

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg  
im  
Bereich der Biologie

vorgelegt von  
Diplom-Biologe Philipp Daiber  
aus Sinsheim  
Dezember 2011

Datum der mündlichen Prüfung:



# Die trigeminale Modulation der olfaktorischen Rezeption

Gutachter: Prof. Dr. Stephan Frings  
Dr. Rohini Kuner



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Zoologie der Universität Heidelberg in der Zeit vom 1. Dezember 2007 bis 22. Dezember 2011 unter Anleitung von Prof. Dr. Stephan Frings und Dr. Frank Möhrle angefertigt.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit einschließlich Tabellen und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass ich diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen habe; dass sie abgesehen von unten angegebenen Publikationen noch nicht veröffentlicht worden ist. Weiterhin versichere ich, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Heidelberg, den 20. Dezember 2011

Philipp Daiber

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Danksagung</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Publikationen und Kongressbeiträge</b>	<b>12</b>
3.1	Publikationen . . . . .	12
3.2	Kongressbeiträge . . . . .	12
<b>4</b>	<b>Abstract</b>	<b>13</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>14</b>
<b>6</b>	<b>Einleitung</b>	<b>15</b>
6.1	Allgemein . . . . .	15
6.2	Das olfaktorische System . . . . .	16
6.2.1	Das olfaktorische Epithel . . . . .	16
6.2.2	Der <i>Bulbus olfactorius</i> . . . . .	17
6.3	Die olfaktorische Transduktionskaskade . . . . .	19
6.4	Der <i>Nervus trigeminus</i> . . . . .	20
6.4.1	Nozizeption . . . . .	21
6.5	Trigeminale Modulation des olfaktorischen Systems und der Perzeption . . . . .	24
6.6	Ziele dieser Arbeit . . . . .	26
<b>7</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
7.1	Material . . . . .	27
7.1.1	Tiere . . . . .	27
7.1.2	Verwendete Lösungen und Chemikalien . . . . .	28
7.2	Methoden . . . . .	38
7.2.1	Präparation des olfaktorischen Gesamtepithels . . . . .	38
7.2.2	Präparation von <i>wholemout</i> Präparaten des Olfaktorischen Epithels für immunhistochemische Versuche . . . . .	38

7.2.3	Dissoziation und FACS-Aufreinigung von olfaktorischem Gesamtepithel	38
7.2.4	RNA Isolation aus olfaktorischem Gesamtepithel und FACS-aufgereinigten ORNs	39
7.2.5	cDNA-Synthese	39
7.2.6	PCR-Analyse der Expression von trigeminalen Rezeptormolekülen in olfaktorischem Gesamtepithel und aufgereinigten ORNs	40
7.2.7	<i>In situ</i> -Hybridisierung: Herstellung von Sonden und Hybridisierung auf Gewebeschnitten des olfaktorischen Gesamtepithels	41
7.2.8	<i>In situ</i> -Hybridisierung	45
7.2.9	Immunhistochemische Analyse der subzellulären Lokalisation von trigeminalen Rezeptormolekülen auf Gewebeschnitten des olfaktorischen Gesamtepithels	45
7.2.10	Anfertigung von Kryostatschnitten für Immunhistochemie und <i>In situ</i> -Hybridisierungen	46
7.2.11	Applikation und Konzentrationen der verwendeten Duftstoffe	48
7.2.12	<i>Air-phase</i> Elektro-Olfaktogramme	48
7.2.13	<i>Submerged</i> Elektro-Olfaktogramme	49
7.2.14	Physikochemische Eigenschaften der verwendeten Duftstoffe	51
7.2.15	Bestimmung des cAMP Gehalts in Proben des olfaktorischen Gesamtepithels mittels eines direkten ELISA-Assays	54
<b>8</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
8.1	Die trigeminale Innervation des olfaktorischen Systems	56
8.1.1	Trigeminale Innervation des olfaktorischen Epithels	56
8.2	Analyse des Expressionsmusters trigeminaler Neuropeptidrezeptoren im olfaktorischen System	60
8.2.1	Expression von Rezeptor cDNA in olfaktorischen Rezeptorneuronen	60
8.2.2	Zelltyp-spezifische Expression der cDNA trigeminaler Rezeptoren	65
8.3	Subzelluläre Lokalisation der trigeminalen Rezeptorproteine im OE	67
8.3.1	Spezifität der verwendeten Antikörper	67
8.3.2	Immunhistochemische Färbungen	68
8.4	Der Einfluß trigeminaler Neuropeptide auf die Funktion von olfaktorischen Rezeptorneuronen	72
8.4.1	Funktionelle Charakterisierung der CGRP Wirkung auf ORNs	73
8.5	Messung der cAMP Konzentration in Proteinextrakten des olfaktorischen Epithels	75
8.6	Modulation olfaktorischer Antworten durch CGRP am Beispiel von PEA	78

8.7	Modulation olfaktorischer Antworten durch Substanz P . . . . .	80
8.8	Vergleich der modulatorischen Aktivität trigeminaler Neuropeptide . . . . .	82
8.9	Funktionelle Charakterisierung von Duftstoffen mit unterschiedlichen trigeminalen Potenzen mittels der Elektrotrigeminogramm-Technik . . . . .	83
8.10	Funktionelle Charakterisierung von Duftstoffen mit unterschiedlichen trigeminalen Potenzen mittels der Elektroolfaktogramm-Technik . . . . .	85
8.11	Zelltypspezifische Expression trigeminaler Rezeptormoleküle im <i>Bulbus olfactorius</i> . . . . .	88
<b>9</b>	<b>Diskussion</b>	<b>90</b>
9.1	Die trigeminale Innervation des OEs . . . . .	90
9.2	Ultrastruktur der trigeminalen Innervation . . . . .	91
9.3	Peptiderge und nicht-peptiderge Innervation des OEs . . . . .	91
9.4	Die trigeminale Innervation des Bulbus und die Kollateralenbildung trigeminaler Neurone . . . . .	92
9.5	Lokalisation der Rezeptoren für trigeminale Neuropeptide . . . . .	94
9.6	Wirkung der Neuropeptide auf ORNs . . . . .	96
9.7	Die physiologische Bedeutung der trigeminalen Innervation . . . . .	98
9.8	Modell der trigeminalen Modulation von olfaktorischen Rezeptorneuronen . . .	99
9.9	Mögliche Implikation für den Menschen . . . . .	101
9.10	Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	102

# 1 Danksagung

Kein Mensch ist eine Insel. Die vorliegende Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe molekulare Physiologie am Institut für Zoologie der Universität Heidelberg angefertigt. Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit mit Rat und Tat unterstützt haben. Weiterhin möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und die immer angenehme Atmosphäre in der Arbeitsgruppe bedanken.

Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. Stephan Frings für die Überlassung des Themas und die engagierte Betreuung
- Dr. Frank Möhrle für all seine konstruktiven Vorschläge
- Semir Jeridi, Kristin Dauner und Kerstin Vocke für alles mögliche
- Federica Genovese, Raphael Steinfeld, Vera Klinkosch, Janine Reinert und allen weiteren Studenten, die mich im Verlauf dieser Arbeit unterstützt haben
- meiner Freundin Simone Holz für ihre unendliche Geduld und Unterstützung
- Prof. Dr. Trese Leinders-Zufall sowie Prof. Dr. Marc Spehr für die Möglichkeit, die verschiedenen EOG-Techniken zu erlernen
- Prof. Dr. Thomas Hummel und Dr. Mandy Scheibe für die menschlichen Gewebeprobe
- der AG Schäfer (insbesondere Thorsten Bus und Izumi Fukunaga) für die freundliche Bereitstellung von Gewebeprobe verschiedener transgener Mausstämme
- meiner Familie und meinen Freunden
- allen Mitarbeitern der AG Braunbeck für die tolle Arbeitsatmosphäre
- dem Exzellenzcluster „Cell Networks“ für die Finanzierung

## 2 Abkürzungen

ACIII	Adenylatzyklase, Typ III
AIC	Allylisothiocyanat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Aktionspotentiale
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
CNG	<i>cyclic nucleotide-gated</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRCP	<i>CGRP receptor component protein</i>
CRLR	<i>Calcitonin receptor-like receptor</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	Spinalganglion (von <i>dorsal root ganglion</i> )
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EOG	Elektroolfaktogramm
EPL	<i>external plexiform layer</i>
FACS	<i>Fluorescence assisted cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
GCL	<i>granule cell layer</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
IAA	Isoamylacetat
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IPL	<i>internal plexiform layer</i>
ISI	Interstimulusintervall
MCL	<i>mitral cell layer</i>
NK1	<i>Neurokinin-1</i>

OB	olfaktorischer Bulbus
OE	olfaktorisches Epithel
OMP	<i>olfactory marker protein</i>
ONL	<i>olfactory nerve layer</i>
OR	Duftstoffrezeptor ( <i>odor receptor</i> )
ORN	olfaktorisches Rezeptorneuron
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEA	Phenylethylalkohol
PI	Propidiumiodid
RAMP-1	<i>receptor activity modifying protein 1</i>
RE	respiratorisches Epithel
RNA	Ribonukleinsäure
SCC	<i>solitary chemosensory cell</i>
SP	Substanz P
SSC	<i>sideway scatter</i>
SZ	Stützzelle

## 3 Publikationen und Kongressbeiträge

### 3.1 Publikationen

- Klimmeck D, Daiber PC, Brühl A, Baumann A, Frings S, Möhrle F: „Bestrophin 2: an anion channel associated with neurogenesis in chemosensory systems.“ J Comp Neurol. 2009 Aug 10;515(5):585-99.
- Mayer U, Küller A, Daiber PC, Neudorf I, Warnken U, Schnölzer M, Frings S, Möhrle F: „The proteome of rat olfactory sensory cilia.“ Proteomics 2009 Jan;9(2):322-34.

### 3.2 Kongressbeiträge

- Symposium „Integrative analysis of olfaction“ 6.-8. Juni, 2011. Zweites Treffen des SPP Olfaktion 1392. Vortrag „The trigeminal modulation of olfactory reception“
- Daiber PC, Söchtig M, Steinfeld R, Klinkosch V, Müller F, Frings S: „The trigeminal modulation of olfactory reception“, Human Chemosensation 2010, 2. Dez. - 4. Dez. 2010, Dresden Deutschland (Kongressbeitrag)  
*Poster gewann den 1. Preis*
- Daiber PC, Steinfeld R, Klinkosch V, Frings S: „The trigeminal modulation of olfactory reception“, First annual meeting of the Olfaction SPP, Symposium 4.-6. März 2010, Seminarzentrum SRH, Heidelberg (Kongressbeitrag)
- Daiber PC, Steinfeld R, Klinkosch V, Frings S: „The trigeminal modulation of olfactory reception“, 36th IUPS, 27. Juli- 1. August 2009, Kyoto, Japan (Kongressbeitrag)
- Klimmeck D, Daiber PC, Brühl A, Baumann A, Frings S, Möhrle F: „Bestrophin 2: a proliferation-associated anion channel in chemosensory systems“ 28. Blankenese Konferenz, „Sensory Signalling and Information Processing“, 25.-29. Mai 2008, Hamburg-Blankenese (Kongressbeitrag)

## 4 Abstract

The trigeminal modulation of olfactory perception means the alteration of odor perception by trigeminal stimuli. By pre-exposition to allyl isothiocyanate (an odorant with pungent properties) for example, odor thresholds of purely olfactory or olfactory/trigeminal stimuli can be significantly lowered. The molecular basis and mechanisms of this modulation remain unknown so far. To better understand its molecular mechanisms, I performed stainings against two marker peptides (substance P and CGRP) of trigeminal peptidergic nerve fibres in the olfactory epithelium (OE), as these two peptides can be released into the surrounding epithelium and might be involved in the modulation. Furthermore, I examined whether olfactory receptor neurons (ORNs) express the receptor proteins for trigeminal neuropeptides, and was able to confirm expression on the level of mRNA and protein (via *in situ*-hybridizations and immunohistochemistry). Also several cell types in the olfactory bulb (OB) expressed the receptor RNA. The functional characterization of the effects of trigeminal neuropeptides on ORNs using the *submerged* EOG technique, revealed distinct effects for each peptide. CGRP had an excitatory effect on ORNs, which seemed to be cAMP based, on its own. When applied as part of a mixture, CGRP had an inhibitory effect on odor reception. Substance P showed no characteristic effect on its own, but had a transient, excitatory effect on odor reception. To estimate the amount of trigeminal modulation on odor reception in a physiological context, I used odorants with different trigeminal potency to perform dose-response curves using the *air-phase* EOG technique. Odorants with trigeminal potency showed reduced saturation and atypical EOG-curves. This means, that trigeminal modulation starts at the level of the epithelium and has to be ORN-based. The modulation seems to be mediated by the reception of trigeminal neuropeptides by ORNs. The trigeminal neuropeptides show distinct effects. Further, this modulation also seems to be relevant for humans, as receptor expression was found in biopsies of human OE. This modulation process might prove critical for migraine sufferers, as the OB is also innervated by the trigeminal nerve and secretion of CGRP due to trigeminal stimulation might trigger migraine attacks.

## 5 Zusammenfassung

Trigeminale Modulation olfaktorischer Perzeption bezeichnet die Veränderung der Geruchswahrnehmung durch trigeminale Stimuli. So können durch Präexposition gegenüber AIC, einem Duftstoff mit stark stechend/brennendem Eindruck, Geruchsschwellen gegenüber rein olfaktorischen Gerüchen und olfaktorisch/trigeminalen Gerüchen gesenkt werden. Die molekularen Mechanismen dieser Modulation sind bis heute noch weitgehend unbekannt. Um diese molekularen Mechanismen besser zu verstehen, wurde zum einen die peptiderge, trigeminale Innervation des OE untersucht, da die enthaltenen Neuropeptide Substanz P und CGRP auf einen möglichen Modulationsmechanismus deuten. Zusätzlich wurde untersucht, ob olfaktorische Rezeptorneurone (ORNs) die Komponenten der Rezeptoren trigeminaler Neuropeptide exprimieren. Dies konnte sowohl auf mRNA-Ebene über *in situ*-Hybridisierungen als auch auf Protein-Ebene über immunhistochemische Färbungen gezeigt werden. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass auch verschiedene Zelltypen im olfaktorischen Bulbus diese Rezeptoren exprimieren. Die funktionelle Charakterisierung der Wirkung der beiden Neuropeptide auf ORNs mittels *submerged* EOG zeigte, dass die beiden Peptide höchst unterschiedliche Wirkungen zeigen. CGRP allein wirkt exzitatorisch auf ORNs, diese Exzitation ist cAMP-basiert, als Bestandteil einer Mischung wirkt es inhibierend. Substanz P allein zeigte keinen charakteristischen Effekt, hat jedoch einen transienten exzitatorischen Effekt auf die Duftstoffrezeption. Um den Anteil der trigeminalen Modulation in einem physiologischen Kontext zu zeigen, wurden drei Duftstoffe mit verschiedenen trigeminalen Potenzen über Dosis-Wirkungskurven mittels *air-phase* EOG charakterisiert. Duftstoffe mit trigeminaler Potenz zeigten verminderte Sättigung der Duftstoffantwort sowie untypische EOG-Kurven. Das bedeutet, dass die trigeminale Modulation auf der Ebene des OE beginnt und ORN-basiert sein muss. Diese Modulation wird über trigeminale Neuropeptide bewirkt, die höchst unterschiedliche Wirkung haben. Zusätzlich scheint dieser Modulationsmechanismus auch für den Menschen relevant zu sein, da die RNA der trigeminalen Rezeptoren auch in Biopsien menschlichen Gewebes gefunden wurde. Weiterhin stellt die trigeminale Modulation auch einen wichtigen Mechanismus für Migränepatienten dar, da auch der olfaktorische Bulbus trigeminal innerviert ist und durch die Ausschüttung von CGRP im Zuge der trigeminalen Modulation zum Auslösen von Migräneattacken beitragen könnte.

# 6 Einleitung

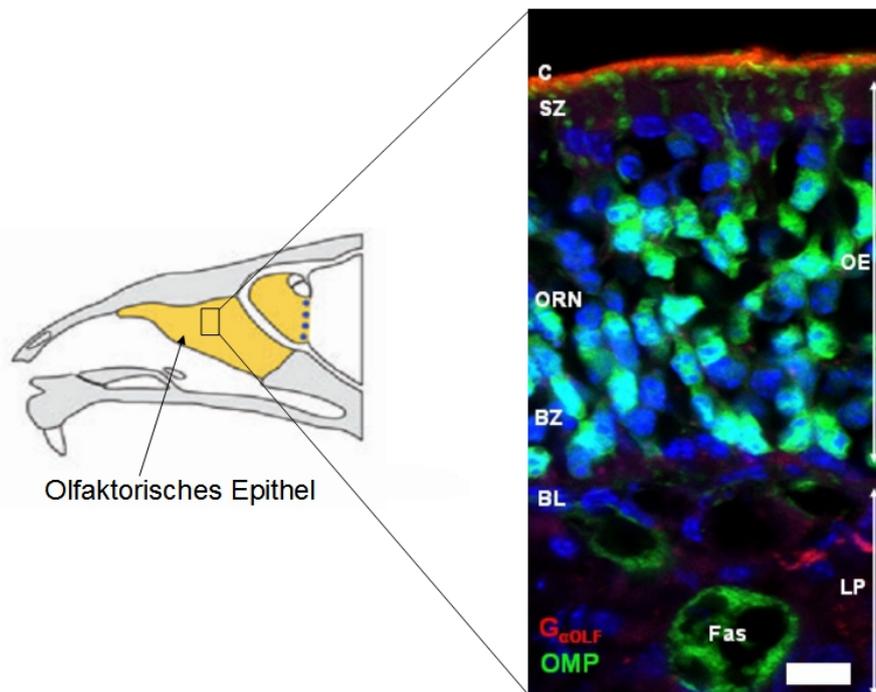
## 6.1 Allgemein

1851 beschrieb Fröhlich in seiner Arbeit „Über einige Modifikationen des Geruchssinnes“ zwei verschiedene Arten von Duftstoffen: reine Geruchstoffe (mit reiner Geruchswirkung, wie von ätherischen Ölen, Harzen und Balsamen) und Gerüche mit Nebenwirkungen (z.B. Halogene, Essigsäure, Ammoniak, Senföl und Meerrettich). Diese Gerüche erzeugten neben dem eigentlichen Geruchseindruck auch eine Reizung der Schleimhäute (Froehlich [1851]). Diese Kategorisierung wurde später durch die Beobachtung des schottischen Naturphilosophen Bain ergänzt: „... wenn ein Strom von Carbonsäure einen Geruch begleitet, wird der Effekt (Geruch) vermindert.“ (Bain [1868]). Bei dieser Beobachtung handelte es sich um eine durch den Trigeminalnerv vermittelte Modulation des Geruchseindrucks (die olfaktorische Perzeption). Ausgehend von diesen ersten Ergebnissen wurden weitere Effekte dieser Modulation auf der klinischen und psychophysischen Ebene verzeichnet. Allerdings blieben die beteiligten Zelltypen sowie die molekulare Grundlage der Modulation unbekannt. Ein erster Durchbruch in diesem Feld gelang mit der Entdeckung der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN), die die olfaktorische Rezeption vermitteln, sowie der Erkenntnis, dass das die ORNs beinhaltende olfaktorische Epithel (OE) stark durch den Hirnnerv V innerviert wird. Dieser Nerv (auch als Trigeminalnerv bezeichnet) vermittelt die Rezeption von noxischen Stimuli. Die Neuroanatomie sowie die funktionelle Charakterisierung dieser beiden Systeme (olfaktorisch und trigeminal) wurde eingehend erforscht. Ebenso wurden die Wechselwirkungen zwischen ihnen genauer charakterisiert (von Skramlik [1924], Seifert [1969], Doty et al. [1978], Cain [1976], Finger et al. [1990], Silver [1992], Finger and Boettger [1993], Schaefer et al. [2002]). Die molekulare Grundlage der trigeminalen Modulation der olfaktorischen Rezeption bleibt jedoch nach wie vor unklar und soll im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden.

## 6.2 Das olfaktorische System

### 6.2.1 Das olfaktorische Epithel

Das olfaktorische System der Landwirbeltiere befindet sich in der Nasenhöhle. Es vermittelt die chemosensorische Wahrnehmung flüchtiger Substanzen. Es lässt sich grob in die Peripherie, die die Stimulusrezeption vermittelt, und einen zentralen Teil, der die weitere Signalverarbeitung steuert, unterteilen. Bei dem peripheren Teil des olfaktorischen Systems handelt es sich um das OE. Das OE befindet sich auf den sog. olfaktorischen Turbinaten. Dies sind paarig angelegte knorpelige Strukturen, die der Oberflächenvergrößerung dienen. Sie werden durch die Nasenscheidewand, das Septum, getrennt.



**Abbildung 6.2.1: Das olfaktorische Epithel (Makrostruktur und Neuroanatomie):** Links: Das olfaktorische Epithel ist ein paarig auf knorpeligen Turbinaten angelegtes pseudostratifiziertes Neuroepithel in der Nasenhöhle. Diese wird durch das Septum in zwei getrennte Unterhöhlen geteilt. Alle Strukturen des olfaktorischen Systems wurden gelb hervorgehoben. Aus: Munger et al. (2009). Rechts: olfaktorisches Epithel einer OMP-GFP Maus. Dieser Stamm exprimiert GFP unter Kontrolle des OMP Promotors. Alle olfaktorischen Neurone fluoreszieren grün. Rot:  $G_{\alpha OLF}$ , Grün: GFP, Blau: DAPI (Kernfärbung). C: chemosensorische Cilien, SZ: Stützzelle, ORN: olfaktorische Rezeptorneurone, BZ: Basalzellen, BL: Basallamina, Fas: Faszikel, LP: Lamina propria, OE: olfaktorisches Epithel. Balken entspricht  $10\mu\text{m}$ . (Aus: Daiber [2007])

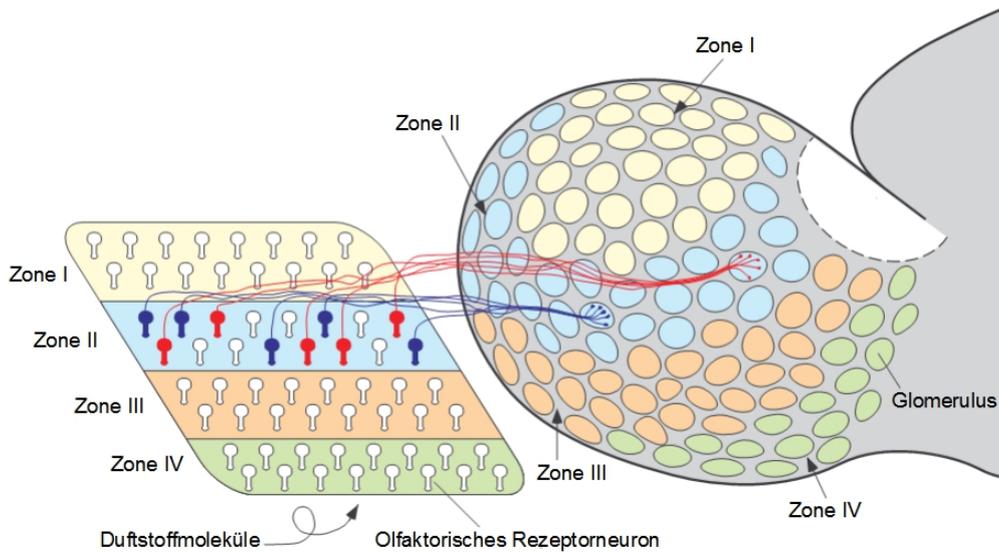
Das olfaktorische Epithel ist ein pseudostratifiziertes Neuroepithel, das mehrere Zelltypen beherbergt. Die Rezeption und Transduktion chemosensorischer Reize wird über die olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) vermittelt. Aus dem Soma dieser Neurone entspringt ein Axon,

welches dann zum olfaktorischen Bulbus projiziert, sowie der Dendrit, der in Richtung der apikalen Oberfläche projiziert, und dort in einem dendritischen Knopf endet. Aus diesem Knopf entspringen mehrere chemosensorische Zilien in das Lumen der Nasenhöhle. Die Zilien werden durch eine Mukusschicht bedeckt. Auf den chemosensorischen Zilien sind die Duftstoffrezeptoren (OR) zu finden, die die Duftstoffrezeption ermöglichen (Buck and Axel [1991]). Die dendritischen Knöpfe sind über *tight junctions* mit den Stützzellen verbunden, wodurch das Epithel vom Lumen abgegrenzt ist. Die genaue Funktion der Stützzellen ist noch unbekannt, allerdings wurden ihnen schon verschiedene Funktionen zugeschrieben, wie die Kontrolle des Wasser- und Salzgehalts des Mukus und die Metabolisierung apoptotischer Zellen sowie xenobiotischer Stoffe (Suzuki et al. [1996]). Im basalen Teil des Gewebes sind zusätzlich die Vorläuferzellen für ORNs und Stützzellen zu finden. Unterhalb der Vorläuferzellschicht erstreckt sich eine Basallamina, die das Gewebe von der *Lamina propria* trennt. Die olfaktorischen Axone werden zu Faszikeln gebündelt und projizieren dann in Richtung des *Bulbus olfactorius*. Die Faszikel wiederum bündeln sich zum olfaktorischen Nerv. Dieser projiziert dann über die Siebbeinplatte in die Schädelhöhle und erreicht so den zentralen Teil des olfaktorischen Systems.

### **6.2.2 Der *Bulbus olfactorius***

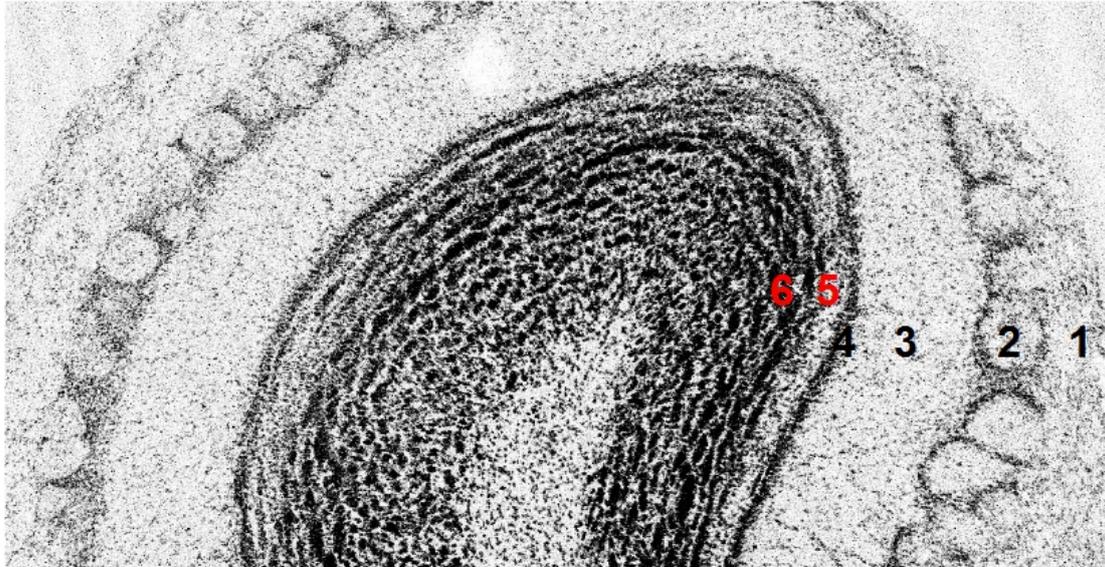
Der olfaktorische Bulbus (OB) ist eine paarig angelegte Struktur in der Schädelhöhle. Er lässt sich in mehrere funktionelle Schichten unterteilen, die alle Teilaufgaben bei der zentralen Verarbeitung von Duftstoffen erfüllen. In der olfaktorischen Nervenschicht (ONL) geschieht eine erste Sortierung der olfaktorischen Axone. Hier lassen sich 2 Prinzipien bei der Projektion der olfaktorischen Axone in den OB beobachten. Einerseits die zonale Projektion: die Expressionsmuster von Duftstoffrezeptoren lassen sich in 4 Zonen einteilen. Diese zonale Einteilung bleibt im Bulbus erhalten, d.h. Axone von ORNs aus Zone 4 projizieren alle in die korrelierende Zone des OB. Andererseits die glomeruläre Konvergenz: ORNs exprimieren immer nur einen Typ OR. Die Axone aller ORNs, die den gleichen Typ OR exprimieren, konvergieren im OB auf 2 Glomeruli (siehe auch Abb. 6.2.2) (Buck and Axel [1991], Mori et al. [1999]).

Bei den Glomeruli handelt es sich um die funktionellen Einheiten der glomerulären Schicht (GL). Ein Glomerulus besteht aus einem dichten Neuropil, welches sich aus den arborisierten Enden der olfaktorischen Axone und den Axonen der Mitralzellen zusammensetzt. Zusätzlich findet man um die Glomeruli assoziierte Zellen wie Büschelzellen und periglomeruläre Zellen. Bei der externen plexiformen Schicht (EPL) handelt es sich um ein dichtes Neuropil aus den Dendriten der Hauptneurone und der Körnerzellen. In dieser Schicht sind nur wenig Zellkörper zu finden. Diese stammen meist von mittleren Büschelzellen oder kurzen Axonzellen. Die Mitralzellschicht (ML) ist die nächsthöhere Verschaltungsebene der olfaktorischen Informationsverarbeitung. Sie ist sehr dünn, da sie nur aus Mitralzellen besteht. Die Dendriten der



**Abbildung 6.2.2: Zonale und glomeruläre Konvergenz:** Die linke Seite des Bildes stellt eine vereinfachte Darstellung des OEs dar. Rechts ist eine vereinfachte Darstellung des *Bulbus olfactorius* zu sehen. Die 4 Zonen der zonalen Konvergenz sind farblich unterschiedlich dargestellt und auf der Oberfläche des Bulbus korrespondierend gefärbt. Kreise auf dem Bulbus stellen einzelne Gomeruli dar. Die roten bzw. blauen olfaktorischen Rezeptorneurone verdeutlichen das Prinzip der glomerulären Konvergenz. Alle roten bzw. blauen Neurone projizieren in den selben Glomerulus (Aus: Mori et al. [2006]).

Mitralzellen projizieren in die externe plexiforme Schicht. Das Axon der Mitralzelle traversiert die EPL und projiziert in der GL in einen Glomerulus. Es folgt die interne plexiforme Schicht (IPL), ein dünnes Neuropil, das aus den Axonen und Axonkollateralen von Mitral- und Büschelzellen besteht. Die wenigen Zellkörper, die in dieser Schicht zu finden sind, stammen von kurzen Axonzellen. Zusätzlich findet man in dieser Schicht auch Dendriten von Körnerzellen. Die Körnerzellschicht (GCL) besteht hauptsächlich aus diesen Zellen. Körnerzellen können in drei Typen unterschieden werden. Sie besitzen kein Axon, ihre peripheren Dendriten enden in der EPL (siehe Abb. 6.2.3) (Doty [2003]).

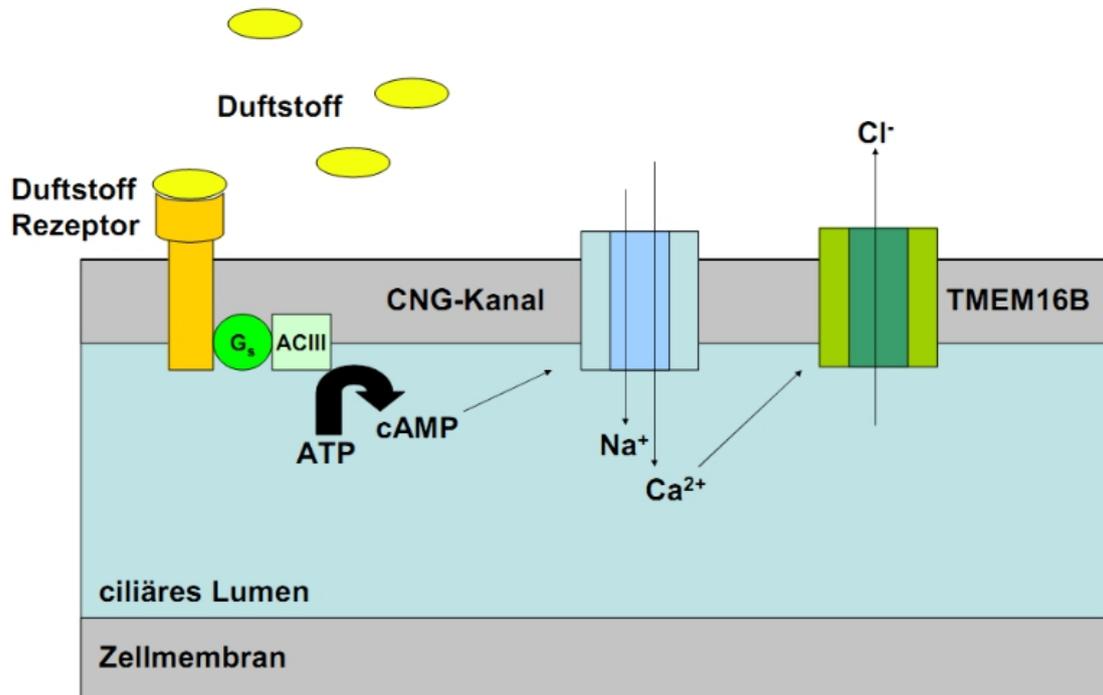


**Abbildung 6.2.3: Neuroanatomie des Bulbus:** Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einer koronalen Ansicht des *Bulbus olfactorius*. Diese Ansicht zeigt den geschichteten Aufbau des Bulbus. 1. Die olfaktorische Nervenschicht (ONL), 2. Die glomeruläre Schicht (GL), 3. Die externe plexiforme Schicht (EPL), 4. Die Mitralzellschicht (MCL), 5. Die interne plexiforme Schicht (IPL), 6. Die granuläre Zellschicht (GCL). Modifiziert und freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Dipl.-Biol. Melanie Söchtig.

### 6.3 Die olfaktorische Transduktionskaskade

Das chemosensorische Kompartiment der olfaktorischen Neurone sind die Zilien. In ihnen sind die Proteine der chemosensorischen Transduktionskaskade lokalisiert, welche chemosensorische Wahrnehmung ermöglicht. Der die Zilienschicht bedeckende Mukus schützt einerseits vor Austrocknung und Infektion. Zusätzlich enthält er Duftstoffbindeproteine, welche den Transport von schwer löslichen Duftstoffen zum Rezeptor ermöglichen. Bei den Duftstoffrezeptoren selber handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Durch die Bindung des Duftstoffs an den Rezeptor wird eine olfaktorische Isoform des  $G_{\alpha S}$ -Proteins ( $G_{\alpha OLF}$ ) aktiviert. Dieses wiederum ist an die Adenylatzyklase Typ III (ACIII) gekoppelt, welche durch die Zyklisierung von Adenosintriphosphat die intrazelluläre Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat erhöht. Durch diese Erhöhung wird der zyklisch-Nukleotid-gesteuerte Kanal (CNG-Kanal) geöffnet, welcher einen Einstrom von  $Ca^{2+}$  und  $Na^{+}$ -Ionen in die Zelle zur Folge hat. Dieser Einstrom depolarisiert die Zelle, reicht jedoch nicht aus, um Aktionspotentiale (AP) zu generieren. Der erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Spiegel öffnet zusätzlich einen  $Ca^{2+}$ -gesteuerten  $Cl^{-}$ -Kanal. Da olfaktorische Neurone eine erhöhte intrazelluläre  $Cl^{-}$ -Konzentration im Vergleich zur Muskelschicht haben, hat die Öffnung des Kanals einen massiven  $Cl^{-}$ -Ausstrom aus der Zelle zur Folge. Durch diesen  $Cl^{-}$ -Efflux wird eine weitere Depolarisation und die Generierung von AP

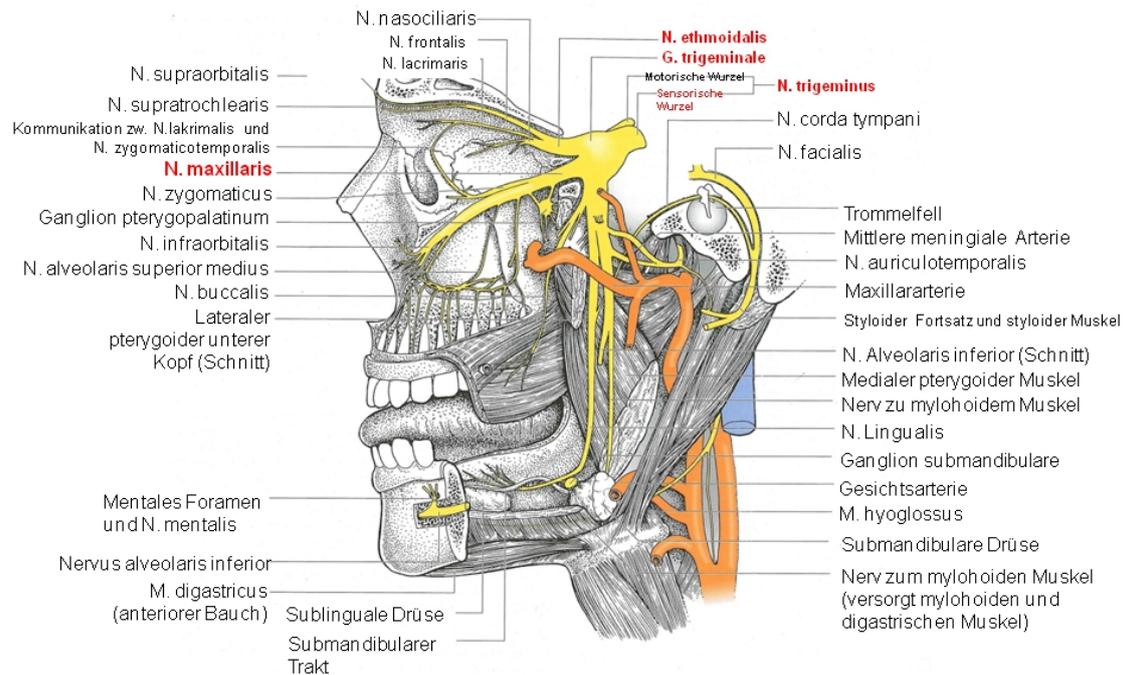
erzeugt. (für eine Übersicht siehe Frings et al. [2000], Frings [2001, 2009]).



**Abbildung 6.3.1: Die chemosensorische Transduktionskaskade:** Alle an der Transduktionskaskade beteiligten Proteine sind in den chemosensorischen olfaktorischen Zilien lokalisiert. Wenn ein Duftstoff an seinen Rezeptor bindet, wird die Kaskade ausgelöst und resultiert in der Depolarisation des Neurons und der Generierung von Aktionspotentialen. Bei dem  $G_{\alpha S}$ -Protein handelt es sich um eine spezielle Isoform,  $G_{\alpha OLF}$ . Die Komponenten der inhibierenden Rückkopplungsmechanismen sowie die Komponenten der Chloridhomöostase sind nicht dargestellt.

## 6.4 Der Nervus trigeminus

Der fünfte Hirnnerv, auch als Trigeminus bekannt, versorgt das komplette Kopfareal mit somatosensorischer Wahrnehmung. Zusätzlich besitzt der Nerv auch motorische Fasern, die verschiedene Gesichtsmuskeln innervieren. Es gibt drei Hauptäste: den ophthalmischen, den maxillaren und den mandibularen. Die somatosensorische Wahrnehmung wird über polymodale nozizeptive Nervenfasern vermittelt. Polymodal bedeutet in diesem Fall, dass die zur Nervenfasern gehörende Neuron verschiedene Reizarten rezeptiert (thermosensorisch, chemosensorisch, mechanosensorisch usw.). Für die chemosensorische Wahrnehmung in der Nasenhöhle sind der ophthalmische und der maxillare Ast zuständig. Das olfaktorische Epithel wird dabei vorrangig durch den ophthalmischen Ast innerviert.



**Abbildung 6.4.1: Der Nervus trigeminus:** Der Nervus trigeminus versorgt das komplette Kopfareal mit somatosensorischer Wahrnehmung und motorischer Efferenz. Die drei Hauptäste sind der ophthalmische (innerviert Cornea, OE u.a.), der maxillare (innerviert Oberkiefer, RE, OE u.a.) und der mandibulare Ast (innerviert Unterkiefer, Zähne u.a.). Neuronales Gewebe ist gelb dargestellt. Die Namen der für diese Arbeit relevanten Strukturen wurden rot hervorgehoben, jedoch nicht die dazugehörigen Unterstrukturen (Aus: Gray [2005]).

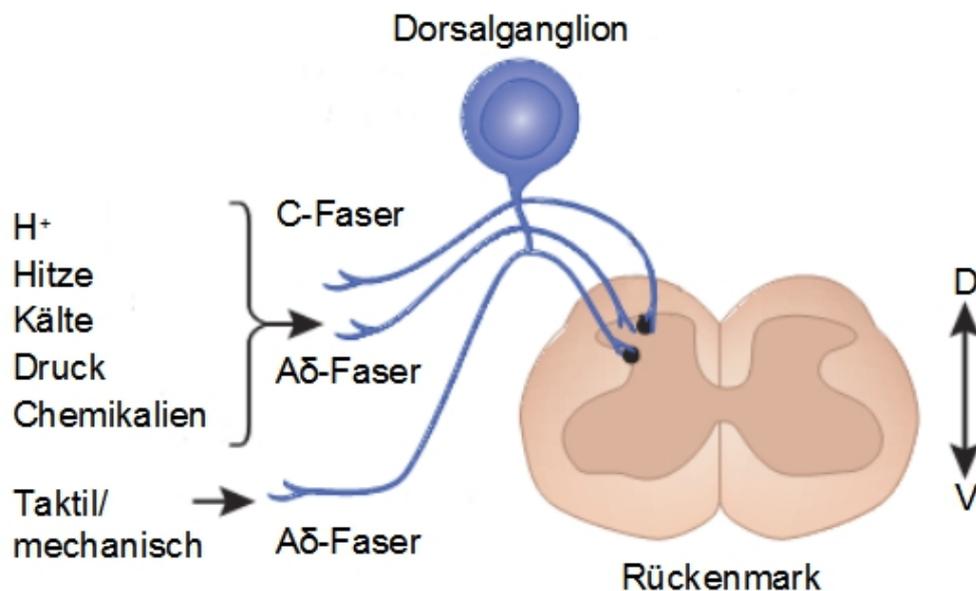
### 6.4.1 Nozizeption

Nozizeption ist die Wahrnehmung gewebeschädigender Umweltreize, seien sie thermisch, chemisch oder mechanisch. Sie wird durch sog. Nozizeptoren vermittelt, eine Subpopulation peripherer Nervenfasern. Diese Nervenfasern melden schmerzhafte Reize, sobald ein Stimulus in den schmerzhaften Bereich kommt (Basbaum et al. [2009]).

Periphere hochschwellige Nervenfasern lassen sich in mehrere Unterkategorien einteilen:

- $A\delta$ : myelinisierte Nervenfasern mittleren Durchmessers, die Reizweiterleitung ist schnell und gut zu lokalisieren (erster Schmerz). Diese lassen sich weiterhin in  $A\delta$  I-Fasern mit einer hohen mechanischen Reizschwelle und  $A\delta$  II unterteilen.  $A\delta$  II-Fasern haben eine niedrigere thermische Reizschwelle, aber eine höhere mechanische als  $A\delta$  I (Basbaum et al. [2009]).
- C: nicht-myelinisierte Nervenfasern mit einem kleinen Durchmesser, die Reizweiterleitung ist langsam und schwer zu lokalisieren (zweiter Schmerz). Auch C-Fasern lassen sich in mehrere Subkategorien unterteilen. Man findet einerseits polymodale Fasern, die

sowohl hitze- als auch mechanosensitiv sind. Andererseits gibt es die sog. „stillen“ Nozizeptoren, die hitzesensitiv sind. Im Normalfall sind sie mechanisch insensitiv, werden aber im Falle einer Verletzung mechanosensitiv. Zusätzlich unterscheidet man bei C-Fasern peptiderge Fasern und nicht-peptiderge. Peptiderge Fasern enthalten die Neuropeptide Substanz P und *calcitonin gene-related peptide* (CGRP), die auf einen adäquaten Reiz hin in das umgebende Gewebe sezerniert werden können. Nicht-peptiderge Fasern exprimieren im Gegenzug exklusiv verschiedene Rezeptormoleküle, wie den cRet Neurotrophin Rezeptor, Mrg Rezeptoren und Rezeptoren für Purine wie P2X<sub>3</sub> (Dong et al. [2001], Spehr et al. [2004]).



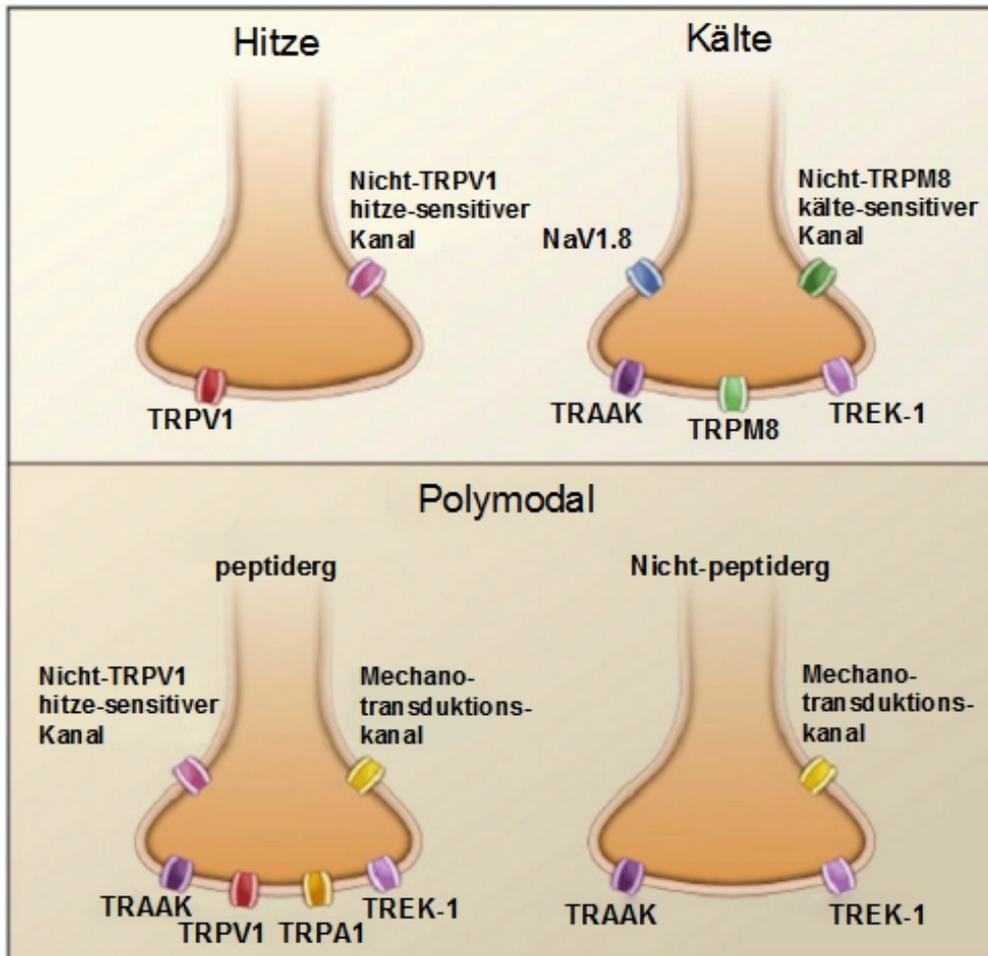
**Abbildung 6.4.2: Nozizeptive Nervenfasern am Beispiel von DRG-Neuronen:** Die Abbildung zeigt die generelle Anatomie von nozizeptiven Neuronen am Beispiel von DRG Neuronen. Aus dem Zellkörper projiziert ein Axon aus dem ein peripherer Neurit (zur Peripherie hin) und ein zentraler Neurit (zum Rückenmark und Cortex hin) entspringen. Diese Morphologie nennt man pseudo-unipolar. Links: Qualitäten von Reizen, auf die eine nozizeptive Faser reagieren kann. Blau: DRG Neurone, Rosa/Grau: Rückenmark. (Aus: Kuner [2010])

Nozizeptoren exprimieren verschiedene Mitglieder der *transient receptor potential* (TRP) Ionenkanalfamilie. Diese bieten die Grundlage für Hitze-, Kälte- und Mechano-Perzeption. Zusätzlich können diese Kanäle durch weitere Liganden oder chemische Irritantien aktiviert werden. Wichtige Kanäle in diesem Kontext sind:

- TRPV1: thermosensitiv (Hitze), kann durch Capsaicin aktiviert werden (Caterina et al. [1997]).
- TRPM8: thermosensitiv (Kälte), kann durch Menthol aktiviert werden (Bautista et al.

[2007], Colburn et al. [2007], Dhaka et al. [2007]).

- TRPA1: mechanosensitiv, chemosensitiv, kann durch Allylisoithiocyanat aktiviert werden (Caterina et al. [1997], McKemy et al. [2002], Peier et al. [2002], Bandell et al. [2004], Jordt et al. [2004]).

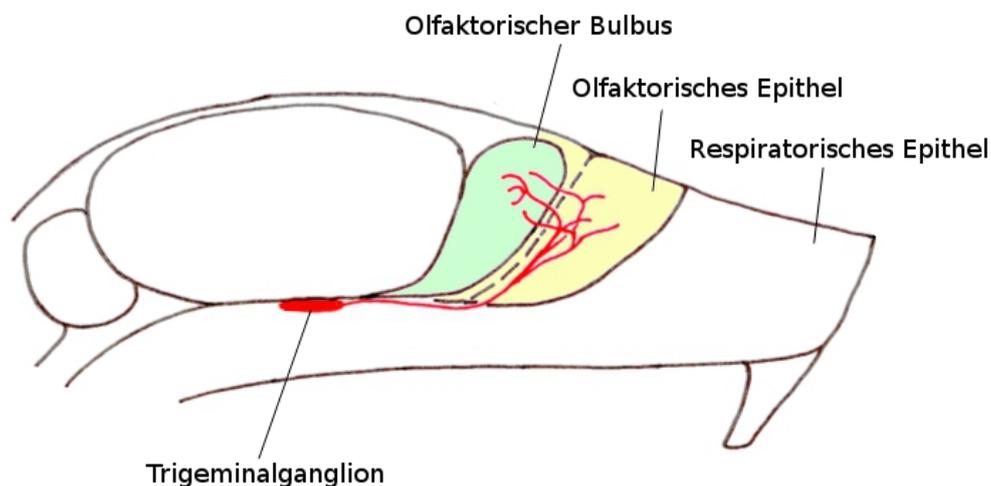


**Abbildung 6.4.3: TRP Kanäle:** TRP Kanäle und ihre sensorischen Modalitäten. Im oberen Teil der Abbildung sind die TRP-Kanäle verzeichnet, die Hitze- und Kälteempfindung vermitteln. Im unteren Teil ist das Expressionsmuster der verschiedenen nozizeptiven Fasern dargestellt (Aus: Basbaum et al. [2009]).

Zusätzlich exprimieren Nozizeptoren Ionenkanäle der ASIC-Familie, welche durch Protonen aktiviert werden, und somit als Sensoren für Ansäuerung fungieren (Price et al. [2001]). Von besonderer Bedeutung ist zudem die Morphologie der Nozizeptoren. Primär afferente Fasern sind pseudo-unipolar. D.h. das zentrale und periphere Terminale von einem gemeinsamen axonalen Stiel ausstrahlen (Basbaum et al. [2009]).

## 6.5 Trigeminale Modulation des olfaktorischen Systems und der Perzeption

Das olfaktorische und respiratorische Epithel werden durch den maxillaren und ophthalmischen Ast des Trigeminalnervs innerviert. Im respiratorischen Epithel vermittelt diese Innervation zusammen mit den *solitary chemosensory cells* (SCC) Schutzreflexe, wie Niesen und Apnoe (Finger et al. [1990], Finger and Boettger [1993], Finger et al. [2003]). Im olfaktorischen Epithel scheinen die polymodal nozizeptiven Fasern des Trigeminalnervs jedoch andere Aufgaben zu haben. Besondere Aufmerksamkeit gilt hier dem Ethmoidalnerv, einem Unterast des ophthalmischen Nervs. Die peripheren Neurite der ethmoidalen peptidergen Nozizeptoren innervieren das OE, die zentralen den OB. Somit ist das olfaktorische System sowohl in der Peripherie, als auch auf der zentralen Ebene eng mit dem Trigeminalnerv verwoben (Finger and Boettger [1993], Schaefer et al. [2002]).



**Abbildung 6.5.1: Die trigeminale Innervation des olfaktorischen Systems:** Die Abbildung zeigt eine vereinfachte Darstellung der trigeminalen Innervation des olfaktorischen Systems. Das trigeminale Ganglion und die dazu gehörenden Strukturen sind rot eingefärbt, das OE gelb und der OB grün. Trigeminale Neurone bilden sog. Kollaterale, d. h. Das das gleiche Neuron sowohl das OE als auch den OB innerviert. (Verändert nach: Schaefer et al. [2002])

Fast alle flüchtigen Stoffe haben sowohl Duftstoffeigenschaften als auch Reizstoffeigenschaften. Dies ergibt sich aus der simultanen Stimulation der nozizeptiven Fasern und der ORNs in der Riechschleimhaut. Es gibt nur wenige flüchtige Stoffe, die exklusiv das trigeminale oder das olfaktorische System stimulieren. Vanillin, Phenylethylalkohol (PEA) und  $H_2S$  gelten als rein olfaktorische Stimuli. Vanillin und PEA sind hedonisch positiv besetzte Duftstimuli,  $H_2S$  dagegen negativ.  $CO_2$  gilt als exklusiv trigeminaler Stimulus. Es erzeugt einen stechenden, später brennenden Sinneseindruck bei Konzentrationen über 50% (Cain [1976], Doty et al. [1978],

Silver and Moulton [1982], Bensafi et al. [2008]).

Ausgehend von der Beobachtung von Bain, dass trigeminale Stimulation zu einer Desensitivierung für olfaktorische Stimuli führt, wurden diese neuromodulatorischen Vorgänge weiter untersucht. Es stellte sich dabei heraus, dass trigeminale Stimuli sowohl eine Desensitivierung als auch Sensitivierung erzeugen können. Dies scheint dabei durch folgende Faktoren beeinflusst zu werden:

1. zeitliche Summation: im Allgemeinen scheinen wiederholte trigeminale chemische Stimuli mit einem kurzen Interstimulusintervall (ISI) eine Erhöhung der Intensitätswahrnehmung derselben zu bewirken ( $ISI < 2 \text{ min}$ ). Wird der ISI größer ( $ISI \text{ 3-4 min}$ ), kommt es zu einer Abschwächung der Intensitätswahrnehmung (Brand [2006]).
2. Die chemische Natur des Stimulus: Wiederholte Stimulation mit Capsaicin, Piperin oder Natriumchlorid-Lösungen führen bei einem kurzen ISI zu einer Erhöhung der Intensitätswahrnehmung dieser Stimuli. Wird mit Ethanol stimuliert, kommt es unabhängig vom ISI immer zu einer Desensitivierung. Zusätzlich kann es aber hier zu Kreuz-Sensitivierungen kommen. Wird z.B. mit Capsaicin stimuliert, wird die durch Zitronensäure verursachte Irritation schwächer wahrgenommen. Stimulation mit Essigsäure führt jedoch immer zu einer Desensitivierung, unabhängig von ISI und nachfolgender Stimulation (Brand [2006]).
3. Konzentration: Viele Duftstoffe zeigen erst mit ansteigender Konzentration Reizstoffeigenschaften, wobei gleichzeitig der Intensität der Duftstoffwahrnehmung schwächer wird (Silver and Moulton [1982]).

Während sich die ersten beiden Punkte auf chemische trigeminale Stimuli beziehen, ist besonders der dritte Punkt für die trigeminale Modulation olfaktorischer Rezeption interessant, da hier gleichzeitig eine trigeminale und eine olfaktorische Stimulation stattfindet. Also kann eine solche Stimulation auch die beiden unter 1. und 2. verzeichneten Mechanismen aktivieren. Interessant in diesem Kontext ist weiterhin, daß trigeminale Stimuli stärker wahrgenommen werden, wenn sie von einem Geruch begleitet werden, obwohl der Geruchseindruck vermindert ist. Zusätzlich ist bei Anosmikern die trigeminale Sensitivität vermindert. Also scheint auch das trigeminale System durch das olfaktorische moduliert zu werden (Brand [2006], Frasnelli et al. [2010]). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die trigeminale Prästimulation mit Allylisothiocyanat (AIC) zu einer Verminderung der Wahrnehmungsschwellen für rein olfaktorische (Phenylethylalkohol, PEA) und olfaktorisch/trigeminale (n-Butanol) Gerüche führt (Jacquot et al. [2004]).

Zwischen den beiden Systemen gibt es auf der perceptiven Ebene also modulatorische Prozesse, die durch psychophysische Studien bestätigt wurde. Die molekulare Basis dieser Vorgänge

sowie die genauen Mechanismen der modulatorischen Vorgänge sind jedoch noch zu großen Teilen unbekannt. Möglich wären folgende Mechanismen:

1. ORNs könnten durch trigeminale Neuropeptide (SP und CGRP) direkt moduliert werden. Die durch die Stimulierung des Trigeminálnerv sezernierten Neuropeptide könnten an die ORNs binden und in diesem Zelltyp exzitatorische oder inhibierende Reaktionen hervorrufen.
2. Die Modulation findet auf der zentralen Ebene des olfaktorischen Systems, dem OB, statt. Da auf dieser Ebene eine weitere Verarbeitung eines Geruchsreizes stattfindet, stehen unter anderem mehrere funktionelle Verschaltungsebenen zur Verfügung (Glomeruli, Mitralzellen, Körnerzellen), die durch die Ausschüttung trigeminaler Neuropeptide beeinflusst werden könnten.
3. Eine weitere Möglichkeit ergibt sich aus der Synthese der ersten beiden Punkte. So ist auch vorstellbar, dass durch die trigeminale Stimulation nicht nur die ORNs moduliert werden, sondern auch gleichzeitig der OB.

## 6.6 Ziele dieser Arbeit

Die trigeminale Modulation des olfaktorischen Systems wurde bis jetzt hauptsächlich auf der klinischen und psychophysischen Ebene untersucht. Die molekulare Natur, die Zielzellen und die molekularen Mechanismen dieser Modulation sind jedoch bei Säugetieren weitgehend unbekannt. Zudem sind Teilaspekte der trigeminalen Innervation des olfaktorischen Systems ungeklärt. Im Verlauf dieser Arbeit sollen nun verschiedene Fragen in bezug auf die trigeminale Modulation des olfaktorischen Systems geklärt werden. So soll einerseits die Dichte der trigeminalen Innervation des olfaktorischen Systems untersucht werden, und ob es Bereiche gibt, die dichter innerviert sind. Weiterhin soll untersucht werden, ob ORNs und andere Zielzellen im olfaktorischen System die Rezeptoren für trigeminale Neuropeptide exprimieren und deren subzelluläre Lokalisation gezeigt werden. Zudem kann dadurch die Frage geklärt werden, ob die Modulation durch den *N. trigeminus* direkt über die Modulation der Aktivität von ORNs oder indirekt über weitere Hilfszellen oder Strukturen geschieht. Die Effekte trigeminaler Neuropeptide auf ORNs müssen untersucht werden und deren zelluläre Wirkmechanismen. Abschließend muss untersucht werden, ob die trigeminale Modulation olfaktorischer Rezeption *in vivo* unter physiologischen Bedingungen bereits im olfaktorischen Epithel beginnt und welchen Anteil sie bei der Rezeption hat.

# 7 Material und Methoden

## 7.1 Material

Die verwendeten Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von folgenden Firmen bezogen: Neolab Migge (Heidelberg/BRD), Merck KGaA (Darmstadt/BRD), Carl Roth GmbH (Karlsruhe/BRD), Fluka Chemie GmbH (Steinheim/BRD), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg/BRD), Sigma Aldrich Chemikalien GmbH (Steinheim/BRD), Invitrogen GmbH (Karlsruhe/BRD), Axon Labortechnik (Kaiserslautern/BRD) und Henkel KGaA (Düsseldorf/BRD). Die Bezeichnungen und Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind in den betreffenden Kapiteln aufgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurde für das Ansetzen der Puffer und Lösungen aufbereitetes Wasser aus einer Milli-Q UF Plus Anlage der Firma Millipore (Schwalbach/BRD) verwendet. Die Anlage wird mit deionisiertem Wasser gespeist, die Restleitfähigkeit des Wassers betrug bei der Entnahme  $5,5 \cdot 10^{-8}$  S.

### 7.1.1 Tiere

Alle Tiere, die für die verschiedenen Versuche verwendet wurden, stammen aus der Interfakultären biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg und wurden dort unter standardisierten Bedingungen in vollklimatisierten Räumen bei einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Alle für Versuche geopferten Tiere wurden gemäß den aktuellen Tierschutzbestimmungen und den Richtlinien der Universität Heidelberg vor der Gewebeatnahme mit Isofluran oder Kohlenstoffdioxid betäubt und durch cervikale Dislokation oder Perfusion über den linken Herzventrikel mit 4% Paraformaldehyd getötet. Für die FACS-Aufreinigung und RNA Isolierung wurden Ratten des Wistar-Stamms verwendet. Für die *in situ*-Hybridisierungen und die immunhistochemischen Versuche wurden Ratten des Wistar-Stamms und transgene OMP-GFP-Mäuse des M55/Cre7-Stamms verwendet. Diese wurden freundlicherweise von Priv.-Doz. Dr. Jörg Strotmann (Universität Hohenheim) zur Verfügung gestellt. Für die EOG Versuche wurden Ratten des Wistar-Stamms verwendet. Für den cAMP-ELISA wurden Ratten des Wistar-Stamms verwendet. Das Alter aller verwendeten Tiere betrug mindestens 6 Wochen. Verwendet wurden Balb/c-Mäuse und OMP-GFP-Mäuse des M55/Cre-Stammes (Potter et al. [2001]).

## 7.1.2 Verwendete Lösungen und Chemikalien

### Allgemein

10x PBS (Phosphate buffered saline):	81mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 19mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 1,3M NaCl pH 7,4
1x PBS (Phosphate buffered saline):	8,1mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 1,9mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 0,13M NaCl pH 7,4

### Fixations- und Decalcifizierungslösungen

4%: Paraformaldehyd (w/v) in PBS

### Pikrinsäurefixativ

0,4 M Phosphatpuffer (Stamm-Lösung):	323 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 76 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
Fixativ	4% Paraformaldehyd (w/v) 121mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 29 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 0,2 % Pikrinsäure (w/v) pH 7,4

### Decalcifizierung

Morse's Lösung	10% Natrium-Citrat (w/v) 22,5% Ameisensäure (v/v)
----------------	--

Dulbecco's PBS / 0,5M EDTA

2,6 mM KCl  
1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
136 mM NaCl  
14 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
500 mM EDTA  
pH 7.8

Trichloressigsäure (TCA)

5% (w/v) TCA

Entwässerung

10% (w/v) Saccharose-Lösung  
30% (w/v) Saccharose-Lösung

Einbettmedium

Tissue-Tek

### Antigendemaskierung

Citratpuffer

10mM  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$   
pH 6  
ad 1l  $\text{H}_2\text{O}$  bidest

Natriumboratpuffer (50x)

60g  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
pH 8  
ad 500ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest  
mit NaOH Plätzchen lösen

### Immunhistochemische Lösungen

C

5% (v/v) Chemiblocker  
ad 50ml PBS

CT

5% (v/v) Chemiblocker  
0,5% (v/v) Triton® X-100  
ad 50ml PBS

CTA

5% (v/v) Chemiblocker  
0,5% (v/v) Triton® X-100  
ad 50ml PBS

DAPI (Stock) 90 $\mu$ M in Wasser

Eindeckmedium Aqua Polymount

### **FACS Analyse**

Trypsin Lösung 0,1% (w/v) Trypsin

DNase-Lösung  
140 mM NaCl  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
2 mM EGTA  
10 mM HEPES  
0,01% DNase  
pH 7,4

Färbelösung 1 mM Fluorescein-di( $\beta$ -D-Galactopyranosid)

Inkubationslösung 1,5  $\mu$ M Propidiumiodid

extrazelluläre Lösung (ES)  
125 mM NaCl  
5 mM KCl  
10 mM EGTA  
10 mM HEPES  
pH 7,4

### **PCR und cDNA-Synthese**

cDNA Synthese:  
SuperScript Reverse Transcriptase III  
Lagerungspuffer 50 mM Tris  
0,1 M NaCl  
1 mM EDTA  
5 mM DTT  
0,1% Triton® X-100  
50% Glycerol  
pH 8,3 (HCl)

**Tabelle 7.1:** Verwendete Antikörper

Name	Hersteller	Spezies	Antigen Spezies	Antigen	Typ
Adenylate cyclase III	SCBT(C-20)sc-588, Lot D1510	Kaninchen	Maus	C-Terminus	polyklonal
Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP)	Calbiochem: PC205L, Lot.: D00109352	Kaninchen	Maus	$\alpha$ -CGRP (Ratte)	polyklonal
CRCP	Sigma HPA007216, Lot R07457	Kaninchen	Mensch	TPCRHQSPEI-VREFLTALKS-HKLTKAEKL-QLLNHRPVT-AVEIQLMVEE-SEERLTEEQI-EALLHTVTSI-LPAEPEAEQK-KNTNSNVAM-DEEDPA	polyklonal
CRLR	Abcam, ab83697, Lot. 850438	Kaninchen	Mensch	DGNWFRHPA-SNRTWTNYT-QCNVNTHEK-VKTALNLFYL-TIIGHGLSIA-SLL	polyklonal
CALCRL	Sigma SAB2100335, Lot QC13837	Kaninchen	Mensch	DGNWFRHPAS-NRTWTNYTQC-NVNTHEKVK-TALNLFYLT-IGHGLSIASLL	polyklonal
Ezrin (C-15)	SCBT: sc-6409	Ziege	Mensch	C-Terminus	polyklonal
Ezrin (C-19)	SCBT: sc-6407	Ziege	Mensch	C-Terminus	polyklonal
G $\alpha$ OLF (C-18)	Santa Cruz Biotechnology: sc-383	Kaninchen	Ratte	C-Terminus	polyklonal
NK-1R (T-20)	SCBT: sc-5220, Lot. J2405	Ziege	Mensch	Interne Region	polyklonal
Substance P	SCBT: sc-9758	Ziege	Mensch	Peptid (volle Länge)	polyklonal
Substance P	Calbiochem, PC232L, Lot. D34277	Kaninchen	Ratte	Peptid (Ratte)	polyklonal
TRPA1	Abcam, ab58844	Kaninchen	Ratte	CEKQHELIKL-IIQKME	polyklonal
TRPA1	Abcam, ab84165 Lot.GR11301-1	Schaf	Ratte	4. cytoplasmatische Schleife	polyklonal
TRPV1	SCBT: sc-12500	Ziege	Mensch	N-Terminus	polyklonal
VR1 (R-130) = TRPV1	SCBT: sc-28759	Kaninchen	Ratte	AS 1-130, N-Terminus	polyklonal

**Tabelle 7.2:** Verwendete Antikörper

Name	Fluorochrom	Hersteller	Lot
donkey anti goat	Alexa Fluor 488	Molecular Probes (A11057)	
donkey anti goat	Alexa Fluor 568	Molecular Probes (A11055)	
donkey anti rabbit	Alexa Fluor 488	Molecular Probes (A21206)	439378
donkey anti rabbit	Alexa Fluor 568	Invitrogen (A10042)	685232
goat anti mouse	Alexa Fluor 488	Molecular Probes (A21121)	845809
goat anti mouse	Alexa Fluor 568	Molecular Probes (A11004)	790348

5xReaction Buffer

250 mM Tris  
250 mM KCl  
20 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM DTT  
pH 8,3 (HCl)

10 mM dNTP Mix

je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP  
pH 7,0

PCR-Reaktion:

10 x Puffer B (Mg<sup>2+</sup>-frei)  
800 mM Tris  
pH 9,4-9,5 (HCl)  
25 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM dNTP Mix  
je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP  
Taq Polymerase (Axon)

TAE (50x)

40 mM Tris-Acetat  
1 mM EDTA  
pH 8,0

**Tabelle 7.3:** Primersequenzen (Ratte)

Name	Orientierung	Sequenz	Größe Produkt (bp)
RAMP1	F	GCCGGGACCCTGACTATGGTA	
	R	GATGCCCTCTGTGCGCTTGC	362
CRCP	F	CGCCGGGCAGCAGAACTTGA	
	R	CTGCCCCATCTCGAGCCCTCT	576
CRLR	F	CAAACAGACTTGGGAGTCACTAGGAA	
	R	CCACTGCCGTGAGGTGAATGATTGTC	505
NK1-R	F	CCAGCATGTGGCTGGCCATGA	
	R	CGTGGGATGGCTGCAGGGGA	617
TRPA1	F	AAGGGGCCTTGTTTCTTAGTG	
	R	TCATGGATAATGGGCATTGGA	498
Aktin	F	GGTCATCACTATCGGCAATGAGC	
	R	GGACAGTGAGGCCAGGATAGAGC	300

**Tabelle 7.4:** Primersequenzen (human)

Name	Orientierung	Sequenz	Größe Produkt (bp)
RAMP1	F	GGCCCATCACCTCTTCATGACC	
	R	AATGCCCTCAGTGCGCTTGCTC	391
CRCP <sup>1</sup>	F	AGTGAAGGATGCCAATTCTGCGCTTCTC	
	R	TTGGTCAACTTGTGGCTTTTCAATGCTG	234
CRLR	F	TTGGACACGGATTGTCTATTGCATCA	
	R	CAGCACAAATTGGGCCATGGATAATG	462
NK1-R <sup>2</sup>	F	ATGGTACTACGGCCTGTTCTACTG	
	R	GGCGAAGGTGCACACCACGACAAT	484
OMP	F	ATGGCGGAGGACAGGCCGCA	
	R	GGGCTCCACACCCTCGCCAA	453
Aktin*	F	CTGGGACGACATGGAGAAAA	
	R	AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC	564

1: detektiert Transkript Varianten 1,2,4 und 5. Größe Produkt 4 und 2: 135bp. Größe Produkt 1: 234bp. 2: detektiert lange und kurze Form. Angegebene Größe für beide Formen gleich. \*: Primersequenz von ShineGene Molecular Biotech, Inc

### **cAMP-Extraktion und ELISA**

Falls nicht anders angegeben, wurden Lösungen aus dem *cAMP Enzyme Immunoassay Kit* ohne Azetylierung (CA200, Sigma-Aldrich) verwendet.

0,1M HCl

Solubilisierungspuffer 2x

100mM HEPES

200mM NaCl

2mM MgCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O

2mM CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O

Bradford-Lösung:

0,01% CBB G250 (w/v)

4,7% Ethanol (w/v)

8,5% Phosphorsäure (v/v)

*Neutralisierungsreagenz (Cat. Nr. N7533)*

*Waschpuffer*

es wurde das mitgelieferte 10x Konzentrat verwendet (W1265, Sigma-Aldrich)

*Substrat*

p-Nitrophenylphosphate

*Stopplösung*

Trinatriumphosphat (Cat.Nr. S2436)

## EOG und *submerged* EOG

### *EOG*

Säuger Ringer 1x

140 mM NaCl  
5 mM KCl  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM HEPES  
10 mM D-Glucose  
1 mM Na-Pyruvat  
pH 7,4

Mucus-Lösung

55 mM NaCl  
70 mM K-Gluconat  
3 mM CaCl<sub>2</sub>  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM HEPES  
pH 7,4

### *submerged EOG*

S1

120 mM NaCl  
25 mM NaHCO<sub>3</sub>  
5 mM KCl  
5 mM BES  
1 mM MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O  
1 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
10 mM Glucose  
pH 7,4

S2

145 mM NaCl  
5 mM KCl  
10 mM HEPES  
1 mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O  
1 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
pH 7,4

### *Duftstoffe*

Phenylethylalkohol (PEA) 100μM, 300μM, 1mM, 10mM, 30mM, 100mM, 300mM, 1M, 3M,

pur in Mineralöl (BioUltra, Sigma-Aldrich, 69794)

Allylthiocyanat (AIC) 100 $\mu$ M, 300 $\mu$ M, 1mM, 10mM, 30mM, 100mM, 300mM, 1M, 3M, pur in Mineralöl (BioUltra, Sigma-Aldrich, 69794)

Isoamylacetat (IAA) 100 $\mu$ M, 300 $\mu$ M, 1mM, 10mM, 30mM, 100mM, 300mM, 1M, 3M, pur in Mineralöl (BioUltra, Sigma-Aldrich, 69794)

### ***in situ* Hybridisierung**

H <sub>2</sub> O-DEPC	1ml DEPC in 1l H <sub>2</sub> Omq (0,1%)
Proteinase K	50 $\mu$ g/ml
50mM Tris/HCl	pH 8,3
5mM EDTA	pH 8,3
SSC (standard saline citrate) 20x	3M NaCl 0,3 M Tri-Na-Citrat x 2H <sub>2</sub> O pH 7,0 (4M Hcl) ad 1l Aqua bidest
0,1M Triethanolamin	pH 8
Prähybridisierungslösung	1,5ml 5x SSC 3ml Formamid (deionisiert) 50% 600 $\mu$ l 50x Denhardts 6 $\mu$ l Triton® X-100 6 $\mu$ l Heringssperma-DNA 5 $\mu$ g ad 6ml mit 888 $\mu$ l H <sub>2</sub> O-DEPC
Hybridisierungslösung	1,5ml 5x SSC 3ml Formamid (deionisiert) 50% 600 $\mu$ l 50x Denhardts 6 $\mu$ l Heringssperma-DNA 5 $\mu$ g ad 6ml mit 894 $\mu$ l H <sub>2</sub> O-DEPC

50x Denhardts	1% Ficoll 400 1% PVP 1% BSA ad 20ml H <sub>2</sub> O-DEPC
Heringssperma-DNA	10mg/ml in H <sub>2</sub> O-DEPC
B1	1x PBS / 0,1% Triton® X-100
B2	1x PBS / 0,1% Triton® X-100 5% BSA
B3	0,1M Tris 0,1M NaCl 5mM MgCl <sub>2</sub> pH 9,5 ad 1l H <sub>2</sub> O
B4	B3 + NBT / BCIP / Levamisol (9%)
B5	10 mM Tris 1mM EDTA pH 8,3 ad 500ml Aqua bidest
NBT (p-Nitrotetrazoliumblauchlorid)	50mg/ml in 70% DMF
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-Toluidinsalz)	50mg/ml in 100% DMF

## 7.2 Methoden

### 7.2.1 Präparation des olfaktorischen Gesamtepithels

Nach der Betäubung mit Kohlenstoffdioxid und der anschließenden cervikalen Dislokation wurde der Kadaver dekapitiert. Der Unterkiefer sowie das Fell wurden vom Kopf entfernt. Für immunhistochemische Versuche wurde dann wie in Kapitel 7.2.9 beschrieben weiter verfahren. Für *in situ*-Hybridisierungen wurde wie in Kapitel 7.2.8 beschrieben weiter verfahren. Für die Präparation des olfaktorischen Gesamtepithels wurde zunächst am Schnittpunkt von *Sutura coronalis* und *Sutura sagittalis* eine Öffnung in das *Cranium* gebohrt. Über diesen Startpunkt wurde das *Cranium* sowie der *Os nasale* sagittal median von posterior nach anterior gespalten. Die olfaktorischen Turbinatate wurden dann mittels Federstahlschere gelöst und mit einer Uhrmacherpinzette entfernt. Es wurde dabei darauf geachtet, die mechanische Beschädigung des Epithels so gering wie möglich zu halten. Das so gewonnene olfaktorische Gesamtepithel wurde für die RNA-Isolation, FACS-Analyse und den cAMP-ELISA eingesetzt. Für elektrophysiologische Untersuchungen wurden die Turbinatate im Gewebeverbund belassen.

### 7.2.2 Präparation von *wholemout* Präparaten des Olfaktorischen Epithels für immunhistochemische Versuche

Die olfaktorischen Turbinatate wurden wie unter 7.2.1 aus dem Gewebeverbund gelöst. Zusätzlich wurde das komplette Septum vorsichtig herauspräpariert. Der Abschnitt des Septums, der hauptsächlich respiratorisches Epithel trägt, wurde entfernt. Der Rest des Septums sowie die olfaktorischen Turbinatate wurden dann in 4% PFA 20 min in 4-Loch-Platten fixiert. Die Fixierung und die dadurch resultierende Quervernetzung der Proteine versteift das Gewebe. Im Falle des Septums kann das auf dem Septum aufliegende Gewebe dann unter einem Binokulor mit einem feinen Spatel oder einem ähnlich geeigneten Werkzeug sanft vom knorpeligen Teil des Gewebes gelöst werden. Im Falle der olfaktorischen Turbinatate müssen z.T. kleine Einschnitte entlang der Turbinatate geführt werden, damit es gelöst werden kann. Alle weiteren Färbeschritte wurden in 4-Loch-Platten oder Petrischalen vorgenommen.

### 7.2.3 Dissoziation und FACS-Aufreinigung von olfaktorischem Gesamtepithel

Die frisch präparierten olfaktorischen Turbinatate werden in eiskalter ES-Lösung gewaschen. Das OE wird vom Knorpel entfernt und mit einer frischen Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten. Anschließend die Stücke in Trypsin-Lösung 30 min bei 37°C inkubieren. Die Trypsin-Lösung wird dann abgenommen und durch DNase-Lösung ersetzt. Das Gewebe wird 10 min bei 37°C inkubiert, zusätzlich wird mit einer feuerpolierten Pasteurpipette trituriert. Es folgt ein Zentri-

fugationsschritt: 300g für 5min bei 20°C. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in Färbelösung resuspendiert. Die Zellen werden in der Färbelösung für 2 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wird Inkubationslösung hinzugegeben, es wird für 30 min bei 4°C inkubiert. Die Lösung wird nun wieder zentrifugiert: 300g für 5min bei 20°C. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in ES-Lösung resuspendiert, die Zellzahl sollte  $10^5$  bis  $10^7$ /ml betragen. Die erhaltene Zelllösung wird nochmal zentrifugiert (300g, 5min, 20°C) und dann für die FACS Aufreinigung verwendet. Die so erhaltene Zelllösung wird abzentrifugiert (300g, 5min, 20°C). Das Pellet wird dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Temperatur sollte bei längerfristiger Lagerung -80°C betragen.

#### **7.2.4 RNA Isolation aus olfaktorischem Gesamtepithel und FACS-aufgereinigten ORNs**

Für die RNA-Isolation aus olfaktorischem Gesamtepithel und aus aufgereinigten ORNs wurden die Gewebeproben zunächst mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann in einem vorgekühlten Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen. Die Isolation der RNA wurde unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurden alle Glaswaren für mindestens 4h auf 180°C erhitzt und alle Lösungen mit DEPC (Verdünnung 1:1000) für 12 h inkubiert und anschließend 30 min autoklaviert. Zusätzlich wurde nur mit RNase freien Plastikwaren (Spitzen, Reaktionsgefäße) gearbeitet und die Arbeitsfläche mit 70%igem Ethanol gereinigt. Im Anschluss wurden das *Dynabeads mRNA DIRECT Kit* (Invitrogen, SKU 610-11) und das *Magnetic mRNA Isolation Kit* (New England Biolabs, Catalog # S1550S) verwendet. Beide Kits wurden entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Das Elutionsvolumen betrug 10-25µl. Die Konzentration sowie der Reinheitsgrad der aufgereinigten mRNA wurden dann mit dem NanoVue Plus Spectrophotometer überprüft. Hierbei wurden die Absorptionen bei 230, 260, 280 und 320 nm Wellenlänge bestimmt.

Alternativ wurde aus den humanen Gewebeproben total RNA isoliert. Hierfür wurde das *innuPREP RNA Mini Kit* von Analytik Jena verwendet (Best.-Nr.: 845-KS-2040010, Analytik Jena AG Lifescience, Jena). Das Kit wurde gemäß der Angaben des Herstellers verwendet. Das Elutionsvolumen betrug 30-80µl.

#### **7.2.5 cDNA-Synthese**

Die cDNA für die RT-PCR wurde bis zu 200 ng mRNA des jeweiligen Gewebes mit dem *RevertAid<sup>TM</sup> Premium Reverse Transcriptase Kit* nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Alle Reaktionen wurden im 0,2 ml Reaktionsgefäß durchgeführt.

### *Reaktionsansatz der cDNA-Synthese*

Oligo dT	1 $\mu$ l
10mM dNTPs	1 $\mu$ l
Gesamt-RNA	x $\mu$ l (150ng)
H <sub>2</sub> O <sub>molbio</sub>	ad 14,5 $\mu$ l

Dieser Ansatz wurde 5 min bei 65°C inkubiert, auf Eis gestellt und folgende Reagenzien hinzugefügt.

5 x Reaktionspuffer	4 $\mu$ l
RevertAid <sup>TM</sup> Premium Transkriptase	1 $\mu$ l
Summe	20 $\mu$ l

Nach kurzem Mischen und Zentrifugation wurden die Proben 30 min bei 50°C inkubiert, und die cDNA-Synthese abschließend durch 5 min bei 85°C beendet. Die Proben wurden auf 4°C abgekühlt, mit H<sub>2</sub>O-DEPC 1:5 verdünnt bzw. 1:100 verdünnt und bis zur PCR bei -20°C gelagert.

### **7.2.6 PCR-Analyse der Expression von trigeminalen Rezeptormolekülen in olfaktorischem Gesamtepithel und aufgereinigten ORNs**

Mit der zuvor synthetisierten cDNA aus olfaktorischem Gesamtepithel und FACS aufgereinigten ORNs wurde eine Expressionsanalyse über PCR durchgeführt. Hierbei wurden Primer gegen trigeminale Rezeptormoleküle verwendet (Sequenzen siehe Tabelle 2). Für die PCR wurde die Axon Taq-Polymerase (Axon Labortechnik, Art.-Nr. 22466) sowie die mitgelieferten Puffer nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach der PCR-Reaktion wurden alle Proben auf einem 1,5% Agarosegel mittels Agarosegelelektrophorese in 1 x TAE Puffer bei 145 mVolt aufgetrennt. Nach zwanzigminütiger Inkubationszeit in 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid wurden die Gele auf einer UV Platte fotografiert. Als Größenstandard wurde die *Mass Ruler<sup>TM</sup> Low Range DNA Ladder* (gebrauchsfertig, 80-1031bp, Fermentas, SM0383) verwendet. Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Daten zu gewährleisten.

Reaktionsansatz RT PCR:

cDNA	1 $\mu$ l
10 pmol forward Primer	1 $\mu$ l
10 pmol reverse Primer	1 $\mu$ l
10 mM dNTPs	0,5 $\mu$ l
10x Reaktionspuffer	2 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ l
Taq Polymerase	0,2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>molbio</sub>	ad 20 $\mu$ l

Reaktionsbedingungen der PCR-Reaktion:

94°C	3 min		initiale Denaturierung
94°C	30 sec	22 bis 38	Denaturierung
62°C	30 sec	Zyklen	Annealing
72°C	30 sec		Elongation
72°C	8 min		finale Elongation

### 7.2.7 *In situ*-Hybridisierung: Herstellung von Sonden und Hybridisierung auf Gewebeschnitten des olfaktorischen Gesamtepithels

#### Herstellung der Vektoren für die *in vitro*-Transkription

##### DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA Fragment wurde mittels PCR amplifiziert, in einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Daraufhin wurde das Fragment mit dem *innu-  
PREP DOUBLEpure Kit* von Analytik Jena nach Herstellerangaben aus dem Gel extrahiert, in 20  $\mu$ l Puffer eluiert und bei -20°C gelagert.

##### Klonierung

Clark (1988) konnte zeigen, dass die Taq-Polymerase während einer PCR keine Fragmente mit glatten Enden produziert, sondern einen Überhang von Adenin schafft (Clark [1988]). Die von

der Taq-Polymerase amplifizierten PCR-Fragmente lassen sich deshalb in einen offenen Vektor mit Thyminüberhangen klonieren. Diese Methode wird auch als TA-Klonierung bezeichnet. Hierzu wurde der pGEM-T Vektor der Firma Promega verwendet. Bei der Ligations-Reaktion wurde das Insert in den pGEM-T Vektor eingebracht. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz für 2h bei Raumtemperatur inkubiert.

Ligationsansatz	2 x Rapid Ligation Buffer 5 Pl
	PCR Produkt 3 Pl
	pGEM-T Vektor 1 Pl
	T4 DNA Ligase 1 Pl

Es wurden elektrokompente XL1-blue Zellen mittels Elektroporation (EasyjecT Plus von EquiBio) transformiert. Die XL1-blue Zellen wurden auf Eis aufgetaut, SOC Medium auf 37°C erwärmt und Küvetten auf Eis bereitgestellt. 1-2 µl des Ligationsansatzes wurden zu 50 µl XL1-blue Zellen gegeben und bei 2500 Volt, einem ohmschen Widerstand von 201Ω, einer Kapazität von 25 PF und einer Pulsdauer von 5 Ps elektroporiert (V=2500, R=201, C=0025, T=0005). Die Bakterien wurden daraufhin in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde ein Teil des Bakterienansatzes auf Agarplatten gegeben, die sowohl mit einem selektiven Antibiotikum (Carbenicillin) als auch mit IPTG und X-Gal (Blau-Weiß-Selektion) versetzt waren. Aufgrund dieser Selektionen war es möglich die Bakterien zu identifizieren, die den Vektor und das Insert aufgenommen haben. Zur Detektion von Insert-Fragmenten wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei wird ein Bakterienklon von einer Plattenkolonie zum PCR-Ansatz gegeben, um das gesuchte Fragment mit Hilfe geeigneter Primer zu amplifizieren. Zur Durchführung der PCR wurde Zellmaterial von Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher direkt in das vorbereitete PCR-Reaktionsgemisch gegeben. Die PCR fand unter den oben beschriebenen Standardbedingungen und 38 Zyklen statt.

### **Isolation von Plasmid-DNA**

Die Plasmid-Isolation im kleinen Masstab (5 ml Übernachtskultur) wurde mit dem *Nucleospin<sup>TM</sup> Plasmid Purification Kit* von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl TE eluiert. Die Plasmid-Isolation im großen Masstab (50 ml Übernachtskultur) wurde mit dem *QIAGEN Plasmid Midi Kit*, laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in 500 µl TE eluiert.

## Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab Göttingen durchgeführt. Es wurden 20 pmol des Sequenzierprimers mit 600 ng der zu sequenzierenden DNA in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben und auf 7  $\mu$ l mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

## Lagerung von Klonen (Glycerinstocks)

Für die Lagerung von Klonen wurden 600  $\mu$ l Flüssigkultur des jeweiligen Klons verwendet und mit 200  $\mu$ l Glycerin (80%) versetzt. Nach gutem Durchmischen wurde die Probe in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

## Restriktionsverdau

Für die *in vitro*-Transkription wurde der isolierte und sequenzierte Vektor in verschiedenen Ansätzen einmal auf der einen Seite des Inserts mit ApaI (je 10 U/ $\mu$ l, Fermentas), linearisiert, ein weiteres Mal wurde er auf der anderen Seite des Inserts mit NdeI (10 U/ $\mu$ l, Fermentas) linearisiert.

Reaktionsansatz des Restriktionsverdaus	Vektor 5 $\mu$ g
	Restriktionsenzym 5-10 U
	Puffer (10 x) 10 $\mu$ l
	H <sub>2</sub> O-DEPC ad 100 $\mu$ l

Der Puffer des Reaktionsansatzes wurde passend zum jeweiligen Enzym gewählt.

Die verwendeten Restriktionsenzyme mit den zugehörigen Puffern:

- Blue Buffer (Fermentas) ApaI, SphI (PaeI)
- Yellow Tango Buffer (Fermentas) AatII, NcoI
- Orange Buffer (Fermentas) NotI

Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Jeweils 4  $\mu$ l eines Reaktionsansatzes wurden im Anschluss mittels Agarosegelelektrophorese (1% Agarose in 1 x TAE) auf die Vollständigkeit des Restriktionsverdaus hin überprüft. Der linearisierte Vektor wurde mit dem *SV Wizard Gel and PCR Cleanup System* (Promega) aufgereinigt. Dies erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA-Konzentration der aufgereinigten Ansätze wurde mittels Photometer (Ultrospec 2100pro, Amersham Biosciences) oder mit dem Spektrometer

NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

### ***In vitro*-Transkription**

Für die *In vitro*-Transkription wurde das Insert des linearisierten und aufgereinigten Vektors mit der zur Schnittstelle passenden RNA-Polymerase (T7- oder SP6- Polymerase) in RNA umgeschrieben. Abhängig von der Orientierung des Inserts im Vektor entsteht mit dem einen Enzym der *sense* und dem anderen Enzym der *antisense* Strang. Der *antisense* Strang ist komplementär zur mRNA, die im Gewebe als *sense* Strang vorliegt, und dient somit als Sonde. Der *sense* Strang ist mit der mRNA identisch, kann diese also nicht binden, und diente als Negativkontrolle (*sense*-Sonde). Zur Sondenherstellung wurde der DIG-RNA-Labeling Mix (Roche) verwendet, der zusätzlich zu den Nukleotidtriphosphaten UTPs enthält, die Digoxigenin gebunden haben. Dieses kann später über einen Anti-Digoxigenin-Antikörper detektiert werden. Die Reaktionsansätze wurden 2 h bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

Reaktionsansatz für die <i>in vitro</i> -Transkription zur Sondenherstellung	Linearisierter Vektor 1 µg 5 x Transkrib. Puffer (Fermentas) 10 µl RNase-Inhibitor RiboLock <sup>TM</sup> (Fermentas) 2 µl DIG-RNA-Labeling Mix (Roche) 2 µl Polymerase SP6/T7 (20 U/µl, Fermentas) 2 µl H <sub>2</sub> O-DEPC ad 50 µl
--	--

Im Anschluss wurden 2 U DNase I, RNase-frei (Fermentas) zugegeben, um den Vektor zu verdauen. Nach 20 min. wurde der Verdau durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA, pH 8 gestoppt. Die transkribierte RNA wurde nach Zugabe von 112,5 µl Hydrolyselösung (Sol A) für 1 h bei 60°C im Hybridisierungsofen hydrolysiert. Durch eine kurze Inkubation bei 4°C wurde die Reaktion im Anschluss gestoppt und durch Zugabe von 112,5 µl Neutralisationspuffer (Sol B) neutralisiert. Die Sonden wurden dann durch Zugabe von 28 µl 4M LiCl und 780 µl Ethanol über Nacht bei -20°C oder 3 h bei -70°C ausgefällt. Nach 20 min Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C in der Kühlzentrifuge wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 75% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Die Sonden wurden in 20 µl Formamid (deionisiert) und 10 µl 5 x SSC aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### 7.2.8 *In situ*-Hybridisierung

Die *In situ*-Hybridisierung ist ein Verfahren, um Nukleinsäuren in Geweben oder einzelnen Zellen nachzuweisen. Hierzu werden Sonden aus Nukleinsäuren eingesetzt, die komplementär zu den nachzuweisenden Nukleinsäuren sind und somit an diese binden können. Die Sonden können auf verschiedene Arten markiert werden. In diesem Fall wurden Digoxigenin-markierte UTPs bei der Herstellung der RNA-Sonden benutzt, die später über Anti-Digoxigenin-Antikörper und eine daran gekoppelte Farbreaktion nachgewiesen werden können. Die Gewebeschnitte wurden zu Beginn mit einem hydrophoben PAP-Pen (Super HT, Polysciences) umkreist und im Anschluss mit 4% PFA in PBS überschichtet und 10 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 x PBS (je 5 min) wurde Proteinase K (50 µg/ml) auf das Gewebe gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Die Schnitte wurden danach erneut in 1 x PBS gewaschen (2 x 5 min) und für 10 min in 0,1 M Triethanolamin, pH 8 mit 0,25% Essigsäureanhydrid inkubiert. Nachdem sie wieder mit 1 x PBS (2 x 5 min) gewaschen wurden, folgte die 4-6 stündige Prähybridisierung mit dem Prähybridisierungspuffer bei Raumtemperatur. Das im Prähybridisierungspuffer enthaltene Heringssperma blockiert unspezifische Bindestellen. Anschließend wurde der Hybridisierungspuffer, zu dem die zuvor hergestellten Sonden gegeben wurden, auf die Objektträger gegeben und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Die Schnitte wurden am nächsten Morgen bei 60°C zunächst 30 min mit 5 x SSC und 30 min mit 0,2 x SSC, dann bei Raumtemperatur weitere 5 min mit 0,2 x SSC gewaschen. Im Anschluss wurden sie 5 min in PBT inkubiert, bevor sie für 1 h in 5% BSA (proteinasefrei) in PBT geblockt wurden. Es folgte die Antikörperinkubation mit dem Antikörper Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche), im Verhältnis 1: 5000 in PBT mit 5% BSA (proteinasefrei) für 2 h bei Raumtemperatur. Danach wurde zweimal 10 min lang in PBT gewaschen. Die Schnitte wurden 5 min im Farbentwicklungspuffer inkubiert, bevor sie in die Färbelösung mit NBT und BCIP gegeben wurden. Die Färbezeit betrug 20 min bis 2 h, teilweise wurde über Nacht gefärbt. Zuletzt wurde die Farbreaktion durch kurze Inkubation in der Färbestopplösung gestoppt, die Schnitte wurden mit *Aqua PolyMount Medium* (Polysciences) benetzt und mit Deckgläsern bedeckt.

### 7.2.9 Immunhistochemische Analyse der subzellulären Lokalisation von trigeminalen Rezeptormolekülen auf Gewebeschnitten des olfaktorischen Gesamtepithels

Immunhistochemisch untersucht wurden das OE von Ratte, OMP-GFP-Maus und Mensch. Die Betäubung und Tötung der Tiere erfolgte wie in 7.1.1 beschrieben, die weitere Präparation erfolgte wie in 7.2.1 beschrieben. Zusätzlich wurden die Schneide- und Backenzähne gekappt. Die

Biopsien menschlichen Gewebes wurden freundlicherweise von der AG Hummel in Dresden zur Verfügung gestellt. Im Folgenden wird die Präparation des Ratten-OEs näher beschrieben. Die Präparate wurden kurz in eiskalten PBS gewaschen. Die Fixation des Gewebes wurde entweder mit 4% PFA-Fixativ oder dem unter 7.1.2 beschriebenen Pikrinsäure-Fixativ für 1h fixiert. Um das Eindringen des Fixativs in die Nasenhöhle zu erleichtern, wurde das Präparat im Fixativ in einen Exsikkator gestellt. Durch den im Exsikkator erzeugten Unterdruck wurde die Luft aus der Nasenhöhle entfernt und die Fixierung des OEs sichergestellt. Im Anschluß an die Fixierung wurde das Präparat drei mal 5 min in PBS gewaschen. War das Tier zum Zeitpunkt der Präparation älter als 6 Wochen, wurde das Präparat zusätzlich entkalkt. Bei Wildtyp-Tieren wurde das mittels mehrtägigen (4 Tage) Inkubation in einer 5% TCA Lösung erreicht. Transgene Tiere, die bereits fluoreszente Proteine exprimieren, wurden 24h in Dulbecco's PBS/0,5M EDTA entkalkt. Die Entkalkung durch EDTA schon die fluoreszenten Proteine, die bei einer säurebasierten Entkalkung ihre fluoreszenten Eigenschaften verlieren (Harms et al. [2002]). Im Anschluß an die Entkalkung wurden die Präparate drei mal 20 min in PBS gewaschen, beim letzten Waschschrift wurde die Präparate zusätzlich im Exsikkator entlüftet. Die Präparate wurden nun in einer 10% Saccharose-Lösung für 2-3h bei RT entwässert und danach ÜN bei 4°C in einer 30% Saccharose-Lösung inkubiert.

#### **7.2.10 Anfertigung von Kryostatschnitten für Immunhistochemie und *In situ*-Hybridisierungen**

Hierzu wurden im Vorfeld Objektträger gelatiniert. Dafür wurde 1g Gelatine in 200ml destilliertem Wasser bei 55°C gelöst. Die Objektträger in Gestellen wurden für mehrere Stunden in 100% Ethanol getaucht. Nach kurzem Eintauchen in destilliertem Wasser wurden die Objektträger in die Gelatinelösung eingetaucht und wieder entfernt. Überschüssige Gelatine wurde durch kurzes Abstellen auf Papier entfernt. Danach wurden die Objektträger für 4h bei 37°C getrocknet. Sollten die Objektträger gelagert werden, wurden sie mit Aluminiumfolie eingepackt, um eine Stau-  
banlagerung zu verhindern. Vom eingebetteten Präparat wurden am Kryostat CM3050 S (Leica Microsystems GmbH, Nussloch) mit einem Stahlmesser (Profil c; Leica Microsystems GmbH, Nussloch) bei -20°C Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnittdicke des olfaktorischen Epithels für die immunhistochemischen Färbungen betrug 8-20µm. Die Schnittdicke des olfaktorischen Epithels lag im Bereich 20-40µm bei postnatalen OMP-GFP-Mäusen und adulten Wistar-Ratten. Die Schnitte wurden auf beschriftete, gelatinierte Objektträger überführt und bis zur Färbung bei -20° C aufbewahrt. Bei Schnitten, die für *in situ*-Hybridisierungen vorgesehen waren, wurde das gleiche Verfahren verwendet, die Schnittdicke betrug ca. 14-16µm. Anstelle gelatinierter Objektträger wurden jedoch Thermo Scientific Superfrost® Plus Objektträger (Gerhard Menzel

GmbH, Braunschweig) verwendet.

### **Antigen-Demaskierung**

Für die Antigen-Demaskierung wurden immunhistochemische Schnitte auf Thermo Scientific Superfrost® Plus Objektträgern (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) verwendet. Die Kryoschnitte werden für 3 min in Citratpuffer (pH 6) bei 100°C inkubiert. Danach werden sie für 5 min in Boratpuffer (pH 8) equilibriert. Es folgt ein 5 min Waschschrift in 1x PBS (pH 7,4). Im Anschluss kann dann die im nächsten Abschnitt beschriebene Antikörperfärbung erfolgen, ab dem Präinkubationsschritt in CT.

### **Antikörperfärbungen**

Im immunhistochemischen Teil dieser Arbeit wurden verschiedene primäre Antikörper, sowie verschiedene sekundäre Antikörper verwendet (siehe Tabelle 7.1 und 7.2). Die Gefrierschnitte wurden 20 min bei Raumtemperatur belassen, um sie zu trocknen. Dann wurden sie mit einem Markierungsstift (PapPen, Daido Sangyo) umrandet und durch eine Inkubation mit 4% Paraformaldehyd (5 min) weiter auf dem Objektträger fixiert. Die Gefrierschnitte wurden darauf in PBS 3 x 5 min gewaschen und vorsichtig mit Papier getrocknet. Die Präinkubation mit CT-Puffer erfolgte für 1h in einer feuchten Kammer. Darauf wurde die Inkubation mit dem spezifischen Erstantikörper für 2h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Negativkontrolle ohne Erstantikörper wurde in dieser Zeit mit CT-Puffer bedeckt. Unspezifische Bindungen des Erstantikörpers wurden durch 3 x 10 min Waschen mit PBS entfernt. Nach dem Trocknen der Schnitte mit Papier erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper für 90 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit in der feuchten Kammer. Unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers wurden durch 3 x 10 min Waschen mit PBS beseitigt. Die Schnitte wurden getrocknet und in das Eindeckmedium Aqua PolyMount (Polysciences Inc., Washington) unter einem Deckglas eingedeckt. Die Präparate wurden bis zur Darstellung am Fluoreszenzmikroskop bei Dunkelheit und 4°C gelagert, um einem Ausbleichen der Fluoreszenzsignale vorzubeugen.

### **DAPI-Färbung**

4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) bindet als interkalierender Fluoreszenzfarbstoff an die DNA. Die DAPI-Färbung lokalisiert somit Zellkerne im Präparat. Gefrierschnitte, die wie unter Kapitel 7.2.9 beschrieben fixiert waren, wurden 3 x 10 min mit PBS gewaschen und mit Papier getrocknet. Danach wurde mit einer 1:300 Verdünnung einer 90µM DAPI-Stammlösung für 1

min inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS für 3 x 10 min wurden die Schnitte getrocknet, und in Aqua Polymount (Polysciences Inc., Washington) unter einem Deckglas eingedeckt.

### **Verwendete Mikroskope und Software**

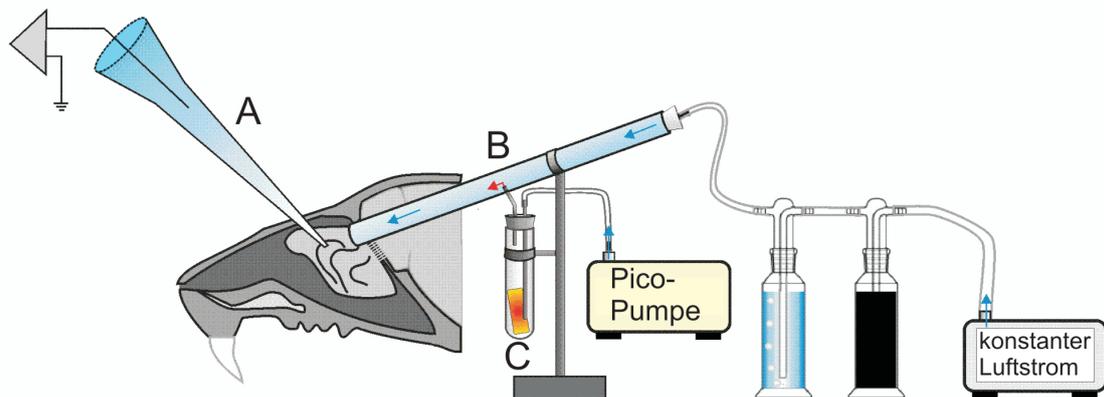
Es wurde ein Epi-Fluoreszenz-Mikroskop (Nikon Eclipse 90i aufrechtes automatisiertes Mikroskop) mit einer gekühlten, Schwarz-Weiss-Kamera (Nikon DS-1QM, CCD Kamera mit 1000 x 1000 pixel Auflösung), ein Konfokalmikroskop (Nikon C1Si spectral imaging konfokales laser scanning system auf Nikon TE2000-E invertiertes Mikroskop) mit den Laserwellenlängen 405 nm, 488/514 nm und 561 nm verwendet sowie ein Konfokalmikroskop (Nikon A1Rsi channel spectral imaging confocal laser scanning system mit einem Hybridscanner auf einem Nikon Ti voll-automatisiertem Mikroskop). Am Nikon Eclipse 90i und den konfokalen System wurde die Software NIS-Elements Version in der aktuellen Version verwendet, am Nikon C1Si z.T auch die Software EZ-C1 Version 3.2 oder 3.4.

### **7.2.11 Applikation und Konzentrationen der verwendeten Duftstoffe**

#### **7.2.12 Air-phase Elektro-Olfaktogramme**

Die olfaktorischen Turbinate wurden wie unter 7.2.1 beschrieben präpariert. Das Gewebe wurde auf einen mit Säuger-Ringer getränkten 2% Agarose Block gebettet und über eine *Interfacekammer* (Numberger M. [1996]) in einer feuchten Atmosphäre gehalten. Als Referenzluftstrom wurde geruchsbereinigte, angefeuchtete Luft mit einer Flussgeschwindigkeit von ca. 0,1l/min verwendet. Für die Messelektrode wurden filamentierte Borosilikatglaskapillaren (Außendurchmesser: 1,5 mm, Innendurchmesser: 0,87 mm, Hilgenberg, Malsfeld) verwendet, die mit einem *Flaming Brown Puller* (Model P-97, Sutter Instr. Co., Novato, CA) gezogen wurden, so das die Öffnung der Spitze einen Durchmesser von 20-25µm hatte. Die Kapillare wurde mit Mucoslösung befüllt. Ein chloriertes Silberpellet diente als Referenzelektrode. Das elektrische Potential auf der Oberfläche der Turbinate wurde mittels eines Bio-Verstärkers (Modell DP-301 Digital Amplifier, Warner Instruments) verstärkt und über eine Laborinterfacekarte (Modell BNC2120, National Instruments) digitalisiert. Alle gezeigten Kurven zeigen den Potentialverlauf ohne Verstärkung. Die Duftstoffapplikation geschah über ein speziell angefertigtes Glasrohr mit mehreren Zuläufen. Über das Hauptrohr wurde der Referenzluftstrom auf die Oberfläche der Turbinate geleitet. Die Duftstoffe wurden in Mineralöl (BioUltra, für Molekularbiologie, Sigma-Aldrich, Nr. 69794) gelöst. 40µl der entsprechenden Lösungen wurden auf ein Whatman-Filterpapier gegeben, welches in ein sog. „*Odortube*“ gegeben. Dieses Gefäß besaß eine Ein- und Ausstro-

möffnung. Die Einstromöffnung wurde mit einer Pico Pumpe (Modell PV830 Pneumatic Pico Pump, Warner Instruments) verbunden, die Ausstromöffnung wurde mit einem der Zuläufe des Glasrohrs verbunden. Zur Protokollierung des elektrischen Potentials der Oberfläche der Turbinatate und zur externen Steuerung der Pico Pumpe wurde das Programm WinWCP der Universität Strathclyde in der aktuellen Version verwendet. Das Programm wurde auch zum Schreiben der Stimulationsprotokolle verwendet.

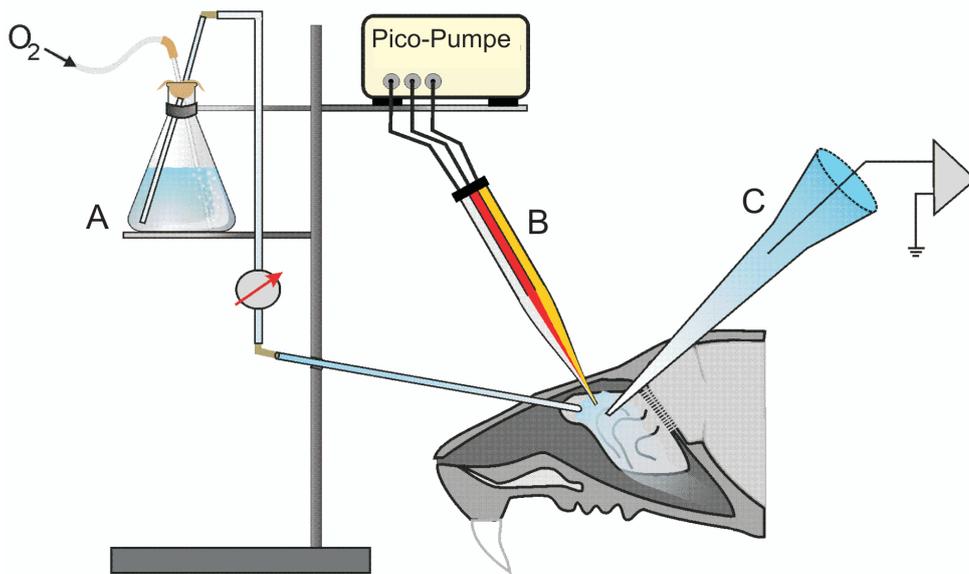


**Abbildung 7.2.1: Aufbau des Air-phase-EOG Messstands:**Die Abbildung zeigt den vereinfachten schematischen Aufbau eines Air-phase-EOG Experiments. Auf dem OE wird eine Messelektrode (A) angelegt, durch die das lokale Oberflächenpotential gemessen wird. Eine zweite Elektrode, die Referenzelektrode, ist an das Präparat angelegt. Auf das Gewebe ist konstant ein Referenzluftstrom (B) aus geruchsbereinigter, angefeuchteter Luft gerichtet (Geruchsbereinigung über dampfaktiviertes Aktivkohlegranulat, Anfeuchtung mit destilliertem Wasser, Verlauf siehe blaue Pfeile). Die Stimulation mit Duftstoffen geschieht über die Injektion der Gasphase eines sog. odor tube (C) in den Referenzluftstrom.

Die Duftstoffe wurden dann in aufsteigender Konzentration nacheinander appliziert und die Änderung des elektrischen Potentials aufgezeichnet. Der Interstimulusintervall (ISI) betrug dabei 2 min, die Stimulusdauer 100ms. Die Amplitudenhöhe der Potentialänderung wurde dann gegen die nominale Konzentration der Stammlösung aufgetragen und ein Fit mit der Hill-Gleichung durchgeführt, um n und EC50 zu erhalten.

### 7.2.13 Submerged Elektro-Olfaktogramme

Die olfaktorischen Turbinatate wurden wie unter 7.2.1 beschrieben präpariert. Das Präparat wurde dann mit zwei Insektennadeln auf einem Silikonblock fixiert. Es wurde eine schwerkraftbetriebene Perfusion so angelegt, dass die Perfusionsflüssigkeit von der rostralen Seite des Präparats zur kaudalen Seite des Präparats floss. Der Abfluss der Perfusionsflüssigkeit aus der Nasenhöhle wurde über einen kleinen Streifen KimTech Science fusselfreie Tücher (Kimberly Clark Professional, USA) ermöglicht.



**Abbildung 7.2.2: Das submerged EOG:** Hierbei wird das OE konstant mit oxygenierter Pufferlösung (S1, siehe Material) perfundiert (A). Die Stimulation mit Duftstoffen geschieht hierbei über eine Multikapillare (B), diese besteht aus mehreren Kapillaren, die getrennt befüllt werden können, und deren Öffnungen dicht nebeneinander liegen. Die Duftstoffe müssen in wässriger Lösung vorliegen. Die Stimulationsdauer wird über die Pico-Pumpe geregelt. Die Platzierung der Elektroden (Mess- und Referenzelektrode) wird wie im *air-phase*-EOG vorgenommen (C). Der Flüssigkeitsstrom sollte von rostral nach caudal erfolgen, überschüssiger Puffer wird über ein am caudalen Rand angelegtes, fusselfreies Zellstofftuch abgesaugt, um eine konstante Perfusion zu ermöglichen (nicht dargestellt).

Für die Messelektrode wurden filament-freie Glasrohlinge der Firma Science Products verwendet (Art.-Nr. GB150-10, Science Products), die mit einem *Flaming Brown Puller* (Model P-97, Sutter Instr. Co., Novato, CA) gezogen wurde, so das die Öffnung der Spitze einen Durchmesser von  $1\mu\text{m}$  und einen Widerstand von  $1\text{M}\Omega$  hatte. Die Spitze der Kapillare wurde mit 1-2% Agar gefüllt und danach mit S2-Puffer aufgefüllt. Als Referenzelektrode diente ein chloriertes Silberpellet. Für die Applikation von Duftstoffen wurden 3-Barrel-Kapillaren der Firma WPI verwendet (Art.-Nr. 3B120F-4, Warner Precision Instruments). Diese wurden mit einem Vertikal-Puller der Firma HEKA gezogen, und anschließend mit einem Micro-Grinder (Modell EG-44, Narishige Instruments) so geschliffen, daß die Spitze einen  $45^\circ$  Winkel hatte (Durchmesser der einzelnen Öffnungen ca. je  $5\mu\text{m}$ ). Die Duftstoffapplikation über die 3-Barrel-Kapillare wurde über eine Pico Pumpe (Modell PV830 Pneumatic Pico Pump, Warner Instruments) gesteuert. Die Duftstoffstimulation erfolgte in sog. kurzen „puffs“. Zur Protokollierung des elektrischen Potentials der Oberfläche der Turbinat und der externen Steuerung der Pico Pumpe wurde das Programm WinWCP der Universität Strathclyde in der aktuellen Version verwendet. Das Programm wurde auch zum Schreiben der Stimulationsprotokolle verwendet.

Um die Wirkung der trigeminalen Neuropeptide Substanz P und CGRP auszutesten, wurden diese entweder direkt auf die Oberfläche des Epithels appliziert (über die Applikationspipette) oder der Perfusionslösung hinzu gefügt. Die Stimulusdauer bei der direkten Applikation betrug 80ms, der ISI betrug 4 min. Bei der Applikation über die Perfusion wurde das Epithel zusätzlich mit PEA stimuliert um den Effekt auf die olfaktorische Rezeption zu dokumentieren. Die Stimulationsdauer betrug 80 ms, der ISI 4 min.

#### 7.2.14 Physikochemische Eigenschaften der verwendeten Duftstoffe

Name	Summenformel	Molekulargewicht (g/mol)	Siedepunkt (°C)	Dampfdruck- (mbar/°C) <sup>1</sup>
PEA	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	122,1644	218,2	0,05007/20
IAA	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130,18486	149,2	3,09445/20
AIC	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NS	99,1542	151,5	3,61530/20

1: berechnet nach dem Artikel von Nannoolal et al. siehe (Nannoolal and Ramjuggernath [2008])  
 Löslichkeit:

PEA: leicht löslich in Mineralöl, 16g/l in Wasser bei 20°C

IAA: mischbar mit Ölen, Hydrocarbonen, Alkoholen, Ethern und Estern, 2g/l Wasser bei 25°C

AIC: mischbar mit Alkohol und den meisten organischen Lösungsmitteln, 2g/l in Wasser bei 20°C

Alle Angaben via *PubChem Compound* (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Als Lösungsmittel wurde Mineralöl (BioUltra, für Molekularbiologie, Sigma-Aldrich, Nr. 69794, Dichte bei 20°C = 0,85g/ml) verwendet, dessen Dampfdruck ist bei Raumtemperatur und Umgebungsdruck vernachlässigbar ist.

Um die ungefähre Stoffmengenkonzentration der verwendeten in ppm zu erhalten, und somit eine ansteigende Stoffmengenkonzentration in der Gasphase zu gewährleisten, wurden folgende Berechnungen getätigt. Zuerst wurde der Dampfdruck der drei verwendeten Duftstoffe bei 20°C berechnet ( $p_{20}$ ), nach dem Artikel von Nannoolal et al. (siehe Nannoolal and Ramjuggernath [2008]). Hierfür wurde das Programm *Dortmund Database Artist, Explorer Edition* verwendet, um eine Strukturdatei zu erstellen (z.B. PEA.ctc). Diese wurde dann zusammen mit weiteren physikalisch-chemischen Daten an den Online Service „*Vapor Pressure of pure liquid organic compounds*“ (zu finden unter [http://www.aim.env.uea.ac.uk/aim/ddbst/pcalc\\_main.php](http://www.aim.env.uea.ac.uk/aim/ddbst/pcalc_main.php)) übergeben, um den Dampfdruck bei der gewünschten Temperatur zu erhalten. Der berechnete Dampfdruck wird dann über das Raoult'sche Gesetz angegeglichen, da der Dampfdruck auch über das Verdünnungsverhältnis beeinflusst wird. Hierfür wird das molare Gewicht des Lösungsmittels

benötigt, da der Molenbruch berechnet werden muss. Es wurde eine mittlere molare Masse von 400g/mol angenommen (dies ist der Mittelwert für die gängigen 3 Mineralölklassen, siehe auch FAO [2006]), weswegen alle weiteren berechneten Werte nur eine Näherung darstellen.

Nachdem man den modifizierten  $p_{20}$  berechnet hat, kann über das Gasgesetz das Verhältnis  $n/V$  berechnet werden:

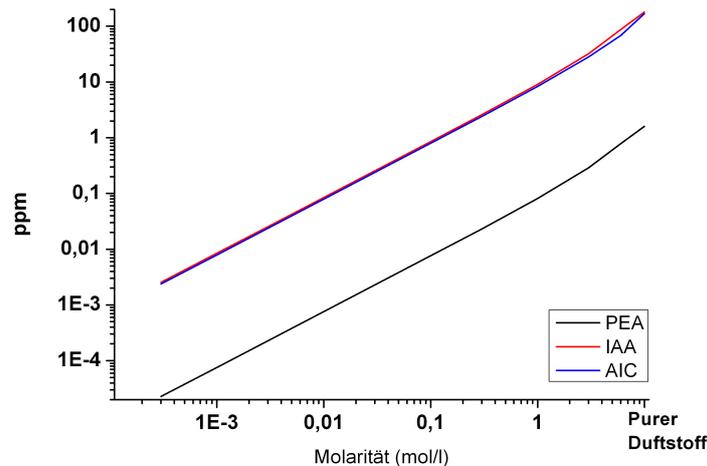
$$pV = nRT \quad (1)$$

$$n/V = p/RT \quad (2)$$

Die Masse des Duftstoffs in der Gasphase (in mg/l) wird mit 1000 multipliziert und dann durch die spezifische Dichte von Luft bei 20°C geteilt, um das Stoffmengenverhältnis in ppm zu erhalten.

**Tabelle 7.5:** ppm Konzentrationen der verwendeten Duftstoffe in der Gasphase

Molarität (mol/l)	ppm PEA	ppm IAA	ppm AIC
0,0003	2,28E-005	2,54E-003	2,37E-003
0,001	7,59E-005	8,46E-003	7,91E-003
0,003	2,28E-004	2,54E-002	2,37E-002
0,01	7,60E-004	8,47E-002	7,91E-002
0,03	2,28E-003	2,54E-001	2,38E-001
0,1	7,64E-003	8,52E-001	7,95E-001
0,3	2,32E-002	2,59E+000	2,41E+000
1	8,15E-002	9,09E+000	8,33E+000
3	2,88E-001	3,21E+001	2,80E+001
6	7,82E-001	8,72E+001	6,81E+001
pur	1,61E+000	1,80E+002	1,68E+002



**Abbildung 7.2.3: Graphische Darstellung des Verhältnisses von ppm zu mol/l:** Achsen logarithmisch skaliert. Schwarz: PEA, Rot: IAA, Blau: AIC.

### 7.2.15 Bestimmung des cAMP Gehalts in Proben des olfaktorischen Gesamtepithels mittels eines direkten ELISA-Assays

Das olfaktorische Gesamtepithel wurde wie unter 7.2.1 beschrieben präpariert. Das OE eines Tieres wurde auf 6 Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt. Im Anschluss wurde es kurz in PBS gewaschen und dann in einer 300 $\mu$ M IBMX-PBS Lösung präinkubiert. Dies diente der Hemmung der PDE2, welche zyklisches AMP abbaut. Nach der Präinkubation wurden drei der Proben in einer 10 $\mu$ M CGRP/ 300 $\mu$ M IBMX/PBS-Lösung für 2 min bei RT inkubiert, dies stellt die behandelte Fraktion dar. Die Lösungen wurden nun entfernt und die Gewebeproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde die Gewebeproben in einem Mörser zu einem feinem Pulver zermahlen und in dem 5-fachen Volumen ihres Gewichts in 0,1 M HCl aufgenommen. Das Volumen der aufgenommenen Gewebeprobe wurde nach dem Transfer in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß neu bestimmt, die Hälfte des Volumens wurde 10min bei 13000g auf 4°C zentrifugiert und dann für den cAMP ELISA auf -20°C gelagert. Die zweite Hälfte der Probe wurde mit 0,1 M NaOH neutralisiert (äquivalentes Volumen), und dann in Solubilisierungspuffer aufgenommen (äquivalentes Volumen). Die Probe wurde 10 min auf Eis gelagert und alle 2 min gevortext. Es folgte die Zentrifugation für 10 min bei 13000g auf 4°C. Diese Fraktion sollte der weiteren Charakterisierung der Probe dienen. Für den cAMP-ELISA wurde das *cAMP Enzyme Immunoassay Kit* ohne Acetylierung (Sigma-Aldrich, CA200) verwendet. Die Volumina der Proben wurden so gewählt, dass die einzelnen Probe 5 $\mu$ g Gesamt protein enthält (Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über den Bradford-Test). Es handelt sich

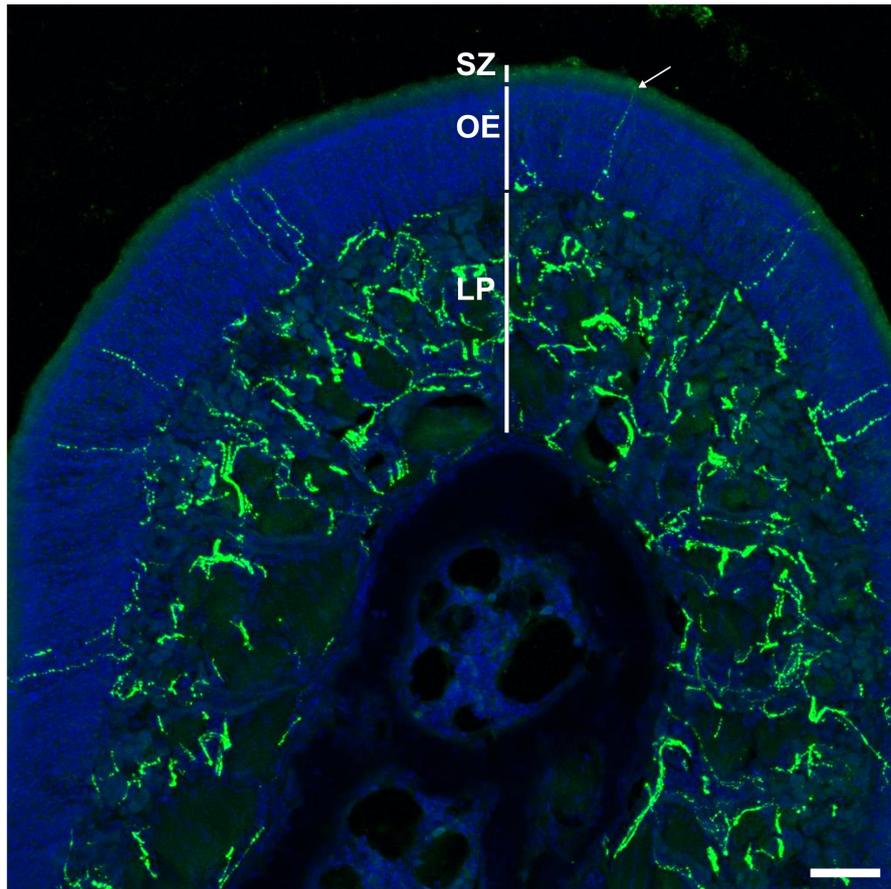
hierbei um einen direkten kompetitiven ELISA, bei dem der Zweitantikörper an die 96-well Platte gekoppelt ist. Das in der Probe enthaltene cAMP kompetitiert mit einem der Probe zugegebenen cAMP-Konjugat (cAMP-AP) um die Bindung am Antikörper. Das Konjugat dient als Reporterkonstrukt, es zeigt an, wieviel natives cAMP in der Probe enthalten ist. Die Proben mit dem geringsten cAMP-Gehalt zeigen nach Substratzugabe die stärkste Farbreaktion. Das Kit wurde gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Es wurde die Absorption bei 405nm Wellenlänge gemessen. Der cAMP-Gehalt der einzelnen Proben wurde über eine zuvor erstellte logarithmische Eichgerade ermittelt.

# 8 Ergebnisse

## 8.1 Die trigeminale Innervation des olfaktorischen Systems

### 8.1.1 Trigemurale Innervation des olfaktorischen Epithels

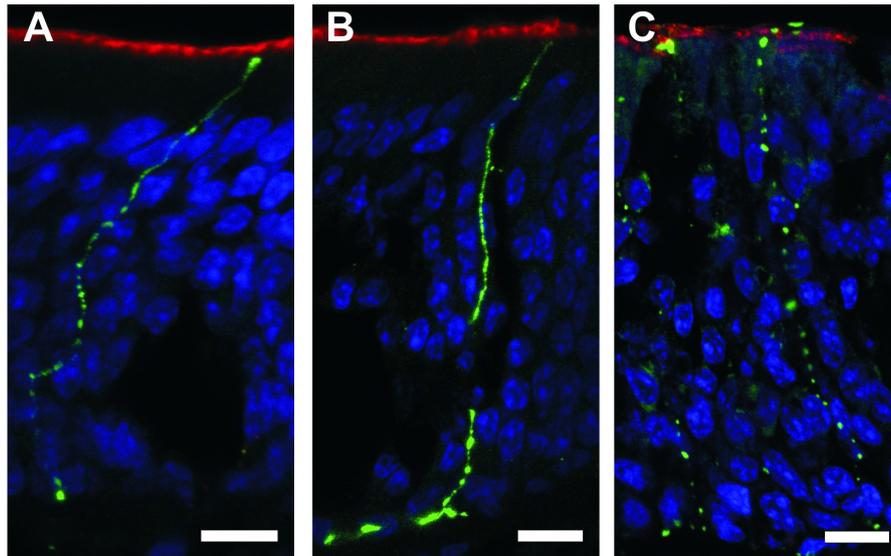
Nozizeptive Nervenfasern lassen sich in 2 Klassen unterteilen: A $\delta$  - und C-Fasern. Diese beiden Klassen lassen sich wiederum jeweils in nicht-peptiderg und peptiderg unterscheiden. Peptiderge Fasern enthalten die Neuropeptide Substanz P und CGRP. Diese Neuropeptide können auf einen adäquaten Reiz hin in das die Nervenfaser umgebende Gewebe abgegeben werden (Sann and Pierau [1998], Yaprak [2008], Basbaum et al. [2009]). Es wurden Antikörper gegen diese beiden Neuropeptide verwendet, um mittels immunohistochemischer Färbungen die peptiderge trigeminale Innervation des olfaktorischen Systems darzustellen. Die nicht-peptiderge nozizeptive Innervation ist als hauptsächlich in der Epidermis vorkommend beschrieben (Todd [2010]). Zusätzlich wurden Färbungen mit Antikörpern gegen etablierte Marker der nicht-peptidergen nozizeptiven Neurone vorgenommen, führten jedoch zu keinem Ergebnis (getestet wurden P2X<sub>3</sub>, Opioid Rezeptor  $\delta$  und Isolektin B4). Es ist also anzunehmen, dass die nicht-peptiderge Innervation im OE entweder nicht vorhanden ist, oder weniger stark ausgeprägt ist. Abb. 8.1.1 zeigt eine koronale Ansicht des olfaktorischen Epithels der Ratte. Das Gewebe wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen CGRP gefärbt. Das CGRP-Fluoreszenzsignal ist auf mehreren Ebenen des Gewebes zu sehen. Eine dichte Innervierung des Epithels durch peptiderge Fasern ist in der *Lamina propria* zu erkennen. Hier ist die Innervierung effektiv so dicht, daß einzelne Nervenfasern nicht zu unterscheiden sind. Aus der *Lamina propria* projizieren im Abstand von durchschnittlich 100 $\mu$ m mehrere Fasern durch das OE in Richtung der apikalen Schicht. Auf der Abbildung sind einzelne Fasern auszumachen, deren Enden bis in die Stützzellschicht projizieren (Pfeil).



**Abbildung 8.1.1: Innervation des OE durch trigeminale peptiderge Nervenfasern:** Die Abbildung zeigt eine koronale Ansicht des olfaktorischen Epithels. Das Gewebe wurde mit einem Antikörper gegen CGRP gefärbt. Grün: CGRP, Blau: DAPI (Kernfärbung). Der Größenbalken entspricht 50 $\mu$ m. Z-Stapel (Tiefe 36 $\mu$ m.)

Bei höherer Vergrößerung lässt sich erkennen, dass die peptidergen Nervenfasern in der Regel kurz unterhalb der mikrovillären Schicht enden (grün, Abb. 8.1.2). Die apikale, mikrovilläre Schicht ist hier durch die Färbung des exklusiv mikrovillären Proteins Ezrin markiert. Durch diese Färbung können die Mikrovilli der Stützzellen dargestellt werden (rot, Abb. 8.1.2) (Elsaesser et al. [2005], Steinke et al. [2008], Voltz et al. [2001]). In Abb. 8.1.2 C ist zusätzlich eine peptiderge Faser gezeigt, deren Ende überhalb des Ezrinsignals liegt, sie scheint also in das olfaktorische Lumen zu projizieren. Dies ist ungewöhnlich, da frühere Publikationen postulierten, dass die freien trigeminalen Nervenfasern hauptsächlich lipophile Stoffe detektieren, die in das Gewebe diffundieren können (für eine Übersicht siehe: Silver and Finger [2009]). Die Beobachtung der in das olfaktorische Lumen projizierenden Fasern bedeutet, daß über diese Fasern auch hydrophile Stoffe detektiert werden können.

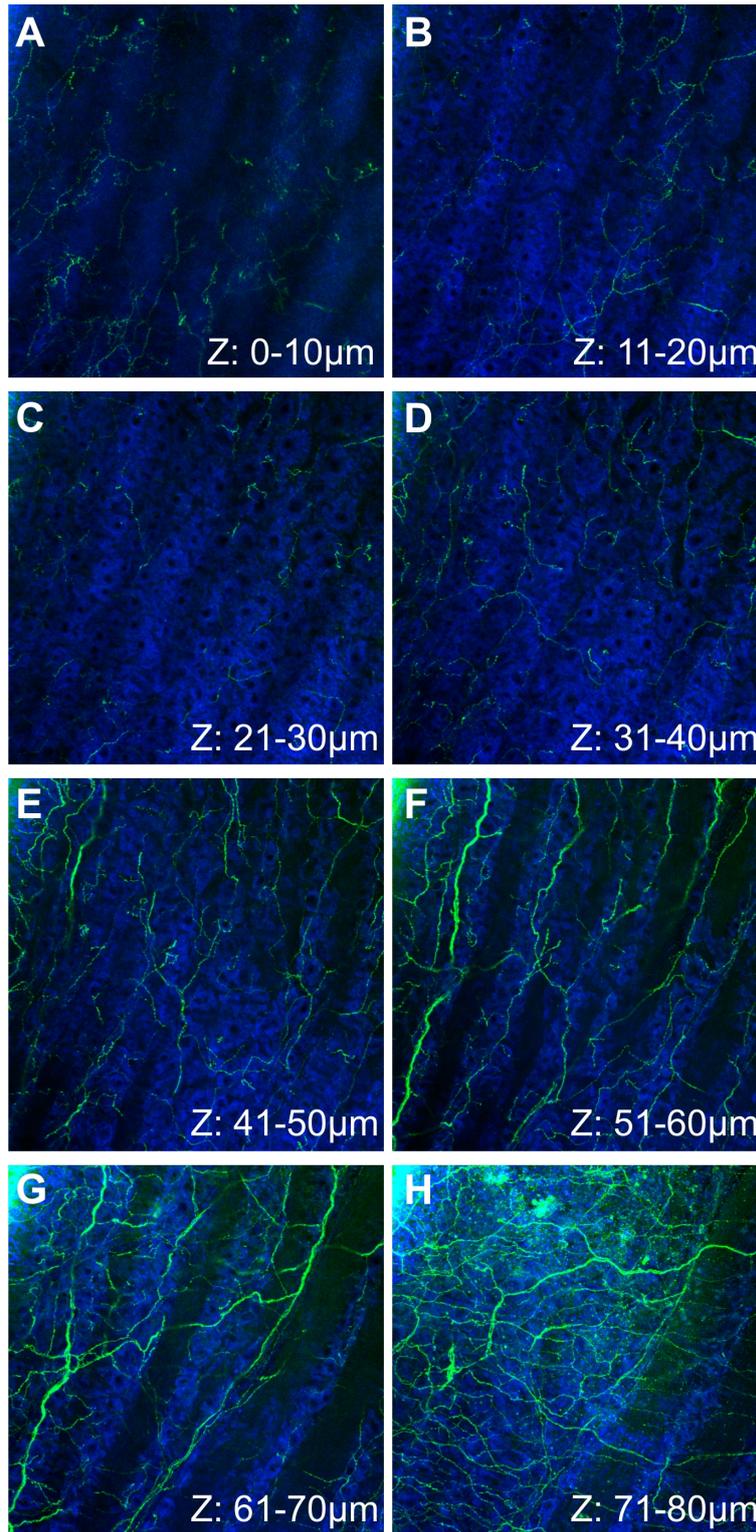
Bei Betrachtung größerer, zusammenhängender Flächen olfaktorischen Epithels in einer Auf-



**Abbildung 8.1.2: Innervation des OE durch trigeminale peptiderge Nervenfasern, Teil 2.:** Die Abbildungen zeigen Ausschnitte aus koronaren Ansichten des olfaktorischen Epithels. Alle Abbildungen zeigen trigeminale peptiderge Fasern, die das OE traversieren Rot: Ezrin, Grün CGRP, Blau: DAPI (Kernfärbung), Ab und B: Einzelschnitte, C: Z-Stapel (Tiefe:  $5\mu\text{m}$ ). Größenbalken entspricht  $10\mu\text{m}$ .

sicht zeigte sich eine starke laterale Ausbreitung trigeminaler Nervenfasern auf allen Ebenen des OEs. Hierzu wurden Z-Stapel von *wholamount*-Präparationen septalen OEs der Ratte hergestellt, wobei das zusammenhängende Stück Septums-OE auf einem Objektträger fixiert wurde und über die komplette Tiefe des Epithels mikroskopiert wurde. Es handelt sich hierbei um sagittale, optische Schnitte. Abb. 8.1.3 zeigt Z-Projektionen aus acht verschiedenen Ebenen des OEs. Hierbei wurden je 10 Einzelaufnahmen übereinander projiziert, der z-Abstand zwischen den einzelnen Ebenen betrug  $1\mu\text{m}$ , die komplette Z-Tiefe des Stapels betrug  $84\mu\text{m}$ . Die Z-Projektionen der verschiedenen Ebenen zeigen jeweils eine starke laterale Innervation durch trigeminale peptiderge Nervenfasern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das olfaktorische System dicht durch den Nervus trigeminus innerviert wird. Da die gefärbten Nervenfasern die peptiderge Fraktion der trigeminalen Innervierung darstellen, ist hiermit ein möglicher Modulationsmechanismus gegeben. Peptiderge Fasern sezernieren auf einen noxischen Reiz hin durch lokale Axonreflexe oder Dorsalwurzelreflexe Substanz P und CGRP in das sie umgebende Gewebe. Rezeptoren für Substanz P finden sich in den Atemwegen z.B. um Mukus-Drüsen und in bronchialen glatten Muskeln. Der CGRP-Rezeptorkomplex findet sich dort in bronchialen und pulmonaren Blutgefäßen und alveolaren Wänden (Groneberg et al. [2004]). Im Falle des OE gilt es nun zu klären, ob auch ORNs zu den Zielzellen dieser Peptide gehören und somit im Falle eines Axonreflex rekrutiert werden.



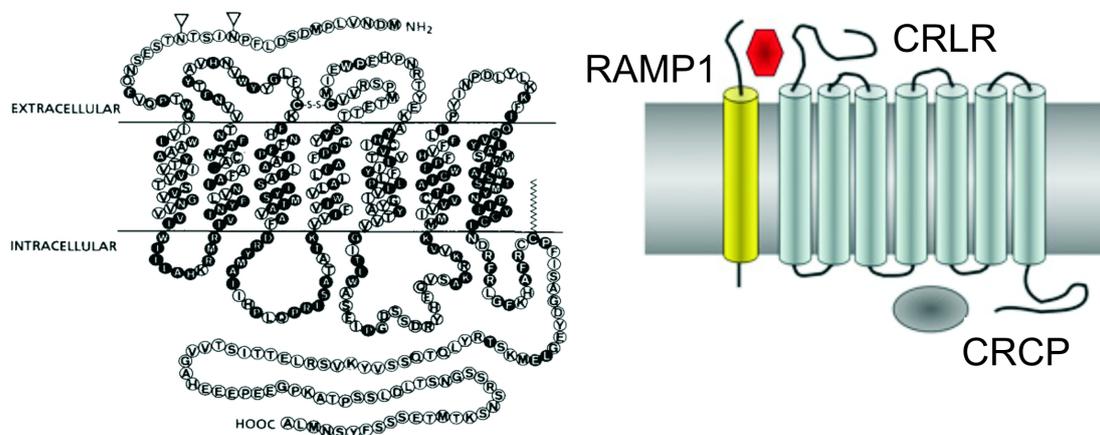
**Abbildung 8.1.3: Trigemiale Innervation des olfaktorischen Epithels, Teil 3:**Die Abbildungen zeigen verschiedene Z-Projektionen aus einem Z-Stapel (Tiefe pro Teilbild 10µm, Gesamttiefe: 80µm). Es handelt sich hierbei um sagittale, optische Schnitte. Für die Anfertigung des Z-Stapels wurde ein *wholemout*-Präparat septalen OEs verwendet. Das Gewebe wurde mit Antikörpern gegen CGRP gefärbt. , Grün: CGRP, Blau: DAPI (Kernfärbung).

Sollten ORNs zu den Zielzellen gehören, müssten sie die Rezeptoren für Substanz P und/oder CGRP exprimieren.

## 8.2 Analyse des Expressionsmusters trigeminaler Neuropeptidrezeptoren im olfaktorischen System

### 8.2.1 Expression von Rezeptor cDNA in olfaktorischen Rezeptorneuronen

Peptiderge trigeminale Nervenfasern können auf einen adäquaten Stimulus hin die Neuropeptide CGRP und Substanz P in das sie umgebende Gewebe abgeben. Der Hauptrezeptor für Substanz P ist NK1, ein 7-Transmembran-Domänen-Protein. Er fällt in die Kategorie der GPCRs (Tuluc et al. [2009]). Der Rezeptor für CGRP ist ein Komplex aus 3 Proteinen: CRLR (*Calcitonin-receptor-like receptor*), CRCP (*CGRP-Receptor-coupling protein*) und RAMP-1 (*Receptor-activity-modifying protein 1*) (van Rossum et al. [1997]). Bei CRLR handelt es sich um ein 7-Transmembran-Domänen-Protein, welches zusammen mit RAMP-1 die bindende Tasche für CGRP bildet. RAMP-1 vermittelt zusätzlich den Transport in die Membran und die Spezifität des Rezeptors. CRCP koppelt CRLR an das assoziierte G-Protein und ermöglicht so die Rezeptoraktivität. Es handelt sich hierbei also auch um einen GPCR (Conner et al. [2002], Muff et al. [1999], Born et al. [2002], McLatchie et al. [1998]).

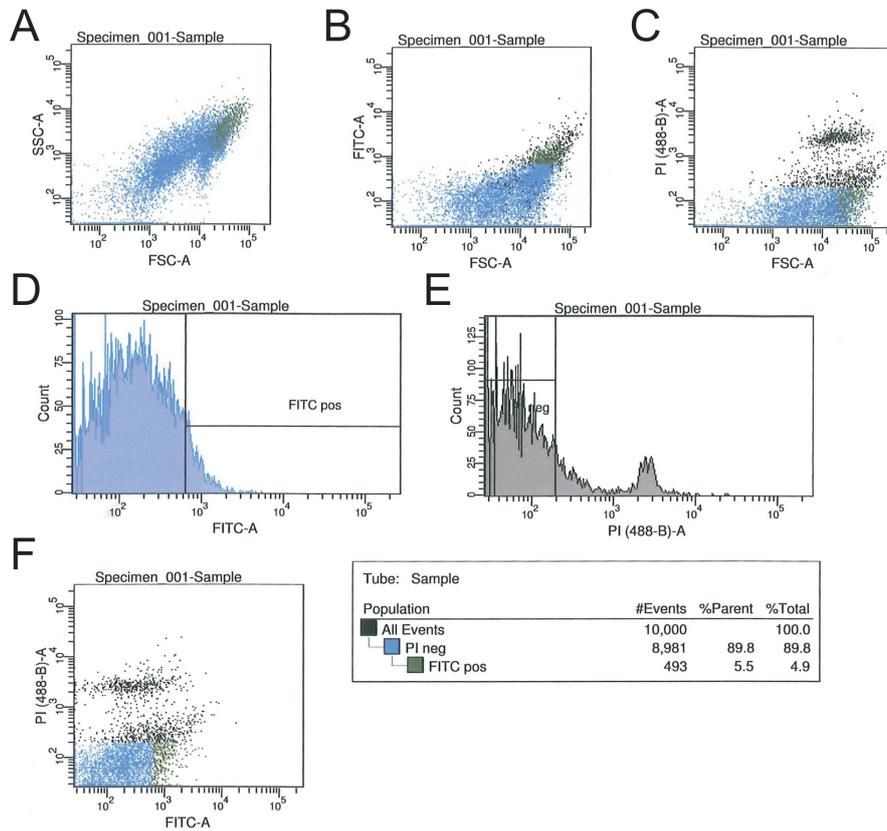


**Abbildung 8.2.1: Schematische Darstellung der Rezeptoren für trigeminale Neuropeptide** Links: NK1 (Abb. aus Ohkubo and Nakanishi [1991], Rechts: CGRP-Rezeptorkomplex (Abb. aus Reeber et al. [2009])

Um herauszufinden, welche Zelltypen im olfaktorischen System die Rezeptoren für diese Peptide bzw. deren Komponenten exprimieren, wurden cDNA-Präparationen von verschiedenen

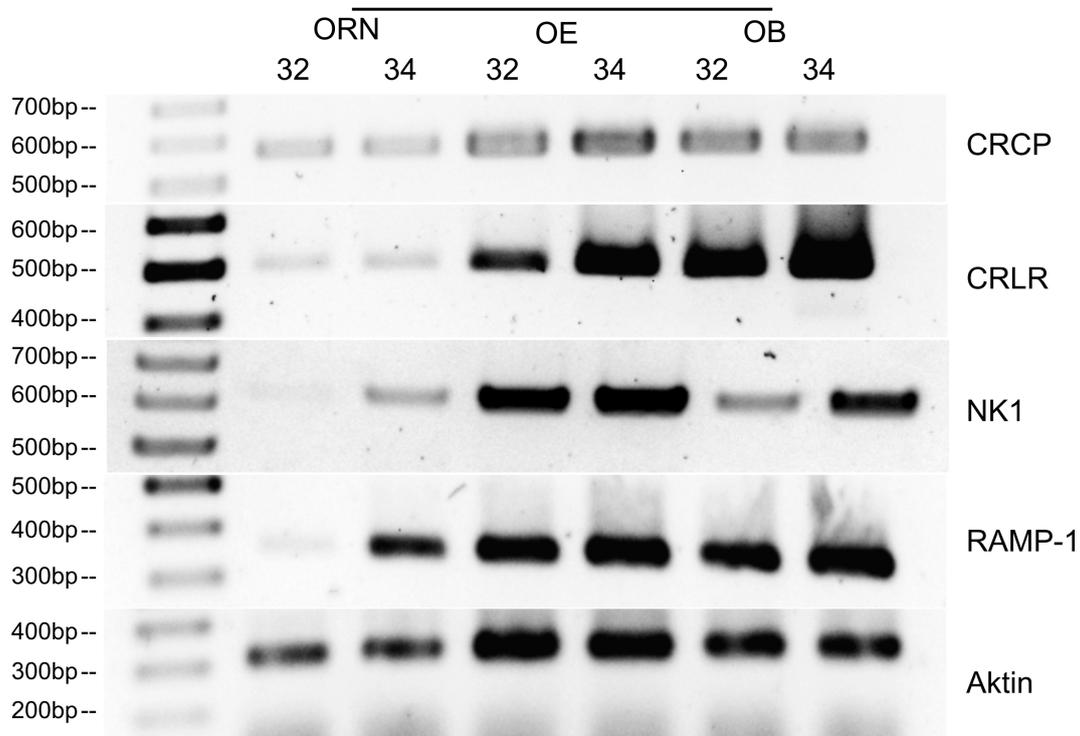
Gewebe- und Zelltypen hergestellt. Zusätzlich zur cDNA-Präparation aus OE wurde eine cDNA-Präparation aufgereinigten olfaktorischen Neuronen hergestellt (diese wurden über *fluorescence assisted cell sorting* bzw FACS aufgereinigt). Hierbei wird die intrinsische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von ORNs genutzt (Liberles and Buck [2006]). Abb. 8.2.2 zeigt die Ergebnisse der FACS-Aufreinigung. Abb. 8.2.2 A zeigt die Punktwolkendarstellung über das Verhältnis von Vorwärtsstreulicht (*Forward scatter* bzw FSC) zu Seitwärtsstreulicht (*sideway scatter* bzw SSC). Der FSC korreliert zur Zellgröße (basierend auf der Lichtbeugung durch die Zelle), während der SSC zur internen Komplexität der Zelle korreliert (da hierbei das Licht von Zellorganellen reflektiert wird) (Tanke and van der Keur [1993]). Abb. 8.2.2 B und C zeigen die Punktwolkendarstellung der Verhältnisse von Fluoreszenzintensität der verwendeten Farbstoffe Fluoroisothiocyanat (FITC) und Propidiumiodid (PI) zu FSC der gemessenen Zellen. Abb. 8.2.2 zeigen die verwendeten Ausschlusskriterien, die x-Achse zeigt die Intensität der Fluoreszenz, die y-Achse die Zahl der gezählten Zellen bei einer bestimmten Intensität. Es wurden Zellen zur weiteren Verwendung aussortiert, deren FITC-Fluoreszenz über dem festgelegten Wert lag ( $16^2$ ), und Zellen, deren PI-Fluoreszenzintensität unter dem festgelegten Wert lag (ca.  $11^2$ ). Die Einstellungen wurden so gewählt, um eine möglichst homogene Zellpopulation zu erhalten. Abb. 8.2.2 zeigt die Punktwolkendarstellung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten der verwendeten Farbstoffe zueinander. Propidiumiodid-negative, lebende Zellen sind auf den Punktwolken blau dargestellt, für die weitere Verwendung aussortierte Zellen (aufgrund ihrer FITC-Fluoreszenzintensität) grün. Das Ziel war, lebende Zellen mit einer hohen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zu erhalten.

Es wurden Primerpaare gegen die cDNA des *Tacr1*-Gens (=NK1, der Rezeptor für Substanz P) und gegen die cDNA der Gene *Calcrl*, *CRCP* und *RAMP1* des CGRP-Rezeptor-Komplex verwendet. Die Primersequenzen wurden so gewählt, dass das gewünschte Amplifikat über eine Exon-Exon-Grenze oder eine Exon-Intron-Grenze verlief. Dadurch sollte die Amplifikation genomischer DNA ausgeschlossen bzw detektiert werden. Zusätzlich wurde die Experimente mindestens dreimal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. In allen cDNA-Präparationen konnte mittels semi-quantitativer PCR ein Amplifikat für das jeweilige Primerpaar festgestellt werden. Die Banden haben alle die erwartete Größe. Die cDNA der CGRP-Rezeptorproteine (*CRCP*, *CRLR* und *RAMP1*) ist in der ORN Fraktion ab 32 Zyklen schwach zu detektieren. Die Reaktionen mit 34 Zyklen zeigen, daß *RAMP1* am stärksten exprimiert ist. Im OE ist für diese Proteine ebenfalls ab 32 Zyklen ein deutliches Signal zu sehen, welches bei 34 Zyklen erwartungsgemäß zunimmt. Das stärkste Signal im OE stammt hierbei von *CRLR*. In cDNA-Präparationen des OB ist die cDNA der CGRP-Rezeptorproteine deutlich ab 32 Zyklen zu erkennen. Auch hier ist bei *CRLR* das stärkste Signal zu sehen. Die cDNA des Substanz P Rezeptor NK1 ist in der ORN Fraktion erst ab 34 Zyklen zu detektieren, in OE und OB sind hingegen bereits deutliche Signale ab 32 Zyklen vorhanden. Um bei negativen Si-



**Abbildung 8.2.2: Fluorescence-assisted cell sorting von olfaktorischen Rezeptorneuronen:** Frisch dissoziiertes olfaktorisches Epithel wurde mit Fluorescein-di( $\beta$ -D-Galactopyranosid) und Propidiumiodid beladen. Im Anschluss wurde die Zellen der Suspension am ZMBH mittels eines BD FACSAria<sup>TM</sup> Zellsortierers auf ihre fluoreszenten Eigenschaften geprüft. Die Abbildung zeigt die verschiedenen Punktwolkendarstellungen sowie die verwendeten Ausschlusskriterien. Für die Aussortierung der toten Zellen in der Suspension wurde Propidiumiodid verwendet, lebende olfaktorische Neurone wurden anhand der Fluorescein-Fluoreszenz aussortiert. Weiterhin vermerkt ist die Gesamtzahl der sortierten Zellen sowie die Anteile von lebenden Zellen und der für die weiteren Verarbeitung aussortierten Zellen.

gnalen ein Fehlen von cDNA in der Probe ausschließen zu können, wurde für alle Reaktionen ein Primerpaar gegen Aktin als Positivkontrolle verwendet.



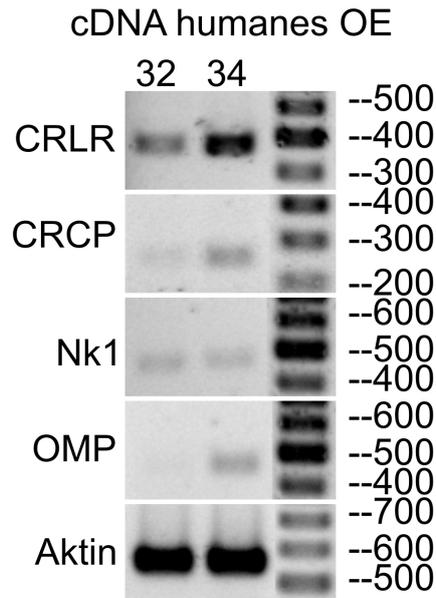
**Abbildung 8.2.3: Expression verschiedener trigeminaler Rezeptor-cDNA im olfaktorischen System:** Auf cDNA Präparationen von OE und FACS-aufgereinigten ORNs wurden PCR-Reaktionen mit Primer-Paaren gegen trigeminale Rezeptor-cDNA durchgeführt. Die Beschriftung zeigt 1. das Ziel-cDNA, gegen das das Primerpaar gerichtet war 2. die verwendete cDNA-Präparation 3. die Zyklenzahl.

Zusätzlich zu den aufgereinigten ORNs und Gewebeproben aus *Rattus norvegicus* wurden Biopsien humanen Epithels entnommen von der mittleren Nasenmuschel (zur Verfügung gestellt von Prof Dr. Thomas Hummel und Dr. Mandy Scheibe) auf die Expression trigeminaler Rezeptor-cDNA sowie OMP getestet. Für diese Experimente wurde die Gesamt-RNA verwendet.

CRLR konnte ab 32 Zyklen detektiert werden. Sowohl für CRCP als auch NK1 ist ein schwaches Signal ab 32 Zyklen zu erkennen, das erwartungsgemäß zunimmt. Auch die PCR gegen OMP lässt ein schwaches Signal ab 32 Zyklen erkennen, welches bei 34 Zyklen zunimmt. Als Positivkontrolle wurde ein Primer gegen Aktin verwendet.

Als Zwischenergebnis lässt sich also festhalten, dass ORNs die Rezeptoren für trigeminale Neuropeptide exprimieren.

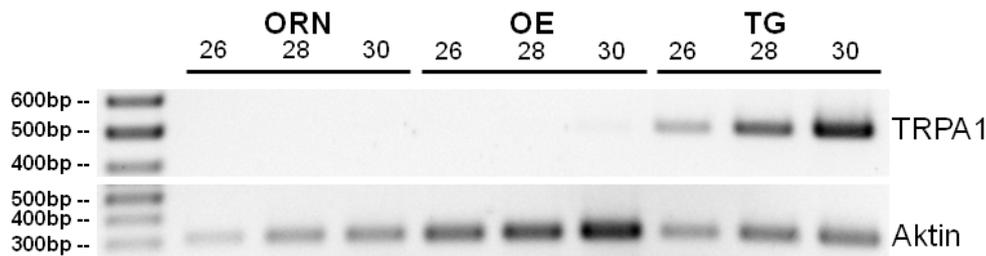
Da Allylthiocyanat ein Ligand für TRPA1 ist, und aufgrund seiner Reizstoffigenschaften



**Abbildung 8.2.4: Expression trigeminaler Rezeptor-cDNA im humanen OE:** Auf cDNA Präparationen von humanem OE (gewonnen aus Einzelbiopsien) wurden PCR-Reaktionen mit Primer-Paaren gegen verschiedene trigeminale Rezeptormoleküle durchgeführt. Die Beschriftung zeigt die Zyklenzahl, die Ziel-cDNA sowie die Größen der Markerbanden (in bp).

für verschiedene Experimente verwendet werden sollte, war es für den weiteren Verlauf des Projektes wichtig zu erörtern, ob olfaktorische Neurone TRPA1 exprimieren. Dies sollte die Frage beantworten, ob AIC nur vom Trigeminale System als chemischer Reizstoff detektiert wird, oder evtl. auch ORNs auf AIC über TRPA1 als Reizstoff reagieren können. Um auszuschließen, daß olfaktorische Neurone TRPA1 exprimieren, wurden zusätzlich PCR Reaktionen mit einem Primer-Paar gegen diesen Ionen-Kanal durchgeführt. Hier wurde zusätzlich eine cDNA-Präparation des trigeminalen Ganglions als Positivkontrolle verwendet.

In den PCR-Reaktionen, die auf cDNA-Präparationen von ORNs und OE durchgeführt wurden, zeigte sich kein Amplifikat. In den PCR-Reaktionen, die auf cDNA-Präparationen des TG durchgeführt wurde, ist ein Amplifikat der vorherbestimmten Größe bereits ab 26 Zyklen zu erkennen. Als Positivkontrolle wurde ein Primer-Paar gegen Aktin verwendet (Abb. 8.2.5). In allen Spuren ist ab 26 Zyklen ein Signal zu erkennen. Zusammenfassend zeigen meine Versuche, dass ORNs die Peptidrezeptoren NK1 und CRCP/CRLR/RAMP1 exprimieren, nicht aber den Reizstoffrezeptor TRPA1. Da auch bei gründlichster Aufreinigung über FACS nicht komplett ausgeschlossen werden kann, dass evtl. zusätzliche Zelltypen in der aussortierten Fraktion enthalten sind, die dann auch in der isolierten cDNA repräsentiert sind, wurden die Amplifikate dazu verwendet, *antisense* Sonden für *in situ*-Hybridisierungen zu generieren. Diese wurden



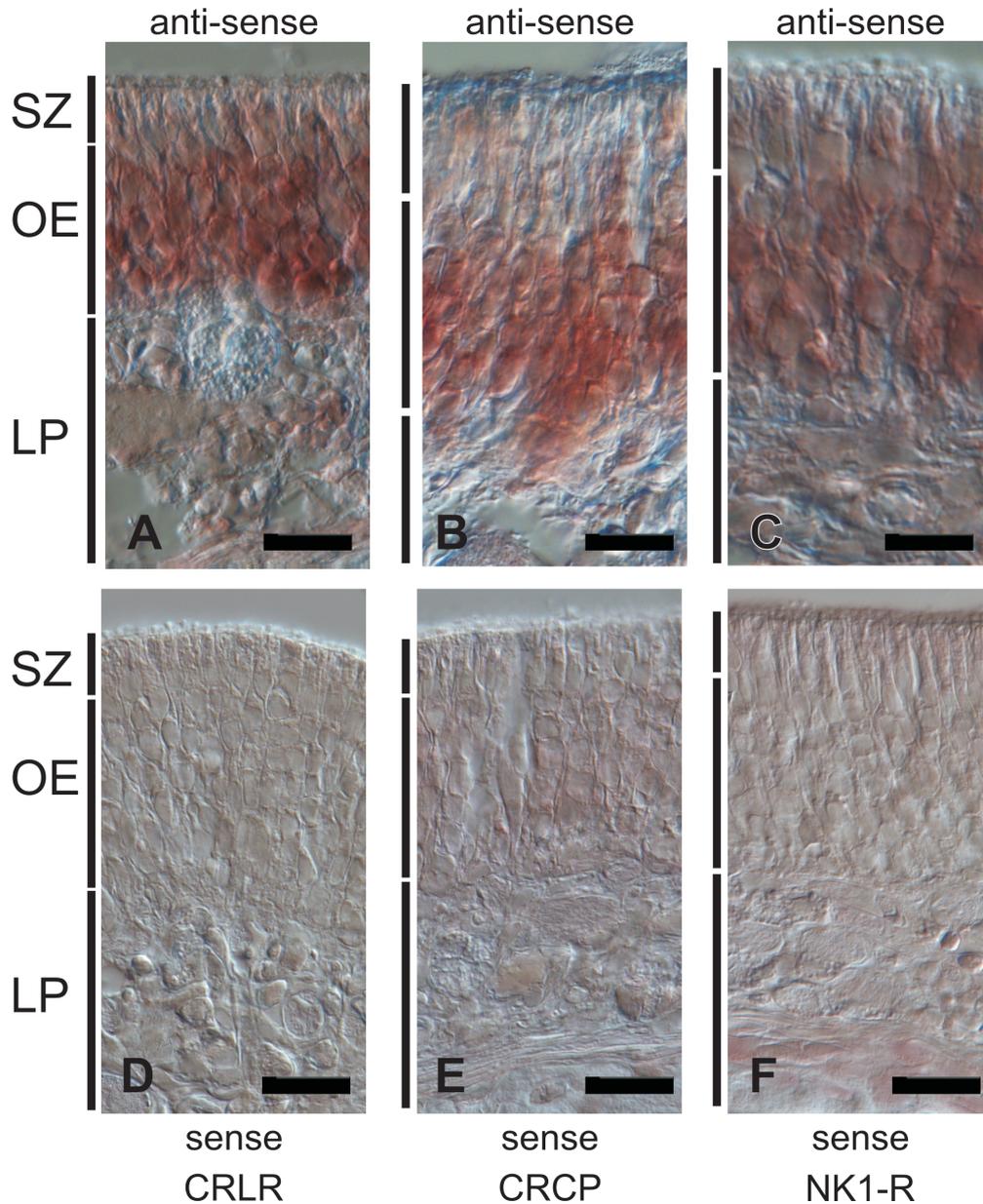
**Abbildung 8.2.5: Expression von TRPA1 und OE und TG:** Auf cDNA Präparationen von OE, FACS-aufgereinigten ORNs und des trigeminalen Ganglions wurden PCR-Reaktionen mit Primer-Paaren gegen den *transient receptor potential channel, subfamily A, member 1* (TRPA1) durchgeführt. Bei den gereinigten Riechzellen (ORN) und im Gesamtepithel konnte keine TRPA1-Expression nachgewiesen werden.

dazu verwendet, um den originären Zelltyp der ORN cDNA zu verifizieren.

## 8.2.2 Zelltyp-spezifische Expression der cDNA trigeminaler Rezeptoren

Die Amplifikate aus den RT-PCR-Reaktionen wurden dazu verwendet, DIG-markierte Sonden für *in situ*-Hybridisierungen herzustellen. Dieses Verfahren dient dazu, die Expression eines Zielgens auf mRNA Ebene in Geweben oder Zellen nachzuweisen. Es basiert auf Hybridisierung der Sonde, die den komplementären Code zur RNA hat, mit der vorhandenen RNA im Zielgewebe oder in den Zielzellen. Über die Markierung der Sonde mit fluoreszierenden Molekülen oder über die Farbreaktion von Enzymen lässt sich diese dann im Gewebe nachweisen. In diesem Fall wurde eine Markierung über Digoxigenin (DIG) verwendet. Hierbei wird beim Generieren der Sonden DIG-markiertes Uracil verwendet, welches im weiteren Verlauf der *in situ* Hybridisierung über einen anti-DIG Antikörper detektiert werden kann. Dieser Antikörper ist an alkalische Phosphatase gekoppelt, welche über eine Farbreaktion (mit NBT und BCIP) die Visualisierung der Hybridisierung ermöglicht. Abb. 8.2.6 A-C zeigt repräsentative Ausschnitte aus koronalen Gewebeschnitten des OEs der Ratte, die mit den *antisense* Sonden inkubiert wurden. Abb. 8.2.6 A zeigt das Farbsignal der Sonde gegen CRLR, das stärkste Farbsignal ist in der Schicht der olfaktorischen Neurone zu erkennen. Auf der Ebene der Stützzellen ist nur ein schwaches Farbsignal zu sehen. Die Schicht der Basalzellen zeigt ein stärkeres Signal als die Stützzellschicht, jedoch ist dieses nicht so stark wie das der ORN-Schicht. Abb. 8.2.6 B zeigt das Farbsignal der Sonde gegen CRCP. Das stärkste Farbsignal ist in der Schicht der olfaktorischen Neurone zu erkennen. Sowohl Stützzellschicht als auch Basalzellschicht zeigen schwächere Signale. Abb. 8.2.6 C zeigt das Farbsignal der Sonde gegen NK1. Hier ist auch ein starkes Signal in der Schicht der olfaktorischen Neurone zu erkennen. Es ist allerdings nicht klar vom Farbsignal der Stützzellen und dem der Basalzellen zu trennen. Allerdings scheinen einzelne Neurone

sehr stark gefärbt.



**Abbildung 8.2.6: In-situ Hybridisierungen mit Sonden gegen trigeminale Rezeptormoleküle im OE:**Die Abbildungen zeigen Ausschnitte aus dem OE. Das Gewebe wurde mit *antisense*-Sonden gegen trigeminale Rezeptormoleküle inkubiert. Auf den Gewebeschnitten, die mit *sense*-Sonden inkubiert wurde, zeigte sich kein Signal. Das stärkste Farbsignal zeigt sich in der ORN-Schicht. A: CRLR, B: CRCP, C: NK1

Es wurden zusätzlich *sense*-Sonden zur Kontrolle der mit den *antisense*-Sonden erhaltenen Signale hergestellt. Die Inkubationszeit war die gleiche wie die der *antisense*-Sonden. Abb. 8.2.6 D-F zeigt repräsentative Ausschnitte aus koronalen Schnitten des olfaktorischen Epithels der

Ratte, die mit den jeweiligen *sense*-Sonden gegen die mRNA trigeminaler Rezeptorproteine inkubiert wurden. Abb. 8.2.6 B und C zeigen allerdings einen recht starken Hintergrund, der jedoch z.T auch auf der *sense*-Kontrolle zu sehen ist, und somit eher von der verwendeten Detektionsmethode stammt.

Die *in situ*-Hybridisierungen bestätigen die im vorherigen Teil erhaltenen Ergebnisse. Die mRNA trigeminaler Rezeptormoleküle ist in ORNs zu detektieren. Das heisst, dass ORNs direkt durch trigeminale Neuropeptide moduliert werden können. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit soll nun die subzelluläre Lokalisation der Rezeptoren geklärt werden, um das Kompartiment der ORNs zu bestimmen, das für trigeminale Modulation empfänglich ist.

### **8.3 Subzelluläre Lokalisation der trigeminalen Rezeptorproteine im OE**

Trigeminale peptiderge Nervenfasern projizieren über die gesamte Länge des olfaktorischen Epithels (siehe Abb. 8.1.1 und 8.1.2). Insofern ist es wichtig zu bestimmen, welches Kompartiment der Zelle für trigeminale Neuropeptide empfänglich ist.

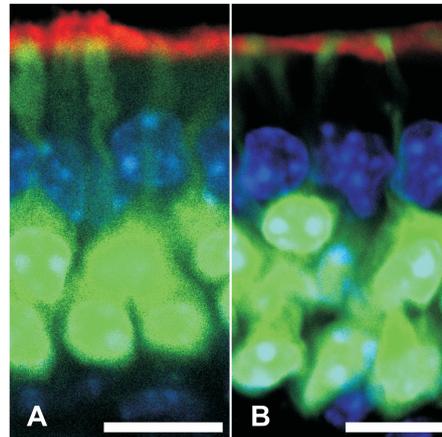
#### **8.3.1 Spezifität der verwendeten Antikörper**

Zunächst wurde die Spezifität der verwendeten Antikörper überprüft.

1. Zur Überprüfung der Spezifität der verwendeten Zweitantikörper wurden Gewebeschnitte nur mit den verwendeten Zweitantikörpern gefärbt, um die nichtspezifische Bindung dieser an das verwendete Gewebe ausschliessen zu können. 2. Zur Überprüfung der Spezifität von Erstantikörpern stehen verschiedene Methoden zur Verfügung (für eine Übersicht siehe auch Saper [2005, 2009]). Eine dieser Methoden ist die Präadsorptionskontrolle. Bei dieser Methode wird die immunhistochemische Färbung mit einer Antikörperlösung vorgenommen, die zuvor mit dem Antigen, gegen das der Antikörper gerichtet ist, präinkubiert wurde. Sollten unspezifische Antikörper in der Lösung vorhanden sein, binden diese nicht an das Antigen, sondern liegen frei in der Lösung vor und können so evtl. zu nicht-spezifischen Signalen führen. Diese Kontrolle wurde für den verwendeten NK1 Antikörper durchgeführt (Peptid, SCBT, sc-5220P). Die mit dem präadsorbierten Antikörper gefärbten Schnitte zeigten kein Signal. Für die Antikörper gegen CRLR sowie für CRCP standen z.Zt. dieser Arbeit keine Blockpeptide zur Verfügung, allerdings wurden die Spezifität der Antikörper bereits durch den Hersteller überprüft. Diese zusätzliche Information steht unter [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org) zur Verfügung (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000064989> für den verwendeten CRLR Antikörper,

<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000241258/antibody> für den verwendeten CRCP Antikörper).

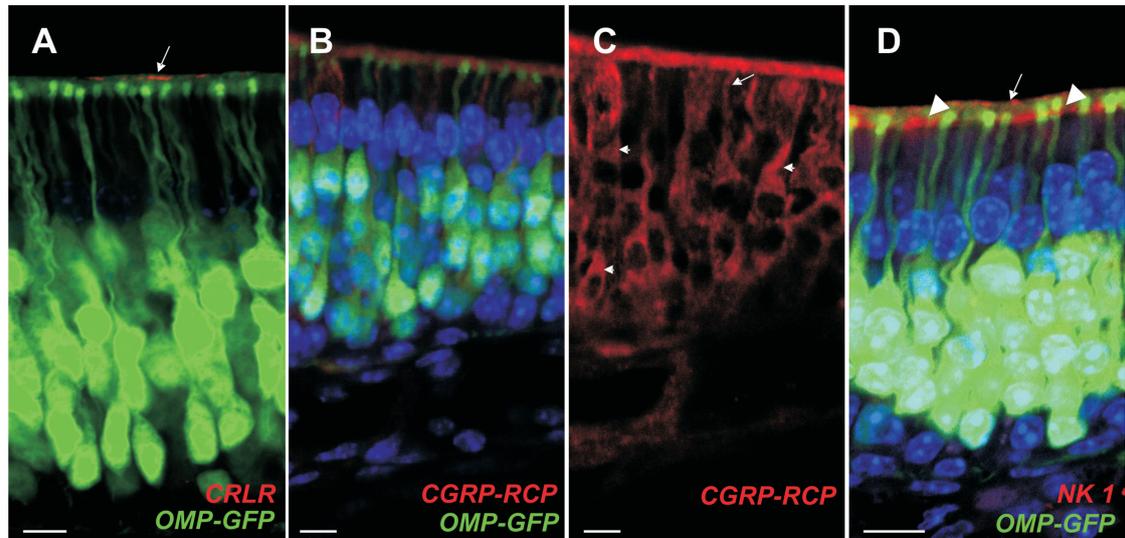
### 8.3.2 Immunhistochemische Färbungen



**Abbildung 8.3.1: Immunhistochemische Färbungen gegen die Markerproteine ACIII und Ezrin:**Die Abbildungen zeigen repräsentative Ausschnitte aus koronalen Gewebeschnitten des OEs. Das Gewebe wurde mit Antikörpern gegen die Markerproteine ACIII und Ezrin gefärbt. A: Rot: ACIII, Grün: OMP-GFP, Blau: DAPI (Kernfärbung). Das rote Immunosignal des ACIII-Antikörpers ist an bzw über den dendritischen Knöpfen der ORNs lokalisiert. B: Rot: Ezrin, Grün: OMP-GFP, Blau: DAPI (Kernfärbung). Das rote Immunosignal lokalisiert zwischen den dendritischen Knöpfen, kaum darüber.

Es wurden Färbungen gegen trigeminale Rezeptorproteine durchgeführt, um zu bestimmen auf welcher subzellulären Ebene die Rezeptoren in ORNs lokalisiert sind. Es handelt sich hierbei um Gewebeschnitte der OMP-GFP Maus. Dieser transgene Stamm exprimiert *green fluorescent protein* (GFP) anstelle des *olfactory marker protein* (OMP) (Potter et al. [2001]). OMP selber wird in einem Großteil der reifen, olfaktorischen Neurone exprimiert (Margolis [1982]). Das so exprimierte Protein lässt sich auf allen Ebenen des olfaktorischen Neurons finden. Die olfaktorischen Neurone sind auf den Mikrografien dementsprechend grün dargestellt. Alle Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und sind blau dargestellt. Zusätzlich wurden zum Vergleich Färbungen gegen das chemosensorische Kompartiment der Riechzellen, die Zilien, und gegen die Mikrovilli der Stützzellen durchgeführt. Abb. 8.3.1 zeigt Färbungen gegen 2 Markerproteine verschiedener Zelltypen des OEs. Abb. 8.3.1 A zeigt eine Färbung gegen ACIII, ein Protein, welches exklusiv in olfaktorischen Zilien lokalisiert ist und einen essentiellen Bestandteil der olfaktorischen Transduktionskaskade darstellt. Es lokalisiert hauptsächlich überhalb der dendritischen Knöpfe. Abb. 8.3.1 B zeigt eine Färbung gegen Ezrin, welches in Stützzellen exprimiert wird und exklusiv in Mikrovilli lokalisiert ist (Voltz et al. [2001]). Es lokalisiert hauptsächlich zwischen den

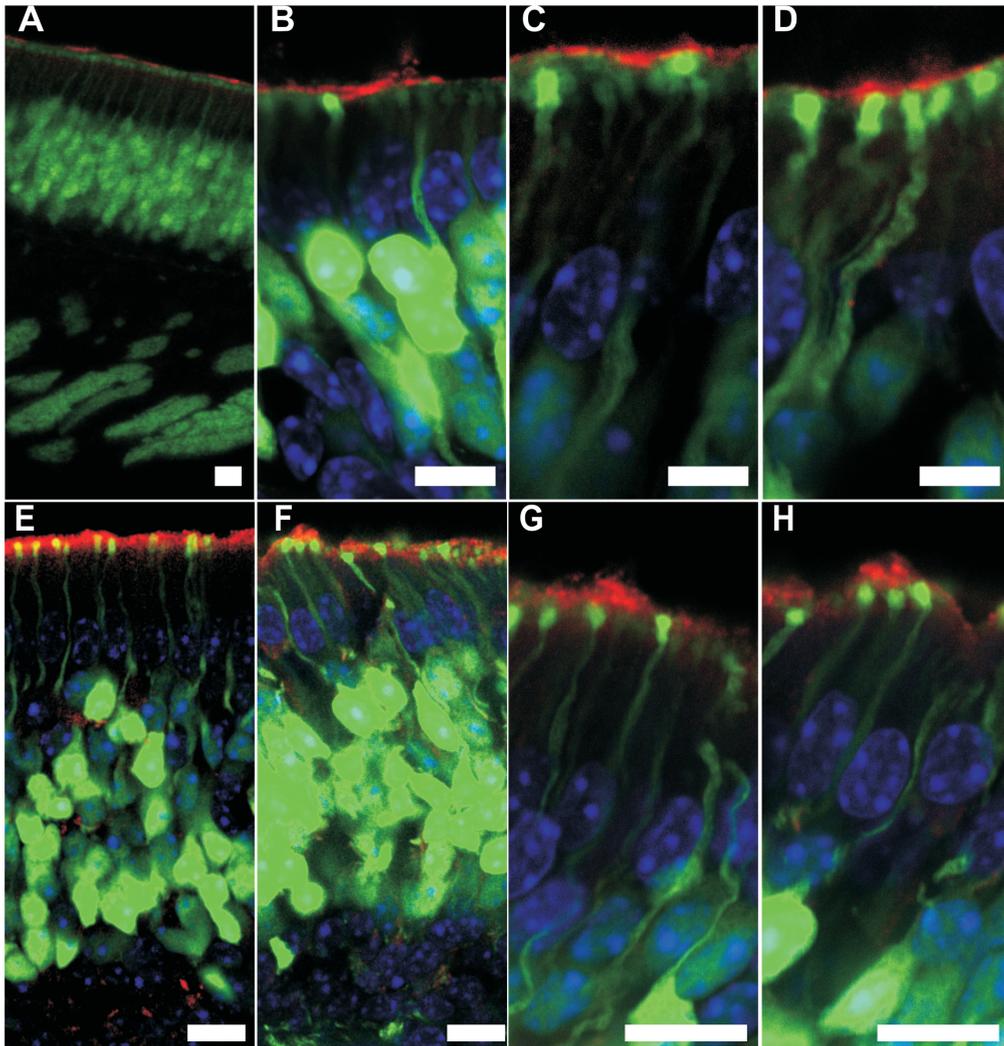
dendritischen Knöpfen, kaum darüber.



**Abbildung 8.3.2: Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen trigeminale Rezeptormoleküle im OE:** Die Abbildungen zeigen Ausschnitte aus koronalen Gewebeschnitten des OE. Die Gewebeschnitte wurden mit Antikörpern gegen die jeweiligen Rezeptormoleküle behandelt. A: Färbung gegen CRLR. Das Signal von CRLR ist in der apikalen Schicht des Gewebes lokalisiert. B, C: Färbung gegen CRCP. Das Signal ist in der apikalen Schicht des Gewebes lokalisiert. Zusätzlich ist eine Lokalisation in Dendriten und Somata von ORNs zu erkennen. D: Färbung gegen NK1. Das Signal ist in der apikalen Schicht des Gewebes lokalisiert. Die Intensität des Signals zeigt einen Anstieg ober- und unterhalb der dendritischen Knöpfe. Die Größenbalken entsprechen 10  $\mu\text{m}$ .

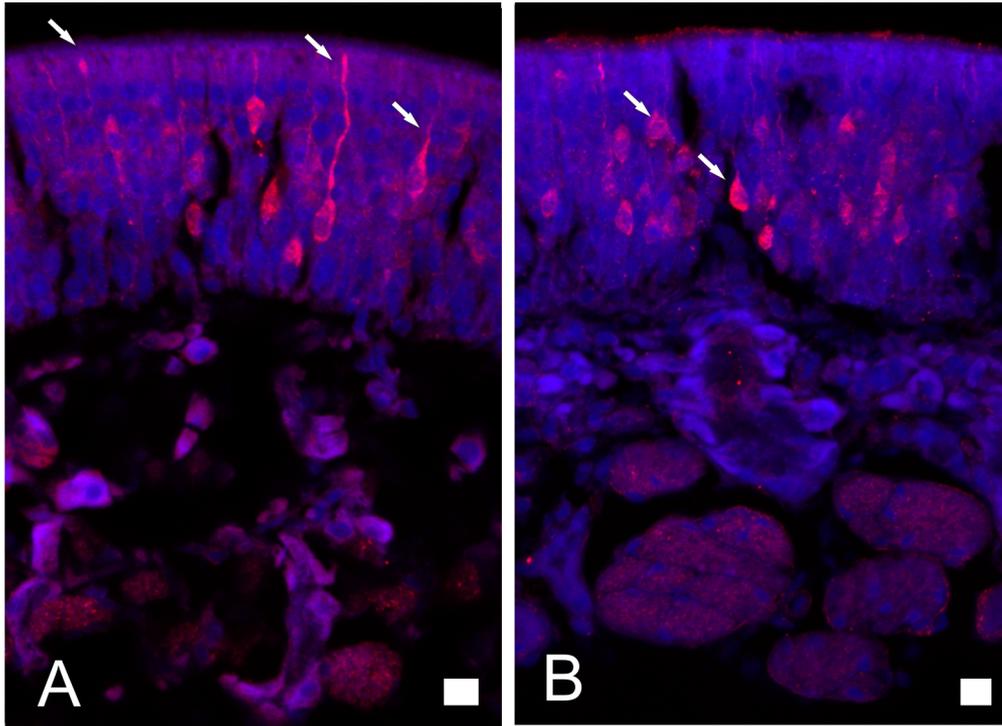
Abb. 8.3.2 zeigt eine Übersicht von verschiedenen Färbungen gegen trigeminale Rezeptoren aus dem OE. Abb. 8.3.2 A zeigt die Färbung gegen CRLR. Das CRLR Signal ist in der apikalen Schicht des OEs zu erkennen, auf der Ebene der chemosensorischen Cilien überhalb der dendritischen Knöpfe. In weiteren Strukturen der Neurone war kein Signal erkennbar. Abb. 8.3.2 B und C zeigen das Ergebnis der Färbung gegen CRCP. Das CRCP Signal ist auf mehreren Ebenen des Neurons zu erkennen. Auffällig ist auch hier das starke apikale Signal, welches sich auf Höhe der chemosensorischen Cilien, überhalb der dendritischen Knöpfe, zu befinden scheint. Abb. 8.3.2 C verdeutlicht jedoch, dass CRCP auch in weiteren Kompartimenten von olfaktorischen Neuronen lokalisiert ist. Wie die Ansicht des Rotkanals verdeutlicht, ist das CRCP Signal auch auf den Ebenen der Dendriten (Pfeil) und der Somata gefärbt (waagerechte Pfeile). Abb. 8.3.2 D zeigt das Immunsignal der Färbung gegen NK1. Hier scheint das Signal hauptsächlich aus dem apikalen Bereich des Gewebes zu stammen. Interessant hier ist, dass das NK1-Signal sowohl über- (Pfeil) als auch unterhalb (Pfeilspitzen) der dendritischen Knöpfe hohe Intensitäten zeigt. Dies deutet auf eine Lokalisation auf Ebene der chemosensorischen Zilien als auch auf der Ebene der Stützzellmikrovilli. Bildblock 8.3.3 soll zusätzliche Informationen über die Lokalisation der verschiedenen Rezeptorproteine liefern, hier wurde auf die apikale Schicht des Gewebes fokus-

siert (CRLR Abb. 8.3.3 A-D, CRCP Abb. 8.3.3 E-H). Auf allen Aufnahmen ist zu erkennen, daß sowohl CRLR als CRCP oberhalb der dendritischen Knöpfe lokalisieren.



**Abbildung 8.3.3: Immunhistochemische Färbungen gegen CRLR und CRCP im OE:**Die Abbildungen zeigen Ausschnitte aus koronalen Gewebeschnitten des OE. Die Gewebeschnitte wurde mit Antikörpern gegen CRLR oder CRCP behandelt. A-D: Auf allen Schnitten ist die Immunfluoreszenz des CRLR-Antikörpers eindeutig oberhalb der dendritischen Knöpfe zu erkennen. Rot: CRLR, Grün: OMP-GFP, Blau: DAPI (Kernfärbung). Größenbalken entspricht  $10\mu\text{m}$  (A,B) und  $5\mu\text{m}$  (C,D). E-H: Das CRCP-Signal lokalisiert deutlich über den dendritischen Knöpfen. Rot: CRCP, Grün: OMP-GFP, Blau: DAPI, Größenbalken entspricht  $10\mu\text{m}$ .

CRLR und CRCP sind im CGRP-Rezeptorkomplex miteinander verbunden. Aufgrund der unterschiedlichen Färberegebnisse (CRLR apikal, CRCP auf allen Ebenen des Neurons) wurde eine Antigendemaskierung durchgeführt, um eine Verfälschung des Färbemusters durch die Fixierung des Gewebes ausschließen zu können (Saper [2009]). Das Färbemuster von CRCP wur-

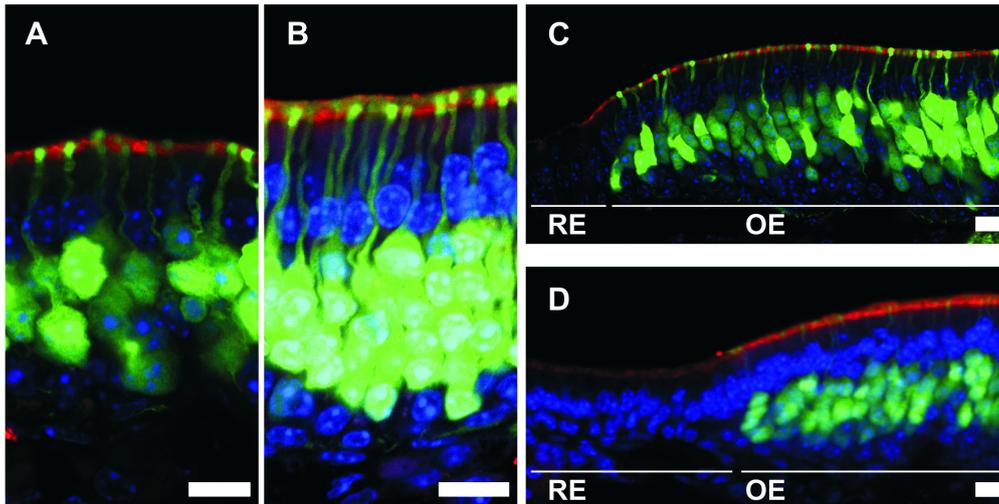


**Abbildung 8.3.4: Immunhistochemische Färbungen gegen CRLR im OE nach Antigenmaskierung:** Nach vorheriger Antigenmaskierung wurde eine Färbung gegen das Rezeptorprotein CRLR durchgeführt. A-B: Das CRLR-Signal ist deutlich in allen Ebenen des OE zu erkennen. Gefärbt werden verschiedene Kompartimente der ORNs, die durch Pfeile hervorgehoben sind (Dendrit, Soma, Axon). A: Z-Stapel Tiefe 4µm, B: Z-Stapel Tiefe 8µm. Größenbalken entspricht 10µm.

de durch die Antigenmaskierung nicht beeinflusst. Im Falle des CRLR-Antikörpers konnte nach vorhergehender Antigenmaskierung (siehe Abb. 8.3.4) zusätzlich eine Lokalisation des CRLR-Signals in weiteren Kompartimenten der ORNs beobachtet werden. Es ist auf Ebene der Dendriten und der Somata zu sehen (Dendrit und dendritischer Knopf 8.3.4 A, Soma 8.3.4 B).

Die immunhistochemischen Experimente gegen Rezeptormoleküle des CGRP-Rezeptors zeigen, dass diese interessanterweise auf der Ebene der chemosensorischen Zilien lokalisiert werden. Sie sind zusätzlich auch in Somata und Dendriten von ORNs lokalisiert. Für NK1 zeigen die Färbungen mehrere Lokalisierungen. Der Rezeptor für Substanz P scheint sowohl auf Ebene der Mikrovilli als auch der chemosensorischen Zilien lokalisiert zu sein.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass olfaktorische Neurone die Rezeptoren für trigeminale Neuropeptide exprimieren. Alle Rezeptoren sind vorrangig im apikalen Kompartiment der ORNs, den chemosensorischen Zilien, lokalisiert. Der nächste Teil der Arbeit wird sich nun mit den Effekten trigeminaler Neuropeptide auf ORNs beschäftigen.



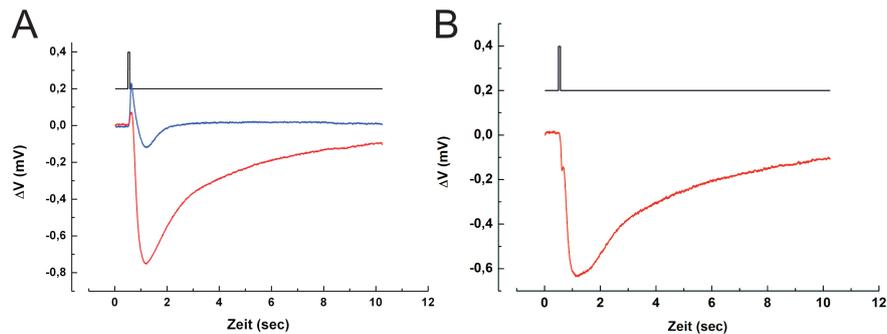
**Abbildung 8.3.5: Immunhistochemische Färbungen gegen NK1 im OE:** Die Abbildungen zeigen Ausschnitte aus koronalen Gewebeschnitten des OE. Die Gewebeschnitte wurden mit Antikörpern gegen *Neurokinin 1-Receptor* (NK1) behandelt. Bei C und D handelt es sich um Aufnahmen des Übergangsbereichs von OE zu RE. A: Das NK1-Signal befindet sich ungefähr auf der Höhe des Ezrinsignals aus Abb.24B. B: Hier findet sich eine bipolare Verteilung des NK1-Signals, einmal über- und einmal unterhalb der dendritischen Knöpfe C: Auf dieser Aufnahme des Übergangsbereichs scheint das NK1-Signal mit den ORNs zu enden. D: Hier zieht das NK1-Signal durch OE und RE, wobei die Intensität im RE stark vermindert zu sein scheint. Rot: CRCP, Grün: OMP-GFP, Blau: DAPI (Kernfärbung). Größenbalken entspricht 10µm.

## 8.4 Der Einfluß trigeminaler Neuropeptide auf die Funktion von olfaktorischen Rezeptorneuronen

Nachdem im vorherigen Teil dieser Arbeit festgestellt wurde, dass ORNs trigeminale Rezeptorproteine exprimieren und diese u.A. im apikalen Teil des Epithels lokalisiert sind, muss nun überprüft werden ob die Rezeptoren auch funktional aktiv sind. Hierzu wurde eine Variante der Elektroolfaktogramm-Technik (EOG) verwendet, das sog. *submerged* oder „Unterwasser“-EOG. Bei der EOG-Technik wird das Oberflächenpotential des olfaktorischen Epithels abgeleitet. Dieses beruht auf dem  $Ca^{2+}$ -Einstrom in und dem  $Cl^{-}$ -Ausstrom aus olfaktorischen Neuronen bei Aktivierung der olfaktorischen Transduktionskaskade. Mittels des Ausgleichsstroms in einer auf dem olfaktorischen Epithel angelegten Messelektrode kann die Oberflächenpotentialänderung auf dem OE gemessen und sichtbar gemacht werden. Bei dieser Methode wird eine Perfusion an den rostralen Bereich der Nasenhöhle angelegt, die über den caudalen Bereich mittels eines Filterpapiers abgeleitet wird. Die Nasenhöhle wird als Messkammer verwendet. Als Perfusionslösung wird eine oxygenierte Ringerlösung verwendet. Duftstoffe werden bei dieser Variante in wässriger Lösung über eine Mehrfachkapillare auf das OE aufgetragen. Diese Variante hat den Vorteil, dass sie die Verwendung von Blockern oder anderen pharmakologisch

wirksamen Agentien, in diesem Fall CGRP oder SP, erlaubt. Diese können entweder direkt auf das OE aufgetragen werden analog zu einer Duftstoffapplikation, oder werden der Perfusionslösung hinzugefügt. Alle EOG-Experimente wurden mindestens 3x wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

#### 8.4.1 Funktionelle Charakterisierung der CGRP Wirkung auf ORNs

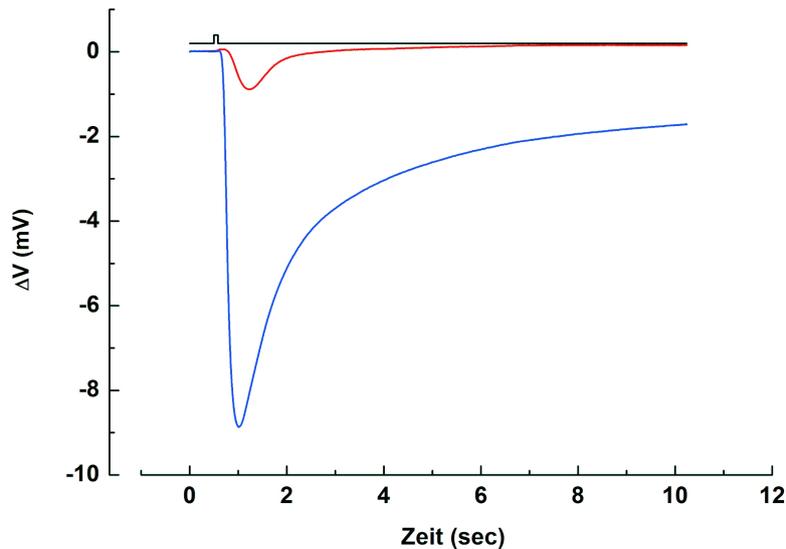


**Abbildung 8.4.1: CGRP bewirkt eine Duftstoff-ähnliche Antwort auf dem OE:** CGRP wurde über eine Applikationskapillare auf das OE appliziert und das Oberflächenpotential mittels der EOG-Technik gemessen. CGRP löst einen Potentialverlauf aus ähnlich zu einer Stimulation mit Duftstoffen. Die Konzentration der CGRP-Lösung in der Applikationspipette betrug  $1\mu\text{M}$ . Teilabbildung A zeigt den zeitlichen Verlauf des Stimulus, die Kontrollkurve (hierbei wurde nur S1-Puffer ohne Duftstoffe oder trigeminale Neuropeptide als Stimulus verwendet) und das CGRP-induzierte Signal. Teilabbildung B zeigt den Nettostrom, hierbei wurde die Kontrollkurve von der Kurve des CGRP-induzierten Signals abgezogen. Die Stimulusdauer betrug 80ms. Schwarz: Stimulus, Blau: Kontrolle, Rot: CGRP. Alle weiteren Abbildungen zeigen den Nettostrom.

CGRP wurde zunächst mittels Applikationskapillare direkt auf das Gewebe appliziert, um zu bestimmen, ob ORNs direkt auf die Stimulation mit CGRP reagieren und wie sich ein eventueller Effekt zeigt. Die Konzentration der Lösung in der Applikationskapillare betrug  $1\mu\text{M}$ . Hierbei stellte sich heraus, dass die direkte Applikation von CGRP eine „Duftstoff-ähnliche“ Antwort bewirkt. Abb. 8.4.1 zeigt eine repräsentative Aufnahme des CGRP-induzierten Signals.

Im Vergleich zur Duftstoffantwort der komplexen Duftstoffmischung Henkel 100 erscheint das CGRP Signal recht klein ( Abb. 8.4.2). Hierbei gilt es jedoch zu bedenken, dass das EOG von Henkel 100 eine starke Stimulation des Epithelbereichs darstellt. Dies liegt daran, dass die verwendete Verdünnung (1:1000) alle Duftstoffe in einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  enthält (Wetzel et al. [1999]).

Da der CGRP-Rezeptorkomplex meistens an ein  $G_{\alpha S}$ -Protein gekoppelt ist, könnte das CGRP-induzierte Signal durch einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration verursacht worden sein. Da cAMP auf die CNG-Kanäle wirkt, würde dies bedeuten, dass bei einem CGRP-induzierten Signal die olfaktorische Transduktionskaskade aktiviert wird. Um dies zu über-

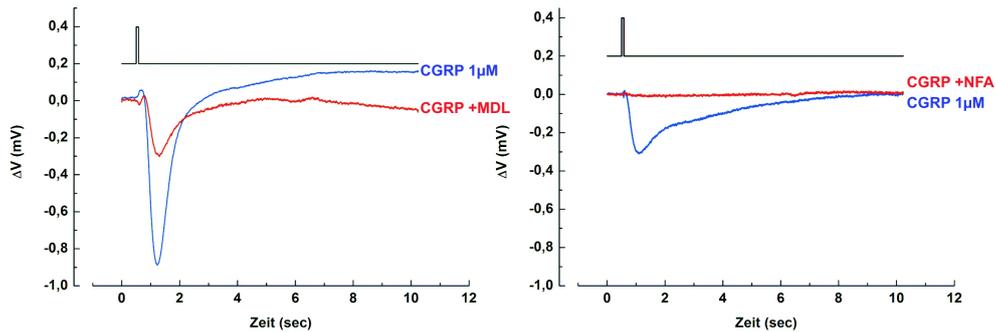


**Abbildung 8.4.2: Vergleich der „Duftstoff-ähnlichen“- Antwort von CGRP mit der Antwort der komplexen Duftstoffmischung Henkel 100:** CGRP wurde direkt auf das OE aufgetragen und das Oberflächenpotential mittels der EOG-Technik gemessen. Im Vergleich wurde auf der selben Stelle des Epithels die komplexe Duftstoffmischung Henkel 100 (1:1000) appliziert. Die Konzentration der CGRP-Lösung in der Applikationspipette betrug  $1\mu\text{M}$ . Schwarz: Stimulus, Rot: CGRP, Blau: Henkel 100

prüfen, wurden mehrere Blockexperimente gegen Schlüsselproteine der Transduktionskaskade durchgeführt. Hierbei handelt es sich z.B. um die Adenylatzyklase Typ III, die nach dem Binden eines Duftstoffs an seinen Rezeptor cAMP synthetisiert. Diese wurde mit MDL-12,330A ( $30\mu\text{M}$ ) blockiert (Chen et al. [2000]). In einem zweiten Versuch wurden die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanäle durch Nifluminsäure ( $300\mu\text{M}$ ) blockiert (Nickell et al. [2006, 2007]). Diese Kanäle werden als letzter Schritt in der Kaskade aktiviert und leiten ca. 80% des Rezeptorstroms. Es stellte sich heraus, dass das CGRP-induzierte Signal in beiden Blockexperimenten drastisch reduziert werden konnte. Abb. 8.4.3 zeigt repräsentative Aufnahmen aus den Blockexperimenten. Abb. 8.4.3A zeigt das Blockexperiment, bei dem mit NFA ( $300\mu\text{M}$ ) geblockt wurde. Die Amplitude des CGRP-Signals wurde stärker als die erwarteten 80% verringert (rote Kurve)

Als Blocker für die Adenylatzyklase Typ III wurde  $30\mu\text{M}$  MDL-12, 230A Hydrochlorid verwendet, welches einen potenten, selektiven Blocker darstellt. Bei diesem Experiment wurde das CGRP Signal um ca. 60% verringert.

Diese Experimente zeigen, dass olfaktorische Neurone auf die Stimulation mit CGRP mit einer „Duftstoff-ähnlichen“-Antwort reagieren, d.h. die Ableitung des lokalen elektrischen Oberflächenpotentials zeigt eine Kurve ähnlich zu der eines Duftstoffs. Im Vergleich zu einer starken Stimulation des Gewebes mit Henkel 100 (1:1000) der dementsprechenden Stelle auf dem OE ist deren Amplitude jedoch verhältnismäßig klein. Die Ergebnisse der Blockexperimente lassen



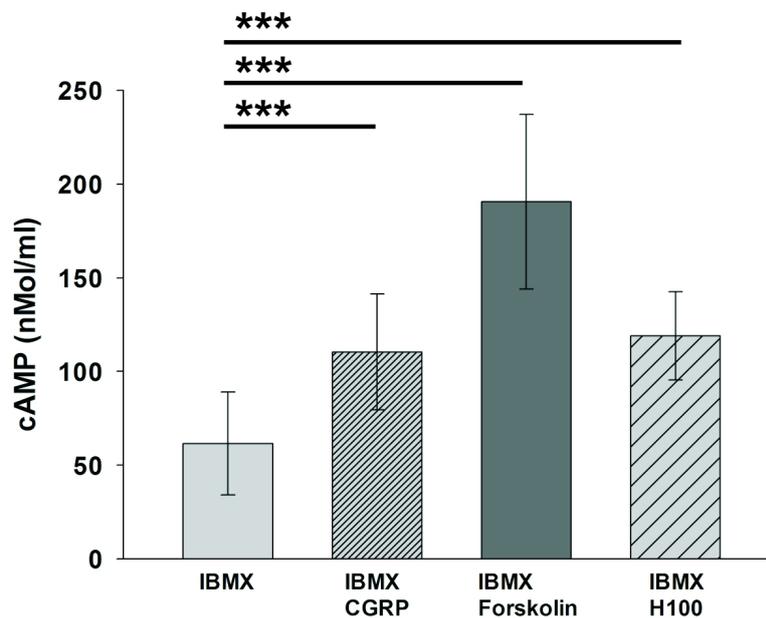
**Abbildung 8.4.3: CGRP-induzierte Signale werden durch Blocker gegen die olfaktorische Transduktionskaskade vermindert:** Das olfaktorische Gewebe wurde über die Perfusionslösung mit Blockern der olfaktorischen Transduktionskaskade für 10min präinkubiert. Verwendet wurden MDL-12, 330A ( $30\mu\text{M}$ ), ein Inhibitor der Adenylatzyklase (Typ III), und Nifluminsäure ( $300\mu\text{M}$ ), ein Blocker von  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chloridkanälen. Im Anschluss an die Präinkubation wurde CGRP über eine Applikationspipette direkt auf das Gewebe aufgetragen (die Konzentration der CGRP-Lösung betrug  $1\mu\text{M}$ ). Es wurden CGRP-induzierte Signale vor und nach der Inkubation mit den jeweiligen Blockern aufgezeichnet. Das CGRP-induzierte Signal wurde durch beide Blocker vermindert. A: Schwarz: Stimulus, Rot: CGRP, Blau: CGRP + NFA. B: Schwarz: Stimulus, Blau: CGRP, Rot: CGRP + MDL-12,330A.

vorerst nur den Schluss zu, dass die CGRP-induzierten Signale die olfaktorische Transduktionskaskade verwenden. Dieser begründet sich durch die festgestellte Minderung der CGRP-induzierten Signale, wenn das OE mit einem *calcium activated chloride channel* -Blocker (CAC) oder einem Inhibitor der Adenylatzyklase, Typ III präinkubiert wird. Der folgende Teil der Arbeit wird sich nun der Frage widmen, ob die Stimulation mit CGRP zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration im olfaktorischen Epithel führt.

## 8.5 Messung der cAMP Konzentration in Proteinextrakten des olfaktorischen Epithels

Der CGRP Rezeptorkomplex gehört zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Er ist häufig mit einem  $G_{\alpha S}$  gekoppelt. Dieses G-Protein vermittelt die Zyklisierung von Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Da die Inhibierung der Adenylatzyklase Typ III mit einer Verminderung des CGRP-induzierten Signals einher ging, sollte mittels der *enzyme-linked immunosorbent assay*-Technik (ELISA) geklärt werden, ob und wieviel cAMP durch die Stimulation mit CGRP produziert wird. Die Herstellung der Proben, deren Proteinkonzentration und cAMP-Konzentration gemessen wurden, ist in Abschnitt 7.2.15 beschrieben. Bei dem hier verwendeten ELISA handelt es sich um einen direkten, kompetitiven ELISA. Das heißt in diesem Fall, dass der Zweit-Antikörper an die verwendete 96-well-Platte gebunden ist. Das zu messende cAMP kompetiert mit einem Konjugat (cAMP-alkalische Phosphatase) um

die Bindung an den Erstantikörper. Je stärker also ein Farbsignal in einer gemessenen Probe ist, desto weniger natives cAMP enthält sie. Es wurden 18 Proben von drei Tieren entnommen (6 Proben pro Tier). Je drei der Proben wurden nur mit einer Isobutylmethylxanthin-Lösung (IBMX) inkubiert, um den Abbau von cAMP durch Phosphodiesterase 2 (PDE2) entgegen zu wirken. Die restlichen drei Proben wurden nach der Präinkubation mit IBMX zusätzlich in einer 10 $\mu$ M CGRP Lösung inkubiert. Die Messung des CGRP Gehalts in den Proben ergab, dass die cAMP-Konzentration in den mit CGRP behandelten Proben höher war, als in den nur mit IBMX behandelten. Die statistische Auswertung mittels T-Test ergab, dass die Erhöhung des cAMP-Spiegels in den behandelten Proben signifikant von dem der unbehandelten Proben abwich (t-Test,  $p < 0,001$ ). Das heißt, daß die Nullhypothese, dass die Erhöhung des cAMP-Spiegels in den mit CGRP behandelten Proben Zufall ist, verworfen werden muss.

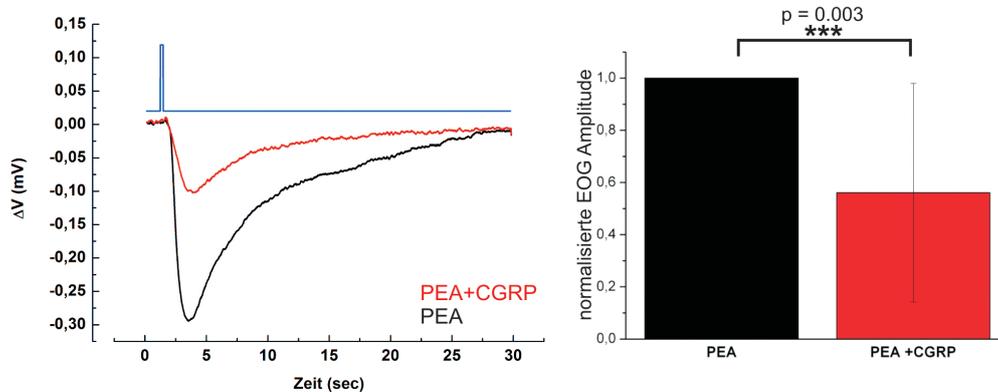


**Abbildung 8.5.1: CGRP erhöht den cAMP-Spiegel im OE:** Es wurden OE Gewebepräparationen mit einem Blocker der PDE2 (IBMX, 300 $\mu$ M) für 5 min vorbehandelt. Ein Teil der Gewebepräparationen wurde dann zusätzlich für 2 min mit CGRP-Lösung (10  $\mu$ M), Forskolin (10  $\mu$ M) oder Henkel 100 (VD 1:1000) behandelt. Die Proben wurden sofort im Anschluss (nach insgesamt 7 min Inkubation) in flüssigem Stickstoff schockgefroren, gemörsert und zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden dann Aliquote entnommen, die 5  $\mu$ g Gesamtprotein enthielten und in einem cAMP-ELISA eingesetzt. Die Auswertung der ELISA-Daten ergab eine signifikante (Student's T-test,  $p < 0,001$ ) Erhöhung der cAMP-Konzentration in den CGRP-behandelten Proben. ( $p_{IBMX \text{ vs. Forskolin}} = 0,003$ ,  $p_{IBMX \text{ vs. H100}} = 0,008$ ,  $n_{IBMX} = 18$ ,  $n_{CGRP} = 16$ ,  $n_{Forskolin} = 4$ ,  $n_{H100} = 4$ )

Die Stimulation mit 10 $\mu$ M CGRP bewirkt einen höchst signifikanten Anstieg der cAMP-Konzentration im Gewebe. Der Anstieg ist ähnlich hoch wie der durch Henkel 100 bewirkte Anstieg. Es bestätigt sich das Ergebnis der Block-Experimente, in denen festgestellt wurde, dass das Duftstoff-ähnliche CGRP Signal durch die Inhibition der ACIII vermindert wird. Bis jetzt

wurde nur die Wirkung von CGRP auf olfaktorische Neurone betrachtet. Wie aber äußert sich die Wirkung von CGRP, wenn es zusammen mit einem Duftstoff appliziert wird? Als Duftstoff für die nächsten Experimente wurde Phenylethylalkohol (PEA) verwendet, da dieser Duftstoff als rein olfaktorischer Stimulus gilt.

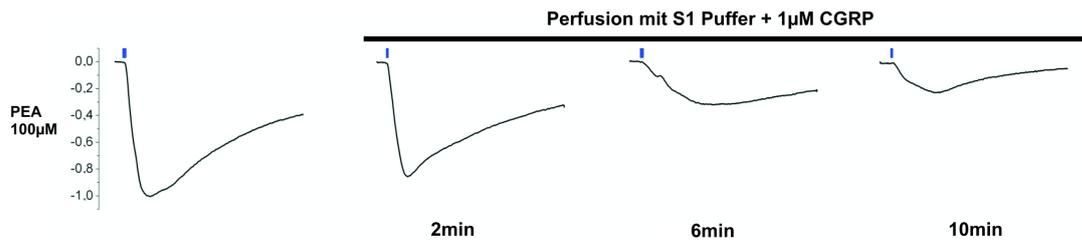
## 8.6 Modulation olfaktorischer Antworten durch CGRP am Beispiel von PEA



**Abbildung 8.6.1: CGRP moduliert PEA-induzierte Signale:** A: Es wurden PEA (Konzentration der Stocklösung:  $100\mu\text{M}$ ) oder PEA und CGRP simultan (Konzentration PEA:  $100\mu\text{M}$ , Konzentration CGRP:  $1\mu\text{M}$ ) auf das OE aufgetragen und das resultierende Oberflächenpotential aufgezeichnet. Die Antwort des Gewebes auf den Duftstoff PEA wurde durch CGRP stark vermindert. Blau: Stimulus, Schwarz: PEA  $100\mu\text{M}$ , Rot: PEA  $100\mu\text{M}$  + CGRP ( $1\mu\text{M}$ ) B: Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung der simultanen Applikation von PEA und CGRP. Die PEA-Antwort wird im allgemeinen im ca. 50% verringert. Die statistische Auswertung mit dem Mann-Whitney-Rangsummentest ergab, dass es sich bei der Verminderung um eine höchst signifikante Änderung handelt (der p-Wert betrug 0,003,  $n = 15$ ).

Für diese Experimente wurden PEA (Konzentration  $100\mu\text{M}$ ) und CGRP ( $1\mu\text{M}$ ) simultan auf das OE appliziert. Alternativ wurde CGRP der Perfusionslösung hinzugefügt und es wurden bei einem ISI von 4 min PEA-Antworten aufgezeichnet. PEA wurde aufgrund seiner Eigenschaften als rein olfaktorischer Duftstoff verwendet, um zusätzliche trigeminale Stimulation durch den verwendeten Duftstoff ausschließen zu können. Wurden PEA und CGRP simultan aufgetragen, kam es zu einer Verminderung der PEA-EOG Amplitude im Vergleich zur reinen PEA Stimulation auf der selben Stelle des OEs. Die statistische Auswertung mehrerer Messungen ergab, dass die Abnahme der Amplitude des PEA-EOGs des Signals höchst signifikant ist (Mann-Whitney Rangsummentest,  $p=0,003$ ,  $n=12$ ). Durchschnittlich wurde das Signal um ca. 50% verringert. Abb. 8.6.1 zeigt sowohl eine repräsentative Aufzeichnung des Oberflächenpotentials bei der Stimulation mit PEA und der PEA/CGRP-Mischung als auch die statistische Auswertung, bei dem Fehlerbalken handelt es sich um die Standardabweichung.

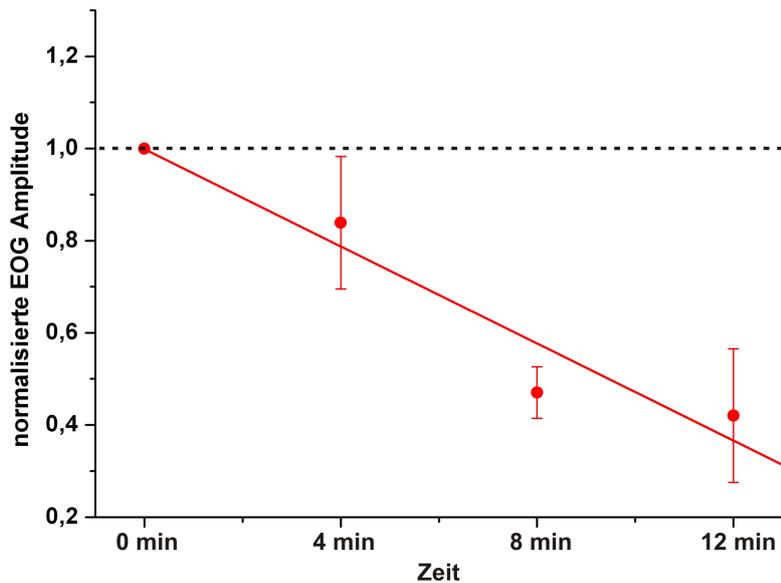
Wurde CGRP der Perfusionslösung hinzugefügt, nahm die Amplitudenhöhe der Duftstoff-EOGs mit der Dauer des Experiments ab. Je länger mit  $1\mu\text{M}$  CGRP perfundiert wurde, desto mehr nahm die Amplitudenhöhe des PEA-EOGs ab. Abb. 8.6.2 zeigt die graphische Darstellung des



**Abbildung 8.6.2: CGRP moduliert PEA-induzierte Signale (Teil 2):** Es wurde PEA (Konzentration der Stocklösung:  $100\mu\text{M}$ ) auf das Gewebe aufgetragen. Anschließend wurde die Perfusionslösung S1 durch eine Perfusionslösung ersetzt, die zusätzlich  $1\mu\text{M}$  CGRP enthielt. Es wurden im Abstand von 4 min das Oberflächenpotential der Antwort auf PEA gemessen. Die Duftstoffantwort auf den PEA-Reiz wurde durch die Perfusion mit CGRP ständig verringert. Die Duftstoffantworten von links nach rechts folgen dem zeitlichen Verlauf. Der schwarze Balken über den Kurven zeigt den Beginn der CGRP-Perfusion an. Die blauen Balken zeigen den Zeitpunkt des Stimulus an. Schwarz: PEA  $100\mu\text{M}$ .

Experiments. Der schwarze Balken zeigt den Beginn der Perfusion mit CGRP, die blauen Balken die Stimuli.

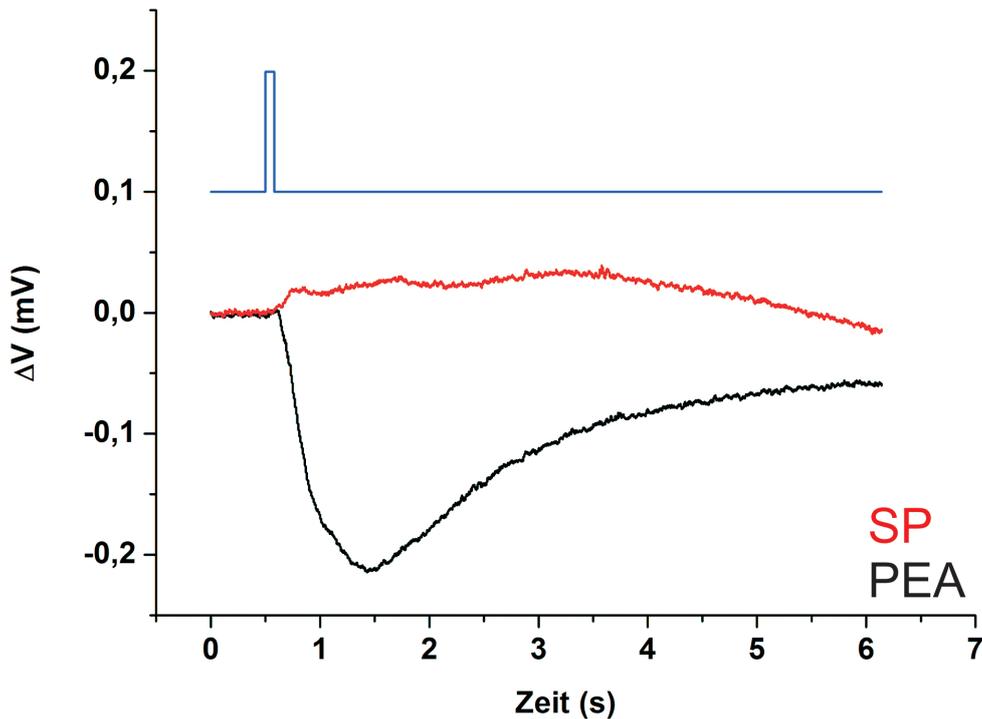
Abb. 8.6.3 zeigt die graphische Darstellung mehrerer repräsentativer CGRP Perfusionsexperimente. Die Amplitudenhöhen der PEA-Duftstoffsignale nach Beginn der CGRP-Perffusion wurden auf den Wert der Amplitude des PEA-Duftstoffsignals vor Beginn der Perfusion normalisiert, deswegen zeigt dieser Wert auch keine Abweichung in y. Das OE wurde 2 min mit CGRP präinkubiert. Bei einem ISI von 4 min sollte im Normalfall wieder die volle Amplitudenhöhe erreicht werden, dieser Sollwert wird durch die gestrichelte Linie dargestellt. Die Abweichung in y ist die Standardabweichung des Mittelwerts. Es ist deutlich zu erkennen, daß die mittlere Amplitudenhöhe des PEA-Duftstoffsignals mit der Dauer der CGRP-Perfusion immer stärker abnimmt. Insgesamt lässt sich also sagen, dass eine simultane Stimulation bzw eine Dauerstimulation mit CGRP einen hemmenden Effekt auf die EOG-Amplituden von PEA hat.



**Abbildung 8.6.3: Graphische Darstellung von CGRP modulierten Duftstoffsignalen:** Die Abbildung zeigt die graphische Darstellung der normalisierten EOG-Amplitudenhöhe repräsentativer Testläufe. Rot: normalisierte EOG-Amplituden der Stimulation mit PEA mit Modulation durch CGRP ( $n_{0-8min}=4$ ,  $n_{12min}=3$ ). Das Gewebe wurde bei der Perfusion mit CGRP 2 min präinkubiert. Bei der Abweichung in y handelt es sich um die Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard error of the mean=SEM*).

## 8.7 Modulation olfaktorischer Antworten durch Substanz P

Analog zu den Experimenten des vorherigen Kapitels wurde eine Substanz P-Lösung mit einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  auf das OE appliziert, um den Einfluss von Substanz P auf das Oberflächenpotential des OE zu prüfen. Die direkte extraepitheliale Applikation von Substanz P zeigte innerhalb des gemessenen Zeitfenster eine leichte Erhöhung des Oberflächenpotentials auf dem Epithel, jedoch keine charakteristische Antwort wie z.B. den Verlauf eines Duftstoff-EOGs oder eines CGRP-induzierten Signals. Daraus lässt sich schliessen, dass entweder die olfaktorische Kaskade durch SP nicht aktiviert wird, oder die Konzentration des Neuropeptids zu gering war. Vergleichbar zu den Experimenten im vorherigen Abschnitt wurde Substanz P der Perfusionslösung hinzugefügt. Zweck des Versuchs war es, die EOGs eines rein olfaktorischen Duftstoffs (PEA) vor und während der Stimulation mit Substanz P aufzuzeichnen. Da die immunhistochemischen Ergebnisse darauf hindeuten, dass der Rezeptor NK1 in der apikalen Schicht des Gewebes lokalisiert ist, wurde für diese Versuche Substanz P extraepithelial appliziert. Dies geschah entweder durch die direkte Applikation über eine Mehrfachkapillare (Abb. 8.7.1) oder

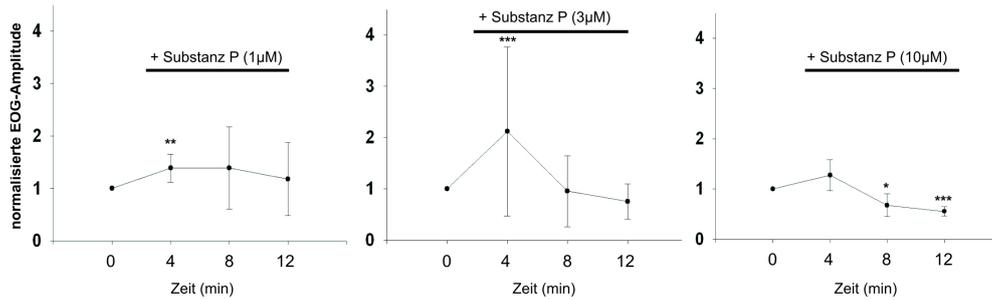


**Abbildung 8.7.1: Einfluß von Substanz P auf das Oberflächenpotential des OE:** Die Abbildung zeigt Aufzeichnungen des Oberflächenpotentials des OE bei Stimulation mit PEA oder Substanz P. Nach der Stimulation mit PEA ist der Verlauf eines Duftstoff-EOGs zu erkennen. Nach Stimulation mit Substanz P allein ist kein EOG-ähnlicher Verlauf (vgl. PEA) zu erkennen. Jedoch steigt das Oberflächenpotential um ca. 0,04 mV an. Blau: Stimulus (80ms), Schwarz: PEA (100mM), Rot: Substanz P (1 $\mu$ M)

über die Zugabe zur Perfusionslösung. Es wurden hierfür Konzentrationen von 1, 3 und 10 $\mu$ M verwendet. Der ISI zwischen den PEA-Stimuli war 4 min. Die Perfusion mit Substanz P wurde 2 min nach dem ersten PEA Stimulus gestartet. Vergleichbar zum Experiment in 8.6 sollte nun die modulatorische Wirkung von Substanz P auf die olfaktorische Rezeption getestet werden. Hierzu wurde der Perfusionslösung Substanz P hinzugefügt und Duftstoff-Antworten vor und während der Perfusion mit Substanz P aufgezeichnet.

Bei Präinkubation mit Substanz P liess sich für die 1  $\mu$ M und die 3  $\mu$ M Konzentration ein signifikanter Amplitudenanstieg beobachten. Bei diesem handelte es sich um ein transientes Phänomen, da sich die restlichen Duftstoffantworten nicht signifikant von der Stimulation ohne Substanz P Modulation unterscheiden. Bei der 10  $\mu$ M Konzentration ist auch ein transienter Amplitudenanstieg zu sehen, allerdings ist der Anstieg nicht signifikant. Die weiteren Stimulationen bei dieser Konzentration zeigen jedoch eine signifikante Minderung der Duftstoffantworten.

Zusammenfassend lässt sich über die Modulation olfaktorischer Reize durch Substanz P sagen:



**Abbildung 8.7.2: Modulation olfaktorischer Antworten durch Substanz P (1-10  $\mu$  M):** Die Abbildung zeigt die graphische Darstellung normalisierter Duftstoffantworten mit und ohne Modulation durch Substanz P. Das OE wurde mit PEA stimuliert bei einem ISI von 4 min. Vor dem zweiten Stimulus wurde das Gewebe zwei Minuten mit Substanz P präinkubiert (durch den schwarzen Balken indiziert). Bei der Abweichung in y handelt es sich um die Standardabweichung. A: Substanz P (1 $\mu$ M),  $p = 0,002$ ,  $n = 6$  B: Substanz P (3 $\mu$ M),  $p < 0,001$ ,  $n = 7$  C: Substanz P (10 $\mu$ M) 3. Stimulus:  $p = 0,013$ ,  $n = 5$ . 4. Stimulus:  $p < 0,001$ ,  $n = 5$ . Als Test wurde der Mann-Whitney-Rangsummentest verwendet (Daten nicht normalverteilt). Es wurde auf die Abweichung zum ersten Stimulus getestet.

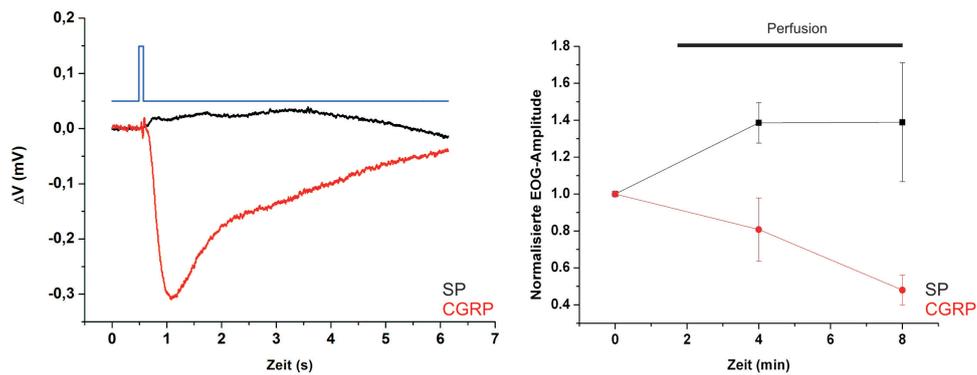
1. Im Vergleich zu CGRP erzeugt Substanz P keine charakteristischen Signale bei direkter Applikation auf dem OE.
2. Die Perfusionsexperimente zeigen einen transienten Anstieg des Mittelwerts der PEA Amplitude kurz nach Beginn der Substanz P Perfusion. Dieser transiente Anstieg der Amplitudenhöhe geht mit der Dauer des Experiments zurück. Für die Experimente mit 1 $\mu$ M und 3 $\mu$ M SP ist dieser Anstieg signifikant.

Der folgende Abschnitt soll einen kurzen vergleichenden Überblick über beide Neuropeptide bieten.

## 8.8 Vergleich der modulatorischen Aktivität trigeminaler Neuropeptide

Grundsätzlich unterscheiden sich die beiden Neuropeptide stark in ihrer Modulation der olfaktorischen Rezeption. CGRP zeigt in einer einen hemmenden modulatorischen Effekt auf Duftstoffrezeption, Substanz P einen exzitatorischen (im Bereich 1-3 $\mu$ M) Der CGRP Effekt wird nach den Ergebnissen in 8.4.1 über die olfaktorische Tansduktionskaskade vermittelt. Die Wirkungsweise des SP-Effekts ist noch ungeklärt. Diese einleitenden Experimente zeigen jedoch, dass Substanz P einen Effekt auf olfaktorische Neurone hat. Weitere Experimente müssen dementsprechend den *second messenger* sowie den Modulationsmechanismus zeigen.

Bisher wurden alle Versuche mit der *submerged* EOG-Technik durchgeführt. Diese Technik ist mit den bereits erwähnten Einschränkungen (ständige Perfusion des Epithels, alle Duftstoffe

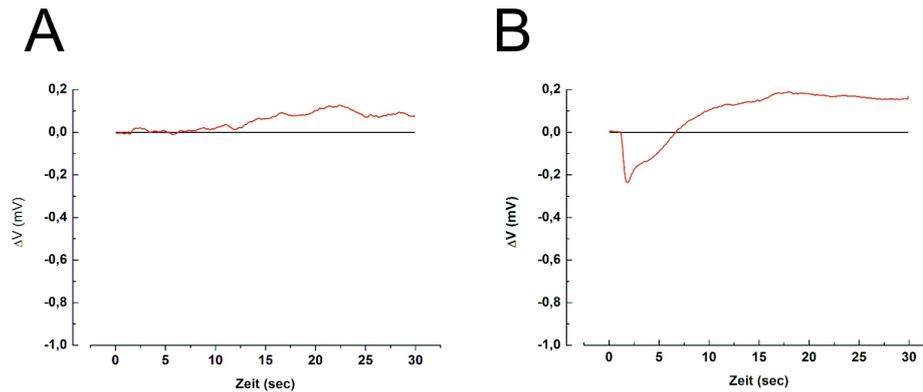


**Abbildung 8.8.1: Vergleich der Modulation olfaktorischer Antworten durch Substanz P und CGRP:** Die Abbildung zeigt den Vergleich der Wirkungen der trigeminalen Neuropeptide bei verschiedenen Applikationstechniken. A zeigt den Einfluss auf das Oberflächenpotential des OE bei Applikation über eine Applikationskapillare analog zu einer Duftstoffstimulation. CGRP zeigt einen Oberflächenpotentialverlauf ähnlich zu einem Duftstoff-EOG. Dies ist bei Substanz P nicht zu beobachten, hier kommt es zu einem leichten Anstieg des Oberflächenpotentials. B zeigt den Vergleich mehrerer Perfusionsexperimente anhand der normalisierten EOG-Amplitude. Die Datenpunkte stellen die normalisierte EOG-Amplitude dar. Die Konzentration von Substanz P oder CGRP betrug  $1 \mu\text{M}$ , das OE wurde für 2min präinkubiert. Bei der Abweichung in y handelt es sich um den SEM.  $n_{\text{Substanz P}}=6$ ,  $n_{\text{CGRP}}=3$ . Blau: Stimulus, Schwarz: Substanz P, Rot: CGRP

werden in wässriger Lösung appliziert) verbunden und stellt für landlebende Tiere wie *Rattus norvegicus* nur einen bedingt physiologischen Zustand dar. Landlebende Tiere inhalieren Duftstoffe im gasförmigen Zustand, diese lösen sich dann in der Nasenhöhle in der Mukus-Schicht. Um die zuvor entdeckten Zusammenhänge in einem physiologischen Kontext zu überprüfen, wurde nun mit der *air-phase* EOG-Technik gearbeitet.

## 8.9 Funktionelle Charakterisierung von Duftstoffen mit unterschiedlichen trigeminalen Potenzen mittels der Elektrotrigeminogramm-Technik

Um die Wirkung von Duftstoffen auf polymodale Nozizeptoren im Gewebeverbund zu überprüfen, wurden vom septalen respiratorischen Epithel (RE) der Ratte negative mukosale Potentiale (NMP, im folgenden wird stellvertretend ETG verwendet) abgeleitet. Diese von Thürauf et al. etablierte Methode erlaubt es, die transepithelialen Potentiale von chemosensitiven Zellen und Nervenfasern abzuleiten (Thürauf et al. [1993]). Auf dem RE wurden Phenylethylalkohol (PEA) und Allylisothiocyanat (AIC) getestet, die jeweils sehr unterschiedliche psychophysische Eigenschaften besitzen. PEA besitzt einen angenehmen blumigen Geruch (Rose), und gilt als vorwiegend olfaktorischer Stimulus. AIC hat einen scharfen, stechenden Geruch (ähnlich zu



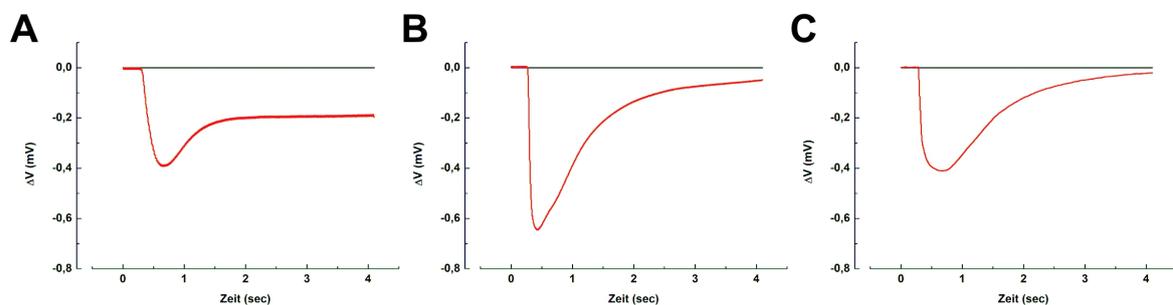
**Abbildung 8.9.1: ETG Ableitungen von zwei verschiedenen Duftstoffen:** Die Abbildung zeigt elektrische Ableitungen von zwei verschiedenen Duftstoffen auf dem respiratorischen Epithel der Ratte. Die Duftstoffe wurden gasförmig aufgetragen. Es ist der Nettostrom aufgetragen. A: Schwarz: Kontrolle, Rot: PEA. B: Schwarz: Kontrolle, Rot: AIC. Die Konzentration der Stammlösungen betrug  $100\mu\text{M}$ .

Meerettich), zusätzlich erzeugt es einen brennenden Eindruck. Es wird stellvertretend für die Fraktion an Duftstoffen verwendet, die hauptsächlich das trigeminale System stimulieren (Doty et al. [1978], Silver and Moulton [1982]). Abb. 8.9.1 zeigt einzelne Aufnahmen von Stimulierungen des OE mit den verschiedenen Duftstoffen. Abb. 8.9.1 A zeigt eine Stimulierung mit PEA. Im Vergleich zur Negativkontrolle unterscheidet sich die Kurve der Stimulation mit PEA bis 6 Sekunden nach Messungsbeginn kaum. Danach steigt das Oberflächenpotential um ca. 0,1 mV. Abb. 8.9.1 B zeigt die Aufnahme der Stimulation mit AIC. Hier fällt die Kurve steil ab, bis sie den Wert von -0,45mV erreicht hat. Danach steigt die Kurve, bis sie den Wert des Ausgangspotentials erreicht hat. Im Vergleich zu Negativkontrolle steigt die Kurve weiter an, bis sie einen Wert erreicht hat, der bei ca. +0,1mV über dem Potential der Kontrollkurve liegt. Die Charakterisierung der Duftstoffe ergab, dass diese sich gemäß ihrer beschriebenen psychophysischen Eigenschaften verhalten. PEA erzeugt kein charakteristisches Signal. AIC erzeugt ein charakteristisches, trigeminales Signal. Für die Fragestellung ob diese zwei Duftstoffe dazu geeignet sind, polymodale nozizeptive Fasern zu aktivieren, ergibt sich folgendes Bild:

Die Stimulation mit PEA scheint so gut wie keine Wirkung auf polymodale nozizeptive Fasern zu haben, die Stimulation mit AIC zeigt eine sehr charakteristische Antwort des Epithels. Grundsätzlich sind die beiden Duftstoffe dafür geeignet, Untersuchungen an polymodalen nozizeptiven Nervenfasern durchzuführen.

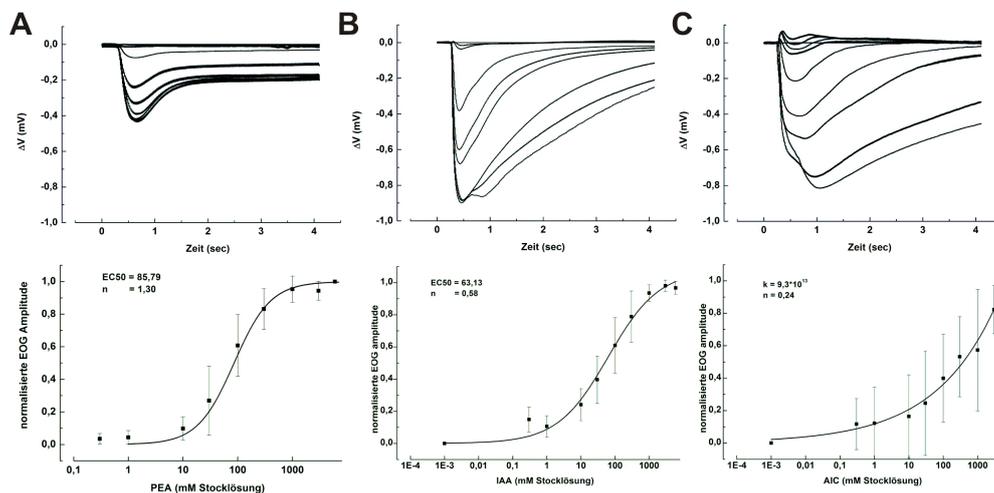
## 8.10 Funktionelle Charakterisierung von Duftstoffen mit unterschiedlichen trigeminalen Potenzen mittels der Elektroolfaktogramm-Technik

Es gibt nur wenige flüchtige Stoffe, die exklusiv die olfaktorischen Neurone stimulieren. Um zu eruieren, welchen Einfluss trigeminale Modulation der olfaktorischen Rezeption unter physiologischen Bedingungen hat, wurden die im Abschnitt 8.9 charakterisierten verschiedenen Duftstoffe mittels der EOG-Technik auf funktionelle Unterschiede geprüft. Laut ihrer beschriebenen psychophysischen Eigenschaften und der gezeigten elektrischen Ableitungen auf dem respiratorischen Epithel unterscheiden sich die verwendeten Duftstoffe in ihrer trigeminalen Potenz und können somit in drei Reizklassen kategorisiert werden: keine bis leichte trigeminale Stimulation (PEA) und starke trigeminale Stimulation (AIC). Zusätzlich wurde ein weiterer Duftstoff für diese Experimente verwendet, der laut seiner psychophysischen Eigenschaften in höheren Konzentrationen einen trigeminalen Stimulus darstellt: Isoamylacetat (IAA). Er wird stellvertretend für die Fraktion dieser Duftstoffe verwendet (Doty et al. [1978]). Beim sog. *air-phase*-EOG werden die Duftstoffe gasförmig aufgetragen. Hierbei wird ein kleines Filterpapier in einem „*Odor-Tube*“ mit einer Stocklösung des jeweiligen Duftstoffs getränkt. Die Gasphase im „*Odor-Tube*“ wird dann in einen Referenzluftstrom injiziert. Einfluss auf die Duftstoffmolekülnzahl in der Gasphase des Röhrchens haben Umgebungstemperatur, Umgebungsdruck und die Konzentration der Duftstofflösung (vgl. auch 7.2.14).



**Abbildung 8.10.1: EOG Ableitungen von drei verschiedenen Duftstoffen:** Die Abbildung zeigt elektrische Ableitungen von drei verschiedenen Duftstoffen auf dem olfaktorischen Epithel der Ratte. Alle Duftstoffe wurden gasförmig appliziert, die Konzentrationen der Stocklösungen betragen 300 mM. Die schwarze Kurve zeigt jeweils die Kontrolle. A: PEA, B: IAA, C: AIC.

Abb. 8.10.1 zeigt repräsentative EOG-Kurven für die drei verwendeten Duftstoffe. Die Stocklösungen der Duftstoffe im Duftstoffröhrchen hatten alle die gleiche Konzentration. Abb. 8.10.1 A zeigt die PEA-Kurve. Auffallend hier ist, dass das Oberflächenpotential innerhalb des gemessenen Zeitfensters nicht mehr seinen Ausgangswert erreicht. PEA zeigt eine sehr langsame Wiederherstellung des Ausgangspotentials. Abb. 8.10.1 B zeigt die IAA-Kurve. Das IAA-Signal zeigt die höchste Maximal-Amplitude (bei Stimulation mit reinem Duftstoff) der gemessenen Duftstoffe, die Steigung der Gerade zum niedrigsten Amplitudenpunkt ist sehr hoch. Im Gegensatz zum PEA-Signal ist die Wiederherstellung des Ausgangspotentials innerhalb des gemessenen Zeitfensters schneller, da die Abklinggeschwindigkeit höher ist. Abb. 8.10.1 C zeigt die AIC-Kurve. Das AIC-Signal zeigt das größte Plateau der drei gemessenen Signale. Die Höhe der Amplitude ist ähnlich zum PEA Signal. Auch hier ist die Abklinggeschwindigkeit höher als bei PEA. Zusammengefasst zeigt jeder der drei Duftstoffe charakteristische Signale, deren Amplitudenhöhe mit der nominalen Konzentration der verwendeten Duftstofflösung zeigt (siehe auch Abschnitt 7.2.14 sowie Abb. 8.10.2 A-C).



**Abbildung 8.10.2: Dosis-Wirkungs-Kurven von drei verschiedenen Duftstoffen mit verschiedenen trigeminalen Potenzen:** A-C: Dosis-Wirkungs-EOG-Aufzeichnungen von 3 verschiedenen Duftstoffen. Die Konzentrationen der Stocklösungen reichten von  $300\mu\text{M}$ -purer Duftstoff, die Konzentration wurde in logarithmischen Schritten erhöht (1,3,10,30,100 usw.). A: PEA, B: IAA, C:AIC D-F: Statistische Auswertung mehrerer Dosis-Wirkungs-Aufzeichnungen mittels der Hill-Gleichung. Auszuwertender Parameter war die Amplitudenhöhe. D: PEA, E: IAA, F: AIC.

Um weitere funktionelle Unterschiede bei der Rezeption dieser Duftstoffe zu erforschen wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Die Duftstoffe wurden hierbei in ansteigender Konzentration auf das OE aufgetragen. Auswertungskriterium war die Höhe der Amplituden. Abb. 8.10.2 zeigt sowohl die Einzelkurven als auch die Auswertung mittels der Hill-Gleichung der drei Dosis-Wirkungskurven. Auffallend hier ist, dass alle Duftstoffe mit einer trigeminalen Potenz ein ver-

mindertes bzw nicht-existentes Sättigungsverhalten zeigen. PEA zeigt eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Kurve mit einem stark sigmoiden Verlauf. Der Hill-Quotient liegt bei 1,30, der EC50 beträgt 85,79 mM (Konzentration der Stocklösung), (n = 7 Messreihen, y-Fehler = Standardabweichung). Die Dosis-Wirkungskurve von IAA zeigt ein vermindertes Sättigungsverhalten, die Kurve flacht zu den höheren Konzentrationen hin ab. Der Hill-Quotient liegt bei 0,58, der EC50 beträgt 63,13 mM (Konzentration der Stocklösung), (n = 5 Messreihen, y-Fehler = Standardabweichung).

Die Dosis-Wirkungskurve von AIC zeigt kein Sättigungsverhalten, die Kurve verbleibt im exponentiellen Bereich, der Hill Quotient liegt bei 0,24.

Zusätzlich lässt sich bei der Betrachtung der Einzel-EOGs (Abb. 8.10.2 A-C, obere Reihe) feststellen, dass zwei von drei Duftstoffen in höheren Konzentrationen nicht mehr die typische EOG-Form zeigen. Die EOG-Kurven von PEA zeigen immer den gleichen Verlauf, wobei die Amplitudenhöhe mit der nominalen Konzentration der verwendeten Duftstofflösungen zunimmt. IAA zeigt in den höchsten Konzentrationen z.B eine Doppelspitze und eine Modifikation der Abklinggeschwindigkeit. AIC zeigt als vorrangig trigeminaler Stimulus bereits in niedrigen Konzentrationen EOG-Kurven, die deutlich positive Komponenten zeigen, welche für EOG-Kurven ungewöhnlich sind. Zudem zeigt sich bei allen Kurven ein mehrphasischer Verlauf. Bei höheren Konzentrationen sind zusätzlich verschiedene Geschwindigkeiten bei der Wiederherstellung des Ausgangspotentials zu erkennen.

Bei der Charakterisierung der drei Duftstoffe mittels der EOG-Technik ließen sich verschiedene Schlüsse ziehen:

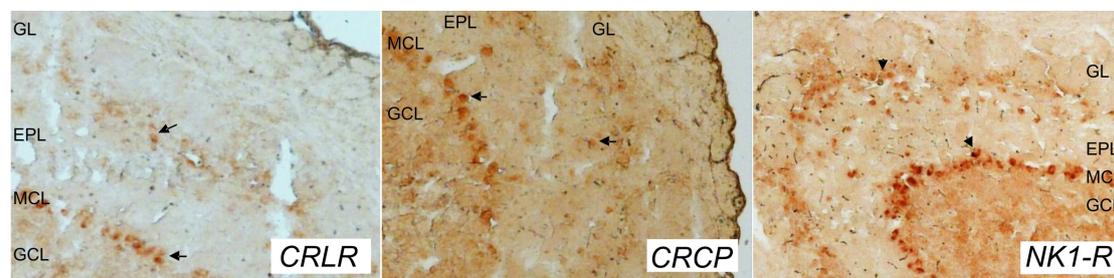
1. Alle drei Chemikalien werden durch olfaktorische Neurone detektiert.
2. Die Reizstärke der beiden Duftstoffe, die auch das trigeminale System aktivieren, scheint größer zu sein, wenn man die Amplitudenhöhe betrachtet.
3. Da der Hill-Quotient der beiden Duftstoffe mit stärkerer trigeminaler Potenz jeweils unter 1 liegt, kann man davon ausgehen, dass sich mehrere Prozesse überlagern (z.B. olfaktorische und trigeminale).
4. Die Sättigung der Duftstoffantwort mit trigeminaler Potenz ist jeweils vermindert.
5. Sowohl die Form der EOGs von Duftstoffen mit trigeminaler Potenz als auch das Ausbleiben der Saturierung deuten auf eine trigeminale Modulation hin. Da mittels der EOG-Technik die Summenrezeptorpotentiale von ORNs gemessen werden, muss diese Modulation ORN-basiert sein.
6. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß eine trigeminale Modulierung der Duft-

stoffrezeption bereits auf der Ebene der ORNs statt findet.

Grundsätzlich scheint die Charakterisierung von Duftstoffen mittels Dosis-Wirkungs-Kurven im *air-phase* EOG dafür geeignet zu sein, die trigeminale Potenz von Duftstoffen zu charakterisieren und den Anteil der trigeminalen Modulation auf das Oberflächenpotential zu zeigen.

## 8.11 Zelltypspezifische Expression trigeminaler Rezeptormoleküle im *Bulbus olfactorius*

Da nicht nur das OE durch den Trigeminalnerv innerviert wird, sondern auch der OB, besteht die Möglichkeit, dass eine trigeminale Modulation auch auf Ebene des Bulbus stattfinden kann. Für solch eine Modulation kommen verschiedene Zelltypen in Frage. Im Normalfall geschieht die olfaktorische Reizweiterleitung vom Glomerulus über die Mitralzellen zum piriformen Cortex. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass verschiedene Zelltypen in der periglomerulären Schicht Anteil an der Reizweiterleitung auf der Ebene des Glomerulus teilhaben. So kann die Aktivität eines Glomerulus über GABAerge periglomeruläre Zellen gehemmt werden, während glutamaterge externe Büschelzellen exzitatorisch auf die Aktivität wirken (Gire and Schoppa [2009]). Um zu ergründen, welche Zelltypen für eine Modulation durch trigeminale Neuropeptide in Frage kommen, wurden Gewebeschnitte mit *antisense*- oder *sense*-Sonden gegen die mRNA trigeminaler Rezeptormoleküle inkubiert, auf denen koronale Schnitte des olfaktorischen Bulbus vorhanden waren. Auf den mit den *antisense*-Sonden inkubierten Schnitten, konnten zelluläre Signale in verschiedenen funktionellen Schichten des OB detektiert werden.



**Abbildung 8.11.1: In-situ Hybridisierungen mit Sonden gegen trigeminale Rezeptormoleküle im OB** Die Abbildungen zeigen Ausschnitte aus koronalen Gewebeschnitten des OB. Das Gewebe wurde mit *antisense*-Sonden gegen trigeminale Rezeptormoleküle inkubiert. Auf den Gewebeschnitten, die mit *sense*-Sonden inkubiert wurde, zeigte sich kein Signal (nicht gezeigt). Die stärksten Signale zeigen sich in der Mitralzellschicht sowie periglomerulär (Pfeile). A: CRLR, B CRCP, C: NK1 GL: glomeruläre Schicht, EPL: externe plexiforme Schicht, MCL Mitralzellschicht, GCL: granuläre Zellschicht. Die interne plexiforme Schicht ist auf den Mikrografien nicht markiert.

Auf allen Schnitten sind Signale in der Mitralzellschicht zu erkennen, sowie Signale aus periglomerulären Schichten (Abb. 8.11.1). Bei den Zellen aus der periglomerulären Schicht könnte es

sich, aufgrund der Lage der Zellkörper im Bulbus, um externe Büschelzellen oder periglomeruläre Zellen handeln. Prinzipiell bedeutet dieses Ergebnis, dass auch im Bulbus Zellen vorhanden sind, die für die trigeminale Modulation empfänglich sind.

## 9 Diskussion

### 9.1 Die trigeminale Innervation des OEs

Einige der ersten Erkenntnisse über die trigeminale Innervation der Nasenhöhle stammen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen und immunhistochemischen Färbungen des respiratorischen Epithels (Finger et al. [1990]). Das respiratorische Epithel zeigt eine dichte Innervation von Stellen, die dem Luftstrom in der Nasenhöhle besonders exponiert sind, wie z.B. die ventromediale Seite des Nasoturbinats. Weiterhin ist die Innervation anterior stärker ausgeprägt als posterior. Im Vergleich zum RE wurde die Innervation des OE als weniger stark ausgeprägt beschrieben (Lee et al. [1995]). Die Innervation des OE besteht dabei aus einem in der *Lamina propria* liegenden Plexus, aus dem Nervenfasern in Richtung der apikalen Schicht des OE projizieren. Die den Nervenfasern zugehörigen Neurone liegen im ophthalmischen Bereich des Trigeminalganglions, sie haben also eine rein sensorische Funktion (Finger and Boettger [1993]). Eine genaue Beschreibung der Dichte der trigeminalen Innervierung ging aus diesen Arbeiten nicht hervor. Ausgehend von diesen Beobachtungen wurden zusätzlich Z-Stapel von *wholemout* Präparaten sowie koronalen Schnitten erstellt, um mittels 3D-Rekonstruktion zu einer quantitativen Aussage zugelingen. Weiterhin wurden Z-Stapel von *wholemout* Präparaten septalen OEs hergestellt, um die laterale Innervation der trigeminalen Fasern im OE zu visualisieren. Hier konnte eine starke laterale Ausbreitung der trigeminalen Nervenfasern auf allen Ebenen des Gewebes beobachtet werden, die in den koronalen Schnitten in dieser Art nicht beobachtet werden konnte. Da bisher kein Unterschied in der trigeminalen Innervation zwischen septalem und auf den olfaktorischen Turbinaten aufliegendem OE beschrieben wurde, muss angenommen werden, dass diese laterale Ausbreitung auch im OE der olfaktorischen Turbinatate vorhanden ist. Dies würde bedeuten, dass die Innervation des OEs dichter ist, als es die Ansicht im Koronalschnitt vermuten lässt. Die Berechnung der trigeminalen Innervationsdichte anhand des Z-Stapels in Abb. 8.1.1 lässt zu dem Schluss kommen, dass in der mikroskopierten Region der olfaktorischen Turbinatate bei einer Gleichverteilung der peptidergen Nervenfasern ca. 548 apikal projizierende Nervenfasern pro  $\text{mm}^3$  OE bei einem durchschnittlichen Abstand von  $100\mu\text{m}$  (Faser zu Faser) zu finden sind.

## 9.2 Ultrastruktur der trigeminalen Innervation

Bisher wurde beschrieben, dass alle peptidergen Fasern unterhalb der *tight junction*-Grenze, die zwischen olfaktorischen Neuronen und Stützzellen besteht, enden. Wie aber können diese Nervenfasern dann hydrophile nozizeptive Reize detektieren? Hydrophile Substanzen überwinden im Normalfall die *tight junction*-Grenze nicht (Schaefer et al. [2002]). Diese Frage wurde durch die Entdeckung einer neuen Zellart im respiratorischen Epithel, den sog. *solitary chemosensory cells* (SCCs), neu beleuchtet. Diese Zellen bilden synaptische Verbindungen mit den trigeminalen peptidergen Nervenfasern und exprimieren verschiedene Proteine der Bitterstoffrezeption wie z.B. TRPM5 und Gustducin Finger et al. [2003], Gulbransen et al. [2008], Hansen and Finger [2008], Lin et al. [2008], Tizzano et al. [2010]. So wurde postuliert, dass die freien Nervenendigungen in RE und OE hauptsächlich lipophile Irritantien detektieren, die die *tight junction*-Grenze überwinden können. Hydrophile Irritantien werden über die SCCs detektiert und einen ungeklärten Mechanismus an den Trigeminalnerv übertragen (Silver and Finger [2009]). Somit liegt im respiratorischen Epithel zusätzlich zur Detektion über freie Nervenfasern ein parazellulärer Detektionsmechanismus vor. Die immunhistochemischen Daten dieser Arbeit zeigen hierzu eine weitere Beobachtung in Bezug auf einen möglichen Detektionsmechanismus im OE. So wurden im Verlauf dieser Arbeit immer wieder einzelne Nervenfasern beobachtet, die in der mikrovillären Schicht endeten oder diese überwandern (Abb. 8.1.2). Diese Nervenfasern sind im Vergleich zu denen, die die mikrovilläre Schicht nicht überwinden, in der Unterzahl. So wäre aber zusätzlich zu den freien Nervenfasern im OE und den SCCs im RE auch die Möglichkeit vorhanden, dass hydrophile Reizstoffe auch über freie Nervenfasern im olfaktorischen Lumen detektiert werden können.

## 9.3 Peptiderge und nicht-peptiderge Innervation des OEs

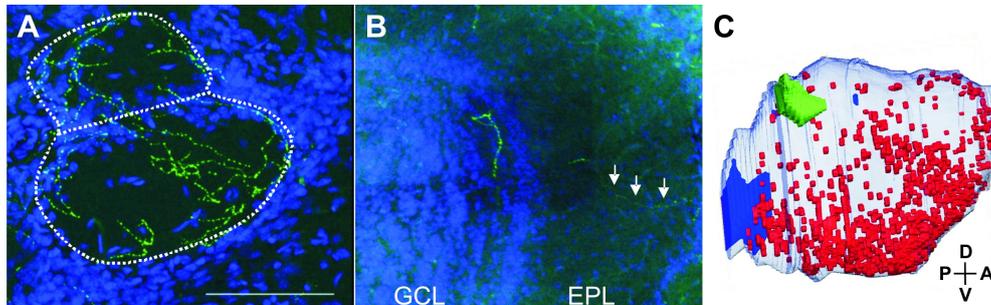
Trigeminalne Neurone sowie die dazugehörigen Neurite lassen sich grundsätzlich in peptiderg und nicht-peptiderg unterteilen. Beide Subpopulationen exprimieren exklusive Marker (peptiderg: Substanz P und GCRP, nicht peptiderg: MRG-Rezeptoren, c-Ret und P2X<sub>3</sub>), zusätzlich lässt sich die nicht-peptiderge Subpopulation über das Pflanzenlektin Isolektin B4 anfärben. Laut Literatur innervieren nicht-peptiderge C-Fasern von spinalen Neuronen vorrangig die Haut (insbesondere die Epidermis). Peptiderge C-Fasern innervieren die tieferen Schichten der Haut sowie die Viszera (Todd [2010]). Es stellt sich also die Frage, ob im OE eine nicht-peptiderge Innervation vorhanden ist. Sollte dies der Fall sein, ist von besonderem Interesse, in welchem Verhältnis die nicht-peptiderge zur peptidergen Innervation steht. Im Verlauf dieser Arbeit bestä-

tigte sich das beschriebene Bild, da nur die peptiderge Fraktion der nozizeptiven Nervenfasern im OE visualisiert werden konnte. Experimente, wie z.B. Färbungen gegen verschiedene etablierte Markerproteine (P2X<sub>3</sub>) oder mit Isolektin B4 gegen die nicht-peptiderge Fraktion der nozizeptiven Nervenfasern, führten zu keinen gefärbten Strukturen, die die Morphologie von Nervenfasern zeigten. Auch die mikroskopische Auswertung des OEs eines transgenen Mausstamms, der unter dem Opioid Rezeptor  $\delta$ -Promotor ein mit GFP markiertes funktionales Rezeptorprotein exprimiert, welches exklusiv in nicht-peptidergen Neuronen exprimiert wird, ließ keine Strukturen erkennen, die die Morphologie von Nervenfasern aufwiesen. Eine weitere Möglichkeit zur Visualisierung trigeminaler Innervation stellen die Ionenkanäle der TRP-Familie dar. Nozizeptive Neurone exprimieren verschiedene Kanäle der TRP-Familie, die Expressionsmuster der verschiedenen Klassen zeigen dabei exklusive Unterschiede. So wird z.B. TRPM8 exklusiv von nicht-peptidergen Neuronen exprimiert (Basbaum et al. [2009]). Interessant ist in diesem Kontext eine transgene Mauslinie, die unter dem TRPM8-Promotor GFP exprimiert. Mit dieser Mauslinie wurden bereits Aufnahmen von nicht-peptidergen Nervenfasern aus der Cornea veröffentlicht, einem Gewebe, das stark durch den Trigeminalnerv innerviert wird (Carr et al. [2009]). Die bisherigen Ergebnisse deuten drauf hin, dass nicht-peptiderge Nervenfasern im OE nicht vorhanden sind. Zusätzlich sezerniert dieser Fasertyp keine Neuropeptide, was eine Modulation von ORNs oder anderen Zelltypen durch die nicht-peptiderge Nervenfasern unwahrscheinlich macht. Die trigeminale Modulation ist also wahrscheinlich auf den Axonreflexen peptiderger Nervenfasern basiert.

## **9.4 Die trigeminale Innervation des Bulbus und die Kollateralenbildung trigeminaler Neurone**

Schaefer et al. beschrieben eine Besonderheit der trigeminalen Innervation des olfaktorischen Systems. Durch *Tracing*-Experimente mit verschiedenen retrograden Farbstoffen, welche in das OE und den OB injiziert wurden, konnten Doppelfärbungen von trigeminalen Neuronen gezeigt werden. Das bedeutet, dass trigeminale Neurite sog. Kollateralen bilden, die in verschiedene Strukturen projizieren. Aufgrund dieser Kollateralenbildung kann ein einzelnes trigeminales Neuron nicht nur das OE, sondern auch gleichzeitig den OB innervieren (Schaefer et al. [2002]). Da es sich bei dem OB im Gegensatz zum OE um keine der Umwelt exponierte Struktur handelt, stellt sich die Frage nach der Funktion einer rein sensorischen Innervation. Über die trigeminale Innervation des olfaktorischen Bulbus war bis jetzt nur bekannt, dass sowohl die olfaktorische Nervenschicht als auch die glomeruläre Schicht innerviert sind (Finger and Boettger [1993]). Daten, die durch die Tandemzusammenarbeit im Rahmen des SPP 1392 (*Integrative analysis*

of olfaction) mit der AG Müller am FZ Jülich gewonnen wurden, lieferten ein differenzierteres Bild. Die immunhistochemischen Färbungen zeigen nicht nur die Innervation der glomerulären Schicht (Abb. 9.4.1 A), sondern auch die Innervation der tieferen Schichten des OB. Einzelne Fasern traversieren die externe plexiforme Schicht bis hin zur Körnerzellschicht (Abb. 9.4.1 B Pfeile). Somit sind die für die olfaktorische Reizverarbeitung wichtigsten Schichten trigeminal innerviert.



**Abbildung 9.4.1: Trigeminal peptiderge Innervation des *Bulbus olfactorius*:** Die Abbildung zeigt Ansichten aus verschiedenen funktionalen Schichten des *Bulbus olfactorius*. Das Gewebe wurde mit einem Antikörper gegen CGRP gefärbt. A: Die Abbildung zeigt 2 Glomeruli (die Grenzen des Glomeruli-Paars werden durch die gestrichelte Linie angezeigt). Größenbalken entspricht 50 $\mu$ m. Grün: CGRP, Blau: DAPI (Kernfärbung). B: Die Abbildung zeigt verschiedene funktionelle Schichten des Bulbus, die Grenzen der externen plexiformen Schicht (EPL) sind durch gestrichelte Linien markiert. Grün: CGRP, Blau: DAPI (Kernfärbung) C: 3D Rekonstruktion der Verteilung trigeminal innervierten Glomeruli. Die Abbildung zeigt die Sagittalansicht, trigeminal innervierte Glomeruli sind rot dargestellt. Der akzessorische Bulbus ist grün dargestellt. In der rechten unteren Ecke ist ein Orientierungskreuz zu sehen (D: dorsal, V: ventral, A: anterior, P: posterior) Die meisten trigeminal innervierten Glomeruli sind ventral zu finden. Die Bilder wurden freundlicherweise von Dipl.Biol.-Melanie Söchtig zur Verfügung gestellt.

Zusätzlich wurde die Lokalisation der trigeminal innervierten Glomeruli untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die ventralen Glomeruli stärker durch den *Nervus trigeminus* innerviert werden. Dies ist insofern von Bedeutung, da Glomeruli in verschiedenen Zonen des Bulbus mit unterschiedlichen weiterführenden Prozessen assoziiert sind. Frühere Arbeiten zeigten eine räumlich spezifische Verteilung von Glomeruli der verschiedenen OR-Klassen im Bulbus. Glomeruli von OR-Rezeptoren der Klasse I sind in der sog.  $D_I$ -Zone zu finden. Glomeruli von OR-Rezeptoren der Klasse II bilden sowohl die  $D_{II}$ -Zone als auch die V-Zone (Mori et al. [1999, 2005, 2006], Kobayakawa et al. [2007], Cho et al. [2011]). Durch die Erzeugung verschiedener transgener Maus-Linien, die es erlaubten, verschiedene Zonen des olfaktorischen Bulbus durch selektive Expression des Diphtheria-Toxins zu eliminieren, konnte gezeigt werden, dass die D- und V-Zonen verschiedene Aufgaben zu haben scheinen. So vermitteln die D-Zonen angeborene Reaktionen wie Aversion und Präferenz (z.B. Vermeidungsverhalten gegenüber dem Geruch von Raubtieren), wohingegen die V-Zone olfaktorisches Lernen zur Aufgabe hat (wie die Erinnerung an bestimmte Duftstoffe). Im Kontext dieser Arbeit würde dies bedeuten, dass trigeminale

Duftstoffe oder Reizstoffe primär diese Zone modulieren und somit z.B auch die damit verbundenen Prozesse beeinflussen können und weniger stark mit dem durch die D-Zonen ausgelösten Verhalten assoziiert sind.

## 9.5 Lokalisation der Rezeptoren für trigeminale Neuropeptide

Der CGRP-Rezeptor-Komplex besteht aus 3 Untereinheiten: CRLR, CRCP und RAMP-1. Der Rezeptorkomplex gehört zur Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, er vermittelt die intrazelluläre Produktion von cAMP über die ACIII (Cooper et al. [1995], Born et al. [2002], Conner et al. [2002], Evans et al. [2000], Prado et al. [2002]). Die molekularbiologischen und immunhistochemischen Daten dieser Arbeit zeigen, daß alle drei Komponenten des Rezeptorkomplex von olfaktorischen Rezeptorneuronen exprimiert werden. Ihre mRNA konnte sowohl in cDNA Präparationen des OE detektiert werden und die exprimierende Zellpopulation mittels *in situ*-Hybridisierungen verifiziert werden. Subzellulär konnte CRLR in der apikalen Schicht des OE lokalisiert werden, auf der Ebene der chemosensorischen Zilien. Wenn zusätzlich zur immunhistochemischen Färbung eine Antigendemaskierung durchgeführt wurde, konnte das CRLR-Signal auch in Dendriten, Somata und Axon von ORNs festgestellt werden. CRCP konnte auf allen Ebenen der Neurone detektiert werden: apikal, in Dendriten und Somata. Eine vorhergehende Antigendemaskierung änderte nichts am Lokalisationsmuster. Für RAMP 1 stand kein Antikörper zur Verfügung, es konnte auf der mRNA-Ebene über PCR in cDNA-Präparationen FACS-aufgereinigter Neurone detektiert werden. 2 der 3 Komponenten des CGRP-Rezeptorkomplexes (CRPCRLR) konnten auf den subzellulären Ebenen der chemosensorischen Zilien, der Dendriten sowie der Somata festgestellt werden.

Die beobachteten immunhistochemischen Signale des Substanz P Rezeptors deuten auf eine Lokalisation auf Ebene der Mikrovilli, aber auch auf der Ebene der chemosensorischen Zilien. Für eine Lokalisation auf Ebene der Mikrovilli gibt einen weiteren Hinweis. So sind im OE mikrovilläre IP3R3-Zellen zu finden, deren Empfänglichkeit für Substanz P über  $Ca^{2+}$ -Imaging-Experimente gezeigt wurde (Hegg et al. [2010]). Gleiches gilt für ORNs: Bouvet et al. konnten durch elektrophysiologische *multi-unit*-Ableitungen, die die AP-Muster mehrerer Neurone zeigten, an ORNs von *Rana ridibunda* zeigen, dass diese sowohl exzitatorisch oder inhibierend beeinflusst werden können. D.h. die AP-Frequenz wurde entweder gemindert oder erhöht. (Bouvet et al. [1988, 1987])

Aufgrund der Lokalisation auf allen Ebenen der ORNs ist es wahrscheinlich, dass eine Modulation durch den *Nervus trigeminus* auch auf mehreren Ebenen des Neurons stattfindet. Durch die Projektion der trigeminalen Fasern über die gesamte Tiefe des OEs und der Projektion in

das olfaktorische Lumen können alle trigeminal sensitiven Kompartimente der ORNs erreicht werden.

Im OB zeigte sich, dass verschiedene Zelltypen essentielle Komponenten des CGRP-Rezeptorkomplex exprimieren, was über *in situ*-Hybridisierungen gezeigt werden konnte. Aufgrund der Lage der Zellkörper im Bulbus scheinen Mitralzellen sowie periglomerulär liegende Zellen die mRNA des CGRP-Rezeptorkomplex exprimieren. Dies korreliert auch mit der trigeminalen Innervation des OB, da sich die stärkste Innervation in der glomerulären Schicht findet, aber auch die tieferen Schichten des Bulbus innerviert werden (siehe auch Abb. 9.4.1). Der Substanz P Rezeptor NK1 zeigt ein sehr ähnliches Expressionsmuster im OB.

Die Identität dieser trigeminal-sensitiven, periglomerulären Zellen im OB ist noch nicht geklärt. Aufgrund der Lage der Zellkörper im olfaktorischen Bulbus könnte sich hierbei um kurze Axonzellen, externe Büschelzellen oder periglomeruläre Zellen handeln. Dies ist insofern interessant, da vor kurzem veröffentlichte Ergebnisse einen „Mikro-Schaltkreis“ in der glomerulären Schicht zeigen, an dem zwei der drei möglichen Zelltypen (externe Büschelzellen und periglomeruläre Zellen) Anteil haben. Hierbei wurde mittels elektrophysiologischer Messungen und mit Imaging-Experimenten gezeigt, dass die externen Büschelzellen stark an der Reizweiterleitung von den ORNs zu den Mitralzellen beteiligt sind. Die Funktion der periglomerulären Zellen in diesem Schaltkreis war eine inhibitorische. Die vermutete Funktion dieses Schaltkreises ist die Filterung schwacher Duftstoff-Signale aufgrund der niedrigeren Aktivierungsschwelle der periglomerulären Zellen. Ferner wurde bereits durch Olpe et al. gezeigt, dass Neuronen des olfaktorischen Bulbus für Substanz P empfänglich sind. In dieser Publikation wurden die AP-Muster von periglomerulären Neuronen aufgezeichnet, die dann über iontophoretische Kapillaren oder Perfusion mit Substanz P stimuliert wurden. Die Stimulation mit Substanz P führte zu einem depressiven Effekt in den AP-Mustern. Olpe et al. vermuteten, dass dieser depressive Effekt auf der Sezernierung von GABA beruhte, da der Effekt durch die Perfusion von Bicucullin und Picrotoxin eliminiert wurde. Da Gire et al. GABAerge periglomeruläre Zellen als inhibitorische Quelle in dem von ihnen beschriebenen Mikroschaltkreis zeigten, ist es hochwahrscheinlich, dass GABAerge periglomeruläre Zellen das Ziel der trigeminalen Modulation sind und über Substanz P aktiviert werden können (Olpe et al. [1987], Gire and Schoppa [2008, 2009]). Abgesehen von den modulatorischen Effekten im OE stellt dies eine Möglichkeit der trigeminalen Modulation im OB dar.

## 9.6 Wirkung der Neuropeptide auf ORNs

Zur Zeit dieser Arbeit lagen bereits erste Ergebnisse über die Wirkung von Substanz P im OE vor. Diese wurden allerdings nicht im Epithel von *Rattus norvegicus* sondern von *Rana ridibunda*, einer Amphibie, durchgeführt. Für CGRP lagen z.Zt. dieser Arbeit keine dementsprechenden Daten vor. Um das olfaktorische Epithel in einem möglichst physiologischen Zustand zu erhalten, wurde die *submerged* EOG-Technik gewählt, da die immunhistochemischen Ergebnisse auf eine apikale Lokalisierung der trigeminalen Rezeptoren deuteten. Zwar ist die konstante Perfusion mit oxygenierter Ringer-Lösung eine Einschränkung gegenüber dem physiologischen Zustand, dennoch ist dies eine der wenigen Techniken, die die Applikation nicht-flüchtiger Stoffe auf das intakte OE erlaubt. Weiterhin ist es mit dieser Technik auch möglich, Blockversuche durchzuführen (Chen et al. [2000], Nickell et al. [2006, 2007]).

Es wurden zwei Varianten gewählt, um die Wirkung der Peptide auf ORNs zu testen: entweder direkt auf das OE, um die Wirkung auf ORNs zu testen. Oder über die Perfusion, um die Wirkung auf die olfaktorische Rezeption zu testen. Hier wurde die Wirkung der Neuropeptide anhand der Veränderung der EOG-Kurve eines rein olfaktorischen Duftstoffs (PEA) untersucht.

Die direkte Applikation von CGRP zeigte ein transientes Absinken des lokalen Oberflächenpotentials, ähnlich eines Duftstoff-EOGs. Dieses Signal war sensitiv gegenüber Nifluminsäure, einer Blocksubstanz von  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Chlorid-Kanälen, und MDL-12(330A), einem Inhibitor der Adenylatzyklase Typ III (Nickell et al. [2006], Chen et al. [2000]). Dies deutet darauf hin, dass die Stimulation mit CGRP die olfaktorische Transduktionskaskade aktiviert, was über die Produktion von cAMP geschehen muss. Die Analyse verschiedener Gewebeproben des OEs mittels cAMP-ELISA ergab, dass die cAMP-Konzentration in Gewebeproben, die mit CGRP inkubiert wurden, gegenüber der cAMP-Konzentration in nicht mit CGRP inkubierten Proben signifikant erhöht war. In Kontrast zu diesem rein exzitatorischem Ergebnis steht die Minderung von Duftstoffantworten (PEA), wenn CGRP simultan mit dem Duftstoff appliziert oder der Perfusion beigemischt wurde, d.h einmal erfolgte die Co-Stimulation simultan und einmal zeitversetzt (trigeminaler Stimulus vor olfaktorischem). Die zeitversetzte Gabe erfolgte aus zwei Gründen: einmal um eine konstante Konzentration von  $1\mu\text{M}$  CGRP auf dem OE zu gewährleisten, und um eine mögliche Aggregatbildung bzw chemische Wechselwirkungen von CGRP und PEA in der Stimuluspipette ausschließen zu können. In beiden Fällen konnte beobachtet werden, dass die durchschnittliche PEA-Amplitude im Beisein von CGRP verringert wird. Auf Ebene der chemosensorischen Zilien kann z. Zt. noch nicht ausgeschlossen, dass die beobachtete Modulation durch CGRP durch zusätzliche Modulationsmechanismen wie kompetitive Inhibition (CGRP und PEA konkurrieren um den selben Rezeptor) oder auch nicht-kompetitive Hemmung. Bei

der nicht-kompetitiven Inhibition handelt es sich um eine durch die Phosphoinositol-3-Kinase vermittelte Inhibition. Diese erklärt das Phänomen, dass Duftstoffmischungen kleinere EOG-Kurven hervorrufen als ihre einzelnen Bestandteile, die Mischung der Bestandteile also keine additive Wirkung zeigt. Es wird vermutet, dass eine Konformationsänderung des ORs die Basis dieser Inhibition ist (Rospars et al. [2008], Klasen et al. [2010], Millar and Newton [2010], Ukhonov et al. [2010, 2011], für eine Übersicht siehe Ache and Young [2005], Ache [2010]). Diese Effekte wurden jedoch bis jetzt noch nicht für Peptide gezeigt und sind in diesem Kontext noch nicht bewiesen.

Diese Inhibitionsmechanismen beruhen jedoch auf 2 Voraussetzungen. Erstens müsste CGRP, um diese inhibitorische Wirkung zu erzielen, an einen OR binden anstatt an seinen Rezeptor. Zweitens müssten in diesem Fall die chemosensorischen Zilien der alleinige Wirkort der trigeminalen Neuropeptide sein. Allerdings sind die Rezeptorproteine für CGRP auch im Soma sowie dem Dendriten lokalisiert, der Rezeptorkomplex ist also nicht exklusiv in den Zilien lokalisiert, somit sind diese als alleiniger Wirkort unwahrscheinlich. Ob CGRP an einen OR bindet, kann letztendlich nur über die funktionelle Charakterisierung der CGRP-Wirkung auf  $G_{\alphaOLF}$ -Knockout-Tieren geklärt werden. Sollte die exzitatorische Wirkung des CGRP bestehen bleiben, läge der Schluss nahe, dass CGRP in der apikalen Schicht des Gewebes an den CGRP-Rezeptorkomplex bindet, da dieser an  $G_{\alpha S}$ -gekoppelt ist und durch den Knockout nicht betroffen sein sollte (Belluscio et al. [1998], Prado et al. [2002]). Insgesamt gibt es einige Punkte, die für die Bindung von CGRP an seinen Rezeptor sprechen: einerseits die über Immunhistochemie gezeigte Lokalisation auf allen Ebenen der ORNs. Zusätzlich unterscheidet sich die Kinetik des CGRP Signals von dem eines Duftstoffsignals, es zeigte sowohl eine höhere Latenz als auch eine niedrigere Reaktionsgeschwindigkeit (das Oberflächenpotential fällt nicht in der gleichen Geschwindigkeit ab, siehe auch Abb. 8.4.2). Es ist auch zu verzeichnen, dass Substanz P, dessen Rezeptor auch apikal lokalisiert ist, bei Applikation über eine Kapillare kein Oberflächenpotential ähnlich eines Duftstoff-EOGs erzeugt, also nicht an einen Duftstoffrezeptor zu binden scheint und bei Applikation über Perfusion modulatorische Wirkung erzielt. Die Bindung von Peptide an einen Duftstoffrezeptor scheint also kein allgemeines Verhalten zu sein. Analog zu dem Verhalten von Substanz P gehe ich in Folge von einer Bindung des extraepithelial applizierten CGRP an seinen Rezeptor aus.

Durch die CGRP-stimulierte Produktion von cAMP im OE ergibt sich ein weiterer Erklärungsansatz für dessen inhibitorische Wirkung: cAMP aktiviert neben der olfaktorischen Transduktionkaskade auch inhibitorische Rückkopplungsmechanismen. So führt der  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle auch zur Bildung von  $Ca^{2+}/CaM$ -Komplexen. Diese können einerseits an die CNG-Kanäle binden und diese dadurch inhibieren. Andererseits regulieren sie die Aktivität der PDE2,

welche cAMP in AMP umsetzt. Beides führt zu einer Minderung von Duftstoffantworten von ORNs (Frings [2009]). Die beobachtete Wirkung von CGRP lässt vorerst den Schluss zu, dass es als Teil einer Duftstoffmischung eine inhibierende Wirkung auf ORNs hat, die bei längerer Dauer zu einer Hemmung der olfaktorischen Rezeption führt. Dies korreliert mit den psychophysischen Beobachtungen, das bei gleichzeitiger olfaktorischer und trigeminaler Stimulierung der olfaktorische Reiz als schwächer wahrgenommen wird im Vergleich zur rein olfaktorischen Stimulation. Das Phänomen, das gleichzeitig der trigeminale Stimulus als intensiver wahrgenommen wird, kann jedoch nicht über die Aktivität von CGRP erklärt werden.

Die Charakterisierung der Wirkung von SP auf olfaktorische Neurone befindet sich noch in einem frühen Stadium. Bis jetzt konnte folgendes festgestellt werden: Direkt auf das Gewebe applizierte SP in einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  zeigte weder ein charakteristisches Signal noch ein Signal vergleichbar zu einem Duftstoff-EOG. In Perfusionsexperimenten zeigte sich bei zwei der drei verwendeten Konzentration eine transiente exzitatorische Wirkung. Insbesondere bei den Experimenten, bei denen eine Konzentration von  $3\mu\text{M}$  verwendet wurde, war eine zum Teil sehr starke Erhöhung der EOG-Amplitude zu beobachten. Der Anstieg bei den Experimenten mit  $10\mu\text{M}$  Substanz P war nicht signifikant, der Verlauf der Kurve ist jedoch sehr ähnlich zu den anderen Verlaufskurven. Welchen *second messenger* Substanz P in ORNs aktiviert, ist im Moment noch nicht bekannt. Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass Substanz P intrazelluläre Wirkung über den Inositolphospholipid-Hydrolyse Weg bewirkt. Über die Effektormoleküle DAG und  $\text{IP}_3$  können wiederum verschiedene andere Effektormoleküle aktiviert werden, wie L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle oder die Proteinkinase C (Khawaja and Rogers [1996], Mantyh [2002]). Der in ORNs durch SP aktivierte Wirkmechanismus kann nur durch verschiedene Blockexperimente gegen Schlüsselproteine des  $\text{IP}_3$ -Wegs bestimmt werden. So wären Blockexperimente gegen Phospholipase C (PLC, Inhibitor: Neomycinsulfat oder D609) oder Proteinkinase C (PKC, Inhibitor: Staurosporin) möglich, um den *second messenger* von Substanz P stärker einzugrenzen. Abschließend lässt sich für SP sagen, dass dieses Peptid eine zweite Modulationsmöglichkeit für ORNs, aber auch für Zielzellen im OB, darstellt.

## 9.7 Die physiologische Bedeutung der trigeminalen Innervation

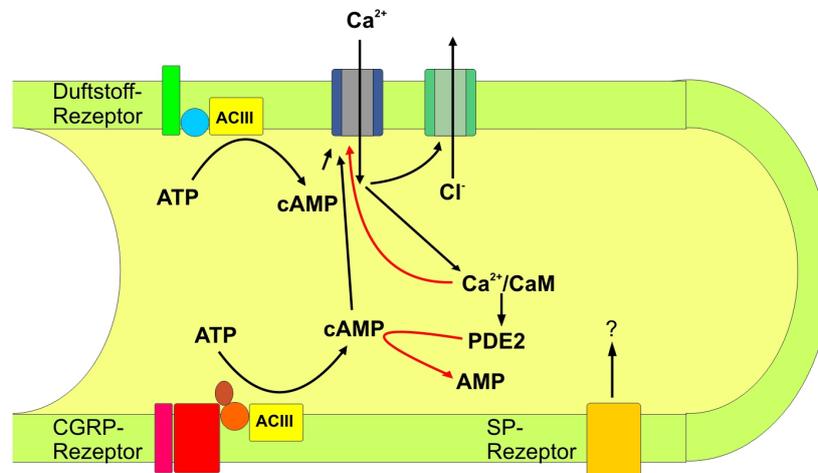
Viele Duftstoffe erzeugen neben dem eigentlichen olfaktorischen Eindruck auch einen trigeminalen Reiz. Dieser nimmt oft mit der Konzentration des Duftstoffs zu und ist für die Lokalisierung von Duftstoffquellen unerlässlich (Doty et al. [1978], Hummel [2000], Frasnelli et al. [2009], Hummel and Livermore [2002]). Psychophysische Arbeiten in diesem Bereich zeigten bereits die unterschiedlichen trigeminalen Potenzen von Duftstoffen und auch verschiedene mo-

dulatorische Wirkweisen wie die Hemmung olfaktorischer Wahrnehmung oder die Senkung von Geruchsschwellen (Brand [2006], Jacquot et al. [2004]). Zusätzlich wurde auf physiologischer Ebene die Aktivierung des ethmoidalen Astes des N. Trigeminus durch Irritantien und Duftstoffe demonstriert (Silver and Moulton [1982], Silver et al. [1988, 1991]). Weiterhin scheint die trigeminale Aktivität an der Riechgedächtnisbildung beteiligt zu sein (Larsson et al. [2009]). Allerdings gab keine dieser Arbeiten Antwort auf die Frage, ob modulatorische Prozesse unter physiologischen Bedingungen bereits auf der Ebene des peripheren Epithels stattfinden oder es sich hierbei um zentral gesteuerte Prozesse handelt. Hierfür wurden Dosis-Wirkungs-Kurven von 3 Duftstoffen mit unterschiedlichen trigeminalen Potenzen erstellt (keine, mittlere und hohe Potenz). Ziel war es, die trigeminale Modulation unter physiologischen Bedingungen (Duftstoffe als gasförmiger Stimulus, Gewebe intakt und im Verbund belassen) ohne die Zugabe trigeminaler Neuropeptide zu erfassen. Die funktionelle Charakterisierung mittels EOG von drei verschiedenen Duftstoffen über Dosis-Wirkungs-Kurven ergab, dass tatsächlich auf der Ebene des peripheren Epithels modulatorische Prozesse stattfinden könnten. Der rein olfaktorische Duftstoff zeigte keinerlei Beeinträchtigung im Dosis-Wirkungs-Verhalten, während beide Duftstoffe mit trigeminaler Potenz eine Verminderung der Sättigung zeigten. Zudem zeigten die Duftstoffe mit trigeminaler Potenz untypische EOG-Kurven. Es liegt also die Vermutung nahe, dass diese Modulation olfaktorischer Antworten auf der Ebene des Epithels über die Sezernierung trigeminaler Neuropeptide geschieht und ORN-basiert ist, da mit dem EOG nur das Summenrezeptorpotential olfaktorischer Neurone erfasst wird. Allerdings kann die physiologische Funktion der trigeminalen Modulation nicht nur über die Modulation der ORNs abgeleitet werden, da über die Kollateralenbildung trigeminaler Neurone nicht nur das OE, sondern auch der OB innerviert wird. Das bedeutet, dass bei einer Aktivierung des Trigeminusnervs nicht nur die ORNs moduliert werden und gleichzeitig der OB.

## **9.8 Modell der trigeminalen Modulation von olfaktorischen Rezeptorneuronen**

Aufgrund der in dieser Arbeit vorliegenden Daten zusammen mit vorherigen Veröffentlichungen lässt sich folgendes Modell erstellen: bei Stimulation des OEs mit Duftstoffen und/oder Reizstoffen kann es zu gleichzeitiger olfaktorischer und trigeminaler Stimulation kommen. Die trigeminale Stimulation wird über Transduktionskanäle in den freien trigeminalen Fasern erfasst und führt zu einer Ausschüttung von Substanz P und CGRP. Diese können nun wiederum an die trigeminalen Rezeptoren der olfaktorischen Neurone binden und führen im Fall von CGRP zu einer Produktion von cAMP. Je nach Menge an CGRP kann dies zur Aktivierung der olfaktorischen

schen Kaskade führen, ansonsten führt der cAMP-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zur Bildung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  Komplexen. Diese wiederum aktivieren die Phosphodiesterase 2 (PDE2), welche cAMP zu AMP abbaut, bzw. binden an die CNG-Kanäle, die dadurch inhibiert werden.

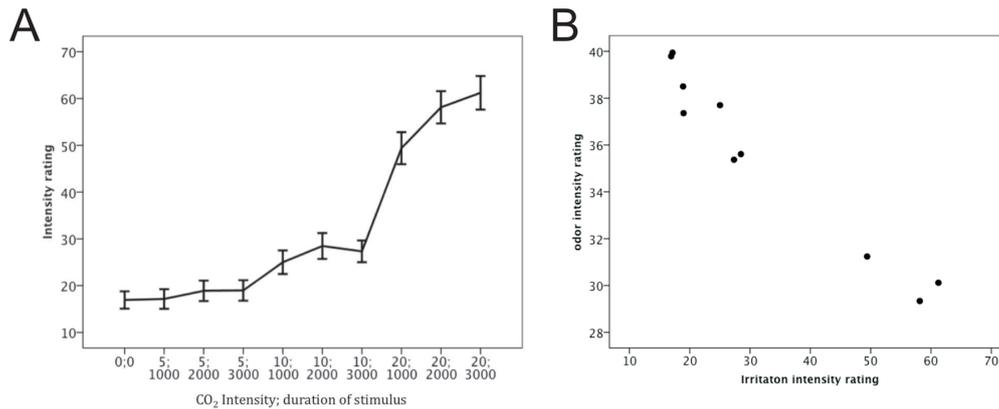


**Abbildung 9.8.1: Modell der trigeminalen Modulation der olfaktorischen Rezeption in den chemosensorischen Zilien:**Die Abbildung zeigt die intrazellulären Wege der trigeminalen Modulation im Inneren der chemosensorischen Zilien in einer vereinfachten schematischen Darstellung. Schwarze Pfeile bedeuten exzitatorische Wirkung, rote Pfeile inhibitorische Wirkung. Hellblau:  $G_{\alpha OLF}$ , Dunkelblau: CNG-Kanal, Mintgrün:  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter  $\text{Cl}^-$ -Kanal, Pink: RAMP-1, Rot:CRLR, Braun:CRCP, Orange:  $G_{\alpha S}$ , Ocker: NK1-R.

Auf Ebene der chemosensorischen Zilien können zusätzliche Modulationsmechanismen wie kompetitive oder nicht-kompetitive Hemmung z.Zt. noch nicht komplett ausgeschlossen werden. Substanz P erzeugt in ORNs eine transiente exzitatorische Wirkung, der Mechanismus ist noch nicht bekannt, sie könnte allerdings über den  $\text{IP}_3$ -Weg vermittelt sein. Durch die Kollateralenbildung der trigeminalen Nozizeptoren kann durch einen trigeminalen Reiz auch der OB moduliert werden. Wie genau diese Reizweiterleitung funktioniert, konnte im Rahmen dieser Arbeit noch nicht geklärt werden. Zielzellen für diese Modulation sind periglomerulär liegende Zellen sowie Mitralzellen.

## 9.9 Mögliche Implikation für den Menschen

Im größeren Zusammenhang stellen diese Ergebnisse auch für den Menschen wichtige Erkenntnisse dar. So basierte diese Arbeit auf Ergebnissen psychophysischer Studien am Menschen, die bereits zeigten, dass sowohl Geruchsempfindung als auch Geruchsschwellen durch trigeminale Stimulation beeinflusst werden. Weiterhin konnte die mRNA der trigeminalen Rezeptoren in menschlichen Biopsien des humanen OEs festgestellt werden (diese wurden freundlicherweise von Prof Dr. Thomas Hummel und Frau Dr. Mandy Scheibe zu Verfügung gestellt), was darauf hindeutet, dass die Rezeptoren und die darauf basierende Modulation auch in menschlichen ORNs vorhanden ist. Zusätzlich konnte von der AG Hummel gezeigt werden, dass mit der Dauer eines trigeminalen Stimulus ( $\text{CO}_2$ ) die Geruchsintensität des PEA-Stimulus immer stärker vermindert wird, wobei gleichzeitig die Intensitätsempfindung des  $\text{CO}_2$ -Stimulus zunimmt. Die Minderung der Geruchsintensität korreliert stark positiv mit der Zunahme der Intensität des  $\text{CO}_2$ -Stimulus (siehe Abb. 9.9.1, nicht veröffentlichte Ergebnisse Valentin Schriever, Universität Göttingen, Institut für Neurophysiologie und zelluläre Biophysik). Diese Beobachtung stützt die durch CGRP induzierte beobachtete Minderung der EOG-Amplituden. CGRP und Tachykinine wie Substanz P sind außerdem oft auch bei inflammatorischen Prozessen involviert (Quartara and Maggi [1998]). So könnte eine permanente trigeminale Stimulation, z.B über eine niedrigschwellige Geruchsbelastung, zu neuroinflammatorischen Prozessen im OE führen. Ein interessanter Zusammenhang könnte auch zwischen trigeminaler Modulation und Migräne-Attacken sowie Cluster-Kopfschmerzen bestehen. Viele Betroffene nennen Gerüche als Auslöser von Migräne-Attacken (Heinrichs [2002], Demarquay et al. [2008], Friedman and De ver Dye [2009], Durham and Vause [2010], Sjostrand et al. [2010], Taylor [2010]). Zudem ist bei vielen Betroffenen während der Attacken der CGRP-Spiegel im Plasma des venösen Halbschlagaderbluts erhöht und wird deswegen mit CGRP-Antagonisten behandelt. CGRP überwindet allerdings im Normalfall nicht die Blut-Hirn-Schranke, so dass seröses CGRP als Auslöser ausgeschlossen werden muss. In der Ratte umgeht der Trigeminalnerv diese Schranke durch die beobachtete Kollateralenbildung, so dass CGRP direkt im Gehirn sezerniert werden kann. Die trigeminale Modulation könnte sich in diesem Zusammenhang als kritische CGRP Quelle erweisen. Im Hinblick darauf ist zu klären, ob das Ausmaß der Kollateralenbildung trigeminaler Neurone im Menschen vergleichbar zu dem der Ratte ist. Weiterhin entscheidend wäre die Entschlüsselung des Mechanismus der Reizweiterleitung, die auf einen Stimulus im OE auch im OB zur Sezernierung von CGRP führt (Durham and Vause [2010], Taylor [2010]).



**Abbildung 9.9.1: Korrelation von Irritationsintensität zu Duftstoffintensität:** A: Graphische Darstellung der Intensitätswahrnehmung eines trigeminalen Stimulus (CO<sub>2</sub>) bei Zunahme der Stimuluskonzentration und der Stimulusdauer. Die Y-Werte stellen die durch den Probanden empfundene Intensität des Stimulus dar. Die obere Reihe der X-Werte stellt die Konzentration des CO<sub>2</sub>-Stimulus in % (v/v) dar, die untere Reihe die Dauer des Stimulus in ms. Die empfundene Intensität des Stimulus nimmt sowohl mit der Konzentration als auch der Dauer zu. B: Die Abbildung zeigt die graphische Darstellung der Korrelationsanalyse zwischen wahrgenommener Duftintensität und wahrgenommener Irritationsintensität. Es ist eine starke Korrelation zu erkennen ( $R=0,98$ ,  $p<0,001$ ). Die Konzentration des Duftstoffs (PEA) blieb gleich (20% v/v Stimulus) während die Konzentration des CO<sub>2</sub> Stimulus variierte (5-20% v/v Stimulus). v/v Stimulus bezieht sich dabei auf die Gasverhältnisse im verwendeten Olfaktometer. Die gesättigte Gasphase in einem Duftstoffbehälter wurde dabei mit einem zweiten Luftstrom geruchsbereinigter Luft gemischt.

## 9.10 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit hatte die trigeminale Modulation olfaktorischer Rezeption zum Thema. Das OE wird durch peptiderge C-Fasern des Trigeminalnervs innerviert, die die Neuropeptide Substanz P und CGRP enthalten. Diese projizieren in einem Abstand von ca. 100 $\mu$ m aus der *Lamina propria* hin zur apikalen Schicht des OEs, einzelne Fasern scheinen das olfaktorische Lumen zu erreichen. Im Verlauf der Arbeit konnte gezeigt werden, dass ORNs und verschiedene Zelltypen des OB die Rezeptoren trigeminaler Neuropeptide exprimieren. Im Epithel ist eine auffällige Lokalisation der Rezeptoren für Substanz P und CGRP auf der Ebene der chemosensorischen Zilien erkennbar, z.T. konnte auch eine Lokalisierung von Rezeptorkomponenten des CGRP-Rezeptors in basalen Kompartimenten der ORNs festgestellt werden. Die Identität der trigeminal-sensitiven Zellen im Bulbus ist noch nicht eindeutig geklärt. Aufgrund der Lage der Zellkörper im OB kommen Mitralzellen, kurze Axonzellen und periglomeruläre Zellen in Frage. Vorherige Arbeiten lassen dabei eine trigeminale Modulation der periglomerulären Zellen als höchstwahrscheinlich erscheinen. Stimulation von ORNs mit den trigeminalen Neuropeptiden CGRP und Substanz P zeigte unterschiedliche Wirkmechanismen der beiden Neuropeptide. Die direkte Stimulation von ORNs mit CGRP demonstrierte exzitatorische, CGRP-induzierte

Signale (ähnlich zu Duftstoff-EOGs). Diese Signale scheinen cAMP-basiert, da sie einerseits durch Blocker der olfaktorischen Transduktionskaskade vermindert werden und andererseits die Inkubation von OE-Proben in CGRP-Lösungen zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels in den Gewebeprobe führt. Fand die CGRP-Stimulation zusammen mit einem Duftstoff (PEA) statt, kam es zu einer Minderung der Duftstoff-EOGs. Einleitende Experimente mit Substanz P zeigten eine transiente exzitatorische Wirkung auf die Duftstoffantworten von ORNs im Bereich 1-3 $\mu$ M. Dosis-Wirkungs-Kurven von drei Duftstoffen mit unterschiedlicher trigeminaler Potenz zeigen, daß die Sättigung der Kurven bei Duftstoffen mit trigeminaler Potenz vermindert ist. Zusätzlich zeigten sich bei Duftstoff-Stimulationen mit starker trigeminaler Potenz untypische Verläufe der EOG-Kurven. Diese Experimente zeigen, dass die trigeminale Modulation bereits auf der Ebene des OEs beginnt und ORN-basiert ist.

Insgesamt stellt diese Arbeit ein erstes molekulares Modell der trigeminalen Modulation der olfaktorischen Rezeption dar. Offen ist noch die Reizweiterleitung des trigeminalen Stimulus vom OE über die trigeminalen Kollaterale zum OB sowie der *second messenger* von Substanz P in ORNs. In Bezug darauf bieten sich verschiedene Blockexperimente gegen Schlüsselproteine der vermuteten zellulären *second messenger*-Wege (PKC, PLC) an. Interessant wäre auch die Überprüfung der Hypothese, dass periglomeruläre Zellen das primäre Ziel der trigeminalen Modulation im OB sind. Hierzu bieten sich direkte elektrische Ableitungen an periglomerulären Zellen in Lebendschnitten an (siehe auch Gire and Schoppa [2009]). Zusätzlich muss genauer untersucht werden, wie eine evtl. Reizweiterleitung vom OE zum OB geschieht. Hierzu müsste eine Methode etabliert werden, die es erlaubt *in vivo* die Aktivität der trigeminal innervierten Glomeruli aufzuzeichnen (zb. über intrinsisches oder Ca<sup>2+</sup>-Imaging). Dies ist durch die anatomische Lage der trigeminal innervierten Glomeruli (ventral) erschwert. Sollte dies *in vivo* nicht möglich sein, wäre ein *ex vivo* Ansatz möglich, bei dem das komplette lebende Gehirn mit dem Trigeminalganglion und einem Teil des OEs entfernt wird (am Meerschweinchen bereits etabliert, siehe auch Ishikawa et al. [2007]).

# Literaturverzeichnis

- Barry W. Ache. Odorant-specific modes of signaling in mammalian olfaction. *Chem Senses*, 35(7):533–539, Sep 2010. doi: 10.1093/chemse/bjq045. URL <http://dx.doi.org/10.1093/chemse/bjq045>.
- Barry W. Ache and Janet M. Young. Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron*, 48(3):417–430, Nov 2005. doi: 10.1016/j.neuron.2005.10.022. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.022>.
- A Bain. The senses and the intellect. *Longmans reen, London*, 1868.
- Michael Bandell, Gina M. Story, Sun Wook Hwang, Veena Viswanath, Samer R. Eid, Matt J. Petrus, Taryn J. Earley, and Ardem Patapoutian. Noxious cold ion channel trpa1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, 41(6):849–857, March 2004.
- Allan I Basbaum, Diana M Bautista, Gregory Scherrer, and David Julius. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2):267–284, Oct 2009. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>.
- Diana M Bautista, Jan Siemens, Joshua M Glazer, Pamela R Tsuruda, Allan I Basbaum, Cheryl L Stucky, Sven-Eric Jordt, and David Julius. The menthol receptor trpm8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, 448(7150):204–208, Jul 2007. doi: 10.1038/nature05910. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature05910>.
- L. Belluscio, G. H. Gold, A. Nemes, and R. Axel. Mice deficient in g(olf) are anosmic. *Neuron*, 20(1):69–81, January 1998.
- M. Bensafi, E. Iannilli, J. Gerber, and T. Hummel. Neural coding of stimulus concentration in the human olfactory and intranasal trigeminal systems. *Neuroscience*, 154(2):832–838, Jun 2008. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.079. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.03.079>.
- Walter Born, Roman Muff, and Jan A Fischer. Functional interaction of g protein-coupled receptors of the adrenomedullin peptide family with accessory receptor-activity-modifying proteins (ramp). *Microsc Res Tech*, 57(1):14–22, Apr 2002. doi: 10.1002/jemt.10051. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.10051>.
- J. F. Bouvet, J. C. Delaleu, and A. Holley. Olfactory receptor cell function is affected by trigeminal nerve activity. *Neurosci Lett*, 77(2):181–186, Jun 1987.

- J. F. Bouvet, J. C. Delaleu, and A. Holley. The activity of olfactory receptor cells is affected by acetylcholine and substance p. *Neurosci Res*, 5(3):214–223, Feb 1988.
- Gerard Brand. Olfactory/trigeminal interactions in nasal chemoreception. *Neurosci Biobehav Rev*, 30(7):908–917, 2006. doi: 10.1016/j.neubiorev.2006.01.002. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.01.002>.
- L. Buck and R. Axel. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1):175–187, Apr 1991.
- W. S. Cain. Olfaction and the common chemical sense: some psychophysical contrasts. *Sens Processes*, 1(1):57–67, Jun 1976.
- Richard W. Carr, Svetlana Pianova, David D. McKemy, and James A. Brock. Action potential initiation in the peripheral terminals of cold-sensitive neurones innervating the guinea-pig cornea. *J Physiol*, 587(Pt 6):1249–1264, Mar 2009. doi: 10.1113/jphysiol.2008.167023. URL <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2008.167023>.
- M. J. Caterina, M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, and D. Julius. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653):816–824, 1997. URL <http://dx.doi.org/10.1038/39807>.
- S. Chen, A. P. Lane, R. Bock, T. Leinders-Zufall, and F. Zufall. Blocking adenylyl cyclase inhibits olfactory generator currents induced by ip(3)-odors“. *J Neurophysiol*, 84(1):575–580, Jul 2000.
- Jin Hyung Cho, Janet E A. Prince, Tyler Cutforth, and Jean-Francois Cloutier. The pattern of glomerular map formation defines responsiveness to aversive odorants in mice. *J Neurosci*, 31(21):7920–7926, May 2011. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2460-10.2011. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2460-10.2011>.
- J. M. Clark. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic dna polymerases. *Nucleic Acids Res*, 16(20):9677–9686, Oct 1988.
- Raymond W Colburn, Mary Lou Lubin, Dennis J Stone, Yan Wang, Danielle Lawrence, Michael R D’Andrea, Michael R Brandt, Yi Liu, Christopher M Flores, and Ning Qin. Attenuated cold sensitivity in trpm8 null mice. *Neuron*, 54(3):379–386, May 2007. doi: 10.1016/j.neuron.2007.04.017. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.017>.
- A. C. Conner, D. L. Hay, S. G. Howitt, K. Kilk, U. Langel, M. Wheatley, D. M. Smith, and D. R. Poyner. Interaction of calcitonin-gene-related peptide with its receptors. *Biochem Soc Trans*, 30(4):451–455, Aug 2002. doi: 10.1042/. URL <http://dx.doi.org/10.1042/>.
- D. M. Cooper, N. Mons, and J. W. Karpen. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and camp signalling. *Nature*, 374(6521):421–424, March 1995. URL <http://dx.doi.org/10.1038/374421a0>.

- Philipp Daiber. Die expression von bestrophenin 2 in chemosensorischen und nozizeptiven systemen. Master's thesis, Ruprecht-Karl Universitaet Heidelberg, 2007.
- G. Demarquay, J. P. Royet, G. Mick, and P. Ryvlin. Olfactory hypersensitivity in migraineurs: a h(2)(15)o-pet study. *Cephalalgia*, 28(10):1069–1080, Oct 2008. doi: 10.1111/j.1468-2982.2008.01672.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-2982.2008.01672.x>.
- Ajay Dhaka, Amber N Murray, Jayanti Mathur, Taryn J Earley, Matt J Petrus, and Ardem Patapoutian. Trpm8 is required for cold sensation in mice. *Neuron*, 54(3):371–378, May 2007. doi: 10.1016/j.neuron.2007.02.024. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2007.02.024>.
- X. Dong, S. Han, M. J. Zylka, M. I. Simon, and D. J. Anderson. A diverse family of gpcrs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell*, 106(5):619–632, Sep 2001.
- R. L. Doty, W. E. Brugger, P. C. Jurs, M. A. Orndorff, P. J. Snyder, and L. D. Lowry. Intranasal trigeminal stimulation from odorous volatiles: psychometric responses from anosmic and normal humans. *Physiol Behav*, 20(2):175–185, February 1978.
- Richard L. Doty. *Handbook of olfaction and gustation. Second edition. Revised and Expanded*. Dekker, 2003.
- Paul L. Durham and Carrie V. Vause. Calcitonin gene-related peptide (cgrp) receptor antagonists in the treatment of migraine. *CNS Drugs*, 24(7):539–548, Jul 2010. doi: 10.2165/11534920-000000000-00000. URL <http://dx.doi.org/10.2165/11534920-000000000-00000>.
- Rebecca Elsaesser, Giorgia Montani, Roberto Tirindelli, and Jacques Paysan. Phosphatidylinositide signalling proteins in a novel class of sensory cells in the mammalian olfactory epithelium. *Eur J Neurosci*, 21(10):2692–2700, May 2005. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04108.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04108.x>.
- B. N. Evans, M. I. Rosenblatt, L. O. Mnayer, K. R. Oliver, and I. M. Dickerson. Cgrp-rcp, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J Biol Chem*, 275(40):31438–31443, Oct 2000. doi: 10.1074/jbc.M005604200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M005604200>.
- FAO. *COMBINED COMPENDIUM OF FOOD ADDITIVE SPECIFICATIONS*. Food & Agriculture Organization (FAO), 2006.
- T. E. Finger and B. Boettger. Peripheral peptidergic fibers of the trigeminal nerve in the olfactory bulb of the rat. *J Comp Neurol*, 334(1):117–124, Aug 1993. doi: 10.1002/cne.903340110. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cne.903340110>.
- T. E. Finger, V. L. St Jeor, J. C. Kinnamon, and W. L. Silver. Ultrastructure of substance p- and cgrp-immunoreactive nerve fibers in the nasal epithelium of rodents. *J Comp Neurol*, 294(2): 293–305, April 1990. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cne.902940212>.

- Thomas E Finger, Baerbel Boettger, Anne Hansen, Karl T Anderson, Hessamedin Alimohammadi, and Wayne L Silver. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(15):8981–8986, Jul 2003. doi: 10.1073/pnas.1531172100. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1531172100>.
- J. Frasnelli, B. Schuster, and T. Hummel. Olfactory dysfunction affects thresholds to trigeminal chemosensory sensations. *Neurosci Lett*, 468(3):259–263, Jan 2010. doi: 10.1016/j.neulet.2009.11.008. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2009.11.008>.
- Johannes Frasnelli, Genevieve Charbonneau, Olivier Collignon, and Franco Lepore. Odor localization and sniffing. *Chem Senses*, 34(2):139–144, Feb 2009. doi: 10.1093/chemse/bjn068. URL <http://dx.doi.org/10.1093/chemse/bjn068>.
- Deborah I. Friedman and Timothy De ver Dye. Migraine and the environment. *Headache*, 49(6):941–952, Jun 2009. doi: 10.1111/j.1526-4610.2009.01443.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1526-4610.2009.01443.x>.
- S. Frings. Chemolectrical signal transduction in olfactory sensory neurons of air-breathing vertebrates. *Cell Mol Life Sci*, 58(4):510–519, Apr 2001.
- S. Frings, D. Reuter, and S. J. Kleene. Neuronal  $ca^{2+}$ -activated  $cl^{-}$  channels—homing in on an elusive channel species. *Prog Neurobiol*, 60(3):247–289, February 2000.
- Stephan Frings. Primary processes in sensory cells: current advances. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 195(1):1–19, Jan 2009. doi: 10.1007/s00359-008-0389-0. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00359-008-0389-0>.
- R. Froehlich. Ueber einige modificationen des geruchsinns. *Akademie der Wissenschaften Wien, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse*, 6:322–328, 1851.
- David H. Gire and Nathan E. Schoppa. Long-term enhancement of synchronized oscillations by adrenergic receptor activation in the olfactory bulb. *J Neurophysiol*, 99(4):2021–2025, Apr 2008. doi: 10.1152/jn.01324.2007. URL <http://dx.doi.org/10.1152/jn.01324.2007>.
- David H. Gire and Nathan E. Schoppa. Control of on/off glomerular signaling by a local gabaergic microcircuit in the olfactory bulb. *J Neurosci*, 29(43):13454–13464, Oct 2009. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2368-09.2009. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2368-09.2009>.
- H Gray. *Gray's anatomy*. Standring, S, 2005.
- D. A. Groneberg, D. Quarcoo, N. Frossard, and A. Fischer. Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases. *Allergy*, 59(11):1139–1152, Nov 2004. doi: 10.1111/j.1398-9995.2004.00665.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00665.x>.
- Brian Gulbransen, Wayne Silver, and Thomas E Finger. Solitary chemoreceptor cell survival is independent of intact trigeminal innervation. *J Comp Neurol*, 508(1):62–71, May 2008. doi: 10.1002/cne.21657. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cne.21657>.

- Anne Hansen and Thomas E Finger. Is trpm5 a reliable marker for chemosensory cells? multiple types of microvillous cells in the main olfactory epithelium of mice. *BMC Neurosci*, 9:115, 2008. doi: 10.1186/1471-2202-9-115. URL <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2202-9-115>.
- John F. Harms, Lynn R. Budgeon, Neil D. Christensen, and Danny R. Welch. Maintaining gfp tissue fluorescence through bone decalcification and long-term storage. *Biotechniques*, 33(6): 1197–1200, Dec 2002.
- Colleen C. Hegg, Cuihong Jia, Wallace S. Chick, Diego Restrepo, and Anne Hansen. Microvillous cells expressing ip3 receptor type 3 in the olfactory epithelium of mice. *Eur J Neurosci*, 32(10):1632–1645, Nov 2010. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07449.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07449.x>.
- LeRoy Heinrichs. Linking olfaction with nausea and vomiting of pregnancy, recurrent abortion, hyperemesis gravidarum, and migraine headache. *Am J Obstet Gynecol*, 186(5 Suppl Understanding):S215–S219, May 2002.
- T. Hummel. Assessment of intranasal trigeminal function. *Int J Psychophysiol*, 36(2):147–155, May 2000.
- Thomas Hummel and Andrew Livermore. Intranasal chemosensory function of the trigeminal nerve and aspects of its relation to olfaction. *Int Arch Occup Environ Health*, 75(5):305–313, June 2002. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00420-002-0315-7>.
- Takahiro Ishikawa, Takaaki Sato, Akira Shimizu, Ken-Ichiro Tsutsui, Marco de Curtis, and Toshio Iijima. Odor-driven activity in the olfactory cortex of an in vitro isolated guinea pig whole brain with olfactory epithelium. *J Neurophysiol*, 97(1):670–679, Jan 2007. doi: 10.1152/jn.01366.2005. URL <http://dx.doi.org/10.1152/jn.01366.2005>.
- Laurence Jacquot, Julie Monnin, and Gérard Brand. Influence of nasal trigeminal stimuli on olfactory sensitivity. *C R Biol*, 327(4):305–311, April 2004.
- Sven-Eric Jordt, Diana M. Bautista, Huai-Hu Chuang, David D. McKemy, Peter M. Zygmunt, Edward D. Hoegstaett, Ian D. Meng, and David Julius. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the trp channel anktm1. *Nature*, 427(6971):260–265, January 2004. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature02282>.
- A. M. Khawaja and D. F. Rogers. Tachykinins: receptor to effector. *Int J Biochem Cell Biol*, 28(7):721–738, Jul 1996.
- K. Klasen, E. A. Corey, F. Kuck, C. H. Wetzel, H. Hatt, and B. W. Ache. Odorant-stimulated phosphoinositide signaling in mammalian olfactory receptor neurons. *Cell Signal*, 22(1):150–157, Jan 2010. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.09.026. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.09.026>.

- Ko Kobayakawa, Reiko Kobayakawa, Hideyuki Matsumoto, Yuichiro Oka, Takeshi Imai, Masahito Ikawa, Masaru Okabe, Toshio Ikeda, Shigeyoshi Itohara, Takefumi Kikusui, Kensaku Mori, and Hitoshi Sakano. Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature*, 450(7169):503–508, Nov 2007. doi: 10.1038/nature06281. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature06281>.
- Rohini Kuner. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med*, 16(11):1258–1266, Nov 2010. doi: 10.1038/nm.2231. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2231>.
- Maria Larsson, Christina Oberg-Björk, and Fredrik U. Jönsson. Bad odors stick better than good ones: Olfactory qualities and odor recognition. *Exp Psychol*, 56(6):375–380, 2009. doi: 10.1027/1618-3169.56.6.375. URL <http://dx.doi.org/10.1027/1618-3169.56.6.375>.
- S. H. Lee, T. Iwanaga, O. Hoshi, I. Adachi, and T. Fujita. Regional differences of cgrp-immunoreactive nerve fibers in nasal epithelium of the rat. *Arch Histol Cytol*, 58(1):117–126, Mar 1995.
- Stephen D Liberles and Linda B Buck. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature*, 442(7103):645–650, Aug 2006. doi: 10.1038/nature05066. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature05066>.
- Weihong Lin, Tatsuya Ogura, Robert F Margolskee, Thomas E Finger, and Diego Restrepo. Trpm5-expressing solitary chemosensory cells respond to odorous irritants. *J Neurophysiol*, 99(3):1451–1460, Mar 2008. doi: 10.1152/jn.01195.2007. URL <http://dx.doi.org/10.1152/jn.01195.2007>.
- Patrick W Mantyh. Neurobiology of substance p and the nk1 receptor. *J Clin Psychiatry*, 63 Suppl 11:6–10, 2002.
- F. L. Margolis. Olfactory marker protein (omp). *Scand J Immunol Suppl*, 9:181–199, 1982.
- David D. McKemy, Werner M. Neuhauser, and David Julius. Identification of a cold receptor reveals a general role for trp channels in thermosensation. *Nature*, 416(6876):52–58, March 2002. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature719>.
- L. M. McLatchie, N. J. Fraser, M. J. Main, A. Wise, J. Brown, N. Thompson, R. Solari, M. G. Lee, and S. M. Foord. Ramps regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, 393(6683):333–339, May 1998. doi: 10.1038/30666. URL <http://dx.doi.org/10.1038/30666>.
- Robert P. Millar and Claire L. Newton. The year in g protein-coupled receptor research. *Mol Endocrinol*, 24(1):261–274, Jan 2010. doi: 10.1210/me.2009-0473. URL <http://dx.doi.org/10.1210/me.2009-0473>.
- K. Mori, H. Nagao, and Y. Yoshihara. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science*, 286(5440):711–715, Oct 1999.

- Kensaku Mori, Yuji K Takahashi, Kei Igarashi, and Shin Nagayama. Odor maps in the dorsal and lateral surfaces of the rat olfactory bulb. *Chem Senses*, 30 Suppl 1:i103–i104, Jan 2005. doi: 10.1093/chemse/bjh135. URL <http://dx.doi.org/10.1093/chemse/bjh135>.
- Kensaku Mori, Yuji K Takahashi, Kei M Igarashi, and Masahiro Yamaguchi. Maps of odorant molecular features in the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev*, 86(2):409–433, Apr 2006. doi: 10.1152/physrev.00021.2005. URL <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00021.2005>.
- R. Muff, N. Buehlmann, J. A. Fischer, and W. Born. An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3. *Endocrinology*, 140(6):2924–2927, Jun 1999.
- Rarey Nannoolal and Ramjuggernath. Estimation of pure component properties-part3: Estimation of the vapor pressure of non-electrolyte organic compounds via group contributions and group interactions. *Fluid Phase Equilibria*, 269:117–133, 2008.
- William T Nickell, Nancy K Kleene, Robert C Gesteland, and Steven J Kleene. Neuronal chloride accumulation in olfactory epithelium of mice lacking nkcc1. *J Neurophysiol*, 95(3):2003–2006, Mar 2006. doi: 10.1152/jn.00962.2005. URL <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00962.2005>.
- William T. Nickell, Nancy K. Kleene, and Steven J. Kleene. Mechanisms of neuronal chloride accumulation in intact mouse olfactory epithelium. *J Physiol*, 583(Pt 3):1005–1020, October 2007. URL <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2007.129601>.
- Draguhn A. Numberger M. *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag, 1996.
- H. Ohkubo and S. Nakanishi. Molecular characterization of the three tachykinin receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 632:53–62, 1991.
- H. R. Olpe, J. Heid, H. Bittiger, and M. W. Steinmann. Substance p depresses neuronal activity in the rat olfactory bulb in vitro and in vivo: possible mediation via gamma-aminobutyric acid release. *Brain Res*, 412(2):269–274, Jun 1987.
- Andrea M. Peier, Aziz Moqrich, Anne C. Hergarden, Alison J. Reeve, David A. Andersson, Gina M. Story, Taryn J. Earley, Ilaria Dragoni, Peter McIntyre, Stuart Bevan, and Ardem Patapoutian. A trp channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, 108(5):705–715, March 2002.
- S. M. Potter, C. Zheng, D. S. Koos, P. Feinstein, S. E. Fraser, and P. Mombaerts. Structure and emergence of specific olfactory glomeruli in the mouse. *J Neurosci*, 21(24):9713–9723, Dec 2001.
- M. A. Prado, B. Evans-Bain, and I. M. Dickerson. Receptor component protein (rcp): a member of a multi-protein complex required for g-protein-coupled signal transduction. *Biochem Soc Trans*, 30(4):460–464, Aug 2002. doi: 10.1042/. URL <http://dx.doi.org/10.1042/>.

- M. P. Price, S. L. McIlwrath, J. Xie, C. Cheng, J. Qiao, D. E. Tarr, K. A. Sluka, T. J. Brennan, G. R. Lewin, and M. J. Welsh. The drASIC cation channel contributes to the detection of cutaneous touch and acid stimuli in mice. *Neuron*, 32(6):1071–1083, Dec 2001.
- L. Quartara and C. A. Maggi. The tachykinin nk1 receptor. part ii: Distribution and pathophysiological roles. *Neuropeptides*, 32(1):1–49, Feb 1998.
- Ana Reicher, Adisa Kuburas, Zhongming Zhang, John A. Wemmie, Michael G. Anderson, and Andrew F. Russo. Role of calcitonin gene-related peptide in light-aversive behavior: implications for migraine. *J Neurosci*, 29(27):8798–8804, Jul 2009. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1727-09.2009. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1727-09.2009>.
- Jean-Pierre Rospars, Petr Lansky, Michel Chaput, and Patricia Duchamp-Viret. Competitive and noncompetitive odorant interactions in the early neural coding of odorant mixtures. *J Neurosci*, 28(10):2659–2666, Mar 2008. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4670-07.2008. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4670-07.2008>.
- H. Sann and F. K. Pierau. Efferent functions of c-fiber nociceptors. *Z Rheumatol*, 57 Suppl 2: 8–13, 1998.
- Clifford B. Saper. An open letter to our readers on the use of antibodies. *J Comp Neurol*, 493(4):477–478, Dec 2005. doi: 10.1002/cne.20839. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cne.20839>.
- Clifford B. Saper. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *J Histochem Cytochem*, 57(1):1–5, Jan 2009. doi: 10.1369/jhc.2008.952770. URL <http://dx.doi.org/10.1369/jhc.2008.952770>.
- Michele L. Schaefer, Baerbel Boettger, Wayne L. Silver, and Thomas E. Finger. Trigeminal collaterals in the nasal epithelium and olfactory bulb: a potential route for direct modulation of olfactory information by trigeminal stimuli. *J Comp Neurol*, 444(3):221–226, March 2002. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cne.10143>.
- Seifert. Geschichte und bibliographie der erforschung des peripheren geruchsorgans. *Clio Medica*, 4:305–337, 1969.
- W. L. Silver. Neural and pharmacological basis for nasal irritation. *Ann N Y Acad Sci*, 641: 152–163, Apr 1992.
- W. L. Silver and D. G. Moulton. Chemosensitivity of rat nasal trigeminal receptors. *Physiol Behav*, 28(5):927–931, May 1982.
- W. L. Silver, A. H. Arzt, and J. R. Mason. A comparison of the discriminatory ability and sensitivity of the trigeminal and olfactory systems to chemical stimuli in the tiger salamander. *J Comp Physiol A*, 164(1):55–66, Nov 1988.
- W. L. Silver, L. G. Farley, and T. E. Finger. The effects of neonatal capsaicin administration on trigeminal nerve chemoreceptors in the rat nasal cavity. *Brain Res*, 561(2):212–216, Oct 1991.

- Wayne L. Silver and Thomas E. Finger. The anatomical and electrophysiological basis of peripheral nasal trigeminal chemoreception. *Ann N Y Acad Sci*, 1170:202–205, July 2009. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.03894.x>.
- Christina Sjostrand, Ivanka Savic, Eva Laudon-Meyer, Lena Hillert, Karin Lodin, and Elisabet Waldenlind. Migraine and olfactory stimuli. *Curr Pain Headache Rep*, 14(3):244–251, Jun 2010. doi: 10.1007/s11916-010-0109-7. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s11916-010-0109-7>.
- Jennifer Spehr, Marc Spehr, Hanns Hatt, and Christian H Wetzel. Subunit-specific p2x-receptor expression defines chemosensory properties of trigeminal neurons. *Eur J Neurosci*, 19(9):2497–2510, May 2004. doi: 10.1111/j.0953-816X.2004.03329.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03329.x>.
- Axel Steinke, Sofia Meier-Stiegen, Detlev Drenckhahn, and Esther Asan. Molecular composition of tight and adherens junctions in the rat olfactory epithelium and fila. *Histochem Cell Biol*, 130(2):339–361, Aug 2008. doi: 10.1007/s00418-008-0441-8. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-008-0441-8>.
- Y. Suzuki, M. Takeda, and A. I. Farbman. Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bulbectomy. *J Comp Neurol*, 376(4):509–517, Dec 1996. doi: gt;3.0.CO;2-5. URL <http://dx.doi.org/gt;3.0.CO;2-5>.
- H. J. Tanke and M. van der Keur. Selection of defined cell types by flow-cytometric cell sorting. *Trends Biotechnol*, 11(2):55–62, Feb 1993.
- Frederick R. Taylor. Using telcagepant for the acute treatment of migraine. *Curr Pain Headache Rep*, 14(3):175–178, Jun 2010. doi: 10.1007/s11916-010-0113-y. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s11916-010-0113-y>.
- N. Thuerauf, T. Hummel, B. Kettenmann, and G. Kobal. Nociceptive and reflexive responses recorded from the human nasal mucosa. *Brain Res*, 629(2):293–299, December 1993.
- Marco Tizzano, Brian D Gulbransen, Aurelie Vandenbeuch, Tod R Clapp, Jake P Herman, Hiruy M Sibhatu, Mair E A Churchill, Wayne L Silver, Sue C Kinnamon, and Thomas E Finger. Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(7):3210–3215, Feb 2010. doi: 10.1073/pnas.0911934107. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0911934107>.
- Andrew J. Todd. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci*, 11(12):823–836, Dec 2010. doi: 10.1038/nrn2947. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2947>.
- Florin Tuluc, Jian Ping Lai, Laurie E. Kilpatrick, Dwight L. Evans, and Steven D. Douglas. Neurokinin 1 receptor isoforms and the control of innate immunity. *Trends Immunol*, 30(6):271–276, Jun 2009. doi: 10.1016/j.it.2009.03.006. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2009.03.006>.

- Kirill Ukhanov, Elizabeth A. Corey, Daniela Brunert, Katharina Klasen, and Barry W. Ache. Inhibitory odorant signaling in mammalian olfactory receptor neurons. *J Neurophysiol*, 103(2):1114–1122, Feb 2010. doi: 10.1152/jn.00980.2009. URL <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00980.2009>.
- Kirill Ukhanov, Daniela Brunert, Elizabeth A. Corey, and Barry W. Ache. Phosphoinositide 3-kinase-dependent antagonism in mammalian olfactory receptor neurons. *J Neurosci*, 31(1):273–280, Jan 2011. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3698-10.2011. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3698-10.2011>.
- D. van Rossum, U. K. Hanisch, and R. Quirion. Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of cgrp, related peptides and their receptors. *Neurosci Biobehav Rev*, 21(5):649–678, Sep 1997.
- J. W. Voltz, E. J. Weinman, and S. Shenolikar. Expanding the role of nherf, a pdz-domain containing protein adapter, to growth regulation. *Oncogene*, 20(44):6309–6314, Oct 2001. doi: 10.1038/sj.onc.1204774. URL <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204774>.
- von Skramlik. Die physiologische charakteristik von riechenden stoffen. *Die Naturwissenschaften*, 12:813–824, 1924.
- C. H. Wetzel, M. Oles, C. Wellerdieck, M. Kuczkowiak, G. Gisselmann, and H. Hatt. Specificity and sensitivity of a human olfactory receptor functionally expressed in human embryonic kidney 293 cells and xenopus laevis oocytes. *J Neurosci*, 19(17):7426–7433, Sep 1999.
- Yaparak. The axon reflex. *Neuroanatomy*, 7:7–19, 2008.