

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Anatomie II
Vorstand: Professor Dr. med. D. Drenckhahn

Untersuchungen zur molekularen Zusammensetzung von Verschluss- und Adhärenskontakten im
olfaktorischen Epithel und den Fila olfactoria der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Axel Steinke
aus
Hammelburg

Würzburg, Januar 2009

Referentin: Professorin Dr. med. Esther Asan

Korreferentin: Professorin Dr. med. Anna Leena Sirén

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28. 04. 2009

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern.

1. Einleitung	1
1.1. Das periphere olfaktorische System	2
1.1.1. Die Riechschleimhaut	2
1.1.2. Zelltypen im olfaktorischen Epithel	4
1.1.3. Lamina propria	8
1.1.4. Bulbus olfactorius	11
1.2. Zellkontakte im peripheren olfaktorischen System	14
1.2.1. Proteine der Zellkontakte	16
1.2.2. Verschlusskontakte	16
1.2.3. Verschlusskontakte im olfaktorischen Epithel und in den Fila olfactoria	20
1.2.4. Adherenskontakte	21
1.2.5. Adherenskontakte im olfaktorischen Epithel und in den Fila olfactoria	24
1.3. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	25
2. Material	27
2.1. Geräte und übrige Materialien	27
2.2. Chemikalien	27
2.3. Primärantikörper	28
2.4. Sekundärantikörper	31
3. Methoden	33
3.1. Gewebegewinnung	33
3.1.1. Gewebe für Fluoreszenzmikroskopie	33
3.1.2. Gewebe für Elektronenmikroskopie	33
3.2. Gewebeschnitte	34
3.3. Gefriertrocknung und Epon-Einbettung	34

3.4. Zellkultur	35
3.4.1. Olfactory ensheathing cells (OECs)	35
3.4.2. Olfaktorische Neurone	36
3.5. Immunfluoreszenz- und Immunelektronenmikroskopie	37
3.5.1. Kryoschnitte	37
3.5.2. Eponschnitte	38
3.5.3. Elektronenmikroskopische Präparate und Immunelektronenmikroskopie	38
3.5.4. Zellen	39
4. Ergebnisse	40
4.1. Darstellung unterschiedlicher Reifestadien von olfaktorischen Neuronen	40
4.2. Claudin-vermittelte Verschlusskontakte im olfaktorischen Epithel	43
4.3. Claudin-vermittelte Verschlusskontakte in den Fila olfactoria	51
4.4. Darstellung von Proteinen von Zonula adherens und Punctum adherens	58
4.5. Adherenskontakte im olfaktorischen Epithel	58
4.6. Adherenskontakte in den Fila olfactoria	66
4.7. Zellkulturen von OECs	70
4.7.1. Charakterisierung mittels Immunfluoreszenz	70
4.7.2. Zellkontaktproteine in OEC-Kulturen	72
4.7.3. Expression von CNTF in OEC-Kulturen	74
5. Diskussion	76
5.1. Methodische Überlegungen	76
5.2. Verschlusskontakte im olfaktorischen Epithel	77
5.3. Verschlusskontakte in den Fila olfactoria	81
5.4. Adherenskontakte im olfaktorischen Epithel	84
5.5. Adherenskontakte in den Fila olfactoria	88

5.6. Zellkontaktproteine in OEC-Kulturen	90
5.7. Expression von CNTF in OEC-Kulturen	90
6. Zusammenfassung	92
7. Literatur	94
Danksagung	107
Lebenslauf	108

Abkürzungsverzeichnis

AJ	Adherensjunktion
AK	Antikörper
AMCA	7-Amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid
AZ	Ausführungsgangzelle
b	Blaue Fluoreszenz
BC	Basal cell
BCL	Basal cell layer
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BMP	Bone morphogenetic protein
BO	Bulbus olfactorius
BSA	Bovine serum albumin
BZ	Basalzelle
β -TUB	Beta-tubulin
β III-TUB	Neuron spezifisches β -tubulin, β III Isotyp
Cad	Cadherin
Cat	Catenin
CK	Cytokeratin
Cl	Claudin
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
D	Dendrit
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTAF	5 - (4,6 - Dichlorotriazinyl)aminofluorescein
EDC	Excretory duct cell
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
FO	Fila olfactoria
g	Grüne Fluoreszenz
GA	Glutaraldehyd

GAP	Growth associated protein 43
GBC	Globose basal cell
GDF	Growth differentiation factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GII	Glandulae
HBC	Horizontal basal cell
HBZ	Horizontale Basalzelle
-ir	-immunreaktiv
JAM	Junction adhesion molecule
LP	Lamina propria
MBP	Myelin basic protein
MC	Microvillar cell
MEM	Minimal Essentiell Medium
MV	Mikrovilluszelle
MZ	Mikrovilluszelle
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NDS	Normal donkey serum
NGS	Normal goat serum
OB	Olfactory bulb
Occl	Occludin
OE	Olfactory epithelium, olfaktorisches Epithel
OEC	Olfactory ensheathing cell
OG	Olfactory gland
ONF	Olfactory nerve fibroblast
OMP	Olfactory marker protein
ON	Olfaktorisches Neuron
ORN	Olfaktorisches Rezeptor Neuron
OSN	Olfactory sensory neuron
OSNL	Olfactory sensory neuron layer
PFA	Paraformaldehyd

PBS	Phosphate buffered saline
p120	p120-Catenin
r	Rote Fluoreszenz
RBZ	Runde Basalzelle
RT	Room temperature
SC	Supporting cell
SCL	Supporting cell layer
SZ	Stützzelle
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGF	Transforming growth factor
TJ	Tight junction
V	Vessel
ZO	Zonula occludens protein
ZO1gp	Goat polyclonal anti-ZO1
ZO1m	Rat monoclonal anti-ZO1
ZO1rp	Rabbit polyclonal anti-ZO1

1. Einleitung

Zellen eines Organismus bilden spezialisierte Zellkontakte mit ihrer Umgebung, also mit ihren Nachbarzellen oder mit Strukturen der extrazellulären Matrix aus. Diese Kontakte sind eine wichtige Voraussetzung für zahlreiche zelluläre Funktionen. Zell-Zell-Kontakte werden in Verschluss- und Adhäsionskontakte eingeteilt. Entscheidender Bestandteil für die Ausbildung von Zellkontakten sind integrale Membranproteine, wobei die Verschlusskontaktproteine (Claudine, Occludin, *junction adhesion molecules* JAMs) von den Adhärenskontaktproteinen (insbesondere Cadherine) unterschieden werden. Kontakte zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix werden über Integrine und Selektine vermittelt (Petruzzelli et al., 1999).

Im Zentralnervensystem erfüllen Zellkontaktproteine vielfältige Aufgaben; so sind Cadherine z.B. am Aufbau, der Bildung und der Plastizität von synaptischen Strukturen sowie dem Wachstum von Axonen und Dendriten beteiligt (Ranscht et al., 2000).

Einen besonderen Abschnitt des Nervensystems bildet das olfaktorische System. Die olfaktorischen Sinneszellen sind echte bipolare Neurone und haben, eingebettet in das olfaktorische Epithel, als einzige Neurone des Organismus direkten Kontakt zur Außenwelt. Weiterhin beteiligen sie sich am Aufbau der Epithelbarriere. Aufgrund des direkten Kontaktes zur Außenwelt sind die olfaktorischen Neurone schädlichen Substanzen in der Atemluft ausgesetzt, welche unter Umständen zu einem massiven Untergang der Sinneszellen führen. Zur Erhaltung des Geruchsinnes ist es somit wichtig, dass ständig neue olfaktorische Neurone nachgebildet werden, welche die Funktion der verloren gegangenen ersetzen. Die olfaktorischen Neurone differenzieren sich aus neuronalen Vorläuferzellen, welche im basalen Kompartiment des olfaktorischen Epithels liegen. Diese Stammzellen besitzen lebenslang die Fähigkeit zur asymmetrischen Teilung: Tochterzellen differenzieren zu neuen olfaktorischen Neuronen, welche ihre Axone in das ZNS entsenden und dort neue Synapsen bilden. Die lebenslang stattfindenden neurogenetischen Prozesse und Axonwachstumsvorgänge sowie die ständige Bildung neuer Synapsen im ZNS machen das olfaktorische System zu einem neurobiologisch höchst interessanten Gebiet.

Für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Epithelbarriere sowie für die Prozesse der Neurogenese, des Axonwachstums und der Synaptogenese sind dynamische Zellkontakte von großer Bedeutung. Die Untersuchung der molekularen Komposition dieser Zellkontakte ist eine Voraussetzung für die Beschreibung ihrer spezifischen Funktionen im Rahmen dieser Prozesse.

1.1 Das periphere olfaktorische System

Das periphere olfaktorische System setzt sich aus drei Bestandteilen zusammen: der *Pars olfactoria tunicae mucosae nasi* (Riechschleimhaut), den *Fila olfactoria* (Riechfasern, die in ihrer Gesamtheit den *Nervus olfactorius*, den ersten Hirnnerven bilden) und dem *Bulbus olfactorius* (Riechkolben).

1.1.1 Die Riechschleimhaut

Die *pars olfactoria tunicae mucosae nasi* bildet nur einen kleinen Teil der Nasenschleimhaut, der über der oberen Nasenmuschel, der davor gelegenen lateralen Nasenwand und dem gegenüberliegenden Abschnitt des *Septum nasi* gelegen ist (s. Abb. 1.1).

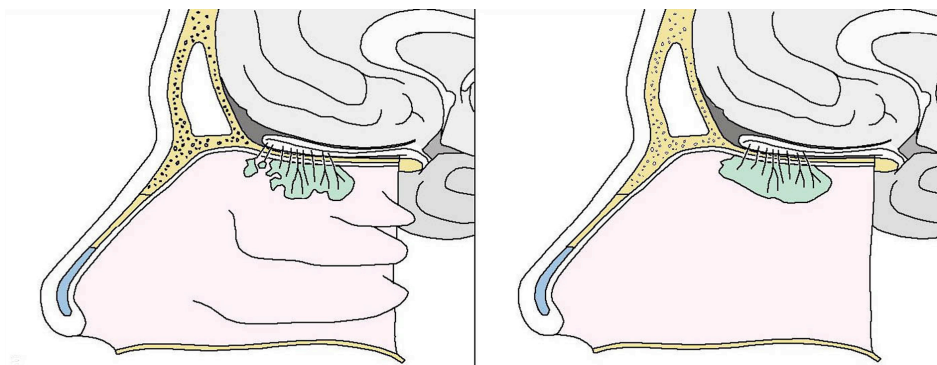


Abb. 1.1: Lokalisation der *Pars olfactoria tunicae mucosae nasi*. In der linken Bildhälfte ist der laterale Abschnitt, in der rechten Bildhälfte der mediale Abschnitt der Riechschleimhaut grün markiert.

Abbildung aus Benninghoff/Drenckhahn Band 2 2004.

Die Abgrenzung gegenüber der *Pars respiratoria tunicae mucosae nasi* ist unscharf; gelegentlich finden sich in der *Pars olfactoria* fleckförmige Bereiche von respiratorischer Nasenschleimhaut (Asan et al., 2003).

Beim olfaktorischen Epithel handelt es sich um ein mehrreihiges Epithel, d.h. alle vorkommenden Zellen haben Kontakt zur Basalmembran, es erreichen aber nicht alle Zellen die apikale Oberfläche des Epithels. Basal an das Epithel schließt sich die *Lamina propria* an, in der u.a. die *Fila olfactoria*, die das Epithel versorgenden Blutgefäße und die olfaktorischen Drüsen (*Glandulae olfactoriae*, Bowman Drüsen) liegen (s. Abb. 1.2).

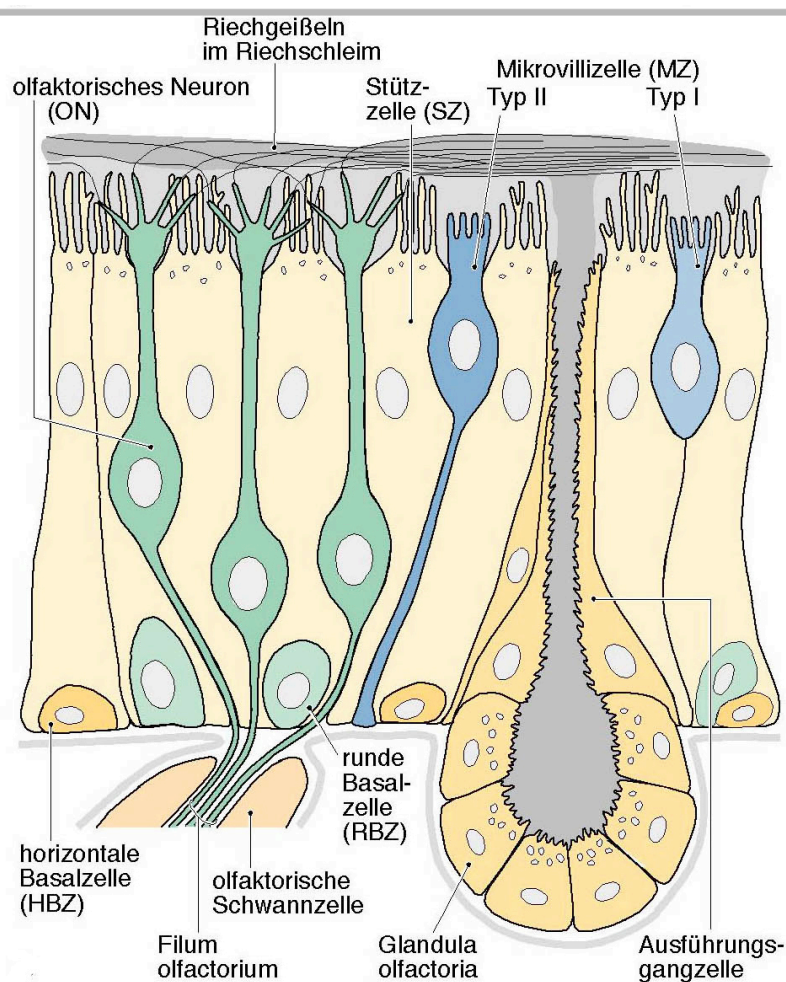


Abb. 1.2: Das Riechepithel ist ein mehrreihiges Säulenepithel. In der Lamina propria sind die Glandulae olfactoriae und die Fila olfactoria lokalisiert. Am Aufbau des Epithels beteiligen sich mehrere Zelltypen: olfaktorische Neurone (ON), Stützzellen (SZ), Mikrovillicellen (MZ). Im basalen Epithelkompartiment sind die runden (RBZ) und die horizontalen (HBZ) Basalzellen lokalisiert.

Abbildung aus Benninghoff/Drenckhahn Band 2.

1.1.2 Zelltypen im olfaktorischen Epithel (s. Abb. 1.2.)

Olfaktorische Rezeptorneurone (ORN, olfaktorische Neurone). Im menschlichen Riechepithel finden sich bis zu 30 Millionen Riechsinneszellen (Asan et al., 2003). Bei ihnen handelt es sich um bipolare Neurone; vom apikalen Pol des Somas entspringt ein Dendrit, welcher zur Epitheloberfläche verläuft. Am basalen Pol entspringt ein dünnes Axon, welches im unteren Abschnitt die Basalmembran des Epithels durchbricht und über die Fila olfactoria in den Bulbus olfactorius projiziert (Graziadei, 1977; Chen et al., 1992). Der Dendrit ragt mit einer verdickten Struktur, dem dendritischen Vesikel, über die Epitheloberfläche und besitzt mehrere fadenförmige Zilien, welche in dem das Epithel überziehendem Riechschleim flottieren. In der Membran der Zilien sind die jeweiligen Geruchsrezeptoren lokalisiert. Im Anfangsteil der Zilien findet sich eine $9 \times 2 + 2$ -Mikrotubuli-Struktur; Dyneinarme fehlen jedoch, was vermuten lässt, dass die Zilien unbeweglich sind.

Die dünnen olfaktorischen Axone ($0,2 - 0,3 \mu\text{m}$) ziehen nach basal in die *Lamina propria* des Epithels und werden auf ihrem Weg zum Gehirn von spezialisierten Gliazellen, den olfaktorischen Gliazellen (*olfactory ensheathing cells, OECs*) umhüllt (Chuah et al., 2002).

Die ORNs haben somit direkten Kontakt zur Außenwelt und sind daher ständig schädlichen Substanzen und Krankheitserregern (z.B. Rhinoviren = Schnupfenviren) ausgesetzt, welche zu neuronalem Zellverlust führen. Eine Besonderheit des olfaktorischen Epithels besteht in der lebenslang stattfindenden Neurogenese, also der Neubildung von Nervenzellen. Bei den neuronalen Vorläuferzellen handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die runden Basalzellen (RBZ). Diese teilen sich asymmetrisch, wobei eine Tochterzelle nach apikal wandert. Im weiteren Verlauf kommt es zur Bildung von einem nach apikal gerichteten dendritischen und einem nach zentral gerichteten axonalen Fortsatz. Schließlich bildet das neu ausgewachsene Axon Synapsen im Bulbus olfactorius, am dendritischen Vesikel sprossen Zilien aus. Diese kennzeichnen morphologisch das funktionell reife olfaktorische Neuron (Schwob et al., 2002).

Je nach Reifegrad unterscheiden sich die olfaktorischen Neurone in der Expression von neuronalen Markerproteinen. So ist das *olfactory marker Protein (OMP)* ausschließlich in reifen olfaktorischen Neuronen nachweisbar (Farman & Margolis, 1980), während das *growth associated protein 43 (GAP43)* vornehmlich in frühen Entwicklungsstufen von olfaktorischen Neuronen nachgewiesen werden kann (Verhaagen et al., 1989, 1990). Ebenso konnte β III-Tubulin als Marker für frühe Reifestadien olfaktorischer Neurone identifiziert werden (Roskams et al., 1998).

Olfaktorische Signaltransduktion. Die Bindung eines Geruchstoffes an seinen jeweiligen Geruchsrezeptor erfolgt über Odotope (Oberflächenstrukturen eines Geruchstoffes). Durch die Bindung eines Odotops an seinen Geruchsrezeptor in der Riechzilienmembran wird die Depolarisation eines olfaktorischen Neurons ausgelöst. Die Interaktion zwischen Odotop und Geruchsrezeptor führt über die Assoziation eines heterotrimeren G-Proteins zur Aktivierung der Adenylatcyclase III (Menini, 1999). Der intrazelluläre Anstieg von cAMP führt zur Öffnung eines Kationenkanals (Nakamura and Gold, 1987) durch welchen Na^+ und Ca^{2+} Kationen entsprechend eines Konzentrationsgefälles zwischen Riechschleim und Zytoplasma der Riechzilie in die Zelle strömen. Die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bewirkt die Öffnung eines Cl^- -Kanals, durch welchen Cl^- -Ionen entsprechend einem Konzentrationsgefälle nach extrazellulär fließen. Die ionale Zusammensetzung des Riechschleimes ist somit von entscheidender Bedeutung für die Depolarisation olfaktorischer Neurone (s. Abb. 1.3).

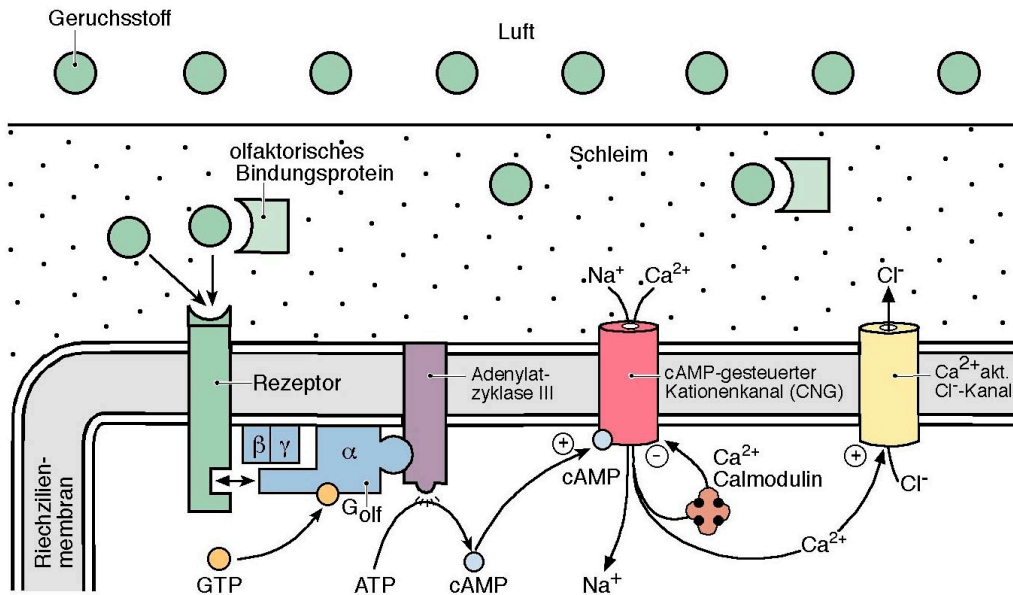


Abb. 1.3: Die Depolarisation der olfaktorischen Neurone ist von der extrazellulären Konzentration bestimmter Ionen abhängig, welche durch die parazelluläre Permeabilität der Verschlusskontakte beeinflusst werden kann.

Abbildung aus Benninghoff/Drenckhahn Band 2.

Der Riechschleim selbst wird von den Glandulae olfactoriae (s. unten) gebildet und in seiner Zusammensetzung durch zelluläre und parazelluläre Transport- und Diffusionsprozesse im olfaktorischen Epithel beeinflusst.

Stützzellen (SZ; supporting cells, SC). Von der Oberfläche dieser Säulenepithelzellen ragen Mikrovilli in den das Epithel überziehenden Riechschleim. Die Funktionen dieser Zellen sind vielfältig; sie beeinflussen durch Sekretions- und Resorptionsmechanismen die ionale Zusammensetzung des Riechschleims, sie phagozytieren abgestorbene olfaktorische Neurone und eliminieren durch Biotransformationsenzyme der Cytochrom-P450-Familie toxische Substanzen (Carr, 2005). In der an olfaktorische Neurone angrenzenden Region der Zelle ist das glatte endoplasmatische Retikulum charakteristischerweise zisternenartig angeordnet und weist viele Vesikel auf. Mit ihrer Umgebung (benachbarte Zellen, olfaktorische Dendriten etc.) bilden sie epitheltypische Zell-Zell-Kontakte aus (*Zonulae occludentes*, *Zonulae adherentes*, *Desmosomen*) (Asan, 2004). Die Zellen sitzen mit einem basalen Fortsatz, der zwischen den Zellkörpern der olfaktorischen Neurone und der Basalzellen hindurchläuft, der Basalmembran auf.

Die Stützzellen enthalten lipofuszinähnliche Einschlüsse, welche der Riechschleimhaut makroskopisch eine gelbliche Farbe verleihen (Drenckhahn et al., 2004).

Basalzellen (BZ; *basal cells*, BC). Sie sind an der Epithelbasis lokalisiert. Man unterscheidet zwei Gruppen, die horizontalen Basalzellen (HBZ; *horizontal basal cells* = HBC) und die runden Basalzellen (RBZ; *globose basal cells* = GBC) (Murray and Calof, 1999). Die GBCs werden als die direkten neuronalen Vorläuferzellen des olfaktorischen Epithels angesehen (Goldstein and Schwob, 1995). Die Funktion der HBCs ist noch nicht vollends geklärt. Es gibt Hinweise, dass sie bei der Umhüllung der olfaktorischen Axone eine Rolle spielen und für die Regeneration des Epithels von Bedeutung sind (Satoh et al., 2000). In ihnen wurde Cytokeratin 14 nachgewiesen, ein Protein der Intermediärfilamente, welches vornehmlich in epithelialen Zellen vorkommt (Satoh et al., 2000).

Mikrovilluszellen (MZ; *microvillus cells*, MC). Sie produzieren das Cytokeratin 18, was auf ihre epitheliale Herkunft hindeutet. Von ihnen gibt es zwei Typen; die kleinere Population der Typ1-Zellen besitzt möglicherweise chemorezeptive Eigenschaften (Höfer et al., 1999; Asan und Drenckhahn 2005), die Funktion der Typ2-Zellen ist noch gänzlich ungeklärt. Die beiden Typen können durch das Vorkommen von bestimmten Proteinen voneinander unterschieden werden (Asan und Drenckhahn 2005). Ihr birnenförmiger Zellkörper liegt im apikalen Bereich des Epithels. Viele Mikrovilluszellen zeichnen sich durch einen 0,4 – 0,6 µm dünnen basalen Fortsatz aus (Morrison et al., 1992), der über der Basalmembran endet (Asan und Drenckhahn 2005).

Ausführungsgangzellen der Glandulae olfactoriae (*excretory duct cells*, EDC). Die Ausführungsgänge der olfaktorischen Drüsen durchsetzen das olfaktorische Epithel in seiner gesamten Höhe. Die Zellen der Drüsenausführungsgänge sind durch Haftkomplexe miteinander verbunden und strecken Mikrovilli in das Drüsenlumen vor.

Durch Sekretions- und Absorptionsmechanismen beeinflussen sie die Zusammensetzung des Riechschleimes. Die Zellkörper erscheinen kuboidal, ihre Längsachse verläuft parallel zum Drüsenausführungsgang. Die Zellen sind epithelialer Herkunft; in ihnen konnte Cytokeratin 18 nachgewiesen werden. Die Zellen sind in ihrer basolateralen Membran reich an Na⁺-K⁺-ATPase. Es gibt Hinweise, dass Zellen der Bowman-Drüsen (s.u.) oder der Ausführungsgänge epitheliale Stammzellen darstellen, welche für die Regeneration des Epithels von Bedeutung sind (Wang et al., 2003).

1.1.3 Lamina propria

Sie schließt sich basal direkt an das Epithel an und ist reich an Nerven und Gefäßen. Neben den *Fila olfactoria* finden sich auch Äste des N. trigeminus sowie vegetative Fasern, welche die Weite von Blutgefäßen und die Sekretionstätigkeit der olfaktorischen Drüsen (*Glandulae olfactoriae*) regulieren.

Glandulae olfactoriae (BOWMAN-Drüsen). Es handelt sich bei ihnen um seröse Drüsen, d.h. sie bilden vornehmlich ein wässriges Sekret. Sie sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung der ionalen Zusammensetzung des Riechschleimes beteiligt, welche von großer Bedeutung für die Geruchswahrnehmung ist. Außerdem enthält das Sekret verschiedene Substanzen, so z.B. IgA-Antikörper zur Infektabwehr und *olfactory binding proteins*. Bei diesen handelt es sich um kleine Proteine, die wahrscheinlich als Tenside für nicht wasserlösliche Geruchsstoffe fungieren (Hajjar et al., 2006). Auf diese Weise können auch hydrophobe Geruchsstoffe im Riechschleim gelöst werden und zu ihrem jeweiligen Rezeptor gelangen.

Fila olfactoria (FO). Innerhalb der Lamina propria des olfaktorischen Epithels bilden die nach zentral gerichteten axonalen Fortsätze der olfaktorischen Neurone Faserbündel. Diese Axonbündel werden als Fila olfactoria bezeichnet und bilden in ihrer Gesamtheit

den N. olfactorius. Beim Menschen ziehen beidseits etwa 20 Fila olfactoria durch die Lamina cribrosa des Os ethmoidale zum Bulbus olfactorius (s. Abb. 1.4).

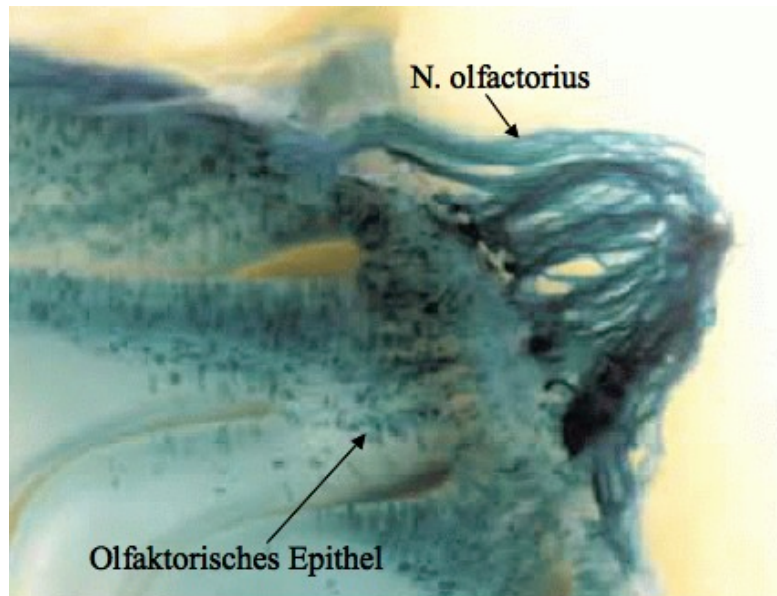


Abb. 1.4: Die Fila olfactoria bilden in ihrer Gesamtheit den N. olfactorius. Die axonalen Fasern projizieren durch die Lamina cribrosa des Os ethmoidale und enden im Stratum fibrosum des Bulbus olfactorius.

Abbildung des olfaktorischen Epithels einer Ratte, modifiziert nach Vassalli 2002.

Olfactory ensheathing cells (OEC). Die OECs (spezifische olfaktorische Gliazellen, olfaktorische Hüllzellen) sind die Gliazellen des peripheren olfaktorischen Systems, welche die Axone der ORNs umhüllen. Sie sind insofern einzigartig, da sie sowohl in den Fila olfactoria, die in ihrem Aufbau mit peripheren Nerven zur vergleichen sind, als auch im Bulbus olfactorius vorkommen, der eine zentralnervöse Struktur darstellt (Fairless et al., 2004). Embryologisch entwickeln sie sich wahrscheinlich wie die ORNs aus der olfaktorischen Plakode, im Unterschied zu anderen Gliazellen, welche von Zellen der Neuralleiste und des Neuralrohrs abstammen (Liu et al., 1995). Diese Gliazellen sind auch für die Aussprossung und das Wachstum der von jungen olfaktorischen Neuronen gebildeten Axone von großer Bedeutung, da sie eine ganze Reihe neurotropher Faktoren produzieren (Mackay-Sim et al., 2000), u.a. auch *ciliary neurotrophic factor (CNTF)* (Lipson et al., 2002).

Wegen ihres Vorkommens sowohl in peripheren als auch zentralnervösen Strukturen und ihrer neurotrophen Fähigkeiten werden diese Gliazellen besonders im Hinblick auf eine Nutzung als Interponate zur Überbrückung von Rückenmarksläsionen bei Querschnittsverletzungen untersucht (Fairless et al., 2004).

Verschiedene Befunde zeigen, dass die axonwachstumsfördernden Eigenschaften der OECs in Rückenmarksläsionen insbesondere von der Produktion neurotropher Faktoren abhängig sind (Lim et al., 2007). Die Fähigkeit zur Bildung einer Myelinscheide, welche gerade im Hinblick auf eine therapeutische Verwendung als Interponat von Querschnittsläsionen interessant wäre, konnte aber bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden (Boyd et al., 2005).

Allerdings wurden in Kulturen von OECs Proteine nachgewiesen, welche in Zusammenhang mit einer möglichen Produktion von Myelin stehen, so z.B. das *myelin basic protein (MBP)* (Ramon-Cueto et al., 1992). Untersuchungen an vielen Säugetierspezies haben gezeigt, dass die Axonbündel der Fila olfactoria durch die OECs in nicht komplett abgeschlossene Kompartimente unterteilt werden (s. Abb. 1.5). Peripher werden die Fila olfactoria von olfaktorischen Fibroblasten (*olfactory nerve fibroblasts, ONFs*) umschichtet, welche einen positiven Einfluss auf die neurotrophen Eigenschaften der OECs ausüben (Raisman, 2001).

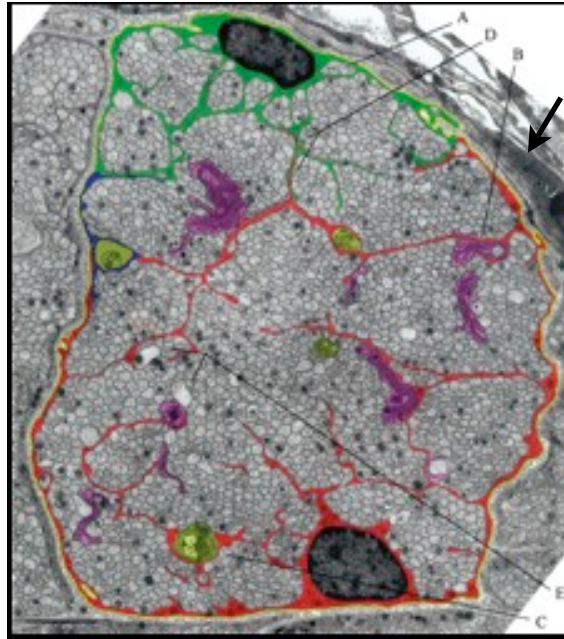


Abb. 1.5: Ultrastrukturell ist die Kompartimentierung der Fila olfactoria durch die OECs (rot und grün markiert) zu erkennen. der Zellkörper eines olfaktorischen Fibroblasten ist durch einen Pfeil markiert. Abbildung modifiziert nach Raisman 2001.

1.1.4 Bulbus olfactorius

Die zwei Bulbi olfactorii sind direkt über der Lamina cribrosa ossis ethmoidalis gelegen. Der Bulbus olfactorius stellt eine telencephale Struktur dar und kann histologisch in sechs Schichten unterteilt werden. Das *Stratum fibrosum* ist die äußerste Schicht des Bulbus und der Eintrittsort der Fasern der Fila olfactoria. Innerhalb des Stratum fibrosum können bei der Maus mehrere Subschichten unterschieden werden (Au et al., 2002). Die zweite Schicht ist das *Stratum glomerulosum*; hier bilden die Axone der olfaktorischen Sinneszellen Synapsenkonglomerate, sog. Glomeruli, mit Projektionsneuronen (Mitral- und Büschelzellen) und mit Fortsätzen der periglomerulären Zellen. Olfaktorische Neurone, welche den gleichen Geruchsrezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren und somit den gleichen Geruchstoff wahrnehmen, projizieren in wenige bestimmte Glomeruli des Bulbus olfactorius. Das geruchsstoffspezifische Aktivierungsmuster olfaktorischer Neurone führt somit zu einem ebenso charakteristischen Aktivierungsmuster bestimmter Glomeruli und damit

zu einer räumlichen Repräsentation des jeweiligen Geruchstoffes im Bulbus olfactorius (s. Abb. 1.6). Die GABAergen periglomerulären Neurone und Körnerzellen können integrativ in die Informationsverarbeitung des Bulbus olfactorius eingreifen.

Das *Stratum plexiforme externum* besteht im Wesentlichen aus den dendritischen Fortsätzen von Mitral-, Büschel- und Körnerzellen. Axonkollateralen der Mitral-, Büschel- und Körnerzellen bilden reziproke dendro-dendritische Synapsen mit lateralen Dendriten der Projektionsneurone. Im *Stratum mitrale* sind die Zellkörper der Mitralzellen lokalisiert. Die Axone der Mitral- und Büschelzellen bilden die Efferenzen des Bulbus olfactorius im Tractus olfactorius. Im *Stratum plexiforme internum* verlaufen Axonkollateralen. Im *Stratum granulosum* sind die Perikaryen der Körnerzellen lokalisiert.

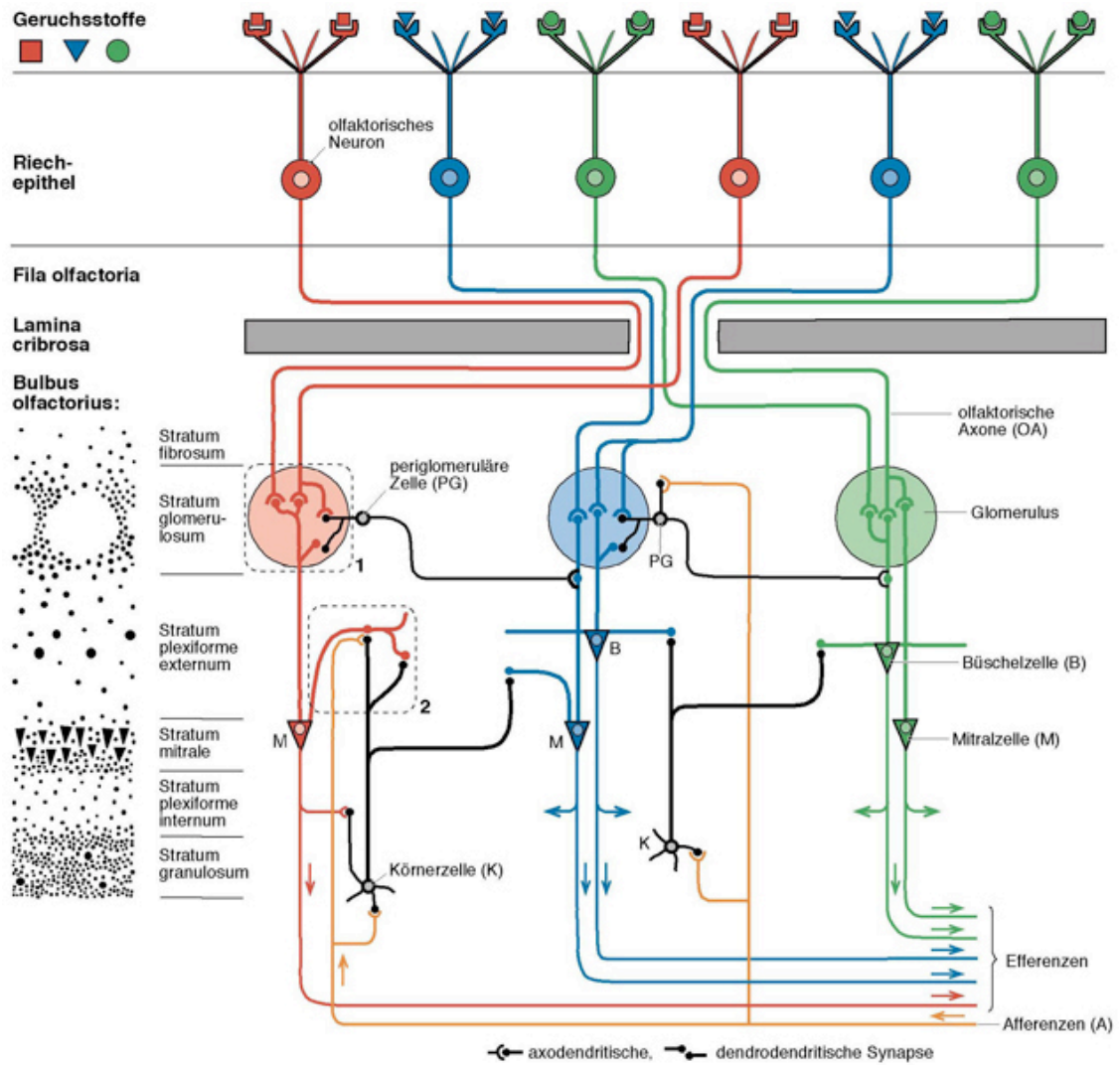


Abb. 1.6: Olfaktorische Neurone, welche den gleichen olfaktorischen Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren (durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet) entsenden ihre Axone in ganz bestimmte olfaktorische Glomeruli. Das geruchsstoffspezifische Aktivierungsmuster olfaktorischer Sinneszellen führt somit zu einer ebenso geruchsstoffspezifischen Aktivierung bestimmter Glomeruli im Bulbus olfactorius.

Abbildung aus Benninghoff/Drenckhahn Band 2.

1.2 Zellkontakte im peripheren olfaktorischen System.

Im Längsschnitt durch das Epithel stellen sich die Zellgrenzen zwischen allen Zelltypen als mehr oder weniger longitudinale Streifen dar. Das Schema der Zellgrenzen im Tangentialschnitt basiert auf der Beobachtung, dass die Dendriten der olfaktorischen Neurone in ihrem apikalen Bereich von Stützzellen teilweise oder vollständig eingehüllt werden (Asan und Drenckhahn 2005; Hussar et al., 2002; Mendoza et al., 1993). Dies ist auch der Fall für die apikalen Enden der Mikrovilluszellen, deren Durchmesser jedoch größer ist, als der Durchmesser der Dendriten. Die Zellgrenzen zwischen Stützzellen stellen sich als polygonale Formen dar; die Zellgrenzen zwischen Stützzellen und Mikrovilluszellen haben die Form größerer Kreise, die Zellgrenzen zwischen Stützzellen und Dendriten die Form kleinerer Kreise (s. Abb. 1.7). Da die Ausführungsgangszellen der Bowman'schen Drüsen das Epithel longitudinal durchziehen, stellen sich im Tangentialschnitt die Kontakte zwischen Stützzellen und Ausführungsgangszellen als sehr große Kreise, die Kontakte zwischen den Ausführungsgangszellen als radiäre Linien innerhalb dieser Kreise dar. Im Longitudinalschnitt erscheinen die Kontakte als längs verlaufende Linien (s. Abb. 1.7).

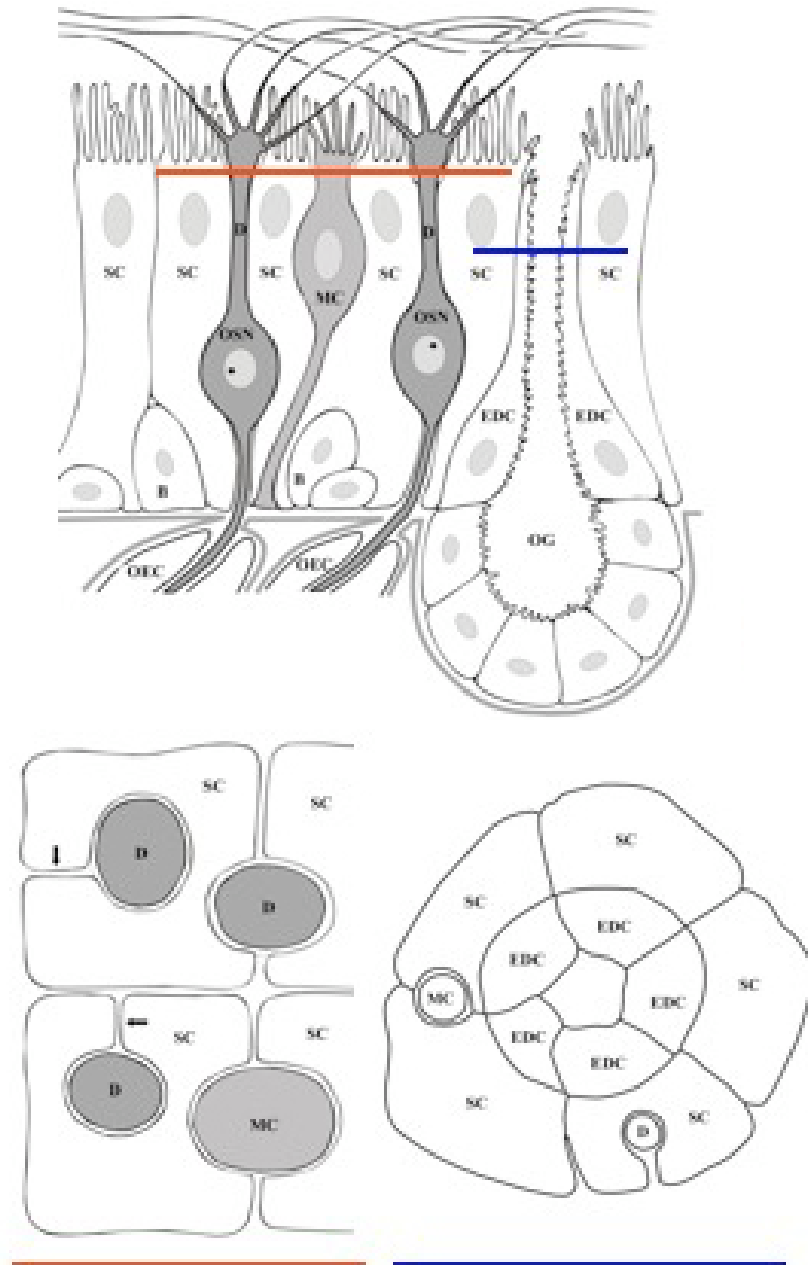


Abb. 1.7: In Transversalschnitten durch das Epithel (rote Linie) stellen sich Kontakte zwischen olfaktorischen Dendriten (D) und Stützzellen (SC) als kreisförmige Strukturen dar. Die Kontakte zwischen Mikrovilluszellen (MC) und Stützzellen (SC) haben ebenfalls ein kreisförmiges Profil, jedoch mit einem größeren Durchmesser. Hetero- und autologe Kontakte zwischen Stützzellen (SC) stellen sich als polygonale Strukturen (in der unteren Bildhälfte sind autologe Stützzellkontakte durch Pfeile gekennzeichnet) dar. In Transversalschnitten durch die Ausführungsgänge der Gll. olfactoriae (blaue Linie) stellen sich die Kontakte zwischen den Ausführungsgangzellen (EDC) als radiär verlaufende Streifen dar, die Kontakte zwischen Stützzellen (SC) und Ausführungsgangzellen (EDC) haben kreisförmigen Charakter.

Abbildung von Sofia Meier-Stiegen 2005.

1.2.1 Proteine der Zellkontakte

Im Riechepithel konnten folgende Kontakte identifiziert werden: die Zonula occludens, oder Tight junction, die Zonula adherens und die Macula adherens. Die Kombination dieser drei Kontakte wird als Haft- oder Schlussleistenkomplex bezeichnet (Drenckhahn et al., 2003). All diese Kontakte sind grundsätzlich ähnlich strukturiert. Integrale Membranproteine, die durch bestimmte Proteindomänen in der Zellmembran verankert sind, vermitteln die Verbindung zur Nachbarzelle oder auch zu extrazellulären Strukturen, z.B. zur Basalmembran. Die Paarung der integralen Membranproteine ist abhängig von den beteiligten Proteinen; so können einige Proteine nur homophile Kontakte bilden, d.h. nur Proteine des gleichen Subtyps können miteinander interagieren, andere Proteine lassen auch heterophile Bindungen zu. Intrazellulär sind die Membranproteine über sog. Plaue- oder Adaptorproteine im Zytoskelett verankert. Diese Proteine haben vielfältige Funktionen, so wirken sie z.B. bei der Signaltransduktion mit (Matter et al., 2005; Balda et al., 2003).

1.2.2 Verschlusskontakte

Die **Zonula occludens** ist gewöhnlich die am meisten apikal gelegene epitheliale Zell-Zell-Junktion (Niessen et al., 2007). Sie unterteilt die Zellmembran in einen apikalen und einen basolateralen Anteil. Lichtmikroskopisch zeigt sie sich als eine Verdichtung im apikalen Epithelbereich; elektronenmikroskopisch erkennt man, dass die Zellmembranen der an der Bildung beteiligten Zellen nahezu fusionieren, es ist kein Extrazellulärspalt zu erkennen (Lapierre, 2000). Die Abbildung 1.6 a zeigt schematisch den Aufbau der Zonula occludens. Mittels Gefrierbruchelektronenmikroskopie konnte der morphologische Bau der Zonula occludens genau charakterisiert werden, wobei horizontale und vertikale Verschlusskontaktleisten, sog. „tight junction strands“, zu erkennen waren (s. Abb. 1.6 b und c).

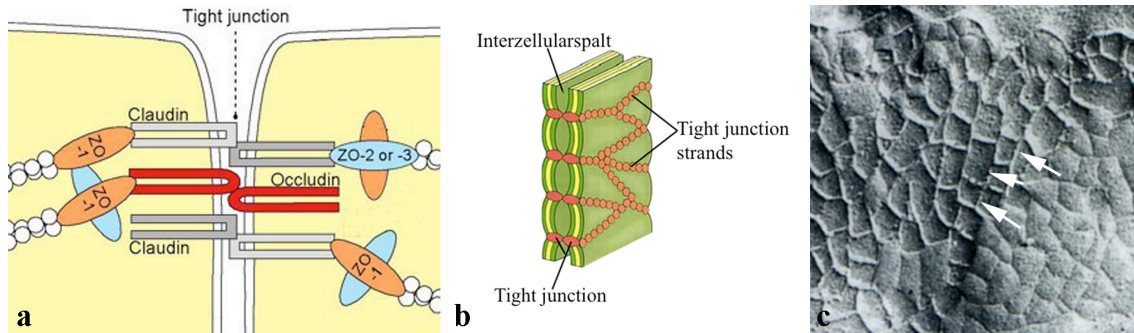


Abb. 1.8: **a** Extrazellulär wird die Zelljunction der Zonula occludens (Tight junction) durch integrale Membranproteine, wie z.B. Occludin oder Claudine vermittelt. Diese sind intrazellulär durch Plaqueproteine, z.B. ZO-1, -2 oder -3, in den zytoskeletalen Actinfilamenten (weiß dargestellt) verankert. **b** Intrazellulär bilden die Zonulae occludentes Leisten (Tight junction strands) aus, welche mittels Gefrierbruchelektronenmikroskopie erkennbar sind (in Abbildung **c** durch weisse Pfeile gekennzeichnet). Abbildung **a** modifiziert nach Benninghoff/Drenckhahn Band 1. Abbildung **c** modifiziert nach Staehelin 1978.

Am Aufbau der Zonula occludens sind drei Gruppen von Proteinen beteiligt: 1.) die integralen Membranproteine. Zu ihnen gehören das *Occludin*, die Familie der *Claudine* mit ihren 24 Mitgliedern und die *junction adhesion molecules* (JAMs). Occludin und die *Claudine* ähneln sich zwar in ihrer Struktur (Abb. 1.9), unterscheiden sich jedoch komplett hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz. Das menschliche Occludin hat eine Molekülmasse von 82 kDa (Wong et al., 1997).

Es ist durch vier transmembrane Domänen in der Zellmembran verankert; extrazellulär besitzt es zwei schleifenförmige Domänen (Furuse et al., 1993). Der lange C-Terminus und der kurze N-Terminus des Proteins sind intrazellulär gelegen (Feldman et al., 2004). Der C-Terminus des Occludin vermittelt die Bindung zu sog. Plaque-Proteinen, welche die integralen Membranproteine in den Aktinfilamenten des Cytoskeletts verankern. Occludin konnte bereits in zellulären Kontakten des Riechepithels nachgewiesen werden (Meier-Stiegen, 2005).

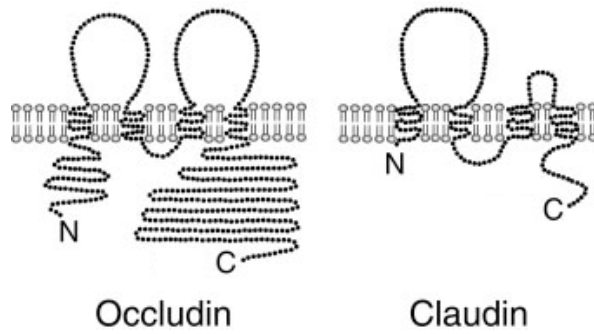


Abb. 1.9: Schematische Gegenüberstellung von Occludin und einem Claudin. Beide Proteine besitzen vier transmembranäre und zwei schleifenförmige extrazelluläre Domänen. Über den C-terminus können nun andere Proteine, wie z.B. Plaqueproteine mit Occludin oder Claudinen interagieren.

Abbildung modifiziert nach E. Schneeberger et al., 2004.

Auch die Claudine besitzen vier Transmembrandomänen und zwei schleifenförmige extrazelluläre Domänen (Schneeberger et al., 2004; Furuse et al., 2006). Wie beim Occludin sind auch bei den Claudinen der C- und N-terminus intrazellulär gelegen. Über den C-Terminus können Plaqueproteine mit den Claudinen in Interaktion treten (Schneeberger et al., 2004). Bisher sind 24 Claudine bekannt, mit einer Molekülgröße von 20-27 kDa (Schneeberger et al., 2004). Die Paarung bestimmter Claudine in der Zonula occludens führt zur Bildung von Poren (s. Abb. 1.10), welche entweder Ionen- oder H₂O-permeabel sein können (Van Itallie et al., 2004). Somit beeinflusst die Paarung bestimmter Claudine die parazelluläre Permeabilität der Zonula occludens, was im olfaktorischen Epithel für die ionale Zusammensetzung des Riechschleimes und somit für die Depolarisationsvorgänge an den olfaktorischen Neuronen von Bedeutung ist. So genannte „leaky“ Tight junctions werden vorwiegend in Epithelien gefunden, welche große Volumina isoosmotischer Flüssigkeiten transportieren müssen, wie z.B. in der Darmschleimhaut. „Tight“ Tight junctions kommen in Geweben, mit einem hohen elektroosmotischen Gradienten vor, wie z.B. im distalen Tubulus und den Sammelrohren der Niere (Van Itallie et al., 2006). Die dritte Gruppe der integralen Membranproteine der Zonula occludens umfasst die sog. *junction adhesion molecules (JAMs)*. Sie gehören zur Klasse der Immunglobuline. Extrazellulär besitzen sie zwei V-Typ Immunglobulin-Domänen und sind mit einer transmembranären Domäne in der Zellmembran verankert. An den intrazellulären C-Terminus können Plaqueproteine mittels PDZ-Domänen (s.u.) binden (Schneeberger et al., 2004).

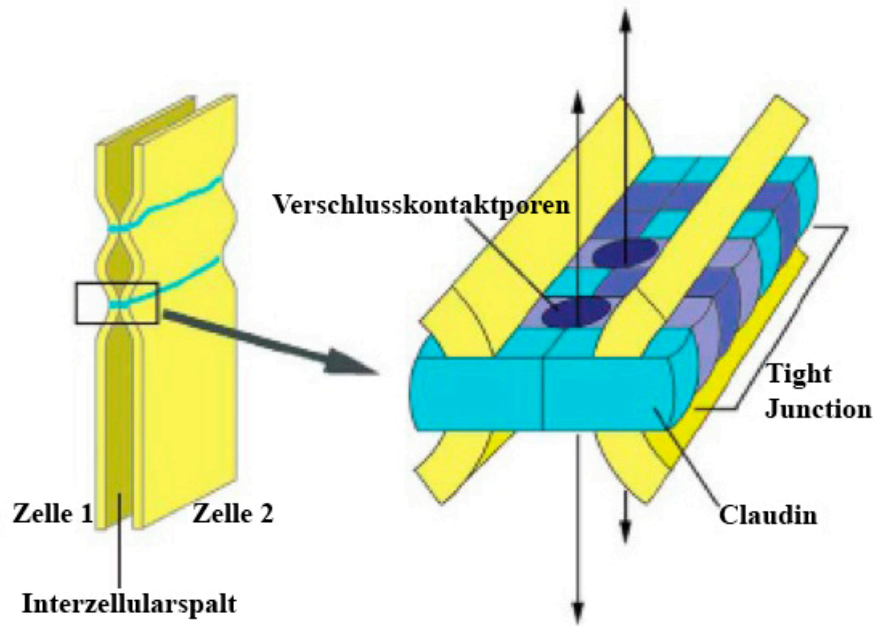


Abb. 1.10: Abhängig von der Paarung bestimmter Claudine entstehen in den Verschlusskontakten durchlässige Poren. Die parazelluläre Permeabilität der Zonula occludens ist somit abhängig von den an ihrer Bildung beteiligten Claudinen.

Abbildung modifiziert nach Furuse 2006.

Die integralen Membranproteine interagieren intrazellulär mit Proteinen der *MAGUK*-Familie (*membrane associated guanylate kinase*) und mit Proteinen, welche sog. *PDZ-Domänen* (*PSD (post synaptic density) -95, Discs large A, ZO (zonula occludens) -1 homology*) besitzen. Weiterhin können diese integralen Membranproteine mit Proteinen der intrazellulären Signaltransduktion interagieren, z.B. mit Proteinkinasen, heterotrimeren G-Proteinen und Regulatorproteinen der Transkription (Tsukita et al., 2001; Gonzalez-Mariscal, 2003). Die Zonula occludens steht über die oben genannten Plaqueproteine mit den intrazellulären Actin-Filamenten in Verbindung (Ivanov et al., 2004). Durch Verschlusskontakte wird auch im olfaktorischen Epithel eine Epithelbarriere geschaffen. Ungewöhnlich ist allerdings, dass sich auch die in das Epithel eingebetteten olfaktorischen Neurone an der Bildung epitheltypischer Barrierekontakte beteiligen (Meier-Stiegen, 2005).

1.2.3 Verschlusskontakte im olfaktorischen Epithel und in den Fila olfactoria

Die Proteine ZO-1 (Miragall et al., 1994) und Occludin (Hussar et al., 2002, Meier-Stiegen 2005) konnten bereits in Junctionen des olfaktorischen Epithels nachgewiesen werden. Beide Proteine waren in allen Verschlusskontakten des olfaktorischen Epithels zu finden, also zwischen Stützzellen untereinander, zwischen den Stützzellen und den Microvilluszellen, zwischen den Drüsenausführungszellen und in den Junctionen der Stützzellen mit den olfaktorischen Neuronen (s. Abb. 1.11). Somit wurde gezeigt, dass sich auch die olfaktorischen Neurone an der Bildung einer Epithelbarriere beteiligen. Weiterhin konnte das Plaqueprotein ZO-1 in den Fila olfactoria gefunden werden (Miragall et al., 1994). Das Vorkommen von Claudinen in den Verschlusskontakten des olfaktorischen Epithels und der Fila olfactoria ist bisher noch nicht untersucht.

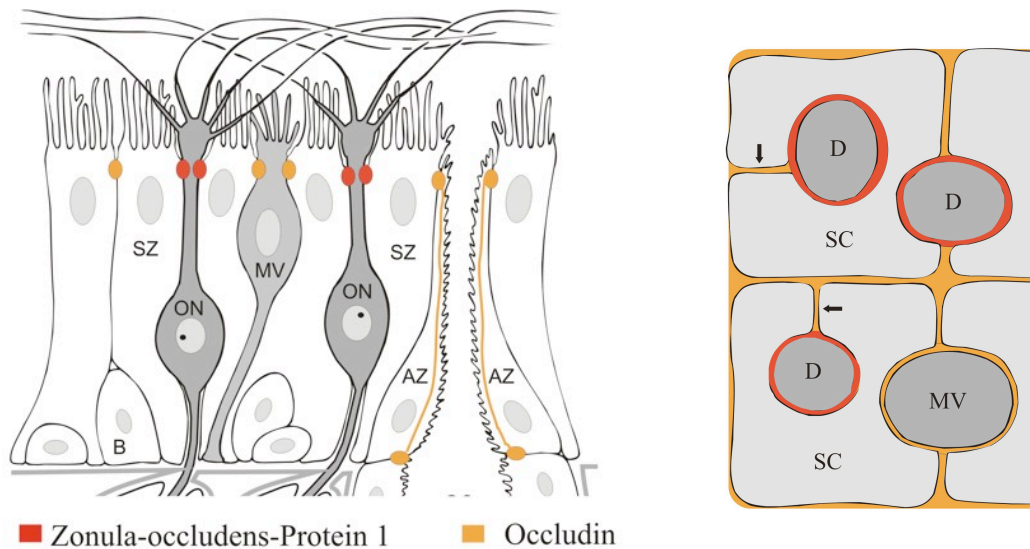


Abb. 1.11: Die Proteine ZO-1 (rot) und Occludin (orange) waren in epithelialen Kontakten des olfaktorischen Epithels nachzuweisen. Auch die olfaktorischen Neurone bildeten Occludin-positive Kontakte aus, jedoch besitzen diese Kontakte weniger Occludin, als die Kontakte zwischen anderen Zelltypen (Meier-Stiegen, 2005). Die linke Bildhälfte zeigt den Sagittalschnitt, die rechte den Transversalschnitt. Durch Pfeile sind autologe Stützzellkontakte markiert. SZ = Stützzelle; MV = Mikrovilluszelle; AZ = Ausführungsgangzelle; B = Basalzelle; D = Dendrit; SC = Supporting cell
Abbildung von E. Asan.

1.2.4 Adherenskontakte

Die **Adherens-Junktionen** werden von Proteinen des Cadherin-Catenin-Komplexes und ihren assoziierten Proteinen, welche u.a. die Verankerung der Adherens-Junktion zum Cytoskelett vermitteln, gebildet. Man unterscheidet die **Zonula adherens** und das **Punctum adherens** von den **Maculae adherentes (Desmosomen)**. Die Zonula schließt sich basal direkt an die Zonula occludens an und umgibt die Zelle gürtelförmig; weiter basal folgen die Maculae adherentes, bei welchen es sich um punktförmige Zell-Zellkontakte handelt. Ultrastrukturelle Beobachtungen zeigten Zonulae adherentes als Bereiche mit einem engen, aber nachweisbaren Interzellularspalt und einer elektronendichten intrazellulären Plaue, in welche Actinfilamente einstrahlen (Farquhar et al., 1963).

Durch molekulare Analysen wurden die Cadherine als die bindungsvermittelnden Strukturen identifiziert. Cadherine sind Ca^{2+} -abhängige Zellkontaktproteine. Man teilt die Familie der Cadherine in folgende Gruppen ein; die klassischen Cadherine, zu denen man E (epithelial) -, N (neuronal) -, P (plazentar) - und VE (vaskulär-endothelial) - Cadherin zählt. Sie vermitteln vorwiegend homophile Bindungen, d.h. es paaren sich nur Moleküle des gleichen Subtyps. Heterophile Bindungen zwischen ähnlichen Cadherin-Typen, z.B. N- und R- (retinales Cadherin (Matsunami et al., 1993)) Cadherin, wurden nachgewiesen, diese Bindungen sind jedoch schwächer als homophile Cadherininteraktionen (Ranscht, 2000). Cadherine kommen gewebe- und zellspezifisch vor; E-Cadherin ist in nahezu allen epithelialen Adherenskontakten nachzuweisen, N-Cadherin hauptsächlich in neuronalen und VE-Cadherin in endothelialen Adherenskontakten. Intrazellulär werden die Cadherine über Adapterproteine (z.B. α -, β -, γ -, p120-Catenin) mit dem Zytoskelett verbunden (s. Abb. 1.12). Die genaue Interaktion der Plaqueproteine mit den Actinfilamenten ist Gegenstand aktueller Forschung (Hartstock und Nelson 2007).

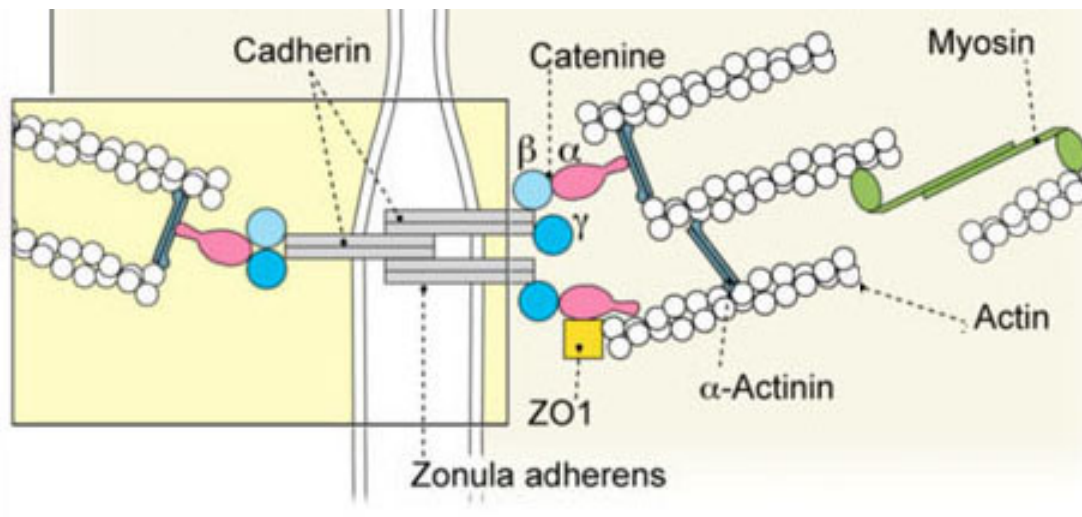


Abb. 1.12: Über Adapterproteine (Catenin, α -Actinin, Vinculin) sind die Cadherine in den Actinfilamenten des Zytoskeletts verankert.

Abbildung modifiziert nach Benninghoff/Drenckhahn Band 2.

Die Adapterproteine vermitteln nicht nur die Verbindung der Cadherine zum Zytoskelett, sondern sie wirken auch bei Vorgängen der Signaltransduktion mit. β -Catenin kann im Zellkern mit Transkriptionsfaktoren interagieren, was die Proliferation der Zelle beeinflusst (Balda et al., 2003). p120-Catenin ist ein wichtiger Regulator der RhoGTPasen (Anastasiadis et al., 2000; Noren et al., 2000; Grosheva et al., 2001). Weiterhin steht p120-Catenin in engem Zusammenhang mit einigen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (Reynolds 2006).

β -Catenin ist Bestandteil der Wnt-Signalkaskade (Bienz, 2005). Die Bezeichnung *wnt* wählte man aufgrund von Sequenzhomologien zwischen dem „wingless“-Gen von *Drosophila melanogaster* und oncogen *int-1* der Maus (Rijsewijk et al., 1987). Der wnt-Signalweg ist einer von vielen Signaltransduktionswegen, durch den die Zelle auf äußere Einflüsse reagieren kann. Er ist essentiell für die Embryonalentwicklung und spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung bestimmter Tumorerkrankungen, so z.B. bei der Entstehung der familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP) (Bienz, 2004), oder bei der Differenzierung von hippocampalen Neuronen (Lie et al., 2005). Auch Plakoglobin kann mit Transkriptionsfaktoren interagieren und somit ebenfalls in die Regulation der Transkription eingreifen (Bienz, 1999).

Im Nervensystem von Wirbeltieren konnten etwa 80 verschiedene Cadherin-Typen identifiziert werden (Ranscht, 2000). Dynamische Cadherin-vermittelte Kontakte spielen eine zentrale Rolle in Prozessen des Axon- und Dendritenwachstums, der axonalen Zielfindung sowie der Synaptogenese (Halbleib et al., 2006). Für N-Cadherin konnte gezeigt werden, dass eine Beeinträchtigung seiner adhesiven Funktion zu einer Zielverfehlung retinaler Axone führt (Inoue und Sanes 1997). An reifen Synapsen bilden Cadherine *Puncta adherentia*, welche die aktive Zone der Zellmembran umgeben, aus welcher ein Neurotransmitter abgegeben wird (Fannon et al., 1996). N-Cadherin vermittelte synaptische Kontakte haben eine entscheidende Bedeutung für die Bildung und die Plastizität von Synapsen (Rubio et al., 2005). *In vitro* Versuche an Kokulturen von Schwannzellen und sensiblen Neuronen aus Spinalganglien zeigten, dass N-Cadherin-vermittelte Kontakte essentiell für die Interaktion zwischen Schwann- und Nervenzelle sind (Wanner und Wood, 2002).

1.2.5 Adherenskontakte im olfaktorischen Epithel und in den Fila olfactoria

E-Cadherin und ein Cadherin, welches durch einen Pan-Cadherin Antikörper nachgewiesen wurde, konnten bereits in Adherenskontakten des olfaktorischen Epithels gefunden werden (Meier-Stiegen, 2005). Die olfaktorischen Neurone bilden mit ihren Nachbarzellen ausschließlich Adherenskontakte, welche über das Pan-Cadherin-Antikörper-reaktive Cadherin vermittelt werden. Abbildung 1.13 zeigt die Lokalisation der Adherenskontakte im olfaktorischen Epithel.

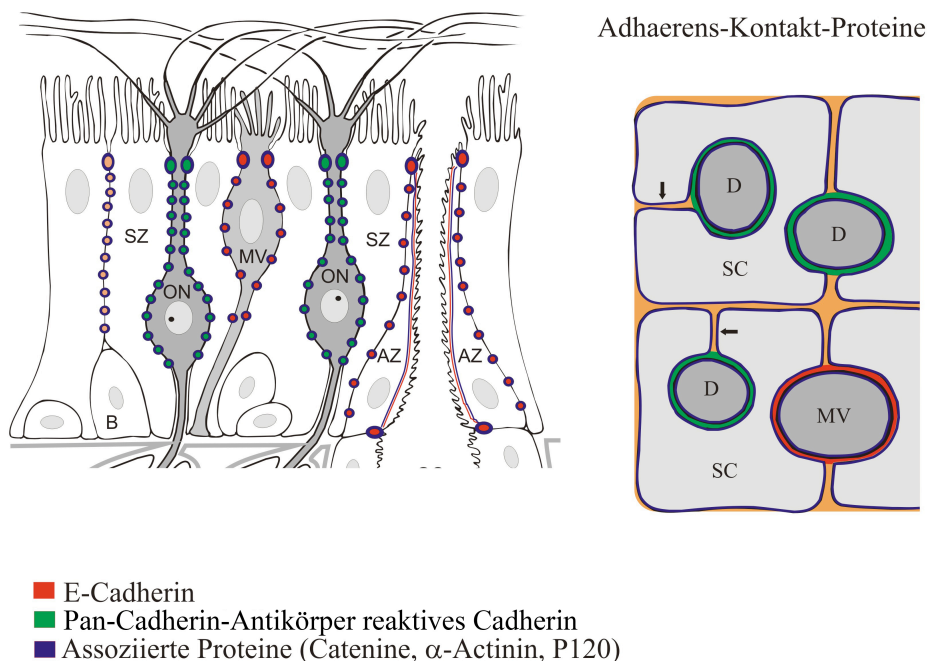


Abb. 1.13: Verschiedene Cadherine und Adhärenzkontaktassoziierte Proteine konnten bereits in Kontakten des olfaktorischen Epithels nachgewiesen werden (Meier-Stiegen, 2005). Im apikalen Epithelbereich wurde die Zonula adherens angefärbt, in den basalen Epithelabschnitten sind die punktförmigen *Puncta adherentia* zu erkennen. Die linke Bildhälfte zeigt den Sagittalschnitt, die rechte den Transversalschnitt. Die Pfeile markieren autologe Stützzellkontakte. SZ = Stützzelle; MV = Mikrovilluszelle; AZ = Ausführungsgangzelle; B = Basalzelle; D = Dendrit; SC = Supporting cell
Abbildung modifiziert nach Meier-Stiegen, 2005.

Apikal bilden die olfaktorischen Neurone mit den sie umgebenden Stützzellen Zonulae adherentes, basolateral stehen sie durch Puncta adherentia mit ihren Nachbarzellen in Verbindung. Ebenso konnten in den Fila olfactoria bereits Adherensjunktionen lokalisiert werden (Akins et al., 2007). Welche Zellen in den Fila olfactoria diese Junktionen ausbilden, ist bisher allerdings noch nicht geklärt worden.

1.3 Fragestellung der vorliegenden Arbeit.

Verschiedene Funktionen wurden für morphologisch nachgewiesene Interzellularkontakte zwischen Neuronen, Epithel- und Gliazellen des peripheren olfaktorischen Systems vorgeschlagen. So sind Kontakte im olfaktorischen Epithel, ähnlich wie in anderen Epithelien, aller Wahrscheinlichkeit nach für Barriereeigenschaften und mechanische Stabilität von Bedeutung. Kontakte in den Fila olfactoria könnten dafür verantwortlich sein, einzelne Bündel der Fila nach außen abzugrenzen und innerhalb der Bündel Kompartimente zu schaffen. Wenig Informationen gibt es bisher über den genauen Aufbau und über mögliche besondere Eigenschaften von morphologisch nachgewiesenen Kontakten im olfaktorischen Epithel, das als einziges Oberflächenepithel im Körper Neurone und neuronale Stammzellen enthält, und in den Fila olfactoria, in denen besondere Gliazellen ein lebenslanges Auswachsen von Axonen neugebildeter olfaktorischer Neurone ins Zentralnervensystem hinein unterstützen. Spezifische Charakteristika von Verschlusskontakten könnten beispielsweise Grundlage differenzierter parazellulärer Permeabilität sein und damit eine wichtige Rolle für die ionale Zusammensetzung des Riechschleims spielen, die ihrerseits von entscheidender Bedeutung für Depolarisationsvorgänge olfaktorischer Neurone ist. Von grundsätzlichem Interesse ist eine Analyse der ungewöhnlichen Verschlusskontakte der Neurone im Epithel und eine genauere Bestimmung der Funktionen von Verschlusskontakten in den Fila olfactoria.

Dies erfordert die detaillierte Analyse spezifischer Eigenschaften dieser Kontakte. Adherenskontakte sind für Neuro- und Axogenesevorgänge von entscheidender Bedeutung, und es liegt nahe, dass diese Kontakte auch für solche Prozesse im peripheren olfaktorischen Epithel eine wichtige Rolle spielen. Die Funktion von Interzellularkontakten wird maßgeblich durch ihren molekularen Aufbau bestimmt. Die Kenntnis dieses Aufbaus ist daher unabdingbare Voraussetzung für eine Aufklärung der spezifischen Bedeutung verschiedener Kontakte.

Ziel der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit war es, den molekularen Aufbau von Verschluss- und Adherenskontakten zwischen den verschiedenen Zellen des peripheren olfaktorischen Systems zu analysieren und so zur Aufklärung spezifischer Eigenschaften und Funktionen der Kontakte in diesem ungewöhnlichen Bereich des Nervensystems beizutragen. Dazu wurden integrale und periphere Membranproteine der Kontakte im olfaktorischen Epithel und in den Fila olfactoria der Ratte immunhistochemisch dargestellt. Doppelmarkierungen für Kontaktproteine und für Markerproteine spezifischer Zelltypen sowie Immunelektronenmikroskopie erlaubten die genaue zelluläre und subzelluläre Analyse der Kontaktlokalisation und ermöglichten Überlegungen zu deren Funktion. Um Untersuchungen zur Ausbildung und zu möglichen Funktionen von Kontakten zwischen olfaktorischen Hüllzellen und olfaktorischen Neuronen auch *in vitro* zu ermöglichen, wurden Primärkulturen von OEC etabliert und erste Experimente zur Charakterisierung der Kulturen bezüglich ihrer Homogenität sowie bezüglich verschiedener *in vivo* gefundener Eigenschaften (Expression von Kontaktproteinen, Produktion von CNTF) in Einzelkulturen und in Kokulturen mit olfaktorischen Neuronen durchgeführt.

2. Material

2.1 Geräte und übrige Materialien

Elektronenmikroskop LEO 912 AB	Zeiss, Jena
Axioskop 2 mot plus (Fluoreszenzmikroskop)	Zeiss, Jena
Spot Camera	Visitron, Puchheim
Nitrozellulosemembran	Amersham, Braunschweig
Plastikreaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
Spektralphotometer Beckmann	Palo Alto, USA
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0	Heraeus, Deutschland
Ultracut E	Reichert-Jung, Nußloch
Zellkulturschalen und Deckgläschen (1.0cm ² , rund)	Cellstar, USA
Zellkulturflaschen (75 ml, 250 1.0cm ²)	Cellstar, USA

2.2 Chemikalien

Amidoschwarz	Serva, Heidelberg
Ampuwa Fresenius	Kabi, Bad Homburg
Arabinosyl-Cytosin (AraC)	Sigma, Deisenhofen
Blei (II)-ziträt-3-hydrat	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Normal donkey serum (NDS)	Dianova, Hamburg
Normal goat serum (NGS)	Dianova, Hamburg
Fetales Kälber Serum (FCS)	Biochrom, Berlin
Minimal Essential Medium (MEM)	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma, Deisenhofen
DNase	Sigma, Deisenhofen
Hyaluronidase	Sigma, Deisenhofen
Collagenase	Sigma, Deisenhofen
Dispase	Sigma, Deisenhofen

NU-Serum	Sigma, Deisenhofen
Epon	Serva, Heidelberg
GLA (Glutaraldehyd) 25%	Roth, Karlsruhe
LR-White	Agar Scientific, Berkshire
Magermilchpulver	Molkerei Feldental
Methylenblau	Chroma, Stuttgart
Natriummethanolat	Fluka, Steinheim
N-Propylgallat (3,4,5-Trihydroxybenzoesäurepropylester)	Serva, Heidelberg
DePex	Serva, Heidelberg
Forskolin (FSK)	Sigma, Deisenhofen
Basic Fibroblast Growth Factor (FGF2)	Sigma, Deisenhofen
Nerve Growth Factor (NGF)	Sigma, Deisenhofen
Puffer	
PBS (Phosphate Buffered Saline) 0,01 M	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	8,1 mM Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfuronsäure)	Biochrom, Berlin

2.3 Primärantikörper

Folgende Erstantikörper wurden verwendet (Tabelle 3-4):

Tabelle 3-4. Verwendete Primärantikörper

Antikörper gegen	Klon (hergestellt in)	Verdünnung	Hersteller
Neuronenspezifische Marker			
Neuronenspezifisches β 3-Tubulin	monoclonal (Maus)	1:100	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Olfactory Marker Protein (OMP)	polyclonal (Ziege)	1:400	Dr. F. Margolis, Baltimore, USA
Neural Cell Adhesion Molecule	monoclonal	1:250	Sigma, Deishofen,

(NCAM)	(Maus)		Deutschland
Growth associated protein (GAP) 43	polyclonal (Kaninchen)	1:500	Novus Biologicals, Acris antibodies, Hiddenhausen, Deutschland
β III Tubulin (β III-Tub)	monoclonal (Maus)	1:100	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
β Tubulin (β -Tub)	monoclonal (Maus)	1:200	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Epitheliale Stammzellen			
Cytokeratin (CK) 14	monoclonal (Maus)	1:100	Chemicon, Temecula, USA
Globose basal cell (GBC) 1	monoclonal (Maus)	1:1	Prof. J. Schwob, Boston, USA
Gliazellspezifische Marker			
S100	monoclonal (Maus)	1:500	Sigma, Deishofen, Deutschland
Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	monoclonal (Maus)	1:10000	Sigma, Deishofen, Deutschland
Nerve Growth factor Receptor p75	monoclonal (Maus)	1:200	Chemicon, Temecula, USA
Adherenskontakmarker			
N-Cadherin (N-CAD)	polyclonal (Kaninchen)	1:200 (1:500)	Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland
E-Cadherin (E-CAD)	monoclonal (Maus)	1:100 (1:25)	Transduction Laboratories, Greenland, USA
α -Catenin (α -Cat)	monoclonal (Maus)	1:100	Transduction Laboratories, Greenland, USA

p120 Catenin (p120-Cat)	monoclonal (Maus)	1:100 (1:50)	Transduction Laboratories Greenland, USA
β-Catenin (β-Cat)	(a) monoclonal (Maus)	1:100 (1:50)	Transduction Laboratories, Greenland, USA
	(b) polyclonal (Kaninchen)	1:100	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Verschlusskontaktmarker			
Claudin 1 (Cl 1)	polyclonal (Kaninchen)	1:100	Zymed, Deutschland
Claudin 2 (Cl 2)	monoclonal (Maus)	1:100	Zymed, Deutschland
Claudin 4 (Cl 4)	monoclonal (Maus)	1:100	Zymed, Deutschland
Claudin 5 (Cl 5)	polyclonal (Kaninchen)	1:100	Zymed, Deutschland
Occludin (Occl)	(a) monoclonal (Maus)	1:50	Transduction Laboratories, Heidelberg, Deutschland
	(b) polyclonal (Kaninchen)	1:50 (1:200)	Zymed, Deutschland
Zonula Occludens Protein 1 (ZO-1)	(a) monoclonal (Ratte)	1:100	Chemicon, Deisenhofen, Deutschland
	(b) polyclonal (Ziege)	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Deutschland
	(c) polyclonal (Kanninchen)	1:100	Zymed, Deutschland
Zonula Occludens Protein 2 (ZO-2)	polyclonal (Ziege)	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

Zonula Occludens Protein 3 (ZO-3)	polyclonal (Ziege)	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
--------------------------------------	-----------------------	-------	--

CNTF-Antikörper

K10	polyclonal (Kaninchen)	1:5000	Prof. M. Sendtner, Würzburg, Deutschland
-----	---------------------------	--------	--

gCNTF	polyclonal (Ziege)	1:100	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
-------	-----------------------	-------	---

2.4 Sekundärantikörper

Zur Darstellung der durch die Primärantikörper markierten Strukturen in den verschiedenen mikroskopischen Verfahren wurden folgende Sekundärantikörper verwendet(Tabelle 3-5):

Tabelle 3-5. Für die Fluoreszenz- und Immunelektronenmikroskopie verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	gekoppelt an	Verdünnung	Hersteller
Ziege-anti-Ratte Hamburg	Cy3	1:800	Dianova,
Ziege-anti-Kaninchen	Cy2	1:300	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen	Cy3	1:600	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus	Cy2	1:300	Dianova, Hamburg

Ziege-anti-Maus	Cy3	1:600	Dianova, Hamburg
Esel-anti-Ziege	Cy3	1:600	Dianova, Hamburg
Esel-anti-Kaninchen	Cy2	1:200	Dianova, Hamburg
Esel-anti-Ziege	Flurescein (DTAF)	1:200	Dianova, Hamburg
Esel-anti-Kaninchen	Cy3	1:600	Dianova, Hamburg
Esel-anti-Ziege	Cy2	1:200	Dianova, Hamburg
Esel-anti-Ziege	AMCA	1:200	Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, USA
Esel-anti-Maus	Cy2	1:200	Dianova, Hamburg
Esel-anti-Maus	Cy3	1:600	Dianova, Hamburg
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)		1:10000	Roche, Mannheim
Ziege-anti-Kaninchen Au 10 nm		1:40	Sigma, Deisenhofen
Ziege-anti-Kaninchen Au 5 nm		1:40	Sigma, Deisenhofen
Ziege-anti-Kaninchen Au ultrasmall		1:80	Aurion, Wageningen
Ziege-anti-Maus Au 10 nm		1:40	Sigma, Deisenhofen
Ziege-anti-Maus Au 5 nm		1:40	Sigma, Deisenhofen
Ziege-anti-Maus Au ultrasmall		1:80	Aurion, Wageningen

3. Methoden

3.1 Gewebegewinnung

3.1.1 Gewebe für Fluoreszenzmikroskopie

Die immunhistochemischen Versuche wurden an adulten Wistar-Ratten beider Geschlechter durchgeführt. Die Ratten wurden in anästhesiertem Zustand entweder durch Dekapitation getötet oder über den linken Ventrikel perfusionsfixiert: nach einer kurzen Vorinfusion einer heparinisierten Kochsalzlösung erfolgte die Fixation mit 4% PFA in 0,01 M PBS, pH 7,4. Anschließend wurde die Riechschleimhaut inklusive der distalen Fila olfactoria und des Bulbus olfactorius präpariert (Asan et al., 2003, Langenhan et al., 2005).

Nicht fixiertes Gewebe wurde unmittelbar in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan gefroren, anschließend gefriergetrocknet und in Epoxy-Kunstharz eingebettet (siehe unten) (Asan und Drenckhahn, 2005).

Perfusionsfixiertes Gewebe wurde entweder über 2-3 h bei Raumtemperatur postfixiert oder über Nacht bei 4°C. Das Gewebe wurde sodann mit PBS gewaschen, anschließend mit 10% und 20%igen Sucrose-PBS-Lösungen inkubiert und in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan gefroren.

3.1.2 Gewebe für Elektronenmikroskopie

Die Ratten wurden wie oben perfusionsfixiert, mit 3% Glutaraldehyd in 0,1 M PBS, pH 7,4 als Fixans. Anschließend erfolgte die Postfixation über 3 h bei Raumtemperatur und die Zerkleinerung des Gewebes. Nach Waschen in PBS wurde das Gewebe für 1 h in 1 % OsO₄ in PBS osmiert, in Ethanol dehydriert und in EPON eingebettet (Asan et al., 2003). Zur Verwendung für die Immunelektronenmikroskopie wurden die Ratten entweder mit 4 % PFA in PBS, 4 % PFA in 2 % Natriumacetat, pH 6,5, gefolgt von 4 % PFA und 0,02 % Glutaraldehyd in 0,1 M Natrium-Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 11

(Berod et al., 1981), oder in 2 % PFA und 0,1 % Glutaraldehyd in 0,1 M PBS, pH 7,4 perfusionsfixiert. Nach Postfixation im Perfusionsfixans ohne Glutaraldehyd wurde die Riechschleimhaut entweder in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Propan schockgefroren (unter Verwendung einer Leica CPC), in -90°C kaltes Methanol überführt, in einer Leica AFS kryosubstituiert und in Lowycryl HM 22 bei -45°C eingebettet, welches unter Einfluß von UV-Licht polymerisierte. Alternativ wurde die Riechschleimhaut in ansteigender Ethanol-Konzentration entwässert und in LR White gegeben, welches unter UV-Licht bei 4°C über 48 h polymerisierte. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Erhalt der Ultrastruktur oder in der Detektierbarkeit von Antigenen zwischen den verschiedenen Fixations- und Einbettungsmethoden festgestellt werden.

3.2 Gewebeschnitte

Schnitte von fixiertem Gewebe wurden mit verschiedenen Techniken angefertigt. Für die Gefrierschnitte wurde das Gewebe innerhalb einer halben Stunde von -80°C auf eine Temperatur von -22°C gebracht, mit einem Kryostat (2800 Frigocut-E, Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland) 14µm dick geschnitten, auf Superfrost-Objektträger (Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen, aufgetaut und über Nacht getrocknet. Zur Herstellung von Semidünnschnitten (0,5 - 1µm) wurde das Ultramikrotom Ultracut E (Reichert-Jung, Wien, Österreich) verwendet.

3.3 Gefriertrocknung und Epon-Einbettung

Zunächst wurde das Gewebe über stickstoffgekühltes Isopentan eingefroren. Die gefrorenen Präparate wurden danach für 12 Stunden bei -90°C, -40°C, -20°C, 0°C und 20°C im Vakuum bei 10⁻⁵ Torr gefriergetrocknet, anschließend bei 20°C für 48h bei 10⁻³ Torr in Epon eingebettet und in Gelatine kapseln bei 60°C für 24-48h ausgehärtet. Aus den angefertigten Blöcken wurden mit einem Ultramikrotom Semidünnschnitte (0,5-1,0µm) angefertigt und auf Deckgläser aufgezogen.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Olfactory ensheathing cells (OECs)

Drei Tage alte Wistar-Ratten wurden durch Enthauptung getötet, beide Bulbi olfactorii entnommen und in frisches DMEM gegeben. Unter einem Stereomikroskop wurden die Hirnhäute so weit wie möglich entfernt und die Bulbi zerkleinert. Die so gewonnenen Gewebestückchen wurden mit Hilfe einer 1000µl Eppendorf-Pipette in ein 50ml Gefäß pipettiert und 5 min bei 900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und der Vorgang wiederholt. Anschließend wurde 0,125%iges Trypsin (Sigma, Deutschland) auf die Gewebestückchen gegeben und für 20 min bei 37°C in einem Wasserbad gelagert. Der Verdau wurde durch Zugabe einer Stopplösung: 10ml DMEM + 10% FCS + 0,05% DNase beendet. Die entstehende Lösung wurde mit einer 10ml Pipette so lange pipettiert, bis keine Gewebebrocken mehr erkennbar waren und anschließend 5 min bei 900rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in DMEM + 10% FCS aufgenommen. Anschließend wurde mit Hilfe eines Hämozytometers (Neubauer) die Zellzahl bestimmt und die Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen (rund, 1.0cm², in Cellstar Gewebescheiden 35/10mm, 1,5 * 10⁵ Zellen pro Deckgläschen) und mit Poly-L-lysin beschichtete Kulturflaschen (75ml, 250cm², zwischen 5*10⁶ und 1*10⁷ Zellen pro Flasche) ausgesät. Die mit Poly-L-Lysin beschichteten Kulturflaschen und Deckgläschen wurden vor Aussaat dreimal mit DMEM gewaschen. Anschließend wurde dem Zellmedium (DMEM + 10% FCS + 2 µm FSK + 20 ng/ml FGF2) Gentamycin zugegeben; die Zellkulturen wurden nun für drei Stunden in einen Brutschrank gegeben. Danach erfolgte die Zugabe von 10µm AraC (Hemmung des Wachstums von kontaminierenden Fibroblasten), die am folgenden Tag wiederholt wurde. Am dritten Tag wurden die Zellen abtrypsiniert und auf neue beschichtete Flaschen (zwischen 5*10⁶ und 1*10⁷ Zellen pro Flasche) und Deckgläschen (1,5 * 10⁴ Zellen pro Deckgläschen) ausgesät. Zur Ernte wurden die Zellen auf Deckgläschen 10 min mit 4% Para-Formaldehyd fixiert und anschließend dreimalig mit PBS gewaschen.

3.4.2 Olfaktorische Neurone

Einen-Tag-alte Wistar-Ratten wurden durch Enthauptung getötet, die Nasenmuscheln aus dem Schädel präpariert und in frisches MEM-Air (MEM + 1% HEPES) gegeben. Unter einem Stereomikroskop wurden die Nasenmuscheln freipräpariert, in frisches MEM gegeben und so weit möglich zerkleinert. Die so gewonnenen Gewebestückchen wurden mit Hilfe einer 1000µl Eppendorf-Pipette in ein 50ml Gefäß pipettiert und 5 min bei 900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und der Vorgang anschließend wiederholt. Anschließend wurden die Gewebestücke in einer Verdauungslösung (1 % BSA; 1 mg/ml Hyaluronidase; 50 µg/ml DNase, 1 mg/ml Collagenase; 2,5 mg/ml Dispase) eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die entstehende Suspension wurde mit einer 10ml Pipette so lange pipettiert, bis keine Gewebebrocken mehr erkennbar waren. Anschließend erfolgte die Filtration durch 150µm, 50µm und 15µm Polyamid-Netze (bezogen über Hartenstein Laborbedarf), die filtrierte Lösung wurde 5 min bei 900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zell-Pellet in 10 ml Plating-Medium (MEM + 5% Nu-Serum + 10% dialysiertes FCS) aufgenommen. Die so entstandene Zellsuspension inkubierte zur Adhäsion kontaminierender Fibroblasten in einer Petrischale für 1 h im Brutschrank. Anschließend wurde der Überstand mit den olfaktorischen Neuronen vorsichtig mit einer Pipette in ein 50ml Gefäß überführt und zentrifugiert (5 min; 900 rpm). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1 ml MEM-Air aufgenommen. Die Zellzahl wurde auf $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt und die olfaktorischen Neurone auf OEC-Kulturen ausgesät und über Nacht in Plating Medium mit 25 ng/ml NGF kultiviert.

3.5 Immunfluoreszenz- und Immunelektronenmikroskopie

Prinzip der Fluoreszenzimmunhistochemie ist es, ein bestimmtes Protein mithilfe eines spezifischen Primärantikörpers (2.3) nachzuweisen. Dieser wird wiederum über einen Sekundärantikörper (2.4), welcher an das F_c-Fragment des Primärantikörpers bindet und mit einem fluoreszierenden Agens gekoppelt ist, detektiert. Das gekoppelte Agens wird mit Hilfe von Licht bestimmter Wellenlänge zum Leuchten angeregt, wodurch die markierten Strukturen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. Zur Kontrolle auf unspezifische Fluoreszenz wurde jeweils ein paralleler Versuchsansatz ohne den Primär-Antikörper durchgeführt.

3.5.1 Kryoschnitte

Die Schnitte wurden nach dem Schneiden aufgetaut und für 24h getrocknet. Anschließend erfolgte eine Vorinkubation (0,01 M PBS + 1% TX-100 + 5% NGS oder NDS) für 2h bei Raumtemperatur. Die Vorinkubationslösung wurde abgesaugt, anschließend inkubierten die Schnitte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C in der Erstantikörper-Lösung (0,01 M PBS + 0,5% TX-100 + 1% NGS oder NDS + 0,05% NaN₃ + Erstantikörper bzw. Kombinationen von Erstantikörpern). Am nächsten Tag wurden die Schnitte 6 mal mit PBS gewaschen und 2 ½ h bei Raumtemperatur in der Zweitantikörper-Lösung (0,01 M PBS + 0,5% TX-100 + 1% NGS oder NDS + Zweitantikörper bzw. Kombinationen von Zweitantikörpern) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte wieder 6 mal mit PBS gewaschen und entweder in 60 % Glycerin in destilliertem Wasser mit 1,5 % N-Propylgallat (als Bleichschutz) eingedeckt, oder die Schnitte wurden in aufsteigender Ethanol-Reihe entwässert und in DePex eingedeckt.

3.5.2 Eponschnitte

Zunächst musste das Eponharz aus den Schnitten herausgelöst werden. Dazu wurden die Schnitte der Reihe nach mit Na-Methanolat (6 min), Methanol/Toluol (5 min), Aceton (zweimal 5 min), destilliertem Wasser (5min) und PBS (5 min) behandelt. Die Schnitte inkubierten für 3h bei Raumtemperatur in der Erstantikörperlösung (0,01 M PBS + 1% NGS oder NDS + 0,05% NaN_3 + Erstantikörper). Anschließend wurden die Schnitte 6 mal mit PBS gewaschen und inkubierten für 30 min bei Raumtemperatur in der Zweitantikörper-Lösung (0,01 M PBS + 0,05% NaN_3 + Zweitantikörper). Anschließend wurden die Schnitte wieder 6 mal mit PBS gewaschen und entweder in 60 % Glycerin, destilliertem Wasser mit 1,5 % N-Propylgallat (als Bleichschutz) eingedeckt, oder die Schnitte wurden in aufsteigender Ethanol-Reihe entwässert und in DePex eingedeckt.

3.5.3 Elektronenmikroskopische Präparate und Immunelektronenmikroskopie

Mittels eines Ultracut wurden Ultradünnschnitte (~70 nm) hergestellt und auf Formvarbeschichtete Nickel-Netze (100 Maschen Athene-Netze, Plano, Deutschland) aufgezogen. Die Netze wurden mit Uranyl-Acetat und Blei-Citrat kontrastiert (nach Reynolds, 1963). Zur Anfertigung immunzytochemischer Präparate für die Elektronenmikroskopie wurden die Ultradünnschnitte für 15 Minuten in 0,05 M Glycin in PBS gebadet. Anschließend erfolgte die Inkubation in 5% BSA, 0,1% Fisch-Gelatine und 5% NGS in PBS über 30 Minuten. Danach wurden die Schnitte 3*5 Minuten in 1% BSA in PBS (Inkubationspuffer) gewaschen und inkubierten anschließend mit dem entsprechenden Primärantikörper im Inkubationspuffer über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Schnitte 6*5 Minuten mit Inkubationspuffer gewaschen und inkubierten anschließend über 2 h in einer entsprechenden Sekundärantikörperlösung (mit 0,8 nm Goldpartikeln gekoppelte Antikörper). Anschließend erfolgte die Waschung mit Inkubationspuffer über 6*5 Minuten und danach die Waschung mit PBS über 3*5 Minuten.

Nachfolgend lagerten die Schnitte zur Postfixation über 5 Minuten in 2% Glutaraldehyd in PBS und wurden danach in PBS und Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Silberintensivierung nach Angaben des Herstellers des entsprechenden Kit's (R-Gent EM). Zur Kontrolle wurde die Inkubation mit dem Primärantikörper ausgelassen. Die Präparate wurden mittels eines LEO 912 AB Elektronenmikroskops ausgewertet.

3.5.4 Zellen

Nach Fixation erfolgte zunächst eine Vorinkubation (0,01 M PBS + 1% TX-100 + 5% NGS oder NDS) für 2h bei Raumtemperatur. Anschließend inkubierten die Präparate über Nacht bei 4°C in der Erstantikörper-Lösung (0,01 M PBS + 0,5% TX-100 + 1% NGS oder NDS + 0,05% NaN₃ + Erstantikörper). Nach 6 maligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit der Zweitantikörper-Lösung (0,01 M PBS + 0,5% TX-100 + 1% NGS oder NDS + Zweitantikörper) für 2 ½ h bei Raumtemperatur. Nach erneutem 6 maligen Waschen mit PBS wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend mit Depex eingedeckt.

4. Ergebnisse

4.1 Darstellung unterschiedlicher Reifestadien von olfaktorischen Neuronen.

Je nach ihrem Reifezustand sind in olfaktorischen Neuronen bzw. in neuronalen Vorläuferzellen verschiedene Markerproteine nachzuweisen. So ist z.B. OMP (*olfactory marker protein*), ein Polypeptid, welches nur in reifen olfaktorischen Neuronen produziert wird (Farbman und Margolis, 1980), ein Marker für reife olfaktorische Neurone. Das neuronenspezifische Protein GAP43 (*growth associated protein 43*) ist in seiner Expression mit neuro- und synaptogenetischen Vorgängen vergesellschaftet. In adulten Ratten ist das Vorkommen von GAP43 auf eine Subpopulation von olfaktorischen Neuronen beschränkt, welche den basalen Zellen des Epithels benachbart sind (Veerhagen et al., 1988), wobei es sich ihrer Lokalisation nach um unreife olfaktorische Neurone handelt. Neuronen-spezifisches β III-Tubulin, ein Bestandteil des neuronalen Zytoskeletts, stellt ebenfalls einen Marker für unreife olfaktorische Neurone dar (Roskams et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass β III-Tubulin in schwacher Konzentration auch in den Dendriten reifer, OMP-immunreaktiver olfaktorischer Sinneszellen lokalisiert ist (s.u.). In jungen, OMP-negativen Neuronen ist β III-Tubulin in hoher Konzentration im Perikaryon zu finden. Zunächst wurden diese Marker an dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten schockgefrorenen und Epon-eingebetteten Material auf ihre Eignung als immunzytochemische Marker für neuronale Reifestadien getestet. Vergleichend hierzu erfolgte die Verwendung an Kryoschnitten, wobei sich identische Färbemuster ergaben. Dokumentiert sind hier nur die Ergebnisse an Semidünnschnitten.

In immunfluoreszenzgefärbten Schnitten (s. Abb. 4.1.1) zeigte sich folgende Verteilung der drei Proteine: Intensive OMP-Immunreaktivität konnte in den apikal gelegenen, reifen olfaktorischen Neuronen, sowohl in Axonen und Dendriten, als auch im Perikaryon beobachtet werden. GAP43 konnte in Zellkörpern, Dendriten und Axonen basal gelegener Neurone nachgewiesen werden und markierte vermutlich unreife olfaktorische Sinneszellen (Schwob et al., 2002).

Weiterhin zeigte sich im Perikaryon basal gelegener neuronaler Zellen eine starke Fluoreszenz von β III-Tubulin, während in reifen OMP-positiven olfaktorischen Neuronen nur noch schwache Reaktivität für β III-Tubulin in den Dendriten der Sinneszellen gefunden wurde (s. Abb. 4.1.1 c und f, kleine Pfeile). Weiterhin konnte in basal gelegenen Zellen die Kolokalisation von GAP43 und β III-Tubulin nachgewiesen werden (s. Abb. 4.1.1 c und d), andere, wenige Zellen zeigten Reaktivität für GAP43 und OMP (s. Abb. 4.1.1 a-f, große Pfeile). OMP-Reaktivität und gleichzeitige intensive β III-Tubulin-Immunfluoreszenz im Perikaryon konnten nicht beobachtet werden (s. Abb. 4.1.1 f).

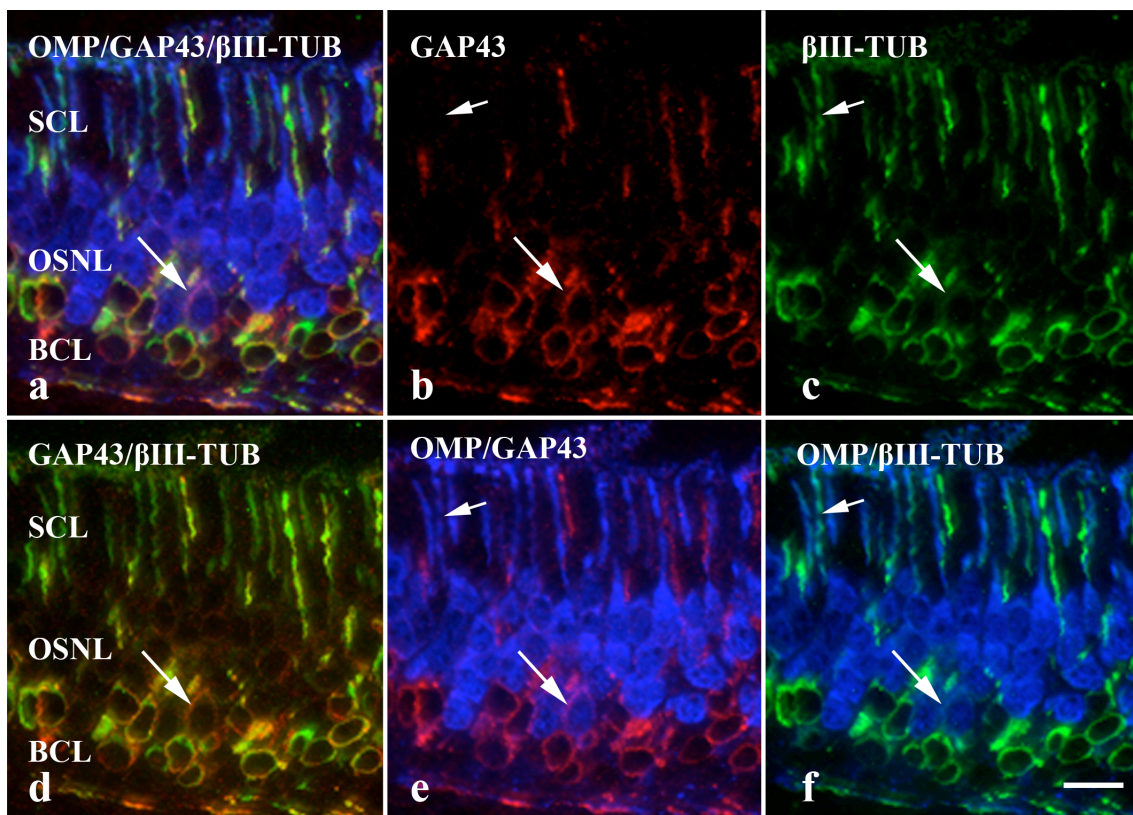


Abb. 4.1.1: Unterschiedliche neuronale Marker weisen ein bestimmtes Verteilungsmuster im olfaktorischen Epithel auf. OMP-reaktive (blau) Neurone sind in der oberen Sinneszellschicht (OSNL = olfactory sensory neuron layer) gelegen. Die Dendriten dieser Neurone zeigen vereinzelt schwache Reaktivität für β III-Tubulin (grün) (s. kleine Pfeile in c und f). Intensive Reaktivität für β III-Tubulin (grün) konnte im Perikaryon basal gelegener Neurone beobachtet werden (s. c und d). GAP43-markierte (rot) unreife olfaktorische Neurone weisen häufig Kolokalisation mit β III-Tubulin (grün) auf (s. c und d). Vereinzelt konnten Zellen beobachtet werden, welche OMP/GAP43 positiv waren und noch sehr schwache perikaryelle Reaktivität für β III-Tubulin aufwiesen (große Pfeile in a-f). SCL = supporting cell layer, OSNL = olfactory sensory neuron layer, BCL = basal cell layer. Maßstab: 10 μ m.

Eine Identifizierung der basal gelegenen Stammzellen mittels Antikörper gegen GBC1 (Marker für runde Basalzellen) und gegen Cytokeratin 14 (Marker für horizontale Basalzellen) war nicht möglich.

In den Fila olfactoria der Lamina propria zeigte sich Reaktivität für GAP43 insbesondere in Axonen, welche OMP-negativ waren (s. Abb 4.1.2). Weiterhin zeigte sich eine intensivere Fluoreszenz für GAP43 in den olfaktorischen Axonen als in den entsprechenden Sinneszellen des olfaktorischen Epithels. OMP-positive Axone der Fila olfactoria zeigten schwache Fluoreszenz für β III-Tubulin (s. Abb 4.1.2 b und c). Intensive β III-Tubulin-Reaktivität fand sich in den Fila olfactoria mit GAP43 kolokalisiert.

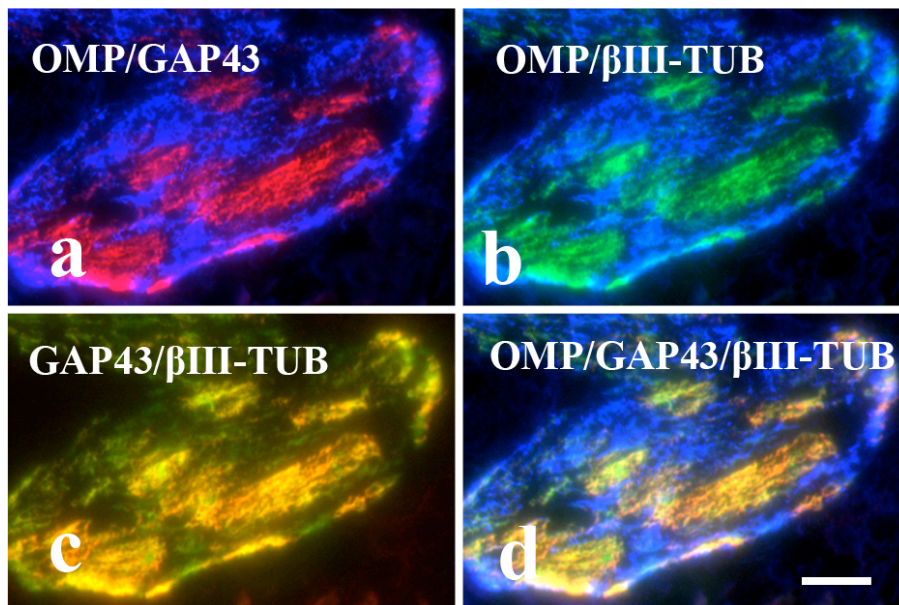


Abb. 4.1.2: Axonbündel olfaktorischer Neurone zeigen eine intensivere GAP43-Immunfluoreszenz (rot), als die Zellkörper entsprechender Neurone. In GAP43-positiven Axonbündeln kann ebenfalls intensive Reaktivität für β III-Tubulin (grün) beobachtet werden. In OMP-markierten Axonen (blau) kann schwache Reaktivität für β III-Tubulin festgestellt werden (vgl. b und c). Maßstab: 5 μ m.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: Zellkörper neu gebildeter olfaktorischer Neurone sowie deren aussprossende Dendriten können mittels der Marker GAP43 und β III-Tubulin identifiziert werden, wobei β III-Tubulin in unreifen olfaktorischen Neuronen durch die starke perikaryelle Immunfluoreszenz imponiert. Es scheint, dass im Zuge der Reifung des olfaktorischen Neurons die Zelle die perikaryelle Immunreaktivität für β III-Tubulin verliert und mit der Synthese von OMP beginnt, noch bevor GAP43 nicht mehr nachzuweisen ist. In reifen, OMP-positiven olfaktorischen Neuronen kann β III-Tubulin weiterhin in deren Dendriten, allerdings in schwacher Konzentration, nachgewiesen werden. In den Fila olfactoria konnte intensive Immunfluoreszenz für GAP43, kolokalisiert mit β III-Tubulin-Immunreaktivität, insbesondere in OMP-negativen Axonbündeln nachgewiesen werden. In OMP-positiven Axonen zeigte sich noch schwache Reaktivität für β III-Tubulin.

4.2. Claudin-vermittelte Verschlusskontakte im olfaktorischen Epithel

Bei der Untersuchung des olfaktorischen Epithels auf das Vorkommen von bestimmten Claudinen wurde das in der Einleitung erwähnte typische Färbemuster sichtbar. Verschlusskontakte zwischen Stützzellen und den Dendriten olfaktorischer Neurone waren im Schräg- bzw. Querschnitt als kleine ringförmige Färbeprofile zu erkennen. Kontakte zwischen Mikrovilluszellen und Stützzellen hatten ebenfalls ringförmigen Charakter, der Durchmesser der ringförmigen Färbeprofile war jedoch größer. Die Kontakte der Stützzellen untereinander stellten sich in polygonalen Färbeprofilen dar. Die Drüsenausführungsgänge zeigten sich im Transversalschnitt als große Kreise mit zentripetalen Ausläufern. Die nachgewiesenen Claudine waren mit ZO-1, -2 und -3 kolokalisiert, es handelt sich also um epitheltypische Verschlusskontakte.

In apikalen Verschlusskontakten des olfaktorischen Epithels konnten mittels Immunfluoreszenz die Claudine 1, 3, 4 und 5 nachgewiesen werden (s. Abb. 4.2.1 - 7). Das Vorkommen von Claudin 5 wurde bisher nur in Verschlusskontakten zwischen Endothelzellen, in Verschlusskontakten der Drüsenzellen des Pancreas, in Verschlusskontakten zwischen Alveolarepithelzellen und in autologen

Verschchlusskontakten myelinisierender Schwann-Zellen beobachtet (Turksen et al., 2004).

Doppelmarkierungen von Claudinen mit neuronalen Markern (OMP für reife olfaktorische Neurone, β III-Tubulin für unreife olfaktorische Neurone) belegten, dass es sich bei den kleinen runden Färbeprofilen wirklich um Kontakte zwischen Stützzellen und olfaktorischen Dendriten handelte (s. Abb. 4.2.1). Weiter konnte damit gezeigt werden, dass sich auch noch unreife, β III-Tubulin-immunreaktive Neurone an der Bildung Claudin-vermittelter Verschchlusskontakte beteiligen (s. Abb. 4.2.1 c, durch Pfeile gekennzeichnet). Allerdings zeigten die Perikarya dieser Neurone bereits eine vergleichsweise geringere β III-Tubulin-Immunreaktivität (in Abb. 4.2.1 c durch Pfeilspitzen markiert). In mit Claudin 1 (grün) / Claudin 4 (rot) / OMP (blau) dreifachmarkierten Schnitten konnte die Kolokalisation beider Proteine in neuronalen Kontakten belegt werden (s. Abb. 4.2.2). Weiterhin war Claudin 3 in allen apikalen Verschchlusskontakten lokalisiert (s. Abb. 4.2.5). Die Claudine 1, 3 und 5 konnten auch in Kontakten der Zellen der Drüsenausführungsgänge der Gll. olfactoriae gefunden werden (in Abb. 4.2.1 a und b beschriftet, Abb. 4.2.5, Abb. 4.2.6). Im Unterschied zu den apikalen Verschchlusskontakten konnte Claudin 4 in den Drüsenausführungsgängen der Gll. olfactoriae nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 4.2.6). Doppelmarkierungen zeigten Kolokalisation der Claudine mit Occludin in allen epithelialen Verschchlusskontakten (s. Abb. 4.2.7 c - e). Sowohl die Claudine als auch Occludin zeigten deutlich stärkere Fluoreszenz in trizellulären Junctionen (Dendrit/Stützzelle/Stützzelle) als in Stützzell-Stützzellkontakten, die wiederum stärker markiert waren als Dendrit/Stützzell-Kontakte (s. Abb. 4.2.7 a - c).

Das Vorkommen von Claudin 1 und -5 in den apikalen epithelialen Verschchlusskontakten konnte mittels elektronenmikroskopischer Immunogoldfärbung bestätigt werden (s. Abb. 4.2.3). In Adhärensjunctionen (in Abb. 4.2.3 durch Pfeile markiert) konnte keine Immunreaktivität der Antikörper gegen Claudin 1 und -5 festgestellt werden, was für die Spezifität der Färbung spricht.

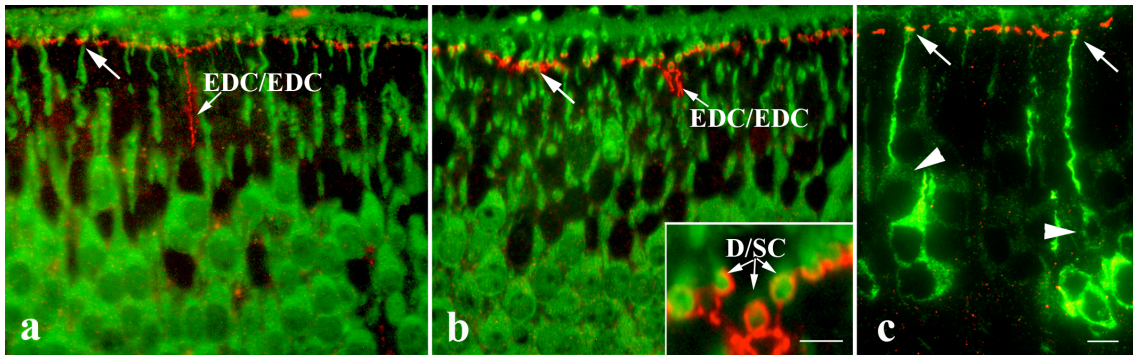


Abb. 4.2.1: **a** Grün angefärbt sind die olfaktorischen Neurone mittels eines Antikörpers gegen OMP, rot angefärbt ist Claudin 1, welches sowohl in den apikalen als auch in den Verschlusskontakten der Ausführungsgänge der olfaktorischen Drüsen (EDC = excretory duct cell) enthalten ist. **b** Claudin 5 (rot) ist ebenfalls in den apikalen und in den Verschlusskontakten der Drüsenausführungsgänge nachweisbar. Bei stärkerer Vergrößerung ist die räumliche Assoziation von OMP- und Claudin-Fluoreszenz (D = Dendrit, SC = supporting cell) erkennbar (Maßstab 2µm). **c** Doppelfärbungen von Claudin 5 (rot) und β III-Tubulin (grün) zeigen, dass sich intensiv angefärbte β III-Tubulin-positive Dendriten an der Bildung Claudin 5 (rot) vermittelter Kontakte beteiligen (Pfeile in **c**). Die Perikaryen dieser Neurone zeigen jedoch schwächere β III-Tubulin-ir Färbeverhalten (Pfeilspitzen in **c**). Maßstab in **c** für **a-c** = 5µm

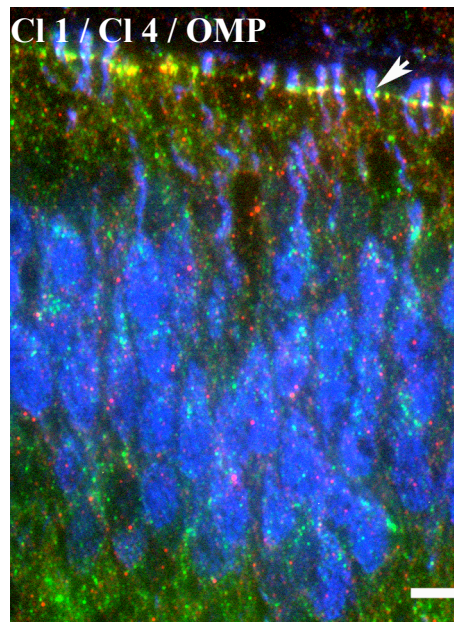


Abb. 4.2.2: In dreifachmarkierten Gewebeschnitten konnte die Kolo-kalisation der Claudine 1 (rot) und 4 (grün) in Verschlusskontakten olfaktorischer Neurone (blau) beobachtet werden (s. Pfeil). Maßstab: 5µm.

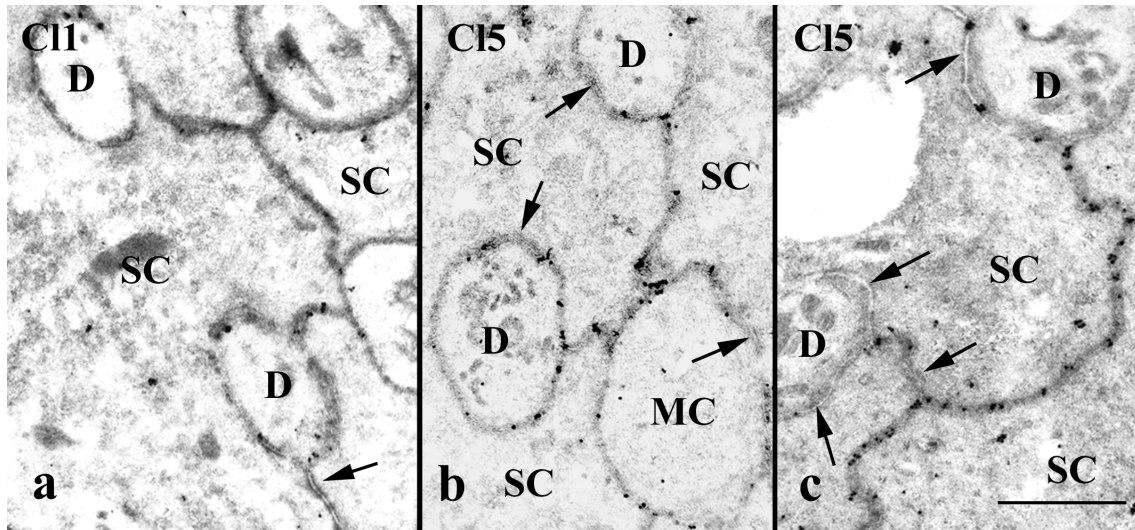


Abb. 4.2.3: Mittels Immunogoldfärbung kann das Vorkommen von Claudin 1 (a) und 5 (b und c) in allen apikalen Verschlusskontakten des Epithels bestätigt werden. Adherenskontakte, durch ein Interzellularspalt erkennbar, sind durch Pfeile markiert und zeigen keine Reaktivität für die untersuchten Claudine. SC = supporting cell, D = olfaktorischer Dendrit, MC = microvillus cell. Maßstab a-c : 1µm.

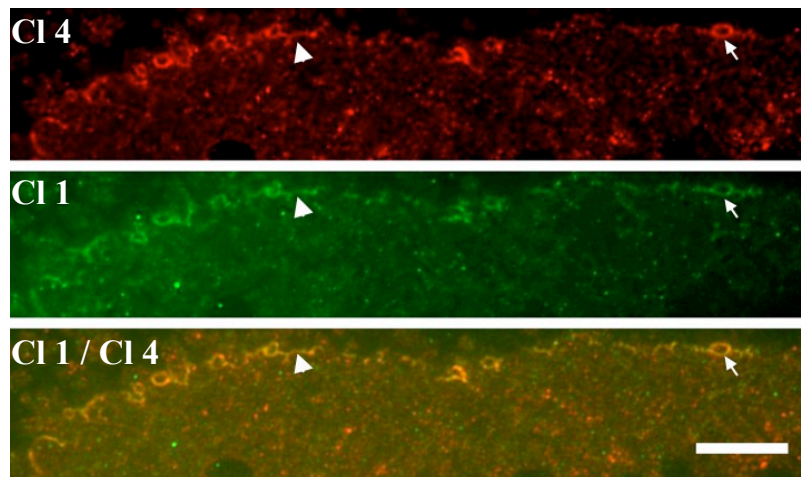


Abb. 4.2.4: Claudin 4 (rot) und Claudin 1 (grün) in Transversalschnitten durch das olfaktorische Epithel. Durch die Pfeilspitzen sind die polygonalen Färbeprofile der Verschlusskontakte zwischen den Stützzellen markiert. Mit den olfaktorischen Dendriten und den Mikrovilluszellen bilden die Stützzellen größere runde Zonulae occludentes aus (durch Pfeile markiert). Maßstab: 10µm.

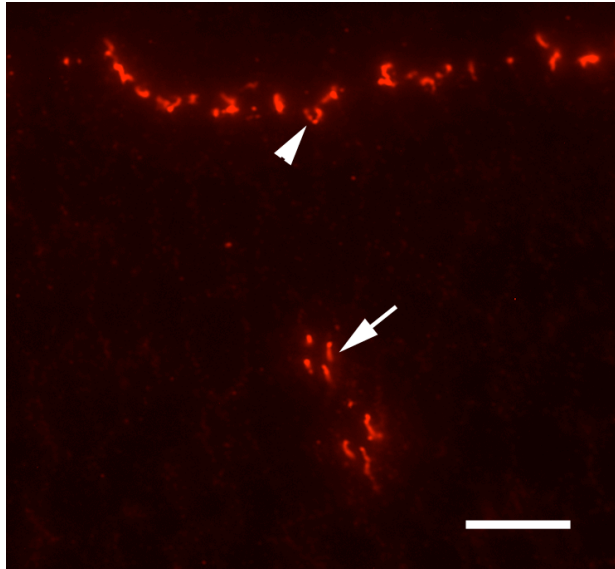


Abb. 4.2.5: Claudin 3 (rot) kann sowohl in den apikalen epithelialen Verschlusskontakten (Pfeilspitze), als auch in den Verschlusskontakten der Drüsenausführungsgänge (Pfeil) nachgewiesen werden.

Maßstab: 10µm

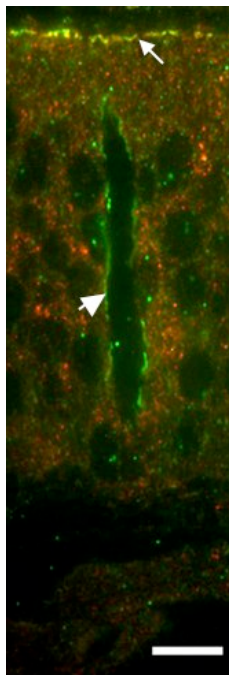


Abb. 4.2.6 In den apikalen Verschlusskontakten (durch Pfeil gekennzeichnet) sind die Claudine 1 (grün) und 4 (rot) kolokalisiert (gelbe Fluoreszenz). In den Kontakten der Drüsenausführungsgänge (durch Pfeilspitze gekennzeichnet) konnte lediglich Claudin 1 (grüne Fluoreszenz) nachgewiesen werden. Maßstab: 10µm.

Auffällig war, dass in Verschlusskontakten, an deren Bildung drei Zellen beteiligt waren, eine stärkere Immunreaktivität besonders für Claudine und Occludin beobachtet werden konnte (in Abb. 4.2.7. s. Pfeilspitzen).

In Doppelmarkierungen konnte die Kolokalisation von Occludin und ZO-1 (s. Abb. 4.2.8 a - c) sowie von Claudin 5 und ZO-1 nachgewiesen werden, wobei in dendritischen Verschlusskontakten stärkere ZO-1-Immunreaktivität beobachtet werden konnte (in Abb. 4.2.8 durch Pfeile gekennzeichnet). Da alle Claudine mit Claudin 5 kolokalisiert sind, kann auf die Kolokalisation auch der Claudine 1, 3 und 4 mit ZO-1 geschlossen werden. In ZO-1 / Occludin doppelmarkierten Präparaten konnte beobachtet werden, dass die Verschlusskontakte der Drüsenausführungsgänge schwächere ZO-1 Immunreaktivität zeigten (s. Abb. 4.2.8 c). In den Drüsenkörpern der olfaktorischen Drüsen zeigte sich wiederum verstärkte Immunfluoreszenz für ZO-1 (s. Abb. 4.2.8 c 2).

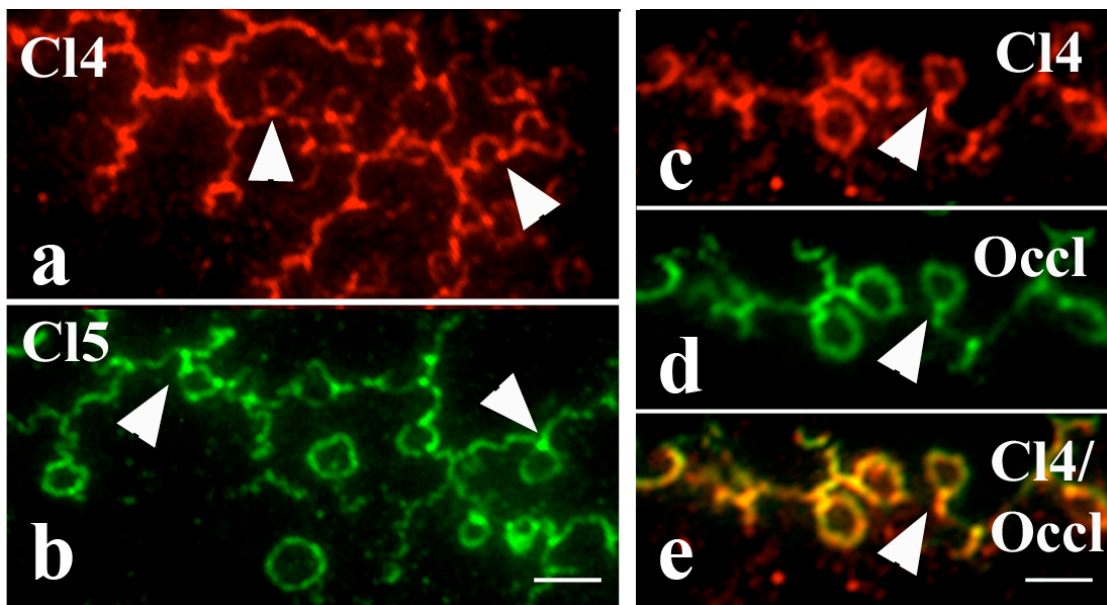


Abb. 4.2.7: In trizellulären Verschlusskontakten konnte stärkere Fluoreszenz für verschiedene Claudine (in a - c durch Pfeilspitzen markiert) beobachtet werden, sowie für Occludin (in d durch Pfeilspitze markiert). Maßstab in a und e: 2µm.

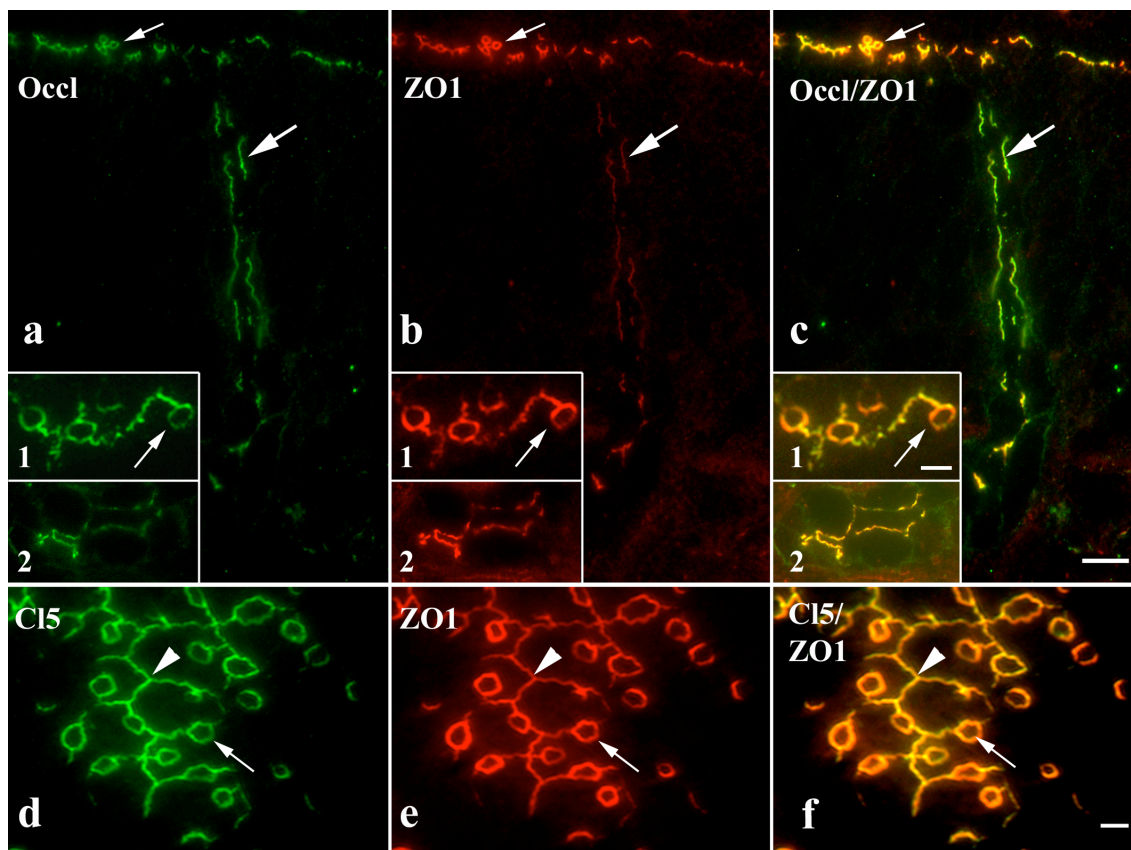


Abb. 4.2.8: **a - c** Occludin (grün) und ZO-1 (rot) sind in den apikalen und ductalen Verschlusskontakten kolokalisiert (s. große Pfeile in **a - c**). Die Fluoreszenzintensität für ZO-1 ist in den ductalen Verschlusskontakten im Vergleich zu den apikalen Tight junctions schwächer (s. großer Pfeil in **c**). In Verschlusskontakten der olfaktorischen Dendriten zeigt sich intensivere Fluoreszenz für ZO-1 (s. Pfeil in **c 1**). In Verschlusskontakten der Stützzellen untereinander sind Occludin und ZO-1 homogen verteilt (s. gelbe Fluoreszenz in **c**). In den ductalen Verschlusskontakten ist stärkere Fluoreszenz für Occludin zu erkennen (s. großer Pfeil in **c**). In Verschlusskontakten der olfaktorischen Drüsen (s. **a - c 2**) ist stärkere Fluoreszenz für ZO-1 zu erkennen (s. **b 2**) als in den ductalen Verschlusskontakten. **d -f** In den apikalen Zonulae occludentes konnte die Kolokalisation von Claudin 5 (grün) und ZO-1 (rot) nachgewiesen werden. In den Verschlusskontakten zwischen Stützzellen und olfaktorischen Dendriten (durch Pfeile gekennzeichnet) zeigt sich eine intensive Fluoreszenz für ZO-1 (rot). Weiterhin zeigen trizelluläre (durch Pfeilspitzen markiert) intensivere Fluoreszenz für Claudin 5. Maßstab: in **c 1** = 5 μ m, in **c** und **f** = 1 μ m.

Weiterhin konnten in den apikalen Verschlusskontakten die Proteine ZO-2 und -3 lokalisiert werden. Auch hier zeigte sich Kolokalisation mit Claudin 5 (s. Abb. 4.2.9 und 4.2.10), für Claudin 5 und ZO-2 auch in den olfaktorischen Drüsen (in Abb. 4.2.9 durch Pfeile markiert).

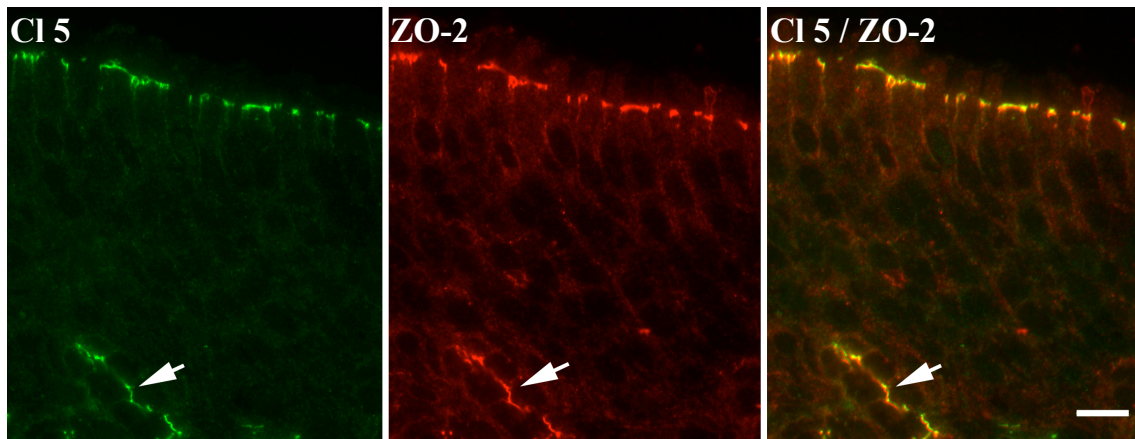


Abb. 4.2.9: In den apikalen Zonulae occludentes waren Claudin 5 (grün) und ZO-2 (rot) kolokalisiert. Zusätzlich konnten beide Proteine in den Verschlusskontakten olfaktorischer Drüsen (durch Pfeile markiert) nachgewiesen werden. Maßstab: 10µm.

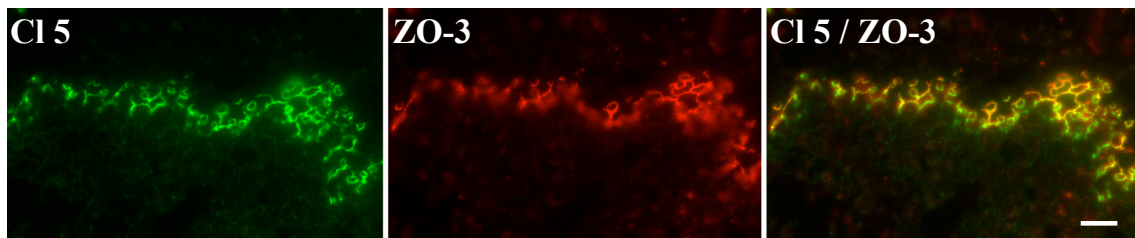


Abb. 4.2.10: Auch Claudin 5 (grün) und ZO-3 (rot) zeigen in den apikalen epithelialen Verschlusskontakten Kolokalisation. Maßstab: 5µm.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: die olfaktorischen Neurone beteiligen sich an der Bildung Claudin-vermittelter Verschlusskontakte. In diesen Zonulae occludentes sind zusätzlich zu Occludin und ZO-1 (Meier-Stiegen, 2005) die Claudine 1, 3, 4 und 5, sowie die Tight junction assoziierten Proteine ZO-2 und -3 nachzuweisen. Alle Proteine finden sich außerdem in den Verschlusskontakten zwischen Stütz- und Mikrovilluszellen sowie in den Zonulae occludentes des Stützzellen untereinander. In trizellulären Tight junctions kann intensivere Immunreaktivität für die Claudine und Occludin beobachtet werden.

In den Kontakten der Zellen der Drüsenausführungsgänge sind die Claudine 1, 3 und 5 und die Zonula occludens Proteine 1, -2 und -3 nachzuweisen. Allerdings zeigen die Zellen der olfaktorischen Drüsen und Drüsenausführungsgänge keinerlei Fluoreszenz für Claudin 4. Im Vergleich zu den apikalen Verschlusskontakten und den Tight junctions der Drüsenkörper zeigen die Verschlusskontakte der Drüsenausführungsgänge schwächere ZO-1- Immunreaktivität.

4.3 Claudin-vermittelte Verschlusskontakte in den Fila olfactoria

Auch innerhalb der Fila olfactoria konnten Proteinkomponenten von Verschlusskontakten, insbesondere Claudine nachgewiesen werden. In dreifachmarkierten (OMP/C11/C14) Präparaten konnte Claudin 1 in der äußersten Schicht von Axonbündeln nachgewiesen werden. Claudin 4 konnte hingegen innerhalb der Fila olfactoria nicht gefunden werden, zeigte aber in den Verschlusskontakten des Epithels in dem selben Präparat spezifische Immunreaktivität. Mittels des neuronalen Markers OMP wurden die Axone der olfaktorischen Neurone markiert, um sicherzustellen, dass es sich auch tatsächlich um Fila olfactoria handelt (s. Abb. 4.3.1).

Claudin 1 und ZO-1 waren in der Peripherie der Fila olfactoria kolokalisiert (s. Abb. 4.3.2). Neben Claudin 1 konnte hier auch Claudin 5 in werden. Dieses war in seinem Vorkommen jedoch nicht wie Claudin 1 auf die Peripherie der Fila beschränkt, sondern war auch zwischen Faserbündeln lokalisiert (s. Abb. 4.3.3). Bei longitudinaler Schnittführung zeigten sich linienförmige Färbemuster, bei transversaler Schnittführung waren punktförmige Färbeprofile zu erkennen.

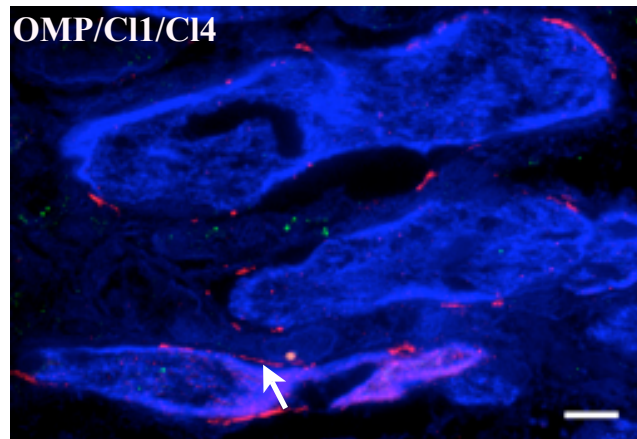


Abb. 4.3.1: Mittels eines Antikörpers gegen OMP sind die olfaktorischen Axone blau angefärbt. In der Peripherie der Fila olfactoria ist Claudin 1 (rot) nachzuweisen (Pfeil). Claudin 4 (grün) war in den Fila nicht vorhanden.

Maßstab: 10µm.

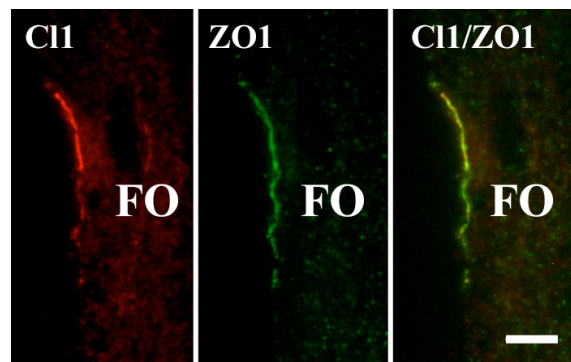


Abb. 4.3.2: Claudin 1 (rot) und ZO-1 (grün) sind in peripheren Bereichen der Fila olfactoria kolokalisiert.

FO = Fila olfactoria. Maßstab: 5µm.

Die olfaktorischen Gliazellen wurden mittels eines spezifischen Antikörpers gegen das *glial fibrillary acidic protein (GFAP)* angefärbt. Hierbei zeigte sich keine eindeutige Kollokalisierung mit Claudin 5, jedoch eine räumliche Assoziation der beiden Proteine (s. Abb. 4.3.3 b und 4.3.4). Beide Proteine sind zwischen den axonalen Faserbündeln lokalisiert, was in zusätzlich mit OMP gefärbten Schnitten zu erkennen war. Zusätzlich zeigte der polyclonale Occludin-Antikörper schwache, jedoch spezifische Reaktivität in peripheren Bereichen der Fila olfactoria sowie in den Fila olfactoria selbst (nicht gezeigt).

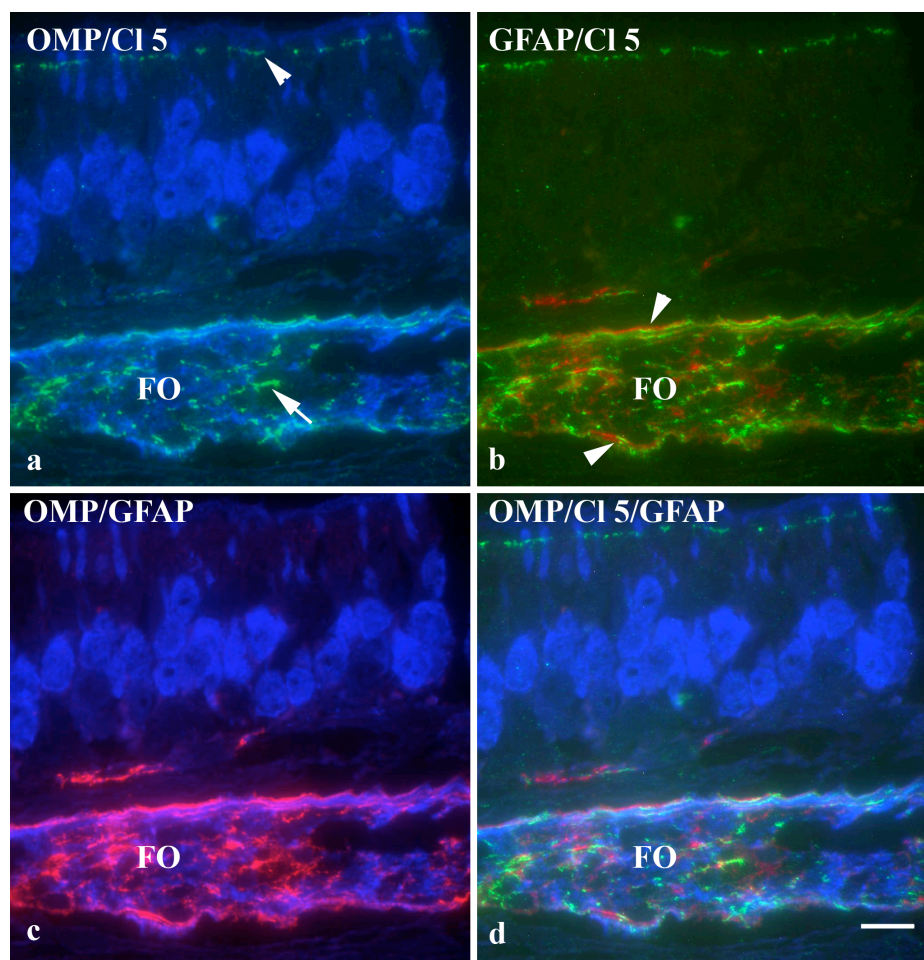


Abb. 4.3.3: Die olfaktorischen Neurone und Axone sind mittels eines Antikörpers gegen OMP blau markiert. Fluoreszenz für Claudin 5 (grün) findet sich sowohl in den apikalen Verschlusskontakten des Epithels (Pfeilspitze in **a**), als auch innerhalb der Fila olfactoria zwischen den axonalen Bündeln (Pfeil in **a**). Fortsätze der olfaktorischen Gliazellen sind mittels eines Antikörpers gegen GFAP rot dargestellt. Auffällig ist die räumliche Assoziation zwischen der Fluoreszenz für GFAP (rot) und Claudin 5 (grün) (s. Pfeilspitzen **b**). FO = Fila olfactoria. Maßstab: 10µm.

Immunreaktivität für ZO-1 fand sich in der Lamina propria des Epithels und im Stratum fibrosum des Bulbus olfactorius besonders in der Umgebung größerer Axonbündel sowie in pialen Strukturen des Bulbus olfactorius. (s. Abb. 4.3.5). In tieferen Schichten des Stratum fibrosum des Bulbus olfactorius verlor sich allerdings die Immunreaktivität für ZO-1.

Zur genaueren Untersuchung des Vorkommens von ZO-1 innerhalb der Fila olfactoria wurden insgesamt drei verschiedene Antikörper gegen ZO-1 verwendet (s. 2. Material). Die Verwendung des monoclonalen Antikörpers gegen ZO-1 (ZO-1m) zeigte keine Immunfluoreszenz innerhalb der Fila olfactoria, obwohl die apikalen, epithelialen Verschlusskontakte in den gleichen Schnitten intensive Färbung aufwiesen (s. Abb. 4.3.6).

Weiterhin zeigte dieser Antikörper schwache Aktivität in endothelialen Verschlusskontakten (s. Abb. 4.3.5). Der polyclonale Ziegen-Antikörper gegen ZO-1 (ZO-1gp) zeigte lediglich unspezifische Reaktivität innerhalb der Fila olfactoria. In den apikalen epithelialen und in den ductalen Verschlusskontakten reagierte der Antikörper nur sehr schwach. Der polyclonale Kaninchen-Antikörper (ZO-1 rp) wies vergleichbare Färbeaktivität in epithelialen und endothelialen Verschlusskontakten des olfaktorischen Epithels auf. Zusätzlich konnten innerhalb der Fila olfactoria Färbemuster erkannt werden, welche in ihrer Morphologie denen von Claudin 5 ähnelten (in Abb. 4.3.6 c durch große Pfeile gekennzeichnet).

Vergleiche von ZO-1m und ZO-1rp zeigten identische Färbemuster beider Antikörper in epithelialen Verschlusskontakten (s. Abb. 4.3.6). Allerdings zeigte ZO-1m keine Aktivität in den Fila olfactoria selbst (s. Abb. 4.3.6 b). Moderate Immunreaktivität für ZO-2 konnte innerhalb der Fila olfactoria beobachtet werden, wobei auch Kolo-kalisation mit Claudin 5 zu erkennen war (s. Abb. 4.3.7). ZO-3 konnte innerhalb der Fila olfactoria nicht nachgewiesen werden.

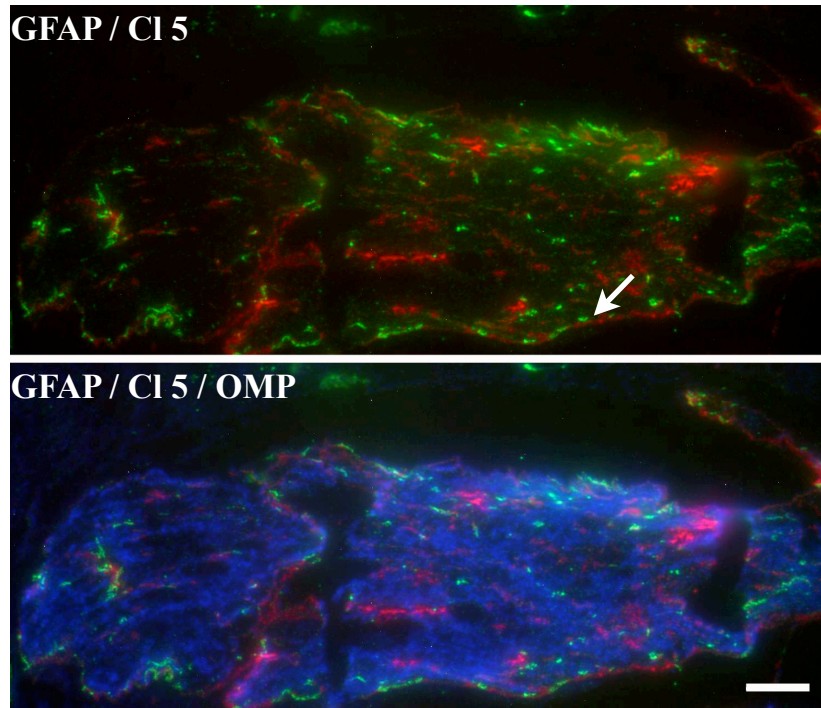


Abb. 4.3.4: Gliale Fortsätze sind mittels eines Antikörpers gegen GFAP rot angefärbt. Claudin 5-ir (grün) und GFAP-ir (rot) Profile sind immer eng benachbart (Pfeil). In der unteren Bildhälfte sind zusätzlich die olfaktorischen Axone mittels eines Antikörpers gegen OMP blau dargestellt. Maßstab: 10µm.

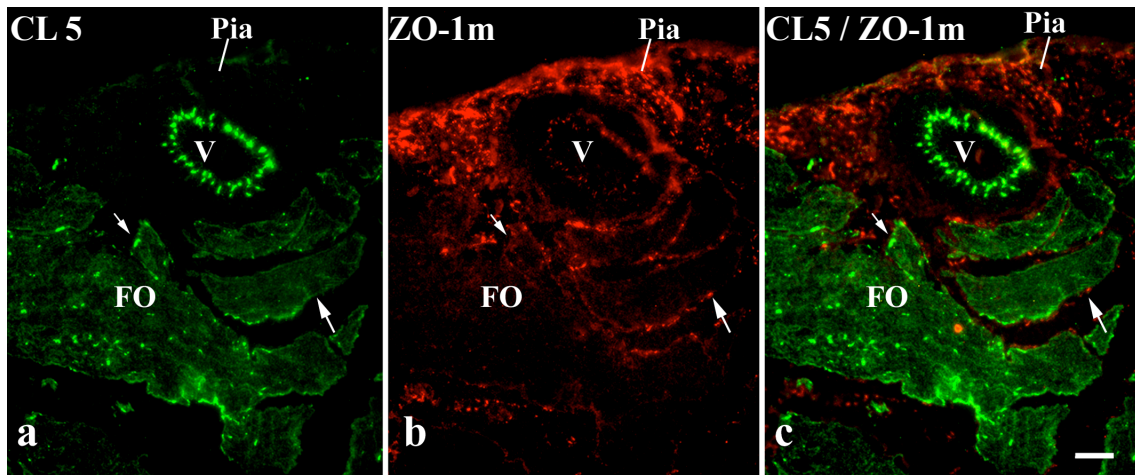


Abb. 4.3.5: Immunreaktivität für ZO-1 (rot) konnte insbesondere in pialen Anteilen des Bulbus olfactorius lokalisiert werden. Weiterhin zeigte sich ZO-1 Immunreaktivität in Bereichen um größere Axonbündel (in **a**, **b** und **c** durch Pfeile markiert). In diesen ZO-1-ir Kontakten konnte kein Claudin 5 (grün) nachgewiesen werden. Starke Fluoreszenz für Claudin 5 (grün) und schwache ZO-1-Fluoreszenz (rot) konnten in endothelialen Verschlusskontakten pialer Blutgefäße (V = vessel) beobachtet werden. FO = Fila olfactoria. Maßstab: 10µm.

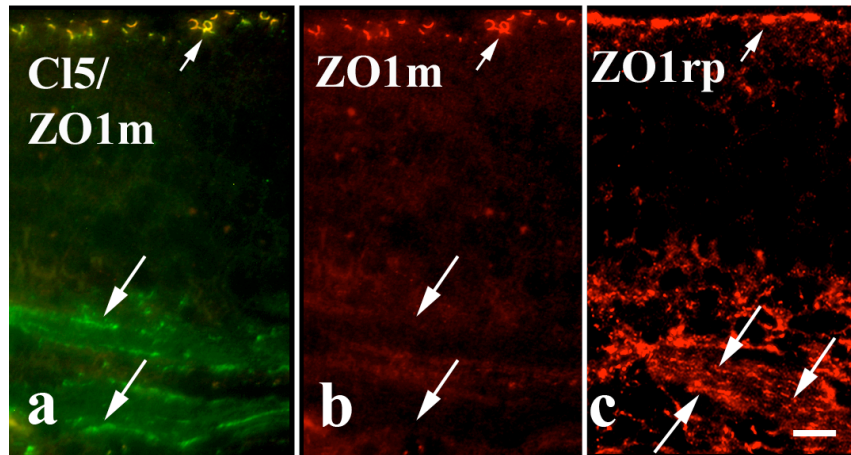


Abb. 4.3.6: Der monoclonale Antikörper gegen ZO-1 (ZO-1m rot) zeigt intensive Immunreaktivität in den apikalen epithelialen Verschlusskontakten (s. kleine Pfeile in **a** und **b**). In diesen Kontakten zeigt sich weiterhin Kolokalisation zwischen Claudin 5 und ZO-1. In den Fila olfactoria kann jedoch keine Immunreaktivität für ZO-1 durch den monoclonalen ZO-1 Antikörper nachgewiesen werden (große Pfeile in **a** und **b**). Der polyclonale Antikörper gegen ZO-1 (ZO-1rp rot) zeigt spezifische Immunreaktivität in den apikalen Verschlusskontakten (s. kleiner Pfeil in **c**). In den Fila olfactoria zeigte dieser Antikörper linienförmige Färbeprofile, welche denen von Claudin 5 ähnelten (s. große Pfeile in **c**) Maßstab: 1µm.

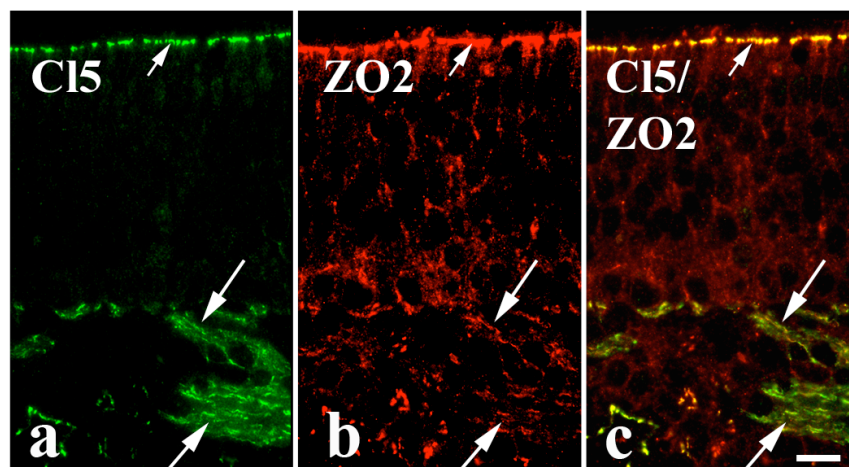


Abb. 4.3.7: Claudin 5 (grün) und ZO-2 (rot) sind in den apikalen, epithelialen Verschlusskontakten kolokalisiert (kleine Pfeile in **a**, **b** und **c**). ZO-2 (rot) zeigt schwache Immunreaktivität in den Fila olfactoria und ist auch hier mit Claudin 5 (grün) kolokalisiert (große Pfeile in **a**, **b** und **c**). Maßstab: 1µm.

Elektronenmikroskopisch konnte Claudin-5-Immunreaktivität zwischen Fortsätzen von OECs nachgewiesen werden (s. Abb. 4.3.8). Elektronenmikroskopische Untersuchungen auf das Vorkommen von Claudin 1, ZO-1 (unter Verwendung aller oben erwähnten Antikörper) und Occludin in den Fila olfactoria erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse.

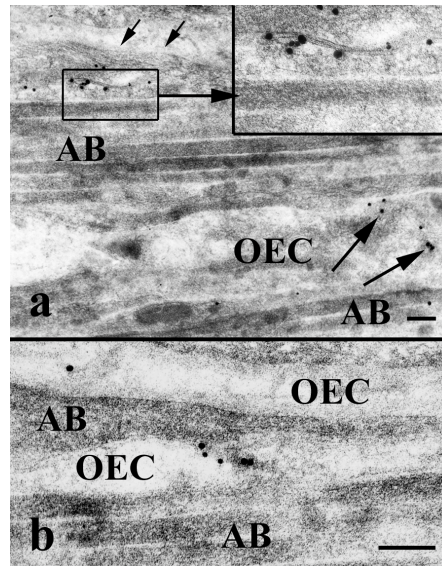


Abb. 4.3.8: Mittels elektronenmikroskopischer Immunogoldfärbung kann Claudin 5 zwischen Fortsätzen von OECs nachgewiesen werden (s. große Pfeile in a). Die kleinen Pfeile in a markieren die Basalmembran, welche die Fila olfactoria peripher begrenzt. AB = Axonbündel; OEC = olfactory ensheathing cell. Maßstab: 0,5µm.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: Immunreaktivität für Claudin 1 beschränkt sich auf die äußere Zirkumferenz größere Axonbündel der Fila olfactoria der Lamina propria sowie den oberflächlichen Teil des Stratum fibrosum des Bulbus olfactorius.

Die beschriebenen Versuche deuten daraufhin, dass OECs Claudin 5 vermittelte Kontakte bilden. In diesen Kontakten sind die Zonula occludens Proteine ZO-1 und ZO-2 kolokalisiert. Weiterhin kann ZO-1 in den oben beschriebenen Claudin 1 vermittelten Kontakten gefunden werden.

Die Ursache für die unterschiedliche Detektierbarkeit der Tight junctions in den Fila olfactoria durch verschiedene ZO-1-Antikörper ist nicht bekannt. Möglicherweise sind unterschiedliche ZO-1-Isoformen an der Bildung der Verschlusskontakte in den Fila olfactoria beteiligt, für die die verwendeten ZO-1 Antikörper unterschiedliche Affinität besitzen.

4.4 Darstellung von Proteinen von Zonula und Punctum adherens.

In epithelialen Adherenskontakten wird die extrazelluläre Zelljunktion über das klassische Cadherin E-Cadherin vermittelt, in neuronalen Adherenskontakten findet sich das klassische Cadherin N-Cadherin. Diese Membranproteine sind intrazellulär über Adapterproteine, die Catenine, in den zytoskelettalen Actinfilamenten verankert. Zu den Cateninen zählen z.B. α -Catenin, β -Catenin, p120 Catenin.

4.5 Adherenskontakte im olfaktorischen Epithel.

Im olfaktorischen Epithel konnte das epitheltypische E-Cadherin und das neuronale N-Cadherin nachgewiesen werden. Beide zeigten intensive Immunfluoreszenz sowohl in den apikalen Zonulae adherentes, als auch in den basolateral gelegenen Puncta adherentia. In E-Cadherin/N-Cadherin doppelmarkierten Präparaten (Abb. 4.5.1 und 4.5.2) war eine unterschiedliche Verteilung beider Cadherine zu erkennen. So wiesen Adherenskontakte zwischen den Zellen der olfaktorischen Drüsenausführungsgänge und Kontakte zwischen Stütz- und Mikrovilluszellen (in Abb. 4.5.2 a beschriftet) lediglich E-Cadherin-Immunreaktivität auf. Ebenso zeigten vereinzelte, direkt oberhalb der Basalmembran gelegene Zellen zahlreiche E-Cadherin vermittelte Puncta adherentia (s. Abb. 4.5.1). Ausschließliches Vorkommen von N-Cadherin konnte in den apikalen Zonulae adherentes der olfaktorischen Dendriten und in den basolateralen Puncta adherentia der olfaktorischen Neurone beobachtet werden (s. Abb. 4.5.2 Pfeilspitze in c). In der basalen Schicht des olfaktorischen Epithels war die Immunreaktivität für N-Cadherin schwächer ausgeprägt, als in anderen Abschnitten des Epithels (s. Abb. 4.5.1). Weiterhin konnten in den polygonalen Zonulae adherentes zwischen Stützzellen E- und N-Cadherin in Kolokalisation beobachtet werden. In basolateralen Puncta adherentia der Stützzellen wechselten sich E- und -N-Cadherin vermittelte Kontakte ab (s. Abb. 4.5.2).

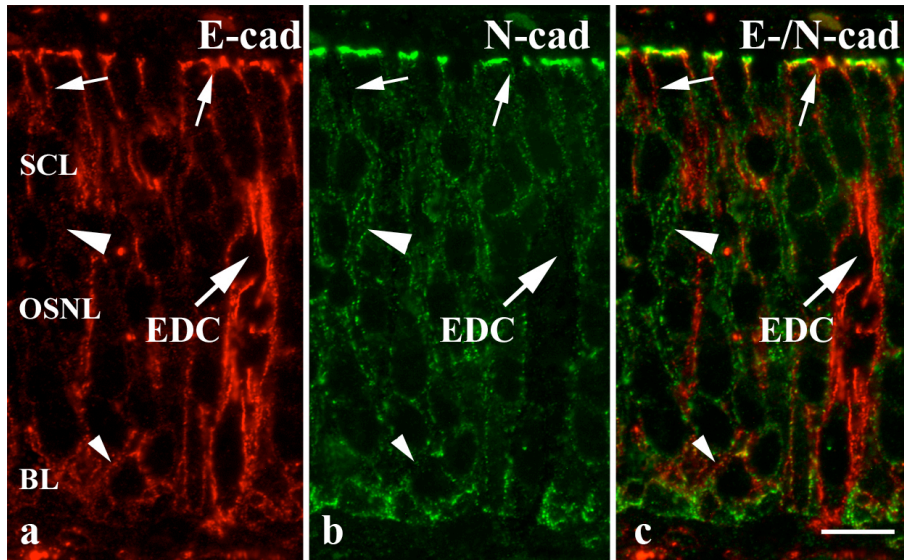


Abb. 4.5.1: E-Cadherin (rot) und N-Cadherin (grün) zeigen bei longitudinaler Schnittführung ein bestimmtes räumliches Verteilungsmuster. Einige apikale und alle ductalen (EDC = excretory duct cell) Adherenskontakte sind E-Cadherin vermittelt (s. kleine Pfeile in **a - c**). Zahlreiche N-Cadherin vermittelte *Puncta adherentia* sind in der neuronalen Schicht des olfaktorischen Epithels lokalisiert (OSNL = olfactory sensory neuron layer; s. große Pfeilspitze in **a - c**). In den basalen Epithelschichten (BCL = basal cell layer) nimmt die Reaktivität für N-Cadherin ab. Unmittelbar über der Basalmembran finden sich Zellen, welche zahlreiche E-Cadherin vermittelte *Puncta adherentia* ausbilden (s. kleine Pfeilspitzen in **a - c**). SCL = supporting cell layer. Maßstab: 10 μ m.

Untersuchungen auf das Vorkommen von α -Catenin, β -Catenin und p120-Catenin im olfaktorischen Epithel zeigten für die verschiedenen Catenine eine insgesamt ähnliche Verteilung. Intensive Immunreaktivität für die verschiedenen Catenine war in der Stützzellschicht (SCL = supporting cell layer), im neuronalen Kompartiment des Epithels (OSNL = olfactory sensory neuron layer), sowie in Zellen zu beobachten, welche unmittelbar über der Basalmembran gelegen waren. Die unmittelbar über dieser basalen Zellschicht gelegene Zelllage zeigte eine vergleichsweise schwächere Immunreaktivität für die verschiedenen Catenine (s. Abb. 4.5.3).

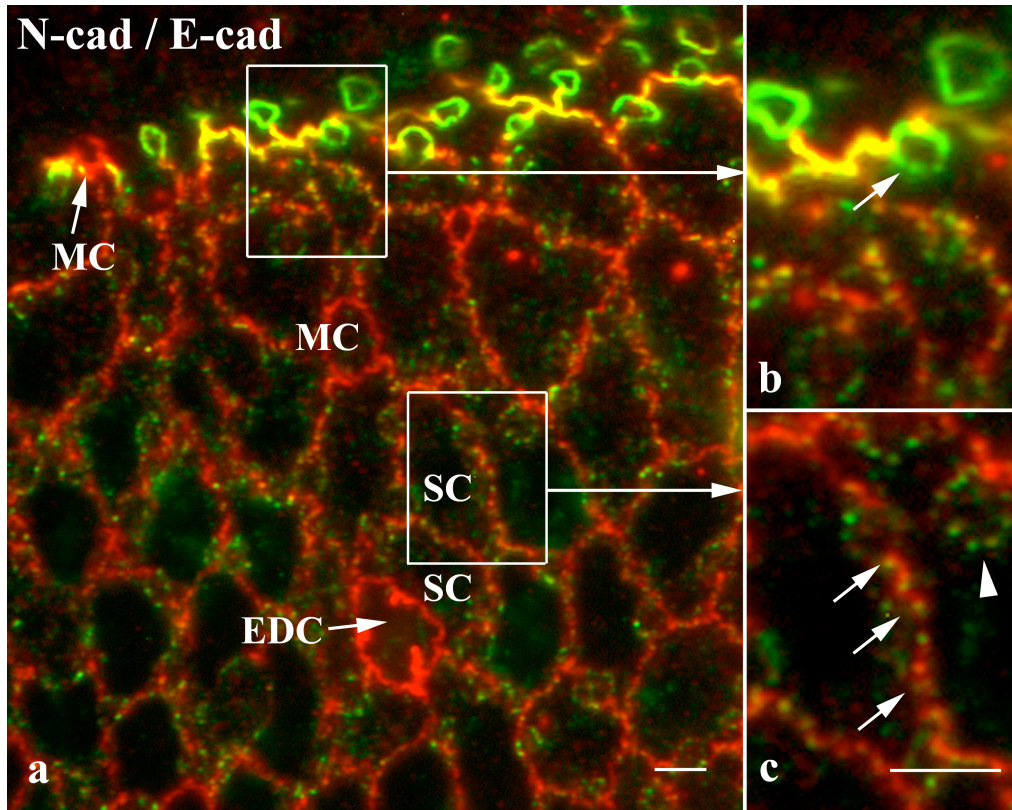


Abb. 4.5.2: In den apikalen Zonulae adherentes zwischen olfaktorischen Dendriten und Stützzellen (SC) ist die Junction lediglich durch N-Cadherin (grün) vermittelt (s. Pfeil in **b**). In den auto- und heterologen Zonulae adherentes der Stützzellen (SC) kommen beide Cadherine vor (gelbe Fluoreszenz in **a** und **b**). In den Zonulae adherentes zwischen Stütz- und Mikrovilluszellen (MC) sowie in den Adherenskontakten der olfaktorischen Drüsen (EDC = excretory duct cell) ist ausschließlich E-Cadherin (rot) nachzuweisen (s. Abb. **a**). Die basolateralen Puncta adherentia zwischen Neuron und Stützzelle sind wiederum lediglich N-Cadherin vermittelt (grüne punktförmige Fluoreszenz, s. Pfeilspitze in **c**), wobei die basolateralen Puncta adherentia zwischen Stützzellen N- und E-Cadherin vermittelte Kontakte darstellen, welche abwechselnd ausgebildet werden (s. Pfeile in **c**). Maßstab: 2µm.

Das Vorkommen von β -Catenin in neuronalen Adherensjunctionen zeigte sich besonders deutlich in N-Cadherin/ β -Catenin/OMP dreifach-gefärbten Präparaten. Weiterhin zeigte sich β -Catenin Immunreaktivität in allen anderen epithelialen Adherenskontakten (s. Abb. 4.5.4). In den apikalen Zonulae adherentes zwischen Stützzellen und olfaktorischen Dendriten sowie in den Zonulae adherentes der Stützzellen untereinander waren N-Cadherin und β -Catenin kolokalisiert (s. Abb. 4.5.4).

Basolaterale Adhärenskontakte zwischen Stützzellen und olfaktorischen Dendriten zeigten zwar Kolokalisation für N-Cadherin und β -Catenin, jedoch war die Intensität der β -Catenin-Färbung schwächer als in Stützzell/Stützzell Kontakten (s. Abb. 4.5.4 a). In den basolateral lokalisierten Puncta adherentia zwischen Stützzellen zeigten sich Kontakte mit N-Cadherin und β -Catenin sowie Kontakte, welche lediglich β -Catenin aufwiesen (s. Abb. 4.5.4 große Pfeilspitze). Diese Kontakte stellen sehr wahrscheinlich die oben beschriebenen E-Cadherin-vermittelten Puncta adherentia dar.

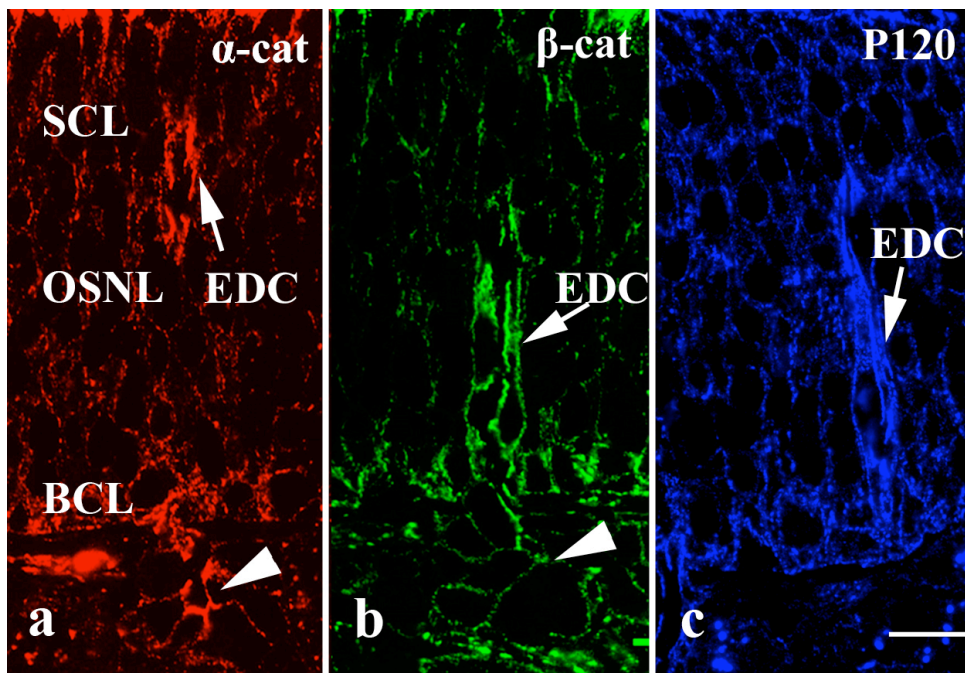


Abb. 4.5.3: Die drei untersuchten Catenine zeigen insgesamt ein ähnliches Verteilungsmuster. Intensivere Immunfluoreszenz ist jeweils in den apikalen Zellschichten (SCL = supporting cell layer; OSNL = olfactory sensory neuron layer), sowie in den Zellen unmittelbar über der Basalmembran (BCL = basal cell layer) zu beobachten. Weiterhin findet sich intensive Immunfluoreszenz für alle drei Catenine in den Kontakten der Drüsenausführungsgänge (EDC = excretory duct cells; durch Pfeile in **a - c** gekennzeichnet) und in Kontakten der in der Lamina propria gelegenen Drüsenkörper (durch Pfeilspitzen in **a** und **b** gekennzeichnet). In der Zellschicht zwischen OSNL und BCL zeigt sich schwächere Immunfluoreszenz. Maßstab: 10 μ m.

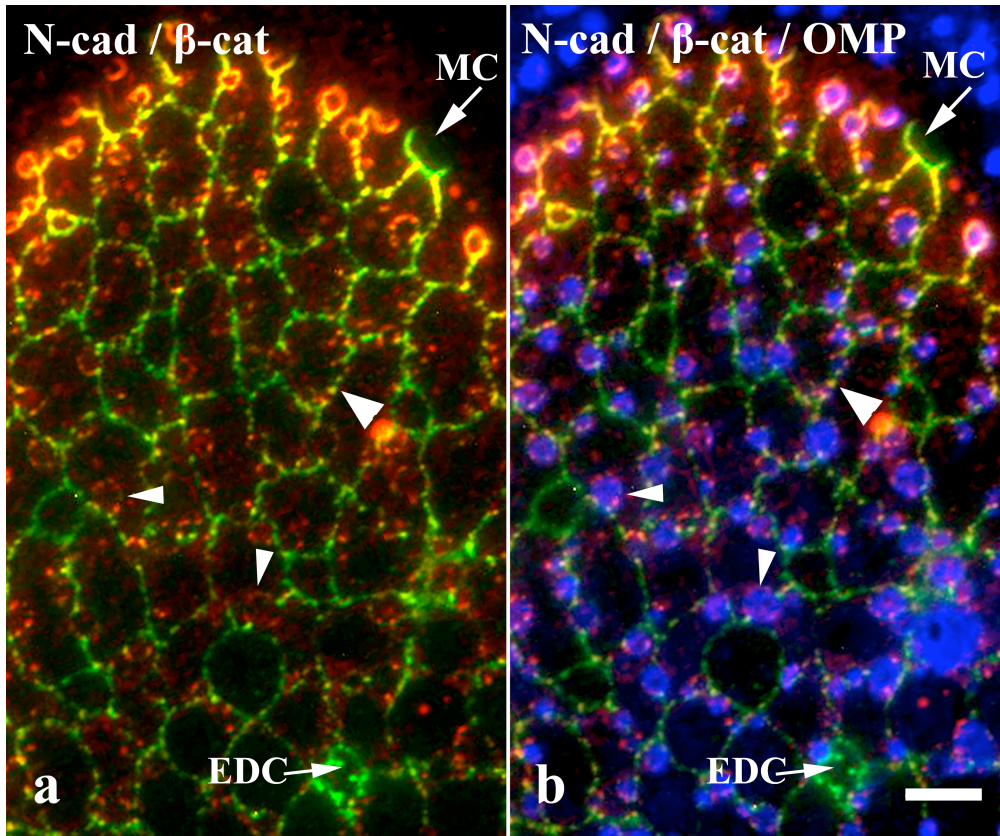


Abb. 4.5.4: **a** In den neuronalen Adherenskontakten sind N-Cadherin (rot) und β -Catenin (grün) stets kolokalisiert (gelbe bzw. gelb-rötliche Fluoreszenz). In den basolateralen Puncta adherentia der olfaktorischen Dendriten zeigt sich schwächere Aktivität für β -Catenin (rötliche Farbe der Puncta adherentia, s. kleine Pfeilspitzen). Weiterhin sind N-Cadherin (rot) und β -Catenin in Stützzellkontakten kolokalisiert (polygonale gelbe Fluoreszenzmuster). Basolaterale Puncta adherentia zwischen Stützzellen zeigen sowohl Kolokalisation von N-Cadherin und β -Catenin, als auch alleiniges Vorkommen von β -Catenin (s. große Pfeilspitze in **a**). Kontakte der Mikrovilluszellen (MC = microvillar cell) und Kontakte der Zellen der Drüsenauführungsgänge (EDC = excretory duct cell) zeigen keinerlei Reaktivität für N-Cadherin (lediglich grüne Fluoreszenz für β -Catenin) **b** Die enge räumliche Assoziation mit den neuronalen Dendriten (blau) belegt, dass es sich um neuronale Kontakte handelt. Maßstab: 5 μ m.

Elektronenmikroskopisch konnte das Vorkommen von E- und N-Cadherin sowie von β -Catenin in den epithelialen Adherenskontakten bestätigt werden (s. Abb. 4.5.5).

Abhängig von ihrem Reifegrad bilden olfaktorische Neurone unterschiedlich häufig Adherenskontakte aus. β III-Tubulin-immunreaktive, unreife olfaktorische Neurone, welche die untere Zellschicht der neuronalen Zellschicht des Epithels bildeten, bilden zahlreiche N-Cadherin vermittelte Kontakte mit ihren Nachbarzellen aus (s. Abb. 4.5.6), ebenso wie OMP-ir reife olfaktorische Neurone (Abb. 4.5.7 b).

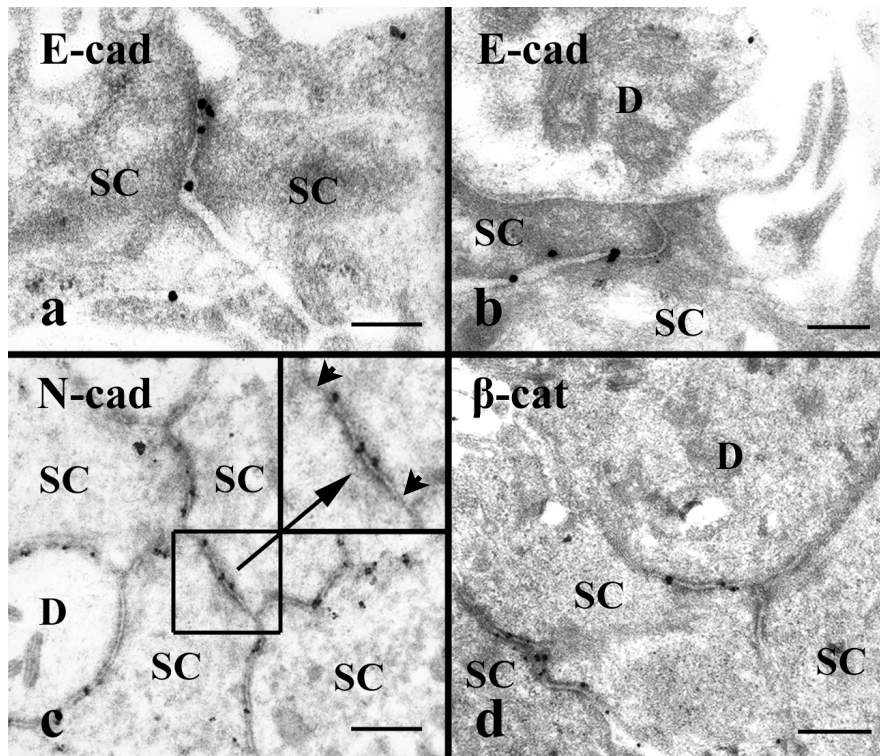


Abb. 4.5.5: **a** E-Cadherin ist in Kontakten der Stützzellen (SC = supporting cell) lokalisiert. **b** In den Kontakten zwischen Stützzellen und olfaktorischen Dendriten (D) ist kein E-Cadherin nachzuweisen. **c** N-Cadherin kann sowohl in Kontakten zwischen Dendrit (D) und Stützzellen (SC) als auch in Kontakten der Stützzellen untereinander nachgewiesen werden (s. Inset in **c**). In Verschlusskontakten (in **c** durch Pfeilspitzen markiert) zeigt sich keine Immunreaktivität für die Cadherine, was für die Spezifität der Färbung spricht. **d** β -Catenin kann sowohl in SC/SC-, als auch in D/SC-Kontakten lokalisiert werden. Maßstab in **a,b**: 0,25 μ m. Maßstab in **c,d**: 0,5 μ m.

Die hohe Dichte von N-Cadherin-positiven Kontakten in der entsprechenden Zellschicht des Epithels erlaubte auch eine Identifikation unreifer olfaktorischer Sinneszellen in N-Cadherin/ β -Catenin/OMP - gefärbten Präparaten (s. Abb. 4.5.7 große Pfeile in a und b). Unreife, β III-Tubulin-positive olfaktorische Neurone bilden mit ihren Nachbarzellen N-Cadherin vermittelte Kontakte aus (s. Pfeilspitzen in Abb. 4.5.6 a). Unmittelbar über der Basalmembran konnten Zellen mit länglichen Zellkernen erkannt werden, welche kein N-Cadherin aufweisen (s. Pfeile in Abb. 4.5.6 a). Bei diesen Zellen könnte es sich um basale Zellen handeln, welche E-Cadherin vermittelte Adherenskontakte ausbilden (s. Abb. 4.5.6 a). Diese Kontakte enthielten weiterhin β -Catenin (s. Abb. 4.5.6 b).

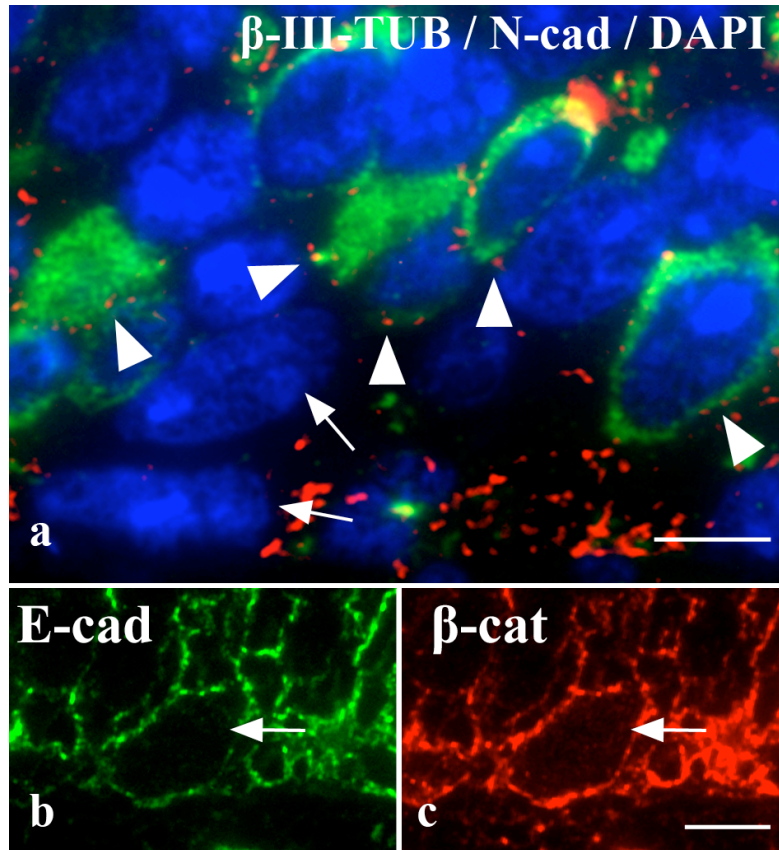


Abb. 4.5.6: **a** Unreife, β III-Tubulin-positive (grün) olfaktorische Neurone bilden mit ihren Nachbarzellen N-Cadherin (rot) vermittelte Kontakte aus (s. Pfeilspitzen). Zellkerne sind mittels DAPI-Färbung blau dargestellt. Unmittelbar über der Basalmembran sind Zellen mit länglichen Zellkernen zu erkennen, welche kein N-Cadherin aufweisen (durch Pfeile gekennzeichnet). Bei diesen Zellen könnte es sich um basale Zellen handeln, welche E-Cadherin (grün) vermittelte Adherenskontakte ausbilden (in **b** durch Pfeil markiert) **c** Diese Kontakte enthalten weiterhin β -Catenin (rot). Maßstab in **a**: $5\mu\text{m}$. Maßstab in **c** für **b** und **c**: $5\mu\text{m}$.

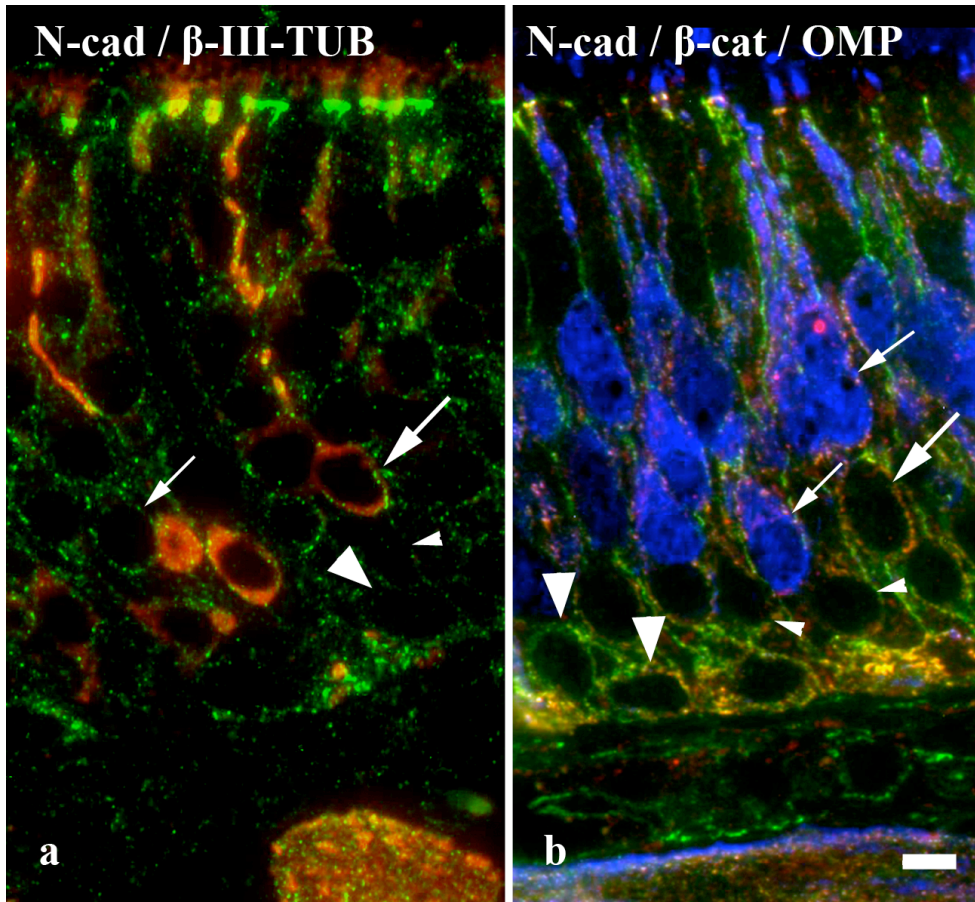


Abb. 4.5.7: **a** N-Cadherin (rot) / β III-Tubulin (grün). **b** N-Cadherin (rot) / β -Catenin (grün) / OMP (blau)
 Unterschiedliche Reifestadien olfaktorischer Neurone bilden unterschiedlich häufig Adherenskontakte aus. Einige basal gelegene Zellen weisen eine hohe Dichte von Adherenskontakten (starke Immunreaktivität für β -Catenin, durch große Pfeilspitzen in **a** und **b** gekennzeichnet) auf. In unmittelbar darüber gelegenen Zellen, welche weder β III-Tubulin (rot) noch OMP (blau) immunreaktiv sind (durch kleine Pfeilspitzen in **a** und **b** gekennzeichnet), konnte weder N-Cadherin noch β -Catenin nachgewiesen werden. OMP (in **b** durch kleine Pfeile gekennzeichnet)- und β III-immunreaktive (in **a** und **b** durch große Pfeile markiert) Neurone bilden N-Cadherin-vermittelte Puncta adherentia mit nur moderater β -Catenin-Immunreaktivität (rötliche Fluoreszenz in **b**, durch kleine Pfeile gekennzeichnet). Maßstab: 5 μ m.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: Adherenskontakte olfaktorischer Neurone sind ausschließlich durch N-Cadherin vermittelt. Adherenskontakte der Stützzellen enthalten sowohl N-, als auch E-Cadherin. Adherenskontakte zwischen Stützzellen und Mikrovilluszellen sowie zwischen Stützzellen und Zellen der Drüsenausführungsgänge enthalten ausschließlich E-Cadherin.

Die Adherenskontakte der Zellen der Drüsenausführungsgänge sind ebenfalls E-Cadherin vermittelt. In allen Adherenskontakten des olfaktorischen Epithels können α -, β - und p120-Catenin nachgewiesen werden. Unmittelbar über der Basalmembran gelegene Zellen weisen eine hohe Anzahl von β -Catenin-haltigen Adherenskontakten auf. Zwischen Basalzellschicht (BCL) und Nervenzellschicht (OSNL) nimmt die Konzentration von β -Catenin assoziierten Kontakten ab, während in der Nervenzellschicht selbst die Anzahl β -Catenin-assoziiierter Kontakte wieder zunimmt.

4.6 Adherenskontakte in den Fila olfactoria.

In den Fila olfactoria waren zahlreiche Adherenskontakte zu erkennen. N-Cadherin-positive Kontakte waren sowohl zwischen Axonen als auch in Regionen lokalisiert, welche keine Immunreaktivität gegenüber einem neuronalen Marker zeigten und somit Adherenskontakte zwischen OEC-Fortsätzen und ihrer Umgebung darstellten (s. Abb. 4.6.1).

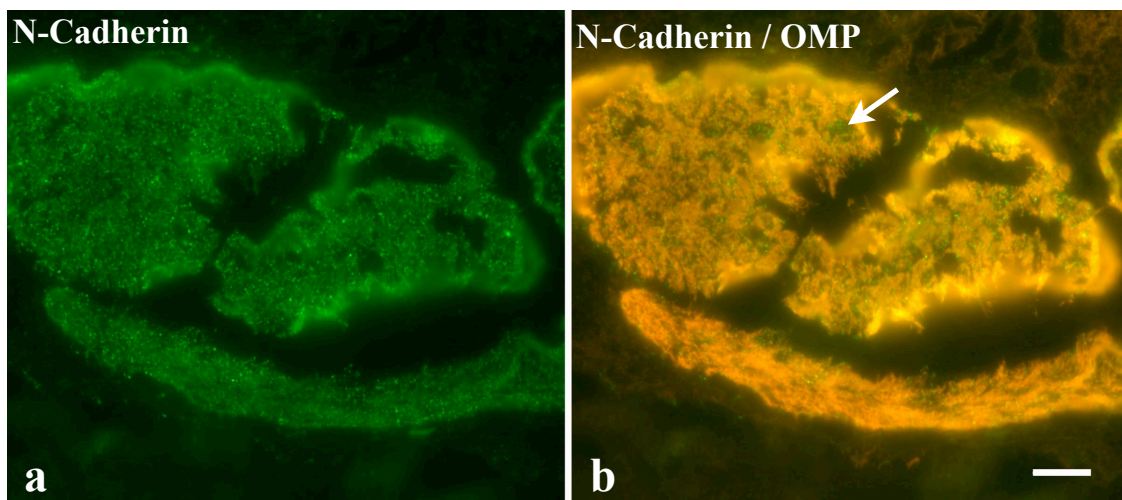


Abb. 4.6.1: In den Fila olfactoria zeigen sich zahlreiche N-Cadherin-Fluoreszenzmuster (grün), wobei das Fluoreszenzmuster diffus verteilt war. N-Cadherin-Fluoreszenz ist sowohl in axonalen Faserbündeln (rot) zu erkennen, als auch in Regionen der Fila nachzuweisen, in denen keine OMP-Fluoreszenz vorhanden ist (Pfeil in **b**). Dies ist möglicherweise durch N-Cadherin-vermittelte Adherenskontakte von OEC-Fortsätzen mit ihrer Umgebung zu erklären. Maßstab: 10 μ m.

Bei der Darstellung der olfaktorischen Axone mittels eines Antikörpers gegen β -Tubulin zeigte sich das Fluoreszenzmuster von N-Cadherin ebenfalls diffus in den Fila verteilt, sowohl zwischen axonalen Strukturen (s. Pfeilspitzen in Abb. 4.6.2) als auch in Regionen von vermuteten Gliazellfortsätzen (s. Pfeil in Abb. 4.6.2). N-Cadherin war auch in den Fila olfactoria stets mit β -Catenin kolokalisiert. Es handelt sich also um typische Adherenskontakte (s. Abb. 4.6.3).

Zusätzlich konnten in N-Cadherin/ β -Catenin-doppelmarkierten Präparaten Adherenskontakte in den Randbereichen der Fila olfactoria beobachtet werden, welche kein N-Cadherin aufwiesen (in Abb. 4.6.3 a und b durch Pfeile gekennzeichnet). Die Markierung der olfaktorischen Axone mittels eines Antikörpers gegen OMP zeigte, dass es sich bei diesen Kontakten nicht um neuronale Adherenskontakte handelte (s. Pfeil in Abb. 4.6.3 b). In den Körpern der olfaktorischen Drüsen konnte keine N-Cadherin-, jedoch β -Catenin-Fluoreszenz beobachtet werden (in Abb. 4.6.3 a und b durch Pfeilspitzen gekennzeichnet).

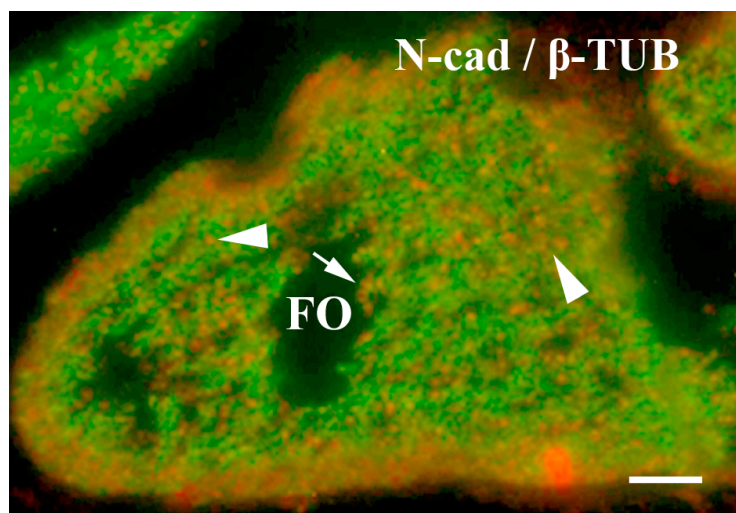


Abb. 4.6.2: Bei der Darstellung der olfaktorischen Axone mittels eines Antikörpers gegen β -Tubulin (grün) zeigt sich die Fluoreszenz von N-Cadherin (rot) diffus über die Fila verteilt. N-Cadherin-Fluoreszenz ist sowohl zwischen olfaktorischen Axonen (s. Pfeilspitzen) als auch in Bereichen der Fila zu erkennen, welche keine Reaktivität für β -Tubulin zeigten (s. Pfeil). FO = Fila olfactoria. Maßstab: 5 μ m.

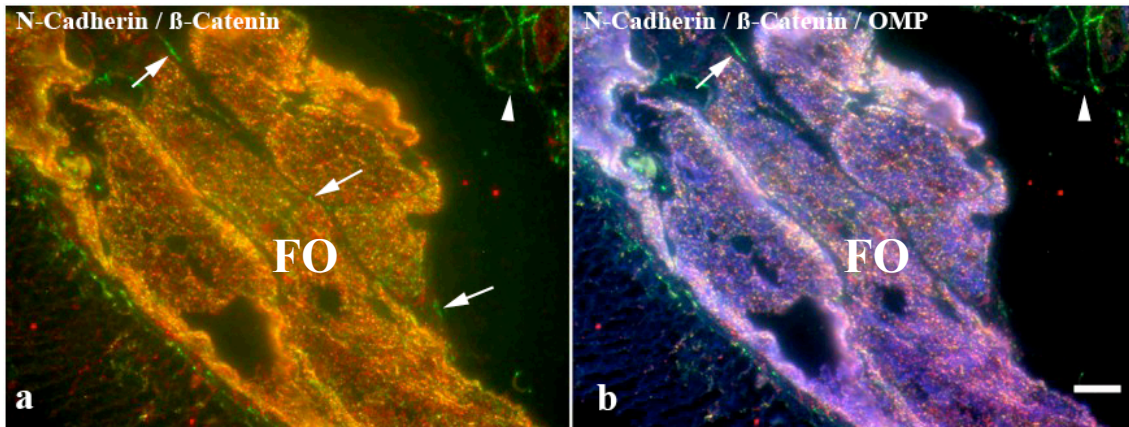


Abb. 4.6.3: **a** N-Cadherin (rot) und β -Catenin (grün) sind in den Fila olfactoria kolokalisiert (gelbe Fluoreszenz in **a**). In peripheren Filabereichen sind einige, lediglich β -Catenin-positive Fluoreszenzen zu erkennen (durch Pfeile in **a** und **b** gekennzeichnet). **b** Die olfaktorischen Axone sind mittels eines Antikörpers gegen OMP blau markiert. In olfaktorischen Drüsen der Lamina propria zeigt sich lediglich Fluoreszenz für β -Catenin (s. Pfeilspitzen in **a** und **b**). FO = Fila olfactoria. Maßstab: 10 μ m.

Weiterhin konnte in Randbereichen der Fila olfactoria E-Cadherin lokalisiert werden, was die in N-Cadherin/ β -Catenin doppelmarkierten Präparaten beschriebenen Profile von alleiniger β -Catenin-Aktivität in peripheren Bereichen der Fila olfactoria erklären könnte (s. Pfeile in Abb. 4.6.4). In elektronenmikroskopischen Immunogoldfärbungen konnte β -Catenin sowohl zwischen Axonbündeln (s. Pfeilspitzen in Abb. 4.6.5), als auch zwischen Axonen und OECs lokalisiert werden (s. Pfeil in Abb. 4.6.5).

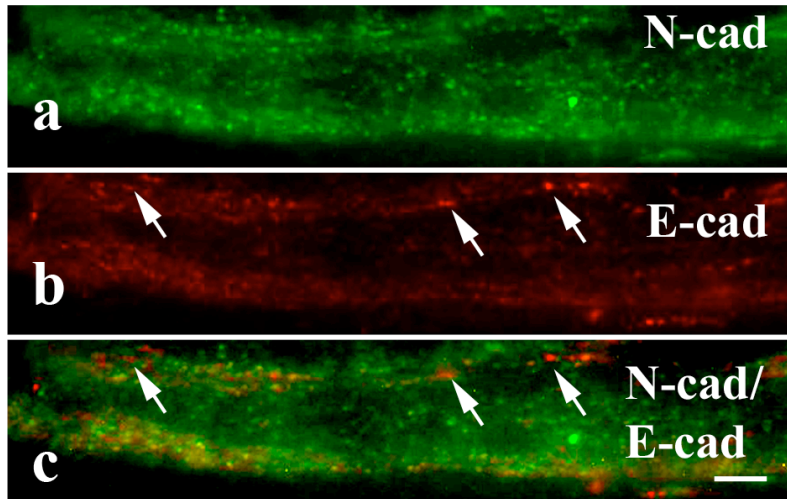


Abb. 4.6.4: **a** Fluoreszenz von N-Cadherin zeigt sich diffus über die Fila olfactoria verteilt. **b, c** In peripheren Bereichen der Fila olfactoria zeigt sich Immunreaktivität für E-Cadherin (rot; durch Pfeile in **b** und **c** markiert). Maßstab: 5µm.

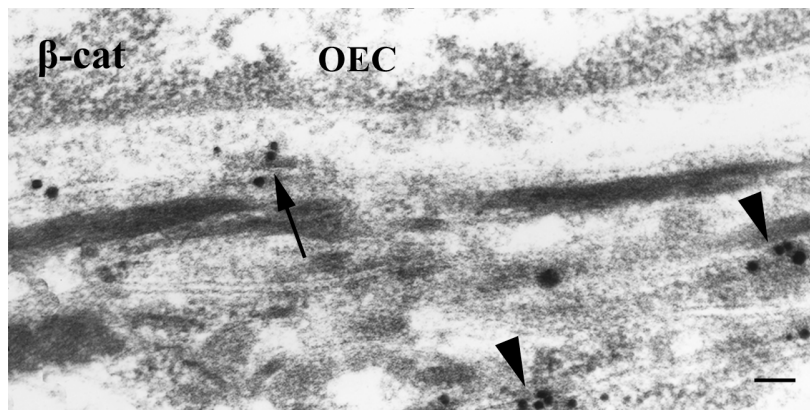


Abb. 4.6.5: Mittels Immunogoldfärbung kann β -Catenin sowohl zwischen olfaktorischen Axonen (durch Pfeilspitzen markiert) als auch zwischen olfaktorischen Axonen und Fortsätzen von olfaktorischen Gliazellen (OEC; durch Pfeil markiert) nachgewiesen werden. Maßstab: 0,1µm.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: N-Cadherin ist überwiegend in zentralen Bereichen der Fila olfactoria lokalisiert. Es vermittelt sowohl Kontakte olfaktorischer Axone als auch Kontakte von OECs. N-Cadherin zeigt auch in den Fila olfactoria stets Kolokalisation mit β -Catenin. In peripheren Bereichen der Fila olfactoria kann E-Cadherin nachgewiesen werden.

4.7 Zellkulturen von OECs.

Wie oben (3. Methoden) beschrieben wurden primäre Zellkulturen aus OECs und olfaktorischen Neuronen angelegt. Die OEC-Kulturen wurden sowohl einzeln als auch in Kokulturen mit den olfaktorischen Nervenzellen untersucht. Mittels verschiedener Antikörper (2. Material) wurden die Zellen in Kultur als OECs charakterisiert.

4.7.1 Charakterisierung mittels Immunfluoreszenz

Die olfaktorischen Gliazellen können anhand unterschiedlicher Marker identifiziert werden und zwar durch die Expression des neurotrophen Wachstumsfaktorrezeptors p75 und durch die Produktion von GFAP (Vincent et al., 2005). Weiterhin können OECs in Kultur durch das Ca²⁺-bindende Protein S100 β angefärbt werden (Vincent et al., 2005). Abbildung 4.7.1.1 zeigt die Aufnahme einer OEC-Kultur im Phasenkontrastmikroskop.

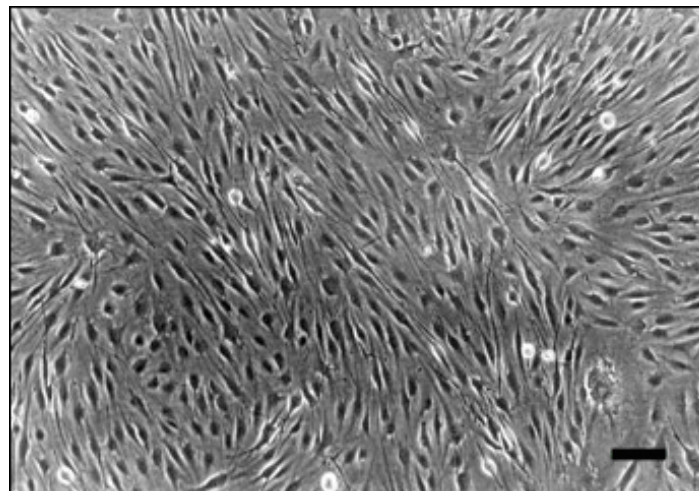


Abb. 4.7.1.1: Zellkultur von *olfactory ensheathing cells* im Phasenkontrastmikroskop. Maßstab: 30 μ m.

Zur genauen Identifikation der OECs wurden die drei Marker p75, GFAP und S100 β verwendet. Die Markerproteine p75 und S100 β waren in OECs kolokalisiert (s. Abb. 4.7.1.2). Abbildung 4.7.1.3 zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung der OECs mittels eines Antikörpers gegen GFAP. Quantitative Analysen der Immunfluoreszenz verschiedener Zellpassagen wiesen auf eine Zunahme der Zellhomogenität mit längerer Kulturdauer hin (s. Tab. 4.7.1.4).

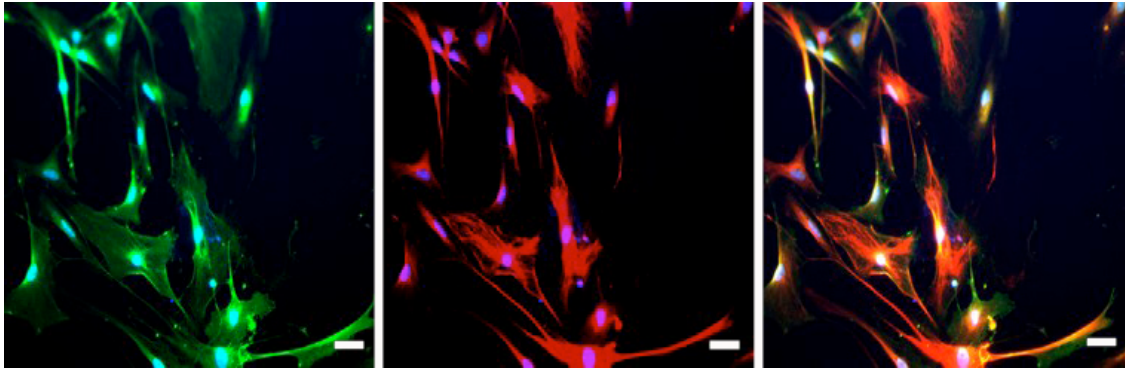


Abb. 4.7.1.2: Der Neurotrophin-Rezeptor p75 (grün) und das Ca^{2+} -bindende Protein S100 β (rot) waren in OECs kolokalisiert. Zusätzlich wurden zum Nachweis der Färbung von zellulären Strukturen die Zellkerne mittels DAPI (blau) angefärbt. Maßstab: 30 μm .

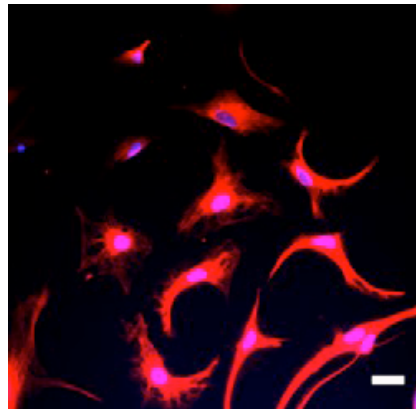


Abb. 4.7.1.3: Zahlreiche OECs sind GFAP-ir (rot). Zellkerne sind mittels DAPI blau angefärbt. Maßstab: 30 μm .

Marker	p0	p1	p2	p3	p4
p75	79.8 ± 3.8 <i>n</i> =13	91.8 ± 1.9 <i>n</i> =14	96.1 ± 1.1 <i>n</i> =11	98.4 ± 0.6 <i>n</i> =8	99.1 ± 0.6 <i>n</i> =7
S100β	62.3 ± 4.3 <i>n</i> =9	83.2 ± 3.1 <i>n</i> =10	87.6 ± 3.8 <i>n</i> =7	88.8 ± 5.4 <i>n</i> =5	92.2 ± 4.8 <i>n</i> =3
GFAP	65.0 ± 8.4 <i>n</i> =3	91.4 ± 4.4 <i>n</i> =3	94.0 ± 2.3 <i>n</i> =3	95.2 ± 4.0 <i>n</i> =3	98.7 ± 0.4 <i>n</i> =3

Tab. 4.7.1.4: Die quantitative Auswertung der OEC-Kulturen über die Kulturdauer mittels der verschiedenen Immunfluoreszenzmarker spricht für eine zunehmende Homogenität der Zellkulturen. Angegeben sind die mittlere Häufigkeiten ± Standardabweichung.

4.7.2 Zellkontaktproteine in OEC-Kulturen

Nachdem, wie oben beschrieben, in den Fila olfactoria Zell-Zellkontakte zwischen den Fortsätzen olfaktorischer Gliazellen beobachtet wurden, erfolgte die Untersuchung der Zellen in Kultur auf die Bildung ähnlicher Interzellularkontakte.

Immunfluoreszenzuntersuchungen von OECs verschiedener Passagen wiesen die Proteine N-Cadherin und β-Catenin nach. Beide Proteine konnten ab Passage 1 nachgewiesen werden, sobald die Zellen konfluent gewachsen waren (s. Abb. 4.7.3.1). Verschlusskontaktproteine, insbesondere Claudin 5, konnten in den Zellkulturen nicht nachgewiesen werden.

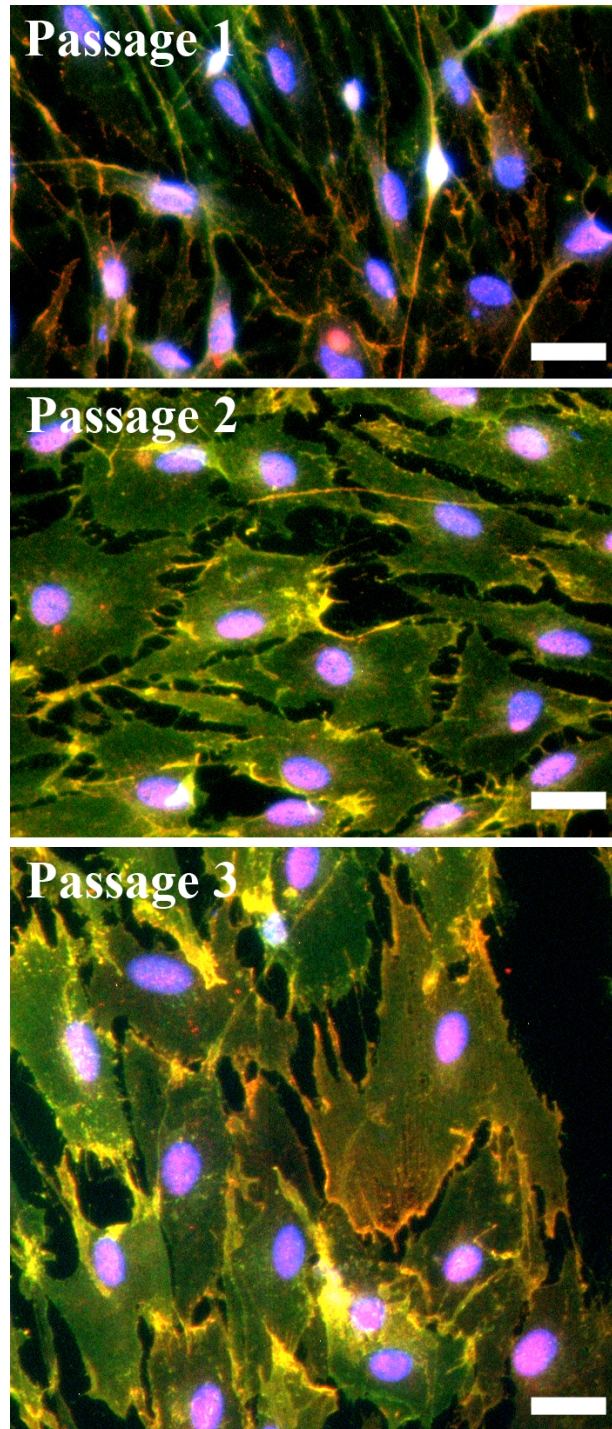


Abb. 4.7.3.1: Die Adherenskontaktproteine N-Cadherin (rot) und β -Catenin (grün) können in OECs ab der ersten Passage nachgewiesen werden. Mit längerer Kulturdauer der Zellen nahmen beide Proteine, insbesondere β -Catenin, an Konzentration zu. Zellkerne sind mittels DAPI blau angefärbt. Maßstab: 20 μ m.

4.7.3 Expression von CNTF in OEC-Kulturen

Zur Charakterisierung der Expression von neurotrophen Faktoren in Kultur wurde CNTF in den Zellkulturen immunzytochemisch nachgewiesen, wobei zur Prüfung der Spezifität zwei Methoden verwandt wurden; zum einen die Inkubation der Präparate ohne Primärantikörper, zum anderen durch Kolo­kalisierung der Färbung zwei verschiedener Anti-CNTF Seren (eines aus Kaninchen, eines aus Ziege). CNTF-produzierende OECs wurden mittels Kolo­kalisierung der Immunfluoreszenz für CNTF und p75 identifiziert (s. Abb. 4.7.2.1). Für Schwann Zellen konnte gezeigt werden, dass die Produktion von CNTF durch axonale Kontakte induziert wird (Lee et al., 1995).

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Produktion von CNTF durch die OECs und dem Kontakt zu olfaktorischen Nervenzellen zu untersuchen, wurden Kokulturen von OECs und olfaktorischen Neuronen angelegt. Hierbei zeigte sich eine besonders intensive Intensität der CNTF-Immunfluoreszenz in OECs, welche direkten Kontakt zu neuronalen Zellkörpern hatten (s. Abb. 4.7.2.3).

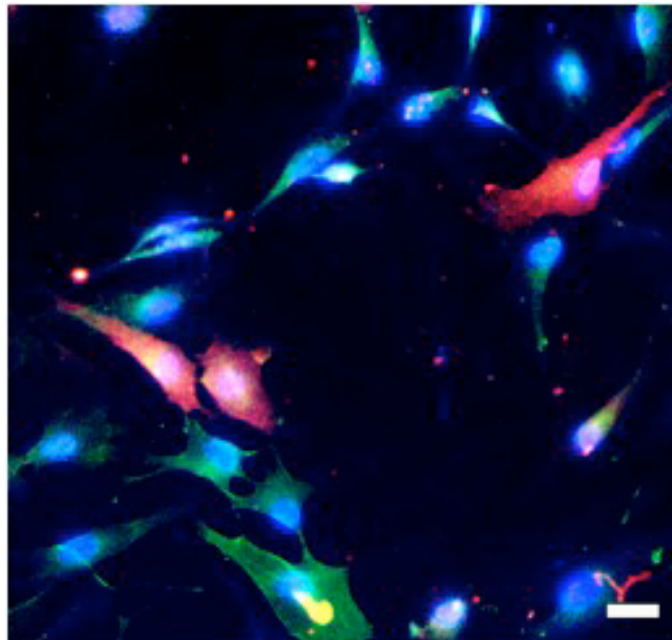


Abb. 4.7.2.1: CNTF-produzierende OECs wurden durch Kolo­kalisierung von CNTF (rot) und p75 (grün) identifiziert. Die Zellkerne sind mittels DAPI blau ange­färbt. Maßstab: 10µm.

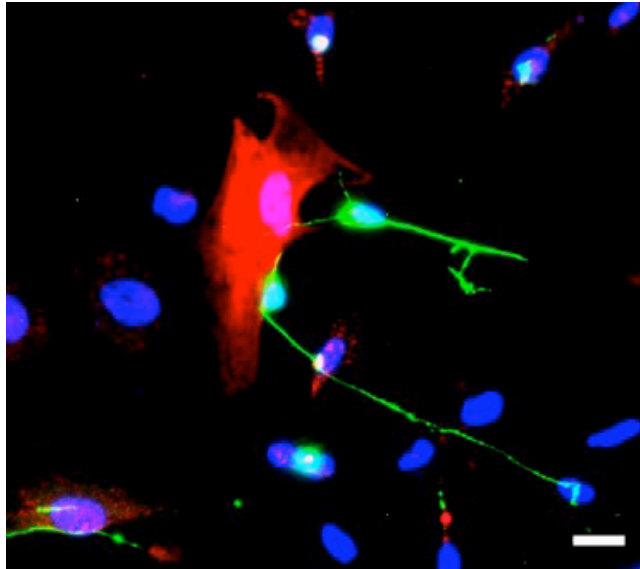


Abb. 4.7.2.3: OECs in direktem Kontakt zu olfaktorischen Neuronen (mittels Antikörpers gegen β III-Tubulin grün dargestellt) zeigen besonders intensive CNTF-Immunreaktivität (rot). Zellkerne sind mittels DAPI blau angefärbt. Maßstab: 30 μ m.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der molekulare Aufbau der Kontakte zwischen verschiedenen Zellen des peripheren olfaktorischen Systems untersucht mit dem Ziel Grundlagen für Aussagen zu möglichen Funktionen der Kontakte für die ungewöhnlichen Eigenschaften dieses Abschnitts des Nervensystems zu schaffen. Hierzu wurden in situ Präparate des peripheren olfaktorischen Systems der Ratte sowie Zellkulturen von OECs licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Die Zellkulturen von OECs wurden weiterhin auf die Produktion von CNTF untersucht.

5.1 Methodische Überlegungen

Zur Beurteilung zellulärer Antigene zeigte die Untersuchung von Semidünnschnitten gegenüber anderen lichtmikroskopischen Verfahren einige Vorteile. Durch die Verwendung von schockgefrorenem, gefriergetrocknetem und anschließend in Epon eingebettetem Material konnte die Antigenität und Lokalisation bestimmter Proteine besser erhalten werden, als mit anderen Methoden. Weiterhin bieten die 0,5 - 1,0 µm dünnen Schnitte eine noch bessere Auflösbarkeit von Fluoreszenzsignalen als virtuelle Schnitte vergleichbarer Dicke in der konfokalen Mikroskopie. Weiterhin können die mikroskopischen Präparate direkt mit den Augen beurteilt werden. Es bedarf somit nicht der Hilfe Computer unterstützter Auswertungssysteme.

Andererseits zeigen Antikörper, welche unter konventionellen Fixationsmethoden klare und spezifische Reaktion zeigten, an gefriergetrocknetem und in Epon-eingebettetem Material gelegentlich keine Reaktion für das betreffende Antigen. Deshalb war es von entscheidender Bedeutung zu überprüfen, ob etablierte Marker für die verschiedenen Zelltypen auch in dem verwendeten System spezifische Reaktivität zeigen. Hierzu wurden die Antikörper an Kryoschnitten getestet und die Reaktivität der Antikörper mit der an Eponschnitten verglichen, wobei keine grundsätzlichen Unterschiede gefunden wurden. OMP (*olfactory marker protein*), der klassische Marker für reife olfaktorische Neurone (Margolis 1980), brachte olfaktorische Neurone und deren Fortsätze sehr

effizient zur Darstellung. Ebenso zeigten die Marker für unreife olfaktorische Neurone GAP43 (*growth associated protein 43*) und β III-Tubulin (Roskams et al., 1998), spezifische Immunreaktivität. In mehrfach markierten Präparaten konnte beobachtet werden, dass starke β III-Tubulin-Reaktivität der spezifischere Marker für unreife olfaktorische Neurone war als GAP43, da GAP43-Immunreaktivität auch in einigen OMP-reaktiven Zellen beobachtet werden konnte. Intensive, perikaryelle β III-Immunfluoreszenz wurde hingegen lediglich in Neuronen beobachtet, welche keine OMP-Immunreaktivität zeigten. Die verwendeten Basalzellmarker zeigten keine Reaktion. Die durchgeführten morphologischen Untersuchungen liefern die Grundlage für eine eindeutige Identifizierung der zellulären Verteilung von Interzellularkontakten im peripheren olfaktorischen System.

5.2 Verschlusskontakte im olfaktorischen Epithel

Verschlusskontakte (Tight Junctions) sind im epithelialen Zellverband die am weitesten apikal gelegenen Zellkontakte. Der Kontakt zur Nachbarzelle wird über integrale Membranproteine (Occludin, Claudine, JAMs) vermittelt. Diese werden wiederum durch intrazelluläre Plaqueproteine (ZO-1, ZO-2; ZO-3, Cingulin) in den intrazellulären Actinfilamenten des Zytoskeletts verankert.

Im olfaktorischen Epithel konnten neben Occludin (Meier-Steigen, 2005) und ZO-1 (Miragall et al., 1994) die Claudine 1, -3, -4 und -5 in den Verschlusskontakten zwischen Stützzellen und olfaktorischen Neuronen, zwischen Stützzellen und Mikrovilluszellen, sowie in Tight junctions, welche die Stützzellen untereinander ausbilden, nachgewiesen werden. In Verschlusskontakten der Zellen der Gll. olfactoriae wurden die Claudine 1, -3 und -5, nicht jedoch Claudin 4 lokalisiert. Zusätzlich zu ZO-1 konnten ZO-2 und -3 in allen Verschlusskontakten des olfaktorischen Epithels nachgewiesen werden. Die Intensität der Fluoreszenz der Claudine und Occludin war in trizellulären Kontakten intensiver als in bizellulären Kontakten. Angesichts früherer Untersuchungen zur Ultrastruktur von Verschlusskontakten im olfaktorischen Epithel (Menco 1980) und aktueller Beobachtungen zur Tight junction Dynamik und

Verschchlusskontaktpermeabilität lassen die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Unterschiede der molekularen Komposition von Tight junctions im olfaktorischen Epithel interessante Schlussfolgerungen über die mögliche Relevanz von Verschchlusskontaktproteinen für die morphologischen und funktionellen Parameter von Tight junctions zu. Durch Menco wurden 1980 Unterschiede im Aufbau von Tight junctions im olfaktorischen Epithel der Ratte beschrieben, welche abhängig von der Zahl der beteiligten Zellen waren. So wiesen bizelluläre Stützzell/Dendrit-, Stützzell/Stützzell- und Verschchlusskontakte olfaktorischer Drüsen, welche vermutlich den Kontakten der Drüsenausführungsgangzellen entsprechen, eine ähnliche Zahl von „tight junction strands“ (Leisten) auf. Trizelluläre Stützzell/Dendrit-Kontakte, also Verschchlusskontakte, an deren Bildung drei Zellen beteiligt waren, zeigten eine größere Anzahl von „tight junction strands“ (Leisten).

Dies korreliert mit Beobachtungen an Immunfluoreszenzen in der vorliegenden Arbeit. So zeigten trizelluläre Stützzell/Dendrit-Verschchlusskontakte ein stärkeres Fluoreszenzsignal für alle integralen Verschchlusskontakproteine als die übrigen epithelialen Verschchlusskontakte. Dies legt nahe, dass das intensivere Fluoreszenzsignal für Claudine durch eine größere Anzahl von „tight junction strands“ verursacht wird und dass die Intensivität der Immunfluoreszenz als Maß für die Anzahl von „tight junction strands“ angesehen werden könnte. Weiterhin beobachtete Menco 1980, dass die Anzahl von „tight junction strands“ in glandulären Verschchlusskontakten nur geringfügig kleiner war als in Stützzell/Stützzell- und Stützzell/Dendrit-Verschlusskontakten. Das Fehlen oder Vorhandensein von Claudin 4, welches in den glandulären Tight junctions nicht nachgewiesen werden konnte, scheint somit keinen Einfluss auf die Anzahl von „tight junction strands“ in den epithelialen Verschchlusskontakten zu haben.

In Übereinstimmung mit Beobachtungen von Miragall aus dem Jahr 1994 zeigte sich in den Versuchen der vorliegenden Arbeit die Immunfluoreszenz von ZO-1 in Stützzell/Dendrit-Kontakten intensiver als in Stützzell/Stützzell-Kontakten. In Verschchlusskontakten der Drüsenausführungsgänge zeigte sich ein extrem schwaches Fluoreszenzsignal von ZO-1.

Dies legt nahe, dass das Vorhandensein von ZO-1 nicht mit der Anzahl von „tight junction strands“ korreliert. Menco beobachtete weiterhin morphologische Unterschiede in den Verschlusskontakten zwischen Stützzellen, Dendriten und Drüsenausführungsgängen. Aufbauend auf sehr frühen Untersuchungen zur Entwicklung und Reifung von Verschlusskontakten (Luciano et al., 1979; Suzuki und Nagano 1979) vermutete Menco, dass diese morphologischen Unterschiede der von unterschiedlichen Zellen ausgebildeten Verschlusskontakte auf den Entwicklungszustand der Tight junctions zurückzuführen sei. Unter normalen Umständen ist die Neubildung olfaktorischer Neurone und folglich die Anzahl der neu in die Epithelbarriere zu integrierenden olfaktorischen Dendriten um ein Vielfaches höher, als die Neubildung und die epitheliale Integration von Stützzellen oder Zellen der Drüsenausführungsgänge (Graziadei et al., 1979; Calof et al., 1998; Schwob et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Dendriten intensiv β III-Tubulin-immunreaktiver, also unreifer olfaktorischer Neurone, an der Bildung von Verschlusskontakten beteiligen. Dies legt nahe, dass die neu gebildeten olfaktorischen Neuronen konstant in die Epithelbarriere integriert werden. Aktuelle Studien haben untersucht, dass für dynamische Prozesse der Junctionsbildung und -veränderung ZO-1 eine entscheidende Rolle spielt (Fanning et al., 2007). Die Reduktion der ZO-1-Expression mittels homologer Rekombination (Umeda et al., 2004) oder durch siRNA (small inhibitory RNA) (McNeil et al., 2006) führt zu einer signifikanten Verlangsamung der Bildung von Tight junctions. Die intensive Reaktivität für ZO-1 in Stützzell/Dendrit-Kontakten könnte somit ein Hinweis auf hohe dynamische Prozesse in den entsprechenden Verschlusskontakten sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass sich Neurone an der Bildung Claudin-vermittelter Verschlusskontakte beteiligen und somit auch zur Produktion bestimmter Claudine fähig sind. Welche Claudine sie produzieren können ist allerdings noch unklar, da zwischen Claudinen auch heterophile Bindungen möglich sind (Furuse et al., 2001). Während die endgültige Funktion von Occludin in Verschlusskontakten noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, konnte für die Claudine gezeigt werden, dass sie Dichtigkeit und die ionenselektive Permeabilität der

Tight junction regulieren (Schneeberger und Lynch 2004; Gonzales-Mariscal et al., 2003; Hartstock und Nelson 2008). Das Vorkommen von Claudin 1 in Verschlusskontakten des olfaktorischen Epithels ist nicht weiter überraschend, da dieses häufig in epithelialen Tight junctions nachgewiesen werden kann und zur Dichtigkeit der epithelialen Verschlusskontakte entscheidend beiträgt, genauso wie Claudin 3 (Turksen und Troy 2004). Das Vorkommen von Claudin 4 in den apikalen Verschlusskontakten des olfaktorischen Epithels könnte von Bedeutung für die regelrechte Depolarisation der olfaktorischen Neurone sein. Die Zusammensetzung des Riechschleimes wird durch die Permeabilität der Verschlusskontakte gegenüber Ionen entscheidend beeinflusst. Insbesondere die Na^+ -Ionen-Konzentration im Riechschleim ist für die Depolarisation der Neurone wichtig, da ein initialer Einstrom von Na^+ -Ionen durch spannungsgesteuerte Na^+ -Kanäle die Depolarisation des olfaktorischen Neurons auslöst (Reuter et al., 1998; Reisert et al., 2005; Nickell et al., 2006/2007). Von Claudin 4 ist bekannt, dass es die Dichtigkeit von Verschlusskontakten gegenüber Na^+ -Ionen erhöht, ohne die die Permeabilität von Cl^- zu beeinflussen (Van Itallie et al., 2001; Schneeberger und Lynch 2004; Gonzales-Mariscal et al., 2003). Die apikalen Zonulae occludentes besitzen also eine geringere parazelluläre Permeabilität gegenüber Na^+ -Ionen als die Verschlusskontakte zwischen den Zellen der Drüsenausführungsgänge der Gll. olfactoriae, in denen kein Claudin 4 nachgewiesen werden konnte. Dies spricht dafür, dass die ionale Zusammensetzung des Riechschleimes im apikalen Epithelbereich durch parazelluläre Ionenströme weniger beeinflusst wird als in den Gll. olfactoriae, in denen die Zusammensetzung des Riechschleimes durch eine parazelluläre Na^+ -Permeabilität mitbestimmt wird. Für die Dichtigkeit aller epithelialen Verschlusskontakte spricht auch das Fehlen von Claudin 2, welches die Bildung von Kationen-selektiven Poren in Verschlusskontakten induziert (Amasheh et al., 2002). Sowohl in den apikalen als auch in den ductalen Verschlusskontakten konnte Claudin 5 nachgewiesen werden. Dieses Claudin wurde bisher vorwiegend in endothelialen Verschlusskontakten, insbesondere in Kontakten der Blut-Hirn-Schranke, nachgewiesen.

In Versuchen mit Knock-out Mäusen für Claudin 5 konnte gezeigt werden, dass diese Tiere eine durchlässigere Blut-Hirn-Schranke gegenüber Molekülen <800 D besaßen (Nitta et al., 2003). Es ist daher von einer hohen Dichtigkeit aller epithelialen Tight junctions gegenüber kleinen Molekülen auszugehen.

5.3 Verschlusskontakte in den Fila olfactoria

Die olfaktorischen Neurone projizieren nach zentral in den Bulbus olfactorius. In der Lamina propria des olfaktorischen Epithels bilden die Axone Faserbündel, die Fila olfactoria. Olfaktorische Fibroblasten bilden eine Art Perineuralscheide um die Fila olfactoria. Die olfaktorischen Axone werden von spezialisierten olfaktorischen Gliazellen (*olfactory ensheathing cells*) umhüllt, wobei eine Gliazelle jeweils mehrere Axone umhüllt. Einzelne Axone sind nicht durch Zytoplasmafortsätze der Gliazellen voneinander getrennt und können daher untereinander Kontakte ausbilden. Frühere Versuche mit Gefrierbruchtechnik und Immunzytochemischen Verfahren deuteten auf das Vorkommen von Verschlusskontakten zwischen OECs hin (Mack und Wollburg 1986; Miragall et al., 1994). Von den Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems ist bekannt, dass sie Tight junctions mit aussprossenden Axonen ausbilden (Dezewa und Adachi-Usami, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte intensive Immunreaktivität von Claudin 5 und moderate, kolokalisierte Immunreaktivität von ZO-1 und ZO-2 in den Fila olfactoria, in räumlicher Assoziation mit OECs, nachgewiesen werden. Weiterhin wurde moderate Immunreaktivität von Occludin in den Fila lokalisiert. Das lichtmikroskopisch nachgewiesene Claudin 5 konnte elektronenmikroskopisch in Tight junctions der OECs lokalisiert werden. Tight junctions zwischen OECs und Axonen sowie zwischen Axonen waren nicht zu beobachten. Abhängig vom verwendeten Antikörper konnte in diesen Verschlusskontakten ZO-1 nachgewiesen werden. Während der monoclonale ZO-1 Antikörper aus der Ratten keine Reaktivität in den Fila olfactoria zeigte, zeigte der polyclonale Antikörper aus dem Kaninchen hier spezifische Reaktivität. Allerdings zeigte der monoclonale Antikörper spezifische und intensive Reaktivität in den apikalen epithelialen Verschlusskontakten und moderate

Immunreaktivität in den endothelialen Tight junctions. Dies könnte folgende Ursache haben: die mRNA von ZO-1 besitzt bei Nagern und bei Menschen verschiedene splicing Domänen (Underwood et al., 1999; Gonzales-Mariscal et al., 1999/2003). Durch alternatives Splicing entstehen somit zwei verschiedene Isoformen von ZO-1: ZO-1 α^+ und ZO-1 α^- , wobei letzterer durch alternatives Splicing ein 80 Aminosäuren langes α -Motiv verlorengelassen (Willott et al., 1992). Beide Isoformen kommen in endo- und epithelialen Geweben vor. Allerdings ist in epithelialen Tight junctions ZO-1 α^- stärker vertreten, während in endothelialen Verschlusskontakten mehr ZO-1 α^+ vorkommt (Willott et al., 1992; Balda und Anderson 1993; Underwood et al., 1999; Gonzales-Mariscal et al., 2003). Das unterschiedliche Detektionsverhalten der verschiedenen ZO-1 Antikörper könnte man somit durch eine unterschiedliche Affinität der Antikörper zu den verschiedenen ZO-1 Isoformen erklären. Im äußeren Randsaum der Fila olfactoria wurde Claudin 1 zusammen mit ZO-1 und ZO-2 nachgewiesen. Bei diesen Claudin 1 positiven Kontakten handelt es sich wahrscheinlich um Tight junctions der olfaktorischen Fibroblasten, welche die axonalen Faserbündel der Fila olfactoria bis zum Eintritt in das Stratum fibrosum des Bulbus olfactorius umschließen (Field et al., 2003; Herrera et al., 2005). In den tieferen Schichten des Stratum fibrosum sind diese Kontakte nicht mehr nachzuweisen (Steinke et al., 2008). Die olfaktorischen Fibroblasten, welche morphologisch und funktionell den perineuralen Fibroblasten im peripheren Nervensystem ähneln (Herrera et al., 2005), bilden die äußerste Schicht der Fila olfactoria und üben einen positiven Einfluss auf die das Axonwachstum fördernden Eigenschaften der OECs aus (Raisman, 2001). Von perineuralen Fibroblasten ist bekannt, dass sie Verschlusskontakte bilden, welche Claudin 1 und ZO-1 enthalten (Pummi et al., 2004). Die Fila olfactoria könnten somit in ihrem Aufbau peripheren Nerven durchaus ähnlich sein.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass OECs Tight junctions bilden, in welchen ZO-1, -2, sowie Claudin 5 und Occludin lokalisiert sind. Neben Claudin 5 konnten keine weiteren Claudine in diesen ungewöhnlichen Verschlusskontakten nachgewiesen werden. Die Befunde wurden durch Arbeiten von Wolburg et al. (2008) bestätigt.

Zukünftige Experimente werden die genaue molekulare Komposition dieser Kontakte untersuchen müssen. Die Funktion dieser Tight junctions ist noch nicht befriedigend geklärt. Von Gliazellen gebildete Verschlusskontakte wurden bereits beschrieben: Myelinisierende Schwann-Zellen bilden in den Schmidt-Lantermann-Inzisuren autologe Verschlusskontakte, in welchen u.a. auch Claudin 5 nachgewiesen werden konnte (Poliak et al., 2002). Nicht myelinisierende Schwann-Zellen bilden in Mesaxonen Verschlusskontakte, welche das abaxonale vom adaxonalen Interstitium trennen (Sugimoto et al., 2002). Die Bildung einer Barriere könnte zu einer für das Axonwachstum notwendigen Isolation der olfaktorischen Axone vor äußeren Einflüssen in der Lamina propria des Epithels beitragen (Wolburg et al., 2008). Ausserdem konnte elektronenmikroskopisch gezeigt werden, dass sich von OECs gebildete Tight junctions in direkter Umgebung von Gap junctions befinden (Wolburg et al., 2008), wodurch die Gap junction stabilisiert werden könnte (Poliak et al., 2002). Weiterhin könnten die zwischen OEC-Fortsätzen ausgebildeten Verschlusskontakte zu einer Kompartimentierung der Fila olfactoria beitragen. Andererseits ist die Separation der axonalen Bündel durch OEC-Fortsätze nicht komplett (Field et al., 2003). Die Bildung Claudin 5 vermittelter Kontakte ist jedoch eine gemeinsame Eigenschaft von OECs und myelinisierenden Schwann-Zellen. Zur Bildung einer Myelinscheide ist die Produktion von Verschlusskontaktproteinen Voraussetzung. Die eventuelle Fähigkeit der OECs zur Myelinbildung ist im Hinblick auf Transplantationsversuche von Interesse.

Normalerweise bilden OECs in Kontakt mit olfaktorischen Axonen keine Myelinscheide, weder in vivo noch in vitro (Doucette et al., 1992, Ramon-Cuete et al., 1993). Dies hängt wahrscheinlich mit dem kleinen Durchmesser olfaktorischer Neurone zusammen und ist wahrscheinlich nicht durch die mangelnde Fähigkeit zur Myelinbildung seitens der OECs bedingt (Barnett et al., 1993, Devon et al., 1992, Doucette et al., 1994). Die Bildung von Myelin durch Schwann-Zellen ist ebenfalls abhängig vom Durchmesser des umhüllten Axons; so bilden Schwann-Zellen in Kontakt mit Axonen von kleinem Durchmesser, wie z.B. vegetativen Axonen, keine Myelinscheide; Axone mit großem Durchmesser, wie z.B. motorische Axone, werden von einer Myelinscheide umgeben (Voyvodic et al., 1989).

Obwohl in myelinisierenden Schwann-Zellen auch Claudin 1 (Poliak et al., 2002) und Claudin 19 (Miyamoto et al., 2005), welche bisher nicht in OEC-Kontakten nachgewiesen werden konnten, könnte die Fähigkeit der OECs zur Bildung von Claudin 5 (Wolburg et al., 2008) von Relevanz für die kontrovers diskutierte Myelinisierungsfähigkeit der olfaktorischen Gliazellen sein. Weiterhin wurden in OECs Proteine nachgewiesen, die in Zusammenhang mit der möglichen Produktion von Myelin stehen, so z.B. das *myelin basic protein (MBP)* (Ramon-Cueto et al., 1992). Es bleibt allerdings weiterhin unklar, ob olfaktorische Hüllzellen wirklich zur Myelinbildung befähigt sind. Allerdings zeigten sie in Transplantationsversuchen in mehreren Studien einen positiven Effekt auf die axonale Regeneration und die Remyelinisierung (Boyd et al., 2005; Ibrahim et al., 2006).

5.4 Adherenskontakte im olfaktorischen Epithel

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zelltyp-spezifische Bildung von Adherensjunctionen im olfaktorischen Epithel dokumentiert. Stützzellen unterscheiden sich von anderen Zellen des olfaktorischen Epithels durch die Ausbildung sowohl von N-Cadherin-, als auch von E-Cadherin-vermittelten Adherenskontakten., während die olfaktorischen Neurone lediglich N-Cadherin- und die anderen epithelialen Zellen (Zellen der olfaktorischen Drüsen, der Drüsenausführungsgänge und Mikrovilluszellen und einige Zellen im basalen Epithelkompartiment) ausschließlich E-Cadherin-vermittelte Kontakte bildeten. Die Beobachtung, dass in der Nervenzellschicht des sich ausdifferenzierenden olfaktorischen Epithels von Mäusen Immunreaktivität für E-Cadherin beobachtet wurde (Akins et al., 2007) ist nach den hier erhobenen Befunden eher auf das Vorkommen von E-Cadherin in Adherenskontakten zwischen Stützzellen und Mikrovilluszellen zurückzuführen (Steinke et al., 2008). Mittels verschiedener Antikörper konnten die olfaktorischen Dendriten dargestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass sie von Stützzellen umhüllt werden und mit den Stützzellen N-Cadherin vermittelte Zonulae adherentes ausbilden.

Autologe Zonulae adherentes der Stützzellen waren sowohl N-, als auch E-Cadherin vermittelt, während die Zonulae adherentes zwischen Stützzellen und epithelialen Nachbarzellen lediglich E-Cadherin vermittelt waren. Basolateral bilden olfaktorische Neurone N-Cadherin vermittelte *Puncta adherentia* aus, während Stützzellen sowohl N- als auch E-Cadherin vermittelte *Puncta adherentia* ausbilden. Da zwischen N- und E-Cadherin keine heterophilen Bindungen möglich sind (Takeichi et al., 1995; Gumbiner et al., 1996; Yap et al., 1997; Marrs und Nelson 1996) kann aus den immunzytochemischen Nachweisen der einzelnen Cadherine gefolgert werden: olfaktorische Neurone sind lediglich zur Bildung von N-Cadherin, Stützzellen zur Bildung von N-, als auch E-Cadherin in der Lage.

Hinsichtlich der intrazellulären Adapterproteine der Adherenskontakte unterschieden sich die Kontakte zwischen den verschiedenen Zellpopulationen nicht. Kolokalisationsexperimente zeigten, dass alle epithelialen Adherensjunktionsstellen die drei untersuchten Catenine enthielten. Mittels verschiedener Antikörper konnten unterschiedliche Reifestadien olfaktorischer Neurone dargestellt werden. Reife olfaktorische Neurone konnten anhand eines Antikörpers gegen OMP (*olfactory marker protein*) identifiziert werden. Junge, unreife olfaktorische Neurone wiesen eine perikaryelle Lokalisation von β III-Tubulin auf. Unterschiedliche Reifestadien olfaktorischer Neurone bildeten verschieden häufig Adherenskontakte aus. Die Intensität der Fluoreszenz der Catenine war in den neuronalen *Puncta adherentia* schwächer ausgeprägt als in den epithelialen *Puncta adherentia*. Da Catenine nicht nur als Verankerung der Cadherine in den zytoskelettalen Actinfilamenten dienen, sondern auch eine Rolle bei der Organisation und dynamischen Prozessen des Zytoskeletts spielen (Baumgartner und Drenckhahn 2002; Baumgartner et al., 2003; Hartsock und Nelson 2008), könnte die verhältnismäßig schwächere Reaktivität der Catenine in den neuronalen *Puncta adherentia* ein Hinweis darauf sein, dass diese Adherensjunktionsstellen instabiler oder dynamischer sind, als die epithelialen *Puncta adherentia*. Von β -Catenin ist bekannt, dass es als Bestandteil der Wnt-Signalkaskade eine entscheidende Rolle bei der Ausdifferenzierung hippocampaler Neurone spielt (Li et al., 2005).

In ausdifferenzierenden Nervenzellen des Hippocampus neonataler Mäuse konnte β -Catenin in Zellkörpern und in Dendriten nachgewiesen werden. In gezielten knock-out Experimenten konnten dendritische Fehlbildungen beobachtet werden (Gao et al., 2007). In den sich ausdifferenzierenden hippocampalen Neuronen der neonatalen Mäuse wurde β -Catenin weiterhin in Kolokalisation mit Cadherinen beobachtet; eine Lokalisation von β -Catenin im Zellkern dieser Neurone konnte nicht beobachtet werden (Gao et al., 2007). Diese Beobachtung legt nahe, dass die Rolle von β -Catenin in der dendritischen Morphogenese eher durch die Regulation dynamischer Prozesse der Actinfilamente bedingt ist als durch die Funktion von β -Catenin als Signaltransduktor in der Wnt-Signalkaskade (Hartsock und Nelson 2008; Gao et al., 2007). Folglich könnte die Ausbildung und Lösung N-Cadherin- und β -Catenin-vermittelter Adherenskontakte für die Dendritogenese und möglicherweise auch für die Axogenese der olfaktorischen Neurone sowie für die epitheliale Integration der olfaktorischen Neurone von Bedeutung sein. Es ist schon lange bekannt, dass nach exzessivem neuronalen Untergang im olfaktorischen Epithel, z.B. durch chemische oder chirurgische Manipulation, die Neubildung olfaktorischer Neurone stark hochreguliert wird, bis der ursprünglich Zustand wieder erreicht ist (Schwob 2002; Kawauchi et al., 2003). Daraus wurde gefolgert, dass entweder aus den zu Grunde gehenden Neuronen Faktoren freigesetzt werden, welche die Neurogenese stimulieren, oder dass die sterbenden Zellen die Abgabe von Neurogeneseinhibitoren stoppen. Von einigen Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF- α (*transforming growth factor α*), TGF- β (*transforming growth factor β*), FGF2 (*fibroblast growth factor*), BMPs (*bone morphogenetic proteins*), GDF11 (*growth differentiation factor 11*) und Follistatin ist bekannt, dass sie neurogenetische Wirkung haben (Schwob 2002,; Kawauchi et al., 2003; Nicolay et al., 2006). Es ist noch nicht geklärt, was den eigentlichen Auslöser für die Hochregulierung der Produktion neurogenetischer Faktoren im olfaktorischen System darstellt. Auch hier könnten die neuronalen Adherenskontakte eine Rolle spielen: durch das Zugrundegehen von olfaktorischen Neuronen kommt es auch zum Lösen der Adherenskontakte der Neurone.

Dies könnte zu einer Aktivierung von intrazellulären, β -Catenin-vermittelten Signalkaskaden in den sterbenden Neuronen oder den umgebenden Zellen führen, was die Produktion oder Sekretion von neurogenetischen Faktoren bewirkt bzw. neurogenetische Prozesse initiiert oder unterstützt oder inhibitorische Mediatoren ausser Kraft setzt.

Im basalen Kompartiment des olfaktorischen Epithels konnten einige Zellen beobachtet werden, welche E-Cadherin vermittelte Kontakte ausbildeten. Morphologisch ähnelten diese Zellen horizontalen Basalzellen (HBCs), allerdings könnte es sich auch um Zellen der olfaktorischen Drüsen handeln, welche in die basalen Epithelschichten hineinragen. Zellen mit rundlicher Morphologie, welche direkt über der Basalmembran lokalisiert waren, wiesen β -Catenin-immunreaktive Puncta adherentia auf, in denen N-Cadherin nicht lokalisiert werden konnte. Es gilt als allgemein anerkannt, dass eine sich langsam teilende, unmittelbar über der Basalmembran gelegene Stammzellpopulation den Ausgangspunkt für neuronale und nicht-neuronale Vorläuferzellen darstellt. Es ist allerdings noch nicht endgültig geklärt, ob die Stammzellpopulation unter den horizontalen Basalzellen (HBCs) oder den runden Basalzellen (GBCs) zu finden ist (Mackay-Sim und Kittel 1991; Schwob 2002; Chen et al., 2004; Carter et al., 2004; Beites et al., 2005). Diese Stammzellpopulation wird als nicht migratorisch angesehen (Mackay-Sim und Kittel 1991). Somit erscheint es als möglich, dass diese Stammzellen in der Zeit zwischen ihren Teilungsphasen durch Adhärensjunctionen in den Zellverband des Epithels integriert sind. Die runden Basalzellen (GBCs), zu welchen Stammzellen und unmittelbare neuronale Vorläuferzellen gerechnet werden (Kawauchi et al., 2003), bilden nach den Befunden der vorliegenden Arbeit besonders wenige Adhärenskontakte aus. Diese Tatsache könnte man dadurch erklären, dass diese Zellen eine vergleichsweise hohe proliferative Aktivität besitzen und folglich wenige Interaktionen mit ihren Nachbarzellen ausbilden (Beites et al., 2005).

5.5 Adherenskontakte in den Fila olfactoria

Mittels verschiedener Antikörper konnten die glialen Strukturen der Fila olfactoria von den axonalen Fortsätzen der olfaktorischen Neurone unterschieden werden. In diversen Studien konnte das Vorkommen verschiedener Cadherine und Catenine im peripheren olfaktorischen System von neonatalen Mäusen gezeigt werden (Akins und Greer 2006; Akins et al., 2007). Durch die in diesen Arbeiten angewendeten Methoden konnte keine präzise zelluläre Lokalisation der Adherenskontaktproteine erreicht werden.

Die immunzytochemischen und morphologischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass innerhalb der Fila olfactoria zahlreiche Adherenskontakte gebildet werden, welche N-Cadherin und diverse Catenine enthalten. Diese Kontakte waren zwischen Fortsätzen von OECs, zwischen OEC-Fortsätzen und olfaktorischen Axonen, sowie zwischen olfaktorischen Axonen lokalisiert. In der Peripherie der Fila olfactoria wurden weiterhin E-Cadherin-immunreaktive *Puncta adherentia* gefunden. Allerdings ist es noch nicht befriedigend geklärt, ob es sich dabei um Kontakte der olfaktorischen Fibroblasten oder um Adherensjunctionen von Fortsätzen von OECs handelt. Die Ausbildung von E-Cadherin vermittelten Adherenskontakten durch olfaktorische Gliazellen würde eine weitere Ähnlichkeit mit myelinisierenden Schwann-Zellen darstellen, da durch diese E-Cadherin-vermittelte Adherensjunctionen gebildet werden (Menichella et al., 2001).

Die genaue Rolle von Adherensjunctionen im sehr neuroplastischen olfaktorischen System bleibt noch unklar. Im Nervensystem von Vertebraten konnten bisher etwa 80 verschiedene neuronale Cadherine identifiziert werden, wobei N-Cadherin das am meisten untersuchte neuronale Cadherin darstellt (Ranscht et al., 2000). Es ist an einer ganzen Reihe neurogenetischer Vorgänge beteiligt, so z.B. an der Neurulation (Kintner et al., 1992), an der Regionalisierung des Neuroektoderm (Matsunami et al., 1995; Redies et al., 1996), an neuronalen Migrationsvorgängen (Nakagawa et al., 1998), an Axonwachstumsvorgängen und der Faszikulation nervaler Strukturen (Matsunaga et al., 1988; Bixby et al., 1990; Drazba et al., 1990; Doherty et al., 1991).

Des Weiteren ist N-Cadherin beteiligt an Vorgängen der Synaptogenese (Ranscht et al., 2000; Baumgartner et al., 2003). In Rattenembryonen konnte die Expression von N-Cadherin in Schwann-Zell Vorläufern während Axonwachstumsprozessen beobachtet werden (Wanner et al., 2006). In Kulturen von Schwann-Zellen, in denen die Funktion von N-Cadherin unterdrückt wurde zeigten sich schlechtere Bedingungen für axonales Wachstum. Bei Reaktivierung der Funktion von N-Cadherin nahm das Axonwachstum in diesen Kulturen wieder zu (Letourneau et al., 1991). Auch für olfaktorische Gliazellen konnte eine axonwachstumsfördernde Wirkung gezeigt nachgewiesen werden (Kafitz und Greer 1999; Chung et al., 2004; Pastrana et al., 2007). Diese Eigenschaft der OECs ist vermutlich sowohl durch direkten zellulären Kontakt als auch durch die Sekretion axogenetischer Wachstumsfaktoren bedingt (Chung et al., 2004). In Zellkulturen von OECs wurde untersucht, ob die axogenetischen Eigenschaften dieser Gliazellen durch die Produktion von N-Cadherin unterstützt werden, allerdings erbrachten diese Versuche keine eindeutigen Ergebnisse (Chuah et al., 1991; Chuah und Au 1994). Der Nachweis von Adhärenskontaktproteinen in Kulturen von olfaktorischen Gliazellen erwies sich als schwierig und die Vergleichbarkeit der hierzu veröffentlichten Studien ist durch unterschiedliche Kultivierungsverfahren der Zellen eingeschränkt. Die immunzytochemischen Versuche der vorliegenden Arbeit zeigen, dass N-Cadherin-immunreaktive Puncta adherentia über die gesamten Fila olfactoria verteilt lokalisiert sind. Elektronenmikroskopisch konnten zahlreiche Adhärensjunktionen zwischen OECs und olfaktorischen Axonen beobachtet werden, was eine Vermittlung der lebenslang im olfaktorischen Epithel stattfindenden axogenetischen Prozesse durch Adhärenskontakte, möglicherweise N-Cadherin-vermittelt, nahelegt. Weiterhin konnten elektronenmikroskopisch interaxonale Adhärenskontakte beobachtet werden (Steinke et al., 2008). Einige Untersuchungen belegen, dass Cadherin-vermittelte Adhärenskontakte eine Rolle bei der Ausbildung axonaler Bahnen, sowie bei der axonalen Zielfindung spielen (Treubert-Zimmermann et al., 2002; Hirano et al., 2003). Die genauen Mechanismen der neuronalen Zielfindung im peripheren olfaktorischen System sind weiterhin nicht geklärt, insbesondere, welche Rolle die olfaktorischen Gliazellen bei der axonalen Zielfindung spielen.

Der Projektionsort der olfaktorischen Axone im Bulbus olfactorius ist von dem auf den Zilien des entsprechenden olfaktorischen Neurons exprimierten Geruchsrezeptor abhängig (Alenius und Bohm 1997; Yoshihara et al., 1997; Feinstein und Mombaerts 2004; Feinstein et al., 2004). In Zukunft muss geklärt werden, ob axonspezifische Adhärenskontakte bei diesen Prozessen eine Rolle spielen.

5.6 Zellkontaktproteine in OEC-Kulturen

Primärkulturen olfaktorischer Gliazellen wurden immunzytochemisch auf die Produktion der Zellkontaktproteine N-Cadherin, β -Catenin und Claudin 5 untersucht. Der Nachweis für eine Produktion von Claudin 5 konnte nicht erbracht werden, weder in den Einzel- noch in den Kokulturen. Allerdings wurden die Gliazellen nur über Nacht mit olfaktorischen Neuronen kokultiviert, was für eine Ausbildung Claudin 5 vermittelter Kontakte zu kurz sein könnte.

N-Cadherin und β -Catenin konnten in den Zellkulturen nachgewiesen werden, wobei mit längerer Kulturdauer beide Proteine zunahmen.

5.7 Expression von CNTF in OEC-Kulturen

CNTF ist ein saures Protein aus der Familie der Zytokine, welches neurotrophe und neuroprotektive Eigenschaften besitzt (Sendtner et al., 1990/1992). Es vermittelt seine Wirkung über einen heterotrimeren CNTF-Rezeptor, welcher im zytoplasmatischen Teil über Januskinasen zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) führt. Einige Arbeiten deuten darauf hin, dass die neuroprotektive Wirkung von CNTF, insbesondere auf Motoneurone, über eine Stabilisierung der Microtubuli erfolgt (Wiese et al., 1999/2001; Götz et al., 2005). Das Vorkommen von CNTF im olfaktorischen System wurde bereits nachgewiesen (Langenhan et al., 2005).

Primärkulturen olfaktorischer Gliazellen wurden immunzytochemisch auf die Produktion von CNTF untersucht. Bei der Untersuchung von Kokulturen mit olfaktorischen Neuronen zeigte sich, dass OECs, welche in Kontakt mit olfaktorischen Neuronen standen intensiv CNTF-immunreaktiv waren. Die Produktion von CNTF durch olfaktorische Gliazellen scheint somit von dem Kontakt zu olfaktorischen Neuronen abhängig zu sein. Welche Mechanismen dieser kontaktvermittelten Induktion der Produktion des neurotrophen Faktors zugrunde liegen und welchen Einfluss diese Produktion auf die Neurone hat muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte die unterschiedliche Verteilung integraler und peripherer Verschlusskontaktpoteine im olfaktorischen Epithel dokumentiert werden. Zusätzlich zu Occludin und ZO-1 wurden die Claudine 1, -3, -4 und -5 in den apikalen Zonulae occludentes des olfaktorischen Epithels lokalisiert. Die Claudine 1, -3 und -5 konnten in Tight junctions olfaktorischer Drüsen und deren Ausführungsgängen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten in allen Verschlusskontakten des olfaktorischen Epithels die Proteine ZO-2 und -3 nachgewiesen werden.

Die unterschiedliche Komposition der Verschlusskontakte könnte deren Permeabilität beeinflussen und somit von entscheidender Bedeutung für die ionale Zusammensetzung des Riechschleimes sein, welche essentiell für die Depolarisation der olfaktorischen Neurone ist. In den Fila olfactoria konnten insbesondere Claudin 5 und ZOs in Verschlusskontakten olfaktorischer Gliazellen nachgewiesen werden. Diese Zellen sind demnach zur Ausbildung von Verschlusskontakten, wie sie auch in peripheren Myelinscheiden beobachtet werden, befähigt. Anders als in Schwanzzell-Myelinscheiden war allerdings Claudin 1 in den Fila nicht nachweisbar.

Weiterhin wurde die Bildung spezifischer Adherenskontakte im olfaktorischen Epithel untersucht und die Verteilung von E- und N-Cadherin sowie verschiedener Catenine in den Adherensjunctionen bestimmter Zelltypen analysiert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Adherensjunctionen zwischen Stützzellen und olfaktorischen Neuronen ausschließlich N-Cadherin-vermittelt sind. In epithelialen Adherensjunctionen konnte lediglich E-Cadherin nachgewiesen werden. Homotype Stützzell-Stützzell Kontakte enthielten sowohl E-, als auch N-Cadherin. Die Bildung neuronaler Adherenskontakte scheint abhängig vom Entwicklungsgrad der neuronalen Zellen zu sein. In den Fila olfactoria zeigten sich Adherensjunctionen zwischen olfaktorischen Gliazellen und olfaktorischen

Axonen, sowie zwischen olfaktorischen Axonen untereinander. Adherenskontakte konnten auch zwischen olfaktorischen Gliazellen in Kultur nachgewiesen werden. Die Produktion des neurotrophen Faktors CNTF, wurde in Kokulturen mit olfaktorischen Neuronen besonders in den Gliazellen induziert, die Kontakt mit Neuronen hatten. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung der Adherenskontakte an Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen im Rahmen der neuro- und axogenetischen Prozesse, welche im peripheren olfaktorischen System ständig stattfinden.

7. Literatur

Akins MR, Greer CA (2006) Axon behaviour in the olfactory nerve reflects the involvement of catenin-cadherin mediated adhesion. *J Comp Neurol* 499: 979-989

Akins MR, Benson DL, Greer CA (2007) Cadherin expression in the developing mouse olfactory system. *J Comp Neurol* 501: 483-497

Akiyama Y, Lankford K, Radtke C, Greer CA, Kocsis JD (2004) Remyelination of spinal cord axons by olfactory ensheathing cells and Schwann cells derived from a transgenic rat expressing alkaline phosphatase marker gene. *Neuron Glia Biol* 1: 47 - 55

Alenius M, Bohm S (1997) Identification of a novel neural cell adhesion molecule-related gene with a potential role in selective axonal projection. *J Biol Chem* 272: 26083-26086

Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115: 4969 - 4976

Anastasiadis PZ, Moon SY, Thoreson MA, Mainer DJ, Crawford HC, Zheng Y, Reynolds AB (2000) Inhibition of RhoA by p120 Catenin. *Nat Cell Biol* 9 : 637-644

Angst BD, Marcozzi C, Magee AI (2001) The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 114 : 629-641

Asan E, Drenkhahn D (2005) Immunocytochemical characterization of two types of microvillar cells in rodent olfactory epithelium. *Histochem Cell Biol* 123: 157-168.

Asan E, Meyer-Stiegen S (1998) Localization of proteins associated with the junctional complex in the rat olfactory epithelium. *Eur J Neurosci* 10, Suppl. 10: 360

Asan E, Langenhan T, Holtmann B, Bock H, Sendtner M, Carroll P (2003) Ciliary neurotrophic factor in the olfactory bulb of rats and mice. *Neuroscience*;120: 99-112.

Asan E, Drenkhahn D (2005) Immunocytochemical characterization of two types of microvillar cells in rodent olfactory epithelium. *J Histochem Cell Biol* 123 : 157-168

- Au WW, Treloar HB, Greer CA (2002) Sublamina organization of the mouse olfactory bulb nerve layer. *J Comp Neurol* 446 : 68-80
- Balda MS, Matter K (2003) Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol* 13 : 310 - 318
- Beites CL, Kawauchi S, Crocker CE, Calof AL (2005) Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Exp Cell Res* 306: 309-316
- Berod A, Hartman BK, Pujol JF (1981) Importance of fixation in immunohistochemistry: use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase. *J Histochem Cytochem* 29: 844-850
- Bienz M (1999) APC: the plot thickens. *Curr Opin Genet Dev* 9 : 595-603
- Bienz M (2005) Beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol* 15 : 64-67
- Bienz M, Hamada F (2004) Adenomatous polyposis coli proteins and cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 16 : 528-535
- Blinder KJ, Pumplin DW, Paul DL, Keller A (2003) Intercellular interactions in the mammalian olfactory nerve. *J Comp Neurol* 466: 230-239
- Boyd JG, Doucette R, Kawaja MD (2005) Defining the role of olfactory ensheathing cells in facilitating axon remyelination following damage to the spinal cord. *FASEB J* 19: 694-703
- Brivanlou AH, Darnell JE (2002) Signal transduction and the control of gene expression. *Sci* 295 : 813-818
- Calof AL, Mumm JS, Rim PC, Shou J (1998) The neuronal stem cell of the olfactory epithelium. *J Neurobiol* 36: 190-205
- Carter LA, MacDonald JL, Roskams AJ (2004) Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *J Neurosci* 24: 5670-5683

- Chauvet N, Prieto M, Fabre C, Noren NK, Privat A (2003) Distribution of p120 catenin during rat brain development: potential role in regulation of cadherin-mediated adhesion and actin cytoskeleton organization. *Mol Cell Neurosci* 22: 467-486
- Chen X, Fank H, Schwob JE (2004) Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 469: 457-474
- Chen J, Zacharek A, Li Y, Li A, Wank L, Katakowski M, Roberts C, Lu M, Chopp M (2006) N-cadherin mediates nitric oxide-induced neurogenesis in young and retired breeder neurospheres. *Neuroscience* 140: 377-388.
- Chuah MI, West AK (2002) Cellular and molecular biology of ensheathing cells. *Microsc Res Tech* 58 : 216-227
- Chuah MI, David S, Blaschuk O (1991) Differentiation and survival of rat olfactory epithelial neurons in dissociated cell culture. *Brain Res Dev Brain Res.* 60:123-132.
- Chuah MI, Au C 1994 Olfactory cell cultures on ensheathing cell monolayers. *Chem Senses.* 19:25-34.
- Chung RS, Woodhouse A, Fung S, Dickson TC, West AK, Vickers JC, Chuah MI (2004) Olfactory ensheathing cells promote neurite sprouting of axons in vitro by direct cellular contact and secretion of soluble factors. *Cell Mol Life Sci* 61: 1238-1245
- Dezawa M, Adachi-Usami E (2000) Role of Schwann cells in retinal ganglion cell axon regeneration. *Progress in retinal and eye research* 19: 171-204
- Drenckhahn D. Benninghoff *Drenckhahn Anatomie Band 1.* 2004a. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Drenckhahn D. Benninghoff *Drenckhahn Anatomie Band 2.* 2004b. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Enck AH, Berger UV, Yu ASL (2001) Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F966-F974
- Fairless R, Barnett SC (2005) Olfactory ensheathing cells: their role in central nervous system repair. *Int J Biochem Cell Biol* 37 : 693-699

Fanning AS, Little BP, Rahner C, Utepbergenov D, Walther Z, Anderson JM (2007) the unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties. *Mol Biol Cell* 18: 721-731

Fannon AM, Colman DR (1996) A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. *Neuron* 17 : 423-434

Farbman AI (1990) Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls? *Trends Neurosci* 13 : 362-365

Feinstein P, Mombaerts P (2004) A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell*. 117: 817-831

Feinstein P, Bozza T, Rodriguez I, Vassalli A, Mombaerts P (2004) axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the β 2 adrenergic receptor. *Cell* 11: 833-846

Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP (2005) Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev* 57 : 883-917

Field PM, Li Y, Raisman G (2003) Ensheathment of the olfactory nerves in the adult rat. *J Neurocyt* 32: 317-324

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123 : 1777-1788

Furuse M, Tsukita S (2006) Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol* 16 : 181-188

Gao X, Arlotta P, Macklis JD, Chen J (2007) Conditional knock-out of β -catenin in postnatal-born dentate gyrus granule neurons results in dendritic malformation. *J Neurosci* 27: 14317-14325

Gess B, Halfter H, Kleffner I, Monje P, Athauda G, Wood PM, Young P, Wanner IB (2008) Inhibition of N-cadherin and beta-catenin function reduces axon-induced Schwann cell proliferation. *J Neurosci Res* 86: 497 - 812

- Getchell ML, Getchell TV (1992) Fine structural aspects of secretion and extrinsic innervation in the olfactory mucosa. *Microsc Res Tech.* 23:111-127.
- Goldstein BJ, Schwob JE (1996) Analysis of the globose basal cell compartment in rat olfactory epithelium using GBC-1, a new monoclonal antibody against basal cells. *J Neurosci* 16 : 4005-4016
- Gonzales-Mariscal L, Betanzos A, nava P, Jaramillo BE (2003) Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Mol Biol* 81: 1-44
- Graziadei PPC and 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* 8: 1-18
- Grosheva I, Shtutman M, Elbaum M, Bershadsky AD (2001) p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J Cell Sci* 114 : 695-707
- Hajjar E, Perahia D, Debat H, Nespoulous C, Robert CH (2006) Odorant binding and conformational dynamics in the odorant-binding protein. *J Biol Chem* 281 : 29929-29937
- Halbleib JM, Nelson WJ (2006) Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 23 : 3199-3214
- Hartsock A, Nelson WJ (2007) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *BBA-Biomembranes* DOI 10.1016/j.bbamem.2007.07.012
- Herrera LP, Casas CE, Bates ML, Guest JD (2005) Ultrastructural study of the primary olfactory pathway in *Macaca fascicularis*. *J Comp Neurol* 488: 427-441
- Hirano S, Suzuki ST, Redies C (2003) The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules. *Front Biosci* 8:306-355.
- Hofer D, Asan E, Srenckhahn D (1999) Chemosensory perception in the Gut. *News Physiol Sci* 14 : 18-23

Hummel T, Zipursky SL (2004) Afferent induction of olfactory glomeruli requires N-cadherin. *Neuron* 42: 77-88

Hussar P, Tserentsoodol, Koyama H, Yokoo-Sugawara M, Matsuzaki T, Takami S, Takat K (2002) The glucose transporter GLUT1 and the tight junction protein occluding in nasal olfactory mucosa. *Chem Senses* 27: 7-11

Ibrahim A, Li Y, Li D, Raisman G, El Masry WS (2006) Olfactory ensheathing cells: ripples of an incoming tide? *Lancet Neurol* 5: 453-457

Inoue A, Sanes JR (1997) Lamina-specific connectivity in the brain: regulation by N-Cadherin, neurotrophins, and glycoconjugates. *Science* 276 : 1428-1431

Ivanov AI, McCall IC, Parkos CA, Nusrat A (2004) Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell* 15 : 2639-2651

Kafitz KW, Greer CA (1999) Olfactory ensheathing cells promote neurite extension from embryonic olfactory receptor cells in vitro. *Glia* 25: 99-110

Kawauchi S, Beites CL, Crocker CE, Wu H_H, bonnin A, Murray R, Calof AL (2004) Molecular signals regulating proliferation of stem and progenitor cells in mouse olfactory epithelium. *Dev Neurosci* 26: 166-180

Langenhan T, Sendtner M, Holtmann B, Carroll P, Asan E.(2005) Ciliary neurotrophic factor-immunoreactivity in olfactory sensory neurons. *Neuroscience* 134:1179-1194.

Lapierre LA (2000) The molecular structure of the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev* 41 : 255-264

Lee DA, Zurawel RH, Windebank AJ (1995) Ciliary neurotrophic factor expression in Schwann cells is induced by axonal contact. *J Neurochem* 65 : 564-568

Letourneau PC, Roche FK, Shattuck TA, Lemmon V, Takeichi M (1991) Interactions of Schwann cells with neurites and with other Schwann cells involve the calcium-dependent adhesion molecule, N-cadherin. *J Neurobiol* 22 : 707-720

- Levy DE, Darnell JE (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 : 651-662
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH (2005) Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437 : 1370-1375
- Lim PA, Tow AM (2007) Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. *Ann Acad Med Singapore* 36 : 49-57
- Luciano L, Thiele J, Reale E (1979) Development of follicles and of occluding junctions between the follicular cells of the thyroid gland. A thin-section and freeze-fracture study in the fetal rat. *J Ultrastruct Res* 66: 164-181
- Mack A, Wolburg H (1986) Heterogeneity of glial membranes in the rat olfactory system as revealed by freeze-fracturing. *Neurosci Lett* 65: 17-22
- Mackay-Sim A, Kittel P (1991) Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: a quantitative autoradiographic study. *J Neurosci* 11: 979-984
- Margolis, FL (1980) A marker protein for the olfactory chemoreceptor neuron. In: Bradshaw, RA, Schneider DM, eds. *Proteins of the nervous system*. Raven Press, New York, pp. 59-84
- Marrs JA, Nelson WJ (1996) Cadherin cell adhesion molecules in differentiation and embryogenesis. *Int Rev Cytol* 165: 159-205
- Matsunami H, Miyatani S, Inoue T, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeichi M (1993) Cell binding specificity of mouse R-Cadherin and chromosomal mapping of the gene. *J Cell Sci* 106 : 401-409
- Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS (2005) Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 17 : 453-458
- McNeil E, Capaldo CT, Macara IG (2006) Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 17: 1922-1932

Meier-Stiegen S (2005) Lokalisierung und Charakterisierung von Zellkontaktproteinen im olfaktorischen Epithel. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

Menco BPhM (1980) Qualitative and quantitative freeze-fracture studies on olfactory and nasal respiratory epithelial surfaces of frog, ox, rat, and dof. III. Tight-junctions. *Cell Tissue Res* 211: 361-373

Menco BP. (1994) Ultrastructural aspects of olfactory transduction and perireceptor events. *Semin Cell Biol.* 5:11-24

Mendoza AS (1993) Morphological studies on the rodent main and accessory olfactory systems: the region olfactoria and vomeronasal organ. *Ann Anat* 175: 425-446

Menichella DM, Arroyo EJ, Awatramani R, Xu T, Baron P, Vallat J-M, Balsamo J, Lilien J, Scarlato G, Kamholz J, Scherer SS, Shy ME (2001) Protein zero is necessary for E-cadherin-mediated adherens junction formation in Schwann cells. *Mol Cell Neurosci* 18: 606-618

Miragall F, Krause D, de Vries U, Dermietzel R (1994) Expression of the tight junction protein ZO-1 in the olfactory system: presence of ZO-1 on olfactory sensory neurons and glial cells. *J Comp Neurol* 341: 433-448

Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, Nakayama K, Okamura Y, Sasaki H, Miyachi Y, Furuse M, Tsukita S (2005) *J Cell Biol* 169: 527-538

Moran DT, Rowley III JC, Jafek BW, Lovell MA (1982) the fine structure of the olfactory mucosa in man. *J Neurocyt* 11: 721-746

Morrison EE, Costanzo RM (1992) Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. *Microsc Res* 23 : 49-61

Nakamura T, Gold GH (1987) A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325 : 442-444

Nickell WT, Kleene NK, Gesteland RC, Kleene SJ (2006) Neuronal chloride accumulation in olfactory epithelium of mice lacking NKCC1. *J Neurophysiol.* 95:2003-2006.

Nickell WT, Kleene NK, Kleene SJ (2007) Mechanisms of neuronal chloride accumulation in intact mouse olfactory epithelium. *J Physiol.* 583: 1005-1020

Nicolay DJ, Doucette JR, Nazarali AH (2006) Transcriptional regulation of neurogenesis in the olfactory epithelium. *Cell Mol Neurobiol* DOI 10.1107/s10571-006-9058-4

Niessen CM (2007) Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatology* 127 : 2525-2532

Noren NK, Liu BP, Burrridge K, Kreft B (2000) p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* 150. 567-580

Norgren RB Jr., Brackenbury R (1993) Cell adhesion molecules and the migration of LHRH neurons during development. *Dev Biol.* 160: 377-387

Obst-Pernberg K, Medina L, Redies C (2001) Expression of R-cadherin and N-cadherin by cell groups and fiber tracts in the developing mouse forebrain: relation to the formation of functional circuits. *Neuroscience* 106: 506-533

O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD (2002) Cytokine signalling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109 : 121-131

Pastrana E, Moreno-Flores MT, Avila J, Wandosell F, Minichiello L, Diaz-Nido J (2007) BDNF production by olfactory ensheathing cells contributes to axonal regeneration of cultured adult CNS neurons. *Neurochem Int.* 50:491-498.

Perez-Moreno M, Fuchs ED (2006) Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell.* 11:601-12.

Petruzzelli, L., Takami, M., and Humes, H. D. (1999): Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* 106, 467-76.

- Poliak S, Matlis S, Ullmer C, Scherer S, Peles E (2002) Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells. *J Cell Biol* 159: 361-371
- Provost E, Rimm DL (1999) Controversies at the cytoplasmic face of the cadherin-based adhesion complex. *Curr Opin Cell Biol* 11 : 567-572
- Pummi KP, Heape AM, Grenman RA, Peltonen JTK, Peltonen SA (2004) Tight junction proteins ZO1, occludin, and claudins in developing and adult human perineurium. *J Histochem Cytochem* 52: 1037-1046
- Raisman G (2001) Olfactory ensheathing cells - another miracle cure for spinal cord injury? *Nat Rev Neurosci* 5 : 369-375
- Ranscht B (2000) Cadherins: molecular codes for axon guidance and synapse formation. *Int J Dev Neurosci* 18 : 643-651
- Reisert J, Lai J, Yau K-W, Bradley J (2005) Mechanism of the excitatory Cl⁻ response in mouse olfactory receptor neurons. *Neuron* 45: 553-561
- Reuter D, Zierold K, Schröder WH, Frings S (1998) A depolarizing chloride current contributes to chemolectrical transduction in olfactory sensory neurons in situ. *J Neurosci*. 18 :6623-6630.
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212
- Roskams AJI, Cai X, Ronnet GV (1998) Expression of neuron-specific beta-III tubulin during olfactory neurogenesis in the embryonic and adult rat. *Neuroscience* 83: 191-200
- Rubio ME, Curcio C, Chauvet N, Bruses JL (2005) Assembly of the N-Cadherin complex during synapse formation involves uncoupling of p120-catenin and association with perisynaptic 1. *Mol and Cell Neurosci* 4 : 611-623
- Sasaki M, Black JA, Lankford KL, Tokuno HA, Waxman SG, Kocsis JD (2006) Molecular reconstruction of nodes of Ranvier after remyelination by transplanted olfactory ensheathing cells in the demyelinated spinal cord. *J Neurosci* 26: 1803-1812

- Sasaki M, Lankford KL, Zemedkun M, Kocsis JD (2004) Identified olfactory ensheathing cells transplanted into the transected dorsal funiculus bridge the lesion and form myelin. *J Neurosci* 24: 8485 - 8493
- Satoh M, Yoshida T (2000) Expression of neural properties in olfactory cytokeratin-positive basal cell line. *Brain Res Dev Brain Res* 121 : 219-222
- Schneeberger EE, Lynch RD (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1213-C1228
- Schwob JE (2002) Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec (Neww Anat)* 269: 33-49.
- Schwob JW, Szumowski KE, Stasky AA (1992) Olfactory sensory neurons are trophically dependent on the olfactory bulb for their prolonged survival. *J Neurosci* 12: 3896-3919
- Seki T, Namba T, Mochizuki H, Onodera M (2007) Clustering, migration, and neurite formation of neural precursor cells in the adult rat hippocampus. *J Comp Neurol* 502: 275-290.
- Sendtner M, Carroll P, Holtmann B, Hughes RA, Thoenen H (1994) Ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol* 25 : 1436-1453
- Sendtner M, Dittrich F, Hughes RA, Thoenen H (1994) Actions of CNTF and neurotrophins on degenerating motoneurons: preclinical studies and clinical implications. *J Neurol Sci* 124 : 77-83
- Staehein LA, Hull BE (1978) Junctions between living cells. *Sci Am* 238: 140 - 152
- Steinke A, Meier-Stiegen S, Drenckhahn D, Asan E (2008) Molecular composition of tight and adherens junctions in the rat olfactory epithelium and fila. *Histochem Cell Biol* 130: 339 - 361
- Sugimoto K, Murakawa Y, Sima AAF (2002) Expression and localization of insulin receptor in rat dorsal root ganglion and spinal cord. *J Periph Nerv Sys* 7: 44-53

- Suzuki F, Nagano T (1979) Morphogenesis of tight junctions in the peritoneal mesothelium of the mouse embryo *Cell Tissue Res* 198: 247-260
- Treubert-Zimmermann U, Heyers D, Redies C (2002) Targeting axons to specific fiber tracts in vivo by altering cadherin expression *J Neurosci* 22: 7617-7626
- Tsukita S, Furuse M (2000) Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149 : 13-16
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M (1999) Structural and signalling molecules come together at tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* 11 : 628-633
- Turksen K, Troy T-C (2004) Barriers built on claudins. *J Cell Sci* 117: 2435-2447
- Umeda K, Matsui T, Nakayama M, Furuse K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (2004) Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem* 279: 44785-44794
- Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S (2005) ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126: 741-754
- Van Itallie CM, Anderson JM (2004) The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology* 19 : 331-338
- Van Itallie CM, Anderson JM (2006) Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 68 : 403-429
- Vassalli A, Rothman A, Feinstein P, Zapotocky M, Mombaerts P (2002) Minigens impart odorant receptor-specific axon guidance in the olfactory bulb. *Neuron*. 35 : 681-696
- Verhaagen J, Greer CA, Margolis FL (1990) B-50/GAP43 gene expression in the rat olfactory system during postnatal development and aging. *Eur J Neurosci* 2 : 397-407
- Verhaagen J, Oestreicher AB, Gispen WH, Margolis FL (1989) The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *J Neurosci* 2 : 683-691

- Wanner IB, Guerra NK, Mahoney J, Kumar A, Wood PM, Mirski R, Jessen KR (2006) Role of N-cadherin in Schwann cell precursors of growing nerves. *Glia* 54 : 439-359
- Wanner IB, Wood PM (2002) N-cadherin mediates axon-aligned process growth and cell-cell interaction in rat Schwann cells. *J Neurosci* 22 : 4066 - 4079
- Weisenhorn DM, Roback J, Young AN, Wainer BH (1999) Cellular aspects of trophic actions in the nervous system. *Int Rev Cytol* 189 : 177-265
- Whitesides JG, LaMantia As (1996) Differential adhesion and the initial assembly of the mammalian olfactory nerve. *J Comp Neurol* 373: 240-254
- Yoshihara Y, Kawasaki M, Tamada A, Fujita H, Hayashi H, Kagamiyama H, Mori K (1997) OCAM: A new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons. *J Neurosci* 17: 5830-5842

Danksagung

Vier Jahre sind vergangen, seitdem ich die vorliegende Arbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie begonnen habe. Jetzt, am Ende meiner Dissertation und nach vier erfüllten Jahren als Doktorand am anatomischen Institut, will ich meinen Kollegen und Helfern großen Dank aussprechen.

Vor allem möchte ich **Frau Professorin Esther Asan** an dieser Stelle herzlichst für ihre Betreuung und unermüdliche Unterstützung beim Anfertigen der vorliegenden Arbeit danken. Sie gab mir weiterhin die Möglichkeit meine wissenschaftlichen Ergebnisse in Form von Postern und Vorträgen öffentlich zu präsentieren. Die freundliche und stets überaus konstruktive Zusammenarbeit mit ihr weckte in mir große Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten.

Herrn Professor Detlev Drenckhahn danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die überaus freundliche Aufnahme am Institut. Weiterhin danke ich ihm für die Möglichkeit neben meiner Dissertation mich als Tutor am makroskopisch anatomischen Unterricht zu beteiligen.

Besonderer Dank gilt **Frau Rita Herrmann, Frau Karin Reinfurt-Gehm, Frau Sieglinde Schenk** und **Frau Erna Kleinschroth** die die mich tatkräftig und überaus freundlich bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit unterstützt haben. Bei **Frau Dr. Heike Bömmel** möchte ich mich herzlich für die Einarbeitung in die Zellkultur bedanken.

Allen Mitarbeitern des anatomischen Instituts danke ich für die überaus freundliche und immer hilfsbereite Atmosphäre.

Schließlich will ich mich bei **meinen Eltern** bedanken, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich stets unterstützt und motiviert haben viele Herausforderungen anzunehmen und zu bestehen.

Lebenslauf

Persönliches:

Name: Axel Steinke
Geboren: 04.01.1982 in Hammelburg
Familienstand: ledig
Konfession: römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1988-1992 Grundschole Hammelburg
1992-2001 Frobenius-Gymnasium Hammelburg
07/2001 Abiturprüfung

Hochschulbildung

11/2001 - 6/2008 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg; Approbation zum Arzt

Praktische Ausbildung während des Studiums

Famulaturen

Februar/März 2004 Unfallchirurgie im Klinikum Leopoldina, Schweinfurt
Juli/August 2004 Allgemein- und Viszeralchirurgie, Krankenhaus Hammelburg
August/September 2004 Anästhesie und Intensivmedizin, Krankenhaus Hammelburg
Februar 2005 Rechtsmedizin, Institut für Rechtsmedizin, Universität Würzburg
August 2006 Allgemeinmedizin, Praxis der Eltern
2004 - 2007 Studentischer Tutor in makroskopischer Anatomie am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Würzburg

Praktisches Jahr

26.02.07 - 17.06.07

Innere Medizin (Juliuspital Würzburg)

18.06.07 - 07.10.07

Anästhesie und Intensivmedizin (Klinikum Leopoldina,
Schweinfurt)

08.10.07 - 27.01.07

Chirurgie (Klinikum Leopoldina, Schweinfurt)

Seit Oktober 2008 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg

Würzburg, den 28. 04. 2009

Axel Steinke