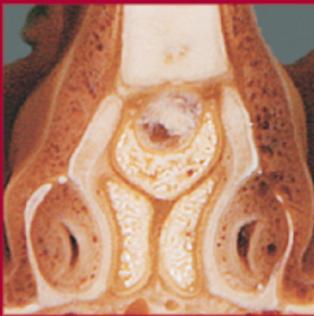


UNTERSUCHUNGEN ZUM FEINBAU
DES VOMERONASALORGANS
BEIM SCHWEIN

-

EINE IMMUNHISTOCHEMISCHE UND
RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE
STUDIE



KATHARINA SIMON

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem
Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik
der Universität Hohenheim
Lehrstuhl für Anatomie und Physiologie der Haustiere
Univ.-Prof. Dr. med. vet. W.M. Amselgruber

Eingereicht über das Institut für Tierpathologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl

**Untersuchungen zum Feinbau des Vomeronasalorgans
beim Schwein - eine immunhistochemische und
rasterelektronenmikroskopische Studie**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Katharina M. Simon
aus Wiesbaden

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Schmahl
Koreferent/en:	Priv.-Doz. Dr. Reese

Tag der Promotion: 08. Februar 2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Anatomie der Nasenhöhlen.....	2
2.1.1 Makroskopische Anatomie des Vomeronasalorgans und der <i>Regio olfactoria</i>	2
2.1.2 Mikroskopische Anatomie des Vomeronasalorgans und der <i>Regio olfactoria</i>	5
2.2 Ontogenese.....	7
2.3 Physiologie der olfaktorischen Wahrnehmung.....	9
2.3.1 Rezeptorvermittelte Signaltransduktion.....	9
2.3.2 Verarbeitung der Nervensignale	11
2.4 Regeneration im olfaktorischen Epithel.....	12
2.4.1 Riechzellen.....	12
2.4.2 Axone.....	14
2.5 Apoptose im Riechepithel.....	15
2.6 Olfactory Marker Protein (OMP).....	16
2.7 Villin	17
2.8 Mitosemarker-Proteine	18
2.8.1 Ki-67	19
2.8.2 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA).....	19
2.9 Lektine	20
3 Material und Methoden	22
3.1 Untersuchungsmaterial	22
3.2 Probennahme und Probenaufbereitung	23
3.2.1 Rasterelektronenmikroskopie	24
3.2.1 Lichtmikroskopie, Immun- und Glykohistochemie.....	25

4	Ergebnisse	30
4.1	Makroskopische Anatomie	30
4.2	Rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse.....	33
4.2.1	Epithelien des VNO	33
4.2.2	Zelltypen des VNO	43
4.2.3	Riechepithel der <i>Regio olfactoria</i>	44
4.3	Histomorphologie	46
4.4	Immunhistochemische Ergebnisse.....	51
4.4.1	Ki-67 und Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)	51
4.4.2	Olfactory Marker Protein (OMP).....	52
4.4.3	Villin	56
4.5	Glykohistochemische Ergebnisse	57
5	Diskussion	60
6	Zusammenfassung	68
7	Summary	70
8	Verzeichnisse	72
8.1	Literaturverzeichnis	72
8.2	Abkürzungsverzeichnis.....	89
8.3	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	91
9	Anhang	95
10	Danksagung	98
11	Lebenslauf	99

1 Einleitung

Das olfaktorische System spielt im gesamten Tierreich eine wichtige Rolle, so z. B. bei der Nahrungssuche, dem Sexualverhalten, der Individualerkennung und der Territorialmarkierung. Neben der *Regio olfactoria* besitzen unsere Haussäugetiere für die Geruchs- und Pheromonwahrnehmung zusätzlich noch ein gut ausgebildetes Vomeronasalorgan (VNO). Während für die *Regio olfactoria* zahlreiche Untersuchungen und Detailkenntnisse vorliegen, ist das VNO bei unseren Haussäugetieren hingegen nur lückenhaft untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie sowie der Immun- und Glykohistochemie den detaillierten Aufbau des VNO an einem umfangreichen Probenmaterial exemplarisch beim Schwein darzustellen. Hierbei wird besonderes Augenmerk auf die morphologischen Besonderheiten der Riechzellen des VNO, deren topographische Verteilung und auf eventuelle altersabhängige Veränderungen des Organs gelegt. Einen weiteren Schwerpunkt bildet die vergleichende Untersuchung der Riechzellen des VNO und der *Regio olfactoria*.

Zusammenfassend zeigt diese Studie eine erstaunlich variable Verteilung der Riechzellen innerhalb des VNO sowie signifikante Unterschiede zwischen den Riechzellen des VNO und der *Regio olfactoria*.

2 Literaturübersicht

2.1 Anatomie der Nasenhöhlen

Die zum oberen Gesichtsschädel gehörende Nase besteht aus den paarigen Nasenhöhlen *Cavum nasi dextrum* und *sinistrum*, die einerseits über die Nares mit der Außenwelt und andererseits über die Choanen mit dem Pharynx in Verbindung stehen. Die beiden Nasenhöhlen sind durch das knorpelige *Septum nasi* voneinander getrennt. Dorsal findet es Anschluss an das Nasendach, ventral an den Nasenboden und kaudal an das *Os ethmoidale* (Ellenberger und Baum, 1943). An der lateralen Wand jeder Nasenhöhle sind zwei *Conchae nasales* befestigt, die die Nasenhöhle in drei *Meatus nasi* unterteilen: den dorsalen Riechgang, den mittleren Sinusgang und den ventralen Atmungsgang. *Cavum nasi* und *Septum nasi* sind fast ausschließlich mit Atmungsschleimhaut ausgekleidet und werden deshalb als *Regio respiratoria* bezeichnet. Nur ein kleiner Teil im Nasengrund, die *Regio olfactoria*, ist mit Riechschleimhaut überzogen (Ghetie, 1941; Ellenberger und Baum, 1943).

2.1.1 Makroskopische Anatomie des Vomeronasalorgans und der *Regio olfactoria*

Im *Meatus nasalis ventralis* findet sich auf Höhe des Caninus der Eingang in den rostroventral gerichteten *Ductus incisivus*, der sich bis zur *Papilla incisiva* in die Mundhöhle erstreckt und dort mit einer schmalen Öffnung endet. In ihn mündet das im ventralen Nasenboden beiderseits des *Septum nasi* (Bakker 1939) gelegene *Organum vomeronasale* (Vomeronasalorgan, VNO, Jacobsonsche Organ). Es ist ein paariges, blind endendes, tubenförmiges Organ, das sich rostral zum *Ductus incisivus* hin öffnet und vom *Cartilago vomeronasalis* umgeben ist (Minett, 1925; Adams, 1992). Die Knorpelspange befindet sich in engem Kontakt zum *Septum nasi* und geht rostral in die knorpelige Einfassung des *Ductus incisivus* über (Trotier und Døving, 1998). Im Anfangsabschnitt erscheint die Knorpelspange geschlossen, weiter kaudal öffnet sie sich dorsal und behält diese Öffnung bis zum kaudalen Ende bei (Minett, 1925; Salazar et al., 2003b). Sie beinhaltet den deutlich kürzeren *Ductus*

vomeronasalis (Abb. 1) sowie Drüsen, Gefäße, Nerven und Bindegewebe (Minett, 1925; Salazar et al., 1996). Die sogenannten Bowman-Drüsen (Getchell and Getchell, 1992) befinden sich in der *Lamina propria* der lateralen Seite des VNO (Minett, 1925; Trotier und Døving, 1998). Sie münden mit ihren Ausführungsgängen hauptsächlich in den Randbereichen der lateralen Seite (Adams, 1992; Salazar et al., 1996). Die arterielle Versorgung des VNO erfolgt über die *Arteria (A.) maxillaris*. Aus ihr geht die *A. sphenopalatina* hervor, von der ein Ast entlang des *Septum nasi* rostral verläuft und mit weiteren Aufzweigungen die Nasenschleimhaut und die zugehörigen Drüsen versorgt, bevor die Endaufzweigungen in die Knorpelspange eintreten. Der Verlauf der Venen gleicht dem der Arterien (Salazar et al., 1996; Trotier und Døving, 1998).

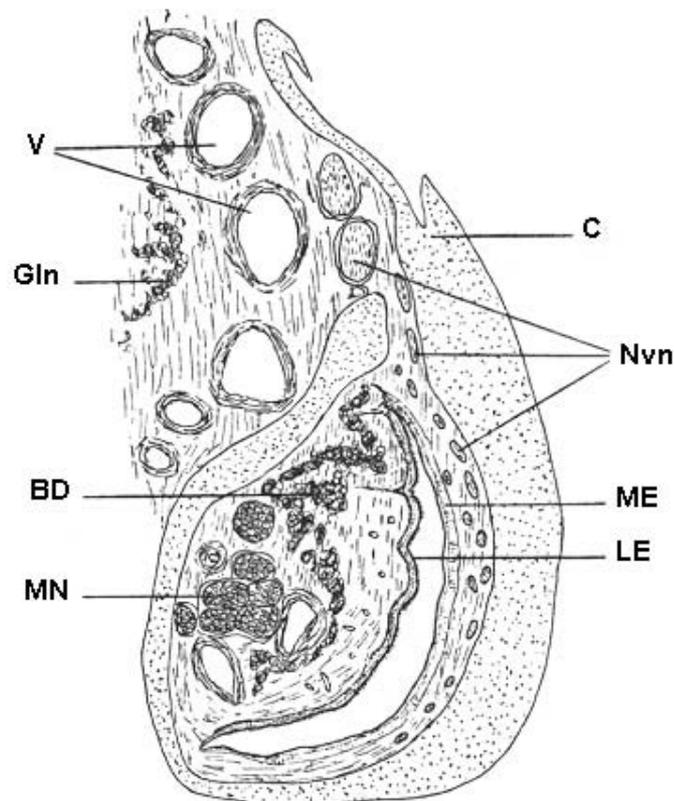


Abb. 1 Schematische Darstellung des VNO (modifiziert nach Minett, 1925). Venen (V), *Glandulae nasales* (Gln), Bowman-Drüsen (BD), myelinisierte Nerven (MN), mediales Epithel (ME), laterales Epithel (LE), *Nervus vomeronasalis* (Nvn), *Cartilago vomeronasalis* (C).

Das VNO ist von Nerven unterschiedlichen Ursprungs umgeben (Abb. 1). Fasern des *N. trigeminus* sind als *N. nasalis caudalis* in der *Lamina propria* der lateralen Seite zu finden (Salazar et al., 1996; Salazar et al., 2003b). Das VNO entlässt Nervenfasern (Axone), die aus den bipolaren Nervenzellen entspringen. Diese Fasern schließen sich zu Nervenfaserbündeln zusammen, passieren gemeinsam als *N. vomeronasalis* die *Lamina cribrosa* und treten in den *Bulbus olfactorius accessorius* ein (Yoshida-Matsuoka et al., 2000; Salazar et al., 2003b). Fasern des *N. terminalis*, dem „nullten“ Gehirnnerven der Wirbeltiere, sind eng mit dem *N. vomeronasalis* vergesellschaftet (Whitlock, 2004; Jastrow und Oelschläger, 2006). Dem *N. terminalis* werden autonome, sensible, sensorische und endokrine Funktionen zugeschrieben (Jastrow und Oelschläger, 2006).

Durch seine Mündung in den *Ductus incisivus* ist das VNO an der Kommunikation zwischen Mund- und Nasenhöhle beteiligt (Minett, 1925; Halpern, 1987). Eine Ausnahme bildet hier das Pferd, bei dem der *Ductus incisivus* keine Verbindung zur Mundhöhle aufnimmt (Ellenberger und Baum, 1943).

Die *Regio olfactoria* befindet sich im proximalen Drittel des Nasengrundes und ist an ihrer gelblich-braunen Farbe makroskopisch leicht zu erkennen (Mendoza, 1993). In der *Lamina propria* befinden sich die *Glandulae olfactoriae*, die ebenfalls Bowman-Drüsen genannt werden, und die *Fila olfactoria* (Mendoza, 1993). Sie setzen sich aus den gebündelten Axonen der Riechzellen der *Regio olfactoria* zusammen und sind wie die Fasern des *N. vomeronasalis* schwach myelinisiert. Gemeinsam passieren sie als *N. olfactorius* die *Lamina cribrosa*, bevor sie im *Bulbus olfactorius* inserieren (Mendoza, 1993; Nedelec et al., 2005). Anteile des *N. terminalis* verlaufen auch hier in enger Nachbarschaft zum *N. olfactorius* (Whitlock, 2004).

Das vomeronasale System wird als ein sekundäres Riechsystem angesehen, das vollständig unabhängig vom Haupttriechsystem ist (Raisman, 1972). Bei den meisten Säugetieren dient es der Wahrnehmung von Pheromonen (Bigiani et al., 2005). Die Organisation des vomeronasalen Systems gleicht jedoch der des Riechsystems der *Regio olfactoria*. Es setzt sich zusammen aus dem Riechepithel des VNO, dem *Bulbus olfactorius accessorius* und einem übergeordneten Zentrum im Gehirn, der vomeronasalen Amygdala (Salazar et al., 2003a). Diese drei Komponenten sind zum einen durch die *Nn. vomeronasales*, zum anderen durch den *Tractus olfactorius accessorius* miteinander verbunden (Wysocki und Meredith, 1987; Salazar et al., 2003a).

2.1.2 Mikroskopische Anatomie des Vomeronasalorgans und der *Regio olfactoria*

Die Auskleidung des sichelförmigen *Ductus vomeronasalis* besteht aus zwei verschiedenen Epithelien: dem rezeptorfreen mehrreihigen Flimmerepithel auf der lateralen Seite (Breipohl et al., 1979; Vaccarezza et al., 1981) und dem Riechepithel auf der medialen Seite (Adams, 1986). Zwischen beiden Epithelien ist eine Übergangszone zu finden (Naguro und Breipohl, 1982). Das rostrale Segment des *Ductus vomeronasalis* weist ein mehrschichtiges Plattenepithel auf. Im mittleren Abschnitt sind sich die beiden organspezifischen Epithelien gegenübergestellt. Das kaudale Segment ist bei der Ratte mit einem einschichtigen hochprismatischen Epithel ausgekleidet (Vaccarezza et al., 1981).

Das Riechepithel besteht aus drei Zelltypen: den Riechzellen, den Basalzellen und den Stützzellen (Halpern, 1987; Adams, 1992). Die Riechzellen sind bipolare Nervenzellen. Ihr apikaler Nervenfortsatz, der Dendrit, weist einige Vesikel und zahlreiche Mitochondrien und Mikrotubuli auf; sein Verlauf zur Epitheloberfläche stellt sich gewunden dar (Naguro und Breipohl, 1982; Adams, 1992). An der Oberfläche präsentiert sich die typische Auftreibung, der „dendritic knob“, von dem aus mehrere kurze Mikrovilli in das Lumen des *Ductus vomeronasalis* ragen (Mendoza, 1993). Die Riechzellen zeichnen sich durch ein helles Zytoplasma mit markanten elektronendichten Mitochondrien aus (Adams und Wiekamp, 1984). Es beinhaltet ferner raues und glattes endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparate, Ribosome und einige Lysosome (Adams, 1992). Die Zellkerne der Riechzellen sind rund und reich an Euchromatin (Adams, 1992). Im basalen Epithelsegment schlängeln sich die Axone der Riechzellen, die teilweise in enger Nachbarschaft zueinander liegen, in Richtung Basalmembran (Adams, 1992), um sich später zum *N. vomeronasalis* zusammenzuschließen (Keverne, 1999).

Über das Vorkommen der Basalzellen gibt es tierartlich sehr unterschiedliche Angaben. Beim Schwein treten sie als elektronendichte, kuboidale Zellen dicht oberhalb der Basalmembran auf (Adams, 1992). Es werden zwei Gruppen von Basalzellen unterschieden: die horizontalen und die rundlichen Basalzellen (Huard und Schwob, 1995; Beites et al., 2005). Rundliche Basalzellen besitzen einen euchromatinreichen Kern und haben, im Gegensatz zu den horizontalen Basalzellen, keine Tonofilamente oder Ribosomen. Gegenwärtig geht man davon aus, dass die Stammzellen des Riechepithels eine Subpopulation der rundlichen Basalzellen sind (Jang et al., 2003).

Die Stützzellen sind in dem der Basalmembran angrenzenden Bereich schmal und erweitern ihr Soma im oberen Drittel des Epithels. In diesem Bereich sind die ovalen, elektronendichten Zellkerne lokalisiert (Adams, 1992). Die Epitheloberfläche der Stützzellen ist mit Mikrovilli besetzt, deren Mikrofilamente häufig dezentral angeordnet sind (Adams, 1992). Das apikale Zytoplasma enthält freie und membrangebundene Ribosomen, Mitochondrien und glattes ER, das in Form parallel liegender Lamellen organisiert ist (Mendoza, 1993). Basal weist das Zytoplasma raues ER, Golgi-Apparate und Mikrotubuli auf (Adams, 1992). Zwischen den Stützzellen sowie zwischen den Stütz- und den Riechzellen bestehen zahlreiche Zellkontakte in Form von *Zonulae occludentes*, *Zonulae adhaerentes* und Desmosomen (Mendoza, 1993; Meier-Stiegen, 2004).

Der Aufbau der Bowman-Drüsen in der *Lamina propria* variiert innerhalb der Tierarten. Die Drüsen können muköse oder seröse Zellen enthalten, gelegentlich sogar beides, und weisen eine unterschiedliche Zusammensetzung von intrazellulären Organellen auf (Getchell und Getchell, 1992). Beim Schwein bestehen die Drüsen aus pyramidenförmigen, sekretorischen Zellen mit runden bis ovalen, basal lokalisierten Kernen und einem an sekretorischen Granula reichen Zytoplasma (Adams, 1992). Der Mukus, der die Epitheloberfläche bedeckt, ist in zwei Schichten geteilt: eine apikale dichte Schicht, die nahezu identisch ist mit der Zusammensetzung des Sekretes der Bowman-Drüsen und eine basale Schicht mit einer differierenden Zusammensetzung. Es wird angenommen, dass auch die Stützzellen sekretorische Funktion aufweisen und ihr Sekret in der basalen Schicht des Mukus vorzufinden ist (Getchell und Getchell, 1992).

Die Nervenfaserbündel und Axone der Riechzellen sind von sogenannten „olfactory ensheathing cells“ (OEC) umgeben (Farbmann und Squinto, 1985). Diese einzigartigen Zellen besitzen Fortsätze, mit denen sie die Axone der Riechzellen umhüllen und sie in Richtung *Bulbus olfactorius* begleiten (Hafner, 1987; Vincent et al., 2005). Ihre Funktion besteht in der Regeneration der olfaktorischen Axone (Boyd et al., 2005).

Die *Regio olfactoria* beinhaltet das Riechepithel und die darunter liegende *Lamina propria* (Mendoza, 1993). Grundsätzlich ist das Riechepithel der *Regio olfactoria* dem Riechepithel des VNO sehr ähnlich, denn es setzt sich ebenfalls aus den drei Komponenten Riech-, Basal- und Stützzellen zusammen. Nahe der Basalmembran sind helle und dunkle Basalzellen lokalisiert, denen sich Riech- und weiter apikal Stützzellen anschließen (Mendoza, 1993). Im Gegensatz zu den mit Mikrovilli ausgestatteten Riechzellen des VNO weisen die Riechzellen der *Regio olfactoria* jedoch Zilien auf (Keverne, 1999).

2.2 Ontogenese

Die Anlage des Gesichtes entsteht aus drei Mesenchymerhebungen: dem Stirnfortsatz und den Ober- und Unterkieferwülsten (Rüsse und Sinowatz, 1998). Auf dem Stirnfortsatz bilden sich die beiden Nasenplakoden, die in die Tiefe verlagert werden und aus denen die primäre Nasenhöhle entsteht. Sie ist durch die *Membrana oronasalis* von der primären Mundhöhle getrennt (Rüsse und Sinowatz, 1998). Durch die Ausbildung eines sekundären Gaumens entwickelt sich die sekundäre Mund- und Nasenhöhle. Die an der Bildung des *Septum nasi* beteiligten Gaumenfortsätze nehmen rostral Kontakt zum primären Gaumen auf und bilden die *Papilla incisiva* aus, auf der durch unvollständige Verschmelzung die paarig angelegten *Ductus incisivi* münden (Rüsse und Sinowatz, 1998).

Das periphere Nervensystem, das das olfaktorische Nervensystem beinhaltet, geht aus der Interaktion der kranialen Neuralleiste und der Sinnesplakode hervor. Plakoden sind Verdickungen des Ektoderms, die durch Zellteilung während der Formation des Neuralrohres entstehen (Whitlock, 2004). Die paarig angelegte Riechplakode bildet die embryonale Anlage des Geruchsystems (Cuschieri und Bannister, 1975a). Kurz bevor sich jede Riechplakode in das darunterliegende Mesenchym einstülpt, wodurch die Riechgrube entsteht (Balmer und LaMantia, 2005), verdickt sich das Epithel und akquiriert erste neurale Charakteristika (LaMantia et al., 2000). Gleichzeitig mit der Bildung der Riechgrube entstehen der mediale und laterale Nasenfortsatz, die Ansätze des *Septum nasi* und der *Nares*. In dem mehrreihigen Epithel der Riechgrube entwickeln sich Riechzellen und respiratorische Zellen (Pellier und Astic, 1994; Balmer und LaMantia, 2005). Mit der Ausprägung der Riechgrube differenzieren sich die Epithelzellen zu den Riechzellen aus, die einen prominenten, apikalen, dendritenähnlichen Fortsatz aufweisen und in tiefer gelegenen Schichten der Riechgrube zahlreich vorhanden sind (Cuschieri und Bannister, 1975a,b). An der Basis des Epithels bündeln sich Axone des *N. olfactorius*, die der dorsalen und lateralen Seite der Riechgrube entspringen und auf die mediale Seite des Vorderhirnbläschens ziehen (Cuschieri und Bannister, 1975a; Pellier und Astic, 1994).

Während der Differenzierung der Riechgrube erfolgt die Bildung des VNO und der *Conchae nasales* (Balmer und LaMantia, 2005). Das VNO tritt beim Menschen im Carnegie-Stadium 16 in Erscheinung (Sherwood et al., 1999). Beim Schaf ist der Beginn der Ausbildung des VNO ab einer Scheitel-Steiß-Länge (SSL) von 20-30 mm zu beobachten. In diesem Stadium ist eine Differenzierung in respiratorisches Epithel und Riechepithel noch nicht möglich

(Salazar et al., 2003a). Die Anlage des VNO stellt sich als Verdickung der medialen Wand der Riechgrube dar. Diese Verdickung stülpt sich ein und formt eine Rinne aus, deren beide Lippen fusionieren und so eine tubuläre Struktur ausbilden. Das entstandene Divertikel behält rostral eine Öffnung in die Riechgrube bei (Cuschieri und Bannister, 1975a). Kaudal schließt sich das Organ zu einem Blindsack (Wöhrmann-Repenning, 1989). Die Epithelauskleidung gleicht der Auskleidung der Riechgrube. An der medialen Seite sind Dendritenfortsätze zu erkennen, die in runden Auftreibungen an der Epitheloberfläche enden (Cuschieri und Bannister, 1975a). Fasern des *N. vomeronasalis* und des *N. terminalis* entstammen der medialen Wand des vomeronasalen Divertikels und können von der Basis des vomeronasalen Epithels in Richtung des *Septum nasi* verfolgt werden (Cuschieri und Bannister, 1975a; Pellier und Astic, 1994). Das mediale Epithel des VNO entwickelt sich zum Riechepithel, während das gegenüberliegende Epithel zur respiratorischen Auskleidung ausdifferenziert (Cuschieri und Bannister, 1975a). Die Unterscheidung der beiden Epithelien kann beim Schaf ab einer SSL von 35 mm erfolgen (Salazar et al., 2003a). Bereits kurze Zeit nach der Ausstülpung aus der Riechgrube ist das VNO in einem relativ progressiven Entwicklungszustand und liegt in der für dieses Sinnesorgan typischen Position: beidseits der Basis des *Septum nasi* und oberhalb des mit dem Oberkieferfortsatz vereinten Nasenfortsatzes. Daher besteht die Vermutung, dass das VNO schon frühzeitig benötigt wird (Wöhrmann-Repenning, 1989).

Während der Embryogenese wandern zwei Zelltypen aus dem Riechepithel aus. Zum einen sind es Zellen, die die olfaktorischen Axonbündel begleiten, einen epitheloiden Charakter haben und häufig als Vorläuferzellen der Schwannschen-Zellen angesehen werden (Cuschieri und Bannister, 1975a; Pellier und Astic, 1994). Andere Autoren sehen demgegenüber die Basalzellen als Vorläuferzellen dieser „ensheathing cells“ an (Marin-Padilla und Amieva, 1989). Zum zweiten Zelltyp zählen Neuroblasten, die als Vorläuferzellen der Ganglionzellen des *N. terminalis* bezeichnet werden (Filogamo und Robecchi, 1969; Farbman und Squinto, 1985).

2.3 Physiologie der olfaktorischen Wahrnehmung

2.3.1 Rezeptorvermittelte Signaltransduktion

Das olfaktorische System ist in der Lage, zahlreiche Odorantien zu identifizieren und zu differenzieren. Die Aktivierung eines intrazellulären Signalweges erfolgt, wenn ein Duftmolekül an den entsprechenden Rezeptor einer Riechzelle bindet und ihn somit aktiviert (Nibu, 2002). An diesem Bindungsvorgang sind sogenannte „odorant-binding proteins“ (OBP) beteiligt (Steinbrecht, 1998; Matarazzo et al, 2002). Sie liegen in dem die Mikrovilli bzw. Zilien umgebenden Mukus vor (Matarazzo et al, 2002; Guiraudie et al., 2003). Es werden ihnen verschiedene Aufgaben zugesprochen. Möglicherweise binden sie bestimmte Klassen von Odorantien und sind so an ihrer Selektion beteiligt (Steinbrecht, 1998). Es wird auch diskutiert, dass sie Stimulantien darstellen, welche die Signaltransduktion günstig beeinflussen. Ebenso ist der Hinweis vorhanden, dass sie toxische Substanzen eliminieren oder die Odorantien nach der Bindung an den Rezeptor sehr schnell wieder deaktivieren können (Steinbrecht, 1998). Untersuchungen beim Schwein zeigten, dass in Abwesenheit eines Odorants ein OBP in Wechselwirkung mit dem Rezeptor tritt. Es wird vermutet, dass jedem Rezeptortyp bestimmte OBP zugeordnet sind (Matarazzo et al, 2002).

Der Mechanismus der Signaltransduktion an den Riechzellen des VNO unterscheidet sich von dem an den Riechzellen der *Regio olfactoria*. Lange Zeit wurde ganz allgemein zwischen der Wahrnehmung von Odorantien in der *Regio olfactoria* und der Registrierung von Pheromonen im VNO unterschieden (Buck und Axel, 1991; Dulac und Axel, 1995; Chehrehasa et al., 2005). Pheromone sind Signalstoffe, die zwischen Individuen derselben Art ausgetauscht werden und wichtige Funktionen im Sozial- und Reproduktionsverhalten erfüllen (Cohn, 1994). Gegenwärtig gibt es zahlreiche Hinweise, dass die Riechzellen des VNO nicht nur Pheromone, sondern auch Odorantien wahrnehmen können (Sam et al, 2001; Lévai et al., 2006). Dies zeigten Untersuchungen an verschiedenen Knockout-Mäusen, die auch ohne eine funktionstüchtige *Regio olfactoria* Odorantien wahrnehmen konnten (Wong et al., 2000; Trinh und Storm, 2003, 2004).

Odorantien und Pheromone binden an sieben-transmembranegebundene, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Meredith, 1998; Rouquier und Giorgi, 2007). Im VNO kommen die spezifischen Rezeptor-Familien V1 und V2 vor (Matsunami und Buck, 1997; Sam et al, 2001). Ein wichtiger Unterschied zwischen den Riechzellen der *Regio olfactoria* und denen des VNO

liegt in ihrer Sensitivität gegenüber einem Duftstoff. Während die Riechzellen der *Regio olfactoria* adaptieren können, das heißt die Empfindlichkeit gegenüber einem speziellen Duftmolekül schnell verlieren, bleibt sie bei den Riechzellen des VNO gegenüber Pheromonen konstant (Biasi et al., 2001). Studien an diversen Nagetieren ergeben eine Unterteilung in apikal lokalisierte Neurone der Rezeptorfamilie V1 mit der G-Protein Untereinheit $G\alpha_2$ und in weiter basal gelegene Neurone der Rezeptorfamilie V2, die die G-Protein Untereinheit $G\alpha_0$ exprimieren (Jia und Halpern, 1996; Fieni et al., 2003). Anhand zahlreicher Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Rezeptoren V1 und V2 jeweils zu unterschiedlichen Arealen im *Bulbus olfactorius accessorius* projizieren (Jia und Halpern, 1996).

Bindet nun ein Geruchsmolekül an ein spezifisch exprimiertes Rezeptorprotein (Abb. 2), wird die Riechzelle über eine Second-Messenger-Kaskade depolarisiert (Breer et al., 1990; Breer, 1994). Die funktionelle Bedeutung des in der *Regio olfactoria* vorherrschenden Transduktionssystems ist noch nicht vollständig geklärt. Gegenwärtig geht man davon aus, dass über die Second-Messenger cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) (Abb. 2) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) Kationenkanäle in der Plasmamembran aktiviert werden (Ronnett, 1993; Breer, 1994). Die Aktivierung der Ionenkanäle führt somit über zwei unterschiedliche Wege zur Weiterleitung der olfaktorischen Information (Trotier, 1994; Getz, 1999).

Auch im VNO ist der Vorgang der Signaltransduktion noch nicht vollständig geklärt. Obwohl beide Second-Messenger, cAMP und IP_3 , ebenfalls im VNO vorzufinden sind, geht man derzeit davon aus, dass die Pheromone den IP_3 -vermittelten Signalweg aktivieren (Keverne, 1999).

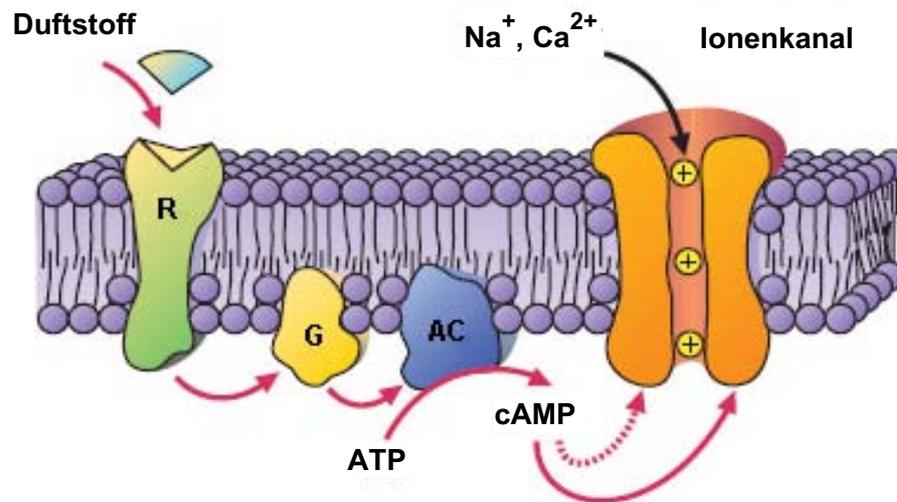


Abb. 2 Signaltransduktion in der *Regio olfactoria* (modifiziert nach Hatt, 2005) Der Duftstoff bindet am Rezeptor (R) und aktiviert ein G-Protein (G), das wiederum eine Adenylatzyklase (AC) aktiviert. Aus Adenosintriphosphat (ATP) entsteht das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP), ein Second-Messenger, der zur Öffnung eines Kationenkanals führt. Der Einstrom von Na⁺ und Ca²⁺ führt zur Depolarisation.

2.3.2 Verarbeitung der Nervensignale

Auf dem Weg in Richtung *Bulbus olfactorius* bzw. *Bulbus olfactorius accessorius* schließen sich die Axone zu Nervenfaserbündeln zusammen (Abb. 3). Diese Bündel enthalten einige tausend Axone verschiedener Riechzelltypen, die einer gemeinsamen Region im Riechepithel entspringen (Treloar et al., 2002; Nedelec et al., 2005). In den Glomeruli des *Bulbus olfactorius* (Abb. 3) bzw. *Bulbus olfactorius accessorius* bilden die Axone Synapsen zu den Mitralzellen aus (Jia und Halpern, 1996; Nedelec et al., 2005).

Jede Riechzelle der *Regio olfactoria* exprimiert jeweils eines der ca. 1000 bekannten Gene für die Odorantrezeptoren. Die Axone der Riechzellen, die den gleichen Odorantrezeptor exprimieren, bündeln sich und ziehen zu zwei spezifischen Glomeruli im *Bulbus olfactorius* (Yoshihara und Mori, 1997; St. John et al., 2002; Cheherasa et al., 2007). Diese mehreren tausend Rezeptoren pro Glomerulus stellen eine hohe Redundanz dar (Astic et al., 1987).

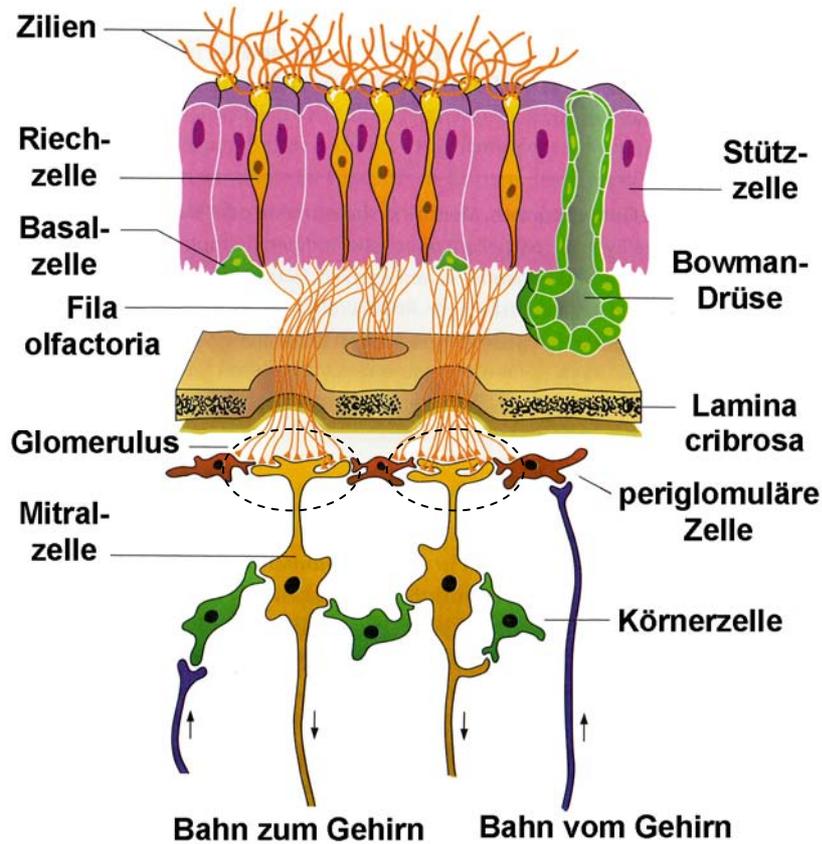


Abb. 3 Schematische Darstellung der Verarbeitung der olfaktorischen Signale (modifiziert nach Hatt, 2006). Jede Riechzelle entsendet ein Axon. Die Axone bündeln sich zu den *Fila olfactoria*, die zu den Mitralzellen im *Bulbus olfactorius* ziehen. Periglomeruläre Zellen und Körnerzellen haben regulierenden Einfluss.

2.4 Regeneration im olfaktorischen Epithel

2.4.1 Riechzellen

Sowohl die Riechzellen des VNO als auch der *Regio olfactoria* haben eine begrenzte Lebenszeit, im Durchschnitt 90 Tage (Gogos et al., 2000), und werden kontinuierlich aus den Basalzellen neu gebildet (Brennan, 2001). Damit sind Riechzellen die einzigen Nervenzellen, die nach ihrer Degeneration durch neue Zellen ersetzt werden (Costanzo, 1991; Cowan und Roskams, 2002).

Zwei Populationen von Zellen lassen sich in dem basalen Bereich des Epithels unterscheiden (Abb. 4). Zum einen die horizontalen Basalzellen mit langsamer asymmetrischer Teilung und zum anderen eine sich schneller teilende Population, die rundlichen Basalzellen (Beites et al., 2005). Die Funktion der horizontalen Basalzellen ist nicht endgültig geklärt. Derzeit geht man davon aus, dass sie das Umfeld für die rundlichen Basalzellen schaffen und ein Reservoir langlebiger Zellen bilden (Beites et al., 2005; Leung et al., 2007). Die Population der rundlichen Basalzellen umfasst den Pool der Vorläuferzellen, die sich durch Marker für neuronale Vorläuferzellen oder bekannte Stammzellmarker anfärben lassen (Mackay-Sim und Kittel, 1991; Beites et al., 2005). Gegenwärtig geht man davon aus, dass die rundlichen Basalzellen die Stammzellen der Riechzellen sind (Huard et al., 1998; Jang et al., 2003).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sich aus den Stammzellen zwei Populationen von Vorläuferzellen entwickeln. Zuerst entstehen die mammalian achaete-scute homolog 1 (Mash-1) exprimierenden Vorläuferzellen (Kawauchi et al., 2004). Mash-1 ist ein Transkriptionsfaktor neuronaler Vorläuferzellen (Guillemot et al., 1993). Die Mash-1 exprimierenden Zellen induzieren die Entstehung einer zweiten Generation von Vorläuferzellen, die das proneurale Gen Neurogenin (Ngn1) exprimieren (Beites et al., 2005). Ngn1 ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor und gehört der Neurogenin Gen-Familie an (Furlong und Graham, 2005). Diese, auch als direkte neuronale Vorläuferzellen (immediate neuronal precursor, INP) bezeichneten Zellen, können ein bis zwei weiteren symmetrischen Zellteilungen unterworfen sein (Calof und Chikarashi, 1989; Calof et al., 2002). Sie differenzieren sich schließlich zu den olfaktorischen Neuronen aus (Abb. 4).

Alle beschriebenen Zellstadien können gleichzeitig innerhalb des Bereiches nahe der Basalmembran existieren. Die Generierung der Riechzellen ist von Wachstumsfaktoren unterschiedlicher Familien (fibroblast growth factor (FGF)-Familie, transforming growth factor (TGF)- β -Superfamilie) abhängig, die sowohl stimulierenden als auch hemmenden Einfluss auf die Entwicklung haben (Beites et al., 2005).

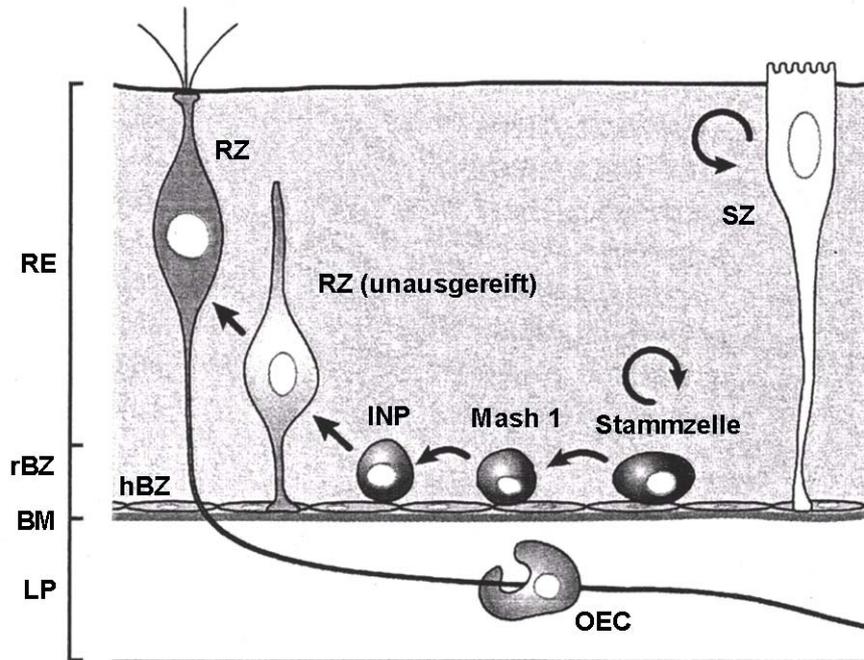


Abb. 4 Modell einer Riechzelle und ihrer Vorläuferzellen (modifiziert nach Beites et al., 2005). Riechepithel (RE), rundliche Basalzellen (rBZ), horizontale Basalzellen (hBZ), Basalmembran (BM), *Lamina propria* (LP), Riechzellen (RZ), Vorläuferzellen mit der Beschriftung INP und Mash 1, die sich aus der Stammzelle entwickeln, olfactory ensheathing cell (OEC), Stützzelle (SZ).

2.4.2 Axone

Umfangreiche Untersuchungen führen derzeit zu der Annahme, dass es sich bei der Bildung neuer Axone nicht bloß, wie lange Zeit angenommen, um ein Aussprossen entlang bereits existierender Nerven handelt (Chehrehasa et al., 2005). Das axonale Wachstum scheint vielmehr ein von den Riechzellen aus gesteuerter, zielgerichteter, hochkomplexer molekularer Vorgang zu sein, an dem Zelladhäsionsmoleküle (Key, 1998), Kohlenhydratreste (Nedelec et al., 2005) und Proteine (Singer et al., 1995) beteiligt sind. Ein weiteres wichtiges Protein im axonalen Wachstum stellt das olfactory marker protein (OMP) dar, welches in Kapitel 2.7 ausführlich beschrieben wird. Von sogenannten „axon guidance molecules“ und den zugehörigen Proteinen wie Semaphorin, Netrin-1, growth-associated protein und OMP weiß man, dass sie auch auf die Entwicklung und strukturelle Organisation des *Bulbus olfactorius* Einfluss nehmen (Tsim et al., 2004). Die „olfactory ensheathing cells“, welche die Axone

unmittelbar nach dem Austritt aus dem Riechepithel umhüllen (Hafner, 1987), sind ein weiterer wichtiger Bestandteil in der lebenslangen Regeneration olfaktorischer Axone (Boyd et al., 2005).

2.5 Apoptose im Riechepithel

Riechzellen gehen unter physiologischen Bedingungen durch Apoptose (programmierter Zelltod) zugrunde und werden durch Vorläuferzellen aus den sich teilenden Basalzellen ersetzt (Suzuki, 2004). Sowohl die ausgereiften Riechzellen als auch die Vorläuferstadien und die rundlichen Basalzellen unterliegen der Apoptose; die Stützzellen und horizontalen Basalzellen sind davon nicht betroffen (Suzuki, 1998). Es wird angenommen, dass die Stützzellen insofern in den Vorgang der Apoptose involviert sind, als sie die zugrunde gegangenen Riechzellen phagozytieren (Suzuki, 2004). Erkennungsmerkmale apoptotischer Zellen sind die Kondensation des Kerns, Zytoplasmaschrumpfung, Abschnürungen der Membran und ein charakteristischer Anstieg in der Elektronendichte der Zelle (Cowan und Roskams, 2002; Suzuki, 2004). Anschließend zerfällt der Kern in kleine Bestandteile, die von einem dünnen Zytoplasmarand umgeben sind. Diese „apoptotic bodies“ können schnell von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert werden (Suzuki, 2004). Makrophagen werden als die wichtigsten Phagozyten im akuten Geschehen angesehen, während den Stützzellen eine kontinuierliche Rolle im Prozeß der Phagozytose zukommt (Suzuki et al, 1995; Cowan und Roskams, 2002).

Bereits in der embryonalen Entwicklung finden im Riechepithel apoptotische Vorgänge statt (Cuschieri und Bannister, 1975a). Bei juvenilen und adulten Tieren sind die Riechzellen selber an der Regulierung von Apoptose und Regeneration beteiligt, indem sie stimulierenden und hemmenden Einfluß auf die Vorläuferstadien nehmen (Calof et al., 1996). Die Apoptose der Riechzellen wird in jeder Phase durch eine Reihe von Faktoren reguliert (Cowan und Roskams, 2002). Ein Beispiel ist der Tumornekrosefaktor (TNF), ein Mitglied der Tumornekrosefaktor/Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF/TNFR) -Superfamilie, der an der Initialisierung der Apoptose beteiligt ist (Baglioni, 1992; Cowan und Roskams, 2002).

2.6 Olfactory Marker Protein (OMP)

Das 19 kDa schwere, saure, leicht lösliche OMP wird im Riechepithel, dem *Bulbus olfactorius* und in den olfaktorischen Nerven exprimiert (Margolis, 1972; Margolis, 1982; Farbman et al., 1998). Innerhalb des Riechepithels ist OMP nahezu ausschließlich in den ausgereiften Riechzellen zu finden (Farbman und Margolis, 1980). Sowohl im Perikaryon als auch in Dendrit und Axon wird es immunhistochemisch nachgewiesen (Miragall und Monti-Graziadei, 1982). Während OMP in den Stammzellen nicht exprimiert wird, ist es in den Synapsen an den Enden der olfaktorischen Nerven und in den Glomeruli im *Bulbus olfactorius* regelmäßig vorhanden (Monti-Graziadei et al., 1977). Eine geschlechtsabhängige Expression von OMP ist nicht bekannt (Margolis, 1982).

Im Riechepithel der *Regio olfactoria* wird OMP nur in den Riechzellen der apikalen Zellreihen in Form einer intensiven Färbung von Zytoplasma und Dendrit exprimiert. Aus diesem Grund ist der Raum oberhalb der Stützzellkerne nicht immer frei von OMP-Expression. Dies korreliert mit der hohen Anzahl von Dendriten, die in diesem Bereich lokalisiert sind (Weiler und Benali, 2005). Einige abgestorbene Zellen weisen ebenfalls OMP-Expression auf, was auf die lange Halbwertszeit von OMP zurückzuführen ist (Kream und Margolis, 1984). Im Riechepithel des VNO sind nahezu alle Riechzellen markiert. Sowohl Zytoplasma als auch Kern weisen eine Anfärbung durch den OMP-Antikörper auf. Allerdings zeigen die weiter apikal lokalisierten Riechzellen vermehrt Zytoplasmafärbung, während bei den mehr basal gelegenen Riechzellen der Zellkern deutlicher markiert ist (Weiler und Benali, 2005). Die Umschlagspunkte an den beiden Kurvaturen werden als Proliferationszone mit unausgereiften Riechzellen angesehen, die sich nicht durch OMP markieren lassen (Farbman und Margolis, 1980; Weiler et al., 1999). Die Nervenfaserbündel in der *Lamina propria* lassen ebenfalls eine positive Reaktion für OMP erkennen, alle anderen Zelltypen sind frei von OMP-Expression (Weiler und Benali, 2005).

Eine Studie an Embryonen von Mäusen und Ratten ergab, dass OMP zuerst in den Riechzellen der *Regio olfactoria* erscheint. Der Zeitpunkt liegt bei der Ratte um den 18. Embryonaltag. Kurze Zeit später ist OMP auch in den Glomeruli des *Bulbus olfactorius* zu sehen, im VNO jedoch erst ab dem vierten Tag *post partum*. Die Synthese des OMP kann in den Riechzellen der *Regio olfactoria* sowie in den Riechzellen des VNO, nicht jedoch im *Bulbus olfactorius* nachgewiesen werden (Hartmann und Margolis, 1975). Da OMP auch im *Bulbus olfactorius* nachgewiesen wird, liegt der Schluss nahe, dass es durch axoplasmatischen

Transport von dem Ort seiner Synthese zu den Synapsen im olfaktorischen Bulbus gelangt (Margolis, 1982).

Die Funktion des OMP ist bis heute nicht endgültig geklärt (Halpern und Martinez-Marcos, 2003). Gegenwärtig geht man davon aus, dass OMP Einfluss auf das Aussprossen der Axone nimmt (Strotmann et al., 2004; St. John und Key, 2005). Zu diesem Schluss führten Untersuchungen an Mäusen, denen das Gen für OMP fehlt. Die Axone dieser Mäuse konnten häufig keine Verbindung zu den Glomeruli des *Bulbus olfactorius* herstellen (St. John und Key, 2005). Weiterhin wird die Entstehung neuer synaptischer Verbindungen mit dem Erscheinen von OMP assoziiert. Daher wird OMP auch für die Steuerung der Synapsenbildung im *Bulbus olfactorius* verantwortlich gemacht. Dieser Prozess nimmt als Rückkopplung wieder Einfluss auf die Rezeptorzelle und regt sie dazu an, neues OMP zu produzieren (Farbman und Margolis, 1980). Über eine weitere interessante Funktion von OMP wurde bereits in älteren Arbeiten nachgedacht. Solange OMP in den Riechzellen produziert wird, ist möglicherweise der Mechanismus der Apoptose unterdrückt (Margolis, 1982).

2.7 Villin

Das der Gelsolin-Familie angehörende Villin ist ein 92,5 kDa schweres, gewebespezifisches aktinbindendes Protein, das hauptsächlich in den Mikrovilli epithelialer Zellen des Darms und des proximalen Nierentubulus lokalisiert ist (Bretscher und Weber, 1979; Revenu et al., 2007). Villin, das die Fähigkeit besitzt, Aktinfilamente kompakt zu bündeln, ist aus sechs Einheiten aufgebaut. Die Einheiten V1 bis V6 bilden den Kern des Proteins. Im Vergleich zu Gelsolin hat Villin eine zusätzliche C-terminale Domäne, das sogenannte Kopfstück (Arpin et al., 1988; Bazari et al., 1988). Es beinhaltet die F-Aktin-bindende Domäne (Meng et al., 2005).

Alle Funktionen des Villins sind Ca^{2+} -abhängig. Bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen wird Aktin mittels Villin gebündelt, bei mittleren Konzentrationen bewirkt es Nukleation (Bildung eines Trimers aus drei Aktinmonomeren) und Capping (Wachstumshemmung) an den spitzen Enden der Filamente und bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen ist Villin in der Lage, die Aktinfilamente zu separieren (Revenu et al., 2007). Die filament-trennende Eigenschaft von Villin legt den Schluss nahe, dass es an der Umformung des Aktin-Zytoskelettes unter

physiologischen Gegebenheiten sowie an der Reperatur von Läsionen beteiligt ist (Friederich et al., 1999). Durch seine bündelnde Eigenschaft wird Villin eine Rolle bei der Bildung der Mikrovilli zugesprochen (Revenu et al., 2007).

Bei einer Vielzahl von Säugetieren treten Mikrovilli-Zellen auch innerhalb des Riechsystems in Erscheinung (Asan und Drenckhahn, 2005). Die Villin-Expression im VNO erfolgt ausschließlich durch die Mikrovilli der Riechzellen, da die Stützzellmikrovilli dieses Protein nicht besitzen. Villin kann somit als selektiver Marker für die Mikrovilli der Riechzellen des VNO angewendet werden (Höfer et al., 2000).

Im Riechepithel der *Regio olfactoria* kommen bei der Ratte zwei verschiedene Mikrovilli-tragende Zellen (MC I und II) vor. Villin wird jedoch nur von dem in geringerer Häufigkeit vorhandenen Zelltyp MC I exprimiert (Asan und Drenckhahn, 2005).

2.8 Mitosemarker-Proteine

Im Riechepithel des VNO und der *Regio olfactoria* findet eine lebenslange Erneuerung der Riechzellen statt (Ishii et al., 2004). Die Proliferation der Zellen kann durch verschiedene Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen werden. Am häufigsten wurden Ki-67, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) und 5-bromo2'-deoxyuridine (BrdU) am Riechepithel eingesetzt (Ohta und Ichimura, 2000a, 2001; Wakabayashi und Ichikawa, 2007). Im VNO der Maus wurde die Proliferation der Riechzellen durch BrdU nachgewiesen. Dabei stellte sich heraus, dass embryonal und neonatal viele sich teilende Zellen vorhanden sind, wohingegen adulte Tiere nur eine geringe Proliferation aufweisen (Wakabayashi und Ichikawa, 2007). Diese altersabhängige Proliferationsrate konnte auch im Riechepithel von Meerschweinchen gefunden werden (Nakamura et al., 1998). Im VNO des erwachsenen Menschen werden proliferierende Zellen ebenfalls nur unregelmäßig detektiert (Witt et al., 2002). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Proliferation in Riechepithel und VNO altersabhängig reguliert wird.

2.8.1 Ki-67

Das Ki-67 Protein ist ein im Zellkern vorkommendes Protein, das in engem Zusammenhang mit dem Zellzyklus steht (Endl und Gerdes, 2000). Innerhalb des Zellzyklus wird das Antigen in der G1-, der S- und der G2-Phase und während der Mitose exprimiert. Zellen in der Ruhephase weisen hingegen keine Expression des Antigens auf (Gerdes et al., 1984). In der Interphase ist das Ki-67 Protein hauptsächlich im Nukleolus lokalisiert. Wenn sich in der Prophase der Mitose die Nukleoli auflösen, wandert das Protein zu den verdichteten Chromosomen und in die Peripherie des Zellkerns (Hernandez-Verdun und Gautier, 1994; Endl und Gerdes, 2000). In der Telophase ist das Protein wieder in kleinen nukleären Strukturen lokalisiert. Die Verteilung des Ki-67 Proteins in der frühen G1-Phase ist durch die Färbung der Nukleoli und durch zahlreiche punktuelle Markierungen des gesamten Nukleoplasmas gekennzeichnet (Verheijen et al., 1989; Endl und Gerdes, 2000).

Ki-67 wird zur Registrierung von Proliferationsschüben während der prä- und postnatalen Entwicklung genutzt sowie als prognostischer Faktor bei der Beurteilung maligner Tumore angewendet (Brown und Gatter, 1990; Sawhney und Hall, 1992).

Als Proliferationsmarker wurde Ki-67 bisher nur an der Riechschleimhaut der *Regio olfactoria* von Mäusen eingesetzt. Der Ki-67 Antikörper zeigte bei zahlreichen basal lokalisierten sowie einigen weiter apikal gelegenen Riechzellen eine positive Reaktion (Ohta und Ichimura, 2000a). Durch die Anwendung des Ki-67 Antikörpers konnten die kugelförmigen Basalzellen („globose basal cells“) als Vorläuferzellen der Riechzellen bestätigt werden (Ohta und Ichimura, 2001).

2.8.2 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

Bei dem PCNA handelt es sich um ein 36 kDa schweres nukleäres Protein, das wie das Ki-67 Antigen mit dem Zellzyklus in Verbindung steht (Hall et al, 1990; Teter et al., 1995). Das auch als Cyclin bekannte Protein wurde erstmals im Serum von Patienten mit der Autoimmunerkrankung Lupus erythematoses entdeckt (Miyachi et al., 1978). Es wird während der Interphase in der späten G1-, der S- und der G2-Phase synthetisiert (Teter et al., 1995). Dabei tritt die PCNA-Expression in der frühen S-Phase als gesprenkeltes Muster, in der späten S-Phase in Form punktierter Herde innerhalb des Zellkerns in Erscheinung.

Erreicht die DNA-Synthese ihr Maximum, ist die Expression des PCNA-Antikörpers nahe der Kernmembran lokalisiert. Beim Übergang in die G2-Phase tritt wieder das gepunktete Muster auf (Celis und Celis, 1985). Die Synthese von PCNA erfolgt unmittelbar vor der DNA-Replikation (Bravo und Macdonald-Bravo, 1985; Macdonald-Bravo und Bravo, 1985). Die Veränderungen in der Verteilung von PCNA während des Zellzyklus werden entweder durch die DNA-Synthese selber kontrolliert oder durch die DNA-Replikation ausgelöst (Takasaki et al., 1981; Celis and Celis, 1985).

Bei immunhistologischen Untersuchungen am Riechepithel und in der Tumordiagnostik wurde PCNA als Marker für proliferierende Zellen angewendet (Nakamura et al., 1998; Pinheiro et al., 2007). Im Riechepithel von Nagetieren wurden altersabhängige Veränderungen in Bezug auf die Zellteilung festgestellt, wobei in den ersten zwei Monaten nach der Geburt die höchste Teilungsrate in der Basalzellschicht nachgewiesen wurde. Eine Korrelation in der Anzahl der sich teilenden Zellen und Riechzellen besteht offensichtlich nicht (Nakamura et al., 1998; Ohta und Ichimura, 2000b). Da PCNA eine Halbwertszeit von mehr als 20 Stunden aufweist, kann es auch in ruhenden Zellen exprimiert werden. Dadurch lassen sich mehr PCNA-positive als Ki-67-positive Zellen in der basalen Schicht des Riechepithels detektieren (Ohta und Ichimura, 2000a).

2.9 Lektine

Lektine sind Proteine, die selektiv an Zuckerreste binden, ohne diese chemisch zu verändern. Sie besitzen keine enzymatische Aktivität (Uhlenbruck, 1983; Gabius und Gabius, 1992).

Bei den Lektinen handelt es sich außerdem um konstitutive Proteine, das heißt sie werden nicht als Reaktion auf äußere Reize gebildet (Rüdiger und Gabius, 1993). Lektine weisen keine Homologie zu Antikörpern auf (Gabius und Gabius, 1992). Viele Proteine und Lipide tragen Zuckerketten. Ihnen ist durch die Lektine ein entsprechender Rezeptor als Gegenstück gegeben, der die Weitergabe der gespeicherten Informationen sichert (Gabius et al., 1988). Die bisher eher als Energieträger bekannten Zuckerstrukturen bilden so neben dem wichtigsten Informationsträger, der DNA, ein weiteres bemerkenswertes Informationssystem (Gabius et al., 1988; Rüdiger und Gabius, 1993).

Heute kennt man eine Reihe ihrer Eigenschaften: Sie blockieren biologische Rezeptoren, fixieren Toxine und stimulieren die Fusion von Zellen. Ihre Fähigkeit zur Agglutination

kohlenhydrathaltiger Zellen, zur Präzipitation von Glycokonjugaten und zur Markierung von Zuckerstrukturen auf Zellmembranen wird verschiedentlich angewendet (Uhlenbruck, 1983; Lis und Sharon, 1986). Teilweise werden Lektine auch in der Tumordiagnostik eingesetzt. Ein Beispiel ist die Bindung von UEA I an entarteten Zellen der Ovarien (Blonski et al., 2007).

Der Aufbau der Lektine besteht meistens aus vier Untereinheiten, die eine Molmasse zwischen 100 und 140 kDa aufweisen und mindestens zwei, teilweise bis zu 18 Zuckerbindungsstellen besitzen (Leathem und Atkins, 1983; Rüdiger und Gabius, 1993). Die Lektine der verschiedenen Pflanzenfamilien unterscheiden sich in ihren Charakteristika: dem Molekulargewicht, der Anzahl an Untereinheiten oder der Anzahl an Zuckerbindungsstellen pro Molekül. Innerhalb einer Pflanzenfamilie weisen sie jedoch große Ähnlichkeiten auf (Rüdiger und Gabius, 1993).

Nach ihrer Kohlenhydratspezifität können die Lektine in fünf Gruppen eingeteilt werden (Damjanov, 1987):

1. Glukose/Mannose Gruppe
2. N-Azetyl-D-Glukosamin Gruppe
3. N-Azetyl-D-Galaktosamin/Galaktose Gruppe
4. L-Fukose Gruppe
5. Sialinsäure Gruppe

Die Nomenklatur richtet sich nach der jeweiligen Herkunft des Lektins. So wird ein Lektin aus der Erdnuss als peanut agglutinin (PNA) bezeichnet (Brown und Hunt, 1978).

In der Histologie werden Lektine besonders eingesetzt, um die Verteilung bestimmter Kohlenhydratstrukturen auf der Zelloberfläche aufzuzeigen (Leathem und Atkins, 1983; Gabius et al., 1988). Durch spezifische Inhibitoren ist es möglich, die Bindungsspezifität einzelner Lektine darzustellen (Leathem und Atkins, 1983).

In Bezug auf das olfaktorische System stellen Lektine eine Möglichkeit dar, Unterschiede zwischen den verschiedenen Epithelien und Zelltypen im VNO und in der *Regio olfactoria* zu präsentieren. In einer umfassenden Arbeit wurde über die Bindungsspezifität von 30 Lektinen zum Riechepithel des VNO und der *Regio olfactoria* bei Nagetieren und Haussäugetieren berichtet (Plendl und Sinowatz, 1998). Innerhalb der Tierarten können starke Unterschiede in der Lektinbindung auftreten, wie eine vergleichende Studie an Schaf und Schwein verdeutlicht (Salazar et al., 2000). Auch das Bindungsmuster innerhalb einer Gruppe, z. B. der Nagetiere, variiert sehr stark (Lundh et al., 1989; Mendoza und Kühnel, 1991).

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Die Untersuchungen erfolgten an Proben vom VNO und von der Riechschleimhaut der *Regio olfactoria* des Schweins. Hierzu wurden 28 männliche und weibliche Tiere unterschiedlicher Altersstufen verwendet. Eine detaillierte Auflistung zeigt Tabelle 1.

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Tiere.

Anzahl	Alter	Geschlecht	Reproduktiver Status	Gewicht
2	7 Wochen	männlich kastriert	-	bd 13 kg
3	3 Monate	männlich kastriert	-	25; 27; 50 kg
5	4 1/2 Monate	männlich kastriert	-	43 kg - 57 kg
1	8 Monate	männlich	-	148 kg
1	10 Monate	weiblich	tragend	166 kg
1	11 Monate	männlich	-	170 kg
1	1 Jahr	weiblich	tragend	176 kg
1	1 Jahr und 2 Monate	männlich	-	137 kg
6	1 Jahr und 6 Monate	weiblich	4 tragend, 2 nicht tragend	175 kg - 225 kg
1	2 Jahre	weiblich	nicht tragend	217 kg
1	2 Jahre und 6 Monate	weiblich	nicht tragend	220 kg
2	3 Jahre und 6 Monate	weiblich	1 tragend, 1 nicht tragend	225; 230 kg
2	4 Jahre und 6 Monate	weiblich	1 tragend, 1 nicht tragend	220; 221 kg
1	5 Jahre	weiblich	nicht tragend	235 kg

Die Tiere stammten von der Versuchsstation für Tierhaltung, Tierzucht und Kleintierzucht „Unterer Lindenhof“ der Universität Hohenheim und aus dem Institut für Tierernährung der Universität Hohenheim.

3.2 Probennahme und Probenaufbereitung

Das Riechepithel ist ein hochempfindliches Gewebe, das unfixiert nach kürzester Zeit *post mortem* der Autolyse unterliegt. Um den Erhalt des Gewebes zu garantieren, kamen in umfangreichen Vorversuchen zahlreiche Entnahme- und Fixierungstechniken zum Einsatz.

Mit der Perfusionsfixierung über die *A. maxillaris* wurden deutlich schlechtere Ergebnisse erzielt als mit der Immersionsfixierung der entnommenen Proben.

Die Schweine aus der Tierernährung wurden durch eine intramuskuläre Injektion von 2,0 mg/kg KGW Azaperon (Stresnil, Janssen-Cilag) in Kombination mit 15,0 mg/kg KGW Ketaminhydrochlorid (Urostamin, Serum-Werk Bernburg AG) anästhesiert und anschließend über die *Vena (V.) jugularis* entblutet. Die Probennahme an den vom „Unteren Lindenhof“ zur Verfügung gestellten Tieren erfolgte im Rahmen des Schlachtprozesses.

Um das VNO sowie die *Regio olfactoria* zu erreichen, wurden mit einer elektrischen Handsäge (Scorpion®, Black & Decker) insgesamt drei Querschnitte im Bereich des oberen Gesichtsschädels vorgenommen. Der erste Schnitt wurde auf Höhe des zweiten Incisivus und der zweite Schnitt direkt vor dem Caninus gesetzt. Das VNO beider Seiten konnte nun mitsamt der Knorpelspange herauspräpariert werden. Für die Rasterelektronenmikroskopie wurde das zwischen 1,0 und 1,9 cm lange Organ in drei Teile geteilt, in der dorsalen oder ventralen Kurvatur eröffnet und anschließend auf eine kleine Korkplatte aufgespannt. Nach dreimaligem Spülen in Phosphate-Buffered-Saline-(PBS)-Puffer (pH 7,4) erfolgte die Fixierung der Proben für 24 Stunden in 2,5-prozentiger Glutaraldehyd-Lösung (GAH). Bei den Proben für die Immunhistochemie fand die Präparation des VNO bei der Hälfte der Tiere nach der oben beschriebenen Methode statt. Bei der anderen Hälfte der Tiere wurde das sich noch in der Knorpelspange befindliche VNO ebenfalls in drei Segmente geteilt und ohne Eröffnen des Organs fixiert. Die Immersionsfixierung erfolgte entweder in Bouin'scher Lösung (Romeis, 1989) für 48 Stunden oder in Methanol/Eisessig 2:1 für 24 Stunden. Das VNO der einen Seite wurde für die Rasterelektronenmikroskopie, das der anderen Seite für die Immunhistologie vorbereitet.

Um die *Regio olfactoria* entnehmen zu können, wurde mit dem dritten Schnitt der Gesichtsschädel bis zum rostralen Augenwinkel abgesetzt. Die Entnahme der Riechschleimhaut erfolgte auf dünnen Conchenlamellen nahe dem *Os ethmoidale*. Die anschließende Fixierung fand nach den oben aufgeführten Methoden statt.

3.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die fixierten Proben wurden dreimal in PBS-Puffer gespült und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 % bis 100 %) dehydriert. Die Trocknung der Proben erfolgte im Critical Point Dryer (Typ CPD 030, Fa. BAL-TEC AG, Witten) unter Verwendung von Kohlendioxid (CO₂) als Medium. Um Beschädigungen durch die hohe Oberflächenspannung, die beim Übergang vom flüssigen in den gasförmigen Zustand entsteht, zu vermeiden, wird über dem kritischen Punkt bei 31 °C und 73,8 bar getrocknet. Die getrockneten Proben wurden mittels Leit C-Klebstoff (Fa. Neubauer, Münster) auf Probenteller aufgeklebt und anschließend im Sputter Coater (Typ SCD 050, Fa. BAL-TEC, Witten) für jeweils 100 Sekunden zweimal gerade und zweimal schräg mit Gold beschichtet. Bei dem Sputtervorgang wurde eine Spannung von 40 µA angelegt. Der Arbeitsabstand zwischen Target (Kathode) und Präparattisch (Anode) betrug 5,5 cm.

Um die Riechzellen des VNO aus dem Epithelverband herausgelöst darstellen zu können, wurde eine Mazeration der Proben mittels Kalilauge (KOH) vorgenommen. In verschiedenen Vorversuchen (Mikrowelle, Ultraschallbad, Brutschrank) hat sich die Mazeration im Brutschrank als die beste Methode erwiesen.

Die GAH-fixierten Proben wurden in PBS-Puffer überführt und auf Raumtemperatur gebracht. Für den ersten Schritt der Mazeration erfolgte die Erwärmung des Brutschrankes (Fa. Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach) und einer 35 %igen KOH auf 65 °C. Die Proben wurden für 10 Minuten in KOH im Brutschrank belassen. Anschließend wurden die Proben in warmen PBS-Puffer umgebettet und unter einer Stereolupe (Fa. Wild, Heerbrugg) der Länge nach in 1 bis 2 mm breite Streifen geteilt. Daran schloss sich eine weitere Mazeration im Brutschrank über 25 Minuten bei 70 °C an. Die abgekühlten Proben wurden dreimal in PBS-Puffer gewaschen und im Folgenden nach der für die Rasterelektronenmikroskopie beschriebenen Methode aufbereitet.

Die Auswertung der Proben fand am Rasterelektronenmikroskop Typ DSM 940 A (Carl Zeiss AG, Oberkochen) statt. Mittels integrierten Messeinrichtungen wurden die Durchmesser der Mikrovilli von Riech- und Stützzellen und die Durchmesser der Zilien des respiratorischen Epithels evaluiert. Für diese Beurteilung wurden die Zellfortsätze an 50 Stellen vermessen und ein Mittelwert gebildet.

3.2.1 Lichtmikroskopie, Immun- und Glykohistochemie

Bei allen Bouin- und M/E-fixierten Proben fand eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe im Gewebeeinfiltrationsautomaten (TP 1020, Leica) über 26 Stunden statt. Anschließend konnten die Proben an der Paraffinausgießstation (EG 1160, Leica) in Paraplast® eingebettet werden. Von jedem Block wurden an einem Rotationsmikrotom (RM 2135, Leica) 2 µm dicke Schnitte angefertigt und auf SuperFrost®-Objektträger (Langenbrinck, Emmendingen) aufgezogen. Nach einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Romeis, 1989), die sowohl der Übersicht als auch der deskriptiven lichtmikroskopischen Auswertung dienen sollte, wurden die geeigneten Blöcke jeder Fixierung ausgewählt und von ihnen weitere Schnitte für die Immun- und Glykohistochemie hergestellt.

Zur Darstellung der Basalmembran wurde eine PAS-Färbung (periodic acid Schiff's reaction) durchgeführt (Romeis, 1989).

Die immunhistochemische Darstellung von Ki-67, PCNA, OMP und Villin erfolgte mit Hilfe der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) nach Hsu et al. (1981). Bei dieser indirekten Methode wird ein biotinylierter Sekundäntikörper durch den Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex markiert und durch Zugabe eines Chromogens sichtbar gemacht. In Tabelle 2 sind die verwendeten Reagentien aufgeführt.

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Reagentien.

Antigen	Verdünnung des Primär-AK	Immunogen	Host	Sekundär-AK biotinyliert	Hersteller
Olfactory Marker Protein (OMP) *	1:200	OMP aus dem Kaninchen	Ziege	Anti-Ziege IgG vom Kaninchen 1:400	Wako Chemicals GmbH, Neuss
Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Klon 19A2, monoclonal	1:500 bzw. 1:1000	gereinigtes PCNA vom Kaninchen-Thymus	Maus	Anti-Maus IgG / IgM vom Kaninchen 1:300	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen
Ki-67 Klon MIB 1, monoclonal	1:200	bakteriell exprimiertes Ki-67	Maus	Anti-Maus IgG vom Kaninchen 1:300	Dianova, Hamburg
Villin	1: 150 bzw. 1:300	Villin aus dem Darm	Kaninchen	Anti-Kaninchen IgG von der Ziege 1:400	**

* Zum Austesten freundlicherweise von Dr. J. Strotmann, Universität Hohenheim, Stuttgart zur Verfügung gestellt.

** Freundlicherweise von Professor Dr. D. Drenckhahn, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg zur Verfügung gestellt.

Die Durchführung der Immunhistochemie folgte dem im Institut für Anatomie und Physiologie der Haustiere der Universität Hohenheim etablierten Testprotokoll.

Zu Beginn wurden die histologischen Schnitte in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Daran schloss sich eine Mikrowellenbehandlung in 10 mM Citratpuffer (pH 6,6) an, um antigene Bindungsstellen zu demaskieren. Mit 10-prozentiger Hydrogenperoxidlösung wurde die zelleigene Peroxidase-Aktivität geblockt, um dadurch eine unerwünschte Hintergrundfärbung zu vermeiden. Im Anschluss verhinderte eine 30-minütige Inkubation mit 1:10 verdünntem Normalserum eine unspezifische Bindung des Antikörpers. Die Inkubation mit dem verdünnten Primärantikörper (Tab. 2) erfolgte über Nacht in einer Feuchtkammer (Shandon®, Frankfurt a.M.) bei 4 °C. Am nächsten Tag schlossen sich für jeweils 30 Minuten zwei weitere Inkubationen an. Zunächst gelangte der biotinylierte Sekundärantikörper zur Anwendung, der an das IgG (IgM) des Primärantikörpers bindet, anschließend der Streptavidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex (DAKO®,

Hamburg). Er koppelt dann an das Biotin des Sekundärantikörpers. Um die Immunreaktion sichtbar zu machen, erfolgte unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur eine 10-minütige Entwicklung in 3,3-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung. Zwischen den einzelnen Inkubationen wurden die histologischen Schnitte in einer entsprechenden Pufferlösung (PBS-Puffer, pH 7,4) gespült. Nach der Gegenfärbung mit Hämalaun und anschließender Dehydrierung über eine aufsteigende Alkoholreihe konnten die Schnitte abschließend mit Entellan[®] (Merck, Darmstadt) eingedeckt werden. Als Positivkontrolle (K0) gelangten Gewebeschnitte zur Anwendung, von denen eine positive Reaktion mit dem Primärantikörper bekannt ist. Als Positivkontrolle für OMP wurde die Riechschleimhaut der *Regio olfactoria* herangezogen. Die Positivkontrolle für Ki-67 erfolgte mit Schnitten vom Ileum des Schweins, für PCNA mit Schnitten von der Ileocaecalsille des Huhns. Bei den drei Negativkontrollen wurde bei jeweils einem Schnitt der Primärantikörper (K1), der Sekundärantikörper (K2) und der Streptavidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex (K3) nicht aufgetragen.

Die deskriptive Auswertung der histologischen Färbungen sowie der immunhistochemischen Präparate fand an dem Mikroskop Typ Laborlux S (Leitz, Wetzlar) statt. Die photographische Dokumentation erfolgte am Mikroskop Typ DMRBE (Leica, Bensheim) bei 100-, 200- oder 400-facher Vergrößerung im Durchlichtstrahlengang mit der integrierten Digitalkamera Typ DFC 420C (Leica, Bensheim) und dem angeschlossenen Bildbearbeitungsprogramm „Image Processing and Analysis“ (IPA).

Für die glykohistochemischen Untersuchungen wurde nach einem modifizierten Protokoll (Lee und Damjanov, 1985; Sinowatz et al., 1988; Kawakami et al., 2002) vorgegangen.

Bouin- und M/E-fixierte histologische Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Bei den Bouin-fixierten Schnitten erfolgte eine Demaskierung antigener Bindungsstellen durch eine Mikrowellenbehandlung in 10 mM Citratpuffer (pH 6,6). Anschließend wurden alle Schnitte in PBS-Puffer gespült. Es folgte die Inkubation mit Fluorescein-Isothiocyanat- (FITC) markierten Lektinen für 2 Stunden in Dunkelheit in einer Feuchtkammer bei 4 °C. Die verwendeten Lektine (Linaris, Wertheim und Sigma, Seelze) wurden zuvor auf eine Konzentration von 33 µg/ml in PBS verdünnt. Eine Übersicht über die verwendeten Lektine ist in Tabelle 3 zu finden. Als Positivkontrolle diente bei den Lektinen Con A, WGA, BS I, PNA und UEA I ein Bouin-fixierter Schnitt aus dem Jejunum, für GS II, DBA, MPA und SBA aus dem Duodenum und für das Lektin BPA ein Schnitt vom dritten Augenlid des Schweins. Nach der Inkubation folgte ein dreimaliges

Spülen der Schnitte in PBS-Puffer. Anschließend wurden die Schnitte mit Vektashield Hard Set™ (Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim) eingedeckt. Die Auswertung am Mikroskop und die Aufnahme der Bilder erfolgten direkt im Anschluß an das Eindecken. Um die Schnitte für einige Tage haltbar zu machen, wurden die Ränder des Deckglases mit Entellan® versiegelt und die Schnitte in Dunkelheit bei 4 °C gelagert.

Tab. 3: Einteilung der verwendeten Lektine nach ihrer Kohlenhydratspezifität.

Abk.	Lektine / Ursprung	Zuckerspezifität	Inhibitor
1. Glucose/Mannose Gruppe			
Con A	Concanavalin A Canavalia ensiformis	α -Man > α -Glc > α -GlcNAc	α -Mannose
2. N-Azetylglucosamin Gruppe			
GS II	Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia II	α - und β -GlcNAc	β -Glc-Nac
WGA	Wheat germ Triticum vulgaris	GlcNAc(β 1,4 GlcNAc)1-2 > β GlcNAc	β -Glc-Nac
3. N-Azetylgalaktosamin / Galaktose Gruppe			
BPA	Bauhinia purpurea Orchideenbaum	α - und β -GlcNAc > α - und β -Gal	D-Galaktose
BS I	Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia	α -GalNAc > α -Gal	D-Galaktose
DBA	Dolichos biflorus Pferdebohne	GalNAc α 1,3 GalNAc > α -GalNAc	α -GalNAc
MPA	Maclura pomifera Maulbeerbaum	α -GalNAc > α -Gal	D-Galaktose
PNA	Peanut Arachis hypogea	Gal β 1,3 GalNAc > α - und β -Gal	D-Galaktose
SBA	Soybean Glycine max	α - und β -GalNAc > α - und β -Gal	Laktose
4. L-Fukose Gruppe			
UEA I	Ulex europaeus Stechginstersamen	α -L-Fuc	α -L-Fukose

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte an dem Mikroskop Typ DMRBE (Leica, Bensheim), wobei die Proben im Auflichtstrahlengang bei 200- und 400facher Vergrößerung beurteilt wurden. Die Bindungsintensität der Lektine wurde semiquantitativ bewertet:

Negativ	-
Schwach positiv	+/-
Positiv	+
Deutlich positiv	++
Stark positiv	+++

Die Bilddokumentation erfolgte am o. g. Mikroskop unter Verwendung der integrierten Digitalkamera Typ DFC 420C (Leica, Bensheim) und dem zugehörigen Bildbearbeitungsprogramm IPA.

4 Ergebnisse

4.1 Makroskopische Anatomie

Das VNO ist beidseits des *Septum nasi* in den knöchernen Strukturen des Nasengrundes eingebettet. Es ist vom *Cartilago vomeronasalis* umgeben. Beim Schwein sind VNO und *Cartilago vomeronasalis* sehr kurz; die Länge des Knorpels beträgt beim adulten Tier je nach Größe zwischen 16 und 19 mm. Das VNO beginnt direkt hinter dem zweiten Incisivus und erstreckt sich lediglich bis kurz hinter den dritten Incisivus. Der vordere Teil der Knorpelspange ist über der *Fissura palatina* gelegen, erst der hintere Teil liegt dem *Processus palatinus* der Maxilla sowie dem *Os incisivum* auf. Dies erklärt sich dadurch, dass VNO und *Cartilago vomeronasalis* beim Schwein sehr weit rostral lokalisiert sind. Medial befindet sich, paarig angelegt, die *Crista mediana* des Nasenbodens. Sie bildet eine Furche, die den Vomer enthält. Er besteht, wie in Abb. 5 skizziert, aus der schmalen Bodenplatte und den beiden Seitenplatten, die gemeinsam den *Sulcus septalis* bilden und der Aufnahme des knorpeligen *Septum nasi* dienen.

Die *Cartilago vomeronasalis* stellt sich als ovale Knorpelspange dar, die in ihrem Inneren das VNO und die Strukturen birgt, die das VNO umgeben (Abb. 6). Sie hat eine tubenförmige Gestalt. Ihr kaudales Ende läuft spitz geschlossen zu. Im rostralen Abschnitt ist die Knorpelspange über eine Länge von ein bis zwei Millimetern geschlossen. Danach öffnet sie sich dorsolateral ein kleines Stück. Diese Öffnung behält sie in ihrem Verlauf nach kaudal bei; erst am spitzen Ende verliert sich die Öffnung wieder. Lateral ist der Knorpel lediglich von der die Nasenhöhle auskleidenden Schleimhaut überzogen. Ventral liegt er dem Nasenboden auf und ist medial eng mit der *Crista mediana* verbunden. Die Knorpelspange entlässt nach dorsal einen Knorpelsteg, der sich dem *Sulcus septalis* anpasst und bis zur ventralen Kante des *Septum nasi* verläuft. Die Verbindung von Knorpel und Knochen ist so fest, dass es bei der Präparation nur schwer gelingt, sie ohne Substanzverlust vom Knochen zu trennen (Abb. 6).

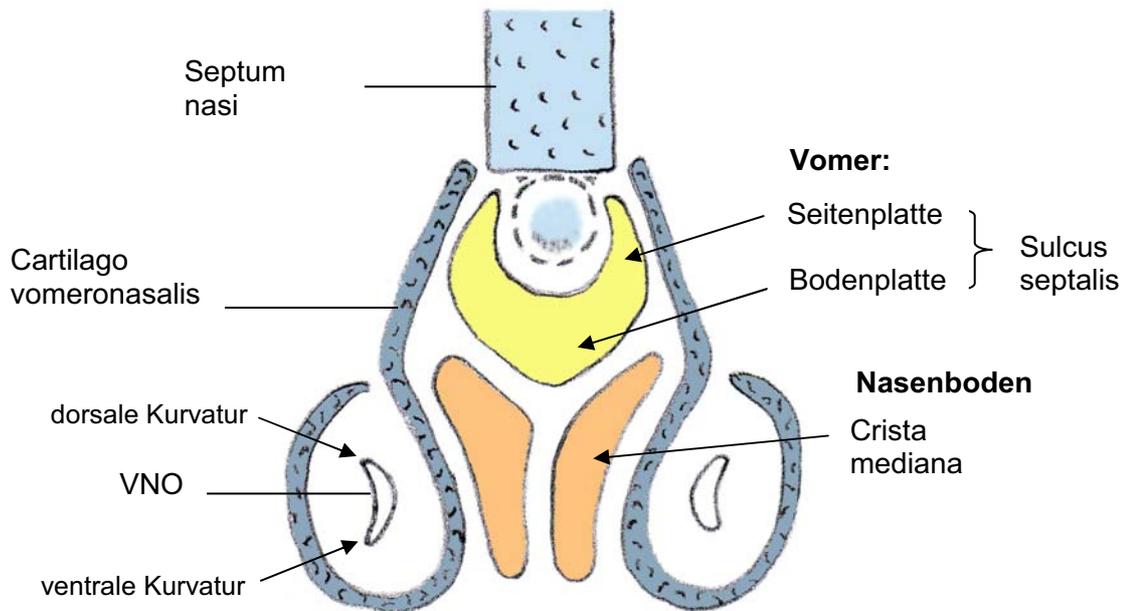


Abb. 5: Schematische Darstellung der knöchernen Strukturen des Nasenbodens ventral des *Septum nasi* in Beziehung zum *Cartilago vomeronasalis*.

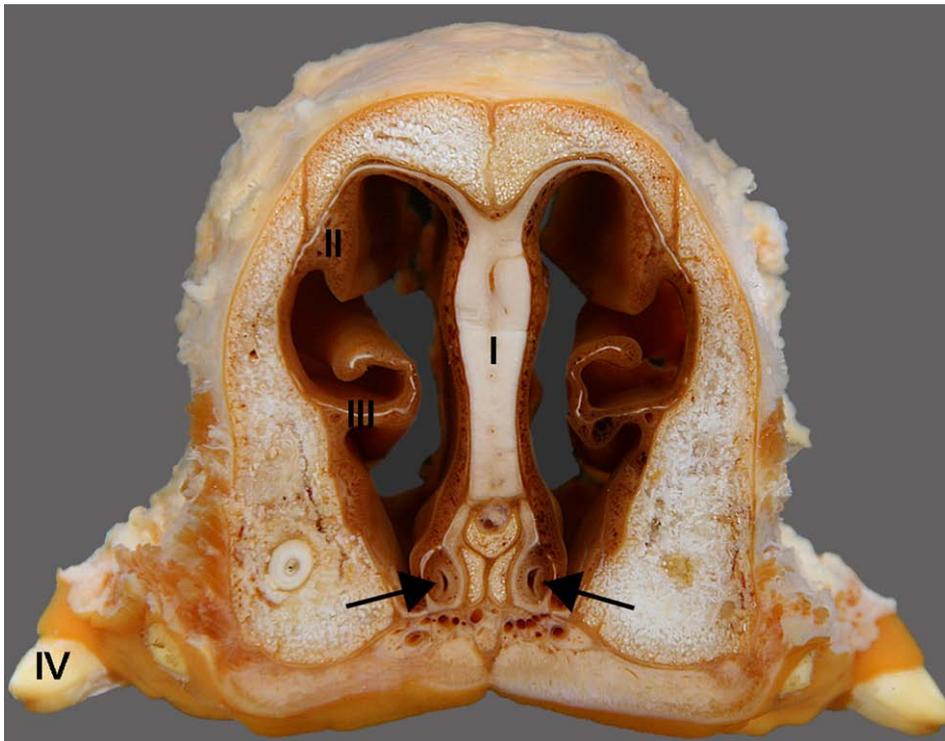


Abb. 6: Querschnitt durch den Gesichtsschädel eines eineinhalb Jahre alten, weiblichen Tieres. Der Schnitt erfolgte auf Höhe des zweiten Incisivus. Die beiden VNO sind durch Pfeile gekennzeichnet. I: *Septum nasi*, II dorsale und III ventrale Nasenmuschel, IV: Caninus.

Die *Crista mediana* stellt im Verlauf von rostral nach kaudal keine glatte Fläche dar. Regelmäßig bildet sie auf Höhe des vorderen Drittels der Knorpelspange eine gebogene Vorwölbung aus, der ventral eine feine Einziehung folgt, in die der Knorpel wie in eine Art schützende Rinne eingefügt ist. Im ventralen Bereich, in dem die Knorpelspange dem *Processus palatinus* aufliegt, ist der Übergang von Knorpel zu Knochen derart verwachsen, dass hier ein Trennen nicht möglich ist.

In Bezug auf die Größe der Knorpelspange und des VNO ist Folgendes festzustellen. VNO und Knorpel sind beim juvenilen Tier deutlich kleiner als beim adulten Tier, das heißt sie sind postnatalem Wachstum unterworfen. Auch dem Gewicht des Tieres sind VNO und *Cartilago vomeronasalis* angepasst; eine Sau mit 175 kg weist ein kleineres VNO auf als eine Altsau mit 240 kg. Ein geschlechtsspezifischer Größenunterschied kann nicht festgestellt werden. Im Probenmaterial befanden sich weibliche Tiere in unterschiedlichen Stadien des Zyklus sowie der Trächtigkeit. Auch hier sind makroskopisch keine Unterschiede vorhanden.

4.2 Rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse

4.2.1 Epithelien des VNO

Der *Ductus vomeronasalis* ist mit zwei charakteristischen Epithelien ausgekleidet, dem respiratorischen Epithel auf der lateralen Seite und dem Riechepithel auf der medialen Seite. In seinem Anfangsabschnitt, dem Bereich, mit dem er beim Schwein in den *Ductus incisivus* mündet, liegt ein mehrschichtiges Plattenepithel vor (Abb. 7).

Der Beginn des respiratorischen Epithels und des Riechepithels liegt nicht immer auf gleicher Höhe. Bei etwa zwei Drittel der untersuchten Tiere ist auf der lateralen Seite bereits respiratorisches Epithel aufzufinden, wohingegen auf der medialen Seite auf derselben Höhe noch Plattenepithel vorherrscht. Hier beginnt das Riechepithel erst etwas später.

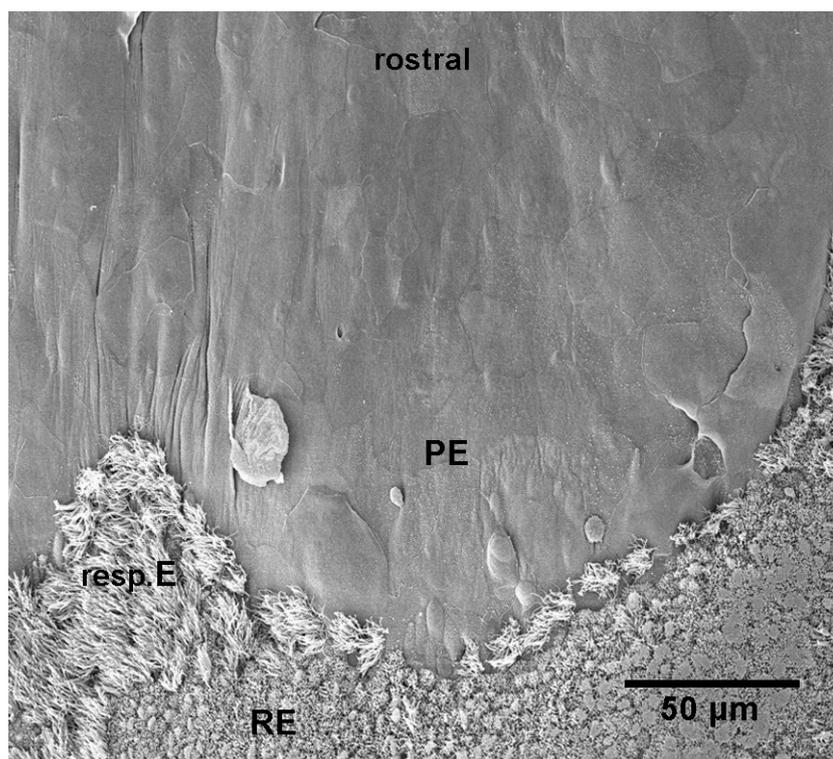


Abb. 7: Rostraler Abschnitt des VNO eines adulten Schweins. Übergang vom mehrschichtigen Plattenepithel (PE) zum lateralen respiratorischen (resp.E) und medialen Riechepithel (RE).

Diese Beobachtung wird histologisch bestätigt (siehe Kap. 4.3). Das mehrschichtige Plattenepithel weist teilweise abgehobene und für dieses Epithel charakteristische Zellen auf, deren Oberfläche mit typischen Mikroplicae, auch Mikroridges genannt, ausgestattet ist (Abb. 8).

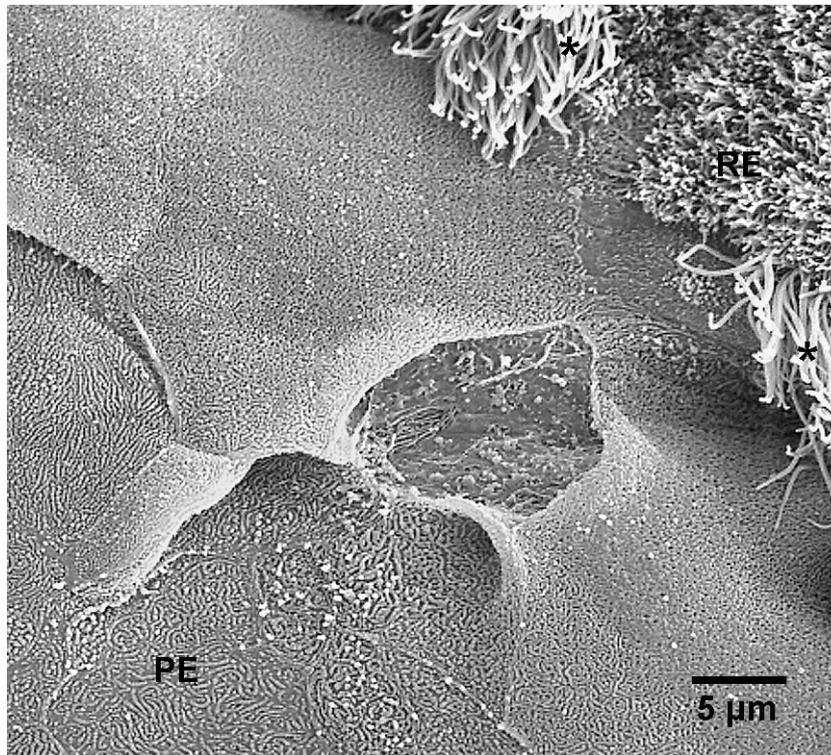


Abb. 8: Ausschnittsvergrößerung des rostralen VNO-Abschnittes eines adulten Schweins im Bereich der Überganszone. Plattenepithel (PE) mit Mikroplicae, zilientragende Zellen (*) des respiratorischen Epithels, Mikrovilli des Riechepithels (RE).

Der Übergang von der lateralen zur medialen Seite des VNO erfolgt in der dorsalen und ventralen Kurvatur des Organs. Hier findet der Wechsel von respiratorischem Epithel zum Riechepithel statt (Abb. 9). Die Ausführungsgänge der Bowman-Drüsen münden in der Regel ebenfalls im Bereich der dorsalen und ventralen Kurvatur (Abb. 9) und sind sowohl im respiratorischen als auch im Riechepithel aufzufinden. Nur vereinzelt münden Ausführungsgänge sehr weit mittig auf der Seite des Riechepithels.

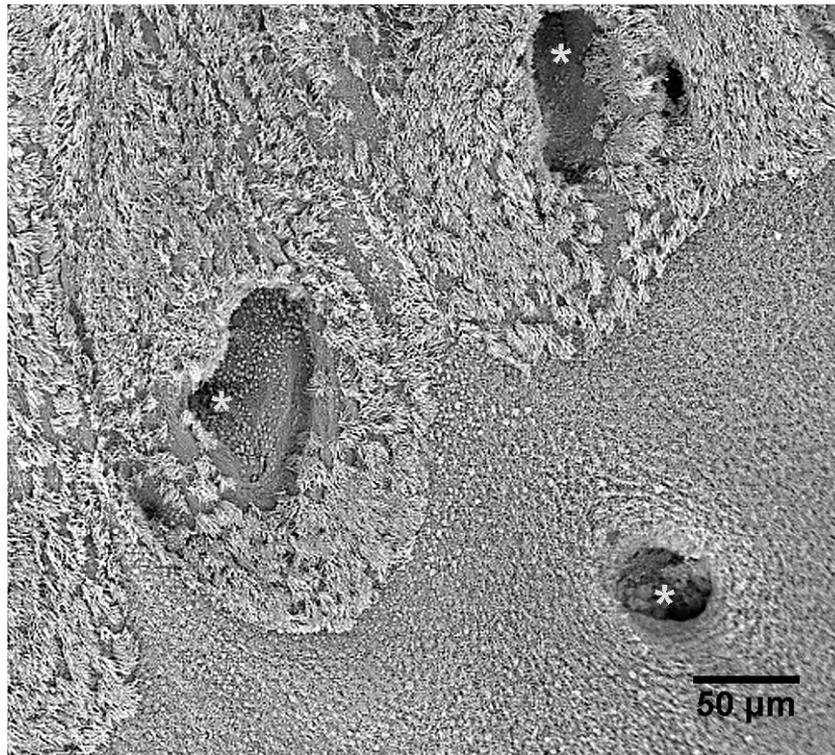


Abb. 9: Übergang vom respiratorischen Epithel (oben links) zum Riechepithel des VNO (unten rechts), adultes Tier. In beiden Epithelien sind im Bereich des Epithelwechsels Ausführungsgänge der Bowman-Drüsen zu finden (*).

Das respiratorische Epithel besteht überwiegend aus hochprismatischen zilientragenden Zellen. Die Epitheloberfläche ist bedeckt mit Büscheln langer, gerader Zilien, die das Bild eines Zilienrasens entstehen lassen. An einigen Stellen sind zwischen den Zilienbüscheln an der Zelloberfläche kurze Zilien (*) verschiedener Wachstumsstufen zu erkennen (Abb. 10).

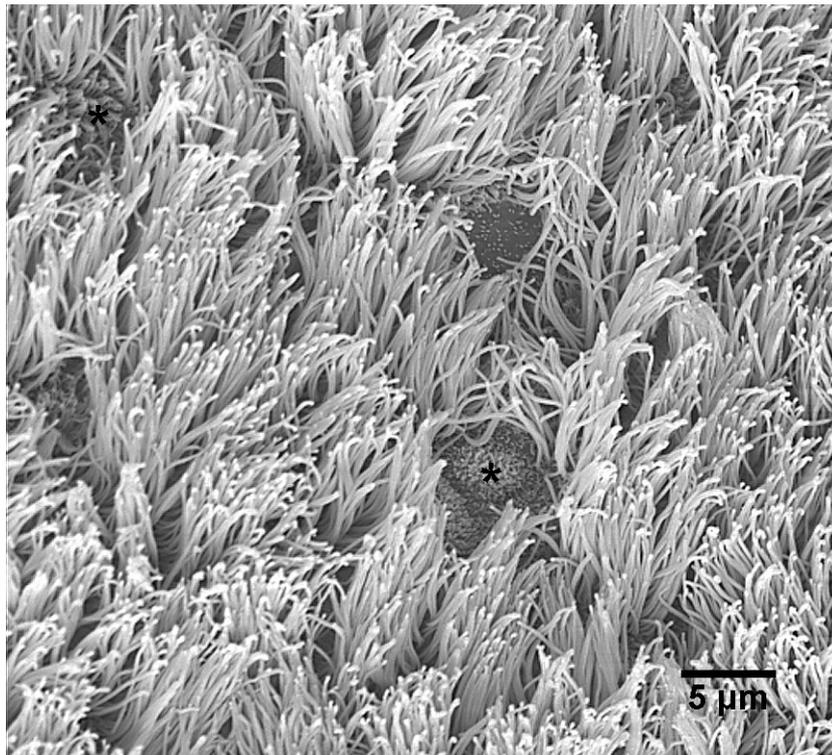


Abb. 10: Aufsicht auf das respiratorische, zilientragende Epithel des VNO eines ein Jahr alten Schweins. Kurze Zilien (*) in Anbildung.

Im Gegensatz dazu besteht das Riechepithel aus Zellen mit einem Mikrovillibesatz, der die Epitheloberfläche flächenhaft bedeckt (Abb. 11). Im Epithelverband lassen sich zwei Zelltypen differenzieren: zum einen die Stützzellen und zum anderen die Riechzellen. Die Mikrovilli der Riechzellen sind zwischen den Mikrovilli der Stützzellen zu finden (Abb. 12). Die kurzen, gedrunenen und oft dicht stehenden Riechzellmikrovilli werden größtenteils von den Mikrovilli der Stützzellen verdeckt. Die Verteilung der Riechzellen ist unregelmäßig. An einigen Stellen treten sie dicht gehäuft auf und bilden kleine Gruppierungen. In anderen Epithelbereichen sind sie nur vereinzelt vorzufinden. Im Gegensatz dazu haben die Mikrovilli der Stützzellen eine feinere Gestalt, sind deutlich kürzer als Zilien und sind zum Teil ineinander verzweigt. So bilden sie eine dicht vernetzte Epitheloberfläche.

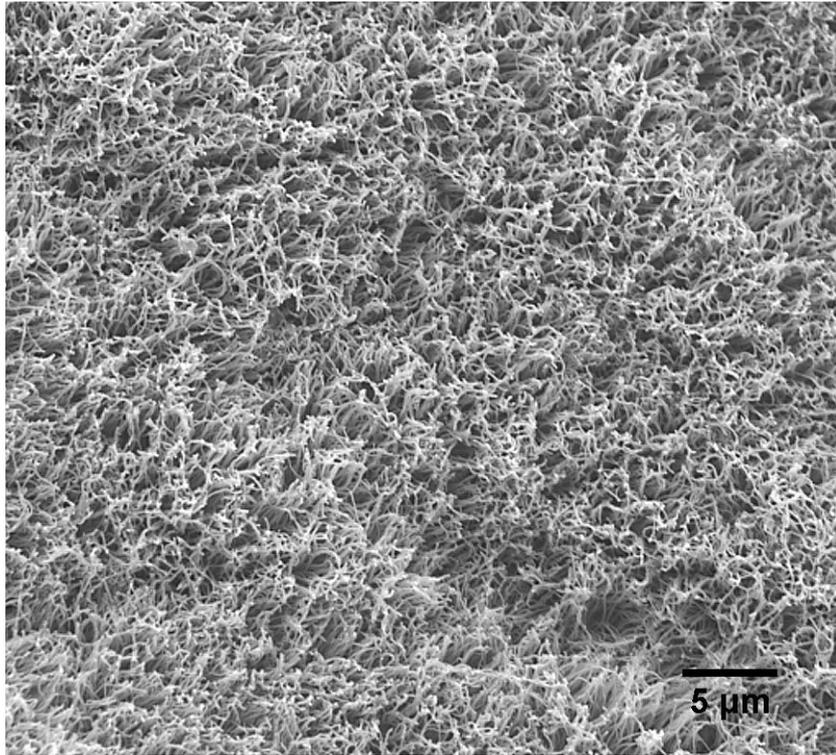


Abb. 11: Aufsicht auf das mit Mikrovilli besetzte Riechepithel des VNO eines eineinhalb Jahre alten Schweins.

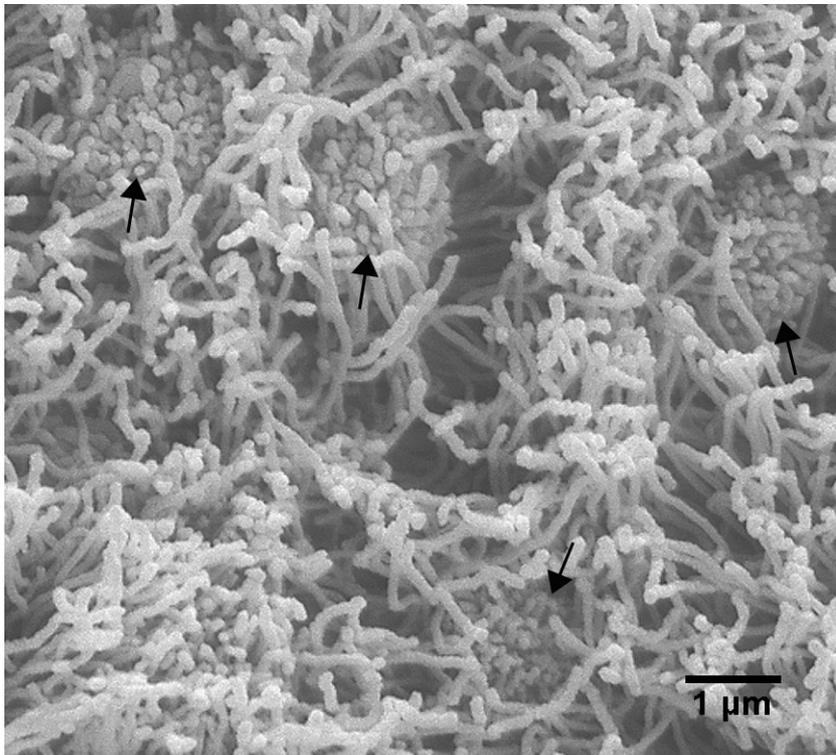


Abb. 12: Riechepithel des VNO eines eineinhalb Jahre alten Schweins. Zwischen den langen Mikrovilli der Stützzellen sind die kurzen, gedrunenen Mikrovilli der Riechzellen (→) zu erkennen.

Besonders an den Umschlagpunkten der dorsalen und ventralen Krümmung (Abb.5) fallen verschiedene Formen des Epithelübergangs auf. Sowohl der Ort des Epithelwechsels als auch die vorherrschenden Zelltypen können variieren (Abb. 13). Die nachfolgenden Abbildungen (14, 15, 16) zeigen drei typische Übergänge. Sie sind in der Zeichnung der Längsachse (Abb. 13) des *Ductus vomeronasalis* markiert.

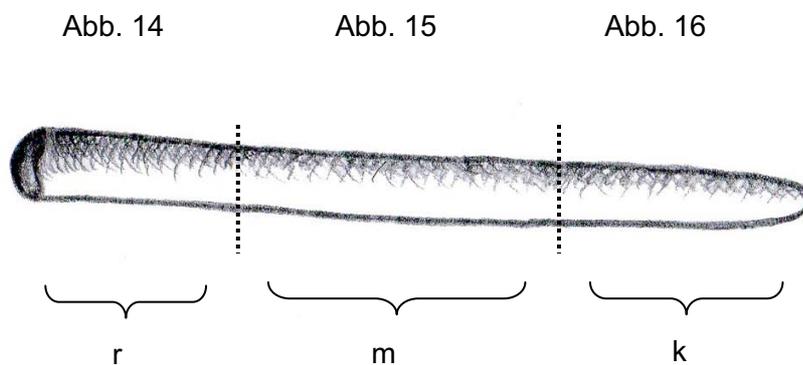


Abb. 13: Schemazeichnung des *Ductus vomeronasalis*. Rostral (r), medial (m), kaudal (k). Eingezeichnet sind die Lokalisationen der in den Abbildungen 14, 15 und 16 gezeigten Übergänge.

In der Regel findet der Wechsel von respiratorischem Epithel zum Riechepithel exakt im Umschlagpunkt in der dorsalen bzw. ventralen Krümmung statt. Im rostralen, teilweise auch im medialen Abschnitt, ist der Übergang von respiratorischem Epithel zum Riechepithel klar abgegrenzt (Abb. 14). Bei etwa einem Drittel der untersuchten Tiere zieht das respiratorische Epithel ein Stück über den Umschlagpunkt hinaus auf die mediale Seite hinüber.

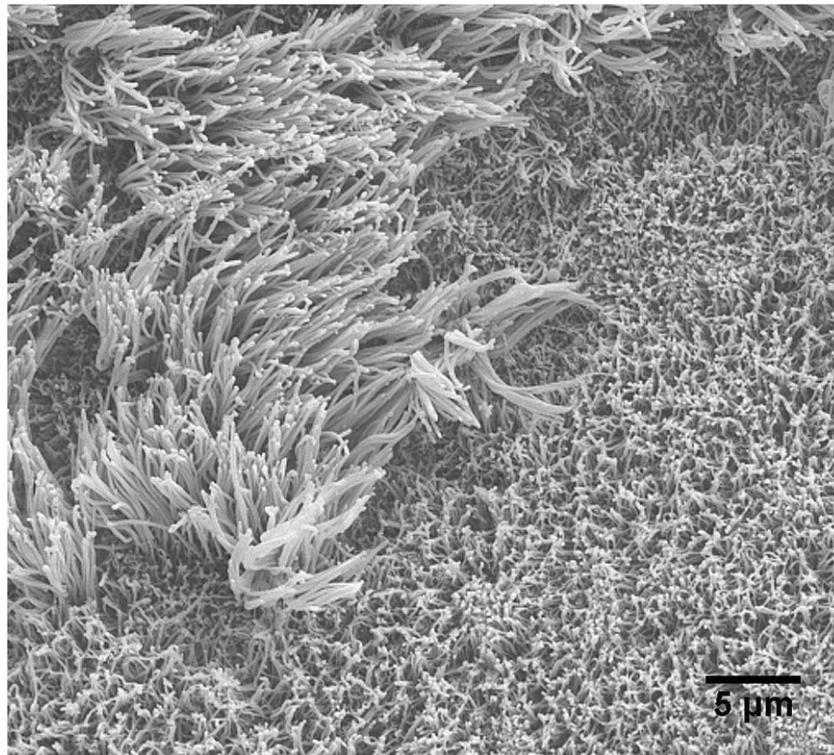


Abb. 14: Übergang vom respiratorischen Epithel zum Riechepithel des VNO eines eineinhalb Jahre alten Schweins. Eine klare Abgrenzung und erhebliche Differenz in der Höhe beider Epithelien sind deutlich erkennbar. Rostraler Abschnitt.

Im medialen Abschnitt des *Ductus vomeronasalis* sind im Bereich des Übergangs von der lateralen zur medialen Seite Übergangszellen vorzufinden (Abb. 15). Diese Übergangsform kann sowohl im Riechepithel als auch im respiratorischen Epithel vorkommen.

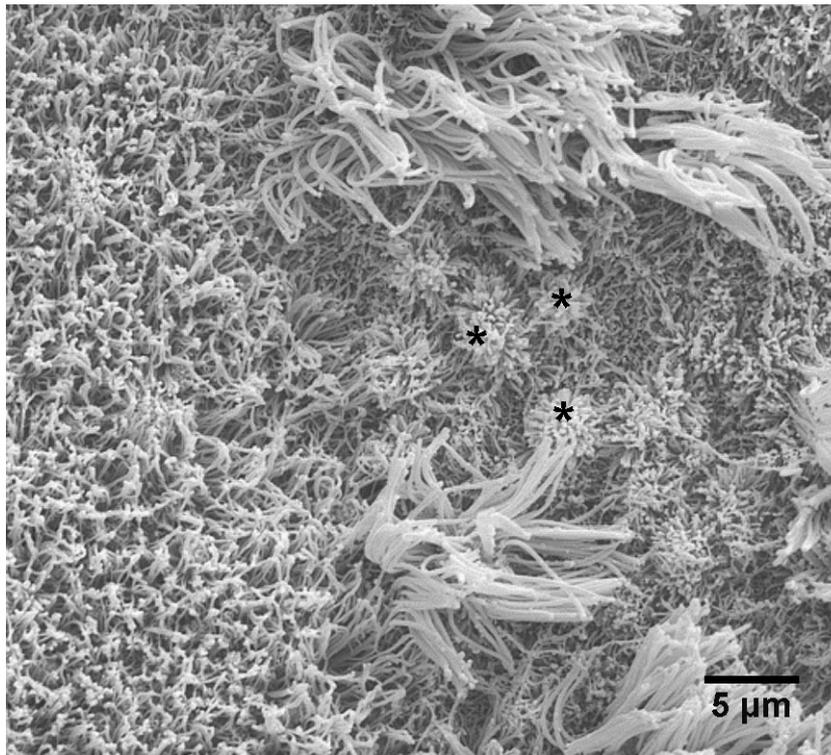


Abb. 15: Übergangszellen (*) im medialen Abschnitt; eineinhalb Jahre altes Schwein.

Im kaudalen Abschnitt des blind endenden VNO ist oft keine klare Trennung der beiden Epithelien mehr möglich. Vielfach zieht das zilientragende respiratorische Epithel auf die mediale Seite hinüber. Es stellt sich dort in einzelnen Zilienbüscheln oder kleinen Gruppen von zilientragenden Zellen dar. Zwischen ihnen befindet sich zum einen das mikrovillibesetzte Riechepithel, zum anderen eine Vielzahl an Übergangszellen (Abb. 16). Im Endbereich des Organs sind weder ein typisches respiratorisches noch ein charakteristisches Riechepithel zu erkennen.

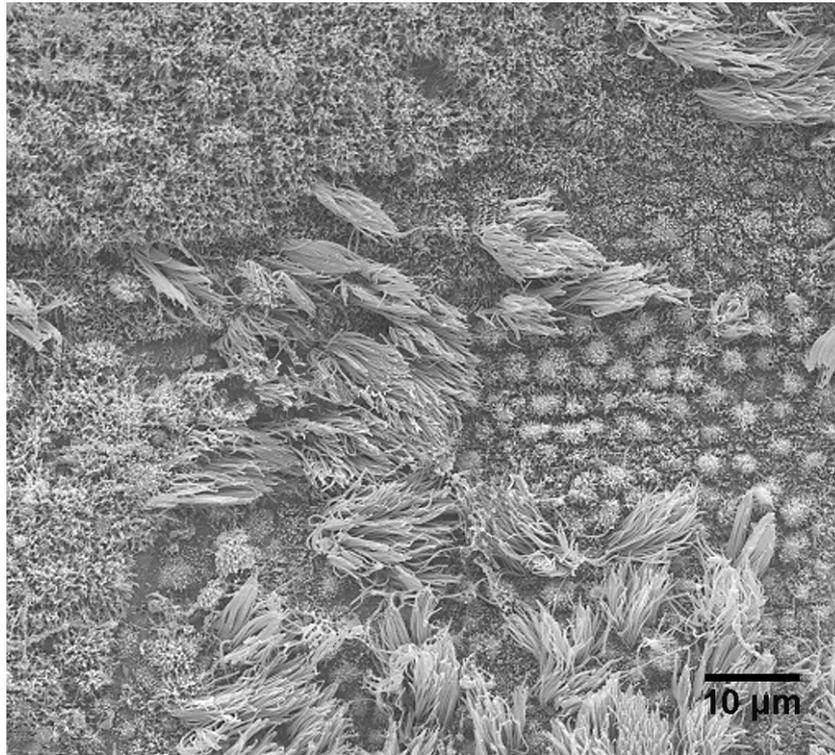


Abb. 16: Kaudaler Abschnitt des VNO eines adulten Schweins. Sehr häufig sind in diesem Bereich Übergangszellen vorzufinden; respiratorisches Epithel und Riechepithel gehen in unregelmäßiger Verteilung ineinander über.

Zusammengefasst verhält sich die topographische Verteilung (Abb. 17) der verschiedenen Epithelformen folgendermaßen: Rostral der beiden Epithelien, die den *Ductus vomeronasalis* auskleiden, befindet sich stets mehrschichtiges Plattenepithel. Wie bereits geschildert, tritt in vielen Fällen das respiratorische Epithel auf der lateralen Seite zuerst in Erscheinung und ragt häufig auf die mediale Seite hinüber. Erst etwas später erfolgt auch auf der medialen Seite der Übergang vom Plattenepithel zum Riechepithel. Im medialen Bereich des Organs findet man typischerweise zwei Verteilungsmuster: Die laterale Seite ist vollständig mit respiratorischer Schleimhaut bedeckt, die mediale Seite weist die Riechschleimhaut auf. Der Übergang von einem zum anderen Epithel erfolgt in der dorsalen bzw. ventralen Krümmung an den Umschlagspunkten (Abb. 5). Dieser Form gegenüber steht eine zweite Variante, die ebenfalls sehr häufig auftritt. Hier ist die laterale Hälfte wiederum vollständig mit respiratorischer Schleimhaut ausgekleidet. Allerdings reicht das respiratorische Epithel an einem der Umschlagspunkte bis auf die mediale Seite hinüber. So ist die mediale VNO-Hälfte oft nur zu

zwei Dritteln mit Riechepithel bedeckt. Im kaudalen Abschnitt des VNO verliert sich die klare Trennung der Epithelien in Richtung Organende. Hier erstreckt sich das respiratorische Epithel im hinteren Bereich auch auf der medialen Seite und vermischt sich dort zu einem unregelmäßigen Muster mit dem Riechepithel. Vereinzelt weist das VNO am geschlossenen Ende kleine Ausbuchtungen auf. Hier sind auf der Oberfläche nur noch einzelne Zilienbüschel zu finden.

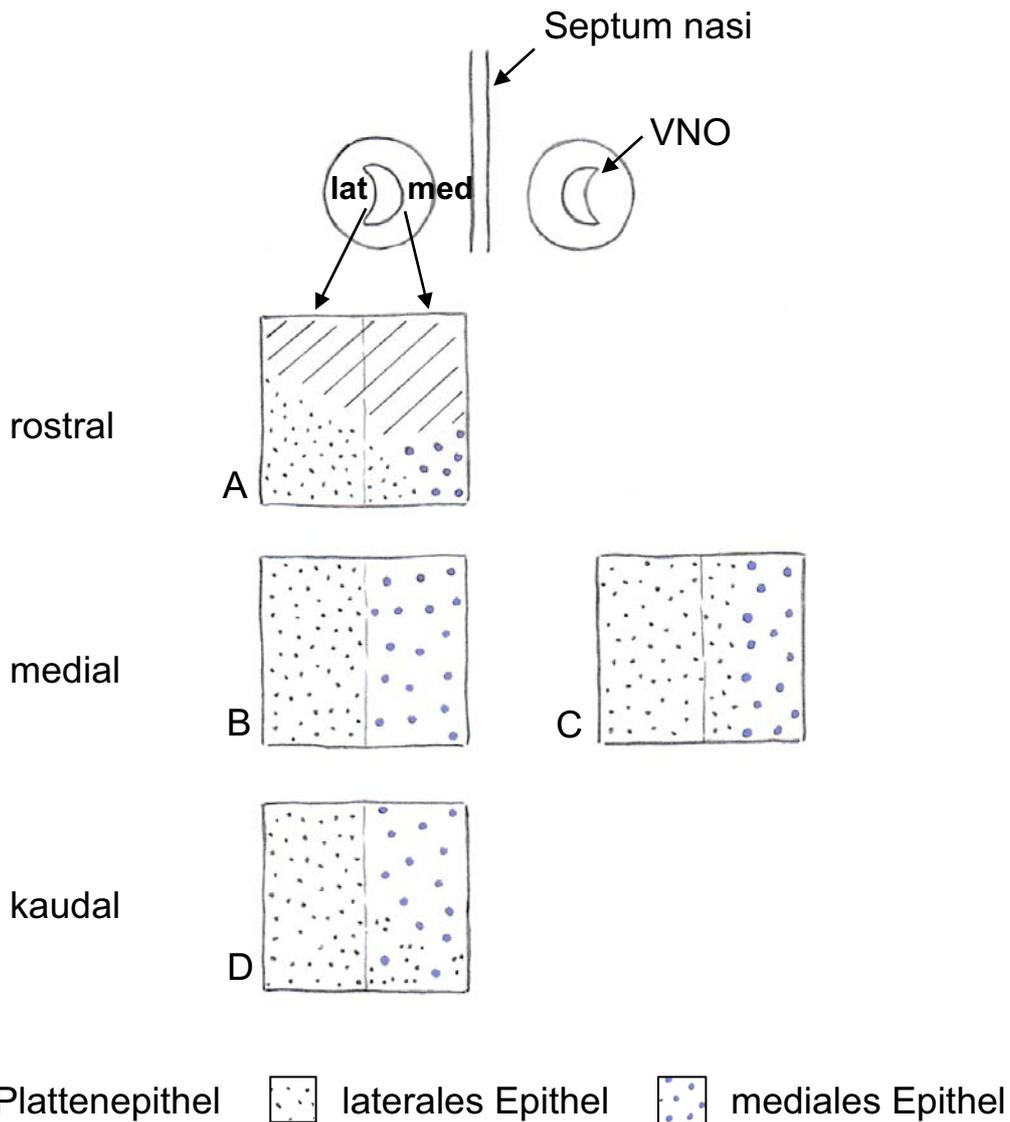


Abb 17:

Schematische Verteilung der Schleimhaut im VNO. A: Respiratorische Schleimhaut auf der lateralen und teilweise medialen Seite, Riechschleimhaut auf der medialen Seite. Kranial befindet sich Plattenepithel. Im medialen Abschnitt gibt es zwei Varianten. B: Typisches Verteilungsmuster mit respiratorischer Schleimhaut lateral und Riechschleimhaut medial. C: Das respiratorische Epithel tritt am Umschlagspunkt auf die Seite mit Riechepithel über. D: Vermischung von respiratorischem Epithel und Riechepithel auf der medialen VNO-Hälfte.

4.2.2 Zelltypen des VNO

Die drei im VNO vorherrschenden Zelltypen sind in Abbildung 18 gegenübergestellt. Zilientragende Zellen (Abb. 18A) aus dem respiratorischen Epithel sind hochprismatisch und besitzen an der Zelloberfläche kräftige, gerade Zilien. Riechzellen (Abb 18B) aus dem Riechepithel heben sich durch den oval geformten Zellkörper ab, an dessen basalem Pol sich das Axon Richtung Basalmembran erstreckt. Am apikalen Pol des Zellkörpers entspringt der Dendrit, der zur Epitheloberfläche hin verläuft. Typischerweise sind weitere Dendriten zu erkennen, da die Riechzellen häufig in kleinen Gruppen angeordnet sind (Abb. 18B). Stützzellen (Abb 18C) aus dem Riechepithel werden häufig zur Basis hin schmaler und weisen zahlreiche Zellverbindungen auf.

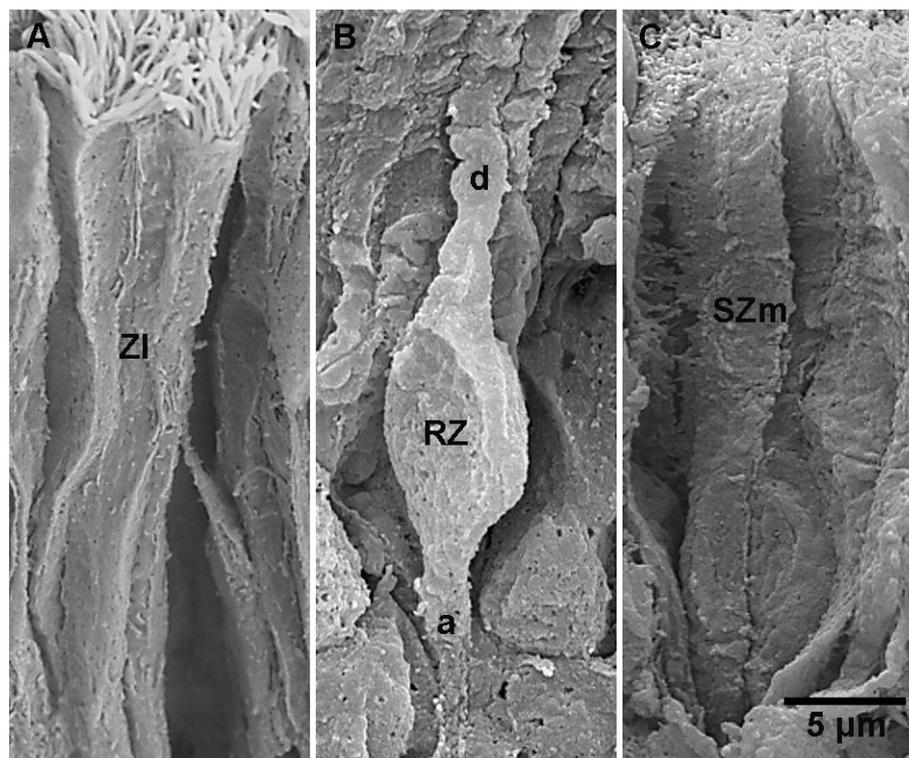


Abb. 18: Gegenüberstellung der drei prominenten Zelltypen des VNO eines adulten Schweins. A: zilientragende Zelle (ZI) aus dem respiratorischen Epithel. B: Riechzelle (RZ) aus dem Riechepithel; a: Axon; d: Dendrit. C: mit Mikrovilli besetzte Stützzelle (SZm) des Riechepithels. Mazerationspräparat.

Die Zilien stellen die längsten Zellfortsätze dar. Im Vergleich dazu sind die Mikrovilli der Stützzellen deutlich kürzer und feiner. Noch kürzere Mikrovilli besitzen die Riechzellen.

Der Durchmesser der Zilien beträgt im Schnitt 209,9 nm und liegt damit deutlich über dem durchschnittlichen Wert der Mikrovilli der Stützzellen mit 111,0 nm. Die Mikrovilli der Riechzellen sind mit 120,2 nm etwas voluminöser.

4.2.3 Riechepithel der *Regio olfactoria*

Das Riechepithel der *Regio olfactoria* (Abb. 19) unterscheidet sich deutlich von dem vorher beschriebenen Riechepithel des VNO. Die Riechzellen der *Regio olfactoria* besitzen im Gegensatz zu denen des VNO zahlreiche lange, gerade Zilien. Das Dendritenende hat eine

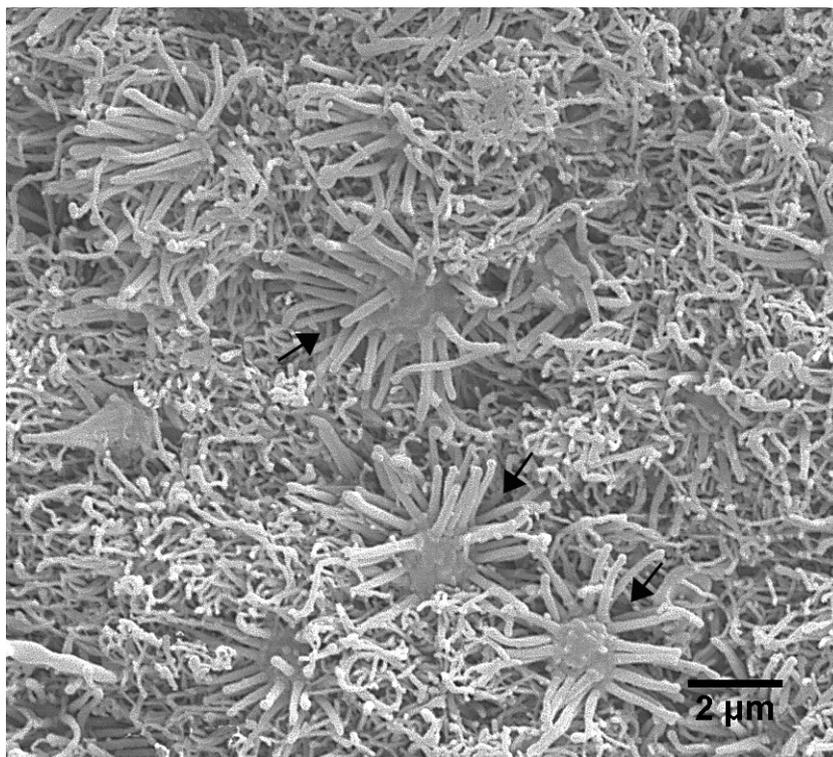


Abb. 19: Riechepithel der *Regio olfactoria* eines vier Monate alten Schweins. Deutlich sind die zilientragenden Riechzellen zu erkennen (→).

charakteristische Vorwölbung, den „dendritic knob“, auf dem die Zilien rinförmig angeordnet sind. Im Gegensatz zum VNO sind die Riechzellen in der *Regio olfactoria* deutlich sichtbar, da sie nicht von den Mikrovilli der Stützzellen verdeckt werden.

Beim Schwein treten zudem zwei Typen von Riechzellen in Erscheinung (Abb. 20). Bei dem einen Zelltyp läuft das Dendritenende leicht konisch zu, mit zilienfreier Kuppenspitze (Abb. 20A). Seitlich am Dendritenende entspringen lange, schmale Zilien, die von der Basis zur Spitze hin eine leichte Verjüngung aufweisen. Bei dem anderen Riechzelltyp hat das Dendritenende eine kugelige Gestalt (Abb. 20B). Über die gesamte Kuppe verteilt, entspringen 15 bis 20 gedrungene, deutlich kürzere Zilien. Die zwei Riechzelltypen sind sowohl in juvenilen als auch in adulten Tieren zu finden. Eine geschlechtsspezifische Zuordnung ist nicht möglich. Beide Zelltypen treten mit der gleichen Häufigkeit auf.

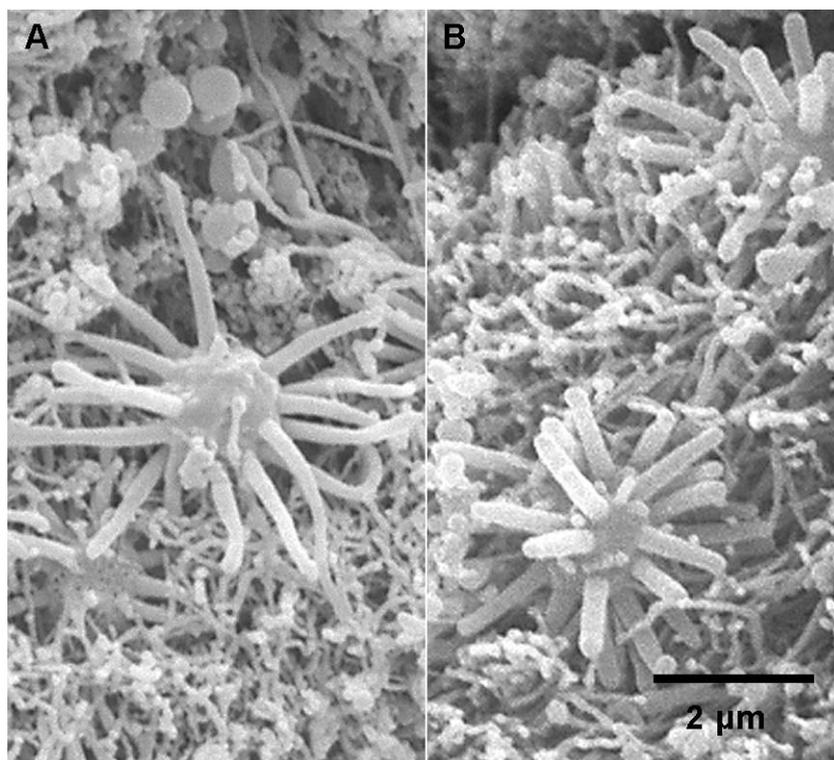


Abb. 20: Darstellung zweier Riechzelltypen aus der *Regio olfactoria*.

4.3 Histomorphologie

Die Innenauskleidung des *Ductus vomeronasalis* ist aus einer *Tunica mucosa respiratoria* und aus einer *Tunica mucosa olfactoria* zusammengesetzt (Abb. 21). Die *Tunica mucosa respiratoria* besteht aus der *Lamina epithelialis*, einem einschichtigen, mehrreihigen, hochprismatischen Epithel mit Basalzellen und Epithelzellen, die an ihrer freien Oberfläche Zilien tragen. Die subepitheliale *Lamina propria mucosae* besteht aus lockerem Bindegewebe, das die Bowman-Drüsen, Gefäße und Nerven einschließt. Gegenüber der *Tunica mucosa respiratoria* befindet sich die funktionell bedeutende *Tunica mucosa olfactoria*, ebenfalls bestehend aus einer *Lamina epithelialis* und einer *Lamina propria mucosae*. Die *Lamina epithelialis* ist ein einschichtiges, mehrreihiges, drei Zelltypen beinhaltendes Epithel, das von der aus lockerem Bindegewebe bestehenden *Lamina propria mucosae* unterlagert ist. Sie enthält Gefäße und die gebündelten Fasern des *N. vomeronasalis*.

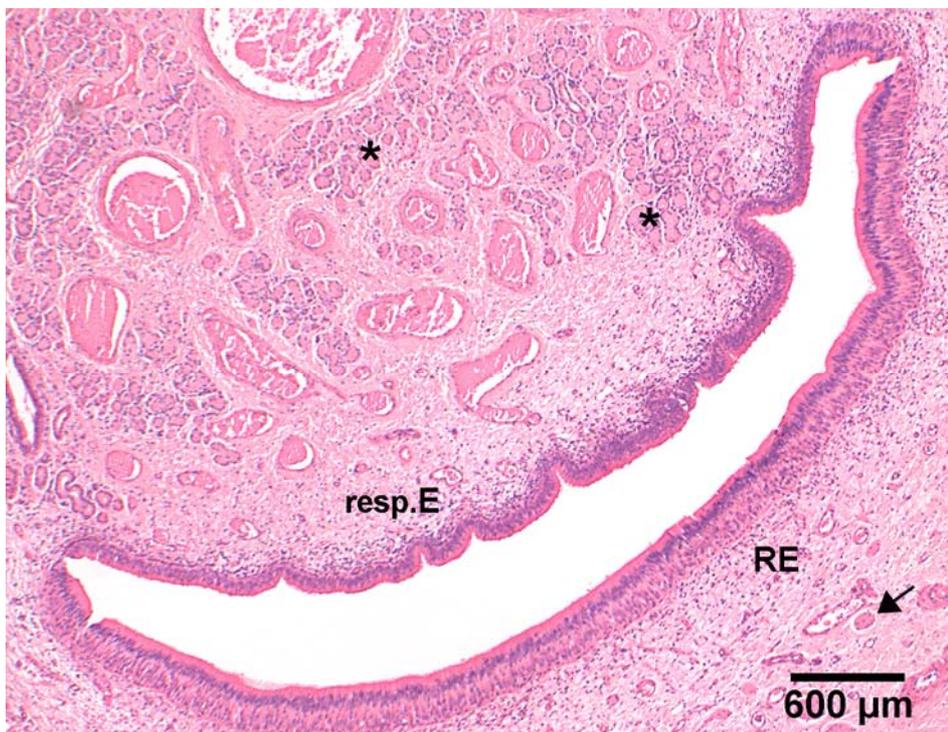


Abb. 21: Querschnitt durch das VNO eines 2 Jahre alten Schweins, medialer Abschnitt, H.E. Das respiratorische Epithel (resp.E) erstreckt sich über die gesamte laterale Seite, während die mediale Seite mit Riechepithel (RE) ausgekleidet ist. Lateral: zahlreiche Bowman-Drüsen (*). Medial: Nervenfaserbündel des *N. vomeronasalis* (→).

Der *Ductus vomeronasalis* weist in dem Anfangsabschnitt, mit dem er in den *Ductus incisivus* mündet, ein mehrschichtiges Plattenepithel auf. Innerhalb des Plattenepithels sind wiederholt Vakuolen aufzufinden. Teilweise sind sie klein und tragen zwei bis drei randständige abgeflachte Kerne. Gelegentlich nehmen sie jedoch die gesamte Epithelhöhe ein und weisen eine Umrandung mit dem bei mukösen Drüsen vorzufindenden Zelltyp auf. Wie bereits dokumentiert, erfolgt der Übergang vom Plattenepithel zum respiratorischen Epithel und zum Riechepithel nicht immer auf gleicher Höhe (Abb. 22). Am Übergang vom mehrschichtigen Plattenepithel zum Riechepithel sind in der *Lamina propria*, teilweise auch in der *Lamina epithelialis* des Riechepithels, zahlreiche Lymphozyten eingelagert.

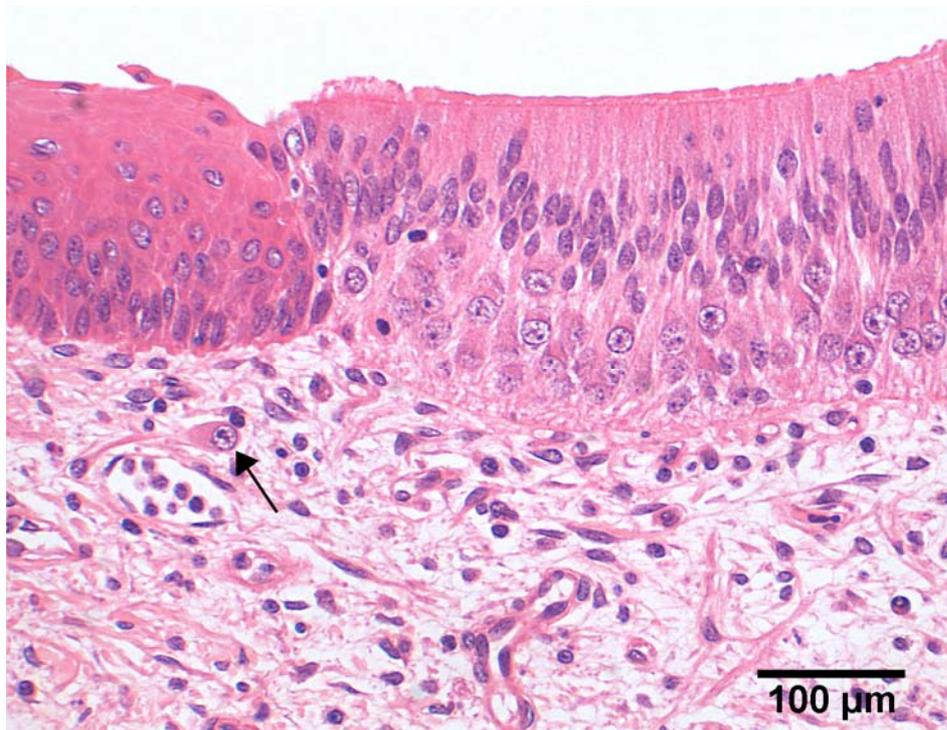


Abb. 22: Rostraler Abschnitt aus dem VNO eines 4 1/2 Monate alten Schweins, H.E. Übergang von Plattenepithel (links) zu Riechepithel (rechts) der medialen Seite. Eine Riechzelle befindet sich außerhalb des Riechepithels in der *Lamina propria* (→).

Das Riechepithel besteht aus drei Zelltypen: den Basalzellen, den Riechzellen und den Stützzellen (Abb. 23). Die Basalzellen stehen in direktem Kontakt oder enger Nähe zur Basalmembran und präsentieren sich als runde bis unregelmäßig geformte Zellen. In einigen Epithelabschnitten sind sie dicht und gleichmäßig nebeneinander aufgereiht, in anderen

Epithelbereichen sind sie nur vereinzelt anzutreffen. Mit geringem Abstand oder unmittelbar an die Basalmembran angrenzend, beginnt die Lage der Riechzellen. Die Anzahl der übereinander auftretenden Kernreihen und somit auch die Epithelhöhe variiert sehr stark. Ein niedriges Epithel besteht lediglich aus ein bis zwei Reihen von Kernen, während bei einem hohen Epithel fünf bis sechs Kernreihen übereinander vorkommen. Die Riechzellen weisen einen charakteristischen, großen runden Kern auf, bei dem der kräftig gefärbte Nukleolus deutlich in Erscheinung tritt. Das Soma der Riechzellen spitzt sich apikal zu und entlässt einen schmalen Nervenfortsatz, den Dendriten, der sich in Richtung Epitheloberfläche windet. Von ihm aus erstrecken sich zahlreiche Mikrovilli in das Lumen des VNO. Der basale Teil des Riechzellsomas ist stärker abgerundet. Hier entspringt der zweite Nervenfortsatz, das Axon, das die Basalmembran durchdringt und gemeinsam mit den Axonen der benachbarten Riechzellen ein kleines Nervenbündel bildet.

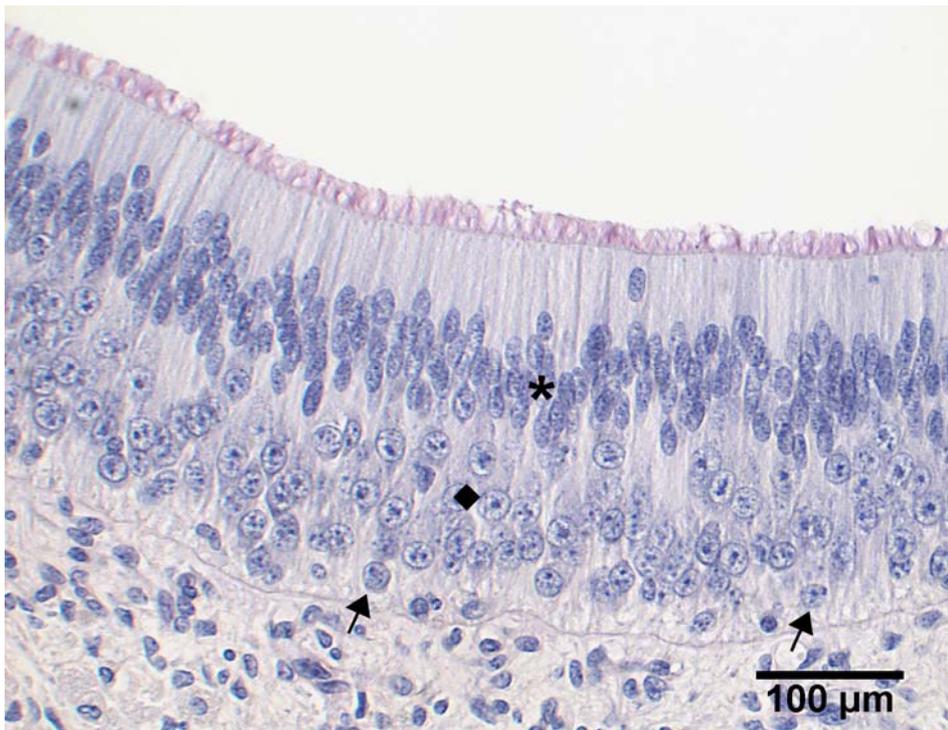


Abb. 23: VNO eines 4 1/2 Monate alten Schweins, PAS-Färbung / Gegenfärbung mit Hämalaun. Die fein gezeichnete Basalmembran bildet die Abgrenzung des Riechepithels, bestehend aus Basalzellen (→), Riechzellen (Raute) und Stützzellen (*), von der *Lamina propria*. Die mit Mukus umgebenen Mikrovilli erscheinen rötlich gefärbt.

Die Anordnung der Riechzellen innerhalb des Riechepithels stellt sich sehr unterschiedlich dar. Teilweise erscheinen sie relativ symmetrisch übereinander aufgereiht. In anderen Epithelabschnitten liegen die Zellkerne in vielen verschiedenen Ebenen und ergeben so ein sehr unruhiges Bild. Oberhalb der Riechzellen ist die Lage der längsoval geformten Stützzellkerne lokalisiert. Die Anzahl der übereinander auftretenden Stützzellkerne richtet sich nach dem Aufkommen an Riechzellen. In der Regel liegen etwas weniger Stützzellen als Riechzellen vor. Zwischen Epitheloberfläche und den Kernen der Stützzellen erstreckt sich ein kernfreier Bereich, der aus dem Soma der Stützzellen und den feinen Dendriten der Riechzellen gebildet wird. Ähnlich den Riechzellen tragen auch die Stützzellen an ihrer Oberfläche zahlreiche Mikrovilli. Gemeinsam bilden sie einen dichten Saum (Abb. 23).

An den Umschlagspunkten in der dorsalen und ventralen Krümmung findet bei einigen Tieren bis zu einem Alter von etwas mehr als einem Jahr eine drastische Höhenzunahme des Riechepithels statt. Riechzellen treten dort stark gehäuft übereinander in Erscheinung. Ebenso ist die Anzahl der Stützzellen stark erhöht.

Die Riechzellen des VNO sind hochspezifische Zellen, die normalerweise innerhalb des Riechepithels vorkommen. Bei juvenilen Tieren unter einem Jahr treten gelegentlich Zellen außerhalb des Riechepithels auf, die starke Ähnlichkeit mit Riechzellen aufweisen (Abb. 22). Sie sind vereinzelt oder in kleinen Gruppen innerhalb der *Lamina propria* lokalisiert und präsentieren sich häufig in direkter Nähe zu einem Axon. Ein Teil der Zellen ist unweit der Basalmembran oder in direktem Kontakt zu ihr aufzufinden. Die Basalmembran ist in diesem Fall durchbrochen.

In der *Lamina propria* der lateralen Seite befinden sich zahlreiche muköse Drüsen. Bei juvenilen Tieren können im rostralen Abschnitt des Organs auch auf der medialen Seite Drüsen zu finden sein, teilweise umringen sie den gesamten *Ductus vomeronasalis*. In diesen Fällen sind die Ausführungsgänge auf der medialen Seite nicht nur an den Umschlagspunkten lokalisiert. Über die gesamte Länge des *Ductus vomeronasalis* ist die *Lamina propria* reich an Gefäßen, die auf beiden Seiten des Organs zu finden sind (Abb 21). Die Nervenfasern in der *Lamina propria* treten überwiegend medial auf und stellen sich im Querschnitt als feine Bündel dar. Auffallend ist die Lokalisation dieser Nervenbündel: Die meisten befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur Knorpelspange. Selbst in dem dorsalen Bereich, in dem die Knorpelspange fast geschlossen ist und nur noch den Knorpelsteg in Richtung *Septum nasi* entlässt, sind Anschnitte von Nervenfaserbündeln zu finden. Nervenfasern auf der lateralen

Seite kommen in wesentlich geringerer Anzahl vor und weisen keine bevorzugte Lokalisation innerhalb der lateralen *Lamina propria* auf.

Das Riechepithel der *Regio olfactoria* (Abb. 24) stellt sich im Gegensatz zum Riechepithel des VNO sehr einheitlich dar. Das Epithel ist bedeutend höher und die Anzahl der Riech- und Stützzellen ist keinen auffälligen Schwankungen unterworfen. Basalzellen an der Basalmembran zeigen das im VNO beschriebene Verteilungsmuster. Die Lage der Riechzellkerne besteht in der Regel aus acht bis zehn Kernreihen übereinander, die Lage der Stützzellkerne ist bedeutend schmaler. Auch das Riechepithel weist einen kernfreien Bereich auf, in dem sich gelegentlich Zellen in unterschiedlichen Teilungsstadien präsentieren. Die Oberfläche des Riechepithels zeigt einen dichten Saum, bestehend aus den Zilien der Riechzellen und den Mikrovilli der Stützzellen. Im Gegensatz zum Riechepithel des VNO sind in der klassischen Riechschleimhaut die Ausführungsgänge der Bowman-Drüsen (Abb. 24) über das gesamte Epithel verteilt.



Abb. 24: Riechepithel der *Regio olfactoria* eines adulten Schweins, H.E. Ausführungsgänge (*) der unterlagerten Bowman-Drüsen.

4.4 Immunhistochemische Ergebnisse

4.4.1 Ki-67 und Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

Zum Nachweis proliferierender Zellen im VNO wurden die zwei Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA eingesetzt. Beide Antikörper markieren die sich in Teilung befindlichen Zellen innerhalb des Epithels, jedoch hat sich die Markierung mittels PCNA als bessere Methode herausgestellt. Im Folgenden werden deshalb die PCNA-markierten mitotischen Zellen beschrieben.

PCNA-markierte Zellen (Abb. 25) sind sowohl basal als auch intermediär und apical lokalisiert. Die Basalzellen weisen mit Abstand die höchste Anzahl an PCNA-positiven Zellkernen auf. Sie sind in der Regel in kleinen Gruppen nahe der Basalmembran lokalisiert. Eine Differenzierung zwischen den Kernen der Stammzellen und lediglich basal lokalisierten Zellkernen ist nicht möglich. Intermediär sind nur selten PCNA-markierte Kerne aufzufinden, während im apicalen Bereich regelmäßig vereinzelte Stützzellkerne markiert sind. Außerhalb des Riechepithels weisen Bindegewebszellen des Interstitiums eine Markierung durch den PCNA-Antikörper auf.

Das Expressionsmuster des PCNA-Antikörpers zeigt auch im Riechepithel der *Regio olfactoria* eine deutliche Trennung in basal lokalisierte, PCNA-markierte Riechzellkerne und in apikal gelegene Stützzellkerne mit positiver Reaktion.

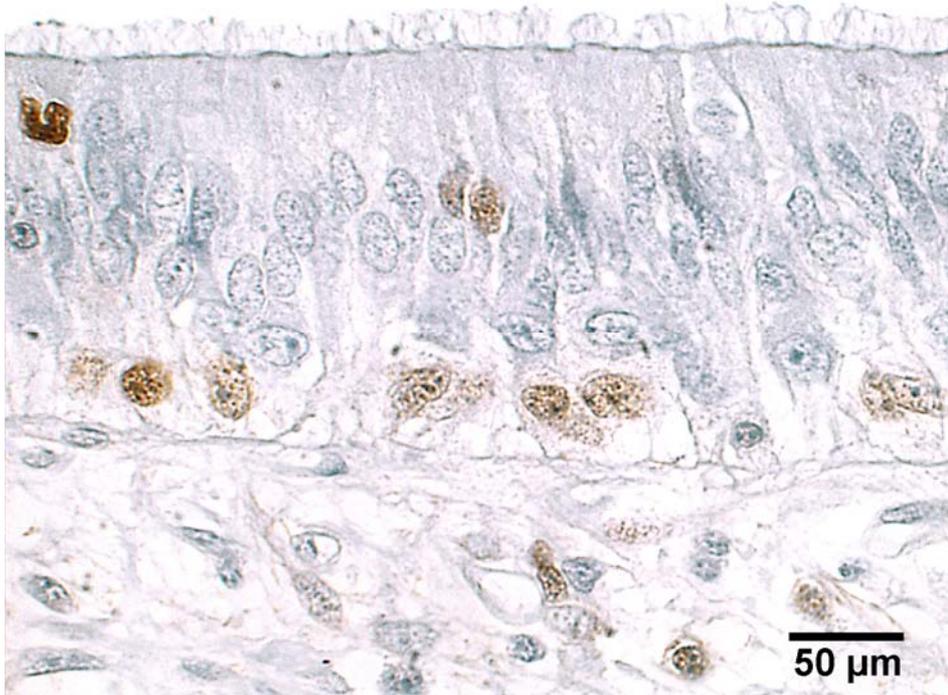


Abb. 25: Ausschnitt aus dem Riechepithel eines 4 1/2 Monate alten Tieres. Innerhalb des Epithels zeigen sich Basal- und Stützzellen in Teilung, durch den PCNA-Antikörper braun markiert. Gegenfärbung mit Hämalaun.

4.4.2 Olfactory Marker Protein (OMP)

Bei allen untersuchten Tieren erfolgt eine Expression von OMP in den Riechzellen des VNO. OMP lässt sich im Zytoplasma der Riechzellen darstellen, allerdings liegen Unterschiede in Intensität und Lokalisation vor. Die Basalzellen präsentieren sich bei allen Tieren stets unmarkiert. Nervenfaserbündel in der *Lamina propria* der medialen Seite weisen wie die Riechzellen ebenfalls eine Markierung mit dem OMP-Antikörper auf. Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren liegen nicht vor. Ebenso kann den unterschiedlichen Altersstufen kein bestimmtes Expressionsmuster zugeordnet werden.

Innerhalb des Riechepithels sind die OMP-positiven Riechzellen solitär oder in Gruppen angeordnet (Abb. 26). Die OMP-Markierung erfolgt zytoplasmatisch und besonders bei den stark gefärbten Riechzellen lässt sich der Dendrit sehr gut bis zur Epitheloberfläche verfolgen. Er endet nach einer feinen Verbreiterung mit der für Riechzellen charakteristischen Auftreibung, dem „dendritic knob“ (Abb. 27).

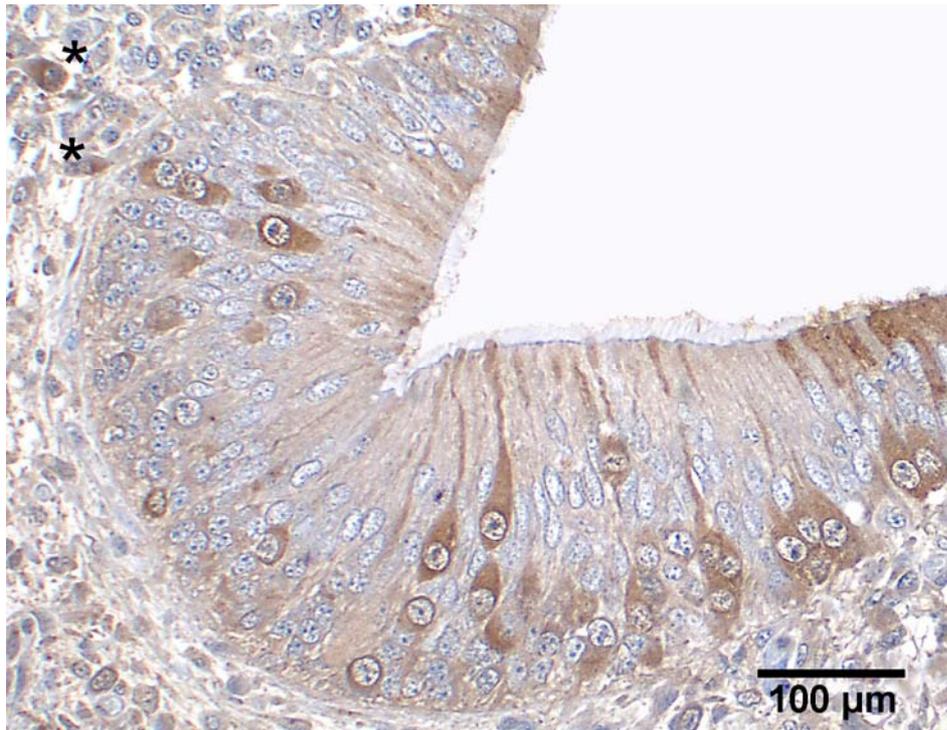


Abb. 26: Riechepithel eines 7 Wochen alten Ferkels. Der OMP-Antikörper markiert spezifisch die Riechzellen des Epithels. Zwei Riechzellen außerhalb des Epithels in der *Lamina propria* (*) zeigen ebenfalls eine positive Reaktion.

Im Gegensatz zu den stets OMP-positiven Nervenfaserbündeln sind die Axone im basalen Epithelsegment nicht immer markiert. Riechzellen ohne OMP-Markierung sind alters- und lokalisationsunabhängig im Riechepithel aufzufinden.

In dem bereits bei der Histomorphologie erwähnten, bedeutend höheren Epithel an den Umschlagspunkten einiger jüngerer Tiere liegen teilweise bis zu 15 Reihen von Riechzellen übereinander. Auffällig ist, dass in diesen Randbereichen etwa 40 Prozent der Riechzellen eine starke zytoplasmatische OMP-Expression aufweisen, während 60 Prozent der Riechzellen nur schwach oder gar nicht OMP-markiert sind.

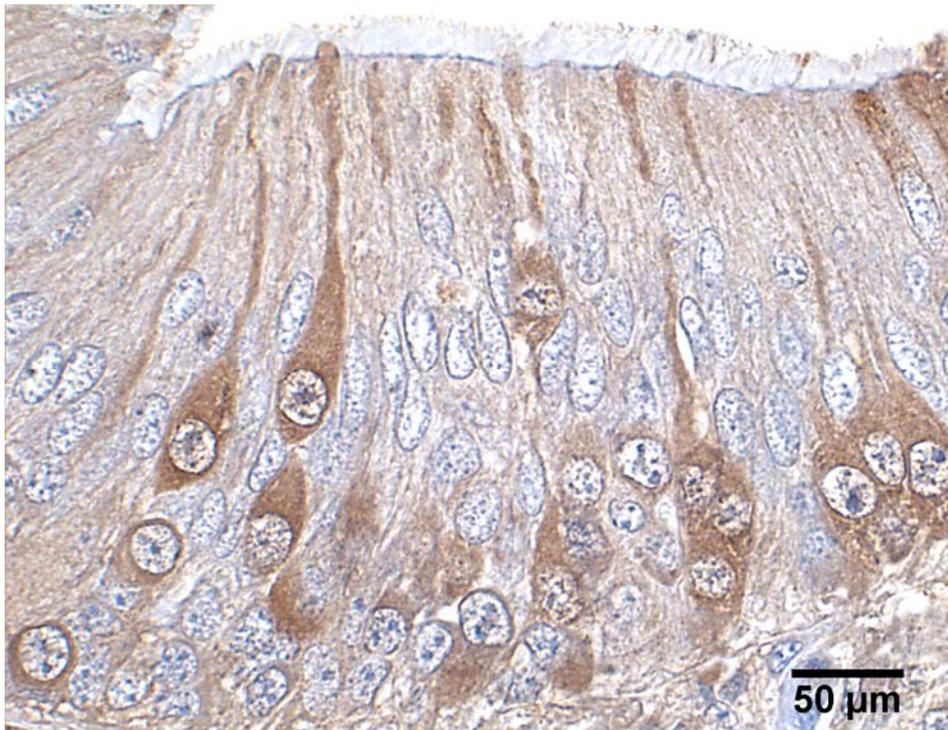


Abb. 27: Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 26. Das Zytoplasma der Riechzellen erscheint deutlich markiert, der Dendrit lässt sich bis zur Epitheloberfläche verfolgen und endet dort mit der für Riechzellen typischen Auftreibung, dem „dendritic knob“.

In der Lichtmikroskopie sind bei Tieren bis zu einem Alter von 10 Monaten Zellen außerhalb des Riechepithels aufzufinden, die starke Ähnlichkeit mit Riechzellen aufweisen. Diese Zellen lassen sich durch den OMP-Antikörper eindeutig und intensiv markieren (Abb. 26). Sie weisen den großen, runden Kern auf, wie er für Nervenzellen typisch ist, und haben ein oval geformtes Perykaryon. Teilweise befinden sich die Zellen nahe der Basalmembran oder liegen ihr sogar an. In diesen Bereichen ist die Basalmembran durchbrochen. Treten die Zellen weiter unterhalb der Basalmembran innerhalb der *Lamina propria* auf, ist die Basalmembran ohne Durchbrechung dargestellt. Häufig weisen die Zellen in der *Lamina propria* eine unmittelbare Nähe zu einem Axon auf, das dann ebenfalls durch den OMP-Antikörper markiert ist.

Ganz anders tritt die Markierung mit dem OMP-Antikörper im Riechepithel der *Regio olfactoria* in Erscheinung (Abb. 28). Hier findet man regelmäßig eine Lage von Riechzellen,

im Durchschnitt zwei bis drei Reihen, die keine oder selten eine schwache Färbung aufweisen. Oberhalb dieser basalen Riechzellage befindet sich die apikale Lage von Riechzellen mit durchschnittlich drei bis vier Kernreihen übereinander. Diese Riechzellen haben eine starke zytoplasmatische OMP-Expression.

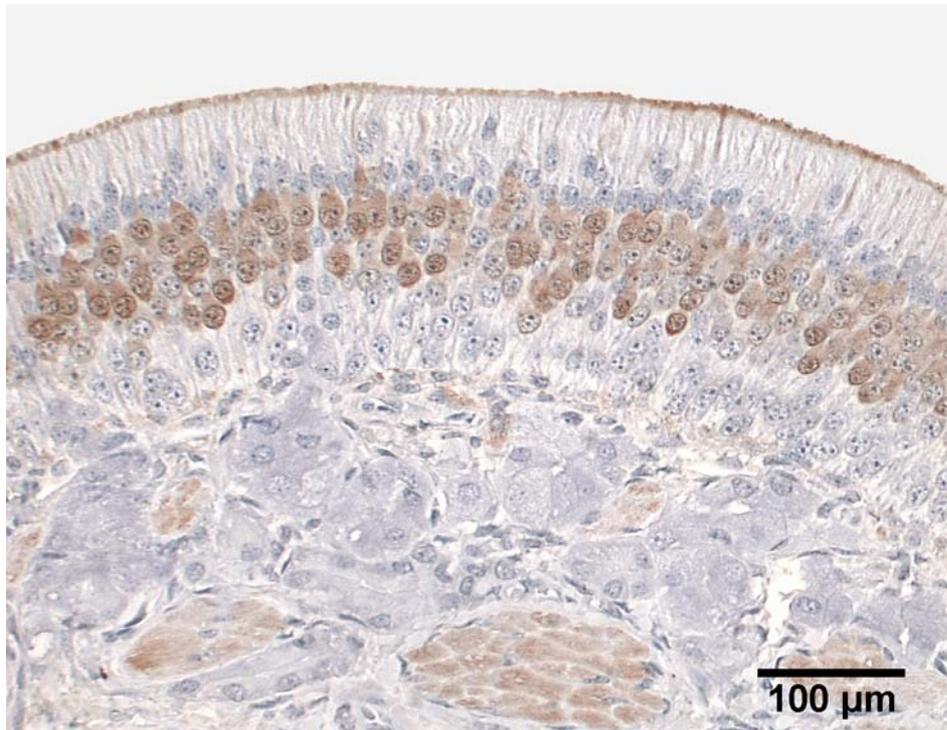


Abb. 28: Riechepithel der *Regio olfactoria* eines 4 Monate alten Schweins. Einige unmarkierte Riechzellen sind oberhalb der Basalmembran zu finden, an die sich die Lage OMP-markierter Riechzellen anschließt. Apikal befindet sich eine dünne Schicht mit Stützzellen. Nervenfasern in der *Lamina propria* zeigen ebenfalls eine positive Reaktion.

Im Gegensatz zum VNO zeigen die Dendriten hier nur eine dezente OMP-Markierung. Dem Riechepithel des VNO entsprechend, sind die Basalzellen unmarkiert. Die Nervenfaserbündel außerhalb des Riechepithels sind entsprechend denen des VNO regelmäßig angefärbt. Der Ziliensaum an der Epitheloberfläche zeigt ebenfalls eine positive Reaktion.

4.4.3 Villin

Das aktin-bindende Protein Villin wird in den Mikrovilli der Riechzellen des VNO (Abb. 29) in altersabhängiger Weise exprimiert. Bei juvenilen Tieren ist die Färbung der Mikrovilli-Büschel in vielen Abschnitten deutlich intensiver als bei adulten Tieren. Gelegentlich ist das Perikaryon einer Riechzelle markiert. An der Epitheloberfläche treten die intensiv gefärbten Mikrovilli-Büschel der Riechzellen deutlich in Erscheinung (Abb. 29). Bei dem entsprechenden Anschnitt der Riechzelle ist die typische dendritische Auftreibung zu erkennen, von der aus sich die Mikrovilli Richtung Lumen erstrecken (Abb. 29, Insert). Im Gegensatz zu den Mikrovilli der Riechzellen stellen sich die langen Mikrovilli der Stützzellen vollständig unmarkiert dar. Teilweise überragen sie die kurzen Mikrovilli der Riechzellen um mehr als die doppelte Länge.

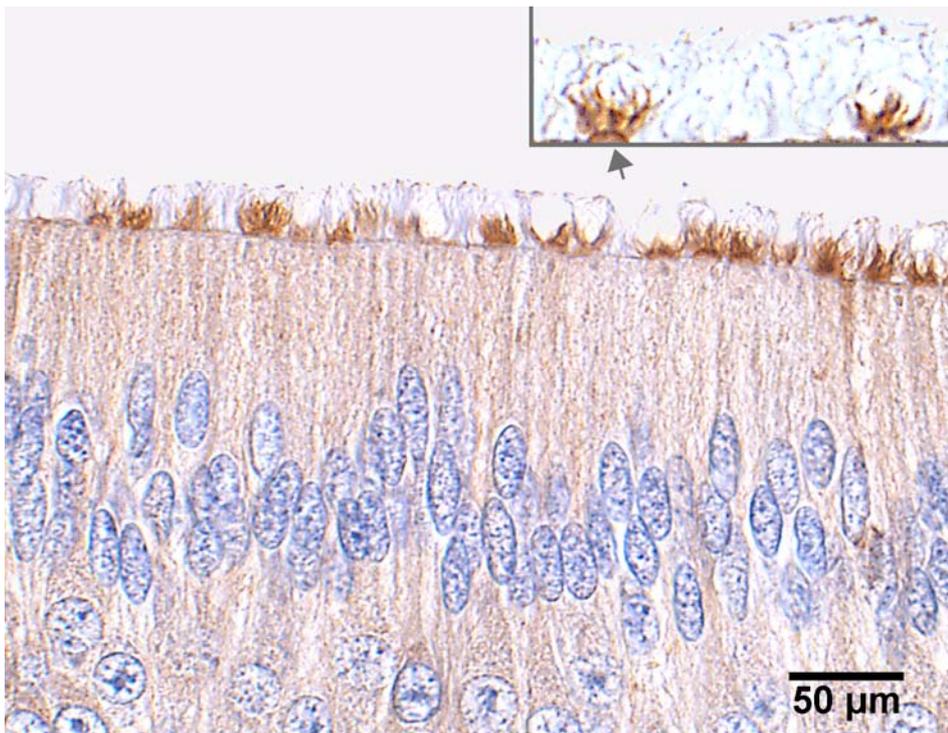


Abb. 29: Riechepithel eines vier Monate alten Schweins. Die Mikrovilli der Riechzellen weisen deutliche Villinexpression auf, während sich die Stützzellen des Epithels völlig unmarkiert darstellen. Insert: Ausschnittsvergrößerung der Mikrovilli. (→) dendritische Auftreibung.

4.5 Glykohistochemische Ergebnisse

Zur selektiven Darstellung der Riechzellen wurden die zehn FITC-markierten Lektine UEA I, PNA, MPA, DBA, WGA, Con A, SBA, BS I, BPA und GS II eingesetzt. Dabei stellte sich PNA als spezifischer Marker der Riechzellen des VNO heraus (Abb. 30).

Das Riechepithel des VNO besitzt für die Hälfte der untersuchten Lektine Bindungsstellen, während das respiratorische Epithel nur bei zwei Lektinen keine Bindungsstellen aufweist. Innerhalb des Riechepithels ist die einzige, deutlich positive Reaktion, die ausschließlich an den Riechzellen stattfindet, bei dem Lektin PNA zu verzeichnen. Es hat zahlreiche Bindungsstellen innerhalb des Zytoplasmas und markiert den Dendriten sowie schwach auch Axon und Nervenfaserbündel innerhalb der *Lamina propria*. Die Stützzellen des Riechepithels färben sich mit PNA nicht an (Abb. 30).

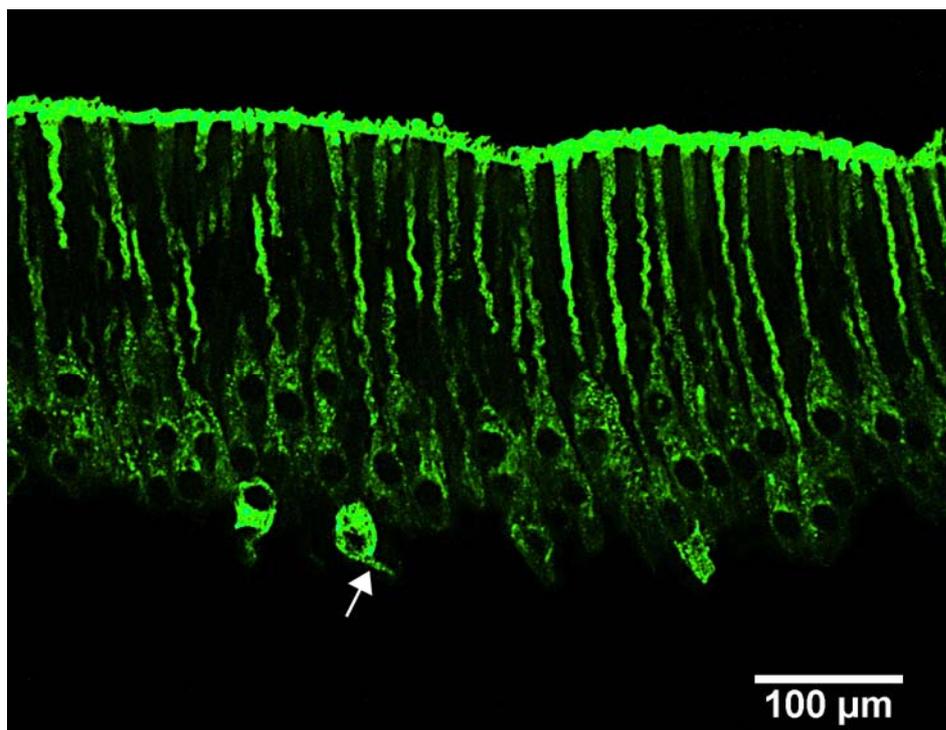


Abb. 30: Riechepithel eines 2 Jahre alten weiblichen Tieres. Die Riechzellen weisen Bindungsstellen für PNA auf, bei den Stützzellen kann keine Reaktion nachgewiesen werden. Drei stark fluoreszierende Riechzellen sind basal lokalisiert. (→) Axon.

Mit einer Ausnahme sind bei allen Lektinen die Kerne der Zellen des Riechepithels sowie die Kerne der Zellen innerhalb der *Lamina propria* nicht FITC-markiert. MPA ist das einzige Lektin, bei dem an den Kernen der Riechzellen Bindungsstellen vorhanden sind. Es stellt sich mit intensiver Fluoreszenz des Nukleolus und der Granula innerhalb des Kerns dar.

Bei vier Lektinen fallen Bindungen an den Riechzellen auf, die nahe der Basalmembran lokalisiert sind oder ihr direkt aufliegen. PNA zeigt eine stark positive (Abb. 30), MPA eine deutlich positive Reaktion dieser Zellen, während sich bei WGA und BPA die Bindungen schwächer darstellen. Die Lektinbindung betrifft das Zytoplasma der Zelle und zeigt sich teilweise in Form deutlich markierter Granula. Der Kern dieser direkt an der Basalmembran lokalisierten Riechzellen ist bei allen vier Lektinen ohne Bindungsstellen. Die großen und oval geformten Zellen weisen basal ein zum Teil ebenfalls granuliert erscheinendes Axon auf, das sich in Richtung der *Lamina propria* erstreckt (Abb. 30).

In der *Lamina propria* des Riechepithels lassen sich entweder direkt unterhalb der Basalmembran oder sogar frei innerhalb der *Lamina propria* Riechzellen darstellen, die eindeutig Bindungsstellen für die Lektine Con A, MPA und PNA aufweisen. Das Zytoplasma dieser Zellen ist bei PNA und MPA granuliert. Häufig sind sie in der Nähe von Axonen vorzufinden, die sich partiell ebenfalls granuliert darstellen.

Bei acht der zehn getesteten Lektine weisen die Bowman-Drüsen innerhalb der *Lamina propria* Bindungsstellen auf. Etwa zwei Drittel der positiv reagierenden Drüsen zeigen eine intensive Fluoreszenz. Entsprechend der Markierung der Drüsen weist auch der die Mikrovilli umgebende Mukus eine positive Reaktion auf (Abb. 30). Nervenfaserbündel innerhalb der *Lamina propria* und die Axone der Riechzellen zeigen bei gut zwei Drittel der Lektine keine positive Reaktion. Die Knorpelspange besitzt, mit zwei Ausnahmen, Bindungsstellen für die Lektine in schwankender Intensität.

Das Bindungsmuster des respiratorischen Epithels zeigt eine auffällige Körnung des Zytoplasmas, das sich teilweise intensiv und grob granuliert, bei anderen Lektinen mit einer feinen Granulierung darstellt. Bei dem Verteilungsmuster der Lektinbindung wird eine Konzentration auf die apikale Hälfte der Zellen deutlich.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über das Verteilungsmuster der einzelnen Lektine innerhalb des Riechepithels.

Tab. 4: Verteilungsmuster der Lektine innerhalb des Riechepithels

Lektin	Stützzelle	Riechzelle	Axon	Dendrit	Nervenfaserbündel	Mukus
UEA I	+	+	+/-	+	+/-	+++
PNA	-	+++	+/-	+	+/-	++
MPA	+/-	+	-	+/-	-	++
DBA	-	-	-	-	-	-
WGA	-	+	+	+/-	+	++
Con A	-	-	-	-	-	+
SBA	-	-	-	-	-	-
BS I	-	-	-	-	-	-
BPA	-	-	-	-	-	+/-
GS II	+/-	+/-	-	-	-	-

Im Gegensatz zum Riechepithel des VNO besitzen die Riechzellen der *Regio olfactoria* keine Bindungsstellen für die getesteten Lektine. Für die Hälfte der Lektine sind an den Drüsen innerhalb der *Lamina propria* Bindungsstellen vorzufinden. Bei MPA, PNA und UEA I ist eine stark positive Fluoreszenz in den Drüsenzellen zu erkennen und in regelmäßigen Abständen zeigt sich ein markierter Drüsenausführungsgang innerhalb des Riechepithels. Entsprechend der Markierung der Drüsen ist auch der Mukus, der den Saum aus Zilien und Mikrovilli umgibt, bei diesen Lektinen mit stark positiver Reaktion.

5 Diskussion

Obwohl das VNO bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen verschiedener Spezies war, ist das Wissen bei unseren Haussäugetieren, insbesondere beim Schwein, gegenwärtig noch lückenhaft. Ziel dieser Arbeit war es daher, mittels rasterelektronenmikroskopischer sowie licht-, immun- und glykohistochemischer Untersuchungen umfassende Detailkenntnisse über das VNO des Schweins zu erlangen. Ergänzend erfolgte zusätzlich eine vergleichende Untersuchung des Riechepithels der *Regio olfactoria* des Schweins. Für diese Studie wurde Probenmaterial von 28 Schweinen unterschiedlicher Altersstufen sowie beider Geschlechter zusammengetragen. Die vorliegende Arbeit ist somit eine der umfangreichsten Untersuchungen, die zum VNO der Haussäugetiere bisher durchgeführt wurde.

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie konnte erstmals beim Schwein aufgezeigt werden, dass topographische Variationen in der epithelialen Auskleidung von Riech- und respiratorischer Schleimhaut bestehen. Bisher ging man davon aus, dass auf der lateralen Seite des VNO respiratorisches Epithel und auf der medialen Seite Riechepithel lokalisiert ist. Die eigenen Untersuchungen zeigen aber deutlich, dass in vielen Fällen das respiratorische Epithel unterschiedlich weit auf die mediale Seite transloziert. Diese morphologische Besonderheit hat mit hoher Wahrscheinlichkeit keine funktionelle Bedeutung, sondern ist vielmehr als normale Variation in der ontogenetischen Ausdifferenzierung der Riechplakode zu betrachten. Weiterhin zeigte sich bei der Mehrzahl der untersuchten Tiere, dass der *Ductus vomeronasalis* zu Beginn nur mit Plattenepithel und nachfolgend mit respiratorischem Epithel ausgekleidet ist. Die Existenz eines Plattenepithels wurde bisher nur beim Nagetier beschrieben (Vaccarezza et al., 1981). Der rostrale Abschnitt des VNO wurde deshalb bisweilen als separater Ausführungsgang angesehen (Halpern, 1987; Menke, 2003). Nach den eigenen Beobachtungen kann der rostrale Abschnitt des *Ductus vomeronasalis* als schützende Übergangszone vor dem sensiblen Bereich der Riechschleimhaut angesehen werden. Hier bestehen Analogien zu anderen Organsystemen im Tierkörper, wie z. B. der Milchdrüse, welche nach außen durch das mehrschichtige Plattenepithel des *Ductus papillaris* charakterisiert ist (Chandler et al., 1969). In der Regel findet der Wechsel von respiratorischem Epithel zum Riechepithel exakt im Umschlagspunkt in der dorsalen bzw. ventralen Kurvatur statt. In den eigenen Untersuchungen konnten beim Schwein, besonders

auf der medialen Seite, epitheliale Übergangszonen dargestellt werden, welche mit Mikrovilli-tragenden Übergangszellen ausgestattet sind. In ähnlicher Weise wurden solche Übergangszonen bereits bei Mäusen beschrieben (Naguro und Breipohl, 1982). Es wird vermutet, dass diese Bereiche spezielle Proliferationszonen darstellen, welche noch wenig-differenzierte Riechzellen produzieren (Farbman und Margolis, 1980; Weiler et al., 1999).

Die verschiedenen Epithelien des VNO des Schweins konnten mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie eindeutig unterschieden werden. Während das respiratorische Epithel von langen, geraden Zilien bedeckt war, wies das Riechepithel ein dichtes Geflecht von feinen und deutlich kürzeren Mikrovilli auf. Sie konnten eindeutig der Population der Stützzellen zugeordnet werden, wodurch die etwas voluminöseren Mikrovilli der Riechzellen vollständig überdeckt werden. Die Unterscheidung und Zuordnung der Mikrovilli wurde immunhistochemisch bestätigt. Eine vergleichbare Beschreibung für die Mikrovilli der Riech- und Stützzellen liegt für Rind und Ratte vor (Adams, 1986; Höfer et al., 2000), während bei der Maus für die Riechzellen deutlich längere Mikrovilli beschrieben wurden als für die Stützzellen (Naguro und Breipohl, 1982). Neben speziesspezifischen Unterschieden können technisch bedingte Schwierigkeiten bei der Auswertung nicht ausgeschlossen werden (Adams, 1986).

Um die eigenen rasterelektronenmikroskopischen Ergebnisse zu bestätigen, wurde der Villin-Antikörper eingesetzt. Mit ihm konnten die Mikrovilli der Riechzellen selektiv markiert werden. Sie stellten sich in Form intensiv gefärbter Büschel dar, an deren Basis bei entsprechendem Anschnitt der Zelle der „dendritic knob“ eindeutig zu erkennen war. Die vollständig unmarkierten Mikrovilli der Stützzellen überragten die Riechzellmikrovilli deutlich. Damit ist eine zweifelsfreie Differenzierung zwischen den Mikrovilli der Riechzellen und den sie umgebenden Stützzellen möglich. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit einer Untersuchung an Ratten, bei denen ebenfalls die kurzen Riechzellmikrovilli durch den Villin-Antikörper markiert werden konnten (Höfer et al., 2000). In dieser Studie wird eine Beteiligung von Villin an der Ausbildung und Stabilisierung der Mikrovilli diskutiert.

Eine weitere Methode, den „dendritic knob“ darzustellen, ist die Markierung der Riechzellen mit dem OMP-Antikörper. Der gewundene Verlauf des OMP-markierten Dendriten konnte bis zur Epitheloberfläche hin verfolgt werden und regelmäßig war an seinem Ende der prominent aufgewölbte „dendritic knob“ zu erkennen. Sowohl die lichtmikroskopischen als auch die immunhistochemischen Ergebnisse zeigten, dass man beim Schwein zweifelsfrei von

einem „dendritic knob“ sprechen kann. Während die Bezeichnung „dendritic knob“ bei den Zilien-tragenden Riechzellen der *Regio olfactoria* üblich ist, ist sie bei den Riechzellen des VNO in der Literatur umstritten. Einige Autoren beschreiben eine ins Lumen ragende Auftreibung am Ende der Dendriten (Ciges et al., 1977; Adams, 1986), andere sprechen beim VNO des Hundes direkt von einem „dendritic knob“ (Dennis et al., 2003). Im Gegensatz dazu wurde bei verschiedenen Nagetieren das gänzliche Fehlen eines „dendritic knob“ als typisches Merkmal der Riechzellen des VNO beschrieben (Mendoza, 1993).

Beim Vergleich des Riechepithels der *Regio olfactoria* mit dem des VNO wurden markante Unterschiede deutlich. Im Gegensatz zu den Mikrovilli-tragenden Riechzellen des VNO war die Oberfläche der Riechzellen der *Regio olfactoria* mit kräftigen, geraden Zilien besetzt. Die Riechzellen hoben sich auf der Epitheloberfläche gut sichtbar hervor und überragten die Mikrovilli der Stützzellen. Dies wird durch eine Vielzahl an Untersuchungen bei verschiedensten Tierarten bestätigt (Morrison und Costanzo, 1989; Menco, 1978, 1980; Nomura et al., 2004). Zwei unterschiedliche Riechzelltypen konnten in der vorliegenden Studie alters- und geschlechtsunabhängig beim Schwein vorgefunden werden und deuten darauf hin, dass es verschiedene Riechzellen mit möglicherweise sogar unterschiedlicher Funktion gibt. Eine Dendritenvariante hatte ein kugeliges Ende und gedrungene Zilien, die andere Variante ein konisches Ende und längere, feinere Zilien. Die erstgenannte Variante wurde bereits beim Meerschweinchen, letztgenannte beim Menschen beschrieben (Fujita et al., 1986; Morrison und Costanzo, 1990).

Im Riechepithel des VNO waren lichtmikroskopisch im Bereich der Basalmembran zwei Typen von Basalzellen vorzufinden. In direktem Kontakt zur Basalmembran fanden sich kleine, kräftig gefärbte Zellen von unregelmäßiger Gestalt, die der Gruppe der horizontalen Basalzellen zuzuordnen sind. Nur wenig oberhalb dieser Zellen waren die größeren, runden Basalzellen lokalisiert, die ein helleres Zytosol aufwiesen. Die auch von anderen Autoren (Graziadei und Graziadei, 1979; Beites et al., 2005) beschriebene Unterteilung in horizontale und runde Basalzellen ist beim Schwein deutlich zu erkennen. In der Literatur werden von verschiedenen Autoren die horizontalen Basalzellen als die Zellen beschrieben, die das Umfeld für die Existenz der rundlichen Basalzellen schaffen. Die rundlichen Basalzellen gelten dagegen als Stammzellen der Riechzellpopulation (Jang et al., 2003; Beites et al., 2005).

Unterstützend für diese These diene der immunhistochemische Einsatz von zwei Proliferationsmarkern (Ki-67 und PCNA), welche beide proliferierende Zellen innerhalb des Riechepithels markieren. Die Markierung mittels PCNA hat sich als bessere Methode herausgestellt. Deshalb wird im Folgenden auf die PCNA-markierten mitotischen Zellen Bezug genommen. Im VNO des Schweins waren Zellteilungsstadien in unterschiedlichen Lokalisationen nachweisbar. Die höchste Anzahl der PCNA-markierten Kerne war im basalen Epithelbereich vorzufinden. Die PCNA-markierten Kerne lagen stets in Gruppen nahe der Basalmembran. Im apikalen Bereich waren nur vereinzelt PCNA-positive Zellen aufzufinden. Es ist bekannt, dass PCNA eine Halbwertszeit von mehr als 20 Stunden hat (Ohta und Ichimura, 2000a). Dadurch können auch Zellen in der G₀-Phase mit PCNA markiert werden und so zu einer höheren Anzahl an proliferierenden Zellen führen. Eine Aussage zu der Anzahl sich teilender Stammzellen kann nicht erfolgen, da eine Differenzierung zwischen den Kernen der Stammzellen und anderen basal lokalisierten Zellkernen mittels der eingesetzten Proliferationsmarker nicht möglich ist. Die Proliferation ist beim Schwein altersabhängig geregelt. Bei juvenilen Tieren war die Teilungsrate im Riechepithel deutlich höher als bei adulten Tieren. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen einer Studie bei Meerschweinchen (Nakamura et al., 1998).

Um Detailkenntnisse über die Riechzellen des VNO und auch der *Regio olfactoria* beim Schwein zu erlangen, wurde ein spezieller Marker für Riechzellen eingesetzt. OMP reagierte mit einem großen Teil der Riechzellen sowohl im Riechepithel des VNO als auch in dem der *Regio olfactoria*.

Die OMP-markierten Riechzellen des VNO waren solitär oder in kleinen Gruppen angeordnet. Sie konnten über die gesamte Epithelhöhe verteilt vorkommen. Am häufigsten wiesen die Riechzellen eine intensive OMP-Expression im Zytoplasma inklusive des Dendriten auf. Es waren jedoch auch immer Riechzellen ohne OMP-Markierung innerhalb des Riechepithels aufzufinden. Im Gegensatz zu der beim Schwein vorhandenen unregelmäßigen Verteilung der OMP-markierten Riechzellen des Riechepithels konnten bei Ratten weiter apikal lokalisierte Riechzellen mit starker zytoplasmatischer OMP-Färbung dargestellt werden und mehr basal lokalisierten Riechzellen, bei denen eine intranukleäre Markierung auftrat. Sie sprechen daher von einer klaren Unterteilung der Riechzellen in einen apikalen und einen basalen Anteil mit unterschiedlicher Anfärbbarkeit (Weiler und Benali, 2005). Ein Expressionsmuster mit zytoplasmatischer und nukleärer OMP-Markierung konnte auch beim Schwein bei einigen Proben aufgefunden werden. Allerdings ist die Aussage einer

nukleären OMP-Expression sehr kritisch zu betrachten. OMP-markierte Riechzellkerne traten ausschließlich bei Proben von Tieren auf, bei denen es durch technisch bedingte Schwierigkeiten bei der Probennahme zu einer verzögerten Fixierung gekommen war. Die Proben, bei denen eine schnelle Fixierung stattgefunden hatte, zeigten keinerlei Hinweis auf eine intranukleäre Reaktion. Dies steht in Einklang mit dem derzeitigen Kenntnisstand einer ausschließlich zytoplasmatischen OMP-Synthese (Breer et al., 1996) und lässt Zweifel an einer tatsächlichen intranukleären OMP-Expression bestehen.

Eine interessante Beobachtung trat beim Schwein im Bereich der dorsalen und ventralen Krümmung auf. An den Umschlagpunkten zum respiratorischen Epithel ließ eine Reihe von jüngeren Tieren eine deutliche Zunahme in der Epithelhöhe mit bis zu fünfzehn übereinanderliegenden Riechzellen erkennen. Wie schon vorher im Riechepithel beobachtet, war auch hier eine unterschiedliche Anfärbbarkeit der Riechzellen mit OMP zu verzeichnen. Vergleichbar zum restlichen Riechepithel wurden intensiv gefärbte Riechzellen sowohl in basalen als auch apikalen Kompartimenten des Epithels in unregelmäßiger Weise vorgefunden. Auch bei der Ratte wurden Erweiterungen des Epithels im Bereich der Umschlagpunkte beschrieben, an die sich eine Zone mit jungen, ausgereiften, stark markierten Riechzellen anschloss (Weiler und Benali, 2005). In starkem Gegensatz zu den Beobachtungen beim Schwein steht allerdings, dass in den verbreiterten Bereichen ausschließlich OMP-unmarkierte Riechzellen vorzufinden waren. Sie stellen einen Pool von jungen unreifen Riechzellen dar, die im Verlauf ihrer Reifung von den Proliferationszonen Richtung Epithelmitte wandern (Weiler et al., 1999; Weiler und Benali, 2005). Die Interpretation der drei Expressionsmuster, unmarkierte Riechzellen seien junge unreife Riechzellen, stark markierte Zellen ausgereifte Riechzellen und schwach markierte Riechzellen seien alternde Riechzellen mit abnehmender OMP-Synthese (Weiler et al., 1999; Halpern und Martinez-Marcos, 2003), kann auch für die Riechzellen beim Schwein angenommen werden. Allerdings weisen die OMP-markierten Riechzellen in den Randbereichen darauf hin, dass sich die Riechzellen beim Schwein bereits dort zu ausgereiften Riechzellen entwickeln.

Eine weitere Besonderheit des VNO konnte sowohl lichtmikroskopisch als auch immunhistochemisch bei Tieren bis zu einem Alter von zehn Monaten innerhalb der *Lamina propria* aufgezeigt werden. Hier traten Riechzellen auf, die sich durch den OMP-Antikörper eindeutig markieren ließen. Da OMP nur von ausgereiften Riechzellen exprimiert wird

(Farbman und Margolis, 1980; Breer et al, 1996), muss es sich bei den Riechzellen in der *Lamina propria* um ausgereifte Riechzellen handeln. In den Bereichen, in denen die Riechzellen in der *Lamina propria* nahe der Basalmembran lokalisiert waren, zeigte sich diese durchbrochen. Das ist ein möglicher Hinweis darauf, dass die Riechzellen aus dem Epithel auswandern. Sehr ähnliche Beobachtungen wurden bei neugeborenen und adulten Nagetieren am Riechepithel der *Regio olfactoria* gemacht (Monti-Graziadei, 1992). Beim Schwein fanden sich OMP-markierte Zellen häufig in direkter Nachbarschaft zu einem Axon, das in diesem Bereich dann ebenfalls eine starke OMP-Expression aufwies. Diese Markierung der Riechzellen inklusive der benachbarten Axone könnte ein Hinweis auf die Beteiligung der Riechzellen am Aussprossen junger Axone sein. Untersuchungen an adulten Mäusen zeigten, dass unter Abwesenheit von OMP die Fähigkeit der Axone, den *Bulbus olfactorius* zu erreichen, stark abnahm (St. John und Key, 2005). Daher wird angenommen, dass OMP an dem Aussprossen neuer Axone beteiligt ist. Möglicherweise begleiten die Riechzellen die aussprossenden Axone in Richtung *Bulbus olfactorius accessorius*. Die unterstützende Funktion beim Aussprossen der Axone wird generell den „olfactory ensheathing cells“ (OEC) zugesprochen. Es stellt sich hier die Frage, ob nicht auswandernde Riechzellen Vorläuferzellen der OEC sein können. Diese These wird dadurch unterstützt, dass bereits während der Ontogenese aus dem Riechepithel auswandernde Zellen als Vorläuferzellen der OEC vermutet werden (Marin-Padilla und Amieva, 1989; Pellier und Astic, 1994). Weiterer Klärungsbedarf besteht für die Beobachtung, dass die ausgereiften Riechzellen innerhalb der *Lamina propria* nur bis zu einem Alter von 10 Monaten auftraten. Möglicherweise wird in der juvenilen Phase des Tieres eine besondere Unterstützung der Axone benötigt.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit bildete der Nachweis von Lektinbindungsstellen an den Riechzellen des VNO und der *Regio olfactoria*. Dazu wurden zehn verschiedene, mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelte Lektine gewählt. Besonderes Augenmerk wurde auf die Möglichkeit einer spezifischen Markierung der Riechzellen des VNO gelegt.

Als einziges Lektin wies PNA eine Vielzahl an Bindungsstellen im Zytoplasma der Riechzellen des VNO auf, während die Stützzellen des Epithels vollständig unmarkiert blieben. Da die Riechzellen der *Regio olfactoria* keine Bindungsstellen für PNA hatten, kann PNA beim Schwein als spezifischer Marker für die Riechzellen des VNO betrachtet werden. Zwar wurden auch an verschiedenen Nagetieren PNA-Bindungsstellen nachgewiesen, allerdings zeigten hier sowohl die Riechzellen und teilweise die Stützzellen des VNO als auch die Riechzellen der *Regio olfactoria* eine positive Reaktion (Lundh et al., 1989; Mendoza und

Kühnel, 1991). Im Gegensatz dazu besaßen die Riechzellen des Pferdes keine Bindungsstellen für PNA (Lee et al., 2003). Diese unterschiedlichen Bindungsmuster sind ein deutlicher Hinweis für speziesspezifische Membran-Zuckerstrukturen. Generell wird den PNA-bindenden Proteinen ein regulierender Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Zellen zugesprochen (Alber et al., 1994; Niehaus und Trotter, 1997). Für Gliazellen wurde gezeigt, dass die PNA-Bindung eine Signaltransduktions-Kaskade aktiviert, welche die Proliferation von Vorläuferzellen induziert (Niehaus und Trotter, 1997).

Die eigenen Untersuchungen zeigten Riechzellen außerhalb des Riechepithels, die eine intensive Fluoreszenz von PNA aufwiesen. Häufig waren diese Zellen in direkter Nachbarschaft zu einem Axon aufzufinden, bei dem dann ebenfalls eine deutliche Fluoreszenz nachzuweisen war. Dieses Bindungsmuster von PNA zeigt eine starke Ähnlichkeit zu dem Expressionsmuster von OMP im VNO des Schweins, bei dem Riechzellen und benachbarte Axone durch den OMP-Antikörper markiert werden konnten. Es liegt die Vermutung nahe, dass PNA im VNO des Schweins an der Axonbündelung beteiligt ist. In früheren Arbeiten wurde bereits für PNA ein Zusammenhang in der Expression von Bindungsstellen und dem Grad der Axonbündelung festgestellt (Gong und Shipley, 1996). Möglicherweise sind PNA- oder andere Lektin-bindende Glykokonjugate verantwortlich oder beteiligt an der Bündelung der Axone (Ichikawa et al., 1994; Plendl und Sinowatz, 1998).

Auffällig war die Bindung der vier Lektine PNA, MPA, BPA und WGA an Riechzellen des VNO, die nahe der Basalmembran lokalisiert waren oder ihr direkt auflagern. PNA und MPA wiesen dabei eine ausgeprägte zytoplasmatische Fluoreszenz auf. Teilweise ließ sich deutlich ein Axon an der Basis der Riechzellen erkennen. Es könnte sich hier um junge, hochaktive Riechzellen mit einem hohen Anteil an Ribonukleinsäure handeln, die im Begriff sind, Axon und Dendrit auszubilden. Vorwiegend Lektine aus der N-Azetylgalaktosamin / Galaktose Gruppe hatten somit eine deutliche Affinität zu den basal lokalisierten Riechzellen. Ausgenommen davon war das Lektin BS I, welches im gesamten Riechepithel keine Bindungsstellen hatte. Spezielle Kohlenhydrat-Protein Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbildung und Variationen an den Kohlenstoffatomen C2 oder C3 sind wichtige Einflussfaktoren, die entscheidend an der Bindungseigenschaft eines Lektins beteiligt sind (Goldstein und Poretz, 1986).

Bei den bisher in der Literatur erzielten Ergebnissen für Lektinbindungsmuster fällt eine außergewöhnlich starke Variation innerhalb der Tierarten auf. Ein Beispiel hierfür ist DBA. In den eigenen Untersuchungen beim Schwein wiesen weder die Riechzellen des VNO noch die der *Regio olfactoria* Bindungsstellen auf. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen

einer anderen Studie (Salazar et al., 2000). Im Gegensatz dazu konnte DBA bei Mäusen, Schafen und Pferden eindeutig als Marker für Riechzellen des VNO und der *Regio olfactoria* identifiziert werden (Plendl und Schmahl, 1988a,b; Salazar et al., 2000; Lee et al., 2003).

Auch wenn bezüglich der Bindungseigenschaften der Lektine noch viele Fragen offen bleiben, wurden für das Schwein wichtige neue Aspekte aufgezeigt. Beim Schwein kann PNA als spezifischer Marker der Riechzellen des VNO eingesetzt werden. Weiter konnte für eine Gruppe von Lektinen eine ausgeprägte Affinität zu Riechzellen nahe der Basalmembran aufgezeigt werden, welche sich offensichtlich in der Ausbildung von Axon und Dendrit befinden. Ergänzend zu den immunhistochemischen Ergebnissen mit OMP, konnte mittels PNA das Vorhandensein von Riechzellen innerhalb der *Lamina propria* bestätigt werden.

6 Zusammenfassung

Untersuchungen zum Feinbau des Vomeronasalorgans beim Schwein - eine immunhistochemische und rasterelektronenmikroskopische Studie

In der vorliegenden Arbeit wurde der Feinbau des Vomeronasalorgans (VNO) beim Schwein mittels rasterelektronenmikroskopischer, immun- und glykohistochemischer Untersuchungen analysiert. Hierzu wurden 28 männliche und weibliche Tiere unterschiedlicher Altersstufen herangezogen. Ergänzend zur detaillierten Darstellung des VNO erfolgte eine vergleichende Untersuchung des Riechepithels von VNO und *Regio olfactoria*.

Die topographische Verteilung der verschiedenen Epithelformen des VNO ergab eine charakteristische Untergliederung des *Ductus vomeronasalis* in drei Segmente. Während das rostrale Segment eine Übergangszone aus mehrschichtigem Plattenepithel aufweist, liegt die organspezifische Epithelauskleidung im medialen Bereich in zwei Varianten vor. Vielfach erfolgt der Epithelwechsel exakt in der dorsalen und ventralen Krümmung, so dass die mediale Seite mit Riechepithel und die laterale Seite mit respiratorischem Epithel ausgekleidet ist. Bei der zweiten Variante nimmt das respiratorische Epithel noch etwa ein Drittel der medialen Seite ein. Im schmal zulaufenden kaudalen Segment tritt eine Vermischung der beiden Epithelien auf.

Immunhistochemisch konnten die Riechzellen des VNO und die der *Regio olfactoria* mittels eines Antikörpers gegen das olfactory marker protein (OMP) markiert werden. In beiden Riechepithelien sind sowohl intensiv OMP-markierte als auch unmarkierte Riechzellen vorzufinden. Im VNO liegen Riechzellen mit und ohne OMP-Expression in unregelmäßiger Verteilung im Riechepithel vor, das heißt intensiv OMP-markierte Zellen sind sowohl basal als auch weiter apikal vorzufinden. Ganz im Gegensatz dazu weisen die Riechzellen der *Regio olfactoria* eine klare Trennung in basal lokalisierte Riechzellen ohne OMP-Expression und apikal lokalisierte Riechzellen mit intensiver OMP-Markierung auf. Dies bedeutet, dass die Differenzierung der Riechzellen im VNO unabhängig von der Lokalisation stattfindet. Neben dem Perikaryon zeigt der Dendrit eine intensive OMP-Expression, wodurch sich die charakteristische Auftreibung der Riechzellen, der „dendritic knob“, eindeutig darstellen lässt. Dies konnte durch den Einsatz eines Villin-Antikörpers bestätigt werden, der nicht nur den „dendritic knob“ aufzeigt, sondern insbesondere die Mikrovilli der Riechzellen selektiv

markiert. Dadurch wird die rasterelektronenmikroskopisch dargestellte Überlagerung der Riechzellmikrovilli durch die Mikrovilli der Stützzellen immunhistochemisch bestätigt.

Bei den glykohistochemischen Untersuchungen wies das Lektin PNA eine ausgeprägte Spezifität für die Riechzellen des VNO auf. Während die Riechzellen im VNO zahlreiche Bindungsstellen zeigen, bleiben die Stützzellen ohne Fluoreszenz. Im Gegensatz dazu lassen sich die Riechzellen der *Regio olfactoria* durch PNA nicht markieren. PNA kann somit als spezifischer Marker der Riechzellen des VNO beim Schwein angesehen werden.

Aufgrund der lebenslangen Regenerationsfähigkeit der Riechzellen ist innerhalb des Riechepithels eine hohe mitotische Aktivität vorhanden. Durch die Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA können im basalen Epithelbereich eine hohe Anzahl proliferierender Zellen nachgewiesen werden, wohingegen apikal nur vereinzelt sich teilende Zellen vorkommen. Das verstärkte Auftreten proliferierender Zellen bei juvenilen Tieren lässt auf eine altersabhängige Zellteilungsrate schließen.

Eine Besonderheit dieser Arbeit war die lichtmikroskopische Darstellung von Riechzellen außerhalb des Riechepithels des VNO. Die Identifikation dieser in der *Lamina propria* lokalisierten Zellen erfolgte anhand der immunhistochemischen Markierung durch das riechzellspezifische OMP. In ähnlicher Weise konnten an diesen Riechzellen zahlreiche Bindungsstellen für das Lektin PNA nachgewiesen werden. Auffällig bei diesen Riechzellen war die häufige direkte Nachbarschaft zu den Axonen, was auf eine Beteiligung der Riechzellen am Aussprossen der Axone hinweist.

7 Summary

Analysis of the morphology of the pig's vomeronasal organ – an immunohistochemical and scanning electron microscopic study

The purpose of the present study was to analyse the fine structure of the pig's vomeronasal organ (VNO) using scanning electron microscopy as well as immuno- and glycohistochemistry. 28 male and female animals of different ages were examined in this study. In addition to the detailed description of the VNO a comparative investigation of the olfactory epithelium of the VNO and *regio olfactoria* was carried out.

The topographic distribution of the different epithelium types of the VNO revealed a characteristic subdivision of the *ductus vomeronasalis* into three segments. While the rostral segment shows a transitional zone of squamous epithelium, the organ-specific epithelial lining within the medial range is regularly present in two variants. Often the change of the epithelium takes place exactly in the dorsal and ventral curvature so the medial side is lined with olfactory epithelium and the lateral side with respiratory epithelium. Within the second variant the respiratory epithelium still takes a third of the medial side and in the caudal segment a mixture of the two types of epithelium occurs.

Immunohistochemically olfactory neurons of both VNO and *regio olfactoria* could be selectively labelled by an antibody against the olfactory marker protein (OMP). In the sensory epithelium of both intensely labelled olfactory neurons as well as non-labelled neurons are found. In the VNO olfactory neurons with and without OMP-expression are present in an irregular distribution, which means intensely stained neurons are located in the basal and in the apical range. In complete contrast to that, the neurons of the *Regio olfactoria* show a clear separation in basally located neurons that miss OMP-staining and more apical neurons with an intense OMP-expression. This means that the differentiation of the olfactory neurons of the VNO occurs independently from their localization. Moreover the dendrit also shows an intense expression of OMP by which the characteristic dendritic knob can clearly be shown. This could be confirmed by an antibody against the actin-binding protein villin which labels not only the dendritic knob but also the microvilli of the olfactory neurons of the VNO. Thus immunohistochemically it is verified that the microvilli of the supporting cells overlay the microvilli of the olfactory neurons as seen in scanning electron microscopy.

The glykohistochemical study clearly shows that the lectin PNA exhibited a pronounced specificity for the olfactory neurons of the VNO. They show a concentration of numerous binding sites whereas fluorescence of the supporting cells is absent. In contrast the olfactory neurons of the *regio olfactoria* have no binding sites for PNA. Therefore PNA can be regarded as a specific marker for the olfactory neurons of the VNO.

Lifelong regeneration of the olfactory neurons reveals a distinct mitotic activity in olfactory epithelium. In the basal compartment of the porcine vomeronasal sensory epithelium a large number of proliferating cells can be detected by the use of the two proliferation markers Ki-67 and PCNA. Apical only a few proliferating cells are seen. The enhanced occurrence of proliferating cells in juvenile animals suggests an age-dependent rate of cell division.

The present study revealed olfactory neurons outside the sensory epithelium of the VNO. These cells, located in the *lamina propria*, were identified by labeling with the OMP antibody. In a similar way numerous binding sites for PNA could be demonstrated at these cells. Often they show a close proximity to the axons of the olfactory neurons. Thus it is presumed that they may be involved in axon guiding.

8 Verzeichnisse

8.1 Literaturverzeichnis

Adams D.R. (1986)

The bovine vomeronasal organ.
Arch Histol Jpn, 49(2): 211-25

Adams D.R. (1992)

Fine Structure of the vomeronasal and septal olfactory epithelia and of glandular structures.
Microsc Res Tech, 23(1): 86-97

Adams D.R., Wiekamp M.D. (1984)

The canine vomeronasal organ.
J Anat, 138(4): 771-87

Alber R., Sporns O., Weikert T., Willbold E., Layer P.G. (1994)

Cholinesterases and peanut agglutinin binding related to cell proliferation and axonal growth in embryonic chick limbs.
Anat Embryol (Berl), 190(5): 429-38

Arpin M., Pringault E., Finidori J., Garcia A., Jeltsch J.M., Vandekerckhove J., Louvard D. (1988)

Sequence of human villin: a large duplicated domain homologous with other actin-severing proteins and a unique small carboxy-terminal domain related to villin specificity.
J Cell Biol, 107(5): 1759-66

Asan E., Drenckhahn D. (2005)

Immunocytochemical characterization of two types of microvillar cells in rodent olfactory epithelium.
Histochem Cell Biol, 123: 157-68

Astic L., Saucier D., Holley A. (1987)

Topographical relationships between olfactory receptor cells and glomerular foci in the rat olfactory bulb.
Brain Res, 424(1): 144-52

Baglioni C. (1992)

Mechanisms of cytotoxicity, cytolysis, and growths stimulation by TNF.
Aus: Beutler B., (edt): Tumor necrosis factors: the molecules and their emerging role in medicine.
Raven Press, New York: 425-38

- Bakker T.J.** (1939)
Het orgaan van Jacobson bij onze huisdieren.
Diss med vet, Utrecht
- Balmer C.W., LaMantia A.S.** (2005)
Noses and neurons: induction, morphogenesis, and neuronal differentiation in the peripheral olfactory pathway.
Dev Dyn, 234(3): 464-81
- Bazari W.L., Matsudaira P., Wallek M., Smeal T., Jakes R., Ahmed Y.** (1988)
Villin sequence and peptide map identify six homologous domains.
Proc Natl Acad Sci U S A, 85(14): 4986-90
- Beites C.L., Kawauchi S., Crocker C.E., Calof A.L.** (2005)
Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium.
Exp Cell Res, 306(2): 309-16
- Biasi E., Silvotti L., Tirindelli R.** (2001)
Pheromone detection in rodents.
Neuroreport, 12(14): A81-4
- Bigiani A., Mucignat-Caretta C., Montani G., Tirindelli R.** (2005)
Pheromone reception in mammals.
Rev Physiol Biochem Pharmacol, 154: 1-35
- Blonski K., Milde-Langosch K., Bamberger A.M., Osterholz T., Utler C., Berger J., Löning T., Schumacher U.** (2007)
Ulex europeus agglutinin-I binding as a potential prognostic marker in ovarian cancer.
Anticancer Res, 27(4C): 2785-90
- Boyd J.G., Doucette R., Kawaja M.D.** (2005)
Defining the role of olfactory ensheathing cells in facilitating axon remyelination following damage to the spinal cord.
FASEB J, 19(7): 694-703
- Bravo R., Macdonald-Bravo H.** (1985)
Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication.
EMBO J, 4(3): 655-61
- Breer H.** (1994)
Signal recognition and chemo-electrical transduction in olfaction.
Biosens Bioelectron, 9(9-10): 625-32
- Breer H., Boekhoff I., Tareilus E.** (1990)
Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction.
Nature, 345(6270): 65-8

- Breer H., Wanner I., Strotmann J. (1996)**
Molecular genetics of mammalian olfaction.
Behav Genet, 26(3): 209-19
- Breipohl W., Bhatnagar K.P., Mendoza A.S. (1979)**
Fine structure of the receptor-free epithelium in the vomeronasal organ of the rat.
Cell Tissue Res, 200: 383-95
- Brennan P.A. (2001)**
The vomeronasal system.
Cell Mol Life Sci, 58: 546-55
- Bretscher A., Weber K. (1979)**
Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus.
Proc Natl Acad Sci U S A, 76(5): 2321-5
- Brown J.C., Hunt R.C. (1978)**
Lectins.
Int Rev Cytol, 52: 277-349
- Brown D.C., Gatter K.C. (1990)**
Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology.
Histopathology, 17(6): 489-503
- Buck L., Axel R. (1991)**
A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition.
Cell, 65(1): 175-87
- Calof A.L., Chikaraishi D.M. (1989)**
Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor in vitro.
Neuron, 3(1): 115-27
- Calof A.L., Hagiwara N., Holcomb J.D., Mumm J.S., Shou J. (1996)**
Neurogenesis and cell death in olfactory epithelium.
J Neurobiol, 30(1): 67-81
- Calof A.L., Bonnin A., Crocker C., Kawauchi S., Murray R.C., Shou J., Wu H.H. (2002)**
Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage.
Microsc Res Tech, 58(3): 176-88
- Celis J.E., Celis A. (1985)**
Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase.
Proc Natl Acad Sci U S A, 82(10): 3262-6
- Chandler R.L., Lepper A.W.D., Wilcox J. (1969)**
Ultrastructural observations on the bovine teat duct.
J Comp Path, 79: 315-19

- Chehrehasa F., St John J., Key B. (2005)**
The sorting behaviour of olfactory and vomeronasal axons during regeneration.
J Mol Histol, 36(6-7): 427-36
- Chehrehasa F., Key B., St John J.A. (2007)**
The shape of the olfactory bulb influences axon targeting.
Brain Res, 1169: 17-23
- Ciges M., Labella T., Gayoso M., Sanchez G. (1977)**
Ultrastructure of the organ of Jacobson and comparative study with olfactory mucosa.
Acta Otolaryngol, 83(1-2): 47-58
- Cohn B.A. (1994)**
In search of human skin pheromones.
Arch Dermatol, 130(8): 1048-51
- Costanzo R.M. (1991)**
Regeneration of olfactory receptor cells.
Ciba Found Symp, 160: 233-42
- Cowan C.M., Roskams A.J. (2002)**
Apoptosis in the mature and developing olfactory neuroepithelium.
Microsc Res Tech, 58(3): 204-15
- Cuschieri A., Bannister L.H. (1975a)**
The development of the olfactory mucosa in the mouse: light microscopy.
J Anat, 119(2): 277-86
- Cuschieri A., Bannister L.H. (1975b)**
The development of the olfactory mucosa in the mouse: electron microscopy.
J Anat, 119(3): 471-98
- Damjanov I. (1987)**
Lectin cytochemistry and histochemistry.
Lab Invest, 57(1): 5-20
- Dennis J.C., Allgier J.G., Desouza L.S., Eward W.C., Morrison E.E. (2003)**
Immunohistochemistry of the canine vomeronasal organ.
J Anat, 203(3): 329-38
- Dulac C., Axel R. (1995)**
A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals.
Cell, 83(2): 195-206
- Ellenberger und Baum (1943)**
Aus: *Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere*.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-NewYork, 18. Auflage: 464-469

- Endl E., Gerdes J. (2000)**
The Ki-67 Protein: Fascinating Forms and an Unknown Function.
Exp Cell Res, 257: 231–37
- Farbman A.I., Margolis F.L. (1980)**
Olfactory Marker Protein during Ontogeny: Immunohistochemical Localization.
Dev Biol, 74(1): 205-15
- Farbman A.I., Squinto L.M. (1985)**
Early development of olfactory receptor cell axons.
Brain Res, 351(2): 205-13
- Farbman A.I., Buchholz J.A., Walters E., Margolis F.L. (1998)**
Does Olfactory Marker Protein Participate in Olfactory Neurogenesis?
Ann N Y Acad Sci, 855: 248-51
- Fieni F., Ghiaroni V., Tirindelli R., Pietra P., Bigiani A. (2003)**
Apical and basal neurones isolated from the mouse vomeronasal organ differ for voltage-dependent currents.
J Physiol, 552(2): 425-36
- Filogamo G., Robecchi M.G. (1969)**
Neuroblasts in the olfactory pits in mammals.
Acta Anat Suppl (Basel), 56: 182-7
- Friederich E., Vancompernelle K., Louvard D., Vandekerckhove J. (1999)**
Villin function in the organization of the actin cytoskeleton. Correlation of in vivo effects to its biochemical activities in vitro.
J Biol Chem, 274(38): 26751-60
- Fujita T., Tanaka K., Tokunaga J. (1986)**
Aus: Zellen und Gewebe. Ein REM-Atlas für Mediziner und Biologen.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart New York: 196-8
- Furlong R.F., Graham A. (2005)**
Vertebrate neurogenin evolution: long-term maintenance of redundant duplicates.
Dev Genes Evol, 215(12): 639-44
- Gabius H.J., Rüdiger H., Uhlenbruck G. (1988)**
Lektine.
Spektrum der Wissenschaft, 11: 50-60
- Gabius H.J., Gabius S. (1992)**
Angewandte Lektinforschung.
Biologie in unserer Zeit, 22(6): 330-35
- Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wacker H.H., Schwab U., Stein H. (1984)**
Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.
J Immunol, 133(4): 1710-5

-
- Getchell M.L., Getchell T.V. (1992)**
Fine structural aspects of secretion and extrinsic innervation in the olfactory mucosa.
Microsc Res Tech, 23(2): 111-27
- Getz W.M. (1999)**
A kinetic model of the transient phase in the response of olfactory receptor neurons.
Chem Senses, 24(5): 497-508
- Ghetie V. (1941)**
Die Lufthöhlen des Schweinekopfes.
Anat Anz, 92: 169-80
- Gogos J.A., Osborne J., Nemes A., Mendelsohn M., Axel R. (2000)**
Genetic ablation and restoration of the olfactory topographic map.
Cell, 103(4): 609-20
- Goldstein I.J., Poretz R.D. (1986)**
Isolation, Physicochemical Characterization, and Carbohydrate-Binding Specificity of Lectins.
Aus: Liener I.E., Sharon N., Goldstein I.J. (edt): *The Lectins. Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine.*
Academic Press, Orlando New York London: 35-244
- Gong Q., Shipley M.T. (1996)**
Expression of extracellular matrix molecules and cell surface molecules in the olfactory nerve pathway during early development.
J Comp Neurol, 366(1): 1-14
- Graziadei P.P., Graziadei G.A. (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): 1-18
- Guillemot F., Lo L.C., Johnson J.E., Auerbach A., Anderson D.J., Joyner A.L. (1993)**
Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons.
Cell, 75(3): 463-76
- Guiraudie G., Pageat P., Cain A.H., Madec I., Nagnan-Le Meillour P. (2003)**
Functional characterization of olfactory binding proteins for appealing compounds and molecular cloning in the vomeronasal organ of pre-pubertal pigs.
Chem Senses, 28(7): 609-19
- Hafner A. (1987)**
Elektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen der neuralen Elemente der Riechschleimhaut des Hundes und lichtmikroskopische und immunhistologische Charakterisierung spontaner Riechschleimhauttumoren bei Hund und Katze.
Diss vet med, München
-

Hall P.A., Levison D.A., Woods A.L., Yu C.C., Kellock D.B., Watkins J.A., Barnes D.M., Gillett C.E., Camplejohn R., Dover R., et al. (1990)

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol*, 162(4): 285-94

Halpern M. (1987)

The organization and function of the vomeronasal system. *Annu Rev Neurosci*, 10: 325-62

Halpern M., Martínez-Marcos A. (2003)

Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog Neurobiol*, 70(3): 245-318

Hartman B.K., Margolis F.L. (1975)

Immunofluorescence localization of the olfactory marker protein. *Brain Res*, 96(1): 176-80

Hatt H. (2005)

Geschmack und Geruch.
Aus: Schmidt R.F., Lang F., Thews G., (edt): *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*
Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 29. Auflage: 408-22

Hatt H. (2006)

Geruch.
Aus: Schmidt R.F., Schaible H.G., (edt): *Neuro- und Sinnesphysiologie*.
Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 5. Auflage: 340-43

Hernandez-Verdun D., Gautier T. (1994)

The chromosome periphery during mitosis. *Bioessays*, 16(3): 179-85

Höfer D., Shin D.W., Drenckhahn D. (2000)

Identification of cytoskeletal markers for the different microvilli and cell types of the rat vomeronasal sensory epithelium. *J Neurocytol*, 29(3): 147-56

Hsu S.M., Raine L., 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): 577-80

Huard J.M., Schwob J.E. (1995)

Cell cycle of globose basal cells in rat olfactory epithelium. *Dev Dyn*, 203(1): 17-26

- Huard J.M., Youngentob S.L., Goldstein B.J., Luskin M.B., Schwob J.E. (1998)**
Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells.
J Comp Neurol, 400(4): 469-86
- Ichikawa M., Osada T., Graziadei P.P. (1994)**
Vicia villosa agglutinin inhibits the fasciculation of vomeronasal axons in fetal rat vomeronasal organ culture.
Brain Res, 668(1-2): 252-5
- Ishii T., Omura M., Mombaerts P. (2004)**
Protocols for two- and three-color fluorescent RNA in situ hybridization of the main and accessory olfactory epithelia in mouse.
J Neurocytol, 33(6): 657-69
- Jang W., Youngentob S.L., Schwob J.E. (2003)**
Globose basal cells are required for reconstitution of olfactory epithelium after methyl bromide lesion.
J Comp Neurol, 460(1): 123-40
- Jastrow H., Oelschläger H.H. (2006)**
Terminal nerve in the mouse-eared bat (*Myotis myotis*): ontogenetic aspects.
Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 288(11): 1201-15
- Jia C., Halpern M. (1996)**
Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins (G_i alpha 2 and G_o alpha) and segregated projections to the accessory olfactory bulb.
Brain Res, 719(1-2): 117-28
- Kawakami E., Morita Y., Hori T., Tsutsui T. (2002)**
Lectin-binding characteristics and capacitation of canine epididymal spermatozoa.
J Vet Med Sci, 64: 543-49
- Kawauchi S., Beites C.L., Crocker C.E., Wu H.H., Bonnin A., Murray R., Calof A.L. (2004)**
Molecular signals regulating proliferation of stem and progenitor cells in mouse olfactory epithelium.
Dev Neurosci, 26(2-4): 166-80
- Keverne E.B. (1999)**
The vomeronasal organ.
Science, 286(5440): 716-20
- Key B. (1998)**
Molecular development of the olfactory nerve pathway.
Ann N Y Acad Sci, 855: 76-82
- Kream R.M., Margolis F.L. (1984)**
Olfactory marker protein: turnover and transport in normal and regenerating neurons.
J Neurosci, 4(3): 868-79

- LaMantia A.S., Bhasin N., Rhodes K., Heemskerk J. (2000)**
Mesenchymal/epithelial induction mediates olfactory pathway formation.
Neuron, 28(2): 411-25
- Leathem A.J.C., Atkins N.J. (1983)**
Lectin binding to paraffin sections.
Aus: Bullock G.R., Petrusz P. (edt.): Techniques in immunochemistry.
Academic Press, New York London: 46-54
- Lee M.C., Damjanov I. (1985)**
Lectin binding sites on human sperm and spermatogenic cells.
Anat Rec, 212(3): 282-7
- Lee J.Y., Kang T.Y., Lee Y.D., Shin T.K. (2003)**
Histochemical characterization of the lectin-binding sites in the equine vomeronasal organ.
J Vet Sci, 4(1): 15-9
- Leung C.T., Coulombe P.A., Reed R.R. (2007)**
Nat Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration.
Neurosci, 10(6): 720-6
- Lévai O., Feistel T., Breer H., Strotmann J. (2006)**
Cells in the vomeronasal organ express odorant receptors but project to the accessory olfactory bulb.
J Comp Neurol, 498(4): 476-90
- Lis H., Sharon N. (1986)**
Biological Properties of Lectins.
Aus: Liener I.E., Sharon N., Goldstein I.J. (edt): The Lectins. Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine.
Academic Press, Orlando New York London: 266-85
- Lundh B., Brockstedt U., Kristensson K. (1989)**
Lectin-binding pattern of neuroepithelial and respiratory epithelial cells in the mouse nasal cavity.
Histochem J, 21(1): 33-43
- Macdonald-Bravo H., Bravo R. (1985)**
Induction of the nuclear protein cyclin in serum-stimulated quiescent 3T3 cells is independent of DNA synthesis.
Exp Cell Res, 156(2): 455-61
- Mackay-Sim A., Kittel P. (1991)**
Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: a quantitative autoradiographic study.
J Neurosci, 11(4): 979-84

Margolis F.L. (1972)

A Brain Protein Unique to the Olfactory Bulb.
Proc Nat Acad Sci, 69(5): 1221-4

Margolis F.L. (1982)

Olfactory Marker Protein (OMP).
Scand J Immunol, 15(9): 181-99

Marin-Padilla M., Amieva M.R. (1989)

Early neurogenesis of the mouse olfactory nerve: Golgi and electron microscopic studies.
J Comp Neurol, 288(2): 339-52

Matarazzo V., Zsürger N., Guillemot J.C., Clot-Faybesse O., Botto J.M., Dal Farra C., Crowe M., Demaille J., Vincent J.P., Mazella J., Ronin C. (2002)

Porcine odorant-binding protein selectively binds to a human olfactory receptor.
Chem Senses, 27(8): 691-701

Matsunami H., Buck L.B. (1997)

A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals.
Cell, 90(4): 775-84

Meier-Stiegen A.S. (2004)

Lokalisierung und Charakterisierung von Zellkontaktproteinen im olfaktorischen Epithel.
Diss med, Würzburg

Menco B.P. (1980)

Qualitative and quantitative freeze-fracture studies on olfactory and nasal respiratory structures of frog, ox, rat, and dog. I. A general survey.
Cell Tissue Res, 207(2): 183-209

Menco B.P., Leunissen J.L., Bannister L.H., Dodd G.H. (1978)

Bovine olfactory and nasal respiratory epithelium surfaces. High-voltage and scanning electron microscopy, and cryo-ultramicrotomy.
Cell Tissue Res, 193(3): 503-24

Mendoza A.S. (1993)

Morphological studies on the rodent main and accessory olfactory systems: the regio olfactoria and vomeronasal organ.
Ann Anat, 175(5): 425-46

Mendoza A.S., Kühnel W. (1991)

Lectin histochemistry on the olfactory region and the vomeronasal organ of rats and golden hamsters.
Acta Histochem, 91(2): 173-84

- Meng J., Vardar D., Wang Y., Guo H.C., Head J.F., McKnight C.J. (2005)**
High-resolution crystal structures of villin headpiece and mutants with reduced F-actin binding activity.
Biochemistry, 44(36): 11963-73
- Menke C. (2003)**
Morphologie und topographische Anatomie der Nase, der Nasenhöhle sowie der Nasennebenhöhlen und assoziierten Strukturen beim Europäischen Mufflon (*Ovis gmelini musimon* PALLAS 1811).
Diss vet med, Hannover
- Meredith M. (1998)**
Vomeronasal function.
Chem Senses, 23(4): 463-6
- Minett F.C. (1925)**
The Organ of Jacobson in the Horse, Ox, Camel and Pig.
J Anat, 60(1): 110-18
- Miragall F., Monti-Graziadei G.A. (1982)**
Experimental studies on the olfactory marker protein. II. Appearance of the olfactory marker protein during differentiation of the olfactory sensory neurons of mouse: an immunohistochemical and autoradiographic study.
Brain Res, 239(1): 245-50
- Miyachi K., Fritzler M.J., Tan E.M. (1978)**
Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells.
J Immunol, 121(6): 2228-34
- Monti-Graziadei A.G. (1992)**
Cell migration from the olfactory neuroepithelium of neonatal and adult rodents.
Brain Res Dev Brain Res, 70(1): 65-74
- Monti-Graziadei G.A., Margolis F.L., Harding J.W., Graziadei P.P. (1977)**
Immunocytochemistry of the olfactory marker protein.
J Histochem Cytochem, 25(12): 1311-6
- Morrison E.E., Costanzo R.M. (1989)**
Scanning electron microscopic study of degeneration and regeneration in the olfactory epithelium after axotomy.
J Neurocytol, 18(3): 393-405
- Morrison E.E., Costanzo R.M. (1990)**
Morphology of the human olfactory epithelium.
J Comp Neurol, 297(1): 1-13
- Naguro T., Breipohl W. (1982)**
The vomeronasal epithelia of NMRI mouse.
Cell Tissue Res, 227: 519-34

- Nakamura H., Fujiwara M., Kawasaki M., Nonomura N., Takahashi S. (1998)**
Age-related changes in dividing cells of the olfactory epithelium of the maturing guinea pig.
Eur Arch Otorhinolaryngol, 255(6): 289-92
- Nedelec S., Dubacq C., Trembleau A. (2005)**
Morphological and molecular features of the mammalian olfactory sensory neuron axons: What makes these axons so special?
J Neurocytol, 34(1-2): 49-64
- Nibu K. (2002)**
Introduction to olfactory neuroepithelium.
Microsc Res Tech, 58(3): 133-4
- Niehaus A., Trotter J. (1997)**
Lectin-binding properties of oligodendrocyte lineage cells aid in defining functionally important surface proteins.
Glia, 20(3): 173-83
- Nomura T., Takahashi S., Ushiki T. (2004)**
Cytoarchitecture of the normal rat olfactory epithelium: light and scanning electron microscopic studies.
Arch Histol Cytol, 67(2): 159-70
- Ohta Y., Ichimura K. (2000a)**
Proliferation markers, proliferating cell nuclear antigen, Ki67, 5-bromo-2'-deoxyuridine, and cyclin D1 in mouse olfactory epithelium.
Ann Otol Rhinol Laryngol, 109(11): 1046-8
- Ohta Y., Ichimura K. (2000b)**
Immunohistochemical localization of proliferating cells and epidermal growth factor receptors in mouse olfactory epithelium.
ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 62(1): 20-5
- Ohta Y., Ichimura K. (2001)**
Globose basal cells are identified as proliferating cells in mouse olfactory epithelium.
Ann Otol Rhinol Laryngol, 110(1): 53-5
- Pellier V., Astic L. (1994)**
Histochemical and immunocytochemical study of the migration of neurons from the rat olfactory placode.
Cell Tissue Res, 275(3): 587-98
- Pinheiro G.S., Silva M.R., Rodrigues C.A., Kerbaui J., de Oliveira J.S. (2007)**
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), p53 and MDM2 expression in Hodgkins disease.
Sao Paulo Med J, 125(2): 77-84

- Plendl J., Schmahl W. (1988a)**
Dolichos biflorus agglutinin: a marker of the developing olfactory system in the NMRI-mouse strain.
Anat Embryol (Berl), 177(5): 459-64
- Plendl J., Schmahl W. (1988b)**
Dolichos biflorus agglutinin distinguishes mature olfactory neurons and synapses in the mouse.
Aus: Freed D., Bog-Hansen T.C. (edt): Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry.
Sigma, St Louis, 6: 663-70
- Plendl J., Sinowatz F. (1998)**
Glycobiology of the olfactory system.
Acta Anat (Basel), 161(1-4): 234-53
- Raisman G. (1972)**
An experimental study of the projection of the amygdala to the accessory olfactory bulb and its relationship to the concept of a dual olfactory system.
Exp Brain Res, 14(4): 395-408
- Revenu C., Courtois M., Michelot A., Sykes C., Louvard D., Robine S. (2007)**
Villin severing activity enhances actin-based motility in vivo.
Mol Biol Cell, 18(3): 827-38
- Romeis B. (1989)**
Mikroskopische Technik.
Urban & Schwarzenberg Verlag, München, 17. Auflage
- Ronnett G.V., Cho H., Hester L.D., Wood S.F., Snyder S.H. (1993)**
Odorants differentially enhance phosphoinositide turnover and adenylyl cyclase in olfactory receptor neuronal cultures.
J Neurosci, 13(4): 1751-8
- Rouquier S., Giorgi D. (2007)**
Olfactory receptor gene repertoires in mammals.
Mutat Res, 616(1-2): 95-102
- Rüdiger H., Gabius H.J. (1993)**
Lektinologie-Geschichte, Konzepte und pharmazeutische Bedeutung.
Dtsch Apotheker Ztg, 133(26): 2371-80
- Rüsse I., Sinowatz F. (1998)**
Aus: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.
Paul Parey Verlag, Berlin, 2. Auflage: 338-67, 409-18
- Salazar I., Sanchez Quinteiro P., Cifuentes J.M., Garcia Caballero T. (1996)**
The vomeronasal organ of the cat.
J Anat, 188(2): 445-54

- Salazar I., Sanchez-Quinteiro P., Lombardero M., Cifuentes J.M. (2000)**
A descriptive and comparative lectin histochemical study of the vomeronasal system in pigs and sheep.
J Anat, 196(1): 15-22
- Salazar I., Lombardero M., Alemañ N., Sánchez Quinteiro P. (2003a)**
Development of the vomeronasal receptor epithelium and the accessory olfactory bulb in sheep.
Microsc Res Tech, 61(5): 438-47
- Salazar I., Lombardero M., Cifuentes J.M., Sánchez Quinteiro P., Alemañ N. (2003b)**
Morphogenesis and growth of the soft tissue and cartilage of the vomeronasal organ in pigs.
J Anat, 202(6): 503-14
- Sam M., Vora S., Malnic B., Ma W., Novotny M.V., Buck L.B. (2001)**
Neuropharmacology. Odorants may arouse instinctive behaviours.
Nature, 412(6843): 142
- Sawhney N., Hall P.A. (1992)**
Ki-67-structure, function, and new antibodies.
J Pathol, 168(2): 161-2
- Sherwood R.J., McLachlan J.C., Aiton J.F., Scarborough J. (1999)**
The vomeronasal organ in the human embryo, studied by means of three-dimensional computer reconstruction.
J Anat, 195(3): 413-8
- Singer M.S., Shepherd G.M., Greer C.A. (1995)**
Olfactory receptors guide axons.
Nature, 377(6544): 19-20
- Sinowatz F., Frieß A. E., Amselgruber W. (1988)**
Zytochemischer Nachweis von Lektinbindungsstellen an epididymalen Spermien.
Acta histochem Suppl, 36: 159-68
- Steinbrecht R.A. (1998)**
Odorant-binding proteins: expression and function.
Ann N Y Acad Sci, 855: 323-32
- St John J.A., Clarris H.J., Key B. (2002)**
Multiple axon guidance cues establish the olfactory topographic map: how do these cues interact?
Int J Dev Biol, 46(4): 639-47
- St John J.A., Key B. (2005)**
Olfactory marker protein modulates primary olfactory axon overshooting in the olfactory bulb.
J Comp Neurol, 488(1): 61-9

- Strotmann J., Levai O., Fleischer J., Schwarzenbacher K., Breer H. (2004)**
Olfactory receptor proteins in axonal processes of chemosensory neurons.
J Neurosci, 24(35): 7754-61
- Suzuki Y. (1998)**
Cell death, phagocytosis, and neurogenesis in mouse olfactory epithelium and vomeronasal organ after colchicine treatment.
Ann N Y Acad Sci, 855: 252-4
- Suzuki Y. (2004)**
Fine structural aspects of apoptosis in the olfactory epithelium.
J Neurocytol, 33(6): 693-702
- Suzuki Y., Schafer J., Farbman A.I. (1995)**
Phagocytic cells in the rat olfactory epithelium after bulbectomy.
Exp Neurol, 136(2): 225-33
- Takasaki Y., Deng J.S., Tan E.M. (1981)**
A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation.
J Exp Med, 154(6): 1899-909
- Teter K.P., Holloway D.C., Sandusky G.E. (1995)**
Assessment of PCNA (19A2) and Ki-67 (MIB1) Cell Proliferation Markers in Formalin Fixed Tissues.
J Histotechnol, 18(2): 99-104
- Trinh K., Storm D.R. (2003)**
Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium.
Nat Neurosci, 6(5): 519-25
- Trinh K., Storm D.R. (2004)**
Detection of odorants through the main olfactory epithelium and vomeronasal organ of mice.
Nutr Rev, 62(11): 189-92
- Treloar H.B., Feinstein P., Mombaerts P., Greer C.A. (2002)**
Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons.
J Neurosci, 22(7): 2469-77
- Trotier D. (1994)**
Intensity coding in olfactory receptor cells.
Semin Cell Biol, 5(1): 47-54
- Trotier D., Døving K.B. (1998)**
Anatomical description of a new organ in the nose of domesticated animals by Ludvig Jacobson (1813).
Chem Senses, 23(6): 743-54

-
- Tsim T.Y., Wong E.Y., Leung M.S., Wong C.C. (2004)**
Expression of axon guidance molecules and their related genes during development and sexual differentiation of the olfactory bulb in rats.
Neuroscience, 123(4): 951-65
- Uhlenbruck G.G. (1983)**
Die Biologie der Lektine: Eine biologische Lektion.
Funkt Biol Med, 2: 40-8
- Vaccarezza O.L., Sepich L.N., Tramezzani J.H. (1981)**
The vomeronasal organ of the rat.
J Anat, 132(2): 167-85
- Verheijen R., Kuijpers H.J., van Driel R., Beck J.L., van Dierendonck J.H., Brakenhoff G.J., Ramaekers F.C. (1989)**
Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes.
J Cell Sci, 92(4): 531-40
- Vincent A.J., West A.K., Chuah M.I. (2005)**
Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells.
J Neurocytol, 34(1-2): 65-80
- Wakabayashi Y., Ichikawa M. (2007)**
Distribution of Notch1-expressing cells and proliferating cells in mouse vomeronasal organ.
Neurosci Lett, 411(3): 217-21
- Weiler E., McCulloch M.A., Farbman A.I. (1999)**
Proliferation in the vomeronasal organ of the rat during postnatal development.
Eur J Neurosci, 11(2): 700-11
- Weiler E., Benali A. (2005)**
Olfactory epithelia differentially express neuronal markers.
J Neurocytol, 34(3-5): 217-40
- Whitlock K.E. (2004)**
A new model for olfactory placode development.
Brain Behav Evol, 64(3): 126-40
- Witt M., Georgiewa B., Knecht M., Hummel T. (2002)**
On the chemosensory nature of the vomeronasal epithelium in adult humans.
Histochem Cell Biol, 117(6): 493-509
- Wöhrmann-Repenning A. (1989)**
Beobachtungen zur frühen Entwicklung des JACOBSONSchen Organs der Katze (*Felis sivestris*).
Gegenbaurs Morphol Jb, 135(5): 765-73
-

Wong S.T., Trinh K., Hacker B., Chan G.C., Lowe G., Gaggar A., Xia Z., Gold G.H., Storm D.R. (2000)

Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice.

Neuron, 27(3): 487-97

Wysocki C.J., Meredith M. (1987)

The vomeronasal system.

In: Finger T.E., Silver W.L., (ed): Neurobiology of taste and smell.

John Wiley & Sons, New York: 125–50

Yoshida-Matsuoka J., Matsuoka M., Costanzo R.M., Ichikawa M. (2000)

Morphological and histochemical changes in the regenerating vomeronasal epithelium.

J Vet Med Sci, 62(12): 1253-61

Yoshihara Y., Mori K. (1997)

Basic principles and molecular mechanisms of olfactory axon pathfinding.

Cell Tissue Res, 290(2): 457-63

8.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μA	Mikroampere
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AG	Aktiengesellschaft
ATP	Adenosintriphosphat
BPA	Bauhinia purpurea
BrdU	Bromodeoxyuridine
BS I	Bandeiraea simplicifolia Lektin I
Ca ²⁺	Kalziumionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Con A	Concanavalin A
DAB	Diaminobenzidin
DBA	Dolichos biflorus
DNA	Desoxiribonukleinsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GAH	Glutaraldehyd
GS II	Griffonia simplicifolia Lektin II
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
IgG / IgM	Immunglobulin G / M
INP	immediate neuronal precursor
IPA	Image Processing and Analysis
IP ₃	Inositoltriphosphat
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Kommanditgesellschaft
KGW	Körpergewicht
KOH	Kalilauge
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
Mash-1	mammalian achaete-scute homolog 1
MPA	Maclura pomifera
N.	Nervus
Na ⁺	Natriumionen
Ngn1	Neurogenin 1

nm	Nanometer
OBP	odorant-binding protein
OEC	olfactory ensheathing cell
OMP	olfactory marker protein
PAS	periodic acid Schiff's reaction
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
pH	potentia hydrogenii
PNA	Peanut agglutinin
SBA	Soybean agglutinin
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
Tab.	Tabelle
TGF	transforming growth factor
TNF/TNFR	Tumornekrosefaktor/Tumornekrosefaktor-Rezeptor
UEA I	Ulex europaeus agglutinin I
V.	Vena
VNO	Vomeronasalorgan
WGA	Wheat germ agglutinin

8.3 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

- Abb. 1:** Schematische Darstellung des VNO (modifiziert nach Minett, 1925). Venen (V), *Glandulae nasales* (Gln), Bowman-Drüsen (BD), myelinisierte Nerven (MN), mediales Epithel (ME), laterales Epithel (LE), Nervus vomeronasalis (Nvn), Cartilago vomeronasalis (C). 3
- Abb. 2:** Signaltransduktion in der *Regio olfactoria* (modifiziert nach Hatt, 2005) Der Duftstoff bindet am Rezeptor (R) und aktiviert ein G-Protein (G), das wiederum eine Adenylatzyklase (AC) aktiviert. Aus Adenosintriphosphat (ATP) entsteht das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP), ein Second-Messenger, der zur Öffnung eines Kationenkanals führt. Der Einstrom von Na⁺ und Ca²⁺ führt zur Depolarisation. 11
- Abb. 3:** Schematische Darstellung der Verarbeitung der olfactorischen Signale (modifiziert nach Hatt, 2006). Jede Riechzelle entsendet ein Axon. Die Axone bündeln sich zu den *Fila olfactoria*, die zu den Mitralzellen im *Bulbus olfactorius* ziehen. Periglomeruläre Zellen und Körnerzellen haben regulierenden Einfluss..... 12
- Abb. 4:** Modell einer Riechzelle und ihrer Vorläuferzellen (modifiziert nach Beites et al., 2005). Riechepithel (RE), rundliche Basalzellen (rBZ), horizontale Basalzellen (hBZ), Basalmembran (BM), *Lamina propria* (LP), Riechzellen (RZ), Vorläuferzellen mit der Beschriftung INP und Mash 1, die sich aus der Stammzelle entwickeln, olfactory ensheathing cell (OEC), Stützzelle (SZ)..... 14
- Abb. 5:** Schematische Darstellung der knöchernen Strukturen des Nasenbodens ventral des *Septum nasi* in Beziehung zum *Cartilago vomeronasalis*. 31
- Abb. 6:** Querschnitt durch den Gesichtsschädel eines eineinhalb Jahre alten, weiblichen Tieres. Der Schnitt erfolgte auf Höhe des zweiten Incisivus. Die beiden VNO sind durch Pfeile gekennzeichnet. I: Septum nasi, II dorsale und III ventrale Nasenmuschel, IV: Caninus..... 31
- Abb. 7:** Rostraler Abschnitt des VNO eines adulten Schweins. Übergang vom mehrschichtigen Plattenepithel (PE) zum lateralen respiratorischen (resp.E) und medialen Riechepithel (RE). 33
- Abb. 8:** Ausschnittsvergrößerung des rostralen VNO-Abschnittes eines adulten Schweins im Bereich der Überganszone. Plattenepithel (PE) mit Mikroplicae, ziliotragende Zellen (*) des respiratorischen Epithels, Mikrovilli des Riechepithels (RE)..... 34

Abb. 9:	Übergang vom respiratorischen Epithel (oben links) zum Riechepithel des VNO (unten rechts), adultes Tier. In beiden Epithelien sind im Bereich des Epithelwechsels Ausführungsgänge der Bowman-Drüsen zu finden (*).....	35
Abb. 10:	Aufsicht auf das respiratorische, zilientragende Epithel des VNO eines ein Jahr alten Schweins. Kurze Zilien (*) in Ausbildung.....	36
Abb. 11:	Aufsicht auf das mit Mikrovilli besetzte Riechepithel des VNO eines eineinhalb Jahre alten Schweins.	37
Abb. 12:	Riechepithel des VNO eines eineinhalb Jahre alten Schweins. Zwischen den langen Mikrovilli der Stützzellen sind die kurzen, gedrungenen Mikrovilli der Riechzellen (→) zu erkennen.	37
Abb. 13:	Schemazeichnung des Ductus vomeronasalis. Rostral (r), medial (m), kaudal (k). Eingezeichnet sind die Lokalisationen der in den Abbildungen 14, 15 und 16 gezeigten Übergänge.....	38
Abb. 14:	Übergang vom respiratorischen Epithel zum Riechepithel des VNO eines eineinhalb Jahre alten Schweins. Eine klare Abgrenzung und erhebliche Differenz in der Höhe beider Epithelien sind deutlich erkennbar. Rostraler Abschnitt.	39
Abb. 15:	Übergangszellen (*) im medialen Abschnitt; eineinhalb Jahre altes Schwein.....	40
Abb. 16:	Kaudaler Abschnitt des VNO eines adulten Schweins. Sehr häufig sind in diesem Bereich Übergangszellen vorzufinden; respiratorisches Epithel und Riechepithel gehen in unregelmäßiger Verteilung ineinander über.....	41
Abb 17:	Schematische Verteilung der Schleimhaut im VNO. A: Respiratorische Schleimhaut auf der lateralen und teilweise medialen Seite, Riechschleimhaut auf der medialen Seite. Kranial befindet sich Plattenepithel. Im medialen Abschnitt gibt es zwei Varianten. B: Typisches Verteilungsmuster mit respiratorischer Schleimhaut lateral und Riechschleimhaut medial. C: Das respiratorische Epithel tritt am Umschlagspunkt auf die Seite mit Riechepithel über. D: Vermischung von respiratorischem Epithel und Riechepithel auf der medialen VNO-Hälfte.	42
Abb. 18:	Gegenüberstellung der drei prominenten Zelltypen des VNO eines adulten Schweins. A: zilientragende Zelle (ZI) aus dem respiratorischen Epithel. B: Riechzelle (RZ) aus dem Riechepithel; a: Axon; d: Dendrit. C: mit Mikrovilli besetzte Stützzelle (SZm) des Riechepithels. Mazerationspräparat.	43
Abb. 19:	Riechepithel der <i>Regio olfactoria</i> eines vier Monate alten Schweins. Deutlich sind die zilientragenden Riechzellen zu erkennen (→).....	44

Abb. 20:	Darstellung zweier Riechzelltypen aus der <i>Regio olfactoria</i>	45
Abb. 21:	Querschnitt durch das VNO eines 2 Jahre alten Schweins, medialer Abschnitt, H.E. Das respiratorische Epithel (resp.E) erstreckt sich über die gesamte laterale Seite, während die mediale Seite mit Riechepithel (RE) ausgekleidet ist. Lateral: zahlreiche Bowman-Drüsen (*). Medial: Nervenfaserbündel des <i>N. vomeronasalis</i> (→).	46
Abb. 22:	Rostraler Abschnitt aus dem VNO eines 4 1/2 Monate alten Schweins, H.E. Übergang von Plattenepithel (links) zu Riechepithel (rechts) der medialen Seite. Eine Riechzelle befindet sich außerhalb des Riechepithels in der <i>Lamina propria</i> (→).	47
Abb. 23:	VNO eines 4 1/2 Monate alten Schweins, PAS-Färbung / Gegenfärbung mit Hämalaun. Die fein gezeichnete Basalmembran bildet die Abgrenzung des Riechepithels, bestehend aus Basalzellen (→), Riechzellen (Raute) und Stützzellen (*), von der <i>Lamina propria</i> . Die mit Mukus umgebenen Mikrovilli erscheinen rötlich gefärbt.	48
Abb. 24:	Riechepithel der <i>Regio olfactoria</i> eines adulten Schweins, H.E. Ausführungsgänge (*) der unterlagerten Bowman-Drüsen.	50
Abb. 25:	Ausschnitt aus dem Riechepithel eines 4 1/2 Monate alten Tieres. Innerhalb des Epithels zeigen sich Basal- und Stützzellen in Teilung, durch den PCNA-Antikörper braun markiert. Gegenfärbung mit Hämalaun.	52
Abb. 26:	Riechepithel eines 7 Wochen alten Ferkels. Der OMP-Antikörper markiert spezifisch die Riechzellen des Epithels. Zwei Riechzellen außerhalb des Epithels in der <i>Lamina propria</i> (*) zeigen ebenfalls eine positive Reaktion.	53
Abb. 27:	Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 26. Das Zytoplasma der Riechzellen erscheint deutlich markiert, der Dendrit lässt sich bis zur Epitheloberfläche verfolgen und endet dort mit der für Riechzellen typischen Auftreibung, dem „dendritic knob“	54
Abb. 28:	Riechepithel der <i>Regio olfactoria</i> eines 4 Monate alten Schweins. Einige unmarkierte Riechzellen sind oberhalb der Basalmembran zu finden, an die sich die Lage OMP-markierter Riechzellen anschließt. Apikal befindet sich eine dünne Schicht mit Stützzellen. Nervenfasern in der <i>Lamina propria</i> zeigen ebenfalls eine positive Reaktion.	55
Abb. 29:	Riechepithel eines vier Monate alten Schweins. Die Mikrovilli der Riechzellen weisen deutliche Villinexpression auf, während sich die Stützzellen des Epithels völlig unmarkiert darstellen. Insert: Ausschnittsvergrößerung der Mikrovilli. (→) dendritische Auftreibung.	56

Abb. 30: Riechepithel eines 2 Jahre alten weiblichen Tieres. Die Riechzellen weisen Bindungsstellen für PNA auf, bei den Stützzellen kann keine Reaktion nachgewiesen werden. Drei stark fluoreszierende Riechzellen sind basal lokalisiert. (→) Axon. 57

Tabellen

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Tiere 22

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Reagentien..... 26

Tab. 3: Einteilung der verwendeten Lektine nach ihrer Kohlenhydrat-spezifität 28

Tab. 4: Verteilungsmuster der Lektine innerhalb des Riechepithels..... 59

Tabellen im Anhang

Tab. 5: Lektinbindungsstellen im VNO 95

Tab. 6: Lektinbindungsstellen an Riech- und Stützzellen des VNO..... 96

Tab. 7: Lektinbindungsstellen in der *Regio olfactoria*..... 97

9 Anhang

Tab. 5: Lektinbindungsstellen im VNO

Lektin	Knorpel	Drüsen	Nervenbündel	Axon	Riechepithel	basale Riechzellen	respirator. Epithel	Mukus
UEAI	-	+++	+/-	+/-	+	-	+	+++
PNA	++	+++	+/-	+/-	+++	+++	+	++
MPA	++	+++	-	-	+	++	+/-	++
DBA	-	+/-	-	-	-	-	+	+
WGA	++	+++	+	+	+	+	+	++
ConA	++	++	-	-	-	-	-	+
SBA	+	+/-	-	-	-	-	+	-
BSI	-	-	-	-	-	-	-	-
BPA	+/-	+	-	-	-	+/-	+/-	+/-
GSII	+/-	-	-	-	+/-	-	+/-	-

lat = lateral

Tab. 6: Lektinbindungsstellen an Riech- und Stützzellen des VNO

Lektin	Riechzellen			basale Riechz.	Stützzellen
	Zellkern	Zytoplasma	Dendrit		
UEAI	-	+	+	-	+
PNA	-	++	++	+++	-
MPA	+	+/-	+/-	++	+/-
DBA	-	-	-	-	-
WGA	-	+/-	+/-	+	+/-
ConA	-	-	-	-	-
SBA	-	-	-	-	-
BSI	-	-	-	-	-
BPA	-	-	-	+/-	-
GSII	-	-	-	-	+/-

Tab. 7: Lektinbindungsstellen in der *Regio olfactoria*

Lektin	Drüsen	Nerven- bündel	Axon	Riech- epithel	Mukus
UEAI	+++	-	-	-	++
PNA	+++	-	-	-	++
MPA	+++	-	-	-	+
DBA	-	-	-	-	+
WGA	+++	-	-	-	+++
ConA	++	-	-	-	-
SBA	-	-	-	-	-
BSI	-	-	-	-	-
BPA	+	-	-	-	+/-
GSII	-	-	-	SZ +/-	-

SZ = Stützzellen

10 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. W.M. Amselgruber für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, seinen fachlichen Rat und die jederzeit gewährte, persönliche Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Ganz herzlichen Dank an Prof. Dr. W. Schmahl für die Übernahme und Vorlage der Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Herrn Dr. M. Steffl danke ich sehr für seine freundliche und fachliche Unterstützung, besonders bei der Korrektur dieser Arbeit. Ferner danke ich Frau Dr. H. Brehm für die Unterstützung bei der Gewinnung des Untersuchungsmaterials und Herrn Dr. M. Schweiger für seinen fachkundigen Rat.

Ein herzliches Dankeschön an Frau K. Müller und Frau T. Holzäpfel für die freundliche und zuverlässige Unterstützung im Labor.

Allen Mitarbeitern des Institutes und der Tierklinik sowie meinen Promotionskolleginnen danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Für die Überlassung der Tiere, die Bereitstellung der Räumlichkeiten und die freundliche Unterstützung bedanke ich mich herzlich bei Herrn L. Peitz und Herrn H. Hageloch, Versuchsstation für Tierhaltung, Tierzucht und Kleintierzucht „Unterer Lindenhof“, bei Frau S. Stabenow, Institut für Tierernährung der Universität Hohenheim.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Partner, die mir mit Vertrauen und großzügiger Unterstützung jederzeit zur Seite standen und mir diese Ausbildung ermöglicht haben.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katharina Maria Simon
Geburtsdatum: 28. April 1977
Geburtsort: Wiesbaden

Schulbildung

1983-1996 Freie Waldorfschule in Mainz
11. Juli 1996 Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung und Arbeiten

1996-1997 und 1999 Angestellte der Kurbetriebe Wiesbaden als
Rettungsschwimmerin
1997-1999 Ausbildung zur Tierarzhelferin in der Tierärztlichen Klinik für
Kleintiere und Großtiere, Dr. Litsch und Dr. Eversfield in
Wiesbaden

Studium

WS 99/00-WS 04/05 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München
21. April 2005 Staatsexamen
01. Juni 2005 Approbation

Promotion

01. September 2005 Beginn der Promotion am Institut für Umwelt- und Tierhygiene
sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5260-9



9 7 8 3 8 3 5 9 5 2 6 0 7