

Aus dem Institut für Anatomie  
Direktor: Herr Prof. Dr. med. R.H.W. Funk

---

# Veränderungen im Bulbus olfactorius der Maus bei Taurinmangel

Morphologische Untersuchungen in einem  
Taurintransporter-knockout-Modell

D i s s e r t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin Doctor

medicinae (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus

der Technischen Universität Dresden

von

Maria Kammerer

aus Wriezen

Dresden 2012

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

gez: \_\_\_\_\_  
Vorsitzender der Promotionskommission

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	VII
1. Einleitung .....	1
1.1. Riechsinn .....	1
1.1.1. Riechschleimhaut .....	1
1.1.1.1. Olfaktorisches Epithel .....	2
1.1.1.2. Lamina propria .....	5
1.1.2. Riechbahn .....	5
1.1.2.1. Bulbus olfactorius.....	5
1.1.2.1.1. Glomerulus .....	8
1.1.2.1.2. Mitralzellen .....	9
1.1.2.1.3. Büschelzellen .....	10
1.1.2.1.4. Periglomeruläre Zellen.....	12
1.1.2.1.5. Short axon cells .....	13
1.1.2.2. Zentrale Riechbahn.....	13
1.1.3. Entwicklung und Regeneration.....	15
1.1.3.1. Entwicklung des Bulbus olfactorius.....	15
1.1.3.2. Regeneration und Homöostase .....	16
1.1.4. Physiologie des Riechens .....	17
1.2. Taurin.....	19
2. Ziel und Fragestellung .....	25
3. Material und Methoden .....	27
3.1. Tiere.....	27

3.2. Gewinnung der Schnitte und Färbung.....	28
3.2.1. Gewinnung der Schnitte .....	28
3.2.1.1. Präparation und Grobzuschnitt der Proben.....	28
3.2.1.2. Entkalkung und Einbettung des Gewebes .....	28
3.2.1.3. Schnitte .....	29
3.2.2. Färbung .....	29
3.2.2.1. Hämatoxylinfärbung .....	29
3.2.2.2. Immunhistochemische Reaktion .....	30
3.2.2.2.1. Materialien .....	30
3.2.2.2.2. Reaktionsprozedur.....	31
3.2.2.2.3. Kontrolle .....	31
3.3. Mikroskopische Datenerhebung.....	32
3.3.1. Qualitative Auswertung.....	32
3.3.1.1. PGP 9.5 .....	32
3.3.1.2. Ki-67 .....	32
3.3.1.3. Caspase 3.....	32
3.3.2. Quantitative Auswertung .....	33
3.3.2.1. Einteilung des Bulbus olfactorius .....	33
3.3.2.2. Länge und Querdurchmesser des Bulbus olfactorius .....	35
3.3.2.3. Zählungen .....	35
3.3.2.4. Flächenbestimmung.....	37
3.3.2.5. Zusätzliche Berechnungen.....	38
3.3.2.5.1. Anzahl der Mitralzellen pro Glomerulus .....	38
3.3.2.5.2. Fläche aller Mitralzellen pro 400µm.....	39
3.3.2.6. Korrektur .....	39
3.4. Statistik .....	39
4. Ergebnisse.....	40
4.1. Qualitative Immunhistochemie .....	40
4.1.1. PGP 9.5 .....	40
4.1.2. Ki-67 .....	40

4.1.3. Caspase-3 .....	40
4.2. Morphometrische Ergebnisse .....	42
4.2.1. Längs- und Querdurchmesser des Bulbus olfactorius .....	42
4.2.2. Mitralzellen .....	43
4.2.2.1. Anzahl der Mitralzellen .....	43
4.2.2.2. Die Anzahl der Mitralzellen pro Glomerulus.....	47
4.2.3. Fläche pro Mitralzelle .....	48
4.2.4. Fläche und Volumen pro Glomerulus .....	50
4.2.5. Ergebnisse des Vergleichs der alten Tiere .....	52
5. Diskussion .....	54
6. Zusammenfassung .....	64
7. Anhang .....	68
7.1. Herstellung von Gebrauchsmaterialien .....	68
7.2. Tabellen zu den Diagrammen .....	70
8. Verzeichnisse .....	71
8.1. Tabellenverzeichnis .....	71
8.2. Abbildungsverzeichnis .....	71
8.3. Literaturverzeichnis .....	74
9. Anlage.....	90
10. Danksagung.....	93

## Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex
AK	Antikörper
AON	Nucleus olfactorius anterior
Aqua dest.	destilliertes (demineralisiertes) Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca	Calcium
CCK	Cholezystokinin
C <sub>F</sub>	Abercrombie Korrekturfaktor
Cl	Chlor
CSAD	cystein sulfinic acid decarboxylase
d	Durchmesser
DAB	3,3'Diamino-benzidintetrahydrochloriddihydrat
EOG	Elektroolfaktogramm
EPL	externe plexiforme Schicht
ERG	Elektroretinogramm
GABA	Gammaaminobuttersäure
GAD	Glutamatdecarboxylase
GBZ	Globose Basalzellen
GL	Glomeruläre Schicht
HBZ	Horizontal Basalzellen
HE	Hämatoxylin-Eosin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
K	Kalium
Ki 67	Ki 67 (Clone Tec 3)
KO	Knockout (taut -/-)
lat	lateinisch
LOT	lateraler olfaktorischer Trakt
MAK	Monoklonaler Antikörper
mRNA	messenger ribonucleid acid; Ribonukleinsäure

MVZ	Mikrovilliäre Zellen
µm	Mikrometer, 1µm = 10 <sup>-6</sup> m
N.	Nervus
Na	Natrium
N <sub>C</sub>	Korrigierte Zellzahl
N <sub>R</sub>	Rohzellzahl
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
π	Pi, griechischer Buchstabe (entspricht ca 3,14)
OB	Bulbus olfactorius
OE	Olfaktorisches Epithel
ORN	Olfaktorische Rezeptorneurone
OT	Objektträger
PAK	Polyklonale Antikörper
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline)
PCD	Purkinje cell degeneration mouse
PG	Periglomeruläre Zellen
PGP 9.5	Protein Gene Product 9.5
pH	pondus Hydrogenii; Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
RMS	rostral migratory stream
*	signifikanter Unterschied zwischen Vergleichsgruppen (p<0.05)
SAC	Short axon cells
Str.	Stratum
SVZ	Subventrikuläre Zone (am Seitenventrikel gelegen)
t	Schnittdicke
Tab.	Tabelle
<i>taut</i> -/-	KO-Typ; Taurintransporter-Knockout-Maus
<i>taut</i> +/+	WT; Wildtypmaus
V	Volumen
Vgl.	Vergleich
vs	versus
Wo	Woche

# 1. Einleitung

## 1.1. Riechsinn

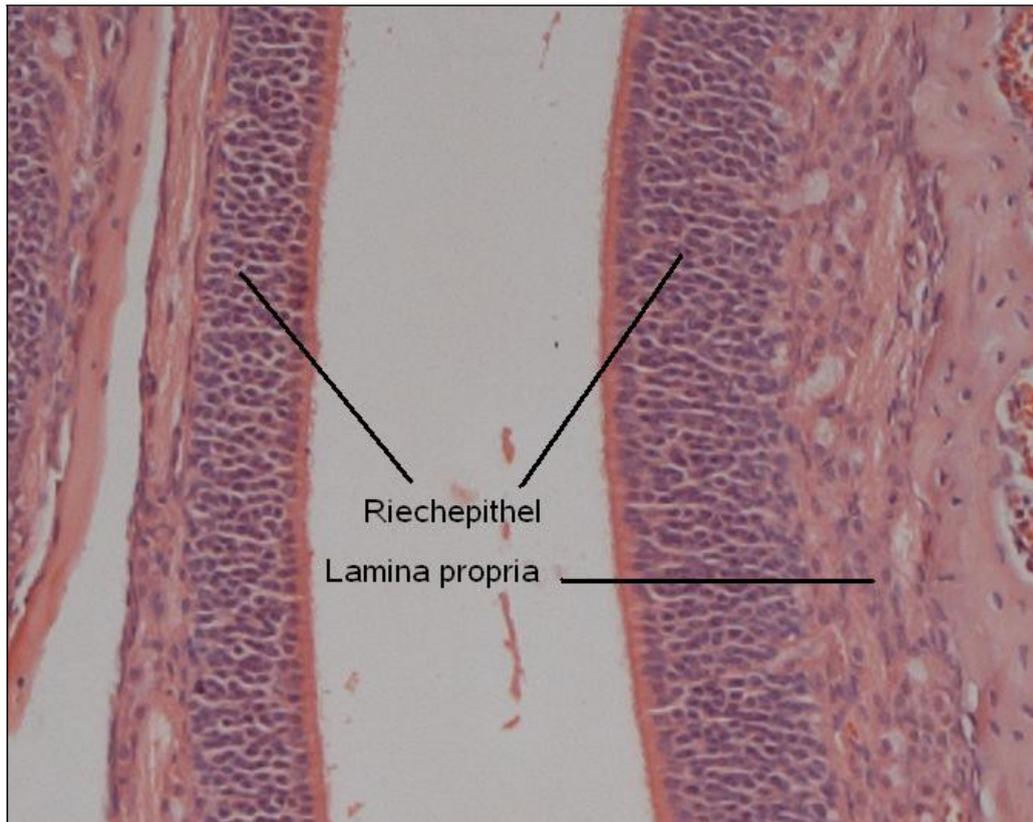
Der Riechsinn dient der Wahrnehmung von Duftstoffen und der Interpretation der entsprechenden Sinneserregungen. Von den olfaktorischen Sinneszellen der Nasenschleimhaut, deren Chemorezeptoren fähig sind, Duftstoffe zu binden, werden Informationen an das Gehirn geliefert.

Das Riechen ist wichtig um mit der Umwelt in Kontakt zu treten. Es stellt die Integrität und Gesamtfunktionalität sicher und dient der Selbst- und Fremderkennung (Krauel et al., 1998). Der Riechsinn hat enge funktionelle Verknüpfungen zum limbischen System. Die meisten Signale der peripheren sensorischen Rezeptoren erreichen den Cortex, ohne vorher den Thalamus passiert zu haben.

Das Riechsystem besteht aus der Riechschleimhaut, dem Bulbus olfactorius (OB) und weiteren zentralen Kern- bzw. Rindengebieten.

### 1.1.1. Riechschleimhaut

Die Riechschleimhaut besteht aus mehrreihigem olfaktorischen Epithel (OE) und der subepithelialen Lamina propria, bestehend aus Bindegewebe, Blutgefäßen, Bowman-Drüsen und gebündelten Axonen der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN)(Abb. 1).



**Abb. 1:** Riechschleimhaut bestehend aus Riechepithel und Lamina propria; Maus 10fache Vergrößerung, HE Färbung

#### 1.1.1.1. Olfaktorisches Epithel

Das olfaktorische Epithel (Abb. 2) besteht aus ORN (primäre Sinneszellen), mikrovillären Zellen (MVZ), Basalzellen, Stützzellen und den Ausführungsgängen der Bowman'schen Drüsen.

##### Olfaktorische Rezeptorneurone

Die olfaktorischen Rezeptorneurone sind bipolare Zellen, wobei jede Zelle einen Dendriten und ein Axon besitzt. Die Kerne liegen überwiegend im mittleren Drittel des OE. Von den ORN geht ein peripherer Dendrit in Richtung Epitheloberfläche (Lumen) ab. Am Ende eines Dendriten befindet sich eine hantelförmige Auftreibung. Von dieser gehen bei Nagern bis zu 50µm lange unbewegliche Zilien mit den Riechrezeptoren ab (Menco and Farbman, 1992). Etwa 0,2µm dicke Axone (Greer et al., 1991a) ziehen als Nn. olfactorii vom basalen Pol durch die Lamina propria zum OB.

### Mikrovilliäre Zellen

Mikrovilliäre Zellen sind nichtneuronale Zellen (Asan and Drenckhahn, 2005; Kwon et al., 2005), die apikal Mikrovilli besitzen und über einen Zellfortsatz Kontakt zur Basalmembran haben (Moran et al., 1982). Es konnten zwei Subtypen (Typ I-MVZ und Typ II-MVZ) differenziert werden. In Typ I-MVZ konnte Villin nachgewiesen werden, ein Protein das vor allem für die Vernetzung von Aktinfilamenten zuständig ist. In Typ II-MVZ sind für den Stofftransport wichtige Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPasen nachweisbar (Asan and Drenckhahn, 2005).

### Basalzellen

Basalzellen unterteilt man in Globose basal cells (GBZ) und Horizontal basal cells (HBZ). Sie haben einen Durchmesser von 4 bis 7 µm. Die HBZ liegen direkt an der Basalmembran, die GBZ darüber. Sie sind Vorläuferzellen, die sich in eine epitheliale (Stützzellen und Zellen der Ausführungsgänge der Bowman Drüsen) und in eine neuronale Linie (ORN) weiterdifferenzieren können. Die GBZ kann man aufgrund von Transkriptionsfaktoren (Sox2, Pax6 und Marker der basic-helix-Familie) in weitere Subtypen einteilen (Cau et al., 2002). Vor allem die GBZ der basic-helix Familie scheinen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der ORN zu spielen (Cau et al., 2002).

Die Bedeutung der Basalzellpopulationen wird noch kontrovers diskutiert. Nach Leung et. al (2007) sind die HBZ nur nach einer umfangreichen Verletzung (z.B. durch Methylbromidgas) des OE die multipotenten Vorläuferzellen für die neuronale und nicht-neuronale Zelllinie. Eine andere Studie zeigt, dass vor allem die HBZ die Vorläuferzellen sowohl für die epitheliale als auch für die neuronale Linie sind (Iwai et al., 2008).

Da sich die Basalzellen asymmetrisch teilen, ist lebenslang eine Regeneration des Riechepithels möglich. Die Lebensspanne der ORN beträgt im Durchschnitt zwischen 35 und 60 Tage, wobei alte ORN bis zu einem Jahr alt werden können (Farbman, 2000).

### **1.1.1.2. Lamina propria**

Unter dem Riechepithel liegt als subepitheliales Bindegewebe die Lamina propria, bestehend aus den Axonen der ORN, den Glandulae olfactoriae (Bowman-Drüsen) und Blut- und Lymphgefäßen. Die Bowman-Drüsen bilden dünnflüssiges Sekret, welches die Schleimhaut der Regio olfactoria benetzt und sich an der Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts, pH-Regulation und der Bindung von Liganden an die Rezeptoren beteiligt (Getchell et al., 1984; Pelosi, 2001). Die Ausführungsgänge dieser serösen Drüsen durchziehen das OE. Die Axone der ORN ziehen in 20 – 100µm dicken Faszikeln, umgeben von gliaähnlichen Zellen, den „olfactory ensheathing cells“, durch die Lamina cribrosa (Schwartz et al., 2000) zum OB. Die olfactory ensheathing cells sollen Fehlverschaltungen durch die sich ständig erneuernden ORN verhindern (Schwartz et al., 2000).

## **1.1.2. Riechbahn**

### **1.1.2.1. Bulbus olfactorius**

Der Bulbus olfactorius („Riechkolben“) befindet sich auf der Lamina cribrosa, die zum Os ethmoidale gehört. Durch die 1-2mm dünnen Knochenkanäle ziehen die Axone der ORN als Fila olfactoria (alle Bündel: Nervus olfactorius, 1. Hirnnerv) zum OB. Daneben erhält er Afferenzen aus der Septumregion, dem Corpus amygdaloideum, der Regio piriformis und dem Tuberculum olfactorium (Kratskin and Belluzzi, 2003). Er lässt sich in zwei Teile untergliedern: (Haupt)Bulbus olfactorius und Bulbus olfactorius accessorius (für die Afferenzen aus dem vomeronasalen Organ).

Histogenetisch ist der OB eine Ausziehung der Großhirnrinde und zeigt einen sechsteiligen Schichtaufbau (von außen nach innen, Abb. 3):

Olfaktorische Nervenzellschicht (Stratum fibrosum): Axone der ORN

Glomeruläre Schicht (Str. glomerulosum): Periglomeruläre Zellen, externe Büschelzellen und short-axon cells

Äußere plexiforme Schicht (Str. plexiforme externum): Büschelzellen

Mitralzellschicht (Str. mitrale): Mitralzellen

Innere plexiforme Schicht (Str. plexiforme internum): short axon cells

Körnerzellschicht (Str. granulosum): Körnerzellen, short axon cells

Außerdem ziehen exzitatorisch wirkende Kollateralen zu den Körnerzellen in der Körnerzellschicht (Transmitter GABA (Gammaaminobuttersäure)). Diese Körnerzellen sowie die periglomerulären Zellen (PG), die die Glomeruli umgeben, werden durch Projektionen aus dem kontralateralen Nucleus olfactorius anterior (AON) gehemmt (Transmitter Dopamin, und GABA) und bilden inhibitorische Synapsen mit den Dendriten der Mitralzellen. Somit sind sie in der Lage, die Menge der nach zentral geleiteten Informationen zu begrenzen.

Zu den Interneuronen zählen PG, short axon cells (SAC) und Körnerzellen. PG und Körnerzellen können postnatal durch die Einwanderung von Zellen aus der subventrikulären Zone (SVZ) via rostral migratory stream (RMS) ersetzt werden. Dagegen ist die Proliferation von Mitralzellen kurz nach der Geburt abgeschlossen (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Carleton et al., 2003). Die größte Anzahl von Mitralzellen entsteht pränatal (Chuah and West, 2002; Christie et al., 2005; Lopez-Mascaraque et al., 2005).

Büschelzellen sind eine heterogene Gruppe. Ein Teil liegt in der externen plexiformen Schicht (EPL) und projizieren mit ihren Axonen auf die gesamte olfaktorische Rinde. Die äußeren periglomerulär liegenden Büschelzellen gehören gemeinsam mit den SAC zu den glutaminergen Interneuronen.

In der Körnerzellschicht enden vor allem Afferenzen aus verschiedenen Gebieten des Gehirns. Körnerzellen gehören wie die PG zu den lokalen Interneuronen und bilden Synapsen mit Büschel- und Mitralzellen (Hall and Macrides, 1983).

**Abb. 4:** Schema des Bulbus olfactorius (Mori et al., 1999). Darstellung der Signalweiterleitung im OB. Bis zu 10.000 ORN konvergieren in einem Glomerulus auf eine Mitralzelle (gelb sind die ORN und Mitralzellen des linken Glomerulus, blau die des rechten Glomerulus). Schwarze Pfeile zeigen erregende, rote Pfeile hemmende Signalweiterleitung. Die Axone der Mitral- und Körnerzellen bilden den LOT (aus Deetjen, Speckmann, Hescheler (Hrsg) Physiologie; 4. Auflage Urban und Fischer Verlag; München; p 181).

#### 1.1.2.1.1. Glomerulus

Der Glomerulus wird von den Axonen der ORN und den synaptischen Verbindungen mit den Dendriten der Mitralzellen, Büschelzellen und den PG gebildet (Pinching and Powell, 1971b; Shepherd, 1972). Sie können ein- oder mehrreihig in der GL des OB liegen. Im zentralen Bulbus sind die Totalfläche und die Anzahl der Glomeruli höher als rostral und caudal (Meisami et al., 1990). Die Anzahl und der Durchmesser nehmen postnatal zu (Meisami and Sendera, 1993). Die Dendriten von ungefähr 25 Mitralzellen ziehen zu einem Glomerulus (Meisami and Safari, 1981).

Jeder Glomerulus wird in zwei Zonen geteilt: in den sensorischen und den synaptischen Teil (Gutierrez-Mecinas et al., 2005). Im sensorischen Teil enden die ORN und gehen synaptische Verbindungen mit den Projektionsneuronen (Mitral- und Büschelzellen) und Interneuronen ein (Kosaka et al., 1998; Gutierrez-Mecinas et al., 2005). In der synaptischen Zone befinden sich die Dendriten der Interneurone die hemmend auf Mitral- und Büschelzellen wirken.

Die geschätzte Anzahl von Glomeruli pro OB von Mäusen beträgt 1800 (Royet et al., 1989). Zu jedem Glomerulus gehören tausende ORN, 10 bis 25 Mitralzellen und 50 bis 70 Büschelzellen (Ressler et al., 1994; Vassar et al., 1994; Mombaerts et al., 1996).

Glomeruli spielen eine kritische Rolle bei der Projektion von ORN nach zentral, deren exakte Funktion allerdings noch nicht komplett verstanden ist. In ihnen werden afferente Informationen aus den ORN analysiert, sortiert und an die Mitralzellen weitergegeben (Freeman, 1972; Shepherd, 1972). Die rezeptorspezifische Projektion auf bestimmte Glomeruli ist die Grundlage für die chemospezifische Präsentation, die zur Identifikation von Duftstoffen beiträgt.

#### 1.1.2.1.2. Mitralzellen

Im OB gibt es zwei verschiedene nach zentral projizierende Typen von Neuronen: Mitral- und Büschelzellen.

Mitralzellen sind die größte Informationen weitergebende Einheit im OB. Die Mitralzellfläche ist im lateralen und medialen Teil größer als im ventralen und dorsalen Teil des OB (Panhuber et al., 1985). Jede Mitralzelle sendet nur einen Dendriten zum nächsten Glomerulus (Shephard, 1974; Macrides and Schneider, 1982). Mitralzellen sind mit Gap Junctions ausgestattet, die einen schnellen Informationsfluss zwischen benachbarten Mitralzellen ermöglichen. Es werden jedoch nur Mitralzellen, deren Dendriten sich innerhalb eines Glomerulus befinden, durch diese Kommunikationskanäle miteinander verbunden (Christie et al., 2005; Monyer, 2005). Der Verlust von Mitralzellen ist anhaltend, da diese sich außer bis zu zwei Wochen postnatal nicht regenerieren können (Devor, 1976). Mitralzellen zeichnen sich durch eine Dynamik aus, die besonders durch inhibitorische Interneurone hervorgerufen wird (Chaput et al., 2004; Christie et al., 2005; Lopez-Mascaraque et al., 2005).

Gemeinsam mit den SAC gehören sie zu den glutaminergen Interneuronen der GL und spielen eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung von olfaktorischen Informationen (Schoenfeld and Macrides, 1984; Aungst et al., 2003; Hayar et al., 2004).

Mitral- und Büschelzellen haben anatomische und physiologische Gemeinsamkeiten. Sie besitzen einen apikalen Dendriten, der mit je einem Glomerulus in Verbindung steht (Cajal, 1911). Dort empfangen sie exzitatorische Informationen von den ORN (Berkowicz et al., 1994; Ennis et al., 1996) und den juxtaglomerulären Interneuronen (Wachowiak and Shipley, 2006). Büschelzellen übertragen mit ihrem Axon sensorische Impulse ähnlich den Mitralzellen an höhere kortikale olfaktorische Gebiete via dem LOT (Haberly and Price, 1977). Allerdings sind die Somata von Büschelzellen kleiner als die der Mitralzellen.

Mehrere Unterschiede zwischen Mitral- und Büschelzellen konnten im Hinblick auf die Verteilung ihrer Dendriten und Axone und ihre Antworten auf elektrische Stimulation des N. olfactorius festgestellt werden (Schoenfeld et al., 1985): Zum Beispiel verzweigen sich die Dendriten der Mitralzellen im tieferen Teil der EPL, wo sie mit verschiedenen Subtypen der Körnerzellen (Typ I und II) in Kontakt stehen. Dagegen verzweigen sich die medialen Büschelzellen im oberflächlichen Teil der EPL und interagieren mit Körnerzellen Typ I und Typ III (Mori et al., 1983; Orona et al., 1984). Außerdem können nur Mitralzellen durch elektrische Stimulation des posterioren piriformen Cortex aktiviert werden (Scott, 1981), wohingegen Büschelzellen auf Signale stärker antworten, die in physiologischer Richtung eines Nervens weitergeleitet wurden (Schneider and Scott, 1983). Auch das Antwortmuster auf Duftstoffe ist unterschiedlich. Während die meisten Büschelzeleinheiten mit mehr als 100 elektrischen Antworten pro Sekunde auf Aldehyde oder Säure reagieren, sind es bei den Mitralzellen weniger als 100. Dies legt den Schluss nahe, dass Mitralzellen und mittlere Büschelzellen unterschiedliche Antwortmuster für die Weitergabe von olfaktorischen Signalen zu ihren Zielneuronen haben (Nagayama et al., 2004). Mediale Büschelzellen sind in der Lage, Cholezystokinin (CCK), eines der neuroaktivsten Peptide der Gastrinfamilie (Seroogy et al., 1985) auszuschütten. Dies könnte den Unterschied zwischen Mitral- und Büschelzellen im Bezug auf ihre Antwortrate ausmachen (Ghijssen et al., 2001). Die laterale Hemmung der Mitralzellen auf den Nachbarglomerulus scheint durch die längeren Dendriten stärker zu sein als die laterale Hemmung von den Büschelzellen (Nagayama et al., 2004). Da mehrere tausend ORN nur mit einer einzelnen Mitral- oder Büschelzelle Kontakt haben, werden die Signale nur sehr sparsam über die Axone weitergeleitet.

#### 1.1.2.1.4. Periglomeruläre Zellen

Die periglomerulären Zellen (PG) des OB sind an primären Prozessen und an der Verfeinerung von sensorischen Informationen des OE beteiligt (siehe Abb. 4).

Die Somata der PG, auch lokale Interneurone genannt, liegen um einen Glomerulus und haben einen Durchmesser von 6-8 µm. PG bilden die größte Subpopulation, von denen angenommen wird, dass sich die kurzen Dendriten nur in einem Glomerulus verzweigen (Pinching and Powell, 1971b). Die Dendriten erhalten Informationen von ORN und bilden Interaktionen mit Mitral- und Büschelzellen. Die Axone der PG haben mit 5-10 anderen Glomeruli Kontakt. Es können zwei verschiedene Typen von PG unterschieden werden. Typ 1 PG bilden mit den ORN im sensorischen Teil des Glomerulus Synapsen, während Typ 2 PG wenige oder gar keine synaptische Verbindungen zu den ORN besitzen und in der synaptischen Zone des Glomerulus liegen (Gutierrez-Mecinas et al., 2005; Kosaka and Kosaka, 2007).

Jedem Typ kann man unterschiedliche Subtypen zuteilen. Die meisten Typ 1 PG bei Mäusen sind GABAerg, davon die Mehrzahl GAD 67-positiv, nur 30% GAD 65-positiv (Glutamatdecarboxylase) (Parrish-Aungst et al., 2007; Kiyokage et al., 2010). Eine kleine Anzahl von PG sind dopaminerg (Parrish-Aungst et al., 2007; Kiyokage et al., 2010). Zudem konnte ein weiterer Subtyp von Typ 1 PG nachgewiesen werden, welcher weder GABA noch Dopamin sondern CCK exprimiert (Baltanas et al., 2001). CCK wirkt über die Freisetzung von GABA und Dopamin hemmend (Rakovska, 1995a; Rakovska, 1995b; Kombian et al., 2005; Deng and Lei, 2006).

Die Typ 2 PG sind GABAerg und enthalten Calbindin oder Calretinin (Kosaka and Kosaka, 2007; Panzanelli et al., 2007; Parrish-Aungst et al., 2007). Bei Mäusen konnte kein CCK in Typ 2 Zellen nachgewiesen werden.

Die neurochemische Charakteristik von PG bei Mäusen unterscheidet sich von denen anderer Nagetiere (Lopez-Mascaraque et al., 1989; Alonso et al., 1995; Brinon et al., 2001; Crespo et al., 2002).

Die PG projizieren zum Glomerulus und sind für die Verbindung zwischen ORN und Mitralzellen verantwortlich (Carlen et al., 2002; Shingo et al., 2003).

Im OB bilden Körner- und PG transversale Verschaltungen zwischen Mitralzellen und Glomeruli. Dies dient vor allem der lateralen Inhibition von Mitralzellen (Schmidt, 1997).

#### 1.1.2.1.5. Short axon cells

Es gibt mehrere Typen von short axon cells (SAC). Man kann sie anhand der Lage ihrer Somata in oberflächliche und tiefe SAC einteilen. Die oberflächlichen SAC befinden sich um die Glomeruli. Außerdem befinden sich SAC noch in der Körnerzellschicht.

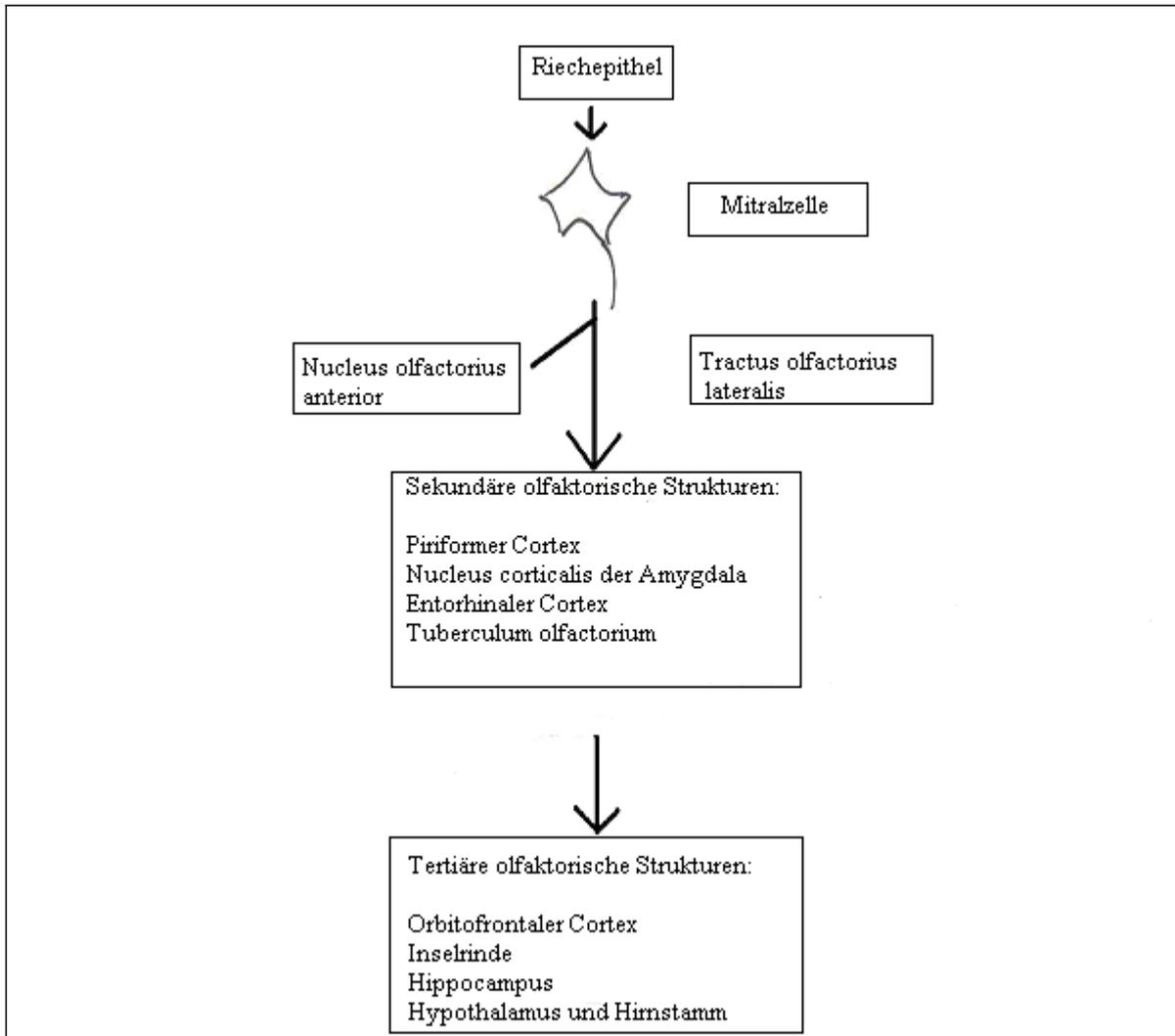
Zudem können sie noch aufgrund von strukturellen Merkmalen und chemischen Eigenschaften (neuroaktive Substanzen, Enzyymbildung, Rezeptoren und Kanäle) unterschieden werden. Vor allem gehen die tiefen SAC selektive synaptische Verbindungen mit GABAergen lokalen Neuronen ein (Gracia-Llanes et al., 2003; Pressler and Strowbridge, 2006; Eyre et al., 2008). Zudem scheinen die SAC über die Hemmung von Neuronen einen wesentlichen Einfluss auf die Informationsweiterleitung des OB zu haben (Schneider and Macrides, 1978).

Somata von SAC sind zudem auch in der inneren plexiformen Schicht nachgewiesen worden. Diese senden ihre Axone in den LOT (Kosaka and Kosaka, 2010).

#### 1.1.2.2. Zentrale Riechbahn

Die meisten olfaktorischen Fasern projizieren ungekreuzt auf ipsilaterale Hirnareale. Zudem umgehen sie den Thalamus und projizieren im frühen Verlauf direkt auf sekundäre olfaktorische Strukturen, die auch als olfaktorischer Cortex bezeichnet werden (Anderson et al., 2003) (Abb. 6).

Alle extrabulbären Fasern der Mitralzellen führen als LOT zu sekundären olfaktorischen Strukturen. Der LOT zieht zum piriformen Cortex, der sich in der Übergangsregion vom Frontal- in den Temporallappen befindet und zu kortikalen Anteilen der Amygdala, die gemeinsam zum Palaeocortex und zur Riechrinde im engeren Sinne gehören. Zudem sendet der LOT olfaktorische Projektionen zum entorhinalen Cortex, der vor allem in den Hippocampus projiziert (Gottfried et al., 2003). Von hier ziehen die Axone, umgeschaltet auf die 2. Neurone, zu zahlreichen nachgeordneten limbischen Zentren (innerer Mandelkernkomplex, Hippocampus) und zu telencephalen Rindengebieten (vordere Inselrinde, orbitofrontale Gyri) (Witt and Hansen, 2008).



**Abb. 6:** Schematische Übersicht über olfaktorische Projektionen: Fasern der Mitralzellen ziehen als Tractus olfactorius lateralis (LOT) zu sekundären olfaktorischen Strukturen. Diese senden dann vor allem Signale zum orbitofrontalen Cortex, zur Inselrinde, zum Hippocampus, zum Hypothalamus und zum Hirnstamm. Verbindungen aus dem Nucleus olfactorius anterior (AON) hemmen kontralaterale Körner- und periglomeruläre Zellen. (Trepel, 2003; Witt und Hansen, 2008).

### **1.1.3. Entwicklung und Regeneration**

#### **1.1.3.1. Entwicklung des Bulbus olfactorius**

Während der Embryonalentwicklung entstehen das Str. fibrosum externum und die EPL aus der Riechplakode (Streit, 2007). Die anderen Teile des OB stammen aus der Hirnanlage (Müller and O'Rahilly, 2004). Die Hauptentwicklung des OB findet (bei Insekten) in den ersten acht von 18 Entwicklungsschritten statt. Die Protoglomerulusbildung findet ab dem 5. Entwicklungsschritt statt, wenn die Axone der ORN in die Glia-schicht, die den primären OB umgibt, wachsen und beginnen getrennte protoglomeruläre Strukturen zu bilden (Oland et al., 1990). Die Entwicklung beginnt von dorsolateral nach ventromedial (Malun et al., 1994). Die darauf folgende Entwicklung wurde auch schon speziell bei Mäusen beobachtet. Die weitere Entwicklung der Glomeruli im caudalen Bereich bleibt derjenigen im rostralen ca 2-3 Tage zurück (Bailey et al., 1999). Einige Studien belegen, dass die Anzahl der Glomeruli noch einige Wochen nach der Geburt zunimmt (LaMantia and Purves, 1989; Pomeroy et al., 1990). Nachdem im 5. Entwicklungsschritt die Protoglomeruli die glomeruläre Schicht schon ausfüllen, wachsen im 9. Entwicklungsschritt ergänzend Axone der ORN nach (Sanes and Hildebrand, 1976). Dieses Wachstum ist als sehr wichtig für die normale Entwicklung des OB anzusehen (Tolbert and Sirianni, 1990; Willis et al., 1995). Die Axone, die von distal einsprossen, begünstigen die Entwicklung von den Glomeruli. Das spätere Ankommen der distalen Axone ist für die Innervationsschwelle zur Bildung des vollständigen Glomerulus wichtig (Tolbert and Sirianni, 1990). Proximale Axone tragen nur zu einer Teilmenge an Glomeruli bei, von denen dann auch die restlichen Glomeruli meist durch distale Axone gebildet werden (Tolbert and Sirianni, 1990).

Die Entwicklung des OB teilt man in zwei Phasen ein. In der ersten Phase entwickeln sich Mitral- und Büschelzellen. Sie entstehen in der Ventrikulären Zone und differenzieren sich an ihrer Endposition im OB (Hinds, 1968; Bayer, 1983). Wenn sich die Proliferation dieser Projektionsneurone verlangsamt, beginnt die zweite Phase mit dem Einwandern von GABAergen Interneuronen aus der SVZ über den RMS (Wichterle et al., 2001; Doetsch et al., 2002; Gritti et al., 2002; Vergano-Vera et al., 2006). Die meisten Interneurone wandern perinatal in den OB ein, ihre Migration wird aber lebenslang fortgesetzt (Altman, 1969; Bayer, 1985; Batista-Brito et al., 2008).

### 1.1.3.2. Regeneration und Homöostase

Die ORN sind in der Lage, sich ununterbrochen während des ganzen Lebens zu regenerieren (Thornhill, 1970; Graziadei and Monti Graziadei, 1979). Basalzellen des OE teilen sich in HBZ und GBZ. Aus ihnen gehen epitheliale (Stützzellen und Zellen der Ausführungsgänge der Bowman Drüsen) und neuronale Zellen (ORN) hervor. Die ORN gehen im OB mit Mitralzellen und PG synaptische Verbindungen ein (Leung et al., 2007); (Pinching and Powell, 1971b). Vermutlich bewirkt eine mangelnde Versorgung der ORN durch den OB eine gesteigerte Zellproliferation (Carr and Farbman, 1993). Zudem müssen vom OB überlebenswichtige Signale, zum Beispiel Wachstumsfaktoren, ausgehen. Außerdem können durch die Regeneration der ORN die Schäden durch Noxen, Traumata oder eintretende Infektionen, die über den OB und LOT bis in den Hirnstamm weitergeleitet werden können (Bodian, 1941), Gefahren minimieren und die Riechleistung aufrecht erhalten werden (Schwob, 2002). Die ORN des Riechepithels werden durchschnittlich 30 – 60 Tage alt. Allerdings nimmt der Umsatz mit dem Alter ab, so dass sie dann erheblich älter werden können (Farbman and Ezeh, 2000). Während des Lebens erhöht sich die Anzahl der ORN, was zur Folge hat, dass jede Mitralzelle mehr synaptische Verbindungen eingeht (Hinds and McNelly, 1981).

Vorläuferzellen von ORN werden im Überschuss produziert. Vermutlich durch fehlerhafte Zellteilung oder durch Mangel an Wachstumsfaktoren sterben viele kurz nach der Mitose ab (Farbman and Ezeh, 2000). Durch caspaseinduzierte Apoptose kommt es zum Abbau neuroepithelialer Zellen des Riechepithels.

Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Mitralzellen mit dem Verlust des LOT abnimmt. Dagegen nimmt die Proliferation der Basalzellen im OE bei experimenteller Durchtrennung des LOT im Durchschnitt um 22% zu (Weiler and Farbman, 1999). Außerdem steigt damit auch die Apoptoserate für die ORN (Carr and Farbman, 1992; Fung et al., 1997). Weiterhin benötigen die ORN den synaptischen Kontakt mit Mitralzellen für ihr Überleben (Weiler and Farbman, 1999).

#### Zellmigration

Im erwachsenen Gehirn ist die Zellmigration auf neuronale Vorläuferzellen vom Gyrus dentatus zum Hippocampus (Kaplan and Bell, 1984; Cameron et al., 1993; Seki, 2002) und von Neuroblasten der SVZ in den OB beschränkt (Luskin, 1993; Lois and Alvarez-Buylla, 1994).

Bei Nagern konnte gezeigt werden, dass die Stammzellen in der SVZ auch im ausgewachsenen Gehirn Interneurone erzeugen und diese über den RMS in den OB wandern. Zwischen 30.000 und 80.000 neugebildete Interneurone wandern jeden Tag über den RMS in die Körnerzellschicht im OB und machen dort ca 1% der gesamten Körnerzellpopulation aus (Kaplan and Bell, 1984; Peterson, 2002). Diese kontinuierliche Neurogenese scheint eine wichtige Rolle für die Erneuerung und Aufrechterhaltung des OB zu sein (Imayoshi et al., 2008).

In der SVZ befinden sich die meisten Stammzellen im ausgereiften Gehirn. Im Vergleich zu Vorläuferzellen im Gyrus dentatus müssen die Zellen aus der SVZ einen langen Weg über den RMS in den OB zurücklegen (Peretto et al., 2005).

Die SVZ wird durch eine Ependymzellschicht vom Lumen des Seitenventrikels getrennt (Doetsch et al., 1997; Doetsch et al., 1999). In der subependymalen Zone befinden sich die Somata der Astrozyten. Die apikalen Enden der Astrozyten reichen zum Ventrikel und die basalen Enden reichen bis zu Blutgefäßen und umhüllen die Neuroblasten (Mirzadeh et al., 2008). Durch die Integration von Signalen aus dem Blut und dem Liquor werden die Proliferation, die Differenzierung und die Migration kontrolliert (Lois et al., 1996). Zudem produzieren die Astrozyten ein Protein (Migration-inducing activity) welches die Geschwindigkeit der Migration reguliert (Mason and Goldman, 2002).

Im OB angekommen, wandern die neuronalen Vorläuferzellen in die Körnerzell- und periglomeruläre Schicht, wo sie sich weiter in GABAerge und dopaminerge Interneurone differenzieren (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Belluzzi et al., 2003; Carleton et al., 2003).

#### **1.1.4. Physiologie des Riechens**

Durch den Kontakt der Duftmoleküle mit den Rezeptoren, die zu den G-Protein - gekoppelten Rezeptorproteinen gehören, wird eine Transduktionskaskade aktiviert. Hochvariable Regionen auf den Chromosomen kodieren für die Ligandenbindungsstelle am Rezeptor (Krautwurst et al., 1998) und machen somit eine rezeptorspezifische Bindung möglich. Wird das G-Protein durch Bindung des Moleküls an den stereochemischen Rezeptor aktiviert, kommt es zur intrazellulären Aktivierung der Adenylatcyclase III und zum Umbau von ATP zu cAMP (second messenger). Der Anstieg von cAMP bewirkt die Öffnung einiger Ionenkanäle und den Einstrom von Kationen. Außerdem werden durch die Potentialänderung noch zusätzlich  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - Kanäle (CNG channels; zyklische Nukleotid-abhängige Kationen-Kanäle) geöffnet und so die intrazelluläre Calciumionenkonzentration erhöht (Schild and Restrepo, 1998) (Abb. 7).

Die dadurch entstandenen Rezeptorpotentiale summieren sich zu Aktionspotentialen. Diese werden dann über das Axon der ORN weitergeleitet und im OB und später in den zentralen Riechzentren weiterverschaltet. Alle ORN eines Glomerulus nutzen den gleichen Rezeptor und reagieren so einheitlich auf Gerüche (Mombaerts, 2004). Jeder Geruchsreiz aktiviert mehrere Typen von Rezeptorneuronen, so dass ein Geruch durch ein Muster glomerulärer Aktivität repräsentiert ist (Wachowiak et al., 2004).

Die meisten Rezeptoren senden Signale an die mediale und die laterale Seite eines Bulbus. Einige Rezeptoren projizieren jedoch nur auf einen Glomerulus, der sich ventral des OB befindet (Strotmann et al., 2004).

Die durch den Duftstoffreiz erhöhte Calciumionenkonzentration löst mehrere Rückkopplungsreaktionen aus. Diese beenden die elektrische Erregung und leiten die Adaptation ein. Calciumionen binden an Calmodulin. Dieser Komplex (CaM) verringert die cAMP Empfindlichkeit und schließt dadurch die CNG-Kanäle. Durch diese Prozesse ist die Zelle adaptiert und sie ist nicht mehr so leicht erregbar.

**Abb. 7:** Olfaktorische Signaltransduktion. Duftmoleküle aktivieren, an G-Protein gekoppelt, eine Enzymkaskade. Diese führt zur Öffnung der CNG-Kanäle und so zum Einstrom von Kationen. Diese depolarisieren die Zelle (aus Witt and Hansen, 2008).

## 1.2. Taurin

Taurin (TAU, 2-Aminoethansulfonsäure) ist nach Glutamat die zweithäufigste freie Aminosäure (Aminosulfonsäure) im Gehirn (Kuriyama et al., 1983; Pow et al., 2002). Im Gehirn übersteigt Taurin die intrazelluläre Konzentration von GABA (Huxtable and Chubb, 1976). Auch andere Gewebe wie Skelett- und Herzmuskulatur haben eine hohe Taurinkonzentration. Taurin ist im Säugerorganismus ein ubiquitärer Bestandteil aller Zellen.

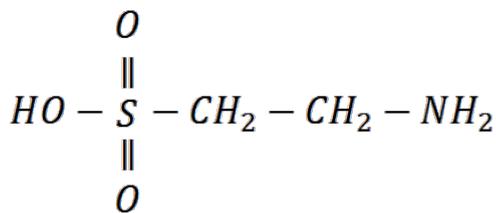


Abb. 8: Taurin

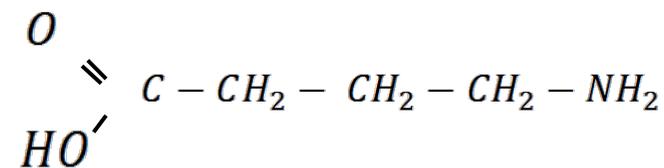


Abb. 9: GABA

Im OB wurde Taurin in den Axonen der ORN, in verschiedenen Neuronen und in Astrozyten (Kratskin et al., 2000; Pow et al., 2002) nachgewiesen. Primäre olfaktorische Synapsen und einige postsynaptische Dendriten enthalten auch Taurin und Glutamat (Didier et al., 1994). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der olfaktorischen Rezeptoren im Frühstadium (Steullet et al., 2000). Taurin entsteht durch Oxidierung mit dem Enzym Hypotaurin-Dehydrogenase aus Hypotaurin, welches aus Methionin und Cystein über das Enzym CSAD (cystein sulfinic acid decarboxylase) durch Decarboxylierung hervorgeht (Pow et al., 2002). Da Taurin an der Stelle einer Carboxylgruppe eine Sulfonsäuregruppe besitzt, kann es keine Peptide binden. Dadurch können auch keine Polypeptidketten aufgebaut werden und somit ist Taurin vor allem in freier Form vorhanden (Huxtable, 1992).

Durch die hohe Hydro- und geringe Lipophilie kann Taurin nur durch Transportsysteme (*TAUT*) durch Lipiddoppelmembranen transportiert werden (Liu et al., 1992; Smith et al., 1992). Bei einem physiologischen pH liegt es als Zwitterion vor. Die Syntheseleistung von Taurin in den meisten Geweben, zum Beispiel Herz und Skelettmuskel, ist stark eingeschränkt, so dass die Gewebe auf die extrazelluläre Taurinaufnahme via *TAUT* angewiesen sind. Diese ionenabhängigen Transportsysteme konnten ubiquitär in Geweben von Säugetieren nachgewiesen werden (Uchida et al., 1992). Die Taurinkonzentration im Plasma ist bis zu 100mal niedriger als im Gewebe, so dass der Taurintransport vom Plasma in das Gewebe entgegen einem großen Konzentrationsgefälle geschieht.

Neben den allgemeinen Funktionen (Tab. 1) agiert Taurin ähnlich GABA (Gammaaminobuttersäure) und Glycin wie ein inhibitorischer Neurotransmitter (Frederickson et al., 1978; Wang et al., 1998). Taurin ist kein klassischer Neurotransmitter, es wird mehr als Neuromodulator gesehen, da es weder spezifisch bindet, noch sich die Konzentration durch Depolarisation von Nervenenden erhöht (Salceda and Pasantes-Morales, 1982; Haroutounian and Petrosian, 1998). Durch pharmakologische Stimulation von Glutamatrezeptoren über die NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptoren konnte die extrazelluläre Taurinkonzentration erhöht werden (Kamisaki et al., 1996).

<b>Funktion</b>	<b>Organ/Gewebe</b>	<b>Literatur</b>
Osmoregulation	Lunge, Niere, Gehirn, Haut	Alfieri et al., 2002; Beck et al., 1998; Brust et al., 1992; Chesney, 1985; Huxtable, 1992; Janeke et al., 2003; Oja und Saransaari, 1996; Solis et al., 1988; Thurston et al., 1980; Timbrell et al., 1995; Uchida et al., 1991
Bildung von Gallensalzen	Leber	Chesney, 1985; Huxtable, 1992; Oja und Saransaari, 1996
Membranstabilisierung	Retina, Herz, Muskeln, Lymphozyten	Chesney, 1985; Huxtable, 1992; Kendler, 1989; Lombardini, 1985; Oja und Saransaari, 1996; Redmond et al., 1998; Timbrell et al., 1995; Wright et al., 1986
Schutz vor Apoptose	Lunge	Alfieri et al., 2002
Neuromodulator/ -protektion/ -inhibitor/ -transmitter	Gehirn, Nervensystem	Barakat et al., 2002; Chesney, 1985; Kuriyama, 1980; Lin et al., 1985; Oja und Saransaari, 1996; Okamoto et al., 1983; Taber et al., 1986
Antioxidans	Spermien, Haut, Auge	Alvarez und Storey, 1983; Değim et al., 2002; Huxtable, 1992; Pasantes-Morales und Cruz, 1985; Redmond et al., 1998; Wright et al., 1986
Calciummodulation	Retina, Herz, Haut, Lymphozyten	Chesney, 1985; Huxtable, 1992; Lobo et al., 2001; Lombardini, 1985, 1991; Redmond et al., 1998; Satoh und Sperelakis, 1998; Timbrell et al., 1995
Antikonvulsivum	Gehirn	Chesney, 1985; Huxtable, 1992
Schutz vor toxischen Stoffen/Entgiftung	Lunge, Leber	Gordon et al., 1986; Huxtable, 1992; Nakashima et al., 1982; Timbrell et al., 1995; Wright et al., 1986
Einfluss auf die Herzfrequenz/Kardioprotektion	Herz	Huxtable et al., 1980; Satoh, 1998
Thermoregulation	Gehirn	Frosini et al., 2003; Huxtable, 1992
Erhöhung der Wasserlöslichkeit/Bioverfügbarkeit von Lipiden	Retina, Blutplättchen	Petrosian und Haroutounian, 2000
Immunmodulation	Blut	Redmond et al., 1998
Radioprotektion		Huxtable et al., 1982
Zellproliferation		Kendler, 1989
Proteinstabilisierung		Arakawa und Timasheff, 1985

**Tab. 1:** Allgemeine Funktionen von Taurin; (Janeke et al., 2003)

Taurin bewirkt die Freisetzung anderer Neurotransmitter im Gehirn (Muramatsu et al., 1978; Kontro et al., 1984). Dieser Effekt wurde als erstes zwischen Taurin und GABA im OB beschrieben (Kamisaki et al., 1996). Hierbei spielt Taurin eine dämpfende Rolle bei der potentialgetriggerten GABA Freisetzung im präsynaptischen Spalt über den GABA<sub>B</sub> Rezeptor. Dieser ist ein G-Protein- gekoppelter Rezeptor, der durch Aktivierung Kaliumkanäle öffnet und so zu einer Hyperpolarisierung der Zellmembran führt. Dies hemmt präsynaptisch die Transmitterausschüttung. Außerdem ist Taurin ein Agonist an der GABA-Bindungsstelle des GABA<sub>A</sub> Rezeptors, der ein ligandengesteuerter Chloridkanal ist. Dieser Effekt kommt vor allem bei Mitral- und Büschelzellen vor. Dadurch steigt die Chloridionenleitfähigkeit dieser Zellen (Belluzzi et al., 2004). Diesen hyperpolarisierenden Effekt löst Taurin selektiv nur bei GABA<sub>A</sub> Rezeptoren mit den Untereinheiten alpha 1 und beta 2 aus. Es gibt insgesamt 15 verschiedene GABA<sub>A</sub> Rezeptoren, die sich in der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten unterscheiden (Laurie et al., 1992; Persohn et al., 1992; Fritschy and Mohler, 1995). In vitro konnte gezeigt werden, dass Mitralzellen reversibel durch die Gabe von Taurin gehemmt werden können. Dies konnte durch GABA<sub>A</sub>-, jedoch nicht durch GABA<sub>B</sub> Antagonisten, aufgehoben werden. GABA beeinflusst die Umschaltung der Signale von außen an den Mitralzellen über die GABA<sub>A</sub> und GABA<sub>B</sub> Rezeptoren. GABA limitiert die Depolarisation von Mitralzellen über GABA<sub>A</sub> Rezeptoren in der GL und verändert so deren Empfindlichkeit gegenüber Signalen von außen (Duchamp-Viret et al., 2000).

#### Taurintransporter (*TAUT*) und Osmoregulation

Es konnten bereits Taurintransportersysteme in verschiedenen Geweben wie Leber (Bucualas et al., 1987), Plazenta (Kulanthaivel et al., 1991), im Darm (O'Flaherty I, 1997), Retina (Miyamoto et al., 1991; Leibach et al., 1993), Niere (Jessen and Sheikh, 1991), Blut-Hirnschranke (Tamai et al., 1995) und in Gliazellen (Tchoumkeu-Nzouessa and Rebel, 1996; Barakat et al., 2002) nachgewiesen werden. Der *TAUT* gehört zu der Na<sup>+</sup>- Cl<sup>-</sup> – abhängigen Neurotransmitter Transporter Familie SLC6 (Chen et al., 2004).

Aufgrund von elektrischen Potentialen über Membranen und dem damit verbundenen Ionentransport kann es zu einer Hyper- oder Hypoosmolarität im Extrazellulärraum kommen. Dieses Ungleichgewicht der Osmolarität würde zur Schrumpfung der Zelle oder zum Einreißen der Membran führen (Huxtable, 1992). Unter hyperosmotischen extrazellulären Bedingungen kommt es zu einer vermehrten Bildung von *TAUT*-mRNA.

Die dadurch erhöhte Transportkapazität bewirkt eine gesteigerte Aufnahme von Taurin in die Zelle. Dagegen kommt es bei Hypoosmolarität zu einer verminderten Bildung von *TAUT*-mRNA. Daraus folgt eine schnellere Freisetzung von Taurin aus der Zelle (Warskulat et al., 1997; Chen et al., 2004). Dadurch wirkt Taurin osmoregulatorisch.

Ein Taurinmolekül wird gemeinsam mit einem Chloridion und zwei bis drei Natriumionen in die Zelle transportiert. Hierbei handelt es sich um einen elektrogenen sekundär aktiven Co-Transporter (Tchoumkeu-Nzouessa and Rebel, 1996). Durch dieses Transportsystem können Gradienten von 1:500 für das Gehirn und 1:400 für die Retina (extra- zu intrazellulär) aufgebaut werden. Die mit Taurin cotransportierten Natriumionen werden über die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase wieder nach extrazellulär befördert.

Taurin spielt in der Leber eine entscheidende Rolle bei der Osmoregulation und der Phagozytose (Kupffer'sche Sternzellen) (Warskulat et al., 2007).

### TAUT-Knockout Modell

Ein transgenes Tiermodell zur Untersuchung der Taurinwirkungen stellt die Inaktivierung der Gene dar, die für die Taurintransporterproteine kodieren und somit zu einem intrazellulären Taurinmangel führen.

Die ersten *TAUT*-Knockout Mäuse wurden 2002 beschrieben. Die Entfernung des Exon 1 vom Taurintransporter-Gen führte zu einer Abnahme der kodierten Aminosäuren von 621 (Wildtyp, *taut* +/+) auf 450 (Knockouttyp, *taut* -/-) und so zu einem Verlust der *TAUT* Funktionen (Heller-Stilb et al., 2002b). Das Gewicht der *taut* -/- Mäuse ist geringer als das der Wildtypmäuse (Heller-Stilb et al., 2002b). Die Taurinkonzentration ist in *taut* -/- Tieren stark reduziert. Die Abnahme der Konzentration ist gewebeabhängig: im Skelett- und Herzmuskel bis zu 98%, im Gehirn, der Niere und der Retina bis zu 80-90% und in der Leber bis zu 70% (Heller-Stilb et al., 2002b; Warskulat et al., 2004). Außerdem ändert sich bei *taut* -/- Tieren die Expression von Neurorezeptoren (Oermann et al., 2005), die Entwicklung des Hörens (Rascher et al., 2004) und Sehens (Heller-Stilb et al., 2002a; Rascher et al., 2004) und die olfaktorischen Funktionen (Witt et al., 2004). Außerdem führt Taurinmangel bei *taut* -/- Mäusen zu chronischer Leberzirrhose (Warskulat et al., 2007) und zur Beeinträchtigung der Wasserausscheidung (Huang et al., 2006). *Taut* -/- Mäuse sind in der Fortpflanzung beeinträchtigt. Obwohl Taurin nicht an der Proteinbiosynthese beteiligt ist, ist es bei Wildtypen in Oozyten, Ovar und Uterus in hohen Konzentrationen zu finden (Dumoulin et al., 1997).

Außerdem ist Taurin im Sperma vorhanden und dort für die Beweglichkeit mitverantwortlich (Alvarez and Storey, 1983). Daraus resultiert eine größere Infertilität von *taut* -/- Mäusen.

Dies alles lässt schlussfolgern, dass Störungen des Taurintransportersystems zu verschiedenen altersabhängigen Krankheiten mit Apoptose führen.

Der Taurinmangel im Skelettmuskel beeinträchtigt die Funktion der Muskeln, wohingegen die Herzfunktion weitgehend unbeeinflusst bleibt (Warskulat et al., 2004). Die Beeinträchtigung der *taut* <sup>-/-</sup> Skelettmuskelzelle kommt durch reduzierte osmotische Regulationsfähigkeit, vermehrter Zellstress und fehlende Regulation des Calciumhaushaltes (Kontraktion) zu Stande. Es folgt eine Atrophie, die histologisch als Myofibrillendestabilisation nachgewiesen werden konnte (Ito et al., 2008). Zudem konnten im Skelettmuskel von *taut* <sup>-/-</sup> Tieren ultrastrukturelle Anomalien hinsichtlich der Filamente und Fettkörperchen gezeigt werden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Taurinmangel vor allem zur Destabilisierung von Myofilamenten oder im Zytosol befindlichen Zellorganellen führt (Ito et al., 2010).

Dagegen ist die Herzmuskelzelle fähig, die fehlende Taurinkonzentration zu kompensieren. Die Gründe, warum nur die Herzmuskelzelle fehlendes Taurin ersetzen kann, sind noch nicht bekannt.

Taurin spielt in der Leber eine entscheidende Rolle bei der Osmoregulation und der Phagozytose (Kupffer'sche Sternzellen) (Warskulat et al., 2007). Kupffer'sche Sternzellen und Sinusoidalzellen zeigen einen Rückgang der Taurinkonzentration von 80% bei Knockouttieren. *Taut* <sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln unspezifische Hepatitiden und Leberfibrosen (Warskulat et al., 2007). Bei über 80% der zweijährigen *taut* <sup>-/-</sup> Tiere, aber nur 20% der Wildtypiere sind Leberentzündungen und Fibrosen nachweisbar. Durch den gesteigerten Verlust an Hepatozyten kommt es bei Mäusen mit Leberfibrose zu einer erhöhten Zellproliferation (Warskulat et al., 2006).

## 2. Ziel und Fragestellung

Die gravierendsten Unterschiede zwischen Taurintransporterknockout- (*taut -/-*) und Wildtypmäusen (*taut +/+*) gibt es in der Retina. Zwei Wochen postnatal ist die Anzahl der Photorezeptorenreihen bei den *taut -/-* Mäusen noch annähernd normal. Innere und äußere Photorezeptorenschicht sind klar voneinander zu unterscheiden und bereits etwas kleiner als bei *taut +/+* Mäusen. Die Amplituden im Elektroretinogramm (ERG) sind schon bei 2 Wochen alten *taut -/-* Mäusen um ein Drittel kleiner als bei *taut +/+* Mäusen, was die Vermutung einer eingeschränkten Sehfähigkeit zulässt (Heller-Stilb et al., 2002a). Eine Woche später beträgt die Höhe der Amplituden im ERG der Knockouttiere nur noch 10 bis 15% der von den Wildtypmäusen. Bei einem Monat alten *taut -/-* Tiere ist die Anzahl der Photorezeptoren durch Apoptose stark reduziert, was zu einem völligen Funktionsverlust und damit zur Erblindung führt (Heller-Stilb et al., 2002a). Der höchste Taurinanteil der Retina befindet sich in den Photorezeptoren (Huxtable, 1992; Pow et al., 2002). Daher lässt sich schlussfolgern, dass die Degeneration der Photorezeptoren von *taut -/-* Mäusen durch Taurinmangel zu Stande kommt (Hayes et al., 1975). Störungen von strukturellen, metabolischen und transduktionellen Prozessen führen vor allem zu Retinadegeneration (Hafezi et al., 2000).

In der Riechschleimhaut haben die ORN, die im Unterschied zu Photorezeptoren zeitlebens zur Regeneration befähigt sind, normalerweise eine Lebensdauer zwischen 30 und 120 Tagen. Die Struktur des OE von *taut -/-* scheint sich nicht von *taut +/+* zu unterscheiden (Witt et al., 2004). Im Vergleich zur Retina gibt es prima vista keine auffallende Zelldegeneration. Elektrophysiologische und immunhistochemische Untersuchungen zeigten allerdings veränderte Antworten auf Zellstress und veränderte Zelldynamik (Witt et al, 2004; Warskulat et al., 2007). Es konnten höhere Proliferationsraten, als Folge des fehlenden Taurins, und höhere Apoptoseraten im OE von *taut -/-* Mäusen festgestellt werden. Elektroolfaktographische Untersuchungen (EOG) zeigten geringere Amplituden bei den *taut -/-* Mäusen. Dies legt nahe, dass die Beeinträchtigung der Wahrnehmung von chemischen Stoffen das Hauptmerkmal des Taurinmangels im ORN ist (Witt et al. 2004).

Nach der Charakterisierung des peripheren Riechsystems ist das Anliegen der vorliegenden Arbeit, zunächst immunhistochemisch zu untersuchen, ob es differentielle Unterschiede auch in der ersten Station des zentralen Riechsystems, im OB, zwischen *taut -/-* und *taut +/+* gibt.

Hierbei sollen die OB morphometrisch untersucht und zwischen den *taut -/-* und *taut +/+* Mäusen verglichen werden. Besonderes wichtig scheint hierbei die Beurteilung der

1. Größe des Bulbus
2. Anzahl der Mitralzellen und der Glomeruli, sowie deren Verhältnis zueinander
3. Durchschnittsfläche pro Mitralzelle und Glomerulus
4. Apoptose- und Proliferationsraten

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Tiere

Die Herstellung, Aufzucht und Tötung der Tiere erfolgte an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Heller-Stilb et al., 2002b). Die Taurintransporter - Knockout Mäuse (*taut* <sup>-/-</sup>) wurden durch homologe Rekombination hergestellt. Sie hatten einen gemischten genetischen Hintergrund (C57Bl/6 x 129/SvJ) (Heller-Stilb et al., 2002b). Als Kontrolltiere dienten Wildtypmäuse.

Die Mäuse wuchsen bei gleicher Ernährung und einem 12 – 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus auf. Sie bekamen Wasser ad libitum. Die Tiere wurden entsprechend den Regeln und Richtlinien der lokalen Ethikkommission gehalten. Wir verwendeten nur männliche Tiere, um den Einfluss geschlechtsspezifischer Unterschiede zu vermeiden (Guillamon et al., 1988; Collado et al., 1990; Segovia and Guillamon, 1993; Peretto et al., 2001; Weruaga et al., 2001).

Verwendete Tiere:

	Alter				Anzahl
	3 Wochen	6 Wochen	10 Wochen	Alt	
<i>taut</i> <sup>+/+</sup>	3	3	3	1 (80Wo)	10
<i>taut</i> <sup>-/-</sup>	3	3	3	1 (60Wo)	10

**Tab. 2:** Verwendete Mäuse; *taut* <sup>+/+</sup> Wildtyp, *taut* <sup>-/-</sup> KO-Typ

## **3.2. Gewinnung der Schnitte und Färbung**

### **3.2.1. Gewinnung der Schnitte**

#### **3.2.1.1. Präparation und Grobzuschnitt der Proben**

Die Mäuse wurden am Zuchtort (Düsseldorf) mit Na-Pentobarbital tief anästhesiert und mit einer Lösung aus 4% Paraformaldehyd ( $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ ) und 0,5% Glutaraldehyd ( $\text{HCO}(\text{CH}_2)_2\text{CHO}$ ) perfundiert (Heller-Stilb et al., 2002a). Danach wurden sie dekapitiert und die Köpfe für weitere 24 Stunden in einer gleichartigen Lösung belassen. Anschließend wurden sie uns in 0,1 M PBS (phosphate-buffered saline) zugeschickt.

Wir beurteilten das Präparat äußerlich auf Vollständigkeit, pathologische Veränderungen und Präparationsschäden. Anschließend durchtrennten wir beidseits die Masseter und entfernten den Unterkiefer vom Schädel. Danach wurde der Schädel median-sagittal geteilt, die beiden Schneidezähne entfernt und der Schädel gründlich von Restgewebe befreit. Nach beidseitiger Entfernung der frontalen, hochfrontalen, temporalen und parietalen Knochen des Schädels konnten der rostrale Anteil des Großhirns sowie die Bulbi olfactorii dargestellt werden.

#### **3.2.1.2. Entkalkung und Einbettung des Gewebes**

Nach einer neuerlichen Spülung in PBS, dekalzifizierten wir die Köpfe bei Raumtemperatur größenadaptiert für 6 bis 24 Stunden in 1% Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA [ $((\text{HOOCCH}_2)_2\text{NCH}_2)_2$ ]). Danach folgte eine Spülung in Aqua dest. und die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Aqua dest., 40%iger, 70%iger-, 96%iger- und absoluter Alkohol, je zwei Stunden). Zunächst wurden die Präparate in sagittaler Richtung orientiert, um auf einem Schnitt das Riechepithel und den OB sichtbar machen zu können. Dieses Verfahren war für die Evaluierung der Riechschleimhaut durchgeführt worden (Witt et al., 2004). Danach orientierten wir die Präparate in der Gussform in frontaler Ausrichtung neu und füllten diese erneut mit Paraplast. Die frontale Schnittführung hat den Vorteil, dass sowohl der mediale, als auch der laterale Teil des OB auf einem Schnitt beurteilt werden kann (Laing et al., 1984).

### **3.2.1.3. Schnitte**

Am Mikrotom (Leica Jung RM 2065) erfolgte eine frontale Schnitfführung mit 20µm dicken Schnitten von caudal bis zum beginnenden OB. Wir kontrollierten dies regelmäßig mit dem Mikroskop (Leitz-Biomed-Mikroskop). Im Zielgebiet fertigten wir zwischen 120 und 180 Serienschnitte von je 10µm Dicke. Diese wurden auf ein 55°C heißes Wasserbad übertragen. Nach der Glättung zogen wir sie auf silanisierte Objektträger (Anhang: Silanisierung) auf. Auf zwei folgende Objektträger (OT) kamen jeweils acht Serienschnitte für die Immunmarkierung und auf den dritten OT zogen wir einen Kontrollschnitt für die Hämaunfärbung auf.

### **3.2.2. Färbung**

#### **3.2.2.1. Hämatoxylinfärbung**

Jeder dritte OT mit einem Serienschnitt wurde mit Hämatoxylinfärbung (Anhang: Hämaunherstellung) gefärbt. Dies diente zur Sicherstellung der Qualität, so dass alle quantitativ auszuwertenden Serienschnitte denselben Startpunkt hatten.

Zur Entparaffinierung tauchten wir die Schnitte dreimal je fünf Minuten in Xylol [ $C_6H_4(CH_3)_2$ ]. Danach folgten Spülungen in der absteigenden Alkoholreihe bis zum Aqua dest. (dreimal absoluter Alkohol, dreimal 96%iger Alkohol, einmal 70%iger und einmal 40%iger Alkohol, je zwei Minuten). Nach einer nochmaligen Spülung in Aqua dest., wurden die OT in das Hämatoxylin für zehn Minuten getaucht. Anschließend kamen sie für zehn Minuten in Leitungswasser zum „bläuen“ und wurden durch Spülungen in der aufsteigenden Alkoholreihe (1x 40%iger, 1x 70%iger, 3x 96%iger und 3x absolute Alkohol) entwässert. Danach deckelten wir sie mit Depex (Serva Electrophorese GmbH; Heidelberg, Deutschland) ein.

### 3.2.2.2. Immunhistochemische Reaktion

#### 3.2.2.2.1. Materialien

Für die immunhistochemische Reaktion benötigten wir als Gebrauchslösungen Citratpuffer und PBS (Anhang: Citrat- und PBS Herstellung).

Jeder zweite OT mit acht Serienschnitten wurde für die quantitative und qualitative Auswertung mit einem polyklonalen Antikörper (PAK) gegen Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5 als ersten Antikörper (AK)) inkubiert. Für das Normalserum, den zweiten AK (Anti-Rabbit) und den Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) benutzen wir das gebrauchsfertige Kit von Vectastain (Linaris Biologische Produkte GmbH; Wertheim; Deutschland). Als ersten AK für die Untersuchung der Proliferation nutzten wir den Anti Ki-67 und für die Apoptose Anti Caspase 3.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
PGP 9.5	1:10000	Biotrend, Köln, Deutschland
Anti Ki-67	1:10	Tec 3, Dako, Hamburg, Deutschland)
Anti Caspase 3	1:20	CellSignaling Technology, Beverly, USA

**Tab. 3:** Übersicht über Antikörper für Immunhistochemische Reaktion

### 3.2.2.2.2. Reaktionsprozedur

Jeder zweite OT mit acht Serienschnitten wurde für die quantitative und qualitative Auswertung verwendet.

Die ausgewählten Schnitte wurden entparaffiniert, über eine absteigende Alkoholreihe hydriert und nach anschließender zweimaliger Aqua-dest.-Spülung zweimal für jeweils fünf Minuten in der Mikrowelle im Citratpuffer (0,05 Mol/l, pH 6) bei anfangs 1000 Watt, später bei 300 Watt gekocht (Micromat von AEG). Durch das Kochen wurden die Epitope für eine spätere Bindung mit dem Primärantikörper zugänglich gemacht (Taylor et al., 1994).

Nach einer 15 Minuten dauernden Abkühlungsphase im Citratpuffer und einer Spülung mit Aqua dest, wurden die OT zweimal je fünf Minuten mit PBS gespült. Für die Darstellung der Antigene im Gewebe wendeten wir eine indirekte Immunperoxidasetechnik an (Hsu and Fanger, 1981). Zunächst wurden endogene Peroxidasen mit 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS unterdrückt (30 Min). Danach haben wir die OT zweimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen und anschließend für 20 Minuten auf jeden Schnitt 30 µl Normalserum (1:68, gebrauchsfertig von Vectastain, Linaris Biologische Produkte GmbH; Wertheim; Deutschland) aufgetragen. Danach wurden die Schnitte mit dem entsprechenden ersten AK über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann haben wir die OT in PBS gespült und den zweiten AK, für 45 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer, aufgetragen (Anti-Rabbit IgG 1:400, Vector Burlingame, Ca, USA). Nach einer weiteren Spülung wurden die Schnitte mit dem gebrauchsfertigen ABC (1:25, Vectastain) für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Spülzyklus mit PBS trugen wir auf die Schnitte mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-aktiviertes und mit PBS 1:10 verdünntes 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochloriddihydrat (DAB) für je fünf Minuten auf. Die Entwicklung stoppten wir mit Aqua dest. Zur besseren Orientierung wurden die Schnitte noch mit Hämalaun für 20 Sekunden gegengefärbt. Für die anschließende Entwässerung durchliefen die OT die aufsteigende Alkoholreihe (1x 40%iger, 1x 70%iger, 3x 96%iger und 3x absolute Alkohol) bis zum Xylol. Danach wurden sie mit Depex eingedeckelt.

### 3.2.2.2.3. Kontrolle

Bei jeder immunhistochemischen Reaktion wurde auf einen Schnitt anstelle des Primärantikörpers PBS gegeben. Alle weiteren Schritte, Sekundärantikörper, ABC-Inkubation und DAB Entwicklung, wurden wie in Abschnitt 3.2.2.2. beschrieben, durchgeführt. Dies diente der Kontrolle, dass der Primärantikörper spezifisch bindet.

## **3.3. Mikroskopische Datenerhebung**

### **3.3.1. Qualitative Auswertung**

#### **3.3.1.1. PGP 9.5**

PGP 9.5 wurde im Zytoplasma von Neuronen und neuroendokrinen Zellen gefunden und eignet sich deshalb gut als Marker für diese (Doran et al., 1983; Kent and Rowe, 1992; Johnson et al., 1994; Nakajima et al., 1996). Mit PGP 9.5 lassen sich vor allem Mitralzellen, Büschelzellen und Interneurone gut darstellen (Nakajima et al., 1996). Dies nutzten wir für die quantitative Auszählung, da wir so die Mitralzellen von den umliegenden Zellen gut unterscheiden konnten.

#### **3.3.1.2. Ki-67**

Die Expression von Ki-67 Protein ist stark mit der Zellproliferation assoziiert. Das Protein ist in allen aktiven Zellphasen vom Zellzyklus (G1; G2 und Mitose) vorhanden und dadurch ein exzellenter Marker für Zellteilung und Wachstum. Wir untersuchten, ob es im OB Zellproliferation gab und inwieweit sie sich in den Vergleichsgruppen unterschieden. (Scholzen and Gerdes, 2000).

#### **3.3.1.3. Caspase 3**

Caspase 3 ist ein Enzym des programmierten Zelltodes und damit ein Marker für Apoptose. (Cowan and Roskams, 2002). Es gehört zur Gruppe der Interleukin-1 Enzyme.

### 3.3.2. Quantitative Auswertung

Neben der qualitativen Auswertung untersuchten wir quantitative Unterschiede zwischen *taut +/+* und *taut -/-* Mäusen, vor allem Unterschiede in der Bulbusgröße, Anzahl der Mitralzellen und der Glomeruli sowie deren Verhältnis zueinander. Darüber hinaus bestimmten wir die Durchschnittsfläche für eine Mitralzelle und einen Glomerulus.

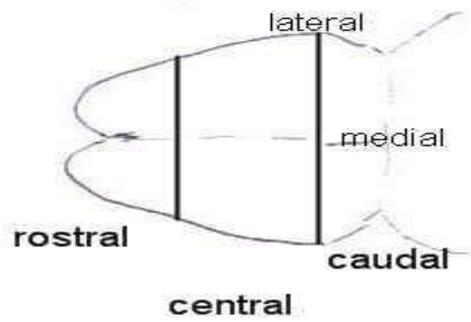
Die mikroskopische Auswertung und die Zählungen wurden am Olympus BX 60 F5 Mikroskop (Tokio, Japan) mit Plan-Apo-Objektiven mit Vergrößerungen von 20-fach bis 40-fach durchgeführt und mit einer CCD - Kamera (F-View soft imaging System) fotografiert. Die Auswertung wurde durch das Analysesystem ANALYSIS 3.1. (Olympus) unterstützt. Wir untersuchten zehn männliche Knockouttyp- und zehn männliche Wildtypmäuse, von denen je drei 21 Tage, drei 42 Tage, drei 70 Tage und eine 60 (*taut -/-*) bzw. 80 Tage (*taut +/+*) alt waren.

Um Ungenauigkeiten beim Zählen und Messen zu vermeiden, haben wir nur gerade und gleich dicke Schnitte ausgewertet.

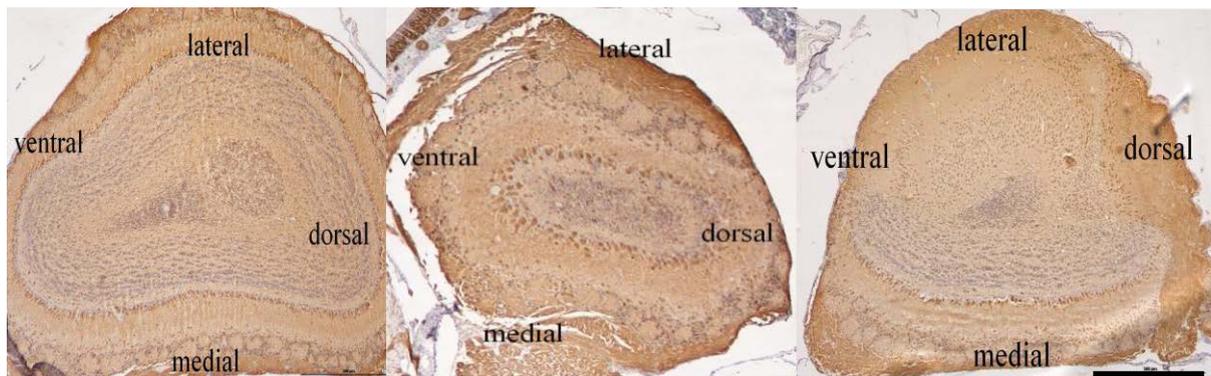
#### 3.3.2.1. Einteilung des Bulbus olfactorius

Es wurde jeweils ein Bulbus pro Maus ausgewertet. Entscheidende Kriterien, ob der rechte oder der linke OB ausgemessen und ausgezählt wurde, waren die Qualität der Schnitte und der Färbung, sowie die Vollständigkeit des OB.

Ausgewertet wurden die OT, die immunhistochemisch mit PGP 9.5 gefärbt wurden (10 bis 12 OT pro Tier). Zur Beurteilung eventueller lokaler Differenzen haben wir den OB in verschiedene Bereiche eingeteilt. Wir analysierten jeweils einen medialen und einen lateralen Teil auf je 400 µm Länge in antero-posteriorer Richtung. Außerdem teilten wir den OB in einen caudalen, centralen und rostralen Anteil ein (Abb. 10). Zur Orientierung nutzten wir die Objektträgeranzahl und markante Stellen wie Frontalhirn oder Riechschleimhaut. Somit wurden bei jedem OB sechs separate Bereiche (caudal medial, central medial, rostral medial, caudal lateral, central lateral und rostral lateral) ausgewertet und die Durchschnittswerte für jeden Bereich, lateral, medial und für den gesamten OB bestimmt (Abb. 11).



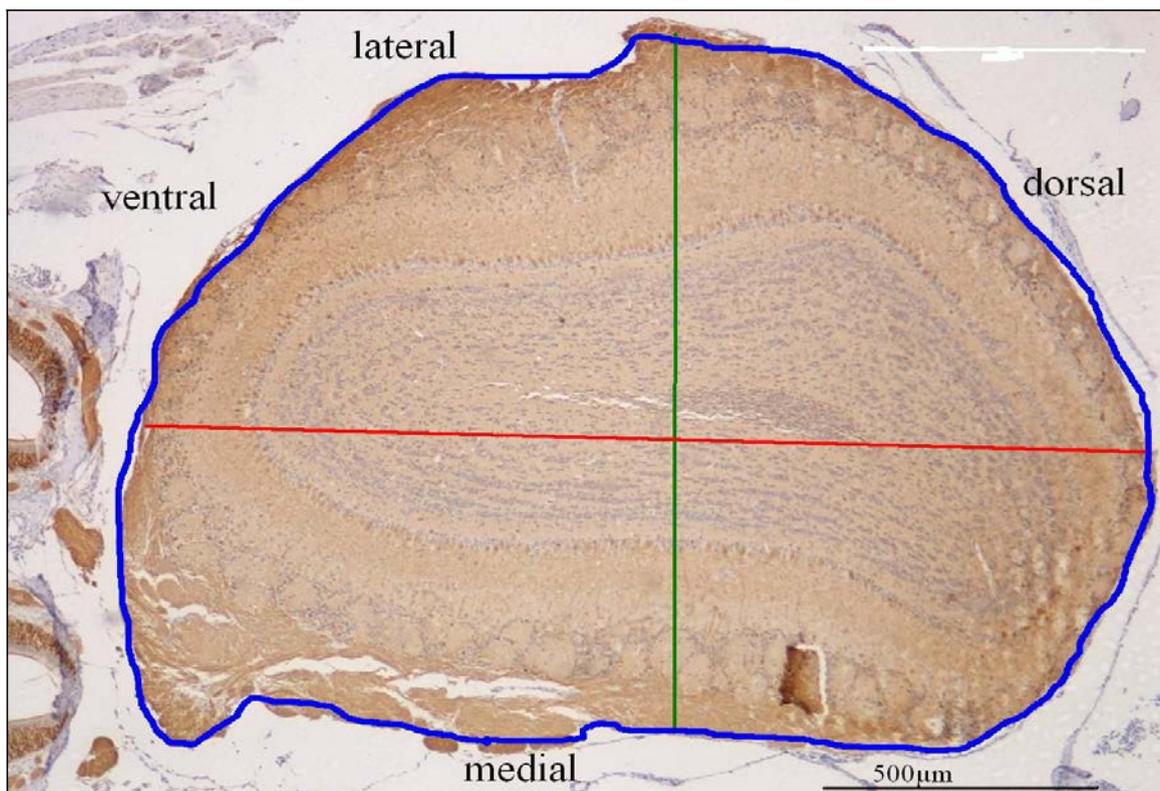
**Abb. 10:** OB von dorsal, Darstellung der Einteilung in medial/lateral und central/caudal/rostral



**Abb. 11:** Querschnitte des OB (von links nach rechts: rostral, central & caudal) Maus, PGP 9.5 immunohistochemische Färbung, Balken entspricht 500µm

### 3.3.2.2. Länge und Querdurchmesser des Bulbus olfactorius

Es wurden jeweils die drei Querschnitte pro Maus ausgewählt, in denen der OB die größte Höhe (ventral-dorsal) und den größten Querdurchmesser (medial-lateral) besaß und mit dem 20er Objektiv fotografiert. Danach wurden der Quer- und der Längsdurchmesser, sowie die Fläche des OB an seiner größten Ausdehnung mit Hilfe des ANALYSIS Programms bestimmt und pro Maus gemittelt (Abb. 12).



**Abb. 12:** Zur Bestimmung des ventro-dorsalen Durchmessers (Höhe; rot) & des Querdurchmessers (grün) sowie der Gesamtfläche (blau); Maus, PGP 9.5 immunhistochemische Färbung, Balken entspricht 500µm

### 3.3.2.3. Zählungen

Um quantitative Unterschiede des OB zwischen *taut -/-* und *taut +/+* Tieren feststellen zu können, haben wir auf einer Strecke von 400µm jeweils die Anzahl der Mitralzellen und der Glomeruli bestimmt.

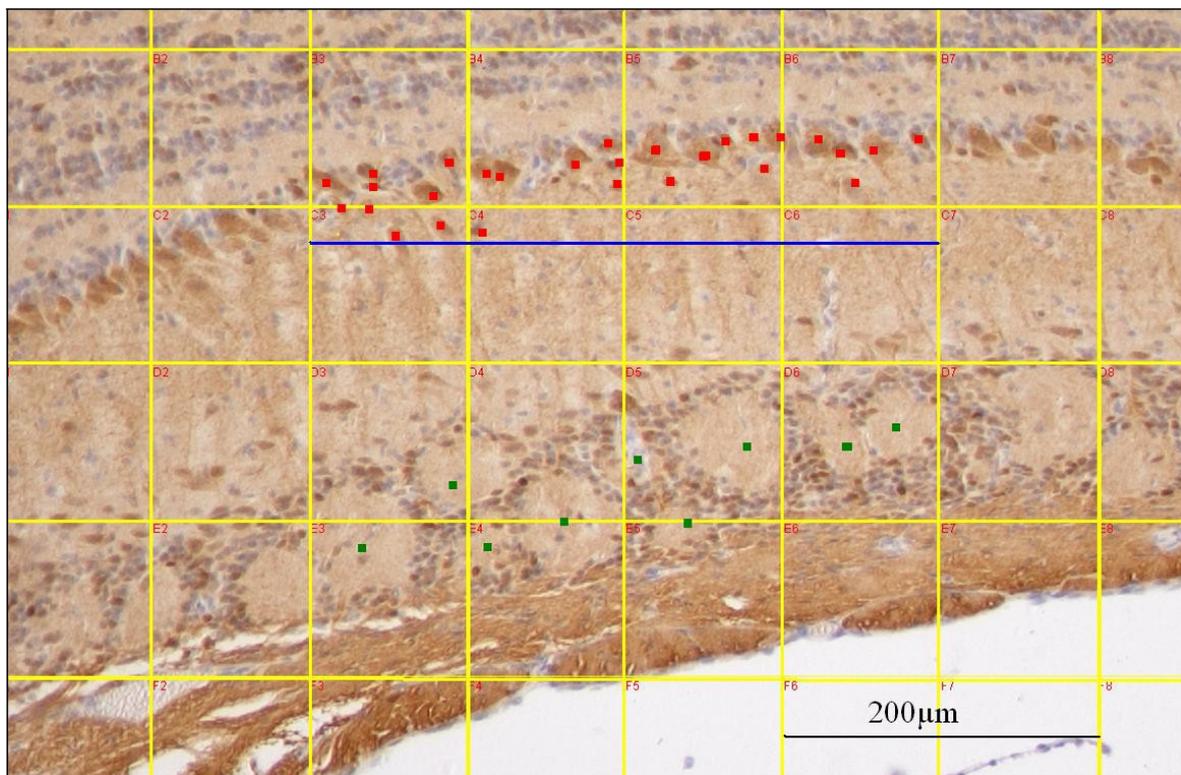
Es wurde von den OT mit je acht Schnitten und PGP 9.5 Reaktion jeder zweite, je OT vier Schnitte, ausgewertet. Wir analysierten nur jeden zweiten Schnitt einer Serie, um mit dem 20 µm weiten Abstand zwischen zwei Schnitten, Doppelzählungen der Mitralzellen zu vermeiden.

Die zu zählende Strecke wurde mit dem 40er Objektiv abfotografiert und mit einem 100µm breiten Messrahmen versehen (Abb. 13). Um eine sehr geringe Fehlerzahl zu erreichen, mussten die Schnitte folgende Kriterien erfüllen:

1. eindeutig markierte Mitralzellen
2. Einschichtigkeit des Schnittes
3. Vollständigkeit (keine Risse oder Scharten) des Schnittes über 400µm

Dann wurde die Anzahl der Mitralzellen unter dem Mikroskop für 400µm bestimmt und für jede Zone und für den gesamten Bulbus gemittelt.

Um Doppelzählungen der Glomeruli zu vermeiden (Durchschnittsdurchmesser 70 µm), zählten wir diese nur auf jedem ersten Schnitt des OT und hatten somit ein Intervall von 170 µm zum nächsten zu analysierenden Schnitt. Auch hier wurde ähnlich der Mitralzellanzahl verfahren. Die ausgewählten Schnitte mussten die gleichen Bedingungen erfüllen und es wurde für 400µm die Anzahl der Glomeruli bestimmt und gemittelt.

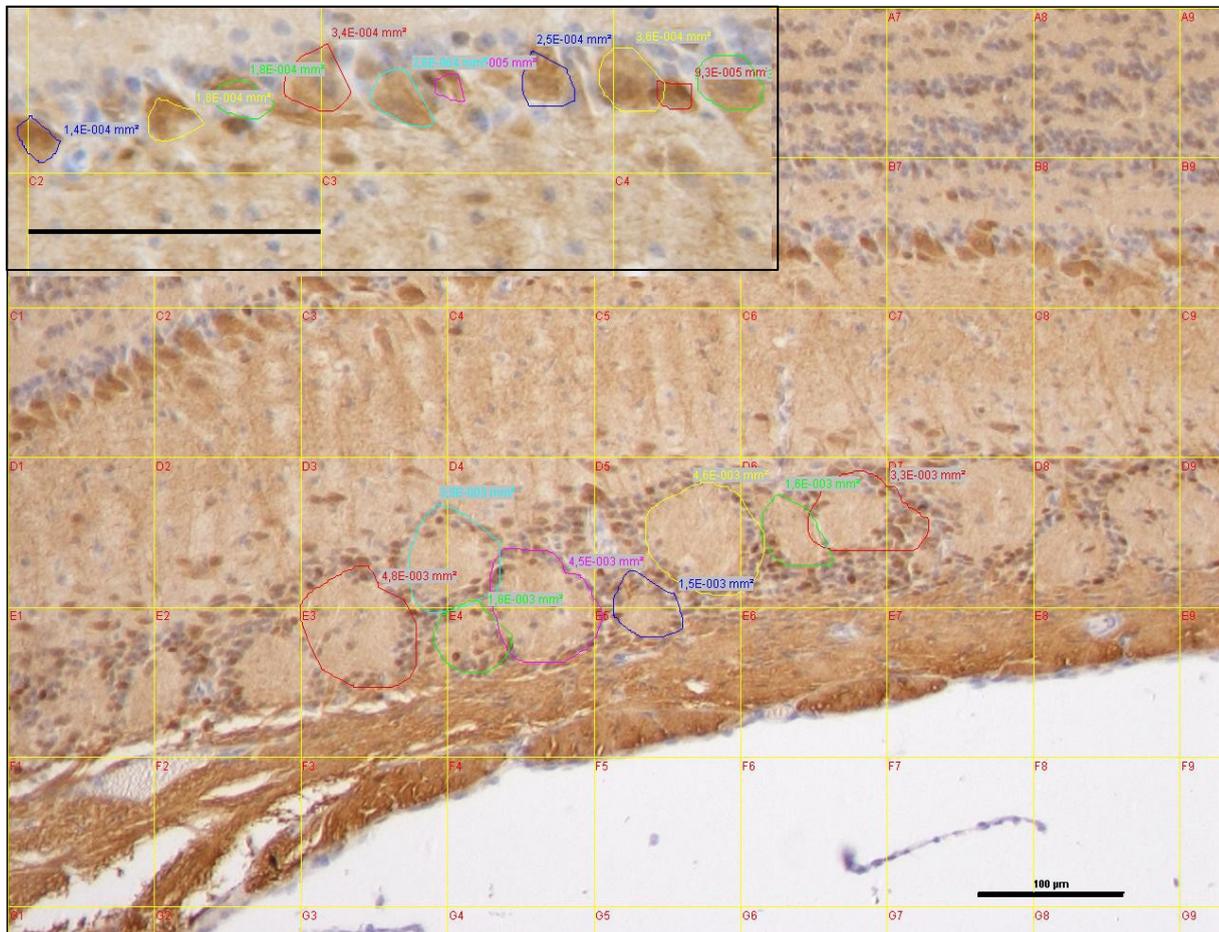


**Abb. 13:** Messrahmen (gelb) 100µm Abstand, ausgezählte Strecke 400µm (blau), exemplarisch gezählte Mitralzellen (rot) und Glomeruli (grün), Maus PGP 9.5 immunhistochemische Färbung (siehe auch Erläuterung des Algorithmus in 3.3.2.5.1), Balken entspricht 200µm

### 3.3.2.4. Flächenbestimmung

Um Unterschiede zwischen den *taut +/+* und *taut -/-* Mäusen in Bezug auf die Fläche der Mitralzellen und der Glomeruli herauszufinden, haben wir alle Mitralzellen und Glomeruli auf einer Strecke von 200µm jeweils medial und lateral ausgemessen (Abb. 14). Um die Durchschnittsfläche für eine Mitralzelle oder einen Glomerulus genau vergleichen zu können, haben wir diese gemittelt. Bei der Flächenbestimmung der Mitralzellen wurden die Perikarya (Somata) gemessen.

Zudem wurden aus der Fläche der Glomeruli die Durchschnittsvolumina mit der Formel  $V=4/3 \cdot \pi \cdot r^3$ , ausgehend von einer sphärischen Form, berechnet.



**Abb. 14:** Messung der Glomerulusfläche (großes Bild) und der Mitralzellfläche (kleines Bild), Maus, PGP 9.5 immunhistochemische Färbung, Balken entspricht 100µm

### 3.3.2.5. Zusätzliche Berechnungen

#### 3.3.2.5.1. Anzahl der Mitralzellen pro Glomerulus

Zuerst berechneten wir aus der Durchschnittsfläche eines Glomerulus mit Hilfe der Formel

$$d = \sqrt{\frac{4 * A}{\pi}}$$

den Durchmesser.

Über den Durchmesser eines Glomerulus konnten wir somit auf die Anzahl der Schnitte schließen (Schnittdicke 10µm), über die sich ein Glomerulus erstreckt. Wir multiplizierten die Anzahl der Schnitte mit der Durchschnittsanzahl der Mitralzellen pro OT (für 400µm). Damit hatten wir die Anzahl der Mitralzellen pro 400µm für die Länge eines Durchschnittsglomerulus. Diese dividierten wir durch die Glomerulusanzahl für 400µm. Somit konnten wir Aussagen zu der Mitralzellanzahl pro Glomerulus treffen. Wir berechneten dies für jede Region und für jede Maus getrennt und mittelten die Ergebnisse in den entsprechenden Gruppen.

Beispielrechnung für DH 102 (*taut*<sup>-/-</sup> Maus, zehn Wochen alt), medialer OB

Durchschnittsfläche der Glomeruli: 5490,35µm<sup>2</sup>

Durchschnittsanzahl der Mitralzellen pro 400µm: 26

Durchschnittsanzahl der Glomeruli pro 400µm: 7

Berechnung:

$$d = \sqrt{\frac{4 * 5490,35 \mu\text{m}^2}{\pi}}$$

d = 83,61 µm, d.h. ein Glomerulus erstreckt sich über 8 Schnitte

Pro Schnitt und 400µm zählten wir 26 Mitralzellen, somit auf acht Schnitte: 26x8 = 208 Mitralzellen.

Pro 400µm gibt es im Durchschnitt sieben Glomeruli und 208 Mitralzellen, somit auf einen Glomerulus 208/7= 29,7 Mitralzellen.

### 3.3.2.5.2. Fläche aller Mitralzellen pro 400µm

Wir berechneten mit Hilfe der Mitralzellanzahl für 400µm (Kapitel 3.3.2.3.) und der Fläche für eine Mitralzelle (Kapitel 3.3.2.4.) die Gesamtfläche aller Mitralzellen über 400µm.

Dazu multiplizierten wir die Anzahl der Mitralzellen mit der Fläche, die durchschnittlich eine Mitralzelle hat. Diese Daten wurden für jede Maus errechnet und in den Vergleichsgruppen gemittelt.

### 3.3.2.6. Korrektur

Je größer die Zellen im Verhältnis zur Schnittdicke sind, umso mehr entfernt sich das Ergebnis von der tatsächlichen Zelldichte nach oben (Schröder et al., 1975). Bei der quantitativen Auswertung besteht daher die Gefahr, fälschlicherweise Zellen aus anderen Schichten mitzuzählen. Deswegen korrigierten wir die morphologischen Rohdaten nach der Abercrombieformel (Abercrombie, 1946):  $N_C = N_R \times C_F$ .

Dabei ist  $N_C$  die korrigierte Zellanzahl und  $N_R$  die Rohzahl (Anzahl der Mitralzellen).

$C_F = t/t + d$ , wobei  $t$  für die Schnittdicke in µm (hier 10µm) und  $d$  für den Zellkerndurchmesser in µm (hier im Durchschnitt 6 µm) steht. Der Zellkerndurchmesser wurde pro Maus an zehn OT, die nur mit Hämatoxylin gefärbt wurden, mit Hilfe des ANALYSIS Programms bestimmt. Pro Maus wurden 60 bis 80 Kerndurchmesser gemessen und dann gemittelt.

## 3.4. Statistik

Es wurden jeweils drei Tiere einer Vergleichsgruppe zugeordnet (3 Wo KO, 3 Wo Wild, 6 Wo KO, 6 Wo Wild, 10 Wo KO und 10 Wo Wild).

Die Ergebnisse wurden mittels SPSS-Software V. 14 (SPSS Inc, Chicago; USA) ausgewertet. Neben der deskriptiven Statistik (Mittelwert und Standardabweichung) wurde auch der t-Verteilungstest, mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  durchgeführt. In den Diagrammen wurden neben den Mittelwerten auch die Standardabweichung T und die Signifikanz \* =  $p < 0,05$  dargestellt.

Die beiden alten Tiere (60 und 80 Wochen) wurden in der Statistik nicht berücksichtigt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Qualitative Immunhistochemie

#### 4.1.1. PGP 9.5

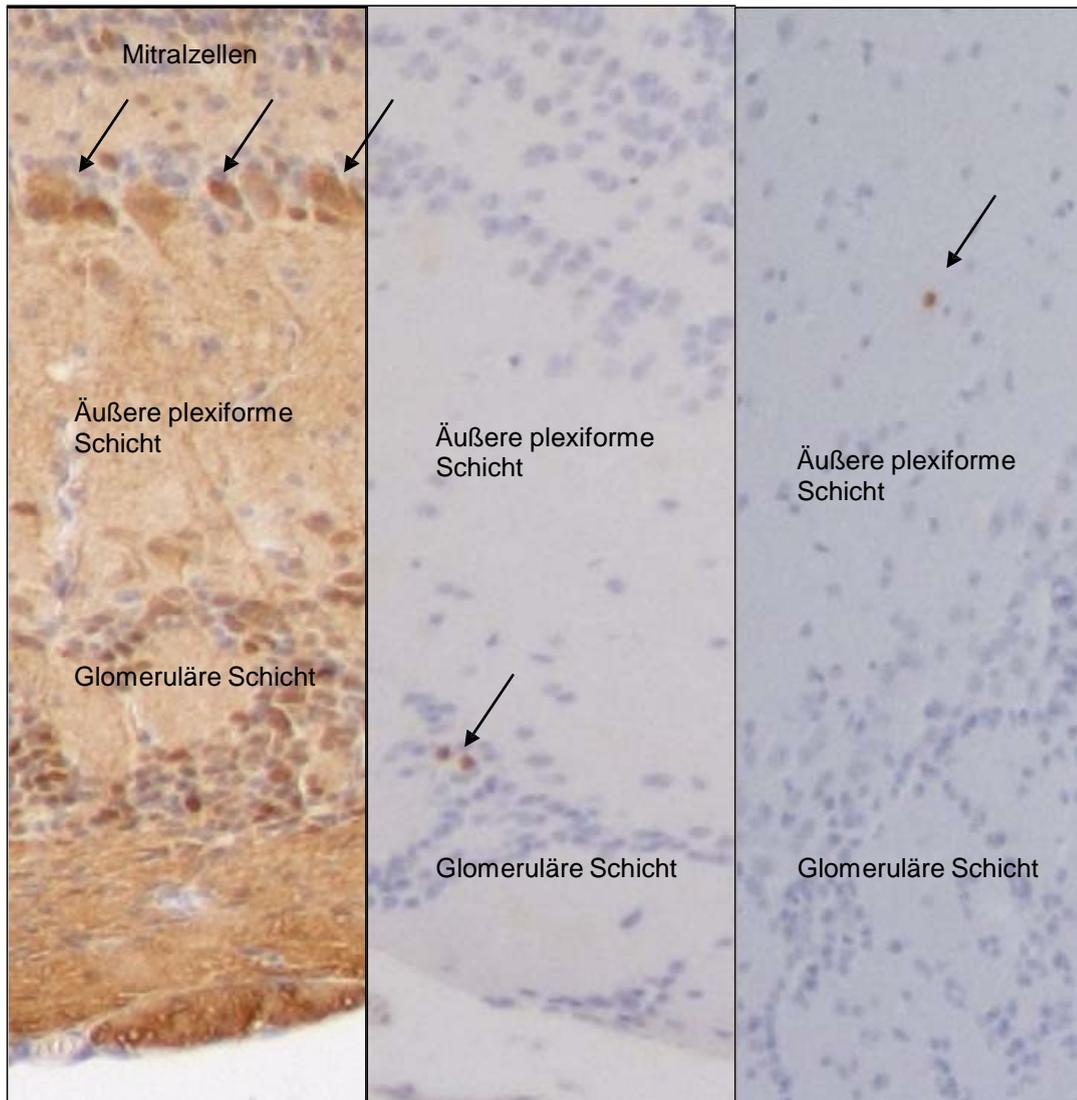
Der neuronale Marker PGP 9.5 reagierte sowohl bei *taut +/+* als auch bei *taut -/-* Mäusen unabhängig vom Alter mit Mitralzellen, Körnerzellen, periglomerulären Zellen und Axonen der Olfaktorischen Nervenzellschicht. Es konnten sowohl die Zellkörper (Somata) als auch die Axone und Dendriten dargestellt werden (Abb. 15a).

#### 4.1.2. Ki-67

Ki-67 ist in allen aktiven Zellphasen vom Zellzyklus (G1; G2 und Mitose) vorhanden und dadurch ein exzellenter Marker für Zellteilung, Proliferation und Wachstum (Scholzen and Gerdes, 2000). Vereinzelt fanden sich Ki-67 positive Zellen sowohl bei den *taut +/+* als auch bei den *taut -/-* Tieren periglomerulär und in der Körnerzellschicht. Auch zwischen den Altersgruppen gab es keinen Unterschied in der Anzahl der Ki-67 positiven Zellen (Abb. 15b).

#### 4.1.3. Caspase-3

Caspase-3 ist ein Marker für Apoptose. Auch hier fanden wir vereinzelt Caspase-3 positive Zellen, ohne jedoch Unterschiede zwischen *taut +/+* und *taut -/-* oder den verschiedenen Altersgruppen beobachten zu können (Abb. 15c).



a) PGP 9.5

b) Ki-67

c) Caspase 3

**Abb. 15:** Qualitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der Mitralzellen. Gegenfärbung immer mit Hämalaun. a) Darstellung von PGP 9.5 als neuronalen Marker, b) Darstellung von Ki-67 als Marker für Proliferation; c) Darstellung von Caspase-3 als Marker für Apoptose. Pfeile markieren jeweils exemplarisch positive Zellen. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen Wild- und KO-Typ Mäusen in der Anfärbbarkeit mit PGP 9.5, Ki-67 und Caspase 3. Bilder von drei Wochen alter KO- Typ Maus, Bild a 100fache Vergrößerung, Bilder b und c 200 fache Vergrößerung

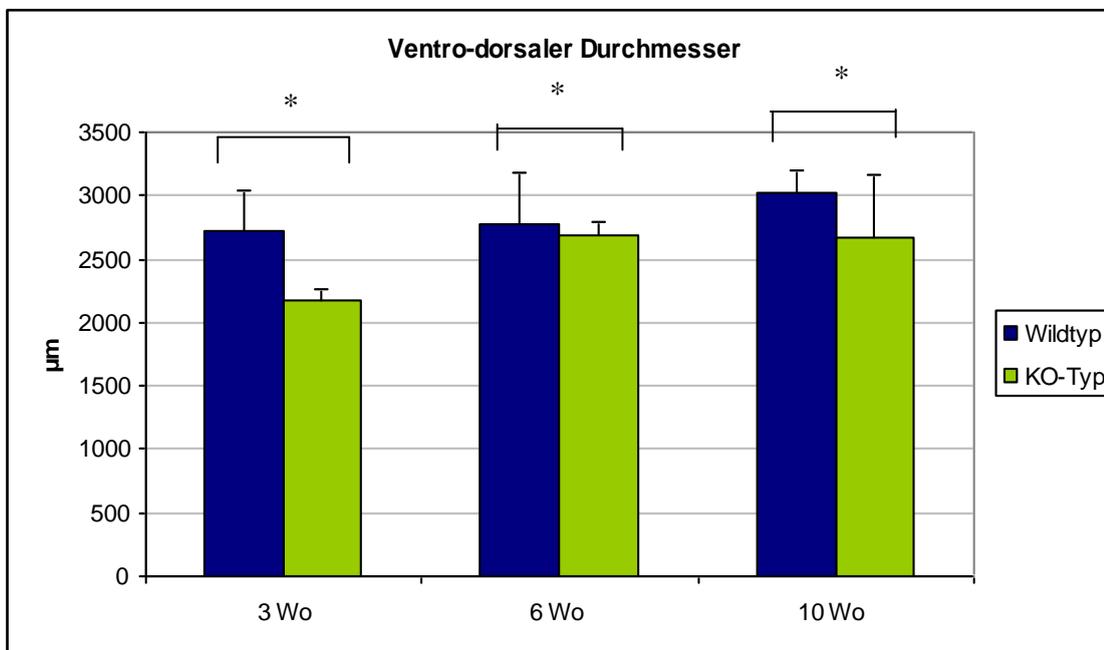
## 4.2. Morphometrische Ergebnisse

Die Ergebnisse der Bulbusmessungen, die Flächenmessungen und die Auszählungen wurden in den jeweiligen Gruppen gemittelt und statistisch bewertet.

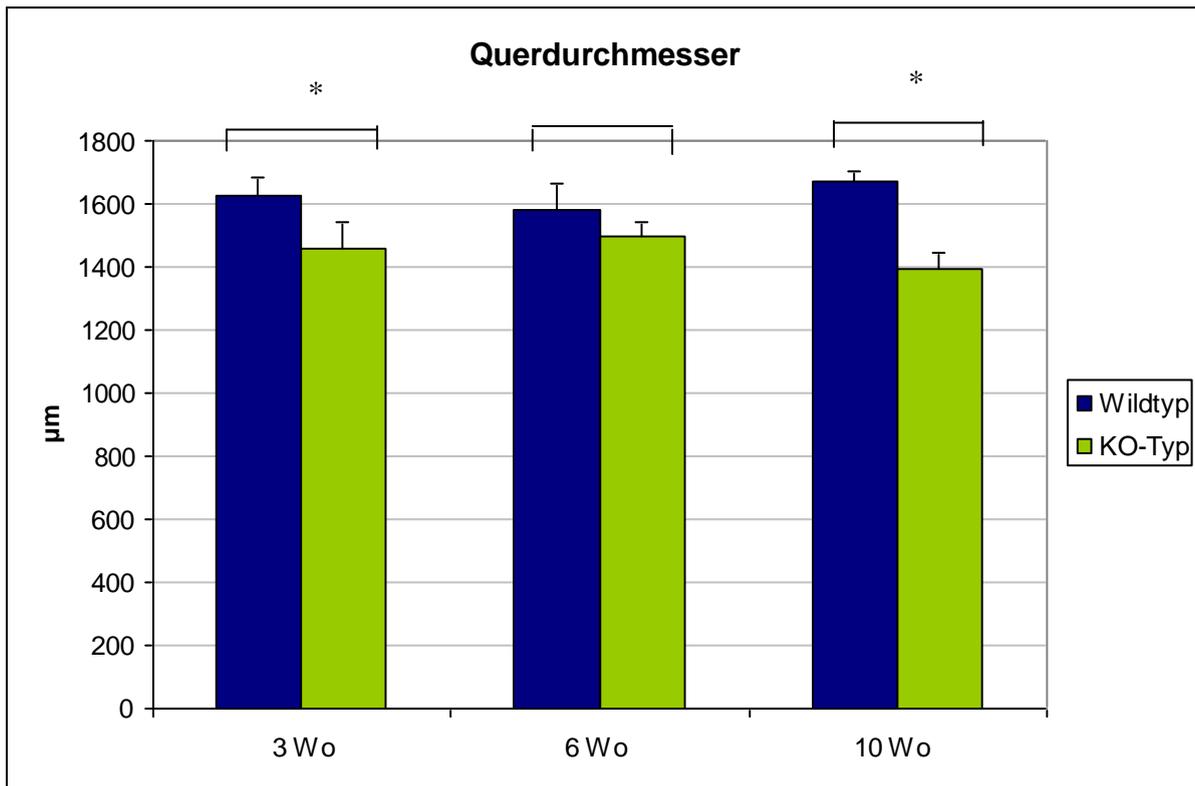
Auf die beiden alten Tiere wird in Kap 4.2.5. gesondert eingegangen. Sie wurden in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt. Die Einzeldaten sind im Anhang tabellarisch zusammengefasst.

### 4.2.1. Längs- und Querdurchmesser des Bulbus olfactorius

Bei diesen Messungen wurden der ventro-dorsale Durchmesser, der Querdurchmesser (medial-lateral) und die Fläche des OB (quer) an der größten Ausdehnung bestimmt. Es konnte beobachtet werden, dass sowohl die Fläche ( $p = 0.05$ ), der ventro-dorsale Durchmesser ( $p = 0.038$ ) als auch die Querdurchmesser ( $p < 0.001$ ) bei den *taut*  $-/-$  Mäusen in jedem Alter signifikant kleiner waren, als bei den *taut*  $+/+$  Tieren (Abb. 16 und 17). Der ventro-dorsale Durchmesser der *taut*  $-/-$  Mäuse entspricht zwischen 80% und 95%, der Querdurchmesser zwischen 83% und 95% und die Fläche zwischen 70% und 86% dem der Wildtypmäuse.



**Abb. 16:** Höhe (ventro-dorsaler Durchmesser) des Bulbus olfactorius. Im Vergleich *taut*  $-/-$  (KO-Typ) und *taut*  $+/+$  Mäuse (Wildtyp) im Alter von 3, 6 und 10 Wochen, Darstellung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen. *Taut*  $-/-$  Mäuse haben in jeder Altergruppe eine signifikant kleinere Bulbushöhe als die Kontrolltiere (*taut*  $+/+$  Mäuse) (\* =  $p < 0.05$ ).



**Abb. 17:** Querdurchmesser des Bulbus olfactorius. *Taut*  $-/-$  und *taut*  $+/+$  Mäuse im Alter von 3, 6 und 10 Wochen, Darstellung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen. Die OB der *taut*  $-/-$  Mäuse haben in jedem Alter einen signifikant kleineren Durchmesser als die der Kontrolltiere (*taut*  $+/+$  Mäuse) (\*= $p < 0.05$ ).

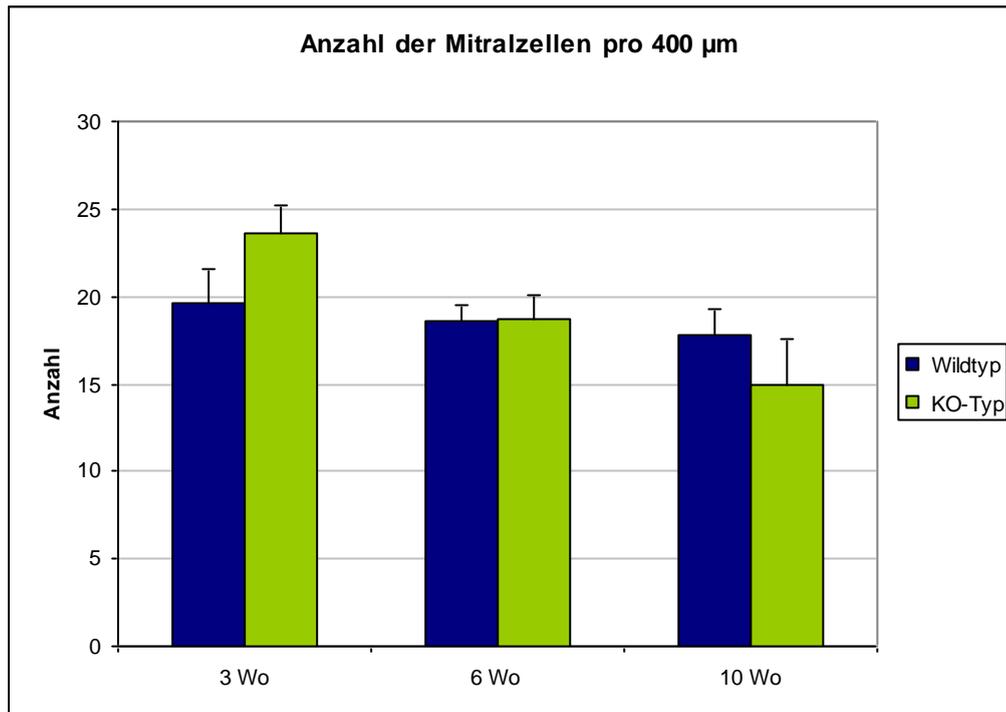
## 4.2.2. Mitralzellen

### 4.2.2.1. Anzahl der Mitralzellen

In diesem Untersuchungsabschnitt wurde die Anzahl der Mitralzellen über eine Strecke von 400µm ermittelt. Es zeigte sich, dass die drei Wochen alten *taut*  $-/-$  Mäuse mehr Mitralzellen haben als die *taut*  $+/+$  Mäuse ( $p = 0.56$ ), bei denen im Alter von zehn Wochen mehr Zellen gezählt wurden ( $p=0.170$ ) (Abb. 18). Bei den 42 Tage alten Tieren fand sich kein Unterschied zwischen den Gruppen.

Außerdem ist jeweils an der medialen Seite des OB die Anzahl der Mitralzellen geringer als an der lateralen. Dabei sind keine Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen erkennbar. In allen Vergleichsgruppen findet sich lateral die größte Mitralzellanzahl im caudalen Bereich des OB.

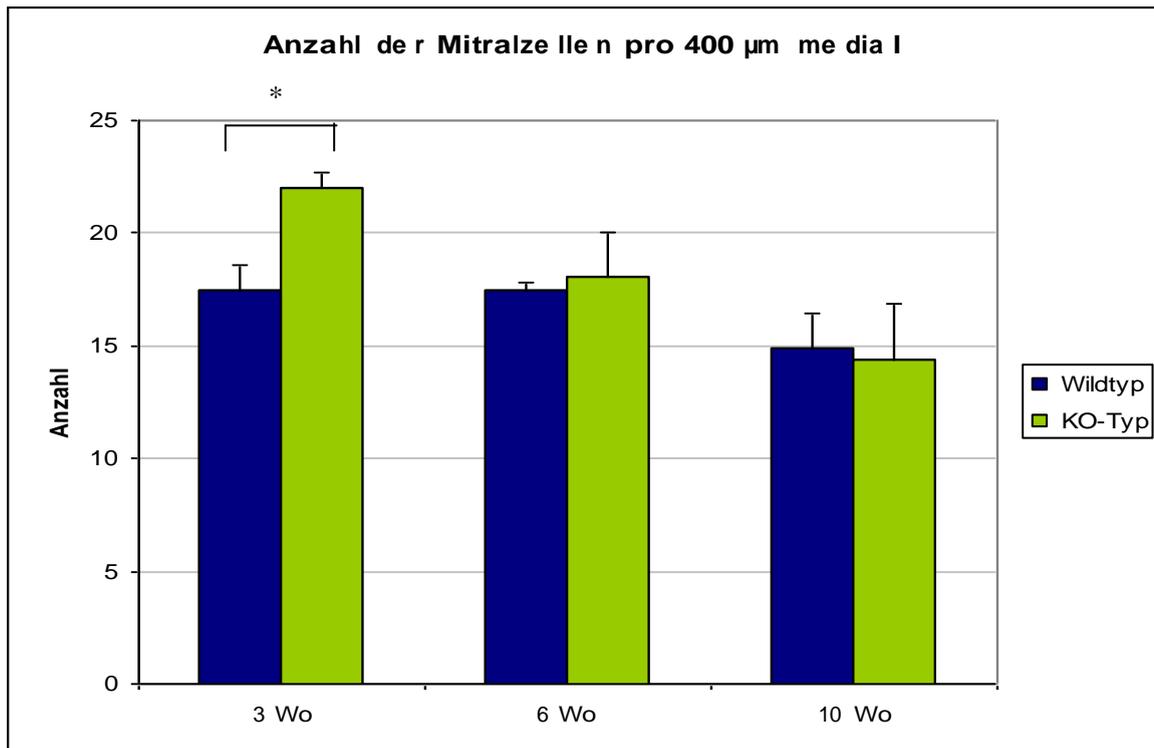
Während bei den 3 Wochen alten Tieren medial die meisten Zellen rostral gezählt wurden, zeigte sich die größte Zellanzahl bei den sechs und zehn Wochen alten Tieren im caudalen medialen Bereich. Auch hier fanden sich keine Unterschiede zwischen den *taut* *-/-* und *taut* *+/+* Mäusen (Tabelle im Anhang 7.2.).



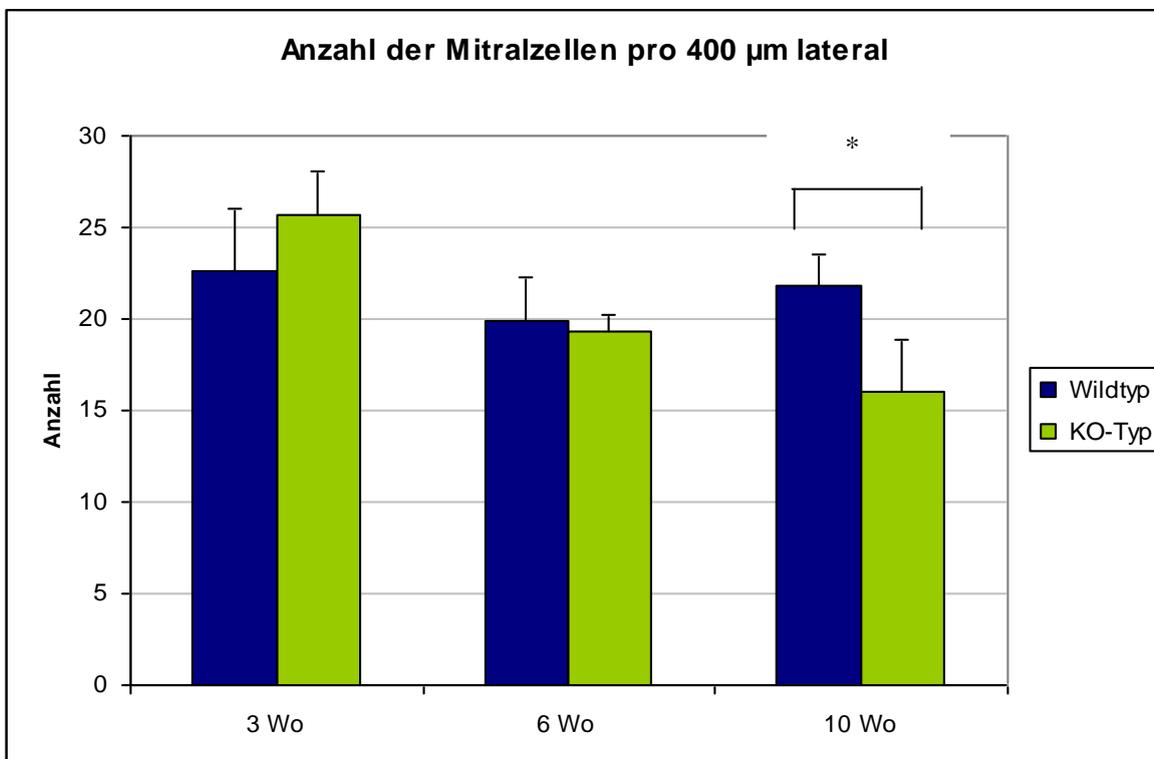
**Abb. 18:** Mitralzellanzahl gesamt (medial und lateral gemittelt) pro 400µm bei *taut* *+/+* und *-/-* Mäusen im Alter von 3, 6 und 10 Wochen. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen. Die OB der *taut* *+/+* Mäuse haben bei den 3 und 6 Wochen alten Tieren weniger Mitralzellen pro 400µm, bei den 10 Wochen alten Mäusen mehr Mitralzellen als bei *taut* *-/-* Tieren.

Abb. 19 und 20 zeigen die Unterschiede in Bezug auf die Anzahl der Mitralzellen über eine Strecke von 400µm, die für medial und lateral getrennt ausgewertet wurden. Hier zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den *taut* *+/+* und *taut* *-/-* Mäusen (medial  $p < 0.05$ ; lateral  $p < 0.05$ ).

Im medialen OB haben *taut* *-/-* Mäuse im Alter von drei und sechs Wochen mehr, mit zehn Wochen weniger Mitralzellen (Abb. 19). Die Anzahl der Mitralzellen im lateralen Bereich des OB ist bei den drei Wochen alten *taut* *-/-* Mäusen höher, bei den sechs und zehn Wochen alten *taut* *-/-* Mäusen geringer als bei den Wildtypmäusen (Abb. 20).

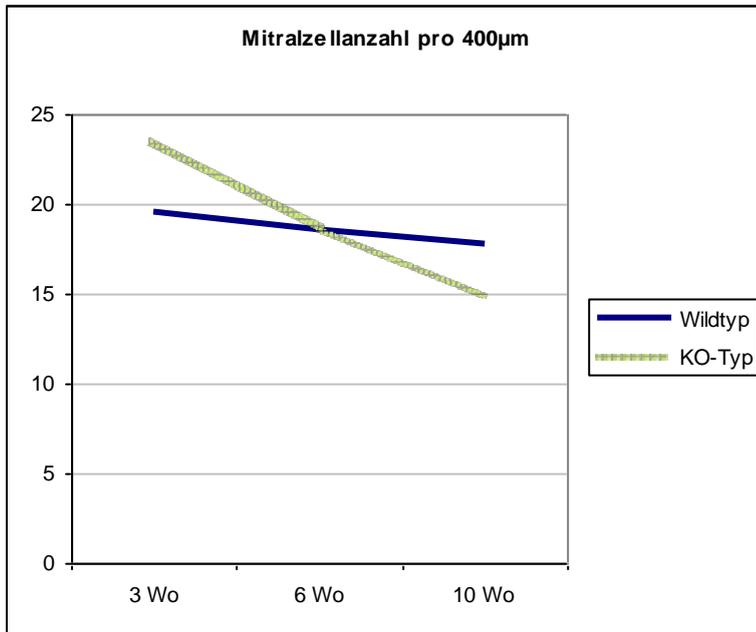


**Abb. 19:** Mitralzellanzahl pro 400μm medial, im Vergleich *taut +/+* und *-/-* Mäuse im Alter von 3, 6 und 10 Wochen. Darstellung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen. 3 Wochen alte *taut -/-* Mäuse haben signifikant mehr ( $p=0.004$ ), 10 Wochen alten Tiere tendenziell weniger Mitralzellen pro 400μm medial als der Wildtyp



**Abb. 20:** Mitralzellanzahl pro 400μm lateral, im Vergleich *taut +/+* und *taut -/-* Mäuse 3, 6 und 10 Wochen alt, Darstellung von Mittelwert, Standardabweichungen und Signifikanz. 3 Wochen alte *taut -/-* Mäuse haben mehr, und 10 Wochen alten Tiere signifikant weniger Mitralzellen pro 400μm lateral als der Wildtyp ( $p = 0.039$ )

In Abb. 21 ist zu erkennen, dass die *taut* <sup>-/-</sup> Mäuse über 10 Wochen prozentual einen höheren Verlust von Mitralzellen als die *taut* <sup>+/+</sup> Mäuse haben. Während die *taut* <sup>+/+</sup> Mäuse im Durchschnitt nur 0,4 % Mitralzellen pro Woche verlieren, haben die *taut* <sup>-/-</sup> Mäuse einen Verlust von 0,7%.



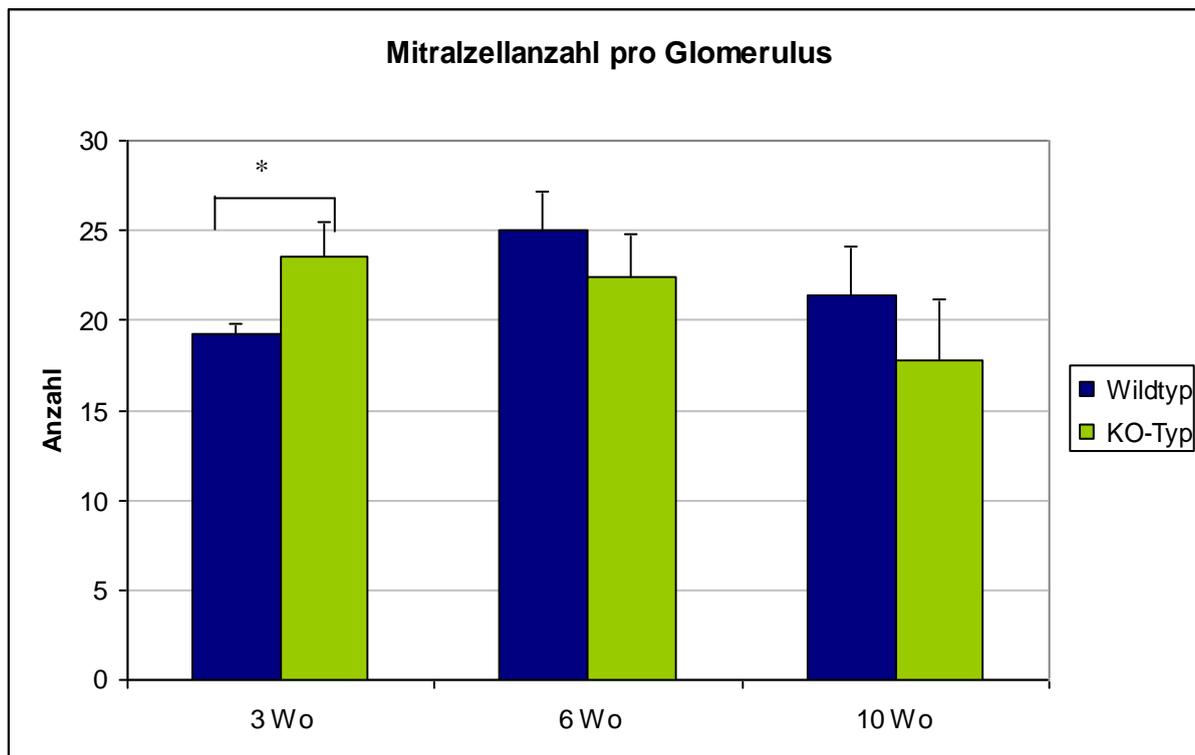
**Abb. 21:** Mitralzellanzahl pro 400µm, im Vergleich *taut* <sup>+/+</sup> und *taut* <sup>-/-</sup> Mäuse 3, 6 und 10 Wochen alt. Darstellung Mitralzellverlust pro Zeiteinheit. Wildtyptiere verlieren pro Zeiteinheit signifikant weniger Mitralzellen als KO-Typmäuse ( $p < 0.05$ )

#### 4.2.2.2. Die Anzahl der Mitralzellen pro Glomerulus

Bei dieser Berechnung zeigte sich, dass sich in den OB von drei Wochen alten *taut +/+* Tieren signifikant weniger ( $p=0.024$ ), von sechs und zehn Wochen alten *taut +/+* Mäusen jedoch mehr Mitralzellen pro Glomerulus als in *taut -/-* Mäusen befinden (Abb. 22). In der alleinigen Betrachtung des lateralen Abschnittes der zehn Wochen alten Tiere ist der Unterschied signifikant ( $p=0.020$ ).

Vergleicht man nur den medialen Teil beider Versuchsgruppen, gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen *taut +/+* und *taut -/-* Mäusen ( $p= 0.151$ ).

Während die Anzahl der Mitralzellen pro Glomerulus bei den *taut -/-* Tieren pro Woche um 2,8 % von den drei zu den zehn Wochen alten Mäusen sinkt, steigt sie bei den *taut +/+* Mäusen von den drei zu den sechs Wochen alten Tieren und fällt dann pro Woche im Durchschnitt um 2,2% ab. Hier fanden sich jedoch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Regionen.

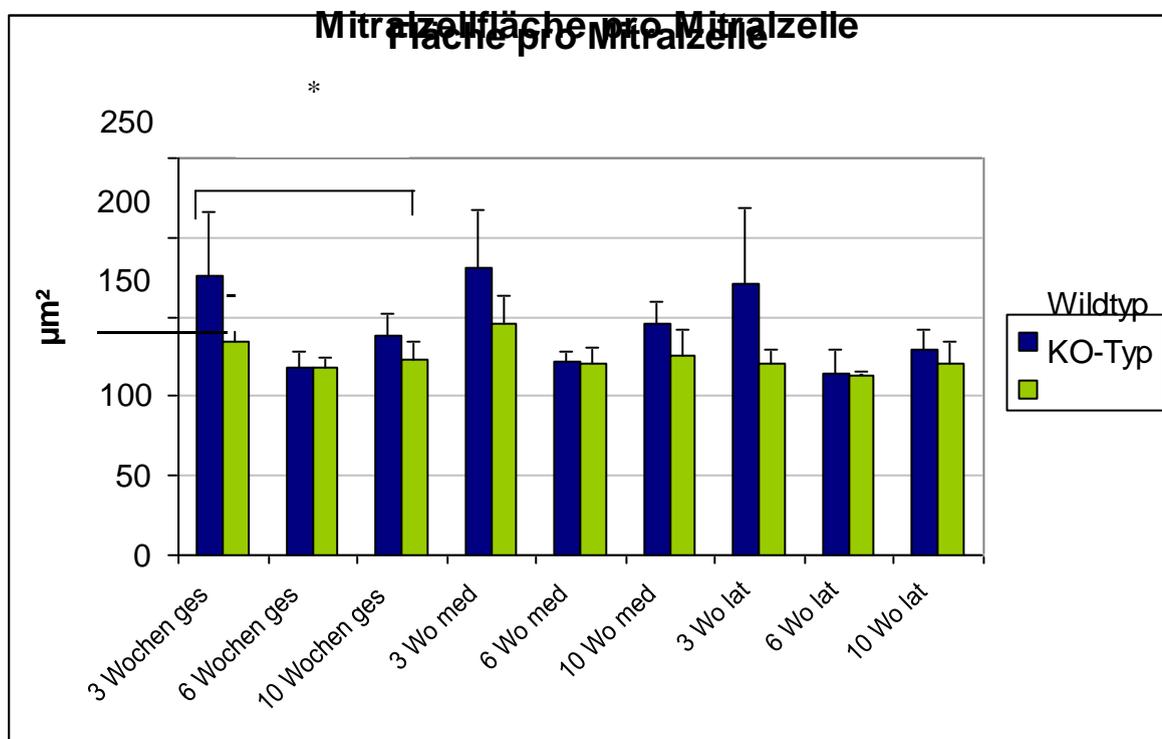


**Abb. 22:** Mitralzellanzahl pro Glomerulus; Vgl. *taut +/+* und *taut -/-* Mäuse 3, 6 und 10 Wochen alt. Darstellung von Mittelwert, Standardabweichungen und Signifikanz. Bulbi der 3 Wochen alten *taut -/-* Mäuse enthalten signifikant mehr ( $p= 0.024$ ), der 6 und 10 Wochen alten Tiere weniger Mitralzellen im Durchschnitt pro Glomerulus als die *taut +/+* Mäuse

### 4.2.3. Fläche pro Mitralzelle

Abb. 23 zeigt die Ergebnisse der Flächenmessungen der Mitralzell-Somata.

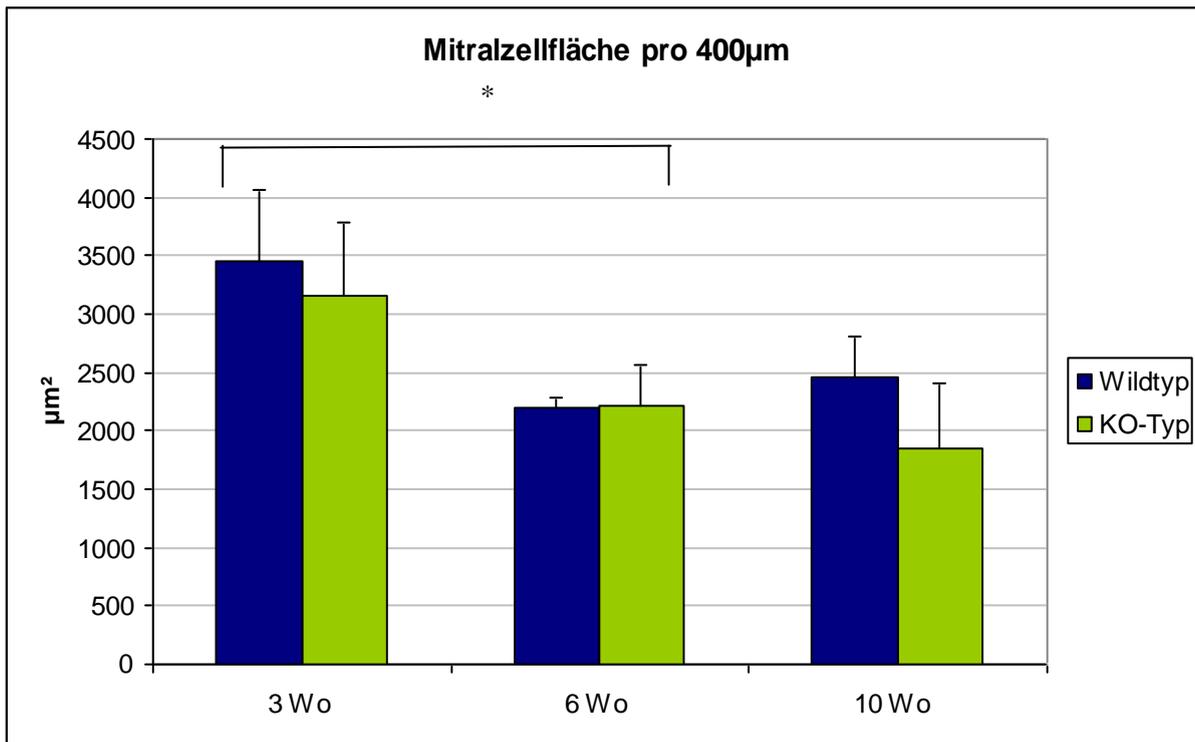
Sowohl bei den *taut* +/+ als auch bei den *taut* -/- Mäusen ist die Durchschnittsfläche der Mitralzellen der medialen Bulbusseite größer als die der lateralen. Kein signifikanter Unterschied lässt sich zwischen den KO-Typ- und Wildtypmäusen jeder Alterstufe feststellen ( $p=0.53$ ). Es zeigt sich jedoch ein signifikanter Unterschied der Mitralzellfläche zwischen den Altersgruppen ( $p= 0.016$ ).



**Abb. 23:** Fläche pro Mitralzelle, Darstellung der Durchschnittsmitralzellfläche für eine Mitralzelle mit Standardabweichungen. Im gesamten Bulbus (ges) und einzeln im medialen (med) und lateralen (lat) Bereich. *Taut* -/- Mäuse haben tendenziell weniger Fläche als *taut* +/+ Mäuse in der entsprechenden Vergleichsgruppe. Es besteht eine Signifikanz der Flächenunterschiede zwischen den verschiedenen Altersgruppen ( $p=0,016$ )

Abb. 24 zeigt die Ergebnisse der Flächenmessung der Mitralzellsomata pro 400µm. Signifikante Unterschiede zwischen den Wild- und KO-Typ Mäusen in Bezug auf die Mitralzellfläche fanden sich nicht ( $p=0.577$ ).

Während die Flächendifferenz zwischen den drei und sechs Wochen alten Mäusen ungeachtet des genetischen Typs signifikant ist ( $p<0.01$ ), fand sich zwischen den sechs und zehn Wochen alten Tieren keine signifikante Differenz ( $p=0.77$ ).

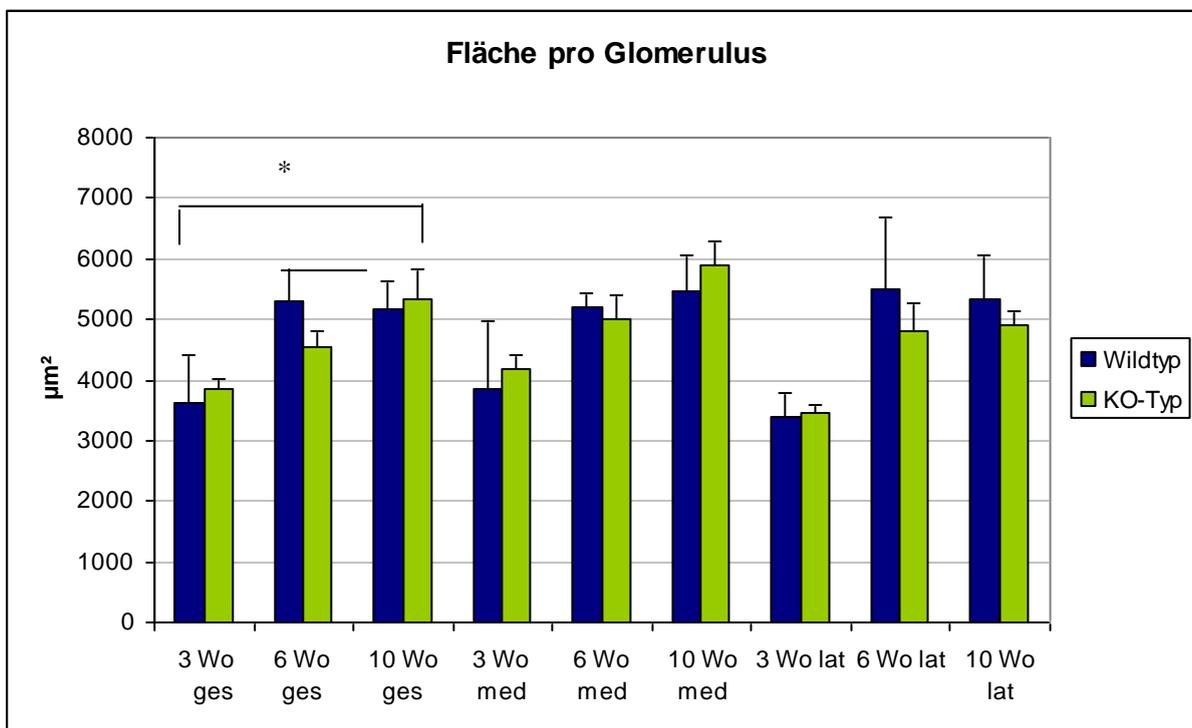


**Abb. 24:** Mitralzellfläche pro 400µm. Darstellung der Durchschnittsmitralzellfläche für eine Strecke von 400µm mit Standardabweichungen. Zwischen *taut*  $-/-$  und *taut*  $+/+$  Mäusen gibt es keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Mitralzellfläche pro 400µm. Signifikant ist der Unterschied zwischen den 3 und 6 Wochen alten Mäusen ( $p<0.001$ ).

#### 4.2.4. Fläche und Volumen pro Glomerulus

Wie bei der Mitralzellfläche wurde auch für die glomeruläre Fläche kein signifikanter Effekt zwischen den *taut +/+* und *taut -/-* Mäusen festgestellt ( $p = 0.719$ ) (Abb. 25). Auch der Vergleich in den einzelnen Bereichen (caudal med, central med, rostral med, caudal lat, central lat, rostral lat) zeigt keinen signifikanten Unterschied.

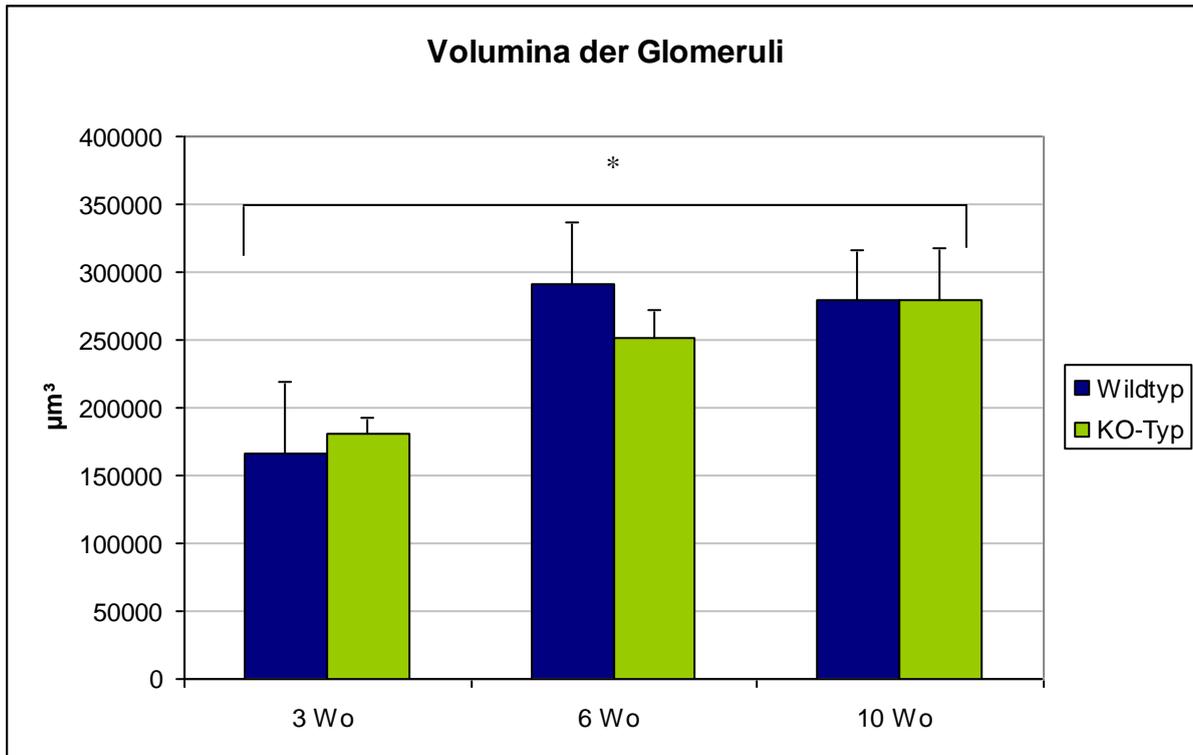
Die Flächendifferenz zwischen den verschiedenen Altersgruppen ungeachtet des genetischen Typs ist dagegen signifikant ( $p < 0.001$ ).



**Abb. 25:** Fläche pro Glomerulus gesamt, medial und lateral. Darstellung der Durchschnittsglomerulusfläche für einen Glomerulus mit Standardabweichung. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den *taut +/+* und *taut -/-* in den Altersgruppen erkennbar. Es besteht eine Signifikanz der Flächenunterschiede beim Vergleich der verschiedenen Altersgruppen ungeachtet des genetischen Typs ( $p < 0.001$ ).

Zudem bestimmten wir einen Schätzwert für das glomeruläre Volumen, unter Voraussetzung dass alle eine sphärische Form besitzen (Abb. 26).

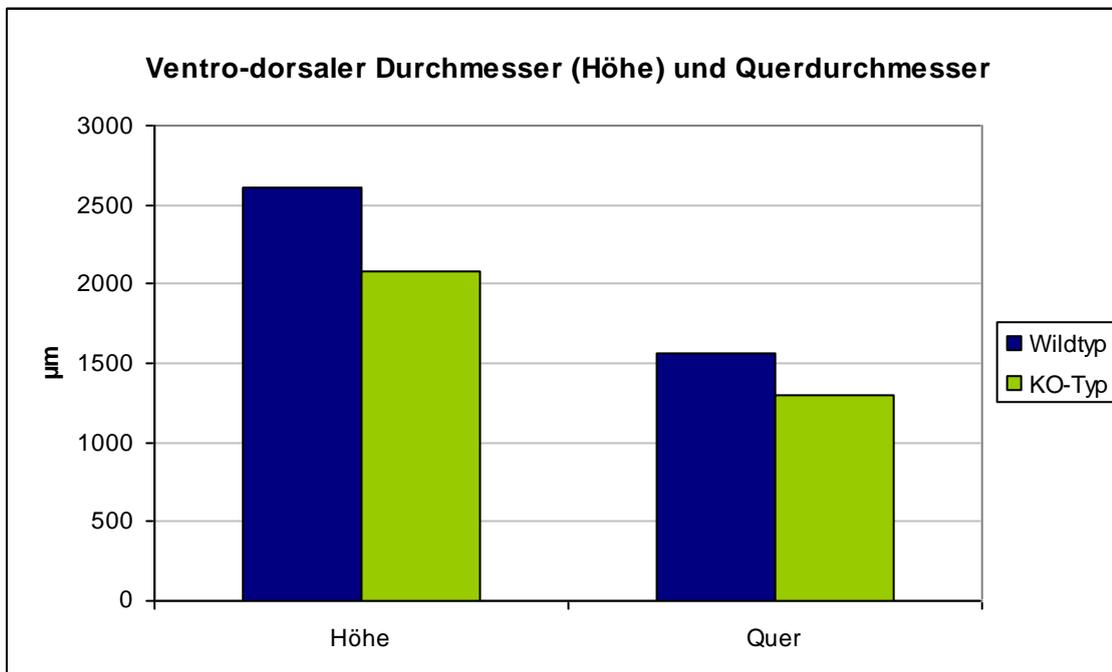
Dabei ist die Differenz zwischen den KO- und Wildtypmäusen nicht signifikant ( $p=0.77$ ). Der Unterschied zwischen den Altersgruppen unabhängig vom genetischen Typ ist signifikant ( $p<0.001$ ).



**Abb. 26:** Volumina pro Glomerulus, Darstellung des Durchschnittsvolumen für einen Glomerulus mit Standardabweichung, ausgehend von einer sphärischen Form. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den *taut +/+* und *taut -/-* Mäusen in den Altersgruppen erkennbar. Es besteht eine Signifikanz der Voluminaunterschiede beim Vergleich der verschiedenen Altersgruppen ( $p<0,001$ ).

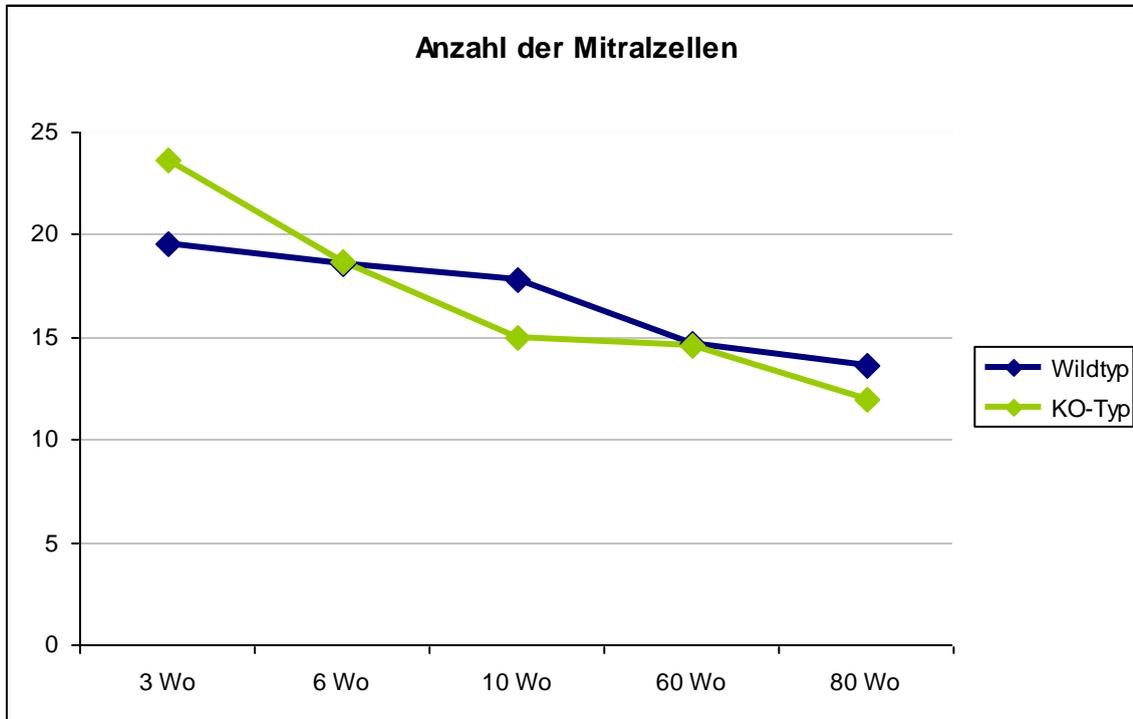
#### 4.2.5. Ergebnisse des Vergleichs der alten Tiere

Abb. 27 zeigt die Ergebnisse des (nicht statistisch ausgewerteten) Vergleichs zwischen einer 60 Wochen alten *taut* *-/-* Maus und einer 80 Wochen alten *taut* *+/+* Maus im Bezug auf den ventro-dorsalen Durchmesser und Querdurchmesser des OB. Wie auch bei den jüngeren Tieren ist sowohl der ventro-dorsale - als auch der Querdurchmesser des OB der *taut* *+/+* Maus größer. Ab der zehnten Lebenswoche verlieren die OB der Wildtypmaus pro Woche durchschnittlich 6,1 $\mu$ m (0,2%) an Höhe und 1,2 $\mu$ m (0,07%) vom Querdurchmesser. Im Vergleich dazu hat die KO-Typ Maus einen Verlust von 10,7 $\mu$ m (0,4%) an Höhe und 3,1 $\mu$ m (0,2%) vom Querdurchmesser pro Woche.



**Abb. 27:** Ventro-dorsaler Durchmesser und Querdurchmesser des OB; im Vergleich der *taut* *+/+* und *taut* *-/-* Maus; Darstellung der Mittelwerte. Die Wildtypmaus (80Wo) besitzt sowohl eine größere Höhe als auch einen größeren Querdurchmesser als die KO-Typ Maus (60Wo)

Abb. 28 zeigt den Verlust an Mitralzellen pro Zeiteinheit. Während die KO-Typ Maus pro Woche durchschnittlich 0,7 % (von 3 bis 60 Wochen alt) Mitralzellen verlor, haben die Wildtypmäuse nur einen durchschnittlichen Verlust von 0,4% (von 3 bis 80 Wochen alt).



**Abb. 28:** Anzahl der Mitralzellen pro 400µm; Vergleich von *taut* *+/+* und *taut* *-/-* Mäusen 3 Wo, 6 Wo, 10 Wo, 60 Wo und 80 Wo. Darstellung der Mittelwerte. Die *taut* *-/-* Mäuse haben bis zum Alter von 10 Wochen einen größeren Verlust von Mitralzellen (die 60 und 80 Wo alten Tiere sind nicht statistisch überprüft).

Fazit:

Der ventro-dorsale Durchmesser und der Querdurchmesser des OB sind bei *taut* *-/-* Mäusen signifikant kleiner. Das Verhältnis von Glomeruli und Mitralzellen ist jedoch nicht signifikant verändert. Aufgrund des signifikant kleineren OB bei *taut* *-/-* scheint bei diesen die Gesamtzahl der Mitralzellen reduziert zu sein.

## 5. Diskussion

Unsere Untersuchungen zeigen morphometrische Unterschiede zwischen Taurinknockout- (*taut* -/-) und Wildtypmäusen (*taut* +/-) im Bulbus olfactorius (OB).

Sie haben ergeben, dass sowohl der Querdurchmesser, als auch ventro-dorsale Durchmesser und damit das Volumen des OB bei den *taut* -/- Mäusen kleiner ist als bei den Wildtypmäusen. Der ventro-dorsale Durchmesser der *taut* -/- Mäuse entspricht zwischen 80% und 95% und der Querdurchmesser zwischen 83% und 95% dem der Wildtypmäuse.

Außerdem verlieren *taut* -/- Mäuse pro Zeiteinheit mehr Mitralzellen als *taut* +/- Mäuse. Drei Wochen alte *taut* -/- Mäuse haben jedoch mehr Mitralzellen pro Glomerulus als die Vergleichsgruppe, sechs und zehn Wochen alte KO-Typ Mäuse haben weniger Mitralzellen als Wildtypmäuse. Eine quantitative Auswertung der Apoptose und Proliferation ist aufgrund der niedrigen Anzahl von Cas- und Ki 67 positiven Zellen nicht möglich.

### Zelldynamik des olfaktorischen Systems: Proliferation und Apoptose

Das olfaktorische System, bestehend aus OE, ORN und OB, ist in der Lage sich ständig in Teilen zu regenerieren. Unter normalen Bedingungen werden die ORN zwischen 30 und 120 Tage alt (Farbman and Ezeh, 2000). Jüngere Neurone entstehen aus basalen Vorläuferzellen, den GBZ bzw. HBZ (Greer, 1991a). In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass vor allem postnatal die HBZ die multipotenten Vorläuferzellen des OE sind (Iwai et al., 2008).

Diese entwickeln sich in eine epitheliale (Stützzellen) und in eine neuronale (ORN) Linie. Ältere ORN befinden sich in höheren Schichten des OE. Nach Verletzungen oder Beschädigungen werden die ORN ersetzt. Die Axone wachsen in den OB und verbinden sich dort in den „zuständigen“ Glomeruli mit den Dendriten der Mitralzellen.

Taurinmangel in *taut* -/- Mäusen führt zur Störung der Zellvolumenregulation, vor allem zur Erhöhung von oxidativen Stress (Warskulat et al., 2007). Oxidativer Stress im olfaktorischen System ist ein Hauptfaktor für die altersabhängige Beeinträchtigung des Riechens. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass Mitral- und Büschelzellen, die vermehrt Lipofuscin, einen Marker für oxidativen Zellschaden durch oxidativen Stress, auch vermehrt Caspase 3, als Marker für Apoptose, zeigen (Vaishnav et al., 2008).

Im OE von *taut* -/- Mäusen kommt es nicht zu einer Zelldegeneration, die vergleichbar mit der in der Retina ist (vgl. Heller-Stilb et al., 2002a). Immunhistochemische und elektrophysiologische Studien (Witt et al, 2004) haben allerdings eine veränderte Antwort auf Zellstress und veränderte Zelldynamik nachgewiesen. Zudem konnte eine erhöhte Proliferationsaktivität unreifer ORN und eine geringere Anzahl reifer ORN in *taut* -/- Mäusen

gezeigt werden. Auch die Apoptoserate, wahrscheinlich als Folge der Störung der Homöostase durch Taurinmangel, ist im OE von *taut* <sup>-/-</sup> Tieren erhöht. Die höhere Proliferationsrate unreifer ORN im OE wird als Reaktion auf die erhöhte Apoptoserate gedeutet (Witt et al, 2004).

Die Proliferation von Mitralzellen ist kurz nach der Geburt abgeschlossen (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Carleton et al., 2003). Sie können sich nur bis zu 2 Wochen postnatal regenerieren (Devor, 1976). Somit ist ihr Verlust anhaltend. Die größte Anzahl von Mitralzellen entsteht pränatal (Chuah and West, 2002; Christie et al., 2005; Lopez-Mascaraque et al., 2005).

In unseren Untersuchungen gab es weder in *taut* <sup>+/+</sup>, noch in *taut* <sup>-/-</sup> Mäusen im OB eine immunhistochemisch erkennbare Proliferation der Mitralzellen. Auch konnten wir im OB weder in *taut* <sup>+/+</sup> noch für *taut* <sup>-/-</sup> Mäuse Caspasen-abhängige Apoptose nachweisen.

#### Neurogenese im OB beschränkt sich auf periglomeruläre Zellen und Körnerzellen

Bei der Neurogenese im erwachsenen Gehirn durchlaufen die Stamm- bzw. Vorläuferzellen verschiedene neuronale Entwicklungsstadien (Biebl et al., 2000; Winner et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Stammzellaktivität innerhalb des OB, im Gegensatz zum Hippocampus, nicht durch Umweltfaktoren beeinflusst werden kann (Brown et al., 2003).

In der adulten Neurogenese gibt es zwei Regionen in denen aus Stammzellen neue Nervenzellen gebildet werden: in der subventrikulären Zone (SVZ) der Seitenventrikel und im zum Hippocampus gehörenden Gyrus dentatus. Die neuronale Differenzierung von proliferierenden Stammzellen über Neuroblasten bis zu ausgereiften Neuronen dauert ca. zwei Wochen. Außerdem ist die Neurogenese abhängig von Wachstumsfaktoren wie VEGF und Neurotransmittern wie Acetylcholin und Noradrenalin (Cooper-Kuhn et al., 2002). Die Stammzellen der SVZ wandern im rostral migratory stream (RMS) in den OB und differenzieren sich dort in zwei verschiedene neuronale Zellreihen, in periglomeruläre Interneurone (1%) und Körnerzellen (99%). Diese treten durch Synapsen mit Mitralzellen in Kontakt (Alvarez-Buylla et al., 2001). Die Aufnahme von neuen Neuronen in den OB scheint für die Aufrechterhaltung der Struktur und Funktion von wesentlicher Bedeutung zu sein (Gheusi et al., 2000; Rochefort et al., 2002).

Die GABAergen Körnerzellen hemmen über ihre Dendriten Mitralzellen und Büschelzellen. Die dopaminergen PG projizieren zum Glomerulus und sind für die Verbindung zwischen ORN mit Mitralzellen verantwortlich (Carlen et al., 2002; Shingo et al., 2003). Kommt es zu einem Mitralzellverlust, verändert sich das Überleben der neugebildeten Interneurone (Valero et al., 2007).

## Büschelzellen vs. Mitralzellen

Im OB gibt es Projektions- und Interneurone. Zu den Projektionsneuronen gehören Mitral- und Büschelzellen. Die PG, Körnerzellen und „short axon cells“ zählen zu den Interneuronen. Wir untersuchten vor allem Mitralzellen.

Mitral- und Büschelzellen liegen in unterschiedlichen Schichten, haben unterschiedliche Antwortmuster und haben unterschiedliche Beziehungen zum intrabulbären Inhibitionszirkel. Die morphologischen Unterschiede zwischen Mitral- und Büschelzellen legen nahe, dass es funktionelle Unterschiede gibt und beide Zellpopulationen olfaktorische Informationen verschieden verarbeiten (Mori, 1987). Physiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass Büschelzellen eine niedrigere Schwelle besitzen, um auf elektrische Stimulation der ORN zu reagieren (Schneider and Scott, 1983). Büschelzellen haben außerdem nach elektrischer Stimulation eine kleinere seitlich hemmende Ausdehnung als Mitralzellen (Christie et al., 2001).

Vergleicht man Büschelzellen aus der glomerulären Schicht mit Mitral- und Büschelzellen aus der äußeren plexiformen Schicht findet man Unterschiede sowohl bei der spontanen Aktivität als auch bei der Antwort auf Duftstoffe. Außerdem scheint die Antwort von Büschelzellen auf Duftstoffe stabiler zu sein als die von Mitralzellen, allerdings verstärken Mitralzellen die laterale Inhibition bei einer Reihe von olfaktorischen Reizen stärker (Nagayama et al., 2004). Zudem zeigen externe Büschelzellen Charakteristika, durch die sie sich von Mitralzellen und anderen Büschelzellen unterscheiden. Die dendritische Aufzweigung ist limitierter (Pinching and Powell, 1971a), ebenso wie die laterale Inhibition (Christie et al., 2001). Zudem wirken interne Büschelzellen, ähnlich den Mitralzellen, mit Körnerzellen zusammen. Dieses Zusammenwirken unterscheidet sich morphologisch und pharmakologisch von dem der externen Büschelzellen (Schoenfeld et al., 1985). Externe Büschelzellen haben eine größere Spontanaktivität und eine größere Leitungsgeschwindigkeit als andere Büschelzellen und Mitralzellen.

All dies lässt schlussfolgern, dass beide Zelltypen olfaktorische Signale unter unterschiedlichen Aspekten verarbeiten. Während Büschelzellen nur in den anterioren Teil des olfaktorischen Cortex projizieren, erreichen Signale der Mitralzellen den gesamten Cortex (Haberly and Price, 1977; Scott, 1981; Schoenfeld and Macrides, 1984). Büschelzellen sind eine sehr heterogene Zellpopulation. Das Muster der Signalweitergabe der internen und medialen Zellen ist denen der Mitralzellen sehr ähnlich, wohingegen die externen Büschelzellen kaum funktionelle und morphologische Gemeinsamkeiten mit den anderen Büschelzellen haben (Griff et al., 2008a; Griff et al., 2008b).

Abschließend kann man sagen, dass Mitralzellen und Büschelzellen ähnliche Leitungsgeschwindigkeiten, Spontanaktivität und Antworten auf Duftreize abhängig von ihrer Somatalage haben. Außerdem wirken beide auf Körnerzellen, von denen sie auch gehemmt werden und es kommt bei Zerstörungen der Axone von Mitral- und Büschelzellen zu höherer Proliferation im OE (Farbman et al., 1999).

Gezielte Untersuchungen hinsichtlich der Reaktion von Büschelzellen auf Taurinmangel fehlen bislang.

### Taurin im Nervensystem

Zahlreiche Studien und Daten legen nahe, dass Taurin eine wichtige Rolle in den verschiedenen Geweben und besonders bei der Entwicklung des Gehirns spielt (Frederickson et al., 1978; Sturman, 1993; Wang et al., 1998; Steullet et al., 2000). Bei Nagern ist die Konzentration von Taurin nach der Geburt am höchsten. Während der weiteren Entwicklung nimmt die Taurinkonzentration im Gehirn ab (Sturman, 1993). Auch in wirbellosen Tieren konnte ein ähnlicher Prozess beschrieben werden (Steullet et al., 2000). Taurin hat im Gehirn eine größere Wirkung als in anderen Geweben. (Okamoto et al., 1983). Zum Beispiel reguliert es die Calciumbindung und -transport, agiert als Neuromodulator und Neurotransmitter (Okamoto et al., 1983) und schützt vor Zellstress (El Idrissi and Trenkner, 2004):

- Taurin reduziert die Glutamat induzierte Erhöhung der Calciumionen, in dem es den Calciumeinstrom hemmt

- Taurin hemmt die Phosphorylierung von Calciumkanälen, reduziert so das freie Calcium intrazellulär

- Taurine hat Einfluss auf das Verhältnis von Apoptoseproteinen (Bax) und Antiapoptoseproteinen (Bcl 2), indem es das Überleben der Zelle begünstigt (Wu, 2009)

Nach Veränderung des Taurintransportergens (*taut -/-*) in Mäusen und damit verbundener Inaktivierung der Taurintransporter und des daraus resultierenden Taurindefizits, kommt es unter anderem zur vollständigen Retinadegeneration mit Erblindung (Heller-Stilb et al., 2002b) und zur Beeinträchtigung der Chemorezeption im OE (Witt et al., 2004).

Taurin liegt physiologisch sowohl im OE als auch im OB in hoher Konzentration vor (Sturmann, 1993). Im OB hemmt Taurin Mitral- und Büschelzellen, hat jedoch keinen Einfluss auf Körner- und PG. Taurin unterdrückt die Weiterleitung von Erregungen der ORN an Mitral- und Büschelzellen. Dies scheint ein physiologischer Effekt zu sein. Die selektive Hemmung durch Taurin im OB dient der Steuerung der Erregbarkeit von Mitral- und Büschelzellen und somit deren Weiterleitung von sensorischen Reizen (Belluzzi et al. 2004). Durch Mangel an Taurin kommt es zu vermehrtem Zellstress und gestörter Osmoregulation mit Schädigung der Membranen (Warskulat et al., 2004). Im visuellen System ist Taurin für die Proliferation von Rezeptorneuronen (Altshuler et al., 1993) und für die Förderung der Zellwanderung wichtig (Moran et al., 1996). Taurin spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum und bei der Differenzierung der retinalen Rezeptorneurone (Altshuler et al., 1993).

#### Reaktionen des olfaktorischen Epithels bei Taurinmangel

Im peripheren olfaktorischen System von Ratten ist die Konzentration von Taurin auch noch bei erwachsenen Tieren sehr hoch. Dies könnte bedeuten, dass es einen Zusammenhang zwischen der Taurinkonzentration und der ständigen Regeneration des OE und ORN gibt (Marr et al., 1995). Es gibt im OE bei Taurinmangel kaum Zelldegeneration. Elektrophysiologische und immunhistochemische Untersuchungen zeigten allerdings veränderte Antworten auf Zellstress und veränderte Zelldynamik bei *taut -/-* Mäusen (Witt et al., 2004). Es konnten höhere Proliferationsraten als Folge des fehlenden Taurins im OE der *taut -/-* Mäuse festgestellt werden. Allerdings nimmt der Proliferationsunterschied zwischen *taut +/+* und *taut -/-* Mäusen mit dem Alter ab. Dies ist ein Hinweis auf Verlust der Kompensationsfähigkeit mit zunehmendem Alter (Witt et al., 2004).

Olfaktorische Gliazellen (ensheathing cells) sind einerseits für den programmierten Zelltod der ORN, andererseits für die Wegweitung der aussprossenden Axone der ORN zum OB verantwortlich (Mackay-Sima and Chuahb, 2000). Es konnten qualitativ keine Unterschiede im Gliagewebe zwischen Wild- und KO-Typ festgestellt werden. Somit kommt es wahrscheinlich nicht zu einer taurinabhängigen Veränderung im Gliagewebe.

### Reaktionen des Bulbus olfactorius bei Taurinmangel

Im OB kommt es bei *taut*  $-/-$  Mäusen zu einem stärkeren Mitralzellverlust als bei *taut*  $+/+$  Mäusen. Die Anzahl der Mitralzellen bei *taut*  $-/-$  Mäusen ist jedoch im Alter von 3 Wochen zunächst höher als bei den *taut*  $+/+$  Mäusen. Da es sich um einen genetisch induzierten Taurinmangel handelt, könnte der fehlende Taurineinfluss in der Fetalzeit für eine peripartale kompensatorische Proliferation der Mitralzellen sorgen.

Der gesamte Bulbus olfactorius ist bei KO-Typ Mäusen kleiner als bei Wildtypmäusen. Jedoch fanden wir in unserer Studie keine vergleichbar massive Degeneration im OB ähnlich der in der Retina. Es wurden dieselben Techniken zur Veränderung des Taurintransporters genutzt. Dies legt nahe, dass Taurin für die Funktion der visuellen Sinneszellen eine wichtigere Rolle spielt als für die der olfaktorischen Sinneszellen, oder dass das olfaktorische System Kompensationsmechanismen, ähnlich dem Herzmuskel, entwickelt hat.

Allerdings scheint das sensorische System allgemein bei den *taut*  $-/-$  Mäusen beeinträchtigt zu sein. *Taut*  $-/-$  Mäuse haben signifikant weniger Fähigkeiten zur Wahrnehmung von CO<sub>2</sub>, einem trigeminalen Reiz (Hummel et al., 2003). Dies macht deutlich, dass auch die chemosensorischen Leistungen des olfaktorischen Systems durch Taurinmangel beeinträchtigt sind. Dagegen ist der OB von *taut*  $-/-$  Mäusen, in den verschiedenen Altersgruppen, signifikant kleiner, als der von *taut*  $+/+$  Mäusen. Zudem konnten wir Mitralzellverluste bei den älteren *taut*  $-/-$  Mäusen nachweisen (nicht statistisch auswertbar), welche als Hinweis auf die fehlende Regenerationsfähigkeit gedeutet werden können.

Untersuchungen zeigten, dass Taurin entscheidend für die GABA-Antwort ist und die inhibitorischen Antworten lenkt (Belluzzi et al., 2004). GABA wirkt jedoch im OB nur an Mitral- und Büschelzellen hemmend. Es zeigt keinen Effekt an Körnerzellen und PG. Der Grund ist, dass der GABA<sub>A</sub> Rezeptor aus verschiedenen Untereinheiten besteht. Dabei scheinen die alpha 1 und beta 2 Untereinheiten für die Interaktion von Taurin an den GABA<sub>A</sub> Rezeptoren entscheidend zu sein. Diese befinden sich jedoch nur an Mitral- und Büschelzellen. Körner – und PG haben vor allem alpha 2 und beta 3 Untereinheiten, die unwichtig für die inhibitorische Wirkung von Taurin sind (Belluzzi et al., 2004). Dies scheint ein Grund zu sein, weshalb sich sowohl die Körnerschichten als auch die Glomeruli von *taut*  $-/-$  und *taut*  $+/+$  kaum unterscheiden. Die Anzahl der Glomeruli, ihre mittlere Fläche und ihr sphärisches Volumen zeigen in unseren Untersuchungen keine Unterschiede.

Der Konzentrationsunterschied von Taurin zwischen taurinmangelernährten Katzen und der Kontrollgruppe ist im OB geringer als im restlichen Gehirn (Sturman et al., 1978), was auf eine gewisse Taurinunabhängigkeit des OB hindeuten könnte. Außerdem ist die Halbwertszeit von Taurin in Geweben und Flüssigkeiten bei KO-Typ Tieren länger als in Kontrolltieren (Sturman et al., 1978).

Dies lässt schlussfolgern, dass durch die höhere Konzentration von Taurin im OB von *taut*<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu anderen Geweben von *taut*<sup>-/-</sup> Tieren und durch die längere Halbwertszeit im Vergleich zu Wildtyptieren das Fehlen von Taurin zum Teil kompensiert werden kann. Zudem konnte gezeigt werden, dass Taurin axonal von den ORN in den OB transportiert wird (Sturman et al., 1978).

In Studien zeigte sich, dass es bei Tieren mit diätetisch bedingtem Mangel an Taurin zu höheren Abortraten und zu niedrigeren Geburtsgewichten kommt (Verner et al., 2007). Außerdem ist das Gehirn leichter. Es zeigte sich zudem, dass die Taurinverteilung im Gehirn bei Katzen, die eine strenge Taurindiät erhielten, anders ist als bei Vergleichstieren. Zudem konnte in Jungtieren von Katzen mit strenger Taurindiät eine verzögerte Zellmigration in das Kleinhirn und in den visuellen Cortex nachgewiesen werden (Sturmann, 1993).

Allerdings ist davon auszugehen, dass die Gehirnfunktion in *taut*<sup>-/-</sup> Tieren teilweise gestört ist. Zum einen ist gezeigt worden, dass in taurindefizienten Mäusen die Konzentration von Taurin im Gehirn sehr stark sinkt, vor allem im Vergleich zu anderen Geweben wie OB, Herz und Skelettmuskel (Sturman et al., 1978). Andererseits ist Taurin essentiell für die embryonale Gehirnentwicklung und stellt dabei die wichtigste Aminosäure dar (Sturman et al., 1978; Huxtable, 1989). Während GABA in der Gehirnentwicklung aktivierend wirkt, kompensiert Taurin dies mit einer hemmenden Antwort. Taurin reguliert die Calcium-Homöostase und somit die Erregung der Nervenzellen. Dies geschieht vor allem in der Entwicklungsphase in der die meisten Synapsen gebildet werden (Ben-Ari, 2002).

Nach experimenteller Zerstörung der Axone von Mitral- und Büschelzellen (LOT) kann man eine gesteigerte Proliferation von Neuronen im OE beobachten. Durch die Reduktion der Anzahl der Mitralzellen kam es zur Steigerung der Basalzellproliferation im OE um bis zu 22% (Farbman et al., 1999).

In der Literatur konnte nachgewiesen werden, dass das periphere olfaktorische System in *taut*<sup>-/-</sup> Mäusen, bei fast unveränderter Morphologie, funktionelle Verluste hinnehmen muss. Da die Fortleitung über den LOT bei den KO-Typ Mäusen gestört scheint, erklärt sich dadurch auch die höhere Proliferationsrate im OE (Witt et al., 2004). In anderen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Büschelzellen bei Mitralzellverlust deren Funktionen kompensieren können (Greer et al., 1991b).

Nach Zerstörung des neonatalen LOT kommt es ca. 4 Wochen später zu einer Regeneration der Axone. Dazu wurde 4-8 Wochen nach der postnatalen Zerstörung des LOT ein retrograder Marker (Fluoro Gold) in den olfaktorischen Cortex injiziert. Dieser Marker konnte dann in Mitralzellen nachgewiesen werden. Man geht davon aus, dass das regenerierte olfaktorische System funktioniert, obwohl die Struktur von dem Normalen abweicht. Unter anderem fehlen elektronenmikroskopisch nachweisbare Axonbündel, Charakteristika für einen normalen LOT (Sakamoto et al., 2010).

### Zelltod im Bulbus olfactorius

Zelltod im OB ist ein wichtiger Prozess in der normalen Entwicklung des OB und kann stark durch das Riechvermögen beeinflusst werden (Fiske and Brunjes, 2001). Die Möglichkeit zur Regulation der Zellzahl spielt vor allem für die Diskrimination von verschiedenen Geruchsstoffen eine wichtige Rolle (Gheusi et al., 2000).

Der Apoptosevorgang ist komplex. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellpopulationen im OB von deren Aktivität abhängig sind und erhebliche Veränderungen postnatal erfahren (Brunjes, 1994). Diese Veränderungen sind von den vorherrschenden Umweltfaktoren und der Entwicklung des OB abhängig. Verhindert man direkt nach der Geburt das Riechen indem man ein Nasenloch blockiert, kann man ca. 30 Tage später eine signifikante Reduktion der Zellzahl im ipsilateralen OB und eine Abnahme des Gesamtvolumens erkennen (Brunjes, 1994). In Kontrolltieren ist die Apoptose in den verschiedenen Schichten im OB in den ersten zwei Wochen postnatal am höchsten, danach fällt sie auf ein konstantes Level zurück (Fiske and Brunjes, 2001). Der Verschluss eines Nasenloches hat keinen Einfluss auf die Apoptoserate in den ersten zwei Wochen (Fiske and Brunjes, 2001).

Zudem kommt es durch Blockade eines Nasenloches zu Veränderungen im Serotoninhaushalt im ipsi- und kontralateralen OB (Gomez et al., 2007). Immunohistochemisch zeigten sowohl der gehemmte als auch der kontralaterale OB die gleiche Serotoninverteilung wie in Kontrolltieren (Gomez et al., 2007). Die Serotoninverteilung ist von der Aktivität des OB abhängig. Es konnten Unterschiede bezüglich der Serotoninausschüttung und -speicherung festgestellt werden (Gomez et al., 2007). Eine Blockade eines Nasenloches verursacht einen beidseitigen Anstieg von Serotonin in den Axonen, allerdings führt es nicht zu einer Änderung der Serotoninrezeptordichte. Diese Beobachtungen kann man sowohl im gehemmten als auch im kontralateralen OB machen.

In den ersten postnatalen Wochen kommt es im OB zu einer massiven Zunahme der Interneurone (PG, Körnerzellen) und externe Büschelzellen (Hinds, 1968; Rosselli-Austin and Altman, 1979). Zudem steigt die Anzahl von Synapsen zwischen Interneuronen und Mitralzellen/Büschelzellen stark an (Hinds, 1968). Die Anzahl der Mitralzellen wird nicht vom Blockieren des Nasenloches beeinflusst und ist somit von sensorischen Reizen unabhängig (Benson et al., 1984; Frazier and Brunjes, 1988). Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass die Größe der Dendriten von Mitralzellen und die Anzahl der Büschelzellen kleiner sind (Meisami and Noushinfar, 1986; Skeen et al., 1986). Zudem ist nach dem Verschluss die Aktivität der Mitralzellen herabgesetzt (Philpot et al., 1997) und die Verbindungen zwischen Mitral- und Körnerzellen sind gehemmt (Benson et al., 1984).

Projektionen vom OE zum OB sind komplett ipsilateral (Shiple and Ennis, 1996). Sie kreuzen im Nucleus olfactorius anterior (AON) zur kontralateralen Hemisphäre (Cleland and Linster, 2003).

In der Literatur ist eine wichtige Neuordnung zwischen dem OB und dem AON nach Mitralzelldegeneration beschrieben worden (Recio et al., 2007). Dazu wurden *Purkinje cell degeneration mice* (PCD) mit Kontrolltieren verglichen. Erstere zeigten ab dem 70. Lebensstag eine Purkinje- und Mitralzelldegeneration, die auch nach 120 Tagen noch nicht abgeschlossen war. Büschelzellen dagegen degenerierten nicht (Baker and Greer, 1990; Recio et al., 2007). Es konnten signifikante histologische Veränderungen nachgewiesen werden:

PCD Mäuse haben mehr Neurone, die von den ipsilateralen AON auf den OB projizieren,

PCD Mäuse verlieren Verbindungen zwischen den Hemisphären und

bei PCD Mäusen degenerieren beide Teile der vorderen Kommissur (Pars anterior und posterior).

Durch fehlende Informationen durch die Mitralzellen kommt es zur Neuordnung der OB-AON Verbindung. Zusätzlich scheint es, als ob die fehlenden kontralateralen Informationen durch die ipsilateralen AON kompensiert werden können (Recio et al., 2007). Das deutet auf eine starke Kompensationsfähigkeit des erwachsenen OB nach Verlust von neuronalen Zellen hin.

Die beiden Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich des LOT nur in der Dicke der Fasern. Es sind in den PCD-Mäusen noch Mitralzellsomata und –dendriten nachweisbar. Wie erwartet zeigen die PCD-Mäuse einen Verlust von Signalen vom OB zu sekundären olfaktorischen Strukturen. Zudem wird angenommen, dass Mitralzellen mehr zu caudalen Regionen projizieren als Büschelzellen (Recio et al., 2007).

Das Verhältnis von Mitralzellen und Glomerulus ist bei *taut* <sup>-/-</sup> Mäusen nicht signifikant verändert. Bei diesen Berechnungen zeigte sich allerdings, dass sich im OB von drei Wochen alten *taut* <sup>+/+</sup> Tieren signifikant weniger ( $p=0.024$ ), von sechs und zehn Wochen alten *taut* <sup>+/+</sup> Mäusen jedoch mehr Mitralzellen pro Glomerulus als in *taut* <sup>-/-</sup> Mäusen befinden. Das deutet auf eine pränatale Proliferation von Mitralzellen in *taut* <sup>-/-</sup> Mäusen aufgrund von Taurinmangel hin und lässt uns schlussfolgern, dass der Taurinmangel die Mitralzellentwicklung vor allem pränatal beeinflusst.

Die gemessenen Durchmesser der OB von *taut* <sup>-/-</sup> Mäusen sind signifikant kleiner und somit auch die absolute Menge von Mitralzellen und Glomeruli.

Nun stellt sich die Frage, ob reduzierte sensorische Leistungen eher auf einen zentralen oder peripheren Taurinmangel zurückzuführen sind.

Es konnten höhere Proliferations- und Apoptoseraten als Folge des fehlenden Taurins im OE der *taut* <sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt werden. Allerdings nimmt der Proliferationsunterschied zwischen *taut* <sup>+/+</sup> und *taut* <sup>-/-</sup> Mäusen mit dem Alter ab (Witt et al, 2004). Sowohl im OE als auch im OB sind keine auffälligen Zelldegenerationen nachweisbar. Aufgrund des fehlenden Taurins kommt es im OE zu Zellstress und veränderter Zelldynamik. Dies legt nahe, dass die Beeinträchtigung der Wahrnehmung von chemischen Stoffen das Hauptmerkmal des Taurinmangels im ORN ist (Witt et al. 2004).

Die Anzahl der Mitralzellen wird nicht vom Blockieren des Nasenloches beeinflusst und ist somit von sensorischen Reizen unabhängig (Benson et al., 1984). Allerdings ist nach dem Verschluss die Aktivität der Mitralzellen herabgesetzt (Philpot et al., 1997). Dies spricht dafür, dass aufgrund der schlechteren peripheren Wahrnehmung von chemischen Stoffen die Mitralzellaktivität herabgesetzt ist und deutet daraufhin, dass reduzierte sensorische Leistungen vor allem auf einen peripheren Taurinmangel zurückzuführen sind.

## 6. Zusammenfassung

### Veränderungen im Bulbus olfactorius der Maus bei Taurinmangel Morphologische Untersuchungen in einem Taurintransporter-knockout-Modell

**Hintergrund:** Das Riechsystem besteht aus der Riechschleimhaut, dem Bulbus olfactorius (OB) und weiteren zentralen Kern- bzw. Rindengebieten. Die Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) der Riechschleimhaut ziehen als Nn. olfactorii durch die Lamina cribrosa des Os ethmoidale zum OB. Dort bilden sie gemeinsam mit den Dendriten der Mitralzellen, Büschelzellen und den periglomerulären Zellen Glomeruli. Mitralzellen sind die erste Informationen weitergebende Einheit im OB und können bis auf zwei Wochen postnatal nicht regeneriert werden. Alle Axone der Mitralzellen führen als Tractus olfactorius lateralis (LOT) zu sekundären olfaktorischen Strukturen. Im erwachsenen OB ist die Neurogenese auf Interneurone in der Körnerzell- und periglomerulären Schicht beschränkt.

Taurin ist nach Glutamat die häufigste freie Aminosäure im Gehirn und im OB. Taurin spielt vor allem während der Gehirnentwicklung eine wichtige Rolle. Es reguliert im Gehirn die Calciumbindung und -transport, agiert als Neuromodulator und Neurotransmitter und schützt vor Zellstress. Taurin spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellvolumenhomöostase und Proteinstabilisierung. Untersuchungen zeigten, dass Taurin entscheidend die inhibitorische Wirkung von GABA an Mitral- und Büschelzellen durch Interaktionen mit den alpha 1 und beta 2 Untereinheiten des GABA Rezeptors lenkt.

**Fragestellung:** Taurin kann aufgrund der geringen Lipophilie nur mit Hilfe von Transportsystemen (*TAUT*) in die Zelle gelangen. Ein transgenes Tiermodell zur Untersuchung der Taurinwirkungen stellt die Inaktivierung der Gene dar, die für die Taurintransporterproteine kodieren und somit zu einem intrazellulären Taurinmangel führen. Bei vorausgegangenen Studien an Taurintransporter-knockout Mäusen (*taut* <sup>-/-</sup>) kam es u.a. zur Degeneration der Retina, der Skelettmuskulatur und zu zelldynamischen Veränderungen im OE. Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob es immunhistochemische Unterschiede zwischen *taut* <sup>-/-</sup> und *taut* <sup>+/+</sup> Mäusen in der ersten Station des zentralen Riechsystems, dem OB, gibt.

**Material und Methoden:** In dieser Arbeit wurden morphologische und qualitative Unterschiede des OB zwischen *taut* <sup>+/+</sup> und *taut* <sup>-/-</sup> Mäusen im Alter von 3, 6 und 10 Wochen verglichen. Speziell sollte überprüft werden, inwieweit sich *taut* <sup>-/-</sup> und *taut* <sup>+/+</sup> Mäuse hinsichtlich Proliferation, Apoptose, Größe des OB und der Anzahl der Mitralzellen unterscheiden.

**Ergebnisse:** Querdurchmesser und ventro-dorsaler Durchmesser des OB der *taut -/-* Mäuse sind signifikant kleiner als die der Wildtypmäuse. Außerdem zeigte sich, dass die Anzahl der Mitralzellen innerhalb einer 10wöchigen Beobachtungszeit postpartal bei den *taut -/-* Mäusen deutlich stärker sinkt als bei den *taut +/+* Mäusen. Während die Gesamtzahl der Mitralzellen aufgrund des signifikant kleineren OB bei *taut -/-* Mäusen reduziert ist, bleibt das numerische Verhältnis von Glomeruli und Mitralzellen erhalten.

Sowohl in den Wildtyp- als auch in den *taut -/-* Mäusen konnten wir im OB immunhistochemisch keine Proliferation oder Apoptose nachweisen.

**Schlussfolgerung:** Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Taurin eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Neuronen im olfaktorischen System, vor allem während der embryonalen und perinatalen Entwicklung besitzt. Es kommt perinatal zu einer reaktiven Proliferation von Mitralzellen. Eine fulminante Degeneration mit komplettem Funktionsausfall, wie bei der Retina, gibt es im olfaktorischen System bei *taut -/-* Mäusen nicht.

Bei Wildtypmäusen findet man Taurin in hohen Konzentrationen vor allem im OB und in den Stützzellen des OE. Aufgrund der fehlenden Fähigkeit, Taurin aus dem Extrazellulärraum aufzunehmen, ist dieses intrazellulär bei *taut -/-* Tieren stark reduziert. Obwohl es im OB nur geringe morphologische Unterschiede zwischen *taut +/+* und *taut -/-* Mäusen gibt, kommt es zu einer starken Reduzierung der sensorischen Wahrnehmung bei Knockouttieren.

Taurinmangel in *taut -/-* Mäusen führt zur Störung der Zellvolumenregulation, vor allem zur Erhöhung des oxidativen Stresses. Oxidativer Stress im olfaktorischen System ist ein Hauptfaktor für die altersabhängige Beeinträchtigung des Riechens. Im OE von *taut -/-* Mäusen konnte eine erhöhte Proliferationsaktivität unreifer ORN als Reaktion auf eine erhöhte Apoptoserate gezeigt werden. Außerdem ist die Anzahl reifer ORN in *taut -/-* Mäusen geringer.

Im OB hemmt Taurin Mitral- und Büschelzellen, hat jedoch keinen Einfluss auf Körner- und periglomeruläre Zellen. Taurin unterdrückt die Weiterleitung von Erregungen der ORN an Mitral- und Büschelzellen und beeinflusst somit die Weiterleitung von sensorischen Reizen.

Die Fortleitung über den LOT scheint bei den *taut -/-* Mäusen gestört zu sein. Andere Experimente konnten zeigen, dass Büschelzellen bei Mitralzellverlust deren Funktionen zum Teil kompensieren können. Zudem deutet die Kompensationsfähigkeit des erwachsenen OB nach Verlust von neuronalen Zellen auf eine Neuordnung zwischen dem OB und dem Nucleus olfactorius anterior hin. Dies legt nahe, dass die Beeinträchtigung der Wahrnehmung von chemischen Stoffen das Hauptmerkmal des Taurinmangels im ORN ist.

Dies spricht dafür, dass reduzierte sensorische Leistungen wahrscheinlich eher auf einen peripheren als auf einen zentralen Taurinmangel zurückzuführen sind.

## **Taurine deficiency causes loss of mitral cells in the olfactory bulb of mice**

**Introduction and aim of the study:** The olfactory system consists of the olfactory epithelium (OE), the olfactory nerve, the olfactory bulb (OB) and olfactory cortex. The main olfactory bulb is a laminated structure. The input via axons of the olfactory receptor neurons terminate in glomeruli. The output from the bulb is carried by the axons of mitral and tufted cells. Glomeruli are ubiquitous structures in the OB and play important roles in transmitting signals from olfactory receptor cells to central relay cells. Mitral cells are the main integrating and relay units of the OB and cannot regenerate after birth. Every mitral cell sends only one dendrite to the ORN. Mitral cells project axons as lateral olfactory tract (LOT) to secondary olfactory structures.

Only interneurons in the granular cell and glomerular layers can be generated in the adult brain.

Taurine is, after glutamate, the most abundant free amino acid in the cerebral cortex and in the OB. Taurine plays an important role in regulating the depolarization-evoked GABA release via GABA receptors. Furthermore, taurine is involved in cell volume homeostasis, antioxidant defense and protein stabilization. It is a neuromodulator, a neurotransmitter and a neuroprotector against L-glutamate-induced neurotoxicity. Taurine has been shown to be important especially in the early stages of olfactory receptor development.

Taurine cannot pass lipid bilayers. Cells express the Na<sup>+</sup>-dependent taurine transport system (*TAUT*), which enables the cell to conduct taurine from extra- to intracellular compartments. Taurine transporter knockout mice (*taut* <sup>-/-</sup>) were generated by homologous recombination. The *TAUT* gene has been knocked out. The result is a loss of the protein activity of *TAUT* and a taurine deficiency in the intracellular compartment.

Previous studies on *taut* <sup>-/-</sup> mice showed degeneration of retina, skeletal muscle and olfactory epithelium. Furthermore *taut* <sup>-/-</sup> mice exhibited a lower body mass compared with *taut* <sup>+/+</sup> mice.

The aim of this study was to investigate cellular reactions due to taurine deficiency of central olfactory components, such as mitral cells, which constitute the major output neurons of the OB.

**Materials and methods:** The present study assesses quantitative differences between *taut* <sup>-/-</sup> mice and controls (on postnatal day 21, 42, 70) concerning the size of the OB as well as numbers and circumference of glomeruli and mitral cells. For histochemical identification of mitral cells in tissue sections we used an antibody against PGP 9.5.

**Results:** *Taut* <sup>-/-</sup> mice had significantly smaller OBs than controls. Furthermore, the average circumference of mitral cell perikarya is lower in *taut* <sup>-/-</sup> mice of every age compared to control animals. After 21d, *taut* <sup>-/-</sup> animals showed more mitral cells, but later they presented significantly less mitral cells than controls. Also, the OB size of *taut* <sup>-/-</sup> mice were significantly smaller in *taut* <sup>-/-</sup> mice and the ratio between mitral cells and glomeruli was not changed. Furthermore we could not find any differences in proliferation and apoptosis using antibodies against Ki-67 and caspase-3, respectively.

**Discussion:** The results indicate that taurine plays an important role in development and maintenance of neurons in the olfactory pathway, especially during embryogenesis. Further, loss of olfactory receptor neurons may lead to a subsequent loss of the secondary relay neurons, namely mitral cells. Our study shows a prenatal proliferation of mitral cells of *taut* <sup>-/-</sup> mice.

ORN are unique in the central nervous system for their ability to constantly recover. Damaged ORN are being replaced, the epithelium reconstitutes and axons make new connections to the olfactory bulb.

In contrast to the taurine-deficient retina, no major degeneration is seen in the olfactory epithelium and in the OB of *taut* <sup>-/-</sup> mice. Studies in *taut* <sup>-/-</sup> mice suggest an altered cellular stress response and changed cell dynamics in the OE. The higher proliferative rate and faster replacement of the ORN in OE of *taut* <sup>-/-</sup> mice can be one way to compensate for taurine deficiency. Disruption of TAUT gene results in disorder of cell volume homeostasis and in increase of oxidative stress. Oxidative stress in the olfactory system is a major factor associated with age-related olfactory impairment. Taurine was found to suppress the spontaneous firing of both mitral and tufted cells, but it does not influence granular or periglomerular cells.

Furthermore some studies showed a compensation of mitral cells by tufted cells.

The regulation of neuronal death is complex and important for the normal developmental program of the OB. The survival of some bulb cell populations is dependent on the level of action and sensory stimuli.

Lack of information by mitral cells may cause a reorganisation of connections between OB and the anterior olfactory nucleus (AON) level. It has been reported that the contralateral AON can compensate for the ipsilateral AON.

It is assumed that the impairment of the conduction of chemical stimuli by ORN is a major feature of taurine deficiency. As a consequence, mitral cell activity can be reduced. Thus it seems that the impaired olfactory perception of *taut* <sup>-/-</sup> mice is caused by peripheral rather than central taurine deficiency.

## 7. Anhang

### 7.1. Herstellung von Gebrauchsmaterialien

Silanisierung: Zur Gewährleistung einer guten Schnittqualität, insbesondere nach der Vorbehandlung für die Immunreaktion durch die Mikrowelle, wurden die Objektträger silanisiert.

1. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter dem Abzug durchgeführt.
2. Um Fett und andere Verunreinigung zu beseitigen, wurden die Objektträger (Hecht-Assistent, Typ ELKA 24/6/1) für 1 Minute in eine 70%ige Ethanollösung gestellt.
3. Danach folgte eine einminütige Immersion der OT in 10%ige Lösung aus (3-Aminopropyl)-triethoxysilan [ $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ ] (Fluka Chemika; MW 221,37g/mol) in Aceton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) (Merck, Pro Analyti; MW 58,08g/mol).
4. Die OT wurden erst zweimal je 1 min in Aceton, dann dreimal je 1 min in Aqua dest. gespült.
5. Danach folgte eine 48 h dauernde Trockenphase im Brutschrank bei 37°C

Hämalaun nach Mayer:

1. 1 g  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$  (Merck, Hämatoxylin, MW 302,29 g/mol) auf 1000ml Aqua dest.
2. + 0,2g  $\text{NaJO}_3$  (Riedel-de Haen, Natriumjodat, MW 197,89 g/mol)
3. + 50g  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Kalium-Aluminium Alaun)
4. + 50g Chloralhydrat (Merck, Abfüllung)
5. + 1g kristallisierte Zitronensäure (Merck, Abfüllung)

PBS-Puffer (0,01 Mol/l)

1. 27,2 g 0,2 molar  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kaliumhydrogenphosphat; MW 136,09 g/mol; Merck, Pro Analyti) in 1l 0,9% physiologischer Kochsalzlösung (Merck, 0,9%  $\text{NaCl}$  54g auf 6l Aqua dest.
2. 71,2g 0,2 molar  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat; MW 177,99 g/mol; Merck, Pro Analyti) in 2l 0,9% physiologischer Kochsalzlösung

Auf 18 ml von Lösung 1 und 82 ml von Lösung 2 kamen 1,9 l physiologische Kochsalzlösung. PBS hat einen Pufferbereich zwischen pH 7,2 und 7,4.

### Citrat-Puffer (0,01 Mol/l)

1. 15 ml 0,1 molar  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  (Zitronensäure-Monohydrat, MW 210,14 g/mol; Merck)
2. 85 ml 0,1 molar  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$  (Trinatriumcitrat-Dihydrat, MW 294,1 g/mol; Merck)

Auf 15 ml von Lösung 1 und 85 ml von Lösung 2 kamen 0,9 ml Aqua dest. Der pH Wert des Citrat- Puffers beträt zwischen 6 und 6,1.

## 7.2. Tabellen zu den Diagrammen

	Höhe in $\mu\text{m}$	Querdurchmesser in $\mu\text{m}$
3 Wo Wild	2720,6	1624,3
3 Wo KO	2173,9	1458,5
6 Wo Wild	2782,6	1583,7
6 Wo KO	2679,8	1498,8
10 Wo Wild	3030,4	1674
10 Wo KO	2669,4	1395,2
80 Wo Wild	2084	1295,3
60 Wo KO	2608,77	1564

	Anzahl der Mitralzellen pro 400 $\mu\text{m}$			Anzahl der Mitralzellen pro Glomerulus		
	gesamt	medial	lateral	gesamt	medial	lateral
3 Wo Wild	19,6	17,5	22,6	19,6	19,2	19,8
3 Wo KO	23,6	22	25,7	18,7	17,5	20,6
6 Wo Wild	18,6	17,5	19,9	19,7	20,3	18,6
6 Wo KO	18,7	18,1	19,3	21,8	20,4	20,4
10 Wo Wild	17,8	14,9	21,8	25,6	24,7	24,7
10 Wo KO	15	14,4	16	23	23	21,3
80 Wo Wild	13,6	12,9	14,3	k.A.	k.A.	k.A.
60 Wo KO	14,6	12,5	16,6	k.A.	k.A.	k.A.

	Mitralzellfläche in $\mu\text{m}^2$			Glomerulusfläche in $\mu\text{m}^2$			Glomerulusvolumen in $\mu\text{m}^3$
	gesamt	medial	lateral	gesamt	medial	lateral	gesamt
3 Wo Wild	176,4	181,4	170,5	3630	3856,4	3377	166632
3 Wo KO	133,9	145,4	120,1	3861,1	4188,1	3450,2	180584
6 Wo Wild	118,4	122,1	114,6	5304	5199,3	5482,5	291381
6 Wo KO	117,6	121	113,5	4542,9	5006	4811,3	251214
10 Wo Wild	138	145,4	128,9	5160	5460	5330	279150
10 Wo KO	123,3	126,1	120	5340,4	5908,2	4894,3	279912
ALT Wild	127,5	124,5	129,8	5580,9	4365,9	6122,9	313556
ALT KO	138,8	135,3	141,6	4365,1	4465,4	4271,8	216940

## 8. Verzeichnisse

### 8.1. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Allgemeine Funktionen von Taurin; (Janeke et al., 2003) .....	21
Tab. 2: Verwendete Mäuse; <i>taut</i> +/+ Wildtyp, <i>taut</i> -/- KO-Typ.....	27
Tab. 3: Übersicht über Antikörper für Immunhistochemische Reaktion .....	30

### 8.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Riechschleimhaut bestehend aus Riechepithel und Lamina propria; Maus 10fache Vergrößerung, HE Färbung .....	2
Abb. 2: Riechepithel mit ORN, Gangzellen der Bowman-Drüsen (B), Basalzellen und Stützzellen; Maus 20fache Vergrößerung, PGP 9.5 immunhistochemische Färbung .....	4
Abb. 3: Schichtaufbau des Bulbus olfactorius; Maus; PGP 9.5 immunhistochemische Färbung; Balken entspricht 100µm .....	6
Abb. 4: Schema des Bulbus olfactorius (Mori et al., 1999). Darstellung der Signalweiterleitung im OB. Bis zu 10.000 ORN konvergieren in einem Glomerulus auf eine Mitralzelle (gelb sind die ORN und Mitralzellen des linken Glomerulus, blau die des rechten Glomerulus). Schwarze Pfeile zeigen erregende, rote Pfeile hemmende Signalweiterleitung. Die Axone der Mitral- und Körnerzellen bilden den LOT (aus Deetjen, Speckmann, Hescheler (Hrsg) Physiologie; 4. Auflage Urban und Fischer Verlag; München; p 181).....	8
Abb. 5: Glomeruläre Schicht, Mitralzell – und äußere plexiforme Schicht, Maus; PGP 9.5 immunhistochemische Färbung; Balken entspricht 500µm .....	10
Abb. 6: Schematische Übersicht über olfaktorische Projektionen: Fasern der Mitralzellen ziehen als Tractus olfactorius lateralis (LOT) zu sekundären olfaktorischen Strukturen. Diese senden dann vor allem Signale zum orbitofrontalen Cortex, zur Inselrinde, zum Hippocampus, zum Hypothalamus und zum Hirnstamm. Verbindungen aus dem Nucleus olfactorius anterior (AON) hemmen kontralaterale Körner- und periglomeruläre Zellen. (Trepel, 2003; Witt und Hansen, 2008).....	14
Abb. 7: Olfaktorische Signaltransduktion. Duftmoleküle aktivieren, an G-Protein gekoppelt, eine Enzymkaskade. Diese führt zur Öffnung der CNG-Kanäle und so zum Einstrom von Kationen. Diese depolarisieren die Zelle (aus Witt and Hansen, 2008). .....	18
Abb. 8: Taurin.....	19
Abb. 9: GABA.....	19
Abb. 10: OB von dorsal, Darstellung der Einteilung in medial/lateral und central/caudal/rostral .....	34
Abb. 11: Querschnitte des OB (von links nach rechts: rostral, central & caudal) Maus, PGP 9.5 immunhistochemische Färbung, Balken entspricht 500µm .....	34
Abb. 12: Zur Bestimmung des ventro-dorsalen Durchmesser (Höhe; rot) & des Querdurchmesser (grün) sowie der Gesamtfläche (blau); Maus, PGP 9.5 immunhistochemische Färbung, Balken entspricht 500µm .....	35
Abb. 13: Messrahmen (gelb) 100µm Abstand, ausgezählte Strecke 400µm (blau), exemplarisch gezählte Mitralzellen (rot) und Glomeruli (grün), Maus PGP 9.5 immunhistochemische Färbung (siehe auch Erläuterung des Algorithmus in 3.3.2.5.1), Balken entspricht 200µm .....	36

Abb. 14: Messung der Glomerulusfläche (großes Bild) und der Mitralzellfläche (kleines Bild), Maus, PGP 9.5 immunhistochemische Färbung, Balken entspricht 100µm .....	37
Abb. 15: Qualitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der Mitralzellen. Gegenfärbung immer mit Hämalan. a) Darstellung von PGP 9.5 als neuronalen Marker, b) Darstellung von Ki-67 als Marker für Proliferation; c) Darstellung von Caspase-3 als Marker für Apoptose. Pfeile markieren jeweils exemplarisch positive Zellen. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen Wild- und KO-Typ Mäusen in der Anfärbbarkeit mit PGP 9.5, Ki-67 und Caspase 3. Bilder von drei Wochen alter KO- Typ Maus, Bild a 100fache Vergrößerung, Bilder b und c 200 fache Vergrößerung.....	41
Abb. 16: Höhe (ventro-dorsaler Durchmesser) des Bulbus olfactorius. Im Vergleich <i>taut -/-</i> (KO-Typ) und <i>taut +/+</i> Mäuse (Wildtyp) im Alter von 3, 6 und 10 Wochen, Darstellung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen. <i>Taut -/-</i> Mäuse haben in jeder Altersgruppe eine signifikant kleinere Bulbushöhe als die Kontrolltiere ( <i>taut+/+</i> Mäuse) (* = $p < 0.05$ ).....	42
Abb. 17: Querdurchmesser des Bulbus olfactorius. <i>Taut -/-</i> und <i>taut +/+</i> Mäuse im Alter von 3, 6 und 10 Wochen, Darstellung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen. Die OB der <i>taut -/-</i> Mäuse haben in jedem Alter einen signifikant kleineren Durchmesser als die der Kontrolltiere ( <i>taut+/+</i> Mäuse) (*= $p < 0.05$ ). .....	43
Abb. 18: Mitralzellanzahl gesamt (medial und lateral gemittelt) pro 400µm bei <i>taut +/+</i> und <i>-/-</i> Mäusen im Alter von 3, 6 und 10 Wochen. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen. Die OB der <i>taut +/+</i> Mäuse haben bei den 3 und 6 Wochen alten Tieren weniger Mitralzellen pro 400µm, bei den 10 Wochen alten Mäusen mehr Mitralzellen als bei <i>taut -/-</i> Tieren. ....	44
Abb. 19: Mitralzellanzahl pro 400µm medial, im Vergleich <i>taut +/+</i> und <i>-/-</i> Mäuse im Alter von 3, 6 und 10 Wochen. Darstellung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen. 3 Wochen alte <i>taut -/-</i> Mäuse haben signifikant mehr ( $p = 0.004$ ), 10 Wochen alte Tiere tendenziell weniger Mitralzellen pro 400µm medial als der Wildtyp .....	45
Abb. 20: Mitralzellanzahl pro 400µm lateral, im Vergleich <i>taut +/+</i> und <i>taut -/-</i> Mäuse 3, 6 und 10 Wochen alt, Darstellung von Mittelwert, Standardabweichungen und Signifikanz. 3 Wochen alte <i>taut -/-</i> Mäuse haben mehr, und 10 Wochen alte Tiere signifikant weniger Mitralzellen pro 400µm lateral als der Wildtyp ( $p = 0.039$ ).....	45
Abb. 21: Mitralzellanzahl pro 400µm, im Vergleich <i>taut +/+</i> und <i>taut -/-</i> Mäuse 3, 6 und 10 Wochen alt. Darstellung Mitralzellverlust pro Zeiteinheit. Wildtypiere verlieren pro Zeiteinheit signifikant weniger Mitralzellen als KO-Typmäuse ( $p < 0.05$ ).....	46
Abb. 22: Mitralzellanzahl pro Glomerulus; Vgl. <i>taut +/+</i> und <i>taut -/-</i> Mäuse 3, 6 und 10 Wochen alt. Darstellung von Mittelwert, Standardabweichungen und Signifikanz. Bulbi der 3 Wochen alten <i>taut -/-</i> Mäuse enthalten signifikant mehr ( $p = 0.024$ ), der 6 und 10 Wochen alten Tiere weniger Mitralzellen im Durchschnitt pro Glomerulus als die <i>taut +/+</i> Mäuse.....	47
Abb. 23: Fläche pro Mitralzelle, Darstellung der Durchschnittsmitralzellfläche für eine Mitralzelle mit Standardabweichungen. Im gesamten Bulbus (ges) und einzeln im medialen (med) und lateralen (lat) Bereich. <i>Taut -/-</i> Mäuse haben tendenziell weniger Fläche als <i>taut +/+</i> Mäuse in der entsprechenden Vergleichsgruppe. Es besteht eine Signifikanz der Flächenunterschiede zwischen den verschiedenen Altersgruppen ( $p = 0,016$ ) .....	48
Abb. 24: Mitralzellfläche pro 400µm. Darstellung der Durchschnittsmitralzellfläche für eine Strecke von 400µm mit Standardabweichungen. Zwischen <i>taut -/-</i> und <i>taut +/+</i> Mäusen gibt es keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Mitralzellfläche pro 400µm. Signifikant ist der Unterschied zwischen den 3 und 6 Wochen alten Mäusen ( $p < 0.001$ ). .....	49
Abb. 25: Fläche pro Glomerulus gesamt, medial und lateral. Darstellung der Durchschnittsglomerulusfläche für einen Glomerulus mit Standardabweichung. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den <i>taut +/+</i> und <i>taut -/-</i> in den Altersgruppen erkennbar. Es besteht eine Signifikanz der Flächenunterschiede beim Vergleich der verschiedenen Altersgruppen ungeachtet des genetischen Typs ( $p < 0.001$ ). .....	50

- Abb. 26: Volumina pro Glomerulus, Darstellung des Durchschnittsvolumen für einen Glomerulus mit Standardabweichung, ausgehend von einer sphärischen Form. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den *taut +/+* und *taut -/-* Mäusen in den Altersgruppen erkennbar. Es besteht eine Signifikanz der Voluminaunterschiede beim Vergleich der verschiedenen Altersgruppen ( $p < 0,001$ ). .....51
- Abb. 27: Ventro-dorsaler Durchmesser und Querdurchmesser des OB; im Vergleich der *taut +/+* und *taut -/-* Maus; Darstellung der Mittelwerte. Die Wildtypmaus (80Wo) besitzt sowohl eine größere Höhe als auch einen größeren Querdurchmesser als die KO-Typ Maus (60Wo) .....52
- Abb. 28: Anzahl der Mitralzellen pro 400µm; Vergleich von *taut +/+* und *taut -/-* Mäusen 3 Wo, 6 Wo, 10 Wo, 60 Wo und 80 Wo. Darstellung der Mittelwerte. Die *taut -/-* Mäuse haben bis zum Alter von 10 Wochen einen größeren Verlust von Mitralzellen (die 60 und 80 Wo alten Tiere sind nicht statistisch überprüft).....53

### 8.3. Literaturverzeichnis

- Abercrombie. 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 94: 239-247.
- Alonso JR, Arevalo R, Garcia-Ojeda E, Porteros A, Brinon JG, Aijon J. 1995. NADPH-diaphorase active and calbindin D-28k-immunoreactive neurons and fibers in the olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J Comp Neurol* 351:307-327.
- Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137:433-457.
- Altshuler D, Lo Turco JJ, Rush J, Cepko C. 1993. Taurine promotes the differentiation of a vertebrate retinal cell type in vitro. *Development* 119:1317-1328.
- Alvarez-Buylla A, JM G-V, AD T. 2001. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2: 287-293.
- Alvarez JG, Storey BT. 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod* 29:548-555.
- Anderson AK, Christoff K, Stappen I, Panitz D, Ghahremani DG, Glover G, Gabrieli JD, Sobel N. 2003. Dissociated neural representations of intensity and valence in human olfaction. *Nat Neurosci* 6:196-202.
- Asan E, Drenckhahn D. 2005. Immunocytochemical characterization of two types of microvillar cells in rodent olfactory epithelium. *Histochem Cell Biol* 123:157-168.
- Aungst JL, Heyward PM, Puche AC, Karnup SV, Hayar A, Szabo G, Shipley MT. 2003. Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature* 426:623-629.
- Axel R. 1995. The molecular logic of smell. *Sci Am* 273:154-159.
- Bailey MS, Puche AC, Shipley MT. 1999. Development of the olfactory bulb: evidence for glia-neuron interactions in glomerular formation [see comments]. *J Comp Neurol* 415:423-448.
- Baker H, Greer CA. 1990. Region-specific consequences of PCD gene expression in the olfactory system. *J Comp Neurol* 293:125-133.
- Baltanas FC, Curto GG, Gomez C, Diaz D, Murias AR, Crespo C, Erdelyi F, Szabo G, Alonso JR, Weruaga E. 2001. Types of cholecystinin-containing periglomerular cells in the mouse olfactory bulb. *J Neurosci Res* 89:35-43.
- Barakat L, Wang D, Bordey A. 2002. Carrier-mediated uptake and release of taurine from Bergmann glia in rat cerebellar slices. *J Physiol* 541:753-767.
- Batista-Brito R, Close J, Machold R, Fishell G. 2008. The distinct temporal origins of olfactory bulb interneuron subtypes. *J Neurosci* 28:3966-3975.
- Bayer SA. 1983. 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp Brain Res* 50:329-340.

- Bayer SA. 1985. Neuron production in the hippocampus and olfactory bulb of the adult rat brain: addition or replacement? *Ann N Y Acad Sci* 457:163-172.
- Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ. 2003. Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 23:10411-10418.
- Belluzzi O, Puopolo M, Benedusi M, Kratskin I. 2004. Selective neuroinhibitory effects of taurine in slices of rat main olfactory bulb. *Neuroscience* 124:929-944.
- Ben-Ari Y. 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728-739.
- Benson TE, Ryugo DK, Hinds JW. 1984. Effects of sensory deprivation on the developing mouse olfactory system: a light and electron microscopic, morphometric analysis. *J Neurosci* 4:638-653.
- Berkowicz DA, Trombley PQ, Shepherd GM. 1994. Evidence for glutamate as the olfactory receptor cell neurotransmitter. *J Neurophysiol* 71:2557-2561.
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. 2000. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291:17-20.
- Bodian D HH. 1941. Experimental studies on intraneural spread fo poliomyelitis virus. In: *Bull Johns Hopkins Hosp* 68: 248-267.
- Brinon JG, Weruaga E, Crespo C, Porteros A, Arevalo R, Aijon J, Alonso JR. 2001. Calretinin-, neurocalcin-, and parvalbumin-immunoreactive elements in the olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J Comp Neurol* 429:554-570.
- Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG. 2003. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 17:2042-2046.
- Brunjes PC. 1994. Unilateral naris closure and olfactory system development. *Brain Res Brain Res Rev* 19:146-160.
- Bucuvalas JC, Goodrich AL, Suchy FJ. 1987. Hepatic taurine transport: a Na<sup>+</sup>-dependent carrier on the basolateral plasma membrane. *Am J Physiol* 253:G351-358.
- Cajal. 1911. *Histologie du Système Nerveux*, vol. 2 Trans. AZOULAY, L. Paris: Maloine.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. 1993. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337-344.
- Carlen M, Cassidy RM, Brismar H, Smith GA, Enquist LW, Frisen J. 2002. Functional integration of adult-born neurons. *Curr Biol* 12:606-608.
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM. 2003. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6:507-518.
- Carr VM, Farbman AI. 1992. Ablation of the olfactory bulb up-regulates the rate of neurogenesis and induces precocious cell death in olfactory epithelium. *Exp Neurol* 115:55-59.
- Carr VM, Farbman AI. 1993. The dynamics of cell death in the olfactory epithelium. *Exp Neurol* 124:308-314.

- Cau E, Casarosa S, Guillemot F. 2002. Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development* 129:1871-1880.
- Chaput MA, Palouzier-Paulignan B, Delaleu JC, Duchamp-Viret P. 2004. Taurine Action on Mitral Cell Activity in the Frog Olfactory Bulb In Vivo. *Chem. Senses* 29:83-91.
- Chen J, Tu Y, Moon C, Matarazzo V, Palmer A, Ronnett G. 2004. The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance. *Dev Biol* 269:165-182.
- Christie JM, Bark C, Hormuzdi SG, Helbig I, Monyer H, Westbrook GL. 2005. Connexin36 mediates spike synchrony in olfactory bulb glomeruli. *Neuron* 46:761-772.
- Christie JM, Schoppa NE, Westbrook GL. 2001. Tufted cell dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is dependent on NMDA receptor activity. *J Neurophysiol* 85:169-173.
- Chuah MI, West AK. 2002. Cellular and molecular biology of ensheathing cells. *Microsc Res Tech* 58:216-227.
- Cleland, Linster. 2003. Central olfactory structure. Doty RL (Eds.). *Handbook of olfaction and gustation*. New York: Marcel Dekker, 165-80).
- Collado P, Guillamon A, Valencia A, Segovia S. 1990. Sexual dimorphism in the bed nucleus of the accessory olfactory tract in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 56:263-268.
- Cooper-Kuhn CM, Vroemen M, Brown J, Ye H, Thompson MA, Winkler J, Kuhn HG. 2002. Impaired adult neurogenesis in mice lacking the transcription factor E2F1. *Mol Cell Neurosci* 21:312-323.
- Costanzo RM, Morrison EE. 1989. Three-dimensional scanning electron microscopic study of the normal hamster olfactory epithelium. *J Neurocytol* 18:381-391.
- Cowan, Roskams. 2002. Apoptosis in the mature and developing olfactory neuroepithelium. *Microsc Res Tech* 58: 204-215.
- Crespo C, Blasco-Ibanez JM, Marques-Mari AI, Alonso JR, Brinon JG, Martinez-Guijarro FJ. 2002. Vasoactive intestinal polypeptide-containing elements in the olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J Chem Neuroanat* 24:49-63.
- Deetjen, Speckmann, Hescheler (Hrsg) *Physiologie*; 4. Auflage Urban und Fischer Verlag; München, p 181

- Deng PY, Lei S. 2006. Bidirectional modulation of GABAergic transmission by cholecystinin in hippocampal dentate gyrus granule cells of juvenile rats. *J Physiol* 572:425-442.
- Devor M. 1976. Neuroplasticity in the rearrangement of olfactory tract fibers after neonatal transection in hamsters. *J Comp Neurol* 166:49-72.
- Didier A, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. 1994. Differential subcellular distribution of glutamate and taurine in primary olfactory neurones. *Neuroreport* 6:145-148.
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A. 1996. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14895-14900.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2002. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021-1034.
- Doran JF, Jackson P, Kynoch PA, Thompson RJ. 1983. Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *J Neurochem* 40:1542-1547.
- Duchamp-Viret P, Delaleu JC, Duchamp A. 2000. GABA(B)-mediated action in the frog olfactory bulb makes odor responses more salient. *Neuroscience* 97:771-777.
- Dumoulin JC, van Wissen LC, Menheere PP, Michiels AH, Geraedts JP, Evers JL. 1997. Taurine acts as an osmolyte in human and mouse oocytes and embryos. *Biol Reprod* 56:739-744.
- Ekstrand JJ, Domroese ME, Johnson DM, Feig SL, Knodel SM, Behan M, Haberly LB. 2001. A new subdivision of anterior piriform cortex and associated deep nucleus with novel features of interest for olfaction and epilepsy. *J Comp Neurol* 434:289-307.
- El Idrissi A, Trenkner E. 2004. Taurine as a modulator of excitatory and inhibitory neurotransmission. *Neurochem Res* 29:189-197.
- Ennis M, Zimmer LA, Shipley MT. 1996. Olfactory nerve stimulation activates rat mitral cells via NMDA and non-NMDA receptors in vitro. *Neuroreport* 7:989-992.
- Eyre MD, Antal M, Nusser Z. 2008. Distinct deep short-axon cell subtypes of the main olfactory bulb provide novel intrabulbar and extrabulbar GABAergic connections. *J Neurosci* 28:8217-8229.
- Farbman AI. 2000. Cell biology of olfactory epithelium. In: Finger TE, Silver W, Restrepo D, Editors. *The Neurobiology of Taste and Smell*. New York, Chicester, Weinheim: Wiley-Liss. p 131-158.
- Farbman AI, Buchholz JA, Suzuki Y, Coines A, Speert D. 1999. A molecular basis of cell death in olfactory epithelium. *J Comp Neurol* 414:306-314.

- Farbman AI, Ezech PI. 2000. TGF- $\alpha$  and olfactory marker protein enhance mitosis in rat olfactory epithelium in vivo. *Neuroreport* 11:3655-3658.
- Fiske BK, Brunjes PC. 2001. Cell death in the developing and sensory-deprived rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 431:311-319.
- Frazier LL, Brunjes PC. 1988. Unilateral odor deprivation: early postnatal changes in olfactory bulb cell density and number. *J Comp Neurol* 269:355-370.
- Frederickson RC, Neuss M, Morzorati SL, McBride WJ. 1978. A comparison of the inhibitory effects of taurine and GABA on identified Purkinje cells and other neurons in the cerebellar cortex of the rat. *Brain Res* 145:117-126.
- Freeman WJ. 1972. Linear analysis of the dynamics of neural masses. *Annu Rev Biophys Bioeng* 1:225-256.
- Fritschy JM, Mohler H. 1995. GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol* 359:154-194.
- Fung KM, Peringa J, Venkatachalam S, Lee VM, Trojanowski JQ. 1997. Coordinate reduction in cell proliferation and cell death in mouse olfactory epithelium from birth to maturity. *Brain Res* 761:347-351.
- Getchell TV, Margolis FL, Getchell ML. 1984. Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction. *Prog Neurobiol* 23:317-345.
- Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM. 2000. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1823-1828.
- Ghijssen WE, Leenders AG, Wiegant VM. 2001. Regulation of cholecystokinin release from central nerve terminals. *Peptides* 22:1213-1221.
- Gomez C, Brinon JG, Orio L, Colado MI, Lawrence AJ, Zhou FC, Vidal M, Barbado MV, Alonso JR. 2007. Changes in the serotonergic system in the main olfactory bulb of rats unilaterally deprived from birth to adulthood. *J Neurochem* 100:924-938.
- Gottfried, TA C, C L. 2003. Central olfactory structures. Doty RL (Eds.). *Handbook of olfaction and gustation*. New York: Marcel Dekker, 165-80).
- Gracia-Llanes FJ, Crespo C, Blasco-Ibanez JM, Marques-Mari AI, Martinez-Guijarro FJ. 2003. VIP-containing deep short-axon cells of the olfactory bulb innervate interneurons different from granule cells. *Eur J Neurosci* 18:1751-1763.
- Graziadei PP, Monti Graziadei GA. 1979. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol* 8:1-18.
- Greer CA. 1991a. Structural organization of the olfactory system. In: Getchell TV, Editor. *Smell and Taste in Health and Disease*. New York: Raven Press. p 65-81.
- Greer JJ, Smith JC, Feldman JL. 1991b. Role of excitatory amino acids in the generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat. *J Physiol* 437:727-749.
- Griff ER, Mafhouz M, Chaput MA. 2008a. Comparison of Identified Mitral and Tufted Cells in Freely Breathing Rats: II. Odor-Evoked Responses. *Chem Senses*.

- Griff ER, Mafhouz M, Perrut A, Chaput MA. 2008b. Comparison of Identified Mitral and Tufted Cells in Freely Breathing Rats: I. Conduction Velocity and Spontaneous Activity. *Chem Senses*.
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL. 2002. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22:437-445.
- Guillamon A, Segovia S, del Abril A. 1988. Early effects of gonadal steroids on the neuron number in the medial posterior region and the lateral division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 44:281-290.
- Gutierrez-Mecinas M, Crespo C, Blasco-Ibanez JM, Gracia-Llanes FJ, Marques-Mari AI, Martinez-Guijarro FJ. 2005. Characterization of somatostatin- and cholecystokinin-immunoreactive periglomerular cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 489:467-479.
- Haberly LB, Price JL. 1977. The axonal projection patterns of the mitral and tufted cells of the olfactory bulb in the rat. *Brain Res* 129:152-157.
- Hafezi F, Grimm C, Simmen BC, Wenzel A, Reme CE. 2000. Molecular ophthalmology: an update on animal models for retinal degenerations and dystrophies. *Br J Ophthalmol* 84:922-927.
- Hall RD, Macrides F. 1983. Olfactory bulbectomy impairs the rat's radial-maze behavior. *Physiol Behav* 30:797-803.
- Halpern M. 1987. The organization and function of the vomeronasal system. *Annu Rev Neurosci* 10:325-362.
- Haroutounian JE, Petrosian AM. 1998. Effects of taurine and light on retinal GABA content and the efflux of <sup>14</sup>C-GABA and <sup>14</sup>C-aspartate from frog retina. *Adv Exp Med Biol* 442:415-421.
- Hayar A, Karnup S, Ennis M, Shipley MT. 2004. External tufted cells: a major excitatory element that coordinates glomerular activity. *J Neurosci* 24:6676-6685.
- Hayes KC, Carey RE, Schmidt SY. 1975. Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science* 188:949-951.
- Heller-Stilb B, van Roeyen C, Rascher K, Hartwig HG, Huth A, Seeliger MW, Warskulat U, Haussinger D. 2002a. Disruption of the taurine transporter gene (*taut*) leads to retinal degeneration in mice. *Faseb J* 16:231-233.
- Heller-Stilb B, van Roeyen C, Rascher K, Hartwig HG, Huth A, Seeliger MW, Warskulat U, Haussinger D. 2002b. Disruption of the taurine transporter gene (*taut*) leads to retinal degeneration in mice. *Faseb J* 16:231-233.
- Hinds JW. 1968. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. I. Time of origin of neurons and neuroglia. *J Comp Neurol* 134:287-304.
- Hinds JW, McNelly NA. 1981. Aging in the rat olfactory system: correlation of changes in the olfactory epithelium and olfactory bulb. *J Comp Neurol* 203:441-453.
- Hsu SM RL, Fanger H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29 (4): 577-580.

- Huang DY, Boini KM, Lang PA, Grahammer F, Duszenko M, Heller-Stilb B, Warskulat U, Haussinger D, Lang F, Vallon V. 2006. Impaired ability to increase water excretion in mice lacking the taurine transporter gene TAUT. *Pflugers Arch* 451:668-677.
- Hummel T, Mohammadian P, Marchl R, Kobal G, Lotsch J. 2003. Pain in the trigeminal system: irritation of the nasal mucosa using short- and long-lasting stimuli. *Int J Psychophysiol* 47:147-158.
- Huxtable R, Chubb J. 1976. Taurine and isoproterenol toxicity. *Proc West Pharmacol Soc* 19:316-319.
- Huxtable RJ. 1989. Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. *Prog Neurobiol* 32:471-533.
- Huxtable RJ. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72:101-163.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R. 2008. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11:1153-1161.
- Ito T, Kimura Y, Uozumi Y, Takai M, Muraoka S, Matsuda T, Ueki K, Yoshiyama M, Ikawa M, Okabe M, Schaffer SW, Fujio Y, Azuma J. 2008. Taurine depletion caused by knocking out the taurine transporter gene leads to cardiomyopathy with cardiac atrophy. *J Mol Cell Cardiol* 44:927-937.
- Ito T, Oishi S, Takai M, Kimura Y, Uozumi Y, Fujio Y, Schaffer SW, Azuma J. 2010. Cardiac and skeletal muscle abnormality in taurine transporter-knockout mice. *J Biomed Sci* 17 Suppl 1:S20.
- Iwai N, Zhou Z, Roop DR, Behringer RR. 2008. Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium. *Stem Cells* 26:1298-1306.
- Janeke G, Siefken W, Carstensen S, Springmann G, Bleck O, Steinhart H, Hoyer P, Wittern KP, Wenck H, Stab F, Sauermann G, Schreiner V, Doering T. 2003. Role of taurine accumulation in keratinocyte hydration. *J Invest Dermatol* 121:354-361.
- Jessen H, Sheikh MI. 1991. Renal transport of taurine in luminal membrane vesicles from rabbit proximal tubule. *Biochim Biophys Acta* 1064:189-198.
- Johnson EW, Eller PM, Jafek BW. 1994. Protein gene product 9.5 in the developing and mature rat vomeronasal organ. *Brain Res Dev Brain Res* 78:259-264.
- Kamisaki Y, Wada K, Nakamoto K, Itoh T. 1996. Release of taurine and its effects on release of neurotransmitter amino acids in rat cerebral cortex. *Adv Exp Med Biol* 403:445-454.
- Kaplan M, Bell D. 1984. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* 4:1429-1441.
- Kent C, Rowe HL. 1992. The immunolocalisation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP9.5) in developing paraneurons in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 68:241-246.
- Kiyokage E, Pan YZ, Shao Z, Kobayashi K, Szabo G, Yanagawa Y, Obata K, Okano H, Toida K, Puche AC, Shipley MT. 2010. Molecular identity of periglomerular and short axon cells. *J Neurosci* 30:1185-1196.

- Kombian SB, Ananthalakshmi KV, Parvathy SS, Matowe WC. 2005. Cholecystokinin inhibits evoked inhibitory postsynaptic currents in the rat nucleus accumbens indirectly through gamma-aminobutyric acid and gamma-aminobutyric acid type B receptors. *J Neurosci Res* 79:412-420.
- Kontro P, Korpi ER, Oja OS, Oja SS. 1984. Modulation of noradrenaline uptake and release by taurine in rat cerebral slices. *Neuroscience* 13:663-666.
- Kosaka K, Kosaka T. 2007. Chemical properties of type 1 and type 2 periglomerular cells in the mouse olfactory bulb are different from those in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 1167:42-55.
- Kosaka K, Toida K, Aika Y, Kosaka T. 1998. How simple is the organization of the olfactory glomerulus? the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci Res* 30:101-110.
- Kosaka T, Kosaka K. 2010. Heterogeneity of calbindin-containing neurons in the mouse main olfactory bulb: I. General description. *Neurosci Res* 67:275-292.
- Kratskin I, Belluzzi O. 2003. Anatomy and neurochemistry of the olfactory bulb. In: Doty RL, Editor. *Handbook of Olfaction and Gustation*. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc. p 139-164.
- Kratskin IL, Rio JP, Kenigfest NB, Doty RL, Reperant J. 2000. A light and electron microscopic study of taurine-like immunoreactivity in the main olfactory bulb of frogs. *J Chem Neuroanat* 18:87-101.
- Krauel K, Pause BM, Sojka B, Schott P, Ferstl R. 1998. Attentional modulation of central odor processing. *Chem Senses* 23:423-432.
- Krautwurst D, Yau KW, Reed RR. 1998. Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell* 95:917-926.
- Kulanthaivel P, Cool DR, Ramamoorthy S, Mahesh VB, Leibach FH, Ganapathy V. 1991. Transport of taurine and its regulation by protein kinase C in the JAR human placental choriocarcinoma cell line. *Biochem J* 277 (Pt 1):53-58.
- Kuriyama K, Ida S, Nishimura C, Ohkuma S. 1983. Distribution and function of taurine in nervous tissues: an introductory review. *Prog Clin Biol Res* 125:127-140.
- Kwon B, Kim M, Kim W, Pyo J, Cheon Y, Cha C, Nam S, Baik T, Lee B. 2005. Age-related changes in microvillar cells of rat olfactory epithelium. *Neurosci Lett* 378:65-69.
- Laing DG, Panhuber H, Willcox ME, Pittman EA. 1984. Quality and intensity of binary odor mixtures. *Physiol Behav* 33:309-319.
- LaMantia AS, Purves D. 1989. Development of glomerular pattern visualized in the olfactory bulbs of living mice. *Nature* 341:646-649.
- Laurie DJ, Seeburg PH, Wisden W. 1992. The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J Neurosci* 12:1063-1076.
- Leibach JW, Cool DR, Del Monte MA, Ganapathy V, Leibach FH, Miyamoto Y. 1993. Properties of taurine transport in a human retinal pigment epithelial cell line. *Curr Eye Res* 12:29-36.

- Leung CT, Coulombe PA, Reed RR. 2007. Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat Neurosci* 10:720-726.
- Liu QR, Lopez-Corcuera B, Nelson H, Mandiyan S, Nelson N. 1992. Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and beta-alanine in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:12145-12149.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-981.
- Lopez-Mascaraque L, Garcia C, Blanchart A, De Carlos J. 2005. Olfactory epithelium influences the orientation of mitral cell dendrites during development. *Dev Dyn* 232:325-335.
- Lopez-Mascaraque L, Villalba RM, de Carlos JA. 1989. Vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in the main olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Neurosci Lett* 98:19-24.
- Luskin MB. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173-189.
- Mackay-Sima A, Chuahb MI. 2000. Neurotrophic factors in the primary olfactory pathway. *Prog Neurobiol* 62:527-559.
- Macrides F, Schneider SP. 1982. Laminar organization of mitral and tufted cells in the main olfactory bulb of the adult hamster. *J Comp Neurol* 208:419-430.
- Malun D, Oland LA, Tolbert LP. 1994. Uniglomerular projection neurons participate in early development of olfactory glomeruli in the moth *Manduca sexta*. *J Comp Neurol* 350:1-22.
- Marr T, Moran J, Schousboe A, Pasantés-Morales H. 1995. Taurine deficiency in dissociated mouse cerebellar cultures affects neuronal migration. *Int J Dev Neurosci* 13:491-502.
- Mason JL, Goldman JE. 2002. A2B5+ and O4+ Cycling progenitors in the adult forebrain white matter respond differentially to PDGF-AA, FGF-2, and IGF-1. *Mol Cell Neurosci* 20:30-42.
- Meisami E, Louie J, Hudson R, Distel H. 1990. A morphometric comparison of the olfactory epithelium of newborn and weanling rabbits. *Cell Tissue Res* 262:89-97.
- Meisami E, Noushinfar E. 1986. Early olfactory deprivation and the mitral cells of the olfactory bulb: a Golgi study. *Int J Dev Neurosci* 4:431-444.
- Meisami E, Safari L. 1981. A quantitative study of the effects of early unilateral olfactory deprivation on the number and distribution of mitral and tufted cells and of glomeruli in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 221:81-107.
- Meisami E, Sendera TJ. 1993. Morphometry of rat olfactory bulbs stained for cytochrome oxidase reveals that the entire population of glomeruli forms early in the neonatal period. *Brain Res Dev Brain Res* 71:253-257.
- Menco BP, Farbman AI. 1992. Ultrastructural evidence for multiple mucous domains in frog olfactory epithelium. *Cell Tissue Res* 270:47-56.

- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2008. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3:265-278.
- Miyamoto Y, Kulanthaivel P, Leibach FH, Ganapathy V. 1991. Taurine uptake in apical membrane vesicles from the bovine retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:2542-2551.
- Mombaerts P. 2004. Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited. *Curr Opin Neurobiol* 14:31-36.
- Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R. 1996. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675-686.
- Monyer. 2005. *Im Dschungel der Düfte*. Uni Spiegel Heidelberg.
- Moran D, Rowley C I, Jafek B. 1982. Electron microscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: The microvillar cell. *Brain Res* 253:39-46.
- Moran J, Maar T, Gegelashvili G, Bock E, Schousboe A, Pasantés-Morales H. 1996. Taurine deficiency and neuronal migration. *Adv Exp Med Biol* 403:519-526.
- Mori K. 1987. Membrane and synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb. *Prog Neurobiol* 29:275-320.
- Mori K, Kishi K, Ojima H. 1983. Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. *J Comp Neurol* 219:339-355.
- Mori K, Nagao H, Yoshihara Y. 1999. The olfactory bulb: Coding and processing of odor molecule information. *Science* 286:711-715.
- Mouradian LE, Scott JW. 1988. Cytochrome oxidase staining marks dendritic zones of the rat olfactory bulb external plexiform layer. *J Comp Neurol* 271:507-518.
- Müller F, O'Rahilly R. 2004. Olfactory structures in staged human embryos. *Cells Tissues Organs* 178:93-116.
- Muramatsu M, Kakita K, Nakagawa K, Kuriyama K. 1978. A modulating role of taurine on release of acetylcholine and norepinephrine from neuronal tissues. *Jpn J Pharmacol* 28:259-268.
- Nagayama S, Takahashi YK, Yoshihara Y, Mori K. 2004. Mitral and tufted cells differ in the decoding manner of odor maps in the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol* 91:2532-2540.
- Nakajima T, Okamura M, Ogawa K, Taniguchi K. 1996. Immunohistochemical and enzyme histochemical characteristics of short axon cells in the olfactory bulb of the golden hamster. *J Vet Med Sci* 58:903-908.
- Nomura T, Osumi N. 2004. Misrouting of mitral cell progenitors in the Pax6/small eye rat telencephalon. *Development* 131:787-796.
- O'Flaherty I SP, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. 1997. Intestinal taurine transport: a review. Royal college of Surgeons in Ireland, Department of Surgery, Beaumont Hospital, Dublin, Ireland.

- Oermann E, Warskulat U, Heller-Stilb B, Haussinger D, Zilles K. 2005. Taurine-transporter gene knockout-induced changes in GABA(A), kainate and AMPA but not NMDA receptor binding in mouse brain. *Anat Embryol (Berl)* 210:363-372.
- Okamoto K, Kimura H, Sakai Y. 1983. Taurine-induced increase of the Cl<sup>-</sup> conductance of cerebellar Purkinje cell dendrites in vitro. *Brain Res* 259:319-323.
- Oland LA, Orr G, Tolbert LP. 1990. Construction of a protoglomerular template by olfactory axons initiates the formation of olfactory glomeruli in the insect brain. *J Neurosci* 10:2096-2112.
- Orona E, Rainer EC, Scott JW. 1984. Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 226:346-356.
- Panhuber H, Laing DG, Willcox ME, Eagleson GK, Pittman EA. 1985. The distribution of the size and number of mitral cells in the olfactory bulb of the rat. *J Anat* 140 (Pt 2):297-308.
- Panzanelli P, Fritschy JM, Yanagawa Y, Obata K, Sassoe-Pognetto M. 2007. GABAergic phenotype of periglomerular cells in the rodent olfactory bulb. *J Comp Neurol* 502:990-1002.
- Parrish-Aungst S, Shipley MT, Erdelyi F, Szabo G, Puche AC. 2007. Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 501:825-836.
- Pelosi P. 2001. The role of perireceptor events in vertebrate olfaction. *Cell Mol Life Sci* 58:503-509.
- Peretto P, Giachino C, Aimar P, Fasolo A, Bonfanti L. 2005. Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain. *J Comp Neurol* 487:407-427.
- Peretto P, Giachino C, Panzica GC, Fasolo A. 2001. Sexually dimorphic neurogenesis is topographically matched with the anterior accessory olfactory bulb of the adult rat. *Cell Tissue Res* 306:385-389.
- Persohn E, Malherbe P, Richards JG. 1992. Comparative molecular neuroanatomy of cloned GABA<sub>A</sub> receptor subunits in the rat CNS. *J Comp Neurol* 326:193-216.
- Peterson DA. 2002. Stem cells in brain plasticity and repair. *Curr Opin Pharmacol* 2:34-42.
- Philpot BD, Foster TC, Brunjes PC. 1997. Mitral/tufted cell activity is attenuated and becomes uncoupled from respiration following naris closure. *J Neurobiol* 33:374-386.
- Pinching AJ, Powell TP. 1971a. The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9:305-345.
- Pinching AJ, Powell TP. 1971b. The neuropil of the periglomerular region of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9:379-409.
- Pomeroy SL, LaMantia AS, Purves D. 1990. Postnatal construction of neural circuitry in the mouse olfactory bulb. *J Neurosci* 10:1952-1966.
- Pow DV, Sullivan R, Reye P, Hermanussen S. 2002. Localization of taurine transporters, taurine, and (3)H taurine accumulation in the rat retina, pituitary, and brain. *Glia* 37:153-168.

- Pressler RT, Stowbridge BW. 2006. Blanes cells mediate persistent feedforward inhibition onto granule cells in the olfactory bulb. *Neuron* 49:889-904.
- Rakovska A. 1995a. Cholecystokinin-GABA interactions in rat striatum. *Neuropeptides* 29:257-262.
- Rakovska A. 1995b. Cholecystokinin [corrected] octapeptide modulates dopamine release in rat striatum. *Neurosci Lett* 195:151-154.
- Rascher K, Servos G, Berthold G, Hartwig HG, Warskulat U, Heller-Stilb B, Haussinger D. 2004. Light deprivation slows but does not prevent the loss of photoreceptors in taurine transporter knockout mice. *Vision Res* 44:2091-2100.
- Recio JS, Weruaga E, Gomez C, Valero J, Brinon JG, Alonso JR. 2007. Changes in the connections of the main olfactory bulb after mitral cell selective neurodegeneration. *J Neurosci Res* 85:2407-2421.
- Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB. 1994. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79:1245-1255.
- Rocheffort N, Quenech'du N, Watroba L, Mallat M, Giaume C, Milleret C. 2002. Microglia and astrocytes may participate in the shaping of visual callosal projections during postnatal development. *J Physiol Paris* 96:183-192.
- Rosselli-Austin L, Altman J. 1979. The postnatal development of the main olfactory bulb of the rat. *J Dev Physiol* 1:295-313.
- Royet JP, Jourdan F, Ploye H, Souchier C. 1989. Morphometric modifications associated with early sensory experience in the rat olfactory bulb: II. Stereological study of the population of olfactory glomeruli. *J Comp Neurol* 289:594-609.
- Sakamoto M, Yokouchi K, Sekiguchi Y, Fukushima N, Kawagishi K, Kakegawa A, Sumitomo N, Moriizumi T. 2010. Re-evaluation of spontaneous regeneration of the lateral olfactory tract. *Neurosci Res* 68:15-21.
- Salceda R, Pasantes-Morales H. 1982. Uptake, release, and binding of taurine in degenerated rat retinas. *J Neurosci Res* 8:631-642.
- Sanes JR, Hildebrand JG. 1976. Structure and development of antennae in a moth, *Manduca sexta*. *Dev Biol* 51:280-299.
- Schild D, Restrepo D. 1998. Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol Rev* 78:429-466.
- Schmidt T. 1997. *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag. Berlin.
- Schneider SP, Macrides F. 1978. Laminar distributions of interneurons in the main olfactory bulb of the adult hamster. *Brain Res Bull* 3:73-82.
- Schneider SP, Scott JW. 1983. Orthodromic response properties of rat olfactory bulb mitral and tufted cells correlate with their projection patterns. *J Neurophysiol* 50:358-378.
- Schoenfeld TA, Macrides F. 1984. Topographic organization of connections between the main olfactory bulb and pars externa of the anterior olfactory nucleus in the hamster. *J Comp Neurol* 227:121-135.

- Schoenfeld TA, Marchand JE, Macrides F. 1985. Topographic organization of tufted cell axonal projections in the hamster main olfactory bulb: an intrabulbar associational system. *J Comp Neurol* 235:503-518.
- Scholzen T, Gerdes J, 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182: 311-322.
- Schröder K, Hopf A, Lange H, G T. 1975. Morphometrisch-statistische Strukturanalysen des Striatum, Pallidum und Nucleus subthalamicus beim Menschen. *Hirnforsch*:330-350.
- Schwartz GA, Kostek C, Ahmad N, Dibble C, Pays L, Puschel AW. 2000. Semaphorin 3A is required for guidance of olfactory axons in mice. *J Neurosci* 20:7691-7697.
- Schwob JE. 2002. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec* 269:33-49.
- Scott JW. 1981. Electrophysiological identification of mitral and tufted cells and distributions of their axons in olfactory system of the rat. *J Neurophysiol* 46:918-931.
- Segovia S, Guillamon A. 1993. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res Brain Res Rev* 18:51-74.
- Seki T. 2002. Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons. *J Neurosci Res* 69:772-783.
- Seroogy KB, Brecha N, Gall C. 1985. Distribution of cholecystokinin-like immunoreactivity in the rat main olfactory bulb. *J Comp Neurol* 239:373-383.
- Shephard DA. 1974. Thomas Edison's attempts at radiography of the brain (1896). *Mayo Clin Proc* 49:59-61.
- Shephard KL. 1989. The effects of mucus and mucilaginous materials on ion-distributions at epithelial surfaces. *Symp Soc Exp Biol* 43:123-130.
- Shepherd GM. 1972. Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev* 52:864-917.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S. 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299:117-120.
- Shiple MT, Ennis M. 1996. Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol* 30:123-176.
- Skeen LC, Due BR, Douglas FE. 1986. Neonatal sensory deprivation reduces tufted cell number in mouse olfactory bulbs. *Neurosci Lett* 63:5-10.
- Skeen LC, Hall WC. 1977. Efferent projections of the main and the accessory olfactory bulb in the tree shrew (*Tupaia glis*). *J Comp Neurol* 172:1-35.
- Smith KE, Borden LA, Wang CH, Hartig PR, Branchek TA, Weinschank RL. 1992. Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Mol Pharmacol* 42:563-569.
- Steullet P, Cate HS, Derby CD. 2000. A spatiotemporal wave of turnover and functional maturation of olfactory receptor neurons in the spiny lobster *Panulirus argus*. *J Neurosci* 20:3282-3294.

- Streit A. 2007. The preplacodal region: an ectodermal domain with multipotential progenitors that contribute to sense organs and cranial sensory ganglia. *Int J Dev Biol* 51:447-461.
- Strotmann J, Levai O, Fleischer J, Schwarzenbacher K, Breer H. 2004. Olfactory receptor proteins in axonal processes of chemosensory neurons. *J Neurosci* 24:7754-7761.
- Sturman JA. 1993. Taurine in development. *Physiol Rev* 73:119-147.
- Sturman JA, Rassin DK, Hayes KC, Gaull GE. 1978. Taurine deficiency in the kitten: exchange and turnover of [<sup>35</sup>S] taurine in brain, retina, and other tissues. *J Nutr* 108:1462-1476.
- Suzuki K, Taniguchi K, Syuto B. 1999. Characterization of olfactory receptor organs in *Xenopus laevis* Daudin. *Anat Rec* 255:420-427.
- Takami S, Fernandez GD, Graziadei PP. 1992. The morphology of GABA-immunoreactive neurons in the accessory olfactory bulb of rats. *Brain Res* 588:317-323.
- Tamai I, Senmaru M, Terasaki T, Tsuji A. 1995. Na(+)- and Cl(-)-dependent transport of taurine at the blood-brain barrier. *Biochem Pharmacol* 50:1783-1793.
- Taylor CR, Shi SR, Chaiwan b, Young L, Imam SA, RJ C. 1994. Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections: androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques. *Hum Pathol* 25: 263 - 270.
- Tchoumkeu-Nzouessa GC, Rebel G. 1996. Regulation of taurine transport in rat astrocytes by protein kinase C: role of calcium and calmodulin. *Am J Physiol* 270:C1022-1028.
- Thornhill RA. 1970. Cell division in the olfactory epithelium of the lamprey, *Lampetra fluviatilis*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 109:147-157.
- Tolbert LP, Sirianni PA. 1990. Requirement for olfactory axons in the induction and stabilization of olfactory glomeruli in an insect. *J Comp Neurol* 298:69-82.
- Trepel. 2003. *Neuroanatomie Urban und Fischer München*; 3. Auflage, pp. 201-202.
- Uchida S, Kwon HM, Yamauchi A, Preston AS, Marumo F, Handler JS. 1992. Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na(+)- and Cl(-)-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8230-8234.
- Vaishnav RA, Getchell ML, Huang L, Hersh MA, Stromberg AJ, Getchell TV. 2008. Cellular and molecular characterization of oxidative stress in olfactory epithelium of Harlequin mutant mouse. *J Neurosci Res* 86:165-182.
- Valero J, Weruaga E, Murias AR, Recio JS, Curto GG, Gomez C, Alonso JR. 2007. Changes in cell migration and survival in the olfactory bulb of the pcd/pcd mouse. *Dev Neurobiol* 67:839-859.
- Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nunez JM, Vosshall LB, Axel R. 1994. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79:981-991.
- Vergano-Vera E, Yusta-Boyo MJ, de Castro F, Bernad A, de Pablo F, Vicario-Abejon C. 2006. Generation of GABAergic and dopaminergic interneurons from endogenous embryonic olfactory bulb precursor cells. *Development* 133:4367-4379.

- Verner, Craig, Guire M. 2007. Effect of taurine supplementation on growth and development in preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007.
- Wachowiak M, Denk W, Friedrich RW. 2004. Functional organization of sensory input to the olfactory bulb glomerulus analyzed by two-photon calcium imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9097-9102.
- Wachowiak M, Shipley MT. 2006. Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* 17:411-423.
- Wang DS, Xu TL, Pang ZP, Li JS, Akaike N. 1998. Taurine-activated chloride currents in the rat sacral dorsal commissural neurons. *Brain Res* 792:41-47.
- Warskulat U, Borsch E, Reinehr R, Heller-Stilb B, Monnighoff I, Buchczyk D, Donner M, Flogel U, Kappert G, Soboll S, Beer S, Pfeffer K, Marschall HU, Gabrielsen M, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Dienes HP, Haussinger D. 2006. Chronic liver disease is triggered by taurine transporter knockout in the mouse. *Faseb J* 20:574-576.
- Warskulat U, Borsch E, Reinehr R, Heller-Stilb B, Roth C, Witt M, Haussinger D. 2007. Taurine deficiency and apoptosis: findings from the taurine transporter knockout mouse. *Arch Biochem Biophys* 462:202-209.
- Warskulat U, Flogel U, Jacoby C, Hartwig HG, Thewissen M, Merx MW, Molojavyi A, Heller-Stilb B, Schrader J, Haussinger D. 2004. Taurine transporter knockout depletes muscle taurine levels and results in severe skeletal muscle impairment but leaves cardiac function uncompromised. *Faseb J* 18:577-579.
- Warskulat U, Zhang F, Haussinger D. 1997. Taurine is an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *J Hepatol* 26:1340-1347.
- Weiler E, Farbman AI. 1999. Mitral cell loss following lateral olfactory tract transection increases proliferation density in rat olfactory epithelium. *Eur J Neurosci* 11:3265-3275.
- Weruaga E, Brinon JG, Porteros A, Arevalo R, Aijon J, Alonso JR. 2001. A sexually dimorphic group of atypical glomeruli in the mouse olfactory bulb. *Chem Senses* 26:7-15.
- Wichterle H, Turnbull DH, Nery S, Fishell G, Alvarez-Buylla A. 2001. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128:3759-3771.
- Willis MA, Butler MA, Tolbert LP. 1995. Normal glomerular organization of the antennal lobes is not necessary for odor-modulated flight in female moths. *J Comp Physiol [A]* 176:205-216.
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG. 2002. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16:1681-1689.
- Witt, Hansen. 2008. Strukturelle und funktionelle Grundlagen des Riechens. In (Hummel T, Welge-Lüssen A, eds) *Riech- und Schmeckstörungen*, Thieme, Stuttgart, pp. 11-26.
- Witt M, Roth C, Hummel T, Warskulat U, Bidmon H-J, D H. 2004a. Taurine transporter knockout in mice reduces their ability to smell. 14th Int. Symp. on olfaction and taste (ISOT XIV), July 5-9 Kyoto, Japan.

Wu. 2009. Role of taurine in the central nervous system. From 17th International Meeting of taurine Fort Lauderdale, FL, USA 14-19 December 2009.