO bzw. Wasser angesetzt und direkt vor Anwendung mit Ringer auf 1-2 μ M Forskolin bzw. 10-20 μ M IBMX verdünnt und eingesetzt.

2.2.10 Acyl-Carrier-Protein (ACP) Markierung

Zur Markierung von ACP-Fusionsproteinen wurden entsprechend transfizierte OE Explantatkulturen für 30 min bei 37°C mit 100 μ l ACP-Färbemedium inkubiert, dreimal mit Neurobasal A Medium gewaschen und nach Zugabe von 500 μ l KM unmittelbar am LSM lebend betrachtet. Zum Blocken von Hintergrundfärbung wurde einerseits 0,5% BSA in KM^{RA-MZ} (10 min, 37°C) oder 5% FCS in KM (über Nacht, 37°C) eingesetzt.

2.2.11 Mikroskopische Analysen und Bildbearbeitung

Mikroskopische Analysen wurden mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie durchgeführt (LSM Meta 510, Zeiss). Folgende Objektive von Zeiss standen hierbei zur Verfügung:

Plan-Neofluar	5x/0,15
Plan-Neofluar	10x/0,3
Plan-Neofluar	20x/0,5
Plan-Neofluar	40x/1,3 Oil DIC
C-Apochromat	63x/1,2 W corr

Zur Anregung der Fluoreszenz verschiedener Fluorochrome konnten Laser mit folgenden Anregungswellenlängen benutzt werden:

Laser	Wellenlänge	Fluorochrom
Argon:	488 nm	GFP, EGFP
Helium-Neon 1:	543 nm	Cy3
Helium-Neon 2:	633 nm	Cy5

Zur Visualisierung von lebenden *in vitro* Kulturen wurden diese in Glasbodenschälchen kultiviert und mittels eines Axiovert 200 Mikroskops von Zeiss und konfokaler Laserscanningmikroskopie digitale Bilder produziert. Nicht fixierte Präparate wurden während der Aufnahme mittels einer Inkubationskammer bei 37°C gehalten. Von konfokalen Schnittebenen eines Bildausschnittes wurden mit dem Programm AIM 510 (Zeiss) γ -Projektionen erstellt und diese, falls die Größe einer zusammenhängenden *in vitro* Kultur dies erforderte, mit dem Programm Powerpoint (Microsoft) arrangiert. Zur Verdeutlichung entsprechender Befunde wurden teilweise γ -Projektionen des Fluoreszenzsignals mit der entsprechenden Schnittebene des Durchlichtkanals mit Hilfe des Programmes AIM 510 von Zeiss kombiniert. Helligkeit und Kontrast wurden mit Powerpoint eingestellt.

Ergebnisse

3.1 Optimierung der Kulturbedingungen zur Maximierung axonalen Wachstums

3.1.1 Bildung von axonalem Netzwerk auf Polylysin/Laminin Substrat

Frühere Arbeiten zur Etablierung von Explantatkulturen des olfaktorischen Epithels (OE) haben gezeigt, dass die Verwendung von Gewebe des Embryonalstadiums 14 (E14) das Wachstum von Axonen olfaktorischer Sinnesneuronen (OSN) *in vitro* prinzipiell ermöglicht (Goetze et al., 2002). Allerdings war unter den verwendeten Kulturbedingungen das Wachstum auf relativ wenige Fasern beschränkt, die zudem extrem stark gebündelt aus dem Explantat auswuchsen. Im Hinblick auf das Ziel, möglichst zahlreiche und langgestreckte axonale Ausläufer zu gewinnen, war es notwendig, das *in vitro* System entsprechend zu optimieren. Möglicherweise wurde das ungleichmäßige axonale Wachstum durch eine unregelmäßige Beschaffenheit des Wachstumssubstrats verursacht, welches aus Laminin-beschichteten Standarddeckgläsern bestand, die in Kulturschalen eingeklebt wurden. Daher wurden für die nachfolgenden Experimente erstmals speziell für die Embryonalkultur zertifizierte Glasbodenschälchen zum Einsatz gebracht. Zusätzlich zum bisher verwendeten Laminin wurde auch Polylysin als Beschichtungsmatrix für die Glasoberfläche eingesetzt, welches sowohl die Bindung von Proteinen (wie Laminin) erhöht (Das et al., 1989), als auch die Anheftung von Zellen an feste Oberflächen steigert (Leifer et al., 1984; Cannella und Ross 1987). Aus vielen Gewebeexplantaten des embryonalen olfaktorischen Epithels, die unter diesen neuen Bedingungen kultiviert wurden, konnte in der Tat bereits nach wenigen Stunden ein robustes Wachstum von Neuriten beobachtet werden. Nach 3 Tagen in Kultur bildeten diese ein dichtes Netzwerk um die Explantate (Abb. 1A). Die auswachsenden Neuriten zeigten dabei im Gegensatz zu den bislang verwendeten Kulturbedingungen eine deutlich geringere Tendenz zur Bildung von Faserbündeln.

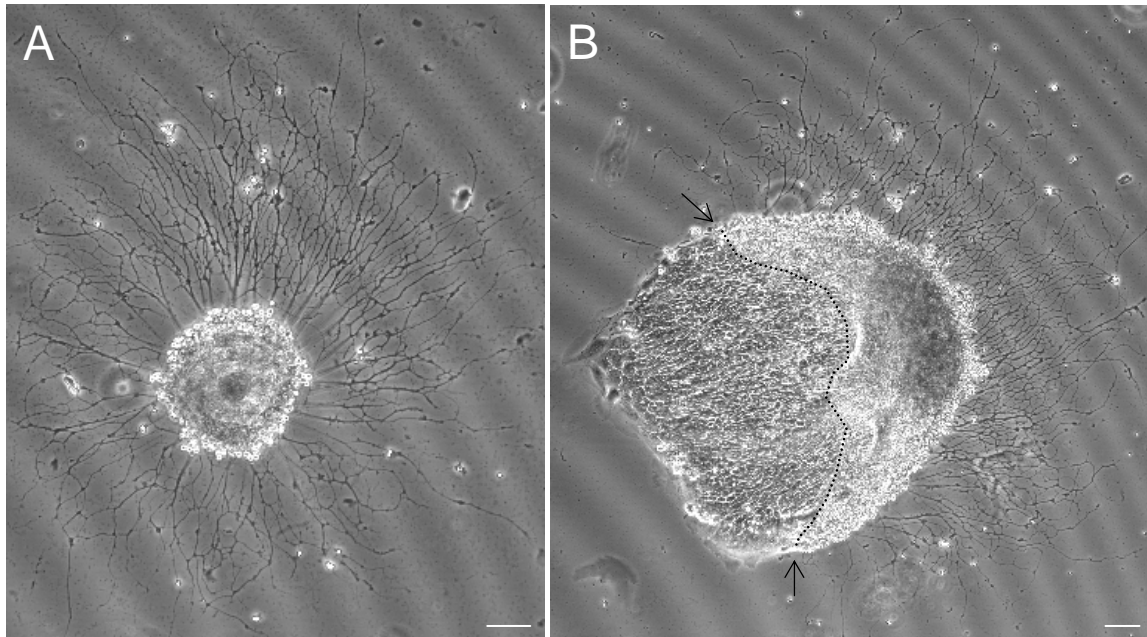


Abbildung 1: Explantate des embryonalen olfaktorischen Epithels

Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von adhärenente Explantaten des olfaktorischen Epithels (OE) präpariert von E14 Embryonen nach 3 Tagen Kultivierung auf Lamininsubstrat.

A, B: Nach dem Anheften der Gewebeexplantate sind zwei morphologisch unterscheidbare Explantattypen vorhanden. Zum Einen findet vom abgerundeten OE Explantat gleichmäßiges Auswachsen von Fortsätzen statt, die sich radiär auf dem Wachstumssubstrat ausbreiten (A). Des Weiteren sind OE Explantate vorhanden, in denen zwei Zellpopulationen vorhanden sind (B), die eine einschichtige oder mehrschichtige Struktur aufweisen (links bzw. rechts der gestrichelten Linie). Robustes axonales Wachstum kann nur ausgehend vom mehrschichtigen Teil des Explantates festgestellt werden (rechts von den Pfeilen). Messbalken: 50 µm

3.1.2 Einschichtige Zellpopulation in olfaktorischen Explantaten

Diese Verbesserungen hinsichtlich eines massiven und gleichförmigen Auswachsens von Neuriten aus den Explantaten waren allerdings nicht in allen Fällen zu beobachten. In einem recht hohen Prozentsatz (~20%) der Explantate war noch immer lediglich geringes Neuritenwachstum ausgeprägt (Abb. 1B).

Typischerweise bestanden diese Explantate zu großen Teilen aus einer einschichtigen Zelllage (s. linker Bereich in Abb. 1B). Der Anteil an darauf aufliegender Zellmasse, die offensichtlich zur Ausbildung von Neuriten befähigt war, war jeweils recht gering. Da ein relativ hoher Anteil von Explantaten mit einer solchen einschichtigen Ausprägung erhalten wurde, waren diese häufig in enger räumlicher Nähe zu Explantaten positioniert, die ein radiäres Neuritenwachstum aufwiesen. In der Mehrzahl dieser Fälle kam es überraschenderweise zu einer Beeinflussung des Neuritenwachstums.

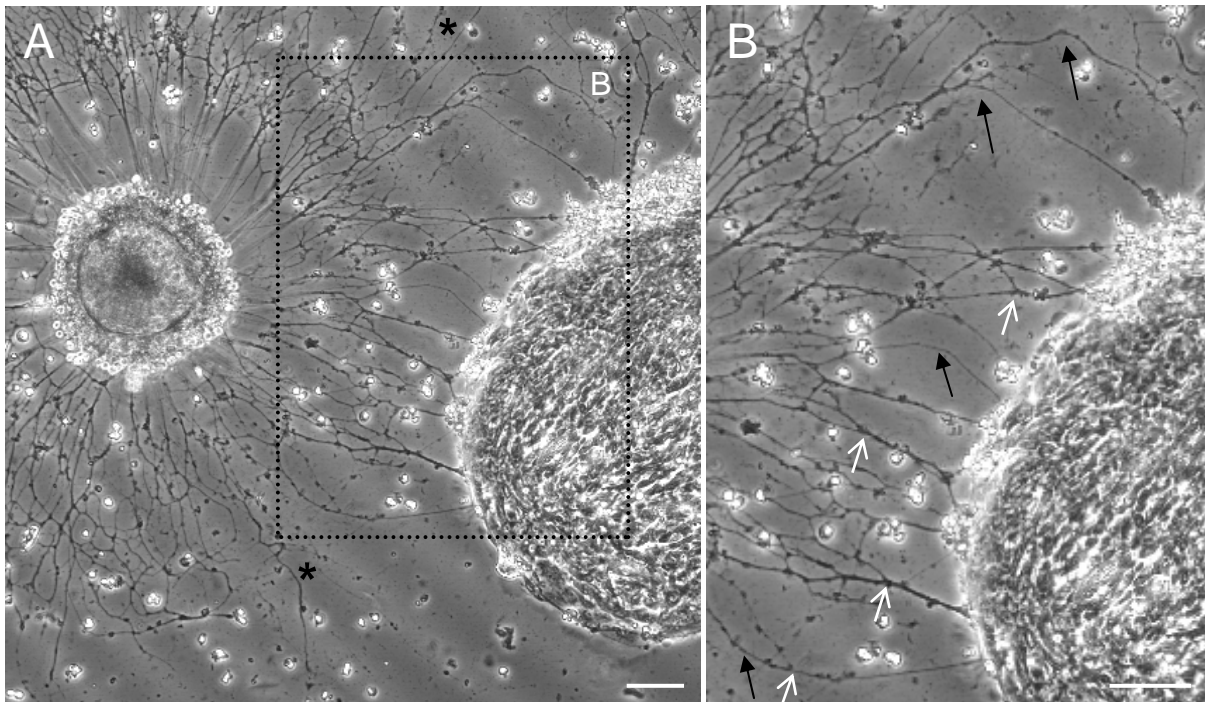


Abbildung 2: Beeinflusstes axonales Wachstum durch einschichtige Zellpopulation

Phasenkontrastaufnahme von zwei OE Explantaten ohne (links) und mit (rechts) einschichtiger Zellpopulation kultiviert für 4 Tage in geringer Entfernung.

A: OE Explantat ohne einschichtige Zellpopulation besitzt zahlreiche Neuriten, die strahlenförmig in alle Richtungen aus dem Gewebe auswachsen. Das einschichtige Explantat besitzt offensichtlich keine auswachsenden Fortsätze (siehe Bereich rechts unten). Axone, welche ausgehend vom linken Explantat tangential in Richtung rechtem Explantat wachsen, werden teilweise in die Richtung der einschichtigen Zellen abgelenkt (siehe auch B), während benachbarte Axone (Sterne) weiter geradeaus wachsen.

B: Vergrößerte Darstellung des umrahmten Bereiches in A verdeutlicht das Verhalten der Neuriten in unmittelbarer Nähe zum einschichtigen Explantat. Axone, welche seitlich am Explantat vorbeiwachsen, ändern ihre Richtung und wachsen auf den Randbereich zu (schwarze Pfeile). Zusätzlich ist eine Bündelung der in die Richtung des einschichtigen Explantats wachsenden Neuriten (weiße Pfeile) zu beobachten. Messbalken: 50 µm

Nach 3 Tagen in Kultur konnte eine deutliche Ablenkung von Neuriten in Richtung der einschichtigen Explantate beobachtet werden (Abb. 2A, B). Zudem war eine Tendenz zur Faszikulation von Neuriten, die in Richtung eines solchen Explantats wuchsen, zu erkennen (Pfeilspitzen in Abb. 2B). Es zeigte sich also, dass sowohl die Wachstumsrichtung als auch die Bündelung der Neuriten nicht unbeeinflusst blieben. Diese nach 3 Tagen in Kultur gemachten Beobachtungen waren nach längerer Zeit *in vitro*, z. B. nach 5 Tagen noch deutlich stärker ausgeprägt. Wie exemplarisch in Abb. 3 gezeigt, wurden die zunächst radiär aus einem Epithelexplantat ausgewachsenen Neuriten in der Nähe des einschichtigen Explantats zu wenigen Bündeln faszikuliert und stark in dessen Richtung abgelenkt. Der hier beobachtete Effekt der starken Bündelung von Neuriten und deren Änderung der Wachstumsrichtung deutete also auf eine starke Beeinflussung durch die einschichtigen

Explantate hin. In Hinblick auf die zu analysierenden Interaktionen auswachsender Axone mit ihrem Zielgewebe, dem olfaktorischen Bulbus, stellten sie daher eine Störgröße dar. Es sollte im Folgenden erreicht werden, ihre Anzahl in den Kulturen stark zu reduzieren.

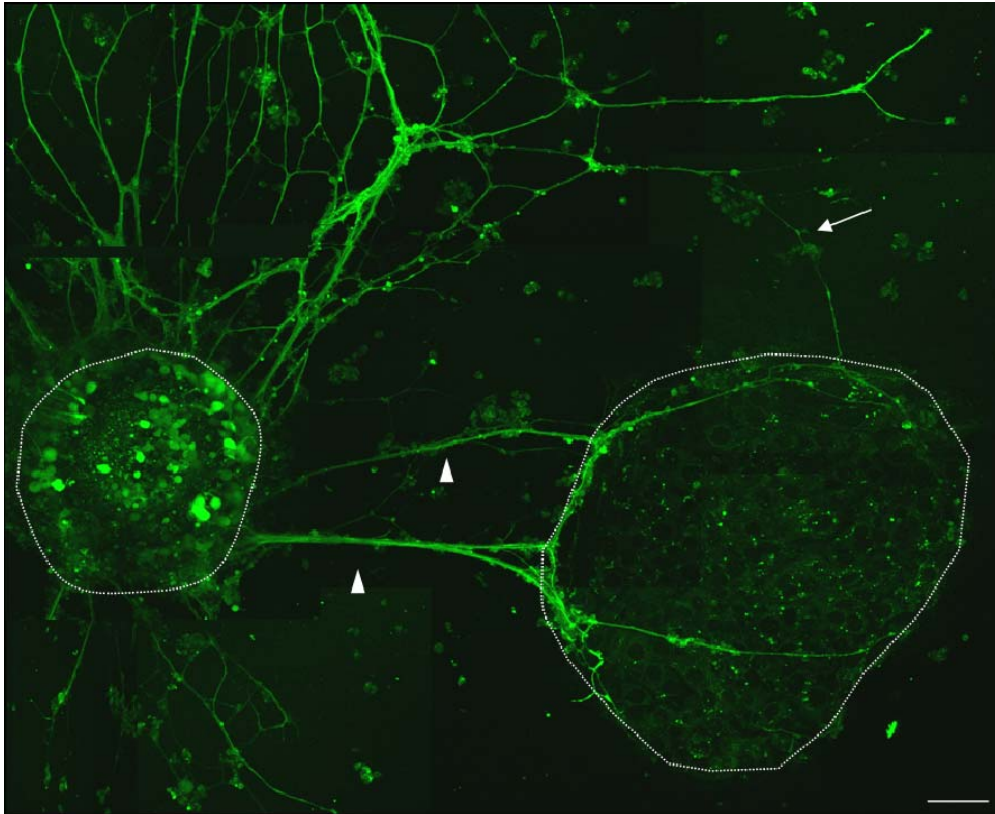


Abbildung 3: Drastische Bündelung von olfaktorischen Axonen in der Nähe einschichtiger Explantate

In vitro Kultur von OE Explantaten präpariert aus OMP-GFP Embryonen, die GFP in reifen olfaktorischen Sinneszellen (positiv für das olfaktorische Markerprotein (OMP)) exprimieren. Kultivierung von Explantaten ohne (links) und mit einschichtiger (rechts) Zellpopulation für 5 Tage und Visualisierung der endogenen OMP-abhängigen Fluoreszenz von OSN und deren Axone. Rechtes OE Explantat besitzt zahlreiche GFP-positive OSN und axonale Ausläufer, die eine starke Bündelung bei Wachstum in die Richtung des einschichtigen Explantats aufweisen (Pfeilköpfe). Seitlich gelegene Axone ändern teilweise drastisch ihre Wachstumsrichtung (Pfeil) und treffen auf die einschichtige Zellpopulation. OMP-GFP+ Axonbündel wachsen nach Kontakt seitlich am einschichtigen Explantat weiter, welches selbst keine OMP-GFP-positiven Zellen oder axonale Ausläufer aufweist. Messbalken: 50 μ m

Bei näherer Betrachtung von Kulturschalen, in die im Laufe einer Präparation Explantate ausgesät wurden, konnte ein zunehmender Anteil von einschichtigen Explantaten festgestellt werden. Es war erkennbar, dass nur in Kulturschalen, die innerhalb von 20 min nach Beginn der Präparation ausplattiert wurden, keines der Explantate (0/10) die unerwünschte einschichtige Struktur besaß (Abb. 4). Ihr Anteil nahm bei Explantaten, die zu späteren Zeitpunkten (30 min - 90 min) in Kultur gebracht wurden, deutlich zu (ca. 20 - 30% der Explantate). Dieses Ergebnis deutete daraufhin, dass die Dauer der Präparation ein

entscheidender Parameter war. Da innerhalb eines Zeitraums von ca. 20 min eine für die zu beantwortenden Fragen zu geringe Anzahl von geeigneten Explantaten hergestellt werden konnte, waren alternative Vorgehensweisen notwendig.

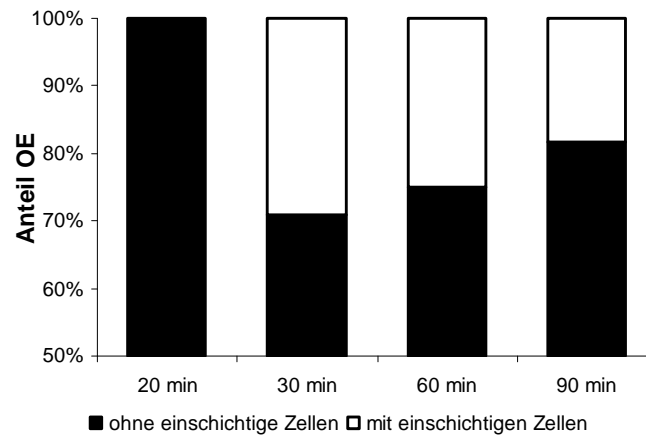


Abbildung 4: Verstärktes Auftreten von einschichtigen Explantaten zu späteren Zeitpunkten der Präparation

Vergleich der Anteile an OE Explantaten mit (weiße Balken) und ohne (schwarze Balken) einschichtiger Zellpopulation nach Abschaben und Ausplattieren zu den Zeitpunkten 20, 30, 60 und 90 min nach Beginn der Präparation. Der durchschnittliche Anteil beträgt 82% (+/- 11%), jedoch tritt eine große Streuung der Einzelwerte auf. Bei Ausplattierung nach 20 min sind 100% der Explantate (10/10) ohne einschichtige Zellen, nach 30 min nur noch 71% (12/17), nach 60 min 75% (15/20) und nach 90 min 82% (27/43).

3.1.3 Olfaktorische Stammzellen in einschichtigen Explantaten

Um Anhaltspunkte dafür zu erhalten, welche Ansätze bei der Reduzierung der einschichtigen Zellpopulation erfolversprechend sein könnten, wurde eine molekulare Phänotypisierung der Zellen in den einschichtigen Explantaten vorgenommen. Die Beobachtung, dass sie offensichtlich die unterste Schicht des isolierten zellulären Lagers des Riechepithels darstellten, legte die Vermutung nahe, dass es sich um die Basalzellpopulationen des olfaktorischen Epithels handeln könnte, die direkt der Basallamina aufliegen (Graziadei und Graziadei 1979a) und aus denen in der embryonalen Entwicklung und in der adulten Regeneration neue olfaktorische Sinnesneurone und Stützzellen ausdifferenzieren (Graziadei und Graziadei 1979b; Calof und Chikaraishi 1989; Caggiano et al., 1994; Huard und Schwob 1995). Sie untergliedern sich in Horizontale Basalzellen (HBZ) und Globöse Basalzellen (GBZ), wobei frühere Studien bereits zeigen konnten, dass die HBZ *in vitro* epitheloide Zellcluster bilden und sich teilweise zu Nachfolgezellen ausdifferenzieren (Mahanthappa und Schwarting 1993; Carter et al., 2004).

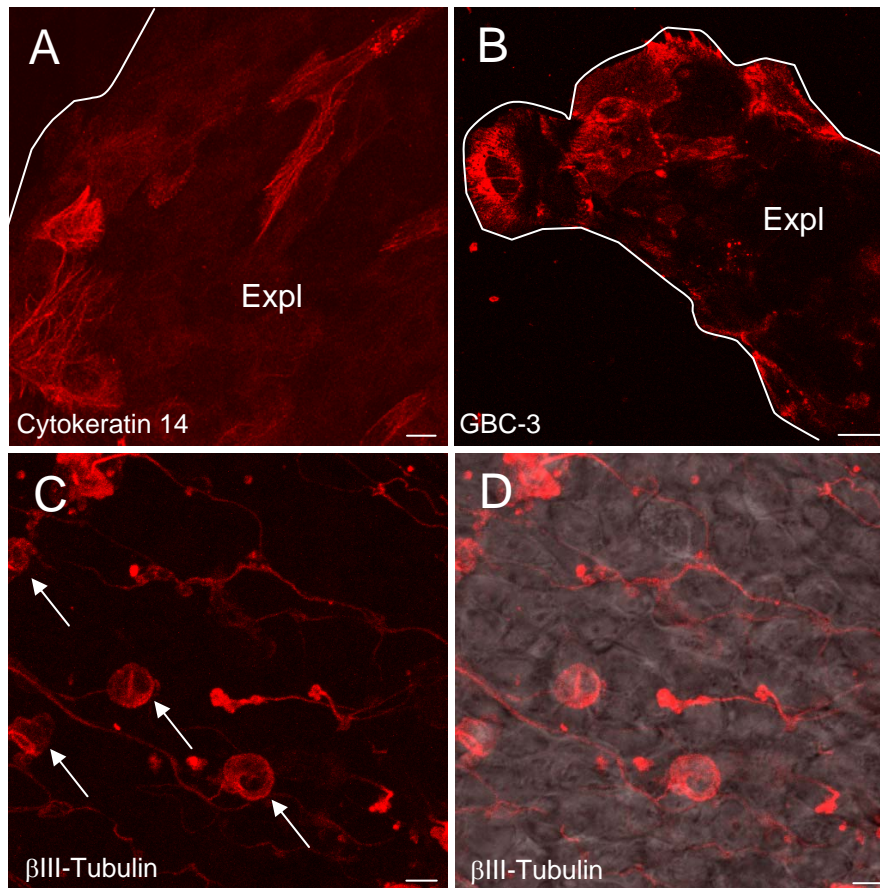


Abbildung 5: Olfaktorische Stammzellen und Neurone in einschichtigen Explantaten

Kultivierung von OE Explantaten mit einschichtiger Zellpopulation (Expl) und immunocytochemischer Nachweis von Cytokeratin 14 (CK14; Horizontale Basalzellen), GBC-3 (Globöse Basalzellen) und β III-Tubulin (Neurone).

A: Nach 7 Tagen in Kultur sind vereinzelte CK14 positive Zellen mit filamentöser Immunreaktivität vorhanden, die unregelmäßig im einschichtigen Explantat verteilt sind.

B: GBC-3 immunpositive Zellen sind meist an den Randbereichen eines epithelialen Explantats verteilt, kommen jedoch auch im Zentrum kultivierter Explantate (10 Tage *in vitro*) vor.

C, D: Nach 5 Tagen in Kultur befinden sich β III-Tubulin positive Neurone mit rundlichem Soma (C, Pfeile) oberhalb des dichten Zellrasens der einschichtigen Zellpopulation (siehe Überlagerung von Durchlichtkanal in D). Messbalken: A, C, D 5 μ m; B 10 μ m

Um zu klären, ob in den einschichtigen Explantaten tatsächlich olfaktorische Stammzellen vorhanden waren, wurden immunocytochemische Untersuchungen durchgeführt, um molekulare Marker für HBZ bzw. GBZ zu detektieren. Cytokeratin 14, ein Bestandteil des Cytoskeletts, welches im olfaktorischen System spezifisch in HBZ produziert wird (Getchell et al., 2000), konnte nach 8 Tagen Kultivierung als filamentöse Färbung in zahlreichen Zellen in den einschichtigen Explantaten nachgewiesen werden (Abb. 5A). Zur Klärung der Frage, ob auch GBZ in den Explantaten vorhanden waren, wurde ein immunocytochemischer Nachweis mit dem Antikörper GBC-3 durchgeführt, welcher ein spezifisch in GBZ vorkommendes Epitop erkennt (Jang et al., 2007). Spezifische Immunreaktivität von GBC-3 konnte in der Tat

ebenfalls in vielen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 5B). Somit zeigte sich, dass die olfaktorischen Stammzellen einen großen Anteil der Zellen in den einschichtigen Explantaten ausmachten; sie repräsentierten allerdings nicht den gesamten Pool an Zellen.

Es wurde daher untersucht, ob auch bereits differenzierte Zellen in solchen Explantaten enthalten waren. Hierzu wurde zunächst geprüft, ob β III –Tubulin, ein Neuronen-spezifisches β -Tubulin, nachweisbar war. β III –Tubulin Immunreaktivität konnte in der Tat in einigen abgerundeten Zellen (Abb. 5C; D) beobachtet werden. Mit dieser Färbung wurden auch β III –Tubulin positive Fasern sichtbar, die von den entsprechenden Zellen ausgingen. Diese verließen jedoch das einschichtige Explantat nicht (Daten nicht gezeigt) und waren somit nicht zur Analyse des axonalen Wachstums geeignet.

3.1.4 Reduzierung der einschichtigen Explantate

Die Ergebnisse zeigten also, dass sich in diesen Explantaten olfaktorische Stammzellen befanden, die offensichtlich eine starke Adhäsion zum Lamininsubstrat aufwiesen und axonales Wachstum massiv beeinflussten. Frühere Studien hatten bereits gezeigt, dass klonale *in vitro* Kulturen von dissoziierten HBZ eine ähnliche einschichtige Morphologie aufweisen und sich zu diversen olfaktorischen Zelltypen entwickeln (Carter et al., 2004); basierend auf diese Informationen war anzunehmen, dass die einschichtige Zellpopulation in dieser Arbeit aufgrund der initialen Adhäsion von HBZ verursacht sein könnte. Es wurde daher nach Möglichkeiten gesucht, diese zu minimieren. Eine Reihe von Studien haben gezeigt, dass in anderen Stammzellpopulationen das Fehlen der extrazellulären Matrix (ECM) zur Ausdifferenzierung *in vitro* führt (Zhu et al., 1999; Watt 2002); auch für HBZ wurde ein solcher Mechanismus diskutiert (Carter et al., 2004). Deswegen wurde geprüft, ob eine initiale Kultivierung der Explantate ohne das ECM Protein Laminin die Entstehung von einschichtigen Explantaten beeinflusst.

Da die Anwesenheit von Laminin als Oberflächensubstrat zum Auswachsen der Axone erforderlich war, wurde getestet, ob eine Inkubation der OE Explantate in Suspension für 2 h in Laminin-freiem Medium vor dem Aussäen in die Kulturschalen einen Effekt hatte. In der Tat führte dieses Vorgehen zu einer deutlichen Reduzierung des Anteils der einschichtigen Explantate auf ca. 5% (Abb. 6). Zeitgleich isolierte und sofort auf Laminin kultivierte Explantate wiesen hingegen einen wesentlichen höheren Anteil (~27%) dieser ungeeigneten Explantate auf. Dieses Ergebnis zeigte, dass eine Laminin-freie Vorkultivierung den Anteil der

Explantate mit gleichförmigem Neuritenwachstum so weit erhöhte, dass sie für die weiteren Untersuchungen geeignet waren.

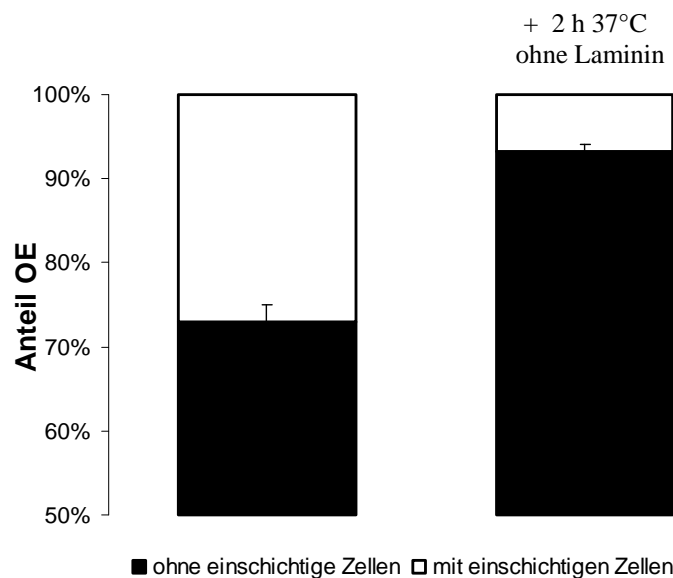


Abbildung 6: Geringerer Anteil an einschichtigen Explantate nach Laminin-freier Vorinkubation

Abschaben von OE Explantaten 30-60 min nach Beginn der Präparation und sofortiges Ausplattieren (links) bzw. 2 h Inkubation in NB27 ohne Laminin bei 37°C und anschließendem Ausplattieren (rechts) auf Laminin. Sofortiges Ausplattieren bewirkt einen höheren Anteil an einschichtigen Explantaten (73% +/- 2%, n = 2, 37 Expl.) während eine Vorinkubation in Laminin-freiem Medium den Wert auf 93,2% (+/-0,9%, n = 2, 30 Expl.) steigen ließ.

3.2 Generierung von reifen olfaktorischen Sinnesneuronen *in vitro*

Die bisherigen Befunde deuteten darauf hin, dass Faktoren, die *in vivo* in Differenzierungsprozesse von olfaktorischen Stammzellen involviert sind, auch in der Explantat-Kultur wirksam waren und unter geeigneten Bedingungen die Ausprägung der Explantatkulturen beeinflussten. Damit schien es möglich, dass *in vitro* elementare Differenzierungsprozesse, die zu reifen olfaktorischen Sinnesneuronen führen, ablaufen könnten.

Zur Klärung der Frage, ob es unter den *in vitro* Bedingungen zu einer Differenzierung von Vorläuferzellen zu reifen Sinnesneuronen kam, wurde eine transgene Mauslinie verwendet, in der unter Kontrolle des Promotors für das olfaktorische Markerprotein (OMP), einem Indikator für reife OSN (Margolis 1972; Keller und Margolis 1976), GFP exprimiert wird (Potter et al., 2001); reife Sinnesneurone können so durch ihre endogene GFP Fluoreszenz visualisiert werden.

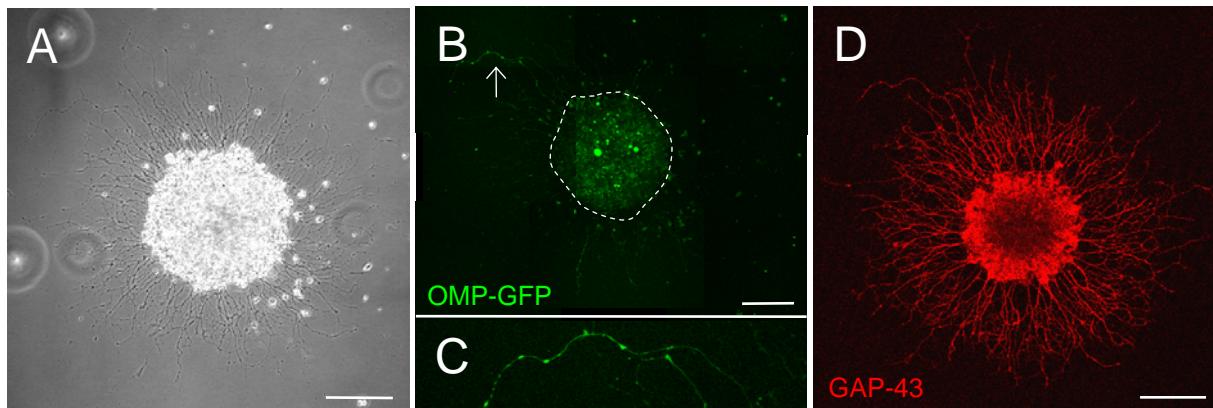


Abbildung 7: Robustes Axonwachstum von unreifen Neuronen

OMP-GFP OE Explantat (E14) nach 2 Tagen *in vitro* visualisiert durch Phasenkontrast (A), endogene GFP-Fluoreszenz (B, C) und GAP-43 Immunreaktivität (D).

A: OE Explantat sendet zahlreiche Fortsätze gleichmäßig in alle Richtungen aus.

B: Vereinzelt olfaktorisches Sinnesneuron und dessen Axon (Pfeil, vergrößerte Darstellung in C) sind durch endogene OMP-GFP Fluoreszenz visualisierbar. Der Großteil der Neuriten ist GFP-negativ.

D: Offensichtlich alle Fortsätze sind GAP-43 positiv und stellen wachsende Neuriten dar.

Messbalken: 100 μm

Explantate des OE, die aus dieser Mauslinie gewonnen wurden, entwickelten nach 2 Tagen in Kultur ein dichtes Netzwerk an Neuriten (Abb. 7A), welche gleichmäßig und radiär vom Explantat auswachsen. Eine GFP Fluoreszenz konnte allerdings nur in sehr vereinzelt Zellen innerhalb des OE Explantats festgestellt werden (Abb. 7B); entsprechend konnten nur wenige Axone mit intrinsischer GFP Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 7C). Es zeigte sich somit, dass die ausgewachsenen Neuriten nicht von reifen OSN gebildet wurden. Um zu prüfen, ob es sich um die Fortsätze unreifer Sinnesneurone handelte, wurde ein immunocytochemischer Nachweis von GAP-43 durchgeführt. Alle im Phasenkontrast (Abb. 7A) sichtbaren Fortsätze wiesen in der Tat eine starke GAP-43 Immunreaktivität auf (Abb. 7D), womit diese These bestätigt wurde.

Um zu testen, ob eine längere Kultivierung die Anzahl OMP⁺ OSN erhöhte, wurden die OE Explantate nach weiteren 3 Tagen *in vitro* untersucht. Nach insgesamt 5 Tagen in Kultur waren zahlreiche GFP⁺, d.h. OMP exprimierende Sinnesneurone innerhalb eines OE Explantats sichtbar (Abb. 8A), deren Morphologie (durch die endogene Fluoreszenz) typisch für OSN war. Die Kulturbedingungen ermöglichten also offensichtlich eine Differenzierung von Zellen zu reifen Sinnesneuronen.

In den meisten Explantaten waren die dendritischen Fortsätze dieser Zellen in Richtung auf das Zentrum des Explantats orientiert. An deren Ende war eine für OSN typische Verdickung, der sogenannte „Knob“ zu erkennen (Abb. 8A Pfeile). Unter den nun etablierten

Kulturbedingungen konnte also eine Differenzierung von Zellen zur vollständigen Reife erzielt werden. In der Umgebung des Explantats wurden nun auch zahlreiche GFP⁺ Neuriten sichtbar, welche gleichmäßig und radiär vom OE Gewebe auswuchsen. Am Ende zahlreicher solcher Fortsätze konnte mittels der GFP Fluoreszenz ein typischer Wachstumskegel visualisiert werden (Abb. 8B Pfeile, C, D). Da in diesen Explantatkulturen der dendritische Ausläufer der Zellen eindeutig als zum Zentrum ausgerichtete Struktur erkennbar war, konnten somit die peripher auswachsenden Neuriten als axonale Fortsätze definiert werden.

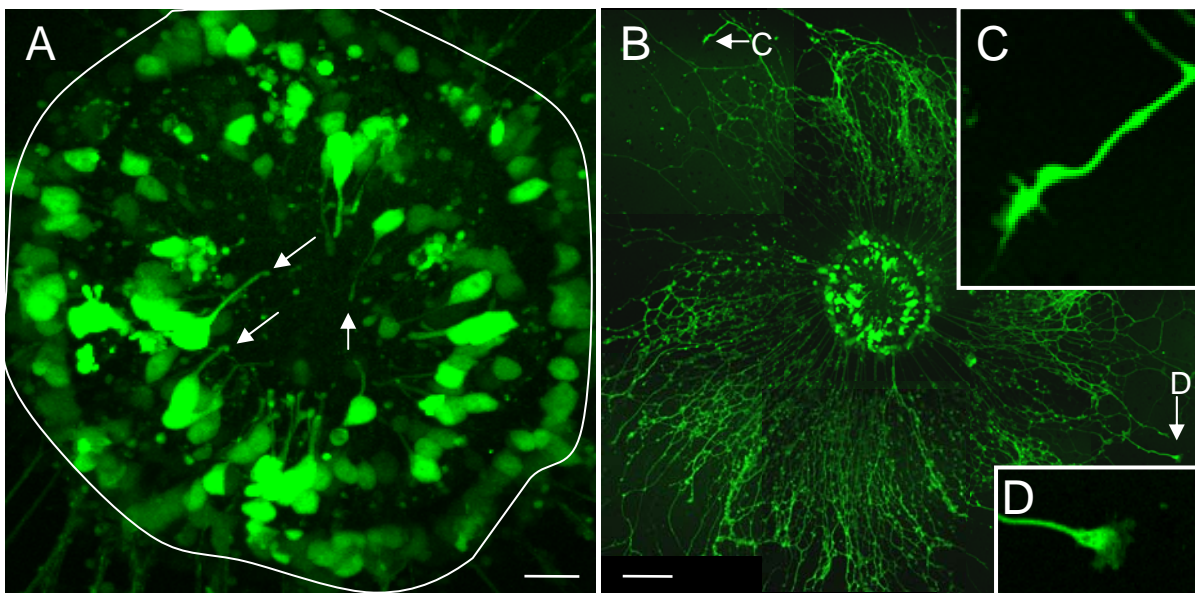


Abbildung 8: *In vitro* Generierung von zahlreichen olfaktorischen Sinnesneuronen nach 5 Tagen

OMP-GFP OE Explantat kultiviert für 5 Tage und lebend visualisiert durch endogene GFP Fluoreszenz.

A: Nach 5 Tagen in Kultur enthält OE Explantat eine Vielzahl an OMP-GFP positiven OSN. Durch die vorhandene GFP Fluoreszenz in Soma, Dendrit und Knob (Pfeile) ist die typische Morphologie von OSN deutlich zu erkennen. Messbalken: 10 μ m

B: OMP-GFP Fluoreszenz des in A gezeigten OE Explantats ist ebenso in offensichtlich allen Neuriten vorhanden, welche das Gewebeexplantat radiär in alle Richtungen verlassen und auf dem Lamininsubstrat wachsen. Die OMP-GFP positiven olfaktorischen Axone besitzen teilweise klar ausgeprägte Wachstumskegel an deren Enden (Pfeile). Messbalken: 50 μ m

C, D: Vergrößerte Darstellungen der in B mit Pfeilen gekennzeichneten Wachstumskegel.

3.3 Erhöhte Differenzierungsrate durch Retinsäure

Die bisherigen Daten zeigten, dass Zellen mit einem Potential zur Differenzierung in den Explantaten des OE enthalten waren und die sukzessiv optimierten Kulturbedingungen schließlich zur Ausbildung reifer Sinnesneurone führten. Um die Kulturen hinsichtlich ihrer Differenzierungskapazität weiter zu charakterisieren, wurde exemplarisch die Wirkung einer Komponente - der Retinsäure (RS)-, die *in vivo* die Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen und damit die Regeneration der OSN entscheidend beeinflusst, analysiert (Whitesides et al.,

1998; Yee und Rawson 2000; Asson-Batres et al., 2003). Dazu wurde die OMP abhängige GFP Fluoreszenz in Explantaten nach Zugabe von RS ermittelt. Es zeigte sich, dass 3 Tage nach Gabe von 10^{-6} M RS die durchschnittliche GFP Fluoreszenz einzelner OE Explantate gegenüber von Kontroll-Explantaten deutlich erhöht war (Abb. 9), was auf einen größeren Anteil an ausdifferenzierten OSN schließen ließ. Auch die Bestimmung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von RS-stimulierten OE Explantaten ergab eine signifikante Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität ($p < 0,05$). Auffällig hierbei war jedoch die große Variabilität in der Fluoreszenzintensität der RS-stimulierten Explantate gegenüber den Kontroll-Explantaten (Abb. 9C).

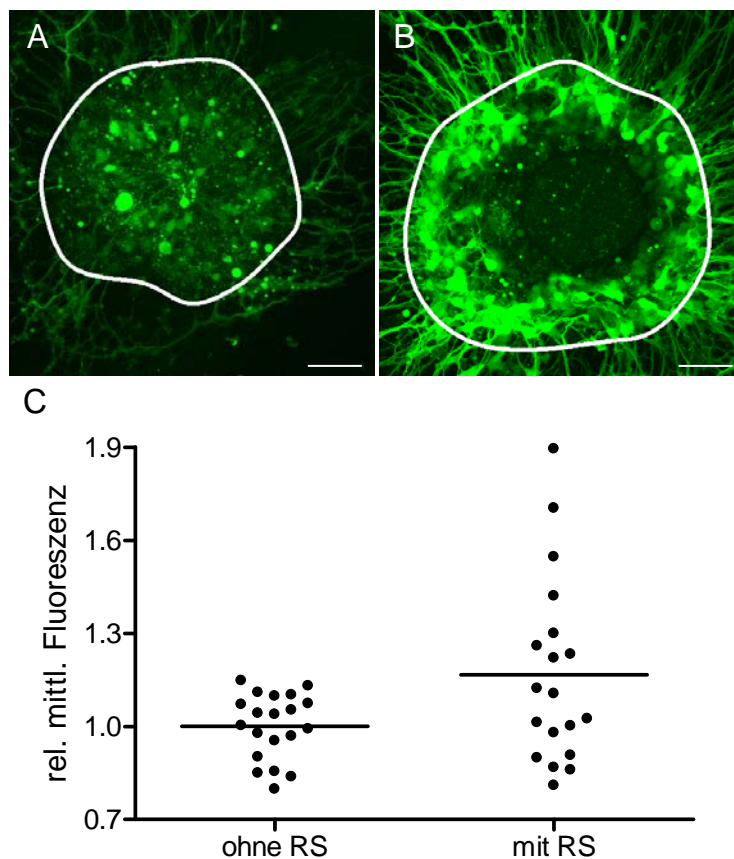


Abbildung 9: Selektiv erhöhte Differenzierung durch Retinsäure

Kultivierung von OMP-GFP OE Explantaten für 3 Tage in steroid-retinoid depletierten Medium ohne (A) bzw. mit Zugabe (B) von 10^{-6} M Retinsäure (RS) und Ermittlung der GFP Fluoreszenzintensitäten einzelner Explantate durch konfokale LSM unter identischen Aufnahmebedingungen. Weiße Linien markieren den Messbereich des Explantats, die GFP Fluoreszenz von auswachsenden Neuriten wurde nicht gemessen. Messbalken: 50 μ m

C: Zugabe von RS führte zu einer signifikant erhöhten Fluoreszenz von OMP-GFP Explantaten (n=19 Expl.) im Vergleich zu Kontroll-Explantaten (ohne RS, n=20, $p < 0,05$). Die Einzelwerte der in RS kultivierten OE Explantate wiesen eine signifikant verschiedene Varianz gegenüber der Kontrolle auf ($p < 0,0001$), was durch stark erhöhte Fluoreszenzintensitäten einzelner in RS kultivierter OE Explantate verursacht wurde. Die Minimalwerte von OE Explantaten beider Kulturbedingungen sind nahezu identisch. 42% (8/19) der in RS kultivierten Explantate besaßen mittlere GFP Intensitäten, die über dem Maximalwert der ohne RS gewachsenen OE Explantate lagen.

Diese Heterogenität deutete darauf hin, dass die Explantate auf die Gabe von RS sehr unterschiedlich reagiert hatten; dies bestätigte sich in der Betrachtung der einzelnen Explantate, von denen einige in der Tat eine deutlich erhöhte Fluoreszenz gegenüber den Kontrollen aufwiesen, während andere sich nicht davon unterschieden. Die Daten zeigten, dass RS eine selektive Wirkung auf distinkte Explantate besaß und nur dort zu einer deutlichen Erhöhung der Differenzierungsrate führte. Diese Ergebnisse korrelierten sehr gut mit früheren Beobachtungen *in vivo*, die eine regional begrenzte Wirkung der RS auf das Riechepithel von Mäusen zeigten (Whitesides et al., 1998).

3.4 Genexpression von Odorantrezeptoren *in vitro*

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass in den Explantatkulturen reife Sinnesneurone entstehen, stellte sich die Frage, ob sich diese Zellen zu den für das olfaktorische System typischen Sinnesneuronen mit distinkter Odorantrezeptor-Expression weiterdifferenzierten. Die Frage, ob es zur Expression eines definierten OR Gens in den kultivierten Zellen kam, ist entscheidend, da für die Etablierung der Projektion olfaktorischer Sinnesneurone in einen definierten Glomerulus ein funktioneller Rezeptor eine notwendige Voraussetzung ist (Wang et al., 1998; Serizawa et al., 2003; Lewcock und Reed 2004; Imai et al., 2006). Da von der Gesamtheit aller Sinnesneurone etwa jede tausendste Zelle mit einem definierten OR ausgestattet ist (Serizawa et al., 2000; Zhang und Firestein 2002), wurde für die diesbezüglichen Analysen eine OR Subpopulation ausgewählt, die *in vivo* zum Zeitpunkt der Präparation (E14) bereits in großer Anzahl vorhanden und in einer Region lokalisiert war, die ihre Isolierung ermöglichte. Frühere Studien haben gezeigt, dass Zellen, die den Rezeptor mOR256-17 exprimieren, diese Kriterien in idealer Weise erfüllen (Schwarzenbacher et al., 2004). Um die Zellen im lebenden Zustand visualisieren zu können, wurde eine neu generierte transgene Mauslinie eingesetzt, in der die mOR256-17 exprimierenden OSN zusätzlich das Markerprotein TauGFP produzieren (Luxenhofer et al., 2008); in den Zellen wird der fluoreszierende Marker durch Fusion mit dem Mikrotubuli assoziierten Protein Tau sowohl in das Axon, als auch in die Cilien transportiert. Es stellte sich also nun die Frage, ob dieses Rezeptorgen *in vitro* eingeschaltet wird. Nach Kultivierung von embryonalen OE Explantaten aus der mOR256-17-ITGFP Mauslinie für 3-4 Tage konnte in ca. 20-30% aller Explantate GFP Fluoreszenz detektiert werden, wobei jedes dieser Explantate durchschnittlich 2-3 solcher Zellen beinhaltete (Abb. 10A). Durch die TauGFP Markierung

wurden das Soma, ein einzelnes Axon und ein Dendrit mit Knob sichtbar. Bei genauerer Betrachtung des Knobs wurde erkennbar, dass sogar kurze ciliäre Strukturen ausgebildet waren, die von der Endigung des Dendriten ausgingen (Abb. 10B). Durch Verwendung dieser transgenen Mauslinie konnte somit gezeigt werden, dass es in einzelnen, wenigen Zellen zur Expression eines definierten OR Gens kam, die Zellen damit nicht nur die morphologischen Eigenschaften olfaktorischer Sinnesneurone besaßen, sondern auch deren charakteristischsten molekularen Marker, den OR ausprägten. Insgesamt konnten also die Kulturbedingungen soweit optimiert werden, dass OR spezifische Subpopulationen generiert wurden, von denen einzeln visualisierbare Axone aus den Explantaten auswuchsen, die anhand ihrer intrinsischen Fluoreszenz lebend beobachtet werden konnten.

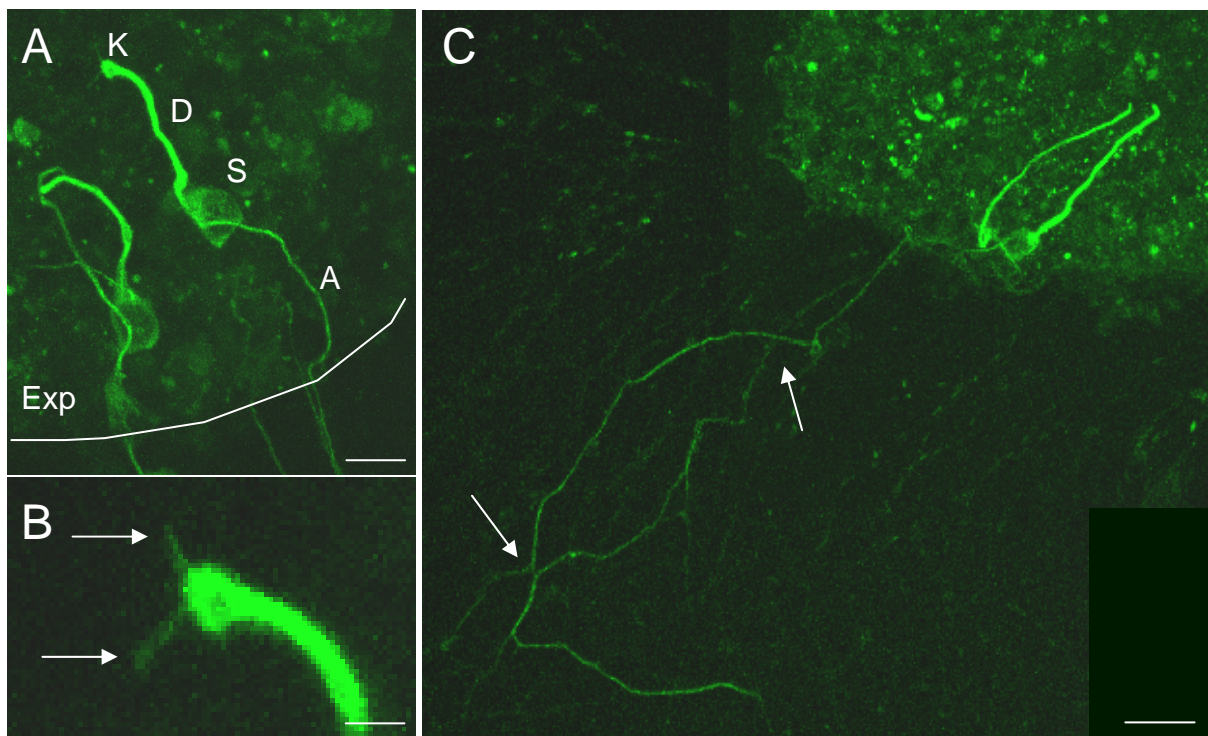


Abbildung 10: Odorantrezeptor mOR256-17 Expression in OE Explantaten

OE Explantate von RF2 Mausembryonen, welche das Transgen mOR256-17-IRES-TauGFP besitzen. mOR256-17 exprimierende OSN werden durch endogene GFP Fluoreszenz sichtbar.

A: Bereits nach 3 Tagen *in vitro* sind deutlich Soma (S) und Dendrit (D) mit Knob (Kn) zu erkennen. Ein einzelnes Axon (Ax) entspringt dem Soma und wächst aus dem Explantat. Messbalken: 10 μ m

B: Vergrößerte Darstellung des Knobs von Bild A zeigt zwei davon ausgehende cilienartige Strukturen (Pfeile). Messbalken: 2,5 μ m

C: Nach 4 Tagen *in vitro* sind wenige OSN je OE Explantat durch die OR spezifische mRNA Expression angefärbt. mOR256-17 positive OSN besitzen lange Axone, die bei Kontakt (Pfeile) getrennt weiterwachsen und keine Tendenz zur Faszikulation zeigen. Messbalken: 20 μ m

3.5 Ungebündeltes Wachstum OR-spezifischer Axone

Die bisherigen Befunde zeigten damit, dass *in vitro* elementare Prozesse der Differenzierung olfaktorischer Sinnesneurone durchlaufen wurden. Als nächstes wurde das Wachstum der Axone daraufhin analysiert, ob charakteristische Parameter der *in vivo* Situation dabei erhalten blieben. Analysen der letzten Jahre haben gezeigt, dass Axone, die sich auf dem Weg zum Zielgewebe, dem olfaktorischen Bulbus (OB) befinden, zunächst unsortiert innerhalb des olfaktorischen Nervs wachsen, so dass eine Durchmischung von Axonen mit unterschiedlicher OR-spezifischer Identität existiert (Key und Akeson 1993). Erst nach dem Durchtritt durch die Siebbeinplatte erfolgt eine Sortierung und rezeptorspezifische Faszikulation, bis die Axone von OSN mit identischem OR in einem distinkten Glomerulus zusammenlaufen (Key und Akeson 1993; Mombaerts et al., 1996; Treloar et al., 2003). Mit Hilfe der *in vitro* kultivierten OE Explantate konnten nun erstmals Axone mit OR-spezifischer Identität während verschiedener Phasen des Wachstums beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass Axone von mOR256-17 exprimierenden Zellen, die während des Wachstums außerhalb des Explantats in Kontakt miteinander kamen, nicht miteinander faszikulierten, sondern sich generell wieder voneinander trennten (Abb. 10C); d.h. es war keine Tendenz zur Bildung von OR-spezifischen Faszikeln zu erkennen. Dieser Befund deutete daraufhin, dass die Bildung von homotypischen Faszikeln im Bereich außerhalb des Zielgewebes nicht erfolgt, selbst wenn dies durch Kontaktaufnahme gleichartiger Fasern prinzipiell möglich wäre.

3.6 Kokulturen von Explantaten des OE und OB

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass in Explantaten des embryonalen olfaktorischen Epithels OR exprimierende reife Sinnesneurone generiert wurden, die robustes axonales Wachstum aufwiesen. Somit konnten entscheidende Voraussetzungen geschaffen werden, um durch Anwendung dieses *in vitro* Systems die Interaktionen zwischen den Axonen und ihrem Zielgewebe, dem OB, zu untersuchen.

3.6.1 Repulsion olfaktorischer Axone durch OB Neuriten

Die Prozesse, welche das initiale Einwachsen von Axonen in den olfaktorischen Bulbus während der Embryonalentwicklung steuern sind noch weitgehend unbekannt. Um die zugrunde liegenden Prinzipien näher zu charakterisieren, wurden Explantate des olfaktorischen Epithels zum Stadium E14 (E14 OE) zusammen mit Explantaten von Fragmenten des OB kultiviert (Abb. 11A).

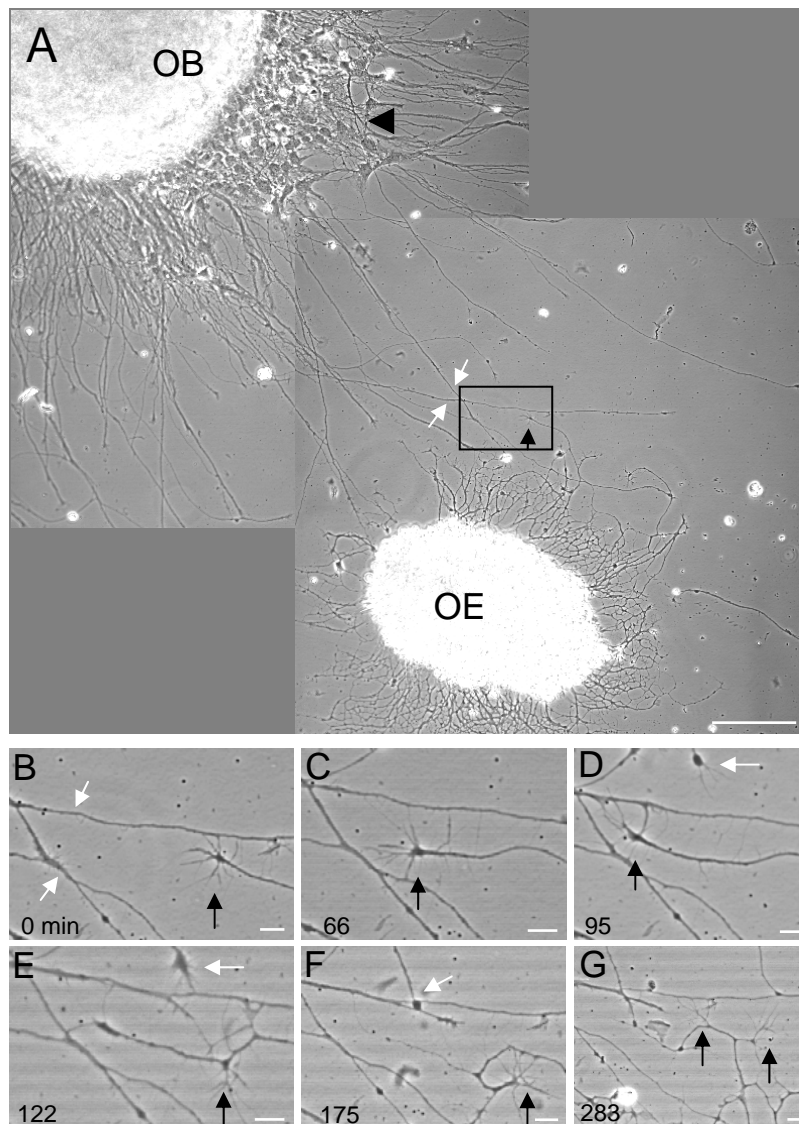


Abbildung 11: Kontakt-vermittelte Repulsion von olfaktorischen Axonen durch OB Neuriten

Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme einer 2 Tage alten *in vitro* Kultur mit zeitgleich präparierten OE und OB Explantaten vom Stadium E14.

A: Zahlreiche Neuriten wachsen sowohl aus dem OE und dem OB Explantat, massive Zellmigration ist jedoch nur aus dem OB Explantat zu beobachten (Pfeilspitze). Ein einzelnes Axon (schwarzer Pfeil) des OE Explantats wird auf seinem Wachstumsweg mit OB Neuriten konfrontiert (weiße Pfeile). Messbalken: 100µm

B – G: Vergrößerte Darstellungen der schwarzen Umrahmung in A zeigen eine Zeitserie eines einzelnen Axons mit Wachstumskegel (schwarze Pfeile) und zahlreichen Filopodien. Neuriten des OB befinden sich oberhalb und links (weiße Pfeile in B) vom Wachstumskegel des Axons. Das Axon wächst nicht über OB Neuriten hinweg oder faszikuliert mit diesen, sondern ändert die Richtung oder bildet neue Wachstumskegel (G, schwarze Pfeile). OB Neuriten sind in der Lage miteinander zu faszikulieren (D- F weiße Pfeile). Messbalken: 10 µm

Dabei wurden beide Gewebe gleichzeitig in Kultur genommen (Kokulturen). Bei dieser Kultivierungsmethode konnte bei beiden Explantaten von Beginn an ein intensives Auswachsen von Neuriten beobachtet werden. Axone der OSN bildeten zunächst ein gleichmäßiges, verzweigtes Netzwerk um das Explantat; auch aus den OB Explantaten waren nach 2 Tagen eine Vielzahl von Neuriten ausgewachsen, die offensichtlich länger und unverzweigter waren (Abb. 11A). Außerdem konnten zahlreiche Zellen beobachtet werden, die aus dem OB Gewebe auf das Wachstumssubstrat ausgewandert waren (Abb. 11A Pfeilspitze). Die Interaktion von olfaktorischen Axonen mit Neuriten des OB führte zu einem sehr charakteristischen Wachstum der OSN Axone. Wie exemplarisch an einem Wachstumskegel (WK) eines solchen Axons gezeigt (Abb. 11A schwarzer Pfeil), welcher von Neuriten des OB (weisse Pfeile) umgeben ist, wurde dieser offensichtlich von den Neuriten beeinflusst (Abb. 11B-F). Zu Beginn berührten mehrere Filopodien (Abb. 11B schwarzer Pfeil) einen Neuriten des OB (Abb. 11C weisse Pfeile) und das Axon wuchs im Folgenden an diesem entlang (Abb. 11C, D), bis es an einem weiteren Neuriten des OB stoppte (Abb. 11D, E). Im Anschluss daran bildeten sich an diesem Axon weitere Wachstumskegel (Abb. 11F, G schwarze Pfeile) und die initiale Wachstumsrichtung des Axons wurde verändert; der Kontakt mit den Neuriten des OB resultierte schließlich in einem Wachstum in die entgegengesetzte Richtung. Eine Faszikulation oder ein Überkreuzen von OE Axonen und OB Neuriten konnte in keinem Fall beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigten exemplarisch, dass die aus dem olfaktorischen Bulbus des Embryonaltags 14 innerhalb von 2 Tagen ausgewachsenen Neuriten auf Axone des gleichaltrigen OE nach Kontakt repulsiv wirkten.

3.6.2 Generelles repulsives Verhalten gegenüber OB Gewebe

Um zu prüfen, ob das repulsive Verhalten ein generelles Prinzip der Interaktion darstellte, wurden entsprechende Kokulturen von E14 Embryonen nach 4 Tagen analysiert. Wie in Abbildung 12A zu erkennen ist, generierten beide Explantate in Kultur zahlreiche Ausläufer; die Axone der OE Explantate konnten dabei selektiv anhand ihrer OMP-GFP Fluoreszenz von den OB Neuriten unterschieden werden (Abb. 12C). Die aus dem OE Explantat auswachsenden Axone zeigten dabei ein sehr charakteristisches Wachstum: Axone die in einem stumpfen Winkel auf das OB Explantat hinwuchsen (Abb. 12B unten), wurden schließlich vom Explantat weggelenkt (Pfeile), während Axone, die von einem dem OB entgegengesetzten Teil des OE Explantats stammten keine Änderung der

Wachstumsrichtung zeigten. GFP⁺ Fasern, die direkt auf die OB Neuriten zuwuchsen, wurden in ihrem Wachstum offensichtlich stark inhibiert (Abb. 12B Stern); in diesem Bereich war nur eine sehr diffuse GFP-Fluoreszenz zu erkennen, die entsprechenden Axone schienen dort zu kollabieren.

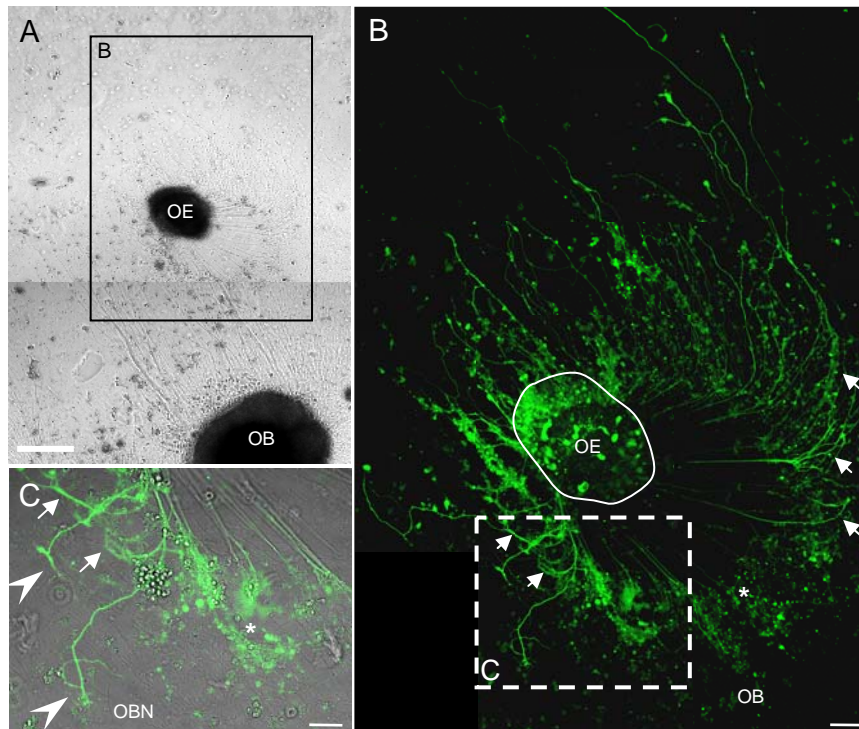


Abbildung 12: Abstoßung olfaktorischer Axone durch E14 OB Gewebe

In vitro Kultur von OE und OB Explantaten aus OMP-GFP Mausembyonen (E14) nach Kokultivierung für 4 Tage
 A: Durchlichtmikroskopische Aufnahme von OE und OB Explantaten. Explantate haben zahlreiche Neuriten gebildet, die das umgebende Substrat bewachsen. Messbalken: 200 μ m

B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des umrandeten Ausschnittes in A zeigt OMP-GFP⁺ Axone von reifen OSN, die in alle Richtungen aus dem Explantat wachsen. Axone auf der dem OB zugewandten Seite (unten, OB) zeigen gestörtes Wachstumsverhalten; Axonendigungen und Wachstumskegel sind nicht zu erkennen (Stern, siehe auch C), im Gegensatz zu Axonen, die auf der gegenüberliegenden Seite wachsen. Axone, die seitlich aus OE Explantat auswandern, vollziehen meist eine Änderung ihrer ursprünglichen Wachstumsrichtung und bewegen sich vom OB Explantat weg (Pfeile). Messbalken: 50 μ m

C: In der Kombination der GFP Fluoreszenz mit dem Durchlichtbild des in B gestrichelten Bereiches sind zahlreiche GFP negative Neuriten (OBN) zu erkennen, die vom OB Explantat stammen. Nur 2 OMP-GFP⁺ Axone des OE wachsen über die OB Neuriten in Richtung OB.

Messbalken: 20 μ m

3.6.3 Einwachsen weniger olfaktorischer Axone in OB Explantat

Die bisherigen Analysen deuteten also darauf hin, dass die Mehrzahl aller Axone eines OE Explantats von Explantaten des OB entweder nicht beeinflusst wurden oder sogar von ihnen abgestoßen wurden, sobald sie die Neuriten des OB erreicht hatten. Nur wenige Axone von OSN zeigten eine klare Tendenz, zu den OB Explantaten hin zu wachsen (Abb. 12C).

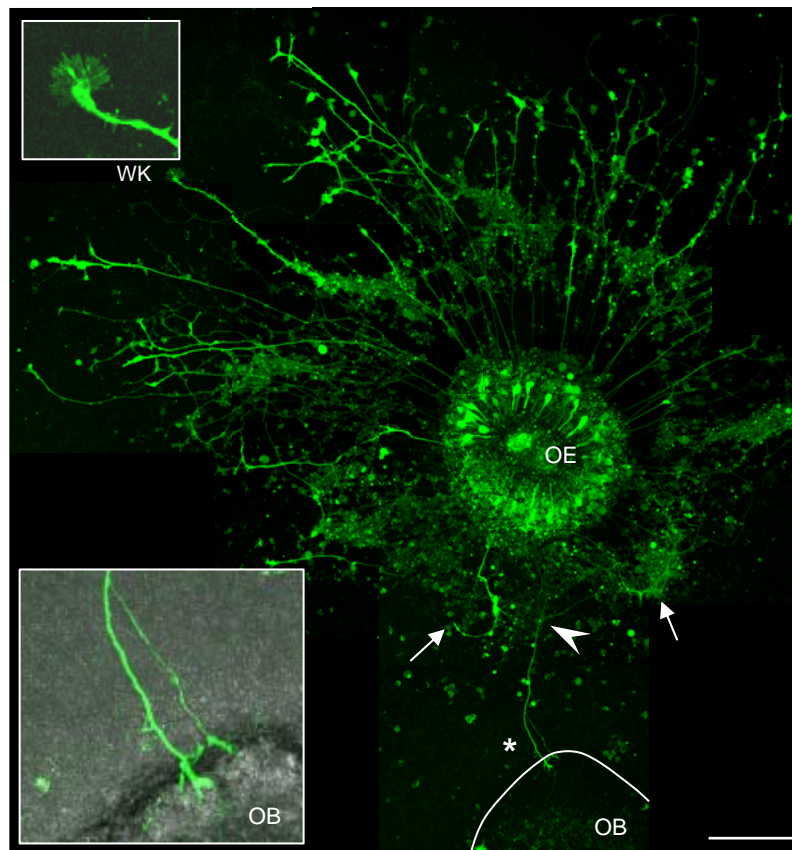


Abbildung 13: Vereinzelter Einwuchs von olfaktorischen Axonen in OB Gewebe

Kultivierung eines OMP-GFP OE Explantats für 6 Tage in der Nähe eines OB Explantats.

GFP Fluoreszenz zeigt deutlich asymmetrisches Wachstumsverhalten von Axonen des OE. Axone, welche auf der dem OB entgegengesetzten Seite aus dem OE Explantat auswachsen, besitzen meist einen deutlich sichtbaren Wachstumskegel (WK, siehe vergrößerte Ansicht links oben) und langes axonales Wachstum. Solches axonales Wachstum ist auf der dem OB zugewandten Seite nicht zu erkennen. Nur wenige GFP⁺ Axone sind in der unteren Region sichtbar, die teilweise abdrehen (Pfeile) oder in Richtung OB wachsen, faszikulieren (Pfeilspitze) und eindringen (Stern; siehe auch vergrößerte Ansicht rechts unten). Durch Kombination von Durchlicht und GFP-Fluoreszenz wird deutlich, dass vor und bei OB Einwuchs der OMP-GFP⁺ Fasern ein Aufsplitten dieser stattfindet. Messbalken: 100 µm

Um zu charakterisieren, in welcher Weise solche Axone weiter mit den OB Explantaten interagierten, wurden OE/OB Kokulturen nach 6 Tagen analysiert. Nach dieser Kultivierungsperiode hatte das Längenwachstum der Axone in der Regel noch zugenommen. Der Effekt der Wachstumsinhibition von Axonen im Kontaktbereich der OB-Explantate war auch in diesen Kulturen durchgehend zu beobachten (Abb. 13). Auch zu diesem Zeitpunkt waren jedoch vereinzelt GFP⁺ Fasern in der dem OB Explantat zugewandten Region detektierbar, die nun z.T. größere Faszikel (Pfeilspitze) bildeten und in das OB Gewebe (Stern) einwuchsen. Bei genauerer Analyse solcher Faser-Bündel (Abb. 13 Vergrößerung links unten) konnte in der Regel eine Defaszikulation von Axonen festgestellt werden, von denen einzelne in das OB Explantat einwachsen konnten, während andere Fasern noch vor dem OB ausscherten und nicht einwuchsen.

3.6.4 Reorientierung einwachsender Axone innerhalb des OB Explantats

Die bisherigen Analysen ergaben, dass die Anzahl an Axonen, die in Richtung eines OB Explantats wuchsen, sehr gering war. In einigen wenigen Fällen wurde jedoch ein gegenteiliges Phänomen beobachtet; hier kam es zu einer massiven Attraktion von Axonen durch ein Bulbus-Explantat und auch zu einem entsprechenden Einwachsen von GFP⁺ Axonen (Abb. 14A). In solchen Fällen konnte zunächst eine starke Faszikulation von GFP⁺ Axonen beobachtet werden; aus diesen Bündeln lösten sich danach nur noch vereinzelt Fasern (Pfeilspitzen). Zur Klärung der Frage, ob diese Axone tatsächlich in das OB Gewebe einwuchsen oder sich lediglich zwischen der Oberfläche der Kulturschale und dem OB Explantat befanden, wurden Z-Projektionen angefertigt, die eine seitliche Ansicht und somit eine Visualisierung von auf- bzw. absteigenden GFP⁺ Fasern ermöglichten (Abb. 14B).

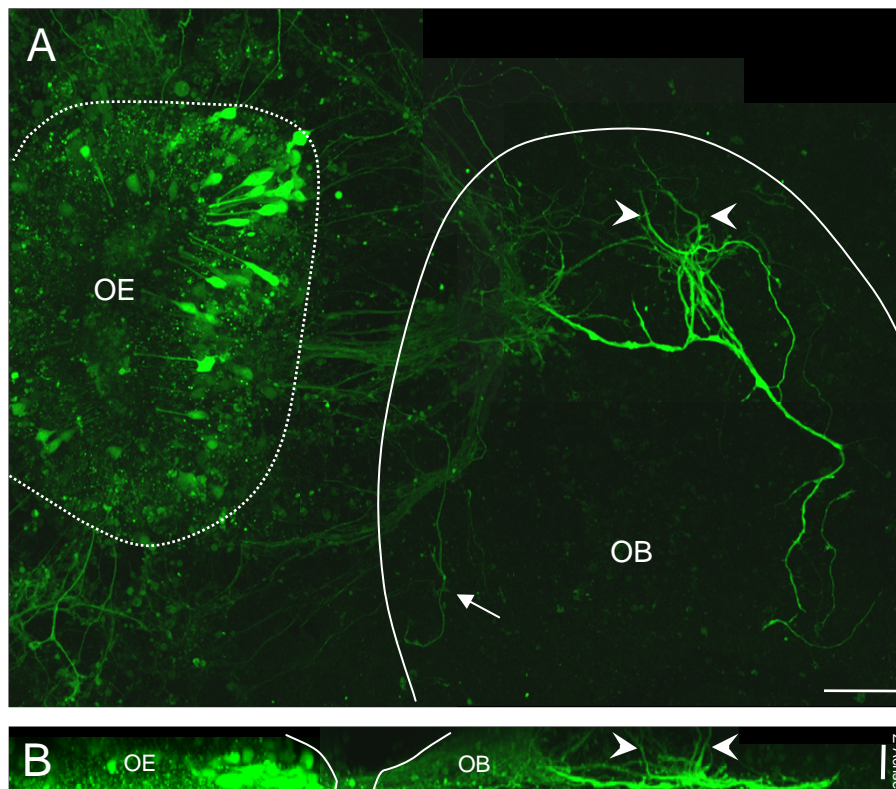


Abbildung 14: Reorientierung olfaktorischer Axone innerhalb des OB Gewebes

A: OMP-GFP OE Explantat in direkter Nähe zu OB Explantat für 6 Tage kultiviert und mit Einwuchs zahlreicher, dem OB anliegender Axone. Axone konvergieren teilweise im OB Gewebe, wachsen anschließend als Bündel weiter, während jedoch einzelne Fasern gelegentlich ausscheren (Pfeilspitzen). Nicht alle Axone aus derselben Region des OE Explantats folgen der anfänglichen Konvergenz, sondern orientieren sich von Beginn an individuell (Pfeil). Messbalken: 50µm

B: Projektion der GFP Fluoreszenz aus Bild A entlang der Z-Achse und somit räumliche Ansicht. GFP⁺ Axonbündel innerhalb des OB Gewebes zeigt ein 3-dimensionales Wachstum einzelner GFP⁺ Fasern (Pfeilspitzen). Messbalken: 20 µm

Die detaillierte Analyse und der Vergleich der Seitenansichten mit den entsprechenden Aufsichten (siehe z.B. Abb. 14A) zeigten, dass GFP⁺ Axone sich in der Regel in allen 3 Dimensionen des OB bewegten (Abb. 14A, B Pfeilspitzen) und somit tatsächlich in das OB Gewebe eingewachsen waren. Bei genauer Analyse der im Bulbus befindlichen Axone war erkennbar, dass einzelne von ihnen (Pfeil) innerhalb dieses Bereiches eine andere Wachstumsrichtung einschlugen. Diese Befunde deuteten daraufhin, dass Axone entsprechend ihrer Prädestinierung verschiedene Bereiche des OB ansteuerten.

3.6.5 Reduktion der Repulsion in späteren embryonalen Stadien

Die bisherigen Befunde zeigten, dass jeweils nur ein geringer Teil der olfaktorischen Axone in die Richtung eines nahe gelegenen OB Explantats gelenkt wurde, der Großteil jedoch von OB Neuriten abgestoßen wurde. Dieses Phänomen konnte bei 19 von 21 untersuchten OE/OB Kokulturen beobachtet werden (Abb. 15). Der hier *in vitro* beobachtete Effekt des OB auf einwachsende Axone des OE könnte in Zusammenhang mit früheren Beobachtungen stehen, die *in vivo* gemacht wurden: Axone von OSN, die um das Stadium E14 die Grenze zum sich entwickelnden OB erreichen, wachsen zunächst nicht in diese Struktur ein (Gong und Shipley 1995; Renzi et al., 2000; Conzelmann et al., 2001). Es stellte sich die Frage, ob das *in vitro* beobachtete Phänomen möglicherweise diese Situation widerspiegelte.

Zur Überprüfung dieser Gegebenheiten wurde das Kultursystem modifiziert. Dabei sollte getestet werden, ob Kokulturen, die zu einem späteren Entwicklungsstadium (E15) etabliert wurden, zu weniger repulsiven Interaktionen führten. In der Tat zeigte sich, dass im Gegensatz zum größtenteils repulsiven Effekt des E14 Gewebes die Abstoßung von Axonen in Kokulturen von Explantaten des Stadiums E15 deutlich abnahm (Abb. 15). Im Vergleich zu E14 OE/OB Kokulturen sank der Anteil von 90% (19/21) auf 44,5% (8/18). Dieser Befund wurde durch die Beobachtung untermauert, dass die Anziehung OB-zugewandter Axone von einem Anteil von 5% (1/21) auf 44,5% (8/18) stieg. Dieser attraktive Effekt von OB Explantaten war insgesamt deutlich ausgeprägter; er wirkte sich auch auf Axone aus, die initial vom OB Explantat wegorientiert wuchsen (Anstieg von 5% (1/21; E14) auf 11% (2/18; E15)).

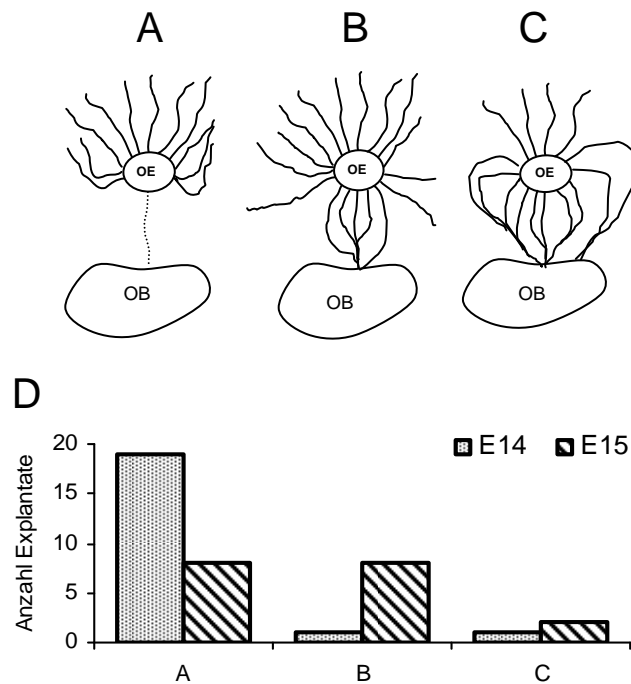


Abbildung 15: Schwächere Repulsion des OB bei späterem embryonalem Stadium

Einteilung der Abstoßung von olfaktorischen Axonen durch kokultivierte OB Explantate von embryonalen Stadien E14 (gepunkteter Balken) und E15 (gestrichelter Balken) in Kategorien A-C:

A: Der Großteil der Axone zeigte repulsives Verhalten, nur einzelne Axone wuchsen in Richtung OB.

B: Axone, die in der Nähe des OB auswuchsen, wanderten in Richtung OB. Weder eine deutliche Attraktion noch Repulsion anderer Axone war zu beobachten.

C: Axone, die seitlich aus OE Explantat wuchsen, migrierten in Richtung OB Explantat und zeigten attraktives Verhalten.

D: Balkendiagramm verdeutlicht die Abnahme der repulsiv beeinflussten Axone (Kategorie A) bei Verwendung von E15 Embryonen, während nicht beeinflusste Axone (Kategorie B) deutlich zunahm. Anteil der attraktiv beeinflussten Axone (Kategorie C) war bei beiden Entwicklungsstufen sehr gering, stieg jedoch bei E15 Explantaten leicht an.

Diese *in vitro* gemachten Befunde bestätigen also die *in vivo* Beobachtungen und ergaben weitere Evidenzen dafür, dass unter den hier eingesetzten Kulturbedingungen elementare Prozesse der Interaktion von olfaktorischen Axonen mit ihrem Zielgewebe rekapituliert wurden. Die Verlagerung des Präparationszeitpunktes auf einen späteren Tag (E15) hatte also eine Erhöhung des Anteils von OB Explantaten zur Folge, die attraktiv auf OE Axone wirkten. Es wurde daher getestet, ob eine noch spätere Präparation den Anteil weiter erhöhen würde. Es zeigte sich jedoch, dass eine Präparation des OE am Embryonaltag 16 (E16) eine sehr geringe Ausbeute an OE Explantaten lieferte (Daten nicht gezeigt). Dieses schien mit der fortschreitenden Festigung des OE einherzugehen, die es erschwerte, das OE von der *lamina propria* zu separieren.

3.7 Axonales Wachstum auf vorkultiviertem OB Gewebe

Da es für die Analyse von Wechselwirkungen zwischen den Axonen der Sinnesneurone und dem Bulbus vorteilhaft war, möglichst viele Axone zu erhalten, die in Richtung des OB wachsen, wurde versucht, dieses auf eine alternative Art weiter zu optimieren. Im Hinblick auf dieses Ziel wurde analysiert, ob eine Vorkultur eines zum Zeitpunkt E14 explantierten OB Fragments für mehrere Tage zu einer entsprechenden Entwicklung dieses Gewebes führen könnte, die ein Wachstum aller olfaktorischen Axone von frisch präparierten OE Explantaten zum OB gewährleistete.

3.7.1 Attraktion olfaktorischer Axone nach Vorkultivierung des OB

Um eine Weiterentwicklung des OB zu erreichen, wurden zunächst E14 Explantate für wenige Tage kultiviert und anschließend frisch präparierte OE Explantate vom embryonalen Stadium E14 zu diesen zugegeben (OB Vorkultur). Wie in Abbildung 11 exemplarisch gezeigt wurde, führte die Kultivierung von OB Gewebe zu einem massiven Auswachsen von Neuriten und zusätzlich einem Auswandern von Zellen. Wie in Abbildung 16A gezeigt, adhärirten die zugegebenen OE Explantate auch in direkter Nachbarschaft zu solch vorkultivierten OB Explantaten mit hoher Effizienz. Nach weiteren 4 Tagen in Kultur waren in den OE Explantaten jeweils zahlreiche GFP⁺ OSN detektierbar; diese hatten Axone auf das umgebende Substrat ausgesendet (Abb. 16A, B). Dabei wurde sichtbar, dass unabhängig von der Lage des OB GFP⁺ Axone das Explantat in alle Richtungen verließen und zunächst radiär auswachsen. Axone, die zu Beginn in Richtung des OB wuchsen, drangen in dessen Randbereich ein, wurden aber anschließend wieder davon abgelenkt. In der Regel vereinigten sie sich dort zu größeren GFP⁺ Bündeln. Axone, die zunächst nicht in die Richtung der OB Explantate auswachsen, vollführten einen Richtungswechsel und wuchsen anschließend in die Richtung des OB Explantats (Abb. 16A). Die GFP⁺ Axone faszikulierten dabei zunehmend, so dass sie schließlich wenige Bündel bildeten; diese wuchsen z.T. über mehrere hundert µm entlang des OB Explantats. Am Ende solcher Bündel (Abb. 16C) konnten einzelne GFP⁺ Fasern detektiert werden, die ein Bündel verließen und anschließend entweder in Richtung des OB Explantats wuchsen oder sich wieder davon entfernten. Diese Beobachtungen zeigten, dass eine Vorkultivierung des OB dazu geeignet war, eine generelle Attraktion von olfaktorischen Axonen zu bewirken.

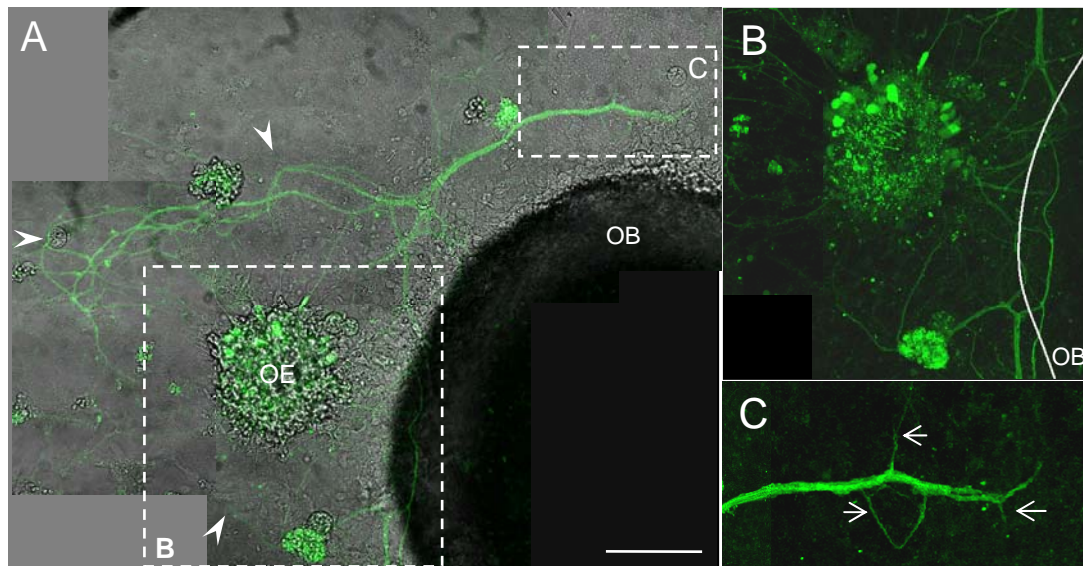


Abbildung 16: Attraction und Faszikulation nach Vorkultivierung des OB

In vitro Kultur für 4 Tage von embryonalen (E14) OMP-GFP OE Explantaten auf 5 Tage vorkultiviertem OB Vibratonschnitt.

A: Olfaktorische Axone wachsen zunächst in alle Richtungen aus OE Explantat radiär aus (siehe Vergrößerung in B), anschließend ändern sie ihre Wachstumsrichtung (Pfeilspitzen) und wachsen zum OB Explantat. Axonale Attraktion mündet in die Bildung eines Bündels, welches parallel zum OB Explantat weiterwächst.

Messbalken: 100 μ m

B: GFP Fluoreszenz verdeutlicht initiales Auswachsen in alle Richtungen und Einwachsen OB-naher Axone, welche anschließend wieder herauswachsen und faszikulieren.

C: Vergrößerung des umrandeten Bereichs in A zeigt Ende des Faszikels, von welchem einzelne Fasern ausscheren und individuell ihre Wachstumsrichtung verändern (Pfeile).

3.7.2 Erhöhte axonale Wachstumsrate durch lösliche OB Komponenten

Die genaue Betrachtung der OE Explantate, die mit vorkultivierten OB Explantaten in Kontakt gebracht wurden, zeigten, dass zusätzlich zu diesem Wachstum in Richtung des OB eine deutlich erhöhte Faszikulation der Axone resultierte und diese zudem längere Distanzen zurückgelegt hatten (Abb. 8 und 16). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine positive Beeinflussung der Wachstumsrate der OE Axone über größere Distanz hin erfolgte und möglicherweise lösliche Faktoren, die von Zellen des OB sekretiert wurden, dafür verantwortlich sein könnten. Um diese These zu überprüfen, wurden OE Explantate mit Kultur-Medium behandelt, welches durch eine 3-tägige Kultur von OB-Gewebe konditioniert (OBKM) worden war (Abb. 17). Dabei zeigte sich, dass aus den OE Explantaten nach 3 Tagen in OBKM tatsächlich etwa doppelt so lange axonale Ausläufer ausgewachsen waren, als aus den in nicht-konditioniertem Medium gehaltenen OE Explantaten (Abb. 17). Bei Wachstum in normalem Kulturmedium konnte lediglich eine durchschnittliche maximale Axonlänge von 131 μ m (+/- 44 μ m) gemessen werden, während bei Explantaten, die in OBKM inkubiert wurden, die Axone eine maximale Länge von 286 μ m (+/- 68 μ m) aufwiesen (Abb. 17C). Ein Unterschied im Grad der Faszikulation konnte nicht festgestellt werden (Abb. 17A, B). Diese

Befunde zeigten, dass lösliche Faktoren, die von Zellen des OB sekretiert werden, einen positiven Einfluss auf das Längenwachstum der Axone olfaktorischer Sinnesneurone haben, jedoch nicht zu ihrer Faszikulation beitragen.

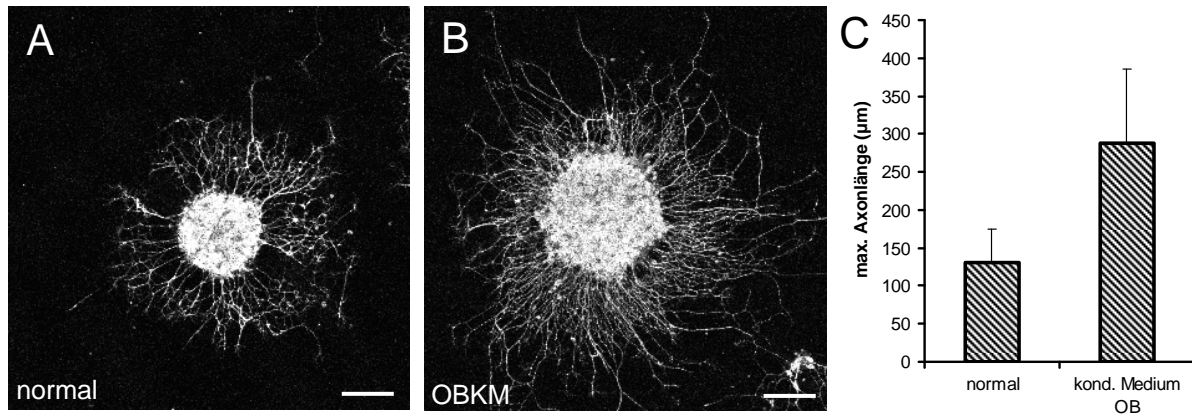


Abbildung 17: Lösliche Faktoren von OB Explantaten induzieren Wachstum von olfaktorischen Axonen

Kultivierung von OE Explantaten für 3 Tage in Normalmedium (A) oder OB konditioniertem Medium (OBKM; B) und anschließende Visualisierung der axonalen Fortsätze durch immunocytochemischen Nachweis von NCAM. OE Explantate kultiviert in OBKM weisen ein vergrößertes NCAM⁺ Axonnetzwerk auf, eine erhöhte Bündelung kann nicht festgestellt werden. Messbalken: 100 µm

C: Der Vergleich der längsten Axone zeigt eine Verdoppelung des Wachstums an. OE Explantate in Normalmedium besitzen eine durchschnittliche maximale Axonlänge von 131 µm +/- 44 µm (Mittelwert +/- Standardabweichung), während Axone von OE Explantaten in OBKM gewachsen eine durchschnittliche maximale Länge von 288 µm +/- 68 µm haben.

3.7.3 Weitreichende Attraktion aller olfaktorischer Axone in OB Vorkultur

Um zu überprüfen, ob Axone verschiedener OE Regionen generell auf ein vorkultiviertes OB Explantat reagieren, wurden mehrere OE Explantate in der Nähe eines OB Fragments kultiviert und das Verhalten der olfaktorischen Axone analysiert. Bei Untersuchung einer exemplarischen OE/OB Vorkultur, bei der 5 OE Explantate für 5 Tage in direkter Umgebung eines vorkultivierten OB Explantats wuchsen (Abb. 18), konnte festgestellt werden, dass die OSN der OE Explantate zahlreiche Axone in alle Richtung aussendeten und offenbar zunächst vom mittig platzierten OB Gewebe unbeeinflusst waren. Axone, die initial vom OB weg wuchsen (Abb. 18A Pfeilspitzen), wurden jedoch anschließend von diesem angezogen. Eine solche attraktive Wirkung konnte sogar noch bei Axonen beobachtet werden, die über 700 µm von OB entfernten wuchsen. Dabei wurde während des Wachstums in Richtung OB bei den meisten GFP⁺ Fasern eine zunehmende Faszikulation beobachtet. Ein solches attraktives und gebündeltes Wachstum von olfaktorischen Axonen konnte bei allen untersuchten OE/OB Vorkulturen festgestellt werden.

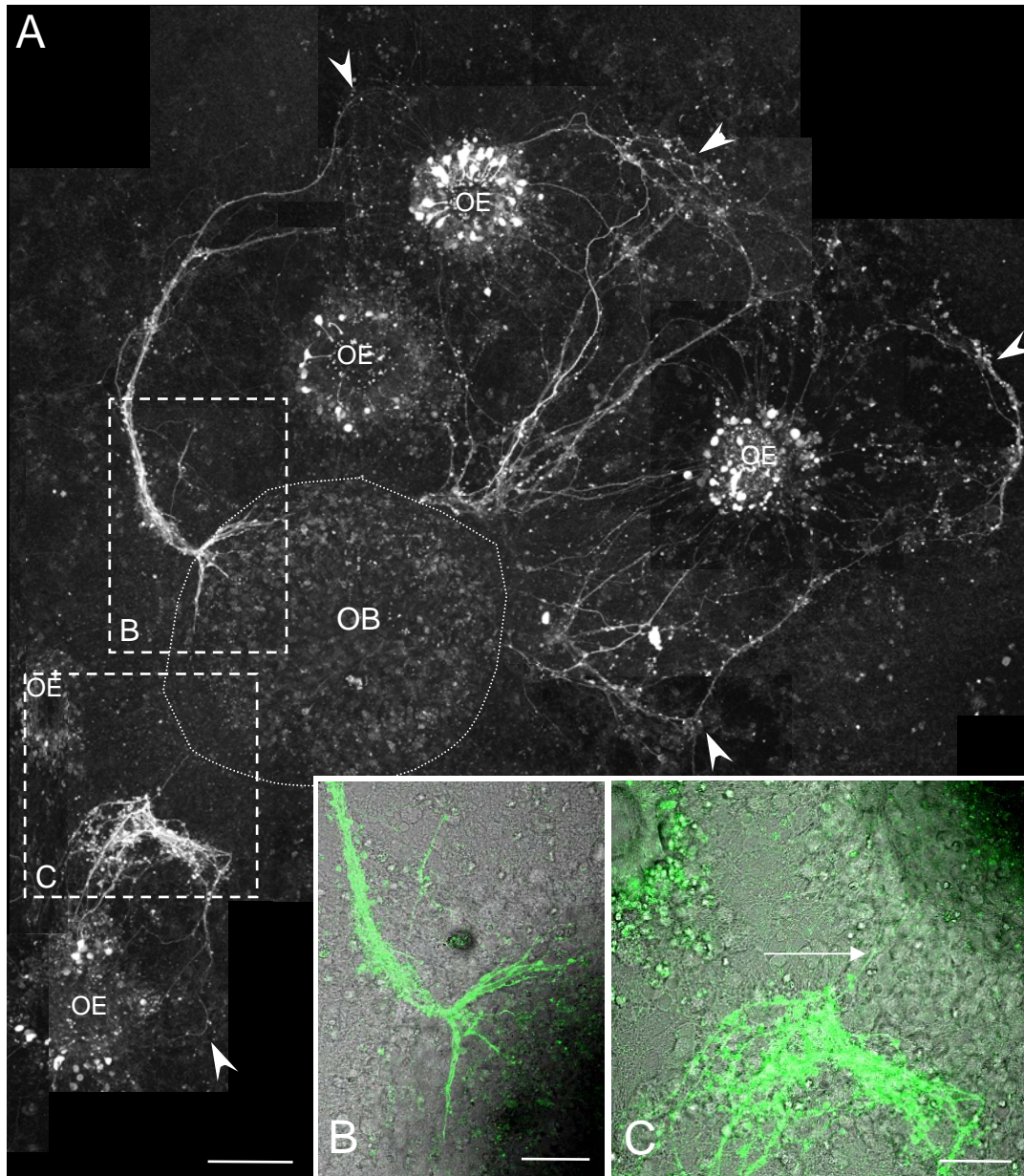


Abbildung 18: Differentielle Reaktion von olfaktorischen Axonen bei Kontakt mit OB Explantat

OE Explantate von OMP-GFP Embryonen (E14) kultiviert auf 7 Tage vorkultiviertem OB Gewebe (E14).

A: 5 OE Explantate senden zahlreiche OMP-GFP⁺ Axone aus, die zunächst einige 100 μm radiär in alle Richtungen auswachsen. Vom OB weg wachsende Axone ändern ihre Wachstumsrichtung (Pfeilspitzen), eine Attraktion in die Richtung des OB Explantats findet statt. Starke OMP-GFP⁺ Faserbündel entstehen, indem sich mehrere Axone oder kleinere Faserbündel vereinigen und in Richtung OB wachsen. Messbalken: 100 μm

B: Die Vergrößerung des Ausschnitts in A in Kombination mit dem Durchlichtbild zeigt deutlich das GFP⁺ Faszikel und dessen Auffaserung, wenn es sich dem OB Explantat (dunkel; rechts unten) nähert. Einzelne Fasern von reifen OSN wachsen daraufhin in unterschiedliche Richtungen im und am OB Explantat weiter. Messbalken: 50 μm

C: Axone von anderen OE Explantaten (siehe A unten) wachsen nicht geschlossen in das OB Explantat ein, sondern stoppen vor dem OB Gewebe, nachdem sie in dessen Richtung gewachsen sind. Einzelne Axone (Pfeil) besitzen jedoch die Fähigkeit in den OB einzuwachsen. Messbalken: 30 μm

3.7.4 Differentielle Reaktion der olfaktorischen Axone vor OB Explantat

Eine detaillierte Analyse der Region, in der die olfaktorischen Axone auf das OB Gewebe trafen, zeigte, dass jeweils nur ein Teil der Axone in der Lage war, in das Explantat einzuwachsen (Abb. 18B, C); aus Bündeln traten einzelne Fasern aus und wuchsen in unterschiedliche Richtungen. Andere Axonbündel bildeten im Abstand zum OB Explantat ein Geflecht (Abb. 18C), aus dem ebenfalls nur einzelne GFP⁺ Fasern in den OB einwuchsen (Abb. 18C Pfeil). Diese Befunde zeigten, dass die Axone der OSN aus verschiedenen OE Explantaten eine differentielle Reaktion auf die unterschiedlichen OB Fragmente zeigten; dies deutete daraufhin, dass die dafür verantwortlichen molekularen Komponenten auch *in vitro* ausgeprägt waren.

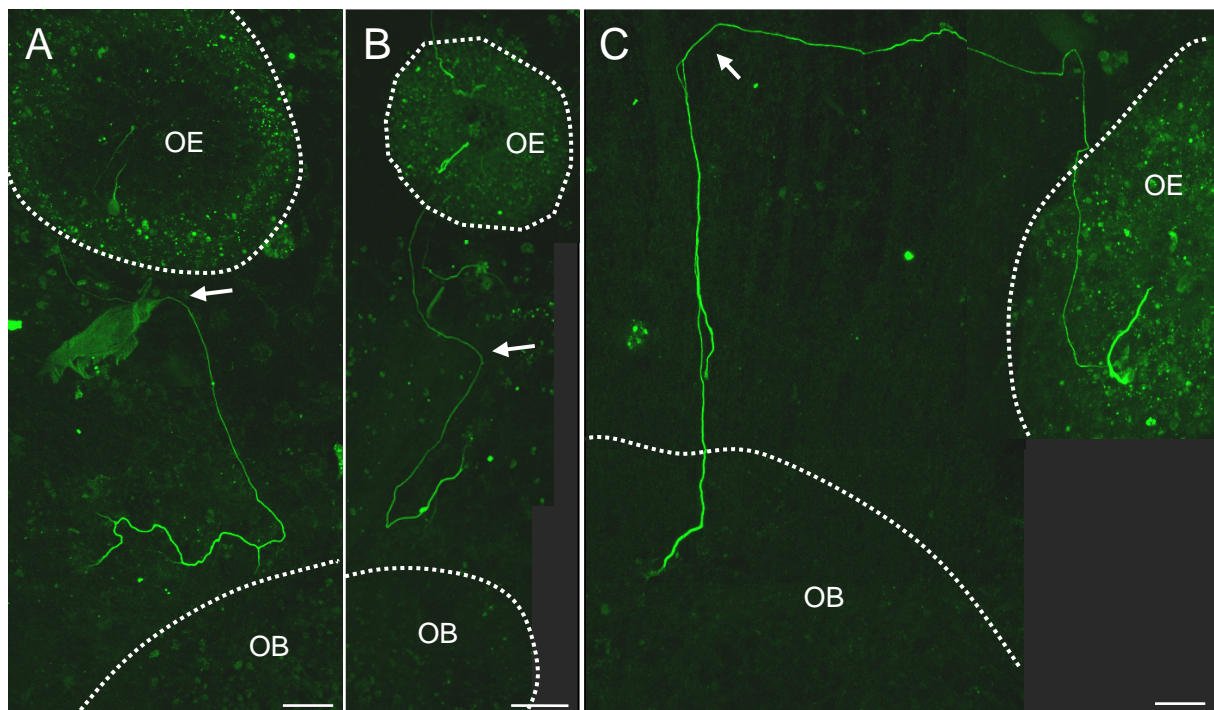


Abbildung 19: Unterschiedliche Reaktion mOR256-17 spezifischer Axone auf vorkultivierte OB Explantate

In vitro Kulturen von mOR256-ITG OE Explantaten auf 2 Tage vorkultivierten E14 OB Explantaten mit anschließendem Wachstum für 4 Tage.

A - C: mOR256-17 exprimierende OSN in OE Explantaten entsenden jeweils einzelne OR Subtyp-spezifisches Axone, die jeweils in die Richtung unterschiedlicher OB Fragmente wachsen. Axone zeigen erst nach Änderung der Wachstumsrichtung (Pfeile) geradlinige Attraktion zum OB, reagieren jedoch unterschiedlich in unmittelbarer Nähe. OR spezifische Axone wachsen teilweise seitlich am OB weiter (A), wieder zurück (B) oder ohne Änderung der Wachstumsrichtung direkt in das OB Gewebe hinein (C). Messbalken A, C: 50 μ m B: 25 μ m

Die Beobachtung, dass Axone, die gemeinsam in einem Bündel in Richtung eines OB Explantats gewachsen waren, in dessen unmittelbarer Nähe defaszikulierten und anschließend eine differentielle Interaktion mit dem potentiellen Zielgewebe zeigten (siehe Abb. 18), ließ die Vermutung zu, dass es sich bei diesen unterschiedlichen Fasern um diejenigen von Sinnesneuronen mit verschiedener Odorantrezeptor-Ausstattung handeln

könnte. Um diese These zu prüfen, wurde untersucht, ob Axone von definierten OR exprimierenden Sinnesneuronen eine entsprechende differentielle Reaktionen gegenüber verschiedenen OB Segmenten aufwiesen. Es zeigte sich, dass OB Explantate generell auf mOR256-17-ITG exprimierende OSN einen attraktiven Einfluss besaßen (Abb. 19A-C; Pfeile), so wie es für die Gesamtheit der OMP⁺ Zellen zu beobachten war (s. Abb. 18); individuelle Axone zeigten dann jedoch eine differentielle Interaktion mit OB Explantaten. Einzelne Axone konnten beobachtet werden, die lediglich am OB Explantat entlang wuchsen (Abb. 19A), andere Fasern wurden von den OB Explantaten abgestoßen (Abb. 19B); wiederum andere Axone konnten in ein OB Explantat einwachsen (Abb. 19C). Dieses differenzielle Verhalten von OR- spezifischen Axonen zeigte, dass *in vitro* ebenso selektive Interaktionen solcher Axone mit dem Zielgewebe existierten, wie dies *in vivo* der Fall ist.

3.8 Funktionelle Ausbildung von Neuronen *in vitro*

Durch die bisherigen Optimierungsschritte der Zellkultur konnte erreicht werden, dass Vorläuferzellen des olfaktorischen Epithels zu reifen Sinnesneuronen differenzierten, die selektiv distinkte Odorantrezeptorgene exprimierten; damit schien es möglich, dass sie auf Duftstoffe reagieren. Frühere Studien haben gezeigt, dass eine duftstoffinduzierte Aktivität der Sinnesneurone für die Präzision der Projektion in singuläre Glomeruli ein entscheidender Parameter ist (Zheng et al., 2000; Zhao und Reed 2001; Zou et al., 2004). Für die entsprechende Funktionalität der Sinnesneurone ist die Ausbildung von Cilien, in deren Membran die Rezeptorproteine inseriert sind (Getchell 1986; Strotmann et al., 2004; Imai et al., 2006), eine kritische Voraussetzung.

3.8.1 OB Vorkultur ermöglicht langes ciliäres Wachstum

Um zu überprüfen, ob die Kulturbedingungen, die sich positiv auf das Axon-Wachstum auswirkten, auch die Bildung von Cilien induzierten, wurden die Dendriten der Zellen näher untersucht. Wie schon in Abschnitt 3.4 beschrieben, ermöglicht die Verwendung der transgenen Mauslinie mOR256-17-ITG auch eine Visualisierung der Cilien (siehe Abb. 10). In der Tat konnten bei den meisten mOR256-17 exprimierenden Zellen auch in OB Vorkultur lange Cilien detektiert werden, diese hatten eine Länge von bis zu 24 µm (Abb. 20). Damit unterschieden sie sich deutlich von den Strukturen, die am Dendriten einzelner OSN ohne Anwesenheit von OB Explantaten beobachtet worden waren; diese hatten lediglich eine

Länge von $\sim 3,5 \mu\text{m}$ (siehe Abb. 10). Somit wurde deutlich, dass auch die Cilienbildung der OSN durch das Zielgewebe begünstigt wurde.

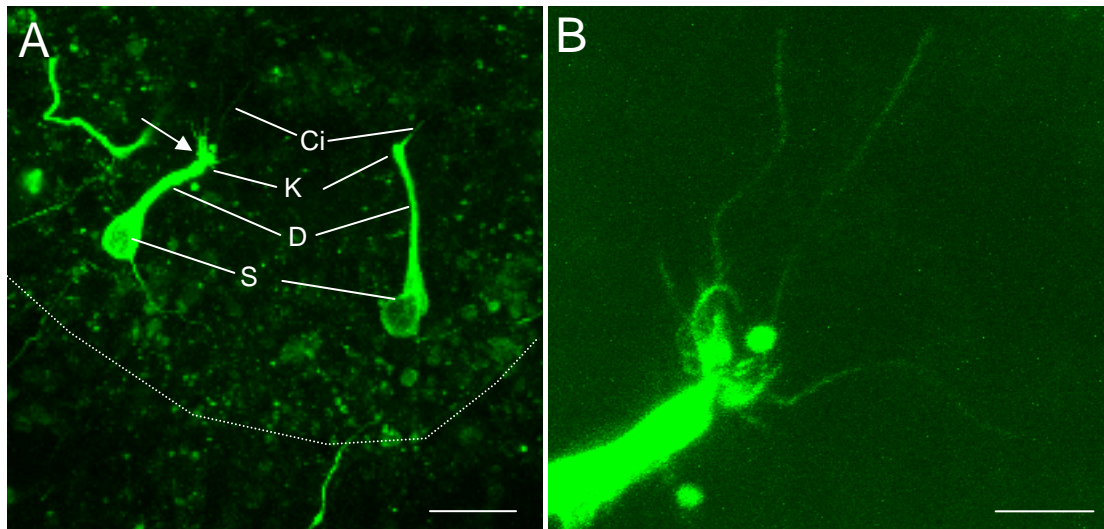


Abbildung 20: Generierung von langen Cilien in OB Vorkultur

Kultivierung von mOR256-17-IRES-TauGFP OE Explantaten in Anwesenheit von vorkultiviertem olfaktorischem Bulbus.

A: Nach 6 Tagen in Kultur ist die Morphologie einzelner mOR256-17 exprimierender Sinnesneurone immer noch deutlich zu erkennen, die TauGFP Fluoreszenz visualisiert Soma (S), Dendrit (D) mit Knob (Kn) und feine Cilien (Ci). Messbalken: $20 \mu\text{m}$

B: Vergrößerte Darstellung des in A mit Pfeil markierten Dendriten zeigt mehrere feine ciliäre Strukturen ausgehend von der Endigung des Dendriten mit einer Länge von bis zu $24 \mu\text{m}$. Messbalken: $5 \mu\text{m}$

3.8.2 Forskolin und Duftstoff aktivierte Zellen in OE Explantaten

Diese Ergebnisse deuteten daraufhin, dass das *in vitro* System dazu geeignet war, OSN zu generieren, die die Fähigkeit zur Duftstoffdetektion besitzen. Um dies zu testen wurden Calcium (Ca^{2+})-Imaging Experimente mit dem Indikator Rhod-2 durchgeführt, der es durch sein Emmisionsspektrum erlaubt, in GFP^+ Zellen zum Einsatz zu kommen. In initialen Experimenten wurde geklärt, ob OSN *in vitro* in der Lage sind, Rhod-2 aufzunehmen und auf externe Stimuli zu reagieren. Mit Hilfe von MK571, einem Inhibitor der multi drug resistance (MDR1) Proteine (Manzini et al., 2008), gelang es in der Tat, dass kultivierte OMP-GFP OSN den Farbstoff aufnahmen (Abb. 21A). Von einzelnen OMP^+ OSN (grün) konnte somit die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (rot) visualisiert werden und durch Darstellung der Rhod-2 abhängigen Fluoreszenz mittels einer intensitätscodierenden Farbskala (Abb. 21B) eine Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Stimulierung einer Zelle beobachtet werden.

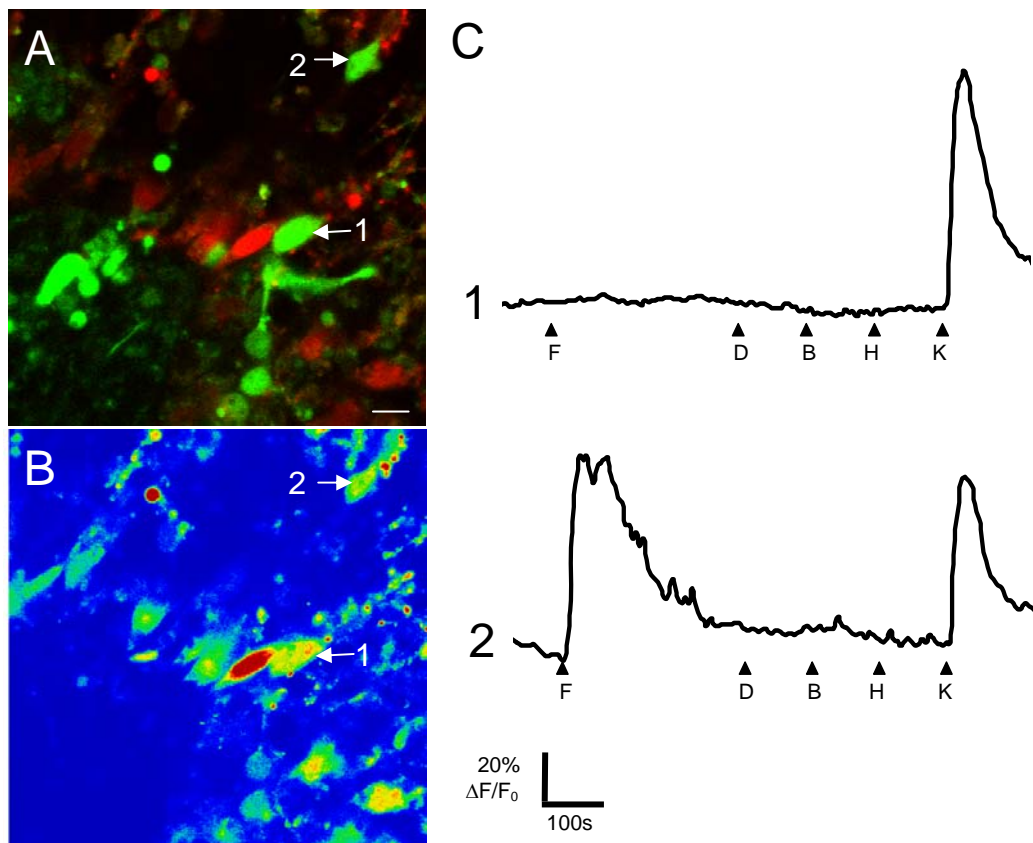


Abbildung 21: Einzelne OSN mit Calcium-Einstrom nach Aktivierung der ACIII

Kultivierung von OMP-GFP OE Explantaten für 6 Tage in OB Vorkultur und Messung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) mit Rhod-2 nach Stimulierung.

A: OMP-GFP Explantat mit diversen OSN (grün) nach Beladung mit Ca^{2+} -sensitivem Indikatorfarbstoff Rhod-2AM (rot) bei Anwesenheit von MK571. Messbalken: 10 μm

B: Intensitätscodierte Farbdarstellung der Rhod-2 Fluoreszenz visualisiert nicht beladene Bereiche bzw. das Fehlen von freien Ca^{2+} Ionen (blau) und Zellkörper mit mittlerer (grün) oder hoher $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (rot). Einzelne OSN sind durch Rhod-2 Fluoreszenz angefärbt (Pfeile 1 + 2).

C: Graphische Darstellung der zeitlichen Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -abhängigen Fluoreszenz $\Delta F/F_0$ (mit $\Delta F = F_i - F_0$ und $F_i =$ Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt $t = i$ und $F_0 =$ Mittelwerte der ersten 4 Messwerte je Messbereich) der in A markierten OSN während der Applikation verschiedener Stimuli für 20 s (Pfeilspitze = Beginn des jeweiligen Stimulus). Zahlreiche Zellen reagierten auf Depolarisation durch 30 mM KCl mit einem Ca^{2+} -Einstrom (siehe Beispielzelle 1), während meist keine Reaktion auf Forskolin/IBMX (F; 2 $\mu\text{M}/20 \mu\text{M}$) oder Duftstoffe wie Benzaldehyd (B; 100 μM) oder Heptanal (H; 100 μM) festgestellt werden konnte. Einzelne OSN (2) zeigten deutliche Aktivität nach Gabe von Forskolin/IBMX und KCl, jedoch nicht auf die applizierten Duftstoffe.

Zunächst wurde getestet, ob OSN durch eine Depolarisation aktivierbar waren (Abb. 21 Zellen 1+2); in der Tat reagierten zahlreiche OMP-GFP⁺ OSN auf eine Depolarisation durch 30 mM KCl mit einem kurzen, aber deutlichen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 21C siehe Beispielzelle 1). Bei wenigen OMP⁺ OSN (Abb. 21A Zelle 2) konnte zusätzlich eine deutliche Reaktion auf die Zugabe von Forskolin und IBMX festgestellt werden. Die Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war in diesem Fall ähnlich hoch wie nach Depolarisation der Zelle (Abb. 21C Spur 2); eine Reaktion auf ausgewählte Duftstoffe konnte ebenfalls in einzelnen Zellen beobachtet werden; wie zu erwarten, war deren Anzahl jedoch sehr gering (Abb. 22).

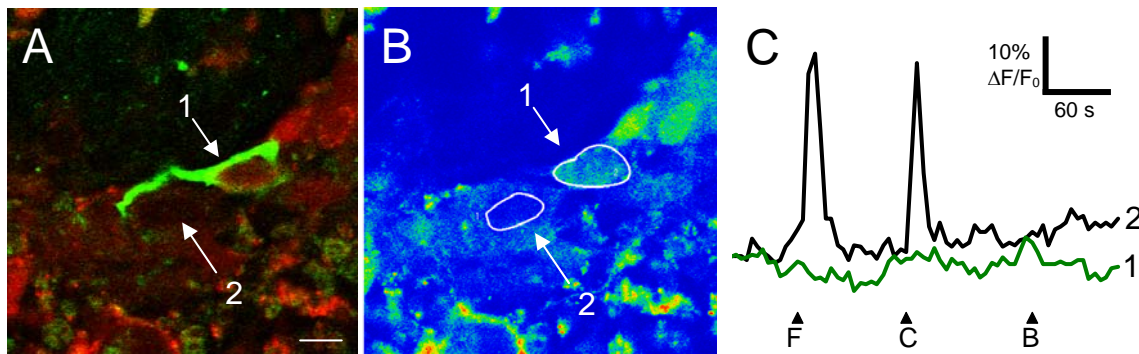


Abbildung 22: Duftstoff-reaktive Zellen in 6 Tage alten OE Explantaten

Ca²⁺-Imaging Experiment an mOR256-17-ITG OE Explantat kultiviert für 6 Tage auf 3 Tage alter OB Vorkultur.

A: mOR256-17 positives OSN (grün, Pfeil 1) befindet sich zwischen weiteren Rhod-2 beladenen Zellen (rot) im OE Explantat. Messbalken: 10 μ m

B: Intensitätscodierte Farbdarstellung der Rhod-2 Fluoreszenz aus A zeigt unterschiedliche [Ca²⁺]_i einzelner Zellen. Umrandete Bereiche markieren zwei Areale (Pfeile 1 und 2), deren Änderung der Fluoreszenzintensität in C aufgetragen ist, wobei Spur 1 (grün) die [Ca²⁺]_i des mOR256-17⁺ OSN wiedergibt.

C: [Ca²⁺]_i abhängige Rhod-2 Fluoreszenzänderung ($\Delta F/F_0$) der in B umrandeten Areale 1 (grün) und 2 (schwarz) nach Applikation von 1 μ M Forskolin/ 10 μ M IBMX (F), 100 μ M (+)-Carvone (C) oder 100 μ M Benzaldehyd (B). Zelle 2 reagierte sowohl auf Forskolin/IBMX und (+)-Carvone mit einer Erhöhung der [Ca²⁺]_i um ca. 30%, während der Duftstoff Benzaldehyd keine Reaktion auslöste. Das mOR256-17⁺ OSN reagierte auf keines der gegebenen Stimuli.

3.9 Zellulärer Transport von OR Proteinen

Insgesamt konnten mit den durchgeführten Optimierungsschritten Bedingungen für Explantatkulturen des olfaktorischen Epithels geschaffen werden, unter denen Sinnesneuronen nicht nur die charakteristischen morphologischen Eigenschaften aufwiesen, sondern auch eine entsprechende Funktionalität besaßen.

Damit wurden nun ideale Voraussetzungen dafür geschaffen, Aspekte der Wegfindung olfaktorischer Axone zu untersuchen, die *in vivo* bislang nicht experimentell zugänglich sind. Ein zentraler Fragenkomplex ist dabei die Rolle, die das Odorantrezeptor-Protein in diesem Prozess spielt. In diesem Kontext ist die Kenntnis der subzellulären Lokalisation des Rezeptorproteins von entscheidender Bedeutung. Es werden zurzeit verschiedene Modelle diskutiert, wie das Rezeptorprotein zur Axon-Zielfindung beitragen könnte (Mombaerts 2006; Imai und Sakano 2007; Henion und Schwarting 2007); für eine Klärung der Frage, welches dieser Modelle zutreffen könnte, sind Informationen über die exakte Rezeptorlokalisierung möglicherweise von ausschlaggebender Bedeutung.

3.9.1 Transfektion von mOR256-17-EGFP in olfaktorische Sinnesneurone

Um der Beantwortung dieser Frage näher zu kommen, welche Rolle das Rezeptorprotein in der Wegfindung spielt, wurde im Folgenden das Explantat-Kultursystem in Kombination mit einer Reihe von genetischen Manipulationen zum Einsatz gebracht. Dabei sollte versucht werden, spezifische Rezeptorvarianten in die kultivierten Sinnesneurone einzubringen und die Lokalisation des Proteins damit zu verfolgen. In einem ersten Ansatz wurde versucht, mit einer markierten Rezeptorvariante dessen Lokalisation zu visualisieren. Dazu war es notwendig, diese durch Elektroporation eines Expressionsvektors die entsprechende Gensequenz in die Zellen eines frisch präparierten OE Explantats einzubringen.

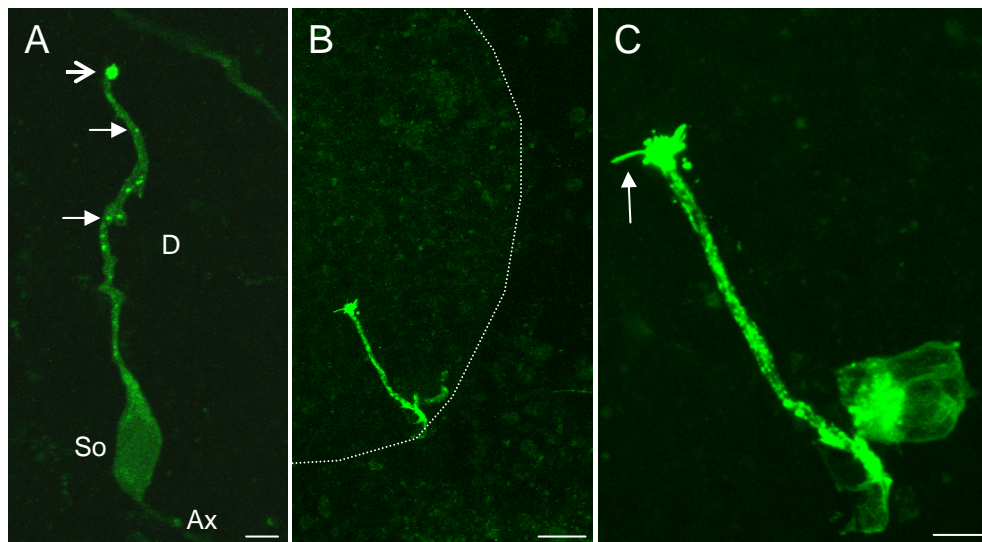


Abbildung 23: Expression und Transport des mOR256-17-EGFP Fusionsproteins *in vitro*

Transfektion eines mOR256-17-EGFP Expressionsvektors in wildtypische OE Explantate und Expression des Fusionsproteins in olfaktorischen Sinnesneuronen. Direkte Visualisierung der transfizierten Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie.

A: Eine mOR256-17-EGFP exprimierende Zelle nach 2 Tagen in OB Kokultur besitzt die für OSN typische Morphologie. Durch die EGFP Fluoreszenz sind Zellsoma (S), Dendrit (D) und axonaler Ansatz (Ax) sichtbar. Im dendritischen Fortsatz tritt das mOR256-17-EGFP Protein punktförmig in vesikulären Strukturen auf (Pfeile). Der Knob am Ende des Dendriten ist durch eine starke Akkumulation des OR Proteins zu erkennen (offener Pfeil). Messbalken: 5 μm

B: Heterologe Expression des mOR256-17-EGFP Fusionsprotein für 4 Tage in OE Explantaten in OB Kokultur. Transfiziertes OSN in randständiger Lage im Explantat und mit ins Zentrum gerichtetem Dendriten. Messbalken: 20 μm

Messbalken: 20 μm

C: Nach längerer Kultivierung ist starke EGFP Fluoreszenz im perinukleären Bereich des Zellsomas, im Dendriten und dessen Knob zu sehen. Das mOR256-17-EGFP Protein wird auch in ciliäre Strukturen (Pfeil) ausgehend vom Knob transportiert. Messbalken: 10 μm

Die Expression des mOR256-17 Rezeptors als EGFP-Fusionsprotein konnte in der Tat nach 2 Tagen in OB Kokultur anhand der Fluoreszenz sowohl im Soma (So), im Axon (Ax) als auch im Dendriten (D) einzelner Zellen visualisiert werden (Abb. 23A). Besonders innerhalb des Dendriten konnten dabei vesikuläre Strukturen, die eine intensive Fluoreszenz aufwiesen, festgestellt werden (Abb. 23A Pfeil); eine sehr ausgeprägte Immunfluoreszenz war dabei im Knob einzelner OSN (Abb. 23 Pfeilspitze) zu detektieren. Bei längerer Kultivierung der transfizierten Zellen konnte die Präsenz des mOR256-17-EGFP Proteins zusätzlich im perinukleären Bereich beobachtet werden, welcher vermutlich den Golgi-Apparat widerspiegelt (Abb. 23C). Diese Beobachtung der Verteilung des OR Proteins deckte sich mit früheren *in vivo* Befunden, die mittels OR-spezifischer Antikörper gemacht wurden (Schwarzenbacher et al., 2005) und deutete daraufhin, dass das OR-EGFP Fusionsprotein auch *in vitro* korrekt transportiert wurde.

3.9.2 Odorantrezeptor Protein in den Cilien olfaktorischer Neurone

Ein entscheidendes Kriterium dafür, dass dieses modifizierte Rezeptorprotein tatsächlich korrekt prozessiert und subzellulär lokalisiert war, könnte der Nachweis des Transports in die Cilien sein; daher wurden mOR256-17-EGFP transfizierte OE Explantate nach 4 Tagen *in vitro* daraufhin untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass das mOR256-17-EGFP Fusionsprotein tatsächlich in den Cilien anhand der intensiven Fluoreszenz dieser Strukturen nachweisbar war (Abb. 23 B, C). Somit konnte gezeigt werden, dass die OSN offensichtlich in der Lage waren, dieses modifizierte Protein korrekt zu prozessieren und zu transportieren.

3.9.3 Intrazellulärer Transport unbeeinflusst nach Rezeptor Transfektion

Die Transfektion des OR Proteins führte wie in Abbildung 23C gezeigt zu einer starken Akkumulation des Fusionsproteins im Golgi-Apparat der Zelle, und könnte damit elementare Prozesse in diesem stören. Um zu überprüfen, ob dies zu einer Beeinträchtigung des Transports anderer Proteine führte, wurde exemplarisch die Lokalisation der Adenylat Cyclase III (ACIII) in transfizierten Zellen nachgewiesen (Abb. 24).

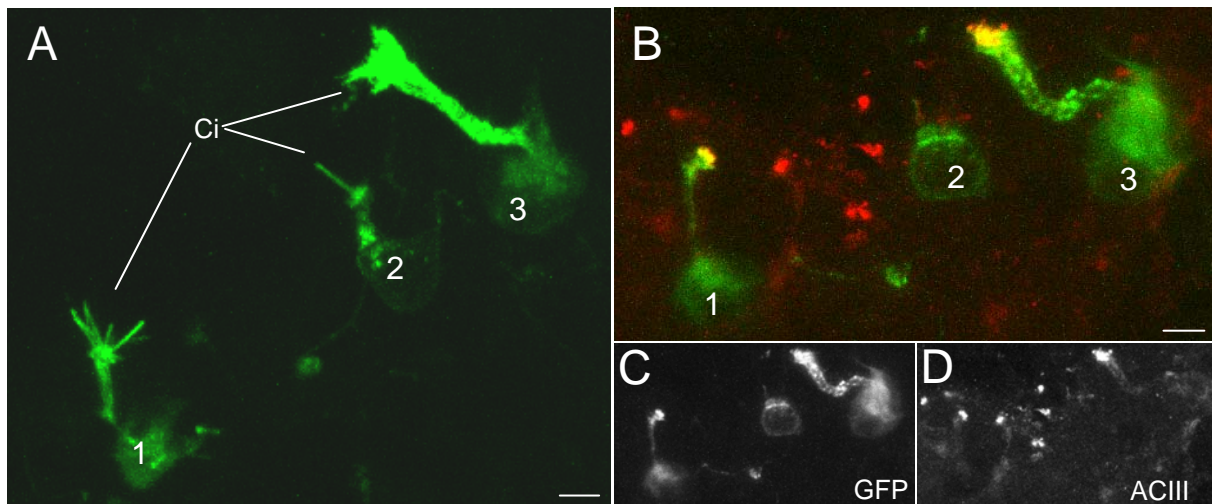


Abbildung 24: Transport der Adenylat Cyclase III in die Knobs durch Transfektion nicht gestört

Transfektion von mOR256-17-EGFP in OE Explantate, Kultivierung in OB Kokultur für 4 Tage und anschließende Immuncytochemie gegen Adenylat Cyclase III (ACIII).

A: Expression von mOR256-17-EGFP in 3 OSN (1-3) und Visualisierung des Fusionsproteins vor Fixierung in Dendriten, Knobs und Cilien (Ci) durch Fluoreszenzmikroskopie. Messbalken: 5 μ m

B: Überlagerung der mOR256-17-EGFP Fluoreszenz (grün) und Immunreaktivität gegen ACIII (rot) zeigt Kolokalisation von ACIII und mOR256-17 an Knobs der in A dargestellten OSN. Nicht kolokalisierte punktförmige ACIII Färbung deutet auf weitere Knobs von nicht transfizierten OSN hin. Messbalken: 5 μ m

C und D: Einzelkanalansichten von mOR256-17-EGFP (C) bzw. ACIII Immunreaktivität (D).

Die ACIII ist ähnlich wie die Odorantrezeptoren ein integrales, glykosyliertes Membranprotein und wird in Richtung des Knob transportiert, um in den Cilien an der Duftstoff-vermittelten Signaltransduktion mitzuwirken (Bakalyar und Reed 1990). Um die Lokalisation der ACIII zu überprüfen wurden OSN, die das mOR256-17-EGFP Fusionsprotein exprimierten (Abb. 24A), mittels Immuncytochemie analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass mOR256-17-EGFP exprimierende OSN eine starke ACIII Immunreaktivität im Bereich des Knob aufwiesen (Abb. 24B), die vergleichbar mit deren Lokalisation in nicht transfizierten Nachbarzellen war; damit wurde gezeigt, dass die Expression des mOR256-17-EGFP Fusionsproteins keine Auswirkungen auf die Transportmechanismen anderer integralen Membranproteine in die dendritischen Ausläufer der kultivierten Zellen hatte.

3.9.4 Präsenz des Odorantrezeptor Proteins in wachsenden Axonen

Somit konnte nun einer zentralen Frage bezüglich der Lokalisation des Rezeptorproteins in den Axonen der OSN nachgegangen werden. In OE Explantaten, die mit dem mOR256-17-EGFP-Konstrukt elektroporiert und nach 2 Tagen analysiert wurden, war erkennbar, dass das Rezeptorprotein entlang des gesamten Axons verteilt vorlag (Abb. 25A). Das heterolog exprimierte Rezeptorprotein wurde dabei bis in die axonalen Endigungen transportiert, wo auch feinste Filopodien angefärbt wurden (Abb. 25B).

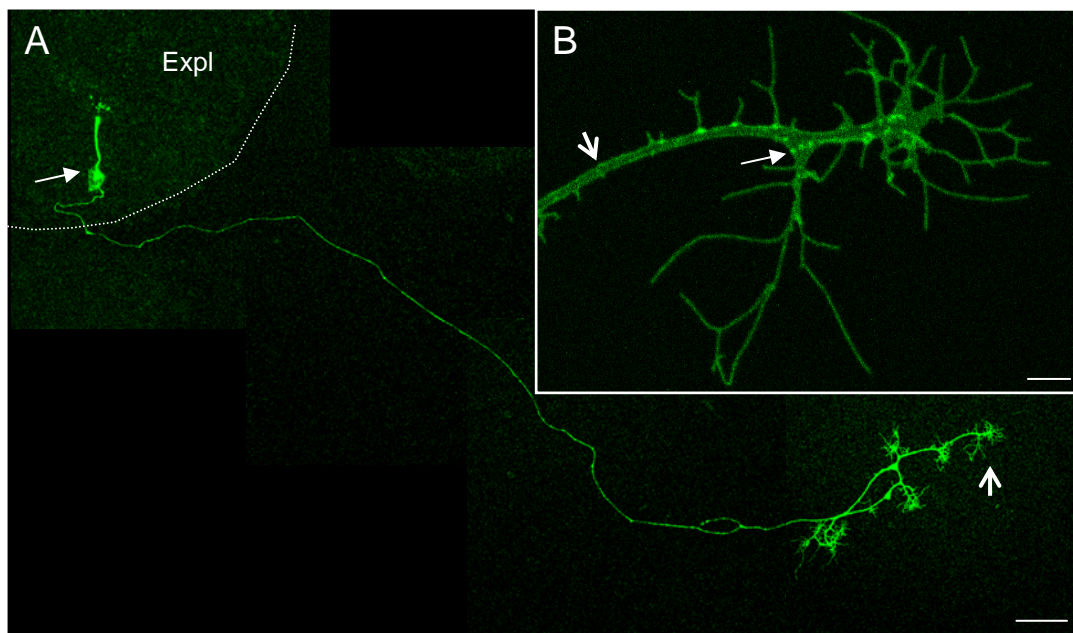


Abbildung 25: OR Protein Verteilung entlang des gesamten Axons

Heterologe Expression von mOR256-17-EGFP in OSN nach Elektroporation in OE Explantat und Kultivierung für 2 Tage in OB Kokultur.

A: Die mOR256-17-EGFP exprimierende Zelle (Pfeil) befindet sich innerhalb des *in vitro* kultivierten OE Explantates (Grenze mit gepunkteter Linie markiert) und besitzt einen langen Fortsatz (~1100 μm), welcher das Explantat verlässt und mit mehreren Wachstumskegel ähnlichen Strukturen endet (offener Pfeil).

Messbalken: 50 μm

B: Vergrößerte Darstellung zeigt die Verteilung des mOR256-17-EGFP Fusionsproteins in axonaler Endigung. Die EGFP Fluoreszenz des Fusionsproteins verteilt sich im Axon in dünnen randständigen Linien (offener Pfeil) und vereinzelt punktförmigen Strukturen (Pfeil). Das mOR256-17-EGFP Protein wird ebenfalls in zahlreiche dünne Filopodien transportiert. Messbalken: 5 μm

3.9.5 Vesikulärer Transport von mOR256-17-EGFP

Eine detaillierte Analyse der Fluoreszenz, die durch das Rezeptor-Fusionsprotein in den Axonen generiert wurde, ergab eine auffällige Häufung von punktförmigen Markierungen (siehe Abb. 25B). Eine Beobachtung dieser Strukturen über einen längeren Zeitraum mittels der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 26) ergab, dass sich diese innerhalb des Axons mit unterschiedlicher Geschwindigkeit anterograd (Pfeilspitzen) bzw. retrograd (offene

Pfeilspitzen) bewegten. Die Strukturen zeigten damit typische Eigenschaften von transportierten Vesikeln, unter anderem typische „stop-and-go“ Phasen, in denen sich Bewegung ($\sim 0,1-0,2 \mu\text{m/s}$) und Stillstand abwechselten (Daten nicht gezeigt). Durch diese *in vitro* Versuche konnten somit erste Indizien dafür gesammelt werden, dass ein Transport von OR Proteinen innerhalb der Axone in Vesikeln erfolgte.

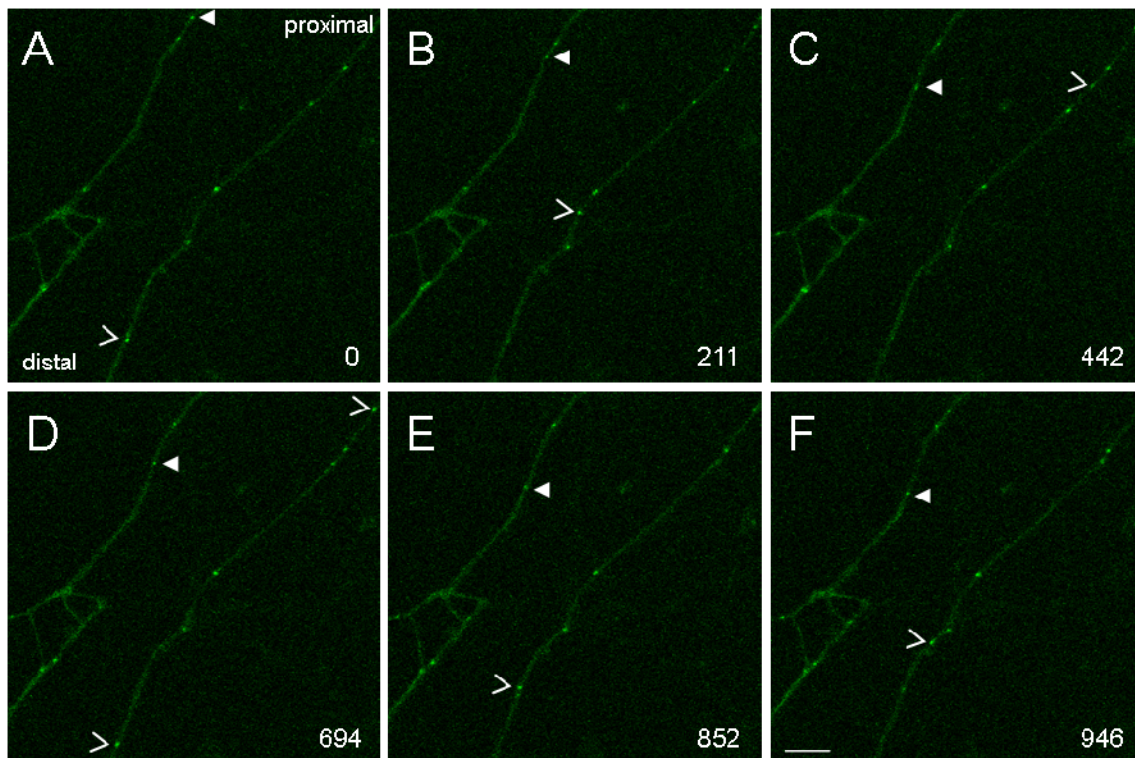


Abbildung 26: Anterograder und retrograder Transport von mOR256-17-EGFP⁺ Vesikel

Transfektion von mOR256-17-EGFP in OE Explantat und „Time Lapse“ Aufnahmen nach 4 Tagen in OB Kokultur Punktformige Verteilung des mOR256-17-EGFP Fusionsproteins innerhalb von Axonen, deren Wachstumsrichtung von rechts oben (proximal) nach links unten (distal) verlaufen (A). Zeitlich versetzte Aufnahmen (A- F, Zahlen indizieren Zeitpunkt der Aufnahme in Sekunden) verdeutlichen die Bewegung vesikulärer Strukturen während des Beobachtungszeitraumes. Es findet sowohl anterograder (Pfeilspitzen) als auch retrograder (offene Pfeilspitzen) Transport einzelner axonaler Vesikel statt. Messbalken: 10 μm (gültig für alle Bilder)

3.9.6 Markierung des OR Proteins in der Plasmamembran

Im Besonderen die Beobachtung, dass ein retrograder Transport von OR Proteinen erfolgte, führte zu der Frage, ob es sich dabei um solche Proteine handelte, die bereits in die axonale Plasmamembran inseriert gewesen waren und anschließend wieder internalisiert wurden. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die Technik der ACP-Markierung angewendet. Dazu wurde das mOR256-17-EGFP Expressionskonstrukt um eine zweite Markierung, das Acyl Carrier Protein (ACP) erweitert (George et al., 2004). ACP bindet durch eine kovalente

Kopplung bei Anwesenheit des Enzyms ACP Synthase das fluoreszierende Substrat CoenzymA-Alexa647 (Abb. 27). Da weder das Substrat noch das Enzym durch die Zellmembran lebender Zellen gelangen können, kann nur solches ACP markiert werden, welches zum Zeitpunkt der enzymatischen Reaktion funktionell im extrazellulären Raum lokalisiert ist (Abb. 27). Markiertes Protein kann anschließend nach Internalisierung und Transport auch intrazellulär nachgewiesen und verfolgt werden.

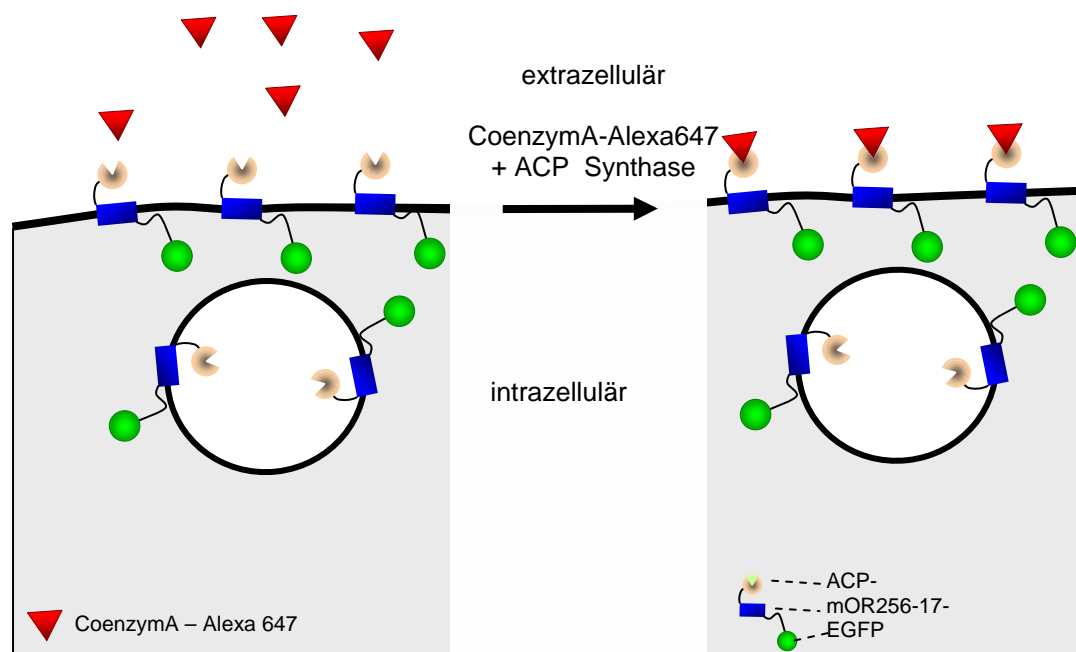


Abbildung 27: Extrazelluläre Markierung durch Acyl Carrier Protein

Schematische Darstellung der Funktionsweise einer Acyl Carrier Protein (ACP) Markierung: Mittels einer nur extrazellulär vorliegenden ACP Synthase wird das zugegebene fluoreszierende Substrat CoenzymA-Alexa647 (rotes Dreieck) durch kovalente Kopplung an das ACP markierte Protein gebunden. Im hier gezeigten Fall liegt ACP-mOR256-17-EGFP entweder intrazellulär in Vesikeln oder in die Plasmamembran inseriert vor. Bei funktionellem Einbau des Fusionsproteins in die Plasmamembran kommt das N-Terminale fusionierte ACP extrazellulär zu liegen. Dieses wird durch das extrazellulär vorliegende Substrat (CoenzymA-Ax647) und Enzym (ACP Synthase) markiert, während intrazellulär vorliegendes ACP-mOR256-17-EGFP unmarkiert bleibt.

Zur Detektion von mOR256-17-EGFP an der Oberfläche von transfizierten OSN wurde ACP an den extrazellulär liegenden N-Terminus des OR fusioniert. Nach Transfektion von ACP-mOR256-17-EGFP in OE Explantate konnte anhand der EGFP Fluoreszenz festgestellt werden, dass auch das ACP-Fusionsprotein in das Axonende transportiert wurde (Abb. 28A). Nach Durchführung der ACP-Markierung für 30 min konnte zudem beobachtet werden, dass eine Fraktion des ACP-mOR256-17-EGFP Proteins zusätzlich mit Alexa647 Farbstoff markiert war (Abb. 28B).

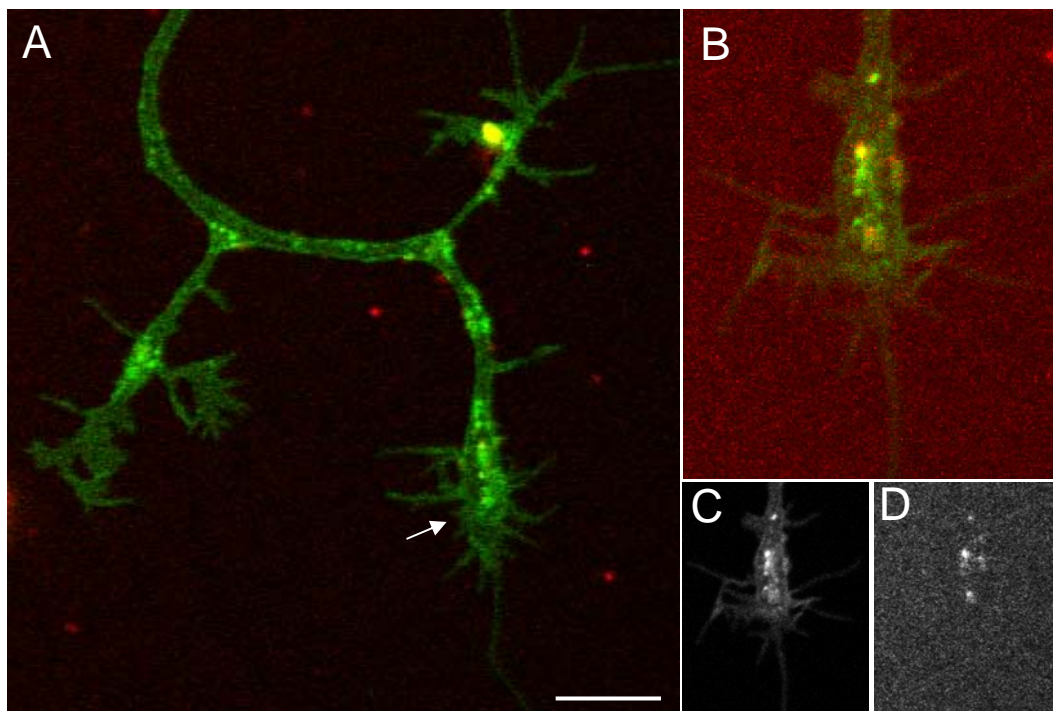


Abbildung 28: Markierung des ACP-mOR256-17-EGFP in Wachstumskegeln

Transfektion von ACP-mOR256-17-EGFP in OE Explantate und Kultivierung für 3 Tage in OB Kokultur

A: Axonale Endigung eines ACP-mOR256-17-EGFP (grün) exprimierenden OSN nach Kopplung von CoenzymA-Alexa647 (rot). ACP-mOR256-17-EGFP ist in Filopodien, in Lammelipodien, in vesikulären Strukturen und in einer randständigen Linie im Axon vorhanden. Messbalken: 10 μm

B: Vergrößerte Darstellungen des in A mit Pfeil markierten Wachstumskegel zeigt Überlagerung von EGFP (grün) und CoenzymA-Alexa647 (rot) Fluoreszenz. Kolokalisation beider Fluorophore (gelb) ist in vesikulären Strukturen im Zentrum des Wachstumskegels zu erkennen.

C: Einzelkanaldarstellung von EGFP aus B

D: Einzelkanaldarstellung von CoenzymA-Alexa647 aus B

Um zu prüfen, ob solch markiertes ACP-mOR256-17-EGFP auch vesikulär transportiert wurde, wurden „Time lapse“ Untersuchungen durchgeführt (Abb. 29). In einem initialen Experiment konnte dabei erstmals beobachtet werden, dass retrograd transportierte ACP-mOR256-17-EGFP Vesikel (Abb. 29A1-C1 Pfeilspitzen) teilweise ebenfalls positiv für den Alexa647 Farbstoff waren (Abb. 29A2-C2 Pfeilspitzen); diese bewegten sich mit einer Geschwindigkeit von $\sim 0,25 \mu\text{m/s}$ retrograd innerhalb des Axons (Abb. 29A-C). Somit konnte gezeigt werden, dass es sich in der Tat um in die Membran inserierte Rezeptorproteine handelte, die internalisiert und transportiert wurden.

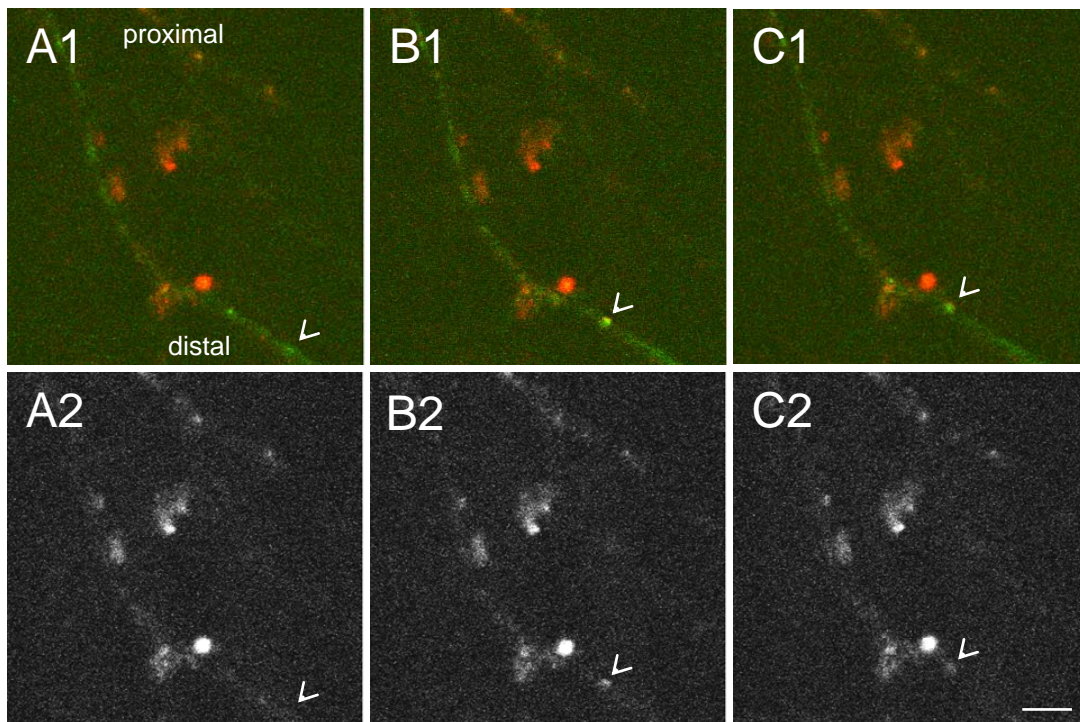


Abbildung 29: Retrograder Transport nach OR Internalisation

Transfektion von ACP-mOR256-17-EGFP (grün) in OE Explantate und ACP-Markierung mit CoenzymA-Alexa647 (rot und in schwarz-weißer Einzelkanaldarstellung) nach 2 Tagen in Kultur.

A1-C1: Ausschnitt eines ACP-mOR256-17-EGFP positiven Axons (grün) eines transfizierten OSN. Am distalen Ende (rechts unten) befindet sich ein EGFP positives Vesikel (offene Pfeilspitze) zusätzlich markiert durch Alexa647 (rot).

Nach 14 Sekunden (B1) ist das ACP-mOR256-17-EGFP positive Vesikel retrograd transportiert worden. 28 Sekunden (C1) nach Zeitpunkt in A bewegte sich das Vesikel um $\sim 8 \mu\text{m}$ weiter.

A2-C2: Einzelkanaldarstellung der Alexa647 Fluoreszenz aus A1-C1. Alexa647 Markierung aus A1 - C1 (Pfeilspitzen) ist ebenso retrograd gewandert.

Messbalken: $10 \mu\text{m}$ (gültig für alle Bilder)

3.9.7 Lokalisation des OR Proteins nach Einwuchs in den OB

Diese Ergebnisse zeigten damit, dass OR Proteine in wachsenden axonalen Fortsätzen *in vitro* vorhanden waren und somit eine direkte Funktion in der Weg- und Zielfindung der Axone im OB wahrnehmen könnten. Um zu prüfen, ob diese OR Proteine auch in Axonen vorhanden waren, die in ein OB Explantat eingewachsen waren, wurden transfizierte OE Explantate in OB-Vorkultur kultiviert und mOR256-17-EGFP exprimierende OSN näher untersucht. Sinnesneurone, die das Fusionsprotein mOR256-17-EGFP enthielten zeigten ein vergleichbares Wachstum, wie die OSN, die das endogene mOR256-17 Gen exprimierten (zum Vergleich siehe Abb. 19), d.h. die Axone wuchsen zunächst geradlinig aus dem OE Explantat aus und wurden anschließend zum vorkultivierten OB Explantat hin abgelenkt

(Abb. 30). Nach Kontakt mit dem OB Gewebe wuchsen entsprechende Axone zunächst am Rand des OB Gewebes entlang und verzweigten sich nach dem Einwachsen; hier konnte sogar ein deutlich ausgeprägter Wachstumskegel am Ende der Fasern detektiert werden. Weiterhin konnten entlang des Axons mOR256-17-EGFP positive Vesikel beobachtet werden, die auch unmittelbar vor dem Wachstumskegel vorhanden waren (Abb. 30 Vergrößerung). Somit konnte gezeigt werden, dass das OR Protein auch *in vitro* in wachsenden axonalen Fortsätzen innerhalb des OB Gewebes vorhanden war.

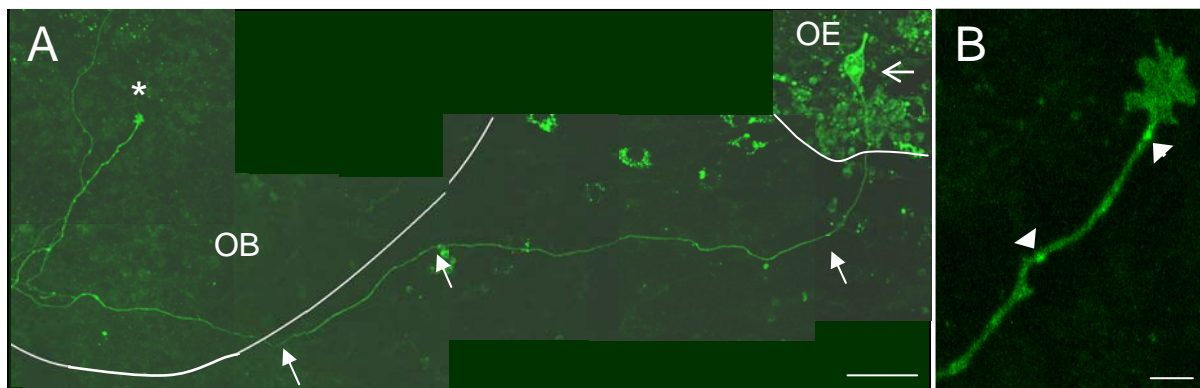


Abbildung 30: OR Protein Transport in OB einwachsende Axone

Kultivierung eines mit mOR256-17-EGFP transfizierten OE Explantats für 5 Tage auf vorkultiviertem OB Gewebe
 A: mOR256-17-EGFP exprimierende Zelle (offener Pfeil in OE) besitzt einzelnes Axon, welches zunächst geradlinig aus dem OE Explantat herauswächst, bevor es vom OB angezogen wird (Pfeil rechts). Vor Bulb Gewebe findet zunächst seitlich orientiertes Wachstum statt (Pfeil mitte), bevor das Axon in den OB einwächst (Pfeil links). Durch die Fluoreszenz des mOR256-17-EGFP Fusionsproteins ist innerhalb des OB Gewebes deutlich ein Wachstumskegel (Stern) zu erkennen. Messbalken: 50 μ m

B: Durch die vergrößerte Darstellung des Wachstumskegels sind im davorliegenden Axon zwei mOR256-17-EGFP positive vesikuläre Strukturen (Pfeilspitzen) zu erkennen. Messbalken: 10 μ m

3.9.8 Mutation des G-Protein Bindemotivs stört Rezeptor Verteilung

Um einen tieferen Einblick in die funktionelle Rolle des Odorantrezeptorproteins bei der axonalen Wegfindung zu erhalten, wurden mutierte Rezeptorvarianten analysiert. Kürzlich durchgeführte *in vivo* Studien haben gezeigt, dass die Projektion von Sinnesneuronen in den OB gestört ist, wenn ein konserviertes Motiv mutiert wird, welches zur Bindung des G-Proteins an den OR notwendig ist (Imai et al., 2006). Es konnte jedoch nicht geklärt werden, welche molekularen Mechanismen diesem Defekt zugrunde liegen. Mithilfe des *in vitro* Systems konnte nun dieser Frage weiter nachgegangen werden. Zu diesem Zweck wurde eine Variante von mOR256-17 hergestellt, in der wie in der vorangegangenen Studie die DRY Sequenz (¹²¹Asp-Arg-Tyr¹²³) durch RDY ersetzt wurde. Nach Transfektion der mOR256-17-RDY-EGFP Variante in OE Explantate konnte im Vergleich zum wildtypischen mOR256-17-

EGFP weder Fluoreszenz im Golgi-Apparat noch in den Neuriten nachgewiesen werden (Abb. 31A, B). Stattdessen war eine diffuse EGFP Fluoreszenz im Soma von transfizierten Zellen detektierbar. Teilweise konnte diesen Zellen zwar ein fluoreszierender Fortsatz zugeordnet werden (Abb. 31A Pfeil); jedoch konnten in keinem Fall olfaktorische Sinnesneurone beobachtet werden, die das mutierte mOR256-17-RDY-EGFP Rezeptorprotein in das Axon, den Dendriten oder die Cilien transportierten (siehe Abb. 31C, D für wildtypisches mOR256-17-EGFP). Diese Befunde deuteten daraufhin, dass die Mutation der G-Protein Bindedomäne eine massive Störung der OR Verteilung in den OSN zur Folge hatte.

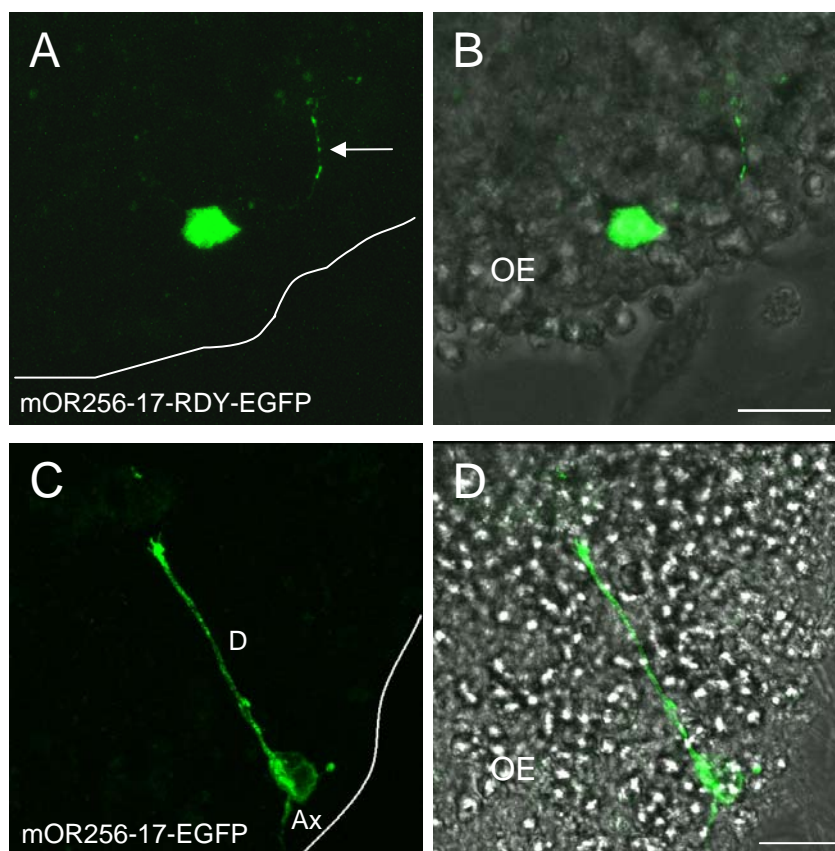


Abbildung 31: Gestörte OR Lokalisation nach Mutation des G-Protein Bindemotivs
 Transfektion von mOR256-17-RDY-EGFP (A, B) bzw. mOR256-17-EGFP (C, D) in OE Explantate und Visualisierung der EGFP Fluoreszenz nach 1-2 Tagen Kultivierung.
 A, B: mOR256-17-RDY-EGFP Protein in transfizierter Zelle innerhalb eines OE Explantates zeigt keine typische Lokalisation auf. EGFP Fluoreszenz ist gleichmäßig verteilt und lässt keine Zuordnung in Zellkompartimente zu. EGFP⁺ längliche Struktur (Pfeil) ist in der Nähe der transfizierten Zelle zu erkennen. Messbalken: 20 µm
 C, D: mOR256-17-EGFP transfiziertes OSN innerhalb eines OE Explantats. Die typischer bipolare Morphologie der OSN bestehend aus Axon (Ax) und Dendrit (D) mit Knob und Cilien ist durch den Transport des Fusionsproteins zu erkennen. Messbalken: 20 µm

Diskussion:

In der hier vorgelegten Arbeit wurden Präparationstechniken und Bedingungen für Explantatkulturen des olfaktorischen Systems der Maus etabliert und soweit optimiert, dass fundamentale Prozesse der Weg- und Zielfindung olfaktorischer Axone *in vitro* rekapituliert werden konnten. Frühere *in vitro* Studien an olfaktorischen Sinnesneuronen lieferten zwar erste Erkenntnisse z. B. über die Interaktionen zwischen olfaktorischen Axonen und diversen Komponenten der extrazellulären Matrix (Chuah et al., 1991; Whitesides, III und LaMantia 1996; Gong und Shipley 1996) oder den olfaktorischen Gliazellen (Chuah und Au 1994). Jedoch erst durch den Einsatz transgener Mauslinien, in denen definierte Sinneszellpopulationen und ihre zellulären Fortsätze durch intrinsische Fluoreszenz sichtbar wurden, konnten in dieser Studie mittels „live-cell imaging“ detaillierte Untersuchungen an wachsenden Axonen durchgeführt werden. Entsprechende Kultursysteme haben sich als ein wichtiges Werkzeug für die Aufklärung zentraler Mechanismen der Weg- und Zielfindung z.B. von Retinalganglienzellen (Hopker et al., 1999; Erskine et al., 2000; Brunet et al., 2005) oder Motoneuronen (Patel et al., 2001; Huber et al., 2005) erwiesen.

Im Zuge der Optimierungsarbeiten für das olfaktorische *in vitro* System wurde dabei ein besonderer Typ von Explantaten des olfaktorischen Epithels beobachtet, der hauptsächlich aus den Stammzell-Populationen des OE bestand; interessanterweise wurde durch diese Explantatart eine deutliche Beeinflussung des Wachstums von olfaktorischen Axonen hervorgerufen, die zu einer überraschend starken Bündelung von Axonen und deren Attraktion führte. Ein solcher Effekt wurde bisher noch nicht beschrieben und könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass die basal gelegenen Zellen im OE nicht nur zur Regeneration des OE befähigt (Graziadei und Graziadei 1979b), sondern möglicherweise auch in Prozesse der Axonlenkung involviert sind. Es wäre denkbar, dass sie die neu gebildeten Axone von apikal gelegenen Neuronen in die Richtung der Basallamina lenken, durch die sie hindurch treten müssen, um in der darunter liegenden *lamina propria* mit anderen Axonen faszikulieren zu können. Möglicherweise spielt in diesem Kontext das chemoattraktive Netrin-1 (Culotti und Merz 1998) eine Rolle, das direkt unterhalb der Basallamina mit immunhistochemischen Techniken detektiert werden konnte (Astic et al., 2002), wobei jedoch unklar blieb, von welchem Zelltyp es produziert wird. Da in dieser Studie Kulturbedingungen etabliert wurden, mit denen der Anteil solcher Basalzellexplantate gezielt manipulierbar war (siehe Abb. 6), könnten weiterführende Studien dazu genutzt

werden, relevante Komponenten, die für die Attraktion und Bündelung verantwortlich sind, anzureichern, zu isolieren und schließlich zu identifizieren.

Mit den *in vitro* Kulturen konnten klare Evidenzen dafür erhalten werden, dass das Wachstum olfaktorischer Axone in starkem Maße durch ihr Zielgewebe, den olfaktorischen Bulbus, beeinflusst wird. Dabei wurden eine Steigerung der Wachstumsrate, eine weitreichende Attraktion sowie eine Faszikulation der Axone beobachtet. Bei diesen Prozessen spielen offenbar sowohl lösliche Faktoren als auch kontakt-vermittelte Interaktionen eine Rolle. Durch die *in vitro* Studien konnten erstmals gezielte Einblicke in definierte Abschnitte der Interaktion von Axonen und Bulbusgewebe gewonnen werden. So wurde direkt sichtbar, dass der OB seine attraktive Wirkung nicht unmittelbar auf auswachsende Axone ausübte, sondern dass diese erst nach einiger Zeit in Kultur ihre Wachstumsrichtung änderten und dann zum OB Gewebe wuchsen. Diese Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass die molekularen Komponenten, die der Axonlenkung zugrunde liegen, erst im Prozess der Ausdifferenzierung der OSN generiert wurden. Diese Befunde stehen vermutlich in engem Zusammenhang mit der früheren Beobachtung, dass olfaktorische Axone vor dem Einwachsen in das Zielgewebe eine Warteperiode durchlaufen (Gong und Shipley 1995; Renzi et al., 2000; Conzelmann et al., 2001), und erst im Anschluss daran in das Gewebe eindringen und synaptische Kontakte ausbilden (Treloar et al., 1996; Treloar et al., 1999). Damit verhalten sie sich in gleicher Weise wie z.B. auch die Axone des Hinterwurzelganglions oder des corticospinalen Systems (Schreyer und Jones 1988; Watanabe et al., 2006). Wie die Prozesse der Differenzierung von Neuronen und der Wegfindung ihrer Axone zeitlich so exakt aufeinander abgestimmt werden, ist bislang noch immer sehr wenig verstanden, da *in vivo* die vielfältigen Interaktionen zwischen Neuronen, Gliazellen und Zielzellen nur schwer zu analysieren sind. Durch *in vivo* Studien konnten zwar erste molekulare Komponenten, wie z.B. Semaphorin3A (Schwartz et al., 2000) und Robo/Slit (Cho et al., 2007), die zur korrekten Etablierung des Projektionsmusters beitragen, identifiziert werden, jedoch sind in keinem Fall die genauen Wirkmechanismen der jeweiligen Faktoren auf wachsende Axone untersucht worden. Erst durch den Einsatz von *in vitro* Kulturen ist dies für andere neuronale Systeme gelungen (Tessier-Lavigne und Goodman 1996; Bashaw et al., 2000; Hong et al., 2000; Knoll und Drescher 2004). Durch das hier etablierte *in vitro* System eröffnen sich nun auch Möglichkeiten, den Effekt definierter Faktoren auf das Wachstum distinkter Axone von OSN Subpopulationen selektiv zu

analysieren und Einblicke in die molekularen Mechanismen der hochkomplexen Verdrahtung olfaktorischer Sinnesneurone mit dem Bulbus zu erhalten.

Durch den Einsatz dieses Systems ist es bereits im Rahmen dieser Arbeit gelungen, neue Erkenntnisse über einen zentralen Mitspieler im Prozess der Verschaltung, den Odorantrezeptor zu gewinnen. Basierend auf früheren Studien, in denen Odorantrezeptorgene ausgeschaltet oder gegeneinander ausgetauscht wurden (Mombaerts et al., 1996; Wang et al., 1998), wird seit einiger Zeit dieser Rezeptortyp als eine wichtige molekulare Determinante in der Wegfindung olfaktorischer Axone diskutiert. Durch immunhistochemische Untersuchungen wurde das OR Protein tatsächlich in den axonalen Fortsätzen bis zu den Endigungen im Glomerulus nachgewiesen (Barnea et al., 2004; Strotmann et al., 2004). Trotz dieser Hinweise auf eine Beteiligung des Rezeptorproteins am Zielfindungsprozess blieb eine zentrale Frage in diesem Kontext unbeantwortet: Ist der Rezeptor bereits während des Wegfindungsprozesses im wachsenden Axon vorhanden? Mit Hilfe des *in vitro* Systems konnte nun zum ersten Mal der Nachweis erbracht werden, dass sich das OR Protein in der Tat im Wachstumskegel olfaktorischer Axone befindet, womit er direkt an der Wegfindung beteiligt sein könnte. Eines der Modelle, das bezüglich der Rolle des OR bei diesem Prozess diskutiert wird, schlägt vor, dass das OR Protein durch eine direkte Interaktion die Faszikulation von Axonen mit gleicher Rezeptor-Ausstattung vermittelt (Feinstein und Mombaerts 2004); ein Mechanismus, der letztendlich zur Konvergenz OR-spezifischer Axone im Glomerulus führen könnte. Hierbei ist von zentraler Bedeutung, dass das Rezeptorprotein in die Membran des Wachstumskegels inseriert ist. Durch die Expression eines Fusionproteins in OSN konnte im Verlauf dieser Arbeit dessen Präsenz in der Membran des Wachstumskegels und speziell in den Filopodien nachgewiesen werden. Das Vorhandensein von extrazellulär markierten ACP-OR Fusionsproteinen ergab weitere Evidenzen, dass Rezeptorproteine in die Plasmamembran eingebaut sind und somit direkt in die Wegfindung involviert sein könnten.

Der Mechanismus, mit dem das Rezeptorprotein in das weit vom Zellkörper entfernt gelegene Axon und sogar bis in den Glomerulus gelangt, ist bislang ungeklärt. Der überraschende Befund, dass in den olfaktorischen Axonen die mRNA für Odorantrezeptoren nachgewiesen werden konnte (Vassar et al., 1994; Ressler et al., 1994), führte zu der These, dass möglicherweise eine lokale Translation dieser mRNA in den Axonendigungen stattfindet und somit das benötigte Protein vor Ort synthetisiert werden könnte. Die Mechanismen

einer axonalen Proteinsynthese sind besonders in letzter Zeit für retinale oder DRG Axone intensiv erforscht worden und haben gezeigt, dass dort ein gerichtetes axonales Wachstum, welches von Wegfindungsmolekülen wie z.B. Semaphorin3A, Slit2 oder Netrin1 induziert wird, von einer lokalen Translation abhängt (Campbell und Holt 2001; Li et al., 2004; Wu et al., 2005; Piper et al., 2006). Für das olfaktorische System liegen bislang noch keine direkten Evidenzen dafür vor, dass die im Axon lokalisierte mRNA der OR tatsächlich lokal translatiert wird. Die Anwesenheit von distinkten Transkriptionsfaktoren wie Emx2 in den Axonen olfaktorischer Sinnesneurone wurde allerdings als ein unterstützendes Indiz gewertet (Nedelec et al., 2005), da die Involvierung von Transkriptionsfaktoren in der lokalen Proteinsynthese bereits in retinalen Axonen beobachtet werden konnte (Brunet et al., 2005). Die in dieser Studie mittels „live-cell imaging“ gewonnenen Daten zur Rezeptorlokalisierung deuten allerdings eher auf einen vesikulären Transport des Rezeptorproteins in das axonale Kompartiment hin, jedoch ist die Frage, wo die Translation des distal lokalisierten Rezeptorproteins stattfindet, nicht abschließend zu beantworten. Insgesamt wurden die Erkenntnisse bezüglich eines lokalen Translationsprinzips vor allem dadurch ermöglicht, dass DRG Explantate oder retinale Ganglienzellen in der Zellkultur ein stark ausgeprägtes Axonwachstum aufweisen. Mit den etablierten Explantatkulturen, in denen ein entsprechendes robustes und langes axonales Wachstum generiert wurde, steht nun auch für das olfaktorische System ein solches Werkzeug zur Verfügung. Durch *in vitro* Transfektion entsprechender Reporterstrukture in OSN könnten weitergehende Studien nun auch für die Axone olfaktorischer Sinnesneurone durchgeführt werden.

Die Frage, wie ein Signal, das vom OR generiert wird in eine zelluläre Antwort, speziell in eine Änderung der Wachstumsrichtung umgesetzt wird, ist noch nicht komplett verstanden. Kürzlich durchgeführte Studien haben erste Hinweise darauf gegeben, dass eine Signalkaskade, die zur Synthese des sekundären Botenstoffs cAMP führt, darin involviert zu sein scheint (Imai et al., 2006). In verschiedenen Experimenten wurde dabei aufgedeckt, dass die Konvergenz der Axone in Glomeruli entlang der anterior-posterioren Achse des OB von der cAMP Konzentration abhängt (Chesler et al., 2007; Col et al., 2007). Die Generierung von cAMP war dabei vom G-Protein G_{α_s} und der Adenylat Cyclase III, jedoch nicht vom G-Protein $G_{\alpha_{olf}}$ abhängig (Belluscio et al., 1998), wodurch ein Beitrag der typischen Duftstoff-vermittelten Signalkaskade in den Cilien zur direkten Wegfindung ausgeschlossen wurde. Die Befunde deuteten zusätzlich darauf hin, dass die cAMP vermittelte Aktivität der

Proteinkinase A und des CREB (cAMP response element Bindeprotein) die Expression von Neuropilin-1 reguliert. Dabei ist allerdings noch unklar, wie das cAMP Signal, das wahrscheinlich vom Rezeptor im axonalen Kompartiment generiert wird, in das Soma transferiert wird und dort eine Genexpression bewirkt. Das Ergebnis der hier durchgeführten Studie zur Lokalisation des OR Proteins ergab deutliche Hinweise für einen retrograden Transport des Rezeptors durch Vesikel; basierend auf diesen Daten erscheint es denkbar, dass die Rezeptoren nach einem Prinzip agieren, das ähnlich abläuft, wie die von Neurotrophinen induzierten Prozesse. So initiiert die Bindung von NGF am Wachstumskegel eine lokale Translation von CREB, welches anschließend zusammen mit dem aktivierten NGF Rezeptor retrograd durch das Axon in den Zellkern transportiert wird (Cox et al., 2008) und dort eine spezifische Genexpression reguliert. Somit sind starke Evidenzen vorhanden, dass ein OR-vermitteltes cAMP Signal im distalen Axonkompartiment initiiert wird und über die vorgeschlagene Signalkaskade zur Bildung der Glomeruli beiträgt.

Die Frage, ob eine Unterbrechung der Kaskade, die zur Bildung von cAMP führt, eine Konvergenz der Axone verhindert, führte kürzlich zu einem überraschenden Ergebnis; ein knock-out der Adenylat Cyclase III resultierte zwar in einer Verschiebung der glomerulären Positionen (Col et al., 2007), die Konvergenz der OR spezifischen Axone blieb allerdings erhalten. Die Einführung einer Mutation in die OR Sequenz, die eine Interaktion des Rezeptors mit G-Proteinen verhindert, resultierte jedoch in einer gestörten Konvergenz (Imai et al., 2006). Dieses Ergebnis wurden als eine Bestätigung der These angesehen, dass eine OR-abhängige cAMP Kaskade für den Prozess der Konvergenz notwendig ist. Ein Versuchsansatz mit einer entsprechenden mutanten Rezeptorvariante im *in vitro* System zeigte nun allerdings, dass dieses Protein nicht wie die unveränderte Form im Sinnesneuron verteilt vorlag. Der Grund für die *in vivo* beobachtete fehlende Konvergenz der Axone könnte also stattdessen ein Resultat der gestörten Verteilung des Rezeptorproteins sein.

Insgesamt haben die im Rahmen der hier vorgelegten Studie erzielten Ergebnisse gezeigt, dass mit der etablierten Explantatkultur des olfaktorischen Systems eine Rekapitulation elementarer Prozesse der *in vivo* Situation gelungen ist, und dass dieses ein geeignetes Werkzeug darstellt, um detaillierte Informationen zu den molekularen Mechanismen zu gewinnen, die zur hochkomplexen Verdrahtung der olfaktorischen Axone führen.

Zusammenfassung

Olfaktorische Sinnesneurone (OSN), die mit einem bestimmten Odorantrezeptor (OR) ausgestattet sind, liegen weit verstreut im olfaktorischen Epithel (OE) der Nase und senden ihr Axon in gemeinsame Glomeruli im olfaktorischen Bulb (OB). In einem räumlich hochkonservierten Muster werden dort rezeptorspezifisch synaptische Kontakte mit nachgeschalteten Projektions- und Interneuronen hergestellt. Über die molekularen Mechanismen, die dieser höchstpräzisen Verdrahtung zugrunde liegen ist trotz intensiver Forschung noch immer wenig bekannt. Im Hinblick auf eine Aufklärung der komplexen Prozesse ist ein geeignetes experimentelles System erforderlich, das eine gezielte Manipulation der auswachsenden Axone ermöglicht. In der hier vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst ein *in vitro* System mit Gewebeexplantaten des olfaktorischen Systems etabliert. Die Verwendung transgener Mauslinien, in denen spezifische Sinneszellpopulationen inklusive aller zellulären Ausläufer durch intrinsische Fluoreszenz visualisierbar sind, erlaubte eine kontinuierliche Beobachtung distinkter Axonpopulationen unter definierten und manipulierbaren Bedingungen. Zellen in Explantaten des OE, die zum Zeitpunkt des Embryonalstadiums 14 (E14) in Kultur gebracht wurden, entwickelten nach wenigen Tagen zahlreiche axonale Ausläufer, die radiär und unfaszikuliert aus den Explantaten auswuchsen. Die Explantate enthielten nach kurzer Kultivierung hauptsächlich Vorläuferzellen von olfaktorischen Sinneszellen; nach einigen Tagen konnten bereits zahlreiche reife Sinneszellen mit robustem Axonwachstum nachgewiesen werden. Durch den Einsatz einer rezeptorspezifischen transgenen Mauslinie konnte weiterhin die Expression distinkter OR Gene in Subpopulationen von Sinneszellen sichtbar gemacht werden. Die Kulturbedingungen erlaubten also die Differenzierung von Vorläuferzellen zu typischen olfaktorischen Sinnesneuronen mit charakteristischer Genexpression.

Bezüglich der zentralen Frage zu Interaktionen zwischen olfaktorischen Axonen und ihrem Zielgewebe zeigten Kokultur-Experimente, dass ein Kontakt der Axone mit dem OB Gewebe zunächst eine repulsive Wirkung hatte. Erst eine Vorkultivierung des OB Gewebes resultierte in einer attraktiven Wirkung, wodurch die Axone sogar aus großen Entfernungen vom OB angezogen wurden. Die Anwesenheit des Bulbusgewebes hatte zudem einen positiven Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Axone. Dabei kam es zunächst zu einer starken Bündelung von Axonen, die in unmittelbarer Nähe des OB wieder in einzelne Fasern

defaszikulierten. Diese Ergebnisse zeigten, dass mit dem in dieser Arbeit etablierten Explantatsystem charakteristische Parameter der Generierung olfaktorischer Sinneszellen, des Auswachsens von Axonen und der Interaktion der Axone mit ihrem Zielgewebe *in vitro* rekapituliert werden konnten. Somit wurden ideale Voraussetzungen dafür geschaffen, um zentrale Fragestellungen zu den molekularen Mechanismen zu bearbeiten, die der Etablierung der einzigartigen Verschaltung in diesem System zugrunde liegen.

Die Explantatkulturen wurden im Folgenden dazu genutzt, die Rolle, die das olfaktorische Rezeptorprotein bei dem Prozess der olfaktorischen Wegfindung spielt, näher zu untersuchen. Durch Expression von genetisch modifizierten Varianten des Odorantrezeptors mOR256-17 in den Explantaten konnten neue Einblicke in dessen subzelluläre Lokalisation gewonnen werden. Anhand eines mOR256-17-EGFP Fusionsproteins wurde ein vesikulärer Transport in die Dendriten der Sinneszellen sichtbar, welcher in einer Akkumulation des OR Proteins in den Cilien resultierte. Erstmals wurde mit dieser Technik das OR Protein in vesikulären Strukturen des Axons sichtbar, die anterograd und retrograd transportiert wurden. Der Rezeptor konnte in den Wachstumskegeln wachsender Axone und dort speziell in den Filopodien visualisiert werden. Mittels einer neuartigen Nachweismethode, mit der selektiv Proteine markiert werden können, die in der Plasmamembran lokalisiert sind, konnte ein retrograder Transport von internalisierten mOR256-17 Proteinen beobachtet werden. Die Generierung einer OR-Variante, bei der die Interaktionsdomäne des Rezeptors mit G-Proteinen mutiert wurde, resultierte in einer gestörten Verteilung des OR Proteins in den Sinneszellen.

Insgesamt wurde mit dem in dieser Arbeit etablierten *in vitro* System ein entscheidendes Werkzeug geschaffen, mit dem bereits neue Einblicke in die Funktion distinkter molekularer Komponenten gewonnen wurde und dessen zukünftiger Einsatz zum weiteren Verständnis der komplexen Prozesse bei der Projektion olfaktorischer Sinneszellen beitragen kann.

Summary

Olfactory sensory neurons (OSN) expressing a particular odorant receptor (OR) are widely scattered throughout the olfactory epithelium (OE) of the nose and send their axon into a small number of common glomeruli in the olfactory bulb (OB). In a spatially well conserved pattern these axons establish synaptic contacts to second order neurons. The molecular mechanisms underlying the precise wiring are still not well understood. To generate a system which may facilitate the investigation of distinct aspects of this complex process, an *in vitro* culture with tissue explants from the olfactory system was established in the present work. The use of tissues from transgenic mice which enabled the visualisation of OSN and their processes by intrinsic fluorescence allowed a continuous observation of distinct axonal populations under defined and manipulable conditions. Cells within an explant from the OE harvested at the embryonic stage 14 (E14) extended numerous axonal processes within a few days which grew out radially and without fasciculation. During the initial culture period the explants contained mainly progenitor cells; after several days in culture cells differentiated to OMP-positive, thus mature OSN. Using receptor specific transgenic mouse lines the expression of distinct OR genes in a subpopulation of OSN could be detected. Altogether, the culture conditions thus allowed the differentiation of progenitor cells into OSN with characteristic gene expression. Concerning the key question of how axons of OSN interact with their target tissue, co-culture experiments with OB tissue were performed; they showed that axons were initially repelled by their target. A precultivation of OB tissue, however, resulted in an attraction of axons even from larger distances. Moreover, the bulb tissue exerted a positive effect on the growth rate of OSN axons. During their growth these axons formed bundles which defasciculated in the vicinity of the OB explants. These results showed that characteristic parameters in the generation of OSN, their axonal growth and interactions with the target tissue were recapitulated by the *in vitro* culture system, thus, providing optimal conditions for the examination of key questions regarding the molecular mechanisms involved in establishing the unique projection pattern.

Subsequently, the explant culture system was used to investigate the role of the odorant receptor protein in the process of path finding. Expression of genetically modified receptor variants in the explants revealed novel insights into the subcellular localisation of the odorant receptor mOR256-17. An mOR256-17-EGFP fusion protein could be detected in

vesicles transported into the dendrite of OSN, resulting in an accumulation of the OR in the cilia. Using this technique it was possible to observe for the first time OR proteins in vesicles which were transported anterogradely and retrogradely along the entire axon. The OR could be visualised within the growth cones and the attached filopodia. Taking advantage of a novel detection method in which proteins integrated into the plasma membrane were selectively marked, retrogradely transported vesicles containing internalised mOR256-17 protein could be observed. The generation of an OR variant, in which the G-protein binding domain was mutated resulted in a disturbed localisation of the OR protein within OSN.

Hence, by developing an improved *in vitro* explant system, an important tool was generated that allowed novel insights into the function of distinct molecular components and should be valuable for future studies aimed at understanding the complex processes that lead to the precise connection of OSN with their target.

Literaturverzeichnis

- Akins M.R. and Greer C.A. (2006a) Axon behavior in the olfactory nerve reflects the involvement of catenin-cadherin mediated adhesion. *J Comp Neurol.* 499, 979-989.
- Akins M.R. and Greer C.A. (2006b) Cytoskeletal organization of the developing mouse olfactory nerve layer. *J Comp Neurol.* 494, 358-367.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., and Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Asson-Batres M.A., Zeng M.S., Savchenko V., Aderoju A., and McKanna J. (2003) Vitamin A deficiency leads to increased cell proliferation in olfactory epithelium of mature rats. *J Neurobiol.* 54, 539-554.
- Astic L., Pellier-Monnin V., Saucier D., Charrier C., and Mehlen P. (2002) Expression of netrin-1 and netrin-1 receptor, DCC, in the rat olfactory nerve pathway during development and axonal regeneration. *Neuroscience* 109, 643-656.
- Au W.W., Treloar H.B., and Greer C.A. (2002) Sublamina organization of the mouse olfactory bulb nerve layer. *J. Comp Neurol.* 446, 68-80.
- Bakalyar H.A. and Reed R.R. (1990) Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* 250, 1403-1406.
- Barnea G., O'Donnell S., Mancina F., Sun X., Nemes A., Mendelsohn M., and Axel R. (2004) Odorant receptors on axon termini in the brain. *Science* 304, 1468.
- Bashaw G.J., Kidd T., Murray D., Pawson T., and Goodman C.S. (2000) Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell* 101, 703-715.
- Belluscio L., Gold G.H., Nemes A., and Axel R. (1998) Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron* 20, 69-81.
- Belluscio L. and Katz L.C. (2001) Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs. *J Neurosci.* 21, 2113-2122.
- Biju K.C., Marks D.R., Mast T.G., and Fadool D.A. (2008) Deletion of voltage-gated channel affects glomerular refinement and odorant receptor expression in the mouse olfactory system. *J Comp Neurol.* 506, 161-179.
- Brunet I., Weinl C., Piper M., Trembleau A., Volovitch M., Harris W., Prochiantz A., and Holt C. (2005) The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* 438, 94-98.

- Caggiano M., Kauer J.S., and Hunter D.D. (1994) Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron* 13, 339-352.
- Calof A.L. and Chikaraishi D.M. (1989) Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: Proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor in vitro. *Neuron* 3, 115-127.
- Campbell D.S. and Holt C.E. (2001) Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 32, 1013-1026.
- Cannella M.S. and Ross R.A. (1987) Influence of substratum on the retrograde response of the rat superior cervical ganglion in vitro. *Exp Neurol.* 95, 652-660.
- Carter L.A., MacDonald J.L., and Roskams A.J. (2004) Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *J Neurosci* 24, 5670-5683.
- Chesler A.T., Zou D.J., Le Pichon C.E., Peterlin Z.A., Matthews G.A., Pei X., Miller M.C., and Firestein S. (2007) A G protein/cAMP signal cascade is required for axonal convergence into olfactory glomeruli. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A* 104, 1039-1044.
- Chess A., Simon I., Cedar H., and Axel R. (1994) Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 78, 823-834.
- Cho J.H., Lepine M., Andrews W., Parnavelas J., and Cloutier J.F. (2007) Requirement for Slit-1 and Robo-2 in Zonal Segregation of Olfactory Sensory Neuron Axons in the Main Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 27, 9094-9104.
- Chuah M.I. and Au C. (1994) Olfactory cell cultures on ensheathing cell monolayers. *Chem. Sens.* 19, 25-34.
- Chuah M.I., David S., and Blaschuk O. (1991) Differentiation and survival of rat olfactory epithelial neurons in dissociated cell culture. *Dev. Brain Res.* 60, 123-132.
- Col J.A., Matsuo T., Storm D.R., and Rodriguez I. (2007) Adenylyl cyclase-dependent axonal targeting in the olfactory system. *Development* 134, 2481-2489.
- Conzelmann S., Malun D., Breer H., and Strotmann J. (2001) Brain targeting and glomerulus formation of two olfactory neuron populations expressing related receptor types. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1623-1632.
- Cox L.J., Hengst U., Gurskaya N.G., Lukyanov K.A., and Jaffrey S.R. (2008) Intra-axonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival. *Nat. Cell Biol* 10, 149-159.
- Culotti J.G. and Merz D.C. (1998) DCC and netrins. *Curr. Opin. Cell Biol* 10, 609-613.
- Cummings D.M., Emge D.K., Small S.L., and Margolis F.L. (2000) Pattern of olfactory bulb innervation returns after recovery from reversible peripheral deafferentation. *J Comp Neurol.* 421, 362-373.

- Cutforth T., Moring L., Mendelsohn M., Nemes A., Shah N.M., Kim M.M., Frisen J., and Axel R. (2003) Axonal ephrin-as and odorant receptors. Coordinate determination of the olfactory sensory map. *Cell* 114, 311-322.
- Das S., Banerjee S.K., Sil M., and Sarkar P.K. (1989) An ELISA method for quantitation of tubulin using poly-1-lysine coated microtiter plates. *Indian J Exp Biol* 27, 972-976.
- Doucette R. (1989) Development of the nerve fiber layer in the olfactory bulb of mouse embryos. *J Comp Neurol.* 285, 514-527.
- Erskine L., Williams S.E., Brose K., Kidd T., Rachel R.A., Goodman C.S., Tessier-Lavigne M., and Mason C.A. (2000) Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: expression and function of robo and slits. *J Neurosci* 20, 4975-4982.
- Feinstein P. and Mombaerts P. (2004) A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell* 117, 817-831.
- George N., Pick H., Vogel H., Johnsson N., and Johnsson K. (2004) Specific labeling of cell surface proteins with chemically diverse compounds. *J Am. Chem. Soc.* 126, 8896-8897.
- Getchell T.V. (1986) Functional properties of vertebrate olfactory receptor neurons. *Physiological Reviews* 66 (3), 772-818.
- Getchell T.V., Narla R.K., Little S., Hyde J.F., and Getchell M.L. (2000) Horizontal basal cell proliferation in the olfactory epithelium of transforming growth factor-alpha transgenic mice. *Cell Tissue Res.* 299, 185-192.
- Goetze B., Breer H., and Strotmann J. (2002) A Long-term Culture System for Olfactory Explants with Intrinsically Fluorescent Cell Populations. *Chem. Senses* 27, 817-824.
- Gogos J.A., Osborne J., Nemes A., Mendelsohn M., and Axel R. (2000) Genetic ablation and restoration of the olfactory topographic map. *Cell* 103, 609-620.
- Gong Q. and Shipley M.T. (1995) Evidence that pioneer olfactory axons regulate telencephalon cell cycle kinetics to induce the formation of the olfactory bulb. *Neuron* 14, 91-101.
- Gong Q. and Shipley M.T. (1996) Expression of extracellular matrix molecules and cell surface molecules in the olfactory nerve pathway during early development. *J. Comp Neurol.* 366, 1-14.
- Graziadei G.A. and Graziadei P.P. (1979a) Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol.* 8, 197-213.
- Graziadei P.P. and Graziadei G.A. (1979b) Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol.* 8, 1-18.

- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Henion T.R. and Schwarting G.A. (2007) Patterning the developing and regenerating olfactory system. *J Cell Physiol* 210, 290-297.
- Hong K., Nishiyama M., Henley J., Tessier-Lavigne M., and Poo M. (2000) Calcium signalling in the guidance of nerve growth by netrin-1. *Nature* 403, 93-98.
- Hopker V.H., Shewan D., Tessier-Lavigne M., Poo M., and Holt C. (1999) Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401, 69-73.
- Huard J.M.T. and Schwob J.E. (1995) Cell cycle of globose basal cells in rat olfactory epithelium. *Developmental Dynamics* 203, 17-26.
- Huber A.B., Kania A., Tran T.S., Gu C., De Marco G.N., Lieberam I., Johnson D., Jessell T.M., Ginty D.D., and Kolodkin A.L. (2005) Distinct roles for secreted semaphorin signaling in spinal motor axon guidance. *Neuron* 48, 949-964.
- Imai T. and Sakano H. (2007) Roles of odorant receptors in projecting axons in the mouse olfactory system. *Curr. Opin. Neurobiol.*
- Imai T., Suzuki M., and Sakano H. (2006) Odorant Receptor-Derived cAMP Signals Direct Axonal Targeting. *Science*.
- Jang W., Kim K.P., and Schwob J.E. (2007) Nonintegrin laminin receptor precursor protein is expressed on olfactory stem and progenitor cells. *J Comp Neurol* 502, 367-381.
- Keller A. and Margolis F.L. (1976) Isolation and characterization of rat olfactory marker protein. *J Biol Chem.* 251, 6232-6237.
- Key B. and Akeson R.A. (1993) Distinct subsets of sensory olfactory neurons in mouse: possible role in the formation of the mosaic olfactory projection. *J. Comp Neurol.* 335, 355-368.
- Knoll B. and Drescher U. (2004) Src family kinases are involved in EphA receptor-mediated retinal axon guidance. *J Neurosci* 24, 6248-6257.
- Leifer D., Lipton S.A., Barnstable C.J., and Masland R.H. (1984) Monoclonal antibody to Thy-1 enhances regeneration of processes by rat retinal ganglion cells in culture. *Science* 224, 303-306.
- Lewcock J.W. and Reed R.R. (2004) A feedback mechanism regulates monoallelic odorant receptor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Li C., Sasaki Y., Takei K., Yamamoto H., Shouji M., Sugiyama Y., Kawakami T., Nakamura F., Yagi T., Ohshima T., and Goshima Y. (2004) Correlation between semaphorin3A-induced facilitation of axonal transport and local activation of a translation initiation factor eukaryotic translation initiation factor 4E. *J Neurosci* 24, 6161-6170.

- Luxenhofer G., Breer H., and Strotmann J. (2008) Differential reaction of outgrowing olfactory neurites monitored in explant culture. *J Comp Neurol.* 509, 580-593.
- Mahanthappa N.K. and Schwarting G.A. (1993) Peptide growth factor control of olfactory neurogenesis and neuron survival in vitro: roles of EGF and TGT- β s. *Neuron* 10, 293-305.
- Malnic B., Hirono J., Sato T., and Buck L.B. (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96, 713-723.
- Manzini I., Schweer T.S., and Schild D. (2008) Improved fluorescent (calcium indicator) dye uptake in brain slices by blocking multidrug resistance transporters. *J Neurosci Methods* 167, 140-147.
- Margolis F.L. (1972) A brain protein unique to the olfactory bulb. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A* 69, 1221-1224.
- Meister M. and Bonhoeffer T. (2001) Tuning and topography in an odor map on the rat olfactory bulb. *J. Neurosci.* 21, 1351-1360.
- Miyamichi K., Serizawa S., Kimura H.M., and Sakano H. (2005) Continuous and overlapping expression domains of odorant receptor genes in the olfactory epithelium determine the dorsal/ventral positioning of glomeruli in the olfactory bulb. *J Neurosci* 25, 3586-3592.
- Mombaerts P. (2006) Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu. Rev. Cell Dev Biol* 22, 713-737.
- Mombaerts P., Wang F., Dulac C., Chao S.K., Nemes A., Mendelsohn M., Edmondson J., and Axel R. (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87, 675-686.
- Nedelec S., Dubacq C., and Trembleau A. (2005) Morphological and molecular features of the mammalian olfactory sensory neuron axons: What makes these axons so special? *J Neurocytol.* 34, 49-64.
- Nguyen-Ba-Charvet K.T., Di Meglio T., Fouquet C., and Chedotal A. (2008) Robos and slits control the pathfinding and targeting of mouse olfactory sensory axons. *J Neurosci* 28, 4244-4249.
- Patel K., Nash J.A., Itoh A., Liu Z., Sundaresan V., and Pini A. (2001) Slit proteins are not dominant chemorepellents for olfactory tract and spinal motor axons. *Development* 128, 5031-5037.
- Piper M., Anderson R., Dwivedy A., Weinl C., van Horck F., Leung K.M., Cogill E., and Holt C. (2006) Signaling mechanisms underlying Slit2-induced collapse of *Xenopus* retinal growth cones. *Neuron* 49, 215-228.
- Potter S.M., Zheng C., Koos D.S., Feinstein P., Fraser S.E., and Mombaerts P. (2001) Structure and emergence of specific olfactory glomeruli in the mouse. *J. Neurosci.* 21, 9713-9723.

- Renzi M.J., Wexler T.L., and Raper J.A. (2000) Olfactory sensory axons expressing a dominant-negative semaphorin receptor enter the CNS early and overshoot their target. *Neuron* 2000. Nov. ;28. (2.):437. -47. [Record. as. supplied. by. publisher.] 28, 437-447.
- Ressler K.J., Sullivan S.L., and Buck L.B. (1993) A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 73, 597-609.
- Ressler K.J., Sullivan S.L., and Buck L.B. (1994) Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79, 1245-1255.
- Riddle D.R., Wong L.D., and Oakley B. (1993) Lectin identification of olfactory receptor neuron subclasses with segregated central projections. *J. Neurosci.* 13, 3018-3033.
- Royal S.J. and Key B. (1999) Development of P2 olfactory glomeruli in P2-internal ribosome entry site-tau-LacZ transgenic mice. *J. Neurosci.* 19, 9856-9864.
- Sambrook J., Frisch E.F., and Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.*
- Schreyer D.J. and Jones E.H. (1988) Topographic sequence of outgrowth of corticospinal axons in the rat: a study using retrograde axonal labeling with Fast blue. *Brain Res.* 466, 89-101.
- Schwarting G.A., Kostek C., Ahmad N., Dibble C., Pays L., and Puschel A.W. (2000) Semaphorin 3A is required for guidance of olfactory axons in mice. *J. Neurosci.* 20, 7691-7697.
- Schwarzenbacher K., Fleischer J., and Breer H. (2005) Formation and maturation of olfactory cilia monitored by odorant receptor-specific antibodies. *Histochem. Cell Biol* 123, 419-428.
- Schwarzenbacher K., Fleischer J., Breer H., and Conzelmann S. (2004) Expression of olfactory receptors in the cribriform mesenchyme during prenatal development. *Gene Expr. Patterns.* 4, 543-552.
- Serizawa S., Ishii T., Nakatani H., Tsuboi A., Nagawa F., Asano M., Sudo K., Sakagami J., Sakano H., Ijiri T., Matsuda Y., Suzuki M., Yamamori T., Iwakura Y., and Sakano H. (2000) Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. *Nat. Neurosci.* 3, 687-693.
- Serizawa S., Miyamichi K., Nakatani H., Suzuki M., Saito M., Yoshihara Y., and Sakano H. (2003) Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science* 302, 2088-2094.
- Shepherd G.M. (1994) Discrimination of molecular signals by the olfactory receptor neuron. *Neuron* 13, 771-790.
- St John J.A. and Key B. (2001) Chemically and morphologically identifiable glomeruli in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 436, 497-507.

- Strotmann J., Conzelmann S., Beck A., Feinstein P., Breer H., and Mombaerts P. (2000) Local permutations in the glomerular array of the mouse olfactory bulb. *J. Neurosci.* 20, 6927-6938.
- Strotmann J., Levai O., Fleischer J., Schwarzenbacher K., and Breer H. (2004) Olfactory receptor proteins in axonal processes of chemosensory neurons. *J. Neurosci.* 24, 7754-7761.
- Tessier-Lavigne M. and Goodman C.S. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.
- Treloar H.B., Feinstein P., Mombaerts P., and Greer C.A. (2002) Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. *J. Neurosci.* 22, 2469-2477.
- Treloar H.B., Gabeau D., Yoshihara Y., Mori K., and Greer C.A. (2003) Inverse expression of olfactory cell adhesion molecule in a subset of olfactory axons and a subset of mitral/tufted cells in the developing rat main olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 458, 389-403.
- Treloar H.B., Nurcombe V., and Key B. (1996) Expression of extracellular matrix molecules in the embryonic rat olfactory pathway. *J. Neurobiol.* 31, 41-55.
- Treloar H.B., Purcell A.L., and Greer C.A. (1999) Glomerular formation in the developing rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 413, 289-304.
- Vassar R., Chao S.K., Sitcheran R., Nunez J.M., Vosshall L.B., and Axel R. (1994) Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79, 981-991.
- Vassar R., Ngai J., and Axel R. (1993) Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* 74, 309-318.
- Wang F., Nemes A., Mendelsohn M., and Axel R. (1998) Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* 93, 47-60.
- Watanabe K., Tamamaki N., Furuta T., Ackerman S.L., Ikenaka K., and Ono K. (2006) Dorsally derived netrin 1 provides an inhibitory cue and elaborates the 'waiting period' for primary sensory axons in the developing spinal cord. *Development* 133, 1379-1387.
- Watt F.M. (2002) Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J* 21, 3919-3926.
- Whitesides J., Hall M., Anchan R., and LaMantia A.S. (1998) Retinoid signaling distinguishes a subpopulation of olfactory receptor neurons in the developing and adult mouse. *J. Comp Neurol.* 394, 445-461.
- Whitesides J.G., III and LaMantia A.S. (1996) Differential adhesion and the initial assembly of the mammalian olfactory nerve. *J. Comp Neurol.* 373, 240-254.
- Wu K.Y., Hengst U., Cox L.J., Macosko E.Z., Jeromin A., Urquhart E.R., and Jaffrey S.R. (2005) Local translation of RhoA regulates growth cone collapse. *Nature* 436, 1020-1024.

- Yee K.K. and Rawson N.E. (2000) Retinoic acid enhances the rate of olfactory recovery after olfactory nerve transection. *Brain Res. Dev Brain Res.* 124, 129-132.
- Yu C.R., Power J., Barnea G., O'Donnell S., Brown H.E., Osborne J., Axel R., and Gogos J.A. (2004) Spontaneous neural activity is required for the establishment and maintenance of the olfactory sensory map. *Neuron* 42, 553-566.
- Zhang X. and Firestein S. (2002) The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat. Neurosci.* 5, 124-133.
- Zhao H. and Reed R.R. (2001) X inactivation of the OCNC1 channel gene reveals a role for activity-dependent competition in the olfactory system. *Cell* 104, 651-660.
- Zheng C., Feinstein P., Bozza T., Rodriguez I., and Mombaerts P. (2000) Peripheral olfactory projections are differentially affected in mice deficient in a cyclic nucleotide-gated channel subunit. *Neuron* 26, 81-91.
- Zhu A.J., Haase I., and Watt F.M. (1999) Signaling via beta1 integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A* 96, 6728-6733.
- Zou D.J., Chesler A.T., Le Pichon C.E., Kuznetsov A., Pei X., Hwang E.L., and Firestein S. (2007) Absence of adenylyl cyclase 3 perturbs peripheral olfactory projections in mice. *J Neurosci* 27, 6675-6683.
- Zou D.J., Feinstein P., Rivers A.L., Mathews G.A., Kim A., Greer C.A., Mombaerts P., and Firestein S. (2004) Postnatal refinement of peripheral olfactory projections. *Science* 304, 1976-1979.

Abkürzungsverzeichnis

ACIII	Adenylat cyclase III
ACP	Acyl-Carrier-Protein
BLAST	Basal local alignment search tool
BP	Blockpuffer
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CK14	Cytokeratin 14
CREB	cAMP response element Bindeprotein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DRG	Dorsal root ganglion (Hinterwurzelganglion)
E (0,14,15,16)	Embryonalstadium (0,14,15,16)
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
GAP-43	Growth associates protein -43
GBS	Glasbodenschälchen
GBZ	Globose Basalzellen
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HBSS	Hanks balanced salt solution
HBZ	Horizontale Basalzellen
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
IRES	Internal ribosomal entry site
ITG	IRES-Tau-GFP
LB	Luria Bertani
LSM	Laser Scanning Mikroskop
MDR1	Multidrug-resistance protein-1
min	Minute
NCAM	Neuronal cell adhesion molecule
NDS	Normal donkey serum
NGF	Nerve growth factor
NGS	Normal goat serum
OB	Olfaktorischer Bulbus
OBKM	Olfaktorischer Bulb konditioniertes Medium
OBN	Olfaktorische Bulb Neuriten
OE	Olfaktorisches Epithel
OMP	Olfaktorisches Markerprotein
ONS	Olfaktorische Nervenschicht
OR	Odorant Rezeptor
OSN	Olfaktorische Sinnesneurone
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
RS	All-trans-Retinsäure
s	Sekunde
TAE	Tris-Acetate-EDTA
WK	Wachstumskegel
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D galaktosid
z.B.	Zum Beispiel

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Breer danke ich, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an dem faszinierenden Thema des axonalen Wachstums im olfaktorischen System zu arbeiten und dazu die vielfältigen Gerätschaften des Instituts nutzen zu können. Vielen Dank auch für die Ratschläge und Diskussionen, die mich auf dem richtigen Weg gehalten haben.

Besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. Jörg Strotmann für seine umfassende Unterstützung, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat und für die Anregungen und Vorschläge, die diese Arbeit in die richtige Richtung geführt haben.

Ein großes Dankeschön gilt vor allem auch meinen Kollegen in MolBio-Labor, da durch ihr - Torben, Reiner, Marion, Pati, Andrea und Julia – für eine ausgelassene Stimmung gesorgt habt, die die Arbeit wie im Flug vorbeigehen lässt.

Ein nicht geringeres Dankeschön geht an meine LaborassistentInnen Heiko, Mirjam und Désirée, die mir viel Arbeit abgenommen und dadurch viel geholfen haben.

Vielen Dank auch an alle anderen Kolleginnen und Kollegen für die angenehmen Zusammenarbeit und die geistreichen Sprüche im Seminarraum, denn jeder weiß:

Nur glückliche Forscher sind gute Forscher!

Auch danke ich den Herren Dr. Horst Pick, Prof. Dr. H. Rösner, Prof. Dr. H. Hildebrand und Prof. Dr. J Schwob für die Bereitstellung des Acyl-Carrier-Proteins und der Antikörper gegen GAP-43, NCAM und GBC-3, durch deren Hilfe interessante Versuche erst möglich wurden.

Vor allem aber danke ich meiner Familie und dir, Heike, da ich mich auf euch jederzeit verlassen kann und ihr ein unendlicher Rückhalt seid.