

Auswirkungen von Taurinmangel auf das Olfaktorische Epithel der Maus und
dessen Regenerationsfähigkeit am Beispiel des Taurintransporter-
Knockout-Modells

Dissertationsschrift

Zur Erlangung des doctor medicinae (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden

vorgelegt von

Christian Roth

geb. am 30.07.1976 in Mainz

Nordhausen, 2008

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

gez. _____

Vorsitzender der Promotionskommission

Gliederung

1. Einleitung

- 1.1. Anatomie des Olfaktorischen Epithels bei Nagern
 - 1.1.1. Olfaktorische Rezeptorneurone
 - 1.1.2. Stützzellen
 - 1.1.3. Mikrovillus-Zellen (MVZ)
 - 1.1.4. Horizontale (HBZ) und Globöse (GBZ) Basalzellen
 - 1.1.5. Gangzellen der Bowman-Drüsen
 - 1.1.6. Bestandteile der Lamina Propria
- 1.2. Anatomie des Bulbus olfactorius bei Nagern
- 1.3. Homöostase im Olfaktorischen Epithel
 - 1.3.1. Wachstums- und Regenerationsprozesse
 - 1.3.2. Apoptose
- 1.4. Physiologie des Riechens: Abläufe auf Rezeptorebene
- 1.5. Taurin: Physiologische Wirkungen im ZNS

2. Ziel und Fragestellung der Arbeit

3. Material und Methoden

- 3.1. Herkunft und genetischer Hintergrund der Tiere
- 3.2. Gewebeaufarbeitung und Gewinnung der Schnitte
 - 3.2.1. Grobzuschnitt der Proben
 - 3.2.2. Vorbereitung der Objektträger
 - 3.2.3. Entkalkung und Einbettung
 - 3.2.4. Schnitte
- 3.3. Hämatoxylin-Färbung
- 3.4. Immunhistochemische Reaktionen
 - 3.4.1. Antikörper
 - 3.4.2. Immunfluoreszenz
 - 3.4.3. Kontrollen
- 3.5. Datenerhebung
 - 3.5.1. Qualitative Auswertung
 - 3.5.2. Quantitative Auswertung

- 3.5.2.1. Zählregime
- 3.5.2.2. Korrektur der Rohdaten
- 3.5.2.3. Statistik

4. Ergebnisse

- 4.1. Immunhistochemie
 - 4.1.1. Olfaktorisches Markerprotein (OMP)
 - 4.1.2. Protein-Gen-Produkt 9.5 (PGP 9.5)
 - 4.1.3. Taurin
 - 4.1.4. Hitzeschock-Protein 25 (HSP 25)
 - 4.1.5. Ki-67
 - 4.1.6. Caspase 3
 - 4.1.7. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)
 - 4.1.8. Cytokeratin (CK)
 - 4.1.9. Co-Lokalisation von OMP und PGP 9.5
 - 4.1.10. Zählung der Stützzellen

5. Diskussion

- 5.1. Erhöhte Proliferationsaktivität bei taut-/ - Tieren
- 5.2. Hitze-Schock-Protein Reaktion
- 5.3. Zytokeratine
- 5.4. Gliagewebe des Olfaktoriums
- 5.5. Die Rolle des Taurins im Nervensystem
- 5.6. Zusammenfassung

6. Methodenkritik

7. Thesen der Arbeit

8. Literaturverzeichnis

9. Anhang

- 9.1. Silanisierung
- 9.2. Gebrauchslösungen

- 9.3. Immunhistochemie: Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC-Methode)
- 9.4. Immunfluoreszenz
- 9.5. Abkürzungsverzeichnis

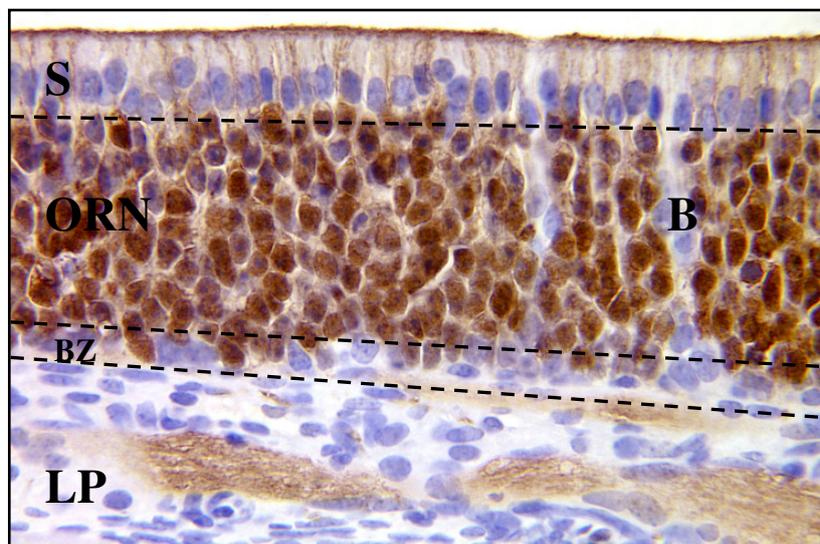
10. Danksagung

11. Eigenständigkeitserklärung

1. Einleitung

1.1. Anatomie des Olfaktorischen Epithels bei Nagern

Das olfaktorische Epithel ist ein mehrreihiges Neuroepithel, dessen Aufbau sich bei Säugetieren strukturell und funktionell sehr ähnelt. Es besteht aus Olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) und nichtneuronalen Zellen, den Stützzellen, Mikrovillus-Zellen und Zellen der Bowman-Drüsen bzw. deren Gangzellen. Basal befindet sich eine Schicht aus Horizontalen- (HBZ) und Globosen Basalzellen (GBZ).



Architektur des Olfaktorischen Epithels bei der Maus: PGP 9.5 IR, Markierung der ORN, (S) Stützzellen, (B) Gangzellen der Bowman-Drüsen, (BZ) Schicht mit (HBZ) Horizontalen- und (GBZ) Globosen Basalzellen, (LP) Lamina propria;

1.1.1. Olfaktorische Rezeptorneurone

Die ORN sind bipolare Zellen, deren Kerne sich vorwiegend im mittleren Drittel des mehrreihigen olfaktorischen Epithels (OE) befinden. Ihre Perikarya sind oval und durchmessen etwa 5 µm. Ein apikaler Dendrit zieht in Richtung Nasenhöhle, an dessen Ende sich ein hantelförmiger dendritischer Knopf befindet. Radiär entspringen aus diesem 6-20 bis zu 50 µm lange Zilien, die auf der Oberfläche des OE liegen (Moran et al., 1982). Lichtmikroskopisch lässt sich bei geeigneter Färbung der ORN ein etwa 3-5 µm dicker Saum darstellen, der das OE überzieht und die Gesamtheit der dendritischen Knöpfe sowie ein dichtes Netzwerk aus Zilien darstellt. Letztere sind passiv beweglich und ragen in einen Schleimfilm hinein, der von den Bowman-Drüsen der Lamina propria gebildet wird.

Riechstoffe lösen sich in ihm und treten so in Kontakt mit den von Geruchsrezeptoren (OR) besetzten Zilien.

Basal entspringt ein ca. 0,2 µm dickes Axon, welches durch die Basalmembran tritt und in Richtung Bulbus olfactorius zieht (Greer, 1991).

1.1.2. Stützzellen

Stützzellen stellen 15-25% der Zellen des OE (Weiler und Farbman, 1998). Sie stehen im OE palisadenförmig nebeneinander. Die Kerne befinden sich subapikal und durchmessen 5-8 µm. Das etwa 2 µm hohe supranukleäre Zytoplasma trägt auf seiner Oberfläche einen dichten Rasen aus elektronenmikroskopisch erkennbaren bis zu 1,5 µm langen Mikrovilli. In diesem Bereich trennt der „junctional complex“ Stützzellen von Fortsätzen der ORN und unterbindet weitgehend einen parazellulären Stofftransport (Greer, 1991; Nomura et al., 2004). Unterhalb des Zellkerns verschmälert sich das Zytoplasma, bis es sich in zahlreichen Fußfortsätzen auf der Basalmembran ausbreitet (Costanzo und Morrison, 1989). Das Zytoplasma bildet in diesen unteren zwei Dritteln des OE großflächige Ausstülpungen, die die einzelnen Axone der ORN voneinander trennen. Es wird davon ausgegangen, dass die Stützzellen eine Markscheidenfunktion zur elektrischen Isolierung der Axone haben (Getchell et al., 1984; Nomura et al., 2004).

Eine Basalmembran trennt das Epithel von der Lamina propria. Nur an Stellen, an denen Axone durchtreten, befinden sich kleine Öffnungen. Es wird vermutet, dass abgestorbene ORN eine solche Öffnung hinterlassen, die für das aussproßende Axon eines neuen ORN eine Leitschiene bildet. Durch diese Öffnung erhält das aussproßende Axon Anschluss an das Nervenfaserbündel der Lamina propria, an das auch das untergegangene Neuron Anschluss hatte.

Stützzellen sind für die Homöostase des OE, sowohl in struktureller als auch in funktioneller Hinsicht, unverzichtbar, weshalb sie in gewisser Weise eine „gliaartige“ Funktion haben (Weiler und Farbman, 1998).

Zu den wichtigsten physiologischen Funktionen gehören:

- 1.) Die von der Basalmembran bis zur Oberfläche reichenden Stützzellen bilden das tragende Grundgerüst des OE, in das die ORN eingebettet liegen (Weiler und Farbman, 1998).
- 2.) Stützzellen sind an der Aufnahme, der Spaltung bzw. Veränderung (Getchell et al, 1984) und an der Inaktivierung der im Schleim gelösten Riechstoffmoleküle beteiligt (Shepherd, 1989)

- 3.) Im OE hat das Zentralnervensystem (ZNS) via ORN direkten Kontakt zur Umwelt. Die ständige Exposition gegenüber exogenen Noxen erfordert einen wirksamen Schutzmechanismus. Stützzellen verfügen daher über ein hochpotentes System verschiedener Cytochrom P-450 Oxidasen. Gleicht man die Gewebsprotein-konzentrationen von OE und Leber an, so zeigt sich, dass der Enzymbesatz für den Xenobiotika-Metabolismus im OE gleich hoch oder höher als der in der Leber ist (Lewis und Dahl, 1995).
- 4.) An Ochsenfröschen konnten Okano und Takagi (1974) zeigen, dass Stützzellen aktiv sezernieren und so an der Bildung des Schleimüberzuges des OE beteiligt sind. Die Autoren wiesen elektronenmikroskopisch eine stetige, wenn auch geringe, apokrine Sekretion nach, die unter Reizung des OE sprunghaft zunahm.
- 5.) Stützzellen phagozytieren nekrotische und apoptotische ORN (Suzuki et al., 1996).
- 6.) Neben der oben beschriebenen elektrischen Isolation der ORN-Axone durch zytoplasmatische Ausstülpungen der Stützzellen findet man eine gleichartige Markscheidenfunktion auch im Bereich der Dendriten (Getchell et al., 1984).
- 7.) Stützzellen sind an der Regulation der Ionenzusammensetzung des das OE bedeckenden Schleims beteiligt (Getchell et al., 1984).

1.1.3. Mikrovillus-Zellen (MVZ)

Bei den Mikrovillus-Zellen handelt es sich um eine weitere nichtneuronale Zellpopulation, die bisher wenig erforscht worden ist. Sie haben einen relativ schmalen Hals und einen bauchigen Körper. Die Perikarya befinden sich auf gleicher Höhe wie die der Stützzellen. Zur Schleimhautoberfläche hin besitzen sie Mikrovilli (Kwon et al., 2005; Asan und Drenckhahn, 2005). Basal lässt sich ein zierlicher, zytoplasmatischer Zellfortsatz bis zur Basalmembran verfolgen (Moran et al., 1982).

Die Funktion der MVZ ist noch umstritten. Moran et al. (1982) vermuten, dass es sich aufgrund des axonartigen Zellfortsatzes um chemorezeptive Zellen handeln könnte, jedoch versagen typische immunhistochemische Marker wie Neuronenspezifische Enolase (NSE), Synaptophysin oder Olfaktorisches Markerprotein (OMP). Neuere Untersuchungen von Carr et al. (1991), Asan und Drenckhahn (2005), Kwon et al. (2005) hingegen unterstützen eher eine nichtneuronale Natur der MVZ.

Aufgrund des immunhistochemischen Reaktionsmusters haben Asan und Drenckhahn (2005) zwei Subtypen von MVZ identifiziert. Die Typ I-MVZ besitzen eine Reaktivität für den Anti-Villin-AK in ihren apikalen Mikrovilli und im Bereich der basolateralen Zellmembran. Villin

spielt eine Rolle bei der Vernetzung von Aktinfilamenten und wird in Büschelzellen des Gastrointestinaltraktes und des Respirationstraktes gefunden. Dieser Typ ist zahlenmäßig geringer vertreten als die Typ II-MVZ. Diese zeichnen sich durch ein Fehlen des Villin-Antigens aus, sind jedoch reaktiv für AK gegen die Na⁺-K⁺-ATPase, die typischerweise bei am Stofftransport beteiligten Zellen nachweisbar ist.

1.1.4. Horizontale und Globose Basalzellen

Im basalen Kompartiment des OE befinden sich zwei Arten von Basalzellen. Die Horizontalen Basalzellen (HBZ) sind flache, unmittelbar der Basalmembran aufliegende Zellen. Sie exprimieren Zytokeratin 5 und 14, jedoch keine neuronalen Marker (Iwai et al., 2008; Leung et al., 2007, Schwob, 2002).

Retrovirale Abstammungsuntersuchungen und die Expression der neuronalen Transkriptionsfaktoren MASH 1 und Neurogenin 1 (Ngn-1) bei einigen der Globosen Basalzellen (GBZ) haben in der Vergangenheit zu der Annahme geführt, dass die über den HBZ befindlichen GBZ die multipotenten Vorläuferzellen des OE sind, die sowohl ORN-Vorläufer als auch die nicht-neuronalen Zelllinien hervorbringen und regenerieren (Caggiano et al., 1994; Huard et al., 1998).

Kürzliche „fate mapping“ Untersuchungen von Leung et al. (2007) und Iwai et al. (2008) gehen jedoch davon aus, dass postnatal die HBZ und weniger die GBZ die multipotenten Vorläufer sowohl für die neuronale- als auch für die nicht-neuronale Linie des OE sind. Ihren Ergebnissen zufolge entsprechen die GBZ eher einer sehr frühen, transienten Entwicklungsstufe im Reifungsprozess der ORN.

1.1.5. Gangzellen der Bowman-Drüsen

Die Ausführungsgänge der Bowman-Drüsen nehmen einen geradlinigen Verlauf durch das gesamte OE senkrecht zur Basalmembran. Ein Gang durchmisst ca. 2-3 µm und entspringt aus einem Acinus in der Lamina Propria und endet an der luminalen Oberfläche. Die Gangzellen sind schlanke, gestreckte Zellen mit perinukleärer Zytoplasmaaufreibung, die spiralförmig ineinander verschlungen, den Ausführungsgang bilden. Die ovalen Zellkerne durchmessen ca. 5-6 µm und sind somit meist geringfügig größer als die Kerne der ORN. Zudem fällt ihre Lage aus dem streng gegliederten Raster des OE heraus, was als ein weiteres Erkennungsmerkmal herangezogen werden kann.

Sie leiten sich von den HBZ ab (Leung et al., 2007 und Iwai et al., 2008).

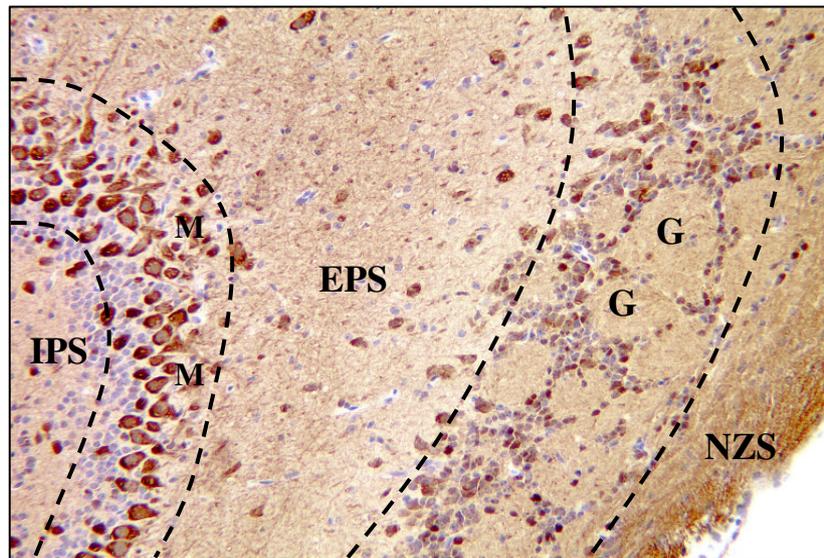
1.1.6. Lamina propria

Unterhalb der Basalmembran des OE schließt sich die Lamina propria an. In ein fibroblastenreiches Stroma sind die Bowman-Drüsen, ein komplexes Netzwerk von Blutgefäßen, die Nervenfaserbündel mit umgebendem Gliagewebe und Zellen der Immunabwehr eingebettet.

Bei den Bowman-Drüsen handelt es sich um tubulo-alveoläre Drüsen, die aus serösen und mukösen Zellen bestehen. Sie bilden den größten Teil des Schleimfilms des OE. Einige Autoren wie Lewis und Dahl (1995) bringen die ausgeprägte Vaskularisation in der Lamina propria der Riechschleimhaut mit deren exponierter Lage in Zusammenhang. So gehen sie davon aus, dass über die Atemluft antransportierte Giftstoffe schneller in den Organismus aufgenommen werden und diese dann zügiger und großflächiger in Kontakt mit den Xenobiotika metabolisierenden Enzymen kommen und abgebaut werden können.

Weiterhin finden sich in der Lamina propria die Olfaktorischen Hüllzellen (OHZ, „ensheathing cells“), welche eine entscheidende Rolle bei der Regeneration des OE spielen. Sie haben sowohl Eigenschaften peripherer Schwann-Zellen, als auch zentraler Astrozyten. Während die beiden letztgenannten sich aus der Neuralleiste beziehungsweise dem Neuralrohr bilden, entwickeln sich die OHZ aus der Riechplakode. Die OHZ bilden eine Führungsschiene für die neu aussprossenden Axone der ORN, so dass diese funktionell den richtigen Anschluss an den passenden Glomerulus im BO finden. Dies ist eine der Ursachen für die weitgehende Konstanz des Geruchssinnes, trotz des kontinuierlichen Ersatzes der ORN (Au und Roskams, 2003).

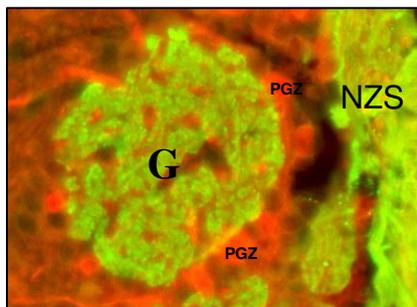
1.2. Bulbus olfactorius



Architektur des Bulbus olfactorius: (NZN) Nervenzellschicht, (G) Glomeruli der glomerulären Schicht, (EPS) externe plexiforme Schicht, (M) Mitralzellen, (IPS) internen plexiforme Schicht / Körnerzellschicht;

Der Bulbus olfactorius (BO) bei Nagern ist ein ovoides, paarig angelegtes Organ und liegt der ventralen Basis des Großhirns an. Nach rostral wird er durch die Lamina cribrosa von der Nasenhöhle abgegrenzt. Bei Mäusen ist der BO ca. 3-5 mm lang und durchmisst ca. 3-4 mm. Lichtmikroskopisch lässt sich eine zwiebelschalenartig angeordnete sechsschichtige Architektur des BO feststellen. Es handelt sich dabei von außen nach innen um die Nervenzellschicht (I), die glomeruläre Schicht (II), die externe plexiforme Schicht (III), die Mitralzellschicht (IV), die innere plexiforme Schicht (V) und die Körnerzellschicht (VI).

Fünf Hauptarten von Neuronen werden innerhalb des BO unterschieden und in der Reihenfolge ihrer zugehörigen Schichten beschrieben. Es handelt sich hierbei um die Periglomerulären Zellen (PGZ), die Büschelzellen, die Mitralzellen, die Körnerzellen und „Short axon cells“.



Die periglomerulären Zellen durchmessen im Schnitt 8 μm . Ihre Perikarya umringen kelchförmig ein Glomerulus (G), wobei meist der oberflächliche Anteil zur Nervenzellschicht (NZN) hin frei bleibt. Ihr dichtes dendritisches Geflecht befindet sich innerhalb der Glomeruli, ohne die angrenzenden Anteile der externen plexiformen Schicht einzubeziehen. Ihre Axone bilden intra- und interglomeruläre Kontakte in einem Radius von ca. 5 Glomeruli.

Die Büschelzellen verteilen sich in drei Subpopulationen in der EPS. Man unterscheidet die tiefen Büschelzellen, deren Perikarya in einem Bereich direkt an der Mitralzellschicht liegen von denen im mittleren und dem oberflächlichen Anteil der EPS. Die oberflächlichen Büschelzellen werden aufgrund ihrer engen örtlichen Beziehung von einigen Autoren mit den Periglomerulären Zellen zur Gruppe der Juxtaglomerulären Zellen zusammengefasst.

Die tiefen Büschelzellen ähneln Mitralzellen und sind mit 15 – 30 μm im Durchmesser meist größer als die mittleren und oberflächlichen, die nur bis 20 μm durchmessen. Die primären Dendriten ziehen zu den Glomeruli, wo sie sich aufzweigen. Sekundäre Dendriten breiten sich horizontal innerhalb der EPS aus und sind bei den oberflächlichen Büschelzellen nur gering ausgeprägt. Die Axone der oberflächlichen und mittleren Büschelzellen zeigen häufige Verzweigungen innerhalb des Bulbus und folgen nur zu einem kleinen Teil dem Tractus olfactorius. Demgegenüber verlassen die Axone der tiefen Büschelzellen ebenso wie die der Mitralzellen den BO über den Tractus olfactorius.

Die Mitralzellen sind 15-30 μm durchmessende Zellen mit meist einem primären Dendriten, der die EPS durchläuft und sich im Bereich der Glomeruli aufzweigt. Eine Mitralzelle steht dabei meist mit fünf bis zwanzig Glomeruli in Kontakt. Man unterscheidet mindestens zwei Subpopulationen von Mitralzellen, die als M1- und M2-Zellen bezeichnet werden, abhängig von der Höhe des Abgangs der sekundären Dendriten. Dabei zweigen die sekundären Dendriten der M1-Zellen vorwiegend im tiefen Anteil der EPS horizontal ab und die der M2-Zellen nahe der glomerulären Schicht. Die sekundären Dendriten beider Gruppen sind häufig mehrere hundert Mikrometer lang und erreichen korrespondierende Bereiche des kontralateralen BO. Am basalen Zellpol entspringt jeweils ein Axon, welches in Richtung Tractus olfactorius zieht. Einige Axone zeigen Aufzweigungen in der Körnerzellschicht.

Bei den Körnerzellen handelt es sich um die zahlenmäßig größte Population im BO. Sie bilden die Körnerzellschicht. Ihre Perikarya sind etwa 6-8 μm groß und besitzen keine Axone. Auch hier werden je nach Lage ihrer Somata mehrere Subtypen unterschieden, wobei sich die Dendriten der oberflächlicher in der Körnerzellschicht gelegenen Körnerzellen erst in der Grenzzone zwischen glomeruläre Schicht und EPS aufzweigen und jene der tiefer liegenden Körnerzellen schon im tiefen Kompartiment der EPS.

Neben den Körnerzellen gibt es in der Körnerzellschicht auch noch „short axon cells“.

Mitral- und Büschelzellen stellen die beiden zentralen Schnittstellen der Signalverarbeitung dar. Sie erhalten ihre Afferenzen aus der Nervenzellschicht und projizieren über den Tractus olfactorius in den Entorhinalen Cortex, die Amygdala, das Tuberculum olfactorium und den piriformen Cortex. Die Körnerzellen, die Periglomerulären Zellen und die „short axon cells“

bilden die zahlenmäßig weit größere Gruppe der Interneurone. Sie moduliert die Signale und bilden die erste Ebene der Signalverarbeitung (Greer, 1991; Au et al., 2002).

1.3. Homöostase im Olfaktorischen Epithel

1.3.1. Wachstums- und Regenerationsprozesse

Das OE eignet sich aufgrund seiner leichten Zugänglichkeit sehr gut zur Untersuchung grundsätzlicher Fragen zu Wachstums- und Regenerationsprozessen.

Vom evolutionären Standpunkt erscheint es sinnvoll, die relativ ungeschützt im OE liegenden ORN schnell ersetzen zu können, da sie via BO eine Eintrittspforte für Noxen und Infektionen in das ZNS darstellen. Schon in den frühen 40er Jahren ist diese Gefahr am Beispiel des Poliomyelitis-Virus untersucht worden (Bodian und Howe, 1941). Gegenwärtige Untersuchungen erwägen auch die Möglichkeit eines nasal eintretenden, neurotrophen Virus als Promotor des M. Parkinson, da schon lange vor der klinischen Manifestation der Erkrankung typische Veränderungen im BO und Tractus olfactorius nachweisbar sind (Hawkes et. al., 2007).

Ein schneller Ersatz der geschädigten ORN reduziert diese Gefahr und erhält die Integrität des Riechsinnes aufrecht (Schwob, 2002).

Daher ist die Suche nach der Quelle der hohen Regenerationsfähigkeit des OE Gegenstand vieler Untersuchungen. Wie bereits unter Punkt 1.1.4 angedeutet, gibt es in der Literatur differierende Meinungen bezüglich der Lokalisation der multipotenten Vorläuferzellen des OE. Untersuchungen von Huard et al. (1998) haben durch Verpflanzung einzelner vektormarkierter GBZ-Klone in ein zuvor durch Methylbromid (MeBr)-Begasung zerstörtes Epithel nachgewiesen, dass aus einigen dieser Vorläuferzellen sowohl neuronale als auch nicht-neuronale Zellreihen wie Stütz- und Mikrovilluszellen entstehen können. Goldstein und Schwob (1995) haben die zuvor genannten Ergebnisse untermauert, indem sie nachgewiesen haben, dass in den ersten Tagen nach Epithelläsion sowohl HBZ als auch Stützzellen Antigene für bestimmte Marker exprimieren, die im normalen OE sonst nur in GBZ und ORN zu finden sind.

Neuere Untersuchungstechniken lassen gegenwärtig jedoch ein anderes Bild entstehen. So sehen Leung et al. (2007) und Iwai et al. (2008) die HBZ als die multipotenten Vorläufer des OE an, die sich selbst als auch die Zellen der Bowmandrüsen und –Gänge, Stützzellen und, über den Zwischenschritt der GBZ, auch die ORN hervorbringen können. Dabei besteht auf

der Ebene der GBZ eine hohe Teilungsaktivität, so dass der physiologische ORN-Ersatz zu einem großen Teil auf dieser Ebene gedeckt werden kann.

Die Lebenserwartung der ORN unterliegt einer großen Schwankungsbreite, wird jedoch im Mittel mit 1 - 3 Monaten angegeben (Graziadei und Monti Graziadei, 1978). Deutlich längere Lebensspannen von bis zu einem Jahr sind beobachtet worden. Dabei scheint das Alter des Tieres eine wichtige Rolle zu spielen (Weiler und Farbman, 1997). Die mittlere Transitionszeit nach der letzten Zellteilung auf Ebene der GBZ bis zu den ausgereiften ORN beträgt nach Schwob und Youngentob (1992) bei Ratten und Mäusen ca. 8-10 Tage.

Aufgrund ihrer Langlebigkeit haben Stützzellen nur eine geringe Teilungsrate. Diese reicht jedoch unter physiologischen Umständen aus, den Zellersatz dieser Population zu sichern (Schwob, 2002).

Nach einer massiven Schädigung des OE z.B. durch Methylbromid - Begasung steigt die Teilungsaktivität der HBZ sprunghaft an, um das OE wieder aufzubauen.

1.3.2. Apoptose

Bei der Apoptose handelt es sich um den sogenannten „programmierten Zelltod“. Dabei wird durch einen endogenen oder exogenen Stimulus ein energieverbrauchender Prozess ausgelöst, in dessen Folge es zu einer koordinierten Auflösung der gesamten Zellstruktur mit anschließender Phagozytose kommt. Eine Entzündungsreaktion bleibt im Gegensatz zur Nekrose aus (Cowan und Roskams, 2002).

Nach Vaux und Strasser (1996) kann die Apoptose in vier Phasen eingeteilt werden. Die erste Phase ist gekennzeichnet durch einen Stimulus, der die Apoptose in Gang setzt. Dieser kann ein exogener, der mit Zelloberflächenrezeptoren reagiert, oder ein endogener sein. Zu den endogenen Stimuli gehören Hypoxie, Strahlung oder Toxine die eine intrazelluläre Veränderung des pH-Wertes oder eine Freisetzung von Radikalen hervorrufen. Daran schließt sich die zweite Phase an, bei der durch die Aktivierung des Rezeptors oder einer Änderung der intrazellulären Homöostase Signalkaskaden in Gang gesetzt werden. In der dritten Phase, der sog. Exekutionsphase, werden Proteasen aktiviert. Die vierte Phase, auch Postmortem-Phase genannt, beinhaltet die Degradation der DNA, die Kondensation des nukleären Chromatins und des Zytoplasmas, die Vakuolisierung der Zelle mit anschließender Lyse der Zellmembran und Phagozytose der Zellreste.

Da sich das olfaktorische Epithel kontinuierlich regeneriert, bedarf es einer feinen Abstimmung von Zellbildung und Apoptose. Fast 50 % der in der Entwicklung befindlichen ORN werden apoptotisch (Mahalik, 1996; Oppenheim, 1991). Es wird davon ausgegangen,

Immer noch offen ist die Frage, ob ein ORN nur einen OR-Typ trägt, wie es in der weit verbreiteten „Ein Neuron – Ein Rezeptortyp“- Hypothese vorgeschlagen wird, oder ob auf einem Neuron mehrere OR exprimiert werden. Laut Mombaerts (2004), der die Hypothese kritisch sieht, können aufgrund der schwierigen technischen Überprüfbarkeit anhand der vorliegenden Daten folgende Schlüsse gezogen werden:

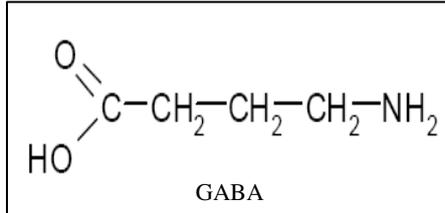
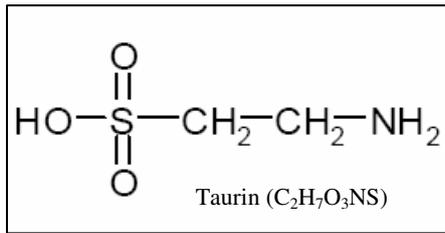
- 1.) die meisten Untersuchungen zu diesem Thema wurden an erwachsenen Versuchstieren gemacht. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass in der embryonalen Entwicklung mehrere OR auf einem ORN exprimiert werden und je nach dem, an welchen Glomerulus des BO das ORN Anschluss bekommt, ein OR-Typ selektioniert wird.
- 2.) Die gängigen Nachweismethoden bei solchen Untersuchungen sind die in-situ-Hybridisierung oder die RT-PCR. Laut Mombaerts (2004) sind Nachteil dieser Methoden, dass sie eventuell nur das am stärksten exprimierte OR-Gen nachweisen und andere, weniger stark vertretene OR-Typen nicht.

Die eigentliche Reiz-Transduktion erfolgt nach Bindung des Liganden am Rezeptor vorwiegend über die G-Protein (G_{olf}) gekoppelte Bildung des second messenger cyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) (Jones und Reed, 1989; Noé und Breer, 1998), welches zyklische Nukleotid-abhängige Kationen-Kanäle (CNG) an den Zilien öffnet. Dies führt zu einem Kationeneinstrom und zu einer Depolarisation der Zellmembran. Durch die Potentialänderung werden zusätzlich spannungsgesteuerte Ca^{++} -Kanäle im Bereich des Somas des ORN geöffnet, wodurch der Pool des intrazellulären Ca^{++} weiter angehoben wird (Schild und Restrepo, 1998). Zytoplasmatische Phosphodiesterasen, die cAMP zu Adenosinmonophosphat abbauen, und Aktivierung der Proteinkinase A beenden die Signalkaskade (Breer und Boekhoff, 1992)

Neben der cAMP-Kaskade können Riechstoffe durch OR-Bindung auch über gasförmige Botenstoffe (Kohlenmonoxid, Stickstoffmonoxid) mittels der Guanylatcyclase zur Bildung des zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) führen, welches wiederum CNG öffnet (Breer und Shepherd, 1993).

Über den Stellenwert des Inositol-1-4-5-trisphosphat (IP_3)-Weges bei der Signaltransduktion wird noch diskutiert (Spehr et al., 2002).

1.5. Taurin: Physiologische Wirkungen im ZNS



Die schwefelhaltige β -Aminosäure Taurin (2-Aminoethansulfonsäure) kommt bei Algen und im gesamten Tierreich einschließlich der Säugetiere und Insekten vor. In der Pflanzenwelt ist es, wenn überhaupt, nur in Spuren nachweisbar (Huxtable, 1992).

Im Bereich der NH₂-Gruppe besteht eine gewisse strukturelle Analogie zu γ -Aminobuttersäure (GABA), was miterklärend für einen Teil der Taurinwirkung im ZNS zu sein scheint.

Herbivoren können Taurin, welches ein Abbauprodukt der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein ist, herstellen, indem sie letztere durch das Enzym Cysteinsulfonatdecarboxylase CSAD (cysteine sulfinic acid decarboxylase) zu Hypotaurin decarboxylieren und anschließend mittels der Hypotaurin-Dehydrogenase zu Taurin oxidieren. Karnivoren, z.B. Katzen, sind auf die diätetische Zufuhr angewiesen (Pow et al., 2002). Nager können Taurin zu einem hohen Prozentsatz selbst bilden. Für den Menschen als Omnivoren wird Taurin als „bedingt essentielle“ Aminosäure angesehen, da er dieses zu einem bestimmten Prozentsatz selbst synthetisieren kann. Eine diätetische Zuführung ist bei Frühgeborenen und nicht durch Muttermilch aufgezogene Säuglinge, als auch bei Menschen mit schweren Leber- oder Nierenleiden sowie längerfristig parenteral ernährten Patienten erforderlich (Lourenço und Camilo, 2002).

Der Taurinbestand eines 70-kg wiegenden Menschen beläuft sich auf bis zu 70 g (560 mmol), wobei es nicht gleichmäßig im Organismus verteilt ist. Die höchsten Gewebkonzentrationen finden sich im Gehirn und im Herz. Im Gehirn übersteigt Taurin sogar die intrazelluläre Konzentration des Neurotransmitters GABA und, während der Gehirnentwicklung, auch die von Glutamat (Davis und Himwich, 1973; Huxtable, 1992).

Absolut gesehen befindet sich jedoch das meiste Taurin in der Muskulatur. Die Gewebsflüssigkeiten wie Plasma, Liquor cerebrospinalis oder die extrazelluläre Flüssigkeit enthalten deutlich weniger Taurin.

Physikochemische Eigenschaften des Taurins

Die Sulfongruppe des Taurins kann im Gegensatz zu der Carboxylgruppe der anderen Aminosäuren keine Peptidbindung eingehen. Der Aufbau großer Polypeptidketten, wie sie in

Proteinen zu finden sind, unterbleibt daher (Bretz, 2002). Folglich liegt Taurin bei Säugetieren ubiquitär zytosolisch in hoher, freier Konzentration vor (Huxtable, 1992).

Weiterhin liegt Taurin aufgrund der stark sauren Sulfongruppe im physiologischen pH-Bereich als Zwitterion vor. Daraus ergibt sich eine hohe Hydro- und geringe Lipophilie. Damit wird ein Übertritt durch Lipid-Doppelmembranen, wenn man von Transportersystemen absieht, fast unmöglich.

Die beiden letztgenannten Eigenschaften sind unabdingbare Voraussetzungen für die am besten beschriebene und, neben der Gallensalzbildung als Taurocholsäure, ältesten Funktion des Taurins, nämlich der Osmoregulation.

Darüber hinaus wird im Folgenden auch auf den Einfluss des Taurins auf Ca^{++} -abhängige Prozesse, als Fänger freier Radikale und seine Interaktion mit bestimmten Proteinen (z.B. GABA_A - und GABA_B -Rezeptoren im Kortex und BO) eingegangen.

Osmoregulation

Osmoregulation wird bei Zellen nötig, die bezogen auf das intrazelluläre Milieu, einem hyper- oder hyposmolaren Umgebungsmilieu ausgesetzt sind, wie es z.B. bei Gangzellen der Speicheldrüsen der Fall ist. Zum anderen ist sie überall dort wichtig, wo elektrische Potentiale über Membranen aufgebaut werden, sei es an Nerven- oder Muskelzellen. Die Imbalance der Ionen über der Membran würde auch zu einer osmotischen Imbalance und konsekutiv zu einer Schrumpfung oder Überblähung der Zelle mit Ruptur der Zellmembran führen (Huxtable, 1992). Die meisten Bakterien und Pflanzenzellen kommen aufgrund einer festen Zellwand ohne osmoregulatorische Mechanismen aus.

Durch das Vorliegen eines spezifischen β -Aminosäure-Transporters, bei dem gleichzeitig 1-3 Na^+ -Ionen co-transportiert werden, kann für Taurin ein sehr hoher intra- zu extrazellulärer Gradient aufgebaut werden (Nervenzellen im Gehirn 500:1, Retina 400:1). Gleichzeitig werden die in die Zelle mittransportierten Na^+ -Ionen über die Na^+ - K^+ -ATPase wieder nach extrazellulär befördert. Somit reagiert die intrazelluläre Taurinkonzentration direkt auf Ionenverschiebungen und wirkt daher osmoregulatorisch. Weiterhin verhält sich Taurin im physiologischen pH-Bereich elektroneutral, so dass bestehende Membranpotentiale nicht wesentlich beeinflusst werden.

Modulation Ca^{++} -abhängiger Prozesse

Eine weitere grundlegende Funktion des Taurins besteht in der Modulation Ca^{++} -abhängiger Prozesse im Organismus. Am Herzmuskel erhöht Taurin die Inotropie bei subnormalen Ca^{++} -

Konzentrationen, senkt diese aber bei Ca^{++} -überladendem Herzmuskel. Auch schützt Taurin am Schweineherz vor ventrikulären Arrhythmien nach wiederholten Hypoxie-Reoxygenierungsphasen. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist Taurin in Japan Bestandteil der Herzinsuffizienztherapie (Azuma et al. 1985). Taurin wirkt allerdings weder über β -adrenerge- oder H_2 -Rezeptoren, noch führt es zu einer Änderung der cAMP-Konzentrationen oder einer Beeinflussung der Na^+ - K^+ -ATPase (Sawamura et al., 1983; Franconi et al., 1984). Vielmehr wird davon ausgegangen, dass Taurin direkt an den Ca^{++} -Kanal-Proteinen angreift und diese sensibilisiert bzw. die Kinetik der Kanalöffnung verändert (Huxtable, 1992).

Taurin als Radikalfänger

Über den Taurin-Hypotaurin-Weg können freie Radikale, die ständig bei Oxidationsvorgängen in den Zellen entstehen, unschädlich gemacht werden. Hierbei nimmt Hypotaurin ein Elektron von einem Hydroxyl-Radikal auf, welches dann als normale Hydroxylgruppe gebunden werden kann. Das dabei entstandene, hochenergetische Hypotaurin-Radikal dimerisiert unter Bildung eines α -Disulfons, welches seinerseits isomolar zu Taurin und Hypotaurin hydrolysiert wird (Fellman und Roth, 1985).

Dieser Mechanismus scheint eine große Bedeutung in den Reproduktionsorganen männlicher Säugetiere zu haben, da insbesondere Sperma und Spermatozoen reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind, die sehr anfällig für Oxidation durch freie Radikale sind. Bezogen auf den Gesamtorganismus werden hier auch die höchsten Konzentrationen von Hypotaurin und immerhin hohe Konzentrationen von Taurin gefunden (Meizel et al., 1980).

Weiterhin verfügen Spermatozoen weder über Katalase noch über Glutathion-Peroxidase, die sonst am Abbau freier Radikale beteiligt sind. Daher kommt dem obigen Kreislauf ein hoher Stellenwert zu. Dies gilt insbesondere bei der Ejakulation und dem daraus resultierenden Wechsel in ein Milieu hoher Sauerstoffspannung (Bildung von Superoxiden) (Huxtable, 1992).

Darüber hinaus scheint Taurin große Bedeutung als Radikalfänger in der Photorezeptorschicht der Retina zu haben. Heller-Stilb et al. (2002) vermuten, dass die hohe natürliche Taurin-Konzentration in der Retina und insbesondere in der Photorezeptorschicht Teil eines Schutzmechanismus gegen die durch den Lichteinfall in das Auge induzierten freien Radikale ist. Sie konnten an Taurintransporter Knockout-Mäusen, deren intraokuläre Taurinkonzentrationen gegenüber den Wildtypen um 74% reduziert waren, nachweisen, dass die postnatal regulär angelegten Photorezeptoren innerhalb von wenigen Wochen degenerierten und in die Apoptose übergingen. Darüber hinaus kommt es auch bei in kompletter Dunkelheit

gehaltenen *taut*^{-/-} Mäusen zu einer retinalen Degeneration, die jedoch langsamer progredient ist (Rascher et al., 2004). Daher ist anzunehmen, dass Taurin über die Funktion als Radikalfänger hinaus weitere wichtige Eigenschaften zum Erhalt der Homöostase ausgereifter Photorezeptoren hat.

Über die Funktion als Osmoregulator und Antioxidans hinaus scheint Taurin auch eine trophische Wirkung und eine retinale Beeinflussung des Ca⁺⁺-Transportes zu haben, da Katzen, die im Dunklen aufgezogen wurden und auf eine diätetische Taurinzufuhr angewiesen sind, trotz des fehlenden Radikalinduktors Licht ähnliche retinale Degenerationen aufwiesen (Heller-Stilb et al., 2002; Huxtable, 1992).

Taurin-Protein-Interaktionen im ZNS

Bezogen auf das Gehirn wird diskutiert, ob Taurin ebenso wie die strukturverwandten Transmittersubstanzen GABA und Glycin ein echter Neurotransmitter ist, oder ob ihm eine Funktion als „Neuromodulator“ zukommt. Ersteres würde voraussetzen, dass man eine andere als die bis jetzt bekannte Taurin-Rezeptor-Interaktion am *Taut*-Transporter nachweisen könnte. Zwar konnten unter bestimmten experimentellen Umständen eine Na⁺-unabhängige, also keine *Taut*-Transporter involvierende, Taurinbindung im Gehirn von Mäusen nachgewiesen werden. Jedoch ist fraglich, ob das wenig gewebeschonende Vorgehen bei diesem Versuch nicht zu artifiziellen Ergebnissen geführt haben könnte (Huxtable, 1992).

Neben einer spezifischen Bindungsstelle würde man für einen Neurotransmitter auch eine durch Depolarisation getriggerte Freisetzung aus Nervenendigungen fordern. Zumindest am BO konnte durch induzierte Depolarisationen keine daraus resultierende erhöhte extrazelluläre Konzentration des Taurins nachgewiesen werden (Kamisaki et al., 1996). Demgegenüber zeigten andere Arbeitsgruppen, dass durch die pharmakologische Stimulation von Glutamat-Rezeptoren die extrazellulären Taurinspiegel stiegen (Menéndez et al., 1989; Shibanoki et al., 1993). Diese Aktivierung erfolgte via NMDA-Rezeptoren.

Zumindest ein Teil der bekannten Wirkmechanismen des Taurins im ZNS kann auf die Funktion als möglicher Neuromodulator zurückgeführt werden. So kommt es beispielsweise während der Ausschüttung eines Neurotransmitters aus präsynaptischen Vesikeln zur Co-Ausschüttung von Taurin, welches seinerseits über präsynaptische Rezeptoren die Freisetzung des Neurotransmitters beeinflusst, also moduliert. Dieser Vorgang soll später am Beispiel des GABA_B-Rezeptors verdeutlicht werden.

Taurin besitzt ähnliche inhibitorische Effekte auf die Neuronenaktivität wie GABA und Glycin (Kamisaki et al., 1996; Pow et al., 2002; Sakata et al., 2003; Belluzzi et al., 2004). Es

konnte nachgewiesen werden, dass Taurin als Agonist direkt an der GABA-Bindungsstelle des GABA_A-Rezeptor-Komplexes angreift und daraufhin die Cl⁻-Leitfähigkeit der Zellmembran ansteigt. Weiterhin ist der beschriebene Effekt nicht von einer eventuellen GABA Freisetzung abhängig, da der erhöhte Cl⁻-Flux auch unter Blockade der GABA-Freisetzung weiter besteht (Belluzzi et al., 2004). Taurin hat zwar an GABA_A-Rezeptoren der Mitral- und Büschelzellen des BO einen nachweislichen Effekt, jedoch sprechen die GABA_A-Rezeptoren der Periglomerulären- und der Körnerzellen des BO nicht auf Taurin an. Es wurden über 15 Formen des GABA_A-Rezeptors nachgewiesen, die sich in ihrer Zusammensetzung der Untereinheiten unterscheiden (Belluzzi et al., 2004). Offensichtlich hat Taurin diesbezüglich eine hohe Selektivität und bindet nur an GABA_A-Rezeptoren mit den Untereinheiten $\alpha 1$ und $\beta 2$ mit einem über einen Cl⁻-Einstrom vermittelten hyperpolarisierenden Effekt.

Weiterhin dämpft Taurin mittels der Aktivierung präsynaptischer GABA_B-Rezeptoren die potentialgetriggerte GABA-Freisetzung in den synaptischen Spalt (Belluzzi et al., 2004). Wie oben angedeutet, moduliert Taurin also mehr die Abläufe, als dass es selbst als klassischer Neurotransmitter in Erscheinung tritt (Kamisaki et al., 1996).

Taurin und Neurogenese

Bei Säugetieren ist Taurin während der Neurogenese die Aminosäure mit der höchsten freien Konzentration. Erst im ausgereiften Gehirn wird sie von Glutamat übertroffen (Huxtable, 1989). An Goldfischen und an Säugetieren konnte ein axonaler Transport von Taurin nachgewiesen werden. Dieser war in der Phase der Axonaussprossung besonders hoch. Erst nachdem das Axon seine Zielstrukturen erreicht hatte, sank der Spiegel des axonal transportierten Taurins wieder ab. Im gleichen Maße, wie der Taurinspiegel sank, stieg jedoch die elektrische Aktivität an den neu gebildeten Synapsen (Sturman, 1993). Diese Beobachtung lässt sich gut mit den oben genannten Befunden in Einklang bringen, dass Taurin durch seine Wirkung am GABA-Rezeptorkomplex zu einem Cl⁻-Einstrom führt und es konsekutiv zu einer Hyperpolarisation kommt. Somit wirkt es indirekt als Wachstumsfaktor bei der Axogenese. Darüber hinaus ist nachgewiesen, dass es entscheidend an der Regulation der Neurogenese mitwirkt (El Idrissi et al., 1998; Oja et al., 1990; Trenkner, 1990).

2. Ziel und Fragestellung der Arbeit

Taurin kommt in hoher Konzentration im ZNS vor und übersteigt während der Neurogenese in der Retina, dem Kleinhirn und im Bulbus olfactorius sogar die Konzentration der klassischen Neurotransmitter Glutamat und GABA.

Da Taurin unter physiologischen Bedingungen als Zwitterion vorliegt, ist ein transmembranaler Übertritt nur mit einem Transportersystem möglich. Eine Inaktivierung des Transportes durch einen genetischen Knockout führt zu einem intrazellulären Taurinmangel. Ziel dieser Arbeit ist es gewesen herauszufinden, ob ein durch Taurintransporter-Knockout induzierter, intrazellulärer Taurinmangel zu ähnlich gravierenden morphologischen Veränderungen im olfaktorischen Epithel führt wie beispielsweise an der Retina (Heller-Stilb et al., 2002) oder im Kleinhirn (Sturman, 1993). Zu diesem Zweck ist an Taurintransporter-Knockout Mäusen (*taut*^{-/-}) untersucht worden, welche Auswirkungen der Taurinmangel

(1) auf das immunhistochemische Profil und

(2) auf den Umsatz der am olfaktorischen Epithel beteiligten Zelllinien hat.

1. Die qualitative histochemische Beurteilung der ORN erfolgt mit Antikörpern gegen den neuronalen Marker OMP (Olfaktorisches Marker Protein). Die Beurteilung der Stützzellen erfolgt mit Markern für Cytokeratin, Taurin und HSP 25. Letzteres schützt als Chaperon wichtige zelluläre Proteine und wird bei vermehrtem Zellstress hochreguliert, sodass hierdurch indirekte Aussagen über den Zustand des OE getroffen werden können. Mit dem Cytokeratinmarker lassen sich darüber hinaus auch die HBZ sowie die MVZ charakterisieren. Der Antikörper gegen Taurin gibt Aufschluss über die Wirksamkeit des Taurintransporter-Knockout.
2. Quantitativ wird die Zahl der OMP positiven, ausgereiften ORN und die der nur PGP 9.5 positiven, unreifen ORN ausgewertet. Aus dem Verhältnis lassen sich Rückschlüsse über die Wachstumsdynamik der ORN ziehen. Weitere Informationen werden durch die Verwendung des Proliferationsmarkers Ki-67 und des Apoptosemarkers Caspase 3 gewonnen.

Alle Ergebnisse werden mit denen gleichartig behandelter Wildtyp-Tiere (*taut*^{+/+}) verglichen und statistisch ausgewertet.

3. Material und Methoden

3.1. Herkunft und genetischer Hintergrund der Tiere

Die Herstellung, Aufzucht und Tötung der Tiere erfolgte an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Heller-Stilb et al., 2002).

Die Taurintransporter-Knockout Mäuse (*taut -/-*) wurden durch homologe Rekombination hergestellt und hatten einen gemischten genetischen Hintergrund (C57Bl/6 x 129S1/SvImJ) (Heller-Stilb et al., 2002). Wildtypmäuse (*taut +/+*) dienten als Kontrolltiere. Das Körpergewicht der 18 Monate alten *taut -/-* Tiere war, verglichen mit den gleichalten Kontrolltieren, reduziert (etwa 30g vs. 40g Gesamtkörpergewicht; Tabelle 1 in (Heller-Stilb et al., 2002)). Die Mäuse wuchsen mit einem 12-12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus auf. Beide Gruppen erhielten die gleiche Ernährung und bekamen Wasser ad libitum.

Die Tiere wurden entsprechend den Regeln und Richtlinien der dortigen Ethikkommission behandelt.

Verwendete Tiere:

	Alter				Anzahl
	3 Wochen (m/f)	6 Wochen (m/f)	3 Monate (m/f)	18 Monate (m/f)	
<i>TAUT -/-</i>	8 (3/5)	7 (7/0)	3 (3)	4 (1/3)	22
<i>TAUT +/-</i>	8 (4/4)	13 (8/5)	-	5 (2/3)	26
<i>TAUT +/+</i>	7 (3/4)	6 (5/1)	3 (3/0)	2 (1/1)	18

m = ♂, f = ♀; *taut -/-* = KO-Tiere, *taut +/-* = Heterozygote Tiere, *taut +/+* = Wildtyp Tiere

3.2. Gewebeaufarbeitung und Gewinnung der Schnitte

Die mit Ether anästhesierten Tiere wurden mit einer Lösung aus 4% Paraformaldehyd ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$) und 0,5% Glutaraldehyd ($\text{HCO}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$) perfundiert (Heller-Stilb et al., 2002) und anschließend dekapitiert. Dann blieben die Köpfe für weitere 24 Stunden in einer gleichartigen Lösung. Diese Arbeitsschritte erfolgten in Düsseldorf.

3.2.1. Grobzuschnitt der Proben

Nach Erhalt der in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) eingebetteten Köpfe sind diese zunächst auf äußerlich erkennbare pathologische Veränderungen oder Präparationsschäden hin beurteilt worden. Anschließend sind die Masseteren beidseits durchschnitten und die Unterkiefer vom Schädel getrennt worden. Nach median-sagittaler Inzision zwischen den oberen Schneidezähnen ist der Oberkiefer leicht gespreizt und die Schneidezähne entfernt worden. Anschließend ist der Schädel im Bereich der Kalotte gründlich von Gewebe befreit und diese anschließend großräumig eröffnet worden, so dass der rostrale Anteil des Großhirns sowie die davor liegenden Bulbi olfactorii zur Darstellung gekommen sind.

3.2.2. Vorbereitung der Objektträger (OT)

Zur Gewährleistung einer guten Bindung der Schnitte an die Glasoberfläche des OT, insbesondere bei Mikrowellenvorbehandlung, werden diese zunächst silanisiert Punkt 9.1. (im Anhang).

3.2.3. Entkalkung und Einbettung

Nach einer neuerlichen Spülung in PBS sind die präparierten Köpfe bei Raumtemperatur größenadaptiert für 6 bis 24 Stunden in 1% Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA $[(\text{HOOCCH}_2)_2\text{NCH}_2)_2]$) dekalzifiziert worden.

Dem hat sich eine Spülung in Aqua dest. und eine Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (Aqua dest., 40%iger-, 70%iger-, 96%iger und absoluter Alkohol) angeschlossen.

In Gussformen sind die Präparate in sagittaler Ausrichtung orientiert, mit Paraplast verfüllt und mit einem Wachsblocckträger versehen worden. Die sagittale Schnittführung hat den Vorteil, dass sowohl das Riechepithel als auch der Bulbus olfactorius auf einem Schnitt sichtbar gemacht werden können.

3.2.4. Schnitte

Für die immunhistochemischen Reaktionen ist eine Schnittdicke von 5µm verwendet worden, was etwa dem Querdurchmesser der im OE am häufigsten vorkommenden Zellkerne, den ORN und Stützzellen, entspricht. Hiermit ist gewährleistet worden, dass möglichst nur eine Schicht der interessierenden Zellen erfasst worden ist. Dies ist insbesondere bei der späteren quantitativen Auswertung von Bedeutung gewesen. Die Schnitte für die Immunfluoreszenz haben eine Dicke von 10-15µm gehabt.

Am Mikrotom (Jung RM 2065, Leica Instruments GmbH) ist zunächst in sagittaler Schnittführung mit 20µm dicken Schnitten eine Annäherung bis zum beginnenden BO erfolgt. Dies ist regelmäßig mikroskopisch durch hämatoxylingefärbte Kontrollen überprüft worden. Im Zielgebiet sind 30-60 Serienschnitte (à 5µm Dicke (10-15µm bei Immunfluoreszenz)) angefertigt, auf ein Wasserbad übertragen und nach Glättung durch Erwärmung auf die silanisierten Objektträger aufgezogen worden.

3.3. Hämatoxylin-Färbung

Vor jeder Schnittserie und nach jeweils 10 weiteren Schnitten ist eine Hämatoxylin-Färbung Punkt 9.2. (im Anhang) angefertigt worden. Somit ist sichergestellt worden, dass auch alle Schnittserien vergleichbare Startpunkte gehabt haben. Dies ist besonders bei quantitativen Aussagen in der Auswertung von Bedeutung gewesen.

3.4. Immunhistochemische Reaktionen

Die Rezepturen der Pufferlösungen sind unter Punkt 9.2. (im Anhang) einzusehen. Für die immunhistochemischen Reaktionen ist die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (ABC-Methode) angewendet worden, welche detailliert unter Punkt 9.3. (im Anhang) beschrieben ist.

3.4.1. Antikörper

1. Antikörper	MAK/ PAK	Quelle	Verdünnung	2. Antikörper / (Kit-Nr.)	Vor- behandlung
Olfaktorisches Markerprotein (OMP)	PAK (goat)	Dr. F. Margolis, University of Maryland, Baltimore, USA	1:6000	Vector laboratories, Goat Kit, Rabbit anti Goat, 1:300, (PK 6104)	Mikrowelle (800W)
Protein-Gen- Produkt 9.5 (PGP 9.5)	PAK (rabbit)	Biotrend, Cologne, Germany	1:6000	Dako, polyclonal, swine anti Rabbit, 1:400, (Ch.: 028(201))	Mikrowelle (800W)
Taurin	PAK	Chemicon, Temecula, CA, USA	1:1000	Dako, polyclonal, swine anti Rabbit, 1:400, (Ch.: 028(201))	-
Hitzeschock- Protein 25 (HSP 25)	PAK (rabbit)	Stressgen Biotechnologies, Victoria, Canada	1:1000	Dako, polyclonal, swine anti Rabbit, 1:400, (Ch.: 028(201))	Mikrowelle (800W)
Ki-67 (Tec-3)	MAK (rat)	Dako	1:10	(Biotinylated) anti Rat (mouse adsorbant), Vector laboratories, (BA 4001)	Mikrowelle (800W)
Caspase 3 (aktiv)	MAK (rabbit)	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA	1:20	Vector laboratories, Rabbit Kit	Mikrowelle (800W)

Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	PAK (rabbit)	Dako, Hamburg, Germany	1:1000	Dako, polyclonal, swine anti Rabbit, 1:400, (Ch.: 028(201))	Mikrowelle (800W)
S-100	PAK (rabbit)	Dako	1:2000	Dako, polyclonal, swine anti Rabbit, 1:400, (Ch.: 028(201))	Pronase
Cytokeratin (Z 622)	PAK (rabbit)	Dako	1:500	Dako, polyclonal, swine anti Rabbit, 1:400, (Ch.: 028(201))	Pronase

Bindungsstellen im OE und OB und mögliche Funktionen

1. Antikörper	Olfaktorisches Epithel/ Lamina Propria	Bulbus olfactorius (BO)	Mögliche Funktion	Quellen
OMP	Ausgereifte ORN	NZS, ORN-Endigungen in der glomerulären Schicht	Zelldifferenzierung	(Margolis, 1982; Baldisseri et al., 2002)
PGP 9.5	Neuronale Zellen, Neuroendokrine Zellen	NZS, periglomeruläre Zellen, Büschelzellen, Mitralzellen	Neuronenartige Eigenschaften	(Nosrat et al., 2000)
Taurin	Stützzellen, (ORN?)	Nervenfasern aus der Körnerzellschicht und EPS bis periglomerulär (Afferente Fasern aus dem kontralateralen Bulbus?)	Osmoregulation, Antioxidanz, Ausreifung neuronalen Gewebes	(Huxtable, 1992 rev.), (Kratskin et al., 2000b), (Sturman, 1993 rev.)
HSP 25	Stützzellen, Horizontale (?) Basalzellen	Pia mater, Endothel, Mitralzellen?	Proteinreparation nach Zellstress, Chaperon	(Carr et al., 2001)
Ki-67	(Proliferierende) Basalzellen	-	Marker für mitotische Zellen	(Scholzen und Gerdes, 2000; Ohta et al., 2000)
GFAP	OHZ der Lamina propria	Astrozyten in Körnerzellschicht	Intermediärfilament von Astrozyten	(Mackay-Sim und Chuah, 2000)
S-100	OHZ der Lamina propria; Untergruppe der ORN?	OHZ der NZS	-	(Yamagishi et al., 1992)
Cytokeratin (CK, Z622)	Stützzellen, Basalzellen	-	Marker für nicht neuronale epitheliale Zellen im OE	(Yamagishi et al., 1989)
Caspase 3	Apoptotische ORN	-	Enzym des programmierten Zelltodes	(Cowan und Roskams, 2002)

3.4.2. Immunfluoreszenz

In dieser Arbeit hat weiterhin die indirekte Immunfluoreszenz Verwendung gefunden. Die Doppelimmunfluoreszenz ist verwendet worden, um zwei Antigene gleichzeitig an einem Schnitt mit unterschiedlichen Fluorochromen nachweisen zu können Punkt 9.4. (im Anhang).

3.4.3. Kontrollen

Bei jedem Experiment sind Kontrollen mitgelaufen, bei denen anstelle des 1.AK nur Pufferlösung aufgebracht worden ist. Dadurch konnte nachgewiesen werden, ob die Peroxidasereaktion mit nachfolgender Entwicklung des Chromogens auch in Abwesenheit eines 1.AK (also unspezifisch) abgelaufen ist. Mögliche Fehlerquellen, die zu solch einer Reaktion geführt haben können, sind eine nicht ausreichend geblockte endogene Peroxidaseaktivität (nicht bei IFL), verunreinigte OT oder eine zu lange Entwicklungszeit des Chromogens Diaminobenzidin (DAB).

Positivkontrollen sind ebenfalls durchgeführt worden.

3.5. Datenerhebung

3.5.1. Qualitative Auswertung

Alle Reaktionen sind zunächst qualitativ beurteilt worden, wobei insbesondere Faktoren wie Intensität und die Verteilung der Immunoreaktivität (IR) eine wichtige Rolle gespielt haben.

3.5.2. Quantitative Auswertung

Neben der qualitativen immunhistochemischen Analyse ist eine Untersuchung zu quantitativen Unterschieden zwischen *taut+/+* und *taut-/-* Mäusen, hier insbesondere der Zusammenhang zwischen unreifen und ausgereiften ORN in beiden Gruppen durchgeführt worden. Da OMP nur in ausgereiften ORN exprimiert wird, sind über eine definierte Distanz des OE OMP positive Zellen stellvertretend für ausgereifte ORN und PGP 9.5-positive Zellen für die Gesamtzahl der neuronalen Zellen gezählt worden. Die Proliferationstätigkeit ist durch Zählung der Ki-67-reaktiven Nuklei bestimmt worden.

Darüber hinaus ist die Anzahl der Stützzellen sowie die Dicke des OE in dem definierten Areal ermittelt worden. Bei letzterem ist hierfür die Zahl der OMP-positiven Zellkerne in einer Säule des OE, das heißt diejenigen Kerne, die in einer Reihe übereinander, senkrecht zur Basalmembran stehen, gezählt worden. Die charakteristische Lage der ORN in Säulen (Farbman et al., 1988) spiegelt die Aktivität und den Reifegrad des OE wieder.

Um das Probenmaterial optimal zu nutzen, ist eine paramedian-sagittale Schnittführung gewählt worden, die die Nasenmuscheln und den Bulbus olfactorius gleichzeitig zur Darstellung gebracht hat. Darüber hinaus ist es bei der gewählten Schnittführung möglich gewesen, den Verlauf der Nervenfaserbündel und deren Durchgang durch die Lamina cribrosa zu erfassen.

Die dargestellten Ebenen der in dieser Arbeit verwendeten (sagittalen) Schnittführung entsprechen annähernd den senkrecht dazu stehenden koronaren Ebenen 4 bis 6 in der Darstellung nach Weiler und Farbman (1997). Von der sagittalen Ebene ausgehend, unterscheidet man drei Areale der Nasenhöhle: den dorsalen, den mittleren und den ventralen Bereich (Abb. 1). Nach Liebich (1975) entspricht der dorsale Bereich den Nasenmuscheln I und II nahe dem Knochen des Nasenbeins, der mittlere Bereich den Muscheln II und III und der ventrale Bereich den Nasenmuscheln III und IV nahe dem knöchernen Gaumen.

Aus diesen Betrachtungen geht hervor, dass in dieser Arbeit eher medial gelegene Nasenmuscheln einbezogen worden sind.

Übersicht der Quantitativ ausgewerteten Untersuchungen:

Beschreibung	n (<i>taut</i> ^{-/-}) jung/alt	n (<i>taut</i> ^{+/+} ; <i>taut</i> ^{+/-}) jung/alt	Strecke des OE (µm)	gezeigt in Abbildung
OE Dicke: Anzahl der Schichten der OMP-pos. Zellen im OE	7/4	11/6	3 Kolumnen gezählt/ 100 µm	Abbildung 2
Co-Lokalisation: Anzahl der PGP 9.5 vs. OMP-pos. Zellen	2/2	3/3	450	Abbildung 6
Anzahl der OMP-pos. Zellen	7/4	11/6	100	Abbildung 1
Proliferation: Anzahl der Ki-67 pos. Zellen	8/4	8/7	500	Abbildung 3
Anzahl der Stützzellen	7/4	11/6	100	Abbildung 7
Caspase 3	6	9	Ganzschnitt	Abbildung 5

jung = 3/10 Wochen alte Tiere, alt = 18 Monate alte Tiere; *taut*^{-/-} = KO-Tiere, *taut*^{+/-} = Heterozygote Tiere, *taut*^{+/+} = Wildtyp Tiere

3.5.2.1. Zählregime

Alle Zählungen sind mit Hilfe des computergestützten morphometrischen Analysesystems ANALYSIS (Münster, Deutschland) durchgeführt worden. Die Schnitte sind auf einem Olympus BX 60 F5 Mikroskop mit Plan-Apo-Objektiven (Vergrößerungen von 20- bis 60-fach), welches mit einer CCD-Kamera verbunden ist, fotografiert und ausgewertet worden.

Insgesamt ist angestrebt worden, Zählungen nur in geraden, gleichmäßig dicken Abschnitten des olfaktorischen Epithels durchzuführen. Der konvex gebogene Übergangsbereich von einer Nasenmuschel zur nächsten nahe der Lamina cribrosa ist gemieden worden, da das Epithel dort eine schwankende Dicke aufweist (Weiler und Farbman, 1998).

Stützzellen, sowie junge und ausgereifte ORN sind in getrennten Gruppen ausgezählt und anhand ihrer charakteristischen Lage im OE, der Form und Größe des Kerns sowie des perinukleären Zytoplasmas (Stützzellen) und ihrer spezifischen immunhistochemischen Charakteristika (OMP und PGP 9.5 bei ORN) identifiziert worden.

Im Gegensatz zu der Epitheldickenbestimmung durch häufige Messungen über sehr lange Bereiche des OE (Weiler und Farbman, 1998), ist hier die unter Punkt 3.5.2. beschriebene Zählung der Kerne pro Säule durchgeführt worden, da hierdurch Mittelungs- und Zählfehler, die durch tangential geschnittenes OE entstehen können, minimiert werden.

Um das Problem des tangential angeschnittenen OE und die daraus resultierende Fehlerquelle bei der Bestimmung der Zellzahl so gering wie möglich zu halten, haben die ausgezählten Bereiche des OE folgende Kriterien zu erfüllen gehabt:

- 1.) Strikt longitudinaler Verlauf des OE und parallel zur Schnittebene verlaufende Säulen, d.h. ein ORN-Zellkern sollte genau über dem anderen stehen.
- 2.) Das supranukleäre Zytoplasma der Stützzellen sollte immer eine gleiche Dicke zwischen apikalem Pol des Zellkerns und der Zelloberfläche aufweisen.
- 3.) Die basalen Zellfortsätze der OMP- oder PGP 9.5-positiven Zellen sollten bis zur Basalmembran verfolgbar sein.

Bei der Schnittdicke von 5 μm ist nur jeder dritte Schnitt einer Serie ausgezählt worden. Durch dieses 10 μm dicke Intervall ist eine Doppelzählung von Kernen, die in zwei benachbarten Schnitten zur Darstellung kommen, vermieden worden.

Abhängig von der zu bestimmenden Zellart ist über die auszählenden Bilder ein Zählrahmen von 100 bis 500 μm Länge gelegt worden. Die Zählung ist an drei Schnitten pro Tier, jeweils

in jeder der drei oben beschriebenen Bereiche (dorsaler-, mittlerer- und ventraler Bereich) wiederholt und anschließend gemittelt worden.

Das Geschlecht der Tiere ist nicht berücksichtigt worden, da aus Untersuchungen von Weiler und Farbman (1997) bekannt war, dass es zwar signifikante Geschlechtsunterschiede bezüglich des Körpergewichtes und der Wachstumsgeschwindigkeit der Tiere gab, jedoch keine Unterschiede hinsichtlich der Wachstumsparameter des OE.

3.5.2.2. Korrektur der Rohdaten

Um nicht fälschlicherweise angeschnittene, nicht zur betrachteten Schicht gehörige, Zellkerne zu erfassen, sind die gewonnenen Rohdaten durch die Formel nach Abercrombie (1946) wie folgt korrigiert worden: es gilt die Gleichung $N_C = N_R \times CF$, wobei N_C die korrigierte Zellzahl, N_R die Rohzellzahl und CF der Abercrombie Korrekturfaktor $CF = t / (t + D)$ ist. Bei letzterem steht t für die Schnittdicke (in μm ; hier $5 \mu\text{m}$) und D für den Durchmesser der Zellkerne (in μm ; z.B. ORN-Kerne: $D = 5 \mu\text{m}$). Daraus folgt $CF = 5 / (5 + 5) = 0.5$ und somit $N_C = N_R \times 0.5$. Mit Hilfe des ANALYSIS-Systems sind für jede Maus und jede der interessierenden Zellpopulationen 40 Kerndurchmesser bestimmt und gemittelt worden, um einen möglichst exakten Wert für D zu erhalten.

Zur Bestimmung des Durchmessers der Zellkerne bei OMP-positiven Zellen sind die benachbarten Hämatoxylin-Schnitte genutzt worden, da die OMP-Reaktivität nicht nur den Kern selbst, sondern auch das perinukleäre Kompartiment erfasst und somit eine saubere Feststellung des Kerndurchmessers auf diesem Weg nicht möglich gewesen wäre.

3.5.2.3. Statistik

Die Ergebnisse sind mit SPSS V.11 (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) statistisch ausgewertet worden. Es erfolgt eine deskriptive Statistik und Varianzanalyse. Zusätzlich werden, wenn sinnvoll, T-Tests für gepaarte oder ungepaarte Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0.05$.

4. Ergebnisse

In der paramedian-sagittalen Schnittführung (Abb. 1) sind die Lagebeziehungen des olfaktorischen Epithels (OE) der Nasenmuscheln und des Bulbus olfactorius (BO) gut nachvollziehbar.

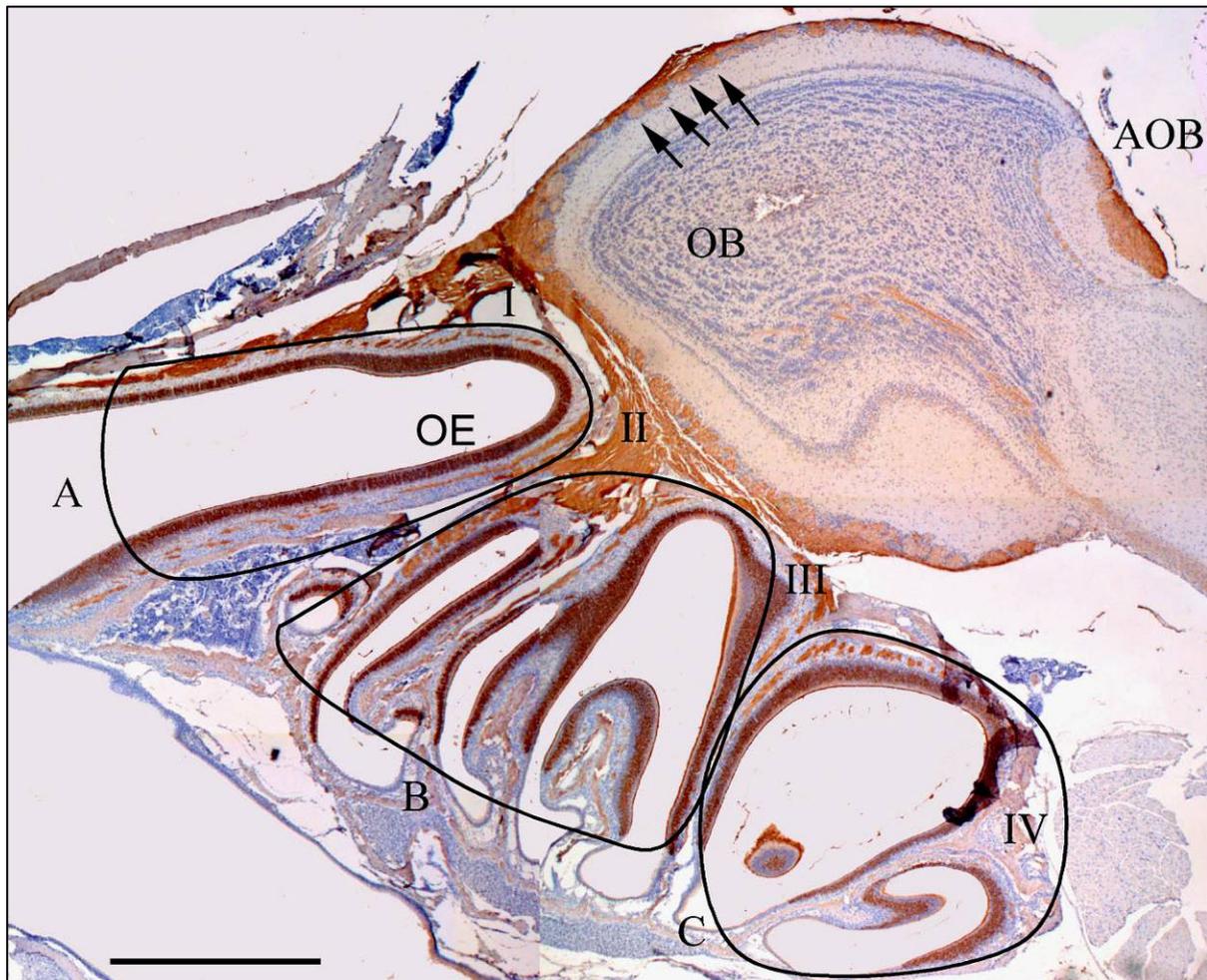


Abb. 1: Olfaktorisches System der Maus: Paramedian sagittale Übersicht. Olfaktorisches Epithel (OE), Bulbus (OB), akzessorischer Bulbus olfactorius (AOB) und Glomeruli (Pfeile). Ebenen des OE: dorsaler Bereich (A), mittlerer Bereich (B), ventraler Bereich (C), Wurzeln der Nasenmuscheln (I-IV). Maßstab: 1mm

4.1. Immunhistochemie

4.1.1. Olfaktorisches Markerprotein (OMP)

OMP wird in ausgereiften ORN, deren Axonen und den Glomeruli des BO exprimiert. Wie in (Abb. 2 a, b) dargestellt, zeigt sich die höchste OMP-Immunoreaktivität (IR) im mittleren Drittel des OE, wo sich die Perikarya der ausgereiften ORN befinden.

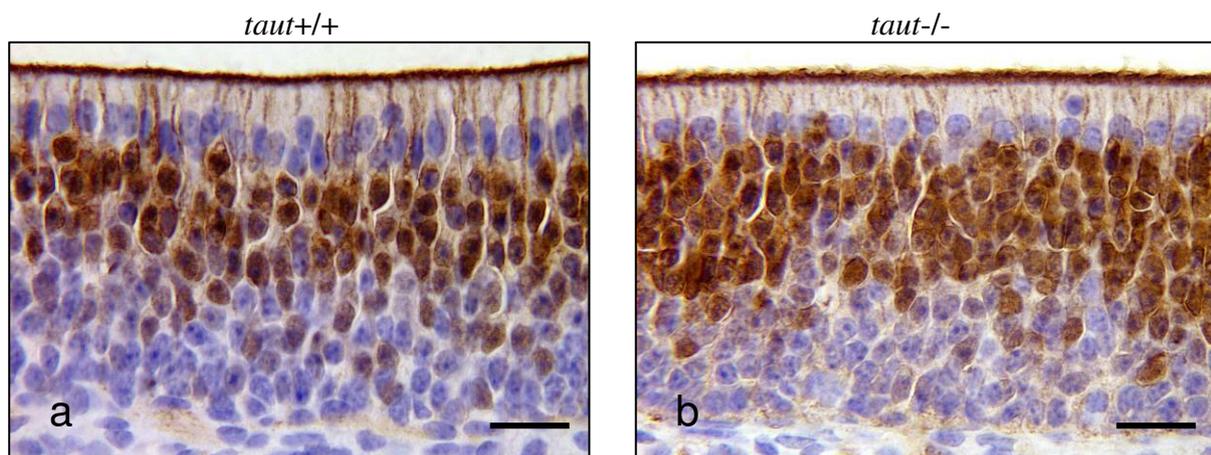


Abb. 2a, b): IR von OMP positiven Perikarya im OE von **taut+/+** (a) und **taut-/-** (b) Mäusen. Kein morphologischer Unterschied. Gut sichtbar werden die ORN im mittleren Drittel des OE. **Maßstab: a,b: 20 µm**

Die Ergebnisse zeigen keine qualitativen Unterschiede der OMP-Reaktion zwischen *taut+/+* und *taut-/-* Mäusen (Abb. 2 a, b).

Morphologisch handelt es sich bei ORN um bipolare Zellen. Ihre apikal entspringenden Dendriten (D) lassen sich durch die palisadenartig angeordnete Reihe von Stützzellkernen bis zum dendritischen Knopf (DK) an der Schleimhautoberfläche der Nasenhöhle verfolgen. Am basalen Pol der ORN-Kerne entspringen die Axone (A), deren Verlauf in Richtung Basalmembran sichtbar wird (Abb. 2 c).

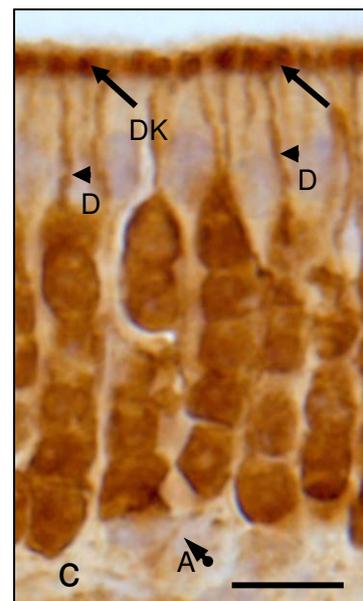


Abb. 2 c): IR von OMP-positiven Perikarya im OE. **Maßstab: 10 µm**

Die Axone formieren sich in der darunter liegenden Lamina propria zu größeren Nervenfasernsträngen und passieren in mehreren Bündeln die Lamina cribrosa (LC). Die Gesamtheit dieser Axonbündel bilden die Nervi olfactorii (NO). Schließlich tauchen die ORN-Axone in die Nervenzellschicht (NZZ) des Bulbus olfactorius ein. Bis auf die markierten Glomeruli zeigt der Bulbus keine OMP-Reaktivität (Abbildung 2 d).

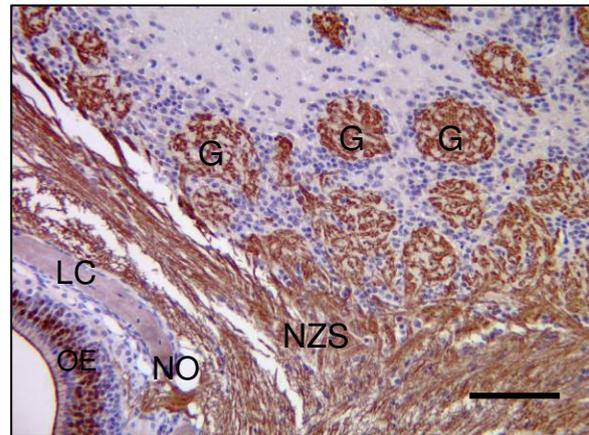


Abb. 2 d): Nervenfaserbündel der Nervi olfactorii (NO), beim Durchtritt durch die Lamina cribrosa (LC) bis zur Nervenzellschicht (NZZ) des OB; Kontakt des NO mit den Glomeruli (G) des OB. **Maßstab:** 100 µm

Anschließend wird die Anzahl der OMP-reaktiven Perikarya von Knockout und Wildtyp-Tieren getrennt nach Altersgruppen verglichen (Abb. 3). Es erfolgt die statistische Auswertung der einzelnen Bereiche der Nasenhöhle (ds.B., mt.B., vt.B.). Hier ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Jungtiergruppen ($p = 0.36$). Gleiches gilt für die Gruppen der alten Tiere ($p = 0.2$), jedoch haben die *taut*^{-/-} Tiere tendenziell weniger OMP-positive Perikarya.

OMP- positive Zellen pro 100 µm OE

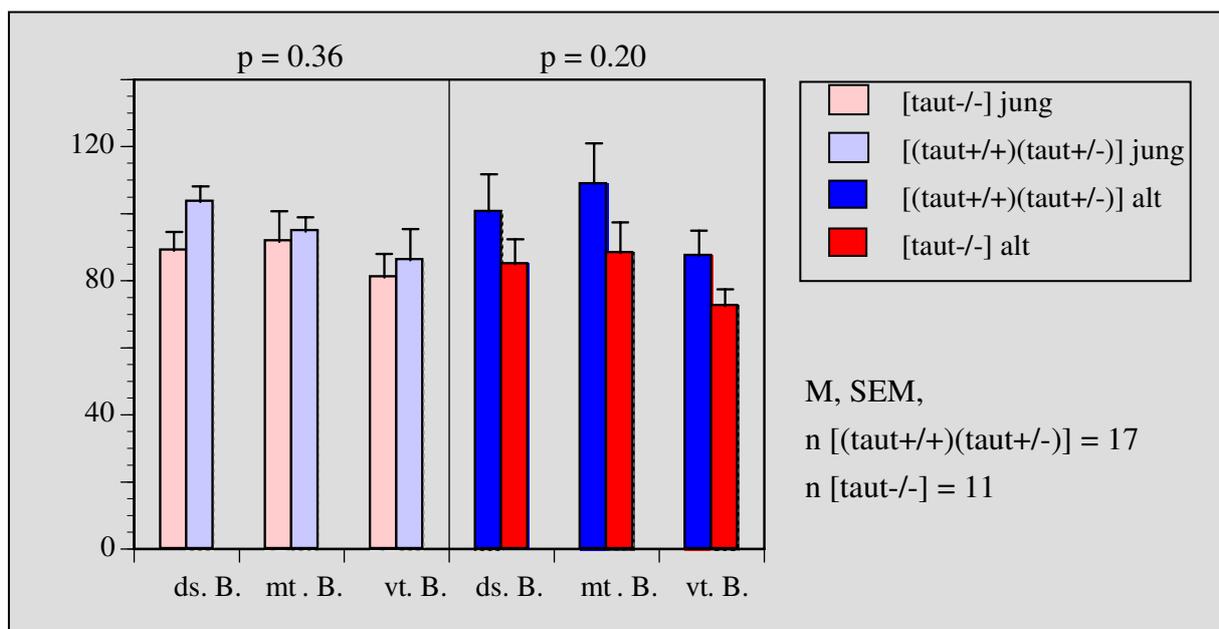


Abb. 3): Dorsaler Bereich (ds.B.), Mittlerer Bereich (mt.B.), Ventraler Bereich (vt.B.)

Der Vergleich der Schichtdicken, der in einer Säule übereinander liegenden OMP-positiven Perikarya, zwischen *taut-/-* Tieren und *taut+/+* Tieren erreicht nicht das Signifikanzniveau (Abb. 4; $p = 0.06$). Es zeigt sich jedoch eine deutliche Tendenz, dass *taut-/-* Mäuse weniger OMP-positive Zellen aufweisen.

Schichten übereinander liegender OMP positiver Perikarya im OE

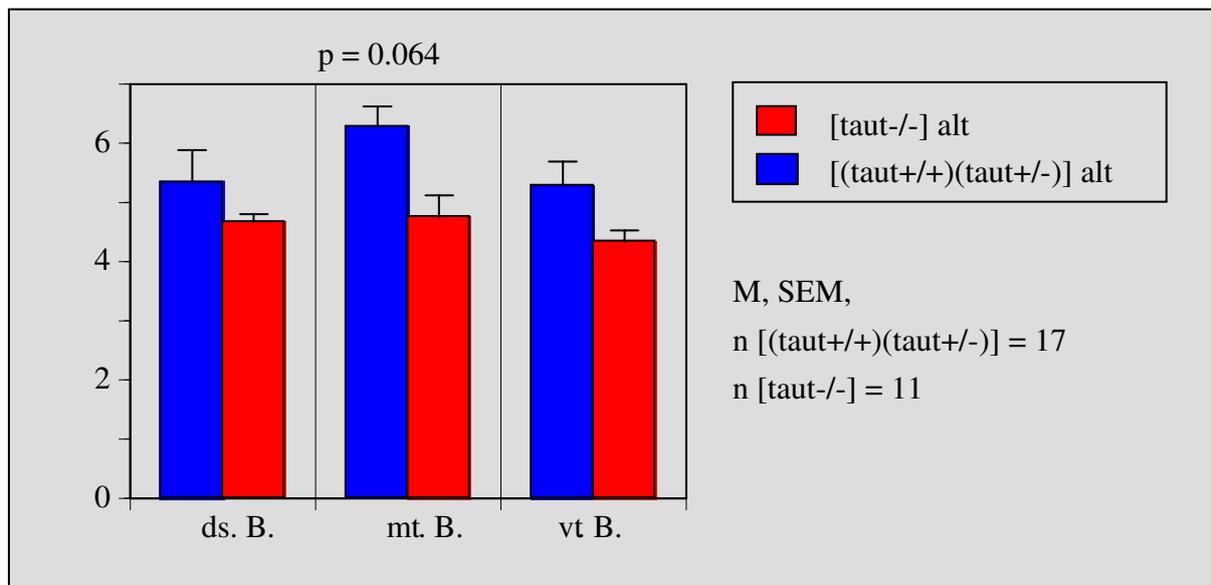


Abb. 4): Dorsaler Bereich (ds.B.), Mittlerer Bereich (mt.B.), Ventraler Bereich (vt.B.)

4.1.2. Protein-Gen-Produkt 9.5 (PGP 9.5)

In der (Abb. 5.1) wird die Verteilung des panneuronalen Markers PGP 9.5 im OE und BO dargestellt.

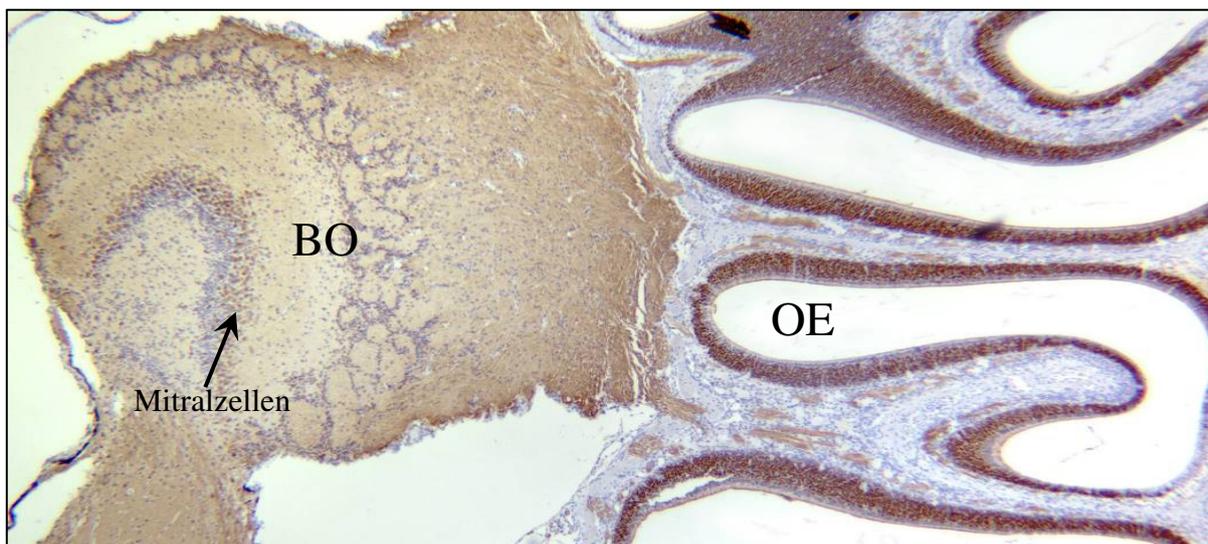


Abb. 5.1): PGP 9.5 IR einer *taut+/+* Maus, paramedian-sagittal, Übersicht mit OE und BO

PGP 9.5 reagiert sowohl bei *taut*^{-/-} als auch bei *taut*^{+/+} Mäusen unabhängig vom Entwicklungsstadium mit allen ORN. Auch bei diesem Marker kommen die Perikarya, die Axone und die Dendriten mit den apikal gelegenen dendritischen Knöpfen und deren Zilien zur Darstellung (Abb. 5.2 a, b).

Die Untersuchungen zeigen keine qualitativen Unterschiede der PGP 9.5-Reaktion zwischen *taut*^{+/+} und *taut*^{-/-} Mäusen.

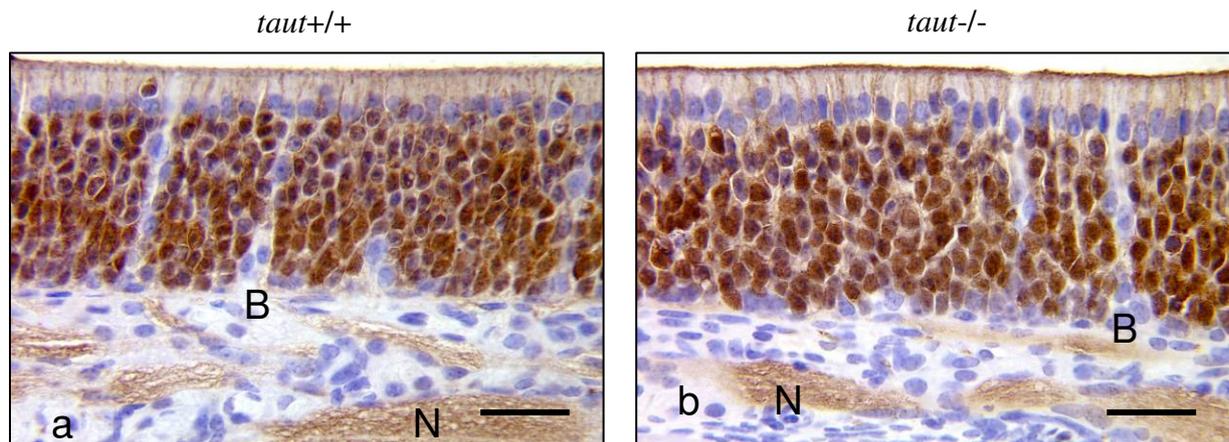


Abb. 5.2 a, b): PGP 9.5 IR von 3 Wochen alten *taut*^{+/+} (a) und *taut*^{-/-} (b) Mäusen. Es werden sowohl unreife (basales Drittel des OE) als auch reife ORN (mittleres Drittel des OE) dargestellt. Dazwischen kommen die Gänge der Bowman-Drüsen (B) zur Darstellung (PGP 9.5 negativ). In der Lamina propria verlaufen Nervenfaserbündel (N). **Maßstab: a,b: 20µm**

Im Unterschied zu OMP zeigt sich eine deutliche Reaktivität im basalen Drittel des OE, wo die unreifen Formen der ORN liegen. Auffällig ist dabei, dass diese basale Reaktivität nahe der Übergangszone zum respiratorischen Epithel besonders intensiv ist (nicht dargestellt).

Bei 10 Wochen alten *taut*^{-/-} Tieren zeichnen sich einige suprabasal gelegene Zellen ab, die erheblich stärker mit dem PGP 9.5-Antikörper reagierten (Abb. 5.2 c).

In der Lamina propria reagiert der PGP 9.5-Antikörper mit den Bündeln der Nervi olfactorii (Abb. 5.2 a, b).

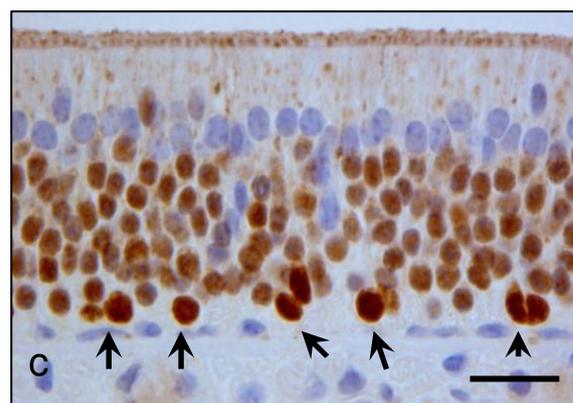
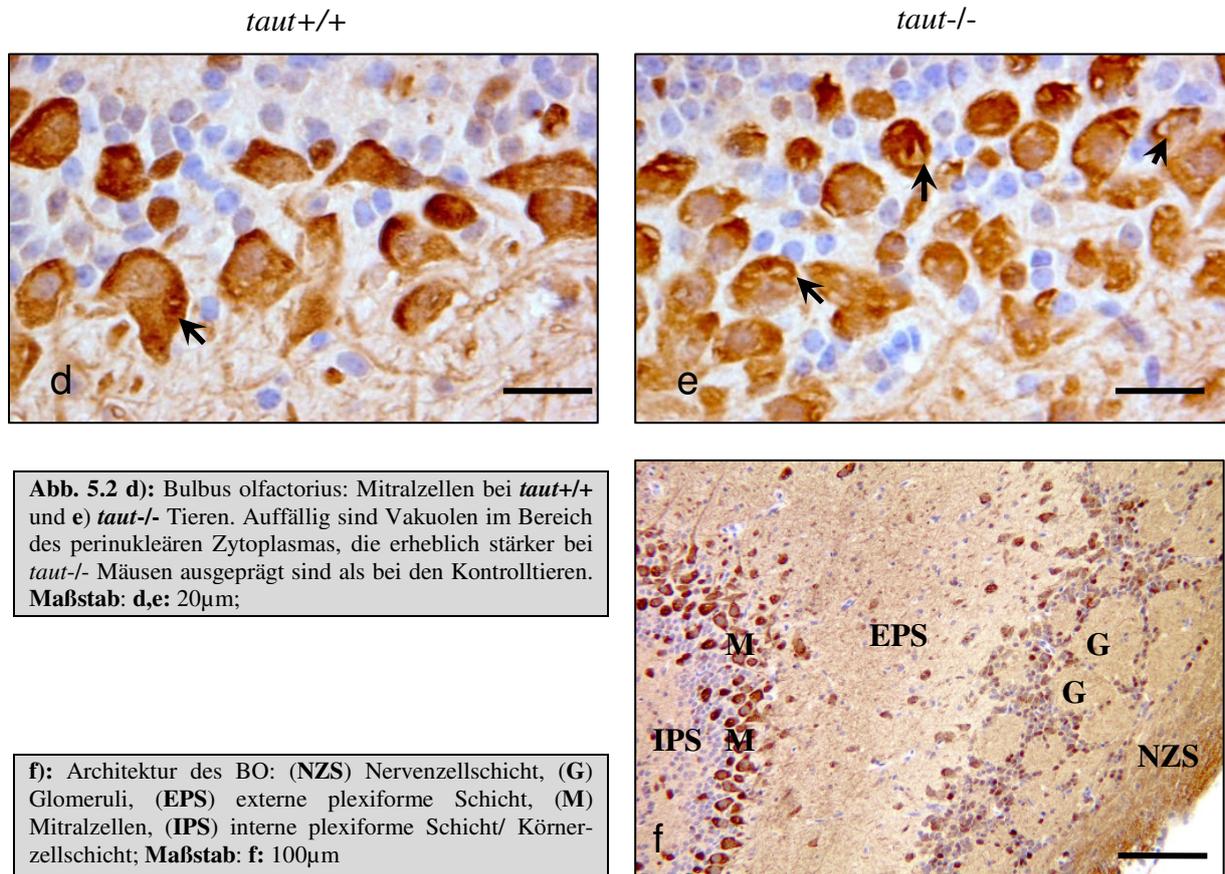


Abb. 5.2 c): Bei 10 Wochen alten *taut*^{-/-} Mäusen zeigten sich basal ovoide bis kugelige Perikarya, die eine erheblich stärkere PGP 9.5-IR aufweisen als die übrigen Zellen. **Maßstab: c: 20µm**

Im BO lassen sich mit dem PGP 9.5-Antikörper neben den Endigungen der ORN-Axone in der glomerulären Schicht (Abb. 5.2 f) auch das Zytoplasma und die Fortsätze der Büschel- und der Mitralzellen darstellen. Letztere zeigen im perinukleären Zytoplasma eine auffällige Vakuolisierung, die tendenziell bei *taut*^{-/-} Mäusen prominenter ausgeprägt zu sein scheint, als bei den Kontrolltieren (Abb. 5.2 d, e).



4.1.3. Taurin

Olfaktorisches Epithel:

Im OE von *taut*^{+/+} Mäusen (Abb. 6 a) und heterozygoten Tieren (*taut*^{+/-}, nicht gezeigt) reagieren besonders das supranukleäre Zytoplasma sowie die basalen Fußfortsätze der Stützzellen mit dem Antikörper gegen Taurin. Stützzellen von *taut*^{-/-} Mäusen (Abb. 6 b) werden fast nicht durch den Taurin-AK markiert.

Bulbus olfactorius:

In der Externen Plexiformen Schicht des BO zehn Wochen alter *taut*^{+/+} Tiere zeigen sich verschiedene Taurin-reaktive Fasern, welche offensichtlich in Kontakt zu den periglomerulären Zellen stehen (Abb. 6 c, e). Die Perikarya der BO-Neurone sind nicht reaktiv.

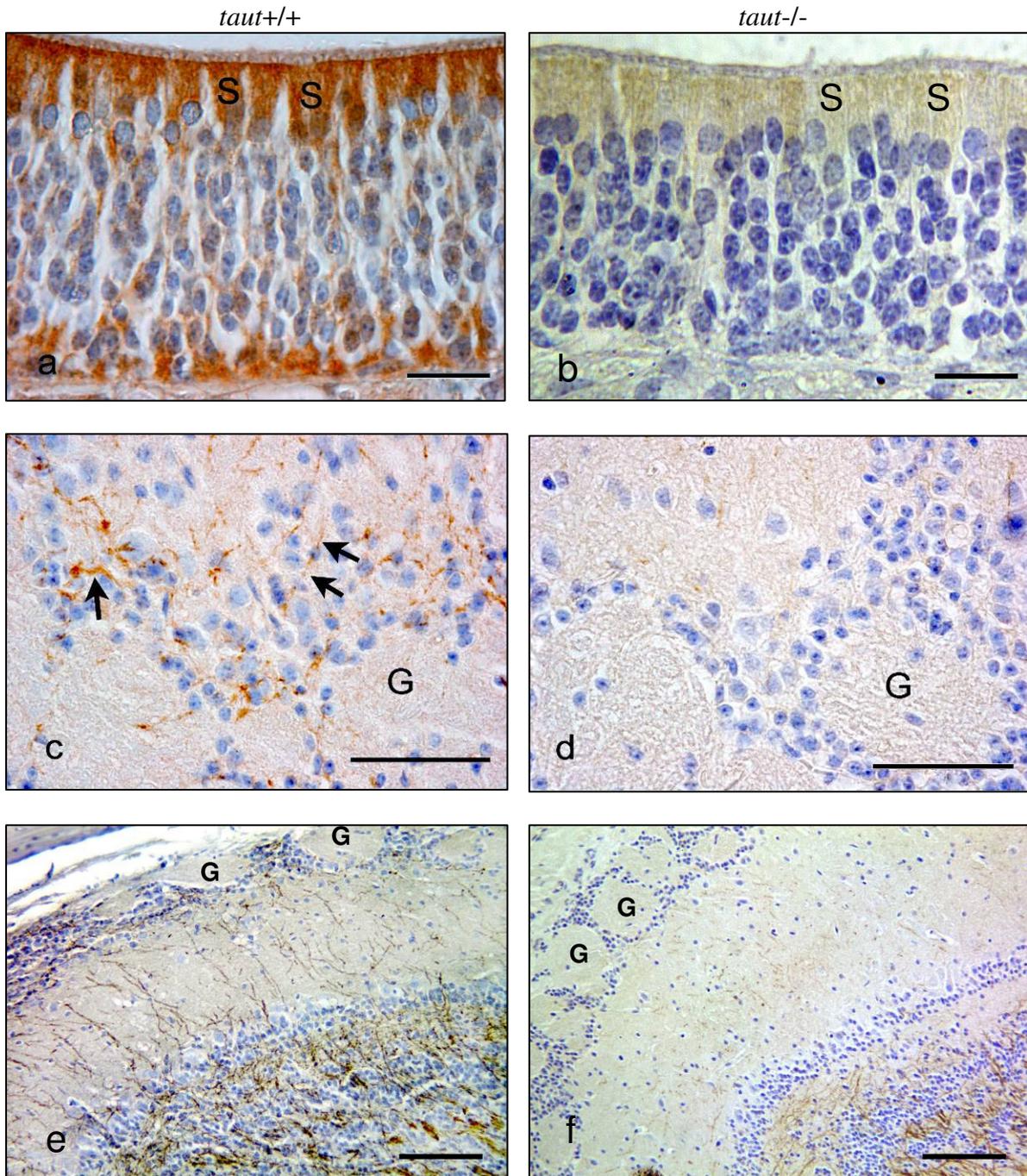


Abb. 6): Taurin-Immunoreaktivität (IR) im OE (a,b) und BO (c, d, e, f).
a) Intensive IR in Stützzellen (S) der *taut+/+* Mäuse im supranukleären Zytoplasma und in Fußfortsätzen nahe der Basalmembran. ORN stellen sich Taurin-frei dar. **b)** Taurin-IR in Stützzellen der *taut-/-* Tiere ist gering.
c) Die Glomeruli (G) des BO sind von den Perikarya der periglomerulären Zellen umgeben. Zwischen diesen ranken zarte Taurin- positive Fasern, die bei *taut-/-* Mäusen in **d)** nicht sichtbar sind. **Maßstab: a-d, 20µm**
e) Bei 10 Wochen alten *taut+/+* Mäusen sind in der Externen plexiformen Schicht des BO Taurin- positive Fasern sichtbar, die bis zu den periglomerulären Zellen ziehen. Die beschriebenen Fasern waren bei jüngeren *taut +/+* Tieren und *taut-/-* Varianten **f)** nicht sichtbar. **Maßstab: e, f, 100µm**

4.1.4. Hitzeschock-Protein 25 (HSP 25)

In *taut+/+* Mäusen verteilt sich die HSP 25-Reaktivität hauptsächlich auf die supranukleären Anteile des Zytoplasmas der Stützzellen und deren basale Fortsätze, sowie auf die Basalzellen (Abb. 7 a). Eine ähnliche Konfiguration ist bei *taut-/-* Tieren sichtbar, jedoch ist die HSP 25-Reaktivität auf einer deutlich längeren Distanz des OE besonders in den mittleren Anteilen der Stützzellen und deren Fußfortsätze stärker als bei den Kontrolltieren (Abb. 7 b).

Eine Besonderheit zeigt das Epithel um den lateralen oberen Nasengang. Hier hört das beschriebene Verteilungsmuster unabhängig vom Taurintransporter-Status abrupt auf. Lediglich einige Basalzellen bleiben positiv (Abb. 7 c, d).

Im BO beschränkt sich die HSP 25-Reaktivität auf die Pia Mater und das Endothel von Blutgefäßen (Abb. 7 e).

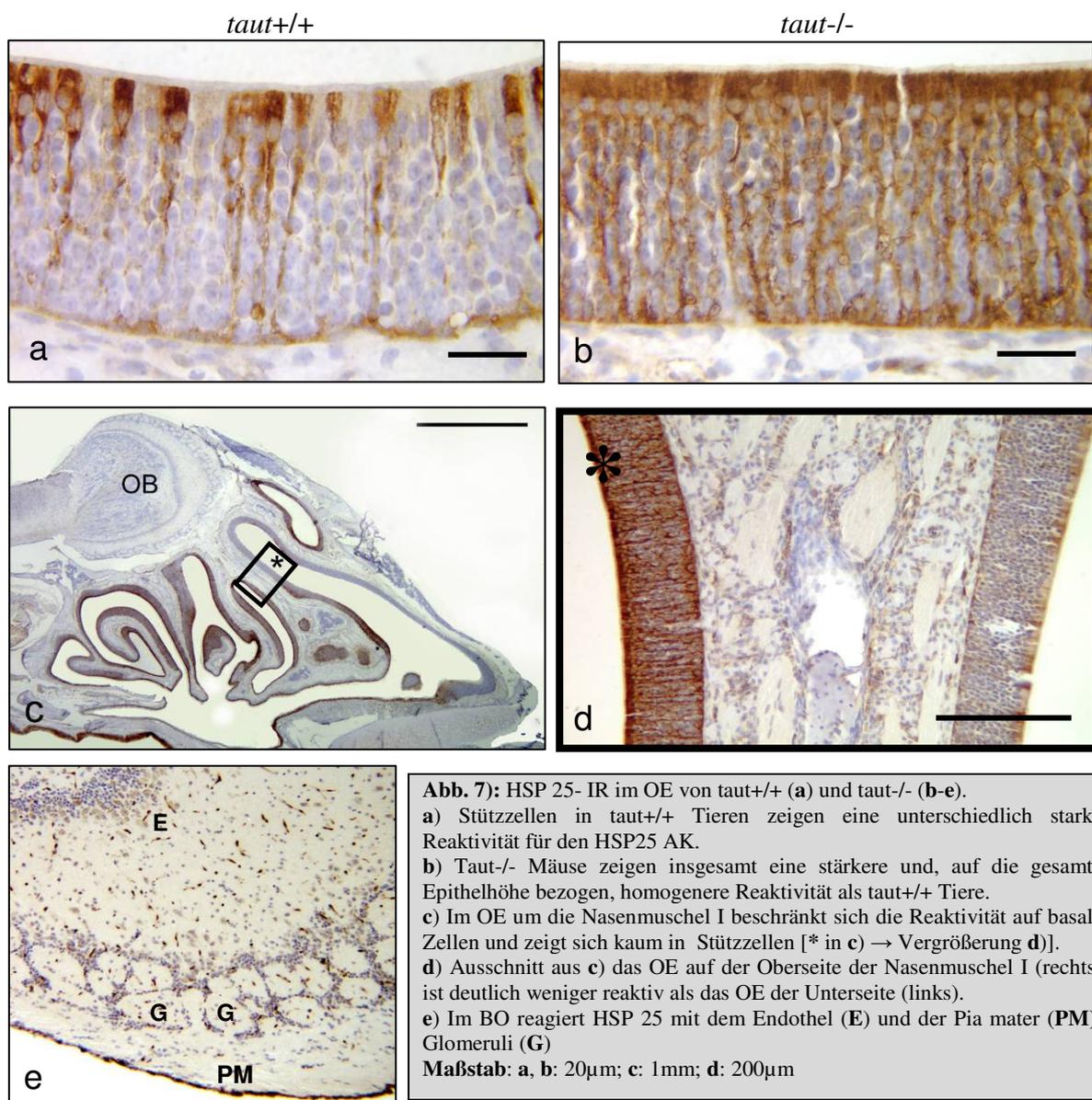


Abb. 7): HSP 25- IR im OE von *taut+/+* (a) und *taut-/-* (b-e).
a) Stützzellen in *taut+/+* Tieren zeigen eine unterschiedlich starke Reaktivität für den HSP25 AK.
b) *Taut-/-* Mäuse zeigen insgesamt eine stärkere und, auf die gesamte Epithelhöhe bezogen, homogenere Reaktivität als *taut+/+* Tiere.
c) Im OE um die Nasenmuschel I beschränkt sich die Reaktivität auf basale Zellen und zeigt sich kaum in Stützzellen [* in c] → Vergrößerung d].
d) Ausschnitt aus c) das OE auf der Oberseite der Nasenmuschel I (rechts) ist deutlich weniger reaktiv als das OE der Unterseite (links).
e) Im BO reagiert HSP 25 mit dem Endothel (E) und der Pia mater (PM); Glomeruli (G)
Maßstab: a, b: 20µm; c: 1mm; d: 200µm

4.1.5. Ki-67

Im OE von *taut*^{-/-} Mäusen finden sich die reaktiven Perikarya vorrangig basal und vereinzelt im oberen Drittel des OE. Im unteren Drittel liegen die Kerne der markierten Zellen häufig in Gruppen, ähnlich einem Cluster, entlang der Basalmembran nebeneinander (Abb. 9 b, d). Zwar zeigt sich im Vergleich dazu im Epithel von *taut*^{+/+} Tieren ein gleiches Verteilungsmuster, jedoch war die Anzahl der markierten Perikarya deutlich geringer. Bei den beiden Gruppen alter Tiere gibt es sowohl bei *taut*^{-/-} als auch bei *taut*^{+/+} Mäusen im Vergleich zu den beiden jungen Gruppen weniger Ki-67 positive Zellen. Die alten *taut*^{-/-} Tiere weisen allerdings signifikant mehr Ki-67 positive Zellen verglichen mit den alten *taut*^{+/+} Tieren auf (Abb. 8; $p = 0.018$).

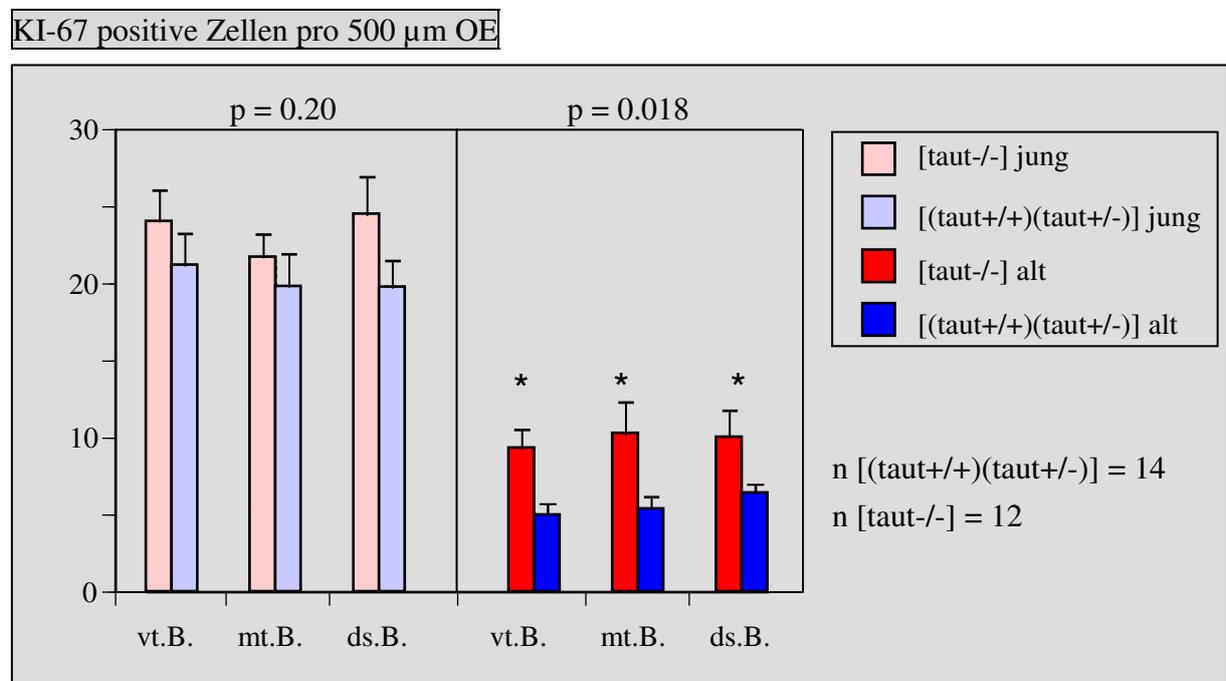


Abb. 8): Dorsaler Bereich (**ds.B.**), Mittlerer Bereich (**mt.B.**), Ventraler Bereich (**vt.B.**)

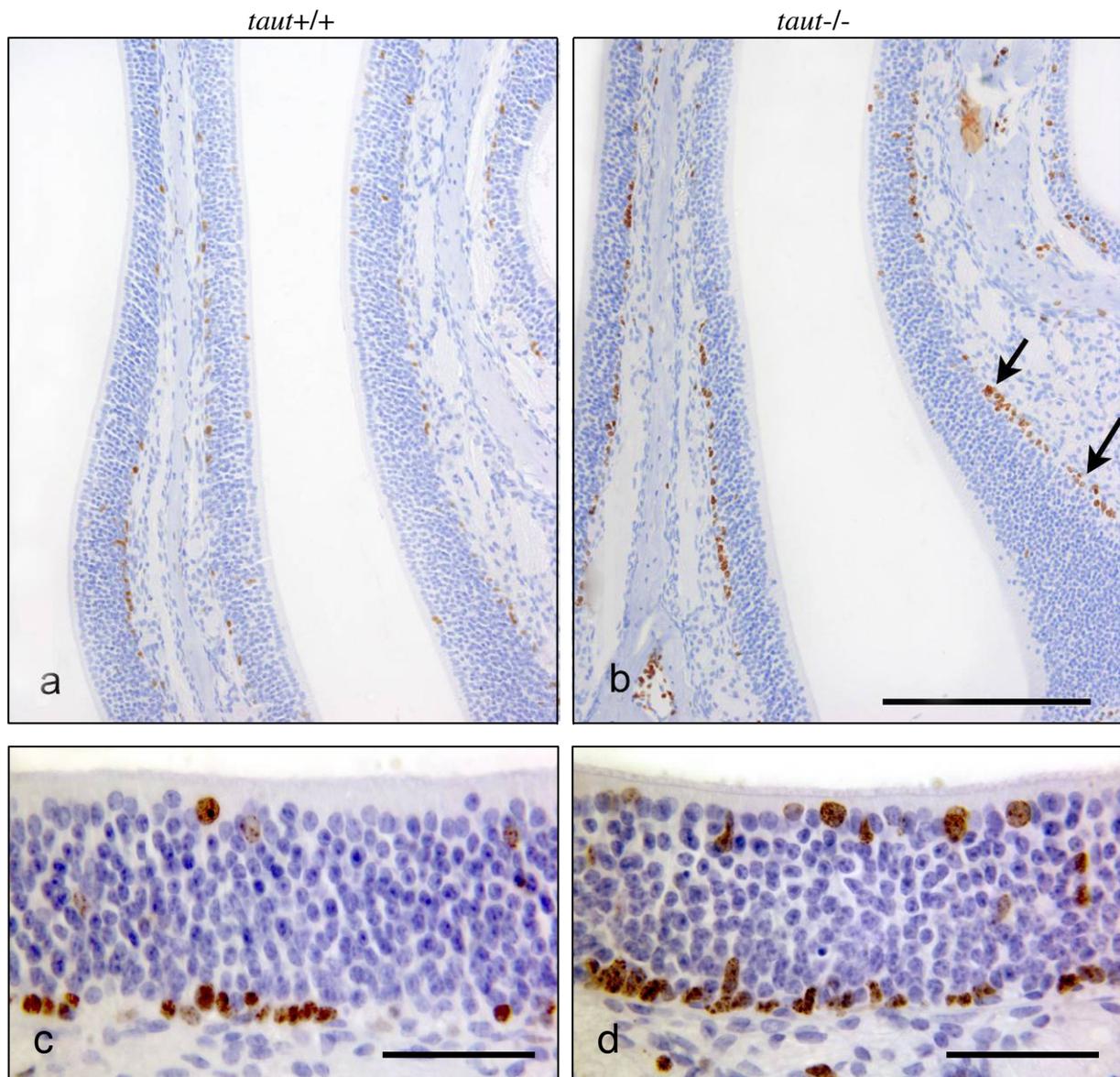


Abb. 9): KI-67 IR in *taut+/+* (a,c) und *taut-/-* (b,d) Mäusen. Ungleichmäßige Verteilung der reaktiven Zellen in Haufen (Clustern, Pfeile in b). Insgesamt ist die Dichte an KI-67 positiven Zellen in *taut-/-* Mäusen (b) höher als bei den Kontrolltieren. Die KI-67 Reaktivität beschränkt sich zumeist auf das basale Kompartiment des OE, wahrscheinlich proliferierende Basalzellen. Einige KI-67 positive Perikarya liegen apikal und könnten zu den Stützzellen gehören.
Maßstab: a, b: 200µm; c, d: 20µm

4.1.6. Caspase 3

Die Caspase-reaktiven Zellen verteilen sich sowohl bei den Knockout Tieren als auch bei den Kontrollen scheinbar zufällig über das gesamte OE. Dabei ist keine Bevorzugung des basalen Bereiches im OE, wie es bei den KI-67 positiven Zellen zu beobachten ist, zu erkennen. Darüber hinaus lässt sich auch keine clusterartige Häufung von reaktiven Zellen nachweisen.

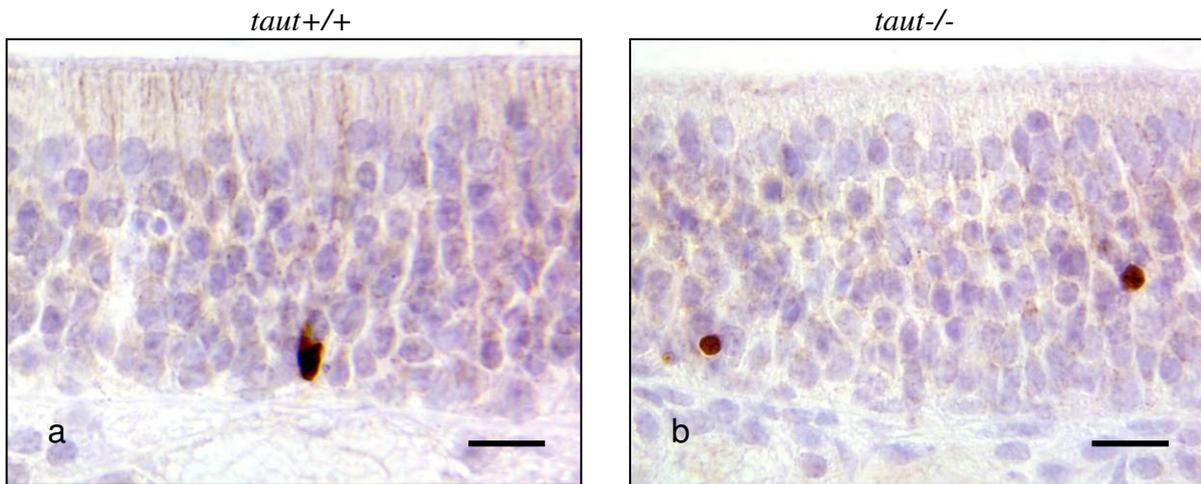


Abb. 10): Caspase 3 IR in *taut+/+* Mäusen (a) und in *taut-/-* Tieren (b). Maßstab: a, b: 20 μ m

Eine wichtige Frage bei der statistischen Auswertung der funktionellen Marker, wie Ki-67 für proliferierende Zellen und Caspase-3 für apoptotische Zellen, ist, ob sich in den Untersuchungen eine Korrelation zwischen Wachstum und Apoptose herstellen lässt. In der (Abb. 11) sind die Anzahl Ki-67 positiver Zellen mit der Anzahl Caspase 3 positiver Zellen eines Tieres korreliert. Mit der Darstellung in Form einer Punktwolke lässt sich ein positiver linearer Zusammenhang zwischen den beiden Variablen feststellen. Dies gilt für alle drei Bereiche des OE. Es erfolgt keine Unterscheidung zwischen *taut+/+* und *taut-/-* Tieren.

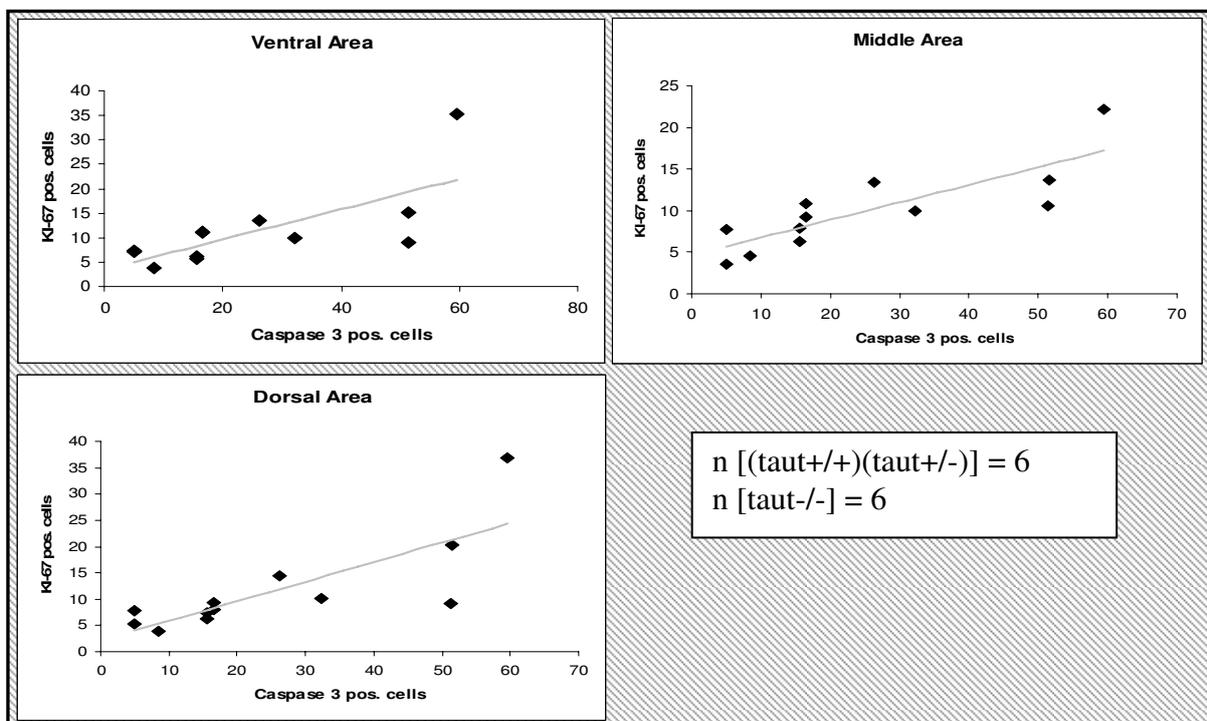


Abb. 11): positiver linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl Ki-67 positiver und Caspase 3 positiver Zellen im OE.

Zur Klärung der Frage, ob es einen Unterschied bezüglich der Anzahl apoptotischer Zellen zwischen taut+/+ Mäusen und taut-/- Tieren gibt, ist eine statistische Auswertung der Anzahl Caspase 3-positiver Zellen pro sagittalem Schnitt durchgeführt worden. Es zeigt sich sowohl in den beiden Gruppen junger als auch in den beiden Gruppen alter Tiere, dass taut-/- Tiere signifikant mehr Caspase 3-positive Zellen aufweisen als taut+/+ Tiere (Abb. 12).

Caspase 3 positive Zellen

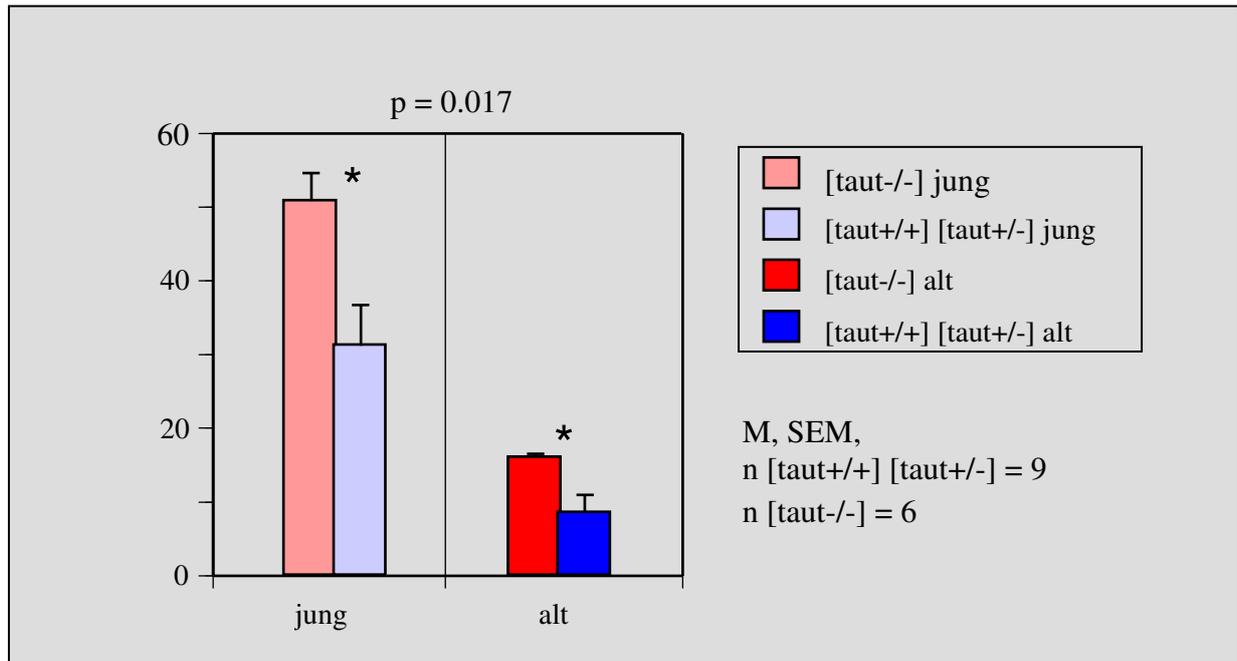


Abb. 12): Caspase 3 positive Zellen pro sagittalem Schnitt OE.

4.1.7. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)

In der Lamina propria ist GFAP immunhistochemisch in den Bündeln der Nervi olfactorii nachweisbar. Die Intensität ist jedoch deutlich geringer ausgeprägt als bei den Astrozyten des BO (Abb. 13 d). In Astrozyten kommt GFAP vorwiegend perinucleär und in deren Fußfortsätzen vor. Letztere legen sich an die Kapillaren des BO an und begleiten deren Verlauf (Abb. 13 d).

Die Ergebnisse ergeben keinen Gruppenunterschied.

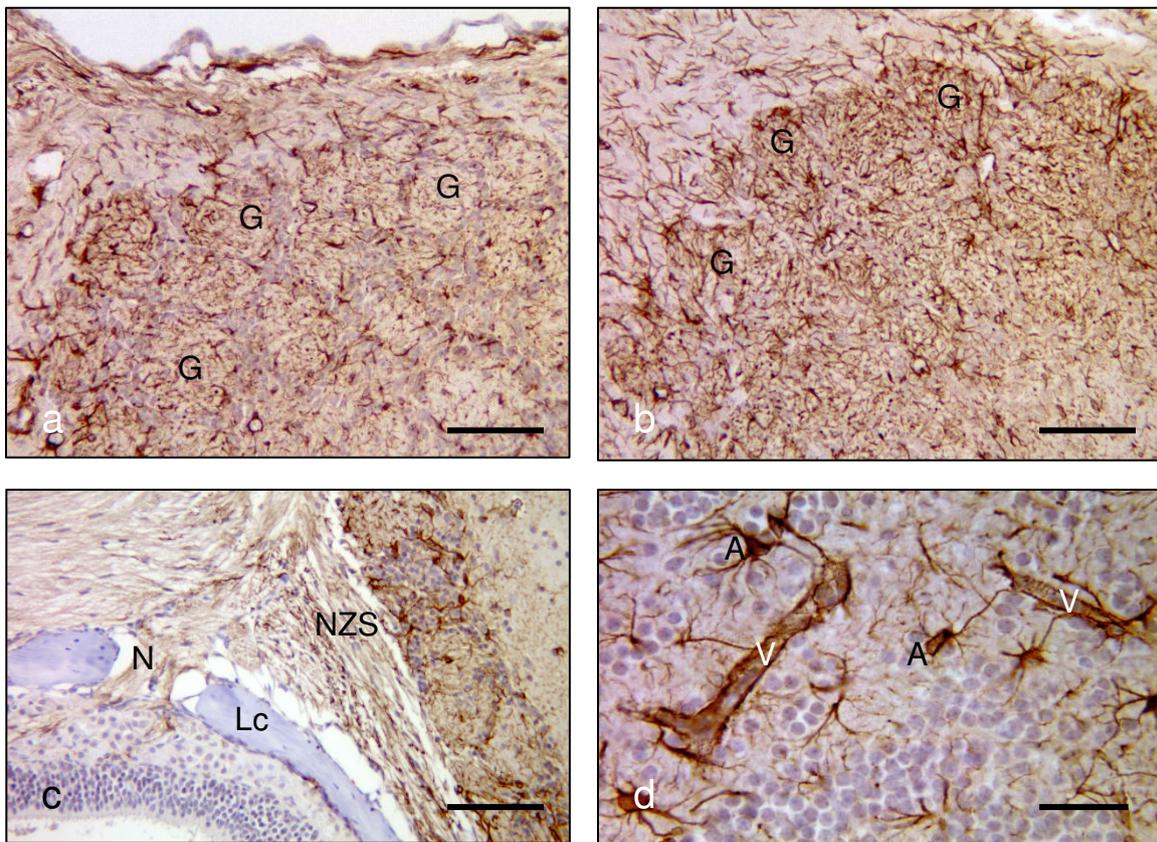


Abb. 13): GFAP IR im BO von taut+/+ (a) und taut-/- Mäusen (b-d). (c) Nervenfaserverlauf (N) in der Lamina propria, beim Durchtritt durch die Lamina cribrosa (Lc) und am Übergang zur Nervenzellschicht (Nzs) des BO. (d): Fußfortsätze der Astrozyten (A) umschließen Gefäße (V) im BO. Maßstab: a-c: 100 µm, d: 20 µm

4.1.8. Cytokeratin (CK, Z622)

Der Zytokeratinantikörper Z622 markiert die Zytokeratine (CK) 5, 6, 8, 18 mit den entsprechenden Molekulargewichten von 58, 56, 45 und 52,5 KD (Moll et al., 1982).

Der Cytokeratin-AK bindet an basal liegende Zellen des OE und an Stützzellen. Darüber hinaus befinden sich zwischen den Stützzellen vereinzelt intensiver markierte Zellen, die morphologisch zur Gruppe der MVZ zu rechnen sind (Pfeile in Abb. 14 b). Unter den Basalzellen fallen horizontale Basalzellen (HBZ) auf, da sie eine intensive perinucleäre Reaktivität bieten (Holbrook et al., 1995; Schwob, 2002 rev.). Die ORN sind CK- negativ (Abb. 14 a, b).

Die Ergebnisse ergeben keine qualitativen Unterschiede zwischen Kontroll-Tieren und Knockout Mäusen.

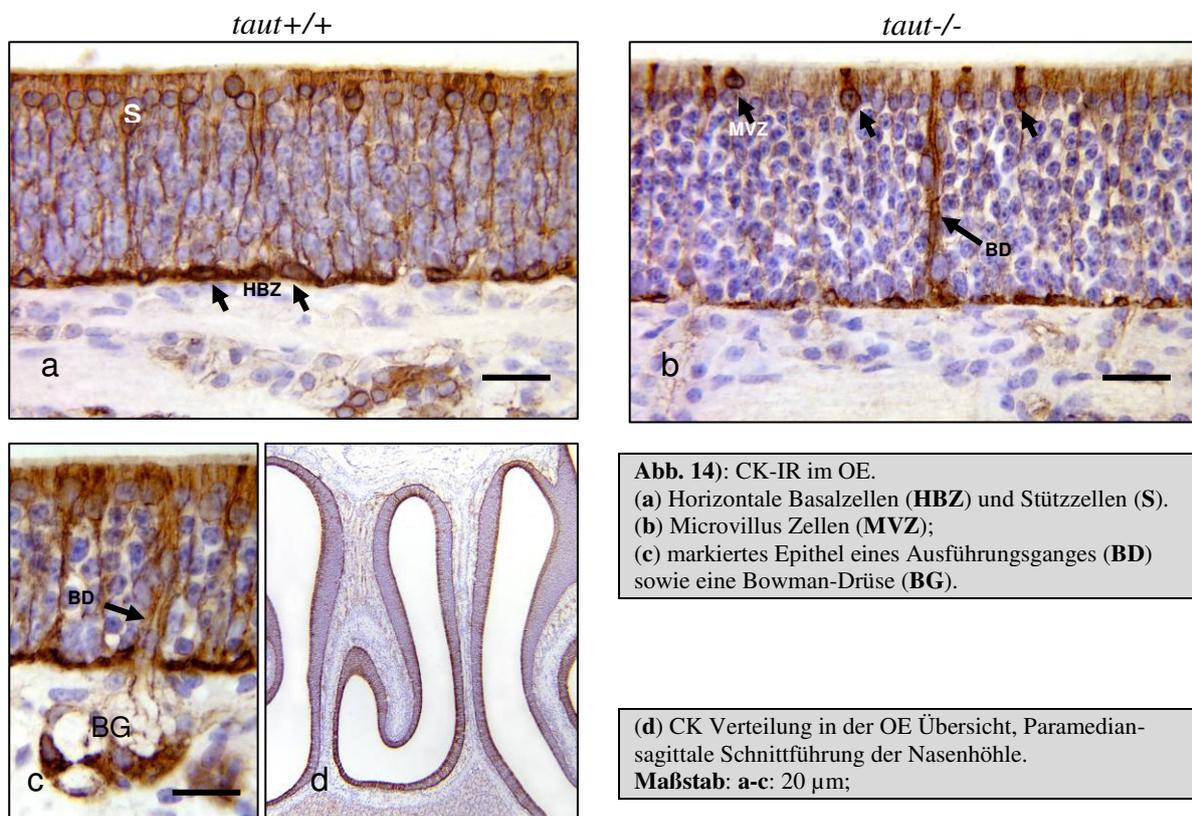


Abb. 14): CK-IR im OE.
(a) Horizontale Basalzellen (**HBZ**) und Stützzellen (**S**).
(b) Microvillus Zellen (**MVZ**);
(c) markiertes Epithel eines Ausführungsganges (**BD**) sowie eine Bowman-Drüse (**BG**).

(d) CK Verteilung in der OE Übersicht, Paramedian-sagittale Schnittführung der Nasenhöhle.
Maßstab: a-c: 20 µm;

4.1.9. Co-Lokalisation von OMP und PGP 9.5

Im Folgenden ist eine Doppelinkubation der AK gegen OMP und PGP 9.5 durchgeführt worden (Abb. 16). Da sowohl OMP, als auch PGP 9.5 in ausgereiften ORN zu erkennen gewesen sind, ist eine Co-Lokalisation mit einer orangefarbenen Fluoreszenz zu erwarten gewesen. In unreifen ORN ist jedoch nur das PGP 9.5 und nicht das OMP exprimiert worden. Mit einer quantitativen Auswertung der nur PGP 9.5- positiven, rot fluoreszierenden, ORN hat somit die Möglichkeit bestanden herauszufinden, ob die Zahl der unreifen ORN in taut-/- Mäusen gegenüber den Kontrollen erhöht oder vermindert ist.

Die Ergebnisse haben eine Co-Lokalisation von OMP und PGP 9.5 in den ausgereiften ORN gezeigt. Eine alleinige Reaktivität für PGP 9.5 ist in der suprabasalen Schicht des OE nachzuweisen gewesen. Dort liegen die unreifen Formen der ORN.

Taut-/- Mäuse haben signifikant mehr unreife, nur PGP 9.5- positive ORN als taut+/+ Mäuse ($p < 0,01$; Abb. 15). Ein qualitativer Unterschied zwischen den Knockout Tieren und den Kontrollen hinsichtlich der Morphologie und Verteilung der ausgereiften ORN ist nicht feststellbar gewesen. Es hat sich jedoch bei den PGP 9.5- positiven unreifen ORN der schon in Punkt 4.1.2 (Abb. 5.2 c) beschriebene Effekt gezeigt, dass ein Teil dieser Zellen erheblich stärker PGP 9.5 reaktiv ist als die anderen unreifen ORN.

PGP 9.5- positive Zellen

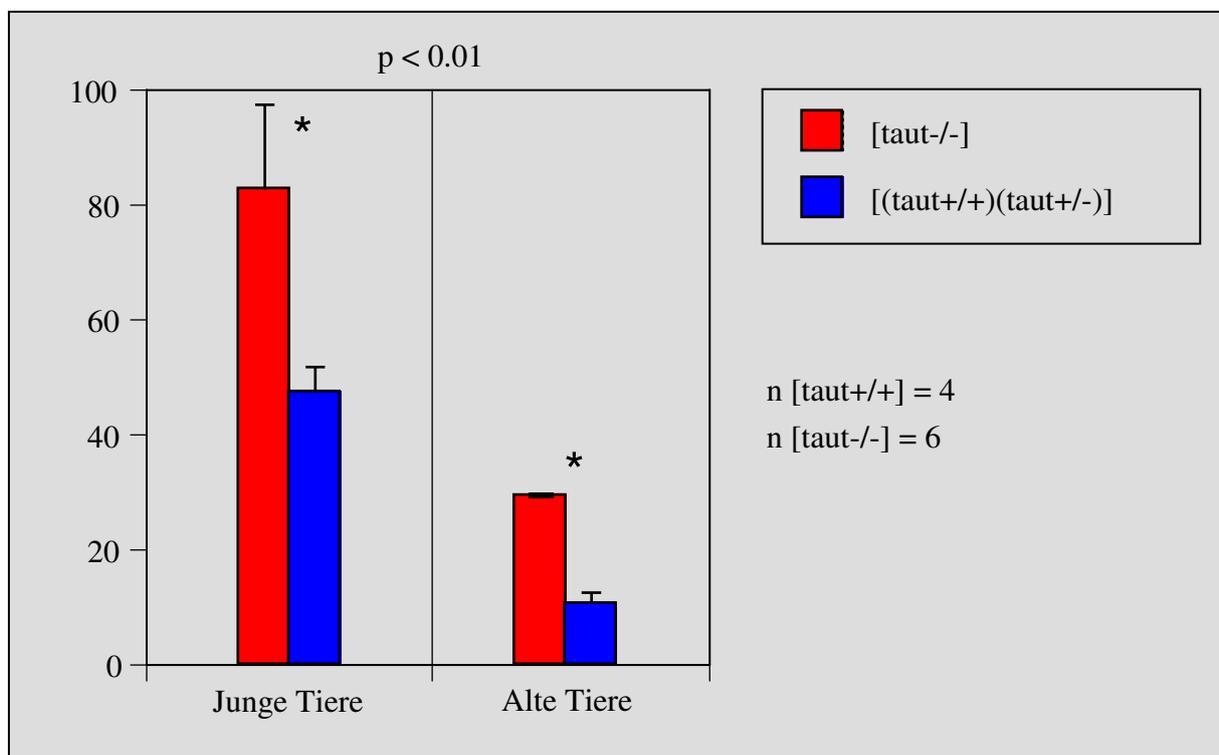


Abb. 15): Unreife ORN (nur PGP 9.5- positive) gezählt auf einer Distanz von 450 μ m des OE

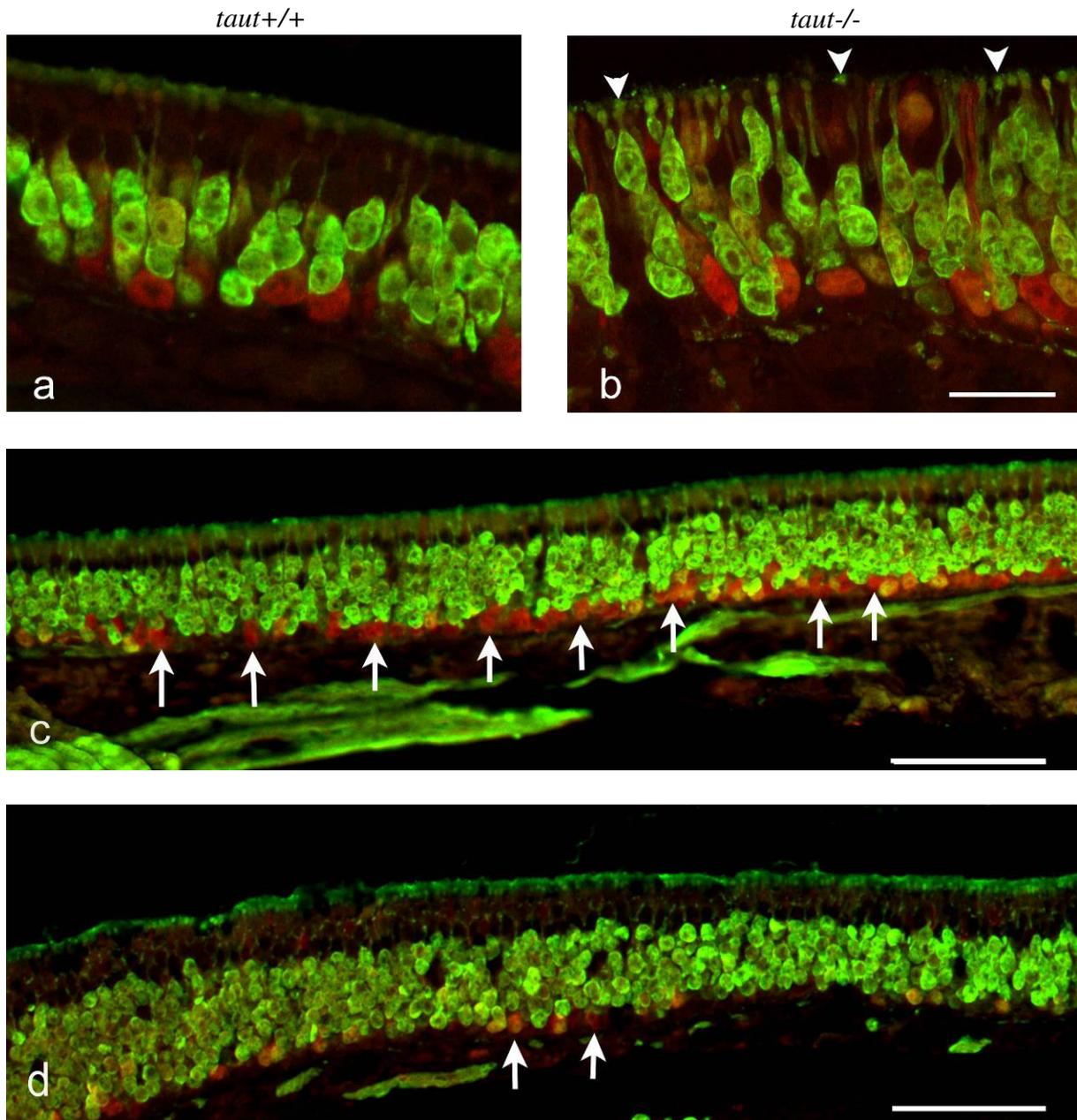


Abb. 16): Die Zahl der ausschließlich PGP 9.5- reaktiven unreifen ORN ist in der Gruppe der alten Tiere (18 Monate) bei *taut-/-* (c) Mäusen gegenüber *taut+/+* (d) signifikant erhöht gewesen (Abb. 15; $p < 0.01$). Dieses Ergebnis hat sich in allen Bereichen des OE gezeigt. **Maßstab:** a,b 20 μm ; c,d 100 μm ;

4.1.10. Zählung der Stützzellen

In den Vorversuchen hat sich gezeigt, dass *taut*^{-/-} Mäuse mehr unreife ORN aufweisen als Kontrolltiere. Bei den ausgereiften ORN ist dieses Verhältnis zugunsten der Kontrolltiere verschoben. Daher hat sich die Frage ergeben, ob die unreifen ORN der *taut*^{-/-} Tiere apoptotisch geworden sind oder sich in Richtung einer anderen Zelllinie weiter entwickeln. Hierfür ist eine Zählung der Stützzellen auf einer Distanz von 100 µm des OE durchgeführt worden. Dies ist sowohl für die beiden Gruppen der jungen Tiere als auch für die beiden Gruppen der alten Tiere geschehen.

Es hat sich gezeigt, dass die alten *taut*^{+/+} Mäuse signifikant mehr Stützzellen als die *taut*^{-/-} Tiere aufweisen. Bei den beiden Gruppen der jungen Tiere haben die Kontrollen tendenziell mehr Stützzellen als Knock-out Mäuse.

Zählung der Stützzellen auf einer Distanz von 100 µm des OE

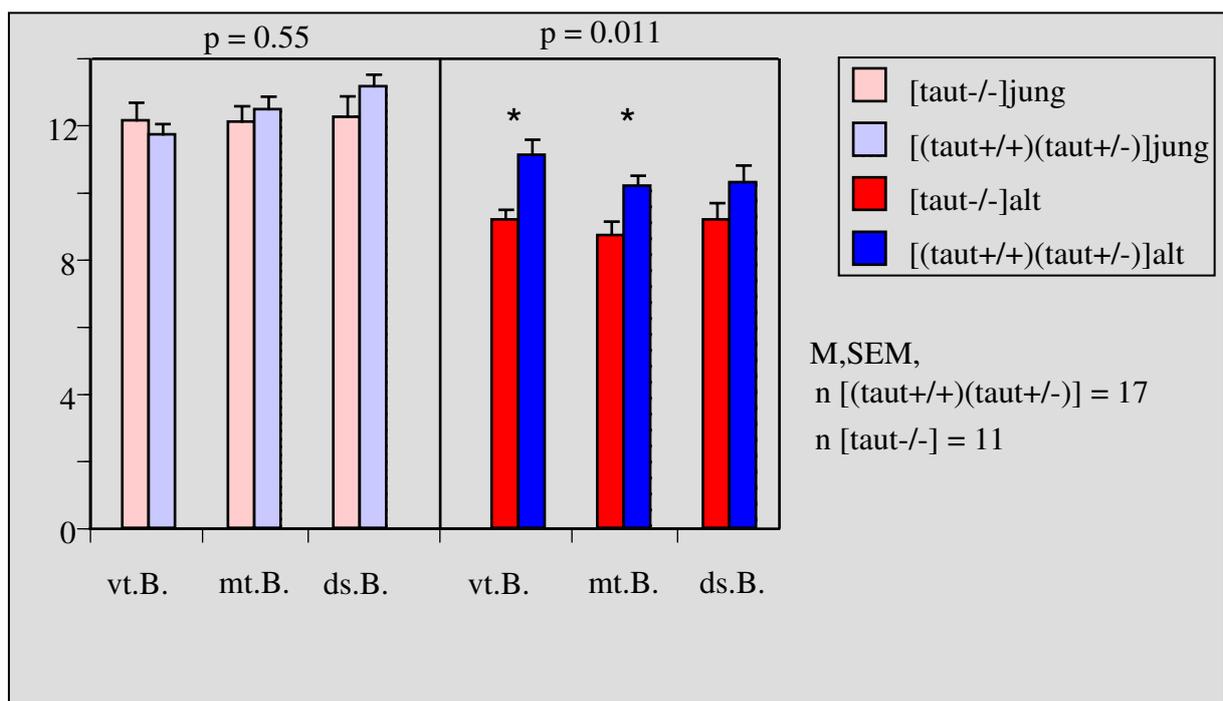


Abb. 17): Dorsaler Bereich (ds.B.), Mittlerer Bereich (mt.B.), Ventraler Bereich (vt.B.)

5. Diskussion

Das Olfaktorische Epithel ist einzigartig im Zentralnervensystem, da es zeitlebens die Fähigkeit zur Regeneration der Olfaktorischen Rezeptor-Neurone (ORN) besitzt. Ihre mittlere Lebensspanne wird mit 1 bis 3 Monaten angegeben (Farbman, 2000). Dabei befinden sich die unreifen ORN im unteren, Basalmembran- nahen Drittel des OE, wo sie sich aus Neuronen-kompetenten Vorläuferzellen differenzieren (Greer, 1991). Zu diesen als multipotent angesehenen Vorläuferzellen zählen die HBZ (Leung et al., 2007 und Iwai et al., 2008). Sie können sowohl Stützzellen, ORN, als auch sich selbst hervorbringen. Ältere, weiter ausgereifte Formen der ORN liegen im mittleren bis oberen Drittel des OE. Im Fall einer Schädigung der ORN oder der Nervi olfactorii kommt ein beschleunigter Regenerationsprozess zustande. Dieser erfolgt mit einem Ersatz der untergegangenen Neurone, Wiederherstellung der epithelialen Integrität, Aussprossung von Axonen und deren nachfolgender Kontaktaufnahme zum BO (Schwob, 2002).

Da Taurin eine Schlüsselrolle in der neuronalen Differenzierung spielt und in hoher Konzentration im OE und BO vorkommt (Sturman, 1993), liegt die Frage nahe, welche Veränderungen sich aus einem Taurindefizit im OE und BO ergeben.

Die Inaktivierung der zellmembranständigen Taurintransporter (TAUT-1 und TAUT-2) im transgenen Mausmodell (*taut-/-*) spiegelt sich in einer schweren retinalen Degeneration mit Erblindung wieder. Zudem zeigen sich Plasmahypotaurinämie, verminderte Taurinspiegel verschiedener Gewebe (Heller-Stilb et al., 2002), eine erhebliche Beeinträchtigung der Skelettmuskelfunktion (Warskulat et al., 2004) und überdurchschnittlicher renaler Taurinverlust (Huang et al., 2005). TAUT gehört zu einer Gruppe von Neurotransmitter-Transportern (Schloss et al., 1994), die mutmaßlich am regulierten Übertritt von Taurin in bestimmte Untereinheiten des ZNS wie das Striatum und den Hippocampus beteiligt sind (Sergeeva et al., 2003).

Die Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit des Olfaktorischen Systems könnte direkt mit folgenden Veränderungen in Verbindung gebracht werden:

- 1.) Taurinmangel in den Stützzellen
- 2.) erhöhte Zellproliferation in *taut-/-* Mäusen als Kompensationsversuch des OE.

Olfaktometrisch konnten Witt et al. (2004) nachweisen, dass das OE von *taut-/-* Tieren im Vergleich zu *taut+/+* Tieren eine verminderte Potentialantwort auf chemische Stimuli generiert. Diese an supravivalem olfaktorischem Gewebe durchgeführten

Untersuchungen unterstützen die Vermutung der funktionellen Beeinträchtigung des OE durch Taurinmangel.

5.1. Erhöhte Proliferationsaktivität bei taut-/- Tieren

Die vorliegenden Daten deuten auf eine veränderte Zelldynamik im OE und eine alterierte Antwort auf Zellstress (z.B. nach chemischen Stimuli) hin. Die signifikant erhöhte Zahl unreifer ORN in taut-/- Tieren zeigt eine verstärkte Teilungsaktivität im OE.

Die proliferative Aktivität ist mit einem Antikörper gegen KI-67 nachgewiesen worden, einem Epitop, welches nur in den proliferativen Phasen des Zellzyklus (G(1); S; G(2); Mitose) exprimiert wird. Darüber hinaus hat KI-67 eine sehr kurze Halbwertszeit, was es zu einem spezifischen Proliferationsmarker macht (Scholzen und Gerdes, 2000).

Unabhängig vom Taurintransporterstatus ist die Zahl der Ki-67 positiven Zellen bei alten Tieren niedriger als bei jungen Tieren. Im Vergleich zeigen die taut-/- Tiere mehr proliferierende Zellen als die taut+/+ Tiere. In der Gruppe der alten Tiere wurde dieser Unterschied signifikant (Abb. 8, $p=0,018$). Dies ist hinweisend auf eine mit zunehmendem Alter abnehmende Kompensationsfähigkeit des Taurinmangels im OE.

Zur Unterscheidung ausgereifter Formen der ORN von ihren Vorstufen ist eine Doppelimmunfluoreszenz-Technik angewandt worden. Hierbei sind die reifen ORN durch den OMP-Marker erfasst worden, während die Gesamtheit des intraepithelialen neuronalen Gewebes durch PGP 9.5-Marker (Gong, 2001; Getchell et al., 2002; Witt et al., 2002) dargestellt worden ist. Die Subpopulation der noch nicht ausgereiften, weiter basal gelegenen ORN ist PGP 9.5-, jedoch nicht OMP- reaktiv gewesen. Diese Zellpopulation entspricht der Gruppe der Anti-GAP 43 positiven Zellen bei Verhaagen et al. (1990). Vermutlich ist die signifikant erhöhte Proliferationsaktivität dieser unreifen ORN der taut-/- Mäuse eine Strategie, den Mangel an intra- oder extrazellulärem Taurin auszugleichen. Aufgrund des Verlustes der protektiven Eigenschaften des Taurins vor oxidativem Zellstress (Huxtable, 1992) oder Exzitotoxizität (El Idrissi und Trenkner, 1999) wird möglicherweise ein gesteigerter Zellersatz der ORN notwendig.

Sowohl bei taut+/+ als auch bei taut-/- Tieren lässt sich histochemisch nahezu kein Taurin in den ORN nachweisen. Daraus ergibt sich, dass die ORN in taut-/- Mäusen nicht direkt durch den Taurinmangel beeinträchtigt werden, sondern mittelbar durch die Veränderungen in der Homöostase ihrer Umgebung im OE. Da die Unterschiede der Taurinreaktivität im Gruppenvergleich in den Stützzellen besonders ausgeprägt sind, ist davon auszugehen, dass

Störungen der Stützzellfunktion zu einer Beeinflussung der Proliferationsaktivität der ORN beitragen.

Weiterhin ist die Proliferationsaktivität in Bezug auf die drei Ebenen (unten, Mitte, oben) des OE untersucht worden. Die auffällige, verstärkte Teilungsaktivität der unreifen ORN im suprabasalen Kompartiment hat jedoch nicht zu einer konsekutiven Zunahme der Zellzahl der weiter apikal gelegenen, ausgereiften ORN geführt. Sie beschränkt sich offensichtlich weitgehend auf die basal lokalisierten, nur PGP 9.5-reaktiven ORN-Vorläufer. Da bei den Untersuchungen an taut-/- Tieren eher eine verminderte Zellzahl der ausgereiften (OMP-positiven) ORN und konsekutiv eine tendenzielle Erniedrigung der Epithelhöhe nachweisbar gewesen ist, sind folgende Möglichkeiten zu diskutieren:

- 1.) Die Vorläufer gelangen nicht zur weiteren Differenzierung und werden in einer Vorstufe arretiert.
- 2.) Die Zellen gehen in die Apoptose über. Die Apoptose als mögliche Erklärung ist die vorherrschende Form des zellulären Abbaus, sowohl während der Embryonalentwicklung (Cowan und Roskams, 2002), als auch bei erwachsenen Tieren (Magrassi und Graziadei, 1995). Mahalik (1996) hat apoptotische (TUNEL-positive) Zellen während aller Phasen der Entwicklung des OE nachgewiesen. Die Untersuchungsergebnisse zeigen altersunabhängig, dass taut-/- Mäuse signifikant mehr apoptotische Zellen im OE aufweisen als taut+/+ Tiere. Eine sichere Zuordnung der apoptotischen Zellen zu einer bestimmten Zelllinie ist aufgrund der diffusen Verteilung im OE sowie dem Fehlen wichtiger morphologischer Charakterisierungsmerkmale im Bereich der Somata der apoptotischen Zellen nicht möglich. Übereinstimmend mit der Literatur ist auch in vorliegender Untersuchung die epitheliale Dicke des OE unverändert geblieben, was ein weiterer Hinweis für diese Hypothese ist.
- 3.) Es könnte eine vermehrte Differenzierung sehr früher Formen von ORN-Vorläufern in Richtung der Stützzellen stattfinden. Ein solcher Differenzierungszweig ist bereits am Tiermodell nach Methylbromid - Läsion des OE nachgewiesen worden (Huard et al., 1998; Schwob, 2002). Derzeit liegen in der Literatur noch keine Daten vor, die eine Korrelation zwischen Basalzell- und Stützzellproliferation in postnatalen Tieren beschreiben. Unabhängig von einer Epithelschädigung ist davon auszugehen, dass der Differenzierungsweg aus HBZ vorwiegend zur normalen Stützzellpopulation beiträgt (Leung et al., 2007 und Iwai et al., 2008). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch einen signifikanten Rückgang der Stützzellpopulation in der Gruppe der alten taut-/- Tiere (18 Monate), welcher in der Vergleichsgruppe der jungen Tiere nicht nachweisbar ist.

Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass sich der Prozentsatz an ausreifenden ORN-Vorläufern mit zunehmendem Alter unter dem Einfluss des Taurinmangels bei taut-/Tieren verringert. Hierfür sprechen die oben angeführte, signifikant verringerte Stützzellpopulation sowie die tendenziell verminderte Zahl der ausgereiften, OMP-positiven ORN in der Gruppe der alten taut-/Mäuse.

Es ist davon auszugehen, dass es durch Taurinmangel zu einer Störung der Homöostase des OE mit einer erhöhten Apoptoserate olfaktorischer Zellen kommt. Dies führt über Autoregulationsmechanismen zu einer gesteigerten Proliferation, um den benötigten Zellersatz zu gewährleisten. Mit zunehmendem Alter der Tiere scheint dieser Zellersatz aufgrund der oben angeführten Befunde ineffektiver zu werden.

5.2. Hitzeschock-Protein 25

Neben der Fähigkeit zur kontinuierlichen Erneuerung neuronaler Zellen zeichnet das OE eine weitere Besonderheit aus: den direkten Kontakt des ZNS via ORN mit der Außenwelt. Man kann annehmen, dass das OE aus diesem Grund über einen besonderen Schutz gegenüber Xenobiotika und Giftstoffen verfügen muss. Tatsächlich besitzen die Stützzellen einen hoch entwickelten Enzymbesatz (Ding und Dahl, 2003).

Das Hitze-Schock Protein 25 (HSP 25) ist eine nagerspezifische Variante aus der Gruppe der kleinen Hitze-Schock-Proteine (Jacob et al., 1993), welches als molekulares Chaperon fungiert und exponierte Proteine in Phasen erhöhten zellulären Stresses schützt (Morimoto, 1998). Zugleich wirkt es an der Reparatur der exponierten Proteine mit. Die Verfügbarkeit des in hoher Konzentration im OE vorkommenden, antioxidativ wirkenden Glutathions wird zum Beispiel durch HSP 25 noch gesteigert (Kirstein et al., 1991). In Übereinstimmung mit Ergebnissen von Carr et al. (2001) ist in dieser Untersuchung gezeigt worden, dass ausschließlich die Stützzellen und deren basale Fußfortsätze eine deutliche Reaktivität gegenüber dem Anti-HSP 25-Antikörper aufweisen. Die ORN sind den Xenobiotika ebenso wie die Stützzellen ausgesetzt, weisen jedoch unter physiologischen Bedingungen keinen derartigen Schutzmechanismus im Sinne einer Hochregulierung von Hitze-Schock-Proteinen auf. Da Stützzellen im Gegensatz zu den ORN unter physiologischen Bedingungen kaum einem kontinuierlichen Zellersatz unterliegen (Weiler und Farbman, 1997), erscheint es sinnvoll, diese integralen Bestandteile zur Aufrechterhaltung der Homöostase im OE vor Proteinschäden wirksam zu schützen. Zudem folgern Carr et al. (2001), dass es für den

Organismus energetisch günstiger ist, die ohnehin kurzlebigeren ORN auszutauschen, statt sie aufwendig zu reparieren.

Die Expression des HSP 25 im OE unterscheidet sich deutlich von der der größeren Hitze-Schock-Proteine (Carr et al., 2001). So beschränkt sich beispielsweise seine Reaktivität auf die Stützzellen und deren basale Fußfortsätze, Bowman-Drüsen erscheinen jedoch HSP 25 frei. Eine entsprechende Verteilung biotransformierender Enzyme in Stützzellen findet sich in der dorsomedialen Region der Nasenhöhle (Miyawaki et al., 1996; Skabo et al., 1997).

Bei Ratten, die experimentell von Riechstoffen abgeschirmt worden sind, ist eine HSP 25-Reaktivität nur in Basalzellen des OE nachgewiesen worden. Nach Limonenöl-Exposition ist die HSP 25-Reaktivität auch in Stützzellen nachweisbar geworden und hat an Intensität entsprechend der Konzentration des Riechstoffes zugenommen, was der Aktivierung eines Schutzmechanismus als Reaktion auf den erhöhten Zellstress zugerechnet wird (Carr et al., 2001).

Die vorliegende Untersuchung hat bei taut-/- Mäusen im Vergleich zu taut+/+ Tieren eine deutlich verstärkte HSP 25-Reaktivität ergeben. Dies zeigt sich besonders im mittleren Drittel des OE sowie im Bereich der Fußfortsätze (Abb. 7 a, b). Wahrscheinlich sind die Stützzellen der taut-/- Tiere auch ohne einem Zellstress durch Riechstoffe ausgesetzt zu sein auf eine vermehrte Aktivierung anderer Schutzmechanismen angewiesen, da die zytoprotektive Wirkung des Taurins fehlt.

5.3. Zytokeratine

Die starke Zytokeratinreaktivität der HBZ hat ebenso wie die unter Punkt 1.1.4) erwähnten retroviralen Abstammungsuntersuchungen in der Vergangenheit zu der Ansicht beigetragen, dass die GBZ, welche ebenso wenig Zytokeratin wie die ORN exprimieren, deren direkte Vorläufer sind (Yamagishi et al., 1989; Caggiano et al., 1994; Schwob, 2002 rev.; Chen et al., 2004).

Wie Daten von Carter et al. (2004) angedeutet und gegenwärtige Untersuchungen von Leung et al. (2007) und Iwai et al. (2008) untermauert haben, liegt der Ursprung der kontinuierlichen Regeneration des OE auf der Ebene der HBZ. Eine massive Proliferationstätigkeit ist jedoch nur nach gravierenden Epithelschäden zu erwarten, andernfalls scheint die Teilungsaktivität der GBZ auszureichen um den physiologischen Zellersatz zu gewährleisten. Da in dieser Arbeit am OE keine Epithelläsionen induziert worden sind könnte dies erklären, weshalb keine Gruppenunterschiede bezüglich der basalen Zytokeratinreaktivität festgestellt worden sind.

5.4. Olfaktorische Gliazellen

Die olfaktorischen Gliazellen helfen einerseits, dem neu aussprossenden Axon eines ORN seinen Weg zum Bulbus olfactorius zu finden und haben andererseits eine wichtige Funktion beim programmierten Zelltod der ORN (Mackay-Sim und Chuah 2000; Au und Roskams 2003). Der Anti-GFAP-AK, der das saure Gliafaser-Protein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) der Gliazellen und der Astrozyten des BO markiert, zeigt in beiden genetischen Varianten der Mäuse keine Gruppenunterschiede. Zwar sind in dieser Arbeit keine speziellen neurotrophen Faktoren und deren Rezeptoren untersucht worden, doch erscheinen durch Taurinmangel induzierte Veränderungen im Gliagewebe aufgrund der fehlenden Unterschiede eher unwahrscheinlich.

5.5. Die Rolle des Taurins im Nervensystem

Im OE und BO heranwachsender Ratten finden sich sehr hohe Taurinkonzentrationen, welche sogar die der klassischen Überträgerstoffe im ZNS Glutamat und GABA übertreffen (Collins, 1974; Margolis, 1974; Banay-Schwartz et al., 1989; Ross et al., 1995). Dies legt die Annahme nahe, dass es einen Zusammenhang zwischen der kontinuierlichen Neurogenese im OE und Taurin geben könnte (Maar et al., 1995). Vieles weist darauf hin, dass die spezifischen, unter Punkt 1.5 beschriebenen Eigenschaften der Aminosulfonsäure Taurin, wie beispielsweise die Beeinflussung der elektrischen Aktivität des aussprossenden Axons während der Neurogenese den kontinuierlichen Ersatz olfaktorischer Rezeptorneurone erst ermöglichen. In der Retina beispielsweise spielt Taurin eine wichtige Rolle in der Differenzierung und dem Wachstum der retinalen Rezeptorneurone (Altshuler et al., 1993) und unterstützt deren Migration (Moran et al., 1996). Weiterhin führt ein intrazellulärer Taurinmangel bei Ratten, Mäusen und Katzen zu einem gravierenden Untergang retinaler Strukturen und Erblindung. Die bei der Geburt morphologisch weitgehend unauffällige Retina von *taut*^{-/-} Mäusen zeigt im Bereich der äußeren und inneren Photorezeptorsegmente eine beginnende Degeneration, die im Verlauf von 1-2 Monaten die gesamte Retina erfasst, sodass die lichtmikroskopisch normalerweise klar abgrenzbare Schichtung der Retina aufgehoben wird (Sturman, 1993; Heller-Stilb et al., 2002).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen keine so tief greifende morphologische Veränderungen im OE und BO von *taut*^{-/-} Mäusen, die denen des retinalen Untergangs vergleichbar wären (Heller-Stilb et al., 2002). Dies kann in dreierlei Weise interpretiert werden:

- 1.) Taurin spielt im OE und BO keine derart entscheidende Rolle, wie es in der Retina der Fall ist, oder

- 2.) das OE und der BO besitzen zumindest teilweise die Fähigkeit, einen Taurinmangel zu kompensieren.
- 3.) Olfaktorische Epithelzellen können im Gegensatz zu Photorezeptorzellen ausgetauscht werden.

Eine andere denkbare Möglichkeit ist, dass zumindest kleine Mengen von Taurin im OE bzw. BO selbst gebildet werden und so eine gewisse Unabhängigkeit von der extrazellulären Zufuhr über den Taurintransporter besteht. Dies ist für einige Zellen der neuronalen Linie sowie für Stützzellen vorstellbar. Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass das OE zumindest bei sehr jungen Mäusen den Taurinmangel zeitweise tolerieren oder kompensieren kann, da die Auswirkungen auf die proliferativen Parameter des OE im Vergleich zu *taut+/+* Tieren erst einige Zeit später manifest werden.

Zu diskutieren ist, ob die Veränderungen ihren Ursprung im Bereich des OE oder des BO haben.

Für das OE sprechen die deutlichen Unterschiede in den proliferativen Eigenschaften zwischen *taut+/+* und *taut-/-* Tieren. Die mutmaßlich durch Taurinmangel der Stützzellen hervorgerufene Dysbalance der Homöostase des OE induziert vermutlich eine gesteigerte Expression von HSP 25 in den Stützzellen, was darauf hinweist, dass Stützzellen den durch Taurinmangel vermehrt entstehenden Zellstress anderweitig kompensieren müssen. Zudem sind die gemittelten Generatorpotentiale des OE, die nach olfaktorischer Stimulation aufgetreten sind, bei *taut-/-* Mäusen deutlich kleiner sind als bei Wildtyptieren (Witt et al., 2004).

Für ursächliche Veränderungen im Bereich des BO spricht der hohe Gehalt an Taurin in Synapsen des BO von *taut+/+* Mäusen, was auf eine möglicherweise entscheidende Rolle bei der Informationsübertragung an Synapsen hinweist (Lopez-Colome und Pasantés-Morales, 1981; Kamisaki et al., 1996). Zudem senkt Taurin die Erregbarkeit von Mitralzellen, die wesentliche Bestandteile der olfaktorischen Signalverarbeitung sind. Taurin hat jedoch offenbar keinen Einfluss auf die Aktivität der kurzen Interneurone im BO der Ratte (Belluzzi et al., 2004). Auch wenn histologisch und immunhistochemisch bis auf den fehlenden Taurinnachweis in den Interneuronen und afferenten Projektionen sowie die in (Abb. 7.2 d, e) dargestellte vermehrte Vakuolisierung im perinukleären Zytoplasma der Mitralzellen bei *taut-/-* Mäusen keine weiteren Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt worden ist, lässt sich eine funktionelle Beeinträchtigung vermuten.

Eine genauere Analyse mit Zählung der Glomeruli, Büschel- und Mitralzellen sowie morphometrische Untersuchungen am Bulbus olfactorius stehen noch aus.

Abschließend stellt sich die Frage, ob Taurin ähnlich den anderen kleinen Aminosäuren auch in den ORN vorkommt oder nicht. Margolis et al. (1974) haben gezeigt, dass der Gehalt anderer kleiner Aminosäuren, z.B. Carnosin, nach Durchtrennung der ORN-Axone zum BO bzw. nach Bulbektomie im OE dramatisch abgefallen ist. Dieser Effekt bleibt jedoch für Taurin aus. Aus diesem Grund ist gefolgert worden, dass sich Taurin nicht in den ORN befindet. Dem gegenüber haben Didier et al. (1994) eine Immunreaktivität für Taurin in der Nervenzellschicht des BO von Ratten nachgewiesen. Möglicherweise überdeckt die kräftige Taurin-Immunreaktivität der Stützzellen im OE in der vorliegenden Untersuchung eine etwaige diskrete Markierung der ORN.

5.6. Zusammenfassung

An einem Taurintransporter-Knockout-Modell der Maus wurde untersucht, ob Taurinmangel zu morphologischen oder immunhistochemisch nachweisbaren Veränderungen an der Riechschleimhaut führt.

In Wildtypen (taut+/+) und Heterozygoten Tieren (taut+/-) befindet sich Taurin in hoher Konzentration in Stützzellen des OE sowie in afferenten Nervenfasern des BO. Da Taurintransporter-Knockout-Mäuse (taut/-) aufgrund der Inaktivierung des Taurintransporters nahezu kein Taurin mehr aus dem Extrazellulärraum in die Zellen aufnehmen können, zeigen sie eine drastisch reduzierte Reaktivität für den Anti-Taurin-AK. Offensichtliche morphologische Veränderungen des OE sowie des BO von taut/- Tieren sind nicht nachzuweisen, jedoch zeigen taut/- Mäuse im OE eine signifikant erhöhte Proliferationstätigkeit sowie eine gesteigerte Apoptose. Zudem weisen die 18 Monate alten Tiere eine signifikante Verringerung der Stützzellpopulation und eine tendenzielle Minderung der Anzahl der ausgereiften ORN auf. Darüber hinaus ist HSP 25, welches in Situationen zellulären Stresses hochreguliert wird, in taut/- Mäusen deutlich stärker exprimiert.

Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass Taurin im OE eine wichtige Rolle beim Schutz vor Zellstress spielt. So ist in dieser Studie nachgewiesen worden, dass Stützzellen aufgrund des Verlustes der Taurinwirkung nun andere zytoprotektive Systeme, wie das HSP 25-System, hochregulieren. Dieser Versuch erscheint jedoch insbesondere bei älteren Tieren als nicht ausreichend, wie die signifikant erhöhte Proliferations- und Apoptoserate im OE zeigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern das Zusammenspiel und die gegenseitige Einflussnahme von Stützzellen und ORN.

6. Methodenkritik

- 1.) Laut Heller-Stilb et al. (2002) wird der Tauringehalt in primären Fibroblasten durch die Inaktivierung des Taurintransportergens um 98% reduziert. Ähnliche Ergebnisse sind für Skelett- und Herzmuskelzellen mit 97% Reduktion gefunden worden. Demgegenüber ist der Tauringehalt in Leberzellen, bei denen eine endogene Taurinproduktion bekannt ist, nur um 74% reduziert. Bei ORN herrscht, wie unter Punkt 5.5) zu sehen, noch eine kontroverse Diskussion, ob und wenn in welchem Maße ORN befähigt sind, selbst Taurin zu synthetisieren. Wäre dies der Fall, so müsste davon ausgegangen werden, dass die Experimente nicht das gesamte Ausmaß der Schädigung durch den Taurinmangel erfassen können. Wie zuvor diskutiert, ist keine Taurin-IR in ORN oder in der NZS des BO nachgewiesen worden.
- 2.) Die Ergebnisse zeigen bezüglich des immunhistochemischen Reaktionsmusters keine Unterschiede zwischen $taut^{+/+}$ - und $taut^{+/-}$ Mäusen. Insbesondere bei der Taurin-IR sind keine Unterschiede festzustellen. Daher sind die Wildtypiere und die Heterozygoten zur Erhöhung der Fallzahl in einer Gruppe zusammengefasst worden. Hierdurch könnte sich ähnlich wie bei dem erstgenannten Punkt eine Verringerung der Unterschiede zwischen ($taut^{-/-}$) und [$(taut^{+/+})(taut^{+/-})$] ergeben.

7. Thesen der Arbeit

- 1.) Taurin spielt eine wichtige Rolle bei der zellulären Homöostase im Olfaktorischen Epithel der Maus. In Stützzellen des OE von taut-/- Mäusen findet sich im Vergleich zu den Kontrolltieren nahezu keine Taurin-IR.
- 2.) Taurin wirkt über den Taurin-Hypotaurin-Weg zytoprotektiv. Dies ist insbesondere im OE von großer Bedeutung, da hier ein direkter Kontakt des ZNS via ORN mit der Außenwelt besteht und das OE ständig Riechstoffen und Xenobiotika ausgesetzt ist.
- 3.) Fällt die schützende Wirkung durch einen Taurinmangel weg, müssen vermehrt andere zytoprotektive Systeme wie z.B. das HSP 25-System aktiviert werden. Da diese den Verlust der schützenden Taurinwirkung nur partiell kompensieren können, kommt es reaktiv zu einer erhöhten Apoptose und zu einer vermehrten zellulären Proliferation im OE.
- 4.) Der Kompensationsweg über eine erhöhte zelluläre Proliferation wird jedoch mit zunehmendem Alter der taut-/- Mäuse insuffizient, da sowohl die Zahl der ORN als auch die der Stützzellen, welche sich zu einem Teil aus der neuronalen Entwicklungsreihe differenzieren, im OE abnimmt.
- 5.) Signifikante morphologische Unterschiede im OE von taut-/- und taut+/+ Mäusen im Sinne einer Degeneration bei taut-/- Tieren, wie sie an der Retina auftreten stellen sich nicht dar. Dies lässt sich zum einen durch die hohe Kompensationsfähigkeit des OE mittels gesteigertem Zellersatz und zum anderen durch die bis jetzt nicht sicher ausgeschlossene endogene Taurinsynthese in den ORN erklären.
- 6.) Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass Taurinmangel zu einer Veränderung der für die Weiterleitung der olfaktorischen Information wichtigen Mitralzellen des BO führt. Im Gruppenvergleich zeigen sich bei taut-/- Mäusen eine vermehrte Vakuolisierung im perinukleären Zytoplasma. Dies kann auf eine beginnende Zelldegradation hinweisen. Gezielte Untersuchungen am BO werden zur Klärung dieser Frage nötig sein.

8. Literaturverzeichnis

- Abercrombie M (1946) Estimation of nucleolar population from microtome sections. *Anatomical Record* 94: 239-247.
- Altshuler D, Lo Turco JJ, Rush J, Cepko C (1993) Taurine promotes the differentiation of a vertebrate retinal cell type in vitro. *Development* 119: 1317-1328.
- Asan E, Drenckhahn D (2005) Immunocytochemical characterization of two types of microvillar cells in rodent olfactory epithelium. *Histochem Cell Biol.* 123(2): 157-68.
- Au E, Roskams AJ (2003) Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro. *Glia* 41: 224-236.
- Au WW, Treloar HB, Greer CA (2002) Sublaminar organization of the mouse olfactory bulb nerve layer. *J Comp Neurol* 446: 68-80.
- Azuma J, Sawamura A, Awata N, Ohta H, Hamaguchi T, Harada H, Takihara K, Hasegawa H, Yamagami T, Ishiyama T (1985) Therapeutic effect of taurine in congestive heart failure: a double-blind crossover trial. *Clin Cardiol.* 8(5):276-82.
- Baldisseri DM, Margolis JW, Weber DJ, Koo JH, Margolis FL (2002) Olfactory marker protein (OMP) exhibits a beta-clam fold in solution: implications for target peptide interaction and olfactory signal transduction. *J Mol Biol* 319: 823-837.
- Banay-Schwartz M, Lajtha A, Palkovits M (1989) Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements. II. Taurine and small neutral amino acids. *Neurochem Res* 14: 563-570.
- Belluzzi O, Puopolo M, Benedusi M, Kratskin I (2004) Selective neuroinhibitory effects of taurine in slices of rat main olfactory bulb. *Neuroscience* 124: 929-944.
- Bodian D, Howe HA (1941) Experimental studies on intraneural spread of poliomyelitis virus. In: *Bull Johns Hopkins Hosp* 68: 248-267.
- Breer H, Boekhoff I (1992) Termination of second messenger signaling in olfaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(2): 471-4.
- Breer H, Shepherd GM (1993) Implications of the NO/cGMP system for olfaction. *Trends Neurosci* 16(1): 5-9.
- Bretz M (2002) Taurin: Chemie, Biochemie, Anwendung. Seminararbeit, Bayrische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie.
- Buck L, Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65(1): 175-87.

- Caggiano M, Kauer JS, Hunter DD (1994) Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron* 13: 339-352.
- Carr VM, Farbman AI, Colletti LM, Morgan JI (1991) Identification of a new non-neuronal cell type in rat olfactory epithelium. *Neuroscience* 45(2): 433-49.
- Carr VM, Menco BP, Yankova MP, Morimoto RI, Farbman AI (2001) Odorants as cell-type specific activators of a heat shock response in the rat olfactory mucosa. *J Comp Neurol* 432: 425-439.
- Carter LA, MacDonald JL, Roskams AJ (2004) Olfactory Horizontal Basal Cells Demonstrate a Conserved Multipotent Progenitor Phenotype. *J Neurosci* 24: 5670-5683.
- Chen X, Fang H, Schwob J (2004) Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 469: 457-474.
- Costanzo RM, Morrison EE (1989) Three-dimensional scanning electron microscopic study of the normal hamster olfactory epithelium. *J Neurocytol* 18: 381-391.
- Collins GG (1974) The rates of synthesis, uptake and disappearance of (14C)-taurine in eight areas of the rat central nervous system. *Brain Res* 76: 447-459.
- Cowan CM, Roskams AJ (2002) Apoptosis in the mature and developing olfactory neuroepithelium. *Microsc Res Tech* 58: 204-215.
- Davis JM, Himwich WA (1973) Amino acids and proteins of developing mammalian brain. In: *Biochemistry of the Developing Brain*, ed. Himwich WA, New York: Dekker, 55-110.
- Didier A, Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1994) Differential subcellular distribution of glutamate and taurine in primary olfactory neurones. *Neuroreport* 6: 145-148.
- Ding XX, Dahl AR. (2003). Olfactory mucosa: composition, enzymatic localization, and metabolism. In: Doty R (ed) *Handbook of olfaction and gustation*. Vol., Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, pp. 51-73.
- El Idrissi A, Harris C, Trenkner E (1998) Taurine modulates glutamate- and growth factors-mediated signaling mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 442: 385-396.
- El Idrissi A, Trenkner E (1999) Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism. *J Neurosci* 19: 9459-9468.
- Farbman AI (2000). Cell biology of olfactory epithelium. In: Finger TE, Silver W, Restrepo D (ed) *The Neurobiology of Taste and Smell*. Vol., Wiley-Liss, New York, Chicester, Weinheim, pp. 131-158.
- Farbman AI, Brunjes PC, Rentfro L, Michas J, Ritz S (1988) The effect of unilateral naris occlusion on cell dynamics in the developing rat olfactory epithelium. *J Neurosci* 8: 3290-3295.

- Farbman AI, Menco B (1986) Development of olfactory epithelium in the rat. In Breipohl W, ed. *Ontogeny of olfaction*. New York: Springer-Verlag, 1986: 45-56.
- Fellman JH, Roth ES (1985) The biological oxidation of hypotaurine to taurine: hypotaurine as an antioxidant. *Prog Clin Biol Res*. 179:71-82.
- Franconi F, Stendardi I, Matucci R, Failli P, Bennardini F, Antonini G, Giotti A (1984) Inotropic effect of taurine in guinea-pig ventricular strips. *Eur J Pharmacol*. 20;102(3-4):511-4.
- Getchell ML, Boggess MA, Pruden SJ, 2nd, Little SS, Buch S, Getchell TV (2002) Expression of TGF-beta type II receptors in the olfactory epithelium and their regulation in TGF-alpha transgenic mice. *Brain Res* 945: 232-241.
- Getchell TV, Narla RK, Little S, Hyde JF, Getchell ML (2000) Horizontal basal cell proliferation in the olfactory epithelium of transforming growth factor-alpha transgenic mice. *Cell Tissue Res* 299: 185-192.
- Getchell TV, Margolis FL, Getchell ML (1984) Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction. *Prog Neurobiol* 23: 317-345.
- Gong SG (2001) Characterization of olfactory nerve abnormalities in Twirler mice. *Differentiation* 69: 58-65.
- Goldstein BJ, Schwob JE (1996) Analysis of the globose basal cell compartment in rat olfactory epithelium using GBC-1, a new monoclonal antibody against globose basal cells. *J Neurosci* 16(12): 4005-16.
- Graziadei PP, Monti Graziadei GA (1978) Continuous nerve cell renewal in the olfactory system. In: Jacobson M, ed. *Handbook of sensory physiology*. Vol. 9 Berlin: Springer Verlag: 55-82.
- Graziadei PP, Monti Graziadei GA (1979) 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* 1:1-18.
- Graziadei PP, Monti Graziadei GA (1979) Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol* 2:197-213.
- Greer CA (1991). Structural organization of the olfactory system. In: Getchell TV (ed) *Smell and Taste in Health and Disease*. Vol., Raven Press, New York, pp. 65-81.
- Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H (2007) Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. (6):599-614. Review.
- Heller-Stilb B, van Roeyen C, Rascher K, Hartwig HG, Huth A, Seeliger MW, Warskulat U, Häussinger D (2002) Disruption of the taurine transporter gene (taut) leads to retinal degeneration in mice. *FASEB J* 16: 231-233.

- Holbrook EH, Szumowski KE, Schwob JE (1995) An immunochemical, ultrastructural, and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 363: 129-146.
- Huang D, Boini K, Lang P, Grahammer F, Duszenko M, Heller-Stilb B, Warskulat U, Häussinger D, Lang F, Vallon V (2005) Impaired ability to increase water excretion in mice lacking the taurine transporter gene TAUT. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* DOI: 10.1007/s00424-005-1499-y.
- Huard JM, Youngentob SL, Goldstein BJ, Luskin MB, Schwob JE (1998) Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells. *J Comp Neurol.* 400(4):469-86.
- Huxtable RJ (1989) Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. *Progress in Neurobiology* 32: 471-533.
- Huxtable RJ (1992) Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72: 101-163.
- Iwai N, Zhou Z, Roop DR, Behringer RR (2008) Horizontal Basal Cells are Multipotent Progenitors in Normal and Injured Adult Olfactory Epithelium. *Stem Cells* 26(5):1298-306
- Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* 268: 1517-1520.
- Jones DT, Reed RR (1989) G_{olf} : an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244(4906): 790-5.
- Kamisaki Y, Wada K, Nakamoto K, Itoh T (1996) Effects of taurine on GABA release from synaptosomes of rat olfactory bulb. *Amino Acids* 10: 49-57.
- Kirstein CL, Coopersmith R, Bridges RJ, Leon M (1991) Glutathione levels in olfactory and non-olfactory neural structures of rats. *Brain Res* 543: 341-346.
- Korsching S (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci.* 13(7): 2739-48.
- Kratskin IL, Rio JP, Kenigfest NB, Doty RL, Reperant J (2000b) A light and electron microscopic study of taurine-like immunoreactivity in the main olfactory bulb of frogs. *J Chem Neuroanat* 18: 87-101.
- Krautwurst D, Yau KW, Reed RR (1998) Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell* 95(7): 917-26.
- Kwon BS, Kim MK, Kim WH, Pyo JS, Cheon YH, Cha CI, Nam SY, Baik TK, Lee BL (2005) Age-related changes in microvillar cells of rat olfactory epithelium. *Neurosci Lett.* 378(2): 65-69.
- Lewis JL, Dahl AR (1995) Olfactory Mucosa: Composition, Enzymatic Localization, and Metabolism. In *Handbook of Clinical Olfaction and Gustation* (Doty RL ed.), Marcel Dekker, Inc., New York 33-52.

- Liebich HG (1975) Zum Bau der oberen Luftwege der weißen Ratte (*Mus rattus norvegicus*, var. albinos). *Anat Anz* 138: 170-179.
- Lopez-Colome AM, Pasantes-Morales H (1981) Taurine binding to membranes from rat brain regions. *J Neurosci Res* 6: 475-485.
- Lourenço R, Camilo ME (2002) Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? *Nutr. Hosp.* XVII (6) 262-270.
- Leung CT, Coulombe PA, Reed RR (2007) Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat Neurosci.* 10(6):720-6.
- Maar T, Moran J, Schousboe A, Pasantes-Morales H (1995) Taurine deficiency in dissociated mouse cerebellar cultures affects neuronal migration. *Int J Dev Neurosci* 13: 491-502.
- Mackay-Sim A, Chuah MI (2000) Neurotrophic factors in the primary olfactory pathway. *Progress in Neurobiology* 62: 527-559.
- Magrassi L, Graziadei PP (1995) Cell death in the olfactory epithelium. *Anat Embryol (Berl)* 192: 77-87.
- Mahalik TJ (1996) Apparent apoptotic cell death in the olfactory epithelium of adult rodents: death occurs at different developmental stages. *J Comp Neurol* 372: 457-464.
- Margolis FL (1974) Carnosine in the primary olfactory pathway. *Science* 184: 909-911.
- Margolis FL, Roberts N, Ferriero D, Feldman J (1974) Denervation in the primary olfactory pathway of mice: biochemical and morphological effects. *Brain Res.* 81(3):469-83.
- Margolis FL (1982) Olfactory marker protein (OMP). *Scand J Immunol Suppl* 9: 181-199.
- Meizel S, Lui CW, Working PK, Mrsny RJ (1980) Taurine and hypotaurine: their effects on motility, capacitation and acrosome reaction of hamster sperm in vitro and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. *Dev. Growth Differ.* 22: 483-494.
- Menco B, Farbman AI (1985) Genesis of cilia and microvilli of rat nasal epithelia during prenatal development. I. Olfactory epithelium, qualitative studies. *J Cell Sci* 78: 283-310.
- Menco B, Farbman AI (1985) Genesis of cilia and microvilli of rat nasal epithelia during prenatal development. II. Olfactory epithelium, a morphometric analysis. *J Cell Sci* 78: 311-336.
- Menco BP, (2005) The fine-structural distribution of G-protein receptor kinase 3, beta-arrestin-2, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and phosphodiesterase PDE1C2, and a Cl⁻-cotransporter in rodent olfactory epithelia. *JNeurcytol.* 34 (1-2): 11-36

- Menéndez N, Herreras O, Solis JM, Herranz AS, Martín del Río R (1989) Extracellular taurine increase in rat hippocampus evoked by specific glutamate receptor activation is related to the excitatory potency of glutamate agonists. *Neurosci Lett.* 102(1):64-9.
- Miyawaki A, Homma H, Tamura H, Matsui M, Mikoshiba K (1996) Zonal distribution of sulfotransferase for phenol in olfactory sustentacular cells. *Embo J* 15: 2050-2055.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11-24.
- Mombaerts P (2004) Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited. *Curr Opin Neurobiol* 14(1):31-6.
- Moran J, Maar T, Gegelashvili G, Bock E, Schousboe A, Pasantés-Morales H (1996) Taurine deficiency and neuronal migration. *Adv Exp Med Biol* 403: 519-526.
- Moran DT, Rowley JC, Jafek III BW (1982) Electron microscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: the microvillar cell. *Brain Res* 253(1-2): 39-46.
- Morimoto RI (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12: 3788-3796.
- Nef P, Heldman J, Lazard D, Margalit T, Jaye M, Hanukoglu I, Lancet D (1989) Olfactory-specific cytochrome P-450. cDNA cloning of a novel neuroepithelial enzyme possibly involved in chemoreception. *J Biol Chem*, 25;264(12):6780-5.
- Noé J, Breer H (1998) Functional and molecular characterization of individual olfactory neurons. *J Neurochem* 71(6): 2286-93.
- Nomura T, Takahashi S, Ushiki T (2004) Cytoarchitecture of the normal rat olfactory epithelium: Light and scanning electron microscopic studies. *Arch Histol Cytol*, 67 (2): 159-170.
- Nosrat IV, Lindskog S, Seiger A, Nosrat CA (2000) Lingual BDNF and NT-3 mRNA expression patterns and their relation to innervation in the human tongue: similarities and differences compared with rodents. *J Comp Neurol.* 417(2):133-52.
- Ohta Y, Ichimura K (2000) Proliferation markers, proliferating cell nuclear antigen, Ki67, 5-bromo-2'-deoxyuridine, and cyclin D1 in mouse olfactory epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109: 1046-1048.
- Oja SS, Holopainen I, Kontro P (1990) Stimulated taurine release from different brain preparations: changes during development and aging. *Prog Clin Biol Res* 351: 277-287.
- Okano M, Takagi SF (1974) Secretion and electrogenesis of the supporting cell in the olfactory epithelium. *J Physiol* 242(2): 353-70.
- Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 14: 453-501.

- Pow DV, Sullivan R, Reye P, Hermanussen S (2002) Localization of taurine transporters, taurine, and (3)H taurine accumulation in the rat retina, pituitary, and brain. *Glia* 37: 153-168.
- Price JL (1987) The central and accessory olfactory stems. In: Finger TE, Silver WL, eds. *Neurobiology of taste and smell*. NY John Wiley & Sons: 179-204.
- Rascher K, Servos G, Berthold G, Hartwig H, Warskulat U, Heller-Stilb B, Häussinger D (2004) Light deprivation slows but does not prevent the loss of photoreceptors in taurine transporter knockout mice. *Vision Res* 44: 2091-2100.
- Rawson NE, Gomez G (2002) Cell and molecular biology of human olfaction. *Microsc Res Tech* 58(3): 142-51.
- Ross CD, Godfrey DA, Parli JA (1995) Amino acid concentrations and selected enzyme activities in rat auditory, olfactory, and visual systems. *Neurochem Res* 20: 1483-1490.
- Sakata Y, Olson JK, Michel WC (2003) Assessment of neuronal maturation and acquisition of functional competence in the developing zebrafish olfactory system. *Methods Cell Sci* 25: 39-48.
- Sawamura A, Azuma J, Harada H, Hasegawa H, Ogura K, Sperelakis N, Kishimoto S (1983) Protection by oral pretreatment with taurine against the negative inotropic effects of low-calcium medium on isolated perfused chick heart. *Cardiovasc Res.* 17(10):620-6.
- Schild D, Restrepo D (1998) Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol Rev* 78(2): 429-66.
- Schloss P, Puschel AW, Betz H (1994) Neurotransmitter transporters: new members of known families. *Curr Opin Cell Biol* 6: 595-599.
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182: 311-322.
- Schwob JE, Youngentob SL (1992) Reconstitution of the olfactory epithelium and reinnervation of the olfactory bulb after methyl bromide lesions. *Chem Senses* 17: 696.
- Schwob JE (2002) Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec* 269: 33-49.
- Schwob JE, Youngentob SL, Mezza RC (1995) Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion. *J Comp Neurol* 359: 15-37.
- Sergeeva OA, Chepkova AN, Doreulee N, Eriksson KS, Poelchen W, Monnighoff I, Heller-Stilb B, Warskulat U, Häussinger D, Haas HL (2003) Taurine-induced long-lasting enhancement of synaptic transmission in mice: role of transporters. *J Physiol* 550: 911-919.

- Shepherd GM (1989) Studies of development and plasticity in the olfactory sensory neuron. *J Physiol (Paris)*. 83(3):240-5.
- Shibanoki S, Kogure M, Sugahara M, Ishikawa K (1993) Effect of systemic administration of N-methyl-D-aspartic acid on extracellular taurine level measured by microdialysis in the hippocampal CA1 field and striatum of rats. *J Neurochem*. 61(5):1698-704.
- Skabo SJ, Holloway AF, West AK, Chuah MI (1997) Metallothioneins 1 and 2 are expressed in the olfactory mucosa of mice in untreated animals and during the regeneration of the epithelial layer. *Biochem Biophys Res Commun* 232: 136-142.
- Spehr M, Wetzel CH, Hatt H, Ache BW (2002) 3-phosphoinositides modulate cyclic nucleotide signaling in olfactory receptor neurons. *Neuron* 33(5): 731-9.
- Sturman JA (1993) Taurine in development. *Physiol Rev* 73: 119-147.
- Suzuki Y, Takeda M, Farbman AI (1996) Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bullectomy. *J Comp Neurol* 376(4): 509-17.
- Taylor CR, Shi SR, Chaiwun B, Young L, Imam SA, Cote RJ (1994) Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections: androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques. *Hum Pathol* 25: 263-270.
- Trenkner E (1990) Possible role of glutamate with taurine in neuron-glia interaction during cerebellar development. *Prog Clin Biol Res* 351: 133-140.
- Vaux DL, Strasser A (1996) The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(6): 239-44.
- Verhaagen J, Oestreicher AB, Grillo M, Khew-Goodall YS, Gispén WH, Margolis FL (1990) Neuroplasticity in the olfactory system: differential effects of central and peripheral lesions of the primary olfactory pathway on the expression of B-50/GAP43 and the olfactory marker protein. *J Neurosci Res* 26: 31-44.
- Warskulat U, Flögel U, Jacoby C, Hartwig H-G, Thewissen M, Merx MW, Molojavyi A, Heller-Stilb B, Schrader J, Häussinger D (2004) Taurine transporter knockout depletes muscle taurine levels and results in severe skeletal muscle impairment but leaves cardiac function uncompromised. *FASEB J* 18: 577-579.
- Weiler E, Farbman AI (1997) Proliferation in the rat olfactory epithelium: age-dependent changes. *J Neurosci* 17: 3610-3622.
- Weiler E, Farbman AI (1998) Supporting cell proliferation in the olfactory epithelium decreases postnatally. *Glia* 22: 315-328.
- Witt M, Georgiewa B, Knecht M, Hummel T (2002) On the chemosensory nature of the vomeronasal epithelium in adult humans. *Histochem Cell Biol* 117: 493-509.

- Witt M, Roth C, Hummel T, Warskulat U, Bidmon HJ, Häussiger D (2004) Taurine transporter knockout in mice reduces their ability to smell. 14th Int. Symp. on olfaction and taste (ISOT XIV), Kyoto, Japan.
- Yamagishi M, Hasegawa S, Takahashi S, Nakano Y, Iwanaga T (1989) Immunohistochemical analysis of the olfactory mucosa by use of antibodies to brain proteins and cytokeratin [see comments]. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 98: 384-388.
- Yamagishi M, Nakamura H, Nakano Y, Kuwano R (1992) Immunohistochemical study of the fourth cell type in the olfactory epithelium in guinea pigs and in a patient. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 54(2):85-90.

9. Anhang

9.1. Silanisierung

- 1.) Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsgänge erfolgen in den entsprechenden Lösungen auf einem Magnetrührer (Heidolph Magnetrührer MR 3002 G).
- 2.) Die trockenen OT (Hecht-Assistent, Typ ELKA 2406/1) werden zunächst für 1 min. in eine 70%ige Ethanollösung gestellt. Dieser Schritt dient der Entfernung von Fett und anderen oberflächlichen Verunreinigungen.
- 3.) Einminütiges Einstellen der OT in 10%ige Lösung aus (3-Aminopropyl)triethoxysilan [$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$] (FLUKA Chemika; MW. 221.37 g/mol) in Aceton [CH_3COCH_3] (Merck, pro analysi; MW. 58.08 g/mol).
- 4.) Zwei einminütige Spülungen in Aceton
Drei einminütige Spülungen in Aqua dest.
- 5.) Abschließend folgt eine 24 Stunden währende Trocknungsphase bei 37°C im Brutschrank (Heraeus Instruments GmbH, Kelvitron t).

9.2. Gebrauchslösungen

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS Puffer) (0.01 Mol/l):

- 1.) 27.2g 0.2 molares KH_2PO_4 (Merck, pro analysi, Kaliumhydrogenphosphat, MW. 136.09g/mol) in 1l 0.9% physiologische Kochsalzlösung (Merck, 0.9% NaCl, 54g auf 6l Aqua dest.)
- 2.) 71.2g 0.2 molares $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, pro analysi, Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, MW. 177.99g/mol) in 2l 0.9% phys. Kochsalzlösung
- 3.) pH-Bereich zwischen 7.2 – 7.4

Zitratpuffer (0.01 Mol/l):

- 1.) 15ml 0.1 molar $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Pro Analyti, Zitronensäure-Monohydrat, MW. 210.14g/mol)
- 2.) 85ml 0.1 molar $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Pro Analyti, Trinatriumcitrat-Dihydrat, MW. 294.1g/mol)
- 3.) 15ml aus 1.) + 85ml aus 2.) + 900ml Aqua dest.

Hämalaun nach Mayer:

- 1.) 1g $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$ (Merck, Hämatoxylin, MW. 302.29g/mol) auf 1l Aqua dest.
- 2.) + 0.2g NaJO_3 (Riedel-deHaën, Natriumjodat, MW. 197.89g/mol)
- 3.) + 50g $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Kalium-Aluminium-Alaun)
- 4.) + 50g Chloralhydrat (Merck, Abfüllung)
- 5.) + 1g kristallisierte Zitronensäure (Merck, Abfüllung)

9.3. Immunhistochemie: Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC-Methode)

- 1.) Zunächst werden die ausgewählten Schnitte entparaffiniert. Hierzu werden sie dreimal in Xylol [$C_6H_4(CH_3)_2$] eingestellt und dann in einer absteigend konzentrierten Ethanolreihe (96% - 40%) bis zum Aqua dest. gespült.
- 2.) Bei der anschließenden Vorbehandlung kochen die Schnitte entweder 10 Minuten in Citratpuffer (0.05 Mol/L, pH 6) bei 800 W in der Mikrowelle oder inkubieren 15 Minuten mit 5% Pronase bei 37°C im Brutschrank. Diese Verfahren erhöhen durch Aufbrechen von Bindungen die freien Epitope, an denen die später aufgebrauchten Erst-Antikörper binden können (Taylor et al., 1994).
- 3.) Im folgenden Schritt wird die Aktivität der endogenen Peroxidasen durch eine 30 Minuten dauernde Inkubation mit 3% Wasserstoffperoxid [H_2O_2] gehemmt.
- 4.) Inkubation der OT für 5 Minuten in einem PBS-Bad, welchem 1% Triton X-100 zur Reduktion der Oberflächenspannung hinzu gegeben wird. Um jeden Schnitt (3 pro OT) wird mit einem Fettstift ein Kreis gezogen. Somit kann der auf den Schnitt getropfte Antikörper (AK) nicht davon fließen. Dies ist insbesondere wichtig, wenn die auf einem OT vereinten Schnitte eine unterschiedliche Behandlung erfahren.
- 5.) Inkubation der Schnitte mit Erstantikörper (1.AK) gelöst in 1% bovinem Serum Albumin (BSA)-PBS. Pro Schnitt wird eine Menge von ca. 80 µl Erstantikörperlösung verwendet, um sicher zu stellen, dass der gesamte Schnitt ausreichend benetzt ist und sich somit keine Areale ohne 1.AK bilden. Die Inkubationszeit des 1.AK beträgt 1 Stunde bei 37°C.
- 6.) Dreimaliges Spülen mit PBS. Es folgen zwei fünfminütige Bäder im PBS-Puffer. Etwaige noch nicht auf dem Präparat an Epitope (Antigen) gebundene 1.AK können so entfernt werden.
- 7.) Danach werden die Schnitte mit je 80 µl des 2.AK überschichtet und bei Raumtemperatur für 45 Minuten inkubiert. An den 2.AK ist das Vitamin Biotin gebunden. Nach einem neuerlichen Spülzyklus gibt man den gebrauchsfertigen Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex entsprechend Dosierungsanleitung auf die Schnitte und lässt diesen erneut für 45 Minuten bei Raumtemperatur ruhen. Es folgt eine abschließende Spülung mit PBS.
- 8.) Zuletzt wird mit H_2O_2 aktiviertes, auf 1:10 mit PBS verdünntes DAB (3,3-Diaminobenzidintetrahydrochloriddihydrat) als Chromogen auf die Schnitte geträufelt. Die Entwicklungszeit ist abhängig von der Präparatgröße und -Dicke, sowie von Gewebe- und Antikörpereigenschaften und liegt zwischen 2 und 5 Minuten. Da der gewünschte Antikörper nur Teilbereiche des Präparates markiert, färbt man zur besseren Orientierung für wenige Sekunden mit Hämatoxylin gegen. Anschließend durchlaufen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol und können dann mit DPX (Dermic-Paraxylol, FLUKA Chemie AG, Buchs, Schweiz) eingedeckelt werden.

9.4. Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz erfolgt in Co-Lokalisationen von OMP und HSP 25 sowie OMP und PGP 9.5:

- 1.) Die Arbeitsschritte 1 und 2 gleichen denen der immunhistochemischen Bearbeitung. Die Inkubationskammer, in der die OT während der Inkubationsphasen liegen, muss jedoch aus Licht- und UV-undurchlässigem Material bestehen.
- 2.) Nach Spülen in PBS für 5 Minuten und Umranden der Schnitte auf dem Objektträger mit einem Fettstift wird der gewünschte erste 1.AK auf die Schnitte pipettiert und anschließend für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
- 3.) Nach einer kurzen Spülung in PBS (max. 2.5 Minuten) werden der erste 2.AK (FITC, Donkey anti Goat, 1:100) aufgetragen. Es erfolgt eine weitere einstündige Inkubationsphase bei 37°C.
- 4.) Nach einer weiteren Spülung in PBS wird der zweite 1.AK auf die Schnitte pipettiert und anschließend für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.
- 5.) Daran schließt sich eine weitere Spülung an, wonach der zweite 2.AK (Texas Red, Goat anti Rabbit, 1:100) aufgebracht wird. Eine letzte Inkubationsphase von 1 Stunde bei 37°C folgt.
- 6.) Nach neuerlicher kurzer Spülung mit PBS können die Schnitte mit Gelatine (Dabko) eingedeckelt werden. Die Lagerung erfolgt lichtgeschützt und kühl.

9.5. Abkürzungsverzeichnis

A	1.) Axon; 2.) Astrozyt
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
AC III	Adenylatcyclase III
AK	Antikörper
AOB	akzessorischer Bulbus olfactorius
ATP	Adenosintrisphosphat
B/BG	Bowman-Drüsen
BD	Ausführungsgang der Bowman-Drüsen
BO	Bulbus olfactorius
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CF	Abercrombie Korrekturfaktor
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CK	Cytokeratin
CNG	zyklische Nukleotid-abhängige Kationen-Kanäle
CSAD	cysteine sulfinic acid decarboxylase
D	1.) Durchmesser in μm ; 2.) Dendrit
DAB	3,3'-Diamino-benzidintetrahydrochloriddihydrat
DK	dendritischer Knopf

E	Endothel
EPS	externe plexiforme Schicht
G	Glomerulus
GAP-43	Growth associated protein of 43-kDa molecular weight
GBZ	Globose Basalzellen
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GTP	Guanosintrisphosphat
HBZ	Horizontale Basalzellen
HSP 25	Hitzeschockprotein 25
IFL	Immunfluoreszenz
IP ₃	Inositol-1-4-5-trisphosphat
IPS	interne plexiforme Schicht
IR	Immunoreaktivität
KD	Kilo Dalton
Ki 67	Ki 67 (Clone Tec-3)
KOH	Kaliumhydroxid
LC	Lamina cribrosa
M	Mitralzellen
MAK	Monoklonaler Antikörper
MeBr	Methylbromid
MVZ	Mikrovillus-Zellen
N	Nervenfasern
N _C	korrigierte Zellzahl
Ngn-1	Neurogenin 1
NO	Nervi olfactorii
N _R	Rohzellzahl
NSE	Neuronenspezifische Enolase
NZS	Nervenzellschicht
OE	Olfactorisches Epithel
OHZ	Olfaktorische Hüllzellen
OMP	Olfaktorisches Markerprotein
ON	Olfaktorischer Nerv
OR	Geruchsrezeptoren
ORN	Olfaktorische Rezeptorneurone

OT	Objektträger
PAK	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat gepufferter Kochsalzlösung
PGP 9.5	Protein-Gen-Produkt
PGZ	Periglomeruläre Zellen
PM	Pia mater
S	Stützzellen
SUS-1	Stützzellspezifischer Marker 1
SUS-4	Stützzellspezifischer Marker 4
taut -/-	(KO) Taurintransporter-Knockout Mäuse
taut +/-	(HT) Heterozygote Mäuse
taut +/+	(WT) Wildtyp Mäuse
V	Gefäß
ZNS	Zentralnervensystem

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Witt für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas und die intensive fachliche Betreuung der Arbeit und Herrn Prof. Dr. T. Hummel für die Hilfe bei der statistischen Auswertung danken. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Institutsdirektor Prof. Dr. R.H.W. Funk.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. Häussinger, Direktor der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf sowie Herrn PD Dr. U. Warskulat und Dr. H.J. Bidmon für die freundliche Überlassung der Taurintransporter Knockout-Mäuse und die gute Zusammenarbeit sowie die fachliche Unterstützung.

Ganz herzlich möchte ich Frau B. Georgiewa und Frau A. Neißer für Ihre Unterstützung im Labor danken.

Meiner Frau Christiane Roth danke ich sehr für Ihre Begleitung und Unterstützung.

Weiterhin danke ich meinen Eltern Ulrike und Thomas Roth.

11. Eigenständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel: „Auswirkungen von Taurinmangel auf das Olfaktorische Epithel der Maus und dessen Regenerationsfähigkeit am Beispiel des Taurintransporter Knockout-Modells“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, habe ich in jedem einzelnen Fall durch die Angabe der Quelle, auch der benutzten Sekundärliteratur, als Entlehnung kenntlich gemacht. Eine Dissertationsschrift zu diesem Thema liegt nach meinem Kenntnisstand nicht vor.

Nordhausen, den 16.09.2008