

**Geruchsstoffinduzierte Aktivität im *Bulbus olfactorius*
der Maus:
Aktivitätsmuster der olfaktorischen Rezeptorneuronen und
Entwicklung eines Mausmodells zur aktivitätsabhängigen
Markierung der Büschel- und Mitralzellen.**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln
vorgelegt von

Hans-Ulrich Fried
aus Heidelberg

Köln 2005

Berichterstatter: Prof. Dr. Sigrun Korsching
Prof. Dr. Peter Kloppenburg

Tag der Mündlichen Prüfung: 16.02.2005

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNGEN	8
1. ABSTRACT	8
2. ZUSAMMENFASSUNG.....	9
1. EINLEITUNG.....	11
1.1 DIE WELT DER GERÜCHE	11
1.2. OLFAKTORISCHE REZEPTOR PROTEINE	13
1.3. MORPHOLOGIE DES GERUCHSSYSTEMS – DIE NASENHÖHLE	16
1.4. MORPHOLOGIE DES GERUCHSSYSTEMS – DER OLFAKTORISCHE BULBUS	17
1.5. ORGANISATIONSPRINZIPIEN DER GLOMERULI	19
1.6. AXONALE ZIELFINDUNG.....	21
1.7. REPRÄSENTATION VON GERUCHSSTOFFEN	23
1.8. UNTERSUCHTE FRAGESTELLUNGEN	25
2. MATERIAL UND METHODEN	28
2.1 MATERIALIEN	28
2.1.1 Lösungen, Chemikalien und kommerzielle Verfahren.....	28
2.1.2 Enzyme und Radioaktivität	31
2.1.3 Maus BAC Bibliothek.....	32
2.1.4 PCR-Primer	32
2.1.5 Instrumente und Software	34
2.1.5.1 Allgemein	34
2.1.5.2 Instrumente und Software für optisches Imagen	36
2.1.5.3 Olfaktometer	36
2.1.5.4 Stereotaktischer Apparat	38
2.1.6 Versuchstiere	38
2.2 PHYSIOLOGISCHE METHODEN	39
2.2.1 Narkose und Applikation von Substanzen ins Riechepithel.....	39
2.2.1.1 Narkose	39
2.2.2 Präparationen	40
2.2.3 Anterograde Färbung der Rezeptorzellaxone.....	41
2.2.3.1 Calciumsensitive Farbstoffe	41
2.2.3.2 Färbung mit Calcium abhängigen Farbstoffen	41
2.2.4 Aufbau der Apparatur zur optischen Messung neuronaler Aktivitäten	42
2.2.4.1 Aufbau der Apparatur bei Reizung mit gasförmigen Duftstoffen	42
2.2.5 Auswahl der verwendeten Geruchsstoffe.....	42
2.2.6 Optische Messung neuronaler Aktivitäten und Datenauswertung	45
2.2.6.1 Statistische Datenanalysen	46
2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	47
2.3.1 Isolation von Plasmid-DNA.....	48
2.3.2 Phenol/Chloroform Extraktion.....	49
2.3.4 Isopropanolfällung	49
2.3.5 Quantifikation von DNA-Lösungen.....	49
2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	50
2.3.7 Pulsfeld-Gelelektrophorese.....	50
2.3.8 Restriktionendonuklease DNA-Verdau.....	50
2.3.9 Auffüllen und Abtrennen der 3'DNA-Überhänge.....	51
2.3.10 Dephosphorylisieren von Plasmid-DNA	51
2.3.11 Ligation von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten.....	51
2.3.12 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	52
2.3.13 "Southern-Blott": DNA-Transfer, DNA-Markierung und DNA-Hybridisierung.....	52
2.3.14 Herstellung von DIG-UTP markierten RNA Sonden	53
2.3.15 Transformation von Plasmiden	54
2.3.16 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	55

2.3.17	<i>Generation von Mutationen</i>	56
2.3.18	<i>DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse</i>	57
2.3.19	<i>Konstruktion der Vektoren</i>	58
2.3.19.1	Vektor AB-pGEM-T	58
2.3.19.2	Vektor AI2CB-pGEM-T	58
2.3.19.3	Shuttlevektor AI2CB-pSV.RecA	59
2.3.20	<i>Homologe Rekombination in Bakterien</i>	59
2.3.20.1	Erzeugung von Kointegrationen des Shuttlevektors in einen BAC	60
2.3.20.2	Erzeugung doppelt rekombinierter BACs	60
2.3.21	<i>Herstellung Transgener Mäuse</i>	61
2.3.21.1	Isolation der BAC-DNA für die pronukleare Injektion	61
2.3.21.2	Identifizierung möglicher transgener Mäuse und Rückkreuzungen	62
2.4	HISTOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN.....	63
2.4.1	<i>Kryostatschnitte</i>	63
2.4.2	<i>In situ Hybridisierung</i>	63
3.	ERGEBNISSE	65
3.1	GERUCHSSTOFFINDUZIERTER ORN-ANTWORTEN IM <i>BULBUS OLFactorIUS</i> DER MAUS	65
3.1.1	<i>Glomeruläre Antwortmuster</i>	66
3.1.2	<i>Die Aldehyd-Domäne – die Chemotopie Teil I</i>	68
3.1.3	<i>Interindividuell identifizierbare Glomeruli</i>	72
3.1.4	<i>Untersuchung einer durch einen Glomerulus definierten Region - die Chemotopie Teil II</i>	75
3.1.4.1	Vorversuche zur Darstellung von Fluoreszenzänderungen in einem eGFP Hintergrund	75
3.1.4.2	Optische Ableitung in M72-eGFP Glomeruli	77
3.1.4.3	Die M72-Region	81
3.1.5	<i>Die Kodierung der Geruchsstoffkonzentration</i>	89
3.1.6	<i>Die Diskriminierbarkeit der Aktivitätsmuster nimmt mit zunehmender Geruchsstoffkonzentration ab</i>	92
3.2	AKTIVITÄTSABHÄNGIGE MARKIERUNG VON MITRAL- UND BÜSCHELZELLEN – EIN MAUSMODELL.....	93
3.2.1	<i>Cre Expression unter der Kontrolle des zellspezifischen Promotors "T-bet"</i>	95
3.2.2	<i>Klonierung eines T-bet/ires/cre Vektors für die Injektion in befruchtete Oozyten der Maus</i>	98
3.2.3	<i>Analyse der Rekombinationshäufigkeit</i>	101
3.2.4	<i>Die Analyse potentieller Founder-Mäuse</i>	103
3.2.4.1	PCR zum Nachweis genomischer Cre-DNA	105
3.2.4.2	Untersuchung der Häufigkeit potentieller Founder Mäuse	105
4.	DISKUSSION	109
4.1	FUNKTIONALER AUFBAU DES OLFaktorISCHEN BULBUS IN DOMÄNEN.....	110
4.1.1	<i>Mögliche Funktionen der Domänen</i>	112
4.1.1.1	Die mögliche Bedeutung der Domäne für die weitere Prozessierung der Geruchsstoffinformation	112
4.1.1.2	Mögliche Rolle der OR-Familie für die Funktion von Domänen	113
4.2	DER DYNAMISCHE FUNKTIONSBEREICH VON ORN.....	117
4.3	VERGLEICH MIT ANDEREN METHODEN DER BILDGEBENDEN ABLEITUNG IN ZELLPopulationEN DES OLFaktorISCHEN BULBUS.....	119
4.3.1	<i>Die neuronale Aktivität der ORN</i>	121
4.4	DIE ANTWORTEN DES M72 GLOMERULUS.....	121
4.5	ANWENDUNG DER ENTWICKELTEN STRATEGIE ZUR AKTIVITÄTSABHÄNGIGEN MARKIERUNG VON BÜSCHEL- UND MITRALZELLEN.....	123
4.5.1	<i>Die einzelnen genetischen Elemente des Mausmodells</i>	124
4.5.2	<i>Verwendete Methoden zur Etablierung der transgenen Mauslinie</i>	125
5.	LITERATUR	128
6.	ANHANG	149
6.1	SEQUENZ DES AI2CB-INSERTS	149
6.2	ERKLÄRUNG.....	150
6.3	TEILPUBLIKATIONEN	150
6.4	LEBENSlauf.....	151

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Fig.1 – Vergleich von Sinnessystemen.	13
Fig.2 – Schematische Darstellung des neuronalen Netzwerkes im olfaktorischen Bulbus der Maus.	18
Fig.3 – Schemazeichnung des Olfaktometers und stereotaktischen Apparats.	37
Fig.4 – Schematische Darstellung des genetischen veränderten Lokus der zwei eGFP exprimierenden Mauslinien.	39
Fig.5 – Schemazeichnung der Apparatur für die Messung neuronaler Aktivitäten im Olfaktorischen Bulbus der Maus.....	43
Fig.6 – Einführen von zwei Restriktionsschnittstellen im AB-Fragment.....	56
Fig.7 – Die Calcium-Signale sind Glomeruli zuzuordnen.	67
Fig.8 – Geruchsstoffinduzierte Calcium-Antworten sind spezifisch und reproduzierbar.....	68
Fig.9 – Die Aldehyd-Domäne: Abnehmende Spezifität und interindividuelle Variabilität hochkonzentrierter aliphatischer Aldehyd-Stimuli.	69
Fig.10 – Die kombinatorische Kodierung aliphatischer Aldehyde.	71
Fig.11 – Durch das Cranium abgeleitete Aktivitätsmuster in der Aldehyd-Subdomäne.	73
Fig.12 – Unterschiedliche Methoden der optischen Ableitung von Aktivitätsmustern.....	74
Fig.13 – Die verschiedenen verwendeten Filtersätze.....	76
Fig.14 – Aktivitätsmuster in der, durch die eGFP Expression des M72-Glomerulus definierten Region.	78
Fig.15 – Aktivitätsmuster der M72-Region.	83
Fig.16 – Interindividuelle Variabilität von dem M72-Glomerulus und acht weiteren identifizierbaren Glomeruli der M72-Region.	87
Fig.17 – Konzentrationsbedingte Änderung im Aktivitätsmuster eines Hexanalstimulus.....	88
Fig.18 – Affinitätsabschätzung für Glomeruli der Aldehyd induzierten Aktivitätsmuster.	89
Fig.19 – Selektivität von Glomeruli.	91
Fig.20 – Schematische Darstellung der Signaltransduktionskaskaden zur Aktivierung einiger IE (Abkürzung von engl.: immediate early) Gene.	94
Fig.21 – T-bet <i>In situ</i> Hybridisierung in einem coronalen Schnitt durch den <i>Bulbus olfactorius</i>	96
Fig.22 – Mausmodell zur aktivitätsabhängigen Markierung der Büschel- und Mitralzellen.....	97
Fig.23 – Endonuklease-Verdaue und Southern-Blot Analysen verschiedener BAC-Klone....	99
Fig.24 – Genomische Umgebung des T-bet Gens in der Maus.	100
Fig.25 – Homologe Rekombination in Bakterien.....	101
Fig.26 – Qualität der modifizierten BAC-DNA vor der Oozyteninjektion in Pulsfeldgelelektrophoresen.	104
Fig.27 – Zwei Strategien für die Analyse der potentiellen Founder-Mäuse.	104
Fig.28 – Ergebnisse der Analyse von den potentiellen Founder-Mäusen.	107
Fig.29 – Phylogenetische Stammbäume einiger OR-Familien.	115
Tabelle1 - Liste der PCR-Primer mit Namen, Sequenz, Schmelztemperatur (Tm) und Verwendungszweck.	33
Tabelle2 - Ligandenspektren von 154 Glomeruli aus fünf verschiedenen Tieren.	85

Zusammenfassungen

1. Abstract.

The rodent olfactory bulb is organized roughly chemotopically and hierarchically: Odorants with particular molecular features map coarsely onto particular regions (often termed domains) of the olfactory bulb. Within these domains similar odors evoke overlapping patterns of activated glomeruli. Finally, the precise identity of a stimulus can be decoded by inspection of the fine glomerular composition of an activity pattern. A single glomerulus is innervated by olfactory receptor neurons expressing the same olfactory receptor type. In the mouse, *in vivo* labeling and identification of specific glomeruli and thus specific olfactory receptors can be achieved by so-called knock-in techniques based on homologous recombination in olfactory receptor genes. Thus, in the mouse one can deduce from the activity within genetically marked glomeruli the ligand spectrum of specific olfactory receptors and from glomerular activity patterns the activity of many underlying olfactory receptors. The later is achieved by optical imaging of neuronal activity within a region of the olfactory bulb that can visualize at once the contributions by many different olfactory receptors responsive to a particular odorant. This technique was used in my work to identify principles of the olfactory coding strategy in the mouse olfactory bulb. Namely, I could reveal the contribution of the structure and concentration of an odorant for receptor-ligand interactions and I was able to find a correlation between an olfactory receptor family and certain activity patterns. In addition, I could identify several previously unknown ligands of a specific olfactory receptor.

It could be shown that about eighty different olfactory receptors projecting to the dorsal olfactory bulb respond to aldehydes (termed aldehyde-domain) and between 30 and 40 olfactory receptors within a dorso-posterior region repond to odorants with different cyclic molecular structures. For both domains incidences were found where glomerular activity could be evoked with odorants mainly activating the other domain. Varying ensembles of about 10 to 20 receptors encode any particular odorant at low stimulus concentration with high specificity. With increasing odorant concentrations more receptors were recruited to a stimulus response. The releative weight af a particular receptor within an activity pattern varied with the stimulus concentration. Accordingly, not only different odorants but also different concentration of an odorant evoked different acivity patterns.

In two independent cases cyclohexanone could be demonstrated as ligand for the mouse M72 olfactory receptor. Nitrobenzene and benzaldehyde represented only a weak ligand, or evoked only in one animal a response in the genetically identified M72 glomerulus, respectively. Alltogether, the glomeruli of the M72 region appeared more heterogenous with ligand spectra differing more dramatically from each other compared to ligand spectra of the aldehyd-domain. This may be due to the relatively small sizes of the different subfamilies of the M72 related receptors,

which contain only few members closely related to each other. Since the present understanding of the glomerular map would predict the members of the M72 olfactory receptor family to define the glomeruli of the M72 containing region and since related OR are expected to possess related ligand spectra, one would expect rather diverse ligand spectra in this domain.

In order to specifically analyse the properties of the projection neurons *in situ* within the whole olfactory information processing network, I attempted to genetically dissect the neural network of the olfactory bulb. To achieve this we attempted to construct two transgenic mouse lines, one expressing the site specific Cre recombinase under control of the mitral/tufted cell-specific t-bet promoter. The other mouse line should express EGFP under the activity dependent cfos promoter only after a transcriptional stop cassette would have been removed by Cre. When both mice lines are crossed the activity dependent EGFP expression should only occur in tufted and mitral cells. Construction of the cfos/EGFP mouse is ongoing in the laboratory of Prof. S. Korsching (as a project of Sunil Kumar). I could generate a single t-bet/Cre founder mouse, however so far it was not possible to breed this mouse further and thus no t-bet/Cre mouse line could be established yet.

2. Zusammenfassung.

Der olfaktorische Bulbus von Nagern besitzt eine grobe chemotopie und hierarchische Organisation: Geruchsstoffe einer Geruchsstoffklasse erregen Großteils die selben Bulbusregionen. Innerhalb dieser Repräsentationsdomänen erregen ähnliche Geruchsstoffe überlappende Muster aus aktivierten Glomeruli. Letztendlich identifiziert die genaue glomeruläre Zusammensetzung eines Aktivitätsmusters den Geruchsstoff eindeutig. In einem Glomerulus terminieren nur rezeptorgleiche Riechsinneszellen. In der Maus können, durch die Verwendung von transgenen Tieren, die mit der sogenannte knock-in Technik, basierend auf der homologen Rekombination, erzeugt wurden, bestimmte olfaktorische Rezeptorgene markiert werden. *In vivo* können so Neurone, die diese olfaktorischen Rezeptoren exprimieren, genauso wie die durch diese olfaktorischen Rezeptoren charakterisierten Glomeruli, identifiziert werden. Demnach kann in der Maus aus der Aktivität eines genetisch markierten Glomerulus auf das Ligandenspektrum des, den Glomerulus charakterisierenden Geruchsrezeptors, und aus den glomerulären Aktivitätsmustern auf die Aktivität vieler Geruchsrezeptoren auf einmal geschlossen werden. Letzteres wird durch die optische Ableitung der Oberflächenaktivität eines Bulbusauschnittes erreicht. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode angewendet, um Grundlagen der Kodierung im *Bulbus olfactorius* der Maus zu beschreiben. So wurde die Bedeutung der Molekülstruktur und Konzentration eines Geruchsstoffes für die Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung ermittelt und eine grobe Korrelation zwischen Geruchsrezeptorfamilien und Aktivitätsmustern hergestellt. Darüber hinaus wurden weitgehendst unbekannte Liganden eines Geruchsrezeptors gefunden.

Im dorsalen Bulbusausschnitt von Mäusen konnte eine etwa 80 Glomeruli umfassende Aldehyd-Domäne und eine 30 bis 40 Glomeruli umfassende posterior-dorsale Domäne in der zyklische Verbindungen repräsentiert wurden, beschrieben werden. Glomeruli beider Domänen konnten zum Teil durch Geruchsstoffe, die in der jeweils andere Domäne repräsentiert waren stimuliert werden. Mit niedrigen Geruchsstoffkonzentrationen wurden Aktivitätsmuster aus 10 bis 20 aktivierten Glomeruli erregt. Zunehmende Geruchsstoffkonzentrationen bewirkten zunehmend mehr aktivierte Glomeruli, wobei die relative Gewichtung eines Glomerulus innerhalb des Aktivitätsmusters von der Konzentration abhing und variierte. Nicht nur unterschiedliche Geruchsstoffe, sondern auch unterschiedliche Konzentrationen eines Geruchsstoffes evozierten verschiedene Aktivitätsmuster.

In zwei Mäusen, in denen der M72-Glomerulus genetisch identifizierbar war, konnte für den M72-Geruchsrezeptor Cyclohexanon als Ligand demonstriert werden. Nitrobenzol und Benzaldehyd vermochten M72 nur sehr schwach, beziehungsweise nur in einem Tier deutlich, zu aktivieren. Insgesamt schienen die Glomeruli der M72-Region unterschiedlichere Ligandenspektren, als die Glomeruli der Aldehyd-Domäne aufzuweisen. Eine Erklärung hierfür könnten die relativ kleinen Rezeptorsubfamilien der M72 verwandten Geruchsrezeptoren, mit nur jeweils wenigen eng verwandten Rezeptoren, liefern. Nach dem heutigen Verständnis des glomerulären Anordnungsprinzipes sollten die Glomeruli der M72 Geruchsrezeptorfamilie in der M72-Region liegen, und nur eng verwandte Geruchsrezeptoren sollten ähnliche Ligandenspektren aufweisen. Demnach würde man ein heterogenes Ligandenspektren der Glomeruli aus der M72-Region erwarten.

In einem weitergehenden experimentellen Ansatz wurde versucht, das neuronale Netzwerk des olfaktorischen Bulbus durch die Hilfe einer zelltypspezifischen aktivitätsabhängigen Markierung in seine zellulären Komponenten zu zerlegen. Um dies zu erreichen sollten zwei Mauslinie erzeugt werden. In einer Mauslinie würde die Expression der Sequenzspezifischen Rekombinase Cre unter dem büschel- und mitralzellspezifischen Promoter T-bet gestellt werden. In der zweiten Mauslinie würde die EGFP Expression unter dem aktivitätsabhängigen Promoter cfos nur dann erfolgen, wenn zuvor Cre-vermittelt eine translationale Stop-Kassette entfernt wurde. Durch die Kreuzung der beiden Mauslinien sollte nur in Büschel- und Mitralzellen die aktivitätsabhängige EGFP Expression erfolgen. An der Konstruktion einer cfos/EGFP Mauslinie wird zur Zeit in dem Labor von Prof. S. Korsching (als ein Projekt von Sunil Kumar) gearbeitet. In der hier vorliegenden Arbeit konnte die Erzeugung einer T-bet/Cre Founder-Maus gezeigt werden, die jedoch nicht weiter verpaart werden konnte und folglich die Etablierung einer Mauslinie nicht möglich war.

1. Einleitung

1.1 Die Welt der Gerüche

In der Luft befinden sich eine unglaublich große Anzahl unterschiedlicher, gasförmiger Moleküle und fast unendlich viele Kombinationsmöglichkeiten dieser Moleküle. Nie haben zwei unterschiedliche Moleküle den exakt gleichen Geruch und keine zwei unterschiedlichen Molekülmischungen riechen gleich (Turin, 2002). Allein der Mensch produziert jeden Tag neue Gerüche wie das wohl populärste Beispiel "Chanel No 5", ein aus vollständig synthetischen organischen Komponenten kreierte Parfüm (Rossiter, 1996). Die Natur übertrumpft den Menschen jedoch bei weitem, sowohl in der Anzahl als auch in der Kombinationsvielfalt der einzelnen Gerüche. Der Duft einer Rose beinhaltet über 400 verschiedene nachweisbare Komponenten, die zum Charakter des Geruches beitragen. Zum Duft von Kaffee zählen sogar über 800 verschiedene Inhaltsstoffe (Ohloff, 1990). Auch die Bedeutung von Gerüchen für die Fauna ist von allen Parametern, die Tiere beeinflussen können, an Informationsgehalt unübertroffen. Gerüche spielen beispielsweise die zentrale Rolle bei der Nahrungssuche, Räuber- und Beute-Verhalten sowie in den mannigfaltigen sozialen Beziehungen, die innerhalb einer Tierart und zwischen zwei Tierarten ausgebildet werden können; sie beeinflussen nicht nur emotionale Zustände der Tiere, den Menschen eingeschlossen, sondern auch die neuroendokrine Regulation im gesamten Körper (zusammengefasst in Wyatt, 2003).

Allen Geruchsstoffen sind einige chemische und physikalische Eigenschaften gemein. Sie sind niedermolekulare Verbindungen mit einem hohen Dampfdruck, niedriger Polarität und haben ein Minimum an Wasserlöslichkeit. In Geruchsstoffen findet sich mindestens eine polare Gruppe, die zumeist als osmophile Gruppe bezeichnet wird. Schon kleine, schrittweise Veränderungen in der Größe des Moleküls oder in der Position der osmophoren Gruppe führen in der Regel zu einer deutlichen Veränderung im Geruchseindruck. Leichte stereochemische Veränderungen, wie die Wandlung von einem Z-Geruchsstoff zu seiner E-Isomeren Form, können zu komplett unterschiedlichen Geruchswahrnehmungen führen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist Carvon. Je nach Isomer riecht es nach Kümmel ((+)-Carvon) oder nach Krauseminze ((-)-Carvon).

Für die Stimulierbarkeit individueller Riechsinneszellen mit unterschiedlichen Geruchsstoffen genauso wie für die Ausprägung ähnlicher Geruchsempfindungen sind jedoch nicht einzelne Eigenschaften der Geruchsstoffe isoliert voneinander bestimmend. Strukturell heterogene

Geruchsstoffe (z.B. Aldehyde, Karbonsäuren und Ketone) sind in der Lage eine einzige Riechsinneszelle zu stimulieren (Duchamp-Viret et al., 1999; Malnic et al., 1999; Sato et al., 1994), und der mandelartige Geruch des Benzaldehyds findet sich auch im Geruch von Nitrobenzol, Benzonitril und Benzo-1,2,3-triazol wieder. Vielmehr scheinen globale Struktureigenschaften, wie die Verteilung der Ladung oder hydrophober Gruppen innerhalb eines Moleküls, von Bedeutung für die Wechselwirkung zwischen Geruchsstoff und Geruchsrezeptor und letztendlich auch für den Geruchseindruck selber zu sein (Araneda et al., 2000). Für die ambrartigen Geruchsstoffe der Dekalin- und Oktalin-Reihe wurde beispielsweise die Triaxialregel formuliert. Sie besagt, dass nur diejenigen Verbindungen ambrartige Geruchsqualitäten entwickeln können, deren axiale Gruppen einen vorhersagbaren, gleichbleibenden Abstand zueinander haben (Ohloff, 1990). Zumeist ist jedoch eine Voraussage des Geruchs aus der Molekülstruktur nur begrenzt oder sogar völlig unmöglich (Rossiter, 1996; Turin, 2002). Folglich lassen sich Gerüche auch nicht mit einem oder wenigen Parametern wie die Wellenlänge für Töne oder Farben beschreiben. Amore unternahm zwar 1952 den Versuch, Gerüche in Kategorien einzuteilen, die heute modifiziert in über 40 Noten wie grün, erdig oder nussig immer noch angewendet werden (Hatt, 1995; Ohloff, 1990). Die allgemeine Anwendung dieser Kategorien hat sich bis heute aber nicht durchgesetzt.

In den meisten Sinnessystemen kann aufgrund der physikalischen Kontinuität der Reize das Kodierungsprinzip, nach dem die für das jeweilige Sinnessystem adäquaten äußeren Reize abgebildet werden, schon in der Morphologie des Sinnessystems erkannt werden. Abhängig von der Frequenz eines Tones werden beispielsweise unterschiedliche Bereiche einer Membran, der Basiliarmembran des Innenohrs, in Schwingung versetzt. Mit abnehmender Tonfrequenz werden immer tieferliegende Bereiche der Basiliarmembran zum Schwingen angeregt. Die in einer Reihe angeordneten Haarsinneszellen der Cochlea, die durch diese Schwingungen erregt werden, sind also der Kontinuität des physikalischen Reizes entsprechend mit kontinuierlich sich verändernden Tonfrequenzen stimulierbar (siehe Fig.1).

Die fehlende Kontinuität olfaktorischer Reize läßt eine bestimmte nachbarschaftliche Anordnung von Riechsinneszellen und vor allem das Erhalten einer solchen Anordnung während der zentralen Projektion als wenig nützlich erscheinen. Das Erforschen der Prinzipien des Erkennens und der Analyse von Geruchsstoffen sowie die Informationsweiterleitung und Prozessierung ist daher eine besondere wissenschaftliche Herausforderung. Die bisher nur ansatzweise vorhandenen Kenntnisse über die Kodierungsprinzipien und Reizprozessierung von Geruchsstoffen sollen durch diese Arbeit erweitert werden.

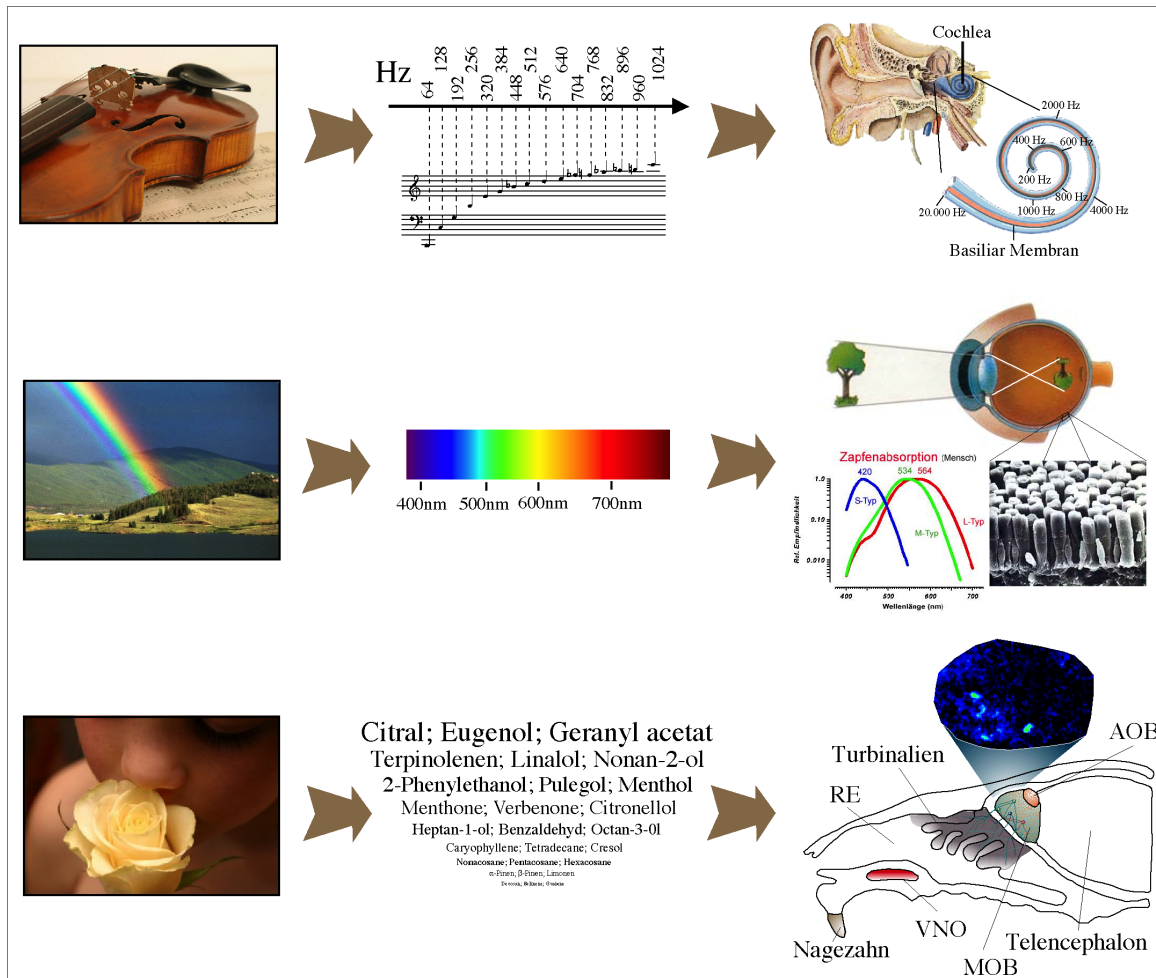


Fig. 1 Vergleich von Sinnessystemen.

Von oben nach unten: Auditorisches System, visuelles System, Geruchssystem. Oben: Im Auditorischen System wird die lineare Tonskala (in Hz) in der Cochlea auf der linearen Basilariemembran abgebildet. Benachbarte Töne stimulieren benachbarte Zellen an der Basilariemembran. Hohe Töne (große Hertzzahl) werden am Anfang, tiefe Töne (kleine Hertzzahl) werden an der Spitze der Cochlea repräsentiert. Mitte: Das visuelle System dient sowohl dem räumlichen Sehen, als auch der Wahrnehmung von Farben. Räumlich benachbarte Objekte stimulieren im Auge benachbarte Sehzellen. Die lineare Skala der Farben (in nm) ist im visuellen System des Menschen durch drei verschiedene Sehzellen (Zapfen) kodiert. Jede Zapfenart wird durch Licht einer anderen Wellenlänge maximal stimuliert. Die neuronale Aktivität der drei Zapfenarten zusammen repräsentiert die exakte Wellenlänge des Lichts. Unten: Im Geruchssystem sind Gerüche, die aus vielen verschiedenen Geruchsstoffen bestehen, durch die Bindung an viele verschiedene OR kodiert. In der Maus definieren etwa 1000 unterschiedliche OR ebenso viele ORN-Typen, deren Somata auf den Turbinalien des Nasenraums liegen. Die Axonterminalien eines ORN-Typs terminieren in einem bestimmten Glomerulus des MOB (engl. für: major olfactory bulb). Pheromone werden über das Vomeronasale System wahrgenommen. Axonterminalien von Vomeronasale Nervenzellen terminieren im AOB (engl. für accessory olfactory bulb) ebenfalls in Glomeruli. Die für einen Geruch spezifische Kombination aktivierter ORN generiert im olfaktorischen Bulbus ein für diesen Geruch spezifisches Aktivitätsmuster aus aktivierten Glomeruli.

1.2. Olfaktorische Rezeptor Proteine

In den späten 1980er-Jahren wurde die Existenz heterotrimerer G Proteine in der olfaktorischen Signaltransduktionskaskade immer deutlicher. Die darauf folgende Vermutung, olfaktorische Rezeptoren (OR) mit sieben transmembranen Domänen stünden am Beginn der olfaktorischen Signaltransduktionskaskade, hat sich bestätigt. Bis heute sind alle bekannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit

sieben transmembranen Domänen ausgestattet, die allesamt gewisse konservierte Motive aufweisen. Anhand dieser Motive konnten 1991 die ersten OR als Mitglieder einer etwa 1000 Gene zählenden Superfamilie in der Ratte beschrieben werden (Buck and Axel, 1991). In allen daraufhin untersuchten Tieren konnte in gleicher Weise eine OR Gene enthaltende Superfamilie entdeckt werden, die stets die jeweils größte Genfamilie dieser Organismen bildet [(Mombaerts, 1999a), für Ratte (Buck and Axel, 1991), für Maus (Godfrey et al., 2004; Zhang and Firestein, 2002), für Hund (Parmentier et al., 1992), für Fische (Barth et al., 1996; Korsching et al., 1997; Ngai et al., 1993; Weth et al., 1996), für *C. elegans* (Bargmann and Kaplan, 1998; Troemel et al., 1997), für *Drosophila* (Vosshall, 2000), für den Mensch (Zozulya et al., 2001)]. Untersuchungen des gesamten Mausgenoms ergaben eine Familiengröße von etwa 1.300 Genen mit um die 20% Pseudogenen (Godfrey et al., 2004; Zhang and Firestein, 2002). Bei Säugetieren konnte bis heute für 27 verschiedene OR Liganden identifiziert werden (zwei für Mensch: (Spehr et al., 2003; Wetzel et al., 1999), zwei für Ratte: (Krautwurst et al., 1998; Raming et al., 1993; Zhao et al., 1998) und 23 für Maus: (Bozza et al., 2002; Feinstein et al., 2004; Gaillard et al., 2002; Kajiya et al., 2001; Krautwurst et al., 1998; Malnic et al., 1999; Touhara et al., 1999). Die Transmembrandomäne III, IV und V bilden hypervariable Abschnitte (Buck and Axel, 1991), die an der Ausgestaltung der Bindungstasche der Rezeptormoleküle beteiligt sein könnten (Singer and Shepherd, 1994).

Über *in situ* Hybridisierungen konnten die RNA Transkripte in den olfaktorischen Rezeptor Neuronen (ORN) nachgewiesen werden. Die ersten Experimente dieser Art wurden an der Ratte durchgeführt. Es wurden nur wenige hybridisierende ORN (Vassar et al., 1993) pro OR-Sonde im Vergleich zu den 50 Millionen ORN eines Epitheliums (Buck, 1996) gefunden. Pro ORN konnte jeweils nur ein OR-Typ, niemals zwei oder mehrere verschiedene OR-Typen nachgewiesen werden; siehe aber (Rawson et al., 2000). Der bis heute beste Beweis dieser ein OR-Typ pro ORN Regel lieferte die Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion an individuellen ORN. In diesen Experimenten konnte pro ORN nur ein OR-Typ amplifiziert werden (Kajiya et al., 2001; Malnic et al., 1999; Touhara et al., 1999). Darüber hinaus konnte sogar gezeigt werden, dass jeweils nur eines von zwei Allelen eines bestimmten OR Genes transkribiert wird (Chess et al., 1994). Ein Befund, der allelische Exklusion genannt wird. Aufgrund der Komplexität des Problems konnte erst vor kurzem ein erster Kontrollmechanismus der OR Expression demonstriert werden. Die Expression eines OR Gens in jedem der circa 2 Millionen ORN der Maus von nur einem Allel erscheint abhängig von der erfolgreichen Expression eines OR-Proteins zu sein (Lewcock and Reed, 2004; Serizawa et al., 2003; Shykind et al., 2004). Durch diese Experimente wurde ein "feedback-Mechanismus" postuliert, in dem ein funktionaler OR die Wahl des OR

Gens, von dem die Expression stattfindet, stabilisiert. Wie dieser "feedback-Mechanismus" genau funktioniert, ist bisher noch nicht bekannt.

Die OR Superfamilie kann aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in Unterfamilien aufgeteilt werden. Es gibt Hinweise darauf, dass Mitglieder einer Unterfamilie ähnliche Grundstrukturen von Geruchsstoffen erkennen, wobei bei den einzelnen Mitgliedern einer Unterfamilie geringfügige molekulare Veränderungen des Geruchsstoffes zu unterschiedlich starken Bindungen führen (Kajiya et al., 2001; Malnic et al., 1999). Für die Identifikation eines Geruchsstoffes ist immer eine Kombination verschiedener OR verantwortlich: Einzelne OR erkennen mehrere verschiedene Geruchsstoffe, z.B. (Fried et al., 2002; Malnic et al., 1999; Touhara et al., 1999) und ein Geruchsstoff wird von mehreren OR erkannt, z.B. (Fried et al., 2002; Kajiya et al., 2001). Mit einer einfachen Rechnung kann man die diskriminative Fähigkeit des Geruchssystem verdeutlichen: Würde ein Geruchsstoff von drei verschiedenen OR erkannt werden und gäbe es für die Geruchsstofferkennung nur die Zustände: Erkannt oder nicht erkannt, so könnte das Geruchssystem von Mäusen mit etwa 1000 verschiedenen OR beinahe eine Milliarde verschiedenartiger Gerüche unterscheiden. Interessanterweise befinden sich die verschiedenen OR Gene auf vielen verschiedenen Chromosomenabschnitten, wobei jedoch eng verwandte OR Gene oft im selben Chromosomenabschnitt liegen, zusammengefasst bei (Godfrey et al., 2004; Mombaerts, 2004a). Spekulationen über chromosomale Abschnitte, deren Genprodukte für die Perzeption von bestimmten Geruchsstoffkategorien verantwortlich sind, finden sich daher des öfteren in der neueren Literatur (Godfrey et al., 2004; Malnic et al., 2004; Takahashi et al., 2004a; Zhang and Firestein, 2002).

Der enormen Vielfalt an Gerüchen steht also auf der Ebene der OR (und damit auch ORN) die enorme Größe der OR Familie gegenüber. Ein Geruch ist demnach in der spezifischen Kombination der OR, die die unterschiedlichen Moleküle eines Geruches binden können, definiert. Vergleiche mit anderen Sinnessystemen verdeutlichen die Komplexität des olfaktorischen Systems. Für die Kodierung der Wellenlänge einer Farbe werden im visuellen System nur wenige unterschiedliche Photopigmente (Photorezeptoren) benötigt (bei dem Menschen nur drei), die jeweils nur durch Photonen, aus einem Teil des sichtbaren Wellenlängenspektrums stammend, aktiviert werden können. Die Teilbereiche des Wellenlängenspektrums der verschiedenen Photopigmente überlappen sich, so dass ein bestimmte Farbe als Kombination der aktivierten Photopigmente kodiert ist. Durch die Kombination einiger weniger reagierender Photopigmente und die räumliche Lage der Lichtsinneszellen, die diese Photopigmente tragen, werden farbige, dreidimensional angeordnete Objekte im visuellen System abgebildet (siehe Fig.1). Das Geruchssystem besteht hingegen aus vielen Rezeptoren die mit dem Reiz interagieren können. Da die Zahl der

unterschiedlichen OR die Anzahl der Parameter bedingt, nach denen ein Geruch eingestuft werden kann, erscheint der Geruchssinn multidimensional und um vieles komplexer als das visuelle oder auditorische System.

1.3. Morphologie des Geruchssystems – die Nasenhöhle

In der Nasenhöhle von Nagetieren finden sich zwei sensorische Epithelien, die zwei olfaktorischen Organen beziehungsweise Systemen angehören. Das Epithel des vomeronasalen Organs (VNO) und das Epithel des zentralen oder Hauptgeruchssystems, zumeist nur olfaktorisches Epithel genannt (Fig.1). Dem an der Basis der Nasenscheidewand (Septum) gelegenen VNO wird eine Bedeutung in der Wahrnehmung von Pheromonen zugeschrieben (Kumar et al., 1999; Tirindelli et al., 1998). Das Epithel des zentralen Geruchssystems erstreckt sich über den gesamten posterioren Nasenraum, der von weit verzweigten knorpeligen Strukturen, den Turbinalien, und der posterioren Nasenscheidewand gebildet wird. In zerstreut angeordneten Bowmanschen Drüsen wird ein Mukus produziert, der die Epithelien im Nasenraum überzieht. Neben Ionen [in der Ratte: Chlorid 55mM, Kalium 69mM, Natrium 55mM, Phosphat 77mM, Sulfat 57mM (Reuter et al., 1998)] befinden sich auch verschiedene Proteine im Mukus. Die "odorant-binding-proteins" (OBPs) beispielsweise gehören der Proteinfamilie der Lipokaline an (Pelosi, 1996). Vermutlich beeinflussen sie die Löslichkeit der zumeist hydrophoben Geruchsstoffe in dem wässrigen Milieu des Mukus.

Die ORN tragen an ihrem apikalen Pol einen Dendriten, dem entweder unbewegliche Zilien (Hauptgeruchssystem) oder Mikrovilli (VNO) entspringen. Die Zilien und Mikrovilli ragen bis in die Mukusschicht, wo sie in direktem Kontakt mit der Außenwelt stehen und vermehrt OR-Proteine in ihrer Zellmembran tragen. Die Axone der ORN sind unverzweigt, unmyelinisiert und terminieren im olfaktorischen Bulbus. Stammen die ORN aus dem VNO projizieren sie in einen spezialisierten, posterior gelegenen Teil des Bulbus, der akzessorischer olfaktorischer Bulbus (AOB) genannt wird.

Schon in den frühen *in situ* Hybridisierungen mit einzelnen OR-Sonden konnte ein Hybridisierungsmuster erkannt werden, in dem die einzelnen OR exprimierenden ORN nicht über die gesamte Fläche des sensorischen Epithels verteilt lagen (Raming et al., 1993). Die daraufhin folgenden detaillierteren Untersuchungen an der Maus (Ressler et al., 1993) oder Ratte (Vassar et al., 1993) zeigten mehrere Zonen, in denen die verschiedenen ORN verteilt lagen. In diesen Studien wurden vier Zonen vorgestellt, die sich nicht überlappten. Neuere Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass sich zumindest in drei der vier postulierten Zonen die ORN einer Zone wesentlich stärker mit ORN einer

benachbarten Zone vermischen können, als ursprünglich angenommen (Iwema et al., 2004). ORN eines OR-Typs erscheinen innerhalb ihrer Zone zufällig verteilt zu liegen (Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993; Sullivan, 1995); siehe aber (Strotmann et al., 1999). Die Zonen erstrecken sich in Form von Streifen über die Turbinalien und die Nasenscheidewand, zusammengefasst beispielsweise in (Mombaerts, 1999b). Die bisher untersuchten Mitglieder einer OR-Familie sind in der gleichen Zone exprimiert, z.B. (Tsuboi et al., 1999).

Die OR sind nur in ausdifferenzierten ORN exprimiert, in denen sie die Bindung von Geruchsstoffen in Form einer Konformationsänderung weiterleiten. Eine ORN spezifische α -Untereinheit des an die OR bindenden G-Proteins, G_{olf} (Jones and Reed, 1989) aktiviert die ebenfalls zelltypspezifische Adenylatzyklase III (Bakalyar and Reed, 1990), die ihrerseits die intrazelluläre cAMP Konzentration ansteigen lässt. Hierdurch werden zyklische nukleotidsensitive Kalziumkanäle (CNG-Kalziumkanäle) in der Zilienmembran geöffnet. Ein kalziumabhängiger Chloridkanal (Kurahashi and Yau, 1993; Kurahashi and Yau, 1994, Frings, 2000), der aufgrund des Ionenmilieus in den ORN und der Mukusschicht einen Ausstrom von Chloridionen bei der Bindung von Kalzium vermittelt (Reuter, 1998), ist der eigentliche Träger der geruchsstoffvermittelten Depolarisierung der ORN. Zu diesem cAMP vermittelten Signaltransduktionsweg wird ein weiterer IP_3 -Signaltransduktionsweg für einige Geruchsstoffe teilweise kontrovers diskutiert (Boekhoff et al., 1990; Schild and Restrepo, 1998).

1.4. Morphologie des Geruchssystems – der olfaktorische Bulbus

Der olfaktorische Bulbus ist ein Allokokortex, der wie andere kortikale Strukturen in charakteristischen Schichten aufgebaut ist. Die unmyelinisierten Axone der ORN verlaufen bei der Maus, in Faszikeln gebündelt, durch die Siebbeinplatte in den olfaktorischen Bulbus, wo sie die äußerste Schicht bilden. In regelmäßigen Abständen biegen einzelne Axonbündel aus der Axonschicht in die darunter gelegene Schicht ab, in der sie 50 μ m bis 200 μ m große, anatomisch erkennbare sphäroide Strukturen, Glomeruli genannt, ausbilden. Diese Schicht wird daher auch als glomeruläre Schicht bezeichnet.

In den Glomeruli bilden die Axone glutamaterge Synapsen mit den apikalen Dendriten der Mitralzellen und Büschelzellen (engl.: tufted cells, Fig.2), wobei bei Säugern eine Mitralzelle nur mit einem Glomerulus direkt verschaltet ist. Insgesamt etwa 20 Mitralzellen senden Dendriten zu einem Glomerulus (Hildebrand et al., 1997). Das Zentrum eines Glomerulus ist eine dichte neuropile Struktur, die durch Astrozyten und sogenannte juxtglomeruläre Nervenzellen

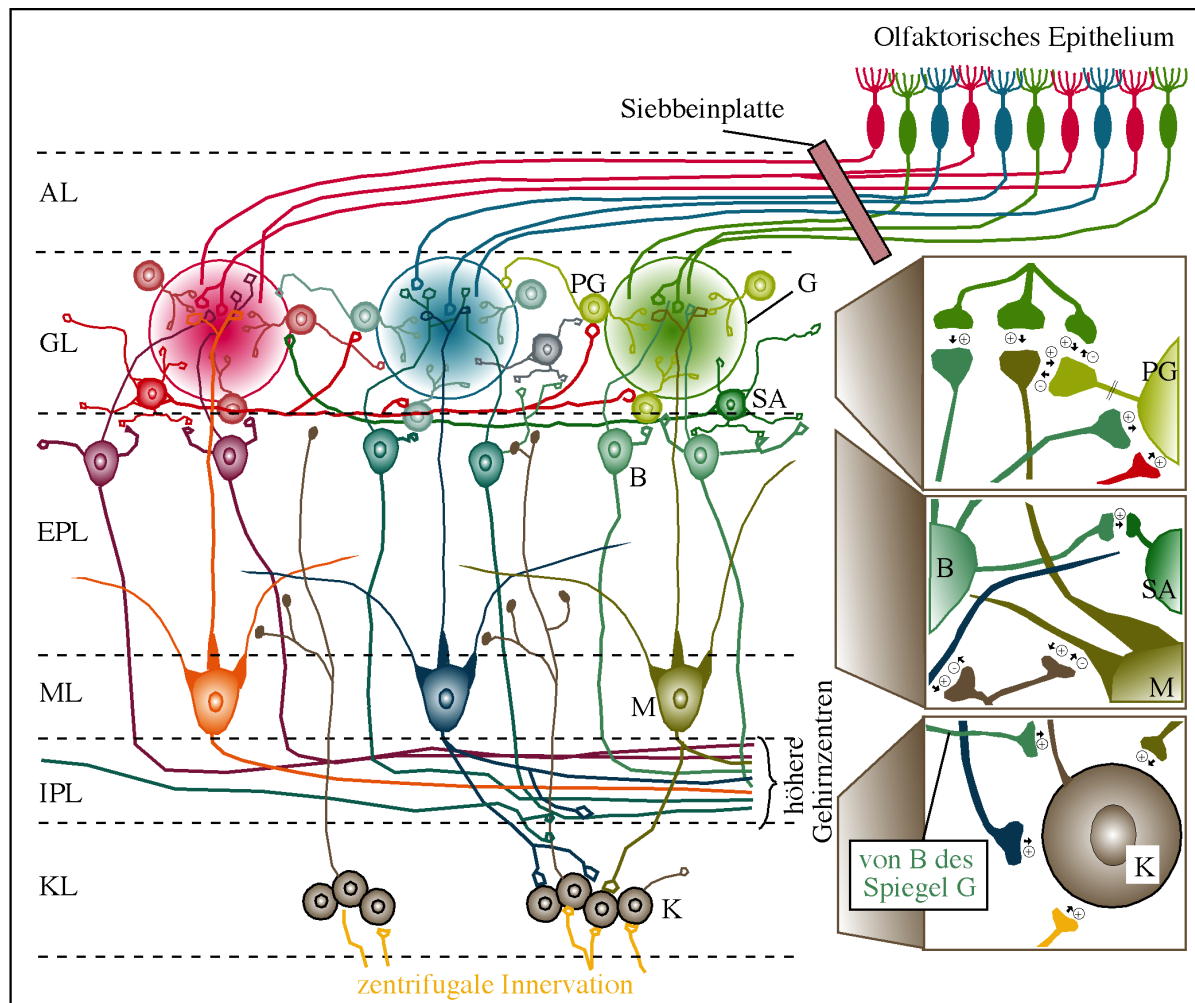


Fig. 2 Schematische Darstellung des neuronalen Netzwerkes im olfaktorischen Bulbus der Maus.

Vereinfachte Darstellung der funktionalen synaptischen Architektur des olfaktorischen Verarbeitungsschaltkreises im Bulbus von Mäusen. Gezeigt sind die Verhältnisse für drei spektral unterschiedlich sensitive Kanäle (rot, blau, grün), die jeweils durch die Expression eines OR-Typs charakterisiert werden. Axone der ORN laufen in der Axon-Schicht (AL) bis rezeptorgleich ORN auf einen gemeinsamen Glomerulus in der glomerulären Schicht (GL) konvergieren. Die Terminalien der ORN bilden erregende glutamaterge Synapsen mit den primären Dendriten der Mitralzellen (M) und den Dendriten der Büschelzellen (B). Periglomeruläre Zellen (PG) und Kurzaxonzellen (SA) verbinden die ORN inhibitorisch über teilweise reziproke Synapsen mit den Dendritenschäften benachbarter Mitralzellen. Unter der Externen plexiformen Schicht (EPL) liegt die Mitralschicht (ML) mit den Somata der Mitralzellen, deren Axone zunächst in der internen plexiformen Schicht (IPL) verlaufen, um schließlich in höhere Gehirnzentren zu terminieren. Körnerzellen (K), deren Somata in der Körnerzellschicht (KL) liegen, vermitteln laterale Interaktionen zwischen den Mitralzellen. Sie verbinden die sekundären Dendriten benachbarter Mitralzellen über reziproke dendro-dendritische Synapsen. Die Körnerzellen erhalten auch zentrifugale Innervationen aus den primären Projektionsgebieten des Bulbus (verändert nach Aungst JL 2003).

umgrenzt ist. Zu den juxtaglomerulären Zellen zählen periglomeruläre Zellen, äußere Büschelzellen (engl.: external tufted cells) und Nervenzellen, denen früher fälschlicherweise nur ein kurzes Axon zugeordnet wurde (engl.: short axon cells; Fig.2). Die Funktion des Netzwerkes aus juxtaglomerulären Zellen besteht vermutlich in der Möglichkeit benachbarte Glomeruli inhibieren zu können (engl.: centre-on, off-surround inhibition: (Aungst et al., 2003). Darüber hinaus sind die äußeren Büschelzellen mit den Körnerzellen direkt unter dem Spiegel-Glomerulus

(siehe unten) synaptisch verbunden (Lodovichi et al., 2003). Möglicherweise werden so die beiden Spiegelhemisphären eines Bulbus miteinander koordiniert.

Die Zellkörper der Mitralzellen formen ein schmales Band, die Mitralzellschicht. Sie ist bei der Maus etwa 200µm unterhalb der glomerulären Schicht gelegen. Zwischen Mitralzell- und glomerulärer Schicht erstreckt sich die externe, plexiforme Schicht, die überwiegend durch Dendriten der Mitral- und Büschelzellen und Verzweigungen lokaler Interneurone aufgebaut wird. Mitralzellen verfügen nicht nur über die primären Dendriten, die im Glomerulus mit den ORN verschaltet sind, sondern auch über sekundäre Dendriten. Die sekundären Dendriten einer einzigen Mitralzelle können sich in der plexiformen Schicht bis über 25% des gesamten Bulbus ausbreiten (Shiplely and Ennis, 1996). Die Zellen einer weiteren, tiefer gelegenen Schicht, die Körnerzellen (engl.: granule cell), verbinden die sekundären Dendriten benachbarter Mitralzellen durch reziproke Synapsen untereinander (Mori et al., 1998) und bilden ein weiteres, inhibitorisch wirkendes Netzwerk aus. Über eine 'feedback'-Schleife können sich die Mitralzellen auch selbst inhibieren. Axonkolaterale der Mitralzellen erregen Körnerzellen, die hemmend auf die Mitralzelle zurückwirken. Große Teile dieser Verschaltungen liegen in der internen plexiformen Schicht, die zwischen der Körnerzellschicht und der Mitralzellschicht liegt und, wie die externe plexiforme Schicht, hauptsächlich aus Dendriten und Axonen besteht.

Die Axone der Mitral- und Büschelzellen verlassen den olfaktorischen Bulbus über den lateralen olfaktorischen Trakt und projizieren parallel in verschiedene Cortexareale (z.B.: Piriformer Cortex, endorhinaler Cortex, diverse Nuklei der Amygdala, olfaktorische Pedunkel, olfaktorische Tuberkel). Mitral- und Büschelzellen leiten somit die olfaktorische Information weiter und werden daher als die primären Ausgangsneuronen angesehen. Von den primären Projektionsgebieten sowie einigen Arealen, die nicht von Mitral- oder Büschelzellen innerviert werden, gehen zentrifugale Innervationen in den olfaktorischen Bulbus zurück, die auf den Körnerzellen enden und somit inhibitorisch auf Mitralzellen zurückwirken können.

Die Morphologie des olfaktorischen Bulbus wurde unter anderem von Shipley und Ennis umfangreich zusammengefasst (Shiplely and Ennis, 1996).

1.5. Organisationsprinzipien der Glomeruli

OR Gene zählen zu den stark exprimierten Genen in ORN. Schätzungen ergaben etwa 1000 mRNA Kopien pro Zelle (Vassar et al., 1993). Dieser hohen Expressionsrate sowie der besonders dichten Innervation von Glomeruli (bis zu 25.000 ORN pro Glomerulus, durchschnittlich aber 1000 bis 3000 ORN pro

Glomeruli, (Hildebrand et al., 1997) ist der Erfolg eines bemerkenswerten Experimentes, in dem die OR-mRNA in ORN-Terminalien nachgewiesen werden konnte, zu verdanken (Ressler, 1994; Vassar et al., 1993). Erstaunlicherweise konnte die mRNA eines bestimmten OR nur in wenigen Punkten im olfaktorischen Bulbus entdeckt werden, die mit den morphologisch erkennbaren Glomeruli leicht zu korrelieren waren. Die Verteilung dieser Glomeruli erschien bilateral symmetrisch und interindividuell gleichbleibend zu sein.

In diesen Experimenten konnte man jedoch nicht zeigen, dass alle Zellen die einen OR exprimieren, in dieselben bilateral symmetrisch verteilten Glomeruli projizieren, noch dass ein Glomerulus nur aus einem OR exprimierenden ORN-Typ gebildet wird. Aus diesem Grund wurde ein genetischer Ansatz entwickelt, in dem einzelne ORN eines ORN-Typs vom Epithel bis in den olfaktorischen Bulbus hinein visualisiert werden können (Mombaerts et al., 1996a; Mombaerts et al., 1996b). Mäuse wurden genetisch verändert, um einen Reporter (tau-eGFP oder tau-LacZ: (Mombaerts et al., 1996a), (Potter et al., 2001) durch den Promotor eines bestimmten OR-Gens mit dem OR exprimieren zu lassen. Die Verwendung einer 'Internal Ribosomal Entry Site' (IRES) konnte die gleichzeitige Expression von Rezeptor und Promotor gewährleisten. In derart genetisch veränderten Mäusen liegen markierte ORN in für den OR spezifischen Zonen des olfaktorischen Epithels (siehe oben), ihre Axone konvergieren im Regelfall in zwei Glomeruli, einem medialen und einem lateralen.

Die Verbindung der aus den unterschiedlichen Experimenten gewonnenen Daten erlaubt ein recht genaues Bild des glomerulären Organisationsprinzips im olfaktorischen Bulbus: ORN eines ORN-Typs konvergieren in zwei spiegelbildlich, interindividuell stereotyp angeordneten Glomeruli. ORN-Typen mit eng verwandten OR konvergieren in benachbarte Glomeruli (Strotmann et al., 2000; Tsuboi et al., 1999), für M71 und M72 vergleiche (Potter et al., 2001) und (Bozza et al., 2002). Daraus folgt, dass auch die zonale Unterteilung des olfaktorischen Epithels im olfaktorischen Bulbus wiederzufinden ist (Nagao et al., 2000; Schoenfeld, 1994; Schwob and Gottlieb, 1986). Die stereotype Lage von Glomeruli scheint sowohl zwischen den beiden Bulbi eines Individuums als auch zwischen zwei Individuen gut erhalten zu sein. In ersten genaueren Untersuchungen der Lage zweier Glomeruli zueinander konnte die Variabilität der Lage auf drei bis vier Glomerulidurchmesser bestimmt werden (Royal and Key, 1999; Schaefer et al., 2001; Strotmann et al., 2000). Auch die Anzahl der Glomeruli pro Bulbus ist bei Mäusen mit etwa 1.800 (Royet et al., 1988) recht konstant. Vergleiche mit der Anzahl identifizierter funktionaler OR von mehr als 900 (Godfrey et al., 2004; Zhang and Firestein, 2002) lassen vermuten, dass nicht jeder ORN-Typ in zwei Glomeruli konvergieren kann. Für die Rezeptoren der MOR 37 Genfamilie wurde dann auch nur jeweils ein Zielglomerulus im Bulbus gefunden. Interessanterweise liegen alle

Glomeruli dieser Rezeptorfamilie auf der Spiegelachse des Bulbus (Strotmann et al., 1999).

1.6. Axonale Zielfindung

Wenn die Lage eines Glomerulus im olfaktorischen Bulbus interindividuell stereotyp ist, wie finden dann die einzelnen ORN, die in einen Glomerulus konvergieren unter den 900 verschiedenen Glomeruli einer Spiegelhemisphäre des Bulbus genau diesen Glomerulus? Oder anders gefragt: wie werden die Positionen der 900 verschiedenen Glomeruli definiert?

Überall im Körper werden wachsende Nervenzellen von einer Vielzahl unterschiedlicher, anziehend und abstoßend wirkender, Wegfindungsmoleküle beeinflusst, z.B. (Timothy, 2001). Unter den bekannten Familien der Wegfindungsmoleküle wurden Netrine, Eph Rezeptoren, Slit/Robo und Semaphorine im olfaktorischen System gefunden. Zum Beispiel konnte für Netrin-1 die Bedeutung in der Wegfindung einiger VNO Axone gezeigt werden (Schwartz et al., 2001). Der Verlust von Mitgliedern der EphA Familie führt zu einer beeinträchtigten Zielfindung von ORN- und VNO-Axonon (Knoll et al., 2001; Cutforth, 2003). Slit und Robo beeinflussen den LOT und konnten in Wegfindungsprozessen von VNO-Axonon nachgewiesen werden (Knoll et al., 2003; Nguyen-Ba-Charvet and Chedotal, 2002) und schließlich, Semaphorine der Klasse 3 regulieren die Ausprägung der beiden Spiegelhemisphären des olfaktorischen Bulbus zumindest in der Maus (Schwartz et al., 2004; Taniguchi et al., 2003). Bisher konnte jedoch keine ausreichend komplexe Verteilung der unterschiedlichen Wegfindungsmoleküle im olfaktorischen Bulbus gefunden werden, die den nötigen Informationsgehalt besäße, um die Lage von 900 verschiedenen Glomeruli auch nur halbwegs stereotyp zu definieren.

In mehreren Studien wurde dem OR selber eine Bedeutung für die Ausprägung des glomerulären Musters zugeschrieben. Zumeist wurde in diesen Experimenten ein OR gegen einen anderen OR ausgetauscht, so dass die unterschiedlichsten OR von demselben chromosomalen OR-Lokus aus gesteuert wurden. Erste Vermutungen, der OR würde die Lage des Glomerulus entlang einer anterior/posterioren-Achse im Bulbus bestimmen (Wang et al., 1998), haben sich als falsch erwiesen. In neueren Studien erscheint die "Identität" eines ORN für die Lage des Glomerulus maßgebend (Feinstein et al., 2004; Feinstein and Mombaerts, 2004). Hierbei wird spekuliert, dass die Glomeruli durch, auf dem OR-Protein beruhenden, homotypischen, Interaktionen der ORN untereinander gebildet werden. Der Aminosäuresequenz der OR kommt demnach eine zentrale Bedeutung in diesem "Identität-Modell" ORN zu. Nicht nur der OR bestimmt dabei

die "Identität", sondern auch die Expressionshäufigkeit eines OR beeinflusst die homotypischen OR-Interaktionen. Darüber hinaus wird der Lage der ORN im olfaktorischen Epithel eine Bedeutung zugeschrieben. Diese könnte grundlegende Unterschiede der ORN festlegen. So konnte beispielsweise in ORN, die im Epithel ventral liegen, das Zell-Adhäsionsmolekül OCAM nachgewiesen werden. In dorsalen ORN wurden keine OCAM Moleküle gefunden (Yoshihara et al., 1997).

Die Bedeutung des OR für die axonale Zielfindung lässt rezeptorvermittelte ORN-Aktivitäten als mögliche Grundlage dieses Phänomens zu. ORN die einen OR exprimieren, liegen im olfaktorischen Epithel teilweise weit auseinander. Durch Geruchsstoffe könnte ihre Antwort jedoch synchronisiert werden. In unabhängigen Studien wurde daher der Einfluss neuronaler Aktivität auf die Ausbildung glomerulärer Muster untersucht (Lin et al., 2000; Zhao and Reed, 2001; Zheng et al., 2000). Ist der CNG-Kanal in ORN in transgenen Mäusen funktionsunfähig, wird also die Signaltransduktionskaskade gestört und jegliche geruchsstoffvermittelte ORN-Antwort verhindert, bilden sich dennoch die stereotypen glomerulären Muster aus. In der Analyse von heterozygoten CNG *knock out* Mäusen konnte jedoch eine massive Verdrängung der inaktiven ORN durch die aktivierbaren ORN gezeigt werden (Zhao and Reed, 2001). Ähnlich der retinalen Projektion in den Thalamus ist die neuronale, möglicherweise geruchsstoffsynchronisierte neuronale Antwort für das Überleben der ORN und die Beständigkeit ihrer synaptischen Verbindungen von Bedeutung. Die Lage eines Glomerulus ist aber nicht von der neuronalen Aktivität der ORN abhängig.

Im beschriebenen Modell der axonalen "Identität" spielen homotypische Interaktionen zwischen ORN eine Rolle. Es wäre aber genauso gut eine Interaktion zwischen ORN und den postsynaptischen Neuronen oder, auf die axonale Wegfindung spezialisierte "Pionierneuronen" (Jhaveri and Rodrigues, 2002; Whitlock and Westerfield, 1998) denkbar. In transgenen Mäusen, die keine Inter- oder Projektionsneurone besitzen, konnte ein dem Wildtyp entsprechendes, stereotypisches glomeruläres Muster demonstriert werden (Bulfone et al., 1998). Für die axonale Zielfindung sind also Inter- oder Projektionsneurone unbedeutend. Durch die einzigartige Fähigkeit des Geruchssystems, ORN laufend zu ersetzen (Graziadei and Graziadei, 1979a; Graziadei and Graziadei, 1979b), kann der Einfluss von möglichen "Pionierneuronen" untersucht werden. Lässt man ORN, die den P2-OR - einen der funktionalen OR in der Maus – exprimieren, absterben, deutet nichts auf eine Notwendigkeit von "Pionierneuronen" bei der Neubildung der P2-ORN und P2-Glomeruli hin (Gogos et al., 2000).

1.7. Repräsentation von Geruchsstoffen

Chromatographische Prinzipien, nach denen Geruchsstoffe über den Mukus der Nasenschleimhaut aufgetrennt werden können, haben sich für die Wahrnehmung von Gerüchen als unbedeutend erwiesen (Kent et al., 1996). Obwohl nur wenig über die Turbulenzen der Luftströmung in der Nase bekannt ist (Kauer and White, 2001), erscheint eine homogene Durchmischung der eingeatmeten Geruchsstoffe wahrscheinlich. Zusammen deuten derartige Befunde auf eine räumlich verteilte Repräsentation von Geruchsstoffen im Epithel hin. Die Wahl des OR, der den ORN-Typ bestimmt, ist in ausdifferenzierten ORN stabil (Shykind et al., 2004), so dass die gefundene zonale Verteilung der geruchsstoffaktivierten ORN-Antwort alleine durch die Verteilung der OR in den Zonen und dem Ligandenspektrum der einzelnen OR erklärbar ist (Chaput and Chalansonnet, 1997; Kent and Mozell, 1992; Sato et al., 1994; Scott et al., 1996). Geruchsinformation ist also in der Nasenschleimhaut nicht wie in anderen Sinnessystemen räumlich, sondern durch die quasi ungeordnete Verteilung der OR-Typen repräsentiert.

Im olfaktorischen Bulbus wird die ungeordnet erscheinende Repräsentation des Epithels in Glomeruli angeordnet. Jeder OR ist zweimal in einem Bulbus, siehe aber (Strotmann et al., 1999), das heißt viermal im gesamten System abgebildet (die funktionelle Relevanz dieser Verdopplung ist bisher nicht bekannt). Im Bulbus ist daher ein Geruchsstoff in Form von glomerulären Aktivitätsmustern kodiert. Aufgrund der 1:1 Korrelation von Glomeruli und Rezeptoren und der stereotypen Lage der Glomeruli kann aus dem Aktivitätsmuster auf die OR, die eine Wechselwirkung mit dem Geruchsstoff eingehen, und theoretisch auch auf den Geruchsstoff selber zurückgeschlossen werden. Entsprechend sind mit verschiedenen Methoden geruchsstoffspezifische räumlich umschriebene Areale neuronaler Aktivität gefunden worden (Guthrie et al., 1993; Johnson et al., 1998; Lancet et al., 1982; Yang et al., 1997), die je nach Auflösung der Methode teilweise exakte glomeruläre Aktivitätsmuster ergeben (Fried et al., 2002; Johnson and Leon, 2000a; Johnson and Leon, 2000b; Meister and Bonhoeffer, 2001; Rubin and Katz, 1999; Wachowiak and Cohen, 2001). Die nach OR geordnete typologische Repräsentation im olfaktorischen Epithel wird also im Bulbus in glomeruläre Aktivitätsmuster übersetzt.

Schon die ersten Ergebnisse mit Methoden, die nur ein geringes Auflösungsvermögen besaßen, konnten die Chemotopie der geruchsstoffaktivierten Areale im olfaktorischen Bulbus zeigen (Guthrie et al., 1993; Johnson et al., 1998; Lancet et al., 1982): Ähnliche Geruchsstoffe führen zu ähnlichen aktivierten Arealen. Neuere Experimente konnten die Chemotopie nicht nur bestätigen, sondern auch bis zu einzelnen Glomeruli hin auflösen (Fried et al.,

2002; Friedrich and Korsching, 1997; Friedrich and Korsching, 1998; Johnson et al., 1999; Meister and Bonhoeffer, 2001; Rubin and Katz, 1999). Das genaue Aktivitätsmuster der aktivierten Glomeruli ist aber selbst bei sehr ähnlichen Geruchsstoffen immer zumindest leicht unterschiedlich (Linster et al., 2001; Rubin and Katz, 2001). Oft antworten einzelne Glomeruli auf mehrere Geruchsstoffe, so dass sich die Aktivitätsmuster verschiedener Geruchsstoffe überlappen, ein Phänomen, das als kombinatorische Repräsentation bezeichnet wird. Mit zunehmender Geruchsstoffkonzentration werden zunehmend mehr Glomeruli zu den Aktivitätsmustern rekrutiert, wobei Aktivitätsmuster eng verwandter Geruchsstoffe immer ähnlicher werden (Fried et al., 2002; Friedrich and Korsching, 1997; Fuss and Korsching, 2001; Meister and Bonhoeffer, 2001). Die genauen Prinzipien der Repräsentation von Geruchsstoffen auf der Ebene von Glomeruli werden aber noch intensiv wissenschaftlich beforscht, zusammengefasst bei (Korsching, 2001).

Die in glomeruläre Aktivitätsmuster geordnete ORN-Aktivität wird an die prinzipiellen Ausgangsneurone (Mitral- und Büschelzellen) weitergeleitet. Mit elektrophysiologischen Methoden konnte ein, verglichen mit dem Antwortspektrum der sie innervierenden ORN, etwas engeres Antwortspektrum von Mitralzellen auf verschiedene Geruchsstoffe demonstriert werden (Yokoi et al., 1995). Darüber hinaus werden durch die Interaktionen mit hauptsächlich Körnerzellen die Mitralzellen 'lateral inhibiert' und ihre Aktionspotentiale zu Oszillationen hin verändert (Chen et al., 2000; Lagier et al., 2004; Laurent et al., 1996; Lowe, 2003; MacLeod and Laurent, 1996; Yokoi et al., 1995). Ein weiteres ebenfalls inhibitorisches Netzwerk wurde erst vor kurzem näher beschrieben und greift schon auf glomerulärer Ebene über ein Netzwerk aus periglomerulären Zellen, äußeren Büschelzellen und "Kurzaxonzellen" (engl.: short axon cells) in die Geruchsverarbeitung ein (Aungst et al., 2003). Als Folge dieser lateralen Interaktionen wird die zeitliche Synchronisation des Aktionspotentialmusters verschiedener Mitralzellen, die an der Erkennung eines Geruchsstoffes beteiligt sind, diskutiert (Friedrich and Laurent, 2001; Friedrich and Laurent, 2004; Friedrich et al., 2004; Kashiwadani et al., 1999; Lei et al., 2002). Die zeitliche Bindung der primären Ausgangsneurone soll vor allem Bedeutung für das Auslesen von Geruchsinformation in höheren Verarbeitungsebenen besitzen (Singer, 1999). Die Bedeutung der rhythmischen Aktivität für die Differenzierung einzelner Geruchsstoffe wurde im Antennenlobus der Honigbiene, eine dem olfaktorischen Bulbus von Säugetieren prinzipiell ähnlich aufgebaute, zentralnervöse Struktur untersucht. Durch die Blockade des inhibitorischen Netzwerkes mit GABA_A-Rezeptorblockern verlor die Biene die Fähigkeit, eng verwandte Geruchsstoffe zu unterscheiden. Strukturell deutlich unterschiedliche Geruchsstoffe hingegen konnte die Biene weiterhin auseinanderhalten (Stopfer et al., 1997). Traditionell wurde die laterale Inhibition jedoch als Kontrastschärfung ähnlich den

Mechanismen in der Retina interpretiert (Yokoi et al., 1995), wobei die auftretenden Oszillationen, die sich durch die inhibitorischen Verschaltungen ergeben, als Epiphänomen gewertet wurden. Wie weit der lateralen Inhibition als Prinzip der Stimuluskontrastschärfung benachbarter Glomeruli oder Regulator der zeitlichen Bindung unterschiedlicher Mitralzellen eine Bedeutung zukommt, ist daher noch nicht endgültig geklärt.

Wie nun ist die Information über Geruchsstoffe im olfaktorischen Kortex, in dem letztendlich der Eindruck unterschiedlicher Gerüche entsteht, organisiert? Anatomische Untersuchungen belegten das Fehlen einer räumlichen Organisation, wie sie im olfaktorischen Bulbus vorliegt. Unterschiedliche Kortexareale werden von Mitralzellen eines Glomerulus innerviert und in einem Kortexareal terminieren Mitralzellen aus unterschiedlichen Bulbusregionen (Shipley and Ennis, 1996). Dennoch ist es gelungen, ein stereotypes Innervierungsmuster beispielsweise im olfaktorischen Kortex nachzuweisen, bei dem Mitralzellen aus einem Glomerulus auf Gruppen von Neuronen einer begrenzten Anzahl verschiedener Kortexareale projizieren (Zou et al., 2001). Würde bei der Projektion die exakte glomeruläre Aufteilung erhalten bleiben, sollte jedoch ein viel kleineres kortikales Projektionsfeld innerviert werden als tatsächlich gefunden wurde. Auch die Untersuchungen von kortikalen Aktivitätsmustern sprechen für die räumlich verteilte Representation von Geruchsstoffen im olfaktorischen Kortex, bei der die glomerulären Aktivitätsmuster des Bulbus nicht wieder zu finden sind (Illig and Haberly, 2003). Darüber hinaus erscheinen Zellen des olfaktorischen Kortex synchronisiert auf Geruchsstoffstimuli zu antworten, so dass eine Bedeutung der oben besprochenen zeitlichen Bindung der primären Ausgangsneurone vorstellbar ist (Litaudon et al., 2003). Die chemotope Kodierung von Geruchsstoffen in glomerulären Aktivitätsmustern wird demnach vermutlich zumindest teilweise in zeitliche Aktivitätsmuster übertragen.

1.8. Untersuchte Fragestellungen

Noch bei dem Beginn dieser Arbeit waren die Grundprinzipien der Geruchskodierung auf der Ebene von ORN, Mitralzellen oder diese beeinflussende Interneurone nur ansatzweise bekannt (Friedrich and Korsching, 1997; Friedrich and Korsching, 1998; Johnson et al., 1998; Rubin and Katz, 1999). Seitdem ist dieses Gebiet intensiv beforscht worden und eine ganze Reihe der Grundprinzipien veröffentlicht und in dieser Einleitung beschrieben worden (Fried et al., 2002; Friedrich and Laurent, 2001; Friedrich and Laurent, 2004; Fuss and Korsching, 2001; Meister and Bonhoeffer, 2001; Rubin and Katz, 2001; Takahashi et al., 2004a; Uchida et al., 2000; Wachowiak and Cohen, 2001). In dieser Arbeit wurden

die Kodierungsprinzipien exklusiv in den Eingangsneuronen des Bulbus, den ORN, untersucht. Durch den gewählten Versuchsansatz (optisches Imagen intrinsischer Fluoreszenzsignale, z.B.: (Meister and Bonhoeffer, 2001; Rubin and Katz, 1999; Takahashi et al., 2004a; Uchida et al., 2000)) wurde in der überwiegenden Mehrheit der veröffentlichten Arbeiten nicht klar zwischen dem Eingangssignal der ORN und dem Signal der Ausgangs- und Interneurone unterschieden. Durch die Verwendung von kalziumsensitiven Farbstoffen konnte spezifisch die Aktivität der ORN im olfaktorischen Bulbus untersucht werden. Bei dieser Methode, die bereits auch für Mäuse beschrieben wurde (Fried et al., 2002; Wachowiak and Cohen, 2001), wird über die Nase der kalziumsensitive Farbstoff "Calcium-Green-Dextran" in die ORN eingeschleust, um nach einem anterograden Transport des Farbstoffes in die Axonterminalien im olfaktorischen Bulbus gezielt in ORN Kalziumkonzentrationsänderungen messen zu können. Diese Konzentrationsänderungen sind ein direktes Maß für die neuronale Aktivität in der Postsynapse (Belluscio et al., 1998; Brunet et al., 1996) der ORN.

Die Kalziumkonzentrationsänderungen der Axonterminalien konnte als glomeruläres Aktivitätsmuster im dorsalen Bulbus mit einer CCD-Kamera abgeleitet werden. Da hier aliphatische Aldehyde eine deutliche Antwort auszulösen vermögen (z.B.: Rubin and Katz, 1999), wurden zunächst die auf diese Aldehyde antwortenden Glomeruli näher untersucht. In diesen Experimenten wurden zunächst aliphatische Aldehyde mit schrittweise verlängerter Kohlenstoffkettenlänge gewählt, um die Kodierung der Länge des Grundgerüsts eines Geruchsstoffes untersuchen zu können. In weiteren Versuchen wurde durch Verdünnungsreihen der Aldehyde der Einfluss der Geruchsstoffkonzentration auf die glomerulären Aktivitätsmuster näher untersucht. Prinzipiell konnten aufgrund der 1 zu 1 Zuordnung von Glomeruli zu OR aus den Aktivitätsmustern auch Eigenschaften der OR erkannt werden. Um jedoch Angaben zu den Kodierungsprinzipien auf einen definierten OR und die in benachbarten Glomeruli anzutreffenden OR-Familienmitglieder dieses OR machen zu können, wurde eine im OR M72 genetisch modifizierte Mauslinie untersucht (Potter et al., 2001). In dieser Mauslinie exprimieren ORN des M72-Typs neben dem M72 OR auch eGFP, so dass der M72 Glomerulus und somit auch die Region des M72 Glomerulus eindeutig durch die eGFP Fluoreszenz erkannt und näher untersucht werden konnte. Hierbei sollte auf das Ligandenspektrum einzelner Glomeruli, insbesondere des M72-Glomerulus, näher eingegangen werden.

Um die Kodierungsprinzipien des Geruchsystems vollständig zu verstehen, müssen auch die Kodierungsprinzipien der den ORN nachgeschalteten Zellpopulationen entschlüsselt werden. In der Ableitung der geruchsstoffinduzierten Aktivität vieler verschiedener Zellen gleichzeitig kann aber nicht auf die detaillierten Kodierungsprinzipien einzelner Zellpopulationen, oder des Geruchsystems als Ganzes, zurückgeschlossen werden. Mit konventionellen

Methoden konnte bisher nur in ORN die Kodierungsprinzipien einer Zellpopulation erforscht werden (siehe aber (Friedrich and Laurent, 2004)). Um dennoch Aussagen über die Kodierungsprinzipien einer ORN nachgeschalteten Zellpopulation im olfaktorischen Bulbus machen zu können, wurde ein Mausmodell entwickelt. Dafür wurde eine Strategie gewählt, bei der zwei unterschiedliche transgene Mauslinien etabliert werden müssen, um anschließend miteinander gekreuzt zu werden. Die eine Mauslinie sollte unter einem Mitral- und Büschelzell-Promotor spezifisch in dieser Zellpopulation die Rekombinase "Cre" (siehe Nagy, 2000) exprimieren. In der anderen Mauslinie sollte nur dann eine Visualisierung neuronaler Aktivität ermöglicht werden, wenn zuvor Cre aktiv wurde. Für die Erzeugung dieser Mauslinien wurde eine auf die homologe Rekombination in "artifiziellen bakteriellen Chromosomen" basierende Strategie gewählt. In Mäusen aus der Kreuzung dieser Mauslinien wäre es theoretisch das erste mal möglich die neuronale Aktivität der gesamten Mitral- und Büschelzellpopulation von der Aktivität anderer Zellpopulationen des olfaktorischen Bulbus zu trennen. Durch Vergleiche der Aktivitätsmuster von Mitral- und Büschelzellen mit den glomerulären Aktivitätsmustern würde die neuronale Reizprozessierung demonstriert und möglicherweise erklärt werden können.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Benützte Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen:

Boehringer Mannheim (Mannheim)

Fluka (Neu-Ulm)

Gibco/BRL (Eggenstein)

Merck (Darmstadt)

Molecular Probes (Leiden, NL)

Pharmacia/LKB (Freiburg)

Roth (Karlsruhe)

Serva (Heidelberg)

Sigma-Aldrich (Steinheim)

"H₂O" steht im folgenden für Reinstwasser aus einer Seralpur DELTA Anlage (NSF Seral), das über verschiedene Filter gereinigt wurde.

Sämtliche Glasgeräte wurden dampfautoklaviert oder hitzesterilisiert. Die überwiegenden Lösungen wurden für 20min bei 121bar und 180°C autoklaviert, oder über einen Filter (0,2 – 0,45µm Porendurchmesser) sterilisiert.

2.1.1 Lösungen, Chemikalien und kommerzielle Verfahren

Standardlösungen für die Molekularbiologie wurden nach dem Laborhandbuch „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) hergestellt. Die Rezepte aller gängigen Lösungen und Medien wie: LB-Medium, LB-Agar, SOB-Medium, SOC-Medium, Antibiotika (Ampizilin: amp, Tetrazyklin: tet, Kanamycin: kan, Chloramphenicol, Chloramp), TAE-Laufpuffer, TBE-Laufpuffer, PBS, TE-Puffer, 10x Ladepuffer, SSC, SDS, EDTA finden sich dort. Alle Lösungen wurden in H₂O (zum Teil autoklaviert) und deionisiertem Wasser angesetzt. Prozentangaben bezeichnen (v/v) für flüssige Chemikalien und (w/v) für Chemikalien in der festen Phase.

Für Standardagarose-Gele sowie Southern-Blot Gele wurde die Agarose der Firma Promega (Madison, WI, USA) benutzt. Kommerzielle molekularbiologische *Kits* für die Aufreinigung von Plasmid DNA, PCR-Produkten und Gelextraktion

wurden von den Firmen QIAGEN (Hilden), Sigma (Deisenhofen) und Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) bezogen.

Maus ACSF (Artifizielle Cerebrospinale-Flüssigkeit; (Czeh et al., 1988):

Es wurden 127mM NaCl; 3,5mM KCl; 1,25mM NaH₂PO₄; 24mM NaHCO₃; 2,5mM CaCl₂; 1,2mM MgSO₄ und 10mM Glucose durch Begasen mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) auf pH 7,4 eingestellt.

Ringer-Lösung: Es wurden 140mM NaCl; 5mM KCl; 1mM CaCl₂; 1mM MgCl₂; 10mM Hepes; 10mM Glucose und 1mM Natrium Pyruvat mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) Begasen und mit NaOH auf pH 7,4 einstellen.

Kombinationsnarkose mit Xylazin und Ketamin: Es wurden 1ml Rompun 2% (Lsg: Xylazin-hydrochlorid, BAYER Sedativum, Analgetikum und Muskelrelaxans für Tiere; BGA-Reg.-NR.R 1061) mit 0,25ml Ketanest 50 (50mg/ml, Parke-Davis; Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid; Reg.-Nr. K 693 4ml 0,9% NaCl) gemischt. Bei 4°C für einige Wochen haltbar.

Fluoreszenzfarbstoffe (Molecular Probes, Leiden): Calcium-Green-1-Dextran (3kD)

Duftstoffe: Über Muelhens KG (Cologne - Paris - New York) bezogen:

Benzylphenylacetat
Civette purifée 53
Giv.Costus Anhydrol
Galaxolide
Geraniol
Hydratropaldehyddimethylacetat
Indol 1%ig
Isobutylchinolin
Moschus Tinkt.
Nardosandol
Orangenöl
Patchoulyöl
Styrylacetat
Vetivenol
Ylang-Ylang
Zimtöl

Über die Regenbogen Apotheke (Köln) bezogen:

Anisöl

Citronelliöl
Fenchelöl
Lavendelöl
Muskateller Salbeiöl
Myrrhae Tinkt.
Nelkenöl
Rosmarinöl
Rosenöl
Oleum Auranti
Oleum Citri
Oleum Eucalypti
Oleum Melissa
Oleum Pini silvestris
Oleum Thymian

Über Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen:

Acetanisol
Acetophenon
Benzaldehyd
Butyrophenon
2',4'-Dimethylacetophenon
4'-Ethylacetophenon
Heptanal
Heptan Säure
Hexanal
Hexan Säure
2'-Hydroxyacetophenon
3'-Methylacetophenon
Methyl- β -Naphthylketon
Nonanal
Nonan Säure
Octanal
Octan Säure
Phenol
Phenylacetaldehyd
1-Phenyl-1,2propandion
Propional
Propion Säure
Safranal
Valeraldehyd
Valerian Säure

Über das Institut für organische Chemie der Universität zu Köln bezogen:

α -Pinen
Anilin
Benzoe Säure
+/- Carcon
Campher
Citronellol
Cyclohexanon
Ethylacetat
Heptan
Heptanol
Hydrochinon
Limonen
(-) Menthol
Menthol
m-Xylol
Nitrobenzol
n-Amylalkohol
Octan
o-Xylol
Phenol
Pyrrolidin
p-Anisaldehyd
p-Cymol
p-Xylol
Triethylamin

Über Colimex GmbH (Köln) bezogen:

Ingweröl
Myrtheöl

2.1.2 Enzyme und Radioaktivität

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt a.M.) und Amersham Pharmacia Biotec (Freiburg), T4 DNA-Polymerase, Taq DNA-Polymerase, T4 DNA-Ligase, Rapid DNA Ligation Kit und Klenow Enzym von der Firma Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), BioMix Red von Bionline (Luckenwalde), Shrimp Alkalische Phosphatase von USB

(Cleveland, OH, USA), RNase A und Proteinase K von Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Radioaktive ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, 3000Ci/mmol) und nicht radioaktive Nukleotide so wie die Hybond NTM Nylonmembranen wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), GB 003 Gel-Blotting Papier und Sterilisationsfilter von Schleicher&Schueller (Dassel), die Röntgenfilme X-OMATTM AR und X-OMARTM LS von Kodak (Stuttgart) und die Röntgenfilmkassetten: IEL6040C mit Verstärkerfolien von Rigo (Augsburg) bestellt.

2.1.3 Maus BAC Bibliothek

Die genomische Maus BAC Bibliothek, hergestellt aus genomischer Nieren- und Gehirn-DNA mit einer etwa 11maligen Abdeckung des Genoms wurde von Patience Frederick vom "Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH" (Bibliothek RPCI-23 Mouse BAC II, Nr. 731, 7-Teilig) zur Verfügung gestellt. Die BAC-Bibliothek basiert auf dem für BACs geeigneten Plasmid pBACe3.6 (Chloramphenicol Resistenz) in DH10B *E.coli* Zellen. 13 Klone wurden positiv getestet (für T-bet) und bestellt:

1. RPCIB731C0649Q5
2. RPCIB731N0617Q5
3. RPCIB731B0624Q5
4. RPCIB731L0917Q5
5. RPCIB731I11351Q5
6. RPCIB731E09325Q5
7. RPCIB731P13331Q5
8. RPCIB731M14237Q5
9. RPCIB731C17267Q5
10. RPCIB731B16267Q5
11. RPCIB731C05278Q5
12. RPCIB731A05466Q5
13. RPCIB731P02479Q5

2.1.4 PCR-Primer

Alle PCR-Primer wurden von Invitrogen Life Technologies oder SIGMA/ARK bestellt. Die PCR-Primer wurden lyophilisiert ausgeliefert, mit H₂O auf eine Konzentration von 100nM verdünnt und bei -20°C gelagert.

Name	Sequenz 5'->3'	Tm(°C)	Zweck
Beta-GlobinF	CCAATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGG	60	T,Kontrolle
Beta-GlobinR	CCTTGAGGCTGTCCAAGTGATTCAGGCCATCG	60	T,Kontrolle
NewCRE.F	CCGGTCGATGCAACGAGTGATGAGGTTCCG	60	T
NewCRE.R	GGTCGAAATCAGTGCGTTGCAACGCTAGAGCC	60	T
Bace3.6F	GCTGCATCCGATGCAAGTG	56	R
Bace3.6R	CCAAAGCTTGCATGCCTG	56	R
3'Bac8-F	CATTCCAGCCTCCATGTCAGAAGAGGG	60	B,SH
3,Bac8-R	GGTGACCAATGCATAGGCAGTGAGAGGC	60	B,SH
IRES-F	GGAATTCTAGCCCCTCTCCCTCCCC	60	SH,SQ,R
IRES-R	CATGGTCGACGTGGCCATATTATCATCG	60	SH,SQ,R
Seq-B-R	GCACCAGGTTCTGACTG	56	SH,SQ,R
Seq-A-F	GAAAATGCCGCTGAATTGG	56	SH,SQ,R
Seq.CRE-R	CATCGACCGGTAATGCAGG	56	SH,SQ,R
Seq.CRE-F	GGAAAATAGCGATCGCTGC	56	SH,SQ,R
'B'-R	CTACAATAAATAGCCTCC	40	SQ,R
Cre F	GAGGAAGGTGTCCAATTAC	56	SH,SQ,R
Cre R	CCAGAAATGCCAGATTACG	56	SH,SQ,R
a-tbr3	GTAICTCGAGGATATGATCTCACAGC	56	M,S
b - t b r 3 M,S	GCTCTAGACTGAATTCCC GCGTCTGTTTTCTAAGTTAGTGG	56	
c - t b r 3 M,S	GGAATTCAGTCTAGAGCGGGCTGAGAGCCCCGAGCTCTTCC	56	
d-tbr3	GTAICTCGAGCACACCCGGTTCAAAGTG	56	M,S
T3-tbr3F	GGATCCATTAACCCTCACTAAAGGGCCAGTATCCTGTTCCC AGCC	64	P
Last-exon R	GTAICTCGAGCTGTCTTCAGACACACC	64	P
T3-tbr3R	GGATCCATTAACCCTCACTAAAGGGGAAGAGAGCAGCTCTCC	64	P
Last-exon F	GTAICTCGAGGAAGAGAGCTCTCC	64	P
Tbr3-1exonR	GCTGAGCGCGACTCTC	54	B
Tbr3-1exonF	GCATCGTGGAGCCGGGC	54	B
Tbr seq	TATCCTGTTCCCAGCCGTTTCTA	60	SQ
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGGG	50	S,SQ
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	50	S,SQ
SP6	CTATTTAGGTGACACTATAGAATAC	62	S,SQ

Tabelle 1: Liste der PCR-Primer mit Namen, Sequenz, Schmelztemperatur (Tm) und Verwendungszweck. (Subklonieren von Plasmiden = S, Generation von Mutationen = M, Sondenherstellung = SH, DNA-Sequenzierung = SQ, Transgenidentifikation = T, Rekombinantidentifikation = R, Überprüfung der Bac's = B, Promotoraddition = P).

PCR-Primer wurden für verschiedene Zwecke wie die Subklonierung von Plasmiden (2.3.15), die Generation von Mutationen (2.3.17), die Sondenherstellung (2.3.13) und die DNA-Sequenzierungen (2.3.18) verwendet. Alle in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer sind in Tabelle 1 aufgelistet.

2.1.5 Instrumente und Software

2.1.5.1 Allgemein

Bohr und Fräsgerät mit passendem Netzgerät:

Micromot 40 (Proxxon, Niersbach/Eifel)

Verschiedene Diamantaufsätzen (Proxxon)

CD-Recorder: CDD 522 (Philips)

Computer:

Power Macintosh 5500/225, Apple

PC (261MHZ Prozessor, 139MB RAM, 16GB Festplatte)

Deckgläser: rund 15mm Ø (Plano, Wetzlar)

Drucker:

Laser Writer 12/640 PS, Apple

Epson Stylus Color 600 und 740

Elektrophorator und Zubehör:

Gene Pulser (BioRad, München) mit:

Pulse Controller (BioRad)

Capacitance Extender (BioRad)

Elektrophoresekammern:

Subcell GT (BioRad)

Mini Subcell GT

Wide Mini Subcell GT

Entwicklermaschine: Curix 60 (Agfa)

Feinwaagen, Sartorius (Heidelberg):

Laboratory

Universal

Handy

Fluorometer: Lumineszenz Spectrometer LS-5B (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Geldokumentation:

Chemi Doc (BioRad) mit:

QuantityOne v4.2.1 Steuersoftware (BioRad)

Heizblöcke:

Dri-Block DB-3 (Techne)

Thermomixer comfort (Eppendorf)

Hitzeplatte: Ikamag Ret (Janke & Kunkel)

Heißluftöfen:

Certomat H (B.Braun, Melsungen)

Hybridiser HB 1D (Techne)

Polymax Inkubator (heidolph, Schwabach) mit Schütteltisch Polymax 1040 (Heidolph).

Kaltlampe: Visilux 150HL (Visitool, Maulbronn)

Kryostat: Cryostat CM 1900, Leica

Magnetrührer:

IKA Combimag (IK)

IKAMAG REO (IK)

IK Ret (IK)

Mikroskope:

Axiophot (Photomikroskop, Zeiss) div. Objektive

Axiovert S 100TV (Zeiss) div. Objektive

Eclipse E600FN (Nikon) mit Plan Fluor 4x und S Fluor 10x Objektiven

Stereomikroskop (Zeiss)

Stereomikroskop (Nikon)

Netzgeräte:

Power Pac 300 (BioRad)

El.phor.-Powerpack P24 (Biometra, Göttingen)

El.phor.-Powerpack P21 (Biometra, Göttingen)

2301 Macrodriver (LKB Bromma)

PCR-Geräte:

T-Gradient (Biometra, Göttingen)

Gene Amp 2400 (Perkin Elmer)

Peristaltische Pumpen: (Pharmacia Chemicals)

PH-Meter: pH Meter 766 (Calimatic, Knick, USA)

Reinstwasseranlage: Seardest BETA 75 (USF Seral, Ransbach Baumbach)

Röntgenfilme:

XLS-I (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA)

X-OMAT AR (Eastman Kodak)

X-OMAT LS (Eastman Kodak)

Scanner: Agfa SnapScan 1236 (Agfa)

Schütteltisch:

Certomat R (B.Braun, Melsungen)

IKA Vibrax-VXR (IK)

Schüttler:

Vortex-Genie Model K550-93 (Bender und Hohbein, Zürich, Schweiz)

Vortex-Genie 2 (Bender und Hohbein)

Silikonklebmasse: Sylgard (Dow Corning, Midland, USA)

Stahlnadeln: Insektennadeln (Fine Science Tools, Heidelberg)

Spektralphotometer: DU-52 (Beckmann)

UV-Gerät: UV Stratalinker (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

Wasserbäder:

Thermomix BU (B.Braun) mit Frigomix U (B.Braun)

Thermomixer M (B.Braun)

Wasserstrahlpumpen. Diverse

Zentrifugen:

Sigma 4K10 (B.Braun)

5415D (Eppendorf)

5417R Kühlzentrifuge (Eppendorf)

Sorvall RC-5B, Refrigerated Superspeed Centrifuge (DuPont, Bad Homburg)

Biofuge 13 (Heraeus)

2.1.5.2 Instrumente und Software für optisches Imagen

CCD-Kamera, IMAGO watercooled S/N 381KL 0041 (T.I.L.L. Photonics)

Gittermonochromator Polychrom II (T.I.L.L. Photonics)

Fluoreszenzlampe Polychrom II (T.I.L.L. Photonics)

Filter FITC: FT 500, LP 515

Filter FITC: FT 565, BP 610/75

Calcium-Green Filtersatz: Q515LP, HQ520LP

GFP only Filtersatz: Q495LP, HQ510/20

Pulsgenerator mit Stimulusisolator, Model 2100 (A-M Systems), A/D-Wandler (T.I.L.L. Photonics)

PC (300 MHz Prozessor, 128 MB RAM, 4 GB Festplatte)

T.I.L.L. Vision Software (Version 3.3)

2.1.5.3 Olfaktometer

Für die Stimulierung mit Duftstoffen in der Gasphase wurde ein Olfaktometer selbst konstruiert und gebaut (Fig.3A). über die Pumpe P (1300 c.c./min; 1,4 PSI; Elite 803, Hagen) wird Raumluft angesaugt und durch einen Aktivkohle-Filter

geschickt. In einem mit H₂O gefüllten 1Liter Erlenmeyerkolben B wird die gereinigte Luft angefeuchtet. Über ein Ausgleichsventil kann die

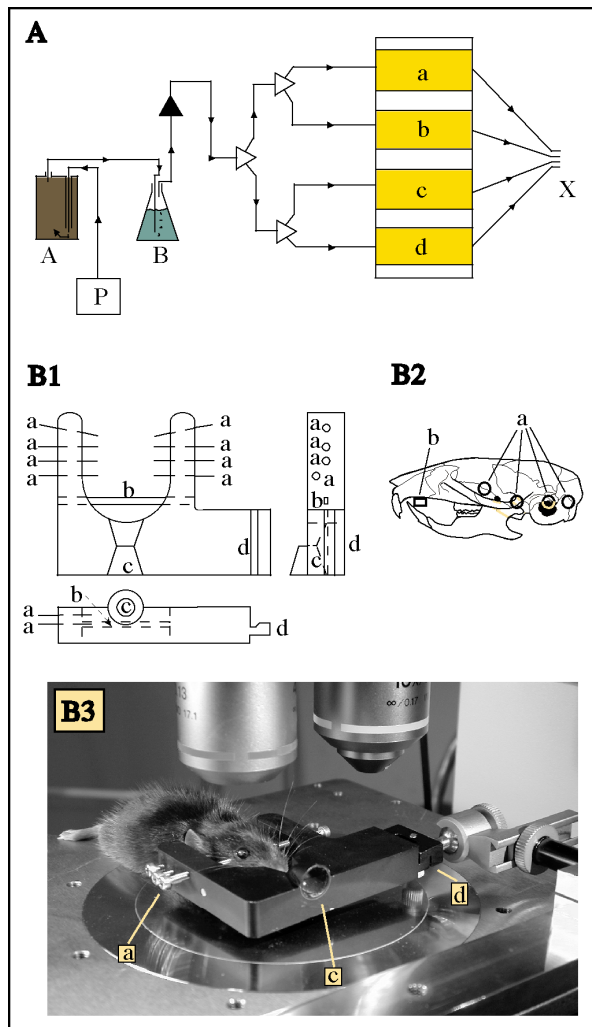


Fig.3 Schemazeichnung des Olfaktometers und stereotaxischen Apparats.

A: Die Pumpe (P) erzeugt einen Luftstrom, der über den Aktivkohlefilter (A) in einen wassergefüllten Erlenmeyerkolben (B) geleitet wird. Durch das Ausgleichsventil (schwarzes Dreieck) kann die Strömungsgeschwindigkeit eingestellt werden. Zwei-Wege-Ventile (weiße Dreiecke) ermöglichen die manuelle Auswahl der Duftstoffkammern (a, b, c und d) durch die der Luftstrom zum Auslass-Stutzen (X) geleitet wird. **B:** Schemazeichnung des stereotaxischen Apparats (B1) mit Angriffspunkten der Schrauben (a) an den Schädelknochen (B2), sowie die Anwendung zur Fixierung einer narkotisierten Maus (B3). Mit den Schrauben (a) kann der Kopf einer Maus so fixiert werden, dass die Canini der Maus vor den Biss-Stutzen (c) zuliegen kommen, und die Nase der Maus vor dem Duftstoffkanal (d) positioniert werden kann. Der Adapter (b) ermöglicht das Einspannen des stereotaxischen Apparats in den Elektrodenhalter UPU-O (Narishige Group).

Strömungsgeschwindigkeit eingestellt werden. Durch die anschließende Zwei-Wege-Ventil Kombination kann der Luftstrom entweder durch die mit einem H₂O befeuchteten Whatmanpaper bestückte Kammer a, oder durch die Duftstoffkammer (60–200µl des Duftstoffes auf ein 50mm² Whatmanpaper Stück) b, c oder d geschickt werden. Die Duftstoffkammern a, b, c und d sind umgebaute 10ml Glasspritzen (Merck) mit Auslassstutzen aus Chirurgienstahl (umgebaute 18G, 1 1/2" Kanülen, Merck) und Einlassteckverbindungen aus Glas und Teflonschlauch (Innendurchmesser 2mm, Merck). Die restlichen Verbindungen sind aus Silikonschlauch (Innendurchmesser 3,5mm, Merck). Vor jeder Benutzung wurden die Duftstoffkammern mit Ethanol und Wasser gewaschen und mindestens 12 Stunden lang bei 60°C erhitzt um Restbestände möglicher Duftstoffe zu beseitigen.

2.1.5.4 Stereotaktischer Apparat

Der stereotaktische Apparat wurde aus Holz selber konstruiert und von der Feinmechanikerwerkstatt aus Aluminium nachgebaut (Abb. 3B). Eine 25mm breite und 30mm große U-förmige Aussparung wurde je Seite mit vier 20mm langen M2-Schrauben sowie den passenden Gewinden versehen. Die Stellung der Schrauben ermöglicht es den Kopf der Mäuse unabhängig von seiner Größe zu fixieren. Ein Bißstutzen wurde vor die Canini quer in die U-förmige Aussparung montiert, die dem Vorderkopf zusätzlichen Halt gibt. Ein Duftstoffkanal wurde direkt vor der Nase, der in dem stereotaktischen Apparat eingespannten Maus gefräst (Fig.3B1 und B2). Der Adapter dient dem Einspannen des stereotaktischen Apparates in den Elektrodenhalter UPU-O (Narishige Group). Der stereotaktische Apparat wurde schwarz eloxiert.

2.1.6 Versuchstiere

Die für physiologische Experimente verwendeten transgenen Mäuse wurden von Prof. Dr. Peter Mombaerts (Rockefeller University, NY, USA) erhalten. Um nur die Subpopulation ORN, die den M72 OR exprimieren, selektiv mit GFP zu markieren, wurde über ein zwischengeschaltetes IRES-Element (internal ribosomal entry site) direkt nach dem M72 Gen eine 'tau-eGFP Kasette' gekoppelt (Mombaerts et al., 1996a; Rodriguez et al., 1999; und Fig. 4a). Diese Veränderung im Genom der Mäuse resultierte in bicistronischen mRNA Transkripten der M72 und tau-eGFP Gene unter der Promoterkontrolle des M72 Gens. In diesen Mäusen sind bei gleichzeitiger M72 Expression also die Mikrotubuli der M72 ORN über das Fusionsprotein aus Mikrotubuli assoziiertem Protein 'tau' und eGFP grün fluoreszierend markiert. Über diese Veränderung hinaus ist das Genom der Tiere das von 129 und C57Bl/6 Mäusen. Diese Mäuse werden im Weiteren als M72-Mäuse bezeichnet.

In einer weiteren Mauslinie wurde das OR-Gen M71 gegen das I7-Gen der Ratte ausgetauscht (Abb.4b). Diese Veränderung im Genom der Mäuse resultierte in bicistronischen mRNA Transkripten der I7 und tau-eGFP Gene unter der Promoterkontrolle des M71 Gens. Vermutlich ist in diesen Mäusen keinerlei M71 Expression vorhanden. Über diese Veränderung hinaus ist das Genom der Tiere das von 129 und C57Bl/6 Mäusen, siehe (Mombaerts et al., 1996a; Rodriguez et al., 1999). Diese Mäuse werden im Weiteren als I7-Mäuse bezeichnet.

Die als 'wild Typ' bezeichneten Mäuse sind CB20 Mäuse aus hauseigener Zucht.

Die Zucht der Mäuse erfolgte in einem konventionellen Mausstall ohne besondere Vorkehrung bezüglich Sterilität mit je 12 Stunden hell (WDR3 als

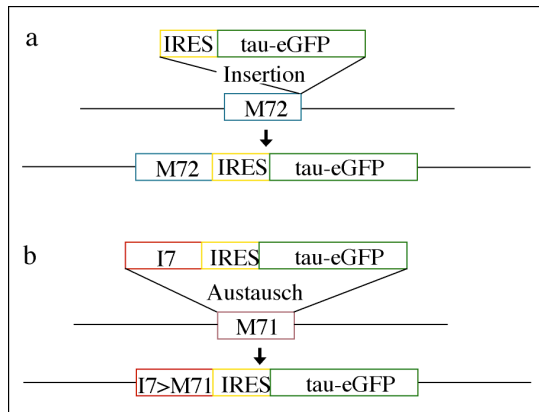


Fig.4 Schematische Darstellung des genetisch veränderten Locus der zwei eGFP exprimierenden Mauslinien.

M72-Maus (a) und I7-Maus (b). Loci für zwei verschiedene murine olfaktorische Rezeptoren (M71 und M72) wurden modifiziert. In der M72-Maus wurde nach einer "internen ribosomal entry site" (IRES) Sequenz das Gen des fluoreszierenden Proteins eGFP hineinkloniert. In der M71 Maus wurde das M71 olfaktorische Rezeptorgen gegen das olfaktorische Rezeptorgen I7 der Ratte ausgetauscht und darüberhinaus wie in der M72-Maus verfahren.

kontinuierliche Geräuschkulisse) und 12 Stunden dunkel Perioden. Die Tiere wurden mit Trockenfutter und Wasser *ad libidum* versorgt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden gemäß §8 Abs. 1 des deutschen Tierversuchsgesetzes beantragt und genehmigt (Regierungspräsidium Köln, Antrag Nr. K13 18/99, Versuchsleiter Prof. Dr. S. Korsching).

Für die Färbung mit Ca^{2+} -Green-1-Dextran wurden Tiere im Alter von 2 bis 6 Wochen verwendet. Bei der überwiegenden Mehrzahl der Versuche wurden jedoch nur Tiere im Alter von 2 bis 3 Wochen mit Ca^{2+} -Green-1-Dextran gefärbt.

2.2 Physiologische Methoden

2.2.1 Narkose und Applikation von Substanzen ins Riechepithel

2.2.1.1 Narkose

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Kombinationsnarkose aus Xylazin und Ketanest (0,011mg/25g Xylazinhydrochlorid und 2,4mg/25g Ketaminhydrochlorid) in einer Mischung mit physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal gespritzt (27G, 1 1/2" Kanüle, Merk). Die Narkose dauert circa 60-90 Minuten.

Flüssige Lösungen wurden mit einer leicht verkürzten Plastikspritze (GELoader, Eppendorf) in das rechte Nasenloch langsam (10-20 Sekunden) appliziert. Die Spitze der Plastikspitze wurde schwarz gefärbt (Edding), um ihre Position während der Applikation deutlich sichtbar zu machen. Dabei wurde die Spitze 2 bis 3mm tief in das Nasenloch eingeführt. Besondere Vorsicht wurde aufgebracht, um den äußeren und inneren Nasenraum nicht zu verletzen.

2.2.2 Präparationen

Für optische Messungen neuronaler Aktivitäten wurden zwei ähnliche, nur leicht unterschiedliche Präparationsmethoden angewandt.

In der Präparation, die den dorsalen Bulbus freilegen soll, wurde das Versuchstier durch die Kombinationsnarkose betäubt (siehe 2.2.1.1) und in einen stereotaktischen Apparat eingespannt. Der dorsale Kopfbereich wurde von Fell befreit und der Schädelknochen des Craniums mit einem Diamantbohrer unter einem Stereomikroskop bis auf eine kleine Schicht abgetragen. Die verbleibenden Reste des Craniums wurden mit einer feinen Präparierpinzette vorsichtig angehoben und schließlich vollständig entfernt. Die dabei entstehenden Blutungen werden mit einem Kleenextuch gestoppt. Sobald der Bulbus frei liegt, wurde er in regelmäßigen Abständen mit oxigenierten Maus ACSF benetzt um mögliche Schäden durch Austrocknen zu verhindern.

Zumeist wurden die narkotisierten Tiere jedoch lediglich in den stereotaktischen Apparat eingespannt und der dorsale Kopfbereich von Fell befreit ohne die Schädelknochen zu verletzen. Ringerlösung ist bei dieser Präparationsmethode nicht notwendig.

Die in beiden Präparationsmethoden am Rand der Präparation liegende Mittellinie (engl. midline) einerseits, und der caudale Sinus andererseits, wurden als Fixpunkte für den interindividuellen Vergleich herangezogen.

Für die Kontrolle beispielsweise der Färbung im Nasenraum wurde eine Sagittalschnittpräparation durchgeführt. In der Sagittalschnittpräparation wurde die Maus wie unter 2.2.1.1 beschrieben betäubt und dekapitiert. Bis auf die direkte Nasenumgebung wurde das Fell vollständig entfernt und der Unterkiefer mit einer kräftigen Präparierschere entfernt. Mit einer feinen Präparierschere wurde die dorsale Schädelkapsel einschließlich des Craniums entfernt. Durch zwei exakt medial angesetzte aber schnell durchgeführte Schnitte wurde unter einem Stereomikroskop mit einem Skalpell die beiden Gehirnhälften, die Bulbi und die Nasenräume voneinander getrennt. Durch diesen Schnitt liegt nun der eine Nasenraum mit dem Epithel des Septums, der andere Nasenraum mit dem Septum und dem sich darunter befindenden Epithel frei. Mit zwei feinen Pinzetten konnte sowohl das Epithel als auch das Septum problemlos entfernt werden. Das

sensorische Epithel mit seinen vier Endoturbinalien sowie das intensiv flimmernde respiratorische Epithel liegt nun an der Oberfläche des Präparates (siehe auch Fig.1).

2.2.3 Anterograde Färbung der Rezeptorzellaxone

2.2.3.1 Calcium sensitive Farbstoffe

Ca²⁺-Indikatoren bestehen aus einem Ca²⁺-Chelator (oft BAPTA, EGTA oder deren Derivate), an denen ein Fluorophor gekoppelt ist (Minta et al., 1989). Bindung eines Ca²⁺-Ions führt zu einer Konformationsänderung und zur Wechselwirkung des konjugierten Systems im Fluorophor mit geladenen Gruppen des Ca²⁺-Chelator-Komplexes. Durch diesen Vorgang ändert sich die Fluoreszenzemission des Fluorophors bei bestimmten Wellenlängen. Bei Ca²⁺-Green-1 wird der Farbstoff beispielsweise mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 490nm angeregt. Die Fluoreszenzemission ist am deutlichsten bei 530nm messbar. In physiologischen Versuchen sind die bei neuronaler Aktivität auftretenden Fluoreszenzänderungen normalerweise bedeutend größer als mit spannungsabhängigen Farbstoffen erzielbaren Fluoreszenzsignale (McPherson et al., 1997). Um den Ca²⁺-Einstrom, der in Nervenzellen aufgrund ihrer Aktivierung beschrieben wurde, zu visualisieren müssen Ca²⁺-Indikatoren ins Cytoplasma eingebracht werden.

2.2.3.2 Färbung mit Ca²⁺-abhängigen Farbstoffen

Im Zebrafisch sowie in der Maus ist gezeigt worden, dass hochmolekulare Farbstoffe in ORN aufgenommen werden, wenn sie zusammen mit einer geringen Konzentration von TritonX-100 ins Riechepithel appliziert werden. Die Farbstoffaufnahme und die auf eine Stimulation folgende Antwortamplitude hängt von der TritonX-100-Konzentration ab und ist bei der Maus maximal bei 0,1% (v/v) (Fried, 1999). Experimente am Zebrafisch und der Maus (Fried et al., 2002; Friedrich and Korsching, 1997; Friedrich and Korsching, 1998) legen nahe, dass der Farbstoff in das Cytoplasma gelangt, während die Membran der Zilien disintegriert. Diese Methode wurde eingesetzt, um ORN mit Ca²⁺-Indikatoren zu beladen, die kovalent an 3kD-Dextrane gebunden waren. Die Kopplung an inerte, hochmolekulare Dextrane verhindert die Extrusion durch Anionentransporter, reduziert die Assoziation der Ca²⁺-Indikatoren mit

intrazellulären Membranproteinen, und beschleunigt eventuell den axonalen Transport der Farbstoffe (Blatter and Wier, 1990; O'Donovan et al., 1993).

Um eine möglichst ideale Färbung mit Ca^{2+} -Green-1-Dextrane zu erhalten wurde eine 6%ige Lösung des Farbstoffs in 1,5mM NaCl und 0,1% TritonX-100 (vor jedem Versuch neu verdünnt) angesetzt. 4 bis 7 μ l der Lösung wurden wie unter 2.2.1.2 beschrieben in die rechten Nasenräume der Versuchstiere injiziert. Bei 2 bis 3 Wochen alten Versuchstieren hat 4 μ l die besten Färbungen ergeben. Nach 5 bis 8 Tagen wurden die Tiere wie unter 2.2.2 beschrieben präpariert und wie in 2.2.6 dokumentiert analysiert.

2.2.4 Aufbau der Apparatur zur optischen Messung neuronaler Aktivitäten

Die mit den Fluoreszenzfarbstoffen gefärbten Mäuse wurden durch das Objektiv mit monochromatischem Licht bestrahlt (erzeugt durch den Gittermonochromator). Fig.5 zeigt eine Schemazeichnung des Aufbaues dieser Apparatur.

2.2.4.1 Aufbau der Apparatur bei Reizung mit gasförmigen Duftstoffen

Für die Messung an narkotisierten Mäusen wurde mit Duftstoffen in der Gasphase stimuliert. Dafür wurden narkotisierte Mäuse in den stereotaktischen Apparat eingeschraubt. Mit der unter 2.2.2 beschriebenen Präparation wurde der dorsale Teil des rechten Bulbus freigelegt.

Der stereotaktische Apparat wurde auf den Mikroskopisch des Nikon Eclipse Mikroskops oder über einen Mikromanipulator auf das Axiovert geschraubt (siehe auch Fig.3 B3). Vor dem Duftstoffkanal des Stereotaktischen Apparates wurde das Olfaktometer positioniert, so dass je nach Stellung der zwei Wege Ventile mit dem entsprechenden Duftstoff gereizt werden konnte (siehe auch Fig.3 A). Die Dauer des Stimulus betrug etwa 2 Sekunden.

2.2.5 Auswahl der verwendeten Geruchsstoffe

Die verwendeten Geruchsstoffe wurden hauptsächlich nach drei Kriterien ausgewählt.

Zunächst sollte eine spezifische Aktivität auf Geruchsstoffstimulation mit der Methode des optischen Imagen in einem möglichst intakten olfaktorischen System auf der Ebene der Glomeruli nachgewiesen werden. Dafür wurden ätherische Öle

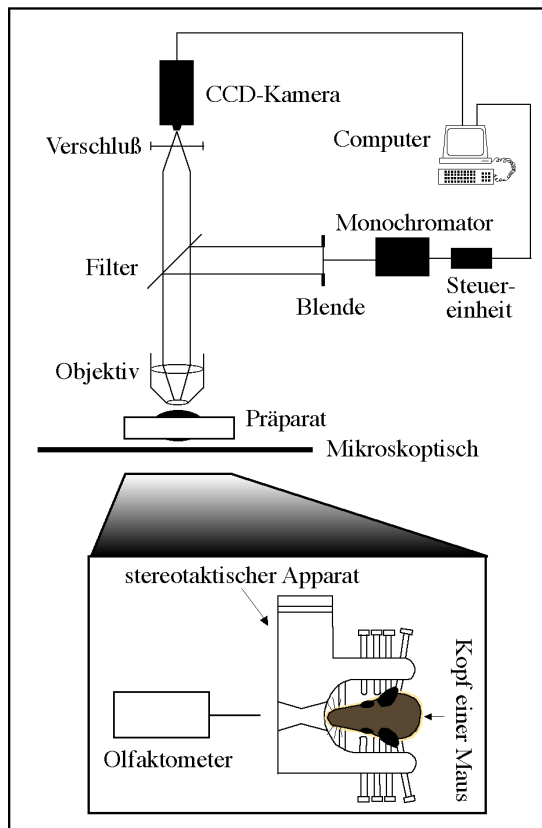


Fig. 5 Schemazeichnung der Apparatur für die Messung neuronaler Aktivitäten im olfaktorischen Bulbus der Maus.

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur optischen Aktivitätsmessung bei einer Stimulation mit gasförmigen Geruchsstoffen an narkotisierten Mäusen.

eingesetzt. Diese haben den Vorteil, viele verschiedene Duftstoffe zu beinhalten (Ohloff, 1990) und sollten somit auch eine ganze Reihe verschiedener Glomeruli aktivieren können.

Zweitens sollte die Methode unter anderem anhand von Kontrollmäusen überprüft werden. Bei diesen Kontrollmäusen ist der Ligand ihres genetisch veränderten Rezeptors bekannt (siehe 2.1.3). Es konnte gezeigt werden, dass der Ratten I7 Rezeptor Octanal mit der größten Affinität bindet (Belluscio et al., 2002; Zhao et al., 1998). Ebenfalls beschrieben wurde Acetophenon und Benzaldehyd als Ligand in dissoziierten ORN, die den OR M71 (aus der selben OR-Familie wie M72) exprimieren (Bozza et al., 2002). Darüber hinaus wurde für M72 Acetophenon als schwacher Ligand nachgewiesen (Firestein et al., 2004). Aus diesem Grund wurde bei allen Experimenten Octanal oder Acetophenon und Benzaldehyd als Stimulus zumindest einmal mit einbezogen.

Drittens: Die Geruchsstoffe, für die ein Aktivitätsmuster im dorsalen Bereich des Bulbes beschrieben wurde, (z.B.: Fried et al., 2002; Takahashi et al., 2004a) gehören zu den aliphatischen, zyklischen oder aromatischen Aldehyden, Alkoholen, Ketonen und Estern. Die Geruchsstoffe sollten daher zu einem Großteil diesen Chemikalienklassen angehören und schrittweise Variationen beispielsweise der

Länge des Kohlenstoffgrundgerüsts, Anzahl der Seitenketten und funktionellen Gruppen ermöglichen.

Die Bedeutung der Kettenlänge im Kohlenstoffgrundgerüst wurde bei Aldehyden untersucht. Dies wurde mit einer Reihe von Aldehyden getestet (Propional, Valeraldehyd, Hexanal, Heptanal, Octanal, Nonanal). Um Dosiswirkungskurven einiger Geruchsstoffe für die Codierung zu untersuchen, wurden von den Aldehyden verschiedene Konzentrationen als Stimulus verwendet. Die Aldehyde wurden in Mineralöl 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} mal verdünnt. Die endgültige Geruchstoffkonzentration in einem Stimulus wurde auf 10 bis 100 mal niedriger als in der Duftstoffkammer geschätzt. Bei gesättigtem Dampfdruck wurden die Konzentrationen der unverdünnten aliphatischen Aldehyde über ihren Siedepunkt mit der Gleichung von Hass und Newton (Hass, 1974) bei 20°C und 1 atm berechnet (4.45×10^4 ppm für Pentanal, 1.45×10^4 ppm für Hexanal, 4.47×10^3 ppm für heptanal, 1.84×10^3 ppm für Octanal und 6.58×10^2 ppm für Nonanal). Die relativen Dampfdrücke über einem Geruchsstoff/Mineralöl Gemisch sind proportional zum Verdünnungsfaktor und müssen aufgrund des unterschiedlichen Lösungsverhalten in Mineralöl darüber hinaus mit einem Koeffizient multipliziert werden (0,12 für Pentanal, 0,24 für Hexanal, 0,47 für Heptanal, 0,93 für Octanal und 1,8 für Nonanal (Meister and Bonhoeffer, 2001)).

Die Anzahl und Lage von Seitenketten (Methyl- oder Ethylgruppen) wurde an zyklischen Verbindungen getestet (z.B.: 2',4'-Dimethylacetophenon, 4'-Ethylacetophenon, 3'-Methylacetophenon, Phenylacetaldehyd und Butyrophenon). Zyklische Verbindungen wurden für diese Experimente gewählt, um Variationen von Acetophenon als potentielle Liganden von M72 zu testen. Aus dem gleichen Grund wurden auch unterschiedliche funktionelle Gruppen in zyklischen Verbindungen getestet (Nitrogruppe in Nitrobenzol, Ketongruppe in Acetophenon oder 1-Phenyl-1,2propandion, Aldehydgruppe in Benzaldehyd, Karboxygruppe in Benzoesäure, Alkoholgruppe in Benzylalkohol oder 2'-Hydroxyacetophenon). Schließlich sollten zyklische Verbindungen mit einem anderen Grundgerüst als es im Acetophenon vorliegt, getestet werden (z.B.: Safranal, Methyl- β -naphthylketon oder Zylohexanon).

Duftstoffe, die nicht nach den drei Kriterien ausgesucht wurden, wurden mir kostenlos zu Verfügung gestellt und daher in einigen Experimenten mitgetestet (z.B.: einige Duftstoffe der Muelhens KG und des Chemischen Institutes der Universität zu Köln).

2.2.6 Optische Messung neuronaler Aktivitäten und Datenauswertung

Die Steuerung der Fluoreszenzlampe und der CCD-Kamera erfolgte über den Computer (Programm: T.I.L.L. Vision). Die Öffnung des Verschlusses in dem Beleuchtungsstrahlengang (Fluoreszenzlampe Polycrom II, T.I.L.L. Photonics), sowie die Aufnahme eines Bildes mit der CCD-Kamera erfolgte synchron. Der Monochromator erzeugte Licht mit einer Bandbreite von 30nm um die eingestellte Wellenlänge. Für die Anregung der Fluoreszenz wurde bei Ca^{2+} -Green-Dextran gefärbten Präparaten eine Wellenlänge von 490nm gewählt. Das die Fluoreszenz anregende Licht wurde von einem Filter (siehe Material und Methoden 2.1.2.3) gespiegelt und durch das Objektiv auf das Präparat gebündelt. Die Fluoreszenzemission (Maximum der Emission für Ca^{2+} -Green bei 530nm, für eGFP bei 515nm) wurde nicht von dem Filter gespiegelt, sondern zur CCD-Kamera durchgelassen (siehe Fig.5).

Fluoreszenzänderungen wurden über eine CCD-Kamera registriert und mit einem Programm (T.I.L.L. Vision) verarbeitet. Der "Interline"-Chip (640X480 Pixel dieser CCD-Kamera wurde mit einem Peltieelement auf -15°C gekühlt, um das intrinsische Rauschen (Dunkelstrom) zu reduzieren. Der A/D-Wandler konnte mit seiner 12 bit Dynamik digitalisierte Bilder mit bis zu 4096 Graustufen liefern. Die Daten wurden mit 12,5 MHz digitalisiert und die Auflösung wurde zumeist reduziert, indem zwei Pixel zusammengezogen wurden (Binning von 2X2).

Eine Messung bestand in der Regel aus 40 Bildern mit zwei Bildern pro Sekunde. Die Belichtung wurde für jedes Objekt individuell eingestellt und betrug zwischen 20 und 440 Millisekunden. Es wurde ab dem 20ten Bild manuell gereizt. In regelmäßigen Abständen wurde mit Luft, Mineralöl, oder ohne jeglichen gezielten Stimulus gemessen. Vor den einzelnen Messungen wurde die Atemfrequenz des Tieres visuell kontrolliert. Die einzelnen Messungen wurden in einem Abstand von zwei bis drei Minuten durchgeführt um Adaptationen zu vermeiden. Zwischen den Messungen wurden die Bilder grob ausgewertet und beurteilt. Daten wurden auf der Festplatte gespeichert und schließlich auf CD's gebrannt.

Da Ca^{2+} -Green-1-dextran durch Anregung mit monochromatischem Licht einer Bleichung unterliegt, die mit der Anregungszeit immer weniger ins Gewicht fällt, wurden die ersten 15 Bilder einer Messung verworfen. So mußte bei den restlichen Bildern keine zusätzliche Bleichungs bedingte Korrektur mehr durchgeführt werden. Für die weitere Auswertung wurden die Bilder 16 bis 20 gemittelt und dienten als Referenz für die $\Delta F/F$ -Berechnung. Für jedes Bild einer Messung wurde pixelweise die Änderung der Fluoreszenzintensität relativ zum Referenzbild berechnet ($\Delta F/F$). Als Kontrolle dienten Messungen mit Luftstimulus, Mineralölstimulus, oder ohne gezielten Stimulus, mit denen gleichermaßen verfahren wurde. Um stochastisches räumliches Hintergrundrauschen zu

unterdrücken, wurden die $\Delta F/F$ Bilder mit einem Niederpass-Filterkernel (5X5; Gauß'sche Gewichtung, SD = 14,8 μ m) konvuliert und 2 bis 4 Antworten (Mittelwert aus 4 oder 5 Einzelbildern während einer Antwort) aus Experimenten am selben Tier mit dem gleichen Geruchsstoff als Stimulus zu einem Bild gemittelt. Letztendlich wurden die Bilder in einer Falschfarbendarstellung farbkodiert und zeigten in jedem Pixel die relative Änderung der Fluoreszenzintensität an.

Die Genauigkeit optischer Intensitätsmessungen ist durch verschiedene Rauschquellen limitiert. Etliche davon sind technischer Natur (Schwankung der Lichtintensität des Monochromators, elektronisches Rauschen), andere hingegen liegen an biologischen Prozessen. Artefakte durch die Bewegung des Bulbus, zumeist aufgrund der Atmung und des Herzschlages, sind schwer vollständig zu beseitigen. Ebenso ist es in lebenden Säugergehirnen unmöglich, den Blutfluß durch Gefäße zu umgehen. Da Blutgefäße aber morphologisch erkannt werden können, konnte der Blutfluß als solcher nicht mit möglichen Antworten verwechselt werden. Die anderen sporadisch auftretenden Artefakte können durch Vergleiche vieler Bilder Stimulus freier Messungen eingeschätzt werden. Dazu diente die Kinetiken einzelner Bildareale. Die Möglichkeit eines Artefaktes ist drastisch minimiert, wenn in repetitiven Experimenten abrupt zur Zeit des Stimulus an mehreren Stellen zugleich eine deutliche Änderung der Fluoreszenzintensität auftritt.

2.2.6.1 Statistische Datenanalysen

Statistische Analysen wurden mit Microsoft Exel 2000 und Kaleidagraph 3.0 durchgeführt.

Fluoreszenzänderungen wurden bei den verschiedenen Geruchsstoffverdünnungen, Präparationsmethoden und Vergrößerungen jeweils unterschiedlich als signifikant eingestuft. Bei höheren Verdünnungen (mehr als 1/10 verdünnt) und bei wegpäpariertem Kranium wurden Signale bewertet, die mehr als die dreimalige Standardabweichung (SD) des mittleren Hintergrundrauschens (MW) betragen (MW: zwischen -0,05% und 0,05%; SD: 0,1%; n = 5). Bei niedrigeren Verdünnungen (1/10 und weniger) sowohl mit als auch ohne Kranium wurden Werte über der für hohe Stimuluskonzentrationen typischen, gleichmäßig auftretenden etwa 1% bis 2% großen Fluoreszenzänderung berücksichtigt (siehe 3.1.6.). Bei optischen Messungen durch intakten Knochen hindurch (und bei 4x Vergrößerung) wurden Signale ebenfalls als signifikant eingestuft, wenn sie oberhalb der dreifachen Standardabweichung lagen. Die Standardabweichung lag aber bei diesen Experimenten durch Knochen um den Faktor 1,5 – 2 mal höher als in

Experimenten ohne Knochen (SD: 0,17%; n = 3) . Für die Versuche mit dem 10x Objektiv und intaktem Knochen nimmt die Standardabweichung wieder Werte von etwa 0,1% (n = 3) an. Da der MW +/- 3SD 99,7% aller Werte enthält, beträgt der Restfehler oberhalb dieser Werte 0,15%, da ja nur einseitig (positive Fluoreszenzänderung) verglichen wurde.

Für Tabellen mit Ligandenspektren einzelner Glomeruli wurde, wenn nicht anders angegeben, die maximalen Fluoreszenzänderungen des Bulbusausschnittes bei einem Geruchsstoffstimulus mit “++++“ angegeben. Mit linear abnehmender Fluoreszenzänderung wurde ein “+“ weniger gesetzt. Unterhalb der 3SD wurde ein “-“ gesetzt. Selten wurde visuell bedingt die Antwortsstärke um eine Kategorie verändert. Wurde diese Veränderung von “-“ nach “+“ durchgeführt wurde eine Klammer gesetzt.

Für die Bestimmung der Durchmesser von eGFP-Glomeruli und Antwortflächen in Calcium-imaging Experimenten wurde eine horizontale Linie durch den Mittelpunkt von isoliert liegenden fluoreszierenden Modulen gezogen. Die Fluoreszenzintensitäten der Pixel auf dieser Linie beschreiben eine Kurve mit Maxima und Minima. Der Durchmesser wurde dann als Abstand benachbarter Minima definiert.

Um die Güte der Geruchsstoff – OR Bindung abschätzen zu können wurde die Dissoziationskonstante K_D errechnet. Setzt man eine einfache Interaktion zwischen Geruchsstoff (Ligand, L) und OR (Rezeptor, R) als



voraus (Sveinsson, 2000), und definiert man die Fluoreszenzänderung in einem Glomerulus als proportional zu RL, kann durch die Formel

$$\Delta F/F = \Delta F/F_{\max} \times \text{Verdünnung}/(\text{Verdünnung} + K_D) \quad (2)$$

eine Näherung der Fluoreszenzwerte bei verschiedenen Verdünnungen an eine sigmoidale Standardkurve erreicht werden. Löst man (2) nach K_D auf, erhält man für jeden Geruchsstoff und OR beziehungsweise Glomerulus den K_D - Wert, der darüber hinaus den Wendepunkt der sigmoidalen Standardkurve beschreibt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Viele der molekularbiologischen Standardverfahren wie Restriktionsverdau, Ligation, Gelelektrophoresen, Entfernung von einzelsträngigen DNA-Überhängen, orientieren sich am Laborbuch “Molecular Cloning“ (Sambrook, 1989). Im

Folgendes wird eine kurze Übersicht wichtiger Eckparameter verschiedener Standardtechniken angegeben.

2.3.1 Isolation von Plasmid-DNA

Um die Identität einzelner **Plasmid-Klone** zu überprüfen sowie für DNA Sequenzierung wurde Plasmid-DNA in geringen Mengen isoliert. Hierfür wurden einzelne *E.coli* Kolonien in 5ml LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika (amp: 100µg/ml, tet: 50 µg/ml, kan 50 µg/ml) inokuliert und in einen Schüttler für Bakterienkulturen (300rpm) bei 37°C über Nacht wachsen gelassen. Für die eigentliche Aufreinigung wurde ein kommerzieller Kit, der auf der Grundlage der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979) basiert, verwendet. DNA-Konzentrationen waren in der Größenordnung von 5-20µg, ausreichend für mehrere Endonukleaseverdaue oder Sequenzierungsreaktionen.

Um die Identität einzelner **BAC-Klone** zu überprüfen wurden einzelne *E.coli* Kolonien in 5ml LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika (chloramp: 12,5 µg/ml, tet: 10 µg/ml) und in einem Schüttler für Bakterienkulturen (300rpm) bei 30°C (temperatursensitive Klone), 37°C oder 42°C (um temperatursensitive Klone am Wachsen zu hindern) über Nacht wachsen gelassen. Bei maximaler Geschwindigkeit in einer herkömmlichen Tischzentrifuge wurden 3ml der Kulturen zentrifugiert und die pelletierten Bakterien in 300µl P1 (50mM Tris-HCl, pH8,0; 10mM EDTA; 100µg/ml Rnase A) aufgenommen. Mit weiteren 300µl P2 (200mM NaOH; 1% SDS) wurden die Bakterien einer alkalischen Lyse (modifiziert nach Birnboim and Doly, 1979) unterzogen, die nach vorsichtigem Mischen (6-10maliges Umdrehen des Reaktionsgefäß) mit 300µl P3 (3,0M Natriumacetat, pH5,5) gestoppt wurde. Nachdem die Lösung erneut vorsichtig gemischt und für 10min zentrifugiert wurde (siehe oben), konnte der Überstand vom weißen Präzipitat getrennt werden und die DNA wie unter 2.3.2 beschrieben gefällt werden. DNA-Konzentrationen waren in der Größenordnung von 3-6µg, ausreichend für 1-2 Endonuklease-Verdaue. Für mehrfache Verdaue oder BAC-Sequenzierungen wurde der selbe Ansatz mit dem 20fachen aller Volumina durchgeführt. Die DNA-Konzentration hierbei waren in der Größenordnung von 20-50µg. Für die Mikroinjektion (von Neil Smyth, Zentrum für molekulare Medizin der Universität zu Köln) in pronukleare befruchtete Eizellen wurde der BAC-Maxi-Kit (Quiagen) verwendet.

Genomische DNA aus Mausschwanz-Amputationen wurde nach einem Protokoll von Dr. Anne Plück (Institut für Genetik, Universität zu Köln) durchgeführt. Hierfür wurden etwa 1cm amputierte Schwanzspitze in Lysispuffer (100mM Tris/HCl pH 8,5; 5mM EDTA; 0,2% SDS; 200mM NaCl) mit Proteinase K (50 - 100mg/ml) gegeben und in einem Thermomixer bei 1000rpm und 56°C für 14-20h

verdaut. Nach 10minütiger Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in einer herkömmlichen Tischzentrifuge wurde der Überstand wie unter 2.3.4 beschrieben mit Isopropanol gefällt und die DNA, je nach der Ausbeute in 50-150ml TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Konzentrationen waren in der Größenordnung von 10-30mg.

2.3.2 Phenol/Chlorophorm Extraktion

Proben wurden mit H₂O auf ein Volumen von 500ml gebracht und mit dem selben Volumen Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (PCI = 25:24:1) verdünnt und geschüttelt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500ml Chlorophorm versehen und geschüttelt. Nach der erneuten Überführung der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurde eine Ethanol-fällung (wie Isopropanolfällung, nur mit Ethanol, siehe 2.3.4) durchgeführt.

2.3.4 Isopropanolfällung

DNA wurde mit 0,3M Natrium Acetat und, zur DNA-Lösung, gleichem Volumen Isopropanol gefällt. Nach der 10minütigen Zentrifugation bei höchster Geschwindigkeit in einer konventionellen Tischzentrifuge wurde die DNA-Präzipitation mit 75%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in einem für die Weiterverarbeitung geeigneten Puffer aufgenommen (H₂O oder TE).

2.3.5 Quantifikation von DNA-Lösungen

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde mit Pico Green im Fluoreszenz-Spektrometer LSB5 (Perkin Elmer) durchgeführt. Dazu wurden Verdünnungen der Messprobe (1/200, in TE-Puffer) 1/1 mit 1/200 PicoGree (in TE-Puffer, Molecular Probes) vermischt und die Fluoreszenz der Probe bei 520nm Wellenlänge (480nm Anregung) und einer Spaltbreite von 10nm bestimmt. Die Konzentration in der Messküvette wurde nach der Formel:

$$[\text{ng}/\mu\text{l}] = 0,001 \times \text{Fluoreszenz} + 0,001$$

bestimmt.

Alternativ wurde die Konzentration in einem Agarose-Gel durch den Vergleich mit einer Bande eines DNA-Größenstandards, bei der die DNA-Konzentration der einzelnen Banden bekannt ist (2-Log; NEB) bestimmt.

2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden auf ein 0,5mg/ml Ethidiumbromid enthaltendes 1%iges Agarosegel (TAE als Lösungsmittel und Laufpuffer) aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden durch das Anlegen von 5-10V/cm der Größe nach aufgetrennt. Um eine zufriedenstellende Trennung von genomischen DNA- oder BAC DNA-Fragmenten zu gewährleisten, wurden diese auf ein geringer prozentiges Gel geladen (0,5% - 0,8%) und bei niedriger Spannung (1-2V/cm) der Größe nach aufgetrennt. Bromphenolblau diente als Ladepuffer. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden verschiedene DNA-Größenstandards verwendet (Low Range PFG Marker oder 2-Log Ladder, BioLabs).

2.3.7 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Sollten Fragmente größer als 50kb voneinander getrennt werden wurde eine Pulsfeld-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wird die Spannung im schnellen Wechsel aus 120° unterschiedlichen Richtungen angelegt. Die DNA-Fragmente richten sich bei jedem Richtungswechsel neu aus. Dies dauert für die verschieden großen Fragmente unterschiedlich lange und die Fragmente bilden, wie in der Agarose-Gelelektrophorese unterschiedliche Banden aus.

Für die Durchführung wurden die Fragmente in Bromphenolblau auf ein 1% Agarosegel (PFGE-Grade Agarose, Biorad) in 0.5x TBE geladen. Die Pulsfeld-Gelelektrophoresekammer (0,5x TBE als Laufpuffer) wurde auf 14°C gekühlt und die DNA bei 6V/cm und einer switch time ramp von 0,1sec bis 6sec für 14h aufgetrennt. Die DNA-Größenstandards (Low Range PFG Marker oder 2-Log Ladder, BioLabs) wurden als Größenvergleich der Banden eingesetzt.

2.3.8 Restriktionsendonukleasen DNA-Verdau

Verschiedene Methoden für den DNA-Verdau wurden verwendet. Für die Charakterisierung von Plasmid-DNA, wie unter 2.3.1 beschrieben isoliert, wurde 0,2-1µl des Plasmids in 1x Endonukleasenpuffer gegeben und mit 5-10U Endonuklease in einem Volumen von 20-50µl je nach Enzym bei 30°C oder 37°C für 2-14h verdaut.

Für BAC-DNA wurden 2-5µg DNA mit Spermidin (2,5mM) für 14-20h je nach Enzym bei 30°C oder 37°C verdaut.

10-30µg genomische DNA aus amputierten Mausschwanzspitzen wurde für 14-20h je nach Enzym bei 30°C oder 37°C verdaut.

2.3.9 Auffüllen und Abtrennen der 3'DNA-Überhänge

Um 3'DNA-Überhänge zu einem DNA-Doppelstrang aufzufüllen wurden dNTPs (Endkonzentration 1mM) zum Restriktionsendonukleaseverdau zugegeben. Die Reaktion wurde mit T4 DNA-Polymerase für 30min bei 37°C inkubiert.

3'DNA-Überhänge wurden abgetrennt, indem dNTPs bis zu einer Endkonzentration von 2mM zum Restriktionsendonukleaseverdau hinzugegeben wurden. Nach der Zugabe von 1U T4 DNA-Polymerase für jedes µg DNA wurde die Reaktion für 30min auf 12°C gebracht und anschließend das Enzym bei 70°C für 15min inaktiviert. Die Reaktionen wurden für die weitere Bearbeitung gereinigt.

2.3.10 Dephosphorylisieren von Plasmid-DNA

Um Religation von Vektoren während einer Ligation zu vermeiden, die nur mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten wurden, oder mit Restriktionsendonukleasen, die keine überhängenden Enden erzeugen, wurden 5'Phosphate der linearisierten Vektor-DNA mit alkalischer Shrimp Phosphatase (Amersham) hydrolysiert (nach Sambrook, 1989).

2.3.11 Ligation von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten

In Standardligationen zur Umklonierung wurde die zu ligierende DNA mit Vektor (ca. 50ng) im Molverhältnis von 3 : 1 (Insert : Vektor) in einem Gesamtvolumen von 10µl (oder 20 µ l) mit 1 µ l (2 µ l) 10x Ligationspuffer (Roche Molecular Biochemicals) und 1 µ l T4 DNA-Ligase (1U/µl, Roch Molecular Biochemicals) gemischt, 5min bei 37°C und anschließend für 14-20h bei 16°C im gekühlten Wasserbad oder PCR Gerät inkubiert. Kritische Ligationen (mehrfach erfolglos) wurden in unterschiedlichen Molverhältnissen (Insert : Vektor) und unterschiedlichen Mengen (bis 500ng) durchgeführt. Die Ligation von drei DNA-Fragmenten wurde ebenfalls bei verschiedenen Molverhältnissen (Insert : Insert : Vektor wie 3 : 3 : 1 oder 1 : 1 : 1 mit 180 µ g Vektor) durchgeführt.

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

2.3.12 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe verschiedener kommerzieller Kits aus Agarosegelen herausgelöst. Im allgemeinen wurde der QIAquick Gel Extraktions Kit (Qiagen), QIAEXII Gel Extraction Kit (Qiagen), Roch High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Biochemicals) oder der GelElute Kit (Sigma) verwendet. Alle diese Kits basieren auf einer Säule, die mit einer Membran aus Silikagel gefüllt ist. DNA adsorbiert an die Membran unter hohen Salzkonzentrationen, die allermeisten Verunreinigungen hingegen nicht. Mit Tris-HCl kann die DNA anschließend wieder von der Membran gelöst werden.

2.3.13 "Southern-Blott": DNA-Transfer, DNA-Markierung und DNA-Hybridisierung

DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde nach Southern (Southern, 1975) auf Nylonmembranen transferiert. Hierbei wurde nach der Durchführung einer Gelektrophorese die doppelsträngige DNA in einem Agarosegel durch ein 5-10minütiges 0,25M HCL-Bad depurinieren. Anschließend wurde die DNA im Agarosegel durch zwei mal 15min in Denaturierungslösung (0,5M NaOH, 1,5M NaCl) in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt. Durch zwei mal 15min im 1M Ammoniumacetat-Bad wurde das Agarosegel neutralisiert. Der eigentliche Transfer wurde vorbereitet, indem eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) auf das Agarosegel gelegt wurde und die Membran mit saugfähigem Gel-Blotting-Papier überschichtet wurde. Schließt man nun das Agarosegel an ein Reservoir mit Transferpuffer (1M Ammoniumacetat) über ein Gel-Blottig-Papier an, entstehen Kapillarkräfte, die die DNA aus dem Gel auf die Nylonmembran überführen, durch die nur der Transferpuffer, nicht aber die DNA durchdringen kann (verändert nach Chomczynski, 1993). Der DNA-Transfer vom Agarosegel auf die Nylonmembran ist nach 12-20h nahezu vollständig (Church et al., 1990), so das nach etwa 14h die DNA durch einen UV-Strahlenlinker (UV-Stratalinker) kovalent an die Nylonmembran gebunden wurde und getrocknet für Monate bei Zimmertemperatur haltbar war.

Um DNA-Banden auf der Nylonmembran zu identifizieren, die eine bestimmte DNA-Sequenz beinhalten, oder DNA von einem Klon aus einer murinen, genomischen Gehirn-Bac-Bibliothek auf Nylonmembranfiltern (siehe 2.1.3) mit dem genomischen DNA-Abschnitt des T-bet Gens zu isolieren, wurden zu diesen Sequenzen komplementäre DNA-Moleküle (Sonden) radioaktiv markiert. Verwendet man die radioaktiven Sonden in einem Hybridisierungsexperiment (siehe unten), kann die Radioaktivität in den Banden oder in dem Klon mit der zur Sonde komplementären DNA wiedergefunden werden. Die radioaktive Markierung erfolgte mit einem kommerziellen Labeling Kit (Stratagen): 50ng einer gereinigten (siehe

hierfür 2.2.7.11) Sonde wurden mit 94,5OD eines Oligo(N)₉-Primer-Mixes für 10min bei 100°C gekocht und anschließend bei Raumtemperatur langsam abgekühlt. Hierbei kann der Primer an die durch das Kochen denaturierte DNA binden. Die Mischung wurde mit Primer-Puffer (aus jeweils 0,1mM dATP, dGTP, dTTP), [α -³²P]dCTP und Exo(-) Klenow Enzym versehen und für 1h bei 37°C inkubiert. Die Reinigung der radioaktiven Sonden wurde mit den Sephadex G50 gefüllten Nick-Säulen (Amersham) durchgeführt, in denen nicht eingebaute Primer und Nukleotide von der radioaktiven Sonde getrennt wurden. Die Menge an eingebauter Radioaktivität wurde durch Messungen vor und nach der Trennung in der Nick-Säule mit einem Geigerzähler kontrolliert.

Um die Sonden mit der DNA auf der Nylonmembran hybridisieren zu lassen wurde diese zuerst mit 2 x SSC angefeuchtet und an die Wand eines Hybridisierungskolben mit der DNA-Seite ins Innere des Kolbens plaziert. Die Nylonmembran wurden mit genügend ULTRAhyb Hybridisierungslösung (Ambion) (je nach Kolbengröße zwischen 5 und 20ml) bei 42°C für 30min im Hybridisierungsofen prehybridisiert um unspezifisches Binden der Sonden an die Nylonmembran zu minimieren.

Die radioaktive Sonde wurde mit 1N NaOH (Endkonzentration 25mM) bei 56°C für 10min zu DNA-Einzelsträngen denaturiert. 10⁶ cpm/ml der radioaktiven Sonde wurden für die Hybridisierung über Nacht bei 42°C in den Hybridisierungskolben mit der prehybridisierten Nylonmembran zugegeben. Die Hybridisierungslösung mit der radioaktiven Sonde wurde nach der Hybridisierung entsorgt oder für eine weitere Hybridisierung bei -20°C aufbewahrt. Die Nylonmembran wurde anschließend erst zwei mal für 5min mit 2 x SSC, 0,1% SD, dann zwei mal für 15min mit 0,1 x SSC, 0,1% SDS bei 42°C gewaschen. Für die Autoradiografie wurden X-OMAT Filme (Kodak) auf die Nylonmembran gelegt und in einer Filmkassette bei -70°C bis zur idealen Kontraststärke von Signal zu Hintergrund exponiert (je nach Menge der Sonde die an eine Bande oder die Klon-DNA gebunden hatte zwischen 10min und einer Woche) und entwickelt.

2.3.14 Herstellung von DIG-UTP markierten RNA Sonden

RNA Sonden zur *in situ*-Hybridisierung wurden aus Plasmid DNA durch *in vitro*-Transkription mit Digoxigenin-11-sUTP markiert. Plasmid DNA wurde durch PCR mit geeigneten PCR-Primern, die eine RNA-Polymeraseerkennungsequenz (T3) enthielten, linearisiert, mit Phenol/Chlorophorm extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die DNA wurde in einem geeigneten Volumen 10mM Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen und 1µg DNA in einem Endvolumen von 20µl mit 2µl NTP Markierungslösung (DIG RNA labelling mix, Roche Molecular Biochemicals, 10mM ATP, 10mM GTP, 10mM CTP, 6,5mM UTP, 3,5mM Dig-UTP; in Tris-HCl, pH 7,5), 2µl

10x Transkriptionspuffer (400mM Tris-HCl, pH 8,0, 60mM MgCl₂, 100mM Dithiothreitol, 20mM Spermidin, 100mM NaCl, 1U/ml Rnase Inhibitor) und 2µl RNA Polymerase (T3, Roche Molecular Biochemicals) gemischt und für 2h bei 37°C inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde 2µl EDTA (0,2M, pH 8,0) zugesetzt und die synthetisierte RNA durch 2,5µl 4M LiCl und 100% EtOH (-20°C) für 30min bei -70°C gefällt und anschließend für 15min bei 4°C zentrifugiert (13.000g). Das Pellet wurde mit 50µl 70% EtOH (-20°C) gewaschen, erneut wie oben zentrifugiert, getrocknet, in 100µl DEPC behandeltem H₂O aufgenommen. Bei -80°C war die RNA-Sonde einige Wochen bis Monate haltbar.

2.3.15 Transformation von Plasmiden

Plasmide wurden mit der Methode der Elektroporation in Bakterienzellen subkloniert. *E.coli* des XL1 Blue Stammes wurden für die Elektroporation vorbereitet. Dieser Stamm ist durch seine Rekombinationsdefizienz für die Subklonierung besonders geeignet. Die elektrokompenten Zellen wurden nach Dower (Dower et al., 1988) präpariert. Zuerst wurde eine Präzipitation aus einer 1L Bakterienkultur (XL1 BlueMRF' in LB/tet Medium, bis OD 0,6 – 0,8 bei 37°C unter Schütteln inkubiert) mehrere Male in eiskaltem H₂O gewaschen und in 2ml eiskaltem 10% Glycerin aufgenommen. Schockgefrorene (in trockeneisgekühltem Ethanol) 50µl Aliquots der Bakterien waren bei -70°C für mehrere Monate haltbar.

Für die Elektroporation wurde eine 50µl Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und mit 1-2µl eines Ligationsansatzes in einer 1mm Küvette gemischt und durch 18kV/cm, 25µF und 200Ω im GenPulser (BioRad) transformiert. Nach der Transformation wurden die Bakterien in 1ml SOB aufgenommen und für 1h bei 37°C und 1000rpm im Schüttelthermostat inkubiert. Auf LB-Platten mit Ampizillin (50µg/ml) und Tetrazyklin (150µg/ml) ausgestrichen bildeten sich nach 12-20h bei 37°C individuelle Bakterienkolonien. In Fällen, bei denen eine blau-weiss Selektion möglich war, enthielten die LB-Platten zusätzlich zu den Antibiotika X-gal (800µg/ml) und IPTG (0,5mM).

Bakterienkolonien wurden entweder durch Endonukleasenverdaue (siehe 2.2.7.7) der Plasmid-DNA, oder durch eine Kolonie-PCR analysiert. Die Kolonie-PCR gibt prinzipiell zwei Resultate. Erstens können Klone mit inserierten DNA-Fragmenten in das Plasmid von solchen ohne inserierten DNA-Fragmenten unterschieden werden. Zweitens kann bei der Wahl der richtigen PCR-Primer die Vollständigkeit des DNA-Fragments eruiert werden. Für die Kolonie-PCR wurden individuelle Bakterienkolonien mit einer Pipettenspitze von der LB-Platte in eine 96 Lochplatte überführt, in der sie mit LB-Medium gemischt für 3h bei 37°C anwachsen konnte. 5µl der Bakteriensuspension wurden als Template in der PCR eingesetzt. Alle PCRs wurden in einem Endvolumen von 20µl durchgeführt.

Entweder in 1 x PCR-Puffer, 1,25mM MgCl₂, 10pM jedes PCR-Primers, 0,1mM von jedem dNTP und 1U Taq DNA-Polymerase (von Roch Biochemicals oder durch V.Oehlmann "selbstgemachte" Taq DNA-Polymerase), oder in 1 x eines kompletten schon vorgefertigten PCR-Mixes (BioMix Red). Im allgemeinen wurden 5' und 3' PCR-Primer des DNA-Fragmentes verwendet, seltener wurden Plasmid PCR-Primer 5' und 3' der "Multiple Cloning Site" wie M13, T3 oder T7 verwendet (siehe Tabelle 1).

Klone, die in der Kolonie-PCR ein DNA-Fragment inseriert in dem Plasmid zeigten, wurden in 3ml LB-Medium über Nacht bei 37°C in einem Bakterienerschüttler wachsen gelassen und, wie in 2.2.7.1 beschrieben, weiterverarbeitet. Um die gewünschten Klone für lange Zeit lagern zu können, wurde sie in Glycerin schockgefroren. Hierfür wurden 150µl steriles Glycerin in 850µl Bakterienkultur gegeben und in trockenisgekühltem Ethanol rasch eingefroren. Bei -70°C waren die Bakterienkulturen über Jahre hinweg haltbar.

2.3.16 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Polymerase-Ketten-Reaktionen wurde in verschiedenen Experimenten eingesetzt wie der Subklonierung von Plasmiden (2.3.15), der Generation von Mutationen (2.3.17), der Sondenherstellung (2.3.13) und der DNA-Sequenzierungen (2.3.18).

PCR-Primer (siehe Tabelle 1) wurden nach Standardmethode unter der Verwendung des Computerprogramms DNASIS designed. Hierbei wurde auf die Abwesenheit von "Hairpins" und "Primer Dimern" geachtet. Auch die Zyklen einer PCR wurden nach Standardmethoden durchgeführt (Aufschmelzen des doppelsträngigen DNA-Template bei 94°C; Anlagerung der PCR-Primer an die aufgeschmolzenen DNA-Templates, bei je nach PCR-Primer angepasster Temperatur und Synthese des komplementären DNA-Stranges bei 72°C). Als Standardansatz wurde 10-50ng Template, 0,5µM Primer, 0,2mM je dNTP, 1-2U Taq Polymerase (Roch Molecular Biochemicals, oder Hauspräparation von V.Oehlmann), 1 x PCR-Puffer, 1,25mM MgCl₂ gemischt und mit H₂O auf 20µl aufgefüllt. Alternativ wurde ein komplett vorgefertigter PCR-Mix (BioMix Red) verwendet. Wenn möglich wurde die PCR mit einem Computerprogramm (Amplify 1.2) vorher simuliert.

Bei PCR mit genomischen DNA-Templates wurde ein 10minütiger Schritt bei 96°C der eigentlichen PCR vorangestellt um die DNA für die PCR-Primer zugänglicher zu machen. Die PCR-Bedingungen waren: 35x (94°C für 1min, 60°C für 1min, 72°C für 2min), 72°C für 10min.

2.3.17 Generation von Mutationen

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Mutationen nur über PCR in DNA eingeführt. Sollten zusätzliche Endonukleaseschnittstellen 5' oder 3' des PCR-amplifizierten DNA-Fragmentes entstehen wurden diese als Überhänge im PCR-Primer eingebaut und der so modifizierte PCR-Primer in der PCR eingesetzt (siehe 2.1.4).

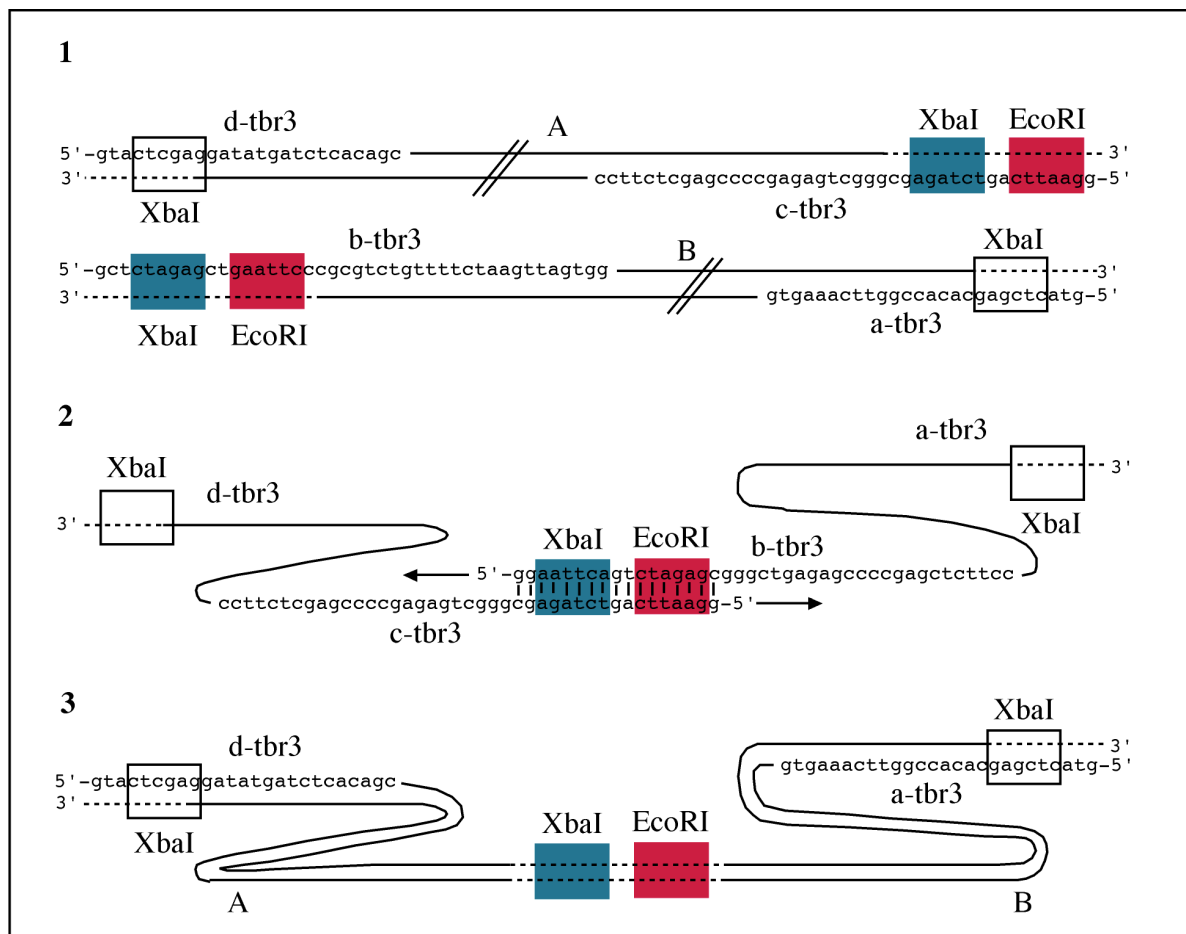


Fig. 6 Einführen von zwei Restriktionsschnittstellen im AB-Fragment.

1: PCR-Amplifikation des A und B Fragmentes mit PCR-Primern (d-tbr3 und c-tbr3 für A, b-tbr3 und a-tbr3 für B), die zusätzliche Endonukleaseschnittstellen (XbaI und EcoRI) tragen. **2:** Nach der Trennung der beiden DNA-Stränge und der Hybridisierung der zueinander komplementären Sequenzen von b-tbr3 und c-tbr3 werden die zum DNA-Doppelstrang fehlenden 5'- Sequenzen synthetisiert. **3:** Mit a-tbr3 und d-tbr3 wird das veränderte AB-Fragment in einer PCR amplifiziert. A und B sind 500bp lange, die Insertionsstelle des IRES-Cre Inserts flankierende Sequenzen, homolog zu dem 3'-Ende der T-bet mRNA.

Für die Homologe Rekombination (siehe 2.3.20) musste in ein 1000bp großes (zu dem genomischen 3' Ende des T-bet Gen homologes) DNA-Fragmente unterschiedliche Endonukleaseschnittstellen eingefügt werden. Hierfür wurden vier PCR-Primer entworfen (a-tbr3, b-tbr3, c-tbr3, d-tbr3; siehe Tabelle1). Zwei äußere

PCR-Primer (a-tbr3 und d-tbr3) wurden wie oben beschrieben mit zusätzlichen Endonukleaseschnittstellen versehen. Primer a-tbr3 fügt 9 und Primer d-tbr3 fügt 8 zusätzliche Basenpaare ein. Zwei innere PCR-Primer (b-tbr3 und c-tbr3) enthielten zusammen mit eingeführten Endonukleaseschnittstellen (siehe oben) jeweils eine 17bp lange Region, die komplementär zueinander angelegt war (siehe Fig.6). Zuerst wurde jeweils eine PCR für die jeweils 500bp langen Homologieregion A und B mit einem äußeren und einem inneren PCR-Primer durchgeführt. Anschließend wurden die gereinigten Homologieregionen A und B für 10min bei 100°C erhitzt, gemischt und bei Raumtemperatur abgekühlt. Einige der 17bp zueinander komplementären Regionen sollten sich unter diesen Bedingungen zu einem DNA-Doppelstrang zusammenfügen, der jeweils 3' von 500bp einzelsträngiger DNA umgeben ist. In 30 Zyklen einer PCR, in der keine Primer eingesetzt wurden entstand ein 1034bp (1000bp + 17bp + 9bp + 8bp = 1034bp) großes DNA-Fragment mit neuen, in der Mitte sowie an den 5' und 3' Enden gelegenen Endonukleaseschnittstellen. Durch eine PCR mit den beiden äußeren PCR-Primern konnte dieses DNA-Fragment amplifiziert und später gereinigt werden.

2.3.18 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die zyklischen Sequenzreaktionen wurden in 10µl mit 2µl Terminationsmix (BigDye, ABI Prism), 0,2 – 0,5µg gereinigtem Plasmid DNA (für BACs 1mg) und 3,2pmol Primer durchgeführt. Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt:

96°C für 2min

[96°C für 30sec, 50°C für 15sec, 60°C für 4min] 25 Zyklen

Die Reaktionen wurden Isopropanol gefällt (2.3.4) und luftgetrocknet. Die getrockneten Sonden wurden bei -20°C im dunklen bis zur Elektrophorese des Sequenzgels aufbewahrt. Die Elektrophorese wurde durch Rita Lange am ABI Prisma 377 Sequencer (Applied Biosystems) im Institut für Genetik (Universität zu Köln) durchgeführt.

Die Sequenzen wurden online unter Verwendung der Software am "National Centre for Biotechnology Information" (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>), die über verschiedene Datenbanken und Suchprogramme verfügen, durchgeführt. Hauptsächlich erfolgte die Sequenzanalyse durch BLAST 2.0 (Gapped BLAST und Graphical Viewer) mit der "advanced BLAST" Option (Altschul, 1990). Einfache Sequenzvergleiche und die Suche nach Endonukleaseschnittstellen erfolgte zumeist durch DNASIS. Promotormotive wurden mit dem Public Domain Programm MatInspector (www.gsf.de) und unter den Internetadressen

www.fruitfly.org und www.genomic.sanger.ac.uk gesucht. Für die Erzeugung phylogenetischer Stammbäume wurden OR Sequenzen aus der Internet-Datenbank ORDB (<http://senselab.med.yale.edu/senselab/ORDB/>) heruntergeladen, mit ClustalW v1.83 (<http://clustalw.genome.jp>) multiple aligned und Sequenzähnlichkeiten mit phyloDraw v.082 in Form eines Stammbaumes dargestellt. Prokaryotische Promotormotive wurden nach Leo (Leo, 2003) online gesucht ([//nostradamus.cs.rkul.ac.uk/~leo/sak.demo/index.cgi](http://nostradamus.cs.rkul.ac.uk/~leo/sak.demo/index.cgi)).

2.3.19 Konstruktion der Vektoren

2.3.19.1 Vektor AB-pGEM-T

Die Homologiearme A und B für die homologe Rekombination wurden wie unter 2.3.17 beschrieben hergestellt. Ein PCR-amplifiziertes AB-Fragment wurde in den pGEM-T Vektor kloniert. Einzelne Klone wurden sequenziert.

2.3.19.2 Vektor AI₂CB-pGEM-T

Um eine "internal ribosomal entry site" (IRES) optimal zu verwenden, muss das Konstrukt im Leseramen nach dem 11 ATG des IRES-Elementes und idealerweise 9bp in 3'-Richtung eingebaut werden (sowohl die 5' als auch die 3' Umgebung des 12 ATGs sollten intakt gelassen werden). Ein derartiges Fragment wurde mit PFU-Polymerase amplifiziert und mit EcoRI und Sall nach der Gel-Aufreinigung verdaut. Aus dem Vektor PGK-Cre (freundlicherweise überlassen von Thomas Wunderlich, Institut für Genetik, Universität zu Köln) wurde die Sequenz der Rekombinase Cre (Cre, inklusive der "nuclear-localisation-sequence") durch die Endonukleasen Sall und SpeI geschnitten und mit dem EcoRI und XbaI geöffneten AB-pGEM-T Vektor und mit dem verdauten IRES-Element ligiert (triple Ligation; die durch einen XbaI und SpeI erzeugten einzelsträngigen Überhänge sind miteinander kompatibel; siehe Fig. 6) und einzelne Klone wurden sequenziert. Positive Klone haben nach dem Stop-Kodon des T-bet Gens im Homologiearm A das IRES-Element gefolgt von Cre und dem Homologiearm B mit der Sequenz für die Anheftung des polyA-Schwanzes (siehe Anhang).

2.3.19.3 Shuttlevektor Al_2CB -pSV.RecA

Für die homologe Rekombination muss das Homologiearm flankierte Konstrukt in einen Shuttlevektor kloniert werden, der Rekombinase A (RecA) exprimiert. Der Shuttlevektor pSV1.RecA (beinhaltet ein Tetrazyklinresistenz-Gen und einen pSC101 temperatursensitiven "Origin of Replication", freundlicherweise überlassen von Xiangdong William Yang, Rockefeller University, New York, NY, USA) wurde hierfür mit Sall geöffnet und das mit XhoI ausgeschnittene und Gel-Aufgereinigte Al_2CB -Fragment (aus Al_2CB -pGEM-T) durch eine Ligation eingesetzt. Al_2CB -pSV.RecA wurde in DH5a *E.coli* Zellen elektroporiert (siehe 2.3.15) und in LB-Medium mit 10µg/ml tet bei 30°C für 16-20h vervielfältigt.

2.3.20 Homologe Rekombination in Bakterien

Die gezielte Modifikation von Bakteriellen Artifiziiellen Chromosomen (BAC) wurde nach Yang (Yang et al., 1997) durchgeführt (siehe Fig. 6). Die Verwendung von BACs in der Konstruktion von genetisch modifizierten Mauslinien bringt einige Vorteile im Vergleich zu transgenen Mauslinien, die durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen erzeugt werden müssen: BACs sind zirkuläre bakterielle Plasmide die bis zu einer Größe von ~700kb stabil propagiert werden können (Ioannou et al., 1994; Shizuya et al., 1992). Die durchschnittliche Größe einer BAC-Bibliothek liegt zwischen 130 und 150kb, so dass genomische Regionen einzelner Gene mit oft allen, aber immer einem Großteil der dazugehörenden Kontrollelemente in einer einzigen Bakterienzelle vorliegen. In Rekombinations defizienten *E.coli* Stämmen können diese BACs über viele Generationen unverändert vererbt werden, und die Isolation der BACs ist jederzeit einfach und in großen Mengen möglich. Die homologe Rekombination der BACs erfolgt in mehreren Schritten, ist schnell (6 bis 8 Wochen) und richtige Rekombinanten sind einfach zu ermitteln.

Im ersten Schritt wird der Shuttlevektor über einen der beiden Homologiearme durch die RecA (vom Shuttlevektor kodiert) in das BAC eingebaut. Die beiden Homologiebereiche A und B sind jeweils 500bp lang, da dies eine optimale Länge für die RecA vermittelte Rekombination ist. Durch die Temperatursensitivität der Shuttlevektoren (siehe 2.3.19) können die erfolgreich eingebauten "Kointegranen" leicht selektioniert werden. Bei 42°C kann der Shuttlevektor nur im BAC integriert repliziert werden und Bakterien mit nicht eingebauten Shuttlevektoren sind nach einer 14h – 16h dauernden Wachstumsphase äußerst selten.

In einem zweiten Schritt wird ebenfalls über RecA (auf dem mittlerweile im BAC eingebauten Shuttlevektor) der im ersten Schritt nicht verwendete

Homologiearm mit der dazu identischen Sequenz im BAC rekombiniert. Hierbei wird der eigentliche Shuttlevektor aus dem BAC wieder herausgenommen, so dass lediglich das Insert (hier Al₂CB) im BAC bleibt. Die erfolgreich doppelt rekombinierten Bakterien können über Fusarsäure selektioniert werden. Fusarsäure ist ein Metall (z.B. Eisen) bindendes, hydrophobes Molekül, das bei pH 5,5 durch die Zellmembran dringt und in der Zelle Metalle bindet. Diese Metall – Fusarsäure Komplexe sind für den Zellmembrantransporter, auf dem die Tetrazyklinresistenz beruht, ein Substrat und werden aus der Zelle transportiert. Der dadurch entstehende Mangel an Metallionen ist der Grund der Fusarsäure sensitivität der Tetrazyklin resistenten Bakterien. Bakterien die beispielsweise durch die erfolgreiche zweite Rekombination die Tetrazyklinresistenz verloren haben, bilden den Zellmembrantransporter nicht mehr aus und die Metallionen werden nicht aus den Zellen transportiert. Die unter der Wirkung von Fusarsäure entstehenden rekombinierten Bakterienzellen tragen alle keine Tetrazyklin Resistenz mehr.

2.3.20.1 Erzeugung von Kointegrationen des Shuttlevektors in ein BAC

Um Al₂CB-pSV.RecA in ein BAC durch homologe Rekombination einzubringen, wurde der gereinigte (siehe 2.3.1) Al₂CB-pSV.RecA-Vektor in elektrokompetente BAC enthaltende DH10B *E.coli* Zellen elektroporiert (siehe 2.3.15) und auf LB-Platten mit tet (10µg/ml) und chloramp (12,5 µ g/ml) bei 30°C für 16-24h wachsen gelassen. Einzelne Kolonien wurden auf LB-Platten (tet 10 µ g/ml , chloramp 12,5 µ g/ml) ausgestrichen und bei 43°C inkubiert (zur Kontrolle jeweils eine LB-Platte pro Klon bei 30°C). Nach 14-20h entstand ein Rasen von kleinen Kolonien, auf dem einige normal große Kolonien wuchsen, die Kointegrenten. Die Kointegrenten, die den Al₂CB-pSV.RecA-Shuttlevektor über eine der beiden Homologiearme im BAC integriert hatten, wurden durch Endonuklease Verdauung (siehe 2.3.8) mit anschließender Separation der Fragmente in der Pulsfeld-Gelelektrophorese (siehe 2.3.7) und Southern Blot Analyse (siehe 2.3.13) bestätigt.

2.3.20.2 Erzeugung doppelt rekombinierter BACs

Identifizierte kointegrierte BAC Klone wurden auf LB-Platten mit 12,5µg/ml Chloramp ausplattiert und bei 43°C für 14-20h inkubiert. Für den weiteren Schritt wurde TB-Agar mit tet (50µg/ml) autoklaviert. Der auf 60°C abgekühlte TB-Agar wurde mit NaH₂PO₄·H₂O (100mM), steril filtrierter Fusar-Säure (6mg/500ml) und

chloramp (12,5 μ g/ml) versehen und in Platten gegossen. Um Klone zu identifizieren, die den temperatursensitiven Shuttlevektor und somit auch die Tetrazyklin-Resistenz verloren hatten, wurden einzelne Klone von der LB-Platte auf eine TB-Platte mit Chloramp und Fusar-Säure (siehe oben) ausgestrichen. Nach 2-3 Tagen bei 37°C konnten individuelle Kolonien unterschieden werden. Durch die Fusar-Säure entstehen die Kolonien sehr langsam, dennoch sollten bei derart langen Inkubationszeiten keine tet resistanten Bakterien wachsen können. Die einzelnen Klone wurden durch Endonuklease Verdauung (siehe 2.3.8), Pulsfeld-Gelelektrophorese (siehe 2.3.7) und durch Southern Blot Analysen (siehe 2.3.13) untersucht. Richtige doppelt rekombinierte BACs wurden als -70°C Glycerinstock eingefroren (siehe 2.3.15).

2.3.21 Herstellung Transgener Mäuse

2.3.21.1 Isolation der BAC-DNA für die pronukleare Injektion

Richtige doppelt rekombinierte BACs wurden entweder linearisiert oder zirkulär für die pronukleare Maus Oozyten Injektion (durchgeführt von Neil Smyth, Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Köln) vorbereitet.

Die genomische DNA mit den homologen Rekombinationen wurde aus dem pBACe3.6 Vektor herausgeschnitten und dadurch linearisiert. Hierfür wurden 50 μ g BAC-DNA aus einer BAC Maxi-Präparation (AX-500 BAC MAXI-Kit, Quiagen) mit 1x Reaktionspuffer, 1x BSA, 2,5mM Spermidin und 200U NotI gemischt und bei 37°C für 14-20h verdaut. Die Trennung des linearisierten genomischen Inserts vom BAC-Vektor erfolgte in einer selbstgebauten Säule: Zwei aufeinandergesetzte 10ml Plastikpipetten wurden mit einem Baumwollstopfen versehen und mit Sepharose CL4b (Sigma) oder "Sephacryl S-1000 Superfine" (Amersham Pharmacia) bis zum Rand der ersten Pipette langsam befüllt. Die Säule wurde durch 30ml Injektionspuffer (10mM Tris.HCL, pH7,5; 0,1mM EDTA, 100mM NaCl) equilibriert. Das Prinzip der Trennung ist nicht bekannt aber ausreichend beschrieben (z.B.: Yang et al., 1997). Die durch NotI verdauten BAC-DNA wurde mit 5 μ l 10x Ladepuffer gemischt, auf die Säule pipetiert und kontinuierlich mit Injektionspuffer überschichtet. Unter der Säule wurden Fraktionen von je 500 μ l gesammelt. Auf einem Pulsfeld-Agarosegel wurden 50 μ l der Fraktionen analysiert und die Fraktion mit der höchsten Konzentration an linearisiertem Insert und der niedrigsten Konzentration an linearisiertem BAC-Vektor für die Injektion abgegeben (zirkuläre BAC-DNA sowie der linearisierte BAC-Vektor kamen zumeist einige Fraktionen vor dem linearisierten Insert aus der Säule). Die BAC-DNA wurde in einer Konzentration von 0,6-1 μ g/ml injiziert.

Zirkuläre BACs können ebenfalls in pronukleare befruchtete Maus Oozyten injiziert werden. Da durch die Injektion die DNA gesichert wird liegt sie in der Oozyte dennoch linearisiert vor. Hierfür wurde die BAC-DNA mit dem BAC-MAXI Kit (AX-500, Quiagen) aufgereinigt und in Injektionspuffer aufgenommen zur Injektion abgegeben. Die BAC-DNA wurde in einer Konzentration von 0,6-1µg/ml injiziert.

2.3.21.2 Identifizierung möglicher transgener Mäuse und Rückkreuzungen

Injizierte pronukleare Maus Oozyten wurden in den Uterus scheinschwangerer Mäuse eingepflanzt (durchgeführt von Neil Smyth, Institut für Molekulare Medizin, Universität zu Köln). Trächtige Weibchen wurden in den Tierstall des Instituts für Genetik (Weyerthal) der Universität zu Köln überführt. Den geworfenen Jungtieren wurde im Alter von 3 Wochen die Schwanzspitze amputiert und genomische DNA extrahiert (siehe 2.3.1). Potentielle Träger der zufällig eingebauten rekombinierten BAC-DNA wurden durch eine genomische PCR mit vier PCR-Primern (je zwei für Cre erzeugten ein 400bp PCR-Produkt und zwei für beta-Globin (Tabelle1) erzeugten ein 500bp PCR-Produkt) wie unter 2.3.16 beschrieben sowie einem Endonukleaseverdau mit EcoRI (80 - 100U) und anschließendem Southern Blot analysiert (2.3.13). Träger der zufällig eingebauten rekombinanten BAC-DNA wurden mit C57BL/6 gepaart (Rückkreuzung) und alle Tiere aus diesen Rückkreuzungen erneut wie oben beschrieben analysiert.

2.4 Histologische Arbeitsmethoden

2.4.1 Kryostatschnitte

Für Kryostatschnitte wurde präpariertes Gewebe in TissueTek (MILES, Elkhart, Indiana, USA) gelegt, ausgerichtet und bei -20°C eingefroren. Gefrorene Proben wurden getrimmt und im Kryostat bei -20°C $15\mu\text{m}$ dick geschnitten. Die Schnitte wurden auf Superfrost plus beschichtete Objektträger montiert und bei 60°C für mehrere Stunden getrocknet. Die Schnitte waren bei -80°C mehrere Monate haltbar.

2.4.2 In situ Hybridisierung

Gewebeschnitte wurden durch nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierungen mit DIG-UTP markierten RNA Sonden durchgeführt. Alle Lösungen wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit DEPC-H₂O hergestellt.

Zunächst wurden die Schnitte mit 2% PFA und 0,4% Glutaraldehyd fixiert, drei mal für 5min mit PBS gewaschen und für 10min in 1%NaBH₄ (in TBS, für 15min aussprudeln lassen) reduziert. Anschließend wurden die Schnitte drei mal für 2min mit TBS (mit PBS äquilibriert) gewaschen, mit 0,5% Triton X-100 (in PBS) für 2min perforiert, drei mal 5min mit PBS gewaschen, für 10min in 0,25% Acetanhydrid (in 0,1M TEA) acetyliert und erneut für 10min in 2xSSC, 5min in DEPC-H₂O gewaschen. Die Hybridisierung erfolgte in 150ml pro Objektträger Hybridisierungslösung (300mM NaCl, 20mM Tris-HCl (pH 7,5), 5mM EDTA, 50% Formaldehyd, 1xDenhardt's Lösung, 10mM Dithiothreitol) mit 0,25mg/ml RNA Sonde über nacht bei 45°C .

Posthybridisierungswaschungen wurden nach 5min Abspülen der Schnitte mit 5xSSC durch ein mal 10min 2xSSC, ein mal 5min bei 45°C und 60min 0,1xSSC bei 60°C auf einem Schüttler durchgeführt. Die gewaschenen Schnitte wurden in MaBS (1M Maleinsäurepuffer) äquilibriert und für 45min in 1% Blockingreagenz (Boehringer, in MaBS) mit 1% Schafnormalserum (hitzebehandelt: 30min bei 56°C) blockiert. Die Antikörperbindung (α -DIG-F(ab')₂-Alkalische-Phosphatase 1:750, Roche Molecular Biochemicals) erfolgte für 40min in der gleichen Lösung bei Raumtemperatur. Ungebundene Antikörper wurden durch zwei mal 15min Waschen (MaBS) entfernt. Für die Gegenfärbung wurden die Schnitte mit DAPI (Molecular Probes) einige Minuten behandelt. Die Entwicklungsreaktion erfolgte nach einer Präinkubation in Reaktionspuffer (0,1M Tris-HCl, pH 9,5, Levamisol) für 2 mal 10min durch die Zugabe von $4,5\mu\text{l}$ NBT und $3,5\mu\text{l}$ BCIP auf 1ml

Reaktionspuffer. Die Reaktion wurde durch Waschen mit PBS beendet und Präparate bei 4°C bis zur photographischen Auswertung aufbewahrt.

3. Ergebnisse

3.1 Geruchsstoffinduzierte ORN-Antworten im *Bulbus olfactorius* der Maus

Die anterograde Färbung durch in die Nase applizierte, dextrangekoppelte Farbstoffe ermöglicht eine Markierung von ausschließlich ORN im *Bulbus olfactorius* der Maus (Fried et al., 2002; Friedrich and Korsching, 1997; Wachowiak and Cohen, 2001; Wachowiak et al., 2004). Die hochmolekulare Dextrangruppe, hier mit einem Molekulargewicht von 3000, verhindert das Einschließen der Farbstoffmoleküle in Zellkompartimente wie das Endoplasmatische Retikulum oder den Golgi-Apparat, sowie einen transsynaptischen Transport in benachbarte Zellpopulationen (Blatter and Wier, 1990; O'Donovan et al., 1993). Die Verwendung von dextrangekoppelten Calcium-Indikatoren erlaubt eine eindeutige Zuordnung von geruchsstoffinduzierten Aktivitäten in ORN zu den Glomeruli im Bulbus olfaktorius (Fried et al., 2002; Wachowiak et al., 2004). Da die präsynaptische Calciumkonzentration nahezu linear abhängig von der Rezeptor-Ligand Interaktion ist (Belluscio et al., 1998; Brunet et al., 1996) und da die eins zu eins Korrelation von Glomeruli und OR zumindest für die Maus gut belegt ist, zusammengefasst bei (Mombaerts, 2004b), lässt sich von den glomerulären Aktivitätsmustern auf die Eigenschaften der die Glomeruli charakterisierenden OR schließen.

Die optisch ableitbare Fläche des Bulbus olfaktorius der Maus entspricht, ähnlich wie bei der Ratte (Takahashi et al., 2004a), ungefähr 10% des gesamten Bulbus mit circa 150 Glomeruli. Nach neueren Maus-Genomanalysen sind etwa 1037 (Zhang et al., 2004) beziehungsweise 913 (Godfrey et al., 2004) funktionale OR vorhanden. Da die optisch ableitbare Fläche des Bulbus olfaktorius allenfalls am ihrem äußersten Rand von der für Mäuse beschriebenen Spiegelachse (Nagao et al., 2000, siehe auch Einleitung) geschnitten wird und somit in diesem Areal undupliziert ist, können etwas mehr als 10% der funktionalen OR untersucht werden.

Ähnliche Geruchsstoffe werden auf der Oberfläche des Bulbus in zum Teil überlappenden Aktivitätsmustern, an denen benachbarte Glomeruli beteiligt sind, abgebildet (z.B.: Friedrich and Korsching, 1997; Johnson et al., 1998; Rubin and Katz, 1999). Noch zu Beginn dieser Arbeit waren die genaueren Prinzipien, nach denen die überlappenden Aktivitätsmuster angeordnet sind, weitgehend unbekannt. Die Bedeutung der verschiedenen osmophoren Eigenschaften einzelner Geruchsstoffe für die Anordnung der Aktivitätsmuster wurde nur ansatzweise gezeigt (Bozza et al., 2002; Johnson et al., 1998; Malnic et al., 1999). Unter Anderem durch Daten aus der hier vorgelegten Arbeit wurden

Kodierungsprinzipien bis auf die Ebene einzelner Gebiete (hier Domänen genannt, bei Johnson als glomeruläre Module und bei Mori als Cluster bezeichnet) des Bulbus entdeckt (z.B.: Bozza et al., 2004; Fried et al., 2002; Fuss and Korsching, 2001; Takahashi et al., 2004a; Uchida et al., 2000). Eine kombinatorische Erkennung isolierter Strukturmerkmale von Geruchsstoffen durch viele OR, wie es das Odotop-Konzept beschreibt (Shepherd, 1987) wurde durch diese Arbeiten immer unwahrscheinlicher. Vielmehr erscheinen nur mehrere dieser Strukturmerkmale zusammen ausreichend für die Aktivierung der unterschiedlichen OR zu sein. Zumindest für Nager erscheint die Kodierung einzelner Geruchsstoffe quasi identisch zu sein (vergleiche z.B.: Fried et al., 2002; Meister and Bonhoeffer, 2001; Rubin and Katz, 1999; Uchida et al., 2000; Wachowiak and Cohen, 2001), so dass die gefundenen Prinzipien auf andere Säugetiere, den Menschen mit eingeschlossen, übertragbar erscheinen.

3.1.1 Glomeruläre Antwortmuster

Die relativ homogene Färbung des Bulbus mit Calcium-Green erschien anterior stärker als posterior, vermutlich aufgrund der längeren axonalen Transportstrecke zu den posterioren Glomeruli und der damit verbundenen geringeren Farbstoffmenge in diesen Glomeruli (Fig. 7). Wie in Fig. 7A zu erkennen waren jedoch einzelne Glomeruli teilweise deutlich unterschiedlich gefärbt. Eine mögliche Erklärung hierfür stellt die unterschiedlich dichte Innervierung einzelner Glomeruli da (Mombaerts et al., 1996a). Die Antwortstärke unterschiedlich gefärbter Glomeruli war jedoch nicht mit der Intensität der Färbung korreliert und betrug typischerweise bei Stimulation mit hohen Geruchsstoffkonzentrationen zwischen 6% und 7% (maximal 13%).

Geruchsstoff induzierte glomeruläre Aktivitätsmuster bestanden immer aus mehreren durch eine Fluoreszenzänderung sichtbar gewordenen Glomeruli (siehe Material und Methoden). Einzelne Glomeruli eines Aktivitätsmusters hatten unterschiedlich starke Fluoreszenzänderungen, die durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen des Geruchsstoffs mit OR erklärt werden könnten. Es konnten aber immer auch schwach aktivierte Glomeruli in unmittelbarer Nachbarschaft zu sehr stark aktivierten Glomeruli eindeutig identifiziert werden (Fig. 8C). Innerhalb eines aktivierten Glomerulus war die Intensitätsverteilung der Fluoreszenzänderung annähernd glockenförmig (siehe Fig. 7B), und exakt mit einigen durch die Calcium Green Färbung erkennbaren Glomeruli kolokalisierbar (Fig. 7A). Ein Vergleich des gemittelten Durchmessers der antwortenden Glomeruli mit dem mittleren Durchmesser von morphologisch identifizierbaren Glomeruli ergab nahezu identische Werte (122 +/- 4µm für antwortende Glomeruli und 116 +/- 7µm für morphologisch identifizierbare Glomeruli, Mittelwert +/- SEM; siehe Fig.

7B). Die gemessenen Durchmesser der Glomeruli stimmten gut mit der Größe von Glomeruli in Gewebeschnitten überein (Royet, 1988). Schwach antwortende Glomeruli erschienen oft in Bildern der Aktivitätsmuster kleiner zu sein. In Linescans konnte jedoch die tatsächliche Größe des Durchmessers mit dem oben beschriebenen, gemittelten Durchmesser gut korreliert werden (siehe Fig. 7A).

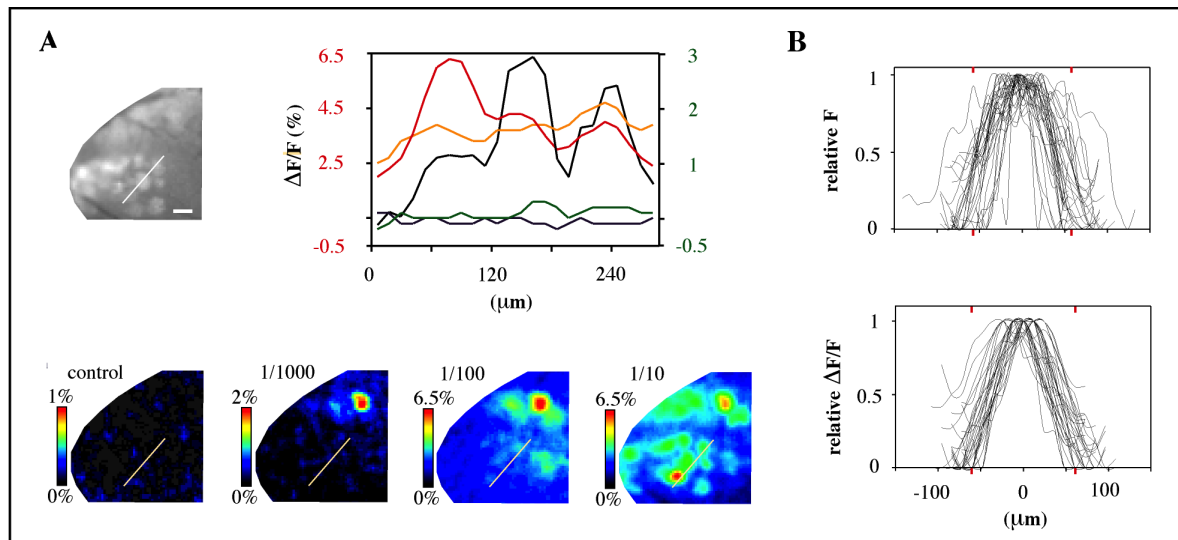


Fig. 7 Die Calcium-Signale sind Glomeruli zuzuordnen.

A: Oben links: Mehrere Glomeruli im anterior-dorsalen Bereich des olfaktorischen Bulbus sind nach der Aufnahme von Calcium-Green-1 Dextran in die Somata und anschließendem axonalen Transport in die Axon-Terminalien erkennbar angefärbt. Blick von dorsal, anterior ist rechts, medial unten; der Größenmaßstab entspricht $100 \mu\text{m}$. Die drei Glomeruli durchquerende weiße Linie zeigt die Lage des Linienskans in der Graphik oben rechts (schwarze Linie). Unten: Vier Aktivitätsmuster des oben gezeigten Bulbusausschnitts mit $\Delta F/F$ in Falschfarben dargestellt. Von links nach rechts sind die Antworten auf Mineralöl, sowie 1/1000, 1/100 und 1/10 verdünntes Hexanal gezeigt. Die Lage der Linienskans (weiße Linien) sind dieselbe wie oben. Die Linienskans in $\Delta F/F$ (oben rechts) sind farblich kodiert: Blau, Mineralöl; grün, 1/1000 Verdünnung; gelb, 1/100 Verdünnung; rot, 1/10 Verdünnung. Die rote Skala gilt für den roten Linienskan, die grüne Skala für alle Anderen. **B:** Übereinander gelegte Linienskans vieler zufällig ausgesuchter Glomeruli um die Variabilität in der Glomeruligröße zu zeigen (Mittelwert = rote Balken). Für die ermittlung der Durchmesser wurden zwischen zwei lokalen Minima gemessen. Für die übersichtlichere Darstellung wurden die Linienskans geglättet, normalisiert und nach ihrem Maximum ausgerichtet. Oben: Linienskans von 33 morphologisch durch die eGFP Expression vom OMP-Lokus identifizierbaren Glomeruli dreier verschiedener Tiere. Unten: Linienskans der Calcium-Antworten ($\Delta F/F$) von 31 Glomeruli aus vier verschiedenen, Calcium-Green gefärbten Tieren.

Einzelne Glomeruli waren durch verschiedene Geruchsstoffe stimulierbar, so dass die Aktivitätsmuster der verschiedenen Geruchsstoffe zum Teil aus den selben Glomeruli bestehen konnten (siehe Fig. 8). Die für einen Geruchsstoff charakteristischen Aktivitätsmuster waren dabei immer gut reproduzierbar (Fig. 8B). Geruchsstoffe aus ähnlichen chemischen Verbindungen führten zu ähnlichen Aktivitätsmustern (vergleiche Fig. 8 und 10). Die Kodierung der Geruchsstoffe auf der Ebene der ORN kann daher als chemotop bezeichnet werden (Korsching, 2001; Xu et al., 2000). Die meisten Glomeruli der optisch ableitbaren Fläche des dorsalen Bulbus konnten durch einen der verwendeten Geruchsstoffe (sowohl einzelne Chemikalien wie Aldehyde, Ketone, Ester und Fettsäuren, als auch

Mischungen vieler unterschiedlicher Chemikalien in Form von ätherischen Ölen; siehe Material und Methoden) stimuliert werden, jedoch nicht alle. Ebenso konnten nicht alle verwendeten Geruchsstoffe eine Antwort im dorsalen Bulbus auslösen.

Zusammengefasst demonstrierten diese Resultate, dass die theoretisch für den Zweck des Entschlüsselns der Prinzipien der Geruchstoffkodierung bei der Maus geeignete Methode auch praktisch anwendbar war.

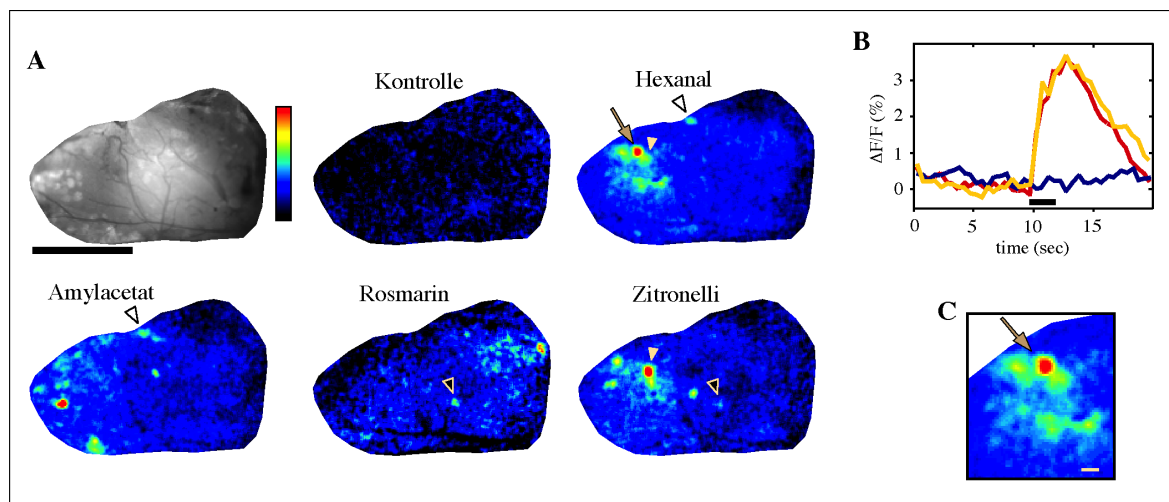


Fig. 8 Geruchstoffinduzierte Calcium-Antworten sind spezifisch und reproduzierbar.

A: Oben links: Glomeruli des dorsalen Bulbusauschnitts sind durch Calcium-Green-1 Dextran angefärbt. Blutgefäße erscheinen schwarz, anterior ist links, medial ist unten. Normalisierte Falschfarbenskala (obere Reihe) der Calciumkonzentrationsänderungen als $\Delta F/F$: Schwarz, keine Fluoreszenzänderungen; rot, die maximalen Fluoreszenzänderungen des jeweiligen Bildes (1,7% - 5,0%), wobei in der Kontrolle die Skala von 0% bis 1,5% geht. Verdünnung von Hexanal ist 1/100. Die offene Pfeilspitze zeigt auf einen Glomerulus der auf einen Hexanal- und Isoamylacetat-Stimulus antwortet. Die schwarze Pfeilspitze zeigt auf einen Glomerulus der auf die ätherischen Öle von Rosmarin und Zitronelli antwortet. Die weiße Pfeilspitze zeigt auf einen Glomerulus der auf einen Hexanal- und Zitronelli-Stimulus antwortet. Der graue Pfeil zeigt auf den in B untersuchten Glomerulus. Größenmaßstab = 1mm. **B:** Kinetiken zweier einzelnen, zeitlich durch mehrere andere Stimuli getrennten Hexanal-Stimuli (rote und gelbe Linie; Kontrolle ohne Geruchsstoff = blaue Linie). Der schwarze Balken zeigt die Dauer des Geruchsstoffstimulus an. **C:** Vergrößerte Region um den grauen Pfeil in A. Stark und schwach aktivierte Glomeruli können, auch wenn sie direkt nebeneinander liegen, voneinander getrennt und als zwei Glomeruli erkannt werden. Größenmaßstab = 100 μ m.

3.1.2 Die Aldehyd-Domäne – die Chemotopie Teil I

In der neueren Forschung ist die chemotope Kodierung im Geruchssystem ein intensiv bearbeitetes Gebiet. In mehreren Untersuchungen wurden sowohl für die unterschiedlichen Regionen innerhalb einer Art (bei der Maus: Belluscio et al., 2002; Fried et al., 2002; Wachowiak and Cohen, 2001; Wachowiak et al., 2004), als

auch für verschiedene Arten (z.B.: Ratte, Schildkröte, Zebrafisch: Fuss and Korsching, 2001; Rubin and Katz, 1999; Wachowiak et al., 2000) detaillierte Prinzipien der chemotopen Kodierung gefunden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Chemotopie anhand schrittweise veränderter aliphatischer Aldehyde,

sowie an einer, durch einen OR definierten Region im *Bulbus olfactorius*, untersucht.

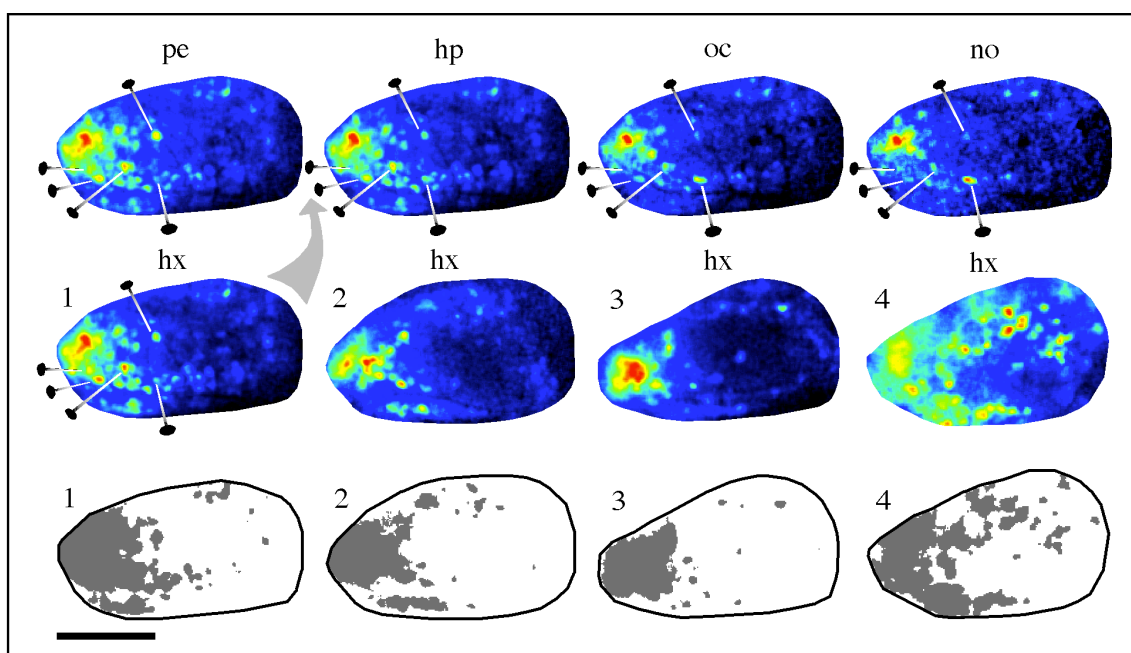


Fig. 9 Die Aldehyd-Domäne: Abnehmende Spezifität und interindividuelle Variabilität hochkonzentrierter aliphatischer Aldehyd-Stimuli.

Oben: Von links nach rechts sind Aktivitätsmuster in normalisierter Falschfarbenskala von unverdünnten aliphatische Aldehyde mit zunehmender Kohlenstoffkettenlänge dargestellt. Die absoluten $\Delta F/F$ -Werte nehmen in etwa um den Faktor 2 mit zunehmender Kohlenstoffkettenlänge ab (vergleiche Meister M 2001). Die Aktivitätsmuster sind ähnlich können aber beispielsweise durch die mit einer Nadel gekennzeichneten Glomeruli unterschieden werden. Mitte: Durch einen unverdünnten Hexanal-Stimulus ausgelöste Aktivitätsmuster in vier verschiedenen Tieren. Tier 1 ist das selbe wie oben. Tier 2 zeigt die gleichen Ausmaße der Aldehyd-Domäne wie Tier 1. Die Aldehyd-Domäne von Tier 3 ist etwas zusammengezogener und von Tier 4 deutlich zerstreuter als gewöhnlich (seltene Beispiele). Unten: Die V-förmige Aldehyd-Domäne, in grau, ist aus aktivierten Glomeruli zusammengesetzt (grau = $\Delta F/F > 1\%$ - 2% , für jedes Tier wurde dieser Cut-off einzeln nach der bei hohen Geruchsstoffkonzentrationen auftretenden, unspezifischen Aktivität bestimmt. Oberhalb des Cut-off wurden nur spezifische, geruchsstoffinduzierte Aktivitäten gemessen. Siehe dazu Kapitel 3.1.6.). Pentanal (pe), Hexanal (hx), Heptanal (hp), Octanal (oc), Nonanal (no). Größenstandard = 1mm.

Aliphatische Aldehyde zählen zu den am besten untersuchten Geruchsstimuli an Nagern und lösen eine besonders starke Antwort im dorsalen Teil des Bulbus aus. Durch schrittweise Veränderung der Anzahl an Kohlenstoffatomen im Grundgerüst aliphatischer Aldehyde lässt sich die Bedeutung der Kettenlänge für die Kodierung im Bulbus untersuchen. Durch unnatürlich hohe Konzentrationen dieser Aldehyde war eine Region – die Aldehyd-Domäne – im dorsalen Bulbus besonders gut darstellbar. Die Aldehyd-Domäne erschien, interindividuell relativ stereotyp, als V-förmige Zone mit einem anterior-dorsalen Zentrum. Wie in Fig. 9 zu erkennen, war die Ausdehnung der Aldehyd-Domäne zwischen den Tieren leicht unterschiedlich, die Anzahl der beteiligten Glomeruli jedoch recht konstant bei 79 ± 3 Glomeruli (Mittelwert \pm SE, $n = 5$). Bei allen Tieren und in allen Experimenten waren einige dieser Glomeruli weit von dem anterior-dorsalen Zentrum entfernt in dem gesamten dorsalen Bulbus zu finden.

Nur in seltenen Fällen lagen die Aldehyd-stimulierbaren Glomeruli ganz verstreut im dorsalen Bulbus (siehe Fig. 9 Tier Nr. 4), wobei auch in diesen Fällen die V-Form der Aldehyd-Domäne noch zu erkennen war. Interindividuelle Identifikation einzelner Glomeruli anhand der Antwortmuster der verwendeten Aldehyde war nicht möglich. Wenn die unterschiedlichen Dampfdrücke der Aldehyde, sowie die Intensität der Wechselwirkungen dieser Aldehyde mit dem Lösungsmittel (Mineralöl) berücksichtigt wurden, sollten die Geruchsstoffkonzentrationen mit zunehmender Kohlenstoffkettenlänge nach oben korrigiert werden. Wurden die hierzu veröffentlichten Werte für diese Aldehyde zugrundegelegt (Meister and Bonhoeffer, 2001; Hass and Newton, 1974), schienen deutlich mehr Glomeruli in der Aldehyd-Domäne aktiviert worden zu sein, je länger die Kettenlänge des Kohlenstoffgrundgerüsts war (Daten nicht gezeigt, vergleiche aber Fuss and Korsching, 2001). Es konnten jedoch immer noch OR identifiziert werden, die die kurzkettigen Aldehyde bevorzugt banden.

Der geringe Standardfehler in der Anzahl der Glomeruli der Aldehyd-Domäne ist mit einer fixen Anzahl an OR gut zu erklären. Darüber hinaus könnte die beobachtete geringe interindividuelle Varianz des Aktivitätsmusters innerhalb der Aldehyd-Domäne durch die experimentell gefundenen Varianz in der Position von genetisch markierten Glomeruli (Strotmann et al., 2000) erklärt werden.

Bei Geruchsstoffkonzentrationen, die den natürlich auftretenden Konzentrationen in Luft ähnlich waren, waren die Aktivitätsmuster aller getesteten aliphatischen Aldehyde deutlich voneinander zu unterscheiden. Viele der 10 bis 20 Glomeruli ($n = 6$) eines durch die aliphatischen Aldehyde stimulierten Aktivitätsmusters lagen im Zentrum (an der Basis) der V-förmigen Aldehyd-Domäne. Bis auf wenige Ausnahmen lagen alle bei niedrigen Konzentrationen noch aktivierten Glomeruli in der durch die hohen Aldehydkonzentrationen definierten Domäne (vergleiche Fig. 10 mit Tier Nr.2 in Fig. 9). Viele Glomeruli dieser Aktivitätsmuster hatten eine geringe Toleranzbreite bezüglich der Kettenlänge des Kohlenstoffgrundgerüsts. Diese Glomeruli waren nur mit ein bis zwei benachbarten Aldehyden (Kettenlänge +1 oder -1 Kohlenstoffatomen) stimulierbar. Glomeruli mit größeren Antwortspektren (3 bis 4 benachbarte Aldehyde) oder breitem Antwortspektrum (alle getesteten aliphatischen Aldehyde) waren seltener zu finden (siehe Fig. 10B). Einige der Glomeruli hatten sogar identische Antwortspektren, möglicherweise aufgrund der geringen Anzahl an getesteten Geruchsstoffen. Eine Verschiebung der Antwortmuster in der Aldehyd-Domäne von posterior nach anterior mit zunehmender Kettenlänge (Meister and Bonhoeffer, 2001; Rubin and Katz, 1999; Takahashi et al., 2004a; Uchida et al., 2000) konnte, wie bei Bozza (Bozza et al., 2004), nicht beobachtet werden. Wie schon bei Bozza erwähnt, könnte auch hier der Grund in der für eine derartige Beobachtung zu geringen Anzahl an getesteten unterschiedlichen aliphatischen Aldehyden gewesen sein.

Wie in Fig. 10A schematisch gezeigt wurde waren, durch die fünf verschiedenen aliphatischen Aldehyde, die bei der niedrigsten Stimuluskonzentration getestet wurden, 31 unterschiedliche Glomeruli aktivierbar. Bei einer Gesamtgröße der Aldehyd-Domäne von etwa 80 Glomeruli (siehe oben) ist zu erwarten, dass in dieser Domäne noch eine Vielzahl anderer Geruchsstoffe repräsentiert werden. Ein einzelner Geruchsstoff konnte schon 10 bis 20 der 80 möglichen Glomeruli der Aldehyd-Domäne aktivieren und verdeutlichte so die Kombinatorik der Geruchskodierung.

Innerhalb der Aldehyd-Domäne konnten die Glomeruli mit aliphatischen Säuren und vereinzelt auch mit Estern und Ketonen (z.B. n-Amylacetat in Fig. 8 und Takahashi et al., 2004a; Uchida et al., 2000) gereizt werden. Nicht aliphatische Aldehyde wie zum Beispiel Benzaldehyd oder zyklische Ketone wie Zyklohexanon konnten ebenfalls Glomeruli der Aldehyd-Domäne aktivieren. Diese Glomeruli lagen fast ausschließlich im posterioren Teil der Aldehyd-Domäne (Fig.

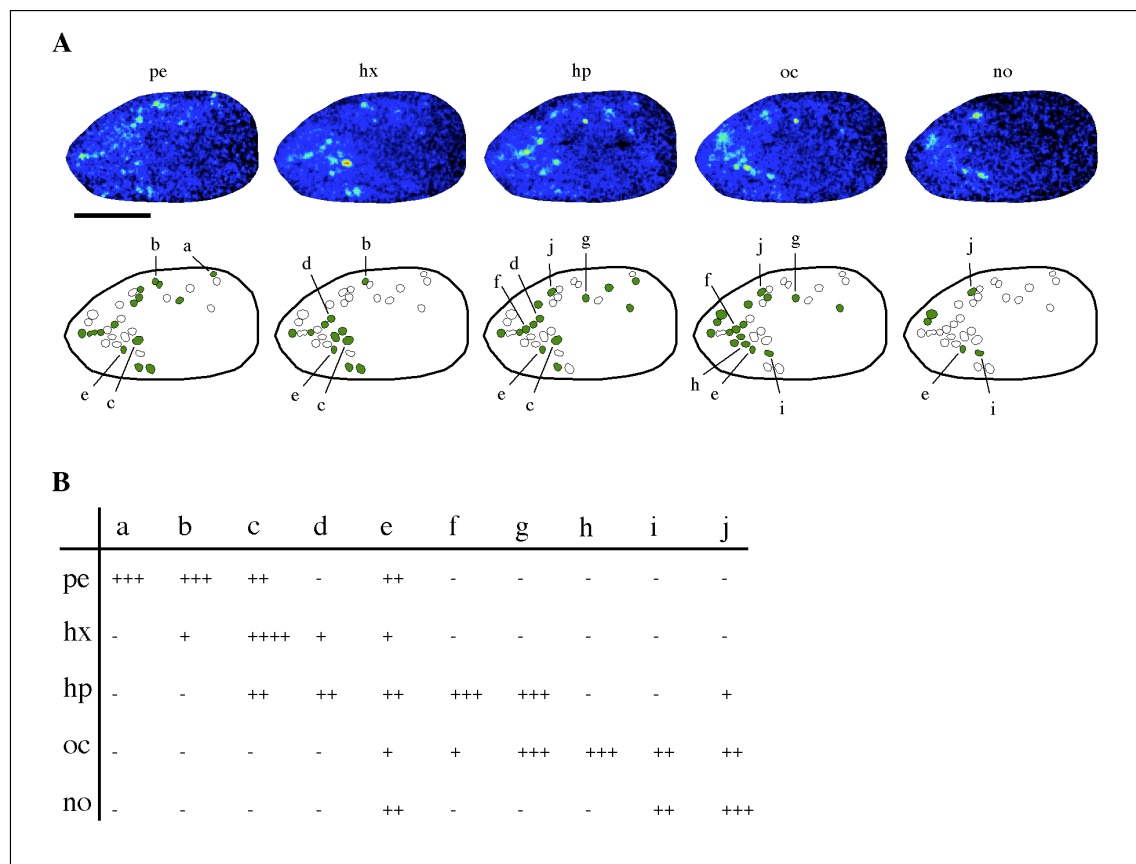


Fig. 10 Die kombinatorische Kodierung aliphatischer Aldehyde.

A: Aktivitätsmuster von 1/100 verdünnten Geruchsstoffen (Pentanal = pe, Hexanal = hx, Heptanal = hp, Octanal = oc, Nonanal = no) in normalisierter Falschfarbenskala (nur bei pe reicht die Falschfarbenskala bis 150% des maximalen Wertes, sonst zeigen rote Gebiete die maximale Aktivität des jeweiligen Aktivitätsmusters an). Unter den Aktivitätsmustern sind die einzelnen Glomeruli (a bis j), die an einem Muster teilnehmen, in grün schematisch dargestellt. Größenmaßstab = 1mm. **B:** Liste der Antwortstärken der Glomeruli a bis j. "-" steht für eine <50%ige Antwortstärke. Die Anzahl der "+" sind nach einer linearen Skala zwischen 50% und 100% verteilt.

11). Die Aldehyd-Domäne konnte daher noch weiter funktional unterteilt werden (z.B.: Takahashi et al., 2004a).

Für eine aktivierende Wechselwirkung zwischen Liganden und OR zumindest der anterioren Aldehyd-Domäne war demnach mit einigen Ausnahmen eine Aldehyd- bzw. Carboxylgruppe notwendig. Auch innerhalb des kleinen Bereichs der anterioren Aldehyd-Domäne konnte durch einige nicht aldehydische Geruchsstoffe wenige Glomeruli aktiviert werden (Fig. 8 und 11). Die chemotope Kodierung ist daher nur in groben Zügen zutreffend. Für die posteriore Aldehyd-Domäne war möglicherweise die Lage eines Sauerstoffatoms in der osmophoren Gruppe, nicht jedoch die komplette Gruppe für die Aktivierung von Bedeutung. Ähnlich wie in den Aldehyd- und Carboxylgruppen existiert auch in Ketonen und Nitroverbindungen ein Sauerstoffatom. So wäre auch die Stimulierbarkeit der Glomeruli aus der posterioren Aldehyd-Domäne mit wesentlich heterogeneren Geruchsstoffen erklärbar. Jedoch waren nicht die Aldehyd- oder Carboxylgruppen noch die Anordnung des Sauerstoffatoms wie in einer Aldehyd- oder Carboxylgruppe alleine für die Aktivierung der Aldehyd-Domäne ausreichend: Für die anteriore Aldehyd-Domäne war darüber hinaus ein aliphatisches Kohlenstoffgrundgerüst eine notwendige Bedingung. Für die heterogenere posteriore Aldehyd-Domäne konnten keine weiteren allgemein gültigen Bedingungen formuliert werden. Um weitere Bedingungen beschreiben zu können musste der Versuchsaufbau leicht modifiziert werden.

3.1.3 Interindividuell identifizierbare Glomeruli

Um die Kodierungsprinzipien im posterioren Teil des optisch ableitbaren Bulbus näher zu untersuchen, sollte die bisher angewandte Methode leicht verändert werden. Vermehrt im posterioren Bulbus erschien durch die bei der Präparation durchgeführte Entfernung der Schädeldecke die Funktionsfähigkeit der Glomeruli nicht immer gewährleistet zu sein (siehe Fig. 12D und E). Die abgeleiteten Aktivitätsmuster könnten demnach unvollständig sein. Um unvollständige Aktivitätsmuster zu vermeiden wurde der gesamte Knochenbereich oberhalb der Bulbi intakt gelassen und durch das Kranium optisch abgeleitet. Bei drei bis vier Wochen alten Tieren ist das Kranium noch ausreichend dünn, so dass die Intensität der geruchsstoffinduzierten Fluoreszenzänderungen für die Berechnung der Aktivitätsmuster groß genug waren. Bei einer niedrigen Vergrößerung konnten im dorsalen Bulbus durch das Kranium hindurch Fluoreszenzänderungen von weniger als 2,5% gemessen werden (Fig. 12). Verglichen mit den Fluoreszenzänderungen an Tieren, denen das Kranium vor den Experimenten entfernt wurde, waren die Werte zumeist deutlich geringer. Durch die Verwendung eines stärker vergrößernden Objektivs konnte dieser Nachteil etwas

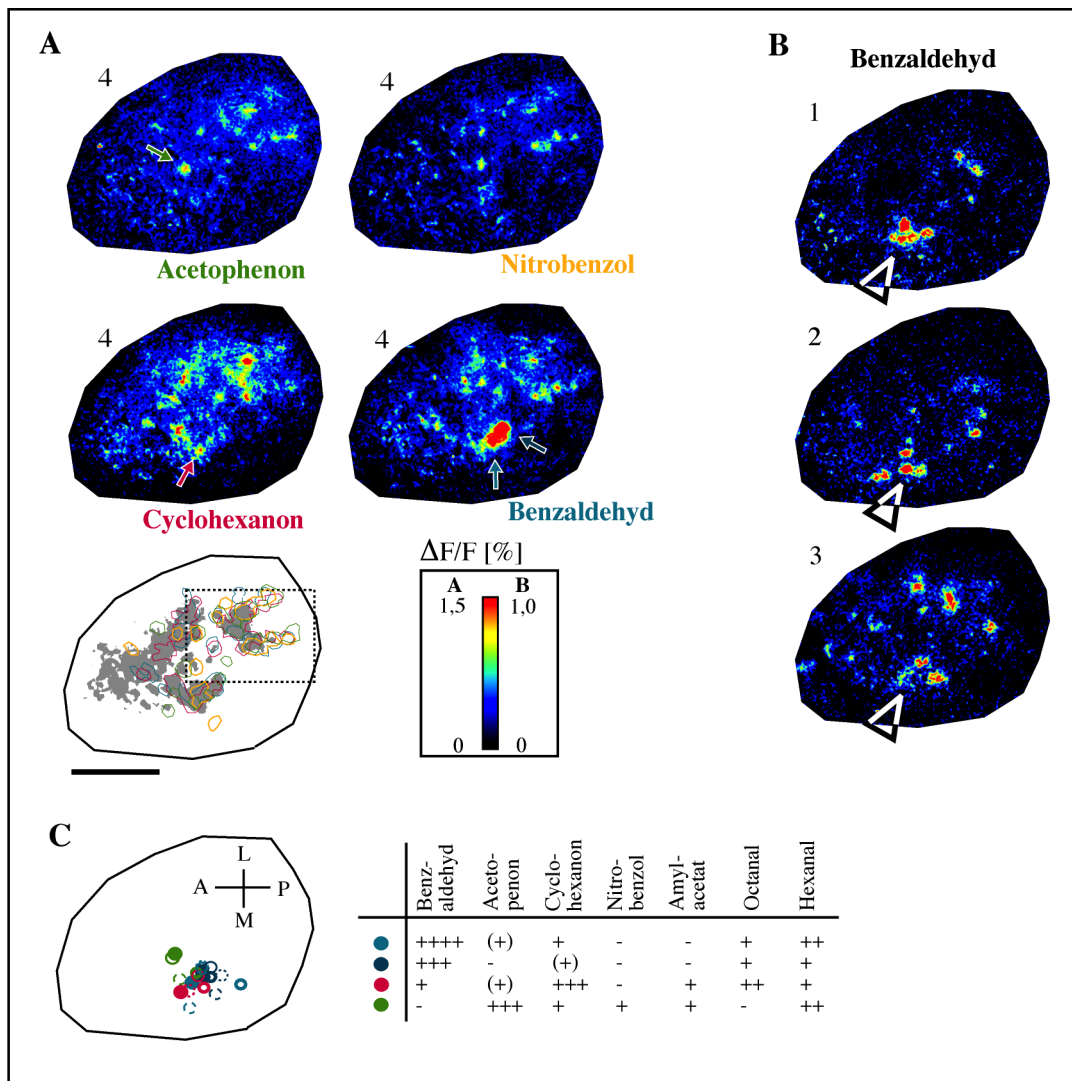


Fig. 11 Durch das Cranium abgeleitete Aktivitätsmuster in einer Aldehyd-Subdomäne.

Aktivitätsmuster vier verschiedener Tiere (1 bis 4). Anterior ist links, medial ist unten. **A**: Zum Teil werden auch Nicht-Aldehyde in dem Bereich der Aldehyd-Domäne repräsentiert. Acetophenon, Nitrobenzol, Cyclohexanon und Benzaldehyd (jeweils 1/10 verdünnt) aktivieren Glomeruli, die großteils in der Aldehyd-Domäne (grauer Bereich in der schematischen Darstellung, wie in Fig. 10 erstellt, gestricheltes Rechteck entspricht dem in späteren Kapiteln untersuchten Ausschnitt der Domäne für zyklische Verbindungen) liegen. Aktivierte Bulbusregionen wurden je nach Geruchsstoff mit einer anderen Farbe in der schematischen Darstellung der Aldehyd-Domäne eingezeichnet (grün, Acetophenon; gelb, Nitrobenzol; rot, Cyclohexanon; blau, Benzaldehyd). Verschiedenfarbige Pfeile zeigen auf verschiedene Glomeruli. Größenmaßstab = 1mm. **B**: Aktivitätsmuster dreier weitere Tiere (1 bis 3), die mit 1/50 verdünntem Benzaldehyd stimuliert wurden. Die Pfeilspitze deutet auf die untersuchte Aldehyd-Subdomäne. **C**: Interindividuelle Lage ($n = 4$; gefüllte Kreise, dick umrandete Kreise, gestrichelt umrandete Kreise, gestrichelt umrandete Kreise) der in A durch einen farbigen Pfeil markierten Glomeruli mit tabellarisch aufgelisteten Ligandenspektren. Die Anzahl der "+" sind nach einer linearen Skala verteilt ("- " Antwort unterhalb der dreifachen Standardabweichung von $\Delta F/F = 0,5\%$, "++++" maximale Antwortstärke).

kompensiert werden. Wie in Fig. 12 und 14 zu sehen, konnten so bei gleichzeitig deutlich besserer Auflösung auch bei höheren Verdünnungen der Geruchsstoffe Fluoreszenzänderungen um die 2,5% erreicht werden.

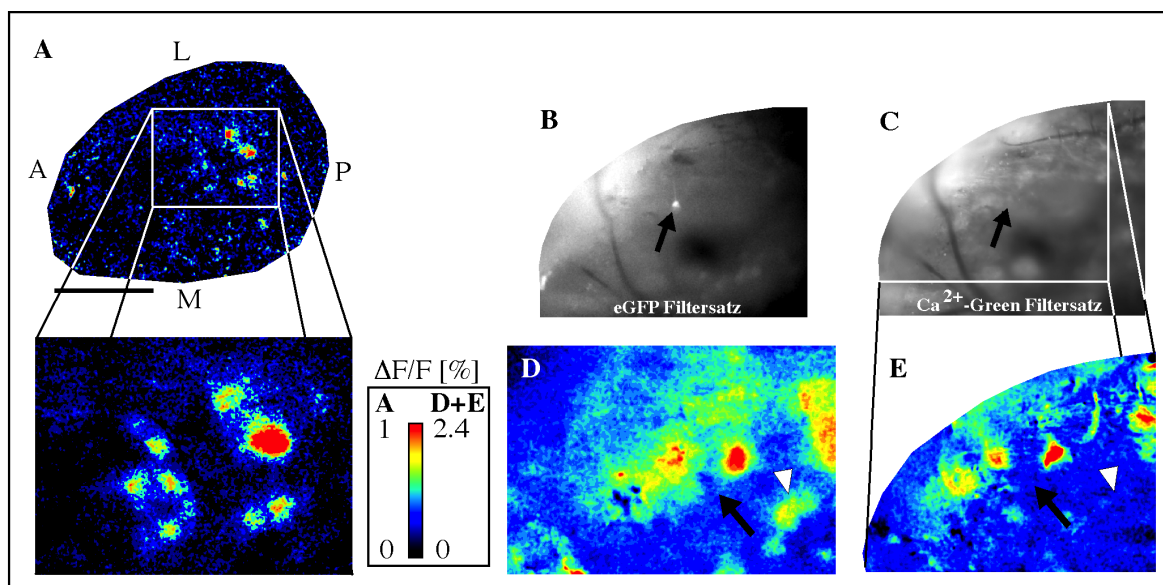


Fig. 12 Unterschiedliche Methoden der optischen Ableitung von Aktivitätsmustern.

A: Die optische Ableitung neuronaler Aktivitäten bei einem Acetophenon-Stimulus durch das intakte Cranium führt zu glomerulären Aktivitätsmustern. Oben: Durch ein 4x Objektiv abgeleitet. Unten durch ein 10x Objektiv abgeleitet. Anterior ist links, medial ist unten. Größenmaßstab = 1mm. **B:** Durch die Verwendung geeigneter Filtersätze (siehe Fig. 13) kann ein eGFP Signal aus einem Calcium-Green Hintergrund(C) herausgefiltert werden. Durch ein 10x Objektiv abgeleitete Aktivitätsmuster mit (**D**) und ohne (**E**) Cranium ähneln sich. Eine, in der Ableitung ohne Cranium ausgefallene, mehrere Glomeruli umfassende Region ist durch die weiße Pfeilspitze in E und D markiert. Der schwarze Pfeil in B, C, D und E deutet auf einen eGFP markierten I7-Glomerulus. I7 kann weder in der optischen Ableitung mit (**D**), noch ohne (**E**) Cranium durch einen Octanal-Stimulus (**D** und **E**) sichtbar aktiviert werden.

Wie in Fig. 11 gezeigt, wurde die Aldehyd-Subdomäne, die besonders deutlich durch Benzaldehyd stimulierbar war, näher untersucht. Diese Aldehyd-Subdomäne beinhaltet fünf Glomeruli, die bei niedriger (Verdünnungsfaktor 1:50) Konzentration von Benzaldehyd einen Großteil des gesamten Benzaldehydmusters bilden (Fig. 11B). Die fünf Glomeruli waren der Teil der Aldehyd-Domäne, die am weitesten medio-posteural lag (bei $n = 6$ Tieren). Bei höheren Konzentration (Verdünnungsfaktor 1:10) konnten einige der Glomeruli neben Benzaldehyd auch mit aliphatischen Aldehyden, Cyclohexanon, Acetophenon und Nitrobenzol aktiviert werden (Fig. 11A). Schon mit diesen wenigen Geruchsstoffen konnten etwa 8 bis 10 Glomeruli anhand ihres Antwortspektrums beschrieben und interindividuell wiedergefunden werden, die jedoch nicht alle in der beschriebenen Aldehyd-Subdomäne angeordnet waren (Fig. 11A und C). Ein Vergleich der Lage von vier der interindividuell identifizierbaren Glomeruli an vier unterschiedlichen Tieren ergab eine Varianz in der Lage der Glomeruli von maximal drei Glomerulidurchmesser, zumeist jedoch nur ein bis zwei Glomerulidurchmesser (Fig. 11C). Bei dieser Analyse diente lediglich die Morphologie des Kraniaums als Fixpunkt für die Überlagerung der Aktivitätsmuster. Da die morphologischen Eigenschaften nur einen groben Fixpunkt ergaben, sollte die Lage einzelner Glomeruli zu dem Fixpunkt ebenfalls nur grob interindividuell übereinstimmen. Die gefundenen Werte von zwei bis drei Glomerulidurchmessern beschreiben daher nur die maximal mögliche Varianz. Der gefundenen Werte von zwei bis drei

Glomerulidurchmessern stimmt aber mit den Werten aus der Literatur erstaunlicherweise exakt überein (Royal and Key, 1999; Schaefer et al., 2001; Strotmann et al., 2000).

3.1.4 Untersuchung einer durch einen Glomerulus definierten Region - die Chemotopie Teil II

Für weitere Analysen sollte die Eigenschaft genetisch veränderten Mäuse ausgenutzt werden, in denen ein bestimmter Glomerulus, der M72-Glomerulus (Potter et al., 2001), mit eGFP sichtbar markiert war. Die Entdeckung, dass OR einer OR-Familie in benachbarten Glomeruli konvergieren (Tsuboi et al., 1999; Strotmann et al., 2000, für M71 und M72 vergleiche Potter et al., 2001 und Bozza et al., 2002), sowie die gefundene grobe chemotope, multidomänenartige Kodierung von Geruchsstoffen im Bulbus von Nagern (z.B.: Igarashi and Mori, 2004; Johnson et al., 1998; Takahashi et al., 2004a; Uchida et al., 2000) legt die Vermutung nahe, dass die OR einer OR-Familie ähnliche Ligandenspektren besitzen (siehe Malnic et al., 1999) und durch die definierte Anordnung der OR-Familien im Bulbus die Eigenschaften der groben Chemotopie festgelegt werden. Durch die optische Ableitung an Mäusen, in denen der M72-Glomerulus durch eGFP sichtbar markiert war, konnten die Kodierungsprinzipien in den posterioren Glomeruli nicht nur demonstriert, sondern auch im Verhältnis zu dem M72 Glomerulus dargestellt werden. Da M72 ein Mitglied einer 31 OR umfassenden OR-Familie ist und die zugehörigen Glomeruli zumindest teilweise stereotyp in der optisch ableitbaren Region lagen (Bozza et al., 2002; Potter et al., 2001), sollten sogar begrenzte Aussagen über die Bedeutung der OR-Familien für die Kodierungsprinzipien im Bulbus möglich sein.

3.1.4.1 Vorversuche zur Darstellung von Fluoreszenzänderungen in einem eGFP Hintergrund

Zunächst sollte die Stimulierbarkeit eGFP gefärbter Glomeruli an einem Glomerulus mit bekanntem Antwortspektrum überprüft werden. Hierfür dienten genetisch modifizierte Mäuse, in denen die Sequenz des M71 OR gegen die Sequenz des Ratten I7 OR ausgetauscht wurde, der, wie in Material und Methoden beschrieben, durch eGFP genetisch markiert war. Für den I7 OR der Ratte sind einige Liganden beschrieben worden, von denen n-Octanal den OR am besten zu aktivieren vermag (Araneda et al., 2000). In den so genetisch veränderten Mäusen liegt der Ratten I7 Glomerulus antero-lateral und sollte in den meisten Fällen in Präparationen mit und ohne Kranium zu erkennen sein. In 12 Tieren in denen das Kranium oberhalb des Bulbus entfernt wurde und der I7 Glomerulus zu erkennen

war, konnte jedoch mit keiner getesteten Verdünnung (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) von Octanal eine Antwort abgeleitet werden. Bei Tieren mit intaktem Krania konnte nur in einem Tier ($n = 6$) eine Antwort auf Oktanal (1/10 verd. Oktanal und 1/10 Verd. Benzaldehyd) erkannt werden. In der überwiegenden Mehrheit der Tiere (11 von 12) wurde jedoch deutlich keine Fluoreszenzänderung im I7 Glomerulus gemessen (Fig. 12D und E).

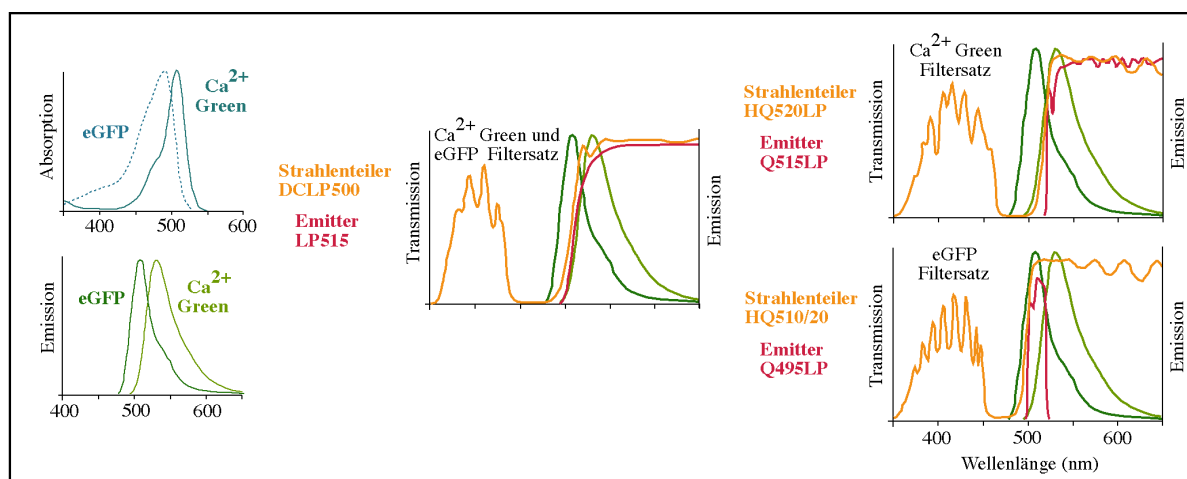


Fig. 13 Die verschiedenen verwendeten Filtersätze.

Links: Absorption und Emission von eGFP und Calcium-Green-1 Dextran. Absorption von eGFP in gestrichelt hellblau, Absorption von Calcium-Green-1 in durchgehend dunkelblau. Emission von eGFP in durchgehend dunkelgrün, Emission von Calcium-Green-1 in durchgehend hellgrün. Mitte und rechts: Strahlenteiler und Emittor von drei verschiedenen Filtersätzen (Calcium-Green und eGFP Filtersatz, Calcium-Green Filtersatz, eGFP Filtersatz) mit überlagerter Emission von eGFP und Calcium-Green-1 (Emission von eGFP in dunkelgrün, Emission von Calcium-Green in hellgrün).

Die Abwesenheit einer Antwort war weder von der Vergrößerung oder der Präparationsmethode noch von der Vollständigkeit der Calcium-Green Färbung abhängig, da zumeist in direkt benachbarten Glomeruli eine starke Fluoreszenzänderung ausgelöst werden konnte (siehe Fig. 12D und E). Möglicherweise war die Abwesenheit einer Antwort durch die genetische Markierung des Glomerulus bedingt. Hierfür kamen zwei Elemente der genetischen Markierung in Frage: (1) Das eGFP selber und/oder (2) die Methode mit der eGFP in die Axon-Terminalien gelenkt wurde – Tau (siehe Fig. 4). Zu (1): eGFP selber könnte derart hell sein, dass im Vergleich hierzu geringe Fluoreszenzänderungen im Hintergrundrauschen der Bilder untergehen würden. Alternativ könnte Calcium-Green von eGFP gequencht (Berkova et al., 2003; Bolsover et al., 2001; Clegg, 1995; Jares-Erijman and Jovin, 2003) werden, oder ein dem Quenchen ähnlicher Mechanismus stattfinden. Zu (2): Von dem Mikrotubuli assoziierten Protein Tau ist bekannt, dass bei einer Überexpression axonale Transportmechanismen gestört werden können (Ebnet et al., 1998; Grundke-Iqbal and Iqbal, 1999; Probst et al., 2000; Wang et al., 2004). Die ausreichende Verteilung von Calcium-Green in den Axon-Terminalien des eGFP

gefärbten Glomerulus würde so nicht garantiert sein, und die geruchsstoffinduzierte Fluoreszenzänderung wäre nur nicht messbar.

Um diese Probleme zu umgehen wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Zunächst wurde ein Filtersatz gewählt, der das eGFP Signal (eGFP Filtersatz: HQ510/20; Q495LP) von der Calcium-Green hervorgerufenen Fluoreszenz (Calcium-Green Filtersatz: HQ520LP; Q515LP) zu trennen vermochte (siehe Fig. 13 und Fig. 12 B und C). In Fig. 13 wurde die Emission von Calcium-Green mit der Emission von eGFP verglichen. Ein kleiner Wellenlängenbereich, etwa 20nm um 505nm herum, scheint exklusiv dem eGFP-Signal eigen zu sein. Durch eine geeignete Filterkombination konnte daher das eGFP Signal, wenn auch nur als ein schwaches Signal, in einer Calcium-Green gefärbten Maus herausgefiltert werden (siehe Fig. 12). Umgekehrt konnte die Calcium-Green-Fluoreszenz von der eGFP-Fluoreszenz nur etwas schlechter getrennt werden. Das Verhältnis von Calcium-Green zu eGFP-Fluoreszenz schien jedoch, verglichen mit dem "alten" Filtersatz DCLP500 als Strahlenteiler und LP515 als Emitter, besser zu sein. Ist die Fluoreszenzintensität beider Farbstoffe etwa gleich wäre im "alten" Filtersatz die Gesamtfluoreszenz durch beide Fluoreszenzquellen etwa gleichermassen bedingt. Im "neuen" Filtersatz hingegen wäre etwa 2/3 der Fluoreszenz durch Calcium-Green erzeugt. Mit dieser neuen Filterkombination konnten aber ebenfalls keine Antworten im I7 Glomerulus gemessen werden (Fig. 12).

Durch Quenchen erzeugte Probleme, oder ein Fehlen von Calcium-Green Molekülen in den Axon-Terminalien durch einen Tau induzierten gestörten Transport, konnte jedoch in diesen Experimenten nicht ausgeschlossen werden. In heterozygoten Tieren sollten gerade diese beiden Punkte umgangen werden können. Aufgrund der "allelischen Exklusion" OR (siehe Einleitung) sollten sich in heterozygoten Mäusen unveränderte ORN mit den eGFP-markierten ORN eines ORN-Typs mischen und in einen Glomerulus konvergieren (Feinstein and Mombaerts, 2004; Feinstein et al., 1991). Zumindest in den unveränderten ORN des Glomerulus sollte sich optisch ableiten lassen. In diesen ORN treffen weder Calcium-Green Moleküle direkt auf eGFP, ein Quenchen oder ähnliches ist also ausgeschlossen, noch könnte Tau die Verteilung von Calcium-Green Moleküle in den Axon-Terminalien verhindern. Da aber für die Ratten I7 ORN in der Maus natürlich keine äquivalenten, unmodifizierten ORN existierten, konnten diese Versuche nur in M72-eGFP markierten, heterozygoten Mäusen durchgeführt werden.

3.1.4.2 Optische Ableitungen in M72-eGFP Glomeruli

Bei der Auswertung von sechs heterozygoten M72 Tieren konnte kein genereller Unterschied der geruchsstoffinduzierten Aktivitätsmuster im Bulbus

erkannt werden. Sowohl die Lage als auch die Intensität der Fluoreszenzänderung einzelner aktivierter Glomeruli erschien vergleichbar zu Wildtyp Mäusen oder homozygoten (I7 oder M72) Mäusen zu sein.

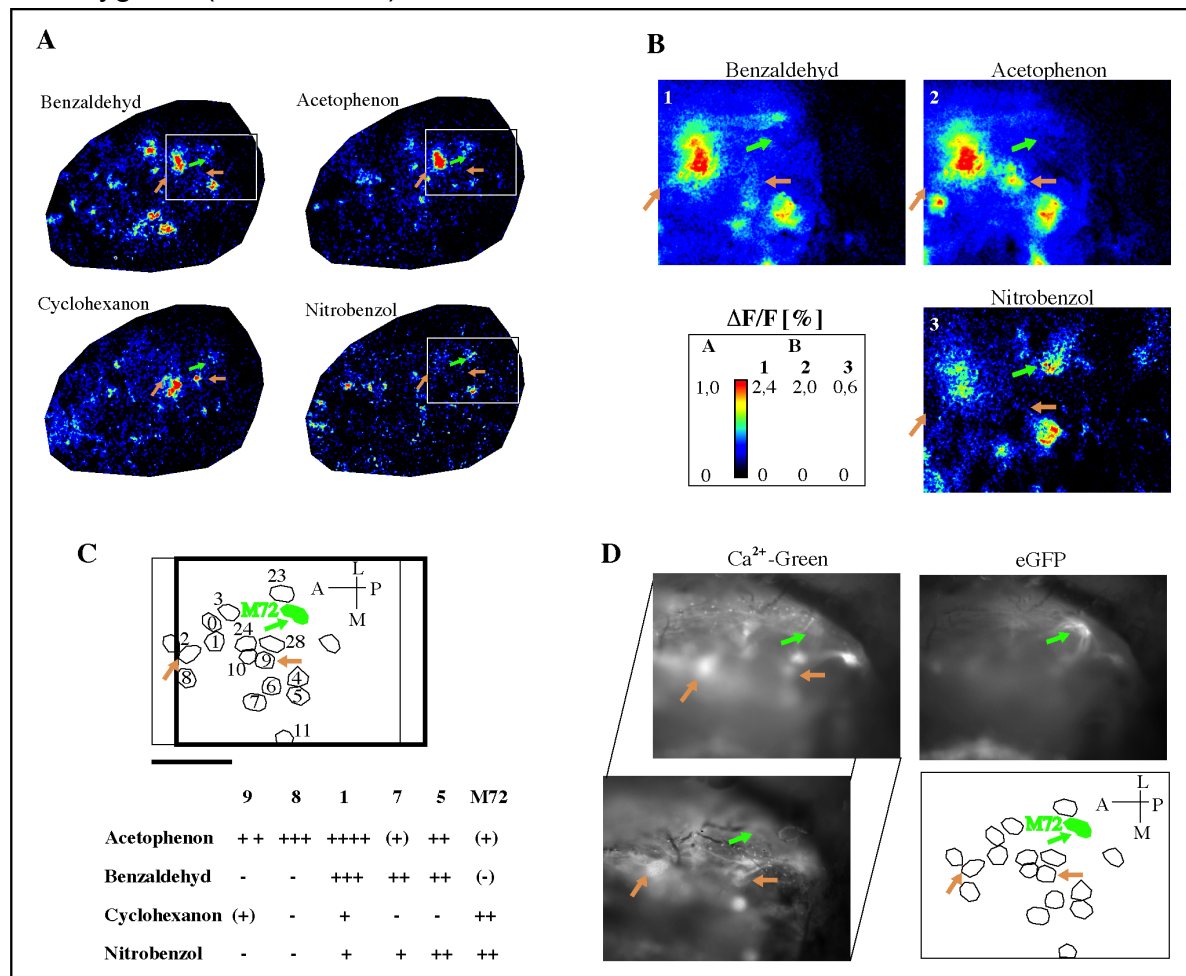


Fig. 14 Aktivitätsmuster in der, durch die eGFP Expression des M72-Glomerulus definierten Region.

Geruchsstoffinduzierte Aktivitätsmuster im posterior-dorsalem Bulbus durch ein 4x Objektiv (**A**), oder 10x Objektiv (**B**) abgeleitet. Die Rechtecke in den Aktivitätsmuster in A zeigen den Bulbusausschnitt in B. **C**: Schematische Darstellung einiger Glomeruli im posterior-dorsalen Bulbusausschnitt. Das Ligandenspektrum von einigen dieser Glomeruli (#9, #8, #1 #7, #5 und M72; siehe auch Tabelle 2 TierII) ist tabellarisch gezeigt. Das dick umrandete Rechteck zeigt den Bulbusausschnitt von B, das dünn umrandete Rechteck zeigt den Bulbusausschnitt von D. Größenmaßstab = 0,5mm. **D**: Durch den geeigneten Filtersatz kann die eGFP Fluoreszenz von der Fluoreszenz des Calcium-Greens getrennt werden. Die Pfeile zeigen in jedem Bild auf die selben Glomeruli (grüner Pfeil auf M72). Anterior ist links, medial ist unten.

Bei der näheren Analyse der M72 Region wurde aber mit abnehmendem Alter der Versuchstiere, unabhängig von der verwendeten eGFP- oder Calcium-Green Filtersätze, ein eGFP gefärbter Glomerulus immer schwieriger zu identifizieren. Möglicherweise lag die Anzahl der eGFP gefärbten ORN in jungen heterozygoten Tieren unterhalb der durch das verwendete Fluoreszenzmikroskop und die Filtersätze nachweisbaren Grenze. Nur in zwei (n = 6) heterozygoten Tieren konnte bei einer gleichzeitigen Calcium-Green Färbung im Bulbus ein eGFP markierter M72 Glomerulus erkannt werden. Von diesen beiden Tieren konnte nur

in einem Fall im heterozygoten M72 Glomerulus eine Fluoreszenzänderung abgeleitet werden (Fig. 14 und Tier III in Tabelle 2). In Fig. 14 beträgt die Fluoreszenzänderung im M72 Glomerulus maximal 0,6% (10xObjektiv, 1/50 verdünntes Nitrobenzol) bei einer maximal gemessenen Fluoreszenzänderung des Ausschnittes von 2,5% (10xObjektiv, 1/50 verdünntes Benzaldehyd). Die Antworten des M72 Glomerulus konnten unter der Verwendung des 4xObjektivs nur schwer erkannt werden, da sie an der Grenze des statistisch ermittelten Hintergrundrauschens (bei 0,5% für optische Ableitungen durch den intakten Knochen unter der Verwendung des 4xObjektivs) lagen. Sollten die Signale dennoch bewertet werden, erschien Nitrobenzol als bester Ligand von M72 unter den untersuchten Geruchsstoffen. Cyclohexanon erschien als etwas schwächerer Ligand von M72 (Fig. 14A). Weder Acetophenon noch Benzaldehyd konnten M72 nennenswert aktivieren. In Versuchen mit dem 10x Objektiv (Fig. 14B) konnten diese Ergebnisse verifiziert werden (Cyclohexanon konnte in diesem Tier nicht mehr bei 10xVergrößerung gemessen werden). Trotz der leichten, knapp über dem statistisch ermittelten Hintergrundrauschen (bei 0,3% für optische Ableitungen durch intakten Knochen unter der Verwendung des 10xObjektivs) liegenden, allgemeinen Aktivierung (bis maximal 0,5%, durchschnittlich aber um 0,3%) mit Benzaldehyd und Acetophenon konnte nur Nitrobenzol M72 klar aktivieren (0,6%).

In homozygoten M72 Mäusen konnte ebenfalls nur in einem von sechs Tieren (Tier IV in Tabelle 2, in 3 der 9 Tiere konnte der M72 nicht im dorsalen Bulbus Bereich erkannt werden) eine Antwort auf Geruchsstoffe abgeleitet werden. In diesem Tier antwortete der M72 Glomerulus jedoch am stärksten auf Benzaldehyd (0,6%, die maximale Antwort eines Glomerulus in diesem Tier wurde mit aliphatischen Aldehyden als Stimulus gemessen und lag bei 1,75%) und ebenfalls stark auf Cyclohexanon (nur in der 4x Vergrößerung gemessen) und Acetophenon. Nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze konnte Nitrobenzol als Ligand demonstriert werden. Verglichen mit der oben beschriebenen heterozygoten Maus, in der eine Antwort im M72 Glomerulus aufgezeichnet werden konnte, wurde in beiden Fällen Cyclohexanon als relativ starker Ligand demonstriert. Nitrobenzol vermochte den M72 Glomerulus einmal stark und einmal nur schwach zu aktivieren und Benzaldehyd konnte nur in einem der beiden Tiere, dann jedoch als starker Ligand nachgewiesen werden. Insgesamt zählten alle potentiell nachgewiesenen Liganden für M72 zu unverzweigten zyklischen, zum Großteil sogar aromatischen Verbindungen (einschließlich der einmaligen schwachen Antwort auf Acetophenon) mit der osmophoren Gruppe direkt vom zyklischen Grundgerüst abzweigend. Acetophenon besitzt außerhalb der Ringstruktur zwei Kohlenstoffatome und stellt möglicherweise daher nur einen sehr schlechten Liganden für M72 dar. Alle verwendeten verzweigten zyklischen Geruchsstoffe konnten keine Antwort im M72-Glomerulus auslösen (siehe Tabelle

2). Die dreidimensionalen räumlichen Ausmaße der Geruchsstoffe scheinen demnach besonders wichtig für die Bindung an M72 zu sein.

Laut Literatur (Bozza et al., 2002) sollte das einzige mit M72 eng verwandte Mitglied dieser OR-Familie (M71) besser auf Acetophenon antworten, jedoch nur teilweise durch Benzaldehyd aktiviert werden können. Der M71 Glomerulus wurde ein bis zwei Glomeruli dorsaler als M72 beschrieben (Potter et al., 2001). In Fig. 14 scheint ein Glomerulus (Glomerulus #9) diesen Bedingungen für den M71 Glomerulus zu genügen. Im Unterschied zu dem M72 Glomerulus konnte in dem Glomerulus #9 bis 1,5% Fluoreszenzänderung (1/10 verdünntes Acetophenon) gemessen werden. Auch im homozygoten M72 Tier konnte ein Glomerulus (Tabelle 2, Tier IV, Glomerulus # 31) erkannt werden, der auf Acetophenon antwortete und durch Benzaldehyd nur schwach zu aktivieren war. Er befand sich lateral, direkt neben M72 und könnte demnach M71 sein. Berücksichtigte man die verschiedenen Konzentrationen der Geruchsstoffe, die durch die unterschiedlichen Dampfdrücke entstanden, konnte man für den potentiellen M71-OR Liganden mit einer längeren osmophoren Gruppe (Butyrophenon und Acetophenon) als für den M72-OR (Cyclohexanon und Benzaldehyd) demonstrieren (Tabelle 2). Aus den Siedepunkten der Geruchsstoffe (Tabelle 2) konnten die Dampfdrücke und somit auch die Konzentrationen in der Gasphase abgeschätzt werden. Von Cyclohexanon (156°C, aus Weast, 1974) über Benzaldehyd (178°C, aus Weast, 1974), Acetophenon (202°C, aus Weast, 1974) nach Butyrophenon (228°C, aus Weast, 1974) nahmen die Siedepunkte zu. Daher sollten die Konzentrationen der Geruchsstoffe in der Gasphase in der selben Reihenfolge abgenommen haben. Schien die Fluoreszenzänderung durch einen Benzaldehydstimulus leicht stärker auszufallen als für den Acetophenonstimulus (gelber Glomerulus Tier I, II und IV Tabelle 2), könnte dies Dampfdruck bedingt dennoch eine stärkere Stimulierbarkeit durch Acetophenon bedeuten. Eine Antwort auf Butyrophenon ist jedoch verglichen mit der Antwort auf Benzaldehyd eher stärker zu bewerten (gelber Glomerulus Tier I, II und IV). Ebenso mussten die seltenen Antworten auf aliphatische Aldehyde im potentiellen M71 Glomerulus (nur deutlich in Tier I) noch geringer als tatsächlich abgeleitet eingestuft werden (Siedepunkte: Hexanal 153°C, Octanal 171°C; aus Weast, 1974). Darüber hinaus ist auch für aliphatische Aldehyde eine zyklische Anordnung der Kohlenstoffatome zumindest in der Bindungstasche der OR vorstellbar (vergleiche die Darstellung der aliphatischen Aldehyde in Fig. 15).

Weder die optische Ableitung heterozygoter noch homozygoter M72-Tiere konnte befriedigende Ergebnisse im M72 Glomerulus liefern. In heterozygoten Tieren konnte nur selten ein M72 Glomerulus in der optisch ableitbaren Bulbusregion erkannt werden und in homozygoten Tieren konnte nur selten im M72 Glomerulus abgeleitet werden. Möglicherweise war die Antwort im M72 Glomerulus in den meisten Fällen für die optische Ableitung unterhalb der Nachweisgrenze. Ob Nitrobenzol, Cyclohexanon oder Benzaldehyd für M72

schlechte Liganden darstellten oder der M72 selbst durch den besten möglichen Liganden nicht stärker aktiviert werden konnte (und daher oft unterhalb der Nachweisgrenze für optische Ableitungen lag), konnte in diesen Experiment nicht geklärt werden. Ebenfalls konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich in den beiden Fällen, in denen eine Antwort im M72 Glomerulus erkannt werden konnte, ein zweiter Glomerulus unterhalb des M72 Glomerulus befand, von dem die Fluoreszenzänderungen ausgingen. So ließe sich auch die in einem Einzelfall beobachtete Antwort im I7 Glomerulus erklären. In der Literatur sind sich überlappende oder komplett übereinander liegende Glomeruli in Schnitten gezeigt worden (z.B.: (Nagao et al., 2000)).

3.1.4.3 Die M72-Region

Um trotz des nur einmaligen Erfolges einer Ableitung aus mit Calcium-Green gefärbten heterozygoten M72 Tieren, in denen der M72 Glomerulus erkannt werden konnte, die M72 Region näher untersuchen zu können, wurden die Ergebnisse mit erkennbaren M72 Glomeruli zusammen ausgewertet, und mit Antworten aus Tieren, in denen der M72-Glomerulus nicht identifiziert werden konnte, verglichen.

In allen untersuchten Tieren, an denen optisch abgeleitet werden konnte, wurden Antworten im posterioren dorsalen Bereich des Bulbus abgeleitet, in dem etwa 50 bis 60 Glomeruli lagen (bestimmt an Tieren mit eGFP gefärbten Glomeruli in OMP-eGFP Mäusen; (Potter et al., 2001)). Mit unterschiedlichen Geruchsstoffen, jeweils 1/50 verdünnt, konnten bis maximal 41 Glomeruli, mindestens aber 17 Glomeruli aktiviert werden (Tabelle 2). Zu den Geruchsstoffen, die am meisten Glomeruli aktivieren konnten, zählten Benzaldehyd (19,4 Glomeruli, SEM = 4,51, n = 5), Cyclohexanon (17,2 Glomeruli, SEM = 3,11, n = 5) und Nitrobenzol (15 Glomeruli, SEM = 5,60, n = 4). Ebenfalls viele Glomeruli konnten durch Pentanal (18,5 Glomeruli, SEM = 7,78, n = 2), Hexanal (20,0 Glomeruli, SEM = 0, n = 2) und teilweise auch Octanal (17,3 Glomeruli, SEM = 5,44, n = 4) aktiviert werden. Möglicherweise war dies jedoch durch die, aus den Siedepunkten abgeschätzten, höheren Dampfdrücke dieser Geruchsstoffe und die daraus resultierende höhere Konzentration im Geruchsstoffstimulus zu erklären (siehe Fig. 15). Aus dem selben Grund könnten auch die Antworten auf einen Benzaldehydstimulus und Cyclohexanonstimulus herabgestuft werden (Siedepunkt: 178°C und 156°C), nicht jedoch die Antworten auf Nitrobenzol (Siedepunkt 211°C).

In jedem daraufhin untersuchten Tier (n = 6) konnten Glomeruli in der M72-Region mit unterschiedlichen Ligandenspektren gefunden werden. Einige Ligandenspektren waren breit, mit vielen Geruchsstoffen, die einen Glomerulus zu aktivieren vermochten. Andere Ligandenspektren waren eng mit teilweise nur

einem Geruchsstoff aus maximal 15 verschiedenen getesteten Geruchsstoffen (Tabelle 2). Zum Teil konnten die Glomeruli aufgrund ihres Antwortspektrums und ihrer Lage im posterioren Bulbusausschnitt identifiziert werden (siehe Fig. 15 und Tabelle 2). Es konnten interindividuell gleichbleibende Gruppen von benachbarten Glomeruli definiert werden, deren Antwortspektrum charakteristisch war, sich jedoch innerhalb der Gruppe kaum unterschied (Fig. 15 und Tabelle 2). Darüber hinaus wurden einzelne, voneinander getrennt liegende Glomeruli mit interindividuell sehr ähnlichem Ligandenspektrum gefunden.

Obwohl nur die Morphologie des Kraniaums verwendet wurde, um interindividuell die Aktivitätsmuster übereinander zu legen, konnte sowohl für die einzelnen durch das Ligandenspektrum identifizierten Glomeruli, als auch für die entsprechenden Glomeruli-Gruppen eine deutliche stereotype Lage gezeigt werden (Fig. 16A). Die interindividuelle Variabilität in der Lage der identifizierbaren Glomeruli war selten mehr als zwei bis drei Glomerulidurchmesser. Eine ähnliche Variabilität konnte für die Lage des M72-Glomerulus beobachtet werden (Fig. 16B). Da die beschriebene Stereotypie in der Lage einzelner Glomeruli (Royal and Key, 1999; Schaefer et al., 2001; Strotmann et al., 2000) recht gut zu der gefundenen Variabilität passte, sollte die Morphologie des Kraniaums einen recht guten Fixpunkt für die Überlagerung der Aktivitätsmuster in den unterschiedlichen Tieren bieten können. Die relative Lage einzelner identifizierbarer Glomeruli veränderte sich nicht bedeutend, wenn anstelle der Morphologie des Kraniaums der M72-Glomerulus als Fixpunkt verwendet wurden. Da für diese Untersuchung nur zwei Tiere benutzt werden konnten, ist dieses Ergebnis nur als vorläufig anzusehen.

Zu den interindividuell wiederfindbaren Glomeruli zählte auch der unter 3.1.4.2 als potentieller M71 beschriebene Glomerulus. Wie bereits oben beschrieben, konnte in diesem Glomerulus eine stärkere Antwort mit zunehmender Anzahl der Kohlenstoffatome der osmophoren Seitengruppe abgeleitet werden. Nur selten konnte ein Glomerulus interindividuell oder intraindividuell beschrieben werden, der nicht mindestens ähnlich gut auf Butyrophenon wie auf Acetophenon antwortete. Eine Ausnahme hierzu stellte der Glomerulus #34 (lila Glomerulus in Tabelle 2) und möglicherweise auch M72 (siehe oben) dar. Wie in Tabelle 2 zu erkennen, antwortete der lila Glomerulus jeweils nur deutlich auf Acetophenon, nicht aber auf Butyrophenon (n = 3 Tiere). Die Fähigkeit eines Geruchsstoffes, mit länger werdendem Kohlenstoffgrundgerüst immer mehr Glomeruli (hier besser einen bestimmten Glomerulus) aktivieren zu können, wurde schon bei den Kodierungsprinzipien der Aldehyd-Domäne (3.1.2) beschrieben und schien auch im posterioren Bulbusareal eine Rolle zu spielen. Selbst ohne den Dampfdruck zu berücksichtigen, konnten mehr Glomeruli beobachtet werden, die nur auf Butyrophenon, nicht aber auf Acetophenon antworteten, als umgekehrt (siehe Fig. 15). Das Prinzip, mit zunehmender Kohlenstoffkettenlänge immer mehr Glomeruli zu aktivieren, bezog

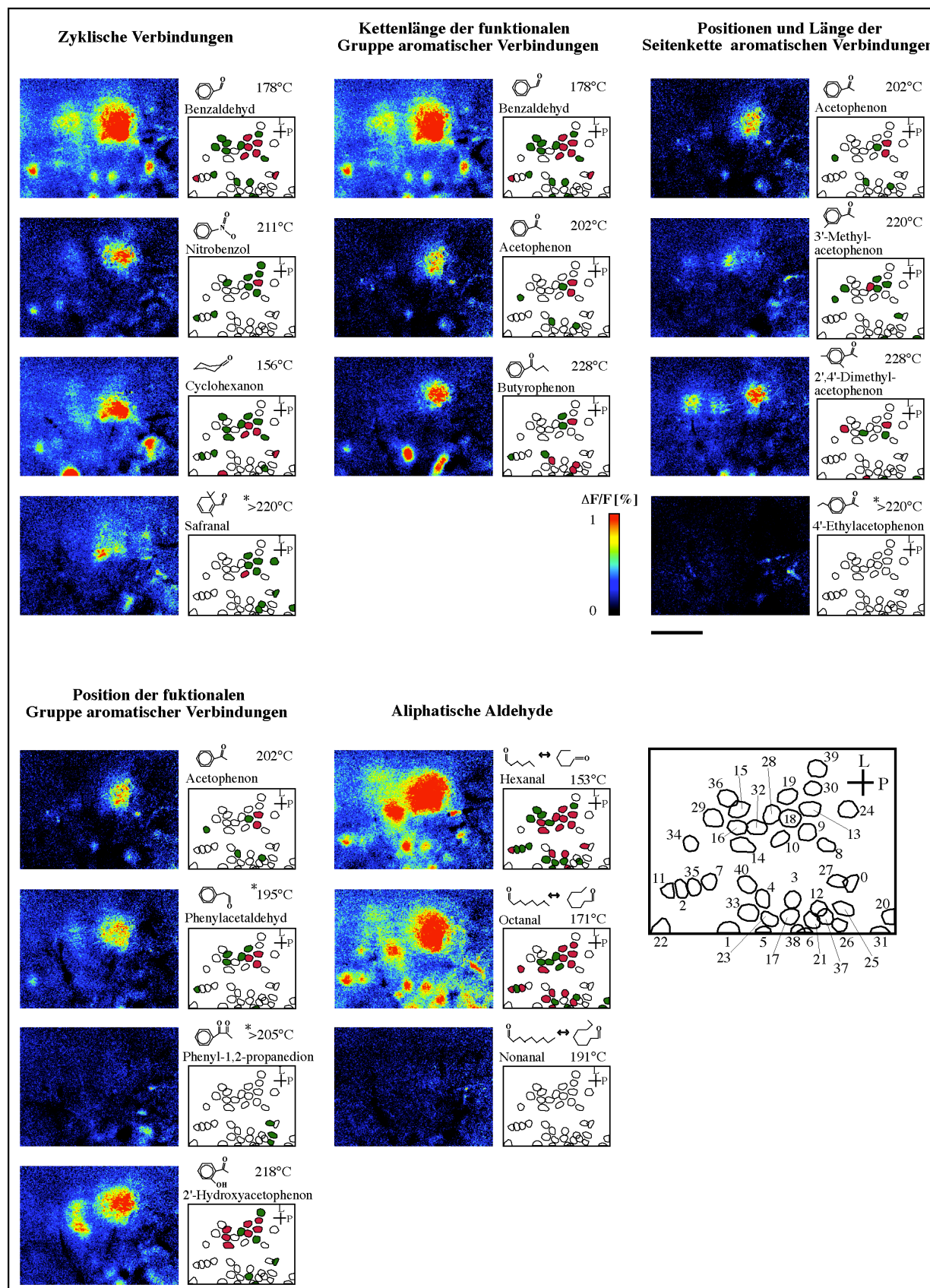


Fig. 15 Aktivitätsmuster der M72-Region.

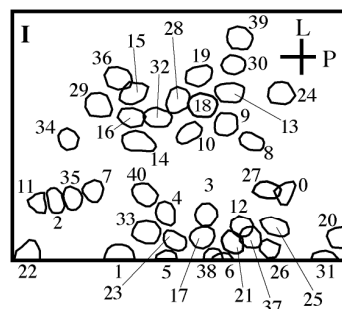
Aliphatische Aldehyde und verschiedene zyklische Verbindungen evozieren unterschiedliche Aktivitätsmuster im posterior-dorsalen Bulbusausschnitt. Die Position und Kettenlänge der funktionalen Gruppe, sowie die Position und Länge der nicht-funktionalen Seitenketten sind für die Geruchsstoff spezifischen Aktivitätsmuster ausschlaggebend. Neben den Aktivitätsmustern sind schematisch die aktivierten Glomeruli in grün (schwach bis mittelmäßig aktivierte Glomeruli) oder rot (stark aktivierte Glomeruli) nach ihrem visuell bestimmten Aktivitätsgrad angegeben. Der Name des Geruchsstoffs, seine Strukturformel und sein Siedepunkt (mit Asterisk gekennzeichnet: nach Sigma-Aldrich, www.Sigma-Aldrich.com, sonst nach Weast, 1974) sind über der Schemazeichnung gezeigt. Einige der Glomeruli des gezeigten Bulbusausschnittes wurden numeriert. Die Nummern der Glomeruli (wie sie in Tabelle 2 verwendet wurden) und ihre Lage sind in der großen Schemazeichnung eingetragen. Falschfarbenskala in allen Aktivitätsmustern wie angegeben von 0% (schwarz) bis 1% (rot). Anterior ist links, medial ist unten. Größenmaßstab = 0,5mm.

sich aber nur auf die Kettenlänge der osmophoren Gruppe. Wurde zum Beispiel in einer weiteren Seitengruppe eine Methylgruppe gegen eine Ethylgruppe ausgetauscht (vergleiche 3'-Methylacetophenon, 2',4'-Dimethylacetophenon mit 4'-Ethylacetophenon in Fig. 15), konnte nur ein Glomerulus schwach aktiviert werden. Obwohl die Siedepunkte von 3'-Methylacetophenon, 2',4'-Dimethylacetophenon und 4'-Ethylacetophenon annähernd gleich sind, konnten deutlich weniger Glomeruli durch den Geruchsstoff mit der längeren Seitenkette stimuliert werden (Fig. 15 und Daten nicht gezeigt, n = 2). Ebenso konnten zwei Methylseitengruppen nicht mehr Glomeruli, oder einzelne Glomeruli stärker aktivieren als nur eine Methylseitengruppe (Tabelle 2 und Daten nicht gezeigt n = 3).

Im Unterschied zu den vereinzelt liegenden Glomeruli, in denen nur seltenein benachbarter Glomerulus mit sehr ähnlichen Ligandenspektrum gefunden werden konnte (siehe aber Glomerulus #1 und #2, Tier I, Tabelle2), konnten regelmäßig Gruppen von zwei oder drei benachbarten Glomeruli beschrieben werden, deren Ligandenspektrum einander ähnelten (Tabelle2). Die genaue Lage der Glomeruli einer Glomeruli-Gruppe untereinander war interindividuell nicht festgelegt (im Gegensatz zu der Lage der Glomeruli-Gruppe an sich, Fig. 16A). In Fig. 15 konnte beispielsweise die Glomeruli-Gruppe aus den Glomeruli #9, #13 und #18 in fast allen Antwortmustern der verschiedenen Geruchsstoffe als besonders stark antwortende Glomeruli wieder gefunden werden. Die relative Antwortstärke der einzelnen Glomeruli variierte bei den unterschiedlichen Geruchsstoffen leicht und ist nur für einige der verwendeten Geruchsstoffe deutlich unterschiedlich (Cyclohexanon, Nitrobenzol, Butyrophenon, 3'-Methylacetophenon und 2',4'-Dimethylacetophenon in Fig. 15 und Tabelle 2). Nur 4'-Ethylacetophenon (n = 2) und Phenyl-1,2-propanedion (n = 2) aus den verwendeten Geruchsstoffen vermochten keinen der drei Glomeruli zu aktivieren. Unter dem Vorbehalt der geringen Anzahl an untersuchten Tieren für diese beiden Geruchsstoffe könnten die stereochemischen Eigenschaften der Ethylgruppe und ein zweites Sauerstoffatom an der osmophoren Seitenkette (nicht jedoch im

	Benzaldehyd	Acetophenon	Cyclohexanon	Nitrobenzol	2-Hydroxy-acetophenon	Butyrophenon	3-Methyl-acetophenon	2,4-Dimethyl-acetophenon	4-Ethylacetophenon	Phenylacet-aldehyd	Phenyl-1,2-propanedion	Safranral	Nonanal	Octanal	Hexanal	Pentanal
I 0	+++	-	++++	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	nd
1	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
2	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
3	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	nd
4	+++	+	+	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	nd
5	++	-	-	+	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++	+	nd
6	++	-	-	(+)	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	nd
7	++	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
8	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
9	++++	++	++++	+	++	+	-	+	-	++	-	++	(+)	++++	++++	nd
10	+++	-	+++	-	-	++	-	-	-	++	-	+++	-	+	+++	nd
11	+++	-	-	++	-	++	-	-	-	++	-	-	-	+++	++	nd
12	-	+	-	+	+	+++	-	-	(+)	-	-	++	-	++	-	nd
13	++++	+++	+	++++	++++	++++	+	++++	-	+++	-	++	-	++	-	nd
14	+	-	+	-	+++	-	-	-	-	+	-	-	-	+++	++++	nd
15	++	-	-	+	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	nd
16	++	+	+	+	++	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	nd
17	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
18	++++	++	++	++	+++	+	+	-	-	+++	-	++	-	++++	++++	nd
19	+++	-	+	++	+++	+	+	+	-	++	-	+	+	+++	+++	nd
20	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	nd
21	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	+	-	+++	-	nd
22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	nd
24	-	-	-	-	(+)	-	-	+	-	-	-	++	-	-	-	nd
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	nd
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	nd
27	-	-	-	-	(+)	-	+	(+)	-	+	-	-	-	-	++	nd
28	++	-	++	-	++	-	++	-	-	++	-	-	-	++	++	nd
29	+	-	-	-	-	-	+	++	-	+	-	-	-	-	+	nd
30	++	-	-	+	+++	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	nd
31	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	++	-	nd
32	-	-	+	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	+	nd
33	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	nd
34	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	++	-	nd
35	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	nd
36	-	-	+	+	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	+	+	nd
37	-	-	+	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	nd
38	+	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	+	+	nd
39	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	nd
40	+	-	-	-	-	+	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	nd

II 0	++	+	-	++	-	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	+	+	nd	-
1	++	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	(+)	nd	nd	-	++	nd	-
2	+++	+	+	++	-	+	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	+	nd	+
3	++	++	+	+	-	+	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	+	nd	-
4	+	++	+	-	-	++	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	-	nd	+
5	++	++	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	-	nd	-
6	++	+	+	-	-	-	nd	nd	nd	(+)	nd	nd	-	-	nd	-
7	+	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	-	nd	+
8	++	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	-	nd	+
9	++++	++++	++++	-	++	++	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	-	nd	+++
10	++++	++	+	++	++	(+)	nd	nd	nd	(+)	nd	nd	-	-	nd	+
11	+++	++	++	+	+	-	nd	nd	nd	(+)	nd	nd	-	+	nd	++
12	++	-	+	-	-	-	nd	nd	nd	(+)	nd	nd	-	-	nd	-
13	-	++	-	-	-	++	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	-	nd	-
14	+	-	+	(+)	(+)	+	nd	nd	nd	-	nd	nd	+	-	nd	-
15	-	-	-	-	-	+	nd	nd	nd	-	nd	nd	+	+	nd	+
16	+	+	-	+	+	+	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	-	nd	(+)
17	+	+	-	-	-	+	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	-	nd	(+)
18	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	(+)	(+)	nd	+++
19	-	-	++	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	(+)	nd	-
20	-	-	+	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	-	nd	-
21	-	-	+	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	-	nd	-
22	-	+	+	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	(+)	nd	-
23	-	+	+	-	-	+	nd	nd	nd	(+)	nd	nd	(+)	-	nd	-
24	+	-	+	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	-	nd	(+)
25	-	+	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	(+)	+	nd	(+)
26	-	-	-	-	+	+	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	-	nd	-
27	++	-	-	+	-	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	-	nd	-



	Benzaldehyd	Acetophenon	Cyclohexanon	Nitrobenzol	2-Hydroxy-acetophenon	Butyrophenon	3-Methyl-acetophenon	2,4-Dimethyl-acetophenon	4-Ethyl-acetophenon	Phenylacet-aldehyd	Phenyl-1,2-propanedion	Safranal	Nonanal	Octanal	Hexanal	Pentanal
III	0	+++	+++	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	+	-	nd
	1	+++	+++	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	(+)	-	+	nd
	2	+	+	+	(+)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	nd
	3	++	+	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	(+)	-	nd
	4	+++	++	-	++	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	+	(-)	nd
	5	++	++	-	++	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	(+)	nd
	6	++	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	-	-	nd
	7	++	(+)	-	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	(+)	(+)	+	nd
	8	-	+++	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	+	-	nd
	9	-	++	(+)	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	(+)	+	nd
	10	-	-	+++	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	++	nd
	11	+	++	(+)	(+)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	(+)	-	nd
	12	+	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	++	nd
	13	+	-	++++	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	-	nd
	14	-	-	++++	(+)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	nd
	15	-	-	++++	(+)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	(+)	(+)	nd
	16	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	++	nd
	17	-	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	(+)	+	+	nd
	18	+	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	+	-	nd
	19	-	-	++	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	nd
	20	+	-	++	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	+	++	nd
	21	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	+	(-)	nd
	22	++	+	+	++	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	(+)	+	-	nd
	23	++	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	-	-	nd
	24	+	+	+	(+)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	+	nd
	25	+	+	(+)	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	nd
M72=	26	+	(+)	(+)	(+)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	nd
	27	(+)	(+)	++	++	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	(+)	nd
	28	-	-	(+)	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	(+)	(+)	+	nd
	29	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+	+	nd
	30	+	-	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	+	nd
	31	++	-	+	++	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	(+)	-	(+)	nd
IV	0	+	(+)	(+)	+	+	(+)	nd	nd	nd	-	nd	+	+++	nd	+
	1	-	(+)	++	-	+	-	nd	nd	nd	-	nd	-	-	nd	+
	2	+	+	+	++	-	-	nd	nd	nd	-	nd	-	++	nd	-
	3	++	(+)	+	+	+	+	nd	nd	nd	++	nd	-	+++	nd	+
	4	++	+	+++	+	+	(+)	nd	nd	nd	+	nd	-	+++	nd	+
	5	++	-	+	-	(+)	(+)	nd	nd	nd	+	nd	nd	-	+	nd
	6	+	-	-	+++	+++	-	nd	nd	nd	+	nd	-	-	nd	(+)
	7	+	+	+	++	+	+	nd	nd	nd	+	nd	-	-	nd	+
	8	+	-	++	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	+	++	nd	+
	9	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	-	+	nd	+
	10	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	++	-	nd	-
	11	-	-	+	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	-	-	nd	-
	12	++	-	+++	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	+	-	nd	+++
	13	+++	-	-	+++	-	-	nd	nd	nd	-	nd	++	++++	nd	+++
	14	+	-	+	++	-	-	nd	nd	nd	-	nd	+	+	nd	-
	15	-	-	-	+	+	-	nd	nd	nd	-	nd	-	+++	nd	++++
	16	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	-	+++	nd	-
	17	-	-	+	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	-	-	nd	++
	18	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	-	+++	nd	-
	19	++	-	-	++++	-	-	nd	nd	nd	-	nd	(+)	++++	nd	++++
	20	+	-	+	++	-	-	nd	nd	nd	-	nd	+	+++	nd	+
	21	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	++	+++	nd	+++
	22	-	-	-	(+)	-	-	nd	nd	nd	-	nd	-	+++	nd	+++
	23	+	-	++	++	-	-	nd	nd	nd	-	nd	+	-	nd	-
	24	+	(+)	+	+	-	+	nd	nd	nd	-	nd	-	++++	nd	+
	25	-	-	-	++	-	(+)	nd	nd	nd	+	nd	nd	+	nd	-
	26	-	-	++	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	-	-	nd	(+)
	27	+	(+)	-	++	+	-	nd	nd	nd	+	nd	-	-	nd	-
	28	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	-	-	nd	+
	29	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	-	-	nd	+
	30	-	-	-	+	-	-	nd	nd	nd	-	nd	+	-	nd	(+)
	31	+	+	-	-	(+)	+	nd	nd	nd	-	nd	-	-	nd	-
	32	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	+	-	nd	-
M72=	33	++	(+)	(+)	(+)	+	-	nd	nd	nd	+	nd	-	-	nd	++++
	34	+++	+++	+++	(+)	-	-	nd	nd	nd	-	nd	-	-	nd	++++
V	0	++	-	+	nd	+	nd	-	-	nd	-	nd	-	nd	nd	nd
	1	-	-	+	nd	+	nd	-	+	nd	-	nd	+	nd	nd	nd
	2	+++	+++	-	nd	+++	nd	+	-	nd	-	nd	-	nd	nd	nd
	3	+++	+++	++	nd	+++	nd	+	-	nd	-	nd	-	nd	nd	nd
	4	(+)	-	+	nd	-	nd	-	-	nd	-	nd	-	nd	nd	nd
	5	++	+	++	nd	+	nd	+	-	nd	+	nd	-	nd	nd	nd
	6	+++	-	+++	nd	+	nd	+	+	nd	-	nd	-	nd	nd	nd
	7	++	+	(+)	nd	-	nd	-	+	nd	-	nd	-	nd	nd	nd
	8	-	-	(+)	nd	-	nd	+	+	nd	-	nd	-	nd	nd	nd
	9	-	-	-	nd	-	nd	-	-	nd	-	nd	-	nd	nd	nd
	10	++	+	(+)	nd	-	nd	-	-	nd	-	nd	+	nd	nd	nd
	11	+	-	-	nd	-	nd	-	-	nd	-	nd	+	nd	nd	nd
	12	(+)	+	(+)	nd	-	nd	-	-	nd	-	nd	-	nd	nd	nd
	13	+++	+	++	nd	-	nd	-	+	nd	-	nd	-	nd	nd	nd
	14	++	-	(+)	nd	-	nd	-	-	nd	-	nd	-	nd	nd	nd
	15	-	+	-	nd	-	nd	-	-	nd	-	nd	-	nd	nd	nd
	16	+	-	+	nd	-	nd	-	-	nd	-	nd	-	nd	nd	nd
	17	-	-	++	nd	-	nd	-	-	nd	-	nd	-	nd	nd	nd

Tabelle 2 Ligandenspektren von 154 Glomeruli aus fünf verschiedenen Tieren.

Das Ligandenspektrum von Glomeruli wurde in fünf Tieren bestimmt (I bis V). Farblich gekennzeichnet sind acht interindividuell wiederfindbare Glomeruli. In zwei der fünf Tiere konnte ein M72 Glomerulus durch die eGFP Expression identifiziert werden. “+“ wurden nach einer linearen Skala verteilt (“-“ = Aktivität unterhalb der 3x Standardabweichung, “++++“ maximale Aktivität im gemessenen Bulbusausschnitt). In seltenen Fällen wurde der Aktivierungsgrad aufgrund des visuellen Eindrucks um ein “+“ hoch oder runter gestuft. Wurde die Bewertung von einem “-“ auf ein “+“ angehoben wurde Zweifeln ein Klammer gesetzt. Nicht bestimmte Werte sind gekennzeichnet (nd). **A:** Schemazeichnung der Lage der Glomeruli von Tier I (siehe auch Fig. 15). Anterior ist links, medial ist unten.

allgemeinen, vergleiche 2'-Hydroxyacetophenon mit Phenyl-1,2,-propandion) die aktivierende Bindung dieser Geruchsstoffe an den OR verhindern.

In der überwiegenden Mehrheit der posterioren Glomeruli war die osmophile Gruppe und die Position sowie Anzahl der Seitenketten von entscheidender Bedeutung für das Aktivitätsmuster. So waren unter den charakterisierbaren Glomeruli einzelne Glomeruli beispielsweise nur mit Benzaldehyd (Glomerulus #22 in Fig. 15) oder Acetophenon (Glomerulus #34 in Fig. 15) aktivierbar (Unterschied in der osmophoren Gruppe). Ebenso zeigten Aktivitätsmuster von Acetophenon und Phenylacetaldehyd nur wenige gemeinsame Glomeruli (Fig. 15, Unterschiede in der Lage des Sauerstoffatoms). Bei der Stimulation mit Geruchsstoffen, die sich nur in der Position und Anzahl der Seitenketten unterschieden (3'-Methylacetophenon und 2',4'-Dimethylacetophenon), konnten nur in Glomeruli, die auf die meisten untersuchten Geruchsstoffe antworteten, eine Antwort mit beiden Geruchsstoffen abgeleitet werden.

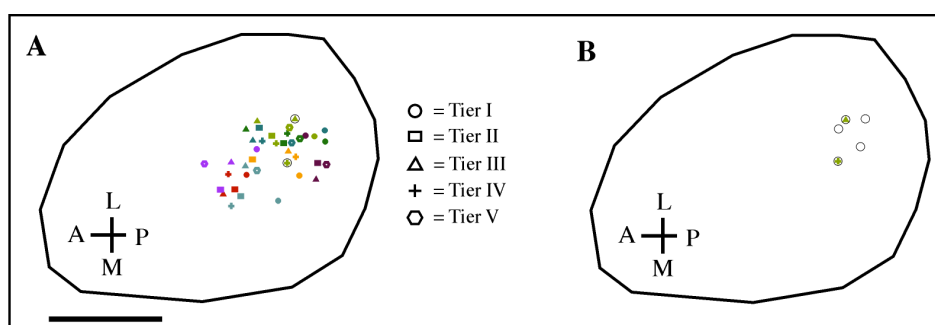


Fig. 16 Interindividuelle Variabilität von dem M72-Glomerulus und acht weiteren identifizierbaren Glomeruli der M72-Region.

A: Interindividuelle Lage der acht farblich markierten Glomeruli aus Tabelle 2. Es wurden die selben Farben wie in Tabelle 2 für die selben Glomeruli verwendet. **B:** Interindividuelle Lage von fünf M72-Glomeruli in fünf verschiedenen Tieren. Das grüne Kreuz entspricht der Lage des M72-Glomerulus in Tier IV und das grüne Dreieck entspricht der Lage des M72-Glomerulus in Tier III (siehe Tabelle 2). Die Glomeruli der verschiedenen Tiere wurden anhand der Morphologie des Kraniaums übereinander gelegt. Die verwendeten Symbole haben etwa die Größe eines halben Glomerulus. Anterior ist links, medial ist unten. Größenstandard = 1mm.

Zusammengefasst erschien die M72-Region für die Unterscheidung von zyklischen oder aromatischen Verbindungen, wie zum Beispiel aromatische Ketone, angepasst zu sein. Wesentlich häufiger als in der Aldehyd-Domäne konnten einzelne Glomeruli anhand ihrer Ligandenspektren charakterisiert werden und interindividuell in recht stereotypen Positionen wieder gefunden werden. Selbst bei höheren Geruchsstoffkonzentrationen (vergleiche Fig. 11) konnte nur in einzelnen Glomeruli nicht in einer größeren glomerulären Domäne eine Aktivität abgeleitet werden. Durch die Glomeruli einer großen, heterogenen OR-Familie mit nur jeweils einem bis wenigen Mitgliedern, die einen engen Verwandtschaftsgrad aufweisen, wie im Fall der M71-M72 OR, könnte diese Gegebenheit erklärt werden (Fig. 29). Benachbarte Glomeruli deren OR aus nicht eng verwandten OR stammen, sollten demnach in ihrem Ligandenspektrum unterschiedlicher sein als Glomeruli mit sehr eng verwandten OR.

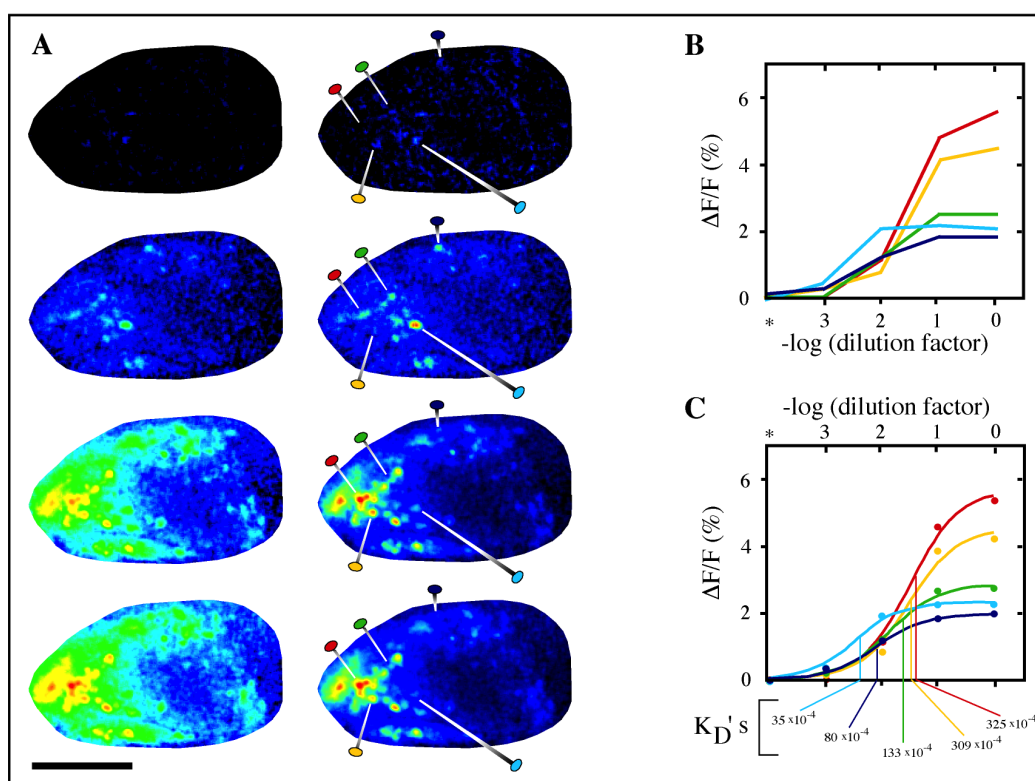


Fig. 17 Konzentrationsbedingte Änderungen im Aktivitätsmuster eines Hexanalstimulus.

A: Von oben nach unten wurden immer höhere Geruchsstoffkonzentrationen getestet (1/1000, 1/100, 1/10 und unverdünntes Hexanal). Links sind die Aktivitätsmuster mit einer absoluten, sigmoidalen Falschfarbenskala (schwarz 0% und rot 6,5% $\Delta F/F$) dargestellt. Rechts sind die normalisierten Aktivitätsmuster mit einer standard Falschfarbenskala (schwarz 0% $\Delta F/F$ und rot von oben nach unten 2,25% $\Delta F/F = 1,5$ facher Wert der maximalen $\Delta F/F$; 2,5% $\Delta F/F$; 5,7% $\Delta F/F$; 6,6% $\Delta F/F$) dargestellt. Das Tier ist ebenfalls in Fig. 10 gezeigt. Größenmaßstab = 1mm.
B: Dosis-Wirkungs-Kurven der in A durch farbliche Nadeln markierten Glomeruli (beibehaltene Farbkodierung). Stern (*), Werte aus Messungen ohne Geruchsstoffstimulus. **C:** Mathematische Annäherung an eine einfache Rezeptor-Liganden-Interaktions-Funktion ($R + L \rightleftharpoons RL$) der in B gezeigten Kurven. Die errechneten Dissoziationskonstanten sind unter dem Graphen angegeben. Die Dissoziationskonstanten variieren etwa um das 10-fache.

3.1.5 Die Kodierung der Geruchsstoffkonzentration

Die Bedeutung der Geruchsstoffkonzentration ist zumindest für den Menschen hinreichend bekannt. Beispielsweise ist bekannt, dass bei einer ganzen Reihe verschiedener Geruchsstoffe unterschiedliche Konzentrationen grundsätzlich unterschiedliche Geruchsqualitäten hervorrufen (Gross-Isseroff, 1988; Ohloff, 1990; Pelz et al., 1997). Zumeist sind für uns hohe Konzentrationen dieser Geruchsstoffe mit einer deutlichen Aversion verbunden, wohingegen niedrige Konzentrationen dieser Geruchsstoffe aromatische oder wohlriechende Charaktere aufweisen (Ohloff, 1990). Die meisten Geruchsstoffe stimulieren bei sehr hohen Konzentrationen neben dem Hauptgeruchssystem (siehe Einleitung) auch den Trigeminalnerv, so dass die Aversion bei sehr hohen Konzentrationen durchaus generell eine Reaktion auf die Trigeminalnervstimulation darstellen könnte (Hummel and Livermore, 2002). Jedoch weisen die oben erwähnten Geruchsstoffe bereits bei niedrigeren Konzentrationen solche Qualitätsänderungen auf, die daher zumindest teilweise unabhängig vom

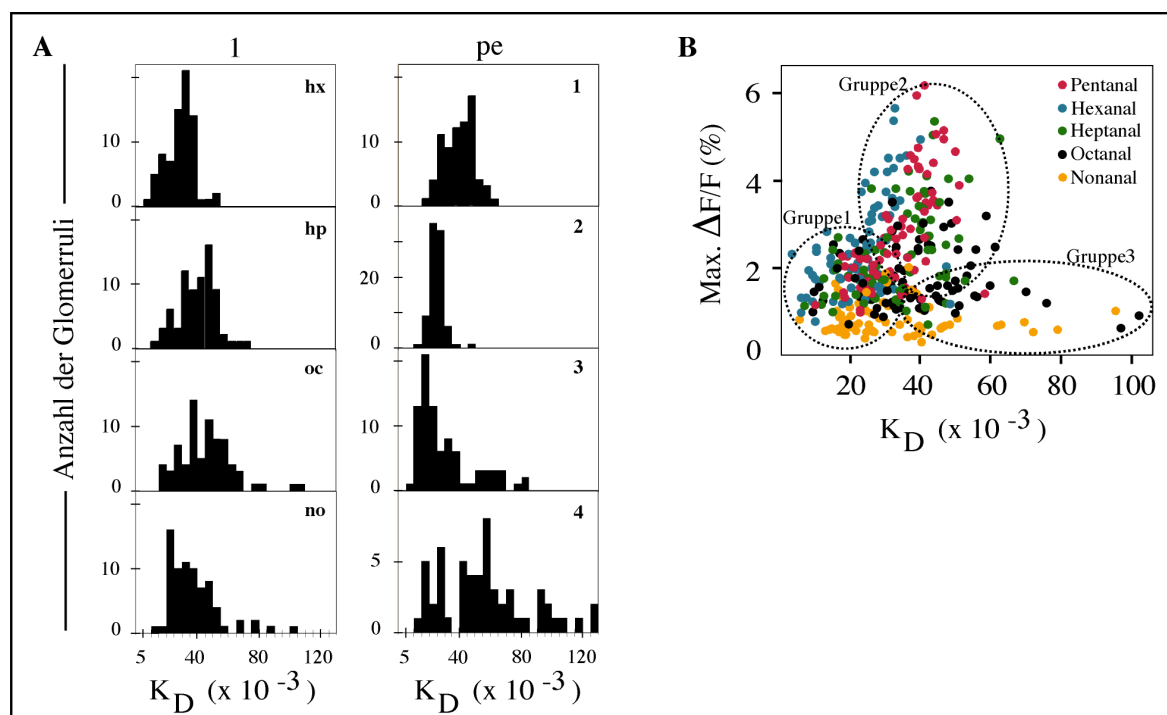


Fig. 18 Affinitätsabschätzungen für Glomeruli der Aldehyd induzierten Aktivitätsmuster.

A: Errechnete Dissoziationskonstanten (siehe Fig. 17C) aus vier Tieren (1 bis 4) von Aldehyd sensitiven Glomeruli in Form eines Histogramms (Einheit der Dissoziationskonstanten: Verdünnungsfaktor). Links sind für Tier #1 die Dissoziationskonstanten der auf Hexanal (hx), Heptanal (hp), Octanal (oc) und Nonanal (no) antwortenden Glomeruli dargestellt. Rechts sind die Dissoziationskonstanten der auf Pentanal (pe) antwortenden Glomeruli aus vier Tieren dargestellt. **B:** Plot aus den errechneten maximalen Fluoreszenzänderungen und zugehörigen Dissoziationskonstanten. Die auf die verschiedenen Aldehyde antwortenden Glomeruli sind, wie dargestellt farblich kodiert. Die gestrichelten Ellipsen umrahmen drei postulierte Gruppen (von links nach rechts Gruppe 1 bis Gruppe 3) unterschiedlicher Glomeruli. Gruppe 1: hoch affine OR mit schwächerer maximaler Antwort (K_D -Werte von 5×10^{-3} bis $3,5 \times 10^{-2}$, $\Delta F/F$ von 0,3 bis 2,7). Gruppe 2: mittelmäßig affine OR mit großer maximaler Antwort (K_D -Werte von $2,0 \times 10^{-2}$ bis $6,0 \times 10^{-2}$, $\Delta F/F$ von 1,8 bis 6,0) und Gruppe 3: niedrig affine OR mit schwacher maximaler Antwort (K_D -Werte von $3,5 \times 10^{-2}$ bis 0,1, $\Delta F/F$ von 1,3 bis 2,0).

Trigeminalnerv entstehen sollten.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen zu der Kodierung der Geruchsstoffkonzentration hauptsächlich an aliphatischen Aldehyden durchgeführt. Für alle daraufhin untersuchten Geruchsstoffe wurden mit zunehmender Konzentration zunehmend mehr Glomeruli aktiviert. Diese Konzentrations bedingte "Rekrutierung" von Glomeruli zu den Aktivitätsmustern wurde für alle getesteten aliphatischen Aldehyde ($n = 6$) beobachtet und ist in Fig. 17A für Hexanal gezeigt. Durch eine absolute Falschfarben-Skala wurde die Konzentrations bedingte "Rekrutierung" deutlich. In einer relativen Falschfarben-Skala konnte jedoch eine Konzentration abhängige relative Gewichtung einzelner Glomeruli eines Aktivitätsmusters beobachtet werden. Obwohl für keinen Glomerulus eine abnehmende Fluoreszenzintensität bei zunehmender Konzentration beobachtet wurde, schienen Glomeruli, die ein Aktivitätsmuster bei niedrigen Konzentrationen dominierten in Aktivitätsmustern hoher Konzentrationen oft eine untergeordnete Rolle zu spielen (Fig. 17A). Durch zunehmende Geruchsstoffkonzentration veränderten sich demnach die glomerulären Aktivitätsmuster nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ.

Dosis-Wirkungs-Kurven wurden für alle Glomeruli aller getesteten aliphatischen Aldehyde erstellt (siehe Fig. 17B). Die meisten Kurven erschienen annähernd sigmoidal und liefen in eine Sättigung. Die Steigungen der Kurven erstreckten sich im allgemeinen über zwei log Einheiten, und näherten sich so einer einfachen Liganden-Rezeptor-Interaktion beschreibenden Kurve an. Aus der Annäherung der Werte an die Funktion einer einfachen Liganden-Rezeptor-Interaktion,



konnten die Dissoziationskonstanten (K_D) abgeschätzt werden (Fig. 17C). Die gute Qualität der rechnerischen Annäherung wurde durch Korrelationskoeffizienten zwischen 0,95 und 0,999 (viele Korrelationskoeffizienten oberhalb von 0,99) bestätigt (vergleiche Fig. 17B und C). Der K_D -Wert ist mit dem Wendepunkt der angenäherten Kurve identisch. Die Affinitäten der unterschiedlicher OR zu einem Aldehyd (Pentanal), als K_D ausgedrückt, wurde in Fig. 18A für 385 Glomeruli vier verschiedener Tiere dargestellt. Die K_D -Werte variierten in etwa um eine Größenordnung und lagen zwischen 5×10^{-3} und 8×10^{-2} (Einheit: relative Verdünnung) In einem Fall (Tier #2 in Fig. 18A) lagen die K_D -Werte nur zwischen 1×10^{-2} und 5×10^{-2} , wobei in einem anderen Tier (Tier #4 in Fig. 18A) die K_D -Werte zwischen 1×10^{-2} und 0,13 lagen. Die tatsächliche Variabilität war vermutlich größer, da die nicht saturierenden Kurven in die Abschätzung mit einfließen und vermutlich von für dieses Aldehyd weniger affinen OR stammten. Der tatsächliche K_D -Werte dieser OR sollte demnach höher als errechnet liegen. Auch bei dem

Vergleich der K_D -Werte verschiedener Geruchsstoffe ergab sich eine ähnliche Verteilung der Affinitäten einzelner OR (Fig. 18A). Diese variierten um eine Größenordnung und lagen im Durchschnitt bei etwa 3×10^{-2} . Die Verteilung der Affinitäten war für die unterschiedlichen Geruchsstoffe recht konstant.

Bei einem Plot, in dem die K_D -Werte den errechneten maximalen Fluoreszenzänderungen gegenübergestellt wurden, erschienen für einen Geruchsstoff extrem empfindliche und extrem unempfindliche OR nur geringe maximale Fluoreszenzänderungen erreichen zu können (Fig. 18B). Mit einem Geruchsstoff stark aktivierbare OR zählten alle zu nur mittelmäßig bis schwach affinen OR. Demnach konnten die OR grob in drei Gruppen eingeteilt werden. 1., hoch affine OR mit schwächerer maximaler Antwort (K_D -Werte von 5×10^{-3} bis $3,5 \times 10^{-2}$, $\Delta F/F$ von 0,3 bis 2,7). 2., mittelmäßig affine OR mit großer maximaler Antwort (K_D -Werte von $2,0 \times 10^{-2}$ bis $6,0 \times 10^{-2}$, $\Delta F/F$ von 1,8 bis 6,0) und 3., niedrig affine OR mit schwacher maximaler Antwort (K_D -Werte von $3,5 \times 10^{-2}$ bis 0,1, $\Delta F/F$ von 1,3 bis 2,0). Theoretisch sollten OR die einen Geruchsstoff nur schlecht binden, durch diesen Geruchsstoff nicht stark aktiviert werden können. Die 3. OR-Gruppe könnte aus derartigen OR bestehen. Für einen Geruchsstoff sehr empfindliche OR sollten jedoch sehr wohl durch hohe Konzentrationen stark beziehungsweise maximal aktiviert werden können. OR-Gruppe 1 und 2 sollte daher einen biologischen Grund aufweisen (siehe Diskussion).

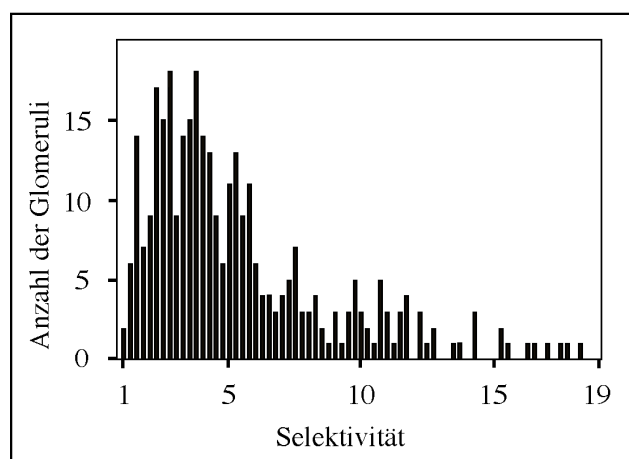


Fig. 19 Selektivität von Glomeruli.

Selektivität (Bandbreite der Dissoziationskonstanten eines Glomerulus bei unterschiedlichen Geruchsstoffstimuli) der in Fig. 18A untersuchten Glomeruli.

Die "Selektivität" eines bestimmten Glomerulus konnte als Bandbreite der aufgetretenen K_D -Werte bei Aldehyden mit unterschiedlichen Kohlenstoff Kettenlängen aufgefasst werden. Die "Selektivität" wurde mit

$$K_D(\max) / K_D(\min),$$

mit $K_D(\max)$ als maximaler K_D -Wert und $K_D(\min)$ als minimaler K_D -Wert, den ein OR bei den unterschiedlichen Aldehydstimuli erreichen konnte, errechnet. Einige der Glomeruli hatten demnach recht große Ligandenspekten mit minimaler

”Selektivität” von 1, andere hatten kleine Ligandenspektren mit einer ”Selektivität” von bis zu 18,3 (Fig. 19). Die mittlere ”Selektivität” aller Glomeruli lag bei 6. Ähnlich wie bei den Resultaten der Datenauswertungen bei einer Geruchsstoffkonzentration (Fig. 10B) konnten Glomeruli mit Präferenzen für alle der getesteten Aldehyde gefunden werden (Pentanal-Präferenz bis Nonanal-Präferenz).

3.1.6 Die Diskriminierbarkeit der Aktivitätsmuster nimmt mit zunehmender Geruchsstoffkonzentration ab

Das oben beschriebene Sättigungsverhalten der Dosis-Wirkungs-Kurven der einzelnen Glomeruli führte zu immer ähnlicher werdenden Aktivitätsmustern mit zunehmender Geruchsstoffkonzentration. Die Aktivitätsmuster der beiden höchsten Konzentrationen (unverdünnte und 1/10 verdünnte Geruchsstoffe) unterschied sich nicht mehr wesentlich voneinander (Fig. 17). Die Aktivitätsmuster der verschiedenen hochkonzentrierten aliphatischen Aldehyde wurden ebenfalls immer schwieriger voneinander zu unterscheiden (Fig. 9). Als Konsequenz aus dieser letztendlichen OR-Eigenschaft ergibt sich eine schlechter werdende Diskriminierbarkeit der Kohlenstoffkettenlänge in aliphatischen Aldehyden bei hohen Geruchsstoffkonzentrationen. Jedoch sind die Aktivitätsmuster selbst bei unverdünnten Stimuli noch anhand der unterschiedlichen Gewichtungen der einzelnen Glomeruli innerhalb eines Aktivitätsmusters voneinander zu unterscheiden. Niemals war es möglich das Aktivitätsmuster eines Stimulus durch das Absenken oder Anheben der Konzentration eines strukturell ähnlichen Geruchsstoff vollständig zu kopieren. Daraus folgt, dass sowohl unterschiedliche Geruchsstoffe als auch ihre Konzentrationen sind auf der Ebene des Bulbus in unterscheidbaren Aktivitätsmustern eindeutig festgelegt.

Bei den beiden höchsten getesteten Geruchsstoffkonzentrationen aliphatischer Aldehyde wurden etwa die Hälfte der in der optisch ableitbaren Fläche des Bulbus liegenden Glomeruli aktiviert. Die anderen Glomeruli wiesen eine für diese hohen Konzentrationen und Geruchsstoffe typische, schwache, einheitliche und über die untersuchte Fläche homogene Aktivität (zwischen einem $\Delta F/F$ von 1% und 2%) auf. Diese Grundaktivität ist deutlich von der spezifischen Aktivität in der Aldehyd-Domäne unterscheidbar, und hat die Merkmale einer unspezifischen Aktivierung. Möglicherweise wurde sie durch eine hohe chemische Reaktionsfreudigkeit von Aldehyden und/oder durch eine nicht durch OR vermittelte Aktivierung der ORN verursacht (Lerner et al., 1988).

3.2 Aktivitätsabhängige Markierung von Mitral- und Büschelzellen – ein Mausmodell.

Im Unterschied zu anderen Sinnessystemen ist im Geruchssystem ein Geruch durch die neuronale Aktivität einer Zellpopulation, beispielsweise der Zellpopulation der ORN oder der Zellpopulation der Mitralzellen, im Gesamten kodiert. Daher ist es nur begrenzt möglich, an wenigen Zellen aus einer Population Kodierungsprinzipien zu ermitteln (Imamura et al., 1992; Katoh et al., 1993; Yokoi et al., 1995). Mit aktivitätsabhängigen Farbstoffen ließen sich einige Kodierungsprinzipien der ORN-Population klären, da die ORN im Bulbus selektiv über den Nasenraum gefärbt werden konnten. Für die mit den ORN verschalteten Neurone (z.B. Mitral- und Büschelzellen) ist es allerdings nicht mehr möglich, selektiv diese Zellpopulationen mit aktivitätsabhängigen Farbstoffen zu färben: Von allen Zellpopulationen im Bulbus sind nur die ORN mit dem Nasenraum verbunden. In höhere Gehirnzentren projizieren hingegen eine Reihe von Zellpopulationen, so dass über den LOT nicht eine einzige Population färbbar ist (Fuss and Korsching, 2001). Im Bulbus selber sind die einzelnen Zellpopulationen für eine selektive Populationsfärbung nicht deutlich genug voneinander getrennt (siehe Einleitung). Eine Ausnahme bilden möglicherweise die Körnerzellen. In einer Studie ist es gelungen, hauptsächlich Körnerzellen mit einem spannungsabhängigen Farbstoff zu beladen und wellenförmige Oszillationen optisch abzuleiten (Friedrich and Laurent, 2004). Mit den heutigen Methoden (elektrophysiologisch oder auf Fluoreszenzfarbstoffen basierend) lassen sich aber darüber hinaus mit Ausnahme der ORN und Körnerzellen nur an wenigen Zellen parallel oder an mehreren Zellpopulationen auf einmal Kodierungsprinzipien studieren.

Eine Lösung des Problems der selektiven, aktivitätsabhängigen Markierung einer neuronalen Zellpopulation stellen genetisch kodierte aktivitätsabhängige Marker da. So konnte der aktivitätsabhängige Marker SynaptoPHluorin (Miesenbock et al., 1998) erfolgreich in einem Mausmodell angewendet werden (Bozza et al., 2004). SynaptoPHluorin reagiert auf eine pH-Änderung mit einer Fluoreszenzänderung. Wird SynaptoPHluorin an synaptische Vesikel gekoppelt, wird das Verschmelzen der Vesikel mit der Zellmembran des synaptischen Spaltes durch eine Fluoreszenzänderung signalisiert, da der pH-Wert in einem synaptischen Vesikel deutlich niedriger als der pH-Wert im synaptischen Spalt ist. Die praesynaptische Membranen von Mitral- und Körnerzellen liegen allerdings bei der Maus nicht im Bulbus. Folglich erscheint SynaptoPHluorin nicht geeignet für die aktivitätsabhängige Markierung von Mitral- oder Körnerzellen im Bulbus.

Eine Reihe weiterer genetisch kodierter aktivitätsabhängiger Marker waren zumindest am Beginn dieser Untersuchung noch nicht für ein Mausmodell ausgereift (z.B. Pericams, G-CaMPs, Cameleon oder Camgaroo: Fiala et al., 2002;

Liu et al., 2003; Reiff et al., 2002; Wang et al., 2003; Yu et al., 2003) sollten daher hier nicht getestet werden (siehe aber Sunil Kumar). Beispielsweise wurde erst jüngst das in der Literatur beschriebene Problem einer schwachen Expressionsrate einiger aktivitätsabhängiger Marker ("Camgaroo-2" und "Invers Pericam") durch das Tet-System, in dem diese Marker unter der Kontrolle eines Tetrazyklin induzierbaren Promoters in ausreichenden Mengen produziert wurden, umgangen (Hasan et al., 2004). Bisher fehlen aber noch die für dieses Tet-System notwendigen Mauslinien, die den Transaktivator in unterschiedlichen Zellpopulationen des Geruchssystems exprimieren.

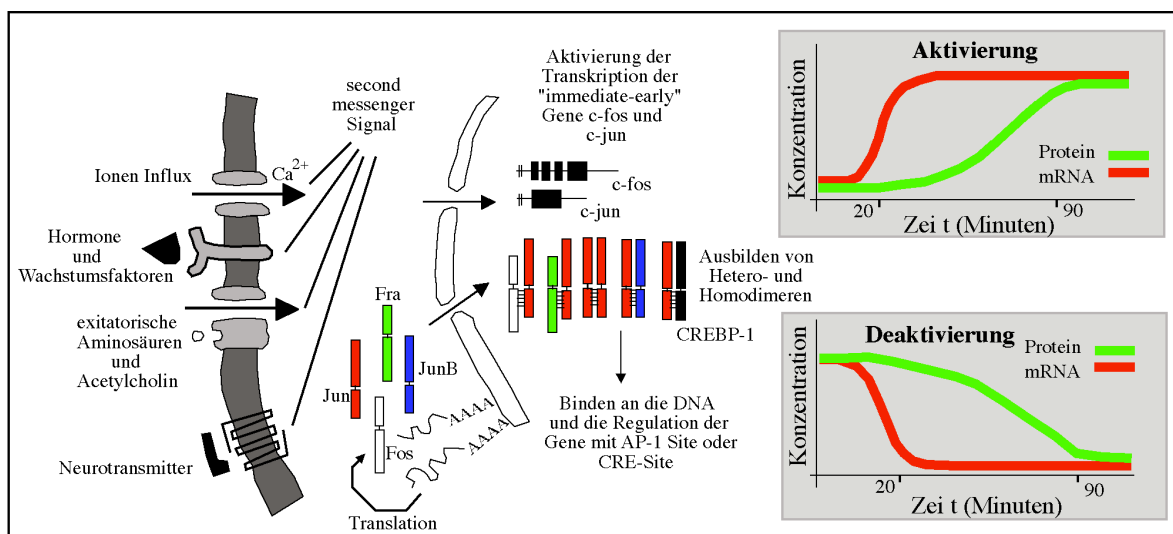


Fig. 20 Schematische Darstellung der Signaltransduktionskaskaden zur Aktivierung einiger IE (Abkürzung von engl.: immediate early) Gene.

Verschiedene extrazelluläre Signale (Aktionspotential-induzierte Ionen Influx; Binden von Hormone, Wachstumsfaktoren, exzitatorische Aminosäuren, Acetylcholin und Neurotransmitter an passende Rezeptoren) führen zu einer Reaktionskaskade, an der sogenannte "second messenger" beteiligt sind. Die Signaltransduktionskaskade erreicht den Nukleus, um dort die Transkription der IE Gene (z.B.: c-Fos, c-Jun, Fra und CREBP-1) zu aktivieren. Die mRNA der IE Gene wird im Zytoplasma translatiert und die fertigen Proteine gelangen wieder zurück in den Nukleus, um als Dimere (aus verschiedenen IE Proteinen) die Transkription anderer Gene zu steuern. Dafür setzen sie sich mit ihrer DNA bindenden Domäne auf bestimmte DNA Sequenzen (z.B.: AP 1, oder CRE Sites) und regulieren mit einer Transaktivations-Domäne die Transkription. Letztendlich wird so auch in Neuronen die aktivitätsabhängige Transkription und Translation einer Vielzahl verschiedener Gene gesteuert. Einschub-Graphen: Oben, aktivitätsabhängige Zunahme der c-fos mRNA (rote Linie) und Proteine (grüne Linie) mit der Zeit. Unten, Zeitverlauf der Abnahme der c-fos mRNA (rote Linie) und Proteine (grüne Linie) nach dem Ende des Stimulus.

Eine weitere Möglichkeit für die aktivitätsabhängige Markierung bieten intrinsische, genetisch kodierte Aktivitätsmarker. Über "second messenger" Kaskaden werden in jeder Nervenzelle direkt nach einer Aktivierung in Form von Aktionspotentialen sogenannte "immediate early" Gene aktiviert. Zu diesen "immediate early" Genen zählt der Transkriptionsfaktor c-fos (Curran and Fianza, 1988; Morgan and Curran, 1989; Morgan and Curran, 1991). Fig. 20 beschreibt die c-fos Aktivierung, zum Beispiel durch einen Ionen Einstrom, wie er bei einer Aktionspotentialreihe (engl.: action potential train) geschieht. Etwa 20 Minuten nach einem Stimulus (beispielsweise ein elektrischer Impuls, der den Ionen-Einstrom

auszulösen vermag) ist die Häufigkeit der c-fos mRNA maximal. 40 bis 90 Minuten nach einem solchen Stimulus folgt das Protein mit seiner maximalen Häufigkeit. Sowohl über *in situ* Hybridisierungen mit Sonden für c-fos, als auch mit Antikörpern gegen das Protein selber können aktive Nervenzellen in Form einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden (Guthrie and Gall, 1995; Jin et al., 1996; Onoda, 1992). Im olfaktorischen Bulbus erscheinen derart gefärbte Zellen über die verschiedenen Schichten verteilt zu liegen mit einem deutlichen Schwerpunkt in der Körnerzellschicht und den Juxtaglomerulären Zellen (z.B.: Guthrie and Gall, 1995; Woo et al., 1996). Mit c-fos alleine lässt sich also nicht selektiv eine Zellpopulation aktivitätsabhängig untersuchen.

Um die generelle aktivitätsabhängige Markierung über c-fos in eine Zellpopulations-spezifische Markierung umzuwandeln, müssen einige Modifikationen durchgeführt werden. Unter zellpopulationsspezifischen Promotoren kann eine virale Rekombinase (Cre) beispielsweise nur in Mitral- und Körnerzellen exprimiert werden. Cre führt eine Rekombination zwischen zwei loxP genannten, 42bp langen, DNA-Sequenzen durch (eine detaillierte Beschreibung der Arbeitsweise von Cre findet sich bei Nagy, 2000). Sind die beiden loxP Sequenzen in derselben Orientierung, wird die dazwischenliegende Sequenz ausgeschnitten. Ist die dazwischenliegende Sequenz eine transkriptionelle "Stop-Kassette" wird nur in Cre-exprimierenden Zellen das nach der "Stop-Kassette" liegende Gen transkribiert, da nur in diesen Zellen die "Stop-Kassette" herausgeschnitten wird (z.B.: DeFalco et al., 2001). Schaltet man nach den regulatorischen Elementen des c-fos Gens eine "Stop-Kassette", gefolgt von einem Markerprotein (z.B. eGFP), erscheinen in allen Cre-exprimierenden Zellen nur die neuronal aktiven Zellen durch das Markerprotein gefärbt. Kreuzt man eine zellpopulationspezifische Cre exprimierende Maus mit einer weiteren Maus, die unter der regulatorischen Kontrolle von c-fos nur dann ein Markerprotein exprimiert, wenn Cre vermittelt eine "Stop-Kassette" entfernt wurde, erhält man eine Maus in der die aktivitätsabhängige Markierung von Neuronen nur in einer Zellpopulation erfolgt (siehe Fig. 22).

Im Folgenden wird die Cre Expression unter einem für Mitral- und Büschelzellen spezifischen Promotor beschrieben. Die Konstruktion einer aktivitätsabhängigen eGFP exprimierenden Maus nach der Cre vermittelten Entfernung einer "Stop-Kassette" findet sich bei Sunil Kumar (Institut für Genetik, Universität zu Köln).

3.2.1 Cre Expression unter der Kontrolle des zellspezifischen Promotors "T-bet"

T-bet ist ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der T-Box Gene (eine Übersicht über die T-Box Genfamilie findet sich bei (Papaioannou and Silver,

1998). T-Box Transkriptionsfaktoren enthalten eine hochkonservierte DNA bindende Domäne, die T-Box (Papaioannou and Silver, 1998). T-Box Transkriptionsfaktoren spielen eine Rolle während der Gastrulation (Wilkinson DG 1990), der Mesodermentwicklung (Chapman and Papaioannou, 1998), der Entwicklung der Gliedmassen (Gibson-Brown et al., 1998; Logan et al., 1998) und der Gehirnentwicklung (Bulfone et al., 1995; Bulfone et al., 1998). Eine Untergruppe der T-Box Familie bilden die Tbr Gene (für T-Box brain), die überwiegend in Neuronen exprimiert werden. Ein Mitglied der Tbr Untergruppe ist T-bet. Die T-bet Expression ist auf wenige Zellpopulationen im Gehirn beschränkt. Ausschließlich Mitral- und Büschelzellenzellen des *Bulbus olfactorius* exprimieren T-bet (Fig. 21 und Faedo et al., 2002). Während der Entwicklung kann die T-bet Expression ab dem 14,5ten Tag eines Mausembryos (E14,5) im AOB festgestellt werden. Erst ab E16,5 ist die mRNA ebenfalls im MOB nachweisbar. Auch in erwachsenen Tieren wird T-bet im Bulbus ausschließlich in Mitral- und Büschelzellen transkribiert (Fig. 21, und Faedo et al., 2002). Wie in Fig. 21 zu erkennen sind die Mitralzellen durch eine T-bet Sonde stark, die Büschelzellen jedoch schwächer gefärbt. Zusätzlich erscheinen nicht alle unterschiedlichen Büschelzellen (externe, mittlere und interne Büschelzellen) gefärbt. Lediglich die in direkter Nachbarschaft zu den Glomeruli

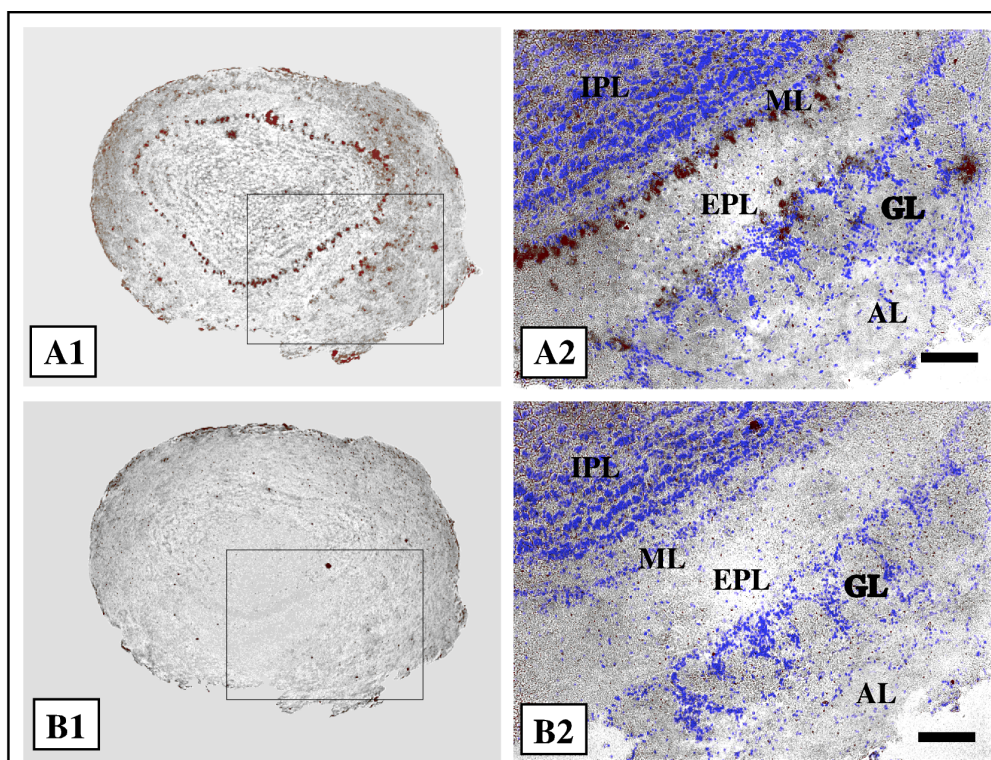


Fig. 21 T-bet *In Situ* Hybridisierung in einem coronalen Schnitt durch den *Bulbus olfactorius*.

In Situ Hybridisierung mit einer anti-Sense Sonde (A), oder Sense-Sonde (B) bei 40facher (A1 und B1) und 100facher (A2 und B2) Vergrößerung. Die Entwicklungsreaktion erzeugte einen braunen Niederschlag. DAPI-Gegenfärbung in blau. Rechtecke (in A1 und B1) zeigen jeweils den Ausschnitt von A2 und B2. AL, Axon-Schicht; GL, glomeruläre-Schicht; EPL, externe plexiforme Schicht; ML, Mitralzell-Schicht; IPL, interne plexiforme Schicht. Unterhalb des Schriftzuges "AL" wurde in A2 und B2 ein Artefakt in PHOTOSHOP retuschiert. Größenmaßstab = 75µm.

liegenden Büschelzellen wurden markiert. Dies läßt die Vermutung zu, nur ein Teil der Büschelzellen, die externalen Büschelzellen (engl.: external tufted cells) seien gefärbt (vergleiche auch Shipley and Ennis, 1996). Darüberhinaus exprimieren zu Th1 differenzierende CD8 positive T-Zellen T-bet (Shier et al., 2000). CD8 positive T-Zellen findet man hauptsächlich in den verschiedenen Organen des

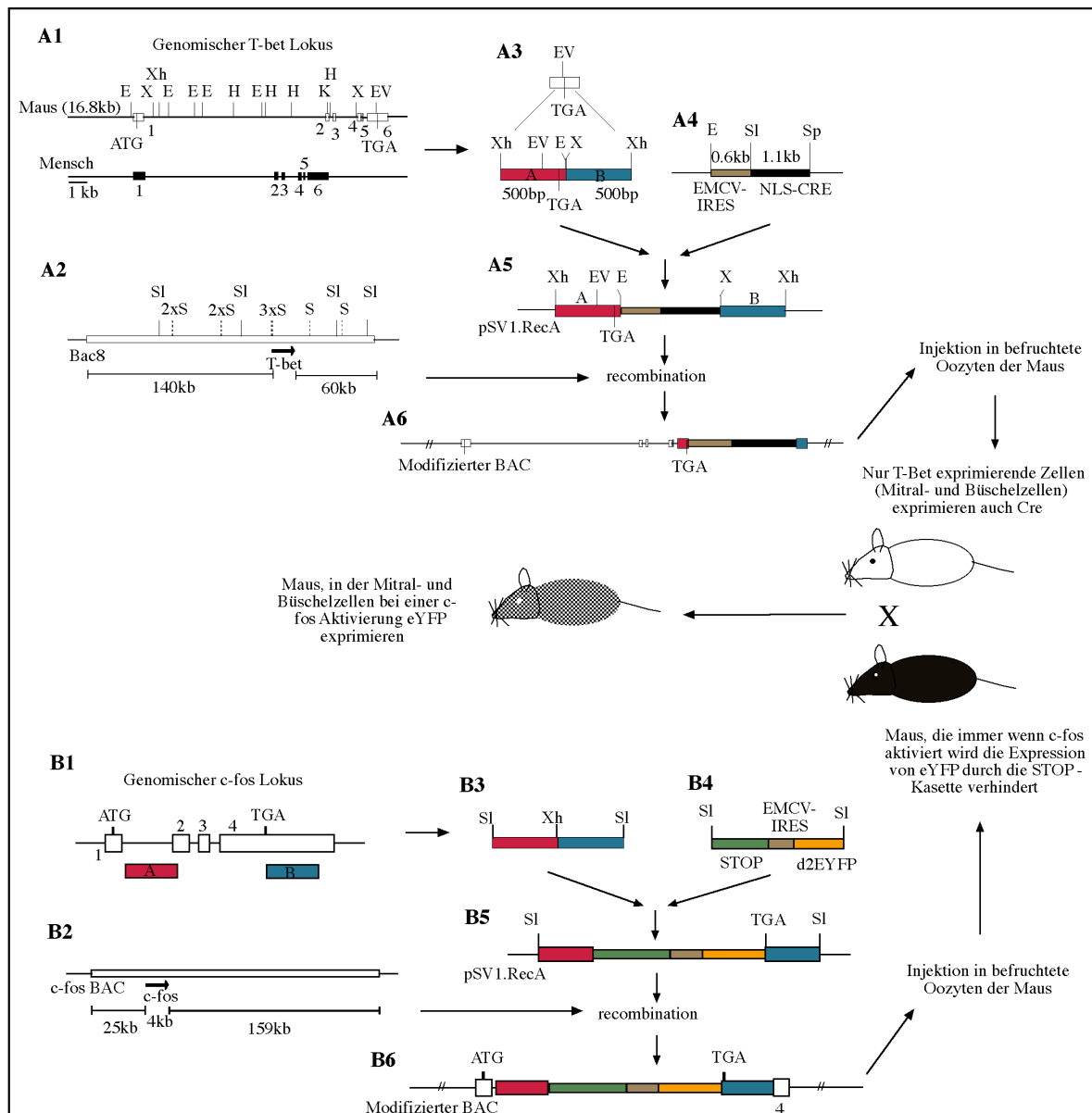


Fig.22 Mausmodell zur aktivitätsabhängigen Markierung der Büschel- und Mitralzellen.

A: Schematische Darstellung der Strategie für die Entwicklung einer Mauslinie, die unter dem in Büschel- und Mitralzellen exprimierten Gen "T-bet" die Rekombinase "Cre" produziert. **A1:** Genomischer Lokus von "T-bet" in der Maus und dem Mensch, mit Introns, Exons (weiße oder schwarze Rechtecke), Start- und Stop- Kodons. **A2:** BAC-Klon (Nr. 8) mit T-bet. **A3:** Die Homologiearme A und B sind um das Stop-Kodon des T-bet Gens herum angeordnet. Das IRES/CRE-Fragment (**A4**) wird zwischen die Homologiearme A und B in den Shuttlevektor (pSV1.RecA) kloniert (**A5**), und das erzeugte A/IRES/CRE-Fragmentes wird in den BAC8 (**A6**) rekombiniert. Der modifizierte BAC8 wurde für die Oozyteninjektion verwendet. Cre exprimierende Mäuse sollten mit den Mäusen aus B gekreuzt werden. In den erzeugten heterozygoten Mäusen sollte nur in Büschel- und Mitralzellen eYFP aktivitätsabhängig exprimiert werden. **B:** Schematische Darstellung der Strategie für die Entwicklung einer Mauslinie, die c-fos gesteuert, aktivitätsabhängig eYFP exprimiert (siehe Dissertation Sunil Kumar). **B1:** Genomischer c-fos Lokus mit Introns, Exons (weiße Rechtecke), Start- und Stop-Kodons. **B2:** BAC-Klon mit c-fos. **B3:** Zusammengefügte Homologiearme (siehe B1) A und B. Ein STOP/IRES/d2EYFP-Fragment (**B4**) wird zwischen die Homologiearme A und B in den Shuttlevektor (pSV1.RecA) kloniert (**B5**), um so in den c-fos BAC rekombiniert zu werden (**B6**). Der modifizierte BAC wurde für die Oozyteninjektion verwendet. Endonukleaseschnittstellen: E, EcoRI; EV, EcoRV; H, HindIII; K, KpnI; S, SacII; SI, Sall; Sp, SpeI; X, XbaI; Xh, XhoI;

Immunsystems (Thymusdüse, Lymphknoten etc.), nicht im Gehirn.

Die regulatorischen Elemente von T-bet sind nicht bekannt. Sie könnten sowohl 5' als auch 3' zum Gen liegen. In Analogie zu anderen Transkriptionsfaktoren könnten einige regulatorische Elemente sogar im Gen selber liegen (Robertson et al., 1995; Wisdon and Verma, 1993). Aus diesen Gründen sollte ein großes genomisches Fragment (hier wurde ein 220kb großer BAC Klon ausgesucht) zur Expression von Cre mit dem intakten T-bet Gen gewählt werden. Um bei der in Eukaryoten generellen mono-zistronischen Transkriptionsstrategie dennoch Cre exprimieren zu können, sollte nach dem translationalen Stop-Kodon des T-bet Gens ein IRES- Element (für Internal Ribosomal Entry Site) vor Cre kloniert werden. Das IRES-Element gewährleistet eine Translation des nachgeschalteten Gens (zusammengefasst z.B. bei van der Velden, 1999). Die mRNA ist also dann bizistronisch. Das Cre Protein selber muss mit einer Sequenz versehen werden, die die Translokation des Proteins in den Zellkern gewährleistet. Diese NLS-Sequenz (für nuclear localisation sequence) ist 24bp lang und wurde direkt nach dem Cre Start-Kodon einkloniert. Die Generation des T-bet/IRES/Cre Vektors ist in Fig. 22A1-A6 zusammengefasst.

3.2.2 Klonierung eines T-bet/IRES/CRE Vektors für die Injektion in befruchtete Oozyten der Maus

Zunächst wurde ein BAC-Klone aus einer Maus Gehirn BAC Bibliothek (RPCI-23; Rosewell Park Cancer Institute, Bufallo, New York, USA ; Dr. Pieter J. de Jong, Kazutoyo Osoegawa, Minako Tateno) ausgewählt. Hierfür wurde die BAC Bibliothek mit einer 670bp langen Sonde, die aus einem 3'-Fragment der cDNA (von A. Bulfone freundlicherweise zur Verfügung gestellt) hergestellt wurde, hybridisiert. Die Hybridisierung von 184.320 Klonen (11 Genomäquivalente) der Bibliothek ergab 48 hybridisierende Kolonien, von denen 13 stark hybridisierten. Im Southern Blot (EcoRI und XbaI Verdau) konnten von 10 unter den 13 stark hybridisierenden Klonen zufällig ausgewählten Klonen sieben verifiziert werden, von denen fünf in weiteren Verdauen (SacII und Sall) und Pulsfeld-Gelelektrophoresen analysiert wurden (Fig. 23 und Daten nicht gezeigt). Wie in Fig. 23 dargestellt, waren im EcoRI Verdau die BAC-Klone zumeist quasi vollständig verdaut (siehe aber 1. und 2. Tasche). Die T-bet enthaltenden BAC-Klone zeigten daher im Southern Blot mit der verwendeten Sonde die zu erwartende 9,9kb Bande.

Der Klon RPCIB731M14237Q5 (im folgenden BAC Nr.8 genannt) besaß eine Größe von circa 220kb, der, wie durch die Analyse des Bandenmusters der Endonuklease-Verdaue und einer Datenbankanalyse (NCBI Mouse Genome) gezeigt werden konnte, zusätzlich zu der genomischen T-bet Sequenz von 16,8kb 140kb 5'- und 60kb 3'- flankierende DNA (siehe Fig. 23) enthält. Im SacII-Verdau in

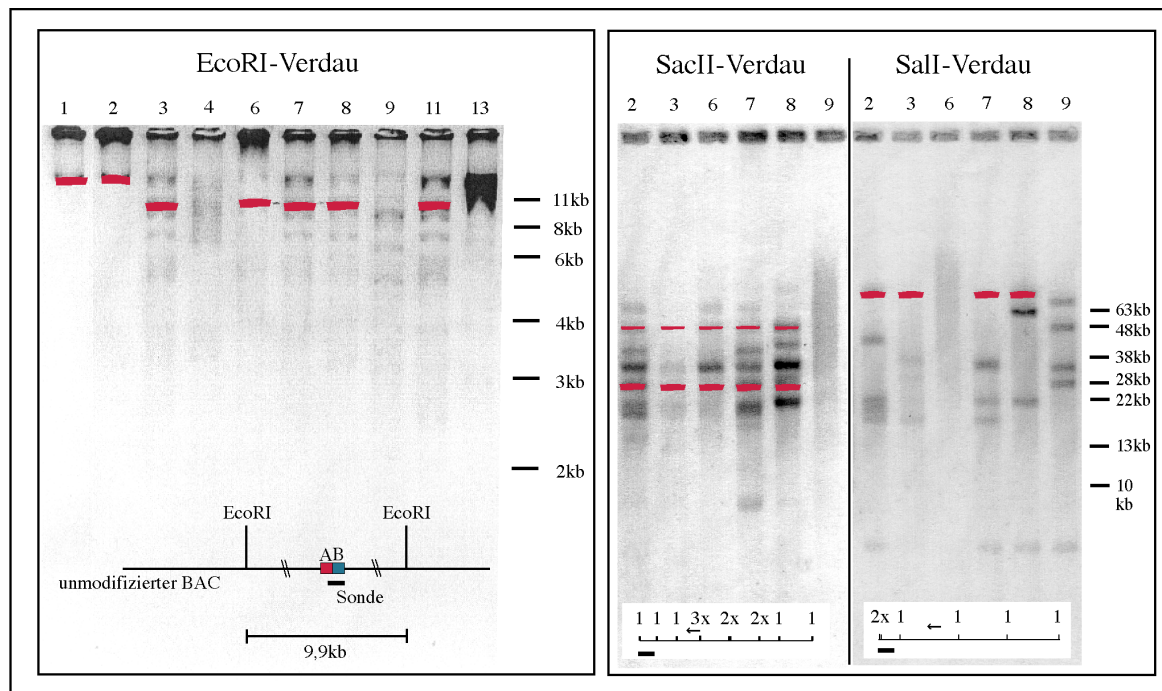


Fig.23 Endonuklease-Verdaue und Southern-Blot Analysen verschiedener BAC-Klone.

EcoRI, SacII und SalI Endonuklease-Verdaue verschiedener BAC-Klone (1-4, 6-9, 11 und 13) die als T-beta enthaltende Klone aus einem BAC-Bibliothek-screening hervorgingen. Banden in rot sind kolorierte, radioaktive Signale des jeweiligen Southern Blots, die auf das zugehörige Bild der Agarose-Gele (standard Agarose-Gel für den EcoRI-Verdau und Puls Field Gelelektrophorese für die SacII und SalI Verdaue) manuell übertragen wurden. In allen Fällen liegt unter der manuell übertragenen Bande eine Bande im Agarose-Gel. Die verwendete Sonde ist im EcoRI-Verdau schematisch eingezeichnet. Die Größe des zu erwartenden Fragments, mit dem diese Sonde hybridisieren sollte ist ebenfalls schematisch unter den einzelnen Verdaue angegeben. Unterhalb der SacII und SalI Verdaue sind die Schnittstellen der jeweiligen Endonukleasen in der genomischen T-beta (schwarze Pfeile) Umgebung eingezeichnet. Die Zahlen oberhalb der Schnittstellen geben die Häufigkeit der Schnittstellen bei einem vollständigen Verdau an und erklären die Bandengröße im Gel (Größenstandard ist jeweils rechts neben den Gelen angegeben). Der Größenmaßstab entspricht 20kb.

Fig. 23 erkennt man in der Auftrennung der 8ten Tasche sieben Banden, von denen zwei deutlich stärker zu sein schienen. Laut Datenbankanalyse sollten 9kb (1x, aus dem Vektor), ~23kb (3x), ~28kb (1x), ~37kb (2x) und ~52kb Banden erscheinen, mit der ~23kb Bande und der ~37kb Bande stärker als die übrigen, da sie mehrfach auftraten. Im Southern Blot Experiment sollte die ~28kb Bande mit einer T-Beta Sonde markierbar sein. Bis auf die ~46kb und ~75kb Banden, die sich durch partielle Verdaue erklären ließen (ebenso die zweite mit der radioaktiv markierten T-Beta Sonde erscheinende ~52kb Bande), konnte in mehreren unabhängigen SacII-Verdaue ein derartiges Bandenmuster nachgewiesen werden. Die SacII-Schnittstellen sind im Bac8 ungleichmäßig verteilt, so dass einige Schnittstellen über zwei bis drei einzelne SacII-Schnittstellen direkt hintereinander verfügten (siehe Fig. 23) und daher vermutlich jedesmal mindestens einmal geschnitten wurden. Alle anderen Schnittstellen könnten nicht immer geschnitten werden (partieller Verdau). Die entstehende Bande wäre demnach so groß wie zwei hintereinander liegende Fragmente (zwei mal ~23kb = ~46kb; ~23kb + ~52kb =

~75kb). Der in Fig. 23 gezeigte Sall-Verdau wies in Übereinstimmung mit der Datenbankanalyse eine ~7kb (1x, aus dem Vektor), ~23kb, ~61kb (2x) und eine ~71kb Bande auf. Auch die in einem Southern Blot Experiment markierbare ~71kb Bande konnte in Übereinstimmung mit der Datenbank die geschilderte Lage des T-Bet Gens im Bac8 demonstrieren.

Neben den Endonuklease-Verdauen und Southern Blot Experimenten konnte die vorhandene online Datenbank der BAC-End-Sequenzen (www.tigr.org/tdb/at/atgenome/bac_end_search/bac_end_search.html) die Ergebnisse aus der Restriktions-Fragment-Analyse verifizieren.

Die Analyse des entsprechenden Abschnittes im Mausgenom (Chromosom 11D, 96.710kb – 96.930kb) zeigte sechs weitere Gene, die ebenfalls auf BAC8 positioniert waren: 1700006D24Rik, mitochondriales ribosomales Protein L120, das 7te, dem C-Oxysterol bindendes Protein ähnliche Protein (engl.: OSBP-related protein 7), 3110043L15Rik, Karyopherin beta-Importin und die puromycin-sensitive Aminopeptidase. Für keines dieser Gene werden für die Konstruktion eines modifizierten BACs nachteilige Eigenschaften vermutet. Die beiden Gene in unmittelbarer Nachbarschaft zu T-bet wiesen zu T-bet unterschiedliche Transkriptionsrichtungen auf (siehe Fig. 24).

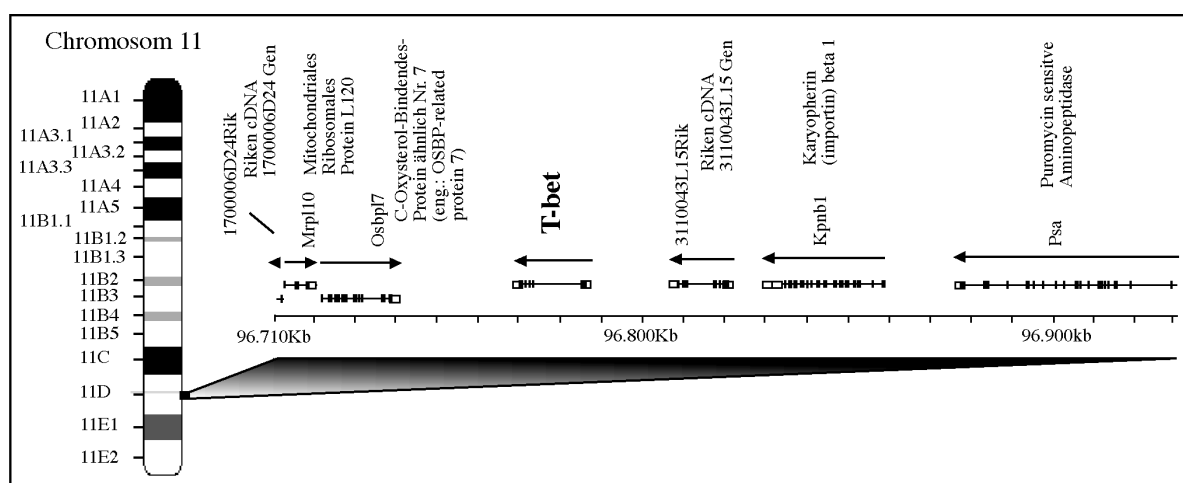


Fig. 24 Genomische Umgebung des T-bet Gens in der Maus.

T-bet liegt auf dem Chromosom Nr. 11 im Abschnitt D. Introns, Exons (schwarze Rechtecke) und differenziell gespleißte Sequenzen (weiße Rechtecke) der 220kb großen T-bet Umgebung (entspricht exakt dem BAC Nr.8) sind angegeben. Die benachbart liegenden Gene sind in unterschiedlicher Orientierung angeordnet (schwarze Pfeile). Quelle: National Centre for Biotechnology Information (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>).

Wie unter 2.3.18 beschrieben, wurde BAC8 für die homologe Rekombination eines A/IRES/CRE/B-Fragmentes in die 3'-Region, 42bp nach dem Stop-Kodon von T-bet verwendet (siehe Fig. 22A5 und A6 und Fig. 25). Durch Endonukleaseverdau und Sequenzanalysen wurde ein erfolgreich rekombinierter

BAC8 Klon ausgewählt (Fig. 25) und für die pronukleäre Oozyteninjektion vorbereitet (Fig. 26).

3.2.3 Analyse der Rekombinationshäufigkeit

Die gewählte Rekombinationsmethode beinhaltet zwei Runden der Rekombination. Bei der 1. Rekombination intergriert der gesamte Shuttlevektor über einen der beiden Homologiearme in den BAC, bei der zweiten erfolgt die Rekombination ebenfalls an einer der beiden Homologiearme (siehe Methoden und Fig. 25A). Nur wenn bei der 2. Rekombination ein anderer Homologiearm als bei der 1. Rekombination verwendet wurde, erhielt man einen erfolgreich rekombinierten BAC (siehe Fig. 25A), bei dem der Shuttlevektor bis auf das Insert

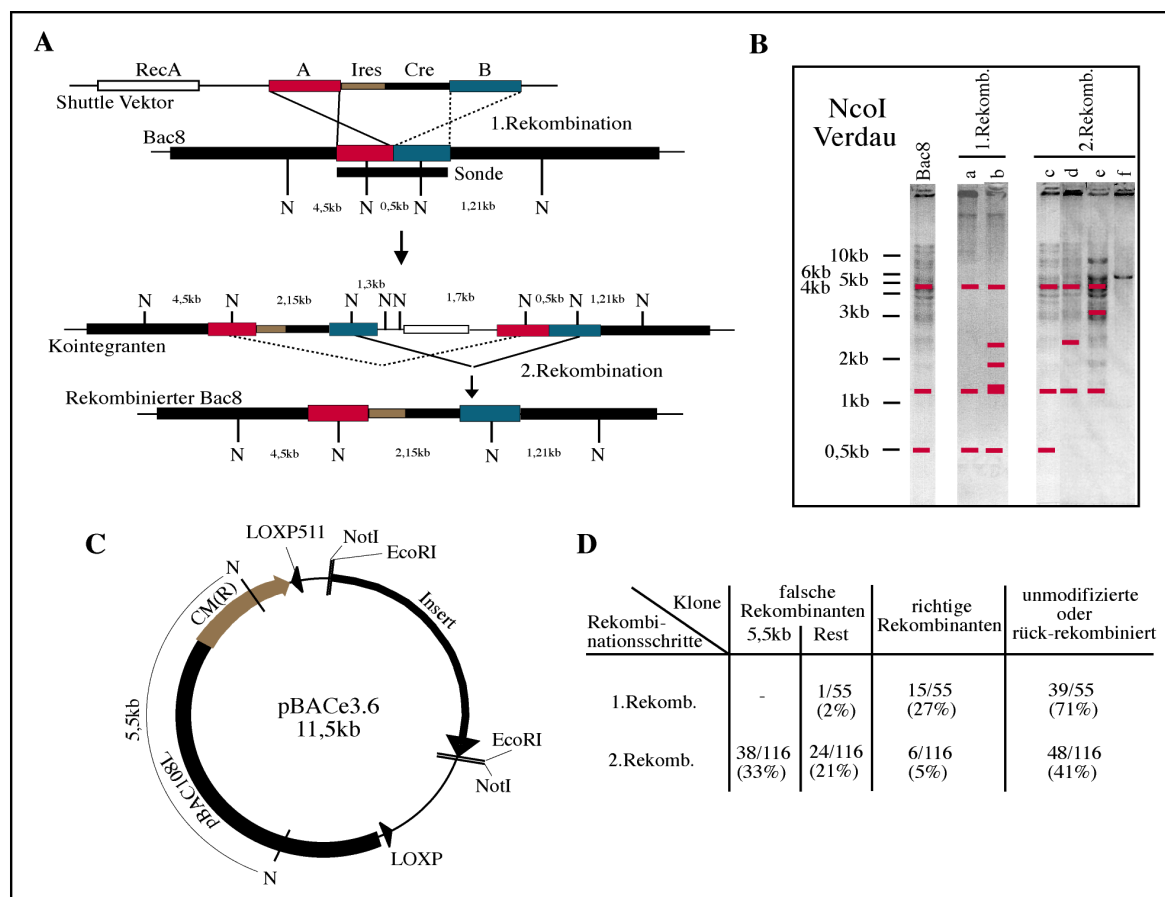


Fig. 25 Homologe Rekombination in Bakterien.

A: Schematische Darstellung der RecA induzierten homologen Rekombination über die Homologiearme A und B. NcoI Schnittstellen (N) und Fragmentgrößen sind ebenso wie die in B verwendete Sonde angegeben. **B:** Bild eines Agarosegels von NcoI-Verdauten Bakterienkolonien mit kolorierten und manuell überlagerten Banden, wie sie im Southern Blot (Sonde siehe A) als radioaktive Banden erschienen. Bac8, unmodifizierte Bakterienkolonie des BAC Klons Nr. 8. Unmodifizierte, oder rückrekombinierte Bakterienkolonie (a) nach der 1. Rekombination (b). Rückrekombinierte (c), und falsch rekombinierte (e und f) Bakterienkolonien nach der 2. Rekombination (d). Die Größenstandards sind links neben dem Agarose-Gel angegeben. **C:** BAC-Vektor (pBACE3.6) mit Kanamycinresistenz (CM(R)), LoxP-Site, mutierte LoxP-Site (LoxP511), NcoI- (N), EcoRI- und NotI-Schnittstellen. **D:** Tabelle mit der Anzahl der verschiedenen Rekombinanten nach der 1. und nach der 2. Rekombination.

wieder aus dem BAC heraus rekombiniert wurde. Bei der Verwendung einer 1,1kb großen, zu den Homologiearmen A und B homologen Sonde konnten alle relevanten Rekombinanten unterschieden werden. In einem NcoI-Verdau konnten im unmodifizierten BAC mit dieser Sonde drei Fragmente markiert werden (4,5kb; 1,21kb und 0,5kb), nach der 1.Rekombination sechs Banden (4,5kb; 2,15kb; 1,7kb; 1,3kb; 1,21kb und 0,5kb) und nach der 2.Rekombination drei Banden (4,5kb; 2,15kb und 1,21kb). Andere durch die Sonde markierte Banden waren auf falsche Rekombinationen zurück zu führen (Fig. 25B), die jedoch das zur Sonde homologe DNA-Fragment enthielten.

Aus drei unabhängigen 1.Rekombinationsschritten wurden 55 Klone näher untersucht. 27% der Klone enthielten erfolgreiche Rekombinanten, 71% der Klone erschienen nicht modifiziert und 2% aller Klone enthielten falsche Rekombinanten (Tabelle in Fig. 25D).

Aus den erfolgreichen Rekombinanten des 1.Rekombinationsschrittes wurden fünf 2.Rekombinationen angesetzt, bei denen insgesamt 116 Klone näher untersucht wurden. 5% aller Klone enthielten erfolgreich 2.Rekombinanten, 41% der Klone vollzogen die 2.Rekombination am selben Homologiearm wie die 1.Rekombination (erscheinen wie der nicht modifizierte BAC8) und bei 54% der Klone wurde eine falsche Rekombination und/oder Mutation beobachtet.

Betrachtete man die Fraktion der falsch rekombinierten und/oder mutierten Klone genauer, schien eine Rekombination unter allen vorhandenen falschen Rekombinationen besonders häufig zu sein. Diese falschen Rekombinanten enthielten in einem NcoI Verdau eine prominente 5,5kb Bande, die im nicht modifizierten und richtig rekombinierten BAC8 vollständig fehlte. Insgesamt waren 61% der falsch rekombinierten und/oder mutierten Klone zu diesen 5,5kb-Rekombinanten zuzuordnen (oder 33% von allen untersuchten Klonen der 2.Rekombination).

Die unerwartet hohe Frequenz der 5,5kb Rekombinanten (33%), sowie die niedrige Frequenz der richtig Rekombinierten Klone (5%) ließen vermuten, dass unter einem Selektionsdruck wie zum Beispiel durch die Fusarsäure-Selektion der 2.Rekombination erstens eine geringe Transkription und Translation von Cre stattfindet, und zweitens eine Cre vermittelte Rekombination der "wild type" loxP-Sequenz und der mutierten loxP-Sequenz, LoxP511, im BAC-Vektor (pBACe3.6) das gesamte genomische Insert herausrekombiniert (siehe Fig. 25C). Die erste Vermutung einer Transkription und Translation von Cre in einer prokaryotischen Zelle (*E.coli*) von einem für eukaryote (Mäuse) gedachten Vektor wurde durch das vollständige Fehlen der 5,5kb Rekombinanten in Rekombinationen ohne Cre im Shuttle-Vektor (z.B. bei Sunil Kumar) unterstützt. Darüber hinaus erscheint das IRES-Element in Promotoranalysen für prokaryotische Transkription als ein cryptischer Promotor (persönliche Kommunikation mit Thomas Wunderlich, Institut für Genetik, Universität zu Köln) agieren zu können. Nach Leo (Leo, 2002) konnte in

einem Online-Sequenzvergleich am 11 ATG-Codon ein schwacher prokaryotischer Promotor vorausgesagt werden (<http://nostradamus.cs.rhul.ac.uk/~leo/sak/demo/index.cgi>). Die Güte des cryptischen Promotors lag bei 0,4019 (1,0 wäre ein idealer prokaryotischer Promotor). Der zweite Teil der Vermutung konnte durch Sequenzanalysen der 5,5kb Rekombinanten bewiesen werden. In mehreren unabhängigen Sequenzierungen (n = 4) wurde eine Rekombination der loxP und loxP511 Sequenz entdeckt (Daten nicht gezeigt). Eine derartige Rekombination in der Frequenz (33%) kann nur durch eine Cre vermittelte Rekombination erklärt werden. Für RecA ist die loxP-Sequenz zu kurz um eine derart hohe Rekombinationseffizienz zu erreichen (Court et al., 2002). Wie die erste wird auch die zweite Vermutung vom Fehlen der 5,5kb Rekombinanten in Rekombinationen mit Shuttle-Vektoren ohne Cre unterstützt (siehe oben).

Aufgrund der Rekombinationsfrequenz-Daten ergab sich für die Injektion bevorzugt ein linearisiertes und vom pBACe3,6 separiertes BAC-Konstrukt zu verwenden. Zumindest musste aber unmittelbar vor jeder BAC-Aufreinigung die Integrität getestet werden. Die BAC-Präparationen, die für die Injektion verwendet wurden, ließen im Puls-Feld-Elektrophorese-Gel keine ungewünschte Rekombination erkennen. In Fig. 26 können sowohl im SacII, Sall und NotI Verdau die erwarteten Banden erkannt werden. Im Sall Verdau erscheint die 71kb Bande (Fig.23) als 33kb und 38kb Bande, da durch die Modifikation zwischen dem IRES-Element und Cre eine Sall Schnittstelle eingefügt wurde (siehe Fig. 22A4). Im SacII Verdau verschob sich lediglich die 28kb Bande zu einer 31kb Bande (vergleiche Fig. 26 und Fig. 23).

3.2.4 Die Analyse potentieller Founder-Mäuse

Die aus der Oozyteninjektion entstandenen potentiellen Founder Mäuse sollten durch zwei unabhängige Methoden auf einen möglichen Einbau des Cre Gens in das Genom der Mäuse untersucht werden. Erstens wurde eine genomische PCR entwickelt, die Cre im Genom der Mäuse erkennen konnte (Fig. 27A), und zweitens sollte über einen genomischen Southern Blot entweder Cre oder die durch den Einbau des Inserts entstandene Modifikation im A-B-Fragment nachgewiesen werden (Fig. 27B). Wurde für einen genomischen Southern Blot eine Cre-Sonde verwendet, musste immer eine genomische Cre Kontrolle mit untersucht werden, um die generelle Funktionalität der Sonde in den einzelnen Southern Blots zu gewährleisten (Fig. 28A, 1. Injektionsrunde). Wurde für den genomischen Southern Blot eine Sonde homolog zu dem Homologiearm "B" gewählt, konnte die Funktionalität der Sonde in jeder einzelnen Laufspur gesehen werden. In jeder genomischen Präparation muriner Zellen sollte eine Wildtyp-Sequenz des Homologiearms "B" von der Sonde erkannt werden (9,9kb, Fig. 23

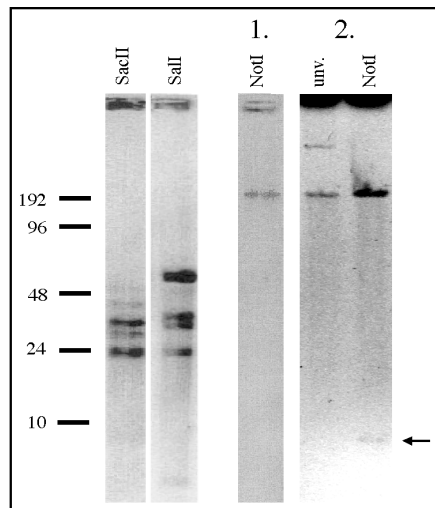


Fig. 26 Qualität der modifizierten BAC-DNA vor der Oozyteninjektion in Pulsfeldgelelektrophoresen.

Im SacII und Sall Verdau mit anschließender Pulsfeldgelelektrophorese erscheint das Bandenmuster zum unmodifiziertem BAC Nr.8 verändert: Im SacII Verdau ist die 28kb Bande durch das Insert nach 31kb verschoben, und im Sall Verdau ist durch die zusätzlich eingeführte Schnittstelle aus der 71kb Bande eine 31kb und eine 38kb große Bande entstanden (vergleiche Fig. 23). Sowohl mit zusätzlicher Säulen-Aufreinigung (1.), als auch ohne zusätzlichen Reinigungsschritte (2.) erschien die DNA in guter Qualität. Der Pfeil deutet auf die BAC-Vektor Bande im NotI Verdau ohne zusätzliche Reinigungsschritte. Die Größenstandards sind ganz Links angegeben. Unv, unverdaut.

und Fig. 28B). Ist das BAC-Insert in das Genom der Zelle eingebaut, sollte zusätzlich eine 3,7kb Bande erkannt werden können (Fig. 28A, 2.Injektionsrunde und Fig. 28B).

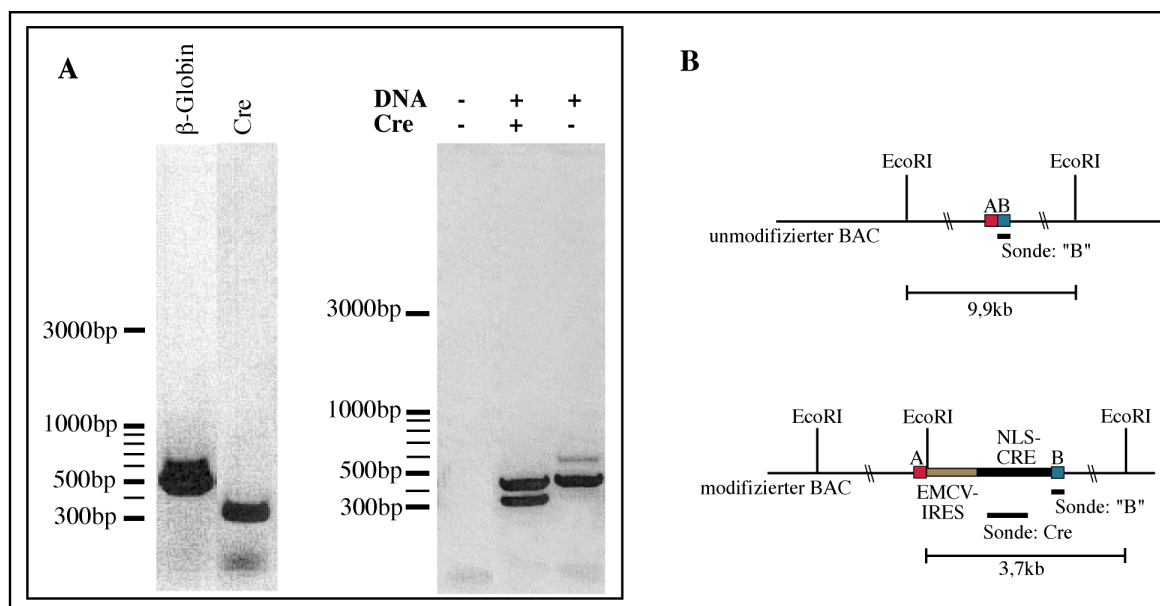


Fig. 27 Zwei Strategien für die Analyse der potentiellen Founder-Mäuse.

A: Genomische Cre-PCR: Geeignete Cre-PCR-Primer erlauben die Amplifizierung eines Cre spezifischen 380bp großen Fragments aus einer genomischen DNA-Präparation, wenn Cre in dem Genom der für die genomische DNA-Präparation verwendeten Zellen vorliegt (1., 2. und 4. Laufspur von rechts jeweils: ohne, mit und mit Cre im Genom). Als Kontrolle dient die PCR mit β -Globin Primern, die ein 490bp Fragment aus genomischer DNA amplifizieren. Die PCR führt auch bei dem Einsatz von allen vier Primern auf einmal (1., 2. und 3. Laufspur von rechts) zu dem spezifischen Bandenmuster. Größenstandards jeweils links angegeben. **B:** Schematische Darstellung der Sonden für einen genomischen Southern Blot: Verwendete Sonden (Sonde: Cre und "B") und erwartete Größe der Fragmente für den unmodifizierten und den modifizierten BAC Nr. 8, mit der die Sonden hybridisieren sollten, wenn ein EcoRI-Verdau durchgeführt wurde (EcoRI-Schnittstellen sind angegeben).

3.2.4.1 PCR zum Nachweis genomischer Cre-DNA

Um in einer PCR mit genomischer DNA als Template spezifische Banden zu erhalten, sollte eine hohe (um 60°C) Temperatur für den Schritt der Primeranlagerung an das Template gewählt werden. Hierfür mussten 30bp beziehungsweise 32bp lange Primer spezifisch für Cre erzeugt werden (siehe Material Tabelle 1), die diese hohen Primeranlagerungstemperaturen aushalten konnten. In Fig. 27A wurde die Funktionalität dieser Primer am genomischen DNA Template gezeigt. Aus einem genomischen Template mit Cre (MOC-Cre, freundlicherweise überlassen von Ari Weismann, Insitut für Genetik, Universität zu Köln) amplifizierten die Cre-Primer ein 380bp großes Fragment. Aus einigen Präparationen genomischer DNA mit inkorporiertem Cre Gen (MOC-Cre Maus) konnte jedoch kein 380bp Fragment amplifiziert werden. Vermutlich lag die genomische DNA nicht in einer PCR-amplifizierbaren Form vor. Daher sollte die PCR-Amplifizierbarkeit jeder genomischen DNA-Präparation mit einer bekannten, publizierten PCR mit Primern spezifisch für das beta-Globin Gen (Transgenic Animal Web: www.med.umich.edu/tamc/globin.html) getestet werden. Beta-Globin kommt im Hämoglobinmolekül, dem Farbstoff der roten Blutkörperchen, zwei mal vor und das Gen sollte in jeder murinen Zelle vorliegen (Voet, 1995). Beta-Globin wurde daher regelmäßig als Kontrolle beispielsweise auf die PCR-Amplifizierbarkeit eines genomischen DNA-Präperates verwendet. Mit den beta-Globin Primern ließ sich ein 490bp großes Fragment amplifizieren (Fig. 27A). Wurden alle vier Primer (zwei beta-Globin Primer und zwei Cre Primer) in einer PCR Reaktion eingesetzt, konnten beide Banden zusammen (die beta-Globin Bande und die Cre Bande) amplifiziert werden (Fig. 27A), und dienten so als Test auf Cre in den potentiellen Founder Mäusen.

3.2.4.2 Untersuchung der Häufigkeit potentieller Founder Mäuse

Bei der 1. Injektionsrunde, in der mit NotI linearisierte BAC-DNA nach einer Säulenaufreinigung (siehe Material und Methoden) für die Oozyteninjektion verwendet wurde, konnten von insgesamt 96 potentiellen Founder Mäusen keine einzige im genomischen Southern Blot bestätigt werden (Fig. 28A, 1.Injektionsrunde und Fig. 28C). In der genomischen Cre-PCR konnten allerdings wiederholt und unabhängig voneinander (zwei genomische DNA-Präparationen für jede potenzielle Founder Maus) in einer Probe eine starke, in zwei weiteren Proben eine schwache Cre-Bande nachgewiesen werden. Insgesamt wurde aber dem genomischen Southern Blot mehr Bedeutung geschenkt, da auch dieser zwei mal unabhängig voneinander mit dem selben Ergebnis durchgeführt wurde. Alle Mäuse

aus der 1. Injektionsrunde wurden verworfen. Um Kontaminationen, die zu den positiven genomischen Cre-PCR Ergebnissen geführt haben könnten, auszuschließen, wurden für die Untersuchung der folgenden Mäuse neue Primer bestellt und angewendet. Als mögliche Ursache der fehlenden Founder Mäuse trotz 96 potentieller Founder Mäuse konnte eine schlechte Qualität der BAC-DNA (z.B.: geschert) unmittelbar vor der BAC-Injektion ausgeschlossen werden. In Fig. 26 konnte der Erfolg der Aufreinigung (weder genomische DNA-Kontamination, noch Vektor-Bande zu sehen) und die Intaktheit der DNA (klare Bande ohne "Schmier" aus gescherter DNA) in einem Puls-Feld Elektrophoresegel demonstriert werden. Darüber hinaus ist diese Methode der Präparation von BAC-DNA für die Oozyteninjektion beschrieben worden und daraus entstandene Mäuse sind publiziert (Yang et al., 1997). Möglicherweise konnte in dem für die Oozyteninjektion zuständigen, jedoch im Injizieren von BAC-DNA ungeübten Labor, das übermäßige Scheren der BAC-DNA während der Injektion nicht vermieden werden. Theoretisch sollten durch den Injektionsvorgang gerade große DNA-Fragmente nicht unerheblich geschert werden, so dass für eine weitere Injektionsrunde zirkuläre BAC-DNA gewählt wurden. Zirkuläre BAC-DNA sollten den Vorteil besitzen, bei der Oozyteninjektion wesentlich weniger geschert zu werden. Im Idealfall würde zirkuläre DNA nur ein einziges Mal geschert werden, mit dem Ergebnis eines linearisierten, "intakten" DNA-Stranges.

Nach der 2. Injektionsrunde (mit zirkulärer BAC-DNA) konnten insgesamt 43 potentielle Founder Mäuse untersucht werden. In der genomischen Cre-PCR konnte für eine Maus ein Cre-Insert nachgewiesen werden, für die zusätzlich im genomischen Southern Blot ein in das Genom integriertes BAC-Insert demonstriert werden konnte (Fig. 28A, 2. Injektionsrunde Maus #6). Neben dieser Maus (#6) konnte für drei weitere Mäuse im genomischen Southern Blot die Integration der BAC-DNA gezeigt werden. Ähnlich den Kontrollbanden waren auch die Insertbanden der vier im genomischen Southern Blot positiv getesteten Mäuse sehr schwach. Es konnte daher nicht mit absoluter Sicherheit die Integration der BAC-DNA gezeigt werden. Alle vier Mäuse (#6, #12, #22 und #28) wurden für eine Rückkreuzung zu C57BL/6 Mäusen verwendet. Founder Mäuse sollten als heterozygote (bezüglich der BAC-DNA) Tiere 50% der Nachkommen aus den Rückkreuzungen das BAC-Insert vererbt haben. Nur für die Rückkreuzung mit der potentiellen Founder Maus #6 konnte unter den Nachkommen über die genomischen Cre-PCR ein BAC-Insert gefunden werden. In dieser Rückkreuzung konnten 13 Tiere untersucht werden von denen nur ein einziges Tier (Maus #6.33) in der genomische Cre-PCR positiv getestet werden konnte. Die enorme Abweichung der gefundenen Anzahl von BAC-Insert Trägern (8% oder 1/13) zu der erwarteten Anzahl von 50% (in diesem Fall also etwa sechs oder sieben Tiere) konnte nicht erklärt werden. In den drei anderen Rückkreuzungen wurde kein Cre-Fragment amplifiziert. Nur Maus #6 kam daher als Founder einer Maus-Linie in

Frage. Für kein Tier aus den vier Rückkreuzungen konnte jedoch über einen genomischen Southern Blot eindeutig ein BAC-Insert nachgewiesen werden (Fig. 28B). Trotz der nicht eindeutigen Ergebnisse wurde Maus #6.33 mit einer C57BL/6 Maus weiter gekreuzt. Es konnten jedoch auch nach einer fünfmonatigen Verpaarung und ausgetauschten Paarungspartnern keine Nachkommen erzeugt werden, so dass die Sterilität der Maus #6.33 angenommen werden musste.

Die möglichen Erklärungen für eine derart geringe Häufigkeit des zufälligen BAC-Insert Einbaus in das Genom der potentiellen Founder Mäuse (0 aus 96 Tieren und 1 aus 43 Tieren) sind verschieden und werden im nächsten Abschnitt genauer diskutiert werden. Offensichtliche Fehlerquellen können jedoch

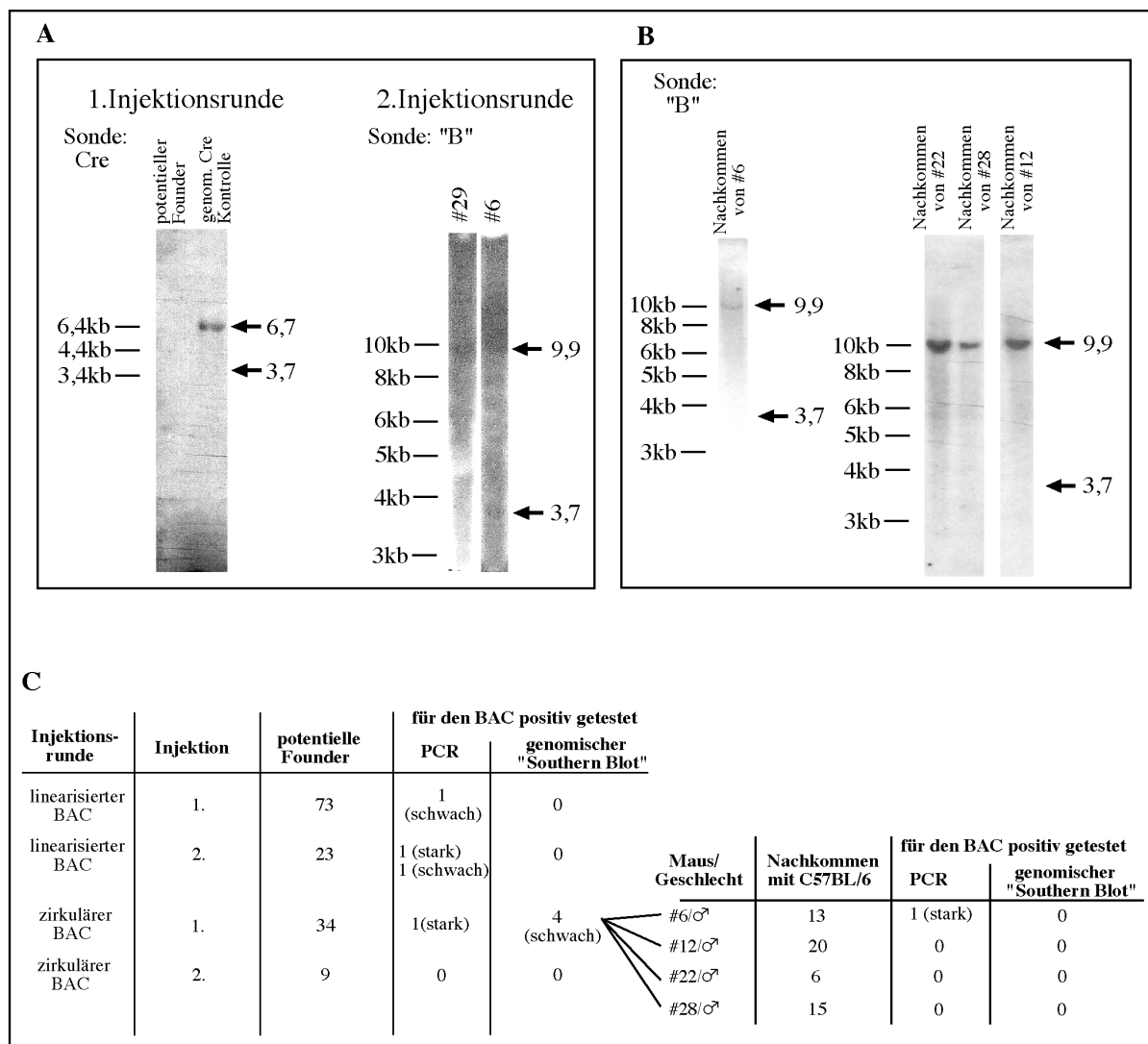


Fig. 28 Ergebnisse der Analyse von den potentiellen Founder-Mäusen.

A: Repräsentative Beispiele der Autoradiographie der Southern Blot Experimente zum Identifizieren potentieller Founder Mäuse nach der 1. und 2. Injektionsrunde. Verwendete Sonden und erwartete Bandenmuster (schwarze Pfeile) in Fig. 27B angegeben. In der 1. Injektionsrunde konnte kein potentielle Founder-Maus identifiziert werden. Als genomische Cre Kontrolle diente eine MOC-Cre Maus, freundlicherweise überlassen von Prof. Ari Waismann). Größenstandards sind links angegeben. **B:** Autoradiographie der Southern Blot Experimente der Nachkommen der in A identifizierten potentiellen Founder-Mäuse (#6, #12, #22 und #28 aus der 2. Injektionsrunde). Verwendete Sonden und erwartete Bandenmuster (schwarze Pfeile) in Fig. 27B angegeben. Größenstandards sind links angegeben. **C:** Übersichtstabelle mit der Anzahl und Ergebnissen der getesteten Mäuse aus der 1. und 2. Injektionsrunde, sowie den Nachkommen der potentiellen Founder Mäuse aus der 2. Injektionsrunde.

ausgeschlossen werden. Prinzipiell sollte jedoch auch für die Injektion mit zirkulärer BAC-DNA die Qualität der DNA unmittelbar vor der Injektion ausreichend gewesen sein. In Fig. 26 konnten sowohl die erwarteten Banden für unverdaute zirkuläre BAC-DNA (durch den Bearbeitungsprozess sind einige BAC-Moleküle zirkulär genickt, andere komplett linearisiert und laufen daher in zwei Banden), als auch die klare Bande nach einem NotI Verdau in einem Puls-Feld Elektrophoresegelel demonstriert werden. Ebenfalls konnten keine größeren Mutationen (Deletionen, Insertionen) im Sall und SacII Verdau festgestellt werden. Obwohl die BAC-DNA nach einem beschriebenen Protokoll aufgereinigt wurde (Yang et al., 1997), konnte eine leichte Verunreinigung durch genomische DNA oder Proteine, die die Erfolgsquote für das Erzeugen von Founder Mäuse herabsetzen könnte, nicht ausgeschlossen werd.

4. Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurden geruchsstoffinduzierte Antwortmuster im olfaktorischen Bulbus von Mäusen untersucht. Es erschien methodisch sinnvoll die unterschiedlichen Ebenen der Reizprozessierung im olfaktorischen Bulbus unabhängig voneinander zu betrachten, da es Hinweise dafür gibt, dass der geruchsstoffinduzierte Ausgangsreiz dem Eingangsreiz zwar ähnelt, nicht aber identisch ist (Friedrich and Laurent, 2001; Luo and Katz, 2001; Yokoi et al., 1995). In einem Vergleich der Antwortmuster der unterschiedlichen Verarbeitungsebenen sollten die Modifikationen der neuronalen Aktivität beschrieben werden können. Funktional liefert die neuronale Aktivität der ORN die Eingangsinformation des Geruchssystems. Die Aktivität der ORN wurde durch eine Färbung mit einem Calcium-indikator Farbstoff (Calcium-Green-1-dextran) optisch abgeleitet. Bevor die Information über einen Geruchsstoff den olfaktorischen Bulbus über die Mitralzellen in Form von Aktionspotentialen wieder verlässt, wird die Eingangsinformation durch Netzwerke aus Interneuronen eingehend modifiziert. Um das Ausmaß der Modifikationen untersuchen zu können, wurde ein Mausmodell entwickelt, in dem das Ausgangssignal der Mitralzellen durch die aktivitätsabhängige Expression von eGFP sichtbar gemacht werden sollte. Aufgrund methodischer Schwierigkeiten konnte jedoch noch keine Maus mit geruchsstoffinduzierten Aktivitätsmustern der Mitralzellen beschrieben werden.

Durch die verwendete Methode des Calcium-Imagens und der dafür durchgeführten Färbung konnten die Ableitungen neuronaler Aktivität auf ORN-Terminalien beschränkt werden (vergleiche Wachowiak and Cohen, 2001; Wachowiak et al., 2004). Die durch einen Geruchsstoffstimulus ausgelösten neuronalen Aktivitäten wurden in Gebieten beobachtet, die als Glomeruli identifiziert werden konnten. Da die Positionen der Glomeruli interindividuell recht invariant erschienen, und die glomeruläre Schicht in erster Annäherung nur eine zweidimensionale Struktur besitzt (Nagao et al., 2000), konnten die Antwortmuster als direktes Abbild eines "Geruchsraums" interpretiert werden. Die Achsen dieses Raums würden durch die OR aufgespannt werden, und ein Geruchsstoff wäre durch die Aktivität einzelner Glomeruli eindeutig definiert (Korsching, 2001; Mori and Shepherd, 1994). Die Einführung eines solchen "Geruchsraum" Konzepts erscheint systematisch sinnvoll, da es in erster Linie die OR sind, die eine Chemikalie als Geruchsstoff definieren.

Im optisch ableitbaren Bereich des Bulbus, einem dorsalen Bulbusausschnitt, wurden unterschiedliche Regionen charakterisiert, in denen bestimmte Eigenschaften der ausgewählten Geruchsstoffe repräsentiert wurden. Durch aliphatische Aldehyde als Stimulus konnte die Region, in der die Kettenlänge des Kohlenstoffgrundgerüsts dieser Aldehyde zu unterschiedlich

aktivierten Glomeruli führt, näher beschrieben werden. In dieser Region, die hier Aldehyd-Domäne genannt wurde, lösten nicht nur unterschiedliche aliphatische Aldehyde, sondern auch unterschiedliche Konzentrationen eines aliphatischen Aldehyds qualitative Unterschiede im Aktivitätsmuster aus. Bei niedrigen Konzentrationen (1/100 bis 1/1000 verdünnten Stimuli) wurde ein Geruchsstoff durch 10 bis 20 Glomeruli repräsentiert. Mit zunehmender Geruchsstoffkonzentration wurden immer mehr Glomeruli für die Antwort rekrutiert, so dass bei unverdünnten aliphatischen Aldehyden in etwa der Hälfte der ungefähr 150 Glomeruli des dorsalen Bulbusausschnitts eine Aktivität messbar war. Durch verschiedene zyklische Verbindungen konnte eine posterior-dorsale Region beschrieben werden, in der leichte Modifikationen dieser Verbindungen zu deutlich unterschiedlichen glomerulären Aktivitätsmustern führten. Niedrige Konzentrationen dieser Geruchsstoffe (1/50 verdünnte Stimuli) erregten ebenfalls nur in wenigen Glomeruli (bis maximal etwa 20) eine neuronale Antwort. Wurde diese Region in transgenen Mäusen, in denen der in dieser Region liegende M72 Glomerulus durch eGFP angefärbt war (Potter et al., 2001), untersucht, konnten die Antworten nicht nur beschrieben, sondern auch bestimmten OR zugeordnet werden. Diese Beobachtungen tragen dazu bei, die Logik der Kodierung von Geruchsstoffen im olfaktorischen System besser zu verstehen und vermitteln einen Eindruck davon, welche Parameter der Stimuli für das Geruchssystem tatsächlich relevant sind.

4.1 Funktionaler Aufbau des olfaktorischen Bulbus in Domänen

Die geruchsstoffinduzierten Aktivitätsmuster des dorsalen Bulbus konnten grob anhand der chemischen Kategorien der Geruchsstoffe eingeordnet werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich aliphatische Aldehyde und zyklische Verbindungen als Geruchsstoffe verwendet. Diese Geruchsstoffe vermochten Aktivitätsmuster auszulösen, in denen die größte Aktivität entweder anterior (bei aliphatischen Aldehyden), oder posterior (bei zyklischen Verbindungen) lag. Daher wurde die anteriore Region als Aldehyd-Domäne bezeichnet. In Analogie zur Aldehyd-Domäne könnte die Region, die verstärkt auf zyklische Verbindungen reagiert, Domäne der zyklischen Verbindungen genannt werden. Wurde die Grundstruktur der die Domäne aktivierenden Geruchsstoffe leicht modifiziert (für die Aldehyd-Domäne wurden beispielsweise aliphatische Aldehyde mit schrittweise länger werdendem Kohlenstoffgerüst gewählt), nahmen innerhalb der Domäne unterschiedliche Glomeruli am Aktivitätsmuster teil. Die Domänen erschienen daher grob chemotop angeordnet zu sein. Je größer die Auflösung der Betrachtung (vom gesamten Bulbus über Domänen bis hin zu

einzelnen Glomeruli), desto präziser ist die Identifikation des Geruchsstoffes, der zu einem Aktivitätsmuster führt, möglich. Allgemeinere chemische Eigenschaften (z.B.: eine Aldehyd-Gruppe besitzend, oder eine zyklische Molekülstruktur etc.) der Geruchsstoffe erregen Aktivitätsmuster mit aktivierten Glomeruli in einer oder mehreren Domänen des olfaktorischen Bulbus (vergleiche Belluscio et al., 2002; Johnson and Leon, 2000a; Johnson et al., 1998). Kleinere Modifikationen in den Geruchsstoffen mit derselben allgemeinen chemischen Eigenschaft evozieren hauptsächlich innerhalb der Domänen unterschiedliche Aktivitätsmuster (wie zum Beispiel bei Johnson and Leon, 2000b; Takahashi et al., 2004a; Uchida et al., 2000 beschrieben). Letztendlich ist jeder Geruchsstoff durch die Kombination der aktivierten Glomeruli präzise identifizierbar.

Verglichen mit anderen Sinnessystemen erscheinen die Aktivitätsmuster des olfaktorischen Bulbus nur grob räumlich angeordnet zu sein (Hudspeth, 1997; Hübener, 1997). Zum Beispiel wurden, bis auf Aktivitätsmuster mit sehr wenigen aktivierten Glomeruli (zwei bis drei Glomeruli, z.B. für Phenyl-1,2-propanedion), immer auch einige aktivierte Glomeruli außerhalb der zur allgemeinen chemischen Eigenschaft des Geruchsstoffes gehörenden Domäne aktiviert. Darüber hinaus ließen sich innerhalb einer Domäne nicht alle Glomeruli mit Geruchsstoffen, die die passende allgemeine chemische Eigenschaft besaßen, stimulieren. Letzteres Beispiel könnte jedoch durch die methodisch bedingte limitierte Anzahl an untersuchten Geruchsstoffen erklärt werden. Andererseits könnten die beobachteten Abweichungen in der chemotopen Kodierung auf die Reduktion des multidimensionalen "Geruchsraums" in die zwei Dimensionen der glomerulären Schicht im Bulbus zurück zu führen sein. Zumindest schien im Vergleich einiger Aktivitätsmuster in der Domäne der zyklischen Verbindungen nicht eine einfache chemische Eigenschaft und ihre möglichen Variationen, sondern wesentlich komplexer, mehrere Eigenschaften auf einmal repräsentiert zu sein (Fig. 15). Eine derartige grobe chemotope Kodierung wurde auch für andere Vertebraten (Doving et al., 1980; Friedrich and Korsching, 1998; Wachowiak et al., 2000) und Insekten beschrieben (Rodrigues and Bulthoff, 1985; Sachse et al., 1999). In Nagetieren konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die grobe chemotope Kodierung noch feiner in Domänen, die ihrerseits in Subdomänen unterteilt sind, in denen, wiederum räumlich gegliedert, minimale Unterschiede der Geruchsstoffe dargestellt sind (Belluscio et al., 2002; Mori et al., 1992; Takahashi et al., 2004a; Uchida et al., 2000). Die grobe chemotope Kodierung tritt nicht nur über die Arten hinweg, sondern auch unabhängig von der verwendeten Untersuchungsmethode auf (Bozza et al., 2004; Guthrie et al., 1993; Johnson and Leon, 2000b; Wachowiak and Cohen, 2001; Xu et al., 2003).

Die in verschiedenen Arten gefundene Ungenauigkeit in der chemotopen Kodierung deutet darauf hin, dass das Geruchssystem, falls es nach den uns bekannten chemischen Eigenschaften bewertet, Geruchsstoffe nur grob nach den

chemischen Kategorien unterscheidet (Friedrich and Stopfer, 2001; Igarashi and Mori, 2004; Takahashi et al., 2004a). Auch die in der Einleitung erwähnten, qualitativen Kategorien der Geruchsstoffe (Harper, 1968), die hauptsächlich in der geruchstoffverarbeitenden Industrie (Parfümeure, Lebensmitteltechnologen etc.) verwendet werden (Ohloff, 1990), werden nur grob in den Domänen dargestellt. Dies verdeutlicht beispielsweise die durch aliphatische Aldehyde aktivierten Glomeruli in der Domäne für zyklische Verbindungen. Nach Harper wäre in diesem Beispiel ein Geruchsstoff der "aldehydischen" Kategorie in einer Domäne für "mandel-" oder "nussartige" Geruchsstoffe repräsentiert.

4.1.1 Mögliche Funktionen der Domänen

Welche Vorteile, beziehungsweise Ursachen könnte die Gliederung des Bulbus in die Domänen haben? Lässt man die Möglichkeit des nur zufälligen Aufbaus in Domänen weg, erscheinen prinzipiell drei Gruppen verschiedener Ursachen oder beliebige Kombinationen der Ursachengruppen denkbar. Erstens, die Ursache des Aufbaus in Domänen liegt vor dem Bulbus. Zum Beispiel durch Zielfindungsmoleküle, die ORN nur einer bestimmten Domäne beeinflussen. Zweitens, die Ursache des Aufbaus in Domänen liegt im Bulbus. In diesem Fall sollte das Geruchssystem auf der Ebene des Bulbus unterschiedliche Geruchsstoffe, beziehungsweise allgemeine chemische Eigenschaften der Geruchsstoffe anhand der aktivierten Domänen unterscheiden. Diese Möglichkeit wurde durch die obige Ausführung zumindest eingeschränkt. Drittens, die Ursache des Aufbaus in Domänen liegt hinter dem Bulbus, in dem die Domänen für die Kodierung der Ausgangssignale des Bulbus in irgend einer Form relevant wären. In den folgenden Kapiteln werden die beiden noch nicht besprochenen Möglichkeiten (1. und 3.) diskutiert.

4.1.1.1 Die mögliche Bedeutung der Domänen für die weitere Prozessierung der Geruchsstoffinformation

Die neuronale Aktivität ORN wird im olfaktorischen Bulbus durch verschiedene Netzwerke aus Interneuronen moduliert (Aungst et al., 2003; Lodovichi et al., 2003; Shipley and Ennis, 1996). Seit längerem wird beispielsweise "laterale Inhibition" als Mechanismus zur Kontrastverschärfung der Aktivitätsmuster diskutiert (Shepherd and Greer, 1990; Imamura et al., 1992; Luo and Katz, 2001; Takahashi et al., 2004b; Yokoi et al., 1995). Innerhalb einer Domäne erscheint eine Kontrastverschärfung durch "laterale Inhibition" denkbar (Yokoi et al., 1995;

Friedrich and Stopfert, 2001). Hier scheint die Kontinuität des Reizes, zumindest teilweise, auch in einer kontinuierlich sich verschiebenden ORN Aktivität angeordnet zu sein, so dass sehr ähnliche Geruchsstoffe (z.B.: schrittweise Verlängerung des Kohlenstoffgrundgerüsts aliphatischer Aldehyde) in der Aktivierung benachbarter Glomeruli resultieren (vergleiche: Igarashi and Mori, 2004; Johnson and Leon, 2000b; Meister and Bonhoeffer, 2001; Sachse et al., 1999; Takahashi et al., 2004a). Ist jedoch ein "benachbarter Stimulus" nicht in der Aktivität benachbarter Glomeruli wiederzufinden, sollte die "laterale Inhibition" für eine Kontrastverschärfung wenig sinnvoll sein. Da die Kodierung von Geruchsstoffen über den Bulbus betrachtet aber nur grob chemotop organisiert ist, und die modulatorischen Netzwerke aus Interneuronen weitreichender als die Ausmaße einer Domäne sind (Aungst et al., 2003; Shipley and Ennis, 1996), erscheint die "laterale Inhibition" als genereller Mechanismus der Kontrastverschärfung nur schwer vorstellbar.

Neben glomerulären Aktivitätsmustern antwortet der Bulbus auch in zeitlichen Aktivitätsmustern auf einen Geruchsstoffstimulus (Friedrich and Laurent, 2001; Friedrich and Laurent, 2004; Kashiwadani et al., 1999; Laurent et al., 1996). Durch die zeitliche Bindung der Aktivität zweier Mitralzellen, deren primäre Dendriten nicht denselben Glomerulus innervieren, konnte im Zebrafisch über die Zeit eine bessere Unterscheidbarkeit zweier Geruchsstoffe demonstriert werden (Friedrich and Laurent, 2001; Friedrich and Laurent, 2004) siehe aber, (Uchida and Mainen, 2003). Der zeitlichen Bindung der Mitralzellaktivität könnte auch in Säugetieren und Insekten eine Bedeutung in der Kodierung von Geruchsstoffen zukommen (Lei et al., 2002; Schoppa and Westbrook, 2002). Für die zeitliche Bindung der Mitralzellen spielt aber die Anordnung der Glomeruli in Domänen keine Rolle, lediglich der Aktivitätszustand eines Glomerulus bei einem Stimulus würde beachtet werden. Die zeitlichen Aktivitätsmuster können daher ebenfalls die Existenz der glomerulären Domänen nicht bedingen.

4.1.1.2 Mögliche Rolle der OR-Familie für die Funktion von Domänen

Ein Organismus, für den die Unterscheidbarkeit sehr vieler verschiedener Gerüche relevant ist, der präzisen Einordnung eines Geruches innerhalb des "Geruchsraums" aber nur eine geringere Bedeutung zukommt, sollte viele unterschiedliche OR besitzen und deren Aktivierungsgrad durch das Geruchssystem voneinander trennen können. Die präzise Zusammensetzung aktivierter OR würde aber relativ unbedeutend sein. Um die Aktivierung der verschiedenen OR voneinander unterscheiden zu können, dürfte die Information keiner zwei unterschiedlicher OR miteinander gemischt werden, wohl aber die

Information aus identischen OR. Erst auf der Ebene in der die Gerüche für die Unterscheidung miteinander verglichen werden, müssten Informationen unterschiedlicher OR zusammenlaufen. Verglichen mit anderen Sinnessystemen kann bei dem Menschen der Geruchssinn nur schlecht Unterschiede zweier Gerüche quantitativ beurteilen (Cleland et al., 2002; Ditzen et al., 2003; Uchida and Mainen, 2003; Wise et al., 2000). Relativ genau können demgegenüber musikalisch nur leicht vorgebildete Menschen die Anzahl der Töne bestimmen, die zwischen zwei beliebigen Tönen liegen (Klinke, 1995). Relativ gut können auch Abstände zwischen zwei Objekten abgeschätzt werden, oder Farbtöne nach zunehmendem z.B. Rotanteil eingestuft werden (Grüsser and Grüsser-Cornehls, 1995). Auch Ratten können nur bedingt die Ähnlichkeiten von Geruchsstoffen quantitativ einordnen. Ratten stufen aliphatische Aldehyde nur als sehr ähnlich ein, wenn das Kohlenstoffgrundgerüst der Geruchsstoffe um ein oder zwei Kohlenstoffatome variiert, erkennen jedoch keine besondere Ähnlichkeit mehr wenn der Aldehyd um drei oder mehr Kohlenstoffatome länger ist (Linster and Smith, 1999). Auf der anderen Seite kann das Geruchssystem oft selbst dann noch zwei Geruchsstoffe voneinander unterscheiden, wenn sie quasi identisch sind. So werden vom Menschen viele (Ohloff, 1990) und von Nagern (Linster et al., 2001; Rubin and Katz, 2001; Slotnick and Bisulco, 2003) alle untersuchten Enantiomere eines Geruchsstoffes voneinander unterschieden. Das Geruchssystem scheint also gut geeignet zu sein, um Unterschiede von Geruchsstoffen zu erkennen, jedoch nur bedingt fähig, die Ähnlichkeiten zweier Geruchsstoffe zu beschreiben. So betrachtet erscheint es wahrscheinlich, dass die akkurate Trennung der Informationen von den unterschiedlichen OR in Form von Glomeruli, die ihrerseits wiederum in Domänen angeordnet sind, der Unterscheidbarkeit von Gerüchen dient.

Die Frage nach den Vorteilen der Domänen könnte man jetzt auch anders stellen. Gibt es Gründe zur Annahme, dass die Domänen auf Grund des Organisationsprinzipes (Trennung der ORN-Typen, Anordnung der ORN-Typen in Glomeruli) entstehen? In der hier vorgestellten Arbeit konnten Domänen beschrieben werden, die funktional aus mehreren Subdomänen bestanden, die ihrerseits nur wenige Glomeruli groß waren (vergleiche Igarashi and Mori, 2004; Takahashi et al., 2004a; Uchida et al., 2000). Für die Domäne der zyklischen Verbindungen schienen die Subdomänen aus sehr wenigen bis zu einem einzigen Glomerulus zu bestehen. Ganz ähnlich bestehen OR-Familien aus sehr wenigen unterschiedlichen OR (bis maximal 34 Mitglieder), und die Mehrheit der OR-Familien besitzt nur ein einziges OR Mitglied (Godfrey et al., 2004; Zhang and Firestein, 2002). Es liegt die Vermutung nahe, die Domänen oder Subdomänen könnten aus ORN, deren OR aus nur einer OR-Familie stammen, aufgebaut sein. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Beobachtung, dass, soweit untersucht, Glomeruli, deren OR ähnliche Aminosäuresequenzen besitzen nebeneinander

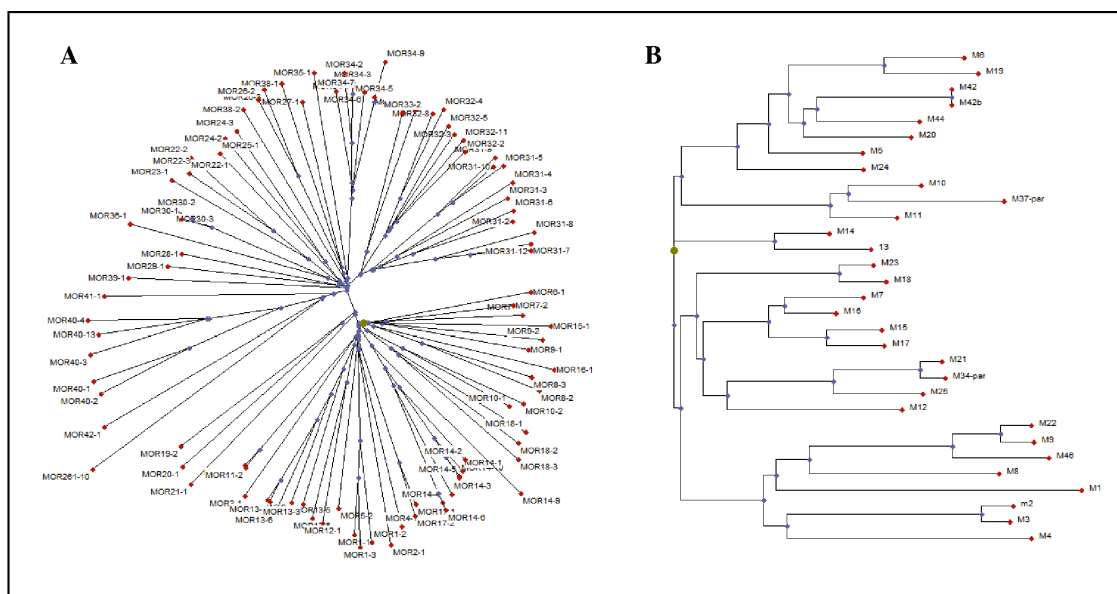


Fig.29 Phylogenetische Stammbäume der Klasse I OR-Familien und der MOR-171 Familie.

A: Phylogenetischer Stammbaum der Klasse I OR. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden nur 96 verschiedene OR der 165 Klasse I OR für die Erzeugung des Stammbaums verwendet. Die 42 OR Familien werden in mehrere Subfamilien unterteilt, zu denen zumeist mehrere verschiedene OR gehören. Die Beschriftung erfolgte nach Zhang (Zhang and Firestein, 2002). **B:** Phylogenetischer Stammbaum der OR Familie 171 aus der Klasse II OR-Familien. Die 31 funktionalen OR gliedern sich in mehrere Subfamilien, zu denen jedoch zumeist nicht mehrere OR gehören. Die Beschriftung erfolgte nach Zhang (Zhang X 2002). Anstelle von beispielsweise MOR171-2 wurde M2 (MOR wurde zu M; 171 wurde weggelassen) gesetzt. Die M71 und M72 OR sind in dieser Nomenklatur jeweils die OR MOR171-2 und MOR171-3.

liegen [(Strotmann et al., 2000; Tsuboi et al., 1999), für M71 und M72 vergleiche (Potter et al., 2001) und (Bozza et al., 2002)].

Darüber hinaus lassen auch die bisher bekannten OR-Liganden Zuordnungen Vermutungen über die Bedeutung der OR-Familien für die Domänen zu. Die meisten Liganden der bisher identifizierten OR-Liganden Paare gehören zu aliphatischen Aldehyden oder aliphatischen Karbonsäuren [(Malnic et al., 1999), zusammengefasst bei (Mombaerts, 2004a)]. Die zugehörigen OR stammen alle aus der Klasse I der OR-Familien, die, soweit untersucht, in Zone IV des sensorischen Epithels (nach Ressler et al., 1993) exprimiert sind [(Bulger et al., 1999; Malnic et al., 1999) zusammengefasst bei (Godfrey et al., 2004)]. Da die Anordnung der Zonen wenigstens grob im Bulbus aufrecht erhalten ist (Nagao et al., 2000), sollten die zu den OR der Klasse I gehörenden ORN in der Zone IV des Bulbus, der dorsalen Region, wiederzufinden sein (Conzelmann et al., 2000). Nicht nur in der hier vorgestellten Arbeit konnte mit aliphatischen Aldehyden im dorsalen Bulbusbereich eine deutliche Aktivität ausgelöst werden (vergleiche z.B.: Johnson and Leon, 2000b; Meister and Bonhoeffer, 2001; Rubin and Katz, 1999; Takahashi et al., 2004a; Xu et al., 2003). Möglicherweise stellt die hier beschriebene Aldehyd-Domäne die Aktivität der ORN mit OR aus der Klasse I dar, und die OR-Familien der Klasse I die Subdomänen (vergleiche Fig. 29A). Einige der Klasse I OR-Familien bestehen aus mehreren eng verwandten OR, die die gefundenen

ähnlichen Ligandenspektren einiger Glomeruli innerhalb dieser Domäne erklären könnten. Auch für die Domäne der zyklischen Verbindungen lässt sich ähnlich argumentieren. M72, ein OR aus der Domäne zyklischer Verbindungen, gehört zur OR-Familie 171 (nach (Zhang and Firestein, 2002) einer der größten OR-Familien überhaupt (31 funktionale Mitglieder). Die OR-Familie 171 wird in mehrere Subfamilien unterteilt (siehe Fig. 29B), wobei im Southern Blot oder in *in situ* Hybridisierungen eine M71 Sonde nur mit M72 ORN kreuzhybridisiert, also nur M71 und M72 erkennt (Feinstein and Mombaerts, 2004; Godfrey et al., 2004; Zhang and Firestein, 2002). Möglicherweise repräsentiert daher die OR-Familie die Domäne der zyklischen Verbindungen, wobei die Heterogenität der Familie (nur wenige OR mit direkt verwandten Familienmitgliedern) die gefundene funktionale Heterogenität (die Anzahl der Glomeruli mit deutlich überlappenden Ligandenspektren ist kleiner als in der Aldehyd-Domäne) innerhalb der Domäne widerspiegeln könnte. Zusammengefasst deuten physiologische, genetische und morphologische Beobachtungen darauf hin, dass die funktional beschriebenen Domänen aus Glomeruli mit OR einer OR-Familie bestehen (vergleiche Igarashi and Mori, 2004; Takahashi et al., 2004a; Uchida et al., 2000).

Vergleiche der Aktivitätsmuster zwischen verschiedenen Individuen konnten das Ausmaß der Variabilität in der Lage einzelner Glomeruli beschreiben. Insgesamt wurde die Lage von 12 verschiedenen Glomeruli, die interindividuell aufgrund des Antwortspektrums identifiziert werden konnten, näher untersucht. Die Lage aller 12 Glomeruli erschien interindividuell relativ stereotyp mit einer Varianz von maximal drei Glomerulidurchmesser. Detaillierte morphologische Untersuchungen wurden an manchen Glomeruli durchgeführt und zeigen, dass die Region, in der ein Glomerulus liegen kann, maximal 20 bis 30 Glomeruli beinhaltet (Royal and Key, 1999; Schaefer et al., 2001; Strotmann et al., 2000). Es ist daher denkbar, dass nicht die Lage eines Glomerulus, sondern vielmehr seine Domäne beziehungsweise Subdomäne stereotyp festgelegt ist. Zu dieser These passen auch die Ergebnisse aus den sogenannten OR-Austausch Experimenten. In diesen Experimenten wurde ein OR unter die transkriptionale Kontrolle eines anderen OR gestellt. In den meisten Fällen liegt der Glomerulus des Donor-OR in der Umgebung des Glomerulus des Akzeptor-OR (Feinstein et al., 2004; Feinstein and Mombaerts, 2004; Mombaerts et al., 1996a; Wang et al., 1998). Lediglich in drei Ausnahmen terminieren die ORN des Akzeptor-OR im Glomerulus des Donor-OR selber (Feinstein and Mombaerts, 2004). Zwei der drei Ausnahmen sind M71 ausgetauscht mit M72 und umgekehrt. Dem OR kommt also nur teilweise eine instruktive Rolle für die stereotype Ausbildung der Lage einzelner Glomeruli zu, möglicherweise ist er aber an der Lage der Domäne maßgebend beteiligt. Das Problem, im Bulbus etwa 1000 Positionen für die etwa 1000 Glomeruli zu definieren, wäre somit auf das Problem beschränkt, nur die Position der Domänen festlegen zu müssen. Die Position eines Glomerulus innerhalb der Domäne

müsste nicht stereotyp festgelegt sein. Domänen wären demnach evolutionär durch die Duplikation einzelner OR mitsamt den zugehörigen, zielgebenden Steuermechanismen entstanden. Einmal entwickelt könnten die Domänen gewisse Eigenschaften wie die grob chemotope Kodierung erhalten haben. Weder die Kodierungsprinzipien noch die weiteren Verarbeitungsschritte, sondern Mechanismen der axonalen Zielfindung wären der primäre Grund für die Domänen.

4.2 Der dynamische Funktionsbereich von ORN

In Messungen mit unterschiedlichen Verdünnungen einzelner Geruchsstoffe konnte der dynamische Funktionsbereich der ORN untersucht werden. Die Mehrzahl der untersuchten Glomeruli, beziehungsweise ORN zeigten Funktionsbereiche größer als eine log Einheit (vergleiche auch (Bozza et al., 2004; Friedrich and Korsching, 1997; Johnson and Leon, 2000b; Meister and Bonhoeffer, 2001; Sachse and Galizia, 2003; Wachowiak and Cohen, 2001; Wachowiak et al., 2000) und die Dosis-Wirkungs-Kurven folgten einer einfachen Rezeptor-Ligand Bindungsfunktion. Im Unterschied zu einer Studie (Meister and Bonhoeffer, 2001) zeigten die Experimente in dieser und anderen Arbeiten für verschiedene ORN-Typen unterschiedliche Steigungen der Dosis-Wirkungs-Kurven (Bozza et al., 2004; Sachse and Galizia, 2003; Wachowiak and Cohen, 2001). Tatsächlich konnte sogar innerhalb eines ORN-Typs unterschiedliche Steigungen für verschiedene Geruchsstoffe gefunden werden (vergleiche Wachowiak and Cohen, 2001). Dieses Resultat steht im Kontrast zu den gefundenen parallelen Steigungen der Dosis-Wirkungs-Kurve aus Messungen an einzelnen ORN (Firestein and Zufall, 1993; Trotier, 1994). Möglicherweise beruht dieser Effekt auf einem unterschiedlichen Wirkungsgrad den die Geruchsstoffe in der OR-Aktivierung aufweisen (Araneda et al., 2000; Jasper and Insel, 1992). Alternativ könnte auch ein unterschiedlicher Zugang der Geruchsstoffe zu den ORN *in vivo*, z.B. durch unterschiedliche Löslichkeit der Geruchsstoffe im Mucus des olfaktorischen Epithels obigen Effekt erklären (Kent et al., 1996).

In dem Vergleich vieler K_D -Werte aus Dosis-Wirkungs-Kurven unterschiedlicher ORN-Typen mit den zugehörigen maximalen Fluoreszenzänderungen konnte ein interessantes Phänomen beobachtet werden. Sehr sensitive ORN-Typen hatten immer nur kleine bis mittelgroße maximale Fluoreszenzänderungen. Nicht besonders sensitive ORN-Typen konnten hingegen sehr große Fluoreszenzänderungen aufweisen. Dieses Phänomen ist in der Literatur meines Wissens noch nicht beschrieben worden. Es ist nicht völlig auszuschließen, dass dieses Phänomen auf einem unverstandenen Artefakt

basieren könnte, obwohl es schwer vorstellbar ist, wie bei der generell guten Korrelation von tatsächlichen neuronalen Antworten und den durch die hier verwendete Methode gemessenen Antworten (Friedrich and Korsching, 1997; Wachowiak and Cohen, 2001; Wachowiak et al., 2004) ein Artefakt spezifisch nur dieses Phänomen verursachen könnte. In der einzigen Studie, die mit derselben Methode wie sie hier verwendet wurde unterschiedliche Geruchsstoffkonzentrationen in der Maus untersuchte, konnten von 6 untersuchten Glomeruli ebenfalls die sensitivsten nicht die größten Fluoreszenzänderungen hervorrufen (Wachowiak and Cohen, 2001). Daher soll im Folgenden eine funktionale Erklärung des Phänomens versucht werden: Wenn alle OR die gleiche maximale Fluoreszenzintensität hätten, und wenn die Selektivität der Gefundenen entsprechen würde, würden eng verwandte Geruchsstoffe bei hohen Konzentrationen tatsächlich die selben Aktivitätsmuster aufweisen. Mit anderen Worten, nur durch unterschiedliche maximale Fluoreszenzintensitäten sind die Aktivitätsmuster hoher Konzentrationen eng verwandter Geruchsstoffe in Form unterschiedlich gewichteter Glomeruli in den einzelnen Aktivitätsmustern zu unterscheiden. Durch die beiden OR-Gruppen (siehe 3.1.5 1. und 2. OR-Gruppe) könnte bei der gefundenen Selektivität der OR eine größere Anzahl unterschiedlicher Geruchsstoffe und ihre Konzentrationen voneinander unterschieden werden. Derartige Aktivitätsmusterunterschiede bei hohen und niedrigen Konzentrationen eines Geruchstoffes könnten die konzentrationsbedingten, qualitativen Unterschiede einiger Geruchsstoffe erklären. In psychophysikalischen Untersuchungen zeigen nur einige Geruchsstoffe markante konzentrationsbedingte Qualitätsunterschiede, die meisten tun dies jedoch nicht (Gross-Isseroff, 1988; Ohloff, 1990; Pelz et al., 1997). Möglicherweise entsteht die konzentrationsunabhängige Repräsentation von Geruchsstoffen erst auf einer zentraleren Verarbeitungsebene, nachdem die Eingangsinformation der ORN durch Prozessierungsschritte modifiziert wurde.

Die Wahrnehmungsschwelle der Geruchsstoffe lag in dieser Arbeit in etwa zwischen einer 1/100 und 1/1000 Verdünnung der Geruchsstoffe (z.B.: für Hexanal), die in der Duftstoffkammer des Olfaktometers erst bei dem Erreichen des gesättigten Dampfdruckes als Stimuli verwendet wurden. Mit der Formel von Hass und Newton (siehe Material und Methoden) errechnete sich demnach die Wahrnehmungsschwelle auf 3,5ppm bis 0,35ppm. Da die tatsächliche Konzentration des Geruchstoffes vor der Maus geschätzte 10 bis 100 mal niedriger war, entsprechen die gefundenen Schwellenwerte in etwa den Angaben aus der Literatur (in der Ratte psychophysikalisch ermittelt für Heptanol 0,01ppm und für Propanol 5ppm, (Passe and Walker, 1985). Nach Cometto-Muniz (Cometto-Muniz et al., 2003), der die Geruchsstoffkonzentration über einer in Mineralöl verdünnten Lösung direkt bestimmt hat, hatte die 1/100 und 1/1000 Verdünnung von Hexanal eine Konzentration von etwa 100ppm bis 1000ppm in den

Duftstoffkammern des verwendeten Olfaktometers. Die gefundene Wahrnehmungsschwelle wäre also entsprechend etwa 1 bis 3 log Einheiten unempfindlicher als die psychophysikalisch ermittelte (geschätzte 1ppm bis 100ppm vor der Nase der Maus zu etwa 0,1ppm als grober Mittelwert zwischen der psychophysikalisch ermittelten Wahrnehmungsschwelle von Pentanal 5ppm und Heptanal 0,01ppm). Da aber in allen Experimenten der unverdünnte Stimulus verglichen mit dem 1/10 verdünnten Stimulus in vielen Glomeruli eine größere Fluoreszenzänderung hervorzurufen vermochte, Cometto-Muniz jedoch keinen Unterschied in der Konzentration zwischen diesen beiden Verdünnungen messen konnte, befanden sich die hier gemessenen Wahrnehmungsschwellen wohl eher in der Nähe der psychophysikalisch bestimmten Schwellenwerte als 1 bis 3 log Einheiten entfernt.

4.3 Vergleich mit anderen Methoden der bildgebenden Ableitung in Zellpopulationen des olfaktorischen Bulbus

Mehrere Methoden wurden bis heute verwendet, um im olfaktorischen Bulbus nicht nur an einer oder wenigen Zellen gleichzeitig eine neuronale Aktivität ableiten zu können. Zu ihnen zählen die aktivitätsabhängige Aufnahme von radioaktiv markierter 2-Deoxyglukose (Guthrie and Gall, 2003; Johnson and Leon, 2000a; Johnson and Leon, 2000b; Johnson et al., 1999; Johnson et al., 1998; Linster et al., 2001; Royet et al., 1987), die Visualisierung der c-fos Aktivität (Ginty, 1997; Guthrie et al., 1993), die funktionale Magnetoencephalographie (Xu et al., 2003), die Positron-Emissions-Tomographie (Zald and Pardo, 2000), die Visualisierung intrinsischer optischer Signale (Belluscio et al., 2002; Grinvald et al., 1986; Igarashi and Mori, 2004; Meister and Bonhoeffer, 2001; Rubin and Katz, 1999; Rubin and Katz, 2001; Takahashi et al., 2004a; Takahashi et al., 2004b; Uchida et al., 2000), sowie auf Fluoreszenzfarbstoffen basierende Aktivitätsableitungen (Cinelli et al., 1995a; Cinelli and Kauer, 1995; Cinelli et al., 1995b; Friedrich and Korsching, 1997; Friedrich and Korsching, 1998; Wachowiak and Cohen, 1999; Wachowiak and Cohen, 2001; Wachowiak et al., 2004; Wachowiak et al., 2000), die teilweise sogar genetisch kodiert werden können (Bozza et al., 2004). Alle diese Methoden variieren in der zeitlich-räumlichen Auflösung, der Direktheit, mit der das gemessene Signal die neuronale Aktivität widerspiegelt, der oder den Zellpopulationen, von denen abgeleitet wird und der Wiederholbarkeit einer Messung (zusammengefasst bei Korsching, 2001). Von allen Methoden erscheint die Messung intrinsischer optischer Signale der hier verwendeten Methode in der Auflösung und der Wiederholbarkeit der Messungen

am nächsten zu kommen. Im Folgenden wird daher weiter auf den Vergleich dieser Beiden Methoden eingegangen.

Einige Ergebnisse dieser Arbeit unterscheiden sich von den aus den intrinsischen optischen Signalen gewonnenen Resultaten. Der wohl eindeutigste Unterschied lag in der Anzahl an - bei gleichem Geruchsstoff und Konzentration gemessenen - antwortenden Glomeruli. Beispielsweise antworten bei Belluscio auf einen 1%-2%ige aliphatischen Aldehydstimulus im Mittel nur 4 bis 6 Glomeruli in dem optisch ableitbaren dorsalen Gebiet des Bulbus (Belluscio et al., 2002; Rubin and Katz, 1999), während in dieser und in einer weiteren Arbeit mit Calcium-Green als Aktivitätsindikator etwa 10 bis 20 Glomeruli auf einen derartigen Stimulus antworten (Wachowiak and Cohen, 2001). Ebenfalls ist bei Takahashi Cyclohexanon im dorsalen Bulbus nur ein mäßig guter Stimulus um aktivierte Glomeruli zu identifizieren, hier konnte unter denselben Bedingungen aber eine ganze Reihe gut aktivierter Glomeruli abgeleitet werden (Takahashi et al., 2004a). Der Unterschied in der Anzahl aktivierter Glomeruli könnte durch ein besseres Verhältnis von Signal zu Hintergrundrauschen erklärt werden. Darüber hinaus könnte auch ein höher gewählter Schwellenwert die kleineren Antworten in den Ableitungen intrinsischer optischer Signal erklären. Bei Meister konnte aber gezeigt werden, dass ein Hochpassfilter die abgeleiteten Signale nicht signifikant reduzierte (Meister and Bonhoeffer, 2001). Der Unterschied in der Signalprozessierung in den beiden Methoden erscheint daher nicht ursächlich für die geringere Anzahl an antwortenden Glomeruli zu sein.

Neben den beobachteten quantitativen Unterschieden der intrinsischen optischen Signale verglichen mit den Calcium-abhängigen Signalen dieser Arbeit, konnten auch qualitative Unterschiede in den Aktivitätsmustern ausgemacht werden. Die Calcium-abhängigen Aktivitätsmuster erschienen in der Regel aus etwas mehr und verstreuter liegenden Glomeruli zu bestehen, und einzelne aktivierte Glomeruli zeigten, wie schon oben diskutiert, zum Teil deutlich unterschiedliche Dosis-Wirkungskurven. Ableitungen intrinsischer optischer Signale konnten nur das Rekrutieren von Glomeruli durch eine erhöhte Geruchsstoffkonzentration, nicht die qualitativen Unterschiede der Aktivitätsmuster verschiedener Stimuluskonzentrationen demonstrieren (Meister and Bonhoeffer, 2001; Rubin and Katz, 1999). Nur teilweise können diese Unterschiede durch das schlechtere Verhältnis von Signal zu Hintergrundrauschen erklärt werden. Vielmehr erscheint die Addition verschiedener Aktivitäten in den Ableitungen intrinsischer optischer Signale für die gefundenen Unterschiede denkbar. Intrinsische optische Signale entstehen durch aktivitätsbedingte Änderungen der Deoxyhämoglobinkonzentration, des Blutvolumens, sowie des Blutdurchflusses (Malonek and Grinvald, 1997; Vanzetta and Grinvald, 1999), so dass die abgeleiteten Aktivitätsmuster die neuronale Aktivität aller Zellen des Bulbus repräsentieren (Laughlin, 2001). Darüber hinaus bestanden die hier vorgestellten

Aktivitätsmuster aus der Amplitudenspitze der Signale (0,5s bis 2s), nicht wie bei den intrinsischen optischen Signalen aus der gemittelten 8s bis 10s dauernden Antwort (z.B.: Igarashi and Mori, 2004; Rubin and Katz, 1999; Takahashi et al., 2004a). Während dieser 8s bis 10s könnte eine deutliche Modifikation des ORN Inputs durch interneuronale Netzwerke stattgefunden haben (z.B.: Aungst et al., 2003). Daher sollten die Calcium-abhängigen Signale, nicht aber die Signale der intrinsischen optischen Aktivität geeignet sein, um selektiv auf die Aktivität der ORN, und somit auch auf die den ORN zugrundeliegenden OR, zurückzuschließen.

4.3.1 Die neuronale Aktivität der ORN

Das selektive Anfärben der ORN mit einem Calcium-sensitiven Farbstoff erlaubte die Analyse der ORN auf der Ebene von Glomeruli. Auf dieser Ebene waren die Eigenschaften der neuronalen Antworten zum Beispiel in dem dynamischen Funktionsbereich, oder der Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurven zu Ergebnissen aus Messungen einzelner ORN unterschiedlich (Firestein and Zufall, 1993; Reister and Matthews, 2001; Trotier, 1994). Die Messungen einzelner ORN können nur begrenzt die gemeinsamen Eigenschaften einer Population aus ORN-Typen beschreiben (siehe aber Bozza et al., 2002). Sie repräsentieren Einzelwerte, die zu den über viele tausend ORN eines Typs gemittelten Ergebnisse der Calcium-abhängigen Messungen in Glomeruli variieren können. Darüber hinaus kann die Konvergenz der ORN in Glomeruli nicht nur eine einfache Bündelung der im Epithel verstreut liegenden ORN bedeuten. Eine präsynaptische Inhibition der Transmitterfreisetzung könnte auch durch interneuronale Netzwerke, die auf ORN-Terminalien zurückprojizieren, erzeugt werden (Aroniadou-Anderjaska et al., 2000; Hsia et al., 1999; Wachowiak and Cohen, 1999). Die präsynaptische Inhibition würde bereits in die über 0,5s bis 2s gemittelten Antwortspitzen der Calcium-abhängigen Signale einfließen und Unterschiede zu Einzelmessungen an ORN bedingen können.

4.4 Die Antworten des M72 Glomerulus

Prinzipiell sollte es möglich sein, die Methode des Calcium-abhängigen optischen Ableiten neuronaler Aktivitäten in genetisch markierten Glomeruli durchzuführen und so Liganden-OR Paare zu finden. In einer Studie ist dies an einem genetisch markierten Ratten I7 Glomerulus in der Maus, jedoch durch die Ableitung intrinsischer optischer Signale gelungen (Belluscio et al., 2002). Erstaunlicherweise antwortete in dieser Untersuchung nur der genetisch markierte

Glomerulus auf Octanal, dem beschriebenen Ligand des Ratten I7 OR, nicht jedoch die anderen dorsal gelegenen Glomeruli, die durch einen Octanalstimulus normalerweise auch mit dieser Methode aktiviert werden können (Meister and Bonhoeffer, 2001; Rubin and Katz, 1999; Takahashi et al., 2004a). Ein Vergleich beispielsweise der Antwort eines bekanntermaßen guten Octanalrezeptors mit der Antwort der anderen OR, die auf Octanal antworten war daher nicht möglich. In dieser Promotion wurde ebenfalls an Mäusen mit genetisch markierten Glomeruli, dem Ratten I7 Glomerulus (Bozza et al., 2002) und dem M72 Glomerulus (Potter et al., 2001), optisch abgeleitet. Weder im Ratten I7 noch im M72 Glomerulus konnten eindeutige Ergebnisse erzielt werden.

In optischen Ableitungen an Ratten I7 Mäusen konnte, obwohl immer auch mit n-Octanal stimuliert wurde, nur in einem Tier eine Antwort im I7 Glomerulus gemessen werden. Da in diesem Fall aber das gefundene Ligandenspektrum nicht zu dem gut beschriebenen Ligandenspektrum des Ratten I7 OR passte (Araneda et al., 2000; Krautwurst et al., 1998; Singer, 2000; Zhao et al., 1998), könnte die gemessene Antwort eher von einem Glomerulus, der an derselben Stelle im Bulbus, oberhalb oder unterhalb des I7 Glomerulus, lag, ausgegangen sein. Im Unterschied dazu war in zwei Tieren das Ligandenspektrum des genetisch markierten M72 Glomerulus ähnlich. In beiden Tieren antwortete M72 auf Cyclohexanon und insgesamt (Mittelwert aus beiden Tieren) schwächer auf Benzaldehyd, Acetophenon und Nitrobenzol. Da die Überlagerung des M72 Glomerulus mit einem zweiten, jeweils gleichen Glomerulus jedoch unwahrscheinlich erscheint, sollte die Antwort aus dem M72 Glomerulus selber stammen. Als Grund für die nur selten gelungene Ableitung aus dem M72 Glomerulus konnte die Überstrahlung des Calcium-Signals durch das eGFP-Signal, dem genetischen Marker, durch die Verwendung einer geeigneten Filterkombination nahezu ausgeschlossen werden. Da einmal in einem heterozygoten und einmal in einem homozygoten M72 Tier ein Calcium-Signal im M72 Glomerulus abgeleitet wurde, konnte die Bedeutung von Tau, einem Teil der Strategie zur genetischen Markierung des M72 Glomerulus (Bozza et al., 2002), für die schlechte Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes und der dadurch möglicherweise bedingten, geringen Effizienz der Ableitung aus dem M72 Glomerulus (Ebner et al., 1998; Grundke-Iqbal and Iqbal, 1999; Probst et al., 2000; Wang et al., 2004), ebenfalls eingeschränkt werden. Wegen der seltenen funktionalen Calcium-Green Färbung in heterozygoten M72 Tieren, in denen ein M72 Glomerulus erkannt wurde, konnte die möglicherweise bessere, oder öfter zu erhaltende Ableitung neuronaler Aktivitäten im M72 Glomerulus von heterozygoten Tieren nicht eindeutig geklärt werden. Der störende Einfluss der Tau-Überexpression konnte also nicht vollständig ausgeschlossen werden. Alternativ könnte die schwache und seltene Antwort im M72 Glomerulus biologische Gründe haben. Möglicherweise waren die bisher verwendeten Geruchsstoffe für den M72

nur äußerst schlechte Liganden. Dafür sprächen auch die schwachen Antworten in M72 Einzelzellmessungen (Feinstein et al., 2004). Noch eine weitere biologische Erklärung wäre denkbar: In Dosis-Wirkungs-Kurven wurde eine ORN-Gruppe beschrieben, die insbesondere für Geruchsstoffe, auf die sie sehr empfindlich reagiert nur mit mäßig starken Fluoreszenzänderungen antwortet. Es wäre daher ebenfalls denkbar, dass M72 ORN zu der Gruppe der, trotz idealen Liganden, nur mäßig stark antwortenden ORN gehören. Dies wäre in Übereinstimmung mit den Ergebnissen für die postulierten M71 Glomeruli zu bringen. Die ebenfalls in der M72 Region liegenden postulierten M71 Glomeruli (Potter et al., 2001) konnten auch mit Acetophenon, dem beschriebenen guten Ligand des M71 OR (Bozza et al., 2002), nur zu mäßig starken Antworten erregt werden.

4.5 Anwendung der entwickelten Strategie zur aktivitätsabhängigen Markierung von Büschel- und Mitralzellen

Wie alle Sinnessysteme prozessiert auch das Geruchssystem die sensorische Information in mehreren Schritten. Um die Funktion, und somit auch die vollständige Bedeutung des Geruchssinnes zu erkennen, ist ein Verständnis der einzelnen Funktionsmechanismen auf den unterschiedlichen Prozessierungsebenen unumgänglich. Funktional schließt sich die Ebene der Mitralzellen an die Ebene der ORN an. Bis auf die Mechanismen, die durch die elektrophysiologischen Messungen in einzelnen Zellen beschrieben werden konnten, liegt die Kodierung der Geruchsinformation jedoch auf der Mitralzellebene weitgehend im Dunkeln (z.B.: Imamura et al., 1992; Katoh et al., 1993; Luo and Katz, 2001; Xiong and Chen, 2002; Yokoi et al., 1995). Für das weiterreichende Verständnis werden daher dringend Strategien benötigt, die die Analyse der neuronalen Aktivität auf dieser Zellpopulationsebene ermöglichen. Das in dieser Arbeit beschriebene Mausmodell könnte eine derartige Analyse der Mitralzellpopulation erlauben. Obwohl alle einzelnen Komponenten des Modells bekannt sind, wurden sie hier erstmals so eingesetzt, dass ebenfalls erstmals die aktivitätsabhängige Markierung einer ausschließlich im *Bulbus olfactorius* liegende Zellpopulation möglich scheint. Die dafür notwendigen transgenen Mauslinien konnten aber bisher noch nicht etabliert werden. Einige der möglichen Ursachen des Misslingens sollen im Folgenden erörtert werden.

4.5.1 Die einzelnen genetischen Elemente des Mausmodells

Das beschriebene Mausmodell basiert auf zwei transgenen Mauslinien, die miteinander gekreuzt werden müssen. In beiden Mauslinien müssen mehrere genetische Elemente in das Genom geschleust werden, um theoretisch eine zellpopulationspezifische und aktivitätsabhängige Markierung zu gewährleisten. Eine der beiden Mauslinien sollte unter dem Büschel- und Mitralzellpromotor des T-bet Gens (Szabo et al., 2000; Zhang and Yang, 2000) die zelltypspezifische Expression der Bakteriophagenrekombinase Cre (z.B.: Sauer and Henderson, 1988) über eine bizistronische mRNA ermöglichen. Die Translation des zweiten Proteins auf der bizistronischen mRNA (hier Cre) sollte durch die Verwendung der viralen "internalen ribosomalen entry site" (IRES) bewirkt werden (zusammengefasst z.B. bei Van der Velden, 1999). In der zweiten Mauslinie sollte durch die Cre induzierte Entfernung einer transkriptionalen Stop-Kassette nur in Büschel- und Mitralzellen die aktivitätsbedingte Transkription von c-fos zur Expression des für nur kurze Zeit stabilen Markerproteins d2-eYFP führen (siehe Promotion von Sunil Kumar). Alle verwendeten genetischen Elemente sind in anderen Zusammenhängen in der Maus bereits erfolgreich beschrieben worden [z.B.: IRES (Kim et al., 1992); Cre (Feil et al., 1996; Kellendonk et al., 1996); die c-fos gesteuerte Expression eines neuronalen Aktivitätsmarkers (Schilling et al., 1991; Smeyne et al., 1992); Stop-Kassette (Lakso et al., 1992); Destabilisierungselement d2 (Li et al., 1998); eYFP (Feng et al., 2000)]. Auch die Kombination von IRES und Cre wurde in verschiedenen Mausmodellen mit guter Cre Expression erfolgreich durchgeführt (z.B.: Gorski and Jones, 1999; Michael et al., 1999). Es gibt daher keinen Grund zur Annahme, T-bet könnte die Cre Expression durch die IRES-Cre-Kassette nicht unterstützen. Die Diskussion der zumindest theoretischen Funktionalität einer aktivitätsabhängigen und Cre induzierten eYFP Expression in der zweiten Mauslinie soll hier nicht geführt werden. Sie findet sich in der Promotion von Sunil Kumar (Institut für Genetik, Universität zu Köln).Zumindest theoretisch sollte daher das Mausmodell geeignete Ergebnisse liefern können.

In der hier vorgestellten Arbeit wurde versucht, eine transgene Mauslinie, die zellspezifisch die Rekombinase Cre exprimieren sollte, zu etablieren. Hierfür wurden das T-bet Gen, und die IRES-Cre-Kassette verwendet. Durch eine *in situ* Hybridisierung konnte die büschel- und mitralzellspezifische Expression von T-bet gezeigt werden, die genauso auch in einer weiteren unabhängigen Studie gefunden wurde (Faedo et al., 2002).

4.5.2 *Verwendete Methoden zur Etablierung der transgenen Mauslinie*

Wenn ein geeigneter Promotor noch nicht beschrieben wurde, ein bestimmtes Protein aber die passende Verteilung der Expression zeigt, kommen prinzipiell für die Erzeugung einer zellspezifischen Cre-exprimierenden Mauslinie zwei unterschiedliche Methoden in Frage. Zum einen die auf embryonalen Stammzellen basierende klassische Gentergeting-Methode (Hogan et al., 1986) und zum Anderen die auf der homologen Rekombination in bakteriellen artifiziellen Chromosomen (BAC) beruhende Integration des BACs in das Genom potentieller Foundermäuse (Yang et al., 1997). T-bet ist ein Transkriptionsfaktor der T-Box Genfamilie (zusammengefasst bei Papaioannou and Silver, 1998). Seine eigenen transkriptionalen Kontrollelemente könnten, wie bei anderen Transkriptionsfaktoren, aus DNA-Sequenzen in den Introns bestehen (Robertson et al., 1995; Wisdon and Verma, 1993). Das komplette T-bet Gen sollte daher intakt gelassen werden, wie es durch die Verwendung der IRES-Cre-Kassette ermöglicht wird. Die Verwendung von IRES bedingt jedoch zumeist eine schwächere Expression des nach dem IRES gelegenen Gens verglichen mit dem vor dem IRES gelegenen Gen (Mombaerts et al., 1996a). BACs integrieren oft in multiplen, hintereinander gelegenen Kopien in das Genom von Mäusen, und können so teilweise von schwachen Promotoren eine mittelmäßig bis starke Expression des nachgeschalteten Gens ermöglichen (Bradley and Liu, 1996; Vassalli et al., 2002; Yang et al., 1997), und so möglicherweise sogar trotz des IRES-Elements eine für die Funktion ausreichend starke Cre-Expression ermöglichen. Da T-bet im olfaktorischen Bulbus nicht zu den stark exprimierten Genen zählt (Faedo et al., 2002), und das IRES-Element notwendig war, wurde die BAC-Methode gewählt.

Für die homologe Rekombination wurde ein BAC Klon aus einer geeigneten BAC-Bibliothek gewählt, der 140kb 5' und 60kb 3' benachbarte genomische Sequenzen des T-bet Gen besaß (insgesamt etwa 220kb). Alle transkriptionalen Kontrollelemente sollten mit hoher Wahrscheinlichkeit auf diesem BAC liegen. Die Rekombination selber wurde exakt nach dem Protokoll von Heinz durchgeführt (Yang et al., 1997). Der erste Schritt der Rekombination erfolgte mit 27% Effizienz sogar besser als beschrieben (10%). Der zweite Rekombinationsschritt wies eine zu den Literaturwerten ähnliche Effizienz auf (hier 4%, bei Yang 5%). Wenn man von der durch Cre im Insert und den loxP-Sequenzen des BAC-Vektors bedingten herabgesetzten Frequenz absieht, mit der richtige Rekombinanten des 2.Schritts auftraten, könnte auch der 2.Rekombinationsschritt im Prinzip eine höhere Effizienz als bei Heinz beschrieben aufweisen. Möglicherweise waren die Homologiearme für die hier durchgeführte Rekombination besser geeignet, als die von Yang verwendeten. Auch die Aufreinigung des rekombinierten BACs wurde, wie beschrieben, erfolgreich durchgeführt (Yang et al., 1997). Ob der hierfür verwendete kommerziell erworbene Kit, und/oder die zum Teil zusätzlich durchgeführte

Säulenaufreinigung für die Oozyten Injektion immer eine ausreichende Qualität garantiert (Thomas Winkler persönliche Kommunikation), konnte nicht eindeutig gezeigt werden.

Nach der Oozyteninjektion wurden insgesamt 139 Mäuse auf die Präsenz des BAC-Inserts überprüft. Davon waren 96 Mäuse aus der Injektion mit linearisierter modifizierter BAC-DNA und 43 Mäuse aus der Injektion mit zirkulärer modifizierter BAC-DNA. Die Injektion von linearisierten BACs konnte keine einzige potentielle Foundermaus erzeugen. In den Mäusen aus dem zirkulären BAC-Injektionsexperiment konnte nur eine einzige Maus als potentielle Foundermaus durch die genomische PCR und den genomischen Southern Blot identifiziert werden, die jedoch in Rückkreuzungen den modifizierten BAC nicht vererbte. Es ist häufiger beschrieben worden, dass nur eine potentielle Foundermaus nicht für die Etablierung einer transgenen Mauslinie ausreicht (siehe z.B.: Hogan et al., 1986), und soll daher hier nicht weiter diskutiert werden. Die Möglichkeit der, auf einem Artefakt beruhenden, Fehleinschätzung der potentiellen Foundermaus konnte ebenfalls nicht vollständig ausgeschlossen werden. Trotz der teilweise guten Qualität der Southern Blots, mit eindeutiger Kontrollbande, konnte die Präsenz des BAC-Inserts nur durch die genomische PCR eindeutig belegt werden. Die beobachtete Banden im Southern Blot waren immer nur sehr schwach. Die Effizienz der Erzeugung einer transgenen BAC-Mauslinie ist daher <1%. Man würde durch die hier verwendete Methode aber etwa 10% potentielle Foundermäuse erwarten (Yang et al., 1997). Darüber hinaus ist der gute Erfolg der Methode durch die Erzeugung von vielen BAC transgenen Mäusen für einen Genexpressionsatlas des Gehirns belegt (Gong et al., 2003).

Welche Erklärungen können, neben den bisher gegebenen methodischen Fehlerquellen für die großen Schwierigkeiten in der Etablierung einer transgenen Mauslinie gefunden werden? Zunächst einmal ist die ausreichende Qualität der für die Oozyteninjektion aufgereinigten BAC-DNA nicht eindeutig bewiesen. Die verwendete Methode sollte aber generell zum Erfolg führen können (Yang et al., 1997), und wurde hier bestmöglichst angewendet. Die fehlenden potentiellen Foundermäuse sollten daher, wenn überhaupt, nur teilweise durch die geringe Qualität der zu injizierenden BAC-DNA erklärt werden können. Eine weitere triviale Erklärung des Misserfolges wäre die Unerfahrenheit des Injektionslabores (Dr. Niel Smyth, Zentrum für Molekulare Medizin, Universität zu Köln) in der Injektion von BAC-DNA. Da das Injektionslabor im Allgemeinen aber eine gute Erfolgsquote aufweisen kann, verschiedene Bedingungen für die Injektion ausgetestet hat (z.B.: mit und ohne Spermidin im Injektionspuffer) und für die Optimierung der Injektion sich von in BAX-Technologie erfahrenen Gruppen hat beraten lassen, scheint auch diese Erklärung unwahrscheinlich. Schließlich ist seit kurzem bekannt, dass sehr große BACs (>200kb) nur eine geringe Erfolgswahrscheinlichkeit aufweisen (Gong et al., 2003). Gong konnte nur in Ausnahmefällen eine transgene BAC-Mauslinie

aus derartig großen BACs etablieren. In unserem Labor ist die Erzeugung noch einer weiteren transgenen BAC-Mauslinie aus einem ebenfalls etwa 200kb großen BAC ähnlich mit Problemen behaftet (siehe Sunil Kumar). Der beschriebene Misserfolg in der Etablierung einer transgenen BAC-Mauslinie könnte daher durchaus auf die Größe des verwendeten BACs zurückzuführen sein. Wenn es gelingt die technischen Schwierigkeiten auszuräumen, eröffnet der "genetische Ansatz" weitreichende Möglichkeiten, neuronale Netzwerke *in situ* gezielt zu analysieren.

5. Literatur

- Araneda, R. C., Kini, A. D., and Firestein, S. (2000). The molecular receptive range of an odorant receptor, *Nat Neurosci* 3, 1248-55, Dec.
- Aroniadou-Anderjaska, V., Zhou, F. M., Priest, C. A., Ennis, M., and Shipley, M. T. (2000). Tonic and synaptically evoked presynaptic inhibition of sensory input to the rat olfactory bulb via GABA(B) heteroreceptors, *J Neurophysiol* 84, 1194-203, Sep.
- Aungst, J. L., Heyward, P. M., Puche, A. C., Karnup, S. V., Hayar, A., Szabo, G., and Shipley, M. T. (2003). Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli, *Nature* 426, 623-9, Dec 11.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool, *J Mol Biol* 215, 403-10.
- Bakalyar, H. A., and Reed, R. R. (1990). Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection, *Science* 250, 1403-6, Dec 7.
- Bargmann, C. I., and Kaplan, J. M. (1998). Signal transduction in the *Caenorhabditis elegans* nervous system, *Annu Rev Neurosci* 21, 279-308.
- Barth, A. L., Justice, N. J., and Ngai, J. (1996). Asynchronous onset of odorant receptor expression in the developing zebrafish olfactory system, *Neuron* 16, 23-34, Jan.
- Belluscio, L., Gold, G. H., Nemes, A., and Axel, R. (1998). Mice deficient in G(olf) are anosmic, *Neuron* 20, 69-81, Jan.
- Belluscio, L., Lodovichi, C., Feinstein, P., Mombaerts, P., and Katz, L. C. (2002). Odorant receptors instruct functional circuitry in the mouse olfactory bulb, *Nature* 419, 296-300, Sep 19.
- Berkova, Z., Morris, A. P., and Estes, M. K. (2003). Cytoplasmic calcium measurement in rotavirus enterotoxin-enhanced green fluorescent protein (NSP4-EGFP) expressing cells loaded with Fura-2, *Cell Calcium* 34, 55-68, Jul.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23, Nov 24.
- Blatter, L. A., and Wier, W. G. (1990). Intracellular diffusion, binding, and compartmentalization of the fluorescent calcium indicators indo-1 and fura-2, *Biophys J* 58, 1491-9, Dec.

-
- Boekhoff, I., Tareilus, E., Strotmann, J., and Breer, H. (1990). Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants, *Embo J* 9, 2453-8, Aug.
- Bolsover, S., Ibrahim, O., O'Lunaigh, N., Williams, H., and Cockcroft, S. (2001). Use of fluorescent Ca²⁺ dyes with green fluorescent protein and its variants: problems and solutions, *Biochem J* 356, 345-52, Jun 1.
- Bozza, T., Feinstein, P., Zheng, C., and Mombaerts, P. (2002). Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system, *J Neurosci* 22, 3033-43, Apr 15.
- Bozza, T., McGann, J. P., Mombaerts, P., and Wachowiak, M. (2004). In Vivo Imaging of Neuronal Activity by Targeted Expression of a Genetically Encoded Probe in the Mouse, *Neuron* 42, 9-21.
- Bradley, A., and Liu, P. (1996). Target practice in transgenics, *Nat Genet* 14, 121-3, Oct.
- Brunet, L. J., Gold, G. H., and Ngai, J. (1996). General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel, *Neuron* 17, 681-93, Oct.
- Buck, L., and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition, *Cell* 65, 175-87, Apr 5.
- Buck, L. (1996). Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu Rev Neurosci* 19, 517-44.
- Bulfone, A., Smiga, S. M., Shimamura, K., Peterson, A., Puellas, L., and Rubenstein, J. L. (1995). T-brain-1: a homolog of Brachyury whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex, *Neuron* 15, 63-78, Jul.
- Bulfone, A., Wang, F., Hevner, R., Anderson, S., Cutforth, T., Chen, S., Meneses, J., Pedersen, R., Axel, R., and Rubenstein, J. L. (1998). An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons, *Neuron* 21, 1273-82, Dec.
- Bulger, M., van Doorninck, J. H., Saitoh, N., Telling, A., Farrell, C., Bender, M. A., Felsenfeld, G., Axel, R., Groundine, M., van Doorninck, J. H. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5129-34.
- Chapman, D. L., and Papaioannou, V. E. (1998). Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene *Tbx6*, *Nature* 391, 695-7, Feb 12.
- Chaput, M. A., and Chalansonnet, M. (1997). Recording the slow potentials evoked by odors in the olfactory mucosa of awake animals, *J Neurosci Methods* 75, 193-8, Aug 22.

-
- Chen, W. R., Xiong, W., and Shepherd, G. M. (2000). Analysis of relations between NMDA receptors and GABA release at olfactory bulb reciprocal synapses, *Neuron* 25, 625-33, Mar.
- Chess, A., Simon, I., Cedar, H., and Axel, R. (1994). Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression, *Cell* 78, 823-34, Sep 9.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples, *Bio Techniques* 15, 532-37.
- Church, K. M., Wurdeman, R. L., Zhang, Y., Chen, F. X., and Gold, B. (1990). N-(2-chloroethyl)-N-nitrosoureas covalently bound to nonionic and monocationic lexitropsin dipeptides. Synthesis, DNA affinity binding characteristics, and reactions with ³²P-end-labeled DNA, *Biochemistry* 29, 6827-38, Jul 24.
- Cinelli, A. R., Hamilton, K. A., and Kauer, J. S. (1995a). Salamander olfactory bulb neuronal activity observed by video rate, voltage-sensitive dye imaging. III. Spatial and temporal properties of responses evoked by odorant stimulation, *J Neurophysiol* 73, 2053-71, May.
- Cinelli, A. R., and Kauer, J. S. (1995). Salamander olfactory bulb neuronal activity observed by video rate, voltage-sensitive dye imaging. II. Spatial and temporal properties of responses evoked by electric stimulation, *J Neurophysiol* 73, 2033-52, May.
- Cinelli, A. R., Neff, S. R., and Kauer, J. S. (1995b). Salamander olfactory bulb neuronal activity observed by video rate, voltage-sensitive dye imaging. I. Characterization of the recording system, *J Neurophysiol* 73, 2017-32, May.
- Clegg, R. M. (1995). Fluorescence resonance energy transfer, *Curr Opin Biotechnol* 6, 103-10, Feb.
- Cleland, T. A., Morse, A., Yue, E. L., and Linster, C. (2002). Behavioral models of odor similarity, *Behav Neurosci* 116, 222-31, Apr.
- Cometto-Muniz, J. E., Cain, W. S., and Abraham, M. H. (2003). Quantification of chemical vapors in chemosensory research, *Chem Senses* 28, 467-77, Jul.
- Conzelmann, S., Levai, O., Bode, B., Eisel, U., Raming, K., Breer, H., and Strotmann, J. (2000). A novel brain receptor is expressed in a distinct population of olfactory sensory neurons, *Eur J Neurosci* 12, 3926-34, Nov.
- Court, D. L., Sawitzke, J. A., and Thomason, L. C. (2002). Genetic engineering using homologous recombination, *Annu Rev Genet* 36, 361-88.
- Curran, T., and Franza, B. R., Jr. (1988). Fos and Jun: the AP-1 connection, *Cell* 55, 395-7, Nov 4.

-
- Cutforth, T., Moring, L., Mendelsohn, M., Nemes, A., Shah, N. M., Kim, M. M., Frisén, J., and Axel, R. (2003). Axonal ephrin-As and odorant receptors: Coordinate determination of the olfactory sensory map, *Cell* 114, 311-22, Aug 8.
- Czeh, G., Obih, J. C., and Somjen, G. G. (1988). The effect of changing extracellular potassium concentration on synaptic transmission in isolated spinal cords, *Brain Res* 446, 50-60, Apr 12.
- DeFalco, J., Tomishima, M., Liu, H., Zhao, C., Cai, X., Marth, J. D., Enquist, L., and Friedman, J. M. (2001). Virus-assisted mapping of neural inputs to a feeding center in the hypothalamus, *Science* 291, 2608-13, Mar 30.
- Ditzen, M., Evers, J. F., and Galizia, C. G. (2003). Odor similarity does not influence the time needed for odor processing, *Chem Senses* 28, 781-9, Nov.
- Doving, K. B., Selset, R., and Thommesen, G. (1980). Olfactory sensitivity to bile acids in salmonid fishes, *Acta Physiol Scand* 108, 123-31, Feb.
- Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, *Nucleic Acids Res* 16, 6127-45, Jul 11.
- Duchamp-Viret, P., Chaput, M. A., and Duchamp, A. (1999). Odor response properties of rat olfactory receptor neurons, *Science* 284, 2171-4, Jun 25.
- Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1998). Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease, *J Cell Biol* 143, 777-94, Nov 2.
- Faedo, A., Ficara, F., Ghiani, M., Aiuti, A., Rubenstein, J. L., and Bulfone, A. (2002). Developmental expression of the T-box transcription factor T-bet/Tbx21 during mouse embryogenesis, *Mech Dev* 116, 157-60, Aug.
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10887-90, Oct 1.
- Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I., Vassalli, A., and Mombaerts, P. (2004). Axon Guidance of Mouse Olfactory Sensory Neurons by Odorant Receptors and the Beta2 Adrenergic Receptor, *Cell* 117, 833-46.
- Feinstein, P., and Mombaerts, P. (2004). A Contextual Model for Axonal Sorting into Glomeruli in the Mouse Olfactory System, *Cell* 117, 817-31.
- Feinstein, P. G., Schrader, K. A., Bakalyar, H. A., Tang, W. J., Krupinski, J., Gilman, A. G., and Reed, R. R. (1991). Molecular cloning and characterization of a Ca²⁺/calmodulin-insensitive adenylyl cyclase from rat brain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10173-7, Nov 15.

-
- Feng, G., Mellor, R. H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q. T., Wallace, M., Nerbonne, J. M., Lichtman, J. W., and Sanes, J. R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP, *Neuron* 28, 41-51, Oct.
- Fiala, A., Spall, T., Diegelmann, S., Eisermann, B., Sachse, S., Devaud, J. M., Buchner, E., and Galizia, C. G. (2002). Genetically expressed cameleon in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons, *Curr Biol* 12, 1877-84, Oct 29.
- Firestein, S., and Zufall, F. (1993). Membrane currents and mechanisms of olfactory transduction, *Ciba Found Symp* 179, 115-26; discussion 126-30, 147-9.
- Fried, H. U (1999). Optische Messung neuronaler Aktivitäten im Bulbus olfactorius der Maus. Diplomarbeit im Fach Biologie der Universität zu Köln, unter Anleitung von Prof. Dr. Sigrun I. Korsching.
- Fried, H. U., Fuss, S. H., and Korsching, S. I. (2002). Selective Imaging of Presynaptic Activity in the Mouse Olfactory Bulb Shows Concentration and Structure Dependence of Odor Responses in Identified Glomeruli, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3222-7. Epub 2002 Feb 19.
- Friedrich, R. W., and Korsching, S. I. (1997). Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging, *Neuron* 18, 737-52, May.
- Friedrich, R. W., and Korsching, S. I. (1998). Chemotopic, combinatorial, and noncombinatorial odorant representations in the olfactory bulb revealed using a voltage-sensitive axon tracer, *J Neurosci* 18, 9977-88, Dec 1.
- Friedrich, R. W., and Laurent, G. (2001). Dynamic optimization of odor representations by slow temporal patterning of mitral cell activity, *Science* 291, 889-94, Feb 2.
- Friedrich, R. W., and Stopfer, M. (2001). Recent dynamics in olfactory population coding, *Cur Opin Neurobiol* 11, 468-74.
- Friedrich, R. W., and Laurent, G. (2004). Dynamics of olfactory bulb input and output activity during odor stimulation in zebrafish, *J Neurophysiol* 91, 2658-69, Jun.
- Friedrich, R. W., Habermann, C. J., and Laurent, G. (2004). Multiplexing using synchrony in the zebrafish olfactory bulb, *Nat Neurosci* 7, 862-71, Aug.
- Frings, S., Reuter, D., and Kleene, S. J. (2000). Neuronal Ca²⁺-activated Cl⁻ channels - homing in on an elusive channel species, *Prog Neurobiol* 60, 247-89.

-
- Fuss, S. H., and Korsching, S. I. (2001). Odorant feature detection: activity mapping of structure response relationships in the zebrafish olfactory bulb, *J Neurosci* 21, 8396-407, Nov 1.
- Gaillard, I., Rouquier, S., Pin, J. P., Mollard, P., Richard, S., Barnabe, C., Demaille, J., and Giorgi, D. (2002). A single olfactory receptor specifically binds a set of odorant molecules, *Eur J Neurosci* 15, 409-18, Feb.
- Gibson-Brown, J. J., S, I. A., Silver, L. M., and Papaioannou, V. E. (1998). Expression of T-box genes *Tbx2-Tbx5* during chick organogenesis, *Mech Dev* 74, 165-9, Jun.
- Ginty, D. D. (1997). Calcium regulation of gene expression: isn't that spatial?, *Neuron* 18, 183-6, Feb.
- Godfrey, P. A., Malnic, B., and Buck, L. B. (2004). The mouse olfactory receptor gene family, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2156-61, Feb 17.
- Gogos, J. A., Osborne, J., Nemes, A., Mendelsohn, M., and Axel, R. (2000). Genetic ablation and restoration of the olfactory topographic map, *Cell* 103, 609-20, Nov 10.
- Gong, S., Zheng, C., Doughty, M. L., Losos, K., Didkovsky, N., Schambra, U. B., Nowak, N. J., Joyner, A., Leblanc, G., Hatten, M. E., and Heintz, N. (2003). A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes, *Nature* 425, 917-25, Oct 30.
- Gorski, J. A., and Jones, K. R. (1999). Efficient bicistronic expression of cre in mammalian cells, *Nucleic Acids Res* 27, 2059-61, May 1.
- Graziadei, G. A., and Graziadei, P. P. (1979a). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy, *J Neurocytol* 8, 197-213, Apr.
- Graziadei, P. P., and Graziadei, G. A. (1979b). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons, *J Neurocytol* 8, 1-18, Feb.
- Grinvald, A., Lieke, E., Frostig, R. D., Gilbert, C. D., and Wiesel, T. N. (1986). Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals, *Nature* 324, 361-4, Nov 27-Dec 3.
- Grüsser, O.-J., Grüsser-Cornehls, U. in Schmidt, R. F., Thews, G. (1995). *Physiologie des Menschen*. 26. Auflage. Berlin Heidelberg New-York: Springer. pp. 278-315.
- Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1999). Tau pathology generated by overexpression of tau, *Am J Pathol* 155, 1781-5, Dec.

-
- Gross-Isseroff, R., and Lancet, D. (1988). *Chem Senses* 13, 191-204.
- Guthrie, K. M., Anderson, A. J., Leon, M., and Gall, C. (1993). Odor-induced increases in c-fos mRNA expression reveal an anatomical "unit" for odor processing in olfactory bulb, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3329-33, Apr 15.
- Guthrie, K. M., and Gall, C. (2003). Anatomic mapping of neuronal odor responses in the developing rat olfactory bulb, *J Comp Neurol* 455, 56-71, Jan 1.
- Guthrie, K. M., and Gall, C. M. (1995). Odors increase Fos in olfactory bulb neurons including dopaminergic cells, *Neuroreport* 6, 2145-9; discussion 2103, Nov 13.
- Harper, R., Land, D. G., Griffiths, N. M., Bate-Smith, E. C. (1968). Odor qualities: a glossary of usage, *Br J Psychol* 59, 231-51.
- Hasan, M. T., Friedrich, R. W., Euler, T., Larkum, M. E., Giese, G., Both, M., Duebel, J., Waters, J., Bujard, H., Griesbeck, O., et al. (2004). Functional fluorescent Ca²⁺ indicator proteins in transgenic mice under TET control, *PLoS Biol* 2, e163, Jun.
- Hass, H. B., and Newton, R. F. in Weast, R. C. (1974). *Handbook of Chemistry and Physics*. 55th edition. Broca Raton: CRC, pp. D155-D156.
- Hatt, H. (1995), in Schmidt, R. F., Thews, G. *Physiologie des Menschen*. 26. Auflage. Berlin Heidelberg New-York: Springer, pp. 316-27.
- Hildebrand, J. G., Rossler, W., and Tolbert, L. P. (1997). Postembryonic development of the olfactory system in the moth *Manduca sexta*: primary-afferent control of glomerular development, *Semin Cell Dev Biol* 8, 163-70, Apr.
- Hogan, B., Costantini, F., and Lacy, E. (1986). *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hsia, A. Y., Vincent, J. D., and Lledo, P. M. (1999). Dopamine depresses synaptic inputs into the olfactory bulb, *J Neurophysiol* 82, 1082-5, Aug.
- Hübener, M., Shoham, D., Grinvald, A., Bonhoeffer, T. (1997). Spatial relationships among three columnar systems in cat area 17, *J Neurosci* 17, 9270-84.
- Hudspeth, A. J. (1997). How hearing happens, *Neuron* 19, 947-50, Nov.
- Hummel, T., and Livermore, A. (2002). Intranasal chemosensory function of the trigeminal nerve and aspects of its relation to olfaction, *Int Arch Occup Environ Health* 75, 305-13, Jun.

-
- Igarashi, K. M., and Mori, K. (2004). Spatial Representation of Hydrocarbon Odorants in the Ventrolateral Zones of the Rat Olfactory Bulb, *J Neurophysiol*, Sep 22.
- Illig, K. R., and Haberly, L. B. (2003). Odor-evoked activity is spatially distributed in piriform cortex, *J Comp Neurol* 457, 361-73, Mar 17.
- Imamura, K., Mataga, N., and Mori, K. (1992). Coding of odor molecules by mitral/tufted cells in rabbit olfactory bulb. I. Aliphatic compounds, *J Neurophysiol* 68, 1986-2002, Dec.
- Ioannou, P. A., Amemiya, C. T., Garnes, J., Kroisel, P. M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M. A., and de Jong, P. J. (1994). A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments, *Nat Genet* 6, 84-9, Jan.
- Iwema, C. L., Fang, H., Kurtz, D. B., Youngentob, S. L., and Schwob, J. E. (2004). Odorant receptor expression patterns are restored in lesion-recovered rat olfactory epithelium, *J Neurosci* 24, 356-69, Jan 14.
- Jares-Erijman, E. A., and Jovin, T. M. (2003). FRET imaging, *Nat Biotechnol* 21, 1387-95, Nov.
- Jasper, J. R., and Insel, P. A. (1992). Evolving concepts of partial agonism. The beta-adrenergic receptor as a paradigm, *Biochem Pharmacol* 43, 119-30, Jan 22.
- Jhaveri, D., and Rodrigues, V. (2002). Sensory neurons of the Atonal lineage pioneer the formation of glomeruli within the adult *Drosophila* olfactory lobe, *Development* 129, 1251-60, Mar.
- Jin, B. K., Franzen, L., and Baker, H. (1996). Regulation of c-Fos mRNA and fos protein expression in olfactory bulbs from unilaterally odor-deprived adult mice, *Int J Dev Neurosci* 14, 971-82, Nov.
- Johnson, B. A., and Leon, M. (2000a). Modular representations of odorants in the glomerular layer of the rat olfactory bulb and the effects of stimulus concentration, *J Comp Neurol* 422, 496-509, Jul 10.
- Johnson, B. A., and Leon, M. (2000b). Odorant molecular length: one aspect of the olfactory code, *J Comp Neurol* 426, 330-8, Oct 16.
- Johnson, B. A., Woo, C. C., Hingco, E. E., Pham, K. L., and Leon, M. (1999). Multidimensional chemotopic responses to n-aliphatic acid odorants in the rat olfactory bulb, *J Comp Neurol* 409, 529-48, Jul 12.
- Johnson, B. A., Woo, C. C., and Leon, M. (1998). Spatial coding of odorant features in the glomerular layer of the rat olfactory bulb, *J Comp Neurol* 393, 457-71, Apr 20.
-

-
- Jones, D. T., and Reed, R. R. (1989). Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction, *Science* 244, 790-5, May 19.
- Kajiya, K., Inaki, K., Tanaka, M., Haga, T., Kataoka, H., and Touhara, K. (2001). Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants, *J Neurosci* 21, 6018-25, Aug 15.
- Kashiwadani, H., Sasaki, Y. F., Uchida, N., and Mori, K. (1999). Synchronized oscillatory discharges of mitral/tufted cells with different molecular receptive ranges in the rabbit olfactory bulb, *J Neurophysiol* 82, 1786-92, Oct.
- Katoh, K., Koshimoto, H., Tani, A., and Mori, K. (1993). Coding of odor molecules by mitral/tufted cells in rabbit olfactory bulb. II. Aromatic compounds, *J Neurophysiol* 70, 2161-75, Nov.
- Kauer, J. S., and White, J. (2001). Imaging and coding in the olfactory system, *Annu Rev Neurosci* 24, 963-79.
- Kellendonk, C., Tronche, F., Monaghan, A. P., Angrand, P. O., Stewart, F., and Schutz, G. (1996). Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486, *Nucleic Acids Res* 24, 1404-11, Apr 15.
- Kent, P. F., and Mozell, M. M. (1992). The recording of odorant-induced mucosal activity patterns with a voltage-sensitive dye, *J Neurophysiol* 68, 1804-19, Nov.
- Kent, P. F., Mozell, M. M., Murphy, S. J., and Hornung, D. E. (1996). The interaction of imposed and inherent olfactory mucosal activity patterns and their composite representation in a mammalian species using voltage-sensitive dyes, *J Neurosci* 16, 345-53, Jan.
- Kim, D. G., Kang, H. M., Jang, S. K., and Shin, H. S. (1992). Construction of a bifunctional mRNA in the mouse by using the internal ribosomal entry site of the encephalomyocarditis virus, *Mol Cell Biol* 12, 3636-43, Aug.
- Klinke, R. in Schmidt, R. F., Thews, G. (1995). *Physiologie des Menschen*. 26. Auflage. Berlin Heidelberg New-York: Springer. pp. 258-77.
- Knoll, B., Isenmann, S., Kilic, E., Walkenhorst, J., Engel, S., Wehinger, J., Bahr, M., and Drescher, U. (2001). Graded expression patterns of ephrin-As in the superior colliculus after lesion of the adult mouse optic nerve, *Mech Dev* 106, 119-27, Aug.
- Knoll, B., Schmidt, H., Andrews, W., Guthrie, S., Pini, A., Sundaresan, V., and Drescher, U. (2003). On the topographic targeting of basal vomeronasal axons through Slit-mediated chemorepulsion, *Development* 130, 5073-82, Nov.

-
- Korsching, S. I. (2001). Odor maps in the brain: spatial aspects of odor representation in sensory surface and olfactory bulb, *Cell Mol Life Sci* 58, 520-30, Apr.
- Korsching, S. I., Argo, S., Campenhausen, H., Friedrich, R. W., Rummrich, A., and Weth, F. (1997). Olfaction in zebrafish: what does a tiny teleost tell us?, *Semin Cell Dev Biol* 8, 181-7, Apr.
- Krautwurst, D., Yau, K. W., and Reed, R. R. (1998). Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library, *Cell* 95, 917-26, Dec 23.
- Kumar, A., Dudley, C. A., and Moss, R. L. (1999). Functional dichotomy within the vomeronasal system: distinct zones of neuronal activity in the accessory olfactory bulb correlate with sex-specific behaviors, *J Neurosci* 19, RC32, Oct 15.
- Kurahashi, T., and Yau, K. W. (1993). Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells, *Nature* 363, 71-4, May 6.
- Kurahashi, T., and Yau, K. W. (1994). Olfactory transduction. Tale of an unusual chloride current, *Curr Biol* 4, 256-8, Mar 1.
- Lagier, S., Carleton, A., and Lledo, P. M. (2004). Interplay between local GABAergic interneurons and relay neurons generates gamma oscillations in the rat olfactory bulb, *J Neurosci* 24, 4382-92, May 5.
- Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Jr., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L., and Westphal, H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6232-6, Jul 15.
- Lancet, D., Greer, C. A., Kauer, J. S., and Shepherd, G. M. (1982). Mapping of odor-related neuronal activity in the olfactory bulb by high-resolution 2-deoxyglucose autoradiography, *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 670-4, Jan.
- Laughlin, S. B. (2001). Energy as a constraint on the coding and processing of sensory information, *Curr Opin Neurobiol* 11, 475-80, Aug.
- Laurent, G., Wehr, M., and Davidowitz, H. (1996). Temporal representations of odors in an olfactory network, *J Neurosci* 16, 3837-47, Jun 15.
- Lei, H., Christensen, T. A., and Hildebrand, J. G. (2002). Local inhibition modulates odor-evoked synchronization of glomerulus-specific output neurons, *Nat Neurosci* 5, 557-65, Jun.
- Leo, G., Alexey, Y., Chervonenkis, A. J., Gammerman, J. A., and Solovyev S. V. (2002). Sequence alignment kernel for recognition of promoter regions, *Bioinformatics* 19, 1964-71, Oct.

-
- Lerner, M. R., Reagan, J., Gyorgyi, T., and Roby, A. (1988). Olfaction by melanophores: what does it mean?, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 261-4, Jan.
- Lewcock, J. W., and Reed, R. R. (2004). A feedback mechanism regulates monoallelic odorant receptor expression, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1069-74, Jan 27.
- Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C. C., Kain, S. R. (1998). Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter, *J Biol Chem* 273, 34970-5, Dec 25.
- Lin, D. M., Wang, F., Lowe, G., Gold, G. H., Axel, R., Ngai, J., and Brunet, L. (2000). Formation of precise connections in the olfactory bulb occurs in the absence of odorant-evoked neuronal activity, *Neuron* 26, 69-80, Apr.
- Linster, C., Johnson, B. A., Yue, E., Morse, A., Xu, Z., Hingco, E. E., Choi, Y., Choi, M., Messiha, A., and Leon, M. (2001). Perceptual correlates of neural representations evoked by odorant enantiomers, *J Neurosci* 21, 9837-43, Dec 15.
- Linster, C., and Smith, B. H. (1999). Generalization between binary odor mixtures and their components in the rat, *Physiol Behav* 66, 701-7, Jun.
- Litaudon, P., Amat, C., Bertrand, B., Vigouroux, M., and Buonviso, N. (2003). Piriform cortex functional heterogeneity revealed by cellular responses to odours, *Eur J Neurosci* 17, 2457-61, Jun.
- Liu, L., Yermolaieva, O., Johnson, W. A., Abboud, F. M., and Welsh, M. J. (2003). Identification and function of thermosensory neurons in *Drosophila* larvae, *Nat Neurosci* 6, 267-73, Mar.
- Lodovichi, C., Belluscio, L., and Katz, L. C. (2003). Functional topography of connections linking mirror-symmetric maps in the mouse olfactory bulb, *Neuron* 38, 265-76, Apr 24.
- Logan, M., Simon, H. G., and Tabin, C. (1998). Differential regulation of T-box and homeobox transcription factors suggests roles in controlling chick limb-type identity, *Development* 125, 2825-35, Aug.
- Lowe, G. (2003). Electrical signaling in the olfactory bulb, *Curr Opin Neurobiol* 13, 476-81, Aug.
- Luo, M., and Katz, L. C. (2001). Response correlation maps of neurons in the mammalian olfactory bulb, *Neuron* 32, 1165-79, Dec 20.
- MacLeod, K., and Laurent, G. (1996). Distinct mechanisms for synchronization and temporal patterning of odor-encoding neural assemblies, *Science* 274, 976-9, Nov 8.

-
- Malnic, B., Godfrey, P. A., and Buck, L. B. (2004). The human olfactory receptor gene family, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2584-9, Feb 24.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., and Buck, L. B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors, *Cell* 96, 713-23, Mar 5.
- Malonek, D., and Grinvald, A. (1997). Vascular regulation at sub millimeter range. Sources of intrinsic signals for high resolution optical imaging, *Adv Exp Med Biol* 413, 215-20.
- McPherson, D. R., McClellan, A. D., and O'Donovan, M. J. (1997). Optical imaging of neuronal activity in tissue labeled by retrograde transport of Calcium Green Dextran, *Brain Res Brain Res Protoc* 1, 157-64, May.
- Meister, M., and Bonhoeffer, T. (2001). Tuning and topography in an odor map on the rat olfactory bulb, *J Neurosci* 21, 1351-60, Feb 15.
- Michael, S. K., Brennan, J., and Robertson, E. J. (1999). Efficient gene-specific expression of cre recombinase in the mouse embryo by targeted insertion of a novel IRES-Cre cassette into endogenous loci, *Mech Dev* 85, 35-47, Jul.
- Miesenbock, G., De Angelis, D. A., and Rothman, J. E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins, *Nature* 394, 192-5, Jul 9.
- Minta, A., Kao, J. P., and Tsien, R. Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores, *J Biol Chem* 264, 8171-8, May 15.
- Mombaerts, P. (1999a). Molecular biology of odorant receptors in vertebrates, *Annu Rev Neurosci* 22, 487-509.
- Mombaerts, P. (1999b). Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors, *Science* 286, 707-11, Oct 22.
- Mombaerts, P. (2004a). Genes and Ligands for Odorant, Vomeronasal and Taste Receptors, *Nat Rev Neurosci* 5, 263-78.
- Mombaerts, P. (2004b). Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited, *Curr Opin Neurobiol* 14, 31-6, Feb.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., and Axel, R. (1996a). Visualizing an olfactory sensory map, *Cell* 87, 675-86, Nov 15.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Vassar, R., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., and Axel, R. (1996b). The molecular
-

- biology of olfactory perception, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61, 135-45.
- Morgan, J. I., and Curran, T. (1989). Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes, *Trends Neurosci* 12, 459-62, Nov.
- Morgan, J. I., and Curran, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun, *Annu Rev Neurosci* 14, 421-51.
- Mori, K., Mataga, N., and Imamura, K. (1992). Differential specificities of single mitral cells in rabbit olfactory bulb for a homologous series of fatty acid odor molecules, *J Neurophysiol* 67, 786-9, Mar.
- Mori, K., Nagao, H., and Sasaki, Y. F. (1998). Computation of molecular information in mammalian olfactory systems, *Network* 9, R79-102, Nov.
- Mori, K., and Shepherd, G. M. (1994). Emerging principles of molecular signal processing by mitral/tufted cells in the olfactory bulb, *Semin Cell Biol* 5, 65-74, Feb.
- Nagao, H., Yoshihara, Y., Mitsui, S., Fujisawa, H., and Mori, K. (2000). Two mirror-image sensory maps with domain organization in the mouse main olfactory bulb, *Neuroreport* 11, 3023-7, Sep 11.
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring, *Genesis* 26, 99-109, Feb.
- Ngai, J., Dowling, M. M., Buck, L., Axel, R., and Chess, A. (1993). The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish, *Cell* 72, 657-66, Mar 12.
- Nguyen-Ba-Charvet, K. T., and Chedotal, A. (2002). Role of Slit proteins in the vertebrate brain, *J Physiol Paris* 96, 91-8, Jan-Mar.
- O'Donovan, M. J., Ho, S., Sholomenko, G., and Yee, W. (1993). Real-time imaging of neurons retrogradely and anterogradely labelled with calcium-sensitive dyes, *J Neurosci Methods* 46, 91-106, Feb.
- Ohloff, G. (1990). *Riechstoffe und Geruchssinn. Die molekulare Welt der Düfte.* Berlin Heidelberg New-York: Springer
- Onoda, N. (1992). Odor-induced fos-like immunoreactivity in the rat olfactory bulb, *Neurosci Lett* 137, 157-60, Mar 30.
- Papaioannou, V. E., and Silver, L. M. (1998). The T-box gene family, *Bioessays* 20, 9-19, Jan.
- Parmentier, M., Libert, F., Schurmans, S., Schiffmann, S., Lefort, A., Eggerickx, D., Ledent, C., Mollereau, C., Gerard, C., Perret, J., and et al. (1992).

- Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells, *Nature* 355, 453-5, Jan 30.
- Passe, D. H., and Walker, J. C. (1985). Odor psychophysics in vertebrates, *Neurosci Biobehav Rev* 9, 431-67, Fall.
- Pelosi, P. (1996). Perireceptor events in olfaction, *J Neurobiol* 30, 3-19, May.
- Pelz, C., Gerber, B., and Menzel, R. (1997). Odorant intensity as a determinant for olfactory conditioning in honeybees: roles in discrimination, overshadowing and memory consolidation, *J Exp Biol* 200 (Pt 4), 837-47, Feb.
- Potter, S. M., Zheng, C., Koos, D. S., Feinstein, P., Fraser, S. E., and Mombaerts, P. (2001). Structure and emergence of specific olfactory glomeruli in the mouse, *J Neurosci* 21, 9713-23, Dec 15.
- Probst, A., Gotz, J., Wiederhold, K. H., Tolnay, M., Mistl, C., Jaton, A. L., Hong, M., Ishihara, T., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., et al. (2000). Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein, *Acta Neuropathol (Berl)* 99, 469-81, May.
- Raming, K., Krieger, J., Strotmann, J., Boekhoff, I., Kubick, S., Baumstark, C., and Breer, H. (1993). Cloning and expression of odorant receptors, *Nature* 361, 353-6, Jan 28.
- Rawson, N. E., Eberwine, J., Dotson, R., Jackson, J., Ulrich, P., and Restrepo, D. (2000). Expression of mRNAs encoding for two different olfactory receptors in a subset of olfactory receptor neurons, *J Neurochem* 75, 185-95, Jul.
- Reiff, D. F., Thiel, P. R., and Schuster, C. M. (2002). Differential regulation of active zone density during long-term strengthening of *Drosophila* neuromuscular junctions, *J Neurosci* 22, 9399-409, Nov 1.
- Reister, J., and Matthews, H. R. (2001). Simultaneous recording of receptor current and intraciliary Ca^{2+} concentration in salamander olfactory receptor cells, *J Physiol* 535, 637-45.
- Ressler, K. J., Sullivan, S. L., and Buck, L. B. (1993). A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium, *Cell* 73, 597-609, May 7.
- Ressler, K. J., Sullivan, S. L., and Buck, L. B. (1994). Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epithope map in the olfactory bulb, *Cell* 79, 597-609.
- Reuter, D., Zierold, K., Schroder, W. H., and Frings, S. (1998). A depolarizing chloride current contributes to chemoelectrical transduction in olfactory sensory neurons in situ, *J Neurosci* 18, 6623-30, Sep 1.
- Robertson, L. M., Kerppola, T. K., Vendrell, M., Luk, D., Smeyne, R. J., Bocchiaro, C., Morgan, J. I., and Curran, T. (1995). Regulation of c-fos expression in

-
- transgenic mice requires multiple interdependent transcription control elements, *Neuron* 14, 241-52, Feb.
- Rodrigues, V., and Bulthoff, I. (1985). Freeze-substitution of *Drosophila* heads for subsequent [³H]2-deoxyglucose autoradiography, *J Neurosci Methods* 13, 183-90, May.
- Rodriguez, I., Feinstein, P., and Mombaerts, P. (1999). Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system, *Cell* 97, 199-208, Apr 16.
- Rossiter, K. J. (1996). Structure-odor relationships, *Chemical Reviews* 96,3201-3240.
- Royal, S. J., and Key, B. (1999). Development of P2 olfactory glomeruli in P2-internal ribosome entry site-tau-LacZ transgenic mice, *J Neurosci* 19, 9856-64, Nov 15.
- Royet, J. P., Sicard, G., Souchier, C., and Jourdan, F. (1987). Specificity of spatial patterns of glomerular activation in the mouse olfactory bulb: computer-assisted image analysis of 2-deoxyglucose autoradiograms, *Brain Res* 417, 1-11, Aug 4.
- Royet, J. P., Souchier, C., Jourdan, F., and Ploye, H. (1988). Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis, *J Comp Neurol* 270, 559-68, Apr 22.
- Rubin, B. D., and Katz, L. C. (1999). Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb, *Neuron* 23, 499-511, Jul.
- Rubin, B. D., and Katz, L. C. (2001). Spatial coding of enantiomers in the rat olfactory bulb, *Nat Neurosci* 4, 355-6, Apr.
- Sachse, S., Rappert, A., and Galizia, C. G. (1999). The spatial representation of chemical structures in the antennal lobe of honeybees: steps towards the olfactory code, *Eur J Neurosci* 11, 3970-82, Nov.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sachse, S., and Galizia, C. G. (2003). The coding of odour-intensity in the honeybee antennal lobe: local computation optimizes odour representation, *Euro J Neurosci* 18, 2119-32.
- Sato, T., Hirono, J., Tonoike, M., and Takebayashi, M. (1994). Tuning specificities to aliphatic odorants in mouse olfactory receptor neurons and their local distribution, *J Neurophysiol* 72, 2980-9, Dec.

-
- Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5166-70, Jul.
- Schaefer, M. L., Finger, T. E., and Restrepo, D. (2001). Variability of position of the P2 glomerulus within a map of the mouse olfactory bulb, *J Comp Neurol* 436, 351-62, Jul 30.
- Schild, D., and Restrepo, D. (1998). Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells, *Physiol Rev* 78, 429-66, Apr.
- Schilling, K., Luk, D., Morgan, J. I., and Curran, T. (1991). Regulation of a fos-lacZ fusion gene: a paradigm for quantitative analysis of stimulus-transcription coupling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5665-9, Jul 1.
- Schoenfeld, T. A., Clancy, A. N., Forbes, W. B., and Macrides, F. (1994). The spatial organization of the peripheral olfactory system of the hamster. Part I: Receptor neuron projections to the main olfactory bulb, *Brain Res Bull* 34, 183-210.
- Schoppa, N. E., and Westbrook, G. L. (2002). AMPA autoreceptors drive correlated spiking in olfactory bulb glomeruli, *Nat Neurosci* 5, 1194-202, Nov.
- Schwarting, G. A., Kostek, C., Bless, E. P., Ahmad, N., and Tobet, S. A. (2001). Deleted in colorectal cancer (DCC) regulates the migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to the basal forebrain, *J Neurosci* 21, 911-9, Feb 1.
- Schwarting, G. A., Raitcheva, D., Bless, E. P., Ackerman, S. L., and Tobet, S. (2004). Netrin 1-mediated chemoattraction regulates the migratory pathway of LHRH neurons, *Eur J Neurosci* 19, 11-20, Jan.
- Schwob, J. E., and Gottlieb, D. I. (1986). The primary olfactory projection has two chemically distinct zones, *J Neurosci* 6, 3393-404, Nov.
- Scott, J. W., Davis, L. M., Shannon, D., and Kaplan, C. (1996). Relation of chemical structure to spatial distribution of sensory responses in rat olfactory epithelium, *J Neurophysiol* 75, 2036-49, May.
- Serizawa, S., Miyamichi, K., Nakatani, H., Suzuki, M., Saito, M., Yoshihara, Y., and Sakano, H. (2003). Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse, *Science* 302, 2088-94, Dec 19.
- Shepherd, G. M. (1987). A molecular vocabulary for olfaction, *Ann N Y Acad Sci* 510, 98-103.
- Shepherd, G. M., Greer, C. A. in Shepherd, G. M. (1990). The synaptic organization of the brain. 3rd edition. New-York: Oxford University Press. pp. 133-169.

-
- Shier, P., Hofstra, C. L., Ma, X. J., Wu, Y., Ngo, K., and Fung-Leung, W. P. (2000). Tbt-1, a new T-box transcription factor induced in activated Th1 and CD8+ T cells, *Immunogenetics* 51, 771-8, Aug.
- Shibley, M. T., and Ennis, M. (1996). Functional organization of olfactory system, *J Neurobiol* 30, 123-76, May.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., and Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8794-7, Sep 15.
- Shykind, B. M., Rohani, S. C., O'Donnell, S., Nemes, A., Mendelsohn, M., Sun, Y., Axel, R., and Barnea, G. (2004). Gene switching and the stability of odorant receptor gene choice, *Cell* 117, 801-15, Jun 11.
- Singer, M. S. (2000). Analysis of the molecular basis for octanal interactions in the expressed rat 17 olfactory receptor, *Chem Senses* 25, 155-65, Apr.
- Singer, M. S., and Shepherd, G. M. (1994). Molecular modeling of ligand-receptor interactions in the OR5 olfactory receptor, *Neuroreport* 5, 1297-300, Jun 2.
- Singer, W. (1999). Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations?, *Neuron* 24, 49-65, 111-25, Sep.
- Slotnick, B., and Bisulco, S. (2003). Detection and discrimination of carvone enantiomers in rats with olfactory bulb lesions, *Neuroscience* 121, 451-7.
- Smeyne, R. J., Schilling, K., Robertson, L., Luk, D., Oberdick, J., Curran, T., and Morgan, J. I. (1992). *fos-lacZ* transgenic mice: mapping sites of gene induction in the central nervous system, *Neuron* 8, 13-23, Jan.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol* 98, 503-17, Nov 5.
- Spehr, M., Gisselmann, G., Poplawski, A., Riffell, J. A., Wetzel, C. H., Zimmer, R. K., and Hatt, H. (2003). Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis, *Science* 299, 2054-8, Mar 28.
- Stopfer, M., Bhagavan, S., Smith, B. H., and Laurent, G. (1997). Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies, *Nature* 390, 70-4, Nov 6.
- Strotmann, J., Conzelmann, S., Beck, A., Feinstein, P., Breer, H., and Mombaerts, P. (2000). Local permutations in the glomerular array of the mouse olfactory bulb, *J Neurosci* 20, 6927-38, Sep 15.
- Strotmann, J., Hoppe, R., Conzelmann, S., Feinstein, P., Mombaerts, P., and Breer, H. (1999). Small subfamily of olfactory receptor genes: structural features, expression pattern and genomic organization, *Gene* 236, 281-91, Aug 20.

- Sullivan, S. L., Adamson, M. C., Ressler, K. J., Kozak, C. A., and Buck, L. (1995). The chromosomal distribution of mouse odorant receptor genes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 884-8.
- Sveinsson, T., and Hara, T. J. (2000). *Comp Biochem Physiol* 97, 279-87.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., and Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment, *Cell* 100, 655-69, Mar 17.
- Takahashi, Y. K., Kurosaki, M., Hirono, S., and Mori, K. (2004a). Topographic representation of odorant molecular features in the rat olfactory bulb, *J Neurophysiol* 92, 2413-27, Oct.
- Takahashi, Y. K., Nagayama, S., and Mori, K. (2004b). Detection and masking of spoiled food smells by odor maps in the olfactory bulb, *J Neurosci* 24, 8690-4, Oct 6.
- Taniguchi, M., Nagao, H., Takahashi, Y. K., Yamaguchi, M., Mitsui, S., Yagi, T., Mori, K., and Shimizu, T. (2003). Distorted odor maps in the olfactory bulb of semaphorin 3A-deficient mice, *J Neurosci* 23, 1390-7, Feb 15.
- Tirindelli, R., Mucignat-Caretta, C., and Ryba, N. J. (1998). Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals, *Trends Neurosci* 21, 482-6, Nov.
- Timothy, W. Y., and Bargmann, C. I. (2001). Dynamic regulation of axon guidance, *Nat Neurosci* 4, 1169-76, Nov.
- Touhara, K., Sengoku, S., Inaki, K., Tsuboi, A., Hirono, J., Sato, T., Sakano, H., and Haga, T. (1999). Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4040-5, Mar 30.
- Troemel, E. R., Kimmel, B. E., and Bargmann, C. I. (1997). Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*, *Cell* 91, 161-9, Oct 17.
- Trotier, D. (1994). Intensity coding in olfactory receptor cells, *Semin Cell Biol* 5, 47-54, Feb.
- Tsuboi, A., Yoshihara, S., Yamazaki, N., Kasai, H., Asai-Tsuboi, H., Komatsu, M., Serizawa, S., Ishii, T., Matsuda, Y., Nagawa, F., and Sakano, H. (1999). Olfactory neurons expressing closely linked and homologous odorant receptor genes tend to project their axons to neighboring glomeruli on the olfactory bulb, *J Neurosci* 19, 8409-18, Oct 1.
- Turin, L. (2002). A method for the calculation of odor character from molecular structure, *J Theor Biol* 216, 367-85, Jun 7.

-
- Uchida, N., and Mainen, Z. F. (2003). Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat, *Nat Neurosci* 6, 1224-9, Nov.
- Uchida, N., Takahashi, Y. K., Tanifuji, M., and Mori, K. (2000). Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features, *Nat Neurosci* 3, 1035-43, Oct.
- Van der Velden, A. W., and Thomas, A. A. M. (1999). The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development, *Int J Biochem Cell Biol* 31, 87-106.
- Vanzetta, I., and Grinvald, A. (1999). Increased cortical oxidative metabolism due to sensory stimulation: implications for functional brain imaging, *Science* 286, 1555-8, Nov 19.
- Vassalli, A., Rothman, A., Feinstein, P., Zapotocky, M., and Mombaerts, P. (2002). Minigenes impart odorant receptor-specific axon guidance in the olfactory bulb, *Neuron* 35, 681-96, Aug 15.
- Vassar, R., Ngai, J., and Axel, R. (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium, *Cell* 74, 309-18, Jul 30.
- Voet, D., and Voet, J. G. (1995). *Biochemistry*. Second edition. New-York Chichester Brisbane: John Wiley & Sons. pp. 215-250.
- Vosshall, L. B. (2000). Olfaction in *Drosophila*, *Curr Opin Neurobiol* 10, 498-503, Aug.
- Wachowiak, M., and Cohen, L. B. (1999). Presynaptic inhibition of primary olfactory afferents mediated by different mechanisms in lobster and turtle, *J Neurosci* 19, 8808-17, Oct 15.
- Wachowiak, M., and Cohen, L. B. (2001). Representation of odorants by receptor neuron input to the mouse olfactory bulb, *Neuron* 32, 723-35, Nov 20.
- Wachowiak, M., Denk, W., and Friedrich, R. W. (2004). Functional organization of sensory input to the olfactory bulb glomerulus analyzed by two-photon calcium imaging, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9097-102, Jun 15.
- Wachowiak, M., Zochowski, M., Cohen, L. B., and Falk, C. X. (2000). The spatial representation of odors by olfactory receptor neuron input to the olfactory bulb is concentration invariant, *Biol Bull* 199, 162-3, Oct.
- Wang, F., Nemes, A., Mendelsohn, M., and Axel, R. (1998). Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map, *Cell* 93, 47-60, Apr 3.
- Wang, J. W., Wong, A. M., Flores, J., Vosshall, L. B., and Axel, R. (2003). Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain, *Cell* 112, 271-82, Jan 24.

- Wang, S. S., Lewcock, J. W., Feinstein, P., Mombaerts, P., and Reed, R. R. (2004). Genetic disruptions of O/E2 and O/E3 genes reveal involvement in olfactory receptor neuron projection, *Development* 131, 1377-88, Mar.
- Weast, R. C. (1974). *Handbook of Chemistry and Physics*. 55th edition. Boca Raton: CRC.
- Weth, F., Nadler, W., and Korsching, S. (1996). Nested expression domains for odorant receptors in zebrafish olfactory epithelium, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13321-6, Nov 12.
- Wetzel, C. H., Oles, M., Wellerdieck, C., Kuczkowiak, M., Gisselmann, G., and Hatt, H. (1999). Specificity and sensitivity of a human olfactory receptor functionally expressed in human embryonic kidney 293 cells and *Xenopus Laevis* oocytes, *J Neurosci* 19, 7426-33, Sep 1.
- Whitlock, K. E., and Westerfield, M. (1998). A transient population of neurons pioneers the olfactory pathway in the zebrafish, *J Neurosci* 18, 8919-27, Nov 1.
- Wisdon, R., and Verma, I. M. (1993). Transformation by Fos proteins requires a C-terminal transactivation domain, *Mol Cell Biol* 13, 7429-38, Dec.
- Wise, P. M., Olsson, M. J., and Cain, W. S. (2000). Quantification of odor quality, *Chem Senses* 25, 429-43, Aug.
- Woo, C. C., Oshita, M. H., and Leon, M. (1996). A learned odor decreases the number of Fos-immunopositive granule cells in the olfactory bulb of young rats, *Brain Res* 716, 149-56, Apr 15.
- Wyatt, T. D. (2003). *Pheromones and Animal Behaviour. Communication by Smell and Taste*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Xiong, W., and Chen, W. R. (2002). Dynamic gating of spike propagation in the mitral cell lateral dendrites, *Neuron* 34, 115-26, Mar 28.
- Xu, F., Greer, C. A., and Shepherd, G. M. (2000). Odor maps in the olfactory bulb, *J Comp Neurol* 422, 489-95, Jul 10.
- Xu, F., Liu, N., Kida, I., Rothman, D. L., Hyder, F., and Shepherd, G. M. (2003). Odor maps of aldehydes and esters revealed by functional MRI in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11029-34, Sep 16.
- Yang, X. W., Model, P., and Heintz, N. (1997). Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome, *Nat Biotechnol* 15, 859-65, Sep.

-
- Yokoi, M., Mori, K., and Nakanishi, S. (1995). Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3371-5, Apr 11.
- Yoshihara, Y., Kawasaki, M., Tamada, A., Fujita, H., Hayashi, H., Kagamiyama, H., and Mori, K. (1997). OCAM: A new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons, *J Neurosci* 17, 5830-42, Aug 1.
- Yu, D., Baird, G. S., Tsien, R. Y., and Davis, R. L. (2003). Detection of calcium transients in *Drosophila* mushroom body neurons with camgaroo reporters, *J Neurosci* 23, 64-72, Jan 1.
- Zald, D. H., and Pardo, J. V. (2000). Functional neuroimaging of the olfactory system in humans, *Int J Psychophysiol* 36, 165-81, May.
- Zhang, W. X., and Yang, S. Y. (2000). Cloning and characterization of a new member of the T-box gene family, *Genomics* 70, 41-8, Nov 15.
- Zhang, X., and Firestein, S. (2002). The olfactory receptor gene superfamily of the mouse, *Nat Neurosci* 5, 124-33, Feb.
- Zhang, X., Rodriguez, I., Mombaerts, P., and Firestein, S. (2004). Odorant and Vomeronasal Receptor Genes in Two Mouse Genome Assemblies, *Genomics* 83, 802-11.
- Zhao, H., Ivic, L., Otaki, J. M., Hashimoto, M., Mikoshiba, K., and Firestein, S. (1998). Functional expression of a mammalian odorant receptor, *Science* 279, 237-42, Jan 9.
- Zhao, H., and Reed, R. R. (2001). X inactivation of the OCNC1 channel gene reveals a role for activity-dependent competition in the olfactory system, *Cell* 104, 651-60, Mar 9.
- Zheng, C., Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I., and Mombaerts, P. (2000). Peripheral olfactory projections are differentially affected in mice deficient in a cyclic nucleotide-gated channel subunit, *Neuron* 26, 81-91, Apr.
- Zou, Z., Horowitz, L. F., Montmayeur, J. P., Snapper, S., and Buck, L. B. (2001). Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex, *Nature* 414, 173-9, Nov 8.
- Zozulya, S., Echeverri, F., and Nguyen, T. (2001). The human olfactory receptor repertoire, *Genome Biol* 2, RESEARCH0018.

6. Anhang

6.1 Sequenz des AI2CB-Inserts

```

G T A C T C G A G G   A T A T G A T C T C   A C A G C C T T A C   T G G C T G G G G A   C A C C T C G G G A   A C A C A G T T A T
G A A G C G G A G T   T C C G A G C T G T   G A G C A T G A A G   C C C A C A C T C C   T A C C C T C T G C   C C C G G G G C C C
A C T G T G C C C T   A C T A C C G G G G   C C A A G A C G T C   C T G G C G C C T G   G A G C T G G T T G   G C C C G T G G C C
C C T C A A T A C C   C G C C C A A G A T   G A G C C C A G C T   G G C T G G T T C C   G G C C C A T G C G   A A C T C T G C C C
A T G G A C C C G G   G C C T G G G A T C   C T C A G A G G A A   C A G G G C T C C T   C C C C C T C G C T   G T G G C C T G A G
G T C A C C T C C C   T C C A G C C G G A   G C C C A G C G A C   T C A G G A C T A G   G C G A A G G A G A   C A C T A A G A G G
A G G A G G A T A T   C C C C C T A T C C   T T C C A G T G G C   G A C A G C T C C T   C T C C C G C T G G   G G C C C C T T C T
C C T T T T G A T A   A G G A A A C C G A   A G G C C A G T T T   T A T A A T T A T T   T T C C C A A C T G   A G A A A A T G C C
G C T G A A T T G G   A A G G T G C C C A   C T A A C T T A G A   A A A C A G A C G C   G G G A A T T C T A   G C C C C T C T C C
C T C C C C C C C C   C C T A A C G T T A   C T G G C C G A A G   C C G C T T G G A A   T A A G G C C G G T   G T G C G T T T G T
C T A T A T G T T A   T T T T C C A C C A   T A T T G C C G T C   T T T T G G C A A T   G T G A G G G C C C   G G A A A C C T G G
C C C T G T C T T C   T T G A C G A G C A   T T C C T A G G G G   T C T T T C C C C T   C T C G C C A A A G   G A A T G C A A G G
T C T G T T G A A T   G T C G T G A A G G   A A G C A G T T C C   T C T G G A A G C T   T C T T G A A G A C   A A A C A A C G T A
C T G T A G C G A C   C C T T T G C A G G   C A G C G G A A C C   C C C C A C C T G G   C G A C A G G T G C   C T C T G C G G C C
A A A A G C C A C G   T G T A T A A G A T   A C A C C T G C A A   A G G C G G C A C A   A C C C C A G T G C   C A C G T T G T G A
G T T G G A T A G T   T G T G G A A A G A   G T C A A A T G G C   T C T C C T C A A G   C G T A T T C A A C   A A G G G G C T G A
A G G A T G C C C A   G A A G G T A C C C   C A T T G T A T G G   G A T C T G A T C T   G G G G C C T C G G   T G C A C A T G C T
T T A C A T G T G T   T T A G T C G A G G   T T A A A A A A A C   G T C T A G G C C C   C C C G A A C C A C   G G G G A C G T G G
T T T T C C T T T G   A A A A A C A C G A   T G A T A A T A T G   G C C A C G T C G A   C C A T G C C C A A   G A A G A A G A G G
A A G G T G T C C A   A T T T A C T G A C   C G T A C A C C A A   A A T T T G C C T G   C A T T A C C G G T   C G A T G C A A C G
A G T G A T G A G G   T T C G C A A G A A   C C T G A T G G A C   A T G T T C A G G G   A T C G C C A G G C   G T T T T C T G A G
C A T A C C T G G A   A A A T G C T T T C   G T C C G T T T G C   C G G T C G T G G G   C G G C A T G G T G   C A A G T T G A A T
A A C C G G A A A T   G G T T T C C C G C   A G A A C C T G A A   G A T G T T C G C G   A T T A T C T T C T   A T A T C T T C A G
G C G C G C G G T C   T G G C A G T A A A   A A C T A T C C A G   C A A C A T T T G G   G C C A G C T A A A   C A T G C T T C A T
C G T C G G T C C G   G G C T G C C A C G   A C C A A G T G A C   A G C A A T G C T G   T T T C A C T G G T   T A T G C G G C G G
A T C C G A A A A G   A A A A C G T T G A   T G C C G G T G A A   C G T G C A A A A C   A G G C T C T A G C   G T T C G A A C G C
A C T G A T T T C G   A C C A G G T T C G   T T C A C T C A T G   G A A A A T A G C G   A T C G C T G C C A   G G A T A T A C G T
A A T C T G G C A T   T T C T G G G G A T   T G C T T A T A A C   A C C C T G T T A C   G T A T A G C C G A   A A T T G C C A G G
A T C A G G G T T A   A A G A T A T C T C   A C G T A C T G A C   G G T G G G A G A A   T G T T A A T C C A   T A T T G G C A G A
A C G A A A A C G C   T G G T T A G C A C   C G C A G G T G T A   G A G A A G G C A C   T T A G C C T G G G   G G T A A C T A A A
C T G G T C G A G C   G A T G G A T T T C   C G T C T C T G G T   G T A G C T G A T G   A T C C G A A T A A   C T A C C T G T T T
T G C C G G G T C A   G A A A A A A T G G   T G T T G C C G C G   C C A T C T G C C A   C C A G C C A G C T   A T C A A C T C G C
G C C C T G G A A G   G G A T T T T T G A   A G C A A C T C A T   C G A T T G A T T T   A C G G C G C T A A   G G A T G A C T C T
G G T C A G A G A T   A C C T G G C C T G   G T C T G G A C A C   A G T G C C C G T G   T C G G A G C C G C   G C G A G A T A T G
G C C C G C G C T G   G A G T T T C A A T   A C C G G A G A T C   A T G C A A G C T G   G T G G C T G G A C   C A A T G T A A A T
A T T G T C A T G A   A C T A T A T C C G   T A A C C T G G A T   A G T G A A A C A G   G G G C A A T G G T   G C G C C T G C T G
G A A G A T G G C G   A T T A G C C A T T   A A C G C G T A A A   T G A T T G C A G A   T C C A C T A G A G   C G G G C T G A G A
G C C C C G A G C T   C T T C C C C A T C   C C T T C C C T G T   A T A G T G A T T G   G T T G G A G A G G   A A G C G G G G C A
A G A A G G A T T C   T G G G G T T T A C   T T C T T G T T T C   C T G G C C C A C A   A G G A A A T A C G   A C A G G A G T G T
C C C C T G C C C C   T T T C T C T G C C   C G A A C T A C A G   T C A C G A A C C T   G G T G C T G C T T   C T G A C C C C A T
G G T T C C A T G G   A G A A C G G A G A   A T G G A C T C C A   G A G A G T T T T G   G A C C C A G A G G   G A C T T C A T G G
C T T T C T G C G A   G G T G G A G G G G   T C G G G G T G G G   G A G T C C A G G A   G A G C T G C T C T   C T T C C C C T G T
C C A G T C A G T A   A C T T T C A A C T   G T T G G T C T G A   C A C C T G T G T T   A A T C T C T G A C   C T G A A A G T G A
A G A T A C A C G C   A T T T T T T A C A A   C A G C C A G C C A   A A C A G A G A A G   A C T C A G G T G A   C T G C G G G C G G
A C T G G G C C A C   C T G C G A G G A G   A C A A G A G A G G   G T G G G T G C A G   A G G A A G G G T T   T G A A G G G T G C
A C A T T T C A C C   A G G C G A G G T C   A C T T T G A A C C   G G T G T G C T C G   A G

```


6.2 Erklärung

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

Köln, den 14. Dezember 2002

Hans-Ulrich Fried

6.3 Teilpublikationen

Fried, H. U., Fuss, S. H., and Korsching, S. I. (2002). Selective Imaging of Presynaptic Activity in the Mouse Olfactory Bulb Shows Concentration and Structure Dependence of Odor Responses in Identified Glomeruli, Proc Natl Acad Sci U S A 99, 3222-7. Epub 2002 Feb 19.

Fried, H.U., Linnig H.D., and Korsching, S.I (2001). An inexpensive mouse headholder suitable for optical recordings, Pysiol Behav 74, 253-5. Oct.

6.4 Lebenslauf

Curriculum Vitae

Hans-Ulrich Fried
Universität zu Köln
Institut für Genetik
Zülpicher Str. 47
50674 Köln
Tel.:++49 221 470 4842
Fax.:++49 221 470 5172
E-mail: a2756552@smail.rz.uni-koeln.de

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 15. Februar 1973
Geburtsort: Heidelberg
Eltern: Ulrike Gerda Sigrid Fried, geb. Stas (05.05.1943)
Prof. Dr. Ludwig Johannes Fried (23.05.1942)
Familienstand: verheiratet

Ausbildung

Apr. 2000 – Dez. 2004: Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Genetik der Universität zu Köln.
Jan. 1999 – Dez. 1999: Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität zu Köln. Vordiplom.
Okt. 1994 – Dez. 1998: Studium der Biologie an der Universität zu Köln. Abitur.
Sep. 1985 – Mai 1993: Besuch der Elisabeth-v.-Thadden-Schule, Wieblingen-Heidelberg.
Sep. 1979 – Jun. 1985: Besuch der Feien Waldorfschule Mannheim.

Berufliche Tätigkeit

Apr. 2000 – jetzt: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik, Universität zu Köln.
Jan. 1999 – Dez. 1999: Studentische Hilfskraft am Institut für Genetik, Universität zu Köln.
Aug. 1993 – Okt. 1994: Zivildienst am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg.

Wissenschaftliche Arbeiten

Fried HU (1999) Optische Messung neuronaler Aktivitäten im *Bulbus olfactorius* der Maus. Diplomarbeit im Fach Biologie der Universität zu Köln, unter Anleitung von Prof. Dr. Sigrun I. Korsching.

Fried HU (2005) Geruchsstoffinduzierte Aktivitätsmuster im *Bulbus olfactorius* der Maus: Neuronale Aktivitäten der olfaktorischen Rezeptorneurone und Entwicklung eines Mausmodells zur aktivitätsabhängigen Markierung der Büschel- und Mitralzellen. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, unter der Anleitung von Prof. Dr. Sigrun I. Korsching.