

Purinerge Modulation neuronaler Aktivität im
Bulbus olfactorius der Maus

DISSERTATION

zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften

des Fachbereichs Biologie der Fakultät
für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von

NATALIE ROTERMUND

aus Hamburg

Hamburg, 2014

Erster Gutachter: Prof. Dr. Christian Lohr

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Schwarz

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Jörg Ganzhorn

Tag der Disputation: 28.11.2014



I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	5
II	Abkürzungsverzeichnis.....	9
III	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	10
IV	Zusammenfassung.....	12
V	Abstract.....	13
1.	Einleitung.....	15
1.1	Der olfaktorische Sinn.....	15
1.1.1	Die synaptische Organisation des <i>Bulbus olfactorius</i> der Maus.....	15
1.1.1.1	Mitralzellen.....	17
1.1.1.2	Synaptische Integration in der äußeren plexiformen Schicht.....	19
1.1.1.3	Synaptische Integration in der Glomerularschicht.....	22
1.1.1.4	Gliazellen sowie Afferenzen und Efferenzen im olfaktorischen Bulbus.....	23
1.2	Purinerge Neurotransmission und Neuromodulation.....	24
1.2.1	P1-Rezeptoren.....	25
1.2.2	P2-Rezeptoren.....	26
1.2.3	ATP/ADP und Adenosin als extrazelluläre Signalmoleküle.....	27
1.3	Fragestellung und Zielsetzung.....	28
2.	Material und Methoden.....	31
2.1	Material.....	31
2.1.1	Geräte.....	31
2.1.2	Verbrauchsmaterialien und weitere Materialien.....	32
2.1.3	Software.....	32
2.1.4	Chemikalien und pharmakologisch aktive Substanzen.....	33
2.1.5	Gebrauchslösungen.....	34
2.1.5.1	Extrazellulärlösungen für <i>patch clamp</i> - und <i>calcium imaging</i> -Experimente..	34
2.1.5.2	Intrazellulärlösungen für <i>patch clamp</i> - und <i>calcium imaging</i> -Versuche.....	35
2.1.5.3	Immunhistochemie.....	36
2.1.5.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung.....	36
2.1.5.5	Antikörper und Primer für Immunhistochemie und <i>in situ</i> -Hybridisierungen	38
2.2	Versuchstiere.....	38
2.2.1	Präparation des olfaktorischen Bulbus und Herstellung akuter Hirnschnitte.....	39

2.3	Messplatz (Versuchsaufbau).....	40
2.4	Versuchsdurchführung.....	40
2.4.1	Die <i>patch clamp</i> -Technik	40
2.4.2	Applikation von Agonisten und Antagonisten über das Versuchsbad	41
2.4.3	Extrazelluläre elektrische Stimulation von ORN-Axonon.....	42
2.4.4	Etablierung einer elektrophysiologischen Messkonfiguration	43
2.4.5	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie.....	45
2.4.6	<i>Calcium imaging</i>	46
2.4.7	Applikation photoaktiver Substanzen (<i>uncaging</i>).....	47
2.5	Datenanalyse	47
2.5.1	Darstellung der Ergebnisse und Vorzeichenkonventionen.....	47
2.5.2	Auswertung von elektrophysiologischen Daten.....	48
2.5.3	Statistische Analysen	50
2.6	Histologie	50
2.6.1	Immunhistochemie	51
2.6.2	TSA-Signalamplifikation.....	51
2.6.3	Ligandenbindungsverfahren	52
2.6.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung.....	52
2.6.4.1	Herstellung einer A ₁ -Rezeptor spezifischen RNA-Sonde	52
2.6.4.2	Versuchsprotokoll für <i>in situ</i> -Hybridisierungen mit DIG-markierten Sonden	57
2.6.4.3	Versuchsprotokoll für <i>in situ</i> -Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Sonden	60
3.	Ergebnisse	63
3.1	ATP als Neuromodulator im olfaktorischen Bulbus.....	63
3.1.1	<i>Uncaging</i> von <i>caged</i> -ATP führt zu einem Einstrom in Mitralzellen.....	63
3.1.2	P2Y ₁ -Rezeptoren vermitteln den durch <i>caged</i> -ATP hervorgerufenen Einstrom in Mitralzellen.....	64
3.1.3	Eine Aktivierung des neuronalen Netzwerks durch <i>caged</i> -ATP evoziert Calciumtransienten in periglomerulären Astrozyten.....	66
3.1.4	Globales <i>versus</i> lokales ATP- <i>uncaging</i>	67
3.1.5	Applikation von ATP über das Versuchsbad.....	69
3.2	Adenosin als Neuromodulator im olfaktorischen Bulbus.....	70
3.2.1	Adenosin führt zu einem Ausstrom in Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus	70
3.2.2	Adenosin hyperpolarisiert Mitralzellen	71
3.2.3	Die Wirkung von Adenosin auf Mitralzellen wird über den A ₁ -Rezeptor vermittelt.....	72

3.2.3.1	A ₁ -Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten	73
3.2.3.2	Untersuchungen an A ₁ -Rezeptor- <i>knockout</i> -Mäusen	74
3.2.4	Histologische Lokalisation des A ₁ -Rezeptors im <i>Bulbus olfactorius</i> der Maus.....	77
3.2.4.1	Immunhistochemischer Nachweis des A ₁ -Rezeptors	77
3.2.4.2	Ligandenbindungsverfahren mit PSB 1165 zur Lokalisation des A ₁ -Rezeptors im olfaktorischen Bulbus.....	82
3.2.4.3	<i>In situ</i> -Hybridisierungen zur Lokalisation des A ₁ -Rezeptors im <i>Bulbus olfactorius</i> der Maus	84
3.2.5	Adenosin vermittelt die Öffnung eines Kaliumkanals in Mitralzellen.....	90
3.2.5.1	Adenosin führt zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit von Mitralzellmembranen	90
3.2.5.2	Bestimmung des Umkehrpotentials von Adenosin-vermittelten Membranpotentialänderungen in Mitralzellen	91
3.2.5.3	Der Adenosin-vermittelte Ausstrom in Mitralzellen ist bei einem Haltepotential von -30 mV größer als bei -70 mV.....	92
3.2.5.4	Die Substitution von intrazellulären Kaliumionen mit Cäsiumionen vermindert den Adenosin-vermittelten Ausstrom.....	94
3.2.5.5	Die intrazelluläre Chloridkonzentration hat keinen Einfluss auf Adenosin-vermittelte Hyperpolarisationen	95
3.2.6	Testung verschiedener spezifischer Blocker von Kaliumkanälen.....	96
3.2.6.1	Pharmakologische Charakterisierung der Adenosin-induzierten Kaliumleitfähigkeit	97
3.2.7	Adenosin moduliert das neuronale Netzwerk des <i>Bulbus olfactorius</i>	102
3.2.7.1	Adenosin verringert die Anzahl synaptischer Eingänge in Mitralzellen	102
3.2.7.2	Charakterisierung der synaptischen Eingänge in Mitralzellen des <i>Bulbus olfactorius</i>	103
3.2.7.3	Einfluss des Vorhandenseins eines intakten <i>tufts</i> auf die Anzahl synaptischer Eingänge in Mitralzellen.....	105
3.2.7.4	Die Frequenz und das Integral von <i>population bursts</i> werden nicht durch Adenosin moduliert	106
3.2.7.5	Adenosin reduziert die Anzahl synaptischer Eingänge in Körnerzellen.....	107
3.2.8	Adenosin reduziert die rekurrente Inhibition von Mitralzellen	108
3.2.8.1	Adenosin reduziert die rekurrente Inhibition von Mitralzellen	108
3.2.8.2	Adenosin reduziert die Glutamatausschüttung von Mitralzellen	111
3.2.9	Einfluss von Adenosin auf den <i>output</i> von Mitralzellen	112
3.2.9.1	Adenosin moduliert differenziert den <i>output</i> von Mitralzellen in verschiedenen Phasen nach einer ORN-Stimulation.....	113
3.2.9.2	Die Latenz der ORN-Mitralzell-Synapse wird nicht von Adenosin beeinflusst.....	115
3.2.9.3	Signal-Rausch-Verhältnis.....	115

4.	Diskussion.....	117
4.1	Eine photolytische Freisetzung von <i>caged</i> -ATP erhöht die neuronale Netzwerkaktivität im <i>Bulbus olfactorius</i>	117
4.2	A ₁ -Rezeptoren vermitteln eine modulatorische Wirkung von Adenosin auf Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus.....	124
4.3	A ₁ -Rezeptoren vermitteln eine Hyperpolarisation von Mitralzellen über die Öffnung eines Kaliumkanals	130
4.4	Adenosin reduziert die neuronale Netzwerkaktivität des <i>Bulbus olfactorius</i>	135
4.5	Physiologische Relevanz einer purinergen Neuromodulation durch ATP, ADP und Adenosin im <i>Bulbus olfactorius</i> der Maus	140
5.	Literaturverzeichnis.....	149
VI	Anhang.....	161
VII	Eidesstattliche Versicherung	167
VIII	Danke	169

II Abkürzungsverzeichnis

ACSF	Artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
ADO	Adenosin
ADP	Adenosin-5-diphosphat
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
AP	Aktionspotential
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS Sonde	komplementäre Sequenz zur Zielsequenz (<i>antisense</i> Sonde)
ATP	Adenosin-5-triphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
c-AMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CT	Kontrolle (<i>control</i>)
DDI	Dendrodendritische Inhibition
DIG	Digoxegenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPCPX	1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthin
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom (<i>excitatory postsynaptic current</i>)
eTC	<i>external tufted</i> -Zelle, äußere Büschelzelle
EtOH	Ethanol
GABA	γ -Amino-Buttersäure
GBZ	Gabazin
GC	Körnerzelle (<i>granule cell</i>)
GIRK	G-Protein gekoppelter einwärts rektifizierender Kaliumkanal (<i>G-protein coupled inwardly rectifying potassium channel</i>)
GluR	Glutamatrezeptor
GTP	Guanosin-5-triphosphat
HCN	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPSC	inhibitorischer postsynaptischer Strom (<i>inhibitory postsynaptic current</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure,
KO	<i>knockout</i>
MC	Mitralzelle (<i>mitral cell</i>)
MCL	Mitralzellschicht
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
NMDA	n-Methyl-D-aspartat
ONL	olfaktorische Nervenfaserschicht (<i>olfactory nerve layer</i>)
ORN	olfaktorisches Rezeptorneuron (<i>olfactory receptor neuron</i>)
P	Postnataltag
RT	Raumtemperatur
sEPSC	spontaner exzitatorischer postsynaptischer Strom (<i>spontaneous excitatory postsynaptic current</i>)
sIPSC	spontaner inhibitorischer postsynaptischer Strom (<i>spontaneous inhibitory postsynaptic current</i>)
S Sonde	identische Sequenz zum Target (<i>sense</i> -Sonde)
TC	<i>tufted</i> -Zelle, Büschelzelle
ü.N.	über Nacht
WT	Wildtyp

III Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abbildung 1	Neuronaler Aufbau des olfaktorischen Bulbus der Maus	17
Abbildung 2	Schema; Liganden und Typen purinerger P1- und P2-Rezeptoren	25
Abbildung 3	ATP-uncaging im olfaktorischen Bulbus.....	64
Abbildung 4	ATP hat einen P2Y ₁ -vermittelten Effekt auf Mitralzellen.....	65
Abbildung 5	ATP-uncaging verursacht Calciumsignale in Astrozyten.....	66
Abbildung 6	Strom und Calciumsignale in Mitralzellen bei globalem und lokalem ATP-uncaging .	68
Abbildung 7	Badapplikation von ATP während einer voltage clamp-Ableitung einer Mitralzelle .	69
Abbildung 8	Adenosin evoziert einen Ausstrom in Mitralzellen.....	70
Abbildung 9	Effekt von Adenosin auf das Membranpotential von Mitralzellen.....	72
Abbildung 10	Verwendung von A ₁ -Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten zur Charakterisierung des P1-Rezeptortyps.	74
Abbildung 11	A ₁ -KO-Mäuse zeigen eine Adenosin-vermittelte Depolarisation.....	75
Abbildung 12	A ₁ -KO-Mäuse zeigen keinen Adenosin-vermittelten Ausstrom.	76
Abbildung 13	Immunhistochemische Färbung des A ₁ -Rezeptors auf A ₁ -WT- und A ₁ -KO-Gewebe mittels free floating-Technik.....	78
Abbildung 14	Immunhistochemische Färbung des A ₁ -Rezeptors auf A ₁ -WT- und A ₁ -KO-Gewebe mittels free floating-Technik und antigen retrieval.	79
Abbildung 15	Immunhistochemische Färbung des A ₁ -Rezeptors mit TSA-Signalverstärkung auf Objektträgern.	81
Abbildung 16	Ligandenbindungsverfahren mit dem fluoreszierenden A ₁ -Rezeptor-Agonisten PSB 1165 in frischem Gewebe von A ₁ -WT- und A ₁ -KO-Mäusen.....	83
Abbildung 17	Current clamp-Ableitung einer Mitralzelle mit PSB 1165-Applikation.....	84
Abbildung 18	In situ-Hybridisierung von A ₁ -Rezeptor-mRNA mit radioaktiv markierten Sonden.....	85
Abbildung 19	In situ-Hybridisierung von A ₁ -Rezeptor-mRNA mit DIG-markierten Sonden in Gewebe von A ₁ -WT- und A ₁ -KO-Mäusen.....	87
Abbildung 20	Negativkontrollen; in situ-Hybridisierungen mit sense-Sonden. bzw. ohne Sonden in A ₁ -WT-Gewebe.	88
Abbildung 21	In situ-Hybridisierung von A ₁ -Rezeptor-mRNA im Hippocampus bei A ₁ -WT- und A ₁ -KO-Mäusen.....	89
Abbildung 22	Bestimmung der Leitfähigkeitsänderung durch Adenosin.	91
Abbildung 23	Bestimmung des Umkehrpotentials des Adenosin-vermittelten Stroms.....	92
Abbildung 24	Bei einem Haltepotential von -30 mV ist der Adenosin-vermittelte Ausstrom größer als bei -70 mV.	93
Abbildung 25	Substitution von Kaliumionen in der Intrazellulärlösung vermindert den Adenosin-vermittelten Ausstrom.....	94
Abbildung 26	Eine veränderte intrazelluläre Chloridkonzentration hat keinen Einfluss auf die Adenosin-vermittelte Hyperpolarisation.....	95
Abbildung 27	Wiederholte Applikation von Adenosin.	96
Abbildung 28	Untersuchung von TEA- und 4-AP-sensitiven Kaliumkanälen.....	98
Abbildung 29	Untersuchung von GIRK-Kanälen, KCNQ/M-Kanälen sowie Erg-Kanälen.	100
Abbildung 30	Statistische Auswertung der pharmakologischen Untersuchung von Kaliumkanälen.	101
Abbildung 31	Adenosin verringert die Anzahl synaptischer Eingänge in Mitralzellen.....	103
Abbildung 32	GABAerge und glutamaterge synaptische Eingänge in Mitralzellen.	104
Abbildung 33	Einfluss eines intakten tufts auf die Anzahl synaptischer Eingänge in Mitralzellen.	105
Abbildung 34	Population bursts werden nicht durch Adenosin moduliert.	106
Abbildung 35	Wirkung von Adenosin auf die Anzahl synaptischer Eingänge in Körnerzellen.....	107
Abbildung 36	Adenosin reduziert die Stärke der DDI in physiologischer Extrazellulärlösung.....	109

Abbildung 37	Unter modifizierten Messbedingungen kann die Wirkung von Adenosin auf die DDI unter Ausschluss von indirekten Effekten untersucht werden.	110
Abbildung 38	Adenosin reduziert die Autoexzitation von Mitralzellen.....	111
Abbildung 39	Adenosin moduliert den output von Mitralzellen nach ORN-Stimulation.	114
Abbildung 40	Die Latenz des ersten auf die ORN-Stimulation folgenden Aktionspotentials verändert sich durch Adenosin nicht.	115
Abbildung 41	Adenosin verbessert das Signal-Rausch-Verhältnis des ORN-Stimulation-abhängigen Mitralzell-output.....	116
Abbildung 42	Hypothese zur Modulation des glomerulären Netzwerks durch ATP.	123
Abbildung 43	Hypothese zur neuromodulatorischen Wirkung von Adenosin im Bulbus olfactorius.....	140
Abbildung 44	Hypothese zur modulatorischen Wirkung von ATP und Adenosin im neuronalen Netzwerk des Bulbus olfactorius.....	146
Abbildung 45	Strukturformel von Adenosine 5'-triphosphate, P ³ -1-(2-Nitrophenyl)ethyl Ester	161
Abbildung 46	Dot-Blot zur Kontrolle einer DIG-Markierung der A ₁ R-Sonden und Kontrolle der Integrität der RNA-Sonden	163
Abbildung 47	In situ-Hybridisierung des A _{2A} -Rezeptors mit radioaktiv markierten Sonden.....	164

Tabellen

Tabelle 1	Pharmakologisch aktive Substanzen.....	33
Tabelle 2	Extrazellulärlösungen für physiologische Experimente	34
Tabelle 3	Intrazellulärlösungen für physiologische Experimente	35
Tabelle 4	Lösungen für die Durchführung von in situ-Hybridisierungen	37
Tabelle 5	Primär- und Sekundärantikörper	38
Tabelle 6	Primer; Genotypisierung und in situ-Hybridisierung	38
Tabelle 7	Kaliumkanal-Familien und deren mögliche Beteiligung an der Adenosin-induzierten Hyperpolarisation.....	101
Tabelle 8	Kaliumkanäle der Maus; Pharmakologie	165

IV Zusammenfassung

Der *Bulbus olfactorius* bildet den ersten Ort einer zentralnervösen Analyse von olfaktorischen Reizen. Eingehende Geruchsinformationen werden hier prozessiert und anschließend über Projektionsneurone, die sogenannten Mitral- und *tufted*-Zellen, an höhere Hirnzentren weitergeleitet. Hierbei ist bisher jedoch weitgehend ungeklärt, durch welche Mechanismen die Verarbeitung der sensorischen Informationen beeinflusst werden kann. Die vorliegende Dissertation beschreibt erstmals eine purinerge Neuromodulation im *Bulbus olfactorius* der Maus. Das purinerge Transmittersystem ist einzigartig in seiner Komplexität, da nicht nur ATP sondern auch seine Hydrolyseprodukte ADP und Adenosin spezifische Rezeptoren aufweisen und neuromodulatorisch wirksam sind. Mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden, *calcium imaging* und histologischen Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Erkenntnisse gewonnen:

- I Die Photolyse von *caged*-ATP führt zu einer erhöhten Netzwerkaktivität im *Bulbus olfactorius*. Eine lokale Photolyse von *caged*-ATP in der glomerulären Schicht ist hierbei ausreichend um diesen Effekt zu erzielen.
- II Der Effekt von ATP auf Neurone des olfaktorischen Bulbus ist P2Y₁-Rezeptor-vermittelt und führt zu einer Exzitation von Mitralzellen.
- III Adenosin ist ebenfalls neuromodulatorisch im *Bulbus olfactorius* wirksam.
- IV Durch die Öffnung von Kaliumkanälen bewirkt Adenosin eine A₁-Rezeptor-vermittelte Hyperpolarisation von Mitralzellen.
- V Adenosin verringert die neuronale Netzwerkaktivität im *Bulbus olfactorius* durch eine verminderte Aktivität von Mitralzellen. Zusätzlich vermindert Adenosin die rekurrente Inhibition von Mitralzellen, durch eine verminderte Glutamatausschüttung seitens der Mitralzelle.
- VI Adenosin verbessert das Signal-Rausch-Verhältnis des Mitralzell-*output*, der durch Stimulation olfaktorischer Rezeptorneurone generiert wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen damit einen Einfluss von ATP/ADP und Adenosin auf die integrativen Eigenschaften von Neuronen des olfaktorischen Bulbus nach. Eine purinerge Neuromodulation könnte durch die beschriebenen Prozesse zu einer differenzierten Verarbeitung von Geruchsinformationen im *Bulbus olfactorius* beitragen.

V Abstract

The olfactory bulb is the first station of odor information processing. Integrated odor information is subsequently sent to higher brain areas by the projection neurons of the olfactory bulb, mitral and tufted cells. The present dissertation describes for the first time a purinergic neuromodulation in the *bulbus olfactorius* of mice. The purinergic transmitter system is unique with regard to its complexity, as not only ATP, but also its hydrolysis products ADP and adenosine, exhibit specific receptors and are neuromodulatory effective. Using electrophysiological methods, calcium imaging, and histologic studies, the following insights were gained in the course of this thesis:

- I Photolysis of caged-ATP increases the network activity in the olfactory bulb. A local photolysis of caged ATP in the glomerular layer is sufficient to achieve this effect.
- II The effect of ATP on olfactory bulb neurons is P2Y₁ receptor mediated and leads to an excitation of mitral cells.
- III Adenosine is also neuromodulatory effective in the olfactory bulb.
- IV Adenosine causes an A₁-receptor-mediated hyperpolarization of mitral cells by opening of potassium channels.
- V Adenosine reduces the neuronal network activity in the olfactory bulb by reducing the spontaneous firing activity of mitral cells. Additionally adenosine reduces the recurrent inhibition of mitral cells by means of a reduced glutamate release from mitral cells.
- VI Adenosine improves the signal-to-noise ratio for olfactory receptor-neuron-dependent mitral cell output.

Accordingly, the results of this thesis provide evidence for an influence of ATP/ADP and adenosine on the information processing properties of olfactory bulb neurons. Through the outlined mechanisms a purinergic neuromodulation possibly serves for a differentiated processing of olfactory information in the olfactory bulb.

1. Einleitung

1.1 Der olfaktorische Sinn

Gerüche eröffnen eine vielfältige Welt der Wahrnehmung. Sie spielen eine unverzichtbare Rolle bei der zwischen- und innerartlichen Kommunikation, bei der Partnersuche, dem Erkennen von Gefahren sowie der Beurteilung von Nahrungsquellen. Wie kaum ein anderer Sinnesindruck beeinflussen Gerüche unmittelbar emotionale Stimmungen und Handlungen. Sie begleiten und ermöglichen dadurch Leben in der Form, wie wir es kennen.

Um diese vielfältigen Aufgaben erfüllen und Gerüche zuverlässig detektieren zu können, stellt der olfaktorische Sinn ein komplexes System neuronaler Verarbeitung dar, das darauf spezialisiert ist, Geruchsmoleküle auch in kleinsten Mengen zu detektieren und zu unterscheiden. Das olfaktorische System ist bei Säugetieren in mehrere funktionelle Einheiten unterteilt. Im Riechepithel und im Vomeronasalorgan werden Geruchsmoleküle detektiert. Der *Bulbus olfactorius* stellt die erste Station der zentralnervösen Integration der Geruchsinformationen dar, nachgeschaltete Hirnregionen übernehmen die darauffolgende Interpretation der Geruchsinformation (Shipley und Ennis, 1996).

1.1.1 Die synaptische Organisation des *Bulbus olfactorius* der Maus

Der olfaktorische Bulbus ist eine evolutiv alte Struktur, dessen grundlegender Aufbau über verschiedene Taxa hinweg eine ähnliche Organisation aufweist (Satou et al., 2005). Insgesamt stellt der synaptische Aufbau des *Bulbus olfactorius* mit einer sehr hohen Anzahl an reziproken Synapsen eine Besonderheit unter den Sinnessystemen dar (Crespo et al., 2013). Der olfaktorische Bulbus zeigt morphologisch eine deutliche Schichtung der verschiedenen Zellpopulationen und wurde deswegen vielfach als Modellsystem für die Untersuchung neuronaler Netzwerke herangezogen (Nicoll, 1971). Zunehmend zeigt sich jedoch die Bedeutung der ungeahnt komplexen subzellulären Organisation des Netzwerks für die Geruchsprozessierung.

Die Detektion von Geruchsmolekülen findet in der Nasenhöhle statt, welche mit dem olfaktorischen Epithelium ausgekleidet ist. Hier gelangen die meist flüchtigen Geruchsmoleküle in die Mukusschicht und binden, häufig unter der Beteiligung von Odorant-Bindeproteinen (Pelosi et al., 2014), an die Cilien der olfaktorischen Rezeptor-Neurone (ORNs), welche sich im olfaktorischen Epithelium befinden. Auf diesen spezialisierten Neuronen befindet sich jeweils ein spezifischer Typ von Geruchsrezeptoren. Die Genklasse der Geruchsrezeptoren bildet mit ihren etwa 1000 Rezeptoren (bei Mäusen) die größte Genfamilie im Erbgut der Säugetiere (Spehr und Munger, 2009). Jedes ORN exprimiert nur einen Subtyp dieser Rezeptoren und bindet die verschiedenen Klassen von Duftmolekülen unterschiedlich gut, wobei derselbe Geruchsstoff durchaus mehrere Rezeptortypen aktivieren kann (Malnic et al., 1999). Durch Bindung des

Duftmoleküls an einen dieser metabotropen Rezeptoren kommt es zur Aktivierung eines speziellen G-Proteins (G_{olf}), was zu einer G_{olf} -vermittelten Aktivierung der Adenylatcyclase III führt. Diese vermittelt, über das Signalmolekül c-AMP, die Öffnung c-AMP-abhängiger Kationenkanäle. Diese Kationenkanäle depolarisieren, zusammen mit sich daraufhin öffnenden Chloridkanälen, die zu einem Ausstrom von Chloridionen führen, die Zellmembran des Neurons und führen beim Überschreiten des Schwellenpotentials letztendlich zu der Entstehung von Aktionspotentialen (Schild und Restrepo, 1998; Frings, 2001). Über die Axone der ORNs gelangen die Aktionspotentiale, die die Geruchsinformation codierenden, durch die Siebplatte in das zentrale Nervensystem bzw. den olfaktorischen Bulbus. Auf ihrem Weg in den *Bulbus olfactorius* werden die Axone entsprechend ihres exprimierten Rezeptortyps in Bündeln zusammengefasst. Sortiert und geleitet werden sie hierbei von einem spezialisierten Gliazelltyp, den olfaktorischen Hüllgliazellen. Diese stehen in einem direkten, wechselseitigen Kontakt zu den Axonen und kommen entlang der Axone bis in die erste Schicht des olfaktorischen Bulbus, der sogenannten olfaktorischen Nervenfaserschicht, hinein vor (Shipley et al., 2004).

Wie auch andere kortikale Strukturen ist der olfaktorische Bulbus in mehreren Schichten aufgebaut. Auf die olfaktorische Nervenfaserschicht folgt die Glomerularschicht, nach der sich die äußere plexiforme Schicht, die Mitralzellschicht, die innere plexiforme Schicht und schließlich der innerste Teil, die Körnerzellschicht, anschließen (Abbildung 1) (Golgi, 1875; Cajal, 1911). Als erste Station der Integration von Geruchseindrücken wird im olfaktorischen Bulbus die Informationsfülle tausender, teils zeitgleich eintreffender Geruchssignale erstmals integriert. Ein erster Schritt hierbei ist, nach der vorhergehenden Sortierung der Axone der ORNs nach ihrem jeweiligen Rezeptortyp in der olfaktorischen Nervenfaserschicht, die Konvergenz der Axonbündel auf je zwei sogenannte Glomeruli pro olfaktorischen Bulbus. Bei der Ratte konvergieren ca. 1000 ORN-Axone eines Rezeptortyps auf einen Glomerulus (Christie und Westbrook, 2003). Die Glomeruli bezeichnen runde, stark Neuropil haltige Strukturen, die von periglomerulären Zellen umgeben sind und in denen die Axone der ORNs enden und mit nachgeschalteten Neuronen des olfaktorischen Bulbus Synapsen bilden (Shipley et al., 2004). Bei Mäusen finden sich pro Bulbus ca. 2000 Glomeruli, die, der sphärischen Organisation des *Bulbus olfactorius* folgend, Glomerularschicht. Da die Aktivität einzelner Glomeruli aufgrund der Rezeptorspezifität geruchsabhängig ist, ergibt sich für jeden Duft, beziehungsweise jedes Duftgemisch, ein charakteristisches Aktivierungsmuster von Glomeruli, das als *olfactory code* bezeichnet wird (Mombaerts et al., 1996). In jedem Glomerulus konvergieren die Axone der ORN auf ca. 10-30 Mitralzellen und ca. 50-80 *tufted*-Zellen (Shepherd, 1972; Shipley et al., 2004). Die Zellkörper der Mitralzellen liegen dabei in einer einlagigen Zellschicht (Mitralzellschicht) zwischen der sogenannten äußeren plexiformen Schicht und der inneren plexiformen Schicht (Abbildung 1).

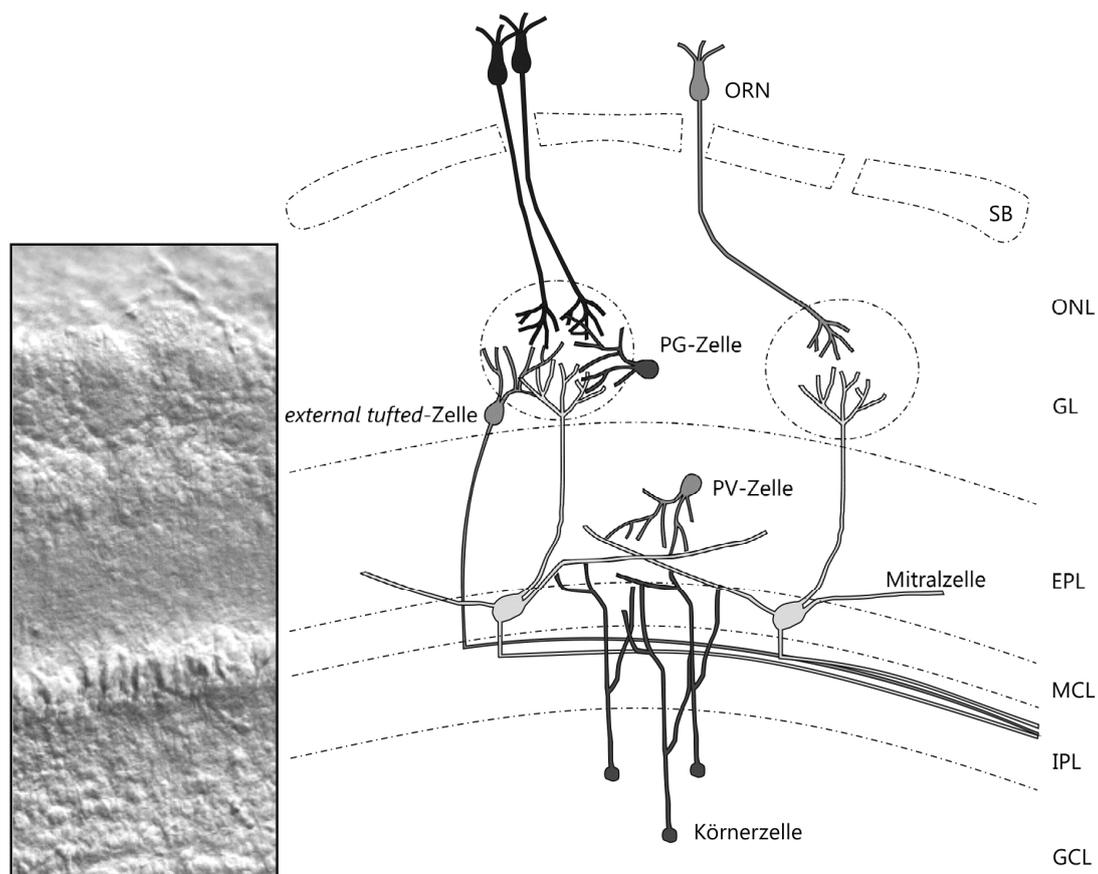


Abbildung 1 | Neuronaler Aufbau des olfaktorischen Bulbus der Maus. Frischer Gewebeschnitt (links) und schematische Übersicht der synaptischen Organisation des *Bulbus olfactorius* (rechts). Olfaktorische Rezeptorneurone (ORN) senden ihre Axone durch die Siebplatte (SB) in die olfaktorische Nervenfaserschicht (ONL). In der Glomerularchicht (GL) bilden sie Synapsen mit periglomerulären Zellen (PG-Zellen), *tufted*-Zellen und Mitralzellen. Mitralzellen finden sich in einem Zellband in der Mitralzellschicht (MCL). Mitral- und *tufted*-Zellen senden ihre Axone entlang der inneren plexiformen Schicht (IPL) in höhere Hirnzentren. In der äußeren plexiformen Schicht (EPL) befinden sich u.a. Synapsen zwischen in der Körnerzellschicht (GCL) liegenden Körnerzellen und Mitralzellen und in der EPL liegenden Parvalbumin-positiven Zellen (PV-Zellen).

1.1.1.1 Mitralzellen

Mitralzellen senden als primäre Projektionsneurone die im olfaktorischen Bulbus integrierte Geruchsinformation in höhere Hirnzentren und stellen damit, neben den *tufted*-Zellen, die Prinzipalneurone des Bulbus dar. Sie haben eine hochspezialisierte, charakteristische Morphologie und reichen mit ihrem primären Dendriten in der Regel in je einen einzigen Glomerulus. Dort bildet der primäre Dendrit eine stark verzweigte Struktur, die als *tuft* bezeichnet wird. Hier finden die Übertragung der Geruchsinformation von ORNs an die Mitralzellen sowie der erste Teil der synaptischen Verarbeitung statt. Den zweiten Ort der synaptischen Integration stellen die lateralen Dendriten der Mitralzelle dar, die sich seitlich vom Zellsoma abzweigend in verschiedenen Schichten der äußeren plexiformen Schicht ausbreiten und Synapsen mit verschiedenen Interneuronen des olfaktorischen Bulbus ausbilden. Mitralzellen haben somit zwei Aufgaben: Einerseits verarbeiten sie

die einkommende Geruchsinformation, andererseits leiten sie die integrierte Geruchsinformation in höhere Hirnzentren weiter. Von dem ca. 20 µm großen, leicht länglichen Soma geht das einzelne Axon der Mitralzelle ab, welches sich in der inneren plexiformen Schicht bis in den Lateralen olfaktorischen Trakt zieht und von dort aus in weitere Hirnzentren projiziert (Shepherd, 1972). Es gibt Hinweise darauf, dass es innerhalb der Gruppe der Mitralzellen, trotz ihrer primär gleichen Funktion als Projektionsneurone des olfaktorischen Bulbus und ihrer anatomischen Ähnlichkeit und Lage, unterschiedliche Subpopulationen gibt. So führt beispielsweise bei Hamstern die Projektion der lateralen Dendriten in unterschiedliche Lagen der äußeren plexiformen Schicht zu morphologisch unterscheidbaren Populationen und zu einer synaptischen Verknüpfung mit unterschiedlichen Subpopulationen von Körnerzellen (Macrides und Stephen, 1982). Des Weiteren gibt es Studien in Ratten, die physiologische Unterschiede in der Ausprägung des HCN-Stroms und des spontanen Aktionspotential-Musters bei verschiedenen Subpopulationen von Mitralzellen beschreiben (Nica et al., 2010; Angelo und Margrie, 2011). Die Bedeutung dieser Subpopulationen für die Informationsverarbeitung im *Bulbus olfactorius* ist noch unklar, insgesamt scheint die Verarbeitung der Geruchsinformation auf zellulärer Ebene komplexer reguliert zu sein als bisher angenommen (Nica et al., 2010).

Mitralzellen und *tufted*-Zellen werden oftmals als Mitral/*tufted*-Zellen bzw. MC/TC zusammengefasst, da es lange keine Unterscheidungskriterien, abgesehen von der unterschiedlichen Lokalisation der Zellen in der Mitralzellschicht bzw. in der äußeren plexiformen Schicht, gab und angenommen wurde, dass sie als Gruppe der Projektionsneurone des *Bulbus olfactorius* eine ähnliche Funktion ausüben. In dieser Arbeit werden Mitral- und *tufted*-Zellen jedoch nicht zusammengefasst, da sie neueren Erkenntnissen zufolge physiologisch unterschieden werden können. Sie unterscheiden sich u.a. in den Bereichen des olfaktorischen Cortex, die sie innervieren, sowie in ihrer Reaktion auf eine anti- bzw. orthodrome Stimulation. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass sie parallele, funktionell getrennte Wege der Geruchsverarbeitung bilden (Shepherd, 1972; Macrides et al., 1985; Burton und Urban, 2014).

Mitralzellen weisen spezielle elektrophysiologische Eigenschaften auf. Sie haben, im Gegensatz zu vielen anderen Neuronen, rücklaufende Aktionspotentiale, welche sich aktiv in ihre Dendriten hinein ausbreiten. Dieser Mechanismus ist wichtig, um Transmission an den dendrodendritischen Synapsen zu ermöglichen (Bischofberger and Jonas, 1997). Eine hohe Dichte an A-Typ-Kaliumkanälen und spannungsgesteuerten Natriumkanälen in Mitralzell-Dendriten scheint hierbei eine wichtige Rolle zu spielen (Christie und Westbrook, 2003). Eine Vielzahl von Mitralzellen zeigt zudem eine sogenannte Membranbistabilität (Heyward et al., 2001). Hierbei wechselt das Membranpotential spontan zwischen zwei Zuständen, einem relativ depolarisierten ‚*upstate*‘ und einem leicht hyperpolarisierten ‚*downstate*‘. Mitralzellen im *upstate* reagieren mit einer schnelleren Aktionspotentialfrequenz auf ORN-*input*. Außerdem kann sich der ‚*state*‘ durch die Stimulation von ORN-Axonon ändern (Heyward et al., 2001). Die Eigenschaft der Membranbistabilität erlaubt es einzelnen Mitralzellen vermutlich, Zustände mit variierender Erregungs-Schwelle und oszillatorischem Rhythmus auszubilden (Llinas, 1988).

Mit der Geburt sind die grundlegenden morphologischen Eigenschaften von Mitralzellen bereits ausgebildet. Bei Mäusen kommt es jedoch in der Phase des ‚*cell refinements*‘ bis zum 30. Tag nach der Geburt noch zu einigen morphologischen und physiologischen Veränderungen. Am fünften postnatalen Tag finden sich noch einige Mitralzellen mit mehreren primären Dendriten. Auch sind die lateralen Dendriten noch nicht voll ausgebildet und bis zum 30. Tag nach der Geburt nimmt die Anzahl an Synapsen im olfaktorischen Bulbus noch stetig zu (Blanchart et al., 2006). In den ersten Wochen nach der Geburt finden außerdem grundlegende physiologische Änderungen statt. In Ratten nimmt die spontane Aktivität von Mitralzellen von der Geburt an bis ins Erwachsenenalter zu (Shafa et al., 1981). Die laterale Inhibition der Mitralzellen durch Körnerzellen verringert sich abrupt nach der zweiten postnatalen Woche (Wang et al., 2005). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass in den ersten zwei Wochen nach der Geburt GABAerge Eingänge in Körnerzellen zu einer Depolarisation führen und somit zu einer Exzitation der Körnerzelle. GABA wirkt in dieser Phase exzitatorisch, da Körnerzellen zu dieser Zeit noch einen erhöhten intrazellulären Chloridspiegel im Vergleich zu adulten Tieren aufweisen und eine Öffnung von Chloridkanälen somit zu einem Ausstrom von Chlorid führt (Wang et al., 2005). Im weiteren Verlauf der Entwicklung sinkt die intrazelluläre Chloridkonzentration in Körnerzellen, und GABAerge Eingänge bewirken eine Hyperpolarisation. Dieser sogenannte ‚*chloride switch*‘, bei dem Signale, die im Erwachsenenalter inhibitorisch wirken, zu einer Exzitation führen, tritt häufig bei einigen Neuronentypen in juvenilen Tieren auf. GABAerge Eingänge erhalten Körnerzellen von GABAergen *short axon*-Zellen die in der Körnerzellschicht liegen. Eine zweite, aber im Gegensatz hierzu glutamaterge Zellpopulation von *short axon*-Zellen findet sich in der glomerulären Schicht (Shipley und Ennis, 1996). Mitralzellen weisen in der Zeit nach der Geburt bereits eine normale intrazelluläre Chloridkonzentration auf und GABAerge Signale wirken inhibitorisch auf sie (Wang et al., 2005). Ihre Morphologie, die es ihnen ermöglicht, synaptische Informationen von verschiedensten Zellen und aus weiten Teilen des olfaktorischen Bulbus zu integrieren, verleiht Mitralzellen eine zentrale Stellung im System des olfaktorischen Bulbus und macht sie (neben *tufted*-Zellen) zu dem zentralen Ort synaptischer Integration in diesem Gehirngebiet.

1.1.1.2 Synaptische Integration in der äußeren plexiformen Schicht

Die lateralen Dendriten der Mitralzellen erstrecken sich in die äußere plexiforme Schicht, die zwischen der Mitralzellschicht und der Glomerularschicht liegt. Die äußere plexiforme Schicht bildet die Basis für eine interglomeruläre Inhibition und ermöglicht dadurch eine Kontrastverschärfung von Geruchsreizen (Yokoi et al., 1995). Diese Schicht enthält nur wenige Zellkörper, ist aber, neben der Glomerularschicht, der Hauptort für synaptische Verschaltungen im *Bulbus olfactorius*. An Zelltypen finden sich hier vor allem die Somata der *tufted*-Zellen und Parvalbumin-positiven Interneurone (PV). *Tufted*-Zellen weisen mit einem apikalen Dendriten, der mit einem *tuft* in einem Glomerulus endet, lateralen Dendriten und einem Axon eine ähnliche Morphologie wie Mitralzellen auf. Die Organisation der lateralen Dendriten der *tufted*-Zellen ist dabei sehr variabel (Shipley et al., 2004). Eine unterschiedliche Lage der *tufted*-Zellsomata unterteilt diese Zellgruppe in weitere Untergruppen. *Tufted*-Zellen, die sich im Bereich der äußeren

plexiformen Schicht nahe der Mitralzellsomata befinden, werden als tiefe, die im mittleren Bereich der äußeren plexiformen Schicht als mittlere *tufted*-Zellen bezeichnet. *Tufted*-Zellen, die am äußeren Rand der externen plexiformen Schicht bzw. schon in der Glomerularschicht liegen, werden als *external tufted*-Zellen (eTCs) bezeichnet. *Tufted*-Zellen gehören neben den Mitralzellen zu den Projektionsneuronen des olfaktorischen Bulbus. Bei allen weiteren Zelltypen des *Bulbus olfactorius* handelt es sich um lokale Interneurone (Shepherd, 1972). Die Parvalbumin-positiven Interneurone in der äußeren plexiformen Schicht sind morphologisch und physiologisch heterogen und lassen sich in bis zu fünf Gruppen unterteilen. Insgesamt haben sie ein etwas kleineres Soma als Mitral- und *tufted*-Zellen und besitzen ein stark verzweigtes und weitläufiges Netz an Dendriten in der äußeren plexiformen Schicht (Kosaka et al., 1994). Sie bilden ausgeprägte reziproke Synapsen mit Dendriten von Mitralzellen aus, die eine hohe Konnektivität aufweisen (Kato et al., 2013).

Ein großer Anteil an dendritischen Synapsen in der äußeren plexiformen Schicht wird von den Dendriten der Körnerzellen gebildet. Dieser Zelltyp bildet den Hauptteil der innersten Schicht und die größte Zellpopulation im *Bulbus olfactorius* (Shiple et al., 2004). Sie besitzen verhältnismäßig kleine, rundliche Somata mit einer Größe von ca. 3-5 μM . Es handelt sich um axonlose Interneurone, die mit ihren Dendriten in die externe plexiforme Schicht reichen und dort größtenteils dendrodendritische, reziproke Synapsen mit Mitralzellen ausbilden. Körnerzellen sind in Paketen von drei bis fünf Zellen organisiert, welche untereinander durch *gap junctions* gekoppelt sind, was vermutlich dazu dient ihre Aktivität zu synchronisieren (Reyher et al., 1991). Unterschiedlich tief in der Körnerzellschicht liegende Körnerzellen kontaktieren verschiedene Ebenen der externen plexiformen Schicht und erreichen dadurch in dieser Schicht laterale Dendriten verschiedener Mitralzell-Subpopulationen (Mouradian und Scott, 1988). Körnerzellen bilden unter den Mitralzellen, die in einen Glomerulus reichen, sogenannte Säulen (*columns*), die synaptische Integration in Blöcken unterhalb des jeweiligen Glomerulus organisieren. Die Säulen reichen durch alle Schichten des olfaktorischen Bulbus hindurch (Willhite et al., 2006). Parvalbumin-positive Zellen sorgen auf der Ebene der externen plexiformen Schicht für eine Quervernetzung der unterschiedlichen Säulen, indem sie gleichzeitig Dendriten von Mitral- bzw. *tufted*-Zellen unterschiedlicher Glomeruli kontaktieren (Kato et al., 2013).

Glutamat und GABA sind die wichtigsten Neurotransmitter des olfaktorischen Bulbus. Dabei sind die sogenannten *short axon*-Zellen in der Glomerularschicht die einzigen lokalen Interneurone, die Glutamat als Neurotransmitter verwenden, der ansonsten nur von den ORNs sowie Mitral- und *tufted*-Zellen ausgeschüttet wird. Alle übrigen Interneurone des olfaktorischen Bulbus verwenden GABA als primären Neurotransmitter (Shiple et al., 2004). Die korrekte Prozessierung eingehender Geruchsinformation beruht auf dem außerordentlich fein abgestimmten Gleichgewicht zwischen diesen beiden Neurotransmittern der Exzitation und Inhibition. Ein Charakteristikum der synaptischen Organisation des olfaktorischen Bulbus ist die hohe Anzahl reziproker Synapsen. In der äußeren plexiformen Schicht sind ca. 80 % aller Synapsen reziprok (Shepherd, 1972). An den reziproken Synapsen kommt es zu einem Kreislauf von Inhibition und Exzitation. Beginnend mit einer Glutamatausschüttung an den lateralen Dendriten der Mitralzelle aufgrund einer Erregung reagiert ein synaptisch verbundenes, inhibitorisches Interneuron auf die Glutamatausschüttung mit

der Ausschüttung von GABA, welches sodann inhibitorisch auf die Mitralzelle zurückwirkt. Eine erste grundlegende Beschreibung dieser rekurrenten Inhibition fand im olfaktorischen Bulbus des Kaninchens statt (Phillips et al., 1963; Nicoll, 1969). Die Prozesse sind mittlerweile jedoch auch in der Maus detailliert beschrieben. Da die Inhibition der Mitralzelle nicht an klassischen axodendritischen Synapsen stattfindet, sondern beide Synapsen auf Dendriten lokalisiert sind, spricht man in diesem Fall auch von einer dendrodendritischen Inhibition (DDI). Welche Typen von Interneuronen genau mit welchem Anteil an der rekurrenten Inhibition auf Mitralzellen beteiligt sind ist noch unklar. Bis heute gehen viele Publikationen davon aus, dass der überwiegende Anteil der rekurrenten Inhibition von Körnerzellen vermittelt ist (Isaacson und Strowbridge, 1998), weshalb sich ein Großteil der verfügbaren Literatur auf die bei Körnerzellen auftretenden Mechanismen bezieht. An dieser Stelle wird daher vereinfachend vom Mechanismus an der Körnerzellsynapse gesprochen. Neuere Veröffentlichungen weisen jedoch darauf hin, dass auch Parvalbumin-positive Zellen der äußeren plexiformen Schicht einen erheblichen Anteil an der rekurrenten Inhibition haben (Kato et al., 2013) und dass außerdem auch in der Glomerularschicht rekurrente Inhibition stattfindet (Gire und Schoppa, 2009). Der Mechanismus der rekurrenten Inhibition verläuft wie folgt: An Dendriten der Mitralzellen einlaufende Aktionspotentiale führen zur Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt. Glutamat wiederum bindet an AMPA- und NMDA-Rezeptoren auf der Körnerzellmembran. Das Aktivieren dieser ionotropen Rezeptoren führt zu einem exzitatorischen postsynaptischen Potential (EPSP) in der Körnerzelle (Wellis und Kauer, 1993). AMPA -Rezeptoren vermitteln hierbei eine schnelle Komponente, die durch ihre initiale Depolarisation die zusätzliche Aktivierung von NMDA-Rezeptoren ermöglicht. Bei Körnerzellen spielen insbesondere NMDA-Rezeptoren eine Rolle, die im Gegensatz zu AMPA-Rezeptoren zusätzlich durchlässig für Calcium sind und dadurch die Calcium-vermittelte GABA-Freisetzung maßgeblich unterstützen (Mayer und Westbrook, 1987). Beide Rezeptoren tragen zur dendrodendritischen Inhibition bei, da es durch die entstandene Depolarisation zu einer Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle und damit zu einem Calciumeinstrom kommt, der zu der vesikulären Freisetzung von GABA führt. GABA bindet wiederum an GABA_A-Rezeptoren auf den Mitralzeldendriten, was zu einem Chlorideinstrom und einem daraus resultierenden inhibitorischen postsynaptischen Potential (IPSP) führt (Mayer et al., 1984; Isaacson und Strowbridge, 1998). Bei der durch Parvalbumin-positive Zellen vermittelten rekurrenten Inhibition sind, im Gegensatz zum Körnerzell-vermittelten Vorgang, vorrangig calciumpermeable AMPA-Rezeptoren involviert (Kato et al., 2013; Miyamichi et al., 2013). Zusätzlich zu GABA-Rezeptoren finden sich auf der Mitralzelle auch Glutamatrezeptoren, die einen Prozess der Autoexzitation ermöglichen. Dadurch kommt es, bei einer großen Menge an freigesetztem Glutamat, an der Mitralzelle selbst zur Exzitation, da Glutamat an Mitralzell-eigene NMDA-Rezeptoren bindet (Salin et al., 2001).

Eine Verbindung von Mitralzellen untereinander sowie zwischen Mitral- und *tufted*-Zellen über *gap junctions* ist zwar vorhanden, deren Einfluss auf die Geruchsverarbeitung im olfaktorischen Bulbus ist jedoch noch fraglich (Kosaka et al., 2005). Außerdem ist noch unklar, ob es in der externen plexiformen Schicht eine dendrodendritische, synaptische Verbindung von Mitralzellen und *tufted*-

Zellen gibt. Axonkollaterale der Mitral- und *tufted*-Zellen projizieren auf sich selbst bzw. auf andere Mitral- und *tufted*-Zellen. Neben einer Autoexzitation durch Glutamat-*spillover* und einer Erregungsweiterleitung über elektrische Synapsen zwischen Mitralzellen kommt es durch diese Axonkollaterale zu einem zusätzlichen exzitatorischen Eingang in Mitral- und *tufted*-Zellen (Nicoll, 1971).

1.1.1.3 Synaptische Integration in der Glomerularschicht

Der zweite wichtige Ort synaptischer Verschaltung im olfaktorischen Bulbus ist die Glomerularschicht. Hier finden sich verschiedene juxtglomeruläre Neurone, die axonalen Endigungen der ORNs, sowie *tufts* von Mitral- und *tufted*-Zellen. Somata, welche die glomerulären Strukturen unmittelbar umgeben und dadurch voneinander abgrenzen, werden klassischerweise in periglomeruläre Zellen (PG), *short axon* Zellen (sAC) und *external tufted*-Zellen (eTC) eingeteilt. Bei periglomerular-Zellen handelt es sich um GABAerge Interneurone, die eine morphologisch und physiologisch heterogene Zellpopulation darstellen. Die glutamatergen, sogenannten *short axon*-Zellen sind ebenfalls Interneurone und zeichnen sich dadurch aus, dass sie mit ihrem Axon periglomeruläre Neurone anderer Glomeruli innervieren. Sie sorgen dadurch für eine Quervernetzung unterschiedlicher Glomeruli (Wachowiak und Shipley, 2006; Panzanelli et al., 2007).

Die synaptischen Verbindungen der unterschiedlichen Zelltypen eines Glomerulus sind sehr komplex. Es gibt unterschiedliche Wege der interglomerulären Signaltransduktion, die abhängig von unterschiedlichen Faktoren, wie z.B. der Stärke eines Geruchsreizes, sind. Grundsätzlich können vier Hauptverschaltungsmuster charakterisiert werden (Wachowiak und Shipley, 2006), die im Folgenden kurz beschrieben werden. 1) Ein möglicher Mechanismus der synaptischen Integration ist eine glutamaterge, monosynaptische Übertragung von ORNs zu Mitral- und *tufted*-Zellen über AMPA-, NMDA- und mGluR₁-Rezeptoren. Diese führt wiederum über dendrodendritische Synapsen zur glutamatergen Erregung periglomerulärer Zellen, welche daraufhin GABA freisetzen, was zu einer GABA_A-Rezeptor-vermittelten *feedback*-Inhibition der Mitral- und *tufted*-Zellen führt (Ennis et al., 1996; Wachowiak und Shipley, 2006). 2) Parallel dazu führt eine direkte synaptische Verbindung von ORNs zu periglomerulären Zellen bei einem Geruchsreiz zu einer GABA- und/oder Dopamin-Freisetzung aus periglomerulären Zellen, die einerseits präsynaptisch die Glutamatausschüttung der ORNs inhibiert und andererseits eine Inhibition von Mitral- und *tufted*-Zellen bewirkt (Wachowiak und Shipley, 2006; Panzanelli et al., 2007). 3) Eine große Bedeutung kommt der monosynaptischen Erregung von *external tufted*-Zellen durch ORNs zu. *External tufted*-Zellen treiben das gesamte Netzwerk des jeweiligen Glomerulus an. Es gibt Hinweise darauf, dass dieser Weg der Signalweiterleitung im Glomerulus bei Geruchsreizen leichter bis mittlerer Intensität hauptsächlich auftritt und es nur bei starken Geruchsreizen tatsächlich zu einer monosynaptischen Übertragung zwischen ORNs und Mitralzellen kommt (Wachowiak und Shipley, 2006; De Saint Jan et al., 2009; Gire et al., 2012). *External tufted*-Zellen treiben zudem durch die Synchronisation synaptischer Aktivität die sogenannten *population bursts*

an, die sich als rhythmisch wiederkehrende synaptische Aktivität in Mitralzellen widerspiegeln (Shirley et al., 2010; Gire et al., 2012). 4) Ein weiterer möglicher Mechanismus findet unter der Beteiligung von *short axon*-Zellen statt. Diese sind nicht monosynaptisch mit ORNs verbunden, werden jedoch über *external tufted*-Zellen aktiviert, was wiederum zu einer glutamatergen Erregung periglomerulärer, inhibitorischer Neurone eines anderen Glomerulus führen kann. Eine starke Aktivierung des glomerulären Netzwerks resultiert somit in einer Inhibition umgebender Glomeruli. Dieser Prozess ermöglicht eine Schärfung starker Geruchsreize durch die gleichzeitige Unterdrückung anderer niederschwelliger glomerulärer Aktivierungen (Wachowiak und Shipley, 2006)

Diese Vielzahl unterschiedlicher glomerulärer Verschaltungen bildet zusammen mit den Vorgängen in der äußeren plexiformen Schicht ein hochkomplex reguliertes Netzwerk, welches eine präzise zeitliche und räumliche Verarbeitung der Geruchsinformationen ermöglicht. Der olfaktorische Bulbus wirkt hierbei wie ein Signalfilter, da niederschwellige Geruchsreize unterdrückt und überschwellige verstärkt werden (Mori et al., 1999).

1.1.1.4 Gliazellen sowie Afferenzen und Efferenzen im olfaktorischen Bulbus

Zusammen mit der synaptischen Aktivität lokaler Neurone im olfaktorischen Bulbus wirken über Zentrifugalfasern aus anderen Hirnzentren weitere modulatorische Einflüsse auf die Verarbeitung der Geruchsinformation im *Bulbus olfactorius*. Dabei gibt es drei Haupttypen von zentrifugalen Verbindungen in den Bulbus hinein, jede assoziiert mit einem spezifischen Neurotransmitter. Noradrenalin enthaltende Fasern kommen aus dem *Locus coeruleus* und enden in der Glomerular- und Körnerzellschicht sowie der inneren plexiformen Schicht. Vermutlich führen sie zu einer verringerten Inhibition auf Mitralzellen (Trombley und Shepherd, 1993). Serotonin haltige Fasern aus den Raphekernen enden in unterschiedlichen Schichten des Bulbus. Ihr Einfluss auf die neuronale Verarbeitung ist unklar, der Einfluss auf Mitralzellen scheint jedoch insgesamt eher inhibitorisch zu sein (Shepherd, 1972). Cholinerge Fasern stammen aus dem basalen Vorderhirn und verbreiten sich relativ gleichmäßig in alle Schichten des olfaktorischen Bulbus hinein. Ionophoretische Applikation von Acetylcholin hat größtenteils eine inhibierende Wirkung auf Mitralzellen, genauere Wirkungsweisen sind jedoch noch nicht bekannt (Bloom et al., 1971; Shepherd, 1972).

Zusätzlich zum neuronalen Netzwerk des *Bulbus olfactorius* sind auch Astrozyten am Prozess der Integration von Geruchsinformation im olfaktorischen Bulbus beteiligt. Die Rolle astrozytärer Zellen bei der Informationsverarbeitung ist jedoch, wie auch in anderen Hirnregionen, noch weitgehend ungeklärt. Einzigartig im Zentralnervensystem sind die spezialisierten OECs (*olfactory ensheathing cells*), die u.a. helfen, ORN-Axone nach ihrem Geruchsrezeptortyp zu sortieren und ihr Einwachsen in das Zentralnervensystem unterstützen, sowie spezialisierte Astrozyten, welche die primären Dendriten von Mitral- und *tufted*-Zellen umhüllen (Shepherd, 1972). Diese Art der Hülle ist ansonsten nur von Oligodendrozyten bekannt, die allerdings eine Hülle um Axone, nicht um Dendriten bilden. Eventuell steht diese astrozytäre Hülle mit den in die Dendriten zurücklaufenden

Aktionspotentialen der Mitralzellen im Zusammenhang (Shepherd, 1972). Astrozyten und OECs stehen im *Bulbus olfactorius* in einem engen Kontakt mit Neuronen und beeinflussen sich wechselseitig. Im Bereich der olfaktorischen Nervenfaserschicht übernehmen vermutlich OECs anstelle von Astrozyten die Neuro-Vaskuläre-Kopplung (Doengi et al., 2009; Thyssen et al., 2010).

Die prozessierte Geruchsinformation gelangt über die Axone der Mitral- und *tufted*-Zellen in höhere Hirnzentren. Hierbei projizieren die beiden Zelltypen in unterschiedliche Hirngebiete und bilden zwei getrennte Wege des *output* von Geruchinformation (Fukunaga et al., 2012). Axone von *tufted*-Zellen enden im vorderen Teil des piriformen Cortex und in rostralen Strukturen, Mitralzellen projizieren in den gesamten olfaktorischen Cortex. Zusätzlich gibt es eine direkte Innervation des limbischen Systems ohne eine weitere Prozessierung in anderen Hirnregionen. Gerüche haben dadurch einen direkten Einfluss auf unbewusste Prozesse (Shiple et al., 2004; Igarashi et al., 2012).

Das olfaktorische System der Säugetiere weist, im Gegensatz zu anderen Sinnessystemen, einige einzigartige Eigenschaften auf. Zum einen wachsen Axone der ORNs zeitlebens vom peripheren ins zentrale Nervensystem ein, ein Vorgang, der im Erwachsenenalter nur an dieser Stelle des Nervensystems stattfindet (Graziadei und Graziadei, 1979). Zum anderen ordnen sich die ORN-Axone beim Eintritt in das Zentralnervensystem um, wohingegen in anderen Sinnessystemen benachbarte Rezeptorneurone topographisch auf benachbarte nachfolgende Projektionsneurone verschaltet sind (Shiple und Ennis, 1996). Außerdem ist der olfaktorische Bulbus neben dem Hippocampus das einzige Gehirneareal, in dem sich Neurone zeitlebens neu in das bestehende neuronale Netzwerk integrieren. Die Neurogenese findet in der subventrikulären Zone statt, danach wandern die unreifen Neurone über den rostralen migratorischen Strom in den olfaktorischen Bulbus ein (Graziadei und Graziadei, 1979; Lois und Alvarez-Buylla, 1994; Gheusi et al., 2013).

1.2 Purinerge Neurotransmission und Neuromodulation

Eine schnelle synaptische Übertragung ist die Basis für Informationsweiterleitungen im Nervensystem. Flexibilität erhält das neuronale System über die Wirkung von Neuromodulatoren. Diese regulieren die integrativen Eigenschaften von Neuronen abseits einer schnellen synaptischen Übertragung. Neuromodulation kann hierbei sowohl eine globale Kontrolle von neuronalen Zuständen als auch eine lokale Modulationen synaptischer Prozesse vermitteln. Viele unterschiedliche Substanzen können neuromodulatorisch aktiv sein (Nadim und Bucher, 2014). Das Vorhandensein einer Purin-basierten Neuromodulation wurde erstmals Anfang der 70iger Jahre von Geoffrey Burnstock beschrieben. Bis zu diesem Zeitpunkt fanden die Purine ATP, ADP und Adenosin vor allem im Zusammenhang mit dem Energiestoffwechsel und dem Aufbau von Ribonukleinsäuren Beachtung. Neben einer wichtigen Funktion im Zellstoffwechsel ist jedoch mittlerweile die ubiquitäre Verbreitung dieser Stoffe als extrazelluläre Signalmoleküle unstrittig. Die Erforschung der purinergen Neuromodulation hatte ihren Anfänge im peripheren Nervensystem des Meerschweinchens (Burnstock et al., 1972), bald darauf folgte jedoch die Postulierung einer

neuromodulatorischen Wirkung von Purinen auch im Zentralnervensystem sowie die Entdeckung eigener Rezeptorklassen (Shimizu et al., 1975; Burnstock, 1976). Es dauerte jedoch noch einige Zeit, bis sich das Forschungsfeld der purinerger Neuromodulation gegen die Lehrmeinung durchsetzte, Purine könnten nicht als Neurotransmitter bzw. -modulatoren dienen. Heutzutage ist die zentrale Bedeutung purinerger Neuromodulation in allen Bereichen der neuronalen Verarbeitung anerkannt und es findet eine vielfältige Forschung auf diesem Gebiet statt (Burnstock, 2013). Die Rezeptoren von ATP und seinen Abbauprodukten, ADP und Adenosin, können in die zwei Großgruppen der P1- und P2-Purinrezeptoren eingeteilt werden (Abbildung 2).

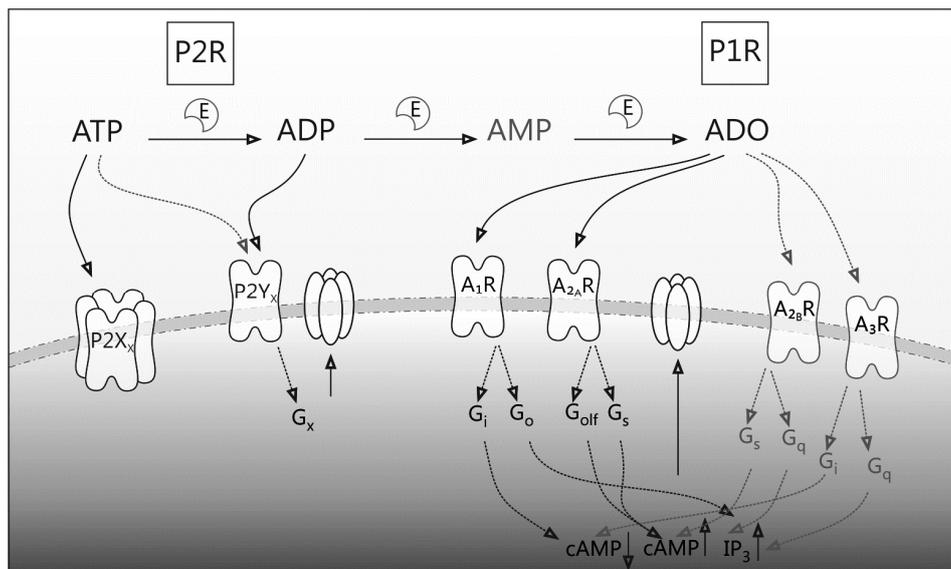


Abbildung 2 | Schema; Liganden und Typen purinerger P1- und P2-Rezeptoren. ATP wird durch verschiedene Enzyme (z.B. Nukleotidasen) (E) extrazellulär zu ADP, AMP und Adenosin (ADO) abgebaut. Diese Substanzen sind Liganden für bestimmte Klassen von purinerger Rezeptoren. ATP und ADP binden an P2Y- und P2X-Rezeptoren, ADO an hochaffine A₁- und A_{2A}-Rezeptoren (A₁R und A_{2A}R) sowie an niederaffine A_{2B}- und A₃-Rezeptoren (A_{2B}R und A₃R). P1- und P2Y-Rezeptoren modulieren über die Aktivierung verschiedener G-Proteine diverse intrazelluläre Signalkaskaden.

1.2.1 P1-Rezeptoren

Die Gruppe der P1-Rezeptoren bindet Adenosin als intrinsischen Liganden. Es handelt sich hierbei um G-Protein-gekoppelte metabotrope Rezeptoren, die sieben Transmembrandomänen aufweisen (Burnstock, 1978, 2013). P1-Rezeptoren werden in vier Untergruppen eingeteilt. A₁-Rezeptoren sind hochaffin für ihren Liganden Adenosin und ubiquitär im peripheren sowie im zentralen Nervensystem und in vielen anderen Geweben zu finden. Sie sind oftmals G_i-Protein-gekoppelt und führen durch ihre Aktivierung zu einer Hemmung der Adenylatcyclase, was einen reduzierten intrazellulären cAMP-Spiegel zur Folge hat (Fredholm, 1995). A₁-Rezeptoren können jedoch auch an weitere G-Proteine gekoppelt sein und dadurch verschiedene andere intrazelluläre Signalwege modulieren (Fredholm et al., 2000). Auch direkte Modulationen von Ionenkanälen (beispielsweise Kir6, Hyperpolarisation-aktivierte Chloridkanäle und HCN-Kanäle) sowie von anderen Rezeptoren wurden bereits nachgewiesen. (Fredholm, 1995; Jan und Jan, 1997). Diese unterschiedlichen

Interaktionspartner machen die A_1 -Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion ausgesprochen komplex und vielfältig. Der zweite G_i -gekoppelte P1-Rezeptor ist der A_3 -Rezeptor. Dieser ist weniger affin für den Liganden Adenosin als A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren und insgesamt deutlich weniger häufig im Zentralnervensystem zu finden (Taliani et al., 2010). A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren sind hingegen entweder an ein G_s - oder G_q -Protein gekoppelt. Ihre Aktivierung führt über das G_s -Protein zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels, wodurch die Proteinkinase A (PKA) aktiviert wird, oder über das G_q -Protein zu einer Stimulation der Phospholipase C (PLC). Diese trägt wiederum IP_3 -abhängig zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration bei. A_{2A} -Rezeptoren weisen eine hohe Affinität gegenüber Adenosin auf und sind sowohl im zentralen Nervensystem als auch in peripheren Körpergeweben ubiquitär zu finden. A_{2B} -Rezeptoren hingegen sind nicht im Zentralnervensystem zu finden und generell niederaffin für Adenosin (Linden und Connor, 1991; Burnstock, 2013). Die Aktivierung von A_1 - und A_3 -Rezeptoren wirkt größtenteils eher inhibitorisch, wohingegen A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren eher exzitatorisch auf Neurone wirken. Allerdings gibt es Ausnahmen und insbesondere für den A_1 -Rezeptor wurden schon exzitatorisch wirksame Modulationen beschrieben (Olah und Stiles, 1995; Burnstock, 2014).

1.2.2 P2-Rezeptoren

Die Klasse der P2-Rezeptoren teilt sich in die Untergruppen der ionotropen P2X- und der metabotropen P2Y-Rezeptoren auf (Khakh et al., 2001). Während an P2X-Rezeptoren ATP als Hauptagonist wirkt, ist ADP für einige P2Y-Rezeptoren der höher-affine Ligand. Es gibt sieben verschiedene P2X-Rezeptor-Untereinheiten ($P2X_{1-7}$), die beim funktionellen Rezeptor als Homo- und Heteromere vorliegen können (Kim et al., 1997). Die Untereinheiten bestehen jeweils aus einer großen, extrazellulären Schleife mit Bindungsstellen für ATP und weiteren Agonisten und Antagonisten sowie zwei Transmembrandomänen, die gemeinsam einen Kanal bilden (Torres et al., 1998). Die Bindung von ATP führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, öffnet ihn dadurch für monovalente Kationen und Calciumionen und kann so zu einer Natrium- bzw. Calcium-vermittelten Depolarisation führen (Samways et al., 2014). Die metabotropen P2Y-Rezeptoren hingegen vermitteln nach der Bindung von ATP, ADP bzw. anderen Nukleotiden G-Protein-abhängige Prozesse, wie z.B. die Öffnung von Ionenkanälen. Derzeit sind acht funktionelle Untereinheiten von P2Y-Rezeptoren bei Säugetieren bekannt ($P2Y_{1, 2, 4, 5, 11, 12, 13, 14}$), die sieben Transmembrandomänen aufweisen (Burnstock, 2006; Jacobson et al., 2012). Die Aktivierung der meist $G_{q/11}$ gekoppelten Rezeptoren ($P2Y_{1, 2, 4, 5, 14}$) führt über die Erhöhung der Aktivität der PLC über den IP_3 -Weg zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels. $P2Y_{11, 12, 13}$ -Rezeptoren (meist $G_{i/o}$ -gekoppelt) inhibieren bei ihrer Aktivierung die Adenylatcyclase, senken damit die Bereitstellung von cAMP und beeinflussen dadurch c-AMP-abhängige Prozesse (Boyer et al., 1994; Torres et al., 2002; Burnstock, 2006).

1.2.3 ATP/ADP und Adenosin als extrazelluläre Signalmoleküle

Unter physiologischen Bedingungen kann die extrazelluläre Konzentration von ATP im Gehirn stark schwanken und Regionen mit hoher und niedriger ATP-Konzentration wechseln sich ab (Kogure und Alonso, 1978; Burnstock, 2013). Die tatsächliche ATP-Konzentration im Gewebe ist schwer zu ermitteln, es scheinen jedoch basale extrazelluläre ATP-Konzentrationen von wenigen Nanomolar ATP in Nervengewebe vorzuliegen (Melani et al., 2005; Grafe et al., 2006). Extrazellulär liegt ATP u.a. in Folge vesikulärer Freisetzung vor. Es wird in eigenen Vesikeln gelagert und kann als alleiniger Transmitter oder als Kotransmitter, z.B. zusammen mit Glutamat, freigesetzt werden (Pankratov et al., 2006; Burnstock, 2009). Außerdem hängt die extrazelluläre ATP-Konzentration von der Diffusion von ATP durch Poren bzw. dem Transport von ATP durch Transporter in der Zellmembran sowie von pathologischen Zuständen, wie dem Absterben von Zellen und einem damit verbundenen Austreten von ATP aus dem Cytosol, ab (Gordon, 1986). Um die Wirkung von ATP zeitlich zu begrenzen, muss das ATP aus dem Extrazellulärraum entfernt werden. Dies geschieht durch eine Aufnahme von extrazellulärem ATP durch verschiedene Zelltypen und durch den enzymatischen Abbau von ATP. Der Abbau wird von unterschiedlichen Enzymfamilien vermittelt und verläuft über die Hydrolyse zu ADP und AMP zum Endprodukt Adenosin. Diese Hydrolyseprodukte können ebenfalls modulatorisch aktiv sein (Chaudry, 1982; Zimmermann, 2000; Burnstock, 2013). Daraus ergibt sich eine einzigartige Eigenschaft des purinergen Transmittersystems, da der Abbau von ATP nicht zu einer Beendigung der Übertragung führt, sondern dessen Hydrolyseprodukte über weitere Rezeptoraktivierungen zusätzliche modulatorische Effekte auslösen können. Extrazelluläre, Purin abbauende Enzyme werden in mehreren Gruppen zusammengefasst, u.a. die Ekto-Nukleotidasen und die alkalischen Phosphatasen. Die meisten Ekto-Nukleotidasen sind membrangebunden, es gibt jedoch auch lösliche Formen, die dann als Exo-Nukleotidasen bezeichnet werden. Eine detaillierte Beschreibung der verschiedenen Typen von ATP, ADP und AMP abbauenden Enzyme findet sich in einer Übersichtsarbeit von Zimmermann (2000). Für die vorliegende Arbeit ist von besonderem Interesse, dass die 5'-Ekto-Nukleotidase, ein Enzym, welches Phosphatgruppen am 5'-Ende hydrolysiert und so zum Abbau von ATP über ADP und AMP zu Adenosin führt, im olfaktorischen Bulbus (neben dem Caudoputamen) von Nagetieren die höchste Aktivität im gesamten Gehirn aufweist (Langer et al., 2008). Insbesondere in der inneren und äußeren plexiformen Schicht ist eine hohe Aktivität des Enzyms feststellbar. Zusätzlich sind auch alkalische Phosphatasen in hohen Konzentrationen im olfaktorischen Bulbus vorhanden (Langer et al., 2008). Diese hohe Konzentration von ATP abbauenden Enzymen im *Bulbus olfactorius* lässt vermuten, dass extrazelluläres ATP und seine Abbauprodukte hier eine wichtige Rolle spielen.

Adenosin wirkt, im Gegensatz zu ATP, welches über P2X- bzw. P2Y-Rezeptoren sowohl schnell als auch eher langsam modulatorisch wirken kann, nicht als schneller Transmitter, sondern nur modulierend auf synaptische Prozesse. Adenosin-Rezeptoren lösen demnach nicht direkt EPSPs oder IPSPs aus, ihre Aktivierung führt vielmehr zur Veränderung der Wirkung postsynaptischer Potentiale, die durch transmitterabhängige Kanäle oder andere modulatorische Prozesse erzeugt werden (Burnstock, 2013). Physiologische extrazelluläre Konzentrationen von Adenosin bewegen

sich vermutlich in einem Bereich von 50-200 nM (Latini und Pedata, 2001). Insgesamt übernehmen ATP, ADP und Adenosin vielfältige Aufgaben im gesamten peripheren und zentralen Nervensystem. Adenosin beispielsweise hält im gesamten Zentralnervensystem einen inhibitorischen Grundtonus aufrecht und wirkt bei pathologischen Zuständen neuroprotektiv (Burnstock, 2007b). Unter anderem werden aber auch die Regulation von Schlaf- und Wachrhythmen und lokale synaptische Modulationen sowie Lernprozesse durch Adenosin als Signalmolekül beeinflusst (Dunwiddie, 1985; Burnstock, 2013). ATP wirkt vorwiegend als exzitatorischer Neurotransmitter, hat aber zusätzlich auch Langzeiteffekte, beispielsweise bei der Zellproliferation und bei verschiedenen Krankheitsbildern (Abbracchio und Burnstock, 1998; Mishra et al., 2006). Sowohl Adenosin als auch ATP und ADP spielen zudem bei Neuro-Glia-Interaktionen als Signalmoleküle eine wichtige Rolle. Im olfaktorischen Bulbus und der Retina etwa führt ATP (und im *Bulbus olfactorius* auch Adenosin) zu Calciumtransienten in Gliazellen, was wiederum zur Freisetzung von Gliotransmittern (u.a. ATP) führen kann und dadurch die synaptische Transmission moduliert (Fields und Burnstock, 2006; Doengi et al., 2008; Lohr et al., 2014). Noch bevor die ubiquitäre Rolle von Purinen als extrazelluläre Signalmoleküle im Zentralnervensystem im vollen Umfang deutlich wurde, war ihre Bedeutung in peripheren sensorischen Systemen bereits etabliert. Neben vielfältigen anderen Wirkungsorten und -weisen, wirkt ATP beispielsweise bei der Nozizeption sowie der Wärme- und Mechanosensitivität typischerweise exzitatorisch auf afferente Fasern (Chen et al., 1995; Cook und McCleskey, 2002; Gourine et al., 2005). Adenosin verringert u.a. in der Retina exzitatorische Neurotransmission auf unterschiedliche Weise und trägt so zu den differenzierten Prozessen in der Retina bei (Housley et al., 2009). Im olfaktorischen Epithel wiederum sorgt eine konstante, basale Konzentration an ATP für eine tonische Suppression der olfaktorischen Rezeptorneurone (Hegg et al., 2003; Housley et al., 2009).

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Obwohl ATP und Adenosin als extrazelluläre Signalmoleküle intensiv erforscht werden, gibt es in der purinergen Neuromodulation noch viele offene Fragen. Im *Bulbus olfactorius* wurde die Bedeutung von ATP und Adenosin für die neuronale Verarbeitung bisher noch nicht untersucht. Die hohe Expression extrazellulärer ATP abbauender Enzyme (Braun und Zimmermann, 1998; Langer et al., 2008), der Effekt von ATP sowie Adenosin auf Gliazellen des olfaktorischen Bulbus (Doengi et al., 2008) und die Wirkungsweise von Purinen in anderen Hirngebieten (Burnstock, 2014) bilden die Grundlage für die Hypothese, dass ATP und Adenosin auch im *Bulbus olfactorius* eine neuromodulatorische Wirkung haben könnten. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Vorhandensein einer purinergen Neuromodulation im *Bulbus olfactorius* zu überprüfen und gegebenenfalls die Wirkung von ATP und Adenosin auf Neurone des olfaktorischen Bulbus grundlegend zu beschreiben.

In dieser Arbeit wird die Wirkung von ATP und ADP auf das neuronale Netzwerk des *Bulbus olfactorius* mit elektrophysiologischen Methoden sowie *calcium imaging* untersucht. Zusätzlich wird

die Wirkung des ebenfalls neuromodulatorisch aktiven Hydrolyseprodukts von ATP, Adenosin, mittels elektrophysiologischer Untersuchungen analysiert. Hierbei wird die Wirkung von Adenosin auf Mitralzellen im Speziellen und auf das neuronale Netzwerk des *Bulbus olfactorius* im Ganzen sowie die Wirkung von Adenosin auf die Verarbeitung eingehender Geruchsinformationen untersucht. Ergänzend wird der Adenosin-A₁-Rezeptor im *Bulbus olfactorius* mit histologischen Methoden nachgewiesen.

Damit möchte diese Arbeit einen Beitrag dazu leisten, die Verarbeitung von Geruchsinformationen besser zu verstehen, und eine Basis für vertiefende Untersuchungen der purinergen Neuromodulation im *Bulbus olfactorius* bilden.

Ergebnisse dieser Dissertation wurden unter folgendem Titel veröffentlicht:

Fischer T*, Rotermund N*, Lohr C, Hirnet D (2012). *P2Y₁ receptor activation by photolysis of caged ATP enhances neuronal network activity in the developing olfactory bulb*. *Purinergic Signal*, 8:191-198 (*equal contribution)

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Folgende Geräte wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Laborgeräte:

Binokular:	Wild M7, Heerbrugg AG, Schweiz
Elektronikrührer:	Variomag® Mono, USA
Feinwaage:	ALJ 220-4NM, Kern GmbH, Großmaiseid
Heizrührplatten:	IKAMAG RH, Jahnke & Kunkel GmbH und Co.KG, Staufen
Millipore-Filtersystem:	Milli-QPLUS PF, Merck Millipore, USA
Osmometer:	Osmomat 030, GONOTEC GmbH, Berlin
pH-Messgerät:	PB-11, Sartorius AG, Göttingen
Tischzentrifuge:	PicoFuge® Mikrozentrifuge, Stratagene, USA
Vortexer:	VTX 3000 L, Harmony
Waage:	PCB, Kern GmbH, Großmaiseid

Patch clamp-Technik und *calcium imaging*:

<i>Patch clamp</i> -Verstärker:	Axon Multi Clamp 700 B
Analog-Digital-Wandler:	Axon CNS Digidata 1440 A, Molecular Devices, USA
<i>Headstage</i>	Axon <i>current clamp and voltage clamp Headstage</i> CV7B
Laserraster-Mikroskop:	C1, Nikon, Japan
Laser:	Diodenlaser (405 nm, 25 mW), Argonlaser (488 nm, 60 mW), Helium-Neon-Laser (543 nm, 5 mW); Melles Griot, Bensheim
Objektiv	Nikon LWD, 16x, 0,8 W
Versuchskammer:	Eigenanfertigung Werkstatt Universitätsklinikum Münster
Faradaykäfig	Science Products, Hofheim
Schwingungsgedämpfter Tisch:	TMC, USA
Videokamera:	Digital Sight DS Qi1MC, Nikon, Japan
Mikromanipulatorsystem:	ROE-200, Sutter Instruments; Patch Star, Scientifica, Großbritannien
Mikropipettenpuller:	P-97 Flaming/Brown micropipette puller, Sutter Instruments, USA
Pumpensystem:	Ismatec, IDEX Health & Science GmbH, Wertheim

Stimulator: Digitimer DS3, Digitimer Ltd, England
Tygonschläuche: Tygon-Schlauch ST, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

In situ-Hybridisierung, Immunhistochemie und Genotypisierung:

Agarosegelkammern: Horizontal-Elektrophoresekammern, A. Hartenstein, Würzburg
Autoklav: 3 850 ELV, Tuttnauer, Breda NL
Geldokumentation: Fusion Fx7, Peqlab, Erlangen
Heizblöcke: Bio TDB-100, A. Hartenstein, Würzburg
Inkubatoren: refrigerated incubator shaker, New Brunswick Sc., Nürtingen
Fluoreszenzmikroskop: BX51, Olympus, Hamburg
Nanodrop: 1000, Peqlab, Erlangen
Spannungsgeber: Consort EV 243, Jencons, Bedfordshire GB
Thermocycler: LabCycler Gradient, SensoQuest GmbH, Göttingen
Vibrator: Leica VT 1200 S, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und weitere Materialien

Die Folgenden Verbrauchsmaterialien und weitere Materialien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Borosilikatglaskapillaren: GC150TF-10, Harvard Apparatus, USA
Mikrofilter: Cameo 3N Syringe-Filter, Carl Roth, Karlsruhe
Pipetten: Pipetman, Gilson, Frankreich
Präparationsbesteck: Dumont, Schweiz
Rasierklingen: Croma Blades, Feintechnik GmbH Eisfeld, Eisfeld
Sofortkleber: Loctite 454, Henkel & Cle.AG, Pratteln

Sämtliche Kunststoffartikel wurden über die Firmen Sarstedt (Nümbrecht), Carl Roth (Karlsruhe) und Semperit (Wien) bezogen.

2.1.3 Software

Folgende Software wurde zu Datenaufzeichnung oder Bearbeitung und Auswertung genutzt:

Review 5.0.2: Bruxton, Seattle, USA
pClamp 10 Software Suite: Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Origin 9.0 G Pro: Origin Lab Corporation, Northhampton, USA
MiniAnalysis 6.0.7: Synaptosoft Inc., Decatur, USA
CorelDRAW X5 15.2.0.695: Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada

2.1.4 Chemikalien und pharmakologisch aktive Substanzen

Alle verwendeten Chemikalien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim). Carbogengas wurde von der Firma Linde (München) bezogen. Die Bezugsquellen pharmakologisch aktiver Substanzen finden sich in Tabelle 1. Alle verwendeten pharmakologisch aktiven Substanzen wurden entsprechend ihrer Herstellerangaben entweder in Methanol gelöst, aliquotiert und abgedampft, oder es wurde eine hochkonzentrierte Stammlösung in H₂O oder DMSO angesetzt und aliquotiert. Gelagert wurden die Stammlösungen bei -20 °C. Zur Verwendung wurden die Substanzen bei Raumtemperatur aufgetaut und der gewünschten Endkonzentration entsprechend in begaster ACSF verdünnt. Die Verdünnung erfolgte, wenn möglich, mindestens 1000-fach, um einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Zellen auszuschließen. *Caged*-ATP wurde zunächst in H₂O gelöst, anschließend lyophilisiert und bei -20 °C gelagert. Zur Verwendung wurde die entsprechende Menge in 1 ml ACSF gelöst.

Tabelle 1 | Pharmakologisch aktive Substanzen

Abkürzung	Name	Endkonzentration	Lösungsmittel	Bezugsquelle
ADO	Adenosin	100-200 µM	DMSO	Sigma
ADP	Adenosin-5'-diphosphorsäure	100 µM	H ₂ O	Sigma
ATP	Adenosin5'triphosphat,Dinatrium-salz	100 µM	H ₂ O	Sigma
Ba ²⁺	Bariumchlorid	1 mM	H ₂ O	Sigma
<i>caged</i> -ATP	Adenosin5'triphosphat, P ³ -1-(2-Nitrophenyl)ethyl Ester 2Na	100 µM	ACSF	Calbiochem
CPA	N ⁶ -Cyclopentyladenosin	1 µM	DMSO	Tocris
CTZ	Cyclothiazid	200 µM	H ₂ O	Abcam, Enzo
D-AP V	D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure	50 µM	H ₂ O	Ascent
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin	3 µM	H ₂ O	Sigma
E-4031	N-[4-[[1-[2-(6-Methyl-2-pyridinyl)ethyl]-4-piperidinyl]carbonyl]phenyl]methanesulfonamide dihydrochloride	10 µM	H ₂ O	Tocris
GBZ	Gabazine (SR95531),Hydrobromid	10 µM	H ₂ O	Ascent
MRS 2179	2'-Deoxy-N6-methyladenosine	50 µM	H ₂ O	Tocris
NBQX	3',5'-bisphosphate N6-methyladenosine 3',5'-bisphosphate	5 µM	H ₂ O	Ascent
PPADS	Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic	100 µM	H ₂ O	Tocris
PSB 1165	6-(9-ibofuranosyl-9H-purin-6-ylamino)-N-(5(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)pentylhexansäureamid (PSB-1165)	100 nM – 100 µM	EtOH	Pers.

MATERIAL UND METHODEN

TEA	Tetramethyl Ammonium	10-20 mM	H ₂ O	Appllichem
TTX	Tetrodotoxin-Citrat	1 µM	H ₂ O	Tocris
XE 991	10,10-bis(4-Pyridinylmethyl)- 9(10H)-anthracenone dihydrochloride	20 µM	H ₂ O	Tocris
4-AP	4-Aminopyridine	10 mM	H ₂ O	Tocris

2.1.5 Gebrauchslösungen

2.1.5.1 Extrazellulärlösungen für *patch clamp*- und *calcium imaging*-Experimente

Die verwendeten Extrazellulärlösungen (Tabelle 2) wurden wöchentlich frisch angesetzt und bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Mindestens eine Stunde vor Verwendung wurden die ACSF-Lösungen auf Raumtemperatur äquilibriert. Die Präparierlösung wurde eisgekühlt verwendet. Alle Extrazellulärlösungen wurden mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast, um einen physiologischen pH-Wert und eine Sauerstoffsättigung zu erzielen.

Tabelle 2 | Extrazellulärlösungen für physiologische Experimente

Bezeichnung	Substanz	Konzentration [mM]
ACSF (pH 7,4)	NaCl	120
	NaHCO ₃	26
	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	1
	KCl	2,5
	D-Glucose x H ₂ O	2,8
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1
Präparierlösung (pH 7,4)	NaCl	83
	NaHCO ₃	26,2
	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	1
	KCl	2,5
	Saccharose	70
	D-Glucose x H ₂ O	20
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,5
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O*	2,5

2.1.5.2 Intrazellulärlösungen für *patch clamp*- und *calcium imaging*-Versuche

Intrazellulärlösungen für die Elektrophysiologie (vgl. Tabelle 3) wurden unter Kühlung hergestellt, der pH-Wert eingestellt (mit dem Hydroxid des entsprechenden Hauptions) und die Osmolarität überprüft. Anschließend wurden sie a 500 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Intrazellulärlösungen wurden jeweils nur einmal aufgetaut und während des Versuchstages auf Eis gelagert. Um die Zellmorphologie zu überprüfen oder Calciummessungen einzelner Zellen durchzuführen, wurden den Intrazellulärlösungen teilweise Farbstoffe am jeweiligen Versuchstag hinzugegeben. Für elektrophysiologische Messungen in *voltage clamp*, bei denen die Aktivität des Netzwerks bzw. synaptische Eingänge oder rekurrente Inhibition untersucht wurden und für *calcium imaging* Experimente an Mitralzellen, wurde die ‚CsCl-basierte Intrazellulärlösung‘ verwendet. Messungen in *current clamp*, insbesondere Untersuchungen an Kaliumkanälen sowie Messungen des Ausstroms in *voltage clamp*, wurden mit der ‚K-Glukonat-basierte Intrazellulärlösung‘ durchgeführt. Zur Untersuchung der Beteiligung von Chloridionen am Adenosin-Effekt wurde die ‚Intrazellulärlösung mit erhöhter Chloridkonzentration (67 mM Cl)⁻‘ verwendet, bei der das Chloridumkehrpotential auf -16 mV eingestellt war. Zur Untersuchung des Umkehrpotentials des Adenosin-vermittelten Stroms wurde die ‚K-Glukonat-basierte Intrazellulärlösung mit reduzierter Kaliumkonzentration (140 mM K⁺)‘ verwendet.

Tabelle 3 | Intrazellulärlösungen für physiologische Experimente

Bezeichnung	Substanz	Konzentration [mM]	LJP
CsCl-basierte Intrazellulärlösung	4-AP	5	-3 mV
	CsCl	120	
	EGTA	1	
	HEPES	10	
	TEA-Cl	20	
	Na-Glutamat	10	
	MgCl ₂	2	
	CaCl ₂	0,5	
	Na-ATP	2	
	Na-GTP	0,5	
	CsMeSO ₄ -basierte Intrazellulärlösung	NaCl	
CsMeSO ₄		120	
EGTA		1,1	
HEPES		10	
MgCl ₂		1	
Mg-ATP		3	
Na-GTP		0,5	
K-Glukonat-basierte Intrazellulärlösung	NaCl	10	-18 mV
	K-Glukonat	105	
	K ₃ -Citrat	20	
	HEPES	10	
	EGTA	0,25	
	MgCl ₂	0,5	

MATERIAL UND METHODEN

	Mg-ATP	3	
	Na-GTP	0,5	
K-Gluconat-basierte Intrazellulärlösung mit reduzierter Kaliumkonzentration (140 mM K ⁺)	NaCl	10	-16 mV
	K-Gluconat	110	
	K ₃ -Citrat	10	
	HEPES	10	
	MgCl ₂	0,5	
	Manitol	21	
	Phosphocreatin	5	
	Mg-ATP	5	
	Na-GTP	0,5	
	Intrazellulärlösung mit erhöhter Chloridkonzentration (67 mM Cl ⁻)	NaCl	
K-Gluconat		52,5	
KCl		55	
K ₃ -Citrat		10	
HEPES		10	
EGTA		5,65	
MgCl ₂		0,75	
Ca Cl ₂		0,25	
Phosphocreatin		7,25	
Mg-ATP		3	
Na-GTP		0,5	

2.1.5.3 Immunhistochemie

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden folgende Lösungen benötigt:

1x PBS (phosphate buffered saline):	130 mM NaCl, 7 mM Na ₂ HPO ₄ , 3 mM NaH ₂ PO ₄
Blockierlösung:	10 % NGS, 0,5 % Triton X-100 (in PBS)
Primärantikörperlösung:	1 % NGS, 0,05 % Triton X-100 (in PBS)
Citratpuffer (pH 6,0):	10 mM Citronensäure, 0,05 % Tween 20
TNT (TRIS-NaCl-Tween) Puffer:	0,1 M TRIS-HCl, 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween 20
TNB (TRIS-NaCl-Blockier) Lösung:	0,1 M TRIS-HCl, 0,15 M NaCl, 0,5 % Blocking Reagent (Roche)

2.1.5.4 *In situ*-Hybridisierung

Zur Herstellung von Sonden für *in situ*-Hybridisierungen wurden folgende Lösungen und Reaktionskits sowie weitere noch nicht genannte Materialien und Geräte verwendet:

L-Medium, pH 7,4:	10 g/L Trypton
	5 g/L Hefeextrakt
	5 g/L Natriumchlorid

L-Agar-Platten:	1 l L-Medium 15 g Agar-Agar
Ampicillin:	100 mg/ml, Endkonzentration 100 µg/ml, sterilfiltriert
Bakterienstamm Jm109:	Klonierungsstamm
Klonierungsvektor:	pGEM-T easy

Für die Durchführung von *in situ*-Hybridisierungen wurden folgende Lösungen benötigt:

Tabelle 4 | Lösungen für die Durchführung von *in situ*-Hybridisierungen

DEPC-Wasser	1 % DEPC in deionisiertem Wasser
Paraformaldehydlösung (4 %)	8 % Paraformaldehyd in 2 x PBS (1:1)
10x PBS (pH 6,9)	1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 15 mM KH ₂ PO ₄ , 81 mM Na ₂ HPO ₄
0,2 M PB	5,65 g NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O, 22,72 g Na ₂ HPO ₄ , 2 Liter DEPC-Wasser
20x SSC Puffer (pH 7,0)	1 % (w/v) BSA, 1 % (w/v) Ficoll-400, 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon
Hybridisierungspuffer	62,5 % Formamide, 25 % Dextransulfat, 7,5 % NaCl (5 M), 2,5 % Denhardts (50 %), 1,25 % TRIS, 0,25 % EDTA (0,5 M)
Probenmischung	12,5 % Sonde in DEPC-Wasser (400 ng/ml / 1000ng/ml), 25 % tRNA (10mg/ml), 5 % DTT
Hybridisierungslösung	20 % Probenmischung, 80 % Hybridisierungspuffer
RNAse Lösung	10 % 5 M NaCl, 1 % 1 M TRIS, 0,1 % 0,5 M EDTA, RNAse A
Puffer 1 (pH 7,5)	100 mM TRIS, 150 mM NaCl
Blockierpuffer (Fluoreszenz-Protokoll)	0,5 % Blockingreagent (Roche) in Puffer 1
Blockierpuffer	2x SSC, 0,05 % Triton X-100, 2 % NGS
Puffer 2 (pH 9,5)	100 mM TRIS, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂
Detektionspuffer	100 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, 0,22 % NBT (50 mg/ml in 70 % Dimethylformamid), 0,17 % BCIP (50 mg/ml BCIP in 100 % Dimethylformamid), 0,5 % 1M MgCl, 0,1 % Levamisole (240 mg/ml)
Antikörperlösung	10 % NGS, 3 % Triton-X100, AP gekoppelter Anti-DIG-F(ab)2-AK (1:1000) in Puffer 1
Stopplösung (pH 7,4)	100 mM TRIS, 1 mM EDTA
TNT (TRIS-NaCl-Tween) Puffer (pH 7,5)	0,1 M TRIS-HCl, 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween 20
TNB (TRIS-NaCl-Blocking) Lösung	0,1 M TRIS-HCl, 0,15 M NaCl, 0,5 % Blocking Reagent (Roche)
TSA (Tyramide Signal Amplification) Plus Cy3 Kit	bezogen von Perkin Elmer TSA Plus Cyanine 3-System
Hybridisierungspuffer radioactive ISH	entionisiertes Formamid 50 %, 20x Hybridisations-Salze, 5x, 100x Denhardt's 5x, 10 % SDS 0,2 %, 1 M DTT 10 mM, Dextransulfat 10 %, Heringspermien DNA 250 µg/ml (vor Gebrauch 5 min bei 95 °C zum Denaturieren), Hefe tRNA 250 µg/ml (20 x Hybridisations-Salze: 3 M NaCl, 0,1 M PIPES, 0,1M EDTA, pH 6,8.
Acetylierungspuffer radioactive ISH	100 x Denhardts: 2% Ficoll, 2 % Polyvinylpirrolidon, 2 % BSA, Fr. V) Triäthanolamin Sigma T1377 0.1 M, NaCl 5 M 0.9 %, Essigsäureanhydrid Sigma A 6404 2.5 ml/l
RNAse-Behandlung radioactive ISH	0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCL pH 7,5, 1mM EDTA und 40 µg RNase A/ml

2.1.5.5 Antikörper und Primer für Immunhistochemie und *in situ*-Hybridisierungen

Folgende Primär- und Sekundärantikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 5 | Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper:	
A1 Adenosin Rezeptor	polyklonal aus Kaninchen (Alomone-Labs), Peptide (C)KKVSASSGDPQKYGKE, 1:500 eingesetzt
AP-gekoppelter Anti-DIG-F(ab)2-AK	monoklonal aus Schaf (Roche Diagnostics) 1:5000, eingesetzt
HRP-gekoppelter Anti-DIG-AK	polyklonal aus Maus (Perkin Elmer) 1:100, eingesetzt
Anti-DIG-Rhodamin-AK	polyklonal aus Schaf (Roche) 1:100, eingesetzt
Sekundärantikörper:	
Alexa Fluor 488, anti-rabbit IgG	polyklonal aus Ziege (Molekular Probes), 1:1000 eingesetzt
HRP-gekoppelter F(ab)2-AK anti-rabbit igG	polyklonal aus Ziege (Sigma), 1:1000 eingesetzt
Cy3 anti-mouse IgG	polyklonal aus Ziege (Jackson Immuno), 1:1000 eingesetzt

Folgende Primer wurden für Genotypisierungen und zur Herstellung von Sonden für *in situ*-Hybridisierungen verwendet:

Tabelle 6 | Primer; Genotypisierung und *in situ*-Hybridisierung

Bezeichnung	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>
A ₁ WT	TACATTGGCATCGAGGTCCTCATT	GAGCTCTGGGTGATGAGGAC
A ₁ KO	GCGATACCGTAAAGCACGAG	CCGTGTTCCGGCTGTCAGCG
A ₁ -Rezeptor Sonden (ISH)	CGTGTCATGTGAGACCCCTCCTGC	AGGCTCAATTTCCAAAGCTGGGC
	TG	TCTG

2.2 Versuchstiere

NMRI-Mauslinie

Als Modellorganismus für die Untersuchung purinerger Modulation neuronaler Prozesse im olfaktorischen Bulbus wurde die Hausmaus (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) verwendet. Für alle Experimente, mit Ausnahme von Experimenten an A₁-Rezeptor-*knockout*-Mäusen, wurden Mäuse des Auszuchtstamms NMRI (Naval Medical Research Institute) verwendet. Bezogen wurden die Zuchtpaare von -Charles River- (Sulzfeld, Deutschland). Die Tierhaltung erfolgte im hauseigenen Tierstall in offener Tierhaltung. Für Experimente wurde stets die F1-Generation von käuflich erworbenen Elterntieren verwendet. Alle Tiere wurden bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus einzeln bzw. eine Mutter mit ihrem Wurf zusammen (bis P 21) bei Futter und Wasser

ad libitum gehalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden juvenile Tiere beiderlei Geschlechtes im Alter zwischen ein- und zwei Wochen (P7- P14) verwendet.

Black 6-A₁-Rezeptor-*knockout*-Mäuse

A₁-Rezeptor-*knockout*-Mäuse (A₁KO) wurden freundlicher Weise von Bertil B. Fredholm und Mattias Carlström (*Department of Physiology and Pharmacology*, Karolinska Institut) zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden im hauseigenen Tierstall unter den gleichen Bedingungen wie NMRI-Mäuse gehalten. Für Experimente wurde jeweils die F1-Generation von P7 bis P14 verwendet. Die Elterntiere waren heterozygot, der Nachwuchs wurde vor dem Experimentieren genotypisiert (Primer siehe Tabelle 6). Experimentiert wurde mit homozygoten A₁-Rezeptore-*knockout*-Mäusen sowie homozygoten A₁-Rezeptor-Wildtyp-Mäusen desselben Wurfs (Kontrolle). Den Tieren dieser *knockout*-Linie fehlt ein großer Teil des A₁-Rezeptortranskripts (siehe Anhang 2; Sequenz des A₁-Rezeptors), der A₁-Rezeptor ist daher nicht mehr funktionell (Johansson et al., 2001).

2.2.1 Präparation des olfaktorischen Bulbus und Herstellung akuter Hirnschnitte

Für alle hier vorgestellten elektrophysiologischen Experimente wurden *in situ*-Schnittpräparate von olfaktorischen Bulbi der Maus angefertigt. Die Präparate wurden nur am Tag der Präparation verwendet. Akute Hirnschnitte ermöglichen die Arbeit in einem System, das noch einen Teil der physiologischen Verbindungen und Gewebestruktur aufweist, gleichzeitig aber, bezogen auf die Versuchsbedingungen, gut zu kontrollieren ist. Für die Präparation des olfaktorischen Bulbus und die anschließende Herstellung von Hirnschnitten wurden die Mäuse mit Isofluran anästhesiert und anschließend dekapitiert. Die Präparation erfolgte in einer mit eisgekühlter und Carbogen begaster Präparationslösung gefüllten Präparierschale unter einem Binokular. Nach Freilegen der Schädelkalotte wurde entlang der *Sutura lambdoidea* ein Skalpellschnitt gesetzt und die Kalotten-Hemisphären seitlich nach außen entfernt. Anschließend wurde der olfaktorische Bulbus mitsamt eines ca. 3-5 mm großen Stücks des frontalen Cortex vom restlichen Gewebe getrennt, die zwei Bulbus-Hemisphären separiert, und aus der Schädelhöhle entnommen. Zur Herstellung von Hirnschnitten wurde je ein einzelner Bulbus mit der Medianseite mittels Sekundenkleber auf Agar-Agar geklebt. Parallel zur Ventralseite des Bulbus wurde der Agar angeschnitten und der Bulbus über diese Schnittfläche auf den Präparatsteller des Vibratoms geklebt. Geschnitten wurde in 160-200 µM Schnittdicke in eisgekühlter, begaster Präparierlösung mit einer Rasierklinge. Die Hirnschnitte wurden anschließend in ein Aufbewahrungsbad mit Carbogen begaster ACSF überführt, in welchem sie zunächst für 30 min bei 30 °C inkubierten und anschließend für mindestens 30 weitere Minuten auf Raumtemperatur abkühlten, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

2.3 Messplatz (Versuchsaufbau)

Für elektrophysiologische Messungen und *calcium imaging*-Experimente wurde der im Folgenden beschriebene Messaufbau (*setup*) verwendet. Alle physiologischen Experimente wurden bei Raumtemperatur (20-26 °C) durchgeführt. Der Mikroskopaufbau war von einem Faradaykäfig umschlossen und auf einem schwingungsgedämpften Tisch gelagert. Das aufrechte Durchlichtmikroskop wurde über einen Kreuztisch über dem fixierten Versuchsbad bewegt. Das Versuchsbad umfasste ein Volumen von ca. 1,5 ml und verfügte über ein Ablauf- und Zulaufsystem für Extrazellulärlösungen sowie eine Referenzelektrode. Das Nikon-Objektiv wies eine 16-fache Vergrößerung und eine numerische Apertur von 0,8 auf. Ein Bild von dem Präparat wurde über eine Kamera digital auf einen Bildschirm außerhalb des Faradaykäfigs übertragen. Über zwei Linsen konnten zusätzlich eine zwei bzw. vierfache Vergrößerung erreicht werden. Die ein bis zwei Mess- bzw. Stimulationselektroden wurden über ein Mikromanipulatorsystem bewegt. Den Messelektroden war ein Vorverstärker vorgeschaltet, der das Messsignal zum Verstärker und anschließend zum Analog-Digital-Wandler weiterleitet. Kontrolliert und bedient wurde die verwendete Auslesesoftware an einem Computer. Dem Mikroskopaufbau angeschlossen war ein konfokales Laser-Raster-Mikroskop, bei dem sich die Laser und die Kontrolleinheit außerhalb des Faradaykäfigs befanden. Das für die Versuche verwendete konfokale Fluoreszenzmikroskop besaß drei Laserlichtquellen mit einer Wellenlänge von jeweils 405 nm (violett), 488 nm (blau) und 543 nm (grün). Bedient und ausgelesen wurden Fluoreszenzaufnahmen an einem Computer.

2.4 Versuchsdurchführung

2.4.1 Die *patch clamp*-Technik

Die elektrischen Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen können mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden untersucht werden. Die *patch clamp*-Methode ermöglicht es sowohl Ströme einzelner Ionenkanäle als auch Ströme aller auf einer Zelle vorkommenden Ionenkanäle zu messen und die entsprechende Zelle dabei gleichzeitig elektrisch zu kontrollieren. Die Methode, die in dieser Form heute in vielen Laboratorien auf der ganzen Welt angewendet wird, erhielt 1991 den Nobelpreis in Medizin und Physiologie (Hamill et al., 1981). Die *patch clamp*-Technik beruht auf dem Prinzip der Spannungsklemme (*voltage clamp*). Durch das Anlegen einer vorgegebenen Spannung kann das Membranpotential einer Zelle konstant gehalten werden und gleichzeitig der dazu benötigte kompensatorische Strom, der durch das Öffnen und Schließen von Ionenkanälen in der Zellmembran notwendig ist, gemessen werden. Das Membranpotential wird dazu auf einem vorgegebenen Wert gehalten, indem das aktuelle Membranpotential kontinuierlich mit dem vorgegebenen ‚Sollpotential‘ abgeglichen wird. Differenzen werden durch einen kompensatorischen Strom ausgeglichen, der der Abweichung entgegengesetzt ist und in die Zelle injiziert wird. Als Messelektrode wird hierfür eine mit einem Elektrolyt gefüllte Glaselektrode verwendet, in die ein chlorierter Silberdraht hineinreicht. Die Zellmembran kann sich bei leichtem

Unterdruck eng an die Öffnung der Glaselektrode anschmiegen. Dabei entsteht eine elektrisch dichte Verbindung zwischen Glas und Zellmembran, die als *gigaseal* bezeichnet wird. Eine Badelektrode, die sich in der extrazellulären Lösung befindet, dient als Referenz für die Messelektrode. Mit der *patch clamp*-Technik können unterschiedliche Messkonfigurationen erreicht werden. Grundsätzlich kann zwischen der *cell attached*-Konfiguration, und der *whole cell*-Konfiguration unterschieden werden. *Cell attached* lassen sich beispielsweise Ströme durch einzelne Ionenkanäle oder auch starke Potentialverschiebungen auf der Zellmembran wie Aktionspotentiale messen, ohne die abgeleitete Zelle zu beschädigen, da die Messelektrode nur auf die Zellmembran aufsetzt. Die *cell attached*-Konfiguration hat den Vorteil, dass das intrazelluläre Milieu nicht verändert wird, gleichzeitig aber auch den Nachteil, dass die Zusammensetzung des intrazellulären Milieus nicht manipuliert und die Zelle elektrisch nicht gut kontrolliert werden kann. Im Unterschied zur *cell attached*-Konfiguration wird bei der *whole cell*-Konfiguration der Membranfleck unterhalb der Messelektrode geöffnet und dadurch ein direkter Zugang zum Zellinneren geschaffen. Das intrazelluläre Milieu und die Ladung der Zellmembran können nun kontrolliert werden. Die Qualität dieser Kontrolle hängt von der Zellmorphologie und davon ab, wie gut der elektrische Zugang zur Zelle ist. Eingestellt wird das intrazelluläre Milieu über sogenannte Intrazellulärlösungen (für die in dieser Arbeit verwendeten Intrazellulärlösungen siehe Abschnitt 2.1.5.2), die aus der Messelektrode in die Zelle diffundieren und mit der Zeit das intrinsische intrazelluläre Milieu ersetzen. Sie ermöglichen eine Manipulation der intrazellulären Ionenzusammensetzung sowie die intrazelluläre Applikation unterschiedlichster Substanzen. Gleichzeitig kann das Auswaschen des Cytosols bei längeren elektrophysiologischen Ableitungen einen negativen Einfluss auf die Vitalität der abgeleiteten Zelle haben. In der *whole cell*-Konfiguration werden alle Ionenströme auf einmal gemessen, was allerdings nur eine theoretische Annahme ist und unter realen Messbedingungen von der Zellmorphologie und vielen weiteren Faktoren abhängt. Unterschiedliche Kanaltypen können in dieser Konfiguration anhand ihrer Eigenschaften unter bestimmten Bedingungen auseinander gehalten oder pharmakologisch isoliert untersucht werden. Grundsätzlich kann zwischen der *voltage clamp* und der *current clamp*-Messmethode unterschieden werden. Bei ersterer wird, wie bei der Spannungsklemme beschrieben, das Membranpotential auf einem Sollwert gehalten und der Kompensationsstrom zum Erreichen des Sollwert gemessen. Diese Messmethode erlaubt eine exakte Kontrolle des Membranpotentials und wird insbesondere zur Analyse der Eigenschaften von Ionenkanälen und der Untersuchung von IPSCs und EPSCs verwendet. Die *current clamp*-Methode bietet die Möglichkeit, das Membranpotential einer Zelle zu beobachten und beispielsweise Aktionspotentiale zu untersuchen.

2.4.2 Applikation von Agonisten und Antagonisten über das Versuchsbad

Während eines elektrophysiologischen Experiments wurden die Hirnschnitte kontinuierlich mit Extrazellulärlösung (ACSF, pH-Wert und Sauerstoffkonzentration eingestellt) umspült. Eine Peristaltikpumpe mit Ab- und Zulauf zum Versuchsbad sorgte für eine kontinuierliche Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min über das Präparat. Die Schlauchverbindungen bestanden aus Tygenschläuchen, eine Tropfenfalle verhinderte die Weiterleitung von Luftblasen im

Schlauchsystem. Um eine möglichst schnelle und gleichbleibende Applikation zu erreichen, wurde das Volumen des Versuchsbads mit 1,5 ml gleichbleibend möglichst gering gehalten. Alle extrazellulär applizierten Pharmaka, mit Ausnahme von *caged-ATP* (vgl. Abschnitt 2.4.7), wurden über die Extrazellulärlösung in das Versuchsbad geleitet. Um pharmakologisch aktive Substanzen einzuwaschen, wurde der Zulauf von der Standard-ASCF in ein Gefäß umgehängt, das die gewünschte Endkonzentration der entsprechenden Substanz in ACSF gelöst enthielt. Die Zeit vom Start der Applikation bis zum Eintreffen der Substanz im Versuchsbad betrug eine Minute. Wurde eine pharmakologisch-aktive Substanz nach ihrer Wirkphase wieder ausgewaschen wurde ein Zeitpunkt, nachdem ihre Wirkung vermutlich aufgehoben war, als *washout* bezeichnet.

2.4.3 Extrazelluläre elektrische Stimulation von ORN-Axonon

Durch eine elektrische Stimulation von ORN-Axonon kommt es zu einer Ausschüttung von Glutamat und ggf. ATP an den Axonen und synaptischen Endigungen der ORNs (Doengi et al., 2009; Thyssen et al., 2010). Diese Methodik bietet daher die Möglichkeit, den physiologischen Prozess, der bei der neuronalen Weiterleitung eines Geruchsreizes stattfindet, zu imitieren. Zur Untersuchung der Wirkung von Adenosin auf die Synapse zwischen ORN und Mitralzellen sowie auf das *output*-Verhalten von Mitralzellen, wurde dieses Prinzip angewandt. Nach Etablierung einer *patch clamp*-Ableitung einer Mitralzelle wurde, mittels eines Mikromanipulators eine Glaselektrode (1-3 M Ω) in der Nervenfaserschicht platziert. Die Elektrode war mit ACSF gefüllt und mit einem chlorierten Silberdraht versehen, der in Kontakt mit der ACSF stand. Ein zweiter chlorierter Silberdraht wurde als Referenzelektrode von außen so um die Glaskapillare gewickelt, dass er in die Extrazellulärlösung reichte. Beide Silberdrähte waren mit dem positiven bzw. negativen Polen eines Stimulators verbunden, welcher über das Programm Clampfit angesteuert wurde. Um zu testen, ob der Stimulationsstrom ohne Erregung der afferenten Axone Mitralzellen erregt, wurde vor dem Experiment die Stimulationselektrode außerhalb der Nervenfaserschicht platziert und Stimulationspulse generiert. Dies führte in keinem Experiment zu einer Reaktion in der abgeleiteten Mitralzelle. Bei der Suche nach einer geeigneten Position der Stimulationselektrode in der Nervenfaserschicht wurden wiederholt Teststimulationen (100 μ A, 50 μ s in unregelmäßigen Abständen) durchgeführt. Bei Erreichen einer geeigneten Positionierung der Elektrode an einem Axonbündel, welches in den von der abgeleiteten Mitralzelle innervierten Glomerulus projizierte, führte die Teststimulation zu Aktionspotentialen in der abgeleiteten Mitralzelle. Es wurde darauf geachtet, dass die Stimulationselektrode sich nicht in der Glomerularschicht, sondern in der Nervenfaserschicht befand, um eine direkte Stimulation der Mitralzelle auszuschließen. Bei *cell attached*-Messungen wurde eine Position als geeignet erachtet, wenn jede Stimulation eine Erhöhung der Aktionspotential-Frequenz bewirkte, wobei die Stimulation mindestens ein Aktionspotential auslösen musste, welches in einem reproduzierbaren Abstand nach Beginn der Stimulation auftrat. Während des Experiments wurde zur Stimulation in einem Intervall von 10 s ein schwacher Einzelstimulus von 100 μ A. mit einer Dauer von 50 μ s appliziert, der zu einer messbaren Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz führte, und wie bei Najac et al. (2011) gezeigt ausreicht, um die typische, mehrphasige Reaktion der Mitralzelle in *voltage clamp* auszulösen. Der

Abstand zwischen den Stimulationen war groß genug, um zusätzlich die basale Aktionspotentialfrequenz der Mitralzelle beobachten und analysieren zu können.

2.4.4 Etablierung einer elektrophysiologischen Messkonfiguration

Zu Beginn des elektrophysiologischen Experiments wurde das Schnittpräparat aus dem Aufbewahrungsbad in das Versuchsbad am Messplatz überführt. Um Bewegungen des Präparates während des Experiments zu vermeiden, wurde es mit einem mit U-förmigen Platindraht, der mit dünnen Nylonfäden bespannt war, am Boden des Versuchsbads fixiert. Über eine Perfusion wurde das Präparat kontinuierlich mit Carbogen begaster ACSF umspült. Messelektroden wurden mittels eines Horizontal-Pipettenziehgeräts aus Borosilikatglaskapillaren (Durchmesser: außen 1,5 mm, innen 1,17 mm) hergestellt und mit einer, zuvor gefilterten Intrazellulärlösung befüllt. Die Größe der Spitze der Messelektrode betrug ca. 1-3 μm . Bei Mitralzellen wurden Pipetten mit einem Widerstand von 1-3 $\text{M}\Omega$, bei Körnerzellen mit einem Widerstand von 3-5 $\text{M}\Omega$ verwendet. Die abzuleitende Zelle wurde zunächst anhand ihres Aussehens im Phasenkontrast-Durchlichtbild ausgewählt. Es wurde darauf geachtet, dass die Zelle sich nicht unmittelbar an der Oberfläche des Schnittpräparates befand, eine integere Form und Membranbegrenzung sowie ein nicht körniges Cytosol und einen unauffälligen Nukleus aufwies. Mitralzellen wurden anhand ihrer Lage in der Mitralzellschicht und ihrer Größe und Morphologie ausgewählt. In der *whole cell*-Konfiguration wurde ihre Morphologie zudem mittels des in der Intrazellulärlösung enthaltenen Farbstoffes Alexa 594 sichtbar gemacht. Auf diese Weise konnte auch kontrolliert werden, ob ein *tuft* vorhanden war oder nicht. Elektrophysiologisch wiesen Mitralzellen einen relativ niedrigen Membranwiderstand von ca. 80-300 $\text{M}\Omega$ und eine relativ große Zellgröße bzw. Membrankapazität auf. Körnerzellen wurden anhand ihrer Lage in der Körnerzellschicht, ihrer geringen Größe und ihrer rundlichen Form identifiziert. Sie wiesen einen hohen Membranwiderstand von bis zu 1,5 $\text{G}\Omega$, eine kleinere Membrankapazität als Mitralzellen und einen geringen Haltestrom auf. Um eine elektrophysiologische Ableitung der ausgewählten Zelle vorzubereiten, wurde die an den Vorverstärkern angeschlossene Messelektrode (mit leichtem Überdruck) mit Hilfe eines Mikromanipulators unter visueller Kontrolle in der Nähe der abzuleitenden Zelle positioniert. Der Pipettenwiderstand wurde kontinuierlich mittels des Kontrollprogrammes (pClamp) überprüft, indem ein hochfrequenter Testpuls von 10 mV an der Elektrode angelegt wurde (Membrantest). Potentialdifferenzen von Bad zu Pipettenlösung wurden in pClamp kompensiert. Ein *liquid junction potential* (LJP) wurde während der Messungen nicht kompensiert, sondern sollte bei der Interpretation der Messdaten, wenn nicht bereits angegeben, berücksichtigt werden. Das LJP der verwendeten Intrazellulärlösungen ist in Tabelle 3 zu finden. Schnelle kapazitative Ströme wurden mittels der C_{fast} -Funktion in pClamp kompensiert. Anschließend wurde die Messelektrode vorsichtig auf die Zellmembran aufgesetzt, bis sich eine leichte Eindellung, das sogenannte *dimpling*, zeigte. Gleichzeitig zeigte eine Erhöhung des Elektrodenwiderstands das Aufsetzen der Messelektrode auf der Zellmembran an. Um eine elektrisch weitestgehend dichte Verbindung zwischen Zelle und Messelektrode herzustellen, wurde dann durch Wegnahme des Überdrucks ein *gigaseal* etabliert. Die Messelektrode und die Zellmembran bildeten daraufhin eine enge

Verbindung. Die Qualität des *gigaseals* wurde über die Testsprünge des Membrantests kontrolliert. Schnelle kapazitative Ströme wurden erneut kompensiert. Die nun erreichte Messkonfiguration wird als *cell attached*-Konfiguration bezeichnet. Die Versuchsdurchführung in dieser Konfiguration ist in Abschnitt 0 beschrieben. Um eine *whole cell*-Konfiguration zu etablieren, wie sie bei *voltage clamp*- und *current clamp*-Ableitungen nötig ist, wurde der Membranfleck unterhalb der Messelektrode, der sogenannte *patch*, geöffnet. Das geschah durch Anlegen eines kurzzeitigen, leichten Unterdrucks an die Messelektrode. Vor Öffnung der Zelle wurde ein Haltepotential von -70 mV angelegt, um die Zelle auf einem negativen Membranpotential zu stabilisieren. War ein guter Zugang zu dem Zellinneren gegeben (erkennbar an dem in pClamp angezeigten Serienwiderstand, der nun höher war als in der Badlösung, jedoch ein Verhältnis zum Membranwiderstand von 1:10 nicht überschreiten sollte), wurde nach Öffnung des Zugangs zur Zelle zunächst etwa zwei Minuten gewartet, um einen relativ stabilen Zustand des Austausches von Intrazellulärlösung und Cytosol zu erreichen. Anschließend wurden basale Vitalitätsparameter wie der Membranwiderstand und der Haltestrom der Zelle überprüft. Bei Mitralzellen durfte der Membranwiderstand einen Wert von 80 MΩ nicht unterschreiten, Zellen mit einem negativeren Haltestrom als -800 pA wurden von der Messung ausgeschlossen. Zu Beginn jeder Messung wurde ein Spannungssprungprotokoll durchgeführt um die Vitalität und charakteristische Ausstattung der Zelle mit Ionenkanälen zu überprüfen. Zellen, die keine bzw. untypische spannungsabhängige Ströme oder keinen Natriumeinstrom bei Depolarisationen aufwiesen, wurden ebenfalls von den Messungen ausgeschlossen. Bei *current clamp*-Messungen sollten die Zellen ein natürliches Ruhemembranpotential negativer als -40 mV (LJP-korrigiert entspricht dies einem Membranpotential von ca. -60 mV) und spontan Aktionspotentiale aufweisen bzw. bei einer depolarisierenden Strominjektion dazu in der Lage sein, Aktionspotentiale zu generieren. Zellen, die diese Kriterien nicht erfüllten, wurden von der Messung ausgeschlossen.

Durchführung von Experimenten in der *cell attached*-Konfiguration

In dieser Arbeit wurden Änderungen der Aktionspotentialfrequenz von Mitralzellen in der *cell attached*-Konfiguration gemessen. Um die *cell attached*-Konfiguration zu erreichen, wurde wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben vorgegangen. In der Messpipette befand sich ACSF. Nach Etablierung eines *gigaseals* wurde die Stabilität der Messung und der Aktionspotentialfrequenz für ca. zwei Minuten beobachtet. Wurden zusätzlich Axone von ORNs elektrisch stimuliert, wurde wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben vorgegangen. Anschließend wurde das Experiment gestartet. Aufgezeichnet wurden die Aktionspotentiale als Membranströme in pA mittels pClamp-Software.

Durchführung von Experimenten in der *voltage clamp*-Konfiguration

Nach Überprüfung der Vitalitätsparameter der abzuleitenden Zelle (siehe Abschnitt 2.4.4) wurde das *voltage clamp*-Experiment gestartet. Spezielle Parameter einzelner Messprotokolle finden sich im Ergebnisteil des zugehörigen Versuchs. Am Ende eines Experiments wurde die Morphologie der abgeleiteten Zelle mittels eines in der Intrazellulärlösung enthaltenen Farbstoffs überprüft und

dokumentiert. Abhängig von dem Versuchsziel wurden unterschiedliche Intrazellulärlösungen in der Messpipette verwendet. Zur Untersuchung des Effekts von ATP auf das neuronale Netzwerk, zur Ableitung synaptischer Eingänge und zur Untersuchung der rekurrenten Inhibition wurde die CsCl-basierte Intrazellulärlösung verwendet. Diese Lösung erlaubt eine besonders gute elektrische Kontrolle der Zelle durch die Verminderung von Kaliumleckströmen durch Cäsium. Dies verbessert die Messbarkeit weiter vom Soma entfernter synaptische Ströme, z.B. im *tuft* der Mitralzelle. Dadurch, dass es sich um eine ‚Hochchlorid‘-Intrazellulärlösung handelt, können zudem inhibitorische Chloridströme bei einem Haltepotential von -70 mV als Einwärtsströme sichtbar gemacht werden. Exzitatorische und inhibitorische synaptische Eingänge werden dadurch in der Messspur nach unten dargestellt. Um den Effekt von Adenosin auf Mitralzellen unter möglichst physiologischen Bedingungen untersuchen zu können, wurde die K-Glukonat-basierte Intrazellulärlösung verwendet, die annähernd physiologische Parameter aufweist. Die Zusammensetzung der Intrazellulärlösungen findet sich in Tabelle 3. Die Aufzeichnung der Messspuren erfolgte mit einem 2 kHz Bessel-Filter bei einer Abtastrate von 20 kHz, die Zellkapazität und der Serienwiderstand wurden nicht kompensiert. Am Ende jeder Messung wurden Vitalitätsparameter und der Serienwiderstand erneut überprüft. Messungen, die eine Verschlechterung des Serienwiderstandes von über 30 % im Verlauf der Messung aufwiesen, wurden von den Auswertungen ausgeschlossen. Grundsätzlich wurden *voltage clamp*-Messungen bei -70 mV Haltepotential begonnen und anschließend auf das experimentell vorgesehene Haltepotential eingestellt

Durchführung von Experimenten in der *current clamp*-Konfiguration

Zu Beginn eines Experiments im *current clamp*-Modus wurde die *whole cell*-Konfiguration wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben etabliert und die Zelle zunächst kurz im *voltage clamp*-Modus bei -70 mV Haltepotential abgeleitet, um ihre Vitalitätsparameter zu überprüfen (vgl. Abschnitt 2.4.4). Anschließend wurde über die pClamp-Software vom *voltage clamp*- in den *current clamp*-Modus gewechselt. Das natürliche Membranpotential der Zelle konnte sich nun einstellen. Vor Beginn des Experimentes wurde eine Brücken-Kompensation durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, wurde für Experimente im *current clamp*-Modus die K-Glukonat-basierte Intrazellulärlösung verwendet, die es der Zelle erlaubt, ein physiologisches Membranpotential zu etablieren. Bei den meisten Experimenten im *current clamp*-Modus wurde das Membranpotential ohne äußere Manipulation aufgezeichnet. Wurde bei einem Experiment ein abweichendes Protokoll verwendet, ist dieses im Ergebnissteil des entsprechenden Experiments vermerkt.

2.4.5 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Das Prinzip der konfokalen Laser-Rastermikroskopie beruht darauf, dass die Emission der mittels eines Lasers angeregten Fluoreszenz nur aus der Fokusebene des Präparats aufgefangen wird. Fluoreszenz aus anderen Ebenen als der Fokusebene wird mit Hilfe einer Lochblende (*pinhole*) abgefangen und gelangt nicht auf den Photodetektor. Fluoreszenzsignale stammen daher nur aus

der Fokusebene und sind dieser Ebene eindeutig zuzuordnen. Es ist dadurch möglich, Messungen tiefer im Gewebe liegend mit einer höheren optischen Auflösung durchzuführen, als es mit herkömmlichen Mikroskopie-Methoden möglich wäre. Das letztendlich erzeugte Bild entsteht dadurch, dass der Laser die Objektfläche Bildpunkt für Bildpunkt abrastert. Dabei wird ein digitales Bild des betrachteten Objekts erstellt, bei dem die dargestellten Farben keine reale Entsprechung haben und frei gewählt werden können.

2.4.6 *Calcium imaging*

Calciumfarbstoffe ermöglichen eine Feststellung der intrazellulären Calciumkonzentration bzw. der relativen Veränderung der Calciumkonzentration über Änderungen ihrer Fluoreszenzeigenschaften. Eine Komplexierung von Calciumionen führt bei den hier verwendeten Farbstoffen zu einer Fluoreszenzerhöhung. Da das gemessene Fluoreszenzsignal das Calciumsignal in der Zelle widerspiegelt, wird im Folgenden eine transiente Fluoreszenzerhöhung als ‘Calciumsignal‘ oder ‘Calciumtransient‘ bezeichnet. In dieser Arbeit wurde mit den Calciumfarbstoffen Fluo-8-Salz und Fluo-4-AM gearbeitet. Der erstere wurde hierbei zur Messung von Calciumsignalen in einzelnen Mitralzellen verwendet. Die Applikation des Farbstoffs erfolgte über die Intrazellulärlösung in der Messelektrode. Der Farbstoff ist nicht membrangängig und verbleibt innerhalb der Zelle. Die Applikation von Calciumfarbstoff über eine Messelektrode erlaubt die Aufzeichnung intrazellulärer Calciumkonzentrationsänderungen parallel zu elektrophysiologischen Ableitungen. Sollten Calciumsignale in einer größeren Gruppe von Zellen im Präparat gleichzeitig aufgezeichnet werden, wurde ein membrangängiges Acetoxymethylester-Derivat verwendet. Durch die Ladung ihrer Chelator-Gruppen sind sowohl Fluo-8- als auch Fluo-4 in ihrer Salzform membranungängig. Die Veresterung des Fluo-4 führt dazu, dass die Moleküle in einer unpolaren Form passiv über die Membran in die Zelle diffundieren können. Intrazellulär wird der Acetoxymethylester durch endogene Esterasen abgespalten, wodurch das Fluo-4 am erneuten passieren der Zellmembran gehindert wird und zusätzlich in seiner aktiven Form vorliegt. Zum Beladen der Hirnschnitte mit Fluo-4-AM wurden sie mit 1 μ M des Calciumfarbstoffs/1 ml ACSF für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend für die Experimente in die Messkammer überführt. Fluo-8 und Fluo-4 wurden jeweils über einen 488 nm-Argon-Laser angeregt, da dessen Licht dem Exzitationsmaximum der Farbstoffe am nächsten ist. Die Fluoreszenz wurde über einen 500-nm-Langpassfilter detektiert. Die Aufnahme der Calciumsignale erfolgte in Zeitserien. Die Software EZ-C1 3.9 (Nikon Corporation) wurde zur Steuerung und Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale verwendet. Es wurden Bilder mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixel in der Glomerularschicht bzw. im Bereich des Mitralzell-*tufts* aufgenommen. Die Taktung der Bildserie erfolgte mit einer maximalen Frequenz von 1,2 Bildern/s. Der Start einer Bildserie wurde von der *patch clamp*-Software getriggert und ermöglichte so eine exakte zeitliche Koordination der *calcium imaging*- und *patch clamp*-Daten.

2.4.7 Applikation photoaktiver Substanzen (*uncaging*)

Photoaktivierbare Substanzen spielen eine zunehmend wichtige Rolle bei der Erforschung physiologischer Vorgänge. Grundsätzlich besteht das Prinzip photoaktivierbarer Substanzen darin, dass eine Substanz ihre Wirkung erst entfalten kann, wenn eine chemische Erweiterung des Moleküls photolytisch entfernt wird. So kann beispielsweise mit photoreaktiven Gruppen wie Nitrobenzol- oder Cumarinverbindungen Substanzen dahingehend modifizieren, dass sie biologisch nicht wirksam sind (*caged*). Die Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge spaltet diese Gruppen ab. Der Prozess der Photoaktivierung einer solchen Substanz wird als ‚*uncaging*‘ bezeichnet. Die Photoaktivierung erlaubt eine räumlich und zeitlich einzigartige Spezifität der Applikation pharmakologisch aktiver Substanzen. Insbesondere für die Untersuchung neuronaler Prozesse ist die Methodik sehr gut geeignet, da z.B. photoaktivierbare Neurotransmitter direkt an einzelnen Synapsen mit einer sehr schnellen Kinetik freigesetzt werden können. In dieser Arbeit wurde sogenanntes *caged*-ATP verwendet, das zunächst physiologisch inaktiv ist, jedoch durch die photolytische Abspaltung einer Nitrophenyl-Ester-Gruppe in seine aktive Form überführt werden kann (vgl. Abbildung 45). *Caged*-ATP wurde in einer Endkonzentration von 100 μM in das Versuchsbad gegeben, während die Pumpe ausgeschaltet war. Damit sich das *caged*-ATP gut im Gewebe verteilen konnte, wurde vor dem ersten *uncaging* acht Minuten gewartet. Die großflächige Photolyse von *caged*-ATP wurde mit einer UV-Lampe für 3 s durchgeführt. Das lokale *uncaging* von *caged*-ATP im *tuft* von Mitralzellen wurde durch die Bestrahlung einer Fläche von 30 x 30 μm in dem Bereich des mit Calciumfarbstoff sichtbar gemachten *tufts* mit dem 405 nm-Diodenlaser für 3 s auf 100 % Laserleistung (30 mW) erreicht.

2.5 Datenanalyse

2.5.1 Darstellung der Ergebnisse und Vorzeichenkonventionen

Im Ergebnisteil werden in der Regel zunächst eine beispielhafte Messspur eines Experiments und anschließend die statistische Auswertungen der dazugehörigen Gesamtstichprobe dargestellt. Die graphischen Darstellungen von elektrophysiologischen Messspuren, relativen Calciumsignalen und statistischen Analysen wurden mit OriginPro 9.0G erstellt und mit der Graphiksoftware CorelDRAW X6 bearbeitet. Die Applikation der Testsubstanzen ATP und Adenosin (bzw. A_1R -Agonisten) sind als Balken oberhalb, Inkubationen von Blockern unterhalb der Originalmessspur dargestellt. Die Dauer der jeweiligen Applikation ist anhand der Länge der Applikationsbalken erkennbar. Der Beginn des Applikationsbalkens zeigt die Ankunft der Substanz im Versuchsbad bzw. beim ATP-*uncaging* den Beginn des *uncaging*s an. Bei elektrophysiologischen Messungen in der *whole cell*-Konfiguration steht die Innenseite der Membran in Verbindung mit der Pipette. Ströme aus der Pipette heraus fließen über die Membran nach außen. Das Vorzeichen des gemessenen Stroms muss daher nicht umgekehrt werden. Die Ströme werden relativ zum Cytoplasma definiert, ein Fluss positiver Ionen in die Zelle hinein bzw. ein Strom von negativen Ionen aus der Zelle heraus wird als Einwärtsstrom bezeichnet und als negativer Strom (nach unten)

dargestellt. Bewegen sich positive Ionen aus der Zelle heraus bzw. negative Ionen in die Zelle hinein, wird dies als Auswärtsstrom bezeichnet und als positiver Strom (nach oben) aufgetragen. In der *cell attached*-Konfiguration müssen die Vorzeichen umgedreht werden, da hier die Außenseite der Membran mit der Pipette in Kontakt steht (Bertl et al., 1992). Originalmessverläufe von *calcium imaging*-Aufzeichnungen werden stets als Änderungen in Prozent in Bezug auf den Ruhe-Fluoreszenzwert angegeben. Histologische Ergebnisse wurden anhand von beispielhaften Fluoreszenz- bzw. Durchlichtaufnahmen dargestellt. Englische Begriffe wurden des einfacheren Verständnisses halber oder aus Mangel an passender deutscher Übersetzung verwendet und wurden in dieser Arbeit kursiv hervorgehoben.

2.5.2 Auswertung von elektrophysiologischen Daten

Auswertung der Größe von Ausströmen und Hyperpolarisationen

Die Größe von Adenosin-vermittelten Ausströmen wurde mit dem Programm Clampfit 10.2 ermittelt. Es wurde dazu die Differenz des Mittelwerts des Haltestroms während einer Minute unmittelbar vor der Adenosin-Applikation zu dem Mittelwert des Haltestroms über 1 min, während Adenosin im Versuchsbad vorhanden war, gebildet. Zur Ermittlung der Größe von Hyperpolarisationen wurde vergleichbar vorgegangen, nur wurden hier Mittelwerte des Membranpotentials gebildet. Eigene Beobachtungen zeigten, dass die maximale Wirkung von Adenosin ca. 1,5 min nach Start der Applikation auftritt. Zusätzlich wurde der Haltestrom bzw. das Membranpotential in der Phase des *washouts* bestimmt, um die Reversibilität der gemessenen Effekte zu untersuchen. Der *washout*-Wert wurde als Mittelwert des Membranpotentials/Haltestroms von einer Minute, frühestens fünf Minuten nach dem Einwaschen von Adenosin für 30 s ins Versuchsbad bestimmt.

Auswertung von Spannungssprüngen und Strominjektionen

Um Leitfähigkeitsänderungen durch Adenosin festzustellen, wurde während einer kontinuierlichen Aufzeichnung des Haltestroms bei -70 mV alle 10 s ein Sprung des Haltepotentials für 1 s auf -80 mV durch Strominjektion vorgenommen. Die Größe dieses Stroms ist proportional zur Membranleitfähigkeit und erlaubt, Änderungen der Membranleitfähigkeit festzustellen. Zur Bestimmung des Umkehrpotentials der durch Adenosin geöffneten Leitfähigkeit wurden verschieden starke, negative Strominjektionen vor und während einer Adenosin-Applikation durchgeführt. Die Amplitude der Potentialänderung wurde in ihrer Plateauphase bestimmt und die Werte unter Adenosin-Einfluss von den Kontrollwerten (vor Adenosin-Applikation) abgezogen. Die Differenz stellt die Potentialänderung dar, die durch Adenosin bei einem vorgegebenen Haltestrom verursacht wird (ΔPotADO). Ist der Anteil der Adenosin-induzierten Leitfähigkeit am vorgegebenen Haltestrom gleich Null (also im Umkehrpotential dieser Leitfähigkeit), so ist keine Potentialänderung durch Adenosin zu erwarten. Wird ΔPotADO (Ordinate) gegen die

entsprechenden Membranpotentialwerte vor Adenosin-Applikation (Abszisse) aufgetragen, so ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Kurve mit der Nulllinie der Ordinate das Umkehrpotential der Adenosin-induzierten Leitfähigkeit.

Auswertung der Frequenz synaptischer Eingänge

Die Anzahl synaptischer Eingänge wurden mit dem Programm Mini Analysis ermittelt. Es wurde dazu die Anzahl der synaptischen Eingänge pro 20 oder 30 s ausgewertet. Mit EXCEL wurden die prozentualen Änderungen der Anzahl über die Zeit bzw. während der Applikation von ATP oder Adenosin bezogen auf die Kontrollwerten berechnet. Als Kontrollwert diente dazu der Mittelwert an synaptischen Eingängen vor der ATP- oder Adenosin-Applikation. Nach Beginn der Messung wurde mindestens zwei Minuten gewartet, bevor die Kontrollwerte erhoben wurden.

Auswertung der rekurrenten Inhibition

Rekurrente Inhibition wurde durch eine kurze Depolarisation der abgeleiteten Mitralzelle evoziert (Isaacson und Strowbridge, 1998). Der ausgelöste kumulative Einwärtsstrom wurde in Form der *netcharge* (pA/s) als Maß für die rekurrente Inhibition definiert. Zur Ermittlung der *netcharge* wurde das Programm Clampfit verwendet. Hierfür wurde der Mittelwert des Haltestroms vor dem Spannungssprung als Referenz verwendet und das Strom-Integral (*netcharge*) unterhalb (negativ) des Referenzwertes in einem Zeitfenster von 2 s nach Ende der Depolarisation bestimmt. Der Mittelwert aus drei Kontrollwerten zu Beginn der Messung diente als Bezugspunkt bei der Berechnung der relativen Änderung der *netcharge* und wurde als 100 % definiert. Um den Effekt von Adenosin zu quantifizieren, wurde der Mittelwert aus den drei Maximalwerten unter dem Einfluss von Adenosin errechnet. Bei der Bestimmung der Autoexzitation wurde analog vorgegangen, das Integral jedoch innerhalb eines Zeitfensters von 1 s nach Ende der Depolarisation bestimmt.

Auswertung der Aktionspotentialfrequenz in der *cell attached*-Konfiguration

Die Aktionspotentialfrequenz wurde mit Hilfe der ‚*event detection*‘ über die Funktion ‚*threshold search*‘ in Clampfit 10.2 ausgewertet. Dabei wurde nur der Zeitpunkt des Aktionspotentials ermittelt, andere Parameter wurden nicht ausgewertet. Anschließend wurden die Daten mit der ‚*binning*‘-Funktion in Zeitintervalle umgerechnet und die Anzahl an Aktionspotentialen pro 100 ms ermittelt. Auf Grundlage dieser Daten wurde in EXCEL weitergearbeitet. Da die Stimulation von ORN-Axonon von der *patch clamp*-Software getriggert wurde, war es möglich, konkrete Phasen bezogen auf den Zeitpunkt der Stimulation zu definieren und den Effekt von Adenosin auf die Anzahl der Aktionspotentiale in den unterschiedlichen Phasen zu untersuchen. Die Phasen wurden anhand von Literaturwerten (Najac et al., 2011) und eigenen Beobachtungen eingeteilt. Die Spontanfrequenz gibt hierbei die stimulationsunabhängige Aktionspotentialfrequenz der Mitralzelle wieder. Die erste Phase umfasst die ersten 100 ms nach der Stimulation. In dieser Zeit ist eine

direkte Reaktion der Mitralzelle auf die Stimulation zu vermuten. Die 2. Phase umfasst einen Zeitrahmen von 600 ms.

Auswertung von *calcium imaging*-Daten

Für die teilweise parallel zu elektrophysiologischen Daten erhobenen *calcium imaging*-Daten erfolgte die erste Auswertung mit dem Programm EZ-E1 Viewer (Nikon). Hier wurden Bereiche sogenannter ‚*regions of interest*‘ (ROI) ausgewählt, in denen die Änderungen von Calciumtransienten über die Zeit der Messung verfolgt wurden. Bei der Auswertung von Calciumtransienten in Astrozyten wurden die Zellkörper von periglomerulären Astrozyten als ROI definiert. Bei Calcium-Messungen im Mitralzell-*tuft* wurde der *tuft* als ROI definiert. Die im EZ-E1-Viewer ermittelten Fluoreszenzänderungen innerhalb der ROI wurden nach EXCEL exportiert. Dort wurden die Daten relativ zur Ruhefluoreszenz normiert. Dargestellt sind die prozentualen Fluoreszenzänderungen (ΔF) bezogen auf die Ruhefluoreszenz unmittelbar vor dem *uncaging* von ATP.

2.5.3 Statistische Analysen

Statistische Auswertungen und Analysen wurden mit den Programmen EXCEL und Origin 9.1G durchgeführt. Zur Analyse von Mittelwertsunterschieden wurden Hypothesentests mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ durchgeführt. Abhängig von den vorliegenden Daten wurde entweder ein gepaarter oder ein ungepaarter Students-T-Test angewendet. Wenn möglich wurde das Versuchsparadigma so gewählt, dass gepaarte statistische Analysen durchgeführt werden konnten. Für die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) galt eine Änderung als signifikant, bei $p < 0,05$ (*), als hochsignifikant, wenn $p < 0,01$ (**) und als höchstsignifikant wenn $p < 0,005$ (***). Signifikanzen wurden in Diagrammen mittels Stern (*/**/***) gekennzeichnet. Nicht signifikante Unterschiede wurden nicht gesondert markiert. Balkendiagramme stellen das arithmetische Mittel des untersuchten Parameters der untersuchten Stichprobe dar. Die Stichprobengröße ist mit dem Kürzel ‚n‘ angegeben. Als Maß für die Streuung einer Stichprobe wird der Standardfehler angegeben und in Diagrammen als Fehlerbalken dargestellt.

2.6 Histologie

Mittels histologischer Methoden wurde der A_1 -Rezeptor im olfaktorischen Bulbus lokalisiert. Es wurden immunhistochemische Methoden, *in situ*-Hybridisierungen und ein Ligandenbindungsverfahren angewendet. Histologische Untersuchungen wurden, soweit möglich, an mindestens zwei Tieren unabhängig voneinander durchgeführt.

2.6.1 Immunhistochemie

Um die Lokalisation des A₁-Rezeptors auf Proteinebene im olfaktorischen Bulbus zu bestimmen wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt. Die genauen Spezifikationen der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 5 zu finden. Immunhistologische Färbungen ohne TSA-Signalamplifikation (siehe Abschnitt 2.6.2) wurden folgendem Protokoll entsprechend durchgeführt:

Der olfaktorische Bulbus wurde wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben präpariert, anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur in PFA (4 %) fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 120 µm dicke Sagittalschnitte angefertigt. Bei einem Teil der Schnitte wurde nun zunächst ein *antigen retrieval* durchgeführt, das durch die Fixierung ggf. maskierte Epitope wieder freilegt (Shi et al., 2011). Hierzu wurden die Gewebeschnitte eine halbe Stunde bei 99 °C in Citratpuffer erwärmt. Alle Präparate wurden dann für eine Stunde in Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verringern. Anschließend wurde der Anti-A₁-Rezeptor-Primärantikörper in Primärantikörperlösung im Verhältnis 1:500 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst dreimal mit PBS gewaschen, ehe sie mit dem Sekundärantikörper (1:1000) und dem Zellkernfarbstoff Hoechst (1 µM) in 1x PBS abgedunkelt und für vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Bevor die Schnitte zur Visualisierung der Fluoreszenzmarkierung auf einem Objektträger in Immomount eingebettet und mit einem Deckgläschen abgedeckt wurden, wurden sie noch dreimal 5 min in PBS gewaschen.

2.6.2 TSA-Signalamplifikation

Das Tyramid-Signal-Amplifikations-System (TSA) von Perkin-Elmer ist eine Methode zur verbesserten Detektion niedrig-exprimierter Proteine oder RNA. Das Prinzip beruht auf der Generierung von Fluorophor-markierten Tyramidradikalen durch eine an den verwendeten Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP). Freie Tyramidradikale binden daraufhin an Tyrosine in unmittelbarer Nähe des Antigen-HRP-Sekundärantikörpers. Ungebundene Tyramidradikale bilden Dimere und werden ausgewaschen. Durch die große Anzahl Fluorophor-markierter Tyramidmoleküle in der Nähe des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers kommt es zu einer 500-1000-fachen Signalverstärkung, die deutlich über der Verstärkung durch ein Standard-Primär-Sekundärantikörpersystem liegt (Qian und Lloyd, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde das TSA-System verwendet, um eine verbesserte Detektion des gering exprimierten A₁-Rezeptors zu erzielen. Da das System am einfachsten in eine immunhistochemische Färbung mit Kryoschnitten auf Objektträgern integriert werden kann, wurde zunächst ein Protokoll zur Immunhistochemie auf Objektträgern im Labor etabliert und anhand des Sauren Gliafaserproteins (GFAP) getestet, da für dieses Protein spezifische Antikörper vorhanden sind. Das TSA-System wurde nach Empfehlungen von Perkin-Elmer in das Färbeprotokoll integriert. Hierbei konnte eine Signalverstärkung nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Nachdem die Methode etabliert war, wurde eine immunhistochemische Färbung des A₁-Rezeptors auf Objektträgern mit integriertem TSA-System (vgl. Abschnitt 3.2.4.1) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Die Herstellung der Kryoschnitte erfolgte wie in Abschnitt 2.6.4.2 beschrieben. Die Schnittpräparate wurden für fünf bis zehn Minuten in PFA (4 %) fixiert und anschließend dreimal in PBS gewaschen (3 x 5 min). Endogene Peroxidasen im Gewebe wurden mit einer zehnminütigen Inkubation in 1,5 % Wasserstoffperoxid inhibiert. Vor einer halbstündigen Präinkubation der Schnitte mit TN-Blockierlösung wurden die Schnitte 3x5 min in TNT-Puffer gewaschen. Anschließend wurde der anti-A₁-Rezeptor-Primärantikörper in TN-Blockierlösung 1:500 für eine Stunde inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen (3x5 min) mit TBS-Puffer, bevor der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper für eine halbe Stunde in TN-Blockierlösung inkubiert wurde. Nach nochmaligem Waschen (3x5 min) mit TBS-Puffer wurde die *TSA Working Solution* (1:50) für zehn Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließendes Waschen (3x5 min TBS) entfernte ungebundene Tyramidradikale. Eine Zellkernfärbung erfolgte mittels Hoechst (1 µM). Nach einem letzten Waschschrift (3x5 min TBS) wurden die Schnitte mit Immomount eingebettet und mit einem Deckgläschen eingedeckelt.

2.6.3 Ligandenbindungsverfahren

In dieser Arbeit wurde der fluoreszenzmarkierte A₁-Rezeptor-Ligand PSB 1165 eingesetzt, um den A₁-Rezeptor in unfixiertem Gewebe zu lokalisieren. PSB 1165 wirkt als Agonist für den A₁-Rezeptor und wurde freundlicherweise von Dr. Christa Müller (Pharmakologisches Institut, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Das Bindungsverhalten von PSB 1165 an den A₁-Rezeptor wurde bis jetzt noch nicht *in situ*, sondern lediglich in Bindungsassays getestet. Die verwendeten Konzentrationen finden sich den einzelnen Ergebnissen zugeordnet in Abschnitt 3.2.4.2.

2.6.4 *In situ*-Hybridisierung

2.6.4.1 Herstellung einer A₁-Rezeptor spezifischen RNA-Sonde

Mit *in situ*-Hybridisierungen (ISH) können RNA bzw. DNA spezifisch im Gewebe nachgewiesen werden. Dazu werden mit einem Nachweissystem markierte RNA- oder DNA-Sonden verwendet die spezifisch an die komplementäre Sequenz der gewünschten RNA oder DNA binden und anschließend im Gewebe nachgewiesen werden können. Wird eine bestimmte *mRNA* im Gewebe nachgewiesen zeigt die Detektion der *mRNA* an, dass das Zielprotein vorhanden ist bzw. wahrscheinlich zur Zeit exprimiert und translatiert wird. Es ist damit folglich möglich die Expression eines bestimmten Proteins im Gewebe nachzuweisen. Abhängig von der verwendeten Methodik erlaubt die *in situ*-Hybridisierung eine Feststellung der Expression der RNA im Gewebe bis hin zur Auflösung auf Einzelzellebene. Im Rahmen dieser Arbeit wurde *mRNA* des A₁-Rezeptors mittels *in situ*-Hybridisierung im olfaktorischen Bulbus nachgewiesen. Es wurden sowohl Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Sonden als auch Hybridisierungen mit DIG-markierten Sonden durchgeführt. Die Methode der DIG-markierten *in situ*-Hybridisierung wurde dazu zunächst im Labor der AG Lohr etabliert. Radioaktive *in situ*-Hybridisierungen gelten als die

sensibelste Nachweismethode bei schwach exprimierter RNA, eine genaue zelluläre Auflösung ist bei dieser Methode allerdings nicht möglich. DIG-markierte Sonden ermöglichen eine bessere Auflösung der Lokalisation der *mRNA* im Gewebe (Jin und Lloyd, 1997). Verwendet wurden in beiden Fällen RNA-Sonden, die bei der Herstellung und Versuchsdurchführung zwar diffiziler als DNA-Sonden sind, aber zum *mRNA*-Template die stabilste Bindung eingehen. Die A₁-Rezeptor-Sonde wurde im Rahmen dieser Arbeit entworfen und mit Hilfe molekularbiologischer Methoden hergestellt. Zusätzlich wurden noch eine GFAP- und eine A_{2A}-Rezeptor spezifische Sonde hergestellt, Ergebnisse hierzu werden in dieser Arbeit jedoch nicht besprochen. Eine radioaktive *in situ*-Hybridisierung des A_{2A}-Rezeptors findet sich im Anhang dieser Arbeit (Anhang 4). Beschreibungen und Ergebnisse beziehen sich größtenteils auf die A₁-Rezeptor-Sonde. Die Sondenherstellung erfolge nach folgendem Schema:

[I] RNA-Isolation → [II] cDNA-Synthese → [III] A₁R spezifische PCR → [IV] Ligation in einen Vektor und Transformation in Bakterien → [V] Plasmidpräparation und Kontrolle der Sequenz → [VI] große Plasmidpräparation → [VII] Linearisierung des Vektors (S / AS) → [VIII] Reinigung des linearisierten Vektors→

Radioaktive ISH: [IXr] Reverse Transkription mit radioaktiv markierten UTPs(³⁵S-UTP) → [Xr] Kontrolle der radioaktiven Markierung

DIG ISH: [IXdig] Reverse Transkription mit DIG-markierten UTPs → [Xdig] Kontrolle der Sondengröße und Kontrolle der DIG-Markierung

[I] Zur Erstellung von Sonden für *in situ*-Hybridisierung wurde zunächst RNA isoliert. Bei der Isolation von RNA aus tierischen Geweben oder Zellen ist darauf zu achten, dass RNA nicht degradiert. Es muss daher zügig, in gekühlter Umgebung und unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden. Zur Gewinnung von RNA wurden Gehirne von zwei bis zehn Tage alten NMRI-Mäusen verwendet. Die Isolation der RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der extrahierten RNA wurde photometrisch bestimmt und die Qualität der RNA mittels RNA-Gelelektrophorese überprüft. Es wurden 1 %ige Agarose-Gele verwendet. Die Agarose wurde dazu in 22,5 ml DEPC-H₂O im entsprechenden Verhältnis durch Aufkochen gelöst und anschließend mit 3 ml 10 x MOPS und 4,5 ml Formaldehyd versetzt. Den RNA-Proben wurde vor dem Erhitzen 2 x RNA-Ladepuffer mit Ethidiumbromid hinzugegeben. Für die Elektrophorese wurden jeweils 700 µl RNA eingesetzt. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS verwendet und die Elektrophorese wurde bei 100 Volt durchgeführt. Die Geldokumentation wurde mit dem Fusion Fx7 (Peqlab, Erlangen) Geldokumentationssystem durchgeführt. Da bereits dem Ladepuffer Ethidiumbromid zugesetzt war, konnten Banden im Gel direkt mittels Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

[II] Die intakte RNA wurde zunächst mit Hilfe einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. cDNA ist stabiler als RNA, kann somit besser gelagert werden und ist zusätzlich das Ausgangsmaterial für PCRs. Verwendet wurde hierfür die reverse Transkriptase ‚SuperScript III‘

(Invitrogen, Karlsruhe). Als Matrize wurde 1 µg Gesamt-RNA, aus der vorhergehenden RNA Isolation eingesetzt. Der Ansatz zu cDNA Synthese bestand aus: x µl RNA, 1 µl dNTP-Gemisch, 1 µl oligo(dT)-Gemisch (50 µM), HPLC Wasser. Der Ansatz wurde zunächst 5 min bei 65 °C erwärmt und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 4 µl 5 x FirstStrand Puffer, 1 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNase out und 1 µl Superscript III Enzym (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und der Ansatz im PCR Cycler für 60 min bei 50 °C und anschließend 15 min bei 70 °C erwärmt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bis zur Verwendung bei -20 °C. Zur Amplifikation der A₁-Rezeptor spezifischen SONDENSEQUENZ wurden zunächst Primer (Tabelle 6) anhand einer bekannten A₁-Rezeptor-Sequenz von NCBI erstellt (siehe Anhang 2).

[III] Mittels PCR wurde anschließend die entsprechende Sequenz amplifiziert. Dabei wurde folgendes PCR-Protokoll verwendet: 1. primäre Denaturierung 96 °C 5 min, 2. Denaturierung 94 °C 30 s, 3. Primer *annealing* 48-58 °C 30 s, 4. Elongation 72 °C 1 min, 5. finale Elongation 72 °C 10 min, 35-39 Zyklen. Der PCR-Ansatz war wie folgt: 5 µl 10x PCR-Puffer, 1,5 µl MgCl₂ (50 mM), 1,5 µl dNTP-Gemisch (10 mM), 1,5 µl *forward*-Primer (10 mM), 1,5 µl *reverse*-Primer (10 mM), 1 µl DNA-Template, 1 µl Taq DNA-Polymerase, ad. 50 µl HPLC-H₂O. Um die Größe eines DNA Fragments, wie beispielsweise eines PCR-Produkts, zu ermitteln, wurde die DNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Sie funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie die RNA-Gelelektrophorese mit dem Unterschied, dass das Gel nicht denaturierende Bedingungen aufweist. Es wurden 1 %ige Gele verwendet und die Agarose dazu in 1 x TBE gelöst. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit einem 6 x Ladepuffer (6 x Loading Dye Solution, Fermentas) versetzt. Als Standard wurde der GeneRuler™ DNA Ladder Mix (100-1000 bp, Fermentas) zusätzlich zu den Proben aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet und die Elektrophorese wurde bei 110 Volt durchgeführt. Bei diagnostischen Gelen wurden 30 ml Gele mit kleinen Probetaschen verwendet und 5 µl Probe aufgetragen. Präparative Gele wurden mit einem Volumen von 36 ml und großen Tasche hergestellt und je nach Probenmenge 20 bis 50 µl aufgetragen. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel für 5-10 min in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt, anschließend mit Wasser gewaschen und die DNA-Banden darauf mit dem Fusion Fx7 (Peqlab, Erlangen) Geldokumentationssystem dargestellt.

[IV] PCR-Produkte oder geschnittene Vektoren, die auf einem Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt wurden, wurden mit Hilfe des MinElute™ Gel Extraktion Kit (Qiagen) aus dem Gel zurückgewonnen (präparatives Gel), von Primern, Salzen und Proteinen befreit und für anschließende Verwendungen aufbereitet. Um den quantitativen Erfolg einer Plasmidpräparation, RNA Isolation oder Gelaufreinigung festzustellen, wurden photometrische Konzentrationsbestimmungen durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmungen wurden mit dem Photometer NanoDrop 1000 (Peqlab, Erlangen) durchgeführt. Dazu wurde 1 µl Probe aufgetragen. Um das durch die PCR und anschließende Gelaufreinigung erhaltene A₁-Rezeptor analoge DNA-Fragment weiter zu bearbeiten wurde es in den pGEM-T easy Vektor ligiert. Ligiert wurde wie folgt: 3 µl DNA-Fragment 1 µl Vektor, 5 µl Ligationspuffer (2x) (Promega, Mannheim), 1 µl T4-DNA Ligase (Promega, Mannheim), ad 10 µl H₂O, Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Für die Transformation, also das Einbringen von Fremd-DNA in eine prokaryotische Zelle, wurde der

Bakterienstamm Jm109 verwendet. Zu 25 µl Jm109 wurden je 5 µl des Ligationsansatzes hinzugegeben und vorsichtig durchmischt. Anschließend wurde der Transformationsansatz 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 50 s folgte eine Kühlung auf Eis und Zugabe von 500 µl L-Medium und eine anschließende eineinhalbstündige Inkubation bei 37 °C. Abschließend wurde die Zellsuspension auf mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum versetzten Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für eine schnelle Identifizierung der nach der Transformation gewachsenen Kolonien auf eine erfolgreiche Transformation hin, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierzu wurde eine PCR Reaktion durchgeführt, bei der die cDNA durch eine kleine Menge der zu untersuchenden Kolonien ersetzt wurde. Zusätzlich war dem Standard PCR-Programm eine vierminütige Hitze phase bei 95 °C vorangeschaltet, die dem Aufschluss der Bakterienzellen dient. Positive Klone wurden als Dauerkultur für die weitere Verwendung bei -80 °C gelagert. Übernachtskulturen werden zum Vermehren einzelner Bakterienkolonien oder aus Dauerkulturen angesetzt. So ist es möglich aus den über Nacht gewachsenen Kulturen größere Bakterienkulturen anzupflanzen oder direkt Plasmide zu isolieren. Standardmäßig wurden die Übernachtskulturen wie folgt angesetzt: Zu 5 ml L-Medium in Inkubationsröhrchen (Sarstedt) wurde das entsprechende Selektionsantibiotikum hinzugegeben und das Medium mit einer kleinen Menge der entsprechenden Bakterien beimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Für die längerfristige Lagerung von Bakterienklonen wurden Dauerkulturen angelegt, indem 700 µl einer Übernachtskultur des jeweiligen Klons mit 300 µl Glycerin versetzt und anschließend gut durchmischt wurden. Die Lagerung der Dauerkulturen erfolgte bei -80 °C.

[V] Unter einer Plasmidisolierung versteht man die Isolation der Plasmid-DNA aus Bakterien. Die Plasmidpräparationen wurden mit dem ‚peqGOLD Plasmid Mini Kit‘ (Peqlab, Erlangen) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Plasmidkonzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt und zunächst auf die Richtigkeit der enthaltenen A₁-Rezeptor-Sequenz hin mittels Sequenzierung untersucht (durchgeführt von der Firma GATC, Konstanz). Benötigt wurden 80-100 ng/µl DNA, 7,5 µl Plasmid und 2,5 µl Primer (T7). Aus dem Klon mit der richtigen Sequenz wurden die Sonden gewonnen. Die Dauerkulturen sollten zum Ansatz neuer Sonden aufgehoben werden. In dieser Arbeit wurden folgende Dauerkulturen (Klone) mit der jeweils korrekten Sondensequenz im Vektor hergestellt: A1-Rezeptor DK A1 1.2, A2A-Rezeptor; A2a 2, GFAP; GFAP6.

[VI] Eine große Plasmidpräparation wird zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid eingesetzt und läuft prinzipiell wie die unter [V] beschriebene Plasmidpräparation ab. Es wurden je Klon 50 ml Bakterienübernachtskultur in dem entsprechenden Selektionsantibiotikum angesetzt.

[VII] Zur Linearisierung des Vektors wurde der Ansatz für die *sense* und *antisense*-Sonde geteilt. Es wurden mindestens 2 µg Plasmid für jeden Ansatz verwendet und zur korrekten Einteilung in *sense*- und *antisense*-Sequenz auf die Orientierung der Sequenz im Vektor des ausgewählten Klons geachtet. Für den Klon DK A1 1.2, der sich ‚verkehrt herum‘ im Vektor befindet gilt:

- *Sense*: Restriktion mit NcoI; *in vitro*-Synthese mit SP6.

- *Antisense*: Restriktion mit NdeI, *in vitro*-Synthese mit T7.
- (Klon DK GFAP6; S = NdeI T7, AS = NcoI SP6. Klon A2_{A2}; S = NcoI SP6, AS = NdeI T7)
- Der Restriktionsansatz wurde für ca. 3 h 37 °C oder ü.N. inkubiert. Pro 10 µl Ansatz wurde 1 µl Enzym verwendet. Wurde das Volumen zu groß, wurde das Plasmid zuvor mit ETOH gefällt um auf diese Weise die Konzentration zu erhöhen. Gestoppt wurde die Reaktion bei 65 °C für 20 min.

[VIII] Reinigung des linearisierten Vektors

- Phenol/Chloroform (PCL)-Extraktion: Der Restriktionsansatz wurde mit HPLC-H₂O auf 200 µl aufgefüllt, 2 x mit 1 Vol PCL ausschüttelt (dabei wurde darauf geachtet, die richtige Phase des PCL - untere Phase - zu verwenden), 1 min abzentrifugiert, die obere wässrige Phase weiterverwendet, 2 x mit 1 Vol Diethylether ausgeschüttelt, abzentrifugiert und schließlich die obere Phase verworfen. Die untere Phase (Präzipitat) wurde weiterverwendet, aber zuvor 30 min bei Raumtemperatur abgedampft.
- Ethanol-fällung: Gelöst wurde das Präzipitat in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 und anschließend 1/10 Vol 3M Na-Acetat + 2,5 Vol 100 % ETOH hinzugeben, bei -80 °C ü.N. gefällt und 20 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen und anschließend 2x mit 70 %igem ETOH gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Gelöst wurde das Pellet in 15 µl 10mM Tris-HCl pH 8,0. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am NanoDrop (pro Sondenansatz wurde 1 µg linearisierter Vektor benötigt)

[IXr] Die reverse Transkription zur radioaktiven Markierung der Sonden erfolgte auf Grundlage des linearisierten Vektors und wurde mit dem Maxiscript Kit (Ambion) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte durch den Einbau von ³⁵S-UTPs.

[Xr] Um zu kontrollieren ob ein Einbau von radioaktiven Nukleotiden in die Sonde erfolgte wurden im Anschluss an die reverse Transkription die *trichloroacetic acid pedictable counts* gemessen. Das Verfahren hierbei entsprach den vom Maxiscript-Kit vorgegebenen Herstellerangaben.

[IXdig] reverse Transkription mit DIG-markierten UTPs

- Das RNA-labeling mit DIG-markierten UTPs erfolgte mit dem DIG-RNA Labeling Kit von Roche: Dazu wurde je 1 µg gereinigtes DNA-Template pro *sense* bzw. *antisense*-Sonde (und außerdem Kontroll-DNA 4 µl) mit RNase freiem DEPC H₂O auf 13 µl aufgefüllt. Auf Eis wurde folgendes hinzugegeben: 10 x NTP labeling mixture (Eppi 7) 2 µl, 10 x Transkriptionspuffer 2 µl, RNase-Inhibitor 1 µl, RNA Polymerase T7 oder SP6 2 µl und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl DNase I-

RNAse-frei dazupipettiert, um das DNA-Template zu entfernen (15 min Inkubation bei 37 °C). Zum Stoppen der Reaktion wurden 2 µl 0.2 M EDTA (pH 8,0) dazugegeben.

- Zur Lithium-Chlorid-Fällung der gelabelten RNA-Sonden wurde 1/10 4 M Lithium-Chlorid + 4 Vol 100 % ETOH zu dem Ansatz hinzugegeben und ü.N. bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 8 °C für 45 min bei 14000 rpm zentrifugiert, mit 10 Vol. vom Ausgangsvolumen 75 % ETHO in DEPC-H₂O gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Gelöst wurden die Sonden in 50 µl H₂O + 1 µl RNAse Inhibitor (Lagerung bei -80 °C).

[Xdig] Kontrolle der erfolgreichen DIG-Markierung und der Integrität der RNA-Sonden

- Ein *Dot-Blot* wurde angewendet um zu überprüfen ob die DIG-Markierung der Sonden erfolgreich war. Hierzu wurde je 1 µl einer bestimmten Sondenkonzentration auf einer Nitrozellulosemembran aufgetragen. Ein Farbumschlag fand nur dann statt, wenn die DIG-Markierung erfolgreich war (vgl. Anhang 3, Abbildung 46 B):
 - Es wurde eine Verdünnungsreihe mit der Sonden-RNA und der Kontroll-RNA aus dem verwendeten DIG RNA Labeling Kit in RNA-Verdünnungspuffer angefertigt.
 - Je 1 µl der Verdünnungen wurden auf eine Nitrocellulosemembran (Porablot NPC, Porenweite 45 µm, Macherey-Nagel, Duren) auftragen.
 - Anschließend wurde ein *crosslinking* der RNA unter UV-Licht für 5 min bei 70 % Intensität durchgeführt, die Membran 5 min in 1x PBS gewaschen und dann für 5 min in Puffer B äquilibriert.
 - Eine Hybridisierung mit alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten (Roche Diagnostics, Mannheim) erfolgte für 1 h bei RT in einer 1:1000-Verdünnung in Puffer B. Anschließend wurde die Membran 2 x 15 min in Puffer A gewaschen und 15 min in Puffer C äquilibriert.
 - Die Detektion erfolgte in 15 ml Detektionspuffer unter Lichtausschluss bis zu einer eindeutigen Signalbildung, Die Reaktion wurde durch Spülen mit VE-H₂O beendet.
- Eine RNA-Gelelektrophorese wurde durchgeführt um die RNA-Sonden auf ihre Integrität hin zu überprüfen. Eine einzelne distinkte Bande zeigte an, dass die RNA-Sonden intakt waren (vgl. Anhang 3, Abbildung 46 A).

2.6.4.2 Versuchsprotokoll für *in situ*-Hybridisierungen mit DIG-markierten Sonden

Zur Detektion von *mRNA* im Gewebe wurden zu der Zielsequenz komplementäre DIG-markierte RNA-Sonden hergestellt. Da RNA schnell von Ribonukleasen (RNAsen) abgebaut wird, müssen

sowohl bezüglich der *mRNA* im Gewebe, die nachgewiesen werden soll, als auch bezüglich der Sonden Vorkehrungen getroffen werden, um die Integrität der RNA zu erhalten. Benötigte Glas- und Plastikware sowie Lösungen wurden daher soweit möglich sterilisiert oder autoklaviert. Zusätzlich wurden einige Lösungen mit DEPC (1 %) behandelt, das RNAsen inaktiviert. Arbeitsflächen und Handschuhe wurden vor und während kritischer Arbeitsschritte mit ‚RNase AWAY‘ behandelt, welches RNAsen deaktiviert. Die Rezepte der benötigten Lösungen finden sich in Tabelle 4. Ausgelegt war die Menge der Lösungen für einen Coplintank (50 ml), in dem zeitgleich bis zu zehn Objektträger (OT) behandelt werden konnten. Im Folgenden ist das im Rahmen dieser Arbeit erarbeitete Protokoll zur Durchführung von DIG-markierten *in situ*-Hybridisierungen (ISH) des A₁-Rezeptors in Stichpunkten in Form einer Arbeitsanweisung aufgeführt:

Gewebepräparation und Herstellung von Kryoschnitten:

- Kryostaten vorbereiten (mind. 30 min vor Beginn): Einstellung der Schnittkammer auf -16°C und des Objektisches auf -18 °C. Arbeitsmaterialien von RNAsen befreien
- Präparation des Gehirns des Versuchstiers: Positionierung des Präparates auf Aluminiumfolie, gefrieren auf Trockeneis. [Zur Lagerung bei -80 °C zusätzlich in ein Plastiktütchen legen, um Austrocknung zu verhindern und ausreichend beschriften mit: Mauslinie, Datum, Alter, ggf. geplante Verwendung des Präparats]
- Herstellung von Kryoschnitten: Proben mit Tissue Tec auf der Objektplatte des Kryostaten befestigen, ausrichten und trimmen. 16 µm dünne Schnitte anfertigen. Schnitte unter Zuhilfenahme zweier Pinsel vorsichtig umdrehen. Nacheinander Aufziehen von ca. 6 Schnittpräparaten auf poly-L-lysinierte OT im Rahmen einer Schnittserie von z.B. zehn OT. [Schnitte sollten während des Schneidens außerhalb des Kryostaten getrocknet und anschließend in einer Box im Kryostaten gelagert werden. Temperaturschwankungen sollten unbedingt vermieden werden.]

Tag eins des DIG-ISH Protokolls: Prähybridisierung und Hybridisierung

- [Zunächst: 8% PFA auftauen (ggf. schon am Tag davor im KS) und 25 ml 0.2 M PB (DEPC) (für die Verdünnung von 8 % PFA) auf Eis stellen. Anschließend 50 % Dextransulfat in 2 ml Eppendorf Gefäß ansetzen und für 2-3 h im Hybridisierungssofen (58 °C) erhitzen bis es sich löst]
- Fixierung der Schnitte: Schnittpräparate auf den OT von -80 °C auf -20 °C 20 min äquilibrieren. 4 % PFA herstellen und in Coplintank auf Eis stellen, vor der Fixierung die OT für einige Minuten auf 4 °C äquilibrieren, Schnitte in 4 % PFA für 20 min auf Eis fixieren; währenddessen 250 ml 0,1 M PB herstellen, in einem neuen Tank Schnitte 2 x in 0,1 M PB für 5 min waschen (RT) (im selben Tank) nebenbei 1 M TEA frisch herstellen.

- Acetylierung der Schnitte: 50 ml 0,1 M TEA herstellen, Schnitte für 2 min in 0,1M TEA inkubieren, 125 µl Essigsäureanhydrid (AA) in leeren Tank pipettieren, 0,1 M TEA aus dem Tank mit den Schnitten in den Tank mit vorgelegtem Essigsäureanhydrid schütten, mit einer sterilen Glaspipette das AA am Tankboden durch Auf- und abpipettieren gründlich vermischen; dabei auf ‚Perlenbildung‘ achten, Schnitte umgehend in den TEA/AA befüllten Tank überführen und für 10 min auf dem Schüttler inkubieren, 2 x in 0,1 M PB für 2 min bei RT waschen, währenddessen die Ethanolreihe vorbereiten.
- Dehydrierung der Schnitte: Schnitte bei RT in 50 % Ethanol für 3 min inkubieren, Schnitte bei RT in 70 % Ethanol für 3 min inkubieren, Schnitte bei RT in 95 % Ethanol für 3 min inkubieren, Schnitte bei RT in 100 % Ethanol für 3 min inkubieren, Schnitte an der Luft trocknen (oder im Vakuum im Exsikkator).
- Während der Trocknung kann der Hybridisierungspuffer sowie die Probenmischung hergestellt werden: Zuerst Heizblock anstellen (65 °C), Die Hybridisierungslösung für einen OT (125 µl) besteht aus 20 % Probenmischung (25 µl) und 80 % Hybridisierungspuffer (100 µl). Alle benötigten Lösungen bei RT auftauen, vortexen und auf Eis stellen. RNA-Sonden auf Eis auftauen. [Hybridisierungspuffer herstellen (ausreichend für 11 OT): 15 ml Falcon-Tube; 1,25 ml Formamide, 150 µl 5 M NaCl, 50 µl 50 x Denhardts, 25 µl 1 M TRIS, 5 µl 0,5 M EDTA, 20 µl DEPC-Wasser, 500 µl 50 % Dextransulfat - gut vortexen -, Lagerung auf Eis bis zur Verwendung] Probenmischung herstellen (hier beispielhaft für 100 µl → 3 OT mit gleicher Sonde) (20 % in Hybridisierungslösung): [200-100 ng/ml Sonde: 12,5 µl Sonde (ad DEPC-Wasser), 25 µl 10mg/ml tRNA, 5 µl 1M DTT, 57,5 µl DEPC-H₂O - vortexen -]
- Hybridisierungsreaktion: [Mischung von Hybridisierungspuffer und Probenmischung im Verhältnis 5:1 zur Herstellung der Hybridisierungslösung (Probenmischungen mit unterschiedlichen Sonden nicht mischen), z.B. für 3 OT mit gleicher Sonde: 100 µl Probenmischung, 400 µl Hybridisierungspuffer - gut vortexen. Hybridisierungslösung bei 65 °C für 10 min im Heizblock erhitzen, danach auf Eis abkühlen lassen] 125 µl Hybridisierungslösung auf OT pipettieren (möglichst ohne Luftblasen zu erzeugen) und unter Zuhilfenahme einer sterilen Pinzette mit einem sterilen Deckgläschen bedecken. Die Kanten des Deckgläschen unter dem Abzug mit DPX *new* versiegeln und mindestens 30 min abdampfen lassen. OT ü.N. in einer Feuchtekammer bei 58 °C im Hybridisierungsöfen inkubieren.

Tag zwei des DIG-ISH Protokolls: Posthybridisierung und Antikörperinkubation

- Posthybridisierung: Schnitte aus dem Hybridisierungsöfen entnehmen und abkühlen lassen, an einer Ecke des Objektträgers beginnend vorsichtig das DPX mit einer Pinzette abziehen, Schnitte für 30 min in 4 x SSC inkubieren, sodass sich das Deckgläschen ablöst, Hybridisierungsöfen auf 37 °C vorheizen und RNase Lösung sowie einen Coplintank im Ofen erhitzen, 4 x 5 min in 4 x SSC bei RT waschen.

- Behandlung der Schnitte mit RNase: 100 µl RNase A zu 50 ml erwärmter RNase Lösung hinzupipettieren und in einen vorgewärmten Tank füllen, Schnitte aus 4 x SSC in diesen Tank überführen und bei 37 °C für 30 min im Hybridisierungsöfen inkubieren [währenddessen SSC-Waschreihe ansetzen: 2 x SSC (100 ml), 1 x SSC (50 ml), 0,5 x SSC (50 ml) und 0,1 x SSC (50 ml)]
- Stringenz-Waschschritte: [Schnitte aus dem Hybridisierungsöfen nehmen und den Ofen auf 60 °C stellen] Schnitte 2 x 5 min in 2 x SSC waschen, 0,1 x SSC in Tank füllen und im Hybridisierungsöfen bei 60 °C erwärmen, 10 min in 1 x SSC bei RT waschen, 10 min in 0,5 x SSC bei RT waschen, Schnitte in einem vorgewärmten Tank mit 0,1 x SSC überführen und für 30 min bei 60 °C inkubieren (währenddessen Blockinglösung ansetzen).

Antikörperinkubation und Zugabe des DIG-Substrats: Schnitte für 30 min bei RT in Blockinglösung inkubieren (Hybridisierungsöfen auf 37 °C vorheizen), Schnitte 2 x 5 min bei RT in Puffer 1 waschen [Antikörperlösung ansetzen, Schnitte aus dem Tank nehmen und die Kante des OTs mit einem Papiertuch abtupfen. Die OT in der Feuchtekammer platzieren] je 300 µl Antikörperlösung auf einen OT auftragen und mit einem Deckgläschen bedecken, die Feuchtekammer mit Parafilm abdichten und die Schnitte bei 37 °C für 2 h inkubieren (die OT dürfen nicht austrocknen). [Feuchtekammer aus dem Ofen entnehmen und die Ofentemperatur auf 30 °C umstellen] Schnitte für 10 min in Puffer 1 bei RT waschen, Schnitte für 10 min in Puffer 2 bei RT waschen (Detektionslösung ansetzen), die OT in der Feuchtekammer platzieren und 300 µl Detektionslösung auf einen OT auftragen und mit einem Deckgläschen bedecken. Feuchtekammer mit Parafilm abdichten, im Dunkeln bei Raumtemperatur (oder 30 °C) inkubieren bis die gewünschte Signalstärke erreicht ist (mind. 3 h bis ü.N.).

Tag zwei bzw. drei des DIG-ISH Protokolls: Reaktionsstopp und Eindeckeln des Präparats

- Schnitte aus dem Hybridisierungsöfen nehmen, 2 x 15 min in Stopp-Lösung bei RT inkubieren, Schnitte für 30 s in 70 % Ethanol tauchen und an der Luft trocknen, OT mit Immunomount benetzen, mit einem Deckgläschen bedecken, trocknen lassen. Das Ergebnis kann unter einem Durchlichtmikroskop betrachtet werden.

2.6.4.3 Versuchsprotokoll für *in situ*-Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Sonden

Neben einer Markierung von Sonden mit DIG können Sonden für die *in situ*-Hybridisierung auch mit radioaktiv markierten Nukleotiden markiert werden. Die Art der Markierung zeigt die höchste Sensitivität aller Markierungsmethoden, ist jedoch aufgrund der Radioaktivität methodisch aufwendig und hat eine geringe zelluläre Auflösung. In diese Arbeit wurden radioaktive *in situ*-Hybridisierungen zur Detektion von A₁-Rezeptor mRNA durchgeführt. Die Sondenherstellung erfolgte wie in Abschnitt 2.6.4.1 beschrieben. Radioaktive Arbeiten wurden am Zentrum für

Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) unter der Leitung von Dr. Susanne Fehr durchgeführt. Es wurde jeweils Gewebe einer Maus im Alter von 8 Tagen, 15 Tagen und 21 Tagen des NMRI Mausstammes untersucht. In dieser Arbeit dargestellt werden Ergebnisse des 15 Tage alten Tieres, da dieses der in physiologischen Experimenten untersuchten Altersklasse entspricht. Die Ergebnisse der radioaktiven *in situ*-Hybridisierungen der unterschiedlichen Altersklassen zeigen jedoch ein weitgehend einheitliches Bild. *In situ*-Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Sonden wurden folgendem Protokoll entsprechend durchgeführt, die verwendeten Lösungen finden sich in Tabelle 4:

- Zur Fixierung wurden die OT in 4 % Paraformaldehyd (in PBS) für 10 min bei 4 °C inkubiert und anschließend 2 x 5 min. in PBS gewaschen.
- Eine Acetylierung erfolgte durch eine 10 minütige Inkubation in Acetylierungspuffer. Anschließend erfolgte eine Trocknung über eine Ethanolreihe (60 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %) und anschließende Trocknung in 5 min in Chloroform und 5 min in 100 % Ethanol. Die abschließende Trocknung erfolgte an der Luft.
- Zur Prähybridisierung wurden die OT flach in eine Feuchtekammer gelegt, je 0,8 ml Prähybridisierungspuffer aufpipettiert und anschließend 2-3 h bei 50 °C inkubiert.
- Zur Hybridisierung wurde der Prähybridisierungspuffer entfernt und daraufhin 100 µl Hybridisierungspuffer mit 2×10^6 cpm radioaktiv markierter Probe je OT aufpipettiert, ein Deckglas aufgelegt und bei 50 °C in der Feuchtekammer ü.N. inkubiert.
- Zum Entfernen des Deckgläschens wurden die OT anschließend in 4 x SSC geschwenkt, die Deckgläser mit einer Pinzette abgehoben und anschließend 3 x je 5 min in 4 x SSC gewaschen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation in 0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCL pH 7,5, 1 mM EDTA und 40 µg RNase A/ml bei 37 °C und anschließend im gleichen Puffer ohne RNase eine 2 x 15 min Inkubation bei 37 °C. Abgeschlossen wurde die Posthybridisierung durch eine zweimalige Inkubation in 2 x SSC für je 15 min bei 50 °C.
- Für die Autoradiografie wurden die Schnitte über eine Alkoholreihe dehydriert und anschließend auf einen Röntgenfilm (Kodak Biomax MR) gelegt. Die Exposition fand über drei Tage hinweg statt. Eine Photoemulsion zur präziseren Lokalisation des radioaktiven Signals wurde über eine Beschichtung mit einer Kodak-Emulsion erreicht. Die Exposition der auf diese Weise behandelten OT erfolgte anschließend für eine Woche bei 4 °C. Entwickelt wurde bei 16 °C mit: 5 min Kodak D 19 Entwickler, 1 min H₂O, 2 x 5 min Kodak Unifix, 3 x 5 min H₂O, 5 min Hämalaun. Anschließend wurden die OT mit H₂O gespült, in 1 % HCl / 70 % Ethanol entfärbt bis die Emulsion farblos war und dann nochmals 10 min mit Leitungswasser gespült. Anschließend wurde über eine Ethanolreihe dehydriert und die OT abschließend in *mounting*-Medium eingebettet.

3. Ergebnisse

3.1 ATP als Neuromodulator im olfaktorischen Bulbus

Als Kotransmitter beeinflusst ATP die neuronale Verarbeitung in vielen Gehirnarealen (Burnstock, 2006). Im olfaktorischen Bulbus wird ATP zusammen mit Glutamat an den Axonen von ORNs freigesetzt. Hier wirkt es auf Gliazellen in der Nervenfaserschicht und in der Glomerularschicht des *Bulbus olfactorius* (Doengi et al., 2008; Thyssen et al., 2010). Diese Arbeit untersucht erstmals, ob und in welchem Maße ATP eine direkte Wirkung auf Neurone des olfaktorischen Bulbus ausübt.

3.1.1 *Uncaging* von *caged*-ATP führt zu einem Einstrom in Mitralzellen

Um den Effekt von ATP auf Neurone im olfaktorischen Bulbus zu untersuchen, wurden Mitralzellen im *voltage clamp*-Modus abgeleitet. Mitralzellen können als Monitor für die synaptische Aktivität im *Bulbus olfactorius* dienen und der Effekt von ATP auf die Netzwerkaktivität auf diese Weise untersucht werden. Um eine schnelle Applikation von ATP zu erreichen, wurde ein *caged compound* (siehe Anhang 1) verwendet, das mit UV-Licht oder einem 405 nm Laser photolytisch aktiviert wurde. *Uncaging* von ATP führte zu einem Einstrom in die gemessene Mitralzelle und zu einer Erhöhung der synaptischen Aktivität des Netzwerks (Abbildung 3). Aufgrund der Verwendung einer Intrazellulärlösung mit hohem Chloridgehalt wurden sowohl inhibitorische als auch exzitatorische Eingänge als Einstrom dargestellt. Abbildung 3 A zeigt beispielhaft die gemessenen Ströme einer Mitralzelle während drei aufeinander folgender ATP-*uncaging*-Ereignisse im Abstand von je drei Minuten. Abbildung 3 B stellt den zeitlichen Verlauf der Frequenz an synaptischen Eingängen als Mittelwert von sieben Zellen dar. Die Frequenz an synaptischen Eingängen lag beim ersten *uncaging* im Mittel bei $22,1 \pm 1,5$ Eingänge/3 s, beim zweiten *uncaging* stieg sie auf $25,4 \pm 1,4$ Eingänge/3 s und sank dann beim dritten *uncaging* geringfügig auf $23,5 \pm 2$ Eingänge/3 s. Die Frequenz der durch drei aufeinander folgende *uncaging*-Ereignisse ausgelösten synaptischen Eingänge war zwischeneinander nicht signifikant unterschiedlich. Um den Effekt des ATP-*uncagings* auf Mitralzellen weiter zu charakterisieren wurde der durch ein ATP-*uncaging* ausgelöste Einstrom als Integral quantifiziert. Beim ersten ATP-*uncaging* wurde ein mittlerer Einstrom von $2,1 \pm 0,3$ nA*s (n = 11) ausgelöst. Bei dem zweiten und dritten *uncaging* nahm die Größe des Integrals jeweils signifikant ab (zweites *uncaging* $1,3 \pm 0,2$ nA*s; drittes *uncaging* $0,9 \pm 0,1$ nA*s, n = 11) (Abbildung 3 C). Wie in Abbildung 3 D zu sehen, resultierte ein *uncaging* von ATP zudem in einer Membrandepolarisation von Mitralzellen. Für die Untersuchung des Effekts von ATP-*uncaging* auf das Membranpotential von Mitralzellen wurde die K-Glukonat-basierte Intrazellulärlösung verwendet. Diese Ergebnisse weisen erstmals elektrophysiologisch einen Effekt von ATP auf die Aktivität von Neuronen im olfaktorischen Bulbus nach.

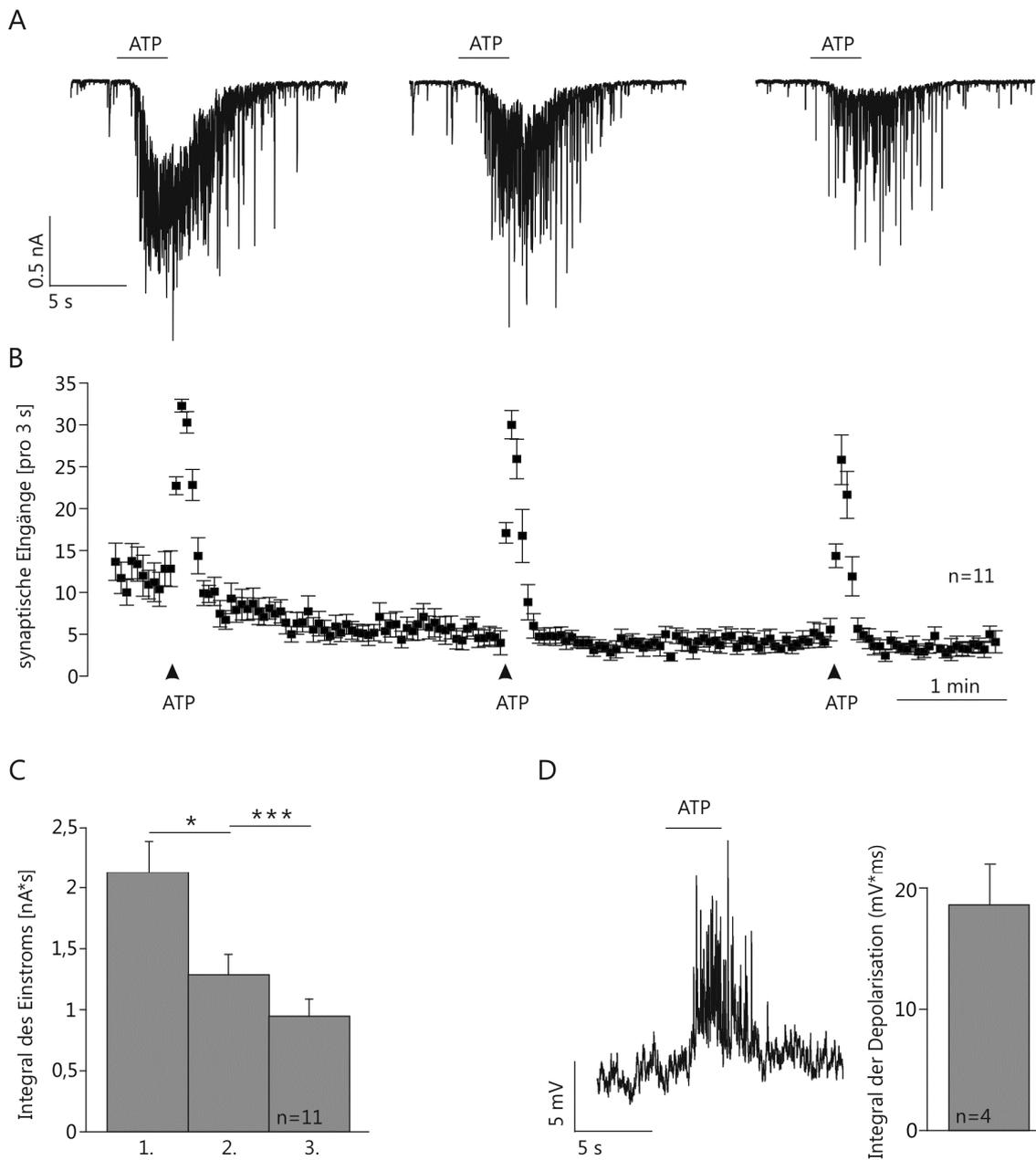


Abbildung 3 | ATP-uncaging im olfaktorischen Bulbus. [A] In voltage clamp gemessene Ströme einer Mitralzelle bei drei aufeinander folgender photolytischer Freisetzung von caged-ATP für je 3 s (100 μ M caged-ATP im Versuchsbad). [B] Anzahl der synaptischen Eingänge ausgelöst durch uncaging, Mittelwert von 11 Zellen. [C] Größe des durch das uncaging hervorgerufenen Stromintegrals (Einstrom) bei der ersten, zweiten und dritten Applikation. [D] Auswirkung des ATP-uncaging auf das Membranpotential von Mitralzellen.

3.1.2 P2Y₁-Rezeptoren vermitteln den durch caged-ATP hervorgerufenen Einstrom in Mitralzellen

Um zu untersuchen, ob P2Y- oder P2X-Rezeptoren den Effekt von ATP vermitteln, wurde ADP anstelle von ATP appliziert. Im Gegensatz zu ATP aktiviert ADP lediglich P2Y-Rezeptoren, nicht

aber P2X-Rezeptoren, und lässt so eine Eingrenzung der Rezeptorfamilie zu (Burnstock et al., 2011). *Uncaging* von *caged*-ADP führte zu einem vergleichbaren Effekt wie das *uncaging* von *caged*-ATP. Das erste *uncaging* evozierte im Mittel einen Einstrom von $3,2 \pm 0,6$ nA*s und das zweite *uncaging* einen Einstrom von im Mittel $2,0 \pm 0,6$ nA*s (jeweils $n = 7$). Das Integral des Einstroms durch ADP unterschied sich nicht signifikant von dem von ATP (Abbildung 4 A und B). Die Verwendung des P2-Rezeptor-Antagonisten (P2X und P2Y) PPADS (100 μ M) führte zu einer signifikanten Reduktion des durch ATP ausgelösten Einstroms um 77 % im Vergleich zur Kontrolle ohne PPADS (100 % = $2,1 \pm 0,3$ nA*s, $n=11$) auf $0,6 \pm 0,3$ nA*s ($n = 4$). Das deutet darauf hin, dass ein Großteil des beobachteten Effekts P2-Rezeptor-vermittelt ist (Abbildung 4 C und D). MRS 2179 blockiert spezifisch P2Y₁-Rezeptoren. Wie in Abbildung 4 C und D zu sehen reduzierte die Verwendung dieses Blockers den mittleren Einstrom durch *caged*-ATP um 61 % auf $0,8 \pm 0,3$ nA*s beim ersten *uncaging* ($n = 10$). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Großteil des durch ATP-*uncaging* hervorgerufenen Einstroms in Mitralzellen auf eine Aktivierung von P2Y₁-Rezeptoren zurückzuführen ist.

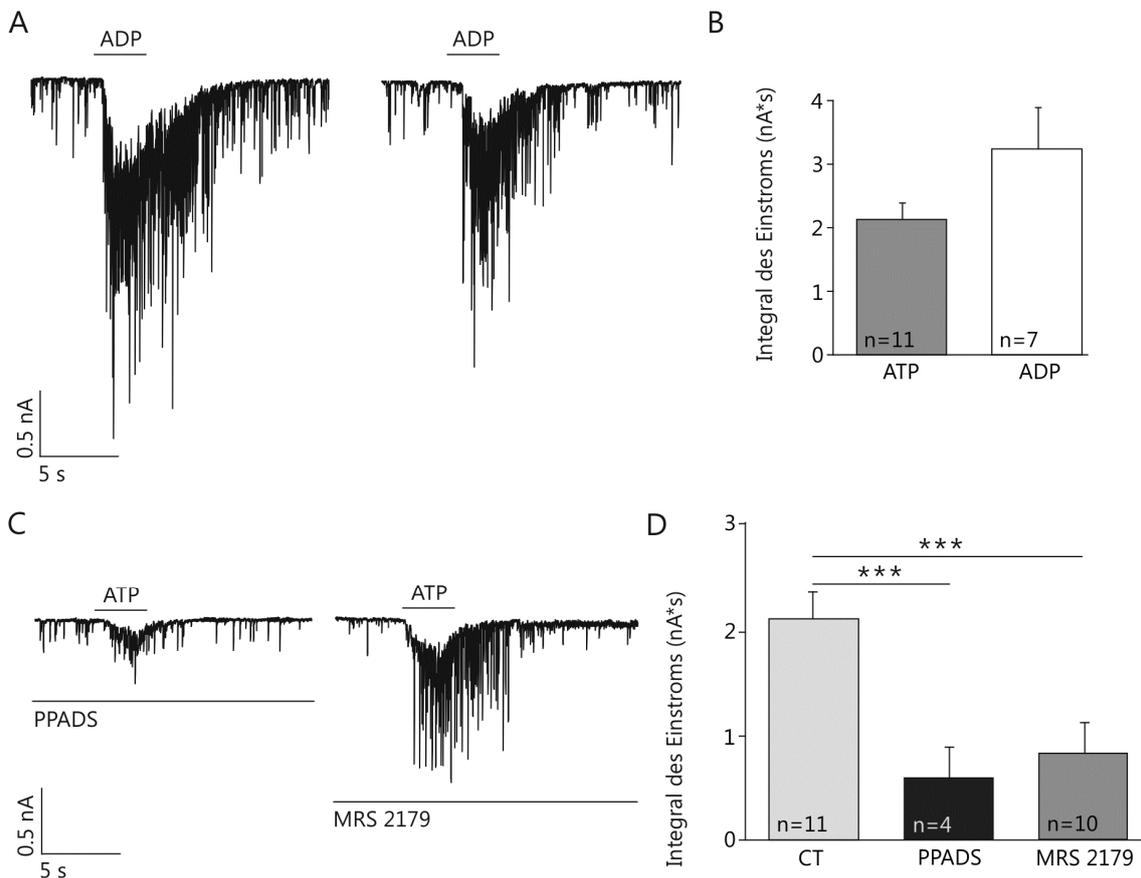


Abbildung 4 | ATP hat einen P2Y₁-vermittelten Effekt auf Mitralzellen. [A] Effekt von ADP-*uncaging* (100 μ M, 3 s) auf Ströme in Mitralzellen; erstes und zweites *uncaging*. [B] Das Integral des Einstroms unterscheidet sich nicht signifikant zwischen ATP- und ADP-*uncaging*. [C] Einfluss von PPADS (100 μ M) und [D] von MRS (50 μ M) auf die Größe des Integrals des Einstroms (CT = Kontrolle ohne Blocker).

3.1.3 Eine Aktivierung des neuronalen Netzwerks durch *caged*-ATP evoziert Calciumtransienten in periglomerulären Astrozyten

Eine Badapplikation von ATP führt zu Calciumtransienten in Astrozyten des olfaktorischen Bulbus (Doengi et al., 2008). Um zu untersuchen, ob auch eine deutlich schnellere Applikation von ATP mittels *ATP-uncaging* zu Calciumsignalen in periglomerulären Astrozyten führt, und um festzustellen, in welchem zeitlichen Verhältnis die Calciumtransienten in Astrozyten zu dem Beginn des Einstroms in Mitralzellen stehen, wurden Calciumsignale in Astrozyten mit Hilfe von Fluo-4 gemessen. Abbildung 5 zeigt eine simultane Messung von Mitralzellströmen und Calciumsignalen in periglomerulären Astrozyten. Wie bei den Fluoreszenzmessspuren von fünf Astrozyten im unteren Teil der Abbildung zu sehen, resultierte ein *uncaging* von ATP in einer deutlichen Erhöhung des astrozytären Calciumspiegels.

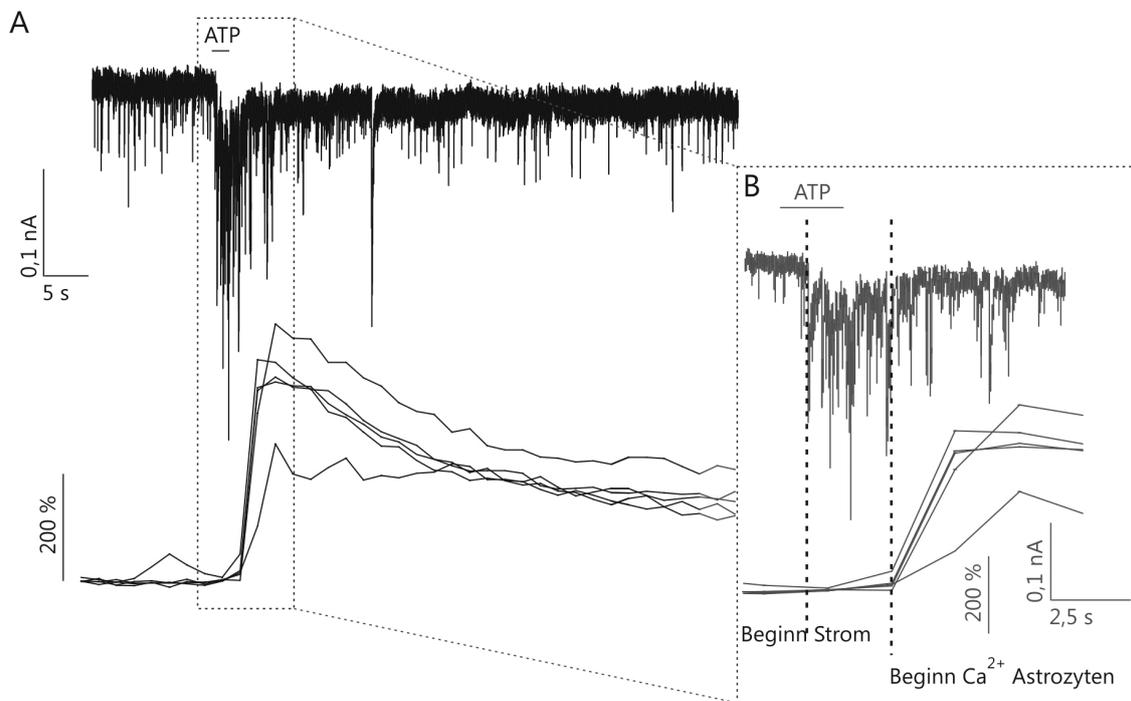


Abbildung 5 | *ATP-uncaging* verursacht Calciumsignale in Astrozyten. [A] *Voltage clamp*-Messung einer Mitralzelle (oben) und Calciumsignale in fünf Astrozyten (unten) (*ATP uncaging* 100 μ M, 3 s). [B] Vergrößerung des Inlays in A. Zu sehen ist die zeitliche Verzögerung des Calcium-Anstiegs in Astrozyten im Verhältnis zum Beginn des Einstroms in Mitralzellen.

Da sowohl Neurone als auch Astrozyten im olfaktorischen Bulbus durch *caged*-ATP stimuliert werden, stellt sich die Frage, ob Neurone direkt oder indirekt über Astrozyten aktiviert werden. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzmessung und der Stromspur in Abbildung 5 B, so wird deutlich, dass der neuronale Effekt zeitlich vor dem Anstieg des astrozytären Calciumspiegels lag. Die Astrozyten reagierten somit gegenüber Neuronen verzögert auf das *ATP-uncaging*. Die mittlere Verzögerung betrug $2,4 \pm 0,5$ s (Mitralzellen $n = 6$; Astrozyten $n = 30$). Diese

Verzögerung deutet darauf hin, dass die Reaktion des neuronalen Netzwerks nicht durch Astrozyten initiiert wurde.

3.1.4 Globales *versus* lokales ATP-*uncaging*

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, wo im olfaktorischen Netzwerk der in Mitralzellen gemessene Effekt seinen Ursprung haben könnte, wurde neben dem großflächigen ‚globalen‘ ATP-*uncaging* mittels einer UV-Lampe auch ein ‚lokales‘ *uncaging* durchgeführt, welches sich auf den *tuft* der gemessenen Mitralzelle beschränkte. Hierbei wurde ein Bereich von 30 x 30 μm innerhalb des innervierten Glomerulus mit einem 405 nm Laser bestrahlt. Um zusätzlich festzustellen, ob durch lokales bzw. globales *uncaging* von ATP Calciumsignale im Mitralzell-*tuft* ausgelöst werden, wurden sowohl beim globalen als auch beim lokalen *uncaging* Calciumsignale im *tuft* der elektrophysiologisch abgeleiteten Mitralzelle gemessen (Abbildung 6).

Globales *uncaging* führte zu einem Einstrom in die abgeleitete Mitralzelle. Des Weiteren führte globales *uncaging*, zu Calciumtransienten im *tuft* der abgeleiteten Mitralzelle (Abbildung 6 B). In sieben von zehn Zellen konnten durch globales *uncaging* Calciumsignale im Mitralzell-*tuft* ausgelöst werden. Um zu untersuchen, ob ein lokales *uncaging* im *tuft* der Mitralzelle einen vergleichbaren Einstrom und Calciumanstieg auslöst, wurde *caged*-ATP lokal im Bereich des *tufts* der abgeleiteten Mitralzelle photolytisch aktiviert. Abbildung 6 D (oben) zeigt eine Originalmessspur abgeleiteter Ströme während lokalen ATP-*uncagings* im *tuft*. Die Kinetiken des Einstroms beim lokalen sowie beim globalen *uncaging* waren vergleichbar (Abbildung 6 B und D), insgesamt war der Einstrom beim lokalen *uncaging* mit $1,1 \pm 0,1 \text{ nA*s}$ ($n = 6$) aber signifikant kleiner als beim globalen ($p < 0,05$) (Abbildung 6 E). Die immer noch sehr deutliche Reaktion des neuronalen Netzwerks durch lokales *uncaging* von ATP im *tuft* zeigt aber, dass allein die Freisetzung von ATP in dem glomerulären Bereich des olfaktorischen Bulbus einen Effekt auf das neuronale Netzwerk ausübt. Beim lokalen *uncaging* konnte bei fünf von sechs abgeleiteten Zellen keine Änderung des Calciumspiegels im Mitralzell-*tuft* gemessen werden (vgl. Abbildung 6 D, unten). Die einzelne Zelle, bei der eine Steigerung des Calciumspiegels im *tuft* beim lokalen *uncaging* gemessen werden konnte, ist hier nicht dargestellt, da das Ergebnis nicht repräsentativ für die Gesamtstichprobe war. Es kann jedoch vermutet werden, dass die Änderungen des Calciumspiegels beim lokalen *uncaging* im *tuft* am Rand der Auflösungsgrenze der gewählten Messbedingungen lagen und daher beim lokalen *uncaging* nur einmal ein Calciumsignal im Mitralzell-*tuft* beobachtet werden konnten.

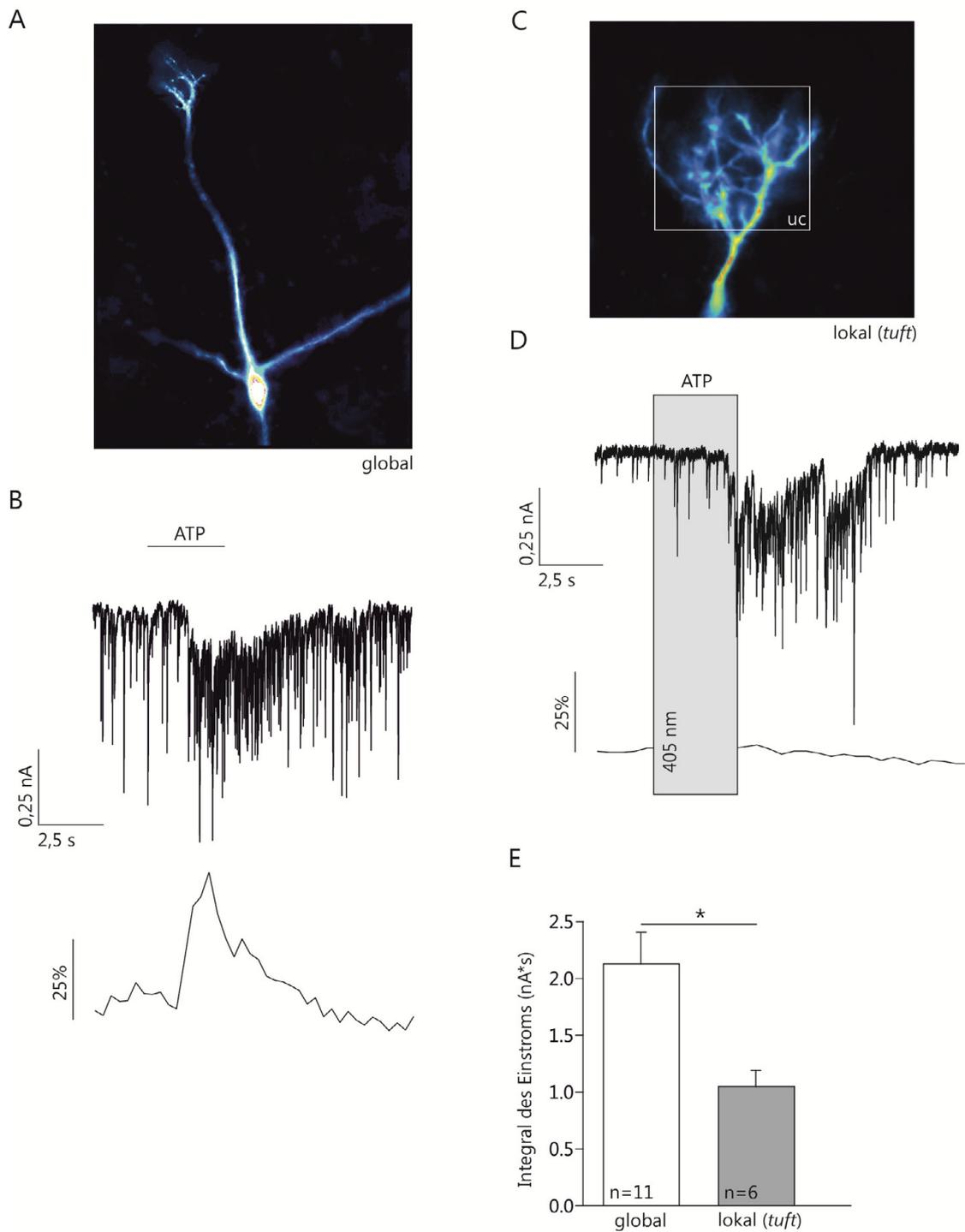


Abbildung 6 | Strom und Calciumsignale in Mitralzellen bei globalem und lokalem ATP-uncaging. [A] Mit Fluo-8 gefüllte Mitralzelle [B] Stromantwort in einer Mitralzelle (oben) und Calciumanstieg im tuft der gemessenen Mitralzelle (unten) bei globalem uncaging (100 μ M, 3 s). [C] Detail vom Mitralzell-tuft mit Bereich der photolytischen Aktivierung (uc, weißer Kasten). [D] Stromantwort in einer Mitralzelle (oben) und Verlauf der Calciumkonzentration im tuft der gemessenen MC (unten) bei lokalem uncaging (100 μ M, 3 s) mittels 405 nm Laser (grauer Balken, calcium imaging während des uncaging unterbrochen) im tuft der gemessenen MC. [E] Vergleich des Einstroms durch globales und lokales uncaging.

3.1.5 Applikation von ATP über das Versuchsbad

Die bisher vorgestellte Applikationsweise von ATP in Form des photolytischen *uncaging* eines *caged compounds* erlaubt eine schnelle Kinetik der ATP-Freisetzung. Das ist insbesondere bei der Untersuchung von schnell desensitivierenden P2-Rezeptoren von Vorteil (Erb et al., 2006). Außerdem besteht ansonsten im Gewebe das Problem, dass ATP sehr rasch von extrazellulären Enzymen abgebaut werden kann noch bevor es seine Wirkung entfalten kann. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass sie sehr kostspielig ist und zudem das Anhalten der Perfusion erfordert, wodurch die Vitalität der Zellen beeinträchtigt werden könnte. Als alternative Applikationsmethode zum *uncaging* wurde in dieser Arbeit auch eine Badapplikation von ATP angewendet. Diese Applikationsmethode führt zu einer deutlich langsameren Bereitstellung von ATP an den Rezeptoren. Bei der Badapplikation von ATP zeigte sich ein anderer Effekt als bei der Applikation von ATP mittels *uncaging*. Abbildung 7 zeigt eine *voltage clamp*-Ableitung einer Mitralzelle unter den gleichen Bedingungen wie in Abschnitt 3.1.1-3.1.4; anstelle einer photolytischen Freisetzung wurde ATP hier jedoch mit der Perfusion appliziert. Dies führte, im Gegensatz zum *uncaging* von ATP, zu einer Reduktion der Anzahl der synaptischen Eingänge in die Mitralzelle. Außerdem ist im Gegensatz zu einer schnellen ATP-Applikation hier auch kein Einstrom zu beobachten. In den in Abbildung 7 B gezeigten Messspuren sind repräsentative Abschnitte vor, während und nach einer ATP-Badapplikation vergrößert dargestellt. Eine schnelle Applikations-Kinetik scheint zum Evozieren einer neuronalen Netzwerkaktivierung durch ATP demnach notwendig zu sein. Eine langsame Applikation hingegen begünstigt offenbar andere Wirkmechanismen, bei denen ggf. das Hydrolyseprodukte von ATP, Adenosin, eine Rolle spielen könnte. Aus diesem Grund wird im Folgenden die Wirkung von Adenosin auf Mitralzellen untersucht.

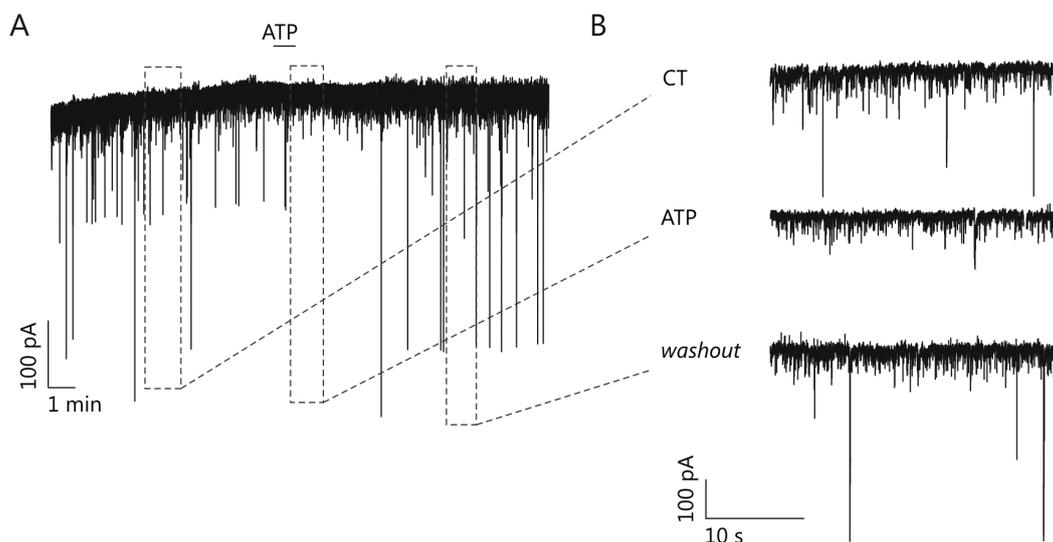


Abbildung 7 | Badapplikation von ATP während einer *voltage clamp*-Ableitung einer Mitralzelle. [A] Übersicht der Messspur, ATP-Applikation per Badapplikation (100µM, 30 s). [B] Ausschnitt der Messspur in A vor (CT), während und nach der Applikation von ATP (*washout*).

3.2 Adenosin als Neuromodulator im olfaktorischen Bulbus

Adenosin kann im Nervengewebe direkt freigesetzt oder als Hydrolyseprodukt von ATP extrazellulär bereitgestellt werden und neuromodulatorisch wirksam sein (Burnstock, 2013). Ob Adenosin eine neuromodulatorische Wirkung auf Neurone des olfaktorischen Bulbus ausübt, wurde im folgenden Ergebnisabschnitt erstmals untersucht.

3.2.1 Adenosin führt zu einem Ausstrom in Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus

Um einen direkten Effekt von Adenosin auf Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus zu untersuchen, wurden Mitralzellen im *voltage clamp*-Modus abgeleitet. Abbildung 8 zeigt eine Originalmessspur einer Mitralzelle bei einem Haltepotential von -70 mV. Um den direkten Effekt von Adenosin auf die gemessene Mitralzelle zu untersuchen, wurde die abgeleitete Zelle synaptisch isoliert, indem TTX sowie die synaptischen Blocker NBQX, D-AP V und GBZ verwendet wurden. Es wurde K-Glukonat-basierte Intrazellulärlösung verwendet, um den Effekt von Adenosin möglichst wenig durch die Verwendung nicht-physiologischer Ionenverhältnisse in der Intrazellulärlösung zu beeinflussen. Adenosin wurde im Folgenden jeweils für 30 s per Badapplikation eingewaschen. Wie in Abbildung 8 A zu sehen, führte Adenosin zu einem reversiblen Ausstrom in der Mitralzelle. Dieser Effekt zeigt sich anhand einer Erhöhung des Haltestroms von im Mittel $12,6 \pm 1,8$ pA ($n = 6$, $p = 0,009$) (Abbildung 8 B.) Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen, dass Adenosin einen direkten Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von Mitralzellen im olfaktorischen Bulbus ausübt.

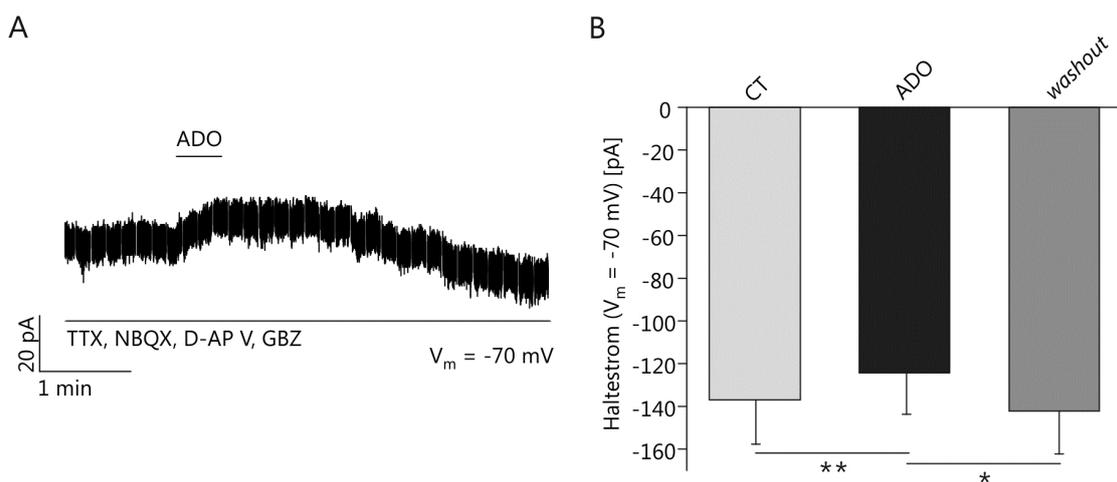


Abbildung 8 | Adenosin evoziert einen Ausstrom in Mitralzellen. [A] Messspur einer Mitralzelle; durch Adenosin-Applikation ($200 \mu\text{M}$, 30 s) kommt es in synaptischer Isolation (TTX, NBQX, D-AP V, GBZ) bei -70 mV Haltepotential zu einem Ausstrom [B]. Die Badapplikation von Adenosin resultiert in einer reversiblen, signifikanten Abnahme des Haltestroms von Mitralzellen.

3.2.2 Adenosin hyperpolarisiert Mitralzellen

In *voltage clamp* gemessen führt Adenosin zu einem Ausstrom in Mitralzellen. Um den Effekt von Adenosin auf das Membranpotential von Mitralzellen zu untersuchen, wurden diese außerdem im *current clamp*-Modus abgeleitet. Abbildung 9 A zeigt beispielhaft das Membranpotential einer Mitralzelle ohne jegliche Blocker. Die Zelle kann ihr Membranpotential selbst regulieren und zeigt die für Mitralzellen typischen Membranpotentialschwankungen, Aktionspotentiale treten in *bursts* auf. Durch Adenosin kommt es zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials von Mitralzellen um im Mittel $2,8 \pm 0,7$ mV ($n = 12$) und zu einer Beendigung des Feuerns von Aktionspotentialen. Um die Aktivität des neuronalen Netzwerks zu unterdrücken und somit den direkten Effekt von Adenosin auf die abgeleitete Mitralzelle zu untersuchen wurde in einem nächsten Schritt TTX eingesetzt. Wie in Abbildung 9 B zu sehen bewirkte die Zugabe von TTX eine Abnahme der Membranpotential-Schwankungen und blockierte die Bildung von Aktionspotentialen. Auch in Anwesenheit von TTX bewirkte Adenosin eine Hyperpolarisation des Membranpotentials von Mitralzellen, die im Mittel $1,6 \pm 0,2$ mV betrug ($n = 28$). Wie in Abbildung 9 B zu sehen, war dieser Effekt von Adenosin reversibel und konnte mehrfach ausgelöst werden. Ein Vergleich von der Hyperpolarisation mit oder ohne TTX zeigt, dass die Adenosin-induzierte Hyperpolarisation ohne TTX insgesamt signifikant größer ausfiel als in TTX ($p = 0,008$). Die Untersuchungen des Effekts von Adenosin auf das Membranpotential von Mitralzellen zeigen, dass sich der in *voltage clamp* beobachtete Ausstrom im Membranpotential der gemessenen Zelle als Hyperpolarisation widerspiegelt.

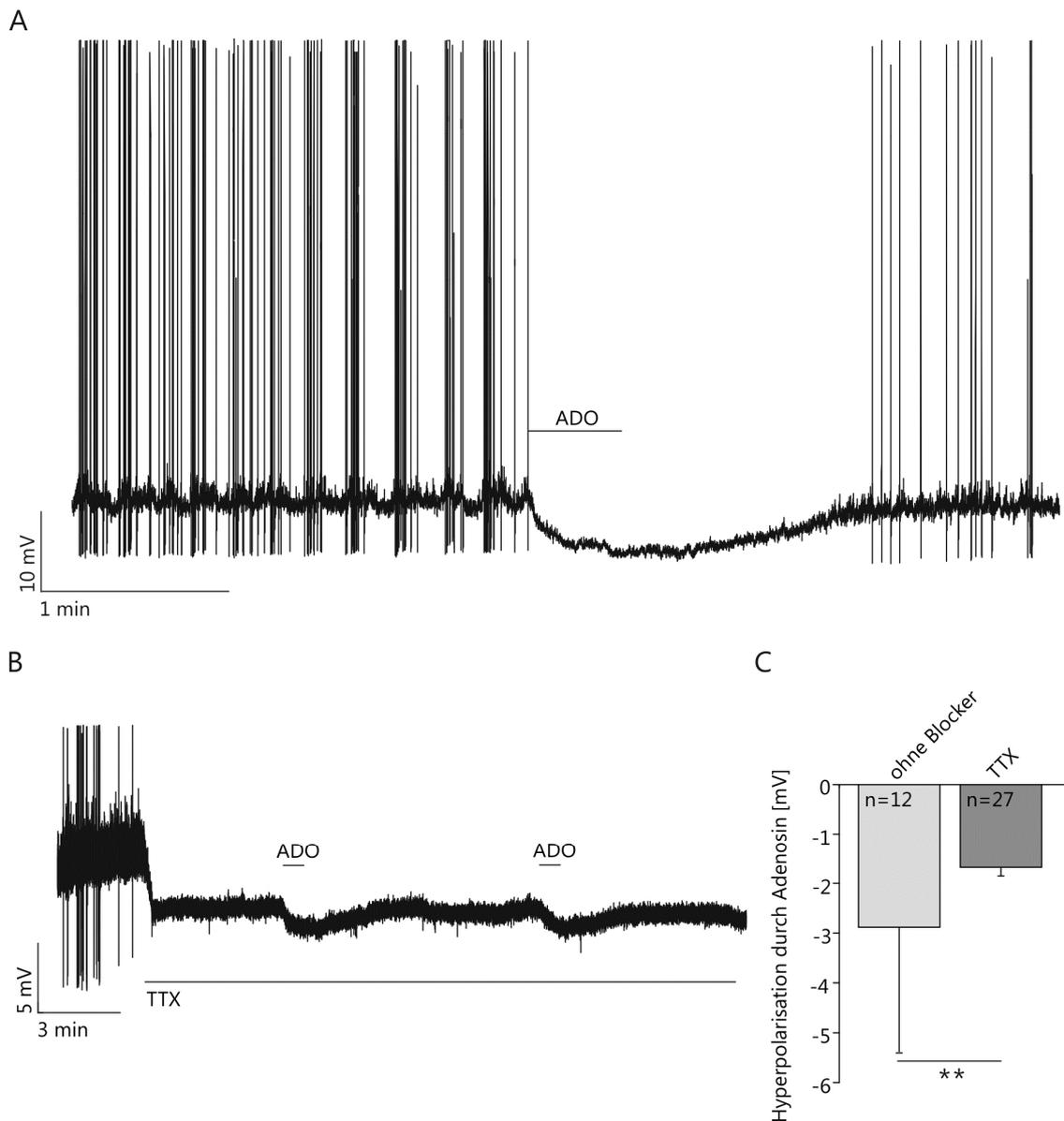


Abbildung 9 | Effekt von Adenosin auf das Membranpotential von Mitralzellen. [A] Messspur einer Mitralzelle in *current clamp*. Das Einwaschen von Adenosin (100 μ M, 30 s) bewirkt eine Hyperpolarisation des Membranpotentials. [B] Das Einwaschen von TTX bewirkt zunächst, dass keine Aktionspotentiale mehr entstehen. Es folgt eine zweifache Applikation von Adenosin, die jeweils eine reversible Hyperpolarisation bewirkt. [C] Vergleich der Größe der Adenosin-vermittelten Hyperpolarisation ohne und mit Einfluss von TTX.

3.2.3 Die Wirkung von Adenosin auf Mitralzellen wird über den A_1 -Rezeptor vermittelt

Da Adenosin einen direkten Effekt auf elektrophysiologische Eigenschaften von Mitralzellen hat, stellt sich die Frage, welcher Subtyp von Adenosin-Rezeptoren diesen Effekt vermittelt. Sowohl A_1 -Rezeptoren als auch A_{2A} -Rezeptoren sind im Zentralnervensystem ubiquitär vorhanden und hochaffin gegenüber Adenosin. A_{2B} - und A_3 -Rezeptoren hingegen werden hauptsächlich im

peripheren Nervensystem exprimiert und sind deutlich weniger affin für Adenosin. Eine Aktivierung des A_{2A} Rezeptors führt vorwiegend zu exzitatorischen, eine Aktivierung des A_1 -Rezeptors hingegen vornehmlich zu inhibitorischen Effekten (Burnstock et al., 2011). Das lässt eine Beteiligung des A_1 -Rezeptors an der Hyperpolarisation von Mitralzellen wahrscheinlich erscheinen, die Aktivierung anderer P1-Rezeptoren könnte jedoch ggf. ebenso zu dem Effekt beitragen.

3.2.3.1 A_1 -Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten

Um festzustellen ob A_1 -Rezeptoren die hyperpolarisierende Wirkung von Adenosin auf Mitralzellen vermitteln, wurden ein Agonist (CPA) und ein Antagonist (DPCPX) für den A_1 -Rezeptor verwendet. Es wurde überprüft, ob diese den Effekt von Adenosin imitieren bzw. blockieren können. Die Experimente mit CPA wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Torsten Fregin durchgeführt. Wie in Abbildung 10 A und B zu sehen, löste CPA ($1 \mu\text{M}$, 30 s) einen vergleichbaren Effekt wie Adenosin aus und führte zu einer Hyperpolarisation der Mitralzellmembran. Jedoch war dieser Effekt im Gegensatz zu dem von Adenosin oftmals nicht vollständig reversibel (Abbildung 10 A). Die durch Adenosin ($-1,6 \pm 0,16 \text{ mV}$, $n = 24$) bzw. CPA ($-1,6 \pm 0,16 \text{ mV}$, $n = 12$) hervorgerufenen Hyperpolarisationen waren nicht signifikant verschieden ($p = 0,9$). Der A_1 -Rezeptor-Agonist CPA imitiert den Effekt von Adenosin, was darauf hin deuten kann, dass derselbe Rezeptor angesprochen wird. Um zu überprüfen, ob der hyperpolarisierende Effekt von Adenosin bzw. CPA tatsächlich A_1 -Rezeptor-vermittelt ist, wurde der A_1 -Rezeptor-Antagonist DPCPX eingesetzt. Wie aus Abbildung 10 C und D hervorgeht blockierte DPCPX ($3 \mu\text{M}$) signifikant die Hyperpolarisation, die durch Adenosin bzw. CPA ausgelöst wurden ($n = 5$, $p = 0,02$) $0,04 \pm 0,1 \text{ mV}$ ($n = 5$). Gemeinsam implizieren diese Ergebnisse, dass der beobachtete Effekt von Adenosin auf Mitralzellen über A_1 -Rezeptoren vermittelt ist.

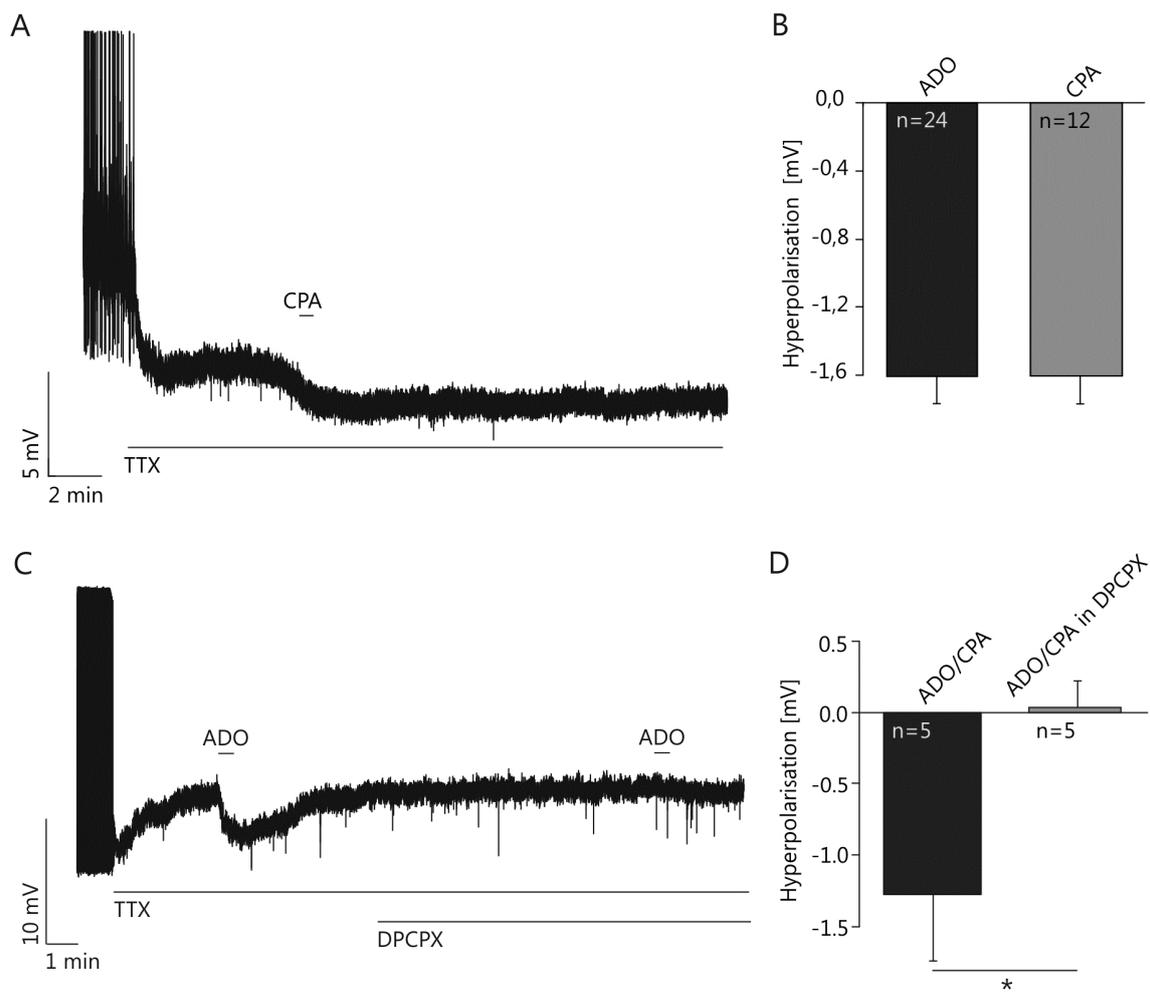


Abbildung 10 | Verwendung von A_1 -Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten zur Charakterisierung des P_1 -Rezeptortyps. [A] Der A_1 R Agonist CPA ($1 \mu\text{M}$, 30 s) ruft eine vergleichbare Hyperpolarisation hervor wie ADO. [B] Die Größe der Hyperpolarisationen durch Adenosin ($100 \mu\text{M}$) und CPA ($1 \mu\text{M}$) unterscheiden sich nicht signifikant. [C] Der A_1 R-Antagonist DPCPX ($3 \mu\text{M}$) blockiert die hyperpolarisierende Wirkung von Adenosin bzw. CPA. [D] Der A_1 -Rezeptor-Antagonist DPCPX verhindert die Hyperpolarisation der Mitralzelle durch Adenosin bzw. CPA.

3.2.3.2 Untersuchungen an A_1 -Rezeptor-*knockout*-Mäusen

Die bisher dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass Adenosin einen direkten, A_1 -Rezeptor-vermittelten Effekt auf Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus ausübt. Um eine Beteiligung des A_1 -Rezeptors zu verifizieren und vertiefend zu untersuchen, wurde mit A_1 -Rezeptor-*knockout*-Mäusen (im Folgenden als ‚ A_1 -KO-Mäuse‘ bezeichnet) gearbeitet. Zunächst wurden Mitralzellen von A_1 -KO-Mäusen in *current clamp* abgeleitet und ihr Membranpotential sowie ihre Aktionspotentialfrequenz auf ihre Sensitivität gegenüber Adenosin hin untersucht. Abbildung 11 A zeigt eine Messung einer A_1 -Rezeptor-Wildtyp-Maus derselben Zuchtlinie (im Folgenden als ‚ A_1 -

WT-Maus‘ bezeichnet), bei der Adenosin einen vergleichbaren Effekt, wie bei den bisher vorgestellten Messungen an NMRI-Mäusen hatte.

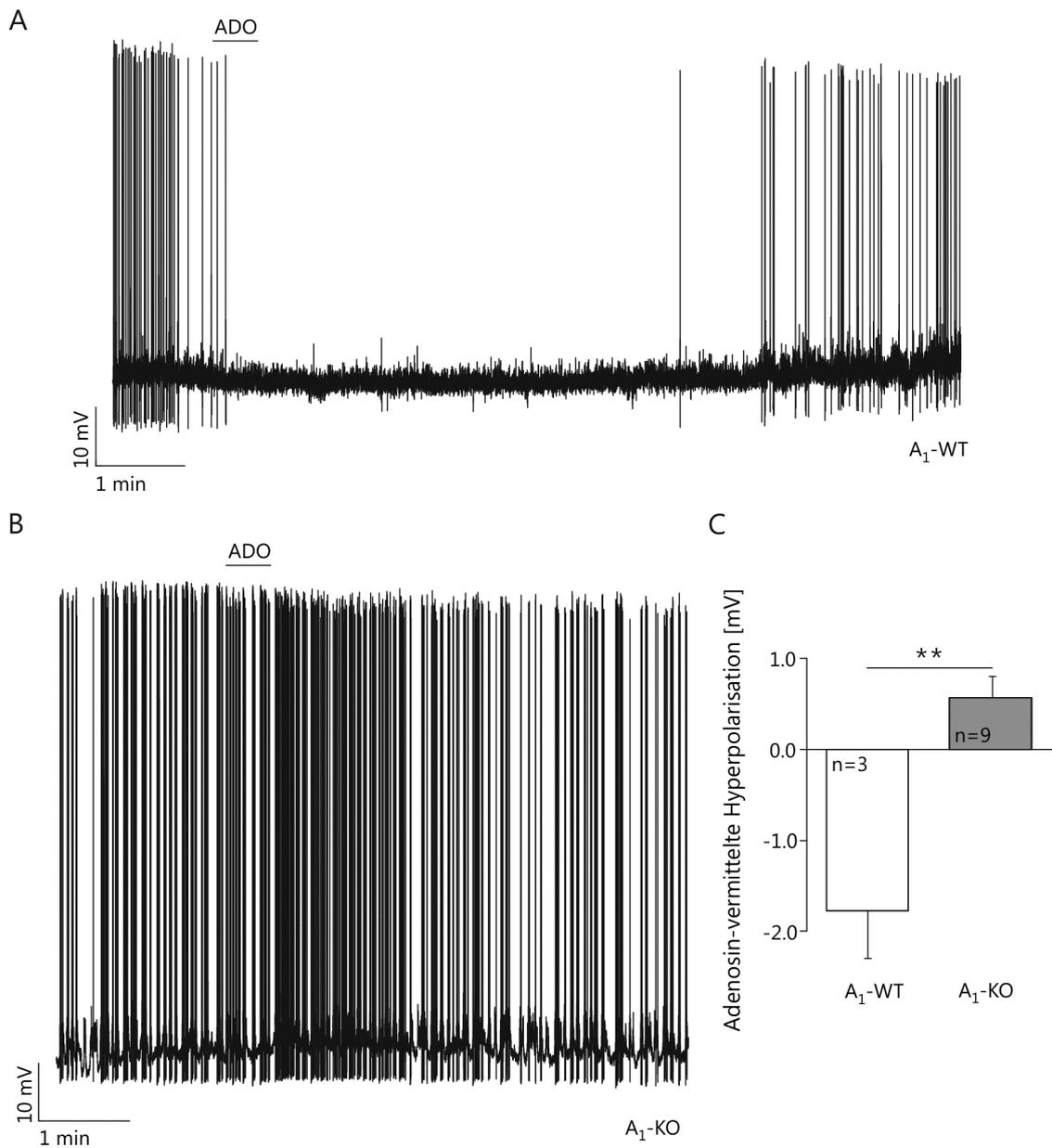


Abbildung 11 | A_1 -KO-Mäuse zeigen eine Adenosin-vermittelte Depolarisation. [A] Messspur einer Mitralzelle einer A_1 -WT-Maus in *current clamp* ohne Blocker, mit einer Adenosin-Applikation (100 μ M, 30s). [B] Messspur einer Mitralzelle einer A_1 -KO-Maus in *current clamp* ohne Blocker, mit einer Adenosin-Applikation (100 μ M, 30s). [C] Bei A_1 -KO-Mäusen führt Adenosin zu einer Depolarisation der Zellmembran.

Adenosin hyperpolarisierte das Membranpotential um $1,8 \pm 0,5$ mV ($n = 3$) und die Zelle generierte keine Aktionspotentiale mehr. Im Gegensatz dazu hatte Adenosin bei A_1 -KO-Mäusen aus dem gleichen Wurf einen gegenteiligen Effekt. Das Membranpotential depolarisierte um $0,6 \pm 0,2$ mV ($n = 9$) und es kam zu einer erhöhten Aktionspotentialfrequenz (vgl. Abbildung 11 B). Der

Unterschied in der Adenosin-vermittelten Membranpotentialänderung zwischen A₁-KO- und A₁-WT-Mäusen aus dem gleichen Wurf war signifikant ($p = 0,03$) (Abbildung 11 C). A₁-KO-Mäuse unterschieden sich auch signifikant von NMRI-Mäuse hinsichtlich der Größe der Adenosin-vermittelten Hyperpolarisation von Mitralzellen ($p = 0,005$), wohingegen es keinen signifikanten Unterschied zwischen A₁-WT-Mäusen und NMRI-Mäusen (ohne TTX, vgl. Abschnitt 3.2.2) gab ($p = 0,4$).

Um zudem zu verifizieren, dass der in Abschnitt 3.2.1 beobachtete Ausstrom in Mitralzellen in synaptischer Isolation ebenfalls A₁-Rezeptor-vermittelt ist, wurden *voltage clamp*-Messungen an A₁-KO-Mäusen und deren A₁-WT-Wurfgeschwistern durchgeführt. Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, wiesen A₁-KO-Mäuse keinen Ausstrom durch Adenosin auf. Vielmehr kam es bei ihnen zu einem schwachen Einstrom von $16,8 \pm 3$ pA ($n = 7$). Hingegen erzeugte Adenosin in A₁-WT-Mäusen einen Ausstrom von $7,8 \pm 5,5$ pA ($n = 6$). Der Unterschied in Adenosin-induzierten Strom zwischen A₁-WT-Mäusen und den A₁-KO-Mäusen ist signifikant ($p = 0,002$). Insgesamt zeigen die Experimente an A₁-KO-Mäusen, dass sowohl der hyperpolarisierende Effekt als auch der Ausstrom von Adenosin in Mitralzellen und die Reduktion der Erregbarkeit von Mitralzellen (bzw. die Reduktion der Aktionspotentialfrequenz) über den A₁-Rezeptor vermittelt werden.

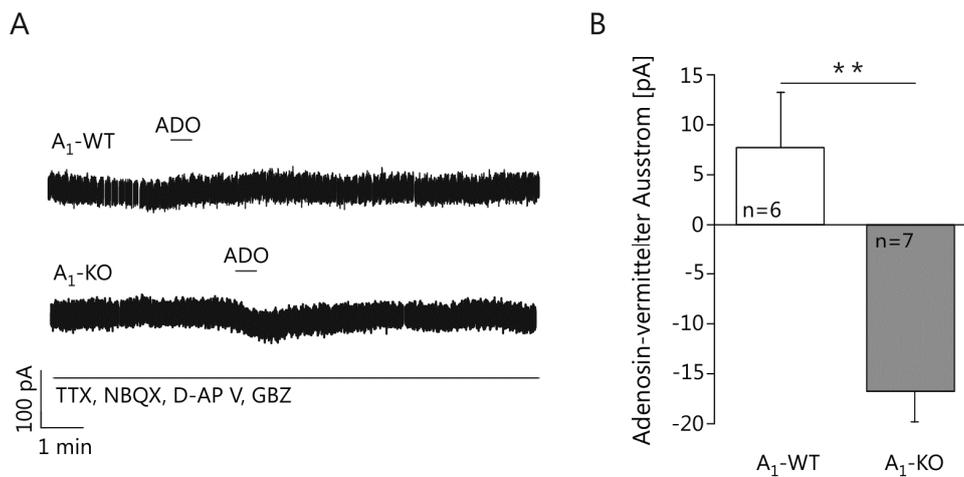


Abbildung 12 | A₁-KO-Mäuse zeigen keinen Adenosin-vermittelten Ausstrom. [A] Voltage clamp-Messungen an A₁-KO-Mäusen (untere Messspur) und deren A₁-WT-Wurfgeschwistern (obere Messspur); A₁R KO-Mäuse zeigen in synaptischer Isolation (TTX; NBQX; D-AP V; GBZ) keinen Ausstrom durch ADO (200 μM, 30 s) [B] Mittlerer Ausstrom durch Adenosin.

3.2.4 Histologische Lokalisation des A₁-Rezeptors im *Bulbus olfactorius* der Maus

Nachdem die funktionelle Expression des A₁-Rezeptors auf Mitralzellen elektrophysiologisch nachgewiesen worden war, sollte der Nachweis des Rezeptors zusätzlich histologisch erfolgen. Zudem könnte die Feststellung der Lokalisation des A₁-Rezeptors in unterschiedlichen Zelltypen im *Bulbus olfactorius* Aufschluss über eine mögliche Wirkung von Adenosin auf weitere Zellen im Netzwerk geben. Der A₁-Rezeptor weist, wie andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auch, eine sehr niedrige Expression auf (Zhao und Wu, 2012), daher erfordert seine Detektion sehr sensitive Nachweismethoden. Um den A₁-Rezeptor nachzuweisen, wurden Antikörper-Färbungen, *in situ*-Hybridisierungen sowie ein fluoreszierender A₁-Rezeptor-Ligand angewandt. Ein großer Teil der histologischen Untersuchungen wurde von Melanie Buchta im Rahmen ihrer von mir betreuten Bachelorarbeit durchgeführt.

3.2.4.1 Immunhistochemischer Nachweis des A₁-Rezeptors

Um das Protein des A₁-Rezeptors im Gewebe nachzuweisen, wurden Antikörper-Färbungen mit einem polyklonalen Antikörper aus Kaninchen durchgeführt (vgl. Tabelle 5). Dabei wurde die *free floating*-Methode verwendet, bei der aufgrund der größeren Schnittdicken Gewebestrukturen generell gut erhalten bleiben. Abbildung 13 zeigt jeweils einen Ausschnitt des olfaktorischen Bulbus mit Zellkernfärbung (blau) und den gleichen Ausschnitt der anti-A₁-Rezeptor-Färbung (grün) ohne Zellkernfärbung. Es ist eine schwache Antikörper-Färbung des gesamten Gewebes mit einer leicht erhöhten Fluoreszenz in der Mitralzellschicht zu sehen. Abbildung 13 A und B zeigen Färbungen am Gewebe einer A₁-WT-Maus, Abbildung 13 C und D Färbungen des Gewebes einer A₁-KO-Maus, in dem der Antikörper nicht an den A₁-Rezeptor binden kann. Beide Färbungen unterscheiden sich nicht deutlich, was auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers an das Gewebe hindeutet.

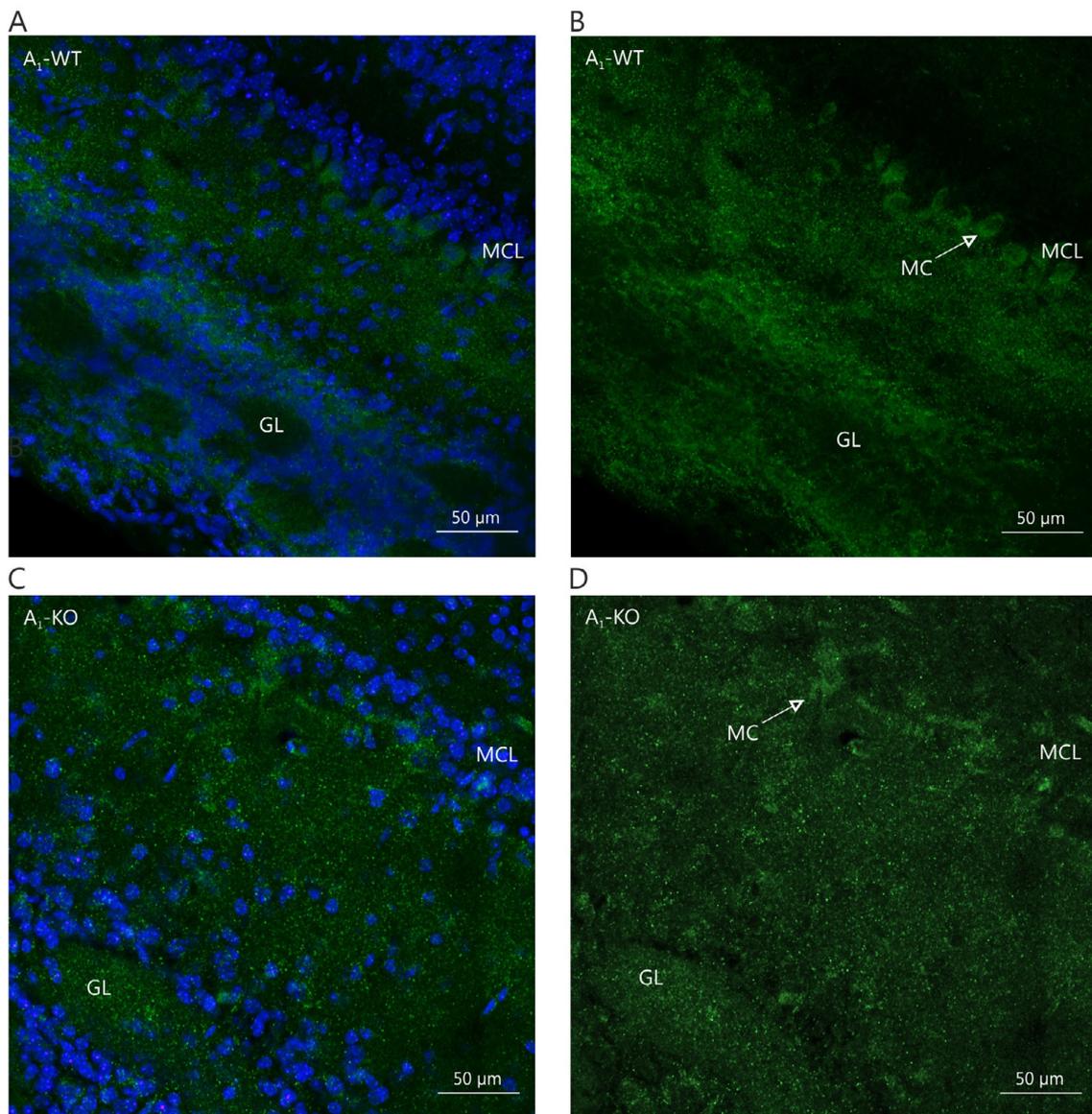


Abbildung 13 | Immunhistochemische Färbung des A_1 -Rezeptors auf A_1 -WT- und A_1 -KO-Gewebe mittels free floating-Technik. Darstellung einer Zellkernfärbung (blau) und einer immunhistochemischen Färbung mit einem Antikörper gegen den A_1 -Rezeptor mit einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper (grün). [A] Ausschnitt des olfaktorischen Bulbus einer A_1 -WT-Maus (P11) mit Zellkernfärbung. [B] Der gleiche Ausschnitt wie in A ohne Zellkernfärbung. Der Pfeil zeigt auf das Soma einer Mitralzelle. [C] Ausschnitt des olfaktorischen Bulbus einer A_1 -KO-Maus (P11) mit Zellkernfärbung. [D] Der gleiche Ausschnitt wie in C ohne Zellkernfärbung. Der Pfeil zeigt auf das Soma einer Mitralzelle. GL = Glomerularschicht, MCL = Mitralzellschicht, MC = Mitralzelle

Die Fixierung des Gewebes zu Beginn der Antikörperfärbung könnte zu einer ‚Maskierung‘ des Epitops des A_1 -Rezeptors führen, gegen welchen der Antikörper gerichtet ist. Um auszuschließen, dass aus diesem Grund keine spezifische Färbung in anti- A_1 -Rezeptor-Färbungen zu detektieren war, wurde ein *antigen retrieval* zur Demaskierung der Epitope durchgeführt. Wie in Abbildung 14 zu sehen, führte dies zu einem deutlichen Fluoreszenzsignal in Blutgefäßen, während neuronale Zellkörper nicht spezifisch gefärbt waren. Da die Fluoreszenz der Blutgefäße sowohl bei der A_1 -

WT-Maus (Abbildung 14 A+B) als auch bei der A_1 -KO-Maus (Abbildung 14 C+D) gleichermaßen stark war, ist davon auszugehen, dass auch das *antigen retrieval* nicht zu einer spezifischen Detektion des A_1 -Rezeptors führte. Insgesamt lassen die immunhistochemischen Färbungen anhand von Kontrollen an A_1 -WT- und A_1 -KO-Mäusen vermuten, dass der verwendete Primär-Antikörper gegen den A_1 -Rezeptor entweder unspezifisch band oder die Anzahl an A_1 -Rezeptoren im *Bulbus olfactorius* unterhalb der Detektionsgrenze für diesen Antikörper und diese Methode lag.

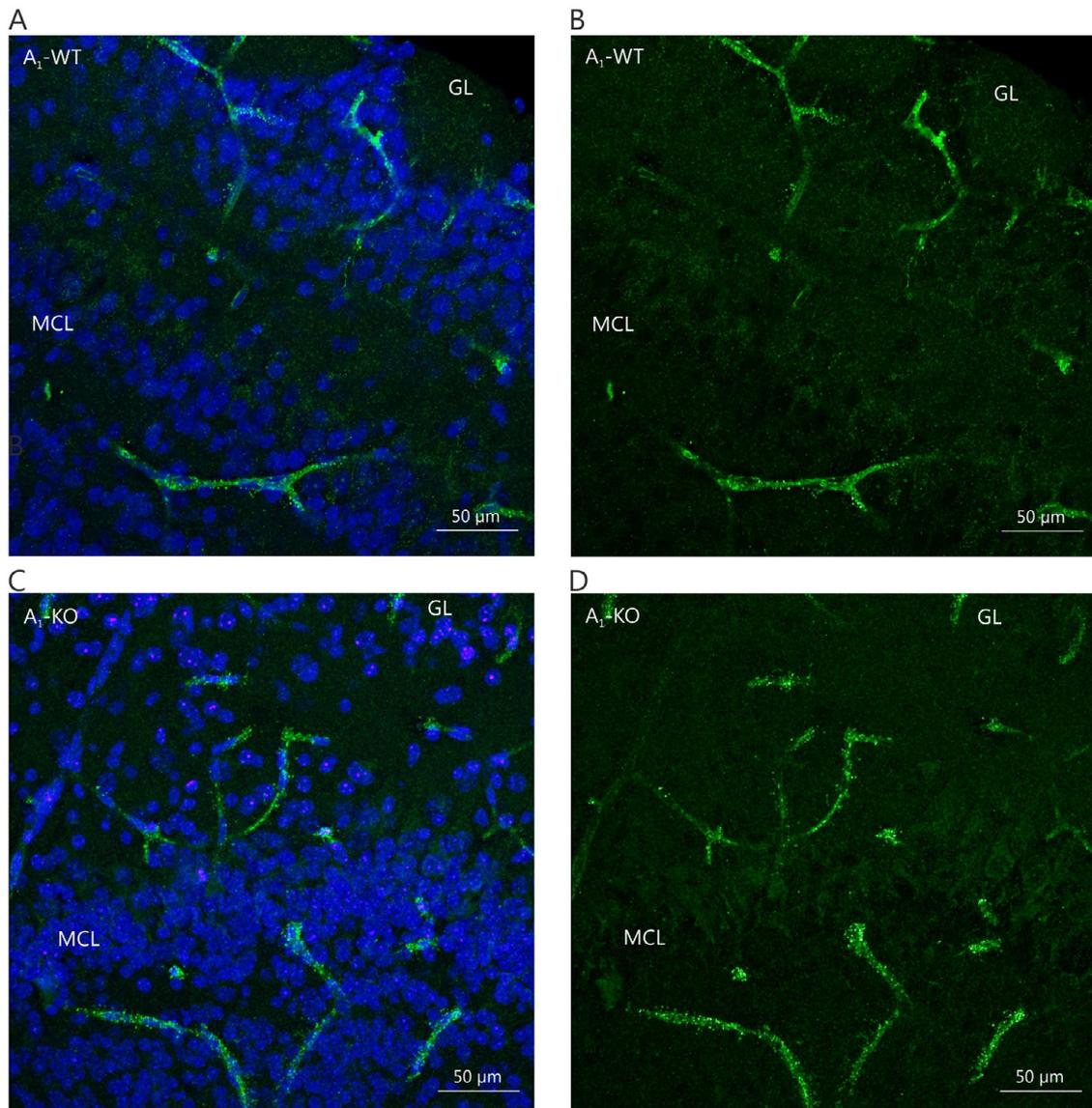


Abbildung 14 | Immunhistochemische Färbung des A_1 -Rezeptors auf A_1 -WT- und A_1 -KO-Gewebe mittels *free floating-Technik* und *antigen retrieval*. Darstellung einer Zellkernfärbung (blau) und einer immunhistochemischen Färbung mit einem Antikörper gegen den A_1 -Rezeptor mit einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper (grün). Zusätzlich wurde ein *antigen retrieval* durchgeführt. [A] Ausschnitt des olfaktorischen Bulbus einer A_1 -WT-Maus (P11) mit Zellkernfärbung. [B] Der gleiche Ausschnitt wie in A ohne Zellkernfärbung. [C] Ausschnitt des olfaktorischen Bulbus einer A_1 -KO-Maus (P11) mit Zellkernfärbung. [D] Der gleiche Ausschnitt wie in C ohne Zellkernfärbung. GL = Glomerularschicht, MCL = Mitralzellschicht

Eine Möglichkeit, gering exprimierte Proteine effektiver zu detektieren, kann die Integration eines Systems der Tyramid-Signalverstärkung (TSA) in das Protokoll der Antikörper-Färbung darstellen (vgl. Abschnitt 2.6.2). Dafür wurde für diese Arbeit zunächst ein Protokoll für die Antikörperfärbung von Kryoschnitten auf Objektträgern getestet, da das TSA-System verlässlicher auf Objektträgern mit fixiertem Gewebe als mittels der *free floating*-Methode angewandt werden kann. Nachdem die Färbung auf Objektträgern etabliert und eine Signalverstärkung mittels TSA-System nachgewiesen worden war (Testung anhand eines spezifischen Antikörpers gegen GFAP; siehe Bachelorarbeit Melanie Buchta, 2014, ‚Methoden der Signalamplifikation in der Immunhistochemie und *in situ*-Hybridisierung zur Detektion des A₁-Rezeptors im olfaktorischen Bulbus‘), wurde die Methode der Tyramid-Signalamplifikation in Kombination mit dem anti-A₁-Rezeptor-Antikörper angewendet. Abbildung 15 A und B zeigen eine TSA-Signalverstärkung der A₁-Rezeptor-Antikörperbindung. Es zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der *free floating*-Methode mit einer diffusen Färbung im ganzen Gewebe und einer leicht verstärkten Färbung im Bereich der Mitralzellschicht. Der Vergleich mit einer Negativkontrolle ohne anti-A₁-Rezeptor Primärantikörper (Abbildung 15 C und D) deutet jedoch darauf hin, dass die detektierte Färbung unspezifisch ist, da die TSA-Signalverstärkung auch ohne Primärantikörper zu einer ähnlich intensiven Färbung des Gewebes führte wie mit Primärantikörper. Somit konnte auch durch eine Signalverstärkung des A₁-Rezeptor-Signals mittels TSA-System keine spezifische Färbung des A₁-Rezeptors über Antikörper erreicht werden. Der verwendete Antikörper scheint dementsprechend für eine Lokalisation des gering exprimierten A₁-Rezeptors im Gewebe nicht geeignet zu sein.

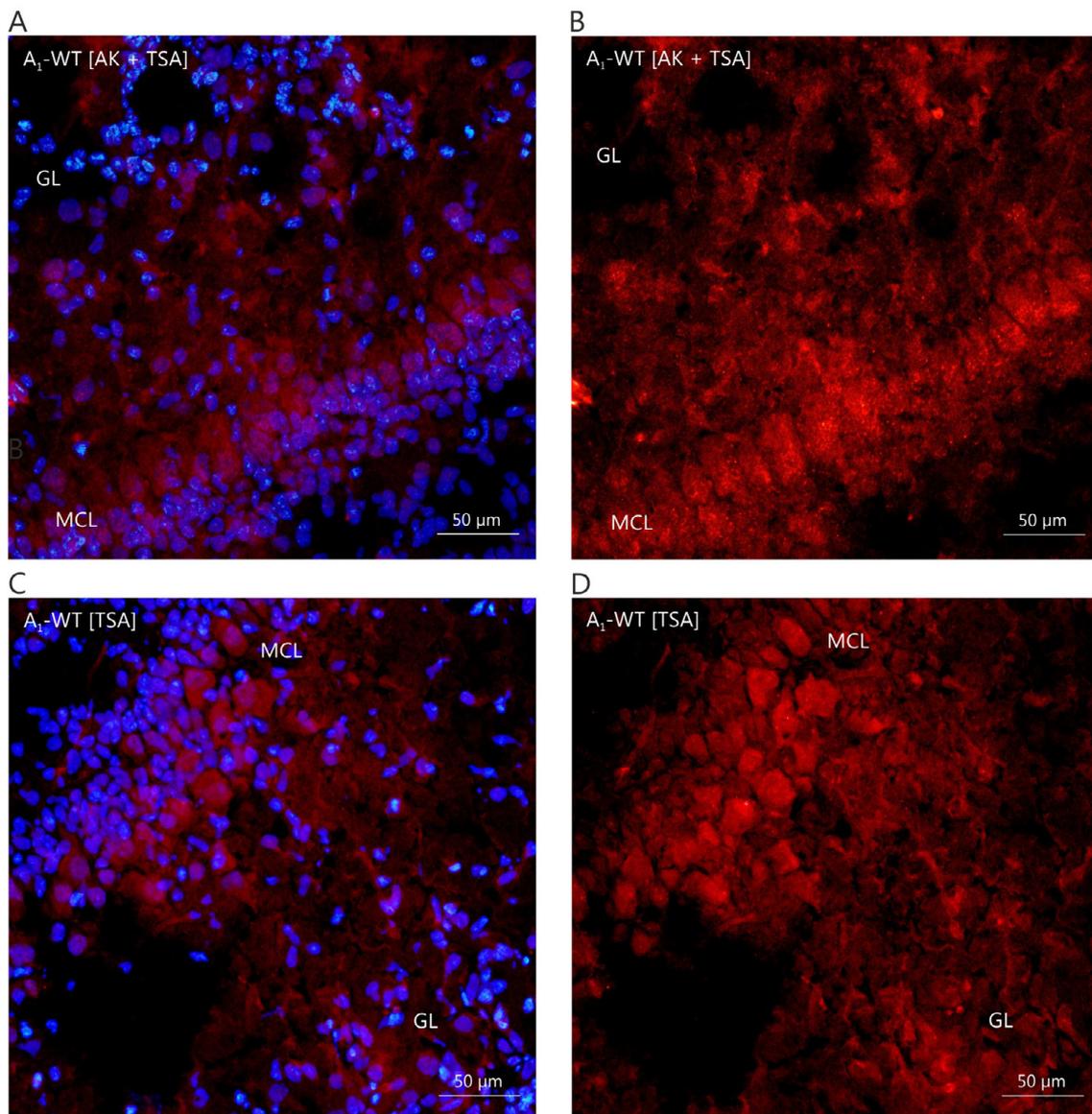


Abbildung 15 | Immunhistochemische Färbung des A_1 -Rezeptors mit TSA-Signalverstärkung auf Objektträgern. Darstellung einer Zellkernfärbung (blau) und einer immunhistochemischen Färbung mit TSA-System (rot) mit und ohne anti- A_1 -Rezeptor-Antikörper im *Bulbus olfactorius* einer NMRI-Maus (P11). [A] Antikörper-Färbung des A_1 -Rezeptors mit TSA-System mit Zellkernfärbung, [B] Der gleiche Ausschnitt wie in A ohne Zellkernfärbung. [C] Negativkontrolle ohne anti- A_1 -Rezeptor-Antikörper aber mit TSA-System mit Zellkernfärbung. [D] Der gleiche Ausschnitt wie in C ohne Zellkernfärbung. GL = Glomerularschicht, MCL = Mitralzellschicht

3.2.4.2 Ligandenbindungsverfahren mit PSB 1165 zur Lokalisation des A₁-Rezeptors im olfaktorischen Bulbus

Neben einer Antikörper-Färbung ist die Verwendung eines fluoreszierenden Agonisten oder Antagonisten eine Möglichkeit, einen Rezeptor direkt im Gewebe zu lokalisieren. Diese Technik, die auch als Ligandenbindungsverfahren bezeichnet wird, bietet zudem die Möglichkeit, einen funktionellen Rezeptor nachzuweisen und ggf. zusätzlich die physiologische Reaktion während der visualisierten Rezeptorbindung darzustellen. PSB 1165 ist ein Fluorophor-gekoppelter Agonist für den A₁-Rezeptor. Die Bindung von PSB 1165 an den A₁-Rezeptor wurde bislang nur in pharmakologischen Testsystemen wie heterolog exprimierenden Zelllinien untersucht, die Funktionalität von PSB 1165 in frischen Gehirnschnitten der Maus wurde bisher noch nicht getestet. Die Substanz ist nicht kommerziell erhältlich und wurde freundlicherweise von Dr. C. Müller (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Abbildung 16 zeigt das Bindungsmuster des Agonisten (grün) auf frischem Gewebe des *Bulbus olfactorius* der Maus. Abbildung 16 A zeigt Gewebe einer A₁-WT-Maus, Abbildung 16 B Gewebe einer A₁-KO-Maus. Beide Tiere waren Wurfgeschwister. Die Gewebe wurden gemeinsam in PSB 1165 inkubiert. Es zeigt sich eine leichte Hintergrundfluoreszenz des gesamten Gewebes und eine verstärkte Fluoreszenz im Bereich einiger Körnerzellen sowie in der Mitralzellschicht und in der Glomerularschicht. Da keine Unterschiede im Bindungsmuster von PSB 1165 bei Wildtyp- im Vergleich zu A₁-Rezeptor-*knockout*-Mäusen auftrat, ist nicht davon auszugehen, dass es sich hierbei um einen spezifischen Nachweis des Rezeptors handelt. PSB 1165 wurde auf frischem Gewebe an mehreren A₁-WT- und A₁-KO-Mäusen, in verschiedenen Konzentrationen (100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM) und mit unterschiedlichen Inkubationszeiten (1 h, 15 min, 5 min) getestet. Zusätzlich wurde das Gewebe teilweise mit dem A₁-Rezeptor-Antagonisten DPCPX (10 µM, PSB 1165 1 µM) präinkubiert, um den Rezeptor kompetitiv zu besetzen und so eine Bindung des PSB 1165 zu verhindern. Da alle erzielten Färbungen ein vergleichbares Bindungsmuster wie bei Abbildung 16 aufwiesen, werden keine weiteren Einzelergebnisse gezeigt. Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass der A₁-Rezeptor Agonist PSB 1165 für eine Visualisierung der A₁-Rezeptorlokalisierung im Gewebe ungeeignet ist.

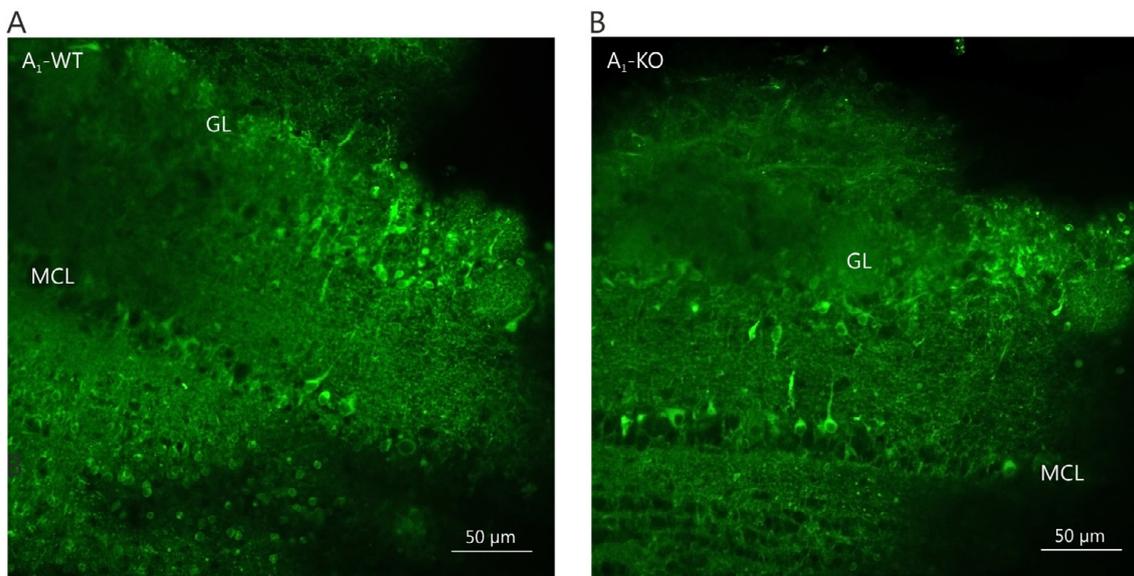


Abbildung 16 | Ligandenbindungsverfahren mit dem fluoreszierenden A_1 -Rezeptor-Agonisten PSB 1165 in frischem Gewebe von A_1 -WT- und A_1 -KO-Mäusen. PSB 1165 100 μ M, 5 min Inkubation, 5 min Auswaschen, gemeinsame Inkubation der Präparate in A und B. [A] Gewebe einer A_1 -WT-Maus (P11). [B] Gewebe einer A_1 -KO-Maus (P11). GL = Glomerularschicht, MCL = Mitralzellschicht

Da PSB-1165 ein funktioneller Agonist für den A_1 -Rezeptor ist, wurde eine potentielle Bindung an den Rezeptor auch elektrophysiologisch untersucht. Dazu wurden *current clamp*-Ableitungen von Mitralzellen durchgeführt. Abbildung 17 zeigt eine Messspur (von Dr. Fregin) mit einer Applikation von PSB-1165 (500 nM) und einer anschließenden Applikation von Adenosin. Bei einer Konzentration von 500 nM wird durch PSB 1165 in heterologen Systemen eine maximale Aktivierung des A_1 -Rezeptors erreicht (pers. Mitteilung, Dr. C. Müller). Aufgrund der potentiell agonistischen Wirkung auf den A_1 -Rezeptor wäre im Hirnschnitt ein vergleichbarer Effekt wie der von Adenosin zu erwarten. PSB 1165 führte in der dargestellten Messung jedoch zu einer leichten Depolarisation und damit zu einem gegenteiligen Effekt wie Adenosin. Eine leichte Depolarisation wurde in drei von zwölf untersuchten Zellen beobachtet. Die anderen neun untersuchten Zellen wiesen keine Reaktion auf PSB 1165 auf. Die elektrophysiologischen Messungen zeigten nicht die erwartete Wirkung eines A_1 -Rezeptor-Agonisten in Mitralzellen. Die physiologische Wirkung von PSB 1165 auf Membraneigenschaften von Mitralzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterführend untersucht. Insgesamt deuten jedoch weder das Fluoreszenzsignal noch die elektrophysiologischen Daten auf eine spezifische Bindung von PSB 1165 an den A_1 -Rezeptor in frischen Gewebepräparaten des *Bulbus olfactorius* hin.

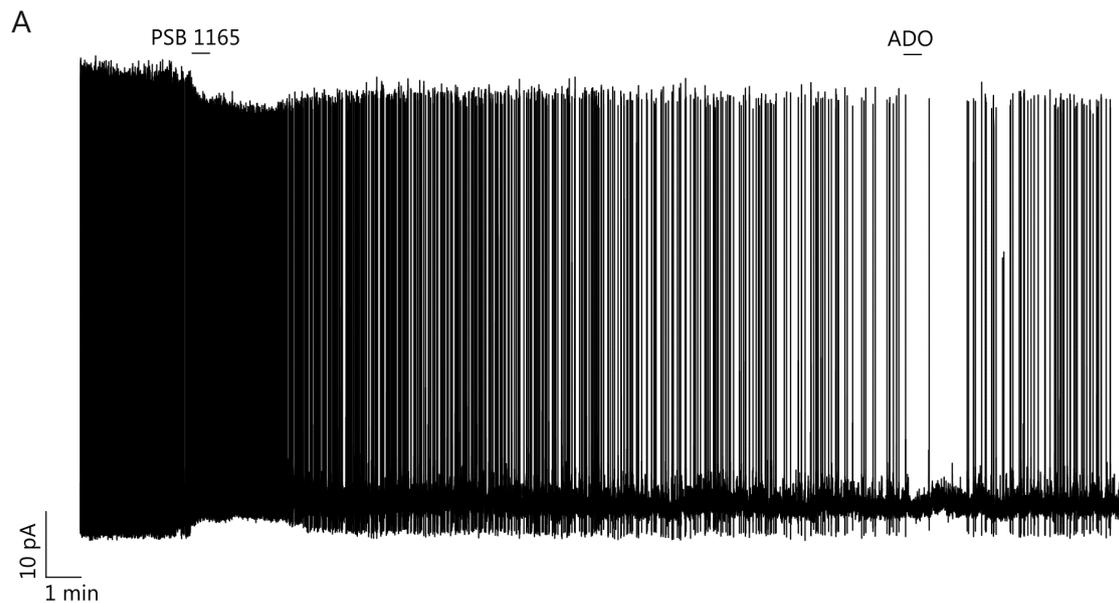


Abbildung 17 | Current clamp-Ableitung einer Mitralzelle mit PSB 1165-Applikation. PSB 1165 (500 nM, 30s) führt entweder zu keiner Reaktion (nicht gezeigt) oder zu einer leichten Depolarisation der Mitralzellmembran, und hat damit einen anderen Effekt als Adenosin (100 μ M, 30 s).

3.2.4.3 *In situ*-Hybridisierungen zur Lokalisation des A₁-Rezeptors im *Bulbus olfactorius* der Maus

Da ein Nachweis des A₁-Rezeptors mittels immunhistochemischer Methoden nicht möglich war, wurde ein Nachweis von A₁-Rezeptor-*mRNA* mittels *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Dazu wurden sowohl radioaktiv als auch DIG-markierte Sonden komplementär zur A₁-Rezeptor-*mRNA* hergestellt (vgl. Abschnitt 2.1.5.4). Ein Protokoll zur *in situ*-Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden wurde im Labor der AG Lohr etabliert und für die Detektion von A₁-Rezeptor-*mRNA* optimiert. Radioaktive *in situ*-Hybridisierungen wurden am ZMNH mit freundlicher Unterstützung von Dr. Susanne Fehr durchgeführt.

In situ-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

Abbildung 18 zeigt einen Sagittalschnitt des Gehirns einer 15 Tage alten Maus. Eine dunkle (schwarze) Färbung zeigt die Bindung der radioaktiv markierten *antisense*-Sonde an A₁-Rezeptor-*mRNA* an (Abbildung 18 A oben). Die gräuliche Hintergrundfärbung ist auf unspezifische Radioaktivität des Gewebes und der Objektträger zurückzuführen. Eine starke Bindung der Sonde liegt vor allem im Hippocampus und in der Mitralzellschicht vor. Der A₁-Rezeptor wird bekanntermaßen auf Purkinjoneuronen des Hippocampus exprimiert (Reppert et al., 1991; Burnstock et al., 2011), eine Detektion des Rezeptors in dieser Region bestätigt somit die Spezifität der durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen. Zusätzlich zeigt eine dunkle Färbung entlang der Mitralzellschicht des olfaktorischen Bulbus die Expression des A₁-Rezeptors in diesem Bereich. Die

in situ-Hybridisierungspräparate wurden zusätzlich mit Photoemulsion behandelt, um die Quelle des radioaktiven Signals genauer zu lokalisieren. Abbildung 18 B bis D zeigen vergrößerte Ausschnitte des olfaktorischen Bulbus aus diesen Präparaten. Zellkerne wurden mittels einer Hämalaun-Färbung (blau) sichtbar gemacht, um eine bessere Orientierung im Gewebe zu ermöglichen.

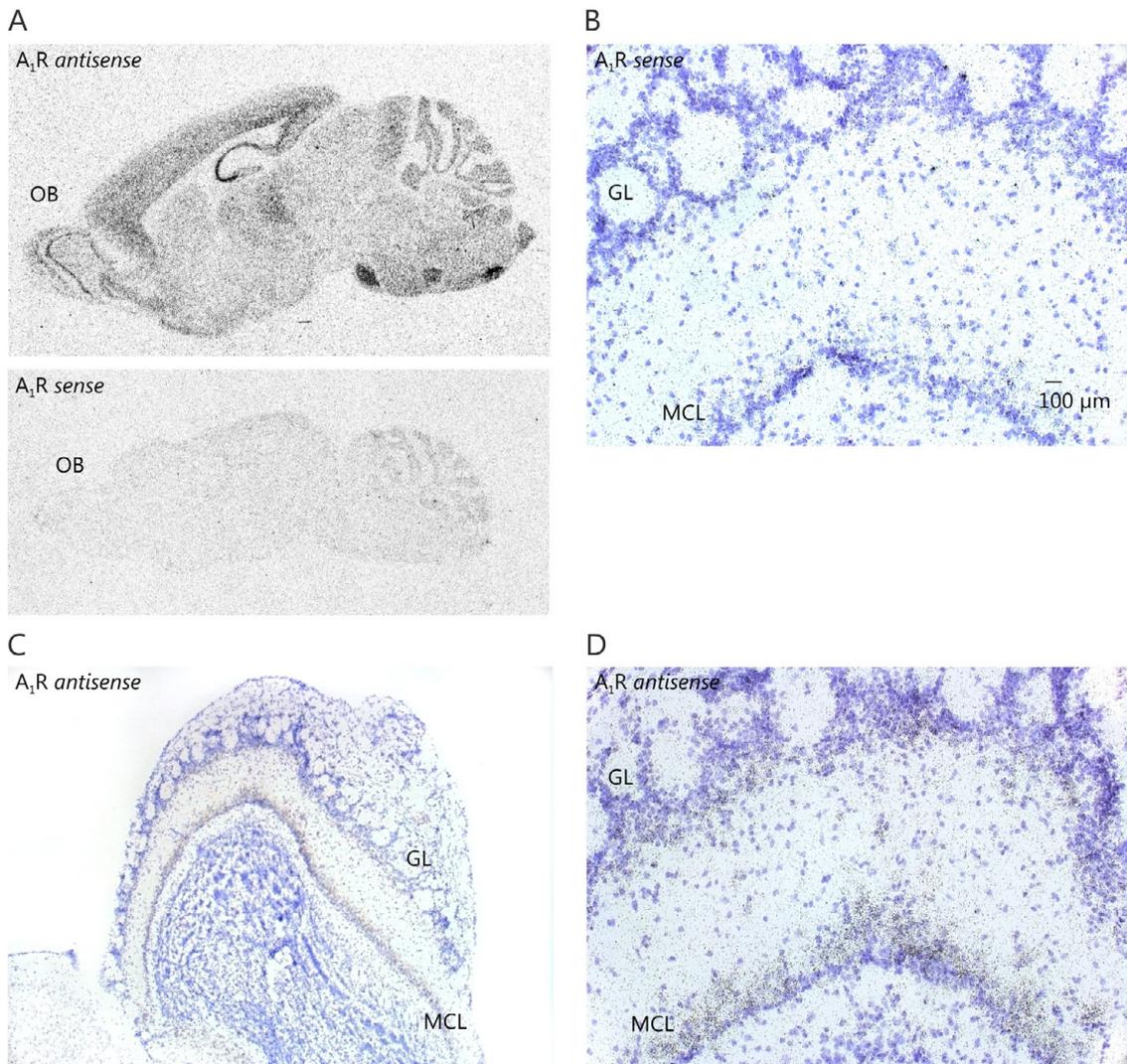


Abbildung 18 | *In situ*-Hybridisierung von A_1 -Rezeptor-*mRNA* mit radioaktiv markierten Sonden. A_1 -Rezeptor-*mRNA*-Nachweis in Gewebe einer P15 NMRI Maus [A] Übersicht Ganzhirn sagittal, ein deutlicher Nachweis zeigt sich im Hippocampus und in der Mitralzellschicht (schwarz) (oben, *antisense*-Sonde). Mit der *sense*-Sonde (Negativkontrolle) lässt sich keine Sondenbindung nachweisen (unten). [B bis D] Mit Photoemulsion behandeltes Präparat; Details des olfaktorischen Bulbus, Zellkernfärbung mittels Hämalaun (blau), ISH Sonde (schwarz) [B] Negativkontrolle mit *sense*-Sonde; es ist keine spezifische Färbung zu erkennen. [C] Übersicht; Detektion der *antisense*-Sonde, eine deutliche Detektion zeigt sich in der Mitralzellschicht und in der unteren Glomerularschicht [D] Detail der Photoemulsion in C. GL = Glomerularschicht, MCL = Mitralzellschicht, OB = olfaktorischer Bulbus

Eine Bindung der A_1 -Rezeptor-*antisense*-Sonde zeigt sich anhand einer punktuellen, schwarzen Färbung. Wie in den Detailaufnahmen Abbildung 18 C und D zu sehen, zeigten sich Signale in der Mitralzellschicht, im Bereich der unteren Glomerularschicht und um vereinzelte Zellen der äußeren plexiformen Schicht. Dieses Färbemuster deutet auf eine Expression des A_1 -Rezeptors in Mitral- und *tufted*-Zellen des olfaktorischen Bulbus hin. Eine Negativkontrolle unter Verwendung der korrespondierenden *sense*-Sonde zeigte keine Bindung der Sonde im olfaktorischen Bulbus (Abbildung 18) und bestätigte dadurch die Spezifität der verwendeten *antisense*-Sonde.

In situ-Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden

Die Verwendung von DIG-markierten Sonden bei *in situ*-Hybridisierungen erlaubt eine genauere zelluläre Auflösung gegenüber radioaktiv markierten Sonden. Aus diesem Grund wurden DIG-markierte Sonden verwendet, um die Lokalisation von A_1 -Rezeptor-*mRNA* im *Bulbus olfactorius* im Detail zu untersuchen. Um die Spezifität der verwendeten Sonde zu überprüfen, wurden zudem *in situ*-Hybridisierungen mit A_1 -KO-Mäusen durchgeführt. Abbildung 19 zeigt *in situ*-Hybridisierungen mit einer A_1 -Rezeptor *antisense*-Sonde auf Gewebe von A_1 -WT- (linke Seite, A-C) und A_1 -KO-Mäusen (rechten Seite D-F). Es ist zu erkennen, dass in Gewebe von *knockout*-Mäusen keine Bindung der Sonde stattgefunden hat. Außer einer leichten Hintergrundfärbung und einem schwachen, unspezifischen Niederschlag ist keine Färbung festzustellen. In Wildtyp-Mausgewebe hingegen ist ein deutliches Präzipitat im Bereich der Mitralzellschicht zu sehen. Dieses ringförmig um große Zellkerne gelegene Muster deutet auf das Vorhandensein von A_1 -Rezeptor-*mRNA* im Cytosol von Mitralzellen hin, da diese die einzigen großen Zellen in dieser Schicht des *Bulbus olfactorius* sind.

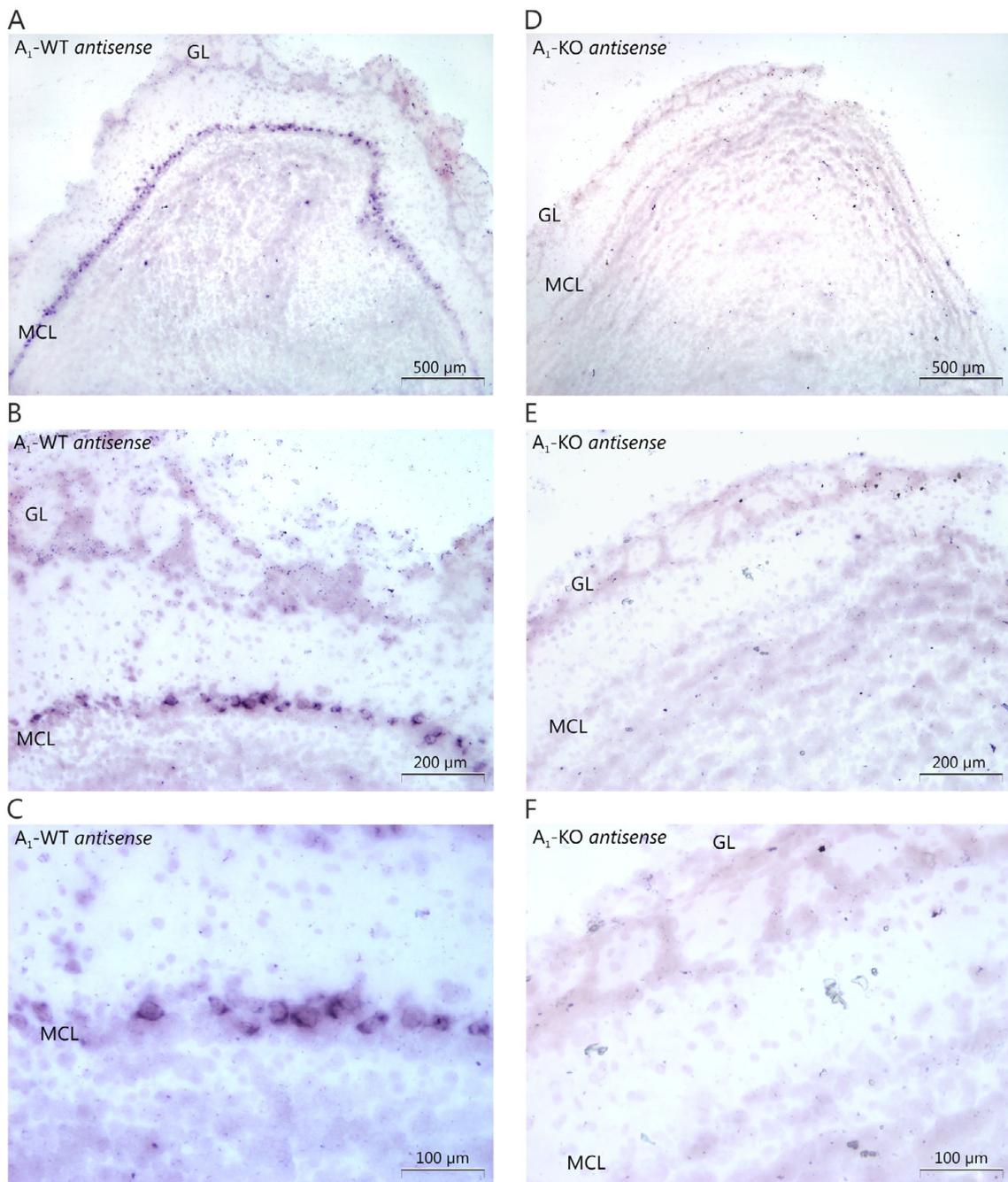


Abbildung 19 | *In situ*-Hybridisierung von A_1 -Rezeptor-*mRNA* mit DIG-markierten Sonden in Gewebe von A_1 -WT- und A_1 -KO-Mäusen. [A] Nachweis der A_1 -Rezeptor-*mRNA* mit einer *antisense*-Sonde (1000 ng/ml) und anschließender Antikörperinkubation und BCIP/NBT-Färbung im olfaktorischen Bulbus einer A_1 -WT-Maus (P33) mit Färbung in der Mitralzellschicht. [B] Detail aus A. [C] Detail aus B. [D] Nachweis der *mRNA* des A_1 -Rezeptors-*mRNA* mit einer *antisense*-Sonde (1000 ng/ml) und anschließender Antikörperinkubation und BCIP/NBT-Färbung im olfaktorischen Bulbus einer A_1 -KO-Maus (P35) ohne spezifische Färbung. [E] Detail aus D. [F] Detail aus E. GL = Glomerularschicht, MCL = Mitralzellschicht

Zusätzlich zu Tests an A_1 -Rezeptor-*knockout*-Mäusen wurden weitere Negativkontrollen durchgeführt; hierzu wurden *in situ*-Hybridisierungen ganz ohne Sonde und mit einer *sense*-Sonde angefertigt. Diese Negativkontrollen (Abbildung 20) bestätigten zusätzlich die Spezifität der angefertigten *in situ*-Hybridisierung von A_1 -Rezeptor-*mRNA*. Weder die *sense*-Sonde noch eine Hybridisierung ohne Sonde zeigten ein mit der *antisense*-Sonde vergleichbares Ergebnis. Wie auch bei Färbungen an Geweben von A_1 -KO-Mäusen (Abbildung 19, rechte Seite), ist eine leichte, das gesamte Gewebe betreffende Hintergrundfärbung sowie ein gleichmäßig auftretender, unspezifischer Niederschlag zu sehen. Da dies auch gänzlich ohne Sonde auftrat, ist diese Färbung vermutlich auf die verwendete Detektionsmethode mittels NBT/BCIP zurückzuführen.

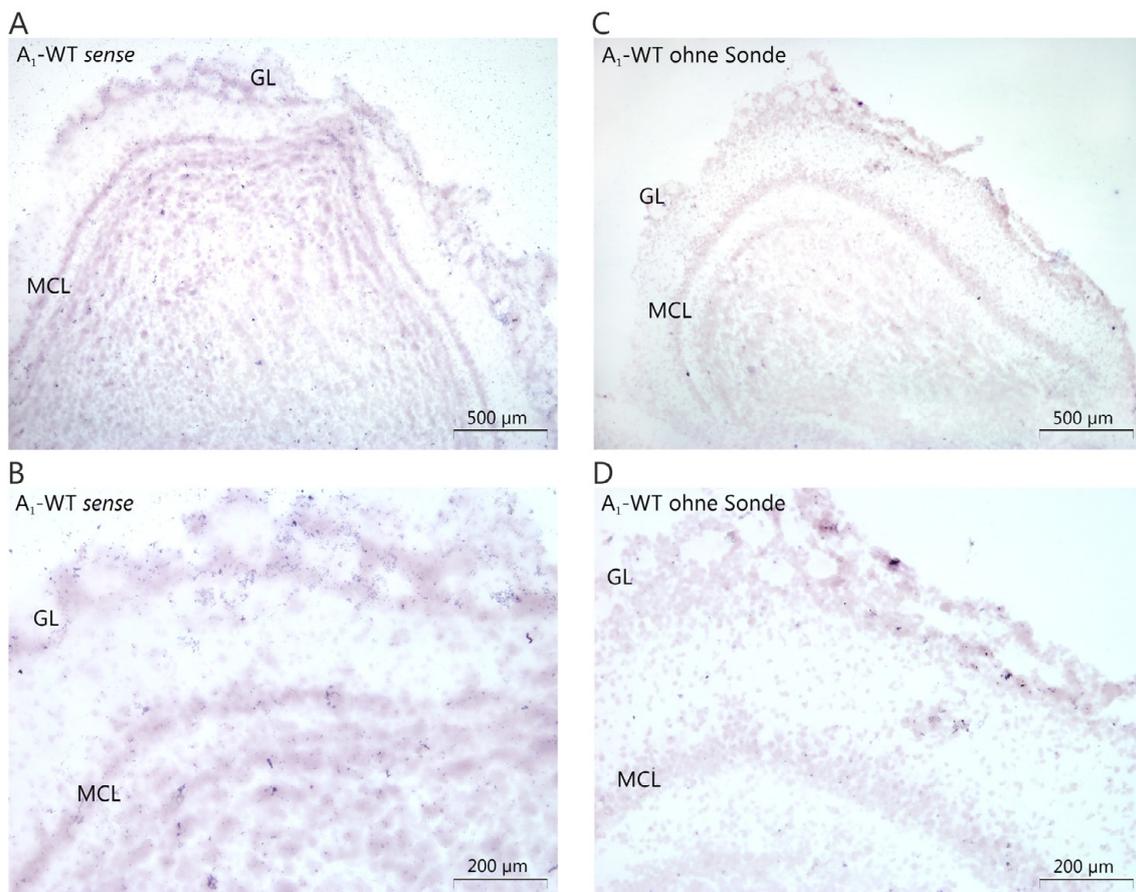


Abbildung 20 | Negativkontrollen; *in situ*-Hybridisierungen mit *sense*-Sonden. bzw. ohne Sonden in A_1 -WT-Gewebe. [A] Gewebe nach *in situ*-Hybridisierung mit einer *sense*-Sonde mit anschließender Antikörperinkubation mit BCIP/NBT-Färbung. [B] Detail aus A. [C] Gewebe nach *in situ*-Hybridisierung ohne Sonde mit anschließender Antikörperfärbung mit BCIP/NBT-Färbung. [D] Detail aus C. GL = Glomerularschicht, MCL = Mitralzellschicht

Während der Fokus der Untersuchung auf der Expression des A_1 -Rezeptors im olfaktorischen Bulbus lag, wurde der Nachweis einer Expression des A_1 -Rezeptors in der CA2 und CA3 Region des Hippocampus als Positivkontrolle betrachtet, da Neurone der CA2 und CA3-Region erwiesenermaßen A_1 -Rezeptoren exprimieren (Reppert et al., 1991). Abbildung 21 A und B zeigen hierbei Gewebe von Wildtyp-Mäusen in Übersicht und Detail der *antisense*-Sonde und Abbildung

21 C der entsprechenden *sense*-Sonde. *In situ*-Hybridisierungen mit A_1 -*antisense*-Sonden Auf A_1 -WT-Gewebe zeigen ein deutliches Präzipitat in der CA2 und CA3-Region des Hippocampus. Abbildung 21 D zeigt Gewebe einer A_1 -Rezeptor-*knockout*-Maus, in dem, im Gegensatz zu A_1 -WT-Gewebe, kein Präzipitat und somit A_1 -Rezeptor nachgewiesen wurde. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass in dieser Arbeit mit *in situ*-Hybridisierungen eine Expression des A_1 -Rezeptors in Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus spezifisch nachgewiesen werden konnte.

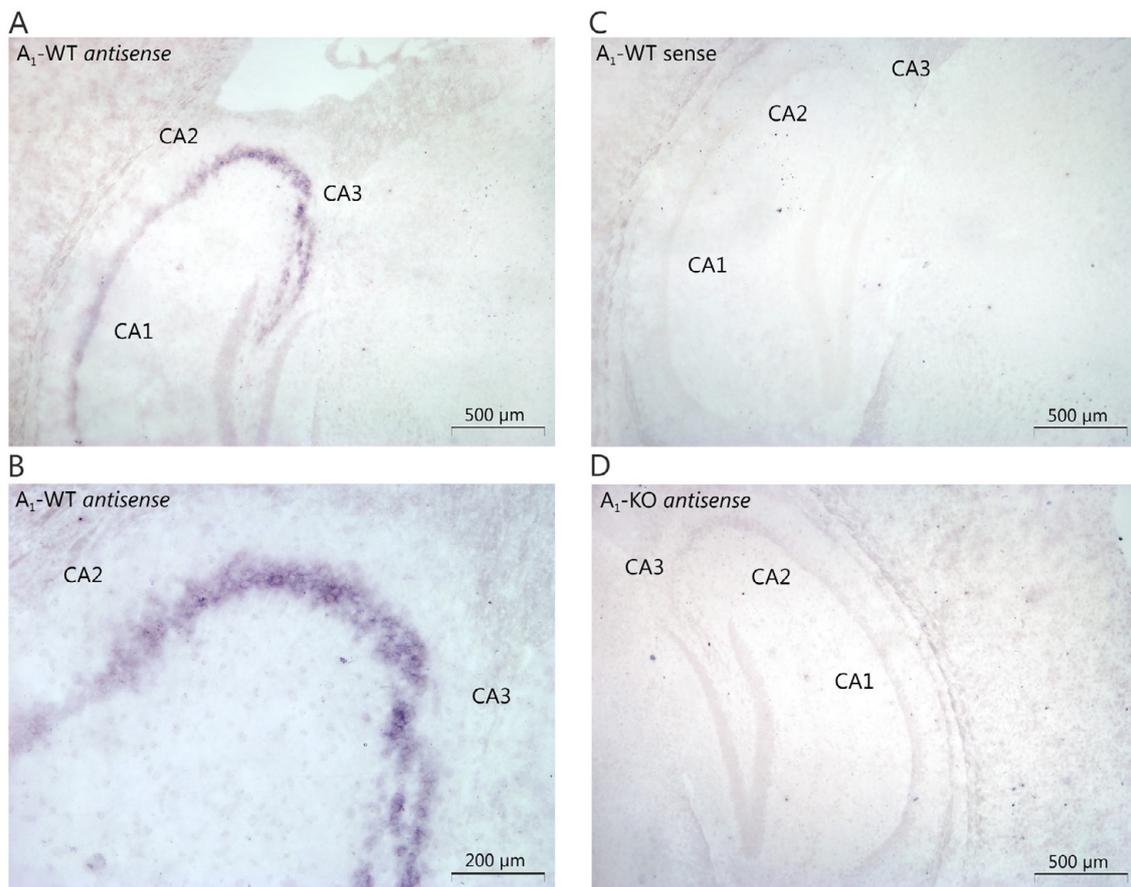


Abbildung 21 | *In situ*-Hybridisierung von A_1 -Rezeptor-*mRNA* im Hippocampus bei A_1 -WT- und A_1 -KO-Mäusen. Nachweis der *mRNA* des A_1 -Rezeptors und anschließender Antikörperinkubation mit BCIP/NBT-Färbung. [A] Ausschnitt des Hippocampus einer A_1 -WT-Maus mit *antisense*-Sonde (1000 ng/ml) [B] Detail der Färbung in A. [C] Hippocampus einer A_1 -WT-Maus mit einer *sense*-Sonde (1000 ng/ml) [D] Hippocampus einer A_1 -KO-Maus mit *antisense*-Sonde (1000 ng/ml). CA1-CA3: Ammonshorn-Region 1-3

3.2.5 Adenosin vermittelt die Öffnung eines Kaliumkanals in Mitralzellen

Die bisher in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen einen A_1 -Rezeptor-vermittelten Effekt von Adenosin auf elektrophysiologische Eigenschaften von Mitralzellen (Ausströme vgl. Abschnitt 3.2.1 und Hyperpolarisation vgl. Abschnitt 3.2.2) sowie einen histologischen Nachweis von A_1 -Rezeptor-*mRNA* in Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus (vgl. Abschnitt 3.2.4.3). Im folgenden Ergebnisabschnitt wird dargestellt, welche Ionen-Leitfähigkeiten an dem hyperpolarisierenden Effekt der A_1 -Rezeptor-Aktivierung in Mitralzellen beteiligt sind.

3.2.5.1 Adenosin führt zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit von Mitralzellmembranen

Ein Vergleich der Leitfähigkeit vor und während der Adenosin-Applikation gibt Aufschluss darüber, ob Ionenkanäle durch Adenosin geöffnet oder geschlossen werden und ermöglicht somit einen Rückschluss auf die Art der an der Hyperpolarisation beteiligten Ionen-Leitfähigkeiten. Um Leitfähigkeiten im *voltage clamp*-Modus zu untersuchen, wurden Mitralzellen in synaptischer Isolation abgeleitet. Um möglichst physiologische intrazelluläre Bedingungen aufrecht zu erhalten, wurde K-Glukonat-basierte Intrazellulärlösung verwendet. Es wurde ein Haltepotential von -70 mV gewählt, von dem aus alle 10 s Spannungssprünge mit einer Amplitude von -10 mV durchgeführt wurden. Die Adenosin-induzierte Änderung der durch den Spannungssprung ausgelösten Haltestromdifferenz gibt Aufschluss darüber, ob Ionenkanäle geöffnet oder geschlossen wurden. Durch die Applikation von Adenosin kam es, wie schon in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, zu einem Ausstrom (Abbildung 22). Die Stromdifferenz während des Spannungssprungs erhöhte sich durch Applikation von Adenosin (Abbildung 22 B). Die aus der Stromdifferenz errechnete Membranleitfähigkeit stieg durch Adenosin von $3,24 \pm 0,8$ nS auf $3,55 \pm 0,8$ nS signifikant an ($n = 8$, $p = 0,00009$). Nach Auswaschen von Adenosin verringerte sich die Leitfähigkeit wieder auf $3,46 \pm 0,8$ nS, war allerdings zur Kontrolle signifikant unterschiedlich ($n = 6$, $p = 0,001$). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch Adenosin Ionenkanäle geöffnet werden.

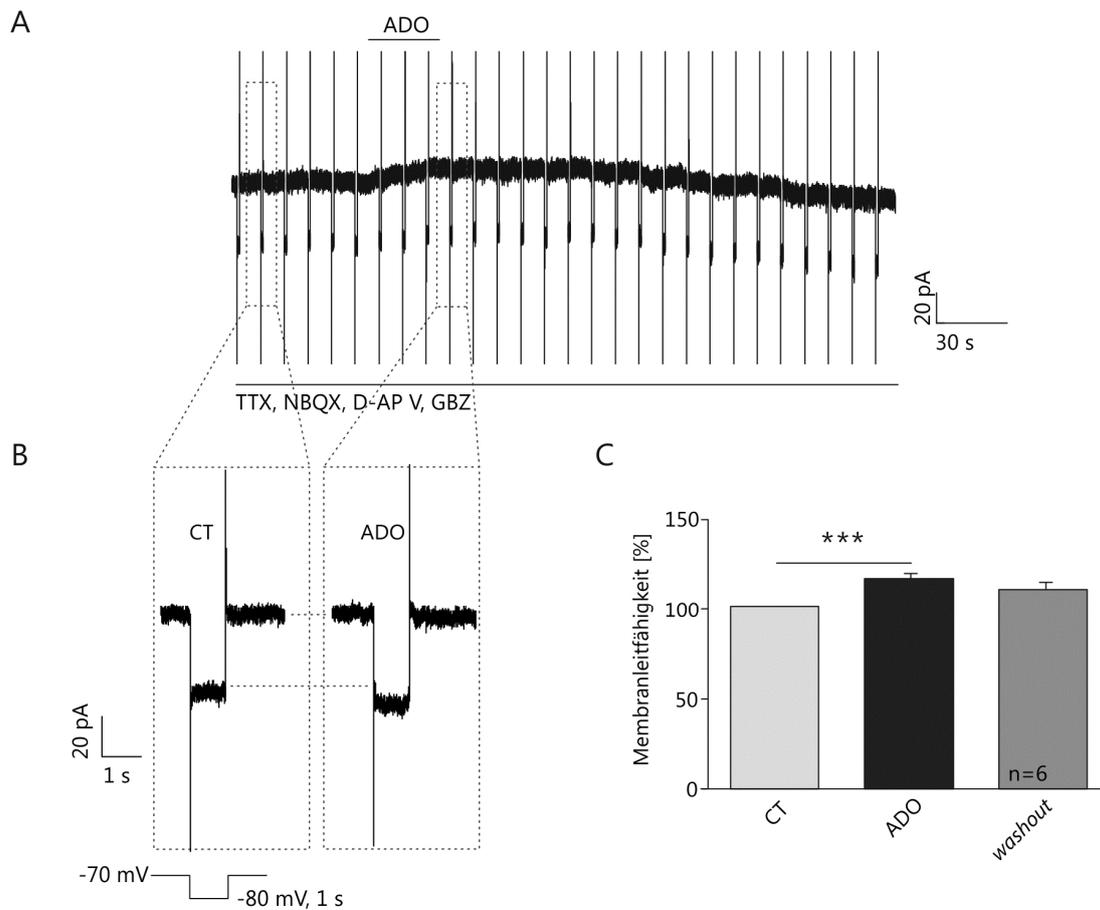


Abbildung 22 | Bestimmung der Leitfähigkeitsänderung durch Adenosin. [A] Messspur einer Mitralzelle, im *voltage clamp*-Modus in synaptischer Isolation (TTX, NBQX, D-AP V, GBZ), bei -70 mV haltepotential mit 1 s langen Spannungssprüngen um -10 mV alle 10 s. Zu sehen ist ein Ausstrom unter ADO (200 μ M, 30 s). [B] Detail einer Stromantwort bei einem Potentialsprung ohne Adenosin (CT) und unter Einfluss von Adenosin (ADO). [C] Durch Adenosin kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Leitfähigkeit.

3.2.5.2 Bestimmung des Umkehrpotentials von Adenosin-vermittelten Membranpotentialänderungen in Mitralzellen

Wie aus Abschnitt 3.2.5.1 hervorgeht, führte Adenosin zur Öffnung von Ionenkanälen in Mitralzellen. Um weiterführend zu untersuchen, welcher Ionenkanal an der Wirkung von Adenosin beteiligt ist, wurde das Umkehrpotential der Adenosin-aktivierten Ionenleitfähigkeit bestimmt. In diesem Experiment wurde mit einer im Vergleich zu den zuvor verwendeten Lösungen erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration von 5 mM und einer reduzierten intrazellulären Kaliumkonzentration von 140 mM gearbeitet (vgl. ‚K-Glukonat-basierte Intrazellulärlösung mit reduzierter Kaliumkonzentration‘ Tabelle 3), um das Umkehrpotential für Kaliumionen auf positivere Werte zu verschieben. Um das Membranpotential der untersuchten Zelle auf verschiedene Niveaus einzustellen wurden Stromsprünge vor, während und nach der Adenosin Applikation durchgeführt (Abbildung 23 A). Um den durch Adenosin verursachten Potentialunterschied zu bestimmen, wurde für jeden Wert der Strominjektion das dazugehörige

Membranpotential vor und während der Adenosin-Applikation bestimmt. Die Differenz der korrespondierenden Membranpotentialwerte vor Adenosin und unter Einfluss von Adenosin ergibt die durch den Einfluss von Adenosin hervorgerufene Potentialänderung. Wird diese gegen das zugehörige Membranpotential vor Adenosin-Applikation aufgetragen, ergibt sich daraus Abbildung 23 B. Die lineare Trendlinie (gemittelt aus fünf Zellen) schneidet die Abszisse bei dem Wert, bei dem durch Adenosin keine Potentialänderung mehr hervorgerufen wird; dieses Potential entspricht dem Umkehrpotential des durch Adenosin vermittelten Stroms und liegt (nach Korrektur des *liquid junction potentials*) bei -86 mV. Das mittels Nernst-Gleichung errechnete Umkehrpotential von Kaliumionen liegt bei den in diesem Experiment verwendeten Intra- und Extrazellulärlösungen bei -84 mV. Die Nähe des ermittelten Umkehrpotentials des durch Adenosin verursachten Stroms zum errechneten Umkehrpotential von Kaliumionen deutet darauf hin, dass in Mitralzellen ein Kaliumstrom von Adenosin moduliert wird.

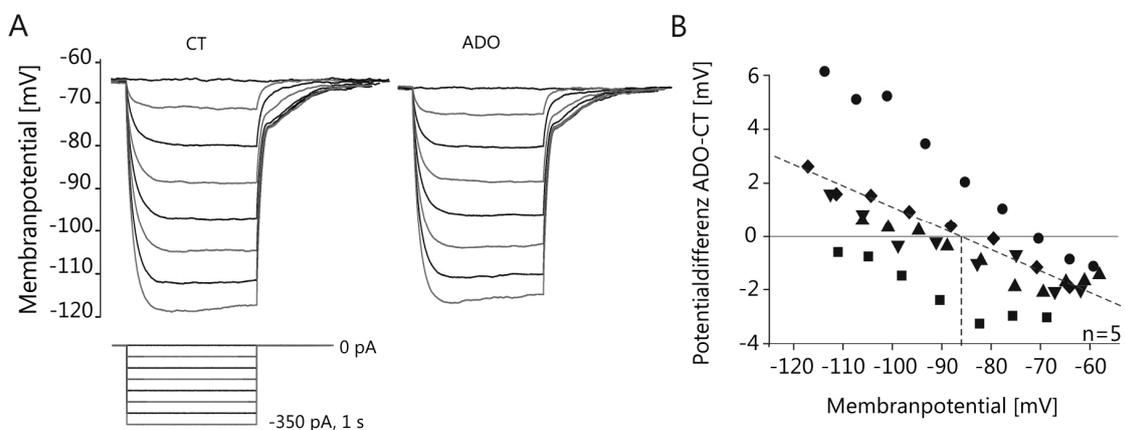


Abbildung 23 | Bestimmung des Umkehrpotentials des Adenosin-vermittelten Stroms. [A] Spannungssprünge evoziert durch Strominjektionen gemessen im *current clamp*-Modus unter Einfluss von 1 μ M TTX, vor (CT), in (ADO) und nach Adenosin-Applikation (*washout*) (100 μ M, 30 s). [B] Potentialänderung durch Adenosin aufgetragen gegen das jeweilige Membranpotential während der Kontrolle. Die Regressionsgerade schneidet die Abszisse bei dem Umkehrpotential des Adenosin-vermittelten Stroms. Das experimentell ermittelte Umkehrpotential liegt bei -86 mV.

3.2.5.3 Der Adenosin-vermittelte Ausstrom in Mitralzellen ist bei einem Haltepotential von -30 mV größer als bei -70 mV

Da die zuvor beschriebenen Experimente darauf hindeuten, dass Adenosin eine Kaliumleitfähigkeit öffnet, müsste sich der durch Adenosin hervorgerufene Ausstrom vergrößern, je weiter sich das Haltepotential vom Kaliumumkehrpotential entfernt. Diese Annahme wurde getestet, indem Mitralzellen in synaptischer Isolation bei -30 mV Haltepotential gemessen wurden und der Adenosin-induzierte Ausstrom mit der Größe des Ausstroms bei -70 mV Haltepotential (vgl. Abbildung 8) verglichen wurde. Bei -30 mV Membranpotential lag der Haltestrom im Mittel bei 245 ± 53 pA, unter Einfluss von Adenosin nahm er signifikant auf 284 ± 55 pA zu ($p = 0,001$, $n = 8$). Nach Auswaschen von Adenosin (*washout*) sank der Haltestrom im Vergleich zum Haltestrom

unter Einfluss von Adenosin wieder signifikant auf 265 ± 59 pA ($p = 0,03$) (Abbildung 24). Bei -30 mV Haltepotential kam es damit zu einem mittleren Ausstrom von 35 ± 6 pA ($n = 8$), der signifikant größer war als bei einem Haltepotential von -70 mV ($p = 0,002$) (Abbildung 24 C).

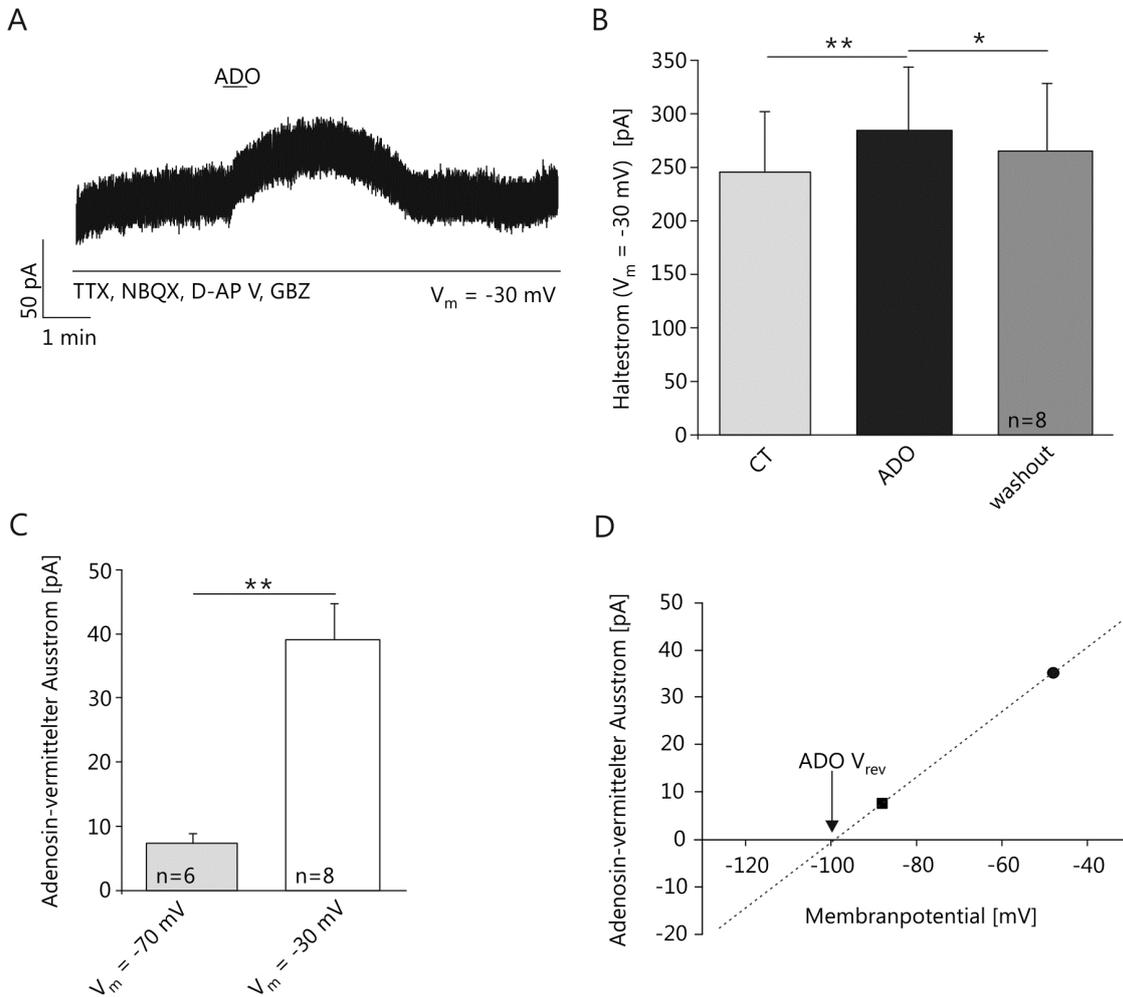


Abbildung 24 | Bei einem Haltepotential von -30 mV ist der Adenosin-vermittelte Ausstrom größer als bei -70 mV. [A] Messspur einer Mitralzelle im voltage clamp-Modus in synaptischer Isolation (TTX, NBQX, D-AP V, GBZ) bei -30 mV Haltepotential; Die Applikation von Adenosin (200 μ M, 30 s) verursacht einen Ausstrom [B] Die Erhöhung des Haltestroms durch Adenosin ist signifikant. [C] Bei -30 mV Haltepotential, kommt es durch Adenosin zu einem signifikant größeren Ausstrom als bei -70 mV Haltepotential. [D] Eine lineare Extrapolation der Ausstromgrößen bei -30 und -70 mV Haltepotential ergibt ein Umkehrpotential für den Adenosin-vermittelten Strom (ADO V_{rev}) von 100 mV, welche nahe an dem errechneten Umkehrpotential für Kaliumionen bei -105 mV liegt (Werte in D sind *liquid junction potential*-korrigiert).

Es bestätigte sich somit die oben genannte Hypothese, dass der Adenosin-vermittelte Ausstrom bei einem positiveren Haltepotential größer wird. Eine lineare Interpolation der Größe der Adenosin-induzierten Ausströme ergibt ein Umkehrpotential des Adenosin-vermittelten Stroms von -100 mV (nach Korrektur des *liquid junction potentials*). Die in den zugrundeliegenden Experimenten verwendeten Lösungen (K-Glukonat-basierte Intrazellulärlösung und standard-ACSF, vgl. Tabelle 2

und Tabelle 3) weisen ein Kaliumumkehrpotential von -105 mV auf. Das durch Interpolation ermittelte Umkehrpotential des Adenosin-vermittelten Stroms liegt damit nahe an dem für Kaliumionen kalkulierten Umkehrpotential und bestätigt das im vorherigen Abschnitt ermittelte Umkehrpotential des Adenosin-vermittelten Stroms nahe dem Umkehrpotential für Kaliumionen.

3.2.5.4 Die Substitution von intrazellulären Kaliumionen mit Cäsiumionen vermindert den Adenosin-vermittelten Ausstrom

Wird durch Adenosin ein Kaliumkanal geöffnet, woraufhin Kalium aus der Zelle ausströmt, müsste ein Entfernen von Kalium aus der Intrazellulärlösung dazu führen, dass durch Adenosin kein Ausstrom mehr festzustellen ist. Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurden Kaliumionen in der Intrazellulärlösung durch Cäsiumionen ersetzt. Da bei -30 mV Haltepotential größere Ausströme durch Adenosin gemessen werden konnten als bei -70 mV, wurden die folgenden Experimente bei einem Haltepotential von -30 mV durchgeführt. Die Messungen mit CsMeSO₄-Intrazellulärlösung wurden von Svenja Winandy im Rahmen der von mir mitbetreuten Masterarbeit durchgeführt. Wie in Abbildung 25 zu sehen verringerte eine Substitution von Kaliumionen in der Intrazellulärlösung durch Cäsiumionen den durch Adenosin vermittelten Ausstrom signifikant auf 11 ± 3 pA ($p = 0,004$, $n = 6$). Dies legt zusammen mit den vorgehenden Ergebnissen nahe, dass Adenosin tatsächlich einen Kaliumkanal moduliert.

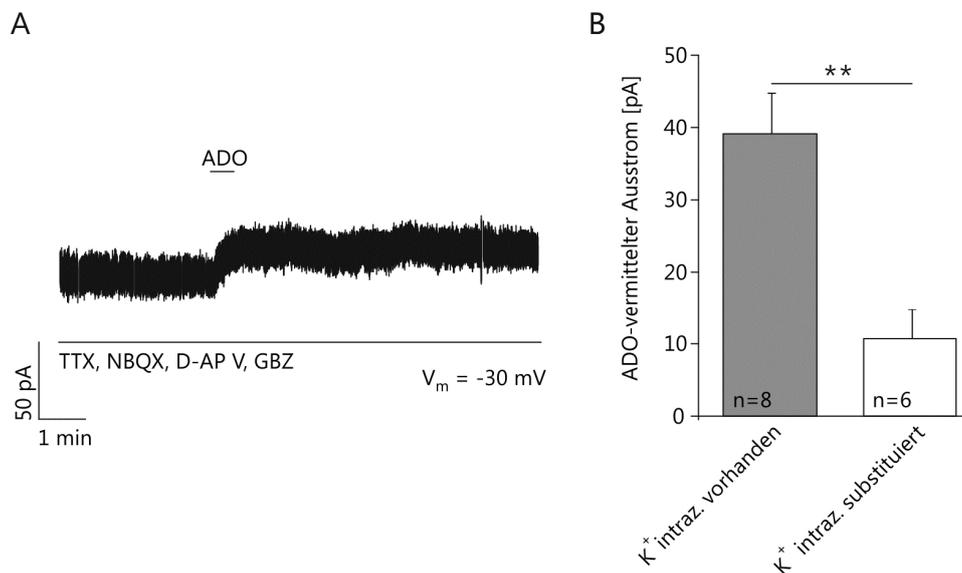


Abbildung 25 | Substitution von Kaliumionen in der Intrazellulärlösung vermindert den Adenosin-vermittelten Ausstrom. [A] Messspuren, oben K-Glukonat-basierte, unten CsMeSO₄-basierte Intrazellulärlösung. Adenosin (200 μ M, 30 s) verursacht einen deutlich größeren Ausstrom in K⁺-basierter als bei Cs²⁺-basierter Intrazellulärlösung. [B] Die Größe des Adenosin-vermittelten Ausstroms mit Kalium-substituierter Intrazellulärlösung ist signifikant kleiner als wenn Kalium intrazellulär vorhanden ist.

3.2.5.5 Die intrazelluläre Chloridkonzentration hat keinen Einfluss auf Adenosin-vermittelte Hyperpolarisationen

Wie in Abschnitt 3.2.5.1 beschrieben, kommt es durch Adenosin zur Öffnung eines Ionenkanals in Mitralzellen. Unter den gegebenen Bedingungen (Lösungen und Ruhemembranpotential) kann bei der Öffnung eines Kanals nur ein Ausstrom von Kaliumionen oder ein Einstrom von Chloridionen zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führen. Die in den vorhergehenden Ergebnisabschnitten beschriebenen Experimente lassen vermuten, dass es durch Adenosin zu einem Ausstrom von Kaliumionen kommt. Um zusätzlich die Beteiligung von intrazellulären Chloridionen an dem Adenosin-induzierten Effekt experimentell zu untersuchen, wurde im folgenden Experiment die Chloridkonzentration der Intrazellulärlösung dahingehend geändert, dass sich das errechnete Umkehrpotential für Chloridionen auf -16 mV erhöht (Abbildung 26). Die in den vorangegangenen Experimenten verwendete K-Glukonat-basierte Intrazellulärlösung wies ein errechnetes Chloridumkehrpotential von -61 mV auf. Bei einem Ruhemembranpotential von ca. -40 mV (nicht *liquid junction potential*-korrigiert) und bei einem Chloridumkehrpotential von -16 mV sollte es bei der Öffnung eines Chloridkanals zu einem Ausstrom von Chloridionen aus der Zelle kommen, was zu einer Depolarisation der Zelle führen würde.

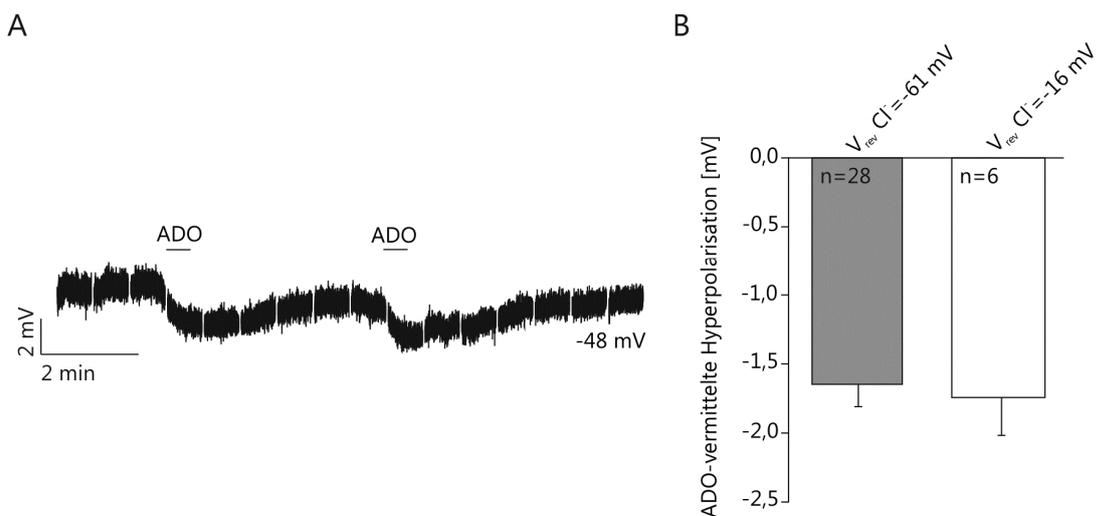


Abbildung 26 | Eine veränderte intrazelluläre Chloridkonzentration hat keinen Einfluss auf die Adenosin-vermittelte Hyperpolarisation. [A] Messspur einer Mitralzelle im *current clamp*-Modus mit einer Intrazellulärlösung mit erhöhtem Chloridgehalt (Chloridumkehrpotential; -16 mV). Zu sehen ist eine zweifache Adenosin-Applikation (100 μ M, 30 s). [B] Die Größe des Ausstroms bei Intrazellulärlösungen mit unterschiedlichem Chloridgehalt unterscheidet sich nicht signifikant.

Wie in Abbildung 26 zu sehen, verursachte Adenosin jedoch, trotz veränderter intrazellulärer Chloridkonzentration, eine vergleichbare Hyperpolarisation wie unter Kontrollbedingungen, d.h. bei einem Chloridumkehrpotential von -61 mV. Die Hyperpolarisation bei einem Chloridumkehrpotential von -16 mV betrug $1,7 \pm 0,3$ mV (n = 6), die Kontrollgruppe mit einem Chloridumkehrpotential von -61 mV wies eine mittlere Hyperpolarisation von $1,6 \pm 0,2$ mV (n = 28) auf. Dieser Unterschied war nicht signifikant (p = 0,6). Eine Änderung der intrazellulären

Chloridkonzentration hatte folglich keinen Einfluss auf die Adenosin-vermittelte Hyperpolarisation. Anhand dieses Ergebnisses kann somit davon ausgegangen werden, dass Chloridionen nicht an der Hyperpolarisation der Mitralzelle durch Adenosin beteiligt sind.

3.2.6 Testung verschiedener spezifischer Blocker von Kaliumkanälen

Die bisher vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass in Mitralzellen über den A_1 -Rezeptor ein Kaliumkanal moduliert wird. Welcher Kaliumkanal den hyperpolarisierenden Effekt von Adenosin vermittelt, wurde mit Hilfe verschiedener Kaliumkanalinhibitoren getestet. Zunächst wurde hierzu ca. zwei Minuten nach Beginn der Messung TTX appliziert, um die Zelle weitestgehend von ihrem neuronalen Netzwerk zu isolieren. Nach einer Inkubationszeit von TTX von mindestens vier Minuten wurde anschließend eine Kontrollapplikation von Adenosin (CT) durchgeführt. Diese Applikation von Adenosin induzierte im Mittel eine Hyperpolarisation von $1,6 \pm 0,2$ mV ($n = 28$). Anschließend wurde der jeweilige Kaliumkanalblocker eingewaschen und Adenosin ein zweites Mal appliziert. Um auszuschließen, dass sich Hyperpolarisationen zweier aufeinanderfolgender Applikationen von Adenosin grundsätzlich voneinander unterscheiden, wurden zunächst zweifache Adenosin-Applikation ohne Kaliumkanalblocker durchgeführt (Abbildung 27). Die Größen der ersten und zweiten Hyperpolarisation unterschieden sich hierbei nicht signifikant voneinander ($n = 6$, $p = 0,4$), wobei der Trend festzustellen war, dass die erste Hyperpolarisation mit einem Wert von $-1,1 \pm 0,16$ mV geringfügig größer ausfiel als die zweite mit $-0,9 \pm 0,16$ mV.

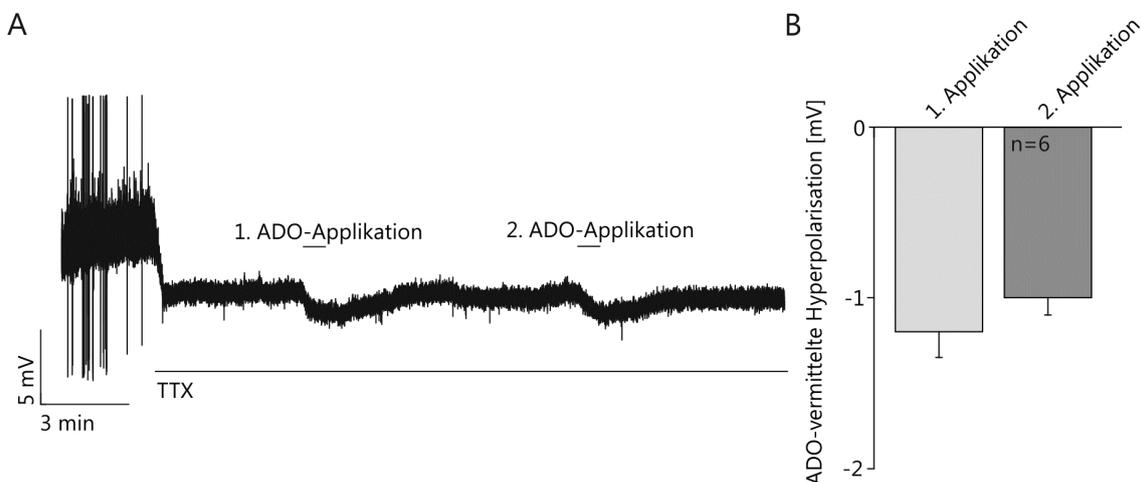


Abbildung 27 | Wiederholte Applikation von Adenosin. [A] Current clamp-Messspur einer Mitralzelle; zunächst führt TTX zu einer Unterdrückung von Aktionspotentialen, es folgen zwei aufeinander folgende Adenosin-Applikationen, welche die Zelle jeweils reversibel hyperpolarisieren. [B] Die durch die erste und zweite Adenosin-Applikation ausgelösten Hyperpolarisationen unterscheiden sich in ihrer Größe nicht signifikant voneinander.

3.2.6.1 Pharmakologische Charakterisierung der Adenosin-induzierten Kaliumleitfähigkeit

Die häufig verwendeten Kaliumkanalblocker TEA und 4-AP blockieren eine Vielzahl verschiedener Kaliumkanäle (vgl. Tabelle 8 im Anhang 5). Abbildung 28 A zeigt eine repräsentative Messspur, bei der nach einer ersten Applikation von Adenosin 4-AP eingewaschen wurde. Dieses führte zu einer Depolarisation der Zelle. Eine erneute Applikation von Adenosin hyperpolarisierte die Mitralzelle in einem vergleichbaren Maß wie die vorhergehende Kontrollapplikation (CT: $-1,6 \pm 0,2$ mV, 4-AP: $-1,3 \pm 0,2$ mV, $n = 7$, $p = 0,06$).

Auch ein Einwaschen von TEA depolarisierte die Mitralzelle leicht (Abbildung 28 B). Die Applikation von Adenosin in TEA rief eine zur Kontrollapplikation vergleichbar große Hyperpolarisation hervor. Der Unterschied war mit $1,4 \pm 0,17$ mV bei der Kontrollapplikation zu $-1,4 \pm 0,1$ mV bei der zweiten Applikation in TEA nicht signifikant ($n = 5$, $p = 0,9$).

Da es einige TEA-sensitive Kanäle gibt, die lediglich durch intrazelluläres TEA blockiert werden, wurden zusätzlich Experimente mit TEA in der Intrazellulärlösung durchgeführt. Hier war keine Kontrollapplikation von Adenosin möglich, da TEA unmittelbar mit Öffnung der Zellmembran in der *whole cell*-Konfiguration intrazellulär vorlag. Verglichen wurde daher für die anschließende Auswertung die erste Hyperpolarisation, die unter Verwendung von intrazellulärem TEA durchgeführt wurden, mit Hyperpolarisationen bei Kontrollexperimenten unter vergleichbaren Bedingungen, aber ohne Verwendung von TEA. Messungen mit intrazellulärem TEA wiesen insgesamt ein sehr ruhiges Membranpotential und klar definierte Hyperpolarisationen durch Adenosin auf (Abbildung 28 C). Sie unterschieden sich in ihrer Größe ($-1,5 \pm 0,3$ mV, $n = 6$) jedoch nicht signifikant von denen bei Kontrollen ohne TEA ($p = 0,8$).

ERGEBNISSE

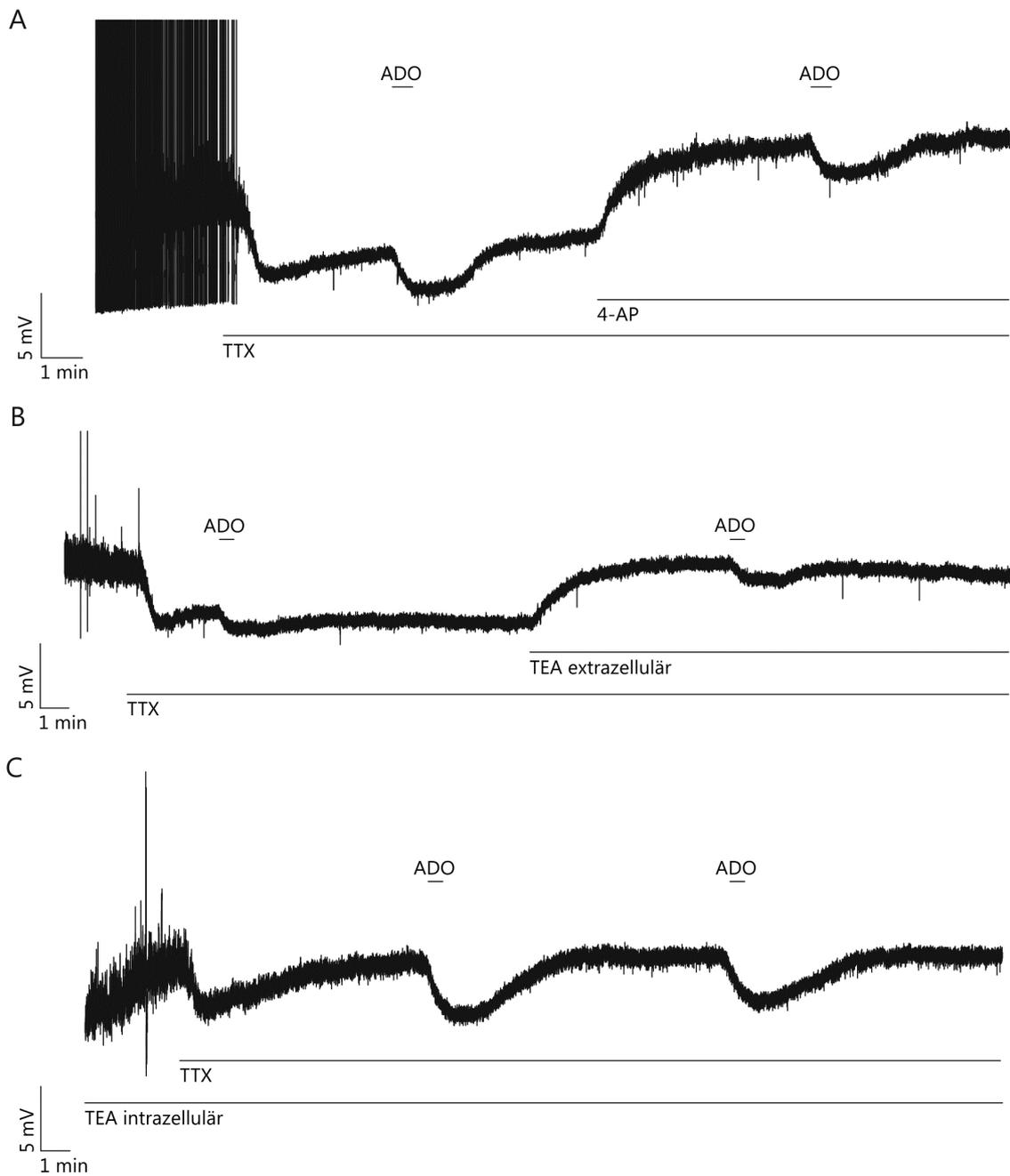


Abbildung 28 | Untersuchung von TEA- und 4-AP-sensitiven Kaliumkanälen. Current clamp-Messspuren von Mitralzellen ($1 \mu\text{M}$ TTX nach 2 min) mit jeweils zwei Adenosin-Applikationen ($100 \mu\text{M}$, 30 s). [A] Einfluss von 4-AP (10 mM). [B] Einfluss von TEA (extrazellulär, 10 mM). [C] TEA ist von Beginn an in der Intrazellulärlösung enthalten (20 mM), beide Adenosin-Applikationen finden unter Einfluss von TEA statt.

Neben Untersuchungen mit den ‚Breitband‘-Kaliumkanalblockern TEA und 4-AP wurden außerdem gezielt Kaliumkanäle getestet, von denen bekannt ist, dass sie in anderen Gehirnarealen vom A_1 -Rezeptor moduliert werden. Insbesondere G-Protein-gekoppelte, einwärts-rektifizierende Kaliumkanäle (GIRKs) sind häufig A_1 -Rezeptor moduliert (Luscher et al., 1997). Abbildung 29 A zeigt eine Messung, bei der Barium als GIRK-Blocker eingesetzt wurde. Das Einwaschen von extrazellulären Bariumionen depolarisierte die Zelle und führte zu einer erhöhten Grundaktivität bzw. starken Membranpotentialschwankungen, was darauf hindeutet, dass GIRKs konstitutiv aktiv sind und durch ihre Inhibition eine erhöhte neuronale Aktivität im Hirnschnitt auftritt. Jedoch verursachte Adenosin auch während der Inhibition von GIRKs eine deutliche Hyperpolarisation, die sich mit einer Größe von $-3,4 \pm 0,5$ mV nicht signifikant von der entsprechenden Kontrollapplikation mit einer Größe von $-2,9 \pm 0,5$ mV unterschied ($n = 6$, $p = 0,07$).

Ein weiterer Kaliumkanal, dessen Modulation unter den gegebenen Umständen zu einer Hyperpolarisation führen könnte und der zudem auf Mitralzellen vorkommt, ist der KCNQ/M-Kanal, der den sogenannten M-Strom vermittelt (Ghatpande und Gelperin, 2009). Abbildung 29 B zeigt eine Messspur, bei der M-Ströme mittels XE 991 blockiert wurden. Die Experimente mit XE 991 wurden ohne TTX durchgeführt. Im Mittel kam es unter XE 991 zu einer Hyperpolarisation von $3,6 \pm 0,8$ mV und bei der entsprechenden Kontrollapplikation vor Inkubation mit XE 991 zu einer Hyperpolarisation von $3,1 \pm 0,4$ mV. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($n = 6$, $p = 0,36$). Der M-Strom scheint daher nicht an der Hyperpolarisation beteiligt zu sein.

Auch E-4031-sensitive Erg-Kanäle werden funktionell auf Mitralzellen exprimiert und können bei ihrer Aktivierung die Erregbarkeit der Zellen reduzieren (Hirdes et al., 2009). Wie in Abbildung 29 C zu sehen, inhibierte E-4031 die Adenosin-vermittelte Hyperpolarisation nicht. Sie unterschied sich in Anwesenheit von E-4031 mit einer durchschnittlichen Größe von $-1,4 \pm 0,3$ mV nicht signifikant von der Hyperpolarisation der entsprechenden Kontrollapplikation ohne E-4031 mit $-1,7 \pm 0,4$ mV ($n = 6$, $p = 0,26$).

ERGEBNISSE

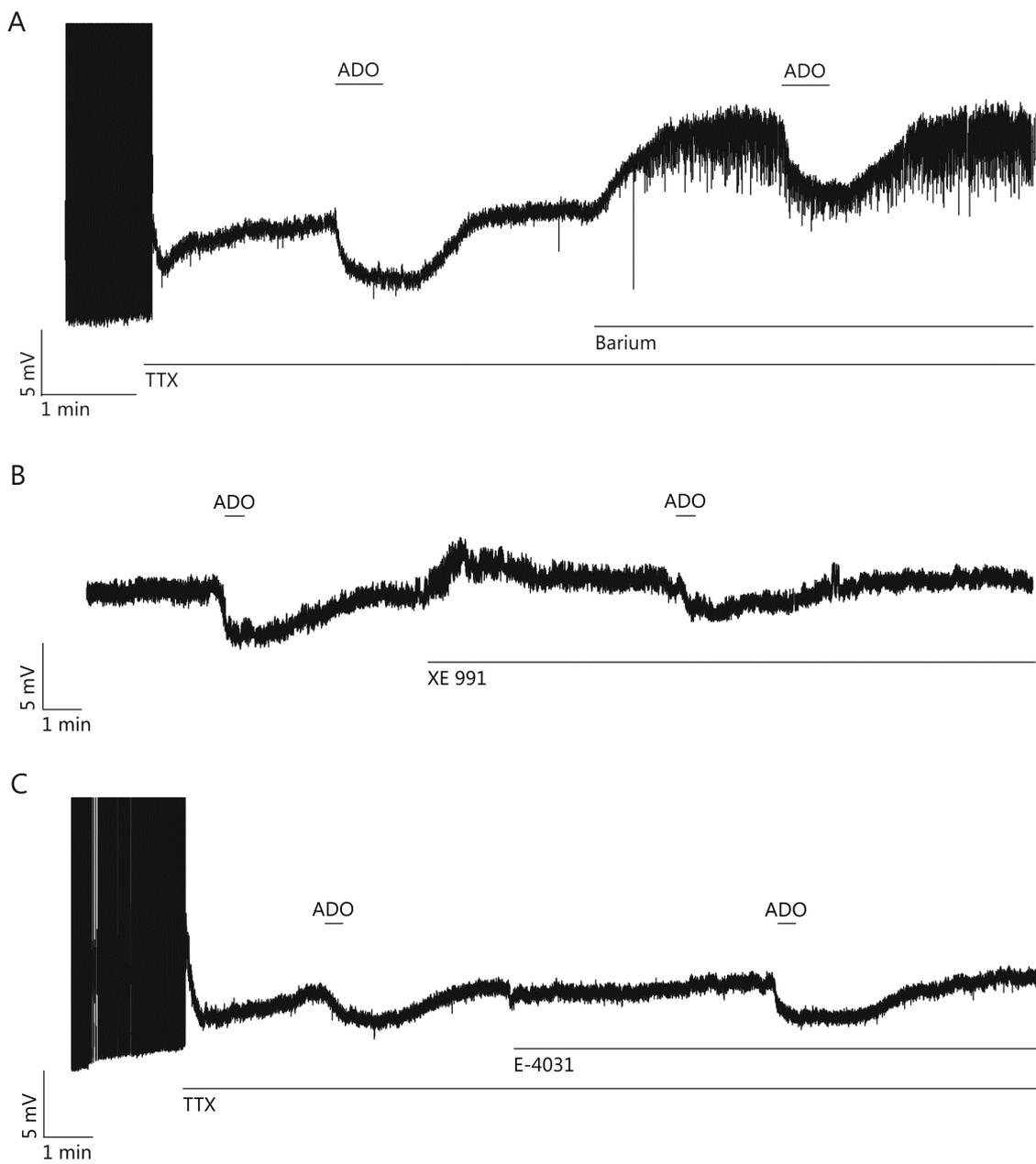


Abbildung 29 | Untersuchung von GIRK-Kanälen, KCNQ/M-Kanälen sowie Erg-Kanälen. Current clamp-Messspuren von Mitralzellen mit jeweils zwei Adenosin-Applikationen (100 μ M, 30 s). [A] Einfluss von Barium (1 mM). [B] Einfluss von XE 991 (20 μ M) [C] Einfluss von E-4031 (10 μ M).

Das Balkendiagramm in Abbildung 30 fasst die Ergebnisse mit den verwendeten Kaliumkanalblockern zusammen. Es ist jeweils die prozentuale Größe der Adenosin-induzierten Hyperpolarisation in Anwesenheit des jeweiligen Blockers bezogen auf die entsprechende Kontrollapplikation ohne Blocker (entsprechend 100 %) dargestellt. Keiner der verwendeten Kaliumkanalblocker führte zu einer signifikanten Reduktion der durch Adenosin ausgelösten Hyperpolarisation. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass keiner der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kaliumkanäle an der Adenosin-vermittelten Hyperpolarisation maßgeblich beteiligt ist.

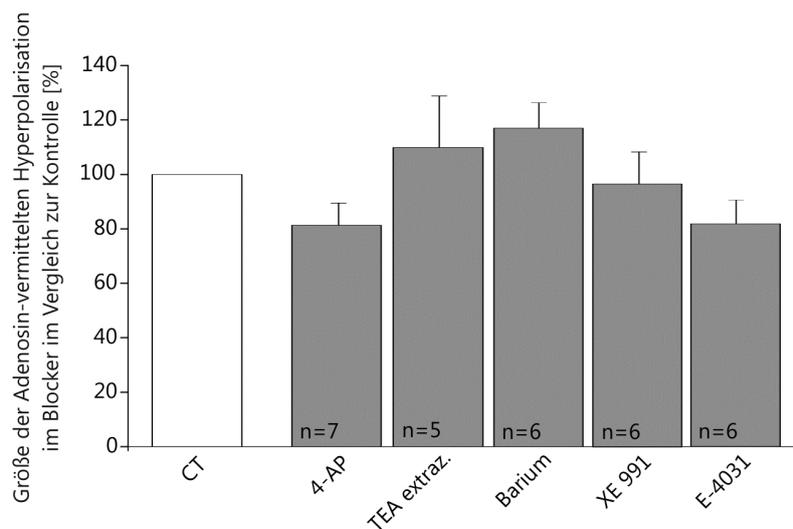


Abbildung 30 | Statistische Auswertung der pharmakologischen Untersuchung von Kaliumkanälen. Dargestellt ist die Größe der Hyperpolarisation im jeweiligen Blocker gegenüber der vorhergehenden Kontrollapplikation (CT) in Prozent. Keiner der verwendeten Kaliumkanalblocker reduzierte die Adenosin-vermittelte Hyperpolarisation signifikant.

In Tabelle 7 sind die bei Mäusen vorkommenden Großfamilien von Kaliumkanälen dahingehend gruppiert, inwieweit sie anhand der durchgeführten Experimente bereits als Interaktionspartner des A₁-Rezeptors in Mitralzellen ausgeschlossen werden können. Eine erweiterte Tabelle, welche diese Auswertung und die einzelnen Kanäle im Detail aufschlüsselt, findet sich im Anhang in Tabelle 8.

Tabelle 7 | Kaliumkanal-Familien und deren mögliche Beteiligung an der Adenosin-induzierten Hyperpolarisation

Kaliumkanal-Familie	nicht A ₁ R-moduliert	Evtl. A ₁ R-moduliert
2-P-Kaliumkanäle	-	K2p1.1-18.1
einwärts rektifizierende Kaliumkanäle	Kir1.1-7.1	-
Spannungsabhängige Kaliumkanäle	Kv1.1-Kv12.3	-
Calcium-aktivierte Kaliumkanäle	Kca 1, 4.1, 4.2, 5.1	Kca2.1-3.1

3.2.7 Adenosin moduliert das neuronale Netzwerk des *Bulbus olfactorius*

Die Abschnitte 3.2.1 bis 3.2.6 zeigen, dass Adenosin über A_1 -Rezeptoren modulatorisch auf Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus wirkt. Es stellt sich daher die Frage, inwieweit sich die Modulation der Mitralzellaktivität auf das gesamte neuronale Netzwerk des *Bulbus olfactorius* auswirkt und ob außerdem weitere Zelltypen des *Bulbus olfactorius* durch Adenosin moduliert werden.

3.2.7.1 Adenosin verringert die Anzahl synaptischer Eingänge in Mitralzellen

Mitralzellen, die Projektionsneurone des olfaktorischen Bulbus, erhalten von den meisten Neuronentypen in diesem Gehirnareal synaptische Eingänge (Shepherd, 1972). Insgesamt spiegeln die synaptischen Eingänge in Mitralzellen somit direkt oder indirekt die neuronale Aktivität im olfaktorischen Bulbus wider und Mitralzellen können daher als Monitor für die Netzwerkaktivität genutzt werden. Die Verwendung einer Cäsium-basierten ‚Hochchlorid‘-Intrazellulärlösung (vgl. CsCl-basierte Intrazellulärlösung, Tabelle 3) ermöglichte hierbei eine gute elektrische Kontrolle der stark verzweigten Mitralzelle durch eine Verminderung von Kaliumleitfähigkeiten mittels Cäsiumionen. Dadurch verbesserte die CsCl-basierte Intrazellulärlösung die Messung von kleineren bzw. weiter vom Soma entfernten eintreffenden synaptischen Eingängen. Das Chloridumkehrpotential bei Verwendung der CsCl-basierten Intrazellulärlösung und ACSF lag bei etwa 0 mV und ermöglichte dadurch eine Messung von Chloridströmen, die sich dann als Einwärtsströme darstellten. In Abbildung 31 ist der Effekt von Adenosin auf die Anzahl der synaptischen Eingänge in Mitralzellen dargestellt. Adenosin reduzierte die Anzahl synaptischer Eingänge in die Mitralzelle deutlich. Im zeitlichen Verlauf ist die Zahl der synaptischen Eingänge, dargestellt als Anzahl synaptischer Ereignisse pro 30 s und normiert in Prozent bezogen auf den Wert zu Beginn der Messung (518 ± 110 Eingänge/30 s entspricht 100 %) dargestellt. Die Abnahme der Anzahl an synaptischen Eingängen durch Adenosin war signifikant ($n = 8$, $p = 0,002$) und betrug im Mittel 65 ± 9 % von der Kontrolle. Die Abnahme der synaptischen Eingänge unter Adenosin war reversibel und das Auswaschen von Adenosin führte zu einer signifikanten Zunahme an synaptischen Eingängen auf 86 ± 8 % ($n = 8$, $p = 0,03$). Die Abnahme der synaptischen Eingänge in Mitralzellen durch Adenosin deutet auf eine Adenosin-vermittelte Reduktion der Netzwerkaktivität im olfaktorischen Bulbus hin.

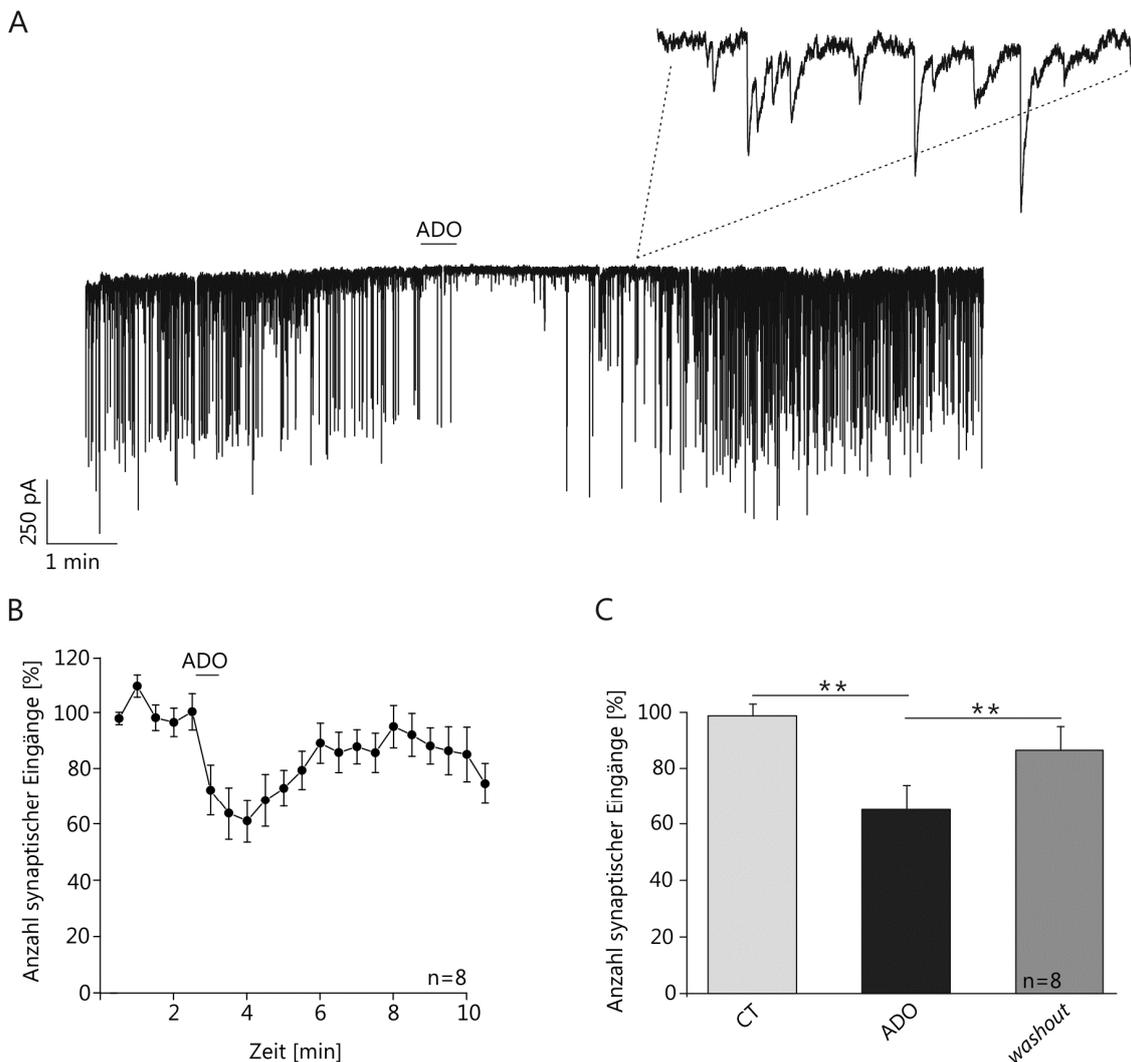


Abbildung 31 | Adenosin verringert die Anzahl synaptischer Eingänge in Mitralzellen. [A] Voltage clamp-Ableitung einer Mitralzelle mit CsCl-basierter Intrazellulärlösung. Die Anzahl synaptischer Eingänge nimmt unter Adenosin (100 μ M, 30 s) ab. [B] Prozentuale Änderung der mittleren Anzahl an synaptischen Eingänge im Verlauf der Messung. [C] Adenosin reduziert die Anzahl synaptischer Eingänge signifikant.

3.2.7.2 Charakterisierung der synaptischen Eingänge in Mitralzellen des *Bulbus olfactorius*

Um herauszufinden, ob die in Mitralzellen eingehenden synaptischen Eingänge vorwiegend GABAerg (sIPSC) oder glutamaterg (sEPSC) sind, wurden die GABAergen bzw. glutamatergen Eingänge pharmakologisch isoliert. Abbildung 32 zeigt beispielhaft Originalmessspuren von Mitralzellen gemessen in *voltage clamp*-Bedingungen mit CsCl-basierter Intrazellulärlösung. In Abbildung 32 A ist die Wirkung einer Inhibition von GABA_A-Rezeptoren mittels Gabazine zu sehen. Durch die Reduktion ihres inhibitorischen Einflusses wurde die Entstehung von *population bursts* begünstigt (siehe Detail in Abbildung 32 A). Abgesehen von den *population bursts* war allerdings kaum spontane glutamaterge Aktivität in Mitralzellen messbar, was darauf

schließen lässt, dass die große Anzahl schneller synaptischer Ströme unter Kontrollbedingungen ohne Gabazine fast ausschließlich GABAerger Natur ist.

Ein Blockieren von AMPA- und NMDA-Rezeptoren mit Hilfe von NBQX und D-AP V gibt einen Aufschluss über die Bedeutung glutamaterger Aktivität im olfaktorischen Bulbus (Abbildung 32). Wie im Detail in Abbildung 32 B zu sehen, führte die Inhibition ionotroper Glutamatrezeptoren nicht nur zur Reduktion der glutamatergen Aktivität, wie z. B. Populationbursts, sondern auch zu einer deutlichen Reduktion der in Mitralzellen gemessenen GABAergen synaptischen Aktivität, wobei lediglich einzelne spontane IPSCs übrig blieben. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass spontane NMDA- und AMPA-vermittelte glutamaterge Aktivität vorhanden sein muss, um GABAerge Aktivität im *Bulbus olfactorius* aufrecht zu erhalten. Es kann somit vermutet werden, dass ein Großteil der GABAergen synaptischen Aktivität rekurrent ist. Außerdem verhindert der inhibitorische Einfluss von GABA_A-Rezeptoren die Entstehung der von *external tufted*-Zellen ausgelösten *population bursts*.

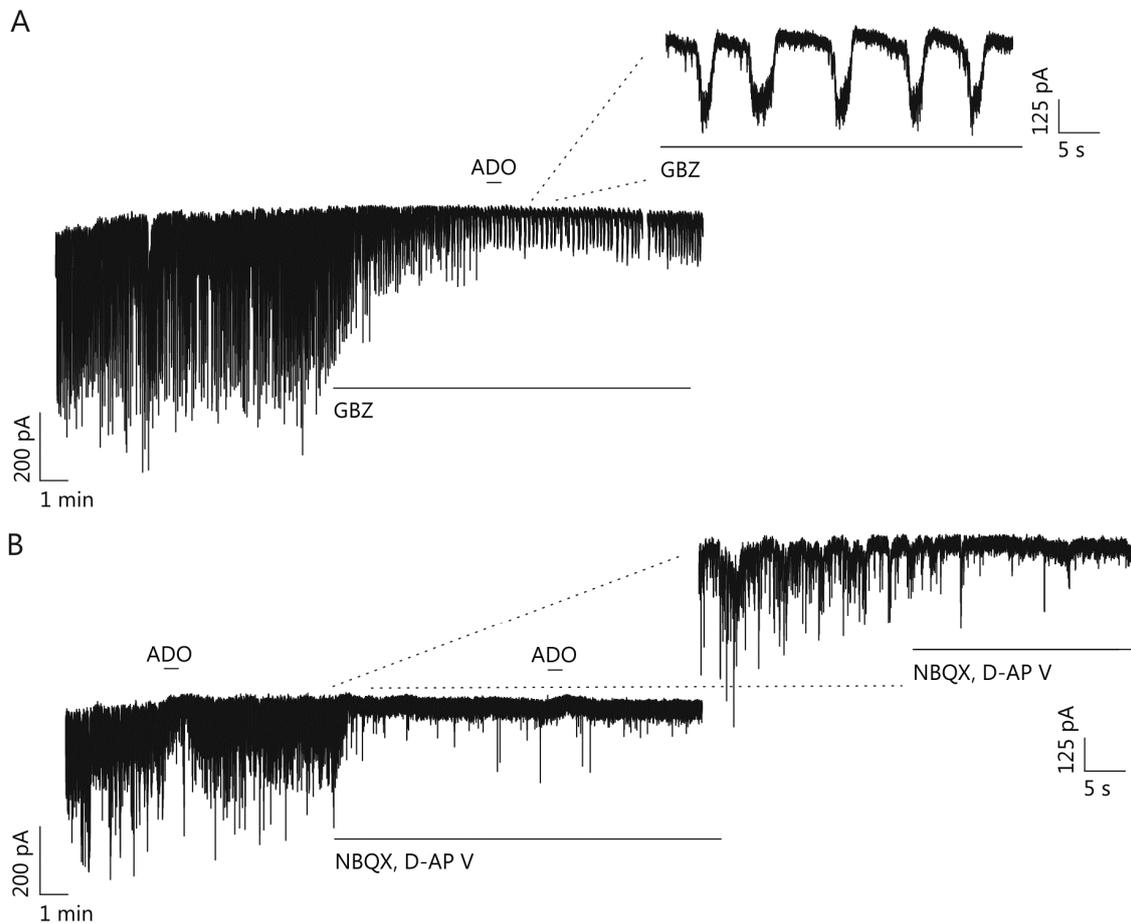


Abbildung 32 | GABAerge und glutamaterge synaptische Eingänge in Mitralzellen. Voltage clamp-Messspuren von Mitralzellen mit CsCl-basierter Intrazellulärlösung. [A] Die Anzahl synaptischer Eingänge nimmt durch GBZ (10 µM) ab, es kommt zur Entstehung von *population bursts*. [B] Die Anzahl synaptischer Eingänge nimmt durch Einfluss von NBQX (10 µM) und D-AP V (50 µM) ab.

3.2.7.3 Einfluss des Vorhandenseins eines intakten *tufts* auf die Anzahl synaptischer Eingänge in Mitralzellen

Durch das Schneiden des Gewebes bei der Präparation wurde bei einem Teil der Mitralzellen der apikale *tuft* abgeschnitten. Am Ende jedes elektrophysiologischen Experiments wurde mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffs in der Intrazellulärlösung kontrolliert, ob ein *tuft* bei der gemessenen Mitralzelle vorhanden war oder nicht. Um zu überprüfen, ob das Fehlen des *tufts* einen Einfluss auf die Anzahl synaptischer Eingänge in Mitralzellen hat, wurde die absolute Anzahl an synaptischen Eingängen von Zellen mit und ohne *tuft* miteinander verglichen. Bei Zellen mit *tuft* traten durchschnittlich 518 ± 71 synaptische Eingänge pro 30 Sekunden auf ($n = 22$). Bei Zellen ohne *tuft* waren im Mittel 869 ± 105 synaptische Eingänge pro 30 Sekunden zu messen ($n = 5$). Die Anzahl synaptischer Eingänge in Mitralzellen ohne *tuft* war damit signifikant größer als mit *tuft* ($p = 0,04$) (Abbildung 33).

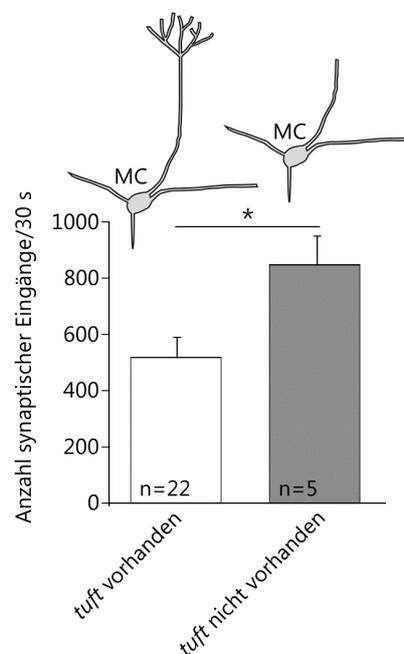


Abbildung 33 | Einfluss eines intakten *tufts* auf die Anzahl synaptischer Eingänge in Mitralzellen. Die Anzahl synaptischer Eingänge in Mitralzellen ist mit *tuft* (weiß) signifikant höher als ohne *tuft* (grau).

Um zu untersuchen, ob das Abschneiden des *tufts* während der Präparation einen Einfluss auf die Qualität der Messungen hatte, wurde der Anteil erfolgreich beendeter und auswertbarer Messungen an der Zahl der begonnenen Messungen errechnet. Die Werte wurden zwischen Zellen mit und ohne *tuft* verglichen. Insgesamt wurden 65 Zellen gemessen, von denen 38 Zellen (56 %) einen *tuft* aufwiesen und 27 Zellen nicht. Zellen, die so wenige synaptische Eingänge aufwiesen, dass ihre Frequenz nicht adäquat ermittelt werden konnte, sowie Zellen, bei denen die Anzahl der Eingänge im Lauf der Messung stark abnahm, wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Von den 38 Zellen mit *tuft* konnten 22 in die Auswertung mit einbezogen werden (58 %), von den 27 Zellen

ohne *tuft* lediglich 5 (19 %). Dieses Ergebnis zeigt, dass Messungen an Zellen ohne *tuft* aus unbekanntem Gründen überdurchschnittlich oft elektrophysiologische Qualitätskriterien für die Auswertung nicht erfüllten. Zudem scheint das Fehlen eines *tufts* in Mitralzellen zu einer Erhöhung der absoluten Anzahl an synaptischen Eingängen zu führen.

3.2.7.4 Die Frequenz und das Integral von *population bursts* werden nicht durch Adenosin moduliert

Population bursts spiegeln sich als rhythmisch wiederkehrende, langanhaltende exzitatorische Einstürme in Mitralzellen wider und können durch ein Blockieren von GABA_A-Rezeptoren mittels Gabazine in ihrer Entstehung begünstigt werden. Da *external tufted*-Zellen für die Entstehung von *population bursts* verantwortlich sind (De Saint Jan et al., 2009), kann durch die Untersuchung von *population bursts* im Zusammenhang mit Adenosin ein möglicher modulatorischer Einfluss von Adenosin auf *external tufted*-Zellen untersucht werden. Das Integral der *population bursts* wurde durch Adenosin nicht signifikant verändert ($n = 6$, $p = 0,74$); Unter Einfluss von Adenosin stieg das Integral auf 111 ± 18 % von der Kontrolle (CT). Nach Auswaschen von Adenosin kam es tendenziell zu einer Zunahme des Integrals der *population bursts* auf 123 ± 20 %, die jedoch nicht signifikant unterschiedlich zum Kontrollwert war ($p = 0,66$) (Abbildung 34 A). Der Abstand der *population bursts* zueinander wurde ebenfalls nicht durch Adenosin verändert ($n = 6$, $p = 0,98$) und stieg unter Einfluss von Adenosin auf 113 ± 12 % vom Kontrollwert. Nach Auswaschen von Adenosin nahm der Abstand zwischen den *population bursts* weiterhin zu (175 ± 33 %, $p = 0,11$) (Abbildung 34 B). Anhand der Untersuchung des Einflusses von Adenosin auf *population bursts* konnte demnach kein modulatorischer Effekt von Adenosin auf *external tufted*-Zellen festgestellt werden.

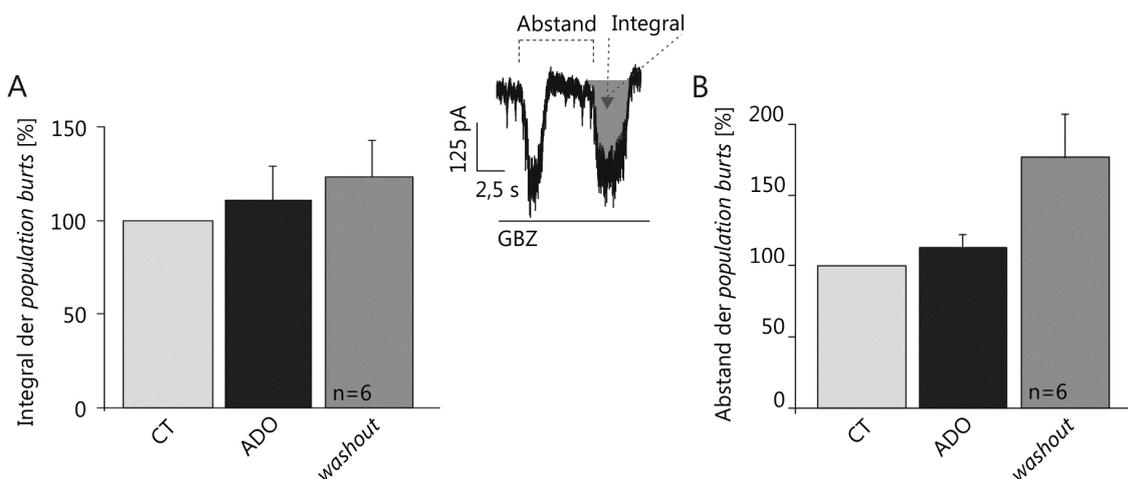


Abbildung 34 | *Population bursts* werden nicht durch Adenosin moduliert. [A] Das Integral von *population bursts* ändert sich unter Einfluss von Adenosin nicht signifikant. [B] Der Abstand von *population bursts* zueinander wird durch Adenosin nicht signifikant verändert.

3.2.7.5 Adenosin reduziert die Anzahl synaptischer Eingänge in Körnerzellen

Körnerzellen sind der häufigste Zelltyp im olfaktorischen. Synaptische Eingänge in Körnerzellen sind zu einem großen Teil glutamaterg und stammen von Mitralzellen (Shepherd, 1972). Um zu untersuchen, ob sich die durch die Hyperpolarisation verringerte Aktivität von Mitralzellen in der Anzahl synaptischer Eingänge in Körnerzellen widerspiegelt, wurden Körnerzellen im *voltage clamp*-Modus mit CsCl-basierter Intrazellulärlösung abgeleitet und die Anzahl synaptischer Eingänge analysiert. Wie in einer beispielhaften Messspur einer Körnerzelle und der statistischen Auswertung in Abbildung 35 zu sehen, reduzierte Adenosin die Anzahl synaptischer Eingänge in Körnerzellen signifikant auf 13 ± 5 % vom Kontrollwert (CT = 49 ± 11 Eingänge/30 s) zu Beginn der Messung ($n = 5$, $p = 0,007$). Nach Auswaschen von Adenosin erhöhte sich die Anzahl der synaptischen Eingänge wieder signifikant auf 44 ± 10 % vom Ausgangswert ($p = 0,03$). Die Abnahme der Erregbarkeit von Mitralzellen scheint sich somit in einer deutlichen Reduktion der Anzahl synaptischer Eingänge in Körnerzellen widerzuspiegeln.

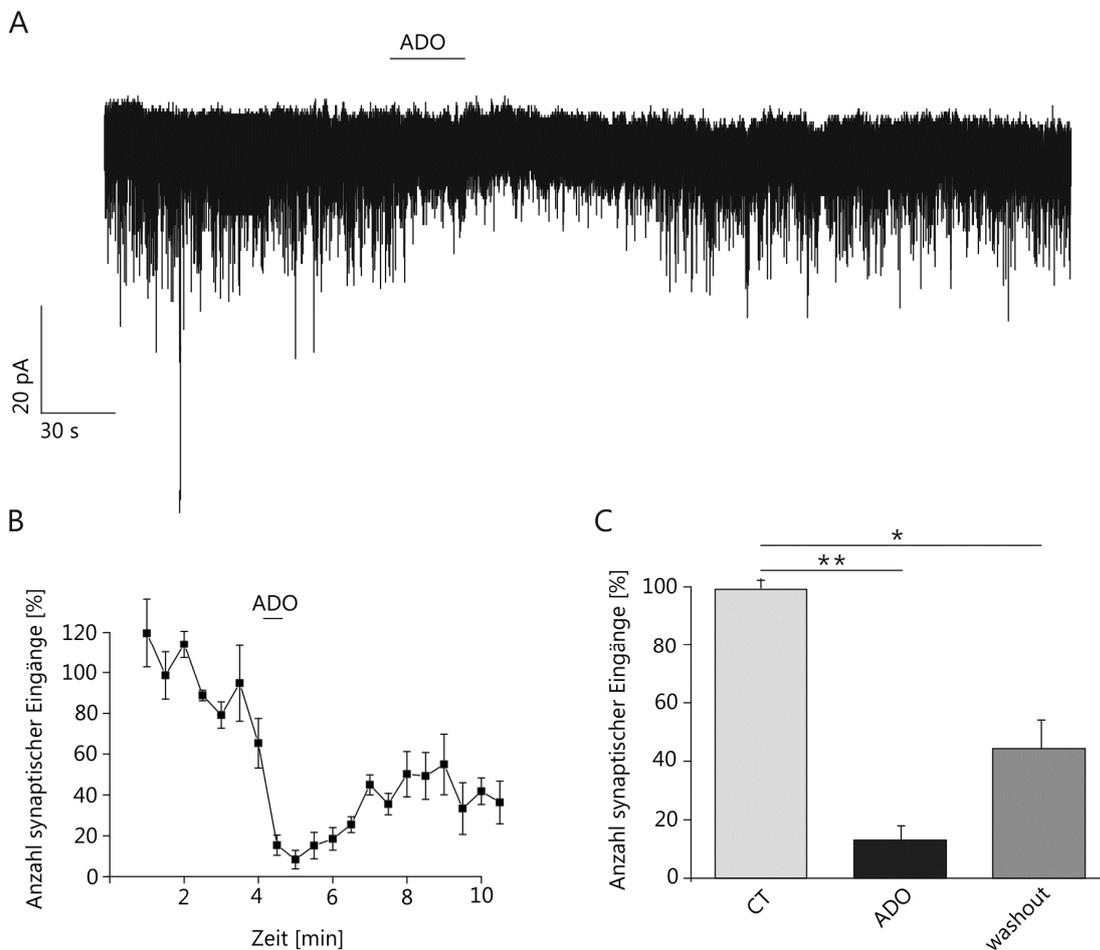


Abbildung 35 | Wirkung von Adenosin auf die Anzahl synaptischer Eingänge in Körnerzellen. [A] *Voltage clamp*-Ableitung einer Körnerzelle mit CsCl-basierter Intrazellulärlösung. Die Anzahl synaptischer Eingänge nimmt in Anwesenheit von Adenosin ($100 \mu\text{M}$, 30 s) ab. [B] Prozentuale Änderung der Anzahl synaptischer Eingänge im Verlauf der Messung [C] Adenosin reduziert die Anzahl synaptischer Eingänge in Körnerzellen signifikant.

3.2.8 Adenosin reduziert die rekurrente Inhibition von Mitralzellen

Im Netzwerk des olfaktorischen Bulbus spielt die rekurrente Inhibition über dendrodendritische, inhibitorische Synapsen (DDI) eine große Rolle bei der lokalen Informationsverarbeitung. In Dendriten von Mitralzellen zurücklaufende Aktionspotentiale depolarisieren die Zelle und führen zu einer Öffnung spannungsgesteuerter Calciumkanäle in den Dendriten, woraufhin es zu einer Glutamatfreisetzung aus Mitralzellen und zu einer rekurrenten GABA-Freisetzung aus Interneuronen kommt. Dieser Prozess bildet einen voneinander abhängigen Kreislauf neuronaler Erregung und Hemmung (Abbildung 36 A). Durch eine Depolarisation des exzitatorischen Neurons kann dieser Kreislauf künstlich evoziert werden (Isaacson und Strowbridge, 1998).

3.2.8.1 Adenosin reduziert die rekurrente Inhibition von Mitralzellen

Um rekurrente Inhibition zu evozieren, wurde eine Mitralzelle in *voltage clamp* zunächst bei -70 mV gehalten und dann für 250 ms auf 0 mV depolarisiert (Abbildung 36). Dieses Protokoll wurde alle 30 s wiederholt und vor (CT) und in Adenosin sowie beim *washout* von Adenosin ausgewertet. Das Integral (graue Fläche in Abbildung 36 B) über der Stromspur unmittelbar nach der Depolarisation spiegelt die Summe rekurrenter synaptischer Eingänge wider und beschreibt die Stärke der rekurrenten Inhibition auf die Mitralzelle. Eine Applikation von Adenosin reduzierte das Integral der rekurrenten Inhibition signifikant von 233 ± 69 nA*ms auf 108 ± 30 nA*ms, ($n = 8$, $p = 0,04$). Abbildung 36 C zeigt das normierte Integral der rekurrenten Inhibition bei Kontrollexperimenten ohne Adenosin-Applikation (CT, grau) und bei Experimenten in denen Adenosin appliziert wurde (ADO, schwarz). Im Mittel verringerte Adenosin die rekurrente Inhibition signifikant auf 54 ± 7 % der Kontrolle ($n = 8$; $p = 0,005$). Der Effekt von Adenosin auf die rekurrente Inhibition war nur geringfügig reversibel; der Wert erreichte nach Auswaschen von Adenosin (60 ± 5 %) von den Ausgangswerten (CT) ($n = 8$), war allerdings nicht signifikant unterschiedlich zu zeitgleichen Werten (t 900) in Experimenten ohne Adenosin-Applikation (CT *rundown*) mit (94 ± 36 %) ($n = 4$) (Abbildung 36 D).

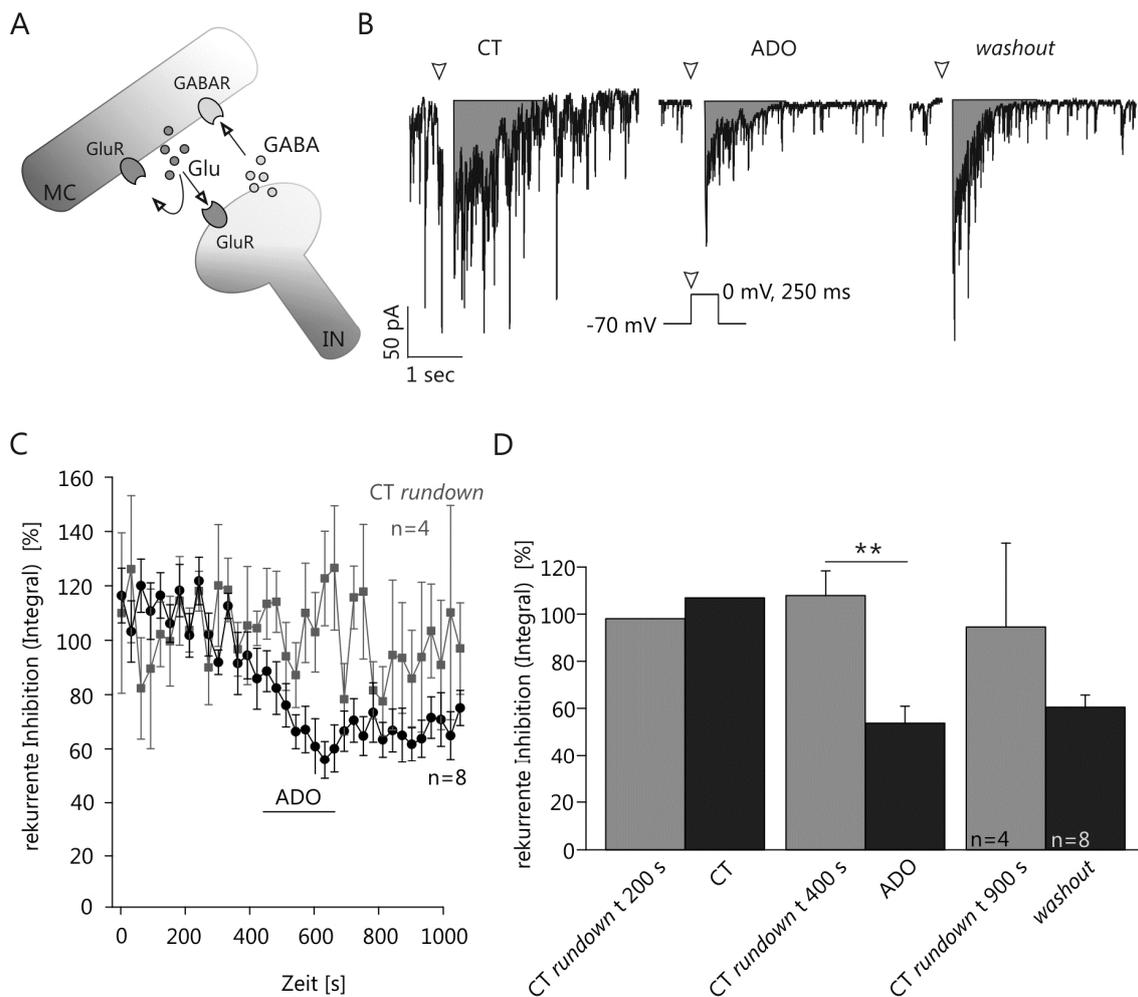


Abbildung 36 | Adenosin reduziert die Stärke der DDI in physiologischer Extrazellulärlösung. [A] Darstellung des Mechanismus der rekurrenten Inhibition; durch einen Spannungssprung wird die Mitralzelle depolarisiert und schüttet Glutamat aus. Inhibitorische Interneurone reagieren darauf mit einer Ausschüttung von GABA. [B] Ausschnitte von Messspuren vor Adenosin, unter Einfluss von Adenosin und nach dem *washout* von Adenosin. Ein Spannungssprung auf 0 mV für 250 ms (Pfeil) löste die rekurrente Inhibition aus. Die Fläche unter der Basislinie repräsentiert die Stärke der rekurrenten Inhibition (Depolarisation-bedingter Einstrom der Übersichtlichkeit halber entfernt) [C] Größe des Integrals der rekurrenten Inhibition im Verlauf der Messung. Beobachtung der Größe des Integrals ohne Adenosin-Applikation (*CT rundown*, grau) und unter Einfluss von Adenosin (100 μ M, 3 min). [D] Vergleich der Größe des Integrals der rekurrenten Inhibition zwischen Kontrollwerten (*CT rundown*) und unter dem Einfluss von Adenosin zu den Zeitpunkten t 200, 400 und 900. MC = Mitralzelle, IN = Interneuron, GluR = Glutamatrezeptor, GABAR = GABA-Rezeptor

Um den Einfluss von Adenosin auf die rekurrente Inhibition in Mitralzellen genauer zu untersuchen, wurden im Zusammenarbeit mit Kristina Schulz im Rahmen ihrer Masterarbeit das verwendete Messprotokoll optimiert und weiterführende Untersuchungen gemacht. Die Ergebnisse in den Abbildung 37 und in Abbildung 38 wurden von Kristina Schulz erzielt.

Die Länge der Depolarisation zur Auslösung der rekurrenten Inhibition wurde auf 50 ms reduziert. Zusätzlich führte der Einsatz von Mg^{2+} -freier ACSF und Cyclothiazid (CTZ) im Vergleich zu den

Bedingungen in normaler ACSF zu einem vergrößerten Integral, anhand dessen der Effekt von Adenosin auf die rekurrente Inhibition besser charakterisiert werden konnte. Außerdem wurden durch die Verwendung von TTX indirekte Effekte minimiert. Wie in Abbildung 37 zu sehen, führte Adenosin auch unter den modifizierten Bedingungen zu einer Reduktion der rekurrenten Inhibition von Mitralzellen. Abbildung 37 A zeigt Messspuren vor (CT, schwarz) und in Adenosin (ADO, schwarz, fett) sowie nach dem *washout* (grau) übereinander gelegt. Im Mittel kam es durch Adenosin zu einer signifikanten Abnahme der Größe des Integrals von 1197 ± 274 nA*ms auf 868 ± 161 nA*ms ($n = 9$, $p = 0,03$), was einer prozentualen Änderung von 76 ± 4 % entspricht. Nach Auswaschen von Adenosin vergrößerte sich das Integral wieder signifikant auf 90 ± 6 % (983 ± 172 nA*ms, $n = 9$), der Effekt von Adenosin auf die rekurrente Inhibition war jedoch, wie in Abbildung 37 zu sehen, reversibel und die Größe des Integrals unter Adenosin signifikant unterschiedlich zum *washout* ($p = 0,002$).

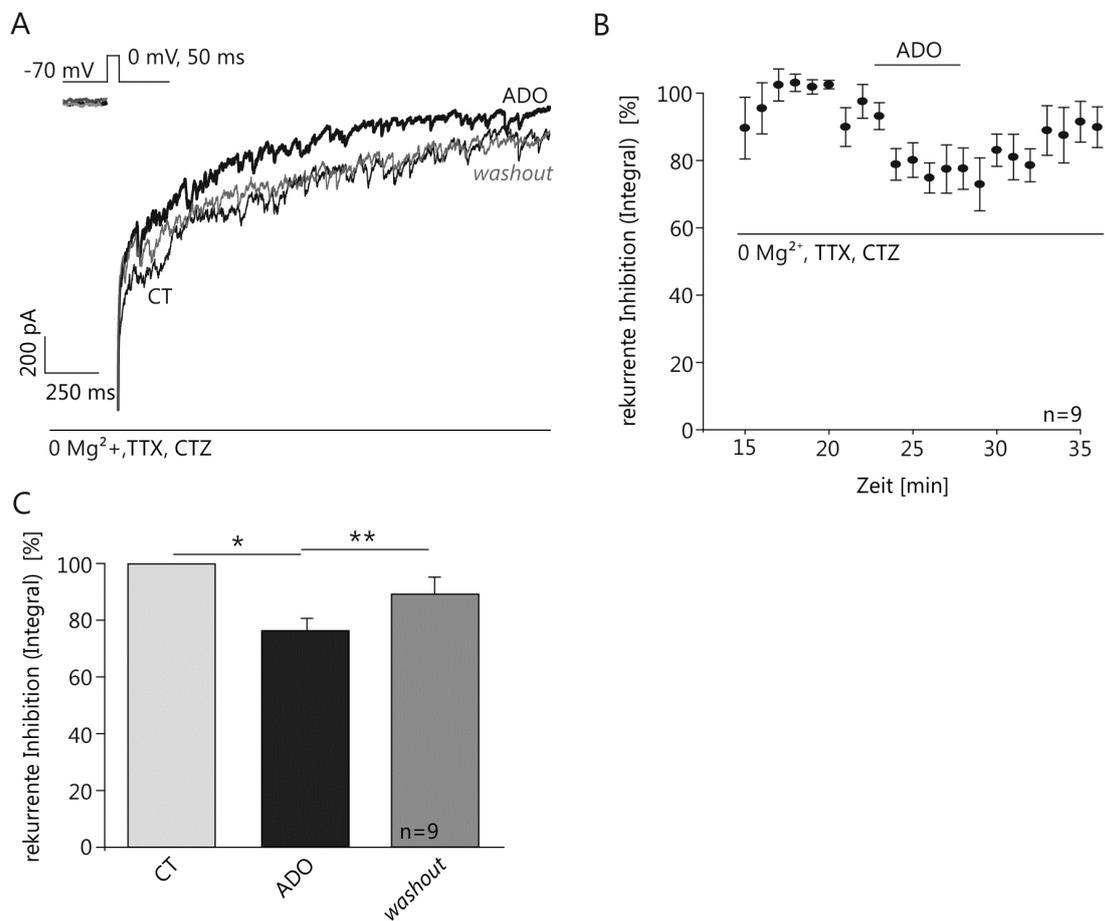


Abbildung 37 | Unter modifizierten Messbedingungen kann die Wirkung von Adenosin auf die DDI unter Ausschluss von indirekten Effekten untersucht werden. Die Messungen wurden in ACSF mit 0 Mg²⁺, TTX (1 μM) und Cyclothiazid (200 μM) durchgeführt, die Zelle wurde für 50 ms auf 0 mV Depolarisiert. [A] Messspuren (Depolarisation-bedingter Einstrom der Übersichtlichkeit halber entfernt) der von rekurrenter Inhibition bedingten Stromantwort einer Mitralzelle vor (CT, schwarz) und in Adenosin (100 μM, schwarz, fett) sowie nach dem *washout* von Adenosin (grau) übereinander gelegt. [B] Größe des Integrals welches die rekurrente Inhibition repräsentiert im Verlauf des Experiments bezogen auf den Anfangswert in Prozent. [C] Adenosin reduziert die Größe des Integrals signifikant.

3.2.8.2 Adenosin reduziert die Glutamatausschüttung von Mitralzellen

Die vorherigen Abschnitte dieser Arbeit zeigen, dass Adenosin die Erregbarkeit von Mitralzellen reduziert und die rekurrente Inhibition auf Mitralzellen verringert. Um zu überprüfen, ob Adenosin die Glutamatausschüttung der Mitralzelle reduziert und möglicherweise dadurch zu einer verringerten rekurrenten Inhibition führt, wurde als Maß für die Glutamatausschüttung der Mitralzelle die Autoexzitation der Mitralzelle untersucht. Autoexzitation findet statt, wenn es zu einer starken Glutamatausschüttung kommt und Glutamat, durch einen sogenannten *spillover*, an Mitralzell-eigene Glutamatrezeptoren bindet. Durch den Einsatz von Gabazine in der Extrazellulärlösung wird bei der Depolarisation der Mitralzelle die rekurrente Inhibition unterdrückt und dadurch die Autoexzitation isoliert (Abbildung 38).

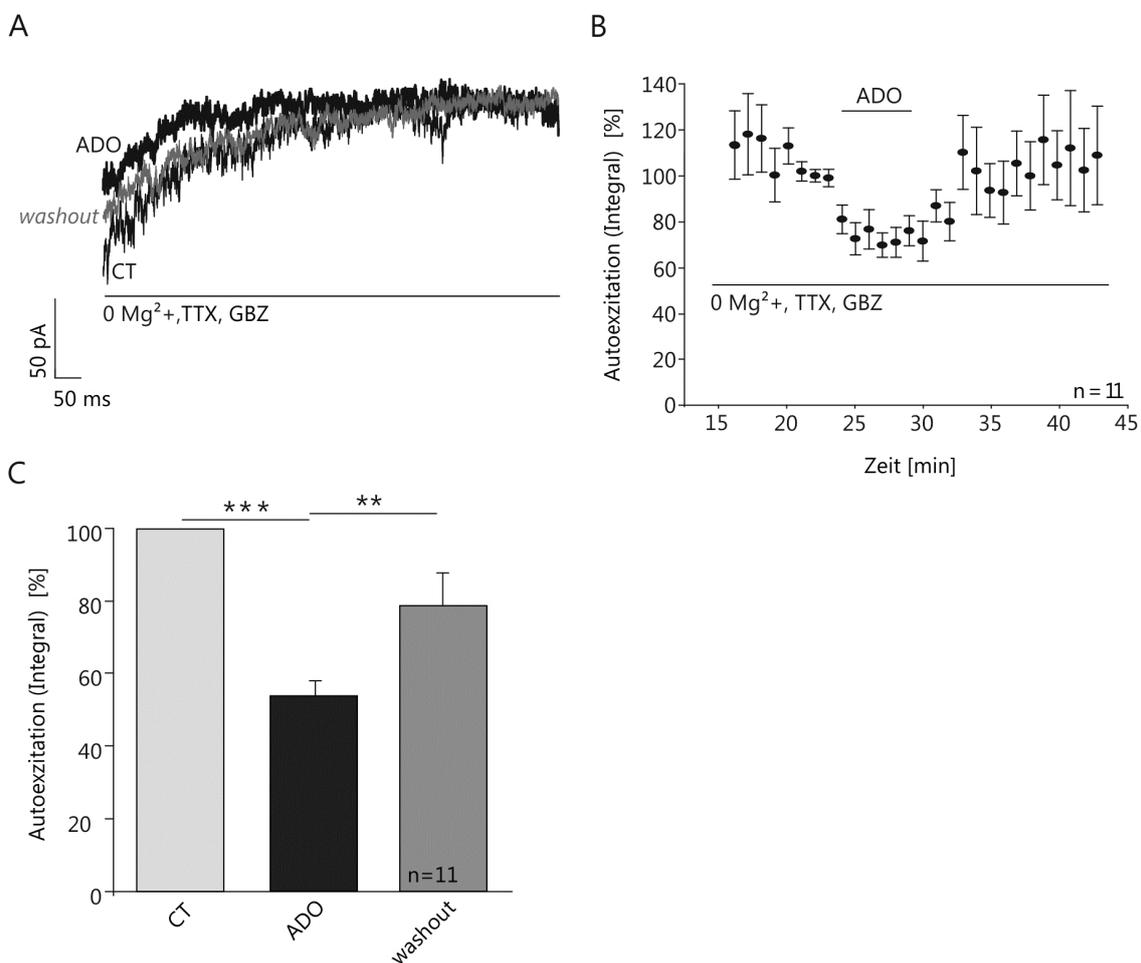


Abbildung 38 | Adenosin reduziert die Autoexzitation von Mitralzellen. Die Messungen wurden in ACSF mit 0 Mg²⁺, TTX (1 μM) und GBZ (10 μM) durchgeführt, der Spannungssprung zur Auslösung der Autoexzitation dauerte 15 ms. [A] Messspur der Autoexzitation einer Mitralzelle vor (CT, schwarz) und unter Einfluss von Adenosin (100 μM, schwarz, fett) sowie nach dem Auswaschen von Adenosin (*washout*, grau) (Depolarisation-bedingter Einstrom der Übersichtlichkeit halber entfernt). [B] Zeitlicher Verlauf der Größe der Autoexzitation in Prozent vom Anfangswert. [C] ADO reduziert die Stärke der Autoexzitation signifikant.

Das verbleibende Integral steht dann repräsentativ für die Stärke der Autoexzitation und somit für die Glutamatausschüttung der Mitralzelle. Wie aus den beispielhaften Messspuren vor und in Adenosin sowie nach dem *washout* von Adenosin in Abbildung 38 A ersichtlich, war die Stärke der Autoexzitation in Gegenwart von Adenosin verringert. Die Autoexzitation verringerte sich durch Adenosin auf $64 \pm 5 \%$ und war mit einer Abnahme des Integrals von $19,5 \pm 3,2 \text{ nA*ms}$ auf $12,8 \pm 2,8 \text{ nA*ms}$ signifikant unterschiedlich zur Kontrolle ($n = 11$, $p = 0,0004$) (Abbildung 38). Das Auswaschen von Adenosin führte zu einer signifikanten Vergrößerung der Autoexzitation auf durchschnittlich $96 \pm 13 \%$ ($-17,5 \pm 3,5 \text{ nA*ms}$, $p = 0,012$). Die Ergebnisse dieser Experimente deuten darauf hin, dass sich zumindest ein Teil der verringerten rekurrenten Inhibition durch Adenosin auf eine Reduktion der Glutamatausschüttung auf Seite der Mitralzelle zurückführen lässt.

3.2.9 Einfluss von Adenosin auf den *output* von Mitralzellen

Mitralzellen erhalten nicht nur synaptische Eingänge aus dem gesamten olfaktorischen neuronalen Netzwerk, sie beeinflussen außerdem die Aktivität des Netzwerks und integrieren Geruchsinformationen bevor sie diese an höhere Hirnzentren weiterleiten. Die Messung des *output* von Mitralzellen ermöglicht eine Aussage darüber, in welcher Form Geruchsinformationen nach der Integration im olfaktorischen Bulbus in andere Hirnregionen weitergeleitet werden. Als *output* wird im Folgenden die Aktionspotentialfrequenz von Mitralzellen verstanden. Um diese zu untersuchen, wurden Mitralzellen im *cell attached*-Modus abgeleitet. Abbildung 39 A zeigt beispielhaft eine Messspur mit spontanen und evozierten Aktionspotentialen. Durch eine Stimulation ($100 \mu\text{s}$, $50 \mu\text{A}$) von ORN-Axonbündeln wird Glutamat an den Axonendigungen der stimulierten ORNs ausgeschüttet. Dies führt zu einer Erregung der synaptisch verbundenen Mitralzellen. Diese Methodik imitiert somit die Wirkung einer Bindung eines Geruchsstoffs an ORNs und ermöglicht damit eine Untersuchung der Integration der Geruchsinformation durch das neuronale Netzwerk des olfaktorischen Bulbus. Die Stimulation der ORN-Axone führte unmittelbar nach der Stimulation zu einem oder mehreren Aktionspotentialen in der gemessenen Mitralzelle (Abbildung 39 A). Diese direkte Reaktion auf die Stimulation wird im Folgenden als ‚erste Phase‘ bezeichnet. Es schloss sich eine zweite Phase einer Stimulation-induzierten erhöhten Aktionspotentialfrequenz an, bevor die Anzahl an Aktionspotentialen wieder auf die stimulationsunabhängige Spontanfrequenz zurückging (Abbildung 39 A).

3.2.9.1 Adenosin moduliert differenziert den *output* von Mitralzellen in verschiedenen Phasen nach einer ORN-Stimulation

Um festzustellen, ob Adenosin eine tonische Wirkung auf den *output* von Mitralzellen hat, wurde der Effekt von DPCPX auf die Aktionspotentialfrequenz von Mitralzellen untersucht. Dazu wurden die zwei Phasen der durch ORN-Stimulation ausgelösten erhöhten Aktionspotentialfrequenz und zusätzlich die Spontanfrequenz getrennt voneinander ausgewertet. So war es möglich, Aussagen über den Einfluss von Adenosin auf die unterschiedlichen Phasen zu treffen. Wie aus Abbildung 39 B hervorgeht führte eine Applikation von DPCPX in Mitralzellen zu einer geringen, nicht signifikanten Reduktion der spontanen Aktionspotentialfrequenz auf $82 \pm 7 \%$ von durchschnittlich $5,2 \pm 1,6$ AP/s auf $4,6 \pm 1,6$ AP/s ($n = 7$, $p = 0,11$). Auch auf die Aktionspotentialfrequenz in Phase eins und zwei nach der Stimulation hatte das Blockieren von A_1 -Rezeptoren, mit einer geringfügigen Verringerung der Aktionspotentialfrequenz von $29,1 \pm 6$ AP/s auf $26,6 \pm 6$ AP/s in der ersten Phase und von $10,9 \pm 3$ AP/s auf $9,8 \pm 3$ AP/s in der zweiten Phase, keinen signifikanten Einfluss ($n = 7$, erste Phase; $p = 0,3$, zweite Phase; $p = 0,2$).

Im Folgenden wurde der Einfluss von Adenosin auf die verschiedenen Phasen nach einer ORN-Stimulation untersucht. Wie in Abbildung 39 C zu sehen, führte eine Applikation von Adenosin zu einer signifikanten Verminderung der spontanen Aktionspotentialfrequenz von Mitralzellen auf $63 \pm 6 \%$ von $4,9 \pm 1$ AP/s auf $3,5 \pm 0,9$ AP/s ($n = 10$, $p = 0,002$). Auch die Aktionspotentialfrequenz in Phase zwei nach der Stimulation wurde signifikant durch Adenosin vermindert ($n = 10$, $p = 0,002$) und fiel von vormals $9,8 \pm 2,8$ AP/s auf $6,5 \pm 1,5$ AP/s. Auf die erste Phase nach der Stimulation hatte Adenosin keinen signifikanten Effekt; hier sank die Aktionspotentialen-Frequenz durchschnittlich von $27,9 \pm 5$ AP/s auf $24,8 \pm 3,6$ AP/s ($n = 10$, $p = 0,07$).

Wurde Adenosin in Gegenwart von DPCPX appliziert, kam es hingegen zu einer Erhöhung der spontanen Aktionspotentialfrequenz auf $143 \pm 20 \%$ von der Kontrolle (Abbildung 39 D). Diese Zunahme war mit einer Erhöhung ausgehend von $3,9 \pm 1,7$ AP/s auf $4,5 \pm 1,7$ AP/s zwar nicht signifikant ($n = 6$, $p = 0,14$), jedoch signifikant unterschiedlich zum *washout* mit $3,8 \pm 1,7$ AP / s ($n = 6$, $p = 0,03$). Die stimulationsabhängige Aktionspotentialfrequenz der ersten und zweiten Phase wurde in Anwesenheit von DPCPX hingegen nicht durch Adenosin moduliert ($n = 6$, $p = 0,3$ bzw. $P = 0,45$). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse eine A_1 -Rezeptor-abhängige Reduktion des spontanen *output* von Mitralzellen und der zweiten Phase nach einer ORN-Stimulation sowie eine A_1 -Rezeptor-unabhängigen Steigerung der spontanen Aktionspotentialfrequenz von Mitralzellen durch Adenosin in Anwesenheit von DPCPX.

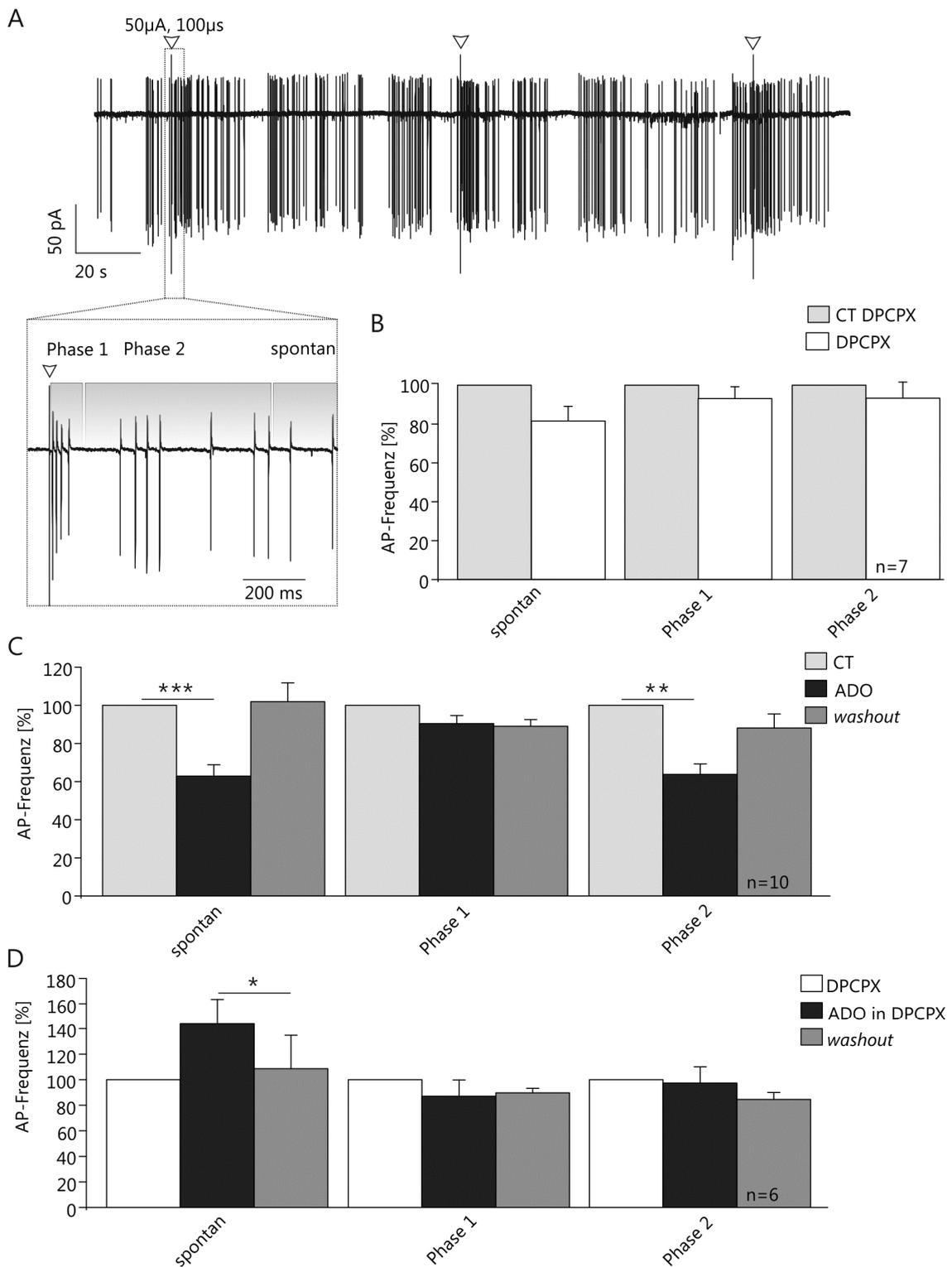


Abbildung 39 | Adenosin moduliert den output von Mitralzellen nach ORN-Stimulation. [A] Cell attached-Ableitung einer Mitralzelle mit elektrischer Stimulation von ORN-Axonon. [B] Eine schwache Stimulation von ORN-Axonon führt nicht zu einer signifikanten Änderung des Mitralzell-output durch eine intrinsische Adenosinfreisetzung. [C] Adenosin (200 μM, 30 s) reduziert den spontanen Mitralzell-output und den output in Phase 2 signifikant. Die 1. Phase wird nicht von Adenosin moduliert. [D] Wirkung von Adenosin auf die AP-Frequenz (AP = Aktionspotential) der unterschiedlichen Phasen unter Einfluss von DPCPX (3 μM).

3.2.9.2 Die Latenz der ORN-Mitralzell-Synapse wird nicht von Adenosin beeinflusst

Die Latenz zwischen der ORN-Stimulation und dem ersten darauf folgenden Aktionspotential der Mitralzelle gibt Auskunft darüber, wie schnell die direkte synaptische Übertragung von ORN zur Mitralzelle stattfindet. Eine Untersuchung der Latenz ermöglicht es, eine Wirkung von Adenosin auf die Geschwindigkeit der synaptischen Übertragung zwischen ORNs und Mitralzellen festzustellen. Abbildung 40 A zeigt beispielhaft die Messspur einer *cell attached*-Ableitung einer Mitralzelle als Übersicht und zeitlich höher aufgelöst im Detail. Es ist eine Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz als Reaktion auf eine Stimulation von ORN-Axonen zu erkennen. Das erste Aktionspotential nach der Stimulation erfolgte unter Kontrollbedingungen im Mittel nach $11,9 \pm 2,3$ ms ($n = 10$). Adenosin veränderte die Latenz des ersten Aktionspotentials nach der Stimulation nicht signifikant auf $11,7 \pm 1,7$ ms, ($p = 0,8$). Die Geschwindigkeit der synaptischen Übertragung zwischen ORNs und Mitralzellen scheint demnach nicht von Adenosin beeinflusst zu werden.

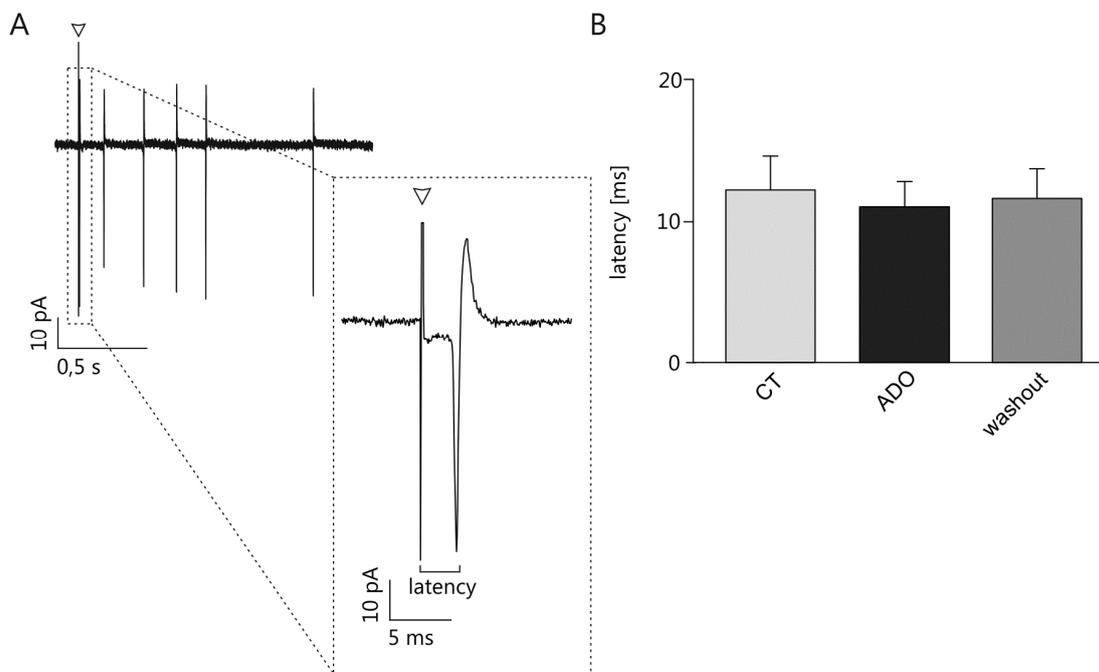


Abbildung 40 | Die Latenz des ersten auf die ORN-Stimulation folgenden Aktionspotentials verändert sich durch Adenosin nicht. [A] Detail der ersten durch eine ORN-Stimulation (100 μ s, 50 μ A) hervorgerufenen Aktionspotentiale bei einer *cell attached*-Ableitung einer Mitralzelle [B] Die Latenz des ersten auf die ORN-Stimulation folgenden Aktionspotentials wird durch den Einfluss von Adenosin nicht verändert.

3.2.9.3 Signal-Rausch-Verhältnis

Das Signal-Rausch-Verhältnis ist ein Maß für die Qualität eines Signals. Ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis zeigt an, dass das jeweilige Nutzsignal gut aus dem Hintergrundrauschen ausgelesen werden kann. Die durch ORN-Stimulation in der Mitralzelle ausgelösten Aktionspotentiale (Phase

1) werden im Folgenden als integrierter *output* der Mitralzelle in Reaktion auf einen Geruchsreiz interpretiert. Wird deren mittlere Frequenz durch die spontane Aktionspotentialfrequenz geteilt, ergibt sich daraus das Signal-Rausch-Verhältnis für den Mitralzell-*output*. Wie in Abbildung 41 zu sehen, führte Adenosin zu einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses von $8,4 \pm 1,9$ auf $15,5 \pm 4,7$ ($n = 10$, $p = 0,04$). Das Einwaschen des A_1 -Rezeptor-Antagonisten DPCPX führte ebenso zu einer leichten, aber nicht signifikanten Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses auf $11,6 \pm 3,2$ ($n = 7$, $p = 0,08$). Eine Applikation von Adenosin in Gegenwart von DPCPX hingegen verringerte das Signal-Rausch-Verhältnis merklich, aber nicht signifikant von $12,9 \pm 3,4$ auf $7,9 \pm 2,9$ ($n = 6$, $p = 0,16$). Diese Ergebnisse weisen somit auf einen modulatorischen Einfluss von Adenosin auf das Signal-Rausch-Verhältnis im *Bulbus olfactorius* hin, wobei Adenosin unter Beteiligung von A_1 -Rezeptoren zu einer deutlichen Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses beiträgt, bei blockierten A_1 -Rezeptoren hingegen zu einem verschlechterten Signal-Rausch-Verhältnis für Mitralzell-*output* führt.

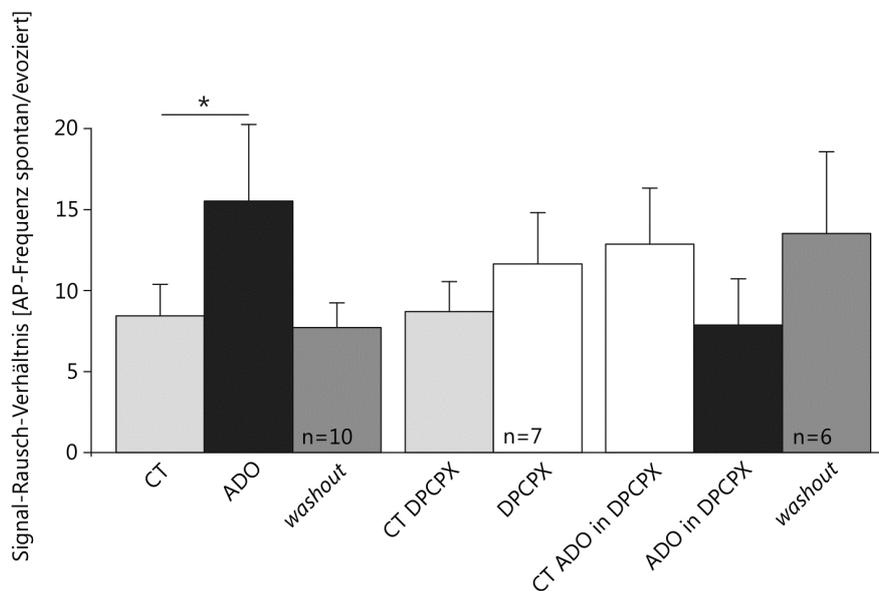


Abbildung 41 | Adenosin verbessert das Signal-Rausch-Verhältnis des ORN-Stimulation-abhängigen Mitralzell-*output*. Durch Adenosin ($200 \mu\text{M}$, 30 s) verbessert sich das Signal-Rausch-Verhältnis (des basalen Mitralzell-*output* zu dem durch die ORN-Axon-Stimulation evozierten *output*) signifikant. DPCPX ($3 \mu\text{M}$) verändert das Signal-Rausch-Verhältnis nicht. Adenosin in DPCPX verschlechtert das Signal-Rausch-Verhältnis tendenziell, aber nicht signifikant.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals eine neuromodulatorische Wirkung von ATP, ADP und Adenosin im *Bulbus olfactorius* der Maus. Es konnte gezeigt werden, dass eine photolytische Freisetzung von *caged*-ATP zu einer erhöhten neuronalen Aktivität im *Bulbus olfactorius* führt, und dass außerdem das Hydrolyseprodukt von ATP, Adenosin, Neurone des olfaktorischen Bulbus auf vielfältige Weise moduliert.

4.1 Eine photolytische Freisetzung von *caged*-ATP erhöht die neuronale Netzwerkaktivität im *Bulbus olfactorius*

Enzyme, die extrazelluläres ATP abbauen, sind im *Bulbus olfactorius* in besonders großer Konzentration vorhanden (Langer et al., 2008). Zudem weisen mehrere histologische Studien auf eine Expression von P2-Rezeptoren im olfaktorischen Bulbus hin (Vulchanova et al., 1996; Le et al., 1998; Kanjihan et al., 1999). Im Jahr 2010 konnten Thyssen et al. außerdem zeigen, dass ATP vesikulär entlang der Axone von olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORNs) freigesetzt wird, zwei Jahre zuvor wurde eine ATP-Freisetzung aus den Axonterminalen der ORNs nachgewiesen (Doengi et al., 2008). Auch konnte in diesen Studien ein Effekt von ATP auf Astrozyten und auf OECs, ein nur im olfaktorischen Bulbus vorkommender Gliazelltyp, gezeigt werden. ATP und seine Hydrolyseprodukte ADP und Adenosin führen, vermittelt über P2Y₁-Rezeptoren bzw. über A_{2A}-Rezeptoren, zu Calciumsignalen in periglomerulären Astrozyten und in OECs. Der physiologische Effekt von ATP auf Gliazellen des olfaktorischen Bulbus warf damit die Frage auf, ob auch Neurone des olfaktorischen Bulbus von ATP moduliert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zum ersten Mal einen Effekt von ATP auf elektrophysiologische Eigenschaften und die cytosolische Calciumkonzentration in Neuronen des olfaktorischen Bulbus durch die Aktivierung von P2Y₁-Rezeptoren. Da P2Y₁-Rezeptoren sowohl über ATP als auch über ADP aktiviert werden können und durch den enzymatischen Abbau von ATP in einem sehr kurzen Zeitraum ADP entstehen kann, konnte bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht unterschieden werden, ob P2Y-Rezeptoren durch das photolytisch aktivierte ATP direkt oder durch ADP aktiviert wurden. Wird daher im Folgenden von einer ATP-vermittelten Wirkung gesprochen, ist eine mögliche Beteiligung von ADP in diesen Aussagen mit eingeschlossen. Die Verwendung von *caged*-ATP in den Experimenten ermöglichte eine schnelle Kinetik der ATP-Applikation und zusätzlich eine lokal begrenzte Freisetzung von ATP. Diese Applikationsmethode bietet vermutlich eine der physiologischen ATP-Freisetzung ähnliche Kinetik (Kaplan und Somlyo, 1989; Giovannardi et al., 1998). Da ATP an ORN-Axonendigungen freigesetzt wird, ist ATP lokal im Glomerulus vorhanden, wie es auch bei dem in dieser Arbeit durchgeführten lokalen ATP-*uncaging* im Glomerulus der Fall ist, wenn auch in weitaus geringerer räumlicher Auflösung. Eine pharmakologische Untersuchung der Wirkungsweise von ATP mit Hilfe spezifischer P2-Rezeptorblocker zeigte, dass ein Großteil des elektrophysiologisch in Neuronen beobachteten

Effekts P2Y₁-vermittelt war. Die vorliegende Arbeit zeigt somit, dass nicht nur Astrozyten, sondern auch Neurone des olfaktorischen Bulbus funktionelle P2Y₁-Rezeptoren besitzen.

Im Zentralnervensystem sind P2Y₁-Rezeptoren unter anderem im Cortex, Hippocampus und Cerebellum zu finden (Burnstock, 2007a; Weisman et al., 2012). Simon et al. (1997) wiesen zudem die starke Bindung eines radioaktiv markierten Liganden des P2Y₁-Rezeptors in der Glomerularschicht und der äußeren plexiformen Schicht des olfaktorischen Bulbus nach, wohingegen die innere plexiforme Schicht sowie die innere Körnerzellschicht nur mittlere Bindungsintensitäten aufwiesen. Die hohe Expression des P2Y₁-Rezeptors in der Glomerularschicht korrespondiert mit der von Doengi et al. (2008) beschriebenen P2Y₁-vermittelten Aktivierung periglomerulärer Astrozyten und der in dieser Arbeit beschriebenen neuromodulatorischen Wirkung des P2Y₁-Rezeptors in der glomerulären Schicht des olfaktorischen Bulbus. In anderen Hirngebieten ist eine P2Y₁-vermittelte Modulation von Neuronen bereits zuvor beschrieben worden. Untersuchungen in Hirnschnitten des Hippocampus von Mäusen wiesen beispielsweise eine P2Y₁-Rezeptor-vermittelte Exzitation von inhibitorischen Interneuronen nach (Kawamura et al., 2004). Neben P2Y₁-Rezeptoren wurden auch alle weiteren P2Y-Rezeptorsubtypen bereits im Zentralnervensystem nachgewiesen. Hierbei wurde bis dato jedoch lediglich der P2Y₂-Rezeptor in ORNs und somit ggf. in der Nervenfaserschicht und Glomerularschicht des olfaktorischen Bulbus, festgestellt.

Zusätzlich zu den metabotropen P2Y-Rezeptoren gibt es im *Bulbus olfactorius* der Maus histologische Nachweise für das Vorkommen von ebenfalls ATP-aktivierten, aber ionotropen P2X_{4,5,6,7}-Rezeptoren (Hassenklover et al., 2010) und von P2X₂-Rezeptoren (Vulchanova et al., 1996; Kanjihan et al., 1999). In ORNs ist außerdem eine Expression von P2X_{1/4}-Heteromeren nachgewiesen worden (Hegg et al., 2003). Die physiologische Funktionalität von P2X-Rezeptoren konnte im *Bulbus olfactorius* jedoch noch nicht gezeigt werden. Funktionell wurden P2X-Rezeptoren bis jetzt insgesamt eher selten elektrophysiologisch in Gehirnschnitten nachgewiesen. So ließen sich bei Jabs et al. (2007) beispielsweise keine P2X-vermittelten Ströme messen, obwohl die Rezeptoren histologisch in den untersuchten hippocampalen Astrozyten lokalisiert wurden. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass eine Applikation von ATP über das Versuchsbad kinetisch zu langsam ist, um diesen Rezeptortyp zu aktivieren (Khakh et al., 2001). Eine weitere Hypothese besagt, dass durch die Präparation und das Schneiden des Gewebes bei Hirnschnitten so viel extrazelluläres ATP vorliegt, dass P2X-Rezeptoren in Schnittpräparaten insgesamt desensitivieren oder sogar dauerhaft inaktivieren (North, 2002). Gegen die zweite Hypothese spricht jedoch die Beobachtung von Zhang et al. (2003), dass extrazelluläres ATP in Schnittpräparaten sehr schnell abgebaut wird. Ein Effekt von ATP in hippocampalen Schnittpräparaten konnte hier überhaupt erst nach einer Inhibition von Ekto-Nukleotidasen beobachtet werden. Möglicherweise liegt daher trotz vieler beschädigter Zellen kein hoher ATP-Grundtonus im Schnittpräparat vor. Prinzipiell ist eine Messung ionotroper, P2X-vermittelter Ströme in Hirnschnitten jedoch möglich. Mori et al. (2001) konnten beispielsweise eine schnelle synaptische Transmission durch ATP in hippocampalen Schnittkulturen zeigen. Die schnelle Kinetik der ATP-Applikation bei der in dieser Arbeit durchgeführten Photolyse von *caged*-ATP

ermöglichte wahrscheinlich einen ausreichend lokalen und schnellen Anstieg der extrazellulären ATP-Konzentration, um prinzipiell auch P2X-Rezeptoren zu aktivieren. Immunhistologisch wurde eine Expression von P2X_{1,2,4+5}-Rezeptoren in der Mitralzellschicht nachgewiesen (Hegg et al., 2003; Guo et al., 2008). Bei den hier durchgeführten Experimenten konnten trotzdem keine Anzeichen für P2X-Rezeptor-vermittelte Ströme in Mitralzellen festgestellt werden. Würde die abgeleitete Mitralzelle in TTX synaptisch isoliert (vgl. Fischer et al. (2012)), sollte eine Aktivierung von P2X-Rezeptoren der Mitralzelle zu einem schnellen Einstrom in die Zelle führen. Es konnte allerdings in keiner der in TTX abgeleiteten Mitralzellen ein derartiger ionotroper Einstrom beobachtet werden. Das für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendete *caged*-ATP bestand jedoch nur zu etwa 90 % aus *caged*-ATP (Herstellerangabe). In den verbleibenden 10 % könnte ggf. freies ATP vorliegen. Es wäre daher möglich, dass dieses freie ATP zu einer Desensitivierung von P2X-Rezeptoren führte und darum kein P2X-vermittelter Effekt mehr beobachtet werden konnte. Eine funktionelle Expression von P2X-Rezeptoren auf weiteren Neuronentypen des *Bulbus olfactorius* wäre ebenfalls möglich, wurde im Rahmen dieser Arbeit aber nicht untersucht.

Während der postnatalen Entwicklung kann es zu einer unterschiedlich starken Expression von P2-Rezeptoren im Gewebe kommen. Im Cerebellum der Ratte kommt es beispielsweise zwischen der ersten und dritten postnatalen Woche zu einer Verschiebung der P2Y₁-Expression von Gliazellen auf Neurone (Amadio et al., 2007). Zhu und Kimelberg (2001) wiesen abhängig von der untersuchten Altersgruppe eine unterschiedliche mRNA-Expression von P2Y-Rezeptoren in isolierten Astrozyten der Ratte nach. In Untersuchungen im *Bulbus olfactorius* beobachteten Doengi et al. (2008) einen P2Y₁-vermittelten Effekt von ATP auf Astrozyten bei drei bis acht Tage alten Mäusen. Das Alter dieser Mäuse liegt am unteren Ende der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Altersgruppe von sieben bis vierzehn Tagen. Untersuchungen von Thyssen et al. (2013) wiesen jedoch zusätzlich P2Y₁-vermittelte Calciumsignale in OECs von bis zu drei Wochen alten Mäusen nach. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass zumindest während einer gewissen Entwicklungsphase P2Y₁-Rezeptoren parallel auf Astrozyten und Neuronen im olfaktorischen Bulbus von Mäusen zu finden sind. Weitere Informationen über eine entwicklungsabhängige Expression von P2-Rezeptoren speziell im *Bulbus olfactorius* sind in der Literatur nicht zu finden. Da in dem Zeitraum der ersten bis zweiten postnatalen Woche jedoch entwicklungsbedingt noch morphologische und physiologische Änderungen im olfaktorischen Bulbus stattfinden, kann der in dieser Dissertation beschriebene Effekt von ATP auf das neuronale Netzwerk des olfaktorischen Bulbus zunächst nur für die untersuchte Altersgruppe angenommen werden. Zum Aufdecken von ggf. entwicklungsbedingt unterschiedlichen Effekten von ATP wären weitere Untersuchungen nötig. Eine weiterführende Diskussion der Bedeutung entwicklungsbedingter Vorgänge für die Beurteilung der Ergebnisse dieser Arbeit findet sich in Abschnitt 4.5.

Bei der Untersuchung der durch ATP-*uncaging* hervorgerufenen synaptischen Eingänge bzw. des Einstroms in Mitralzellen kann bei der verwendeten Intrazellulärlösung zunächst nicht differenziert werden, ob es sich dabei um inhibitorisch oder exzitatorisch wirksame synaptische Eingänge handelt, da sowohl exzitatorisch wirksame Ströme als auch Chloridströme zu einem Einwärtsstrom führen. Weiterführende Experimente (Fischer et al., 2012) untersuchten den GABAergen bzw.

glutamatergen Anteil des ATP-vermittelten Effekts pharmakologisch durch die Verwendung von GABA_A- bzw. NMDA/AMPA-Rezeptor-Blockern. Das *uncaging* von ATP bei einer Isolation glutamaterger Eingänge durch Gabazine führte dabei zu einem langsamen Einstrom, der gegenüber der Kontrolle um 60 % reduziert war und keine einzelnen synaptischen Eingänge mehr aufwies. Die Isolation GABAerger Vorgänge mittels Glutamatrezeptorblocker hingegen führte zu einer kompletten Inhibition des langsamen Einstroms, einige einzelne synaptische Eingänge bleiben hier jedoch erhalten. Diese Experimente deuten darauf hin, dass sowohl eine GABAerge als auch eine glutamaterge Komponente an dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Effekt eines ATP-*uncagings* beteiligt sind. Der durch ATP-*uncaging* ausgelöste Effekt könnte somit auf eine Summation des glutamatergen Einstroms und der, auf rekurrente Inhibition zurückzuführende, synaptischen Eingänge beruhen. Die durch ein ATP-*uncaging* ausgelöste Glutamatausschüttung würde dieser Hypothese zufolge dann nicht nur zu einem Einstrom in die Mitralzelle führen, sondern gleichzeitig rekurrente, inhibitorische Synapsen aktivieren (Isaacson und Strowbridge, 1998; Gire und Schoppa, 2009), was wiederum zu einer Zunahme synaptischer Eingänge in die Mitralzelle führte. Dieser Mechanismus könnte die pharmakologisch festgestellte Beteiligung GABAerger sowie glutamaterger Komponenten an dem Effekt erklären.

Eine Eingrenzung der funktionellen Expression des P2Y₁-Rezeptors auf unterschiedliche Neuronentypen im *Bulbus olfactorius* wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass eine lokale Applikation von ATP durch *uncaging* in einem einzelnen Glomerulus einen vergleichbaren Effekt hervorruft wie ein globales *uncaging* von ATP im gesamten Versuchsbad. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass ATP hauptsächlich periglomeruläre Zellen und das glomeruläre Netzwerk, bestehend aus den Mitral- bzw. *tufted*-Zellen, beeinflusst. Wie von Fischer et al. (2012) gezeigt, ist unter TTX kaum noch eine Wirkung von ATP in der abgeleiteten Mitralzelle festzustellen. Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass Mitralzellen keine P2Y₁-Rezeptoren aufweisen und folglich durch andere P2Y₁-exprimierende Neurone erregt wurden, oder darauf, dass aufgrund der Verwendung einer CsCl-basierten Intrazellulärlösung in diesen Experimenten eine direkte Aktivierung von P2Y₁-Rezeptoren auf Mitralzellen nicht nachweisbar war. Zumindest der hier an der Mitralzelle gemessene Effekt von ATP scheint somit ein indirekter Effekt auf die Mitralzelle zu sein. Eine Beteiligung von glutamatergen *external tufted*-Zellen scheint in diesem Zusammenhang denkbar, da der durch ATP-*uncaging* ausgelöste Effekt den spontan vorkommenden *population bursts* stark ähnelt. *Population bursts* sind von *external tufted*-Zellen angetriebene, rhythmische Netzwerkaktivitäten von ca. 2-3 s Dauer (De Saint Jan et al., 2009). Ein zweiter glutamaterger Zelltyp im glomerulären Netzwerk sind die *short axon*-Zellen, welche im Unterschied zu den *short axon*-Zellen der Körnerzellschicht glutamaterg sind (Shiple und Ennis, 1996). Auch diese könnten den P2Y₁-Rezeptor exprimieren und nach ihrer Aktivierung Glutamat ausschütten und dadurch das glomeruläre Netzwerk aktivieren. Um herauszufinden, welcher Zelltyp P2Y₁-Rezeptoren exprimiert, wären weiterführende Experimente nötig. Es könnte beispielsweise ein möglicher direkter Effekt von ATP auf *external tufted*-Zellen untersucht werden, indem diese elektrophysiologisch abgeleitet werden.

Der durch ein dreisekündiges ATP-*uncaging* ausgelöste Effekt dauert ca. fünf bis sieben Sekunden. Da extrazelluläres ATP überwiegend innerhalb von Millisekunden zu Adenosin abgebaut wird (Zimmermann, 2000), erscheint dieser Effekt relativ langandauernd. Erklärt werden könnte die langanhaltende Antwort durch die Annahme, dass sich der Effekt aus einem Kreislauf von Exzitation und Inhibition zusammensetzt. Weiterhin werden durch P2Y₁-Rezeptoren metabotrope Prozesse in der Zelle ausgelöst, die zu einem länger anhaltenden Effekt führen könnten. Auch wird die Größe des Effekts durch die verwendete Intrazellulärlösung vermutlich tendenziell überschätzt. Unter physiologischen Bedingungen würden sich Exzitation und Inhibition zumindest teilweise aufheben, mit der verwendeten Intrazellulärlösung summieren sich die Effekte. Es kann jedoch insgesamt davon ausgegangen werden, dass es durch eine ATP-Freisetzung in Summe zu einer exzitatorischen Aktivierung von Mitralzellen kommt, da die Photolyse von *caged*-ATP zu einer Depolarisation des Membranpotentials von Mitralzellen führte. In der Regel führt Exzitation zu einem Anstieg des Calciumspiegels, eine Inhibition hingegen nicht (Grienberger und Konnerth, 2012). Ein P2Y-Rezeptor-vermittelter, eine glutamaterge Exzitation verstärkender Effekt von ATP wurde bereits auch in anderen Gehirnarealen beschrieben. Im Präfrontalen Cortex beispielsweise verstärkt ATP eine NMDA-Rezeptor-vermittelte Depolarisation von pyramidalen Neuronen (Illes et al., 2001).

Calcium imaging im *tuft* von Mitralzellen zeigte, dass ein globales ATP-*uncaging* Calciumtransienten im Mitralzell-*tuft* auslöst. Da ein direkter elektrophysiologischer Effekt auf die Mitralzelle, zumindest mit der im Experiment verwendeten Intrazellulärlösung, nicht auftrat (Fischer et al., 2012), ist davon auszugehen, dass sich auch der Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels im Mitralzell-*tuft* auf eine Erregung des glomerulären Netzwerks zurückführen lässt. Bei dem lokalen *uncaging* von ATP im *tuft* konnte nur bei einer von sieben untersuchten Mitralzellen ein Calciumanstieg gemessen werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass auch ein lokales *uncaging* grundsätzlich zu einem Calciumanstieg im *tuft* führen kann, das verwendete Versuchsprotokoll ggf. aber nicht sensibel genug war, um schwache Calciumtransienten zu detektieren. Da die Stromantwort beim lokalen *uncaging* signifikant kleiner war als beim globalen, waren die Calciumkonzentrationsänderungen eventuell nicht groß genug um nachgewiesen werden zu können. Mit einer Aufnahme Frequenz von einem Bild alle 1,2 s wurden zudem möglicherweise kürzer andauernde Calciumsignale nicht aufgezeichnet.

Calcium imaging-Experimente in periglomerulären Astrozyten parallel zu elektrophysiologischen Messungen an Mitralzellen zeigten, dass die astrozytäre Calciumantwort im Mittel mit 2,3 s Verzögerung gegenüber der Stromantwort in Mitralzellen auftrat (siehe Abbildung 5). Es ist daher davon auszugehen, dass die neuronalen Reaktionen auf ATP nicht initial Astrozyten-vermittelt waren. Auf Grundlage dieses Ergebnisses könnte vielmehr eher davon ausgegangen werden, dass die durch ATP ausgelöste neuronale Aktivität sekundär eine Aktivierung von Astrozyten zur Folge gehabt haben könnte. Doengi et al. (2008) zeigten jedoch, dass periglomeruläre Astrozyten funktionelle P2Y₁-Rezeptoren aufweisen und dass ein Anstieg intrazellulären Calciums nicht

ausschließlich auf eine neuronale Aktivierung zurückzuführen ist. Periglomeruläre Neurone und Astrozyten scheinen somit unabhängig voneinander durch ATP über P2Y₁-Rezeptoren erregbar zu sein. Dass in der zitierten Arbeit von Doengi et al. (2008) kein Calciumanstieg in periglomerulären Neuronen durch ATP-Freisetzung infolge einer ORN-Axon-Stimulation festgestellt werden konnte, in der vorliegenden Arbeit jedoch Calciumsignale im *tuft* von Mitralzellen gemessen wurden, könnte darauf zurückzuführen sein, dass in der Arbeit von Doengi et al. der Calciumfarbstoff über ein Färbebad appliziert wurde. Welche Zellen hierbei den calciumsensitiven Farbstoff aufnehmen ist schwer vorherzusagen (Manzini et al., 2008). Prinzipalneurone des olfaktorischen Bulbus wie Mitral- und *tufted*-Zellen lassen sich z. B. mit Fluo-4-AM nicht anfärben (pers. Mitteilung, Prof. Dr. C. Lohr). Möglicherweise nehmen auch die P2Y₁-aktivierten Neurone über das Färbebad keinen Calciumfarbstoff auf und wurden deshalb von Doengi et al. (2008) nicht mitgemessen. Zusätzlich könnte die unterschiedliche Art der ATP-Freisetzung über eine ORN-Axon-Stimulation bzw. durch ATP-*uncaging* zu abweichenden Ergebnissen geführt haben. Insgesamt scheint jedoch zumindest eine schnelle Applikation von ATP im Glomerulus sowohl Neurone als auch Astrozyten zu modulieren. Durch einen P2Y₁-Rezeptor-vermittelten Calciumanstieg in Astrozyten könnte es zu einer Gliotransmitterausschüttung in Form von ATP kommen, was die Dauer des Effekts von ATP insgesamt verlängern würde. ATP ist ein im gesamten Zentralnervensystem verbreiteter Gliotransmitter (Gordon et al., 2005; Fields und Burnstock, 2006). In Astrozyten des olfaktorischen Bulbus wurde eine ATP-Freisetzung von Astrozyten allerdings noch nicht beschrieben. Eine ATP-getriggerte ATP-Freisetzung aus periglomerulären Astrozyten wäre daher ein rein hypothetischer, aber möglicher Mechanismus, um den durch extrazelluläres ATP abbauende Enzyme ansonsten zeitlich stark begrenzten Effekt von ATP zu verlängern. Dieser Mechanismus, zusammen mit dem zuvor beschriebenen Kreislauf aus Exzitation und Inhibition, könnte erklären, warum der in dieser Arbeit beschriebene Effekt von ATP länger andauerte als aufgrund der reinen Dauer des ATP-*uncagings* zu erwarten gewesen wäre. Neben ATP könnten weitere Gliotransmitter wie Glutamat und D-Serin von Astrozyten freigesetzt werden und ebenfalls exzitatorisch auf Neurone wirken (Araque et al., 2014).

Die von Doengi et al. (2008) beschriebene Freisetzung von ATP an den Axonterminalen der ORNs im Glomerulus deutet auf eine physiologische Funktion von ATP im glomerulären Netzwerk des olfaktorischen Bulbus hin. Eine Kotransmission von ATP konnte allerdings nur bei einer starken Stimulation von ORN-Axonon festgestellt werden (Doengi et al., 2008). Es könnte daher vermutet werden, dass nur starke Geruchsreize eine ATP-Freisetzung aus ORN-Axonterminalen auslösen und dass ATP in diesem Fall zu einer verstärkten Erregung des glomerulären Netzwerks beiträgt.

Zusammenfassend kann auf Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse folgendes hypothetische Modell zur Wirkungsweise von ATP im glomerulären Netzwerk des olfaktorischen Bulbus aufgestellt werden (Abbildung 42):

- [I] Durch einen starken Geruchsreiz kommt es neben der Ausschüttung von Glutamat zu einer vesikulären Freisetzung von ATP an den axonalen Endigungen von ORNs.

- [II] ATP aktiviert P2Y₁-Rezeptoren auf glutamatergen, periglomerulären Neuronen und ggf. auf Mitralzellen sowie auf periglomerulären Astrozyten.
- [III] Es kommt zu einer Glutamatfreisetzung aus den über P2Y₁-Rezeptoren erregten Neuronen. Die exzitatorische Wirkung der Glutamatfreisetzung aus ORNs wird dadurch unterstützt.
- [IV] Eventuell kommt es zusätzlich zu einer ATP-Ausschüttung aus P2Y₁-aktivierten periglomerulären Astrozyten. Diese ATP-induzierte ATP-Freisetzung verlängert die exzitatorische Wirkung von ATP.
- [V] Durch die Glutamatfreisetzung werden zudem inhibitorische periglomeruläre Neurone erregt, die in der Folge GABA ausschütten.
- [VI] Mitralzellen erhalten daraufhin sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Eingänge, wobei die Exzitation insgesamt überwiegt.

Dieser Wirkmechanismus von ATP würde zu einer verstärkten Erregung des glomerulären Netzwerks und von Mitralzellen führen. Starke Geruchsreize könnten somit durch die Freisetzung von ATP gegenüber schwächeren Geruchsreizen hervorgehoben werden.

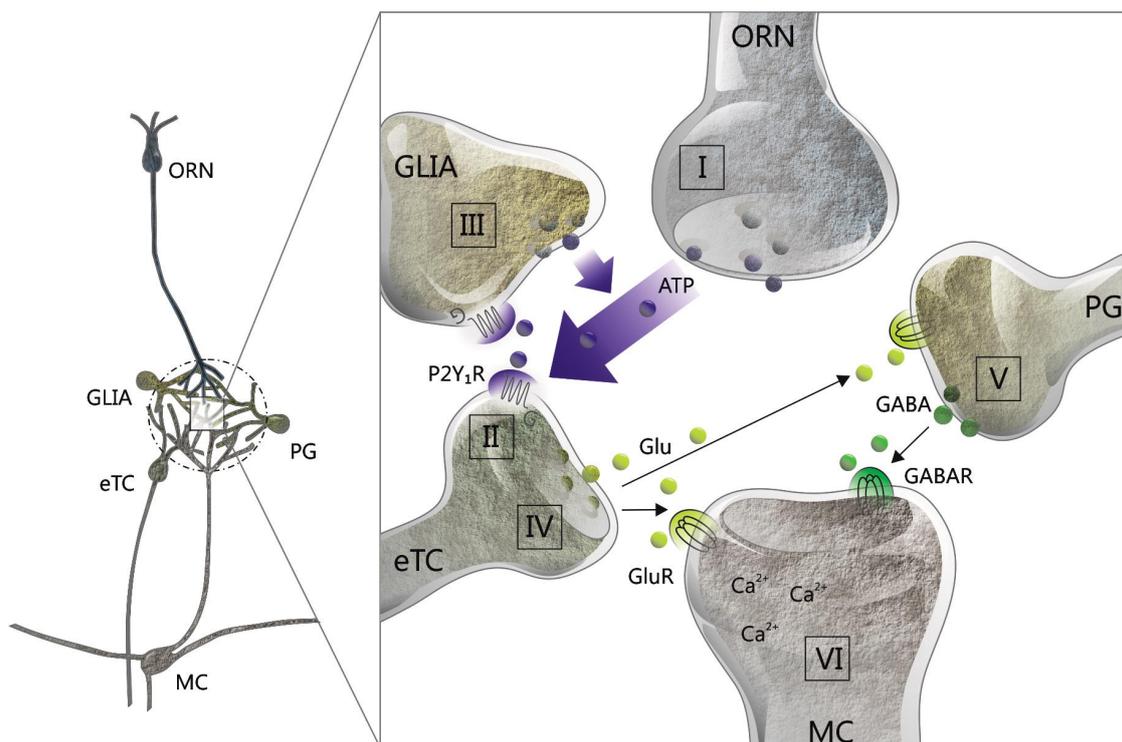


Abbildung 42 | Hypothese zur Modulation des glomerulären Netzwerks durch ATP. Links: Übersicht über einen Ausschnitt des neuronalen Netzwerks des olfaktorischen Bulbus, Rechts: Detail einiger Synapsen innerhalb eines Glomerulus. Detail: ATP wird aus ORN-Axonterminalen freigesetzt [I] und aktiviert P2Y₁-Rezeptoren auf external tufted-Zellen (eTC) [II] und Gliazellen [III]. Mitralzellen (MC) [IV] und GABAerge periglomeruläre Neurone (PG) [V] werden daraufhin glutamaterg aktiviert. [VI] Mitralzellen erhalten sowohl glutamaterge als auch GABAerge synaptische Eingänge, wobei insgesamt die Exzitation überwiegt und es zu einem Calciumanstieg im Mitralzell-tuft kommt.

Eine Applikation von ATP über das Versuchsbad verursachte eine entgegengesetzte Reaktion des neuronalen Netzwerks des olfaktorischen Bulbus wie eine Applikation von ATP mittels *uncaging*. Durch ATP kam es dabei zu einer Reduktion der Anzahl synaptischer Eingänge in die Mitralzelle. Der genaue Mechanismus, der den unterschiedlichen Effekten einer schnellen oder langsamen ATP-Applikation zugrunde liegt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Da P2-Rezeptoren jedoch schnell desensitivieren (Burnstock, 2007a) und extrazelluläres ATP außerdem zügig zu Adenosin abgebaut wird (Zimmermann, 2000), könnte vermutet werden, dass die langsamere Kinetik der Badapplikation von ATP zu einer Desensitivierung von P2-Rezeptoren geführt hat und/oder außerdem ein enzymatischer Abbau von ATP zu Adenosin stattgefunden hat. Die beobachtete Reduktion der Anzahl synaptischer Eingänge könnte daher Adenosin-vermittelt sein. Wie von Doengi et al. (2008) beschrieben, kommt es durch eine Badapplikation von ATP zu einer Aktivierung von A_{2A}-Rezeptoren auf periglomerulären Astrozyten. Es ist daher davon auszugehen, dass Adenosin durch eine Badapplikation von ATP in ausreichender Menge vorliegt, um funktionell P1-Rezeptoren zu aktivieren. Adenosin führt in Schicht-2/3-Pyramidenzellen des visuellen Cortex zu einer Reduktion der Amplitude von synaptischen Eingängen (EPSCs) und zu einer Reduktion von *miniature* EPSCs (Bannon et al., 2014). Im *Globus pallidus* führt die Aktivierung von A_{2A}-Rezeptoren zu einer Zunahme der Frequenz von IPSC (Shindou et al., 2001). Möglicherweise findet auch im olfaktorischen Bulbus eine Adenosin-abhängige, P1-Rezeptor-vermittelte Neuromodulation statt, welche bei einer langsamen ATP-Applikation gegenüber den P2-Rezeptor-vermittelten Effekten überwiegt.

4.2 A₁-Rezeptoren vermitteln eine modulatorische Wirkung von Adenosin auf Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus

Die Freisetzung von ATP aus ORN-Axonterminalen könnte eine Quelle für extrazelluläres Adenosin darstellen, da der olfaktorische Bulbus eine hohe Aktivität ATP abbauender extrazellulärer Enzyme aufweist (Langer et al., 2008). Zusätzlich zeigten Experimente von Doengi et al. (2008) A_{2A}-Rezeptor-vermittelte Calciumsignale in periglomerulären Astrozyten. Die Wirkung von Adenosin auf Neurone des olfaktorischen Bulbus wurde bisher allerdings noch nicht untersucht und wurde in dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen.

Mitralzellen bilden eine Schlüsselposition im neuronalen Netzwerk des *Bulbus olfactorius*. Geruchsinformationen werden durch sie prozessiert und anschließend an höhere Hirnzentren weitergeleitet. Als primäre Projektionsneurone des olfaktorischen Bulbus ist es von besonderem Interesse herauszufinden, ob Adenosin diesen Zelltyp moduliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Adenosin die Anzahl spontaner Aktionspotentiale in Mitralzellen reduziert und ihre Zellmembran hyperpolarisiert. Auch in Anwesenheit von TTX führte eine Applikation von Adenosin zu einer reversiblen und reproduzierbaren Hyperpolarisation der Mitralzellmembran. TTX unterdrückt fast vollständig synaptische Aktivität im Präparat, da die für Aktionspotentiale notwendigen spannungsaktivierten Natriumkanäle blockiert werden. Der direkte Effekt von

Adenosin auf Mitralzellen lässt sich außerdem unter zusätzlicher Blockade von GABA_A-Rezeptoren und ionotropen Glutamaterezeptoren reproduzieren. Da ein Großteil synaptischer Verbindungen zu Mitralzellen GABAerg oder glutamaterg ist (Shiple und Ennis, 1996), kann somit davon ausgegangen werden, dass die abgeleitete Mitralzelle in diesen Experimenten weitestgehend synaptisch isoliert war. Metabotrope Glutamaterezeptoren sowie P1-Rezeptoren wurden jedoch nicht blockiert und könnten einen neuromodulatorischen Einfluss bewirken. Insgesamt kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die in TTX, NBQX, D-AP V und Gabazine gemessenen Zellen ausreichend synaptisch isoliert waren, um den Effekt von Adenosin auf die Mitralzelle einzugrenzen. Dafür spricht auch, dass bei diesen Messungen keinerlei synaptische Eingänge mehr sichtbar waren. Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse kann somit angenommen werden, dass Mitralzellen funktionelle P1-Rezeptoren exprimieren.

Eine direkte Wirkung von Adenosin auf Projektionsneurone ist bereits aus anderen Hirngebieten bekannt. In hippocampalen Pyramidenzellen von Ratten führt Adenosin beispielsweise zu einer verstärkten Nachhyperpolarisation und zu einer generellen Hyperpolarisation der Zellmembran (Haas und Greene, 1984; Li und Henry, 1992). Haas und Greene (1984) wiesen eine Adenosin-induzierte Hyperpolarisation von CA1-Neuronen von 3,14 mV nach. Die Größe der Hyperpolarisation ist vergleichbar mit der in dieser Arbeit gemessenen Adenosin-induzierten Hyperpolarisation der Mitralzellmembran ohne TTX von 2,8 mV. Auch intrazelluläre Ableitungen von Pan et al. (1995) in *Locus coeruleus*-Neuronen der Ratte zeigten eine vergleichbar starke Hyperpolarisation von im Mittel 3,0 mV. Zusätzlich kam es hier in 55 % der untersuchten Zellen zu einer Unterdrückung von spontanen Aktionspotentialen. Adenosin (100 µM) führte zudem zu einem Ausstrom, welcher mit 15,5 pA bei -60 mV Haltepotential ähnlich groß war wie in der vorliegenden Arbeit bei einem Haltepotential bei -70 mV (nicht *liquid junction potential* korrigiert) (Pan et al., 1995). Der in dieser Arbeit beschriebene Effekt von Adenosin auf Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus passt damit von seiner Größe und Ausprägung her zu bereits in anderen Gehirnarealen beschriebenen Wirkungsweisen von Adenosin.

Grundsätzlich kommen vornehmlich A₁- und A_{2A}-Rezeptoren für die Vermittlung des Effekts in der Mitralzelle in Frage. A_{2B}- und A₃-Rezeptoren sind im Allgemeinen nur sehr schwach im Zentralnervensystem exprimiert (Stehle et al., 1992; Salvatore et al., 1993). Im *Bulbus olfactorius* konnte zudem bis jetzt noch keine Expression dieser Rezeptoren nachgewiesen werden. A_{2A}-Rezeptoren führen aufgrund einer Erhöhung des cAMP-Spiegels zumeist zu einer exzitatorischen Reaktion, die Aktivierung von A₁-Rezeptoren hingegen hat tendenziell eine inhibitorische Wirkung (Burnstock, 2013). Es ist daher am wahrscheinlichsten, dass der A₁-Rezeptor die beobachtete Hyperpolarisation der Mitralzelle verursachte. Tatsächlich zeigten Untersuchungen an A₁-Rezeptor-*knockout*-Mäusen, dass der hyperpolarisierende Effekt von Adenosin auf Mitralzellen A₁-Rezeptor-vermittelt ist. Das Fehlen des A₁-Rezeptors im gesamten Organismus führt bei Mäusen zu einer erhöhten Ängstlichkeit. Davon abgesehen weisen A₁-Rezeptor-*knockout*-Mäuse eine normale Physiognomie und Produktivität sowie ein normales Verhalten auf. Elektrophysiologisch wurde die fehlende Funktionalität des A₁-Rezeptors in der verwendeten *knockout*-Linie von Johansson et al. (2001) durch ein Ausbleiben von Adenosin-induzierter Inhibition im Hippocampus und durch eine

Theophyllin-induzierte Erhöhung glutamaterger Exzitation nachgewiesen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete *knockout*-Linie eignete sich daher für die elektrophysiologischen Untersuchungen zur neuromodulatorischen Wirkung des A₁-Rezeptors. Zusätzlich zu Untersuchungen an *knockout*-Mäusen wurde im Rahmen dieser Arbeit der hyperpolarisierende Effekt von Adenosin mit dem A₁-Rezeptor-spezifischen Antagonisten DPCPX und dem A₁-Rezeptor-Agonisten CPA untersucht. Diese Experimente bestätigen zusätzlich, dass Adenosin einen A₁-Rezeptor-vermittelten inhibitorischen Effekt auf Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus ausübt. A₁-Rezeptoren sind im gesamten Zentralnervensystem an der Modulation vielfältiger physiologischer Prozesse beteiligt. Beispielsweise modulieren sie die Erregbarkeit von Neuronen (Pan et al., 1995) und sind an der Induktion von synaptischer Plastizität beteiligt (zur Nedden et al., 2011). Zusätzlich ist der A₁-Rezeptor bei verschiedenen pathologischen Zuständen involviert; er wirkt beispielsweise bei hypoxischen Zuständen neuroprotektiv (Abbracchio und Burnstock, 1998). Dem vielfältigen modulatorischen Repertoire des A₁-Rezeptors kann auf Grundlage der Ergebnisse dieser Dissertation eine zusätzliche modulatorische Funktion im *Bulbus olfactorius* hinzugefügt werden.

Adenosin ist kein klassischer Neurotransmitter im eigentlichen Sinne, da er nicht in Vesikeln gelagert wird, nicht zu einem unidirektionalen Informationsaustausch führt und außerdem nicht vorrangig an Synapsen wirkt. Vielmehr erfüllt extrazelluläres Adenosin im Zentralnervensystem eine doppelte Rolle: es wirkt neuromodulatorisch und ist zusätzlich ein homöostatischer Modulator (Cunha, 2001; Fredholm et al., 2005). In sämtlichen Geweben und Organen reguliert extrazelluläres Adenosin den homöostatischen Zustand von Zellen. Viele pathologische Situationen führen zu einer Akkumulation von extrazellulärem Adenosin - eine Reduktion des zellulären Energiestatus zeigt sich in dem Verschieben des Verhältnisses von intrazellulärem ATP zu Adenosin. Bei einem Anstieg der intrazellulären Konzentration von Adenosin wird Adenosin durch Adenosintransporter in den Extrazellulärraum abgegeben und fungiert dort als Signal für ein Energiedefizit (McIlwain und Poll, 1986; Bischofberger et al., 1997). Im Nervensystem kommt zu dieser homöostatischen Funktion von extrazellulärem Adenosin ein neuromodulatorischer Aspekt hinzu. Teilweise überschneiden sich beide Funktionen, da eine Reduktion der Netzwerkaktivität oder Aktionspotentialfrequenz durch Adenosin in pathologischen Situationen, wie beispielsweise einem epileptischen Zustand, neuroprotektiv wirkt (Boison et al., 2013). Cunha (2001) vermutet, dass die subzelluläre Lokalisation von P1-Rezeptoren auf ihre primäre Funktion als Vermittler von Neuromodulation oder zur Regulation der Homöostase hindeuten könnte. So sind dendritische A₁-Rezeptoren vermutlich primär in neuromodulatorischen Prozessen involviert, somatische A₁-Rezeptoren hingegen vor allem an der homöostatischen Regulation des Neurons beteiligt. Eine homöostatische Funktion von Adenosin ist beispielsweise die Reduktion des ATP-Verbrauchs von Zellen. Wenn Neurone unter einem Energiedefizit leiden, könnte die Adenosin-vermittelte Reduktion der allgemeinen Exzitation zur Reduktion des ATP-Verbrauchs beitragen (Fredholm et al., 2005). In welchem zeitlichen Rahmen eine homöostatische Regulation des Zellmetabolismus eintritt sowie welche Adenosinkonzentrationen dabei eine Rolle spielen, ist bisher allerdings unklar. Da Adenosin in den Experimenten der vorliegenden Arbeit über das Versuchsbad appliziert wurde, ist davon auszugehen, dass prinzipiell neben synaptischen auch somatische P1-Rezeptoren und

darüber homöostatische Mechanismen aktiviert worden sein könnten. Allerdings kann vermutet werden, dass eine metabolische Umstellung der Zelle eine längere Verzögerung aufweist als der in dieser Arbeit beobachtete Effekt von Adenosin. Außerdem dürfte eine länger anhaltende erhöhte Adenosinkonzentration benötigt werden als die 30-sekündige Adenosin-Applikation in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, da auch pathologische Zustände, welche eine homöostatische Regulation erfordern, in der Regel länger andauern. Um experimentell synaptische von somatischen Effekten zu isolieren, könnte in einem nächsten Schritt Adenosin lokal appliziert werden, beispielsweise durch eine lokale Druckapplikation über Kapillaren oder *uncaging* von Adenosin. Ein photolytisch aktivierbares Adenosin ist zurzeit allerdings nicht kommerziell erhältlich.

Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten *in situ*-Hybridisierungen weisen eine Expression des A₁-Rezeptors in großen Neuronen in der Mitralzellschicht des *Bulbus olfactorius* nach, wobei es sich hierbei höchstwahrscheinlich um Mitralzellen handelt, da dort keine Somata anderer großer Neurone in dieser Zahl vorkommen. Die histologische Lokalisation des Rezeptors auf Mitralzellen und die elektrophysiologischen Messungen zeigen somit einheitlich, dass der A₁-Rezeptor in Mitralzellen vorhanden ist. Bei DIG-markierten *in situ*-Hybridisierungen wurde eine Detektion des Rezeptors nur auf Mitralzellen nachgewiesen. Bei der zwar zellulär schlechter auflösenden, aber insgesamt sensitiveren radioaktiven *in situ*-Hybridisierung ist eine schwache Detektion des A₁-Rezeptors im unteren Bereich der Glomerularschicht sowie bei vereinzelt Zellen in der äußeren plexiformen Schicht zu erkennen. Dieses Muster könnte neben einer Expression des A₁-Rezeptors in Mitralzellen auf eine Expression in *tufted*-Zellen hinweisen, die genau an diesen Positionen im *Bulbus olfactorius* zu finden sind. Dass bei der DIG-gekoppelten *in situ*-Hybridisierung keine A₁-Rezeptor-*mRNA* in diesen Zellen detektiert werden konnte, könnte daran liegen, dass die Methode weniger sensitiv ist als die radioaktive Methode (Jin und Lloyd, 1997). Dieser Faktor könnte durchaus kritisch sein, da aufgrund des G-Protein-gekoppelten Signalwegs des A₁-Rezeptors nur wenige Rezeptoren pro Zelle für eine effektive Signaltransduktion notwendig sind, sie folglich niedrig exprimiert werden und sich die Detektion entsprechend ohnehin an der Auflösungsgrenze bewegt. Des Weiteren wurden bei der *in situ*-Hybridisierung Kryoschnitte verwendet, die mit 16 µm nicht dicker sind als ein bis zwei Zellschichten. Da *tufted*-Zellen nur vereinzelt vorkommen und nicht wie Mitralzellen ein einheitliches Zellband bilden, kann es vorkommen, dass von Schnitt zu Schnitt unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden, da es nicht zu einer Anhäufung der Ziel-RNA kommt. Um in Bezug auf die Expression des A₁-Rezeptors in *tufted*-Zellen Sicherheit zu erlangen, könnte mit Hilfe von umfangreichen Schnittserien ein besserer Eindruck über eine Expression des A₁-Rezeptors in verstreuten Zellpopulationen gewonnen werden. Da *mRNA* nicht zwangsläufig zu einem funktionellen Protein translatiert wird, ist der direkte Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers die beste Methode zur histologischen Feststellung des Vorhandenseins eines Proteins in einer Zellpopulation. Antikörper müssen jedoch sehr sorgfältig getestet werden, um ihre Spezifität zu gewährleisten, da es häufig zu unselektiven Bindungen an andere Proteine kommt, die dann ein falsch-positives Signal hervorrufen (Eisenbarth, 1981). Im Rahmen dieser

Arbeit wurde ein gegen eine Epitop des A₁-Rezeptors gerichteter, polyklonaler Antikörper verwendet und zusätzlich ein TSA-Amplifikationssystem (Qian und Lloyd, 2003) zur Verbesserung der Detektion schwach exprimierter Proteine eingeführt. Verschiedene Kontrollexperimente sowie die Verwendung von A₁-Rezeptor-*knockout*-Mäusen zeigten jedoch eindeutig, dass es sich bei der Bindung des verwendeten Antikörpers nicht um eine spezifische Detektion des A₁-Rezeptors handelte. Bei der verwendeten *knockout*-Maus fehlt ein großer Bereich ab dem Exon 2 des A₁-Rezeptorgens. Der verwendete Antikörper bindet im Bereich der dritten intrazellulären Schleife, welche in dem nicht mehr vorhandenen Bereich des Exons 2 liegt (vgl. Anhang 2). Ein identisches Detektionsmuster bei Wildtyp- und *knockout*-Maus zeigte daher, dass die Bindung des Antikörpers unspezifisch war. Möglicherweise band der Antikörper zusätzlich auch korrekt, das Signal war jedoch zu schwach, um sich gegenüber der unspezifischen Hintergrundbindung abzuheben. Eine Verstärkung des A₁-Rezeptor-Antikörper-Signals mittels TSA-Signalamplifikation führte allerdings ebenfalls nicht zu einer spezifischen Lokalisation des A₁-Rezeptor-Proteins. Ein Ligandenbindungsverfahren unter der Verwendung des fluoreszenzgekoppelten A₁-Rezeptor-Agonisten PSB 1165 zeigte ebenfalls ein diffuses Bindungsmuster, und auch hier konnte die Spezifität der Bindung an den A₁-Rezeptor anhand von *knockout*-Tieren nicht bestätigt werden. Elektrophysiologische Daten lassen eine A₁-Rezeptor-aktivierende Bindung von PSB 1165 an den A₁-Rezeptor ebenso eher unwahrscheinlich erscheinen, da entweder keine oder eine von der von A₁-Rezeptor-Agonisten (Adenosin und CPA) abweichende elektrophysiologische Reaktion in Mitralzellen zu messen war. Eine Bindung von PSB 1165 an den A₁-Rezeptor wurde bislang noch nicht in Geweben, sondern nur in pharmakologischen Testsystemen geprüft. Im Rahmen dieser Dissertation wurde der A₁-Rezeptor demnach histologisch nicht auf Proteinebene lokalisiert, eine Expression der A₁-Rezeptor-*mRNA* in Mitralzellen wurde jedoch mittels *in situ*-Hybridisierungen nachgewiesen.

Radioaktive *in situ*-Hybridisierungen des A_{2A}-Rezeptors, die im Rahmen dieser Arbeit angefertigt wurden, jedoch nicht in den Ergebnissen aufgeführt sind, zeigten eine Expression von A_{2A}-Rezeptoren im Bereich der Mitralzellschicht und in der Körnerzellschicht sowie eine starke Expression im unteren periglomerulären Bereich (siehe Anhang 4). Eine hohe Expression des A_{2A}-Rezeptors im olfaktorischen Bulbus wurde auch von Kaelin-Lang et al. (1999) und Yang (2008) beschrieben. Gelegentlich kommen sowohl A₁- als auch A_{2A}-Rezeptoren nebeneinander auf einem Neuron oder sogar einer Synapse vor (Burnstock, 2009). Bei der Wirkung von Adenosin spielt die genaue Lokalisation der Adenosinfreisetzung daher eine große Rolle. Welcher Rezeptor aktiviert wird, hängt außerdem von dem basalen Adenosintonus und der Adenosinkonzentration direkt am jeweiligen Rezeptor ab. Durch das Vorhandensein von Adenosintransportern auf Astrozyten oder ATP abbauender Enzyme direkt um den jeweiligen Rezeptor herum kann die Adenosinkonzentration beispielsweise lokal moduliert werden (Zimmermann, 2000). Eine funktionelle Wirkung von A_{2A}-Rezeptoren im olfaktorischen Bulbus wurde an Astrozyten bereits nachgewiesen (Doengi et al., 2008). Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass auch A_{2A}-Rezeptoren eine modulatorische Wirkung auf Neurone des olfaktorischen Bulbus ausüben. So kommt es in dem A₁-Rezeptor-Antagonisten DPCPX zu einer Erhöhung der

Aktionspotentialfrequenz durch Adenosin. Dieser Effekt ist auch bei einer Adenosin-Applikation bei A_1 -Rezeptor-*knockout*-Mäusen zu beobachten, zudem bewirkt Adenosin bei A_1 -Rezeptor-*knockout*-Mäusen einen leichten Einstrom in Mitralzellen. Da eine Beteiligung von A_{2B+3} -Rezeptoren aus zuvor bereits beschriebenen Gründen wenig wahrscheinlich ist, kann davon ausgegangen werden, dass A_{2A} -Rezeptoren funktionell in Mitralzellen exprimiert werden. A_{2A} -Rezeptoren haben in der Regel einen exzitatorischen Effekt auf Neurone, indem sie über G_S -Proteine den cAMP-Spiegel erhöhen (Burnstock et al., 2011). In cholinergen, striatalen Nervenendigungen vermittelt der A_{2A} -Rezeptor beispielsweise eine verstärkte Acetylcholin-Freisetzung *in vivo* (Kurokawa et al., 1996). Eine A_{2A} -Rezeptor-vermittelte Erhöhung der Aktionspotentialfrequenz, wie in dieser Arbeit bei A_1 -Rezeptor-*knockout*-Mäusen beobachtet, wurde zuvor noch nicht beschrieben und deutet auf eine interessante Doppelfunktion von Adenosin in Mitralzellen hin: Eine Aktivierung von A_1 -Rezeptoren führt zu einer verminderten, eine Aktivierung von A_{2A} -Rezeptoren zu einer erhöhten Aktionspotentialfrequenz. Ein derartiger antagonistischer Effekt von A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren wurde auch in anderen Gehirnanlagen beobachtet. Im Hippocampus kommt es beispielsweise zu einer von der Balance zwischen A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren abhängigen Modulation von Gamma-Oszillationen (Pietersen et al., 2009). Ein weiteres Beispiel der komplexen A_1 - und A_{2A} -Rezeptor-vermittelten Modulation von neuronalen Netzwerken findet sich in striatalen Projektionsneuronen, in denen Adenosin abhängig von lokal exprimierten A_1 - oder A_{2A} -Rezeptoren zu einer Regulation von Calciumströmen beiträgt (Hernandez-Gonzalez et al., 2014). Es ist zu vermuten, dass die in der vorliegenden Arbeit als A_1 -Rezeptor-vermittelt beschriebenen Effekte die A_{2A} -Rezeptor-vermittelten Effekte maskierten, da der Effekt des A_{2A} -Rezeptors erst bei Inhibition des dominanten A_1 -Rezeptor-vermittelten Effekts zum Vorschein kam. Es ist daher sinnvoll, weitere Untersuchungen der A_1 -Rezeptor-vermittelten Wirkung von Adenosin in Anwesenheit eines A_{2A} -Rezeptor-Blockers durchzuführen oder alternativ einen A_1 -Rezeptor-spezifischen Agonisten zu verwenden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der A_1 -Rezeptor-Agonist CPA verwendet, bei dem sich jedoch herausstellte, dass der ausgelöste hyperpolarisierende Effekt zwar von der Größe her identisch mit dem Effekt von Adenosin war, der Effekt jedoch oftmals nicht reversibel war. Da dies Nachteile für die Versuchsdurchführung und Auswertung birgt, wurde CPA in dieser Arbeit nicht standardmäßig zur Untersuchung des A_1 -Rezeptors verwendet. Es gibt allerdings noch weitere Agonisten für den A_1 -Rezeptor, die möglicherweise zu diesem Zweck eingesetzt werden könnten. Welcher Rezeptor in Mitralzellen in welchem Maße von Adenosin aktiviert wird, ist dabei vermutlich abhängig von lokalen Adenosinkonzentrationen und den homöostatischen Zuständen der Zellen. Untersuchungen des Zusammenspiels von A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren erfordern daher sensitive Experimente. Die Rolle der A_{2A} -Rezeptoren wurde in dieser Arbeit nicht vertiefend untersucht, sollte aber bei der Beurteilung der purinergen Neuromodulation im *Bulbus olfactorius* nicht außer Acht gelassen werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine funktionelle Expression von A_1 -Rezeptoren in Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus in dieser Arbeit zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Eine Aktivierung von A_1 -Rezeptoren führt dabei zu einer reversiblen Hyperpolarisation der Mitralzellmembran. Zusätzlich scheinen jedoch auch A_{2A} -Rezeptoren einen modulatorischen Einfluss auf Mitralzellen auszuüben.

4.3 A₁-Rezeptoren vermitteln eine Hyperpolarisation von Mitralzellen über die Öffnung eines Kaliumkanals

A₁-Rezeptoren modulieren unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden. Klassischerweise kommt es zur Aktivierung von G_{ij/o}-Proteinen. Deren Alpha-Untereinheit vermittelt eine Inhibition der Adenylatcyclase, was einen verringerten cAMP-Spiegel zur Folge hat und einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität von Neuronen ausübt (Burnstock et al., 2011). Adenosin kann jedoch auch vielfältige andere Signalkaskaden aktivieren. Eine Aktivierung der Beta/Gamma-Untereinheit eines G-Proteins durch A₁-Rezeptoren kann beispielsweise eine Aktivierung von K_{ir}-Kanälen zur Folge haben (Linden, 1991). Des Weiteren kann Adenosin sowohl zu einer Inhibition des Inositol-Phosphat-Weges über G_q-Proteine als auch zu einer Stimulation über G_s-Proteine führen (Linden, 1991; Dickenson und Hill, 1998). Welcher Signalweg aktiviert wird, hängt u.a. von der Expressionsdichte des Rezeptors, der extrazellulären Adenosinkonzentration und weiteren intrazellulären Faktoren ab. Die Verwendung verschiedener A₁-Rezeptor-Agonisten kann außerdem zur Aktivierung unterschiedlicher G-Proteine beitragen, was vermutlich über unterschiedliche Konformationen des Rezeptors durch Bindung der Agonisten zu erklären ist (Cordeaux et al., 2004). Zusätzlich zu der beschriebenen G-Protein-abhängigen Aktivierung kann Adenosin auch G-Protein-unabhängig neuromodulatorisch wirksam werden. In Purkinjoneuronen beispielsweise vermittelt Adenosin eine Reduktion der Glutamatausschüttung über die Bildung von mGluR-A₁-Rezeptor-Komplexen (Tabata et al., 2007).

Der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Adenosin-vermittelten Hyperpolarisation von Mitralzellen liegt vermutlich die G-Protein-abhängige Modulation eines Ionenkanals zugrunde. Um herauszufinden, welche Ionenleitfähigkeit hierdurch moduliert wird, wurden in dieser Arbeit diesbezüglich unterschiedliche Parameter untersucht. Grundsätzlich kann die Hyperpolarisation der Mitralzellmembran durch Adenosin unter den gegebenen Bedingungen entweder durch das Öffnen eines Kaliumkanals, bei dem Kalium seinem Umkehrpotential folgend aus der Zelle herausfließt, durch die Öffnung eines Chloridkanals und ein dadurch verursachtes Einströmen von Chlorid, oder durch das Schließen eines unspezifischen Kationenkanals erfolgen. Das Umkehrpotential von Chlorid liegt bei den verwendeten Lösungen bei -61 mV. Im Mittel lag das gemessene Ruhemembranpotential von Mitralzellen bei ca. -45 mV. Dieser Wert entspricht nach Korrektur des *liquid junction potentials* einem Ruhemembranpotential von etwa -60 mV. Das errechnete Umkehrpotential von Chlorid läge damit sehr nah beim kalkulierten Ruhemembranpotential von Mitralzellen. Das Öffnen von Chloridkanälen würde unter diesen Umständen nicht zu einer Hyperpolarisation führen. Da jedoch das tatsächliche Umkehrpotential von Chlorid um den Ionenkanal ggf. vom errechneten Umkehrpotential abweichen kann und das *liquid junction potential* ebenfalls nur näherungsweise bestimmt werden kann, könnten Chloridkanäle trotzdem zu einer Hyperpolarisation führen. Letztendlich kann eine maßgebliche Beteiligung von Chloridkanälen an der Adenosin-aktivierten Leitfähigkeit jedoch ausgeschlossen werden, da das Verschieben des errechneten Chloridumkehrpotentials auf -16 mV keinen Einfluss auf die Adenosin-induzierte Hyperpolarisation hatte. Das Schließen von unspezifischen Kationenkanälen

würde in der Mitralzelle zu einer Hyperpolarisation führen, zum Beispiel liegt das Umkehrpotential von HCN-Kanälen bei ca. -30 bis -40 mV, das von TRP-Kanälen sogar noch positiver (Aponte et al., 2006; Vennekens et al., 2012). Es käme daher bei einem Ruhemembranpotential von -60 mV bei geöffneten Kanälen zu einem permanenten Einstrom von Kationen. Das Schließen der Kanäle würde dazu führen, dass dieser positive Ladungseinstrom entfiel und die Zelle dadurch hyperpolarisierte. Über eine Bestimmung der Membranleitfähigkeit lässt sich zeigen, ob Ionenkanäle durch Adenosin geöffnet oder geschlossen werden. Durch Adenosin kommt es in Mitralzellen zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit. Dies bedeutet, dass Ionenkanäle geöffnet werden. Das Schließen eines unspezifischen Kationenkanals erscheint daher als Auslöser für die beobachtete Hyperpolarisation unwahrscheinlich.

Jeder Ionenkanal hat ein bestimmtes Umkehrpotential, welches sich aus seiner Hauptleitfähigkeit bzw. der gemischten Leitfähigkeit für unterschiedliche Ionen ergibt. Über eine Bestimmung des Umkehrpotentials kann auf die an der Leitfähigkeit beteiligten Ionen geschlossen werden. Experimentell konnte für die Adenosin-vermittelte Leitfähigkeit ein Umkehrpotential von -86 mV bestimmt werden. Dieser Wert liegt nah bei dem für Kalium errechneten Umkehrpotential von -88 mV (bei den in diesem Experiment verwendeten Lösungen) und deutet somit auf eine Adenosin-vermittelte Kaliumleitfähigkeit hin. Eine noch exaktere Messung des Umkehrpotentials in *current clamp* wäre zwar möglich gewesen, indem die durch Adenosin evozierte negative Verschiebung des Membranpotentials vor den Testsprüngen artifiziell wieder auf das ursprüngliche Potential gebracht worden wäre, wie bei Arrigoni et al. (2006) geschehen. Dadurch wäre der Einfluss von Hyperpolarisations-aktivierten Kanälen ausgeschlossen worden. Die mittlere Hyperpolarisation durch Adenosin war jedoch mit 1,6 mV so gering, dass nicht davon auszugehen ist, dass durch diese Potentialdifferenz ein anderes Kanalrepertoire angesprochen worden wäre als unter Kontrollbedingungen. Zusätzlich ist das artifizielle Regulieren des Membranpotentials nicht unproblematisch und erschien daher bei der geringen Hyperpolarisation durch Adenosin nicht zielführend. Zudem lag auch das Umkehrpotential der Adenosin-induzierten Leitfähigkeit, das mittels linearer Regression der Ausströme (bei Haltepotentialen von -30 und -70 mV) festgestellt wurde, nahe dem Umkehrpotential für Kalium. Die Ermittlung der Größe des Adenosin-induzierten Ausstroms in Abhängigkeit vom Haltestrom bestätigt zudem die Vermutung, dass Kaliumleitfähigkeiten durch Adenosin moduliert werden: Ein Entfernen vom ermittelten Kaliumumkehrpotential äußerte sich in einem vergrößerten Ausstrom und deutet damit zusätzlich auf eine Kaliumleitfähigkeit hin. Eine Modulation von Kaliumleitfähigkeiten durch Adenosin wurde in anderen Gehirnarealen bereits beschrieben. Eine Charakterisierung des Adenosin-induzierten Stroms in *Locus coeruleus*-Neuronen ergab beispielsweise ein Umkehrpotential von -110 mV, was nah beim Umkehrpotential von Kalium (-115 mV) lag und daher, wie in der vorliegenden Arbeit auch, auf das Adenosin-vermittelte Öffnen eines Kaliumkanals hindeutet (Pan et al., 1995). Clark et al. (2009) wiesen ebenfalls ein Umkehrpotential eines Adenosin-vermittelten Stroms nahe ihres Kaliumumkehrpotentials von -80 mV in retinalen Ganglienzellen nach.

Es zeigte sich, dass eine Substitution von Kaliumionen durch Cäsiumionen in der Intrazellulärlösung den Adenosin-vermittelten Ausstrom drastisch reduzierte. Der im Mittel

verbleibende Effekt von etwa 30 % der Kontrolle könnte darauf zurück zu führen sein, dass Kaliumionen ständig aus dem Extrazellulärmedium wieder in die Zelle hineingelangen und dadurch die Substitution mit Cäsiumionen nicht vollständig erfolgte. Insbesondere bei der komplexen dendritischen Organisation der Mitralzelle ist es denkbar, dass es in den kleinsten Volumina der feinsten Ausläufer durch die Aktivität der Natrium-Kalium-Pumpe, die Kaliumionen in die Zelle hineinpumpt, zu nennenswerten Kaliumkonzentrationen kommt. Es ist daher nicht verwunderlich, dass der Effekt eines Kaliumausstroms nicht vollständig durch die intrazelluläre Substitution von Kalium verhindert wurde. Zusammengefasst lassen sowohl die Bestimmung der Adenosin-induzierten Leitfähigkeit als auch die Ermittlung des Umkehrpotentials derselben und zusätzlich der Ausschluss von Chloridströmen es sehr wahrscheinlich erscheinen, dass der A₁-Rezeptor in Mitralzellen eine Kaliumleitfähigkeit moduliert.

Da die A₁-Rezeptor-induzierte Hyperpolarisation von Mitralzellen vermutlich durch eine Kaliumleitfähigkeit vermittelt wird, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Kaliumkanäle auf eine Beteiligung am Adenosin-Effekt hin untersucht. Eine Übersicht der bei Säugetieren vorkommenden Kaliumkanäle im Zusammenhang mit der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Pharmakologie findet sich in Tabelle 8 im Anhang dieser Arbeit. Vereinfacht lassen sich die Kaliumkanäle der Säugetiere in die Gruppen der 2-P-Kaliumkanäle, der einwärts-rectifizierenden-Kaliumkanäle, der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle und der calciumaktivierten Kaliumkanäle einteilen (Alexander et al., 2013):

2-P-Kaliumkanäle weisen eine charakteristische Struktur aus zwei Poren und vier Transmembrandomänen auf. Viele Kaliumleckströme in Neuronen werden durch diese Kanäle verursacht, die Kanäle tragen dadurch zur Regulation des Ruhemembranpotentials bei. Sie können u.a. durch pH-Wert-Änderungen, eine mechanische Stimulation, aber auch über G-Proteine aktiviert werden (Bayliss und Barrett, 2008; Tian et al., 2014). Die klassischen Kaliumkanalblocker TEA und 4-AP inhibieren diese Kanäle nicht, sie können aber teilweise durch das Narkotikum Halothan inhibiert werden (Alexander et al., 2013). Insgesamt sind diese Kanäle bis jetzt jedoch nicht umfassend untersucht worden, denn das pharmakologische Repertoire zu ihrer Untersuchung ist eingeschränkt und die einzelnen Kanäle können teilweise nicht gut pharmakologisch differenziert werden. Eine Modulation von 2-P-Kaliumkanälen durch Adenosin wurde zwar bisher noch nicht beschrieben, da die Kanäle im Rahmen dieser Arbeit jedoch pharmakologisch nicht untersucht wurden, kommen sie theoretisch als Interaktionspartner des A₁-Rezeptors in Mitralzellen des *Bulbus olfactorius* infrage. Dass sie zudem durch unterschiedliche Signalwege moduliert werden können, macht die 2-P-Kanäle als Interaktionspartner des A₁-Rezeptors in Mitralzellen interessant.

Einwärts-rectifizierende Kaliumkanäle besitzen vier Transmembrandomänen und halten u.a. ein stabiles, negatives Membranpotential in Neuronen aufrecht. Negativ des Kaliumumkehrpotentials weisen sie eine mittlere bis starke Einwärts-Rektifikation auf, was ihre Namensgebung erklärt. Sie werden u.a. durch PIP₂, intrazelluläres ATP oder G-Proteine moduliert (Tian et al., 2014). Insbesondere bei der Untergruppe der G-Protein-gekoppelten einwärts rectifizierenden

Kaliumkanäle (GIRK) wurde schon eine Modulation durch A_1 -Rezeptoren beschrieben. In cholinergen Neuronen des magnozellulären präoptischen Nucleus beispielsweise vermittelt Adenosin eine GIRK-basierte Inhibition. (Arrigoni et al., 2006). Eine Inhibition der GIRK mit Barium führte in den Studien von Arrigoni et al. (2006) dazu, dass kein Adenosin-abhängiger Effekt mehr festzustellen war. In CA1-Neuronen des Hippocampus führt Adenosin zu einer GIRK-vermittelten Hyperpolarisation (Haas und Greene, 1984). mRNA von GIRK-Kanälen wurde außerdem im Mitralzellsoma nachgewiesen und immunhistologische Daten deuten auf eine Expression des Kanals in Mitralzeldendriten hin (Iizuka et al., 1997). Extrazelluläres Barium blockiert alle einwärts-rektifizierenden Kaliumkanäle (Hinino, 2010), es kann daher davon ausgegangen werden, dass bei der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration von 1 mM Barium alle einwärts-rektifizierenden Kaliumkanäle blockiert waren. Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit im *Bulbus olfactorius* durchgeführten Experimenten verursachte das Einwaschen von Barium eine anhaltende Depolarisation der Mitralzelle, was auf eine konstitutive Aktivität von einwärts-rektifizierenden Kaliumkanälen in Neuronen des *Bulbus olfactorius* hinweist. Die Adenosin-induzierte Hyperpolarisation wurde jedoch durch Barium nicht verringert. Da eine Inhibition von einwärts-rektifizierenden Kaliumkanälen den Adenosin-Effekt demnach nicht beeinflusst, können einwärts-rektifizierende Kaliumkanäle als Interaktionspartner des A_1 -Rezeptors in Mitralzellen ausgeschlossen werden.

Um eine mögliche Beteiligung weiterer Kaliumkanäle zu untersuchen wurden im Rahmen dieser Dissertation außerdem die Breitband-Kaliumkanalblocker TEA und 4-AP eingesetzt. Diese blockieren zuverlässig einen Großteil der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Kaczorowski und Garcia, 1999). Die Gruppe der spannungsabhängigen Kaliumkanäle besitzt sechs Transmembrandomänen. Zu ihnen zählen u.a. die *delayed rectifier*-Kanäle, die an der Repolarisation der Zellmembran während des Aktionspotentials beteiligt sind. Des Weiteren beinhalten sie die Großgruppe der calciumabhängigen Kaliumkanäle sowie die Gruppen der EAG- und KCNQ-Kanäle. Die Gruppe der KCNQ-Kanäle (Kv7.1-5) beinhaltet u.a. solche, die den M-Strom vermitteln. Diese Kanäle sind durch XE 991 und teilweise auch durch 4-AP blockierbar (Alexander et al., 2013). Pharmakologisch konnten KCNQ-Kanäle in dieser Arbeit als Interaktionspartner des A_1 -Rezeptors in Mitralzellen ausgeschlossen werden, da eine Inhibition von KCNQ-Kanälen den hyperpolarisierenden Effekt von Adenosin über A_1 -Rezeptoren nicht verhinderte. EAG-Kanäle (Kv10.1-12.3) modulieren u.a. die Erregbarkeit von Neuronen und weisen ein charakteristisches Strommuster mit einem geringen Ausstrom während der Plateauphase und einem deutlichen Ausstrom in der Repolarisationsphase auf. Durch Methansulfonanilide wie beispielsweise E-4031 können die Kanäle spezifisch blockiert werden (Schwarz und Bauer, 2004). Wie von Hirdes et al. (2009) beschrieben, exprimieren Mitralzellen funktionelle Erg-Kanäle, welche zur Familie der EAG-Kanäle gehören. Untersuchungen in kultivierten Mitralzellen zeigen, dass eine Inhibition der Kanäle zu einer Kaliumkonzentrations-abhängigen Depolarisation der Mitralzellmembran im Bereich des Ruhemembranpotentials führt. Eine Öffnung der Kanäle durch Adenosin könnte daher zu einer Hyperpolarisation der Membran führen. Um zu untersuchen, ob diese Kanäle in den Adenosin-vermittelten Effekt auf Mitralzellen involviert sind, wurden Experimente mit dem Erg-

Kanal-Blocker E-4031 durchgeführt. Da bei den Experimenten in dieser Arbeit Kaliumkonzentrationen verwendet wurden, bei denen der Effekt einer Membrandepolarisation durch E-4031 voraussichtlich nicht sichtbar gewesen wäre (Hirdes et al., 2009), trat durch E-4031 wie zu erwarten keine Depolarisation auf. Es kann bei einer verwendeten Konzentration des Blockers von 10 μM jedoch davon ausgegangen werden, dass der Blocker wirksam war und in den Experimenten eine effektive Blockierung der Erg-Kanäle vorlag (Liu et al., 1996; Niculescu et al., 2013). Ein Blockieren der Erg-Kanäle hatte allerdings keinen Einfluss auf die Adenosin-vermittelte Hyperpolarisation. In Mitralzellen ist eine Modulation von Erg-Kanälen durch den A_1 -Rezeptor daher vermutlich auszuschließen. In der Gruppe der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle sind die Kv5.1-6.4- und Kv8.1-9.3-Untereinheiten als Homomere nicht funktionell und coassemblieren mit anderen Kv-Kanälen (insbesondere Kv2-Untereinheiten), deren Funktion sie modifizieren (Alexander et al., 2013). Sie sind dann gegenüber dem entsprechenden Blocker der heteromeren Untereinheiten sensibel und können dementsprechend ebenfalls pharmakologisch als Interaktionspartner des A_1 -Rezeptors ausgeschlossen werden.

Calciumabhängige Kaliumkanäle (K_{Ca}) werden durch intrazelluläres Calcium bzw. indirekt über Calcium-modulierte Proteine wie Calmodulin reguliert. Sie werden eingeteilt in *maxi*, *intermediate* und *small conductance*- K_{Ca} (Kaczorowski und Garcia, 1999; Tian et al., 2014). Kca1.1 und Kca4.1.-5.1 (*maxi conductance*- K_{Ca}) sind durch TEA inhibierbar, *small* und *intermediate conductance*- K_{Ca} hingegen nicht (Alexander et al., 2013). Letztere können daher anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Pharmakologie nicht als Interaktionspartner des A_1 -Rezeptors in Mitralzellen ausgeschlossen werden. *Small conductance*- K_{Ca} öffnen sich bei steigenden intrazellulären Calciumkonzentrationen und regulieren dadurch die Erregbarkeit von Neuronen in Abhängigkeit des *second messengers* Calcium (Stocker, 2004). Adenosin hyperpolarisiert retinale Ganglienzellen durch die Modulation von GIRKs und *small conductance*- K_{Ca} anteilig zu je etwa 50 % (Clark et al., 2009). Eine Modulation dieser Kanäle könnte entsprechend den Mechanismus der Adenosin-vermittelten Hyperpolarisation in Mitralzellen darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl der in Mäusen vorkommenden Kaliumkanäle pharmakologisch als Interaktionspartner des A_1 -Rezeptors in Mitralzellen ausgeschlossen (vgl. Tabelle 8). Eine Untersuchung der verbleibenden Kaliumkanalgruppen könnte schließlich den oder die Interaktionspartner des A_1 -Rezeptors in Mitralzellen aufdecken. Die Gruppe der 2-P-Kaliumkanäle könnte zu einem großen Teil durch die Verwendung von Halothan untersucht werden. Eine Eingrenzung des Effekts auf einzelne Kanäle dieser Gruppe wäre jedoch pharmakologisch kompliziert, da keine ausreichend spezifischen Blocker zur Unterscheidung der Kanäle vorliegen. Dennoch wäre auch ein Nachweis der 2-P-Kanalfamilie insgesamt interessant, da bisher noch keine Interaktion des A_1 -Rezeptors mit 2-P-Kaliumkanälen nachgewiesen wurde. *Small* und *intermediate conductance*- K_{Ca} stellen die zweite Gruppe von Kaliumkanälen dar, die potentiell noch als Interaktionspartner des A_1 -Rezeptors in Mitralzellen in Frage käme. Eine pharmakologische Untersuchung dieser Kanäle wäre beispielsweise mit den *small conductance*- K_{Ca} -Blockern Apamin oder U1684 bzw. mit dem Blocker für *intermediate conductance*- K_{Ca} TRAM 34 möglich.

Grundsätzlich können Leitfähigkeiten in Neuronen auch durch elektrogene Transporter oder Ionenpumpen entstehen, da sie Ionen über die Zellmembran umverteilen. Allerdings ist sehr wenig über Mechanismen bekannt, bei denen extrazelluläre Signalmoleküle die Aktivität von Transportern regulieren. Glutamattransporter können beispielsweise über den cAMP-Spiegel und die Proteinkinase A moduliert werden (O'Shea, 2002), welche wiederum über A₁-Rezeptoren moduliert werden können (Linden, 1991). Transporter oder Ionenpumpen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht auf einen möglichen A₁-Rezeptor-vermittelten modulatorischen Effekt auf das Membranpotential von Mitralzellen hin untersucht. Sollte eine Untersuchung der verbleibenden, bislang nicht pharmakologisch untersuchten Kaliumkanäle jedoch nicht zu einer Identifikation des Interaktionspartners des A₁-Rezeptors führen, könnten Transporter und Ionenpumpen zur Untersuchung in Betracht gezogen werden.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass extrazelluläres Adenosin in Mitralzellen des olfaktorischen Bulbus über die Aktivierung von A₁-Rezeptoren zur Öffnung eines Kaliumkanals führt, der jedoch nicht zu den klassischerweise von A₁-Rezeptoren modulierten Kaliumkanälen gehört und ggf. in den Gruppen der 2-P-Kaliumkanäle oder *small* und *intermediate conductance*-K_{Ca} zu finden ist.

4.4 Adenosin reduziert die neuronale Netzwerkaktivität des *Bulbus olfactorius*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine A₁-Rezeptor-vermittelte Wirkung von Adenosin auf Mitralzellen detailliert untersucht. Mitralzellen spielen eine zentrale Rolle im neuronalen Netzwerk des olfaktorischen Bulbus. Es stellt sich daher die Frage, inwieweit die Modulation von Mitralzellen durch Adenosin das gesamte Netzwerk des Bulbus beeinflusst. In den auf eine Mitralzelle konvergierenden synaptischen Eingängen spiegelt sich ein Großteil der synaptischen Aktivität des gesamten Netzwerks wider. Der *Bulbus olfactorius* ist in Säulen organisiert, wobei periglomeruläre Interneurone, Mitral- und Körnerzellen um bzw. unter einem Glomerulus untereinander synaptisch verschaltet sind und eine Säule bilden. Quervernetzt sind diese Säulen durch synaptische Kontakte mit weiteren Interneuronen wie Parvalbumin-positiven Interneuronen und *short axon*-Zellen sowie über die langen lateralen Dendriten der Mitralzellen (Willhite et al., 2006). Außerdem erhält die Mitralzelle über Axonkollaterale zusätzlich Eingänge von anderen Mitralzellen (Nicoll, 1971). Da Mitralzellen aus den verschiedensten Bereichen des olfaktorischen Bulbus und über eine Vielzahl von Zelltypen synaptische Eingänge erhalten, kann die Anzahl synaptischer Eingänge in Mitralzellen als ein Maß für die neuronale Netzwerkaktivität im *Bulbus olfactorius* genutzt werden. Um möglichst viele synaptische Eingänge zu erfassen, ist es hierbei wichtig, bei den Experimenten eine für diesen Zweck geeignete Intrazellulärlösung zu verwenden, die es erlaubt, sowohl inhibitorische als auch exzitatorische synaptische Ströme aufzuzeichnen. Die verwendete CsCl-basierte Intrazellulärlösung ermöglicht die Messung von EPSCs und IPSCs, da das Umkehrpotential für Chlorid bei 0 mV liegt und daher weit genug vom Haltepotential entfernt,

um Chloridströme aufzeichnen zu können. Zusätzlich ermöglichten die enthaltenen Cäsiumionen eine verbesserte Messung weiter vom Soma entfernter synaptischer Eingänge, da Kaliumleckströme vermindert wurden. Unter diesen Bedingungen reduziert Adenosin die Anzahl in Mitralzellen gemessener synaptischer Eingänge deutlich um etwa 40 %. Ein gewisser Teil des mit der Mitralzelle verbundenen neuronalen Netzwerks scheint also durch Adenosin direkt oder indirekt inhibiert zu werden.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen lässt die Reduktion der synaptischen Eingänge in Mitralzellen keine Aussage darüber zu, in welcher Weise Adenosin das neuronale Netzwerk des olfaktorischen Bulbus beeinflusst und ob die verringerte synaptische Aktivität auf eine Reduktion GABAerger oder glutamaterger Eingänge zurückzuführen ist. Experimente von Dr. Daniela Hirnet mit dem A_1 -Rezeptor-Antagonisten DPCPX zeigen, dass die Reduktion der Netzwerkaktivität durch Adenosin A_1 -Rezeptor-vermittelt ist (pers. Mitteilung, Dr. Hirnet).

GABA und Glutamat sind die zwei wichtigsten Neurotransmitter im olfaktorischen Bulbus. Glutamat vermittelt über die Aktivierung ionotroper NMDA- und AMPA/Kainat-Rezeptoren einen Einstrom von Kationen. In Mitralzellen finden sich zudem die metabotropen Glutamatrezeptoren $mGluR_{1,2,7+8}$ (Schoppa und Westbrook, 1997). Durch die Verwendung der spezifischen AMPA- und NMDA-Rezeptor-Blocker NBQX und D-AP V kann ein Großteil der in Mitralzellen messbaren EPSCs blockiert werden. Es bleiben dann vorwiegend GABA-vermittelte Ströme, wobei das Vorkommen vereinzelter $mGluR$ -vermittelter EPSCs nicht ausgeschlossen werden kann. EPSCs können weitgehend durch eine Verwendung von Gabazine isoliert werden. Bei der Betrachtung des glutamatergen Anteils der in Mitralzellen gemessenen synaptischen Aktivität fällt auf, dass nur sehr vereinzelt synaptische Eingänge auftreten. Eine Großzahl der synaptischen Eingänge auf die Mitralzelle scheint daher GABA-vermittelt zu sein. Die Verminderung der Inhibition im gesamten Präparat durch den Einsatz von Gabazine führte jedoch zu einem vermehrten Auftreten sogenannter *population bursts*. Diese werden durch *external tufted*-Zellen angetrieben (De Saint Jan et al., 2009). Eine Untersuchung der *population bursts* lässt daher Rückschlüsse auf eine Modulation von *external tufted*-Zellen durch Adenosin zu. Eine Applikation von Adenosin hatte jedoch weder auf den Abstand einzelner *population bursts* zueinander noch auf die Fläche der *population bursts* einen Effekt. Diese Ergebnisse deuten daher darauf hin, dass *external tufted*-Zellen nicht durch Adenosin moduliert werden. Um einen Effekt von Adenosin auf *external tufted*-Zellen jedoch endgültig ausschließen zu können, sollten weitere Experimente durchgeführt werden. *External tufted*-Zellen könnten beispielsweise elektrophysiologisch abgeleitet und dahingehend untersucht werden, ob Adenosin einen direkten Einfluss auf diesen Zelltyp hat. Da insgesamt zu wenige sEPSCs in Gabazine auftraten, um Änderungen ihrer Frequenz untersuchen zu können, kann anhand der Untersuchungen in dieser Arbeit keine Aussage zu dem Einfluss von Adenosin auf die Anzahl glutamaterger, synaptischer Aktivität getroffen werden.

Bei der Betrachtung von isolierten, GABAergen synaptischen Eingängen fällt auf, dass die absolute Zahl an synaptischen Eingängen unter Einfluss der ionotropen Glutamatrezeptorblocker deutlich reduziert wurde (vgl. Abbildung 32). Diese deutliche Reduktion könnte darauf zurückzuführen

sein, dass der rekurrente Anteil an inhibitorischen Eingängen wegfällt, wenn die glutamaterge Erregung unterdrückt wird. Dies deutet darauf hin, dass ein großer Anteil der synaptischen Eingänge in Mitralzellen in den Experimenten dieser Arbeit auf direkter oder indirekter rekurrenter Inhibition basiert. Um für weiterführende Untersuchungen die GABAergen Eingänge vollständig von exzitatorischem Einfluss zu isolieren, sollten zudem metabotrope Glutamatrezeptoren und P2-Rezeptoren blockiert werden, da Schoppa und Westbrook (1997) metabotrope glutamaterge synaptische Eingänge in kultivierten Mitralzellen nachwiesen und im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein exzitatorischer Einfluss von P2Y₁-Rezeptoren auf Mitralzellen gezeigt wurde. Es wäre jedoch nicht auszuschließen, dass bei einer Verhinderung der gesamten glutamatergen Übertragung auch keine spontanen inhibitorischen Eingänge in Mitralzellen mehr auftreten würden. Da der Kreislauf aus Inhibition und Exzitation sehr komplex ist, wäre es bei weiteren Experimenten daher vermutlich zielführender, die Wirkung von Adenosin im neuronalen Netzwerk des Bulbus durch gezielte Experimente an verschiedenen Zelltypen zu untersuchen, als die Quelle der durch Adenosin modulierten synaptischen Eingänge in Mitralzellen weiter einzugrenzen. Da *in situ*-Hybridisierungen in dieser Arbeit offen lassen, ob (*external*) *tufted*-Zellen A₁-Rezeptoren besitzen, wäre die elektrophysiologische Untersuchung von (*external*) *tufted*-Zellen in dieser Hinsicht interessant. Auch wenn davon auszugehen ist, dass ein großer Teil der synaptischen Eingänge in Mitralzellen GABAerg ist, da nur vereinzelt spontane glutamaterge Eingänge unter Gabazine auftreten, kann jedoch nicht automatisch davon ausgegangen werden, dass Adenosin die Aktivität inhibitorischer Neurone reduziert. Insgesamt legen die Ergebnisse dieser Arbeit nah, auch im Hinblick auf die rekurrente synaptische Organisation des olfaktorischen Bulbus, dass die Reduktion synaptischer Eingänge in Mitralzellen durch Adenosin auf eine verminderte Erregung von Mitralzellen zurückzuführen ist, was sich wiederum in einer reduzierten Erregung inhibitorischer Neurone widerspiegelt. Dies reduziert schließlich die sIPSC-Frequenz. Eine Reduktion der Frequenz von EPSCs durch A₁-Rezeptoren wurde bereits in einigen Gehirnarealen beobachtet. So kommt es über A₁-Rezeptoren beispielsweise zu einer Reduktion des glutamatergen *input* auf cholinerge Vorderhirnneurone (Hawryluk et al., 2012). In supraoptischen Neuronen führt Adenosin, A₁-Rezeptor-vermittelt, durch eine Hyperpolarisation zu einer Reduktion synaptischer Eingänge (Ponzio und Hatton, 2005). Durch eine Lokalisation von A₁-Rezeptoren auf inhibitorischen Neuronen kann es jedoch auch zu einer verminderten Frequenz von sIPSCs kommen, wie Li und Henry (2000) in Interneuronen des Hippocampus zeigten. Hier kam es sowohl zu einer Reduktion der Erregbarkeit dieser Neurone, vermittelt durch ihre Hyperpolarisation, als auch zu einer Reduktion synaptischer exzitatorischer Eingänge auf diese Neurone. Li et al. (2011) wiesen außerdem eine Reduktion von EPSC- und IPSC-Miniaturströmen in stellaren Neuronen der Schicht II des entorhinalen Cortex durch A₁-Rezeptoren nach und schlossen auf eine Reduktion der glutamatergen und GABAergen Übertragung gleichermaßen.

Die synaptische Organisation des *Bulbus olfactorius* zeichnet sich dadurch aus, dass etwa 80 % der vorkommenden Synapsen rekurrenter Natur sind (Shepherd, 1972). Es stellt sich daher die Frage,

ob und, wenn ja, auf welche Weise Adenosin die rekurrente Inhibition im *Bulbus olfactorius* moduliert. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Experimente zeigen, dass Adenosin die rekurrente Inhibition auf Mitralzellen um 50 % (physiologische ACSF) bzw. 35 % (ACSF ohne Mg^{2+} und mit TTX und CTZ) verringert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Adenosin-vermittelten Reduktion der Anzahl an sPSCs, da ein Großteil der sPSCs in Mitralzellen vermutlich auf eine direkte oder indirekte rekurrente Inhibition zurückzuführen sind. Ein Blockieren ionotroper Glutamatrezeptoren beispielsweise führt zu einer drastischen Reduktion der Anzahl an IPSCs in Mitralzellen. Prinzipiell gibt es drei naheliegende Mechanismen, die eine Reduktion der rekurrenten Inhibition in Mitralzellen auslösen könnten: Erstens eine Reduktion der Glutamatfreisetzung der Mitralzellen, zweitens eine verminderte Sensitivität von GABA-Rezeptoren auf Mitralzellen und drittens eine Reduktion der GABA-Freisetzung aus Körnerzellen, hervorgerufen entweder durch eine Inhibition der Körnerzellen oder eine verminderte Sensitivität ihrer Glutamatrezeptoren.

Eine Reduktion der GABA-Freisetzung über A_1 -Rezeptoren seitens der Körnerzelle ist wenig wahrscheinlich, da *in situ*-Hybridisierungen keine Expression des A_1 -Rezeptors auf Körnerzellen nachweisen konnten. Zusätzlich zeigen elektrophysiologische Messungen von Kristina Schulz im Rahmen ihrer von mir angeleiteten Masterarbeit, dass Adenosin in Anwesenheit von TTX keinen direkten Effekt auf das Membranpotential von Körnerzellen ausübt (siehe Masterarbeit von Tina Schulz, 2014, ‚Einfluss von Adenosin auf die dendrodendritische Synapse zwischen Mitral- und Körnerzellen im *Bulbus olfactorius* der Maus‘). Sie werden folglich nicht auf dieselbe Weise durch Adenosin inhibiert wie Mitralzellen. A_{2A} -Rezeptoren konnten mittels *in situ*-Hybridisierungen zwar auf Körnerzellen nachgewiesen werden, eine Aktivierung von A_{2A} -Rezeptoren würde jedoch vermutlich zu einer Exzitation der Zelle führen (Burnstock, 2007b), was zu einer erhöhten GABA-Freisetzung führen und dadurch die rekurrente Inhibition tendenziell verstärken würde. Inwieweit andere Interneurone wie Parvalbumin-positive Interneurone, die einen starken Einfluss auf die Erregbarkeit der Mitralzellen haben (Kato et al., 2013), durch A_1 -Rezeptoren moduliert werden, ist nicht bekannt und sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

Untersuchungen der Autoexzitation von Mitralzellen zeigen, dass Adenosin die Glutamausschüttung der Mitralzelle vermindert. Daher ist vermutlich zumindest ein Teil der durch Adenosin verringerten rekurrenten Inhibition auf eine reduzierte Glutamatfreisetzung durch Mitralzellen zurückzuführen. Eine präsynaptische Reduktion der Glutamatfreisetzung durch Adenosin über A_1 -Rezeptoren wurde bereits mehrfach bei anderen Zelltypen beschrieben (Lupica et al., 1992; Brundage und Dunwiddie, 1996; Hargus et al., 2009; Rau et al., 2014). Da Adenosin in anderen Hirngebieten eine präsynaptische Freisetzung von Glutamat vermindert, wäre dies auch ein plausibler Mechanismus, um die durch Adenosin reduzierte rekurrente Inhibition im *Bulbus olfactorius* zu erklären. Experimente von Kristina Schulz zeigen des Weiteren, dass Adenosin in Mitralzellen zu einem verminderten Calciumeinstrom bei depolarisierenden Spannungssprüngen führt. Eine Reduktion des intrazellulären Calciumspiegels ist der am weitesten verbreitete Mechanismus, der zu einer reduzierten Freisetzung von Neurotransmittern führt (Wu und Saggau, 1997). Auch im Zusammenhang mit dem A_1 -Rezeptor wurde dieser Mechanismus bereits

beschrieben. In striatalen Projektionsneuronen beispielsweise führte die Aktivierung von A_1 -Rezeptoren zu verminderten spannungsabhängigen Calciumströmen (Hernandez-Gonzalez et al., 2014). Eine Reduktion des durch rücklaufende Aktionspotentiale ausgelösten Calciuminfluxes in Mitralzeldendriten wäre daher ein plausibler Mechanismus zur Erklärung der reduzierten Glutamatfreisetzung der Mitralzelle.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen einen mehrfachen neuromodulatorischen Effekt von Adenosin im *Bulbus olfactorius* vermuten. Zum einen kam es durch Adenosin zu einer A_1 -Rezeptor-vermittelten Hyperpolarisation der Mitralzellmembran. Dieser Effekt alleine reduziert bereits die Erregbarkeit von Mitralzellen, was zu einer verringerten synaptischen Aktivität im gesamten olfaktorischen Bulbus führt. Des Weiteren zeigte eine Untersuchung der Autoexzitation in Mitralzellen, dass Adenosin eine Glutamatausschüttung in Mitralzellen, vermutlich aufgrund eines verringerten Calciuminfluxes, reduziert und dadurch zusätzlich die rekurrente Inhibition im Netzwerk vermindert. Fredholm et al. (2005) charakterisiert drei primäre Wirkungsweisen von Adenosin in Neuronen: 1. eine präsynaptische Aktivierung von A_1 -Rezeptoren, die die Glutamatausschüttung verringern, 2. eine postsynaptische Lokalisation von A_1 -Rezeptoren in Dendriten, die spannungsgesteuerte Calciumkanäle modulieren und 3. eine Lokalisation von A_1 -Rezeptoren auf dem Soma und Dendritenansätzen, die die Aktivierung von Kaliumleitfähigkeiten vermitteln, die Zelle dadurch hyperpolarisieren und ihre Erregbarkeit modulieren. Mitralzellen scheinen alle drei beschriebenen A_1 -Rezeptor-vermittelten Wirkungsweisen von Adenosin in ihrem modulatorischen Repertoire zu vereinen.

Insgesamt führen die Ergebnisse dieser Arbeit zu folgender, in Abbildung 43 schematisch zusammengefassten Hypothese, auf welche Weise Adenosin die neuronale Aktivität im *Bulbus olfactorius* A_1 -Rezeptor-vermittelt modulieren könnte:

- [I] Adenosin aktiviert A_1 -Rezeptoren auf Mitralzellen.
- [II] Es kommt zur Öffnung von Kaliumkanälen in Mitralzellen, was zu einem Ausstrom von Kalium führt und die Mitralzelle hyperpolarisiert. Die Hyperpolarisation verringert die Erregbarkeit der Mitralzelle.
- [III] Gleichzeitig vermittelt Adenosin einen verminderten Calciumeinstrom, was die Glutamatfreisetzung aus der Mitralzelle reduziert und dadurch zusätzlich die rekurrente Inhibition im Netzwerk vermindert.
- [IV] Insgesamt führt Adenosin auf diese Weise zu einer verringerten Aktivität des gesamten neuronalen Netzwerks des olfaktorischen Bulbus.

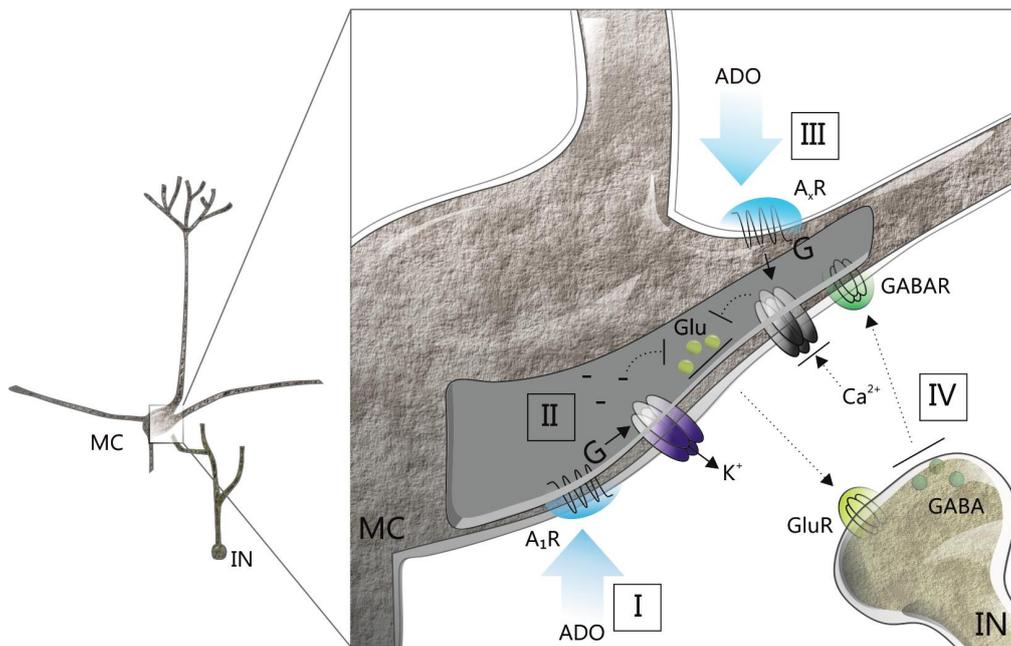


Abbildung 43 | Hypothese zur neuromodulatorischen Wirkung von Adenosin im Bulbus olfactorius. Links: Übersicht einer Mitralzelle (MC) und eines Interneurons (IN), rechts: Detail des Mitralzellsoma mit Dendritenansätzen und einer synaptischen Endigung eines Interneurons (IN). [I] Adenosin bindet an A₁-Rezeptoren auf Mitralzellen, daraufhin es kommt zu einer Öffnung von Kaliumkanälen, was die MC hyperpolarisiert [II], gleichzeitig wird durch Adenosin ein Calciumeinstrom reduziert [III], was insgesamt zu einer verminderten Glutamate Ausschüttung und einer verringerten Erregbarkeit der MC führt und dadurch die Aktivität des neuronalen Netzwerks reduziert [IV].

4.5 Physiologische Relevanz einer purinergen Neuromodulation durch ATP, ADP und Adenosin im *Bulbus olfactorius* der Maus

Im Rahmen dieser Dissertation wurden neuromodulatorische Effekte von ATP, ADP und Adenosin auf Neurone des olfaktorischen Bulbus nachgewiesen. Bei den untersuchten Mäusen der Altersgruppe zwischen ein und zwei Wochen weisen die meisten Neurone des Netzwerks des olfaktorischen Bulbus, insbesondere die Mitralzellen, bereits weitgehend adulte Charakteristika auf (Blanchart et al., 2006). Obwohl davon auszugehen ist, dass grundlegende Prozesse im juvenilen olfaktorischen Bulbus ähnlich ablaufen wie im adulten Tier, sollte bei der Übertragung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf Vorgänge der Geruchsverarbeitung im adulten Tier jedoch beachtet werden, dass noch nicht alle neuronalen Elemente des olfaktorischen Bulbus in der untersuchten Altersgruppe voll ausgereift sind (Shafa et al., 1981; Wang et al., 2005; Blanchart et al., 2006). Auch die Expression und Wirkungsweise von purinergen Rezeptoren und Ektonukleotidasen kann im Laufe der Entwicklung einer differenziellen Regulation unterliegen. Beispielsweise führt ATP in Neuronen der Medulla bei 0-4 Tage alten Mäusen zu einem deutlichen Einstrom, bei etwas älteren, 15-21 Tage alten Tieren hingegen ist kaum noch ein Einstrom feststellbar (Zhu und Kimelberg, 2001). In Astrozyten des cerebralen Cortex von Ratten kommt es zu einer entwicklungsabhängigen Expression von P2Y₁- und P2Y₂-Rezeptoren; die Expression des

P2Y₁-Rezeptors wechselt hier von einer glialen zu einer neuronalen Expression (Zimmermann, 2006; Amadio et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit gelten daher zunächst insbesondere für die untersuchte Altersklasse. Vor einer Übertragung der Hypothesen auf adulte Tiere sollten grundlegende Experimente, wie beispielsweise die direkte Wirkung von Adenosin auf die Mitralzelle und die Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses durch Adenosin, in adulten Tieren wiederholt werden, um auszuschließen, dass sich die Wirkung von Purinen im *Bulbus olfactorius* von adulten und juvenilen Mäusen unterscheidet.

Caged-ATP wurde bei im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten in einer Endkonzentration von 100 μM verwendet. Es ist allerdings nicht möglich vollständig nachzuvollziehen, welche Konzentration an freiem ATP nach dem *uncaging* letztlich am Rezeptor vorlag. Schon eine exakte Bestimmung der ATP-Konzentration unter physiologischen Bedingungen im Wirkungsbereich der Rezeptoren im perizellulären Raum ist schwierig und die Konzentrationen hängen wahrscheinlich stark von den Versuchsumständen ab. Die physiologische ATP-Konzentration im Gewebe bewegt sich vermutlich im unteren nanomolaren Bereich, wobei direkt um die extrazelluläre Membran herum lokal wahrscheinlich auch deutlich höhere Konzentrationen auftreten können, die unter Umständen sogar eine lokal begrenzte, tonische Aktivierung von P2-Rezeptoren zur Folge haben könnten (Falzoni et al., 2013). Die verwendete Konzentration von 100 μM *caged compound* bewegt sich daher vermutlich ungefähr im Rahmen des physiologisch relevanten Bereichs. Adenosin liegt im Gewebe unter physiologischen Bedingungen in Konzentrationen von 50-200 nM vor (Latini und Pedata, 2001). Die Konzentration von Adenosin an seinem Wirkungsort am Rezeptor ist jedoch schwer zu bestimmen (Dunwiddie und Diao, 1994; Latini und Pedata, 2001). Durch elektrische Stimulation im *Stratum radiatum* der CA1-Region des Hippocampus wurde eine Adenosinfreisetzung von 250 nM erreicht (Wall und Dale, 2013). Elektrophysiologische Studien, welche den Effekt von Adenosin auf Neurone untersuchten, verwendeten beispielsweise 10-100 μM Adenosin zur extrazellulären Perfusion von Hirnschnitten (Haas und Greene, 1984; Pan et al., 1995; Bannon et al., 2014). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden Adenosinkonzentrationen von 100-200 μM verwendet. Bei Experimenten von Dr. Daniela Hirnet hatte die extrazelluläre Perfusion von 50 μM Adenosin einen vergleichbaren Effekt wie die Perfusion von 100 μM Adenosin, bei 100 μM schien der Effekt jedoch verlässlicher auslösbar zu sein (pers. Mitteilung, Dr. Hirnet). Welche Adenosinkonzentration bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten letztendlich im Gewebe am Rezeptor vorlag, kann nicht nachvollzogen werden und hängt vermutlich von der Tiefe der untersuchten Zellen im Gewebe, der Konzentration Adenosin abbauender Enzyme und dem Vorhandensein von Nukleosid-Transportern direkt im Bereich des Rezeptors ab. Astrozyten beispielsweise können Adenosintransporter aufweisen, welche extrazelluläres Adenosin innerhalb von Sekunden aus dem synaptischen Spalt entfernen (Boison et al., 2010). Zudem trägt die Aktivität der Adenosin-Deaminase, welche Adenosin zu Inosin abbaut, zu einer Beendigung der extrazellulären Wirkung von Adenosin bei. Im Gehirn von Ratten ist die Aktivität der Adenosin-Deaminase interessanterweise im olfaktorischen Bulbus am höchsten (Geiger und Nagy, 1987). Es kann daher nicht direkt von der verwendeten experimentellen Adenosinkonzentration auf die

Endkonzentration am Rezeptor geschlossen werden. Da mit den verwendeten Konzentrationen jedoch ein zuverlässiger und reversibler Effekt erzeugt werden konnte, scheint die experimentell gewählte Konzentration adäquat gewesen zu sein.

Um herauszufinden, welchen Einfluss Adenosin auf die Integration von Geruchsreizen im Glomerulus haben könnte, wurde im Rahmen dieser Dissertation der *output* von Mitralzellen in Abhängigkeit von einer Stimulation von ORN-Axonon, welche einen Geruchsreiz imitiert, untersucht.

Die durchgeführte Untersuchung der Latenz der Synapse zwischen ORNs und Mitralzellen zeigte, dass Adenosin keinen Einfluss auf die Schnelligkeit dieser Synapse ausübt und daher eine präsynaptische Modulation dieser Synapse unwahrscheinlich ist. Von Dr. Hirnet durchgeführte Experimente an transgenen Mäusen, die in ORNs SynaptopHluorin exprimieren und somit eine Visualisierung der Vesikelfreisetzung in ORNs mittels eines Fluoreszenzanstiegs ermöglichen, bestätigen dieses Ergebnis. Es konnte kein Einfluss von Adenosin auf die Vesikelfreisetzung von ORNs festgestellt werden. Adenosin scheint demnach nicht präsynaptisch an ORNs zu wirken.

Bei einer Aktivierung der ORNs durch einen Geruchsreiz kommt es zu einer direkten synaptischen Erregung von ORNs zu Mitralzellen oder, abhängig von der Reizstärke, zu einer indirekten Erregung der Mitralzelle über *external tufted*-Zellen und einer daraus resultierenden Aktivierung des glomerulären Netzwerks zur Erregung von Mitralzellen in Form von *feedforward excitation* (Ennis et al., 1996). Mitralzellen integrieren als primäre Projektionsneurone des olfaktorischen Bulbus (gemeinsam mit *tufted*-Zellen) die einlaufenden Informationen. Ihr *output* in Form von Aktionspotentialen spiegelt daher die durch Vorgänge im olfaktorischen Bulbus gefilterte und prozessierte Geruchsinformation wider, die in höhere Hirnzentren gelangt. Es lassen sich zwei Phasen des stimulationsabhängigen Mitralzell-*output* beschreiben. Die Stromantwort der Mitralzelle in Reaktion auf eine ORN-Stimulation stellt sich ebenfalls biphasisch dar, mit einer initialen, schnellen Komponente von ca. 10 ms Länge und einer länger (mehrere 100 ms) andauernden Phase (Najac et al., 2011). Bezogen auf den *output* der Mitralzelle ist davon auszugehen, dass die erste Phase nach der ORN-Stimulation auf einen direkten, Glutamat-vermittelten Einstrom zurückgeführt werden kann. Betrachtet man die erste Phase des *output*, die direkt auf den Stimulus folgt, war in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten keine Modulation durch Adenosin feststellbar. In der zweiten Phase des ORN-stimulationsabhängigen Mitralzell-*output*, der vermutlich auf eine indirekte Erregung der Mitralzelle von Seiten des glomerulären Netzwerks zurückführbar ist, hatte Adenosin hingegen einen signifikanten Einfluss. Adenosin reduzierte die zweite Phase des geruchsreizabhängigen *output* von Mitralzellen um etwa 40 %. Auch der spontane, ORN-unabhängige *output* von Mitralzellen wurde von Adenosin um etwa 40 % reduziert. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der zuvor getroffenen Beobachtung, dass Adenosin die Aktivität des Netzwerks im Bulbus reduziert. Durch die verringerte Mitralzell-Erregbarkeit, die sich auf das gesamte Netzwerk überträgt, lässt sich die Beobachtung der reduzierten basalen

Aktionspotentialfrequenz in Mitralzellen und eine verminderte Aktivierung des glomerulären Netzwerks plausibel erklären.

Die Reduktion der Spontanaktivität zusammen mit der gleichbleibenden direkten ORN-stimulationsabhängigen Aktivität (erste Phase) führt zu einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis für ORN-vermittelten Mitralzell-*output*. Das Signal-Rausch-Verhältnis ist ein wichtiger Parameter für ein System der Reizweiterleitung (Okawa et al., 2010). Je klarer das Reizsignal aus dem Rauschen der Basisaktivität heraussteht, desto besser und genauer kann dieses Signal dechiffriert werden. Im Hippocampus der Ratte beispielsweise führt Adenosin zu einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis, indem nach einer Stimulation aktivierte Afferenzen Adenosin freisetzen und dadurch die Aktivität anderer Afferenzen reduzieren (Mitchell et al., 1993). Im *Bulbus olfactorius* könnte Adenosin eine ähnliche Aufgabe in der Glomerularschicht ausüben, indem es nach einem Geruchsreiz die Spontanaktivität reduziert und dadurch das Signal-Rausch-Verhältnis für den Geruchsreiz verbessert.

Im olfaktorischen Bulbus ist bisher nur eine Stelle aktiver ATP-Freisetzung bekannt: ATP wird aus Axonterminalen der ORNs freigesetzt und könnte damit eine Quelle für extrazelluläres Adenosin darstellen. Die Lokalisation extrazellulären Adenosins und ATPs spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation seiner modulatorischen Aktivität. Ob es noch weitere Quellen für extrazelluläres Adenosin im Bulbus gibt, ist nicht bekannt, aber zu vermuten, da die Hyperpolarisation der Mitralzelle durch Adenosin vermutlich zumindest teilweise auch auf somatische A_1 -Rezeptoren zurückzuführen ist (Cunha, 2001; Fredholm et al., 2005) und außerdem A_{2A} -Rezeptoren in der Körnerzellschicht zu finden sind. Eine alleinige Bereitstellung von extrazellulärem Adenosin durch eine Freisetzung von ATP in der Glomerularschicht scheint daher unwahrscheinlich. Weitere Quellen für extrazelluläres ATP/Adenosin könnten beispielsweise Astrozyten darstellen, die ATP als Gliotransmitter freisetzen (Lohr et al., 2014). Des Weiteren kann Adenosin theoretisch von allen Zelltypen über Nucleosidtransporter in den Extrazellulärraum abgegeben werden (Parkinson et al., 2011). Lovatt et al. (2012) zeigten sogar, dass ATP im Cortex *in vivo* keine Quelle für neuromodulatorisch wirksames Adenosin darstellt, da die 5'-Ektonucleotidase, das Enzym, das vorrangig extrazelluläres AMP zu Adenosin abbaut, dort *in vivo* kaum aktiv ist. Stattdessen vermuten Lovatt et al. (2012), dass Adenosin im Rahmen eines *feedback*-Mechanismus bei neuronaler Aktivität direkt freigesetzt wird. Die Herkunft extrazellulären Adenosins im *Bulbus olfactorius* ist jedoch noch unklar.

Da eine vesikuläre Freisetzung von ATP bei einer starken Stimulation von ORN-Axonon in den Glomeruli stattfindet, kommt das in dieser Arbeit angewandte, lokale *uncaging* von ATP der physiologischen Wirkungsweise von ATP vermutlich relativ nahe. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass auch bei einer Freisetzung von ATP durch einen starken Geruchsreiz eine ähnliche Reaktion des neuronalen Netzwerks auftritt wie in den Ergebnissen dieser Arbeit beschrieben. Doengi et al. (2008) machten die Beobachtung, dass es bei einem einzelnen Stimulus der ORN-Axone nicht zu einer Freisetzung von ATP kam. Dies könnte auch erklären, warum bei

der Untersuchung des stimulationsabhängigen Mitralzell-*output* in dieser Arbeit bei der schwachen Stimulation der ORN-Axone kein endogener Einfluss von Adenosin auf den *output* von Mitralzellen festgestellt wurde. Das von Doengi et al. (2008) verwendete Stimulationsprotokoll, mit dem eine ATP-Freisetzung aus ORN-Axonterminalen ausgelöst wurde, war mit einer Frequenz von 50 Hz bei 30-60 V für 15 s relativ intensiv verglichen mit dem in dieser Arbeit verwendeten Einzelstimulus von 50 μ A für 100 μ s. Möglicherweise führen auch *in vivo* nur starke Geruchsreize zu einer ATP-Freisetzung aus ORN-Axonterminalen. Die Expression der Rezeptoren in der Glomerularschicht und die spezifischen Reaktionen von Neuronen auf eine experimentelle Applikation von ATP oder Adenosin lassen vermuten, dass eine ATP-Freisetzung auch unter physiologischen Bedingungen Neurone modulieren würde. Es ist sogar möglich, dass die differenzielle ATP-Ausschüttung bei schwachen bzw. starken Geruchsreizen einen Mechanismus darstellt, um starke Geruchsreize gegenüber schwachen, niederschweligen hervorzuheben.

Des Weiteren ist es vorstellbar, dass es durch einen länger andauernden, starken Geruchsreiz zu einer Anhäufung von Adenosin im aktiven Glomerulus kommt. Eine erhöhte Konzentration von extrazellulärem Adenosin könnte dann als eine Art ‚Kurzzeitgedächtnis‘ dienen, welches eine vorhergehende oder länger andauernde erhöhte Aktivität des Glomerulus anzeigt. Ein wichtiges Charakteristikum der Geruchswahrnehmung ist der Prozess der Habituation (auch als *olfactory fatigue* bezeichnet), der dazu führt, dass Gerüche nach einer gewissen Zeit nur noch abgeschwächt oder gar nicht mehr wahrgenommen werden (Wilson, 2009). Eine kurzzeitige Habituation (ms - s) findet schon in den ORNs statt, indem der CNG-Kanal, der die Geruchstransduktion initial vermittelt, durch eine Calcium-Calmodulin-abhängige Konformationsänderung gehemmt wird (Menini, 1999). Ein weiterer kurzzeitiger Mechanismus der Habituation wird in höheren Hirnzentren über eine verstärkte mGluR-vermittelte Erregung inhibitorischer Interneurone erreicht, die auf Pyramidenzellen des piriformen Cortex projizieren (Wilson, 2009). Längerfristige neuronale Habituationsmechanismen, welche von ihrer Dauer her habituationsbedingten Verhaltensänderungen entsprechen, sind vermutlich hauptsächlich auf NMDAR-abhängige Prozesse im *Bulbus olfactorius* zurückzuführen, die letztendlich zu einem verminderten geruchsabhängigen Mitralzell-*output* führen (Chaudhury et al., 2010). Es wäre vorstellbar, dass eine Akkumulation von Adenosin in einem über einen längeren Zeitraum aktiven glomerulären Netzwerk einen Beitrag zu einem verminderten Mitralzell-*output* bei einem andauernden Geruchsreiz führen könnte. Um diese Hypothese experimentell zu überprüfen, könnte der Einfluss von A₁-Rezeptoren auf die Geruchs-Habituation untersucht werden. Hierzu könnten beispielsweise ähnliche Experimente wie bei Chaudhury et al. (2010) an A₁-Rezeptor-*knockout*-Mäusen durchgeführt werden, die *in vivo* den *output* von Mitralzellen in Abhängigkeit von Geruchsstimulationen untersuchten.

Zusammenfassend lässt sich vor dem Hintergrund dieser Arbeit folgende Hypothese zur purinergen Modulation des neuronalen Netzwerks im *Bulbus olfactorius* aufstellen: Bei einem starken Geruchsreiz führt die Freisetzung von ATP aus ORNs in Glomeruli, neben der basalen

Ausschüttung von Glutamat, zu einer zusätzlichen Aktivierung periglomerulärer, exzitatorischer Neurone. In diesem ersten Schritt führt ATP so über die Aktivierung von P2Y₁-Rezeptoren auf glutamatergen Neuronen zu einer verstärkten Aktivierung des Netzwerks. Gleich darauf kommt es durch den enzymatischen Abbau von ATP zu einer erhöhten Adenosinkonzentration im aktivierten Glomerulus. Über A₁-Rezeptoren führt Adenosin dann, zeitlich leicht versetzt zur exzitatorischen Wirkung von ATP, zu einer Hyperpolarisation von Mitralzellen und gleichzeitig zu einer verringerten Glutamatausschüttung von Mitralzellen in Reaktion auf verminderte Calciumeinströme an dendrodendritischen Synapsen. Dies wiederum führt zu einer verringerten Erregung des gesamten Netzwerks. Da die direkte ORN-vermittelte Erregung von Mitralzellen im Gegensatz dazu nicht durch Adenosin reduziert wird, verbessert sich durch Adenosin in der Folge das Signal-Rausch-Verhältnis für den Geruchsreiz gegenüber der Hintergrundaktivität. Die Abschwächung der Netzwerkaktivität durch Adenosin führt außerdem zu einer Beendigung der geruchsreizabhängigen Exzitation und damit zu einer zeitlichen Begrenzung der Aktivität des aktivierten Glomerulus. Durch dieses komplexe Zusammenspiel von ATP und Adenosin könnte ATP so zunächst zu einer Verstärkung der Exzitation durch den Geruchsreiz führen und Adenosin im Anschluss das Signal-Rausch-Verhältnis verbessern und zu einer zeitlichen Begrenzung des Signals beitragen. Abbildung 44 fasst die beschriebene Hypothese zur Wirkung von ATP und Adenosin im olfaktorischen Bulbus schematisch zusammen:

1. [I] Ein starker Geruchsreiz führt zu einer Freisetzung von ATP im aktivierten Glomerulus.
- [II] ATP vermittelt über P2Y₁-Rezeptoren eine Aktivierung periglomerulärer, glutamaterger Neurone wie *external tufted*-Zellen und möglicherweise auch von Mitralzellen.
- [III] Es kommt zu einer P2Y₁-vermittelten Glutamatausschüttung der aktivierten periglomerulären Neurone. Dies führt wiederum zu einer Erregung von Mitralzellen und gleichzeitig zur Erregung von weiteren Neuronen, die dann inhibitorisch auf Mitralzellen wirken. Zunächst überwiegt jedoch die Exzitation und es kommt zu einem Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels im Mitralzell-*tuft*.
2. [IV] Das freigesetzte ATP wird über extrazelluläre Enzyme zügig zu Adenosin abgebaut, das nun seinerseits modulatorisch aktiv wird.
- [V] Adenosin bindet an A₁-Rezeptoren auf Mitralzellen, Kaliumkanäle öffnen sich und es kommt zu einer Hyperpolarisation der Mitralzelle. Dies reduziert die spontane, von Mitralzellen angetriebene Netzwerkaktivität im gesamten *Bulbus olfactorius*.
- [VI] Zusätzlich hemmt Adenosin über eine Reduktion des Calciumeinstroms die Glutamatfreisetzung aus Mitralzellen, was ebenfalls zu einer Beendigung exzitatorischer Kreisläufe im olfaktorischen Bulbus beiträgt.
- [VII] Adenosin führt schließlich zu einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis für die Geruchsinformation sowie zu einer zeitlichen Begrenzung der Erregung und dadurch insgesamt zu einer erhöhten Präzision der Geruchsverarbeitung.

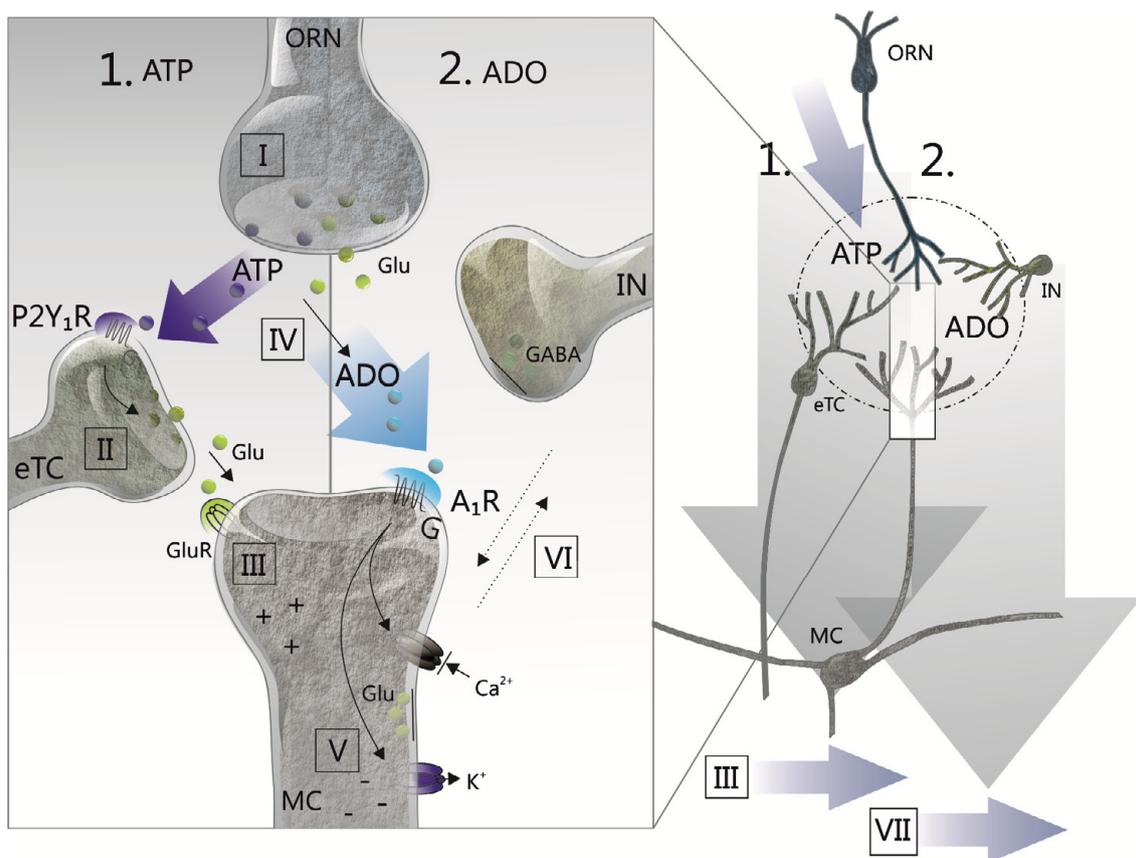


Abbildung 44 | Hypothese zur modulativen Wirkung von ATP und Adenosin im neuronalen Netzwerk des Bulbus olfactorius. Links: vergrößerter Ausschnitt des glomerulären Netzwerks, rechts: Übersicht über das Netzwerk und schematische Darstellung der zeitlich versetzten Wirkung von ATP (1) und Adenosin (2). 1: ATP wird aus ORN-Axonterminalen freigesetzt [I] und aktiviert P2Y₁-Rezeptoren auf external tufted-Zellen (eTC) [II]. [III] Mitralzellen (MC) werden daraufhin stärker erregt. 2: ATP wird enzymatisch zu Adenosin abgebaut [IV], hyperpolarisiert A₁-Rezeptor-vermittelt Mitralzellen (V) und führt zu einem verminderten Calciumeinstrom in Mitralzellen, was gemeinsam zu einer Verringerung der exzitatorischen Kreisläufe im Glomerulus führt und damit auch die Exzitation von GABAergen Interneuronen (IN) vermindert [VI]. [VII] Adenosin verbessert dadurch das Signal-Rausch-Verhältnis für die Geruchsinformation und beendet die Exzitation des glomerulären Netzwerks. Die direkte glutamaterge Übertragung zwischen ORN und Mitral- bzw. external tufted-Zelle wurde der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

Auf die beschriebene Weise könnte eine purinerge Neuromodulation zur verbesserten Informationsverarbeitung im olfaktorischen Bulbus beitragen. Eine längerfristig erhöhte Adenosinkonzentration im aktiven Glomerulus könnte zudem zu einem Mechanismus der Geruchs-Habituation beitragen. Ein besseres Verständnis des modulativen Repertoires der purinergen Neuromodulation im *Bulbus olfactorius* wäre allerdings nötig, um die komplexen Vorgänge umfassend zu verstehen. Eine lokale Applikation spezifischer Agonisten für verschiedene P1- und P2-Rezeptoren bei elektrophysiologischen Experimenten könnte beispielsweise helfen, die einzelnen Komponenten der purinergen Neuromodulation im *Bulbus olfactorius* differenzierter zu untersuchen. Ein weiterer Schritt bei der Aufklärung der Funktion von ATP, ADP und Adenosin im olfaktorischen Bulbus wäre außerdem die Untersuchung der beobachteten Effekte *in vivo*. Auch

wäre es wichtig zu wissen, ob *in vivo* eine von der Stärke des Geruchsreizes abhängige Freisetzung von ATP stattfindet oder nicht. Die Konzentration von ATP im Gewebe könnte beispielsweise über ATP-sensitive Elektroden bestimmt werden. Mittels extrazellulärer Mehrkanalelektroden könnte außerdem die neuronale Aktivität in unterschiedlichen Schichten des *Bulbus olfactorius* bei Wildtyp- und A_1 -Rezeptor-*knockout*-Mäusen untersucht werden, während die Maus mittels eines Olfaktometers verschiedene Geruchsstimuli erhält. Dieses Experiment könnte die Bedeutung des A_1 -Rezeptors für Aktivitätsmuster in unterschiedlichen Schichten des olfaktorischen Bulbus *in vivo* aufzudecken. Mit Hilfe von Verhaltensexperimenten an A_1 -Rezeptor-*knockout*-Mäusen könnte zudem die Bedeutung des A_1 -Rezeptors für die Qualität der Geruchsdiskriminierung untersucht werden. Dazu könnten Geruchsdiskriminationstests dienen, wie beispielsweise der *odor sensitivity test*, der auch feine Unterschiede in der Geruchsdiskriminationsfähigkeit aufdecken kann (Witt et al., 2009). Dabei ist eine hohe Sensitivität des Versuchsaufbaus wichtig, da Neuromodulatoren wie Adenosin generell an der Feinregulation von Prozessen beteiligt sind und daher sensitive Nachweismethoden zu ihrer Untersuchung benötigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden ATP/ADP und Adenosin erstmals als Modulatoren der neuronalen Verarbeitung im olfaktorischen Bulbus beschrieben. Es wurde gezeigt, dass eine Freisetzung von ATP in der Glomerularschicht zu einer $P2Y_1$ -Rezeptor-vermittelten Erhöhung der neuronalen Netzwerkaktivität führt und dass die Modulation von Mitralzellen durch Adenosin einen effektiven Wirkmechanismus zur Regulation der Netzwerkaktivität im *Bulbus olfactorius* darstellt. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass eine differenzielle Modulation der geruchsreizabhängigen Mitralzellaktivität zu einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis für Geruchsreize gegenüber der Spontanaktivität führt. Die Ergebnisse dieser Dissertation deuten zudem insgesamt darauf hin, dass das Zusammenspiel der neuromodulatorischen Wirkung von ATP und Adenosin zur Verarbeitung von Geruchsinformationen im *Bulbus olfactorius* beiträgt.

5. Literaturverzeichnis

- Abbracchio MP, Burnstock G (1998) Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Japanese journal of pharmacology* 78:113-145.
- Alexander SP, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Catterall WA, Spedding M, Peters JA, Harmar AJ, Collaborators C (2013) *The Concise Guide to Pharmacology 2013/14: ion channels*. *British journal of pharmacology* 170:1607-1651.
- Amadio S, Vacca F, Martorana A, Sancesario G, Volonte C (2007) P2Y1 receptor switches to neurons from glia in juvenile versus neonatal rat cerebellar cortex. *BMC developmental biology* 7:77.
- Angelo K, Margrie TW (2011) Population diversity and function of hyperpolarization-activated current in olfactory bulb mitral cells. *Scientific Reports* 1:50.
- Aponte Y, Lien CC, Reisinger E, Jonas P (2006) Hyperpolarization-activated cation channels in fast-spiking interneurons of rat hippocampus. *The Journal of physiology* 574:229-243.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81:728-739.
- Arrigoni E, Chamberlin NL, Saper CB, McCarley RW (2006) Adenosine inhibits basal forebrain cholinergic and noncholinergic neurons in vitro. *Neuroscience* 140:403-413.
- Bannon NM, Zhang P, Ilin V, Chistiakova M, Volgushev M (2014) Modulation of synaptic transmission by adenosine in layer 2/3 of the rat visual cortex in vitro. *Neuroscience* 260:171-184.
- Bayliss DA, Barrett PQ (2008) Emerging roles for two-pore-domain potassium channels and their potential therapeutic impact. *Trends in pharmacological sciences* 29:566-575.
- Bertl A, Blumwald E, Coronado R, Eisenberg R, Findlay G, Gradmann D, Hille B, Kohler K, Kolb HA, MacRobbie E, et al. (1992) Electrical measurements on endomembranes. *Science* 258:873-874.
- Bischofberger N, Jacobson KA, von Lubitz DK (1997) Adenosine A1 receptor agonists as clinically viable agents for treatment of ischemic brain disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* 825:23-29.
- Blanchart A, De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L (2006) Time frame of mitral cell development in the mice olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology* 496:529-543.
- Bloom FE, Hoffer BJ, Siggins GR (1971) Studies on norepinephrine-containing afferents to Purkinje cells of art cerebellum. I. Localization of the fibers and their synapses. *Brain research* 25:501-521.
- Boison D, Chen JF, Fredholm BB (2010) Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell death and differentiation* 17:1071-1082.
- Boison D, Sandau US, Ruskin DN, Kawamura M, Jr., Masino SA (2013) Homeostatic control of brain function - new approaches to understand epileptogenesis. *Frontiers in cellular neuroscience* 7:109.
- Boyer JL, Zohn IE, Jacobson KA, Harden TK (1994) Differential effects of P2-purinoceptor antagonists on phospholipase C- and adenyl cyclase-coupled P2Y-purinoceptors. *British journal of pharmacology* 113:614-620.
- Braun N, Zimmermann H (1998) Association of ecto-5'-nucleotidase with specific cell types in the adult and developing rat olfactory organ. *The Journal of comparative neurology* 393:528-537.

- Brundege JM, Dunwiddie TV (1996) Modulation of excitatory synaptic transmission by adenosine released from single hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:5603-5612.
- Burnstock G (1976) Purinergic receptors. *Journal of theoretical biology* 62:491-503.
- Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. Raven Press.
- Burnstock G (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in pharmacological sciences* 27:166-176.
- Burnstock G (2007a) Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64:1471-1483.
- Burnstock G (2007b) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological reviews* 87:659-797.
- Burnstock G (2009) Purinergic cotransmission. *Experimental physiology* 94:20-24.
- Burnstock G (2013) Introduction to purinergic signalling in the brain. *Advances in experimental medicine and biology* 986:1-12.
- Burnstock G (2014) Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Experimental physiology* 99:16-34.
- Burnstock G, Satchell DG, Smythe A (1972) A comparison of the excitatory and inhibitory effects of non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation and exogenously applied ATP on a variety of smooth muscle preparations from different vertebrate species. *British journal of pharmacology* 46:234-242.
- Burnstock G, Fredholm BB, Verkhratsky A (2011) Adenosine and ATP Receptors in the Brain. *Current topics in medicinal chemistry* 11:973-1011.
- Burton SD, Urban NN (2014) Greater excitability and firing irregularity of tufted cells underlies distinct afferent-evoked activity of olfactory bulb mitral and tufted cells. *The Journal of physiology*.
- Cajal R (1911) *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres*. Paris, Maloine.
- Chaudhury D, Manella L, Arellanos A, Escanilla O, Cleland TA, Linster C (2010) Olfactory bulb habituation to odor stimuli. *Behavioral neuroscience* 124:490-499.
- Chaudry IH (1982) Does ATP cross the cell plasma membrane. *The Yale journal of biology and medicine* 55:1-10.
- Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377:428-431.
- Christie JM, Westbrook GL (2003) Regulation of backpropagating action potentials in mitral cell lateral dendrites by A-type potassium currents. *Journal of neurophysiology* 89:2466-2472.
- Clark BD, Kurth-Nelson ZL, Newman EA (2009) Adenosine-evoked hyperpolarization of retinal ganglion cells is mediated by G-protein-coupled inwardly rectifying K⁺ and small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:11237-11245.
- Cook SP, McCleskey EW (2002) Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain* 95:41-47.
- Cordeaux Y, Ijzerman AP, Hill SJ (2004) Coupling of the human A1 adenosine receptor to different heterotrimeric G proteins: evidence for agonist-specific G protein activation. *British journal of pharmacology* 143:705-714.
- Crespo C, Liberia T, Blasco-Ibanez JM, Nacher J, Varea E (2013) The circuits of the olfactory bulb. The exception as a rule. *Anatomical record* 296:1401-1412.

- Cunha (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry international* 38:107-125.
- De Saint Jan D, Hirnet D, Westbrook GL, Charpak S (2009) External tufted cells drive the output of olfactory bulb glomeruli. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:2043-2052.
- Dickenson JM, Hill SJ (1998) Involvement of G-protein betagamma subunits in coupling the adenosine A1 receptor to phospholipase C in transfected CHO cells. *European journal of pharmacology* 355:85-93.
- Doengi M, Deitmer JW, Lohr C (2008) New evidence for purinergic signaling in the olfactory bulb: A2A and P2Y1 receptors mediate intracellular calcium release in astrocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22:2368-2378.
- Doengi M, Hirnet D, Coulon P, Pape HC, Deitmer JW, Lohr C (2009) GABA uptake-dependent Ca(2+) signaling in developing olfactory bulb astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:17570-17575.
- Dunwiddie TV (1985) The physiological role of adenosine in the central nervous system. *International review of neurobiology* 27:63-139.
- Dunwiddie TV, Diao L (1994) Extracellular adenosine concentrations in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 268:537-545.
- Eisenbarth GS (1981) Review: application of monoclonal antibody techniques to biochemical research. *Analytical biochemistry* 111:1-16.
- Ennis M, Zimmer LA, Shipley MT (1996) Olfactory nerve stimulation activates rat mitral cells via NMDA and non-NMDA receptors in vitro. *Neuroreport* 7:989-992.
- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA (2006) P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 452:552-562.
- Falzoni S, Donvito G, Di Virgilio F (2013) Detecting adenosine triphosphate in the pericellular space. *Interface focus* 3:20120101.
- Fields RD, Burnstock G (2006) Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nature reviews Neuroscience* 7:423-436.
- Fischer T, Rotermund N, Lohr C, Hirnet D (2012) P2Y1 receptor activation by photolysis of caged ATP enhances neuronal network activity in the developing olfactory bulb. *Purinergic signalling* 8:191-198.
- Fredholm B, Chen J, Rodrigo A, Svenningsson P, Vaugeois JM (2005) Adenosine and Brain function. *International review of neurobiology* 36.
- Fredholm BB (1995) Purinoceptors in the nervous system. *Pharmacology & toxicology* 76:228-239.
- Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, x000F, rn, Schulte G, Wasserman W (2000) Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 362:364-374.
- Frings S (2001) Chemolectrical signal transduction in olfactory sensory neurons of air-breathing vertebrates. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 58:510-519.
- Fukunaga I, Berning M, Kollo M, Schmaltz A, Schaefer AT (2012) Two distinct channels of olfactory bulb output. *Neuron* 75:320-329.
- Geiger JD, Nagy JI (1987) Ontogenesis of adenosine deaminase activity in rat brain. *Journal of neurochemistry* 48:147-153.

- Ghatpande AS, Gelperin A (2009) Presynaptic muscarinic receptors enhance glutamate release at the mitral/tufted to granule cell dendrodendritic synapse in the rat main olfactory bulb. *Journal of neurophysiology* 101:2052-2061.
- Gheusi G, Lepousez G, Lledo PM (2013) Adult-born neurons in the olfactory bulb: integration and functional consequences. *Current topics in behavioral neurosciences* 15:49-72.
- Giovannardi S, Lando L, Peres A (1998) Flash Photolysis of Caged Compounds: Casting Light on Physiological Processes. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 13:251-255.
- Gire DH, Schoppa NE (2009) Control of on/off glomerular signaling by a local GABAergic microcircuit in the olfactory bulb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:13454-13464.
- Gire DH, Franks KM, Zak JD, Tanaka KF, Whitesell JD, Mulligan AA, Hen R, Schoppa NE (2012) Mitral cells in the olfactory bulb are mainly excited through a multistep signaling path. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:2964-2975.
- Golgi C (1875) Sulla fine struttura dei bulbi olfattori. *Rivista Sperimentale di Freniatria e di Medicina Legale*.
- Gordon GR, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha WR, Fisher TE, Bains JS (2005) Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nature neuroscience* 8:1078-1086.
- Gordon JL (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *The Biochemical journal* 233:309-319.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N, Spyer KM (2005) ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature* 436:108-111.
- Grafe P, Schaffer V, Rucker F (2006) Kinetics of ATP release following compression injury of a peripheral nerve trunk. *Purinergic signalling* 2:527-536.
- Graziadei PP, Graziadei GA (1979) Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *Journal of neurocytology* 8:1-18.
- Grienberger C, Konnerth A (2012) Imaging calcium in neurons. *Neuron* 73:862-885.
- Guo W, Xu X, Gao X, Burnstock G, He C, Xiang Z (2008) Expression of P2X5 receptors in the mouse CNS. *Neuroscience* 156:673-692.
- Haas HL, Greene RW (1984) Adenosine enhances afterhyperpolarization and accommodation in hippocampal pyramidal cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 402:244-247.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 391:85-100.
- Hargus NJ, Bertram EH, Patel MK (2009) Adenosine A1 receptors presynaptically modulate excitatory synaptic input onto subiculum neurons. *Brain research* 1280:60-68.
- Hassenklover T, Schulz P, Peters A, Schwartz P, Schild D, Manzini I (2010) Purinergic receptor-mediated Ca signaling in the olfactory bulb and the neurogenic area of the lateral ventricles. *Purinergic signalling* 6:429-445.
- Hawryluk JM, Ferrari LL, Keating SA, Arrigoni E (2012) Adenosine inhibits glutamatergic input to basal forebrain cholinergic neurons. *Journal of neurophysiology* 107:2769-2781.

- Hegg CC, Greenwood D, Huang W, Han P, Lucero MT (2003) Activation of purinergic receptor subtypes modulates odor sensitivity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:8291-8301.
- Hernandez-Gonzalez O, Hernandez-Flores T, Prieto GA, Perez-Burgos A, Arias-Garcia MA, Galarraga E, Bargas J (2014) Modulation of Ca²⁺-currents by sequential and simultaneous activation of adenosine A1 and A2A receptors in striatal projection neurons. *Purinergic signalling* 10:269-281.
- Heyward P, Ennis M, Keller A, Shipley MT (2001) Membrane bistability in olfactory bulb mitral cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:5311-5320.
- Hinino (2010) Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles.
- Hirdes W, Napp N, Wulfsen I, Schweizer M, Schwarz JR, Bauer CK (2009) Erg K⁺ currents modulate excitability in mouse mitral/tufted neurons. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 459:55-70.
- Housley GD, Bringmann A, Reichenbach A (2009) Purinergic signaling in special senses. *Trends in neurosciences* 32:128-141.
- Igarashi KM, Ieki N, An M, Yamaguchi Y, Nagayama S, Kobayakawa K, Kobayakawa R, Tanifuji M, Sakano H, Chen WR, Mori K (2012) Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:7970-7985.
- Iizuka M, Tsunenari I, Momota Y, Akiba I, Kono T (1997) Localization of a G-protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channel, CIR, in the rat brain. *Neuroscience* 77:1-13.
- Illes P, Wirkner K, Nörenberg W, Dunwiddie TV (2001) Interaction Between the Transmitters ATP and Glutamate in the Central Nervous System. *Drug development research* 52:76-82.
- Isaacson JS, Strowbridge BW (1998) Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS. *Neuron* 20:749-761.
- Jabs R, Matthias K, Grote A, Grauer M, Seifert G, Steinhauser C (2007) Lack of P2X receptor mediated currents in astrocytes and GluR type glial cells of the hippocampal CA1 region. *Glia* 55:1648-1655.
- Jacobson KA, Balasubramanian R, Deflorian F, Gao ZG (2012) G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: ligand design and receptor interactions. *Purinergic signalling* 8:419-436.
- Jan LY, Jan YN (1997) Receptor-regulated ion channels. *Current opinion in cell biology* 9:155-160.
- Jin L, Lloyd RV (1997) In situ hybridization: methods and applications. *Journal of clinical laboratory analysis* 11:2-9.
- Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hardemark A, Betsholtz C, Herlenius E, Fredholm BB (2001) Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:9407-9412.
- Kaczorowski GJ, Garcia ML (1999) Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *Current opinion in chemical biology* 3:448-458.
- Kaelin-Lang A, Lauterburg T, Burgunder JM (1999) Expression of adenosine A2a receptors gene in the olfactory bulb and spinal cord of rat and mouse. *Neuroscience letters* 261:189-191.

- Kanjihan R, Housley GD, Burton L, Christie D, Kippenberger A, Thorne P, Luo L, Rayan A (1999) Subunit of the ATP-Gated Ion Channels in the Rat Central Nervous System Distribution of the P2X2 Receptor. *The Journal of comparative neurology* 407:11-32.
- Kaplan JH, Somlyo AP (1989) Flash photolysis of caged compounds: new tools for cellular physiology. *Trends in neurosciences* 12:54-59.
- Kato HK, Gillet SN, Peters AJ, Isaacson JS, Komiyama T (2013) Parvalbumin-expressing interneurons linearly control olfactory bulb output. *Neuron* 80:1218-1231.
- Kawamura M, Gachet C, Inoue K, Kato F (2004) Direct excitation of inhibitory interneurons by extracellular ATP mediated by P2Y1 receptors in the hippocampal slice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:10835-10845.
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M, Humphrey PP (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacological reviews* 53:107-118.
- Kim M, Yoo OJ, Choe S (1997) Molecular assembly of the extracellular domain of P2X2, an ATP-gated ion channel. *Biochemical and biophysical research communications* 240:618-622.
- Kogure K, Alonso OF (1978) A pictorial representation of endogenous brain ATP by a bioluminescent method. *Brain research* 154:273-284.
- Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T (1994) Calcium-binding protein parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat olfactory bulb. 1. Distribution and structural features in adult rat. *Experimental brain research* 99:191-204.
- Kosaka T, Deans MR, Paul DL, Kosaka K (2005) Neuronal gap junctions in the mouse main olfactory bulb: morphological analyses on transgenic mice. *Neuroscience* 134:757-769.
- Kurokawa M, Koga K, Kase H, Nakamura J, Kuwana Y (1996) Adenosine A2a receptor-mediated modulation of striatal acetylcholine release in vivo. *Journal of neurochemistry* 66:1882-1888.
- Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, Zimmermann H (2008) Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell and tissue research* 334:199-217.
- Latini S, Pedata F (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *Journal of neurochemistry* 79:463-484.
- Le KT, Villeneuve P, Ramjaun AR, McPherson PS, Beaudet A, Seguela P (1998) Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. *Neuroscience* 83:177-190.
- Li H, Henry JL (1992) Adenosine-induced hyperpolarization is depressed by glibenclamide in rat CA1 neurones. *Neuroreport* 3:1113-1116.
- Li H, Henry JL (2000) Adenosine action on interneurons and synaptic transmission onto interneurons in rat hippocampus in vitro. *European journal of pharmacology* 407:237-244.
- Li Y, Fan S, Yan J, Li B, Chen F, Xia J, Yu Z, Hu Z (2011) Adenosine modulates the excitability of layer II stellate neurons in entorhinal cortex through A1 receptors. *Hippocampus* 21:265-280.
- Linden DJ, Connor JA (1991) Participation of postsynaptic PKC in cerebellar long-term depression in culture. *Science* 254:1656-1659.
- Linden J (1991) Structure and function of A1 adenosine receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5:2668-2676.
- Liu S, Rasmusson RL, Campbell DL, Wang S, Strauss HC (1996) Activation and inactivation kinetics of an E-4031-sensitive current from single ferret atrial myocytes. *Biophysical journal* 70:2704-2715.

- Llinas RR (1988) The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242:1654-1664.
- Lohr C, Grosche A, Reichenbach A, Hirnet D (2014) Purinergic neuron-glia interactions in sensory systems. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Lovatt D, Xu Q, Liu W, Takano T, Smith NA, Schnermann J, Tieu K, Nedergaard M (2012) Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:6265-6270.
- Lupica CR, Proctor WR, Dunwiddie TV (1992) Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission by adenosine in rat hippocampus: analysis of unitary EPSP variance measured by whole-cell recording. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12:3753-3764.
- Luscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA (1997) G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19:687-695.
- Macrides F, Stephen S (1982) Laminar Organization of Mitral and Tufted Cells in the Main Olfactory Bulb of the Adult Hamster. *The Journal of comparative neurology* 208.
- Macrides F, Schoenfeld T, Marchand J, Clancy A (1985) Evidence for morphologically, neurochemically and functionally heterogeneous classes of mitral and tufted cells in the olfactory bulb. *Chemical Senses* 10.
- Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96:713-723.
- Manzini I, Schweer TS, Schild D (2008) Improved fluorescent (calcium indicator) dye uptake in brain slices by blocking multidrug resistance transporters. *Journal of neuroscience methods* 167:140-147.
- Mayer ML, Westbrook GL (1987) The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Progress in neurobiology* 28:197-276.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261-263.
- McIlwain H, Poll JD (1986) Adenosine in cerebral homeostatic role: appraisal through actions of homocysteine, colchicine, and dipyridamole. *Journal of neurobiology* 17:39-49.
- Melani A, Turchi D, Vannucchi MG, Cipriani S, Gianfriddo M, Pedata F (2005) ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia. *Neurochemistry international* 47:442-448.
- Menini A (1999) Calcium signalling and regulation in olfactory neurons. *Current opinion in neurobiology* 9:419-426.
- Mishra SK, Braun N, Shukla V, Fullgrabe M, Schomerus C, Korf HW, Gachet C, Ikehara Y, Seigny J, Robson SC, Zimmermann H (2006) Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development* 133:675-684.
- Mitchell JB, Lupica CR, Dunwiddie TV (1993) Activity-dependent release of endogenous adenosine modulates synaptic responses in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13:3439-3447.

- Miyamichi K, Shlomai-Fuchs Y, Shu M, Weissbourd BC, Luo L, Mizrahi A (2013) Dissecting local circuits: parvalbumin interneurons underlie broad feedback control of olfactory bulb output. *Neuron* 80:1232-1245.
- Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87:675-686.
- Mori K, Nagao H, Yoshihara Y (1999) The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* 286:711-715.
- Mori M, Heuss C, Gähwiler BH, Gerber U (2001) Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *The Journal of physiology* 535:115-123.
- Mouradian L, Scott J (1988) Cytochrome Oxidase Staining Marks Dendritic Zones of the Rat Olfactory Bulb External Plexiform Layer. *The Journal of comparative neurology* 271.
- Nadim F, Bucher D (2014) Neuromodulation of neurons and synapses. *Current opinion in neurobiology* 29C:48-56.
- Najac M, De Saint Jan D, Reguero L, Grandes P, Charpak S (2011) Monosynaptic and polysynaptic feed-forward inputs to mitral cells from olfactory sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:8722-8729.
- Nica R, Matter SF, Griff ER (2010) Physiological evidence for two classes of mitral cells in the rat olfactory bulb. *Brain research* 1358:81-88.
- Nicoll RA (1969) Inhibitory mechanisms in the rabbit olfactory bulb: dendrodendritic mechanisms. *Brain research* 14:157-172.
- Nicoll RA (1971) Recurrent excitation of secondary olfactory neurons: a possible mechanism for signal amplification. *Science* 171:824-826.
- Niculescu D, Hirdes W, Hornig S, Pongs O, Schwarz JR (2013) Erg Potassium Currents of Neonatal Mouse Purkinje Cells Exhibit Fast Gating Kinetics and Are Inhibited by mGluR1 Activation. *Journal of Neuroscience* 33:16729-16740.
- North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews* 82:1013-1067.
- O'Shea RD (2002) Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 29:1018-1023.
- Okawa H, Miyagishima KJ, Arman AC, Hurley JB, Field GD, Sampath AP (2010) Optimal processing of photoreceptor signals is required to maximize behavioural sensitivity. *The Journal of physiology* 588:1947-1960.
- Olah ME, Stiles GL (1995) Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annual review of pharmacology and toxicology* 35:581-606.
- Pan WJ, Osmanovic SS, Shefner SA (1995) Characterization of the adenosine A1 receptor-activated potassium current in rat locus ceruleus neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 273:537-544.
- Pankratov Y, Lalo U, Verkhatsky A, North RA (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 452:589-597.
- Panzanelli P, Fritschy JM, Yanagawa Y, Obata K, Sassoe-Pognetto M (2007) GABAergic phenotype of periglomerular cells in the rodent olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology* 502:990-1002.
- Parkinson FE, Damaraju VL, Graham K, Yao SY, Baldwin SA, Cass CE, Young JD (2011) Molecular biology of nucleoside transporters and their distributions and functions in the brain. *Current topics in medicinal chemistry* 11:948-972.

- Pelosi P, Mastrogiacomo R, Iovinella I, Tuccori E, Persaud KC (2014) Structure and biotechnological applications of odorant-binding proteins. *Applied microbiology and biotechnology* 98:61-70.
- Phillips CG, Powell TP, Shepherd GM (1963) Responses of Mitral Cells to Stimulation of the Lateral Olfactory Tract in the Rabbit. *The Journal of physiology* 168:65-88.
- Pietersen AN, Lancaster DM, Patel N, Hamilton JB, Vreugdenhil M (2009) Modulation of gamma oscillations by endogenous adenosine through A1 and A2A receptors in the mouse hippocampus. *Neuropharmacology* 56:481-492.
- Ponzio TA, Hatton GI (2005) Adenosine postsynaptically modulates supraoptic neuronal excitability. *Journal of neurophysiology* 93:535-547.
- Qian X, Lloyd RV (2003) Recent developments in signal amplification methods for in situ hybridization. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B* 12:1-13.
- Rau AR, Ariwodola OJ, Weiner JL (2014) Presynaptic adenosine A(1) receptors modulate excitatory transmission in the rat basolateral amygdala. *Neuropharmacology* 77:465-474.
- Reppert SM, Weaver DR, Stehle JH, Rivkees SA (1991) Molecular cloning and characterization of a rat A1-adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. *Molecular endocrinology* 5:1037-1048.
- Reyher CK, Lubke J, Larsen WJ, Hendrix GM, Shipley MT, Baumgarten HG (1991) Olfactory bulb granule cell aggregates: morphological evidence for interperikaryal electrotonic coupling via gap junctions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11:1485-1495.
- Salin PA, Lledo PM, Vincent JD, Charpak S (2001) Dendritic glutamate autoreceptors modulate signal processing in rat mitral cells. *Journal of neurophysiology* 85:1275-1282.
- Salvatore CA, Jacobson MA, Taylor HE, Linden J, Johnson RG (1993) Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:10365-10369.
- Samways DS, Li Z, Egan TM (2014) Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:6.
- Satou M, Anzai S, Huruno M (2005) Long-term potentiation and olfactory memory formation in the carp (*Cyprinus carpio* L.) olfactory bulb. *Journal of comparative physiology A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 191:421-434.
- Schild D, Restrepo D (1998) Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiological reviews* 78:429-466.
- Schoppa, Westbrook (1997) Modulation of mEPSCs in Olfactory Bulb Mitral Cells by Metabotropic Glutamate Receptors. *Journal of neurophysiology* 78:1468-1475.
- Schwarz JR, Bauer CK (2004) Functions of erg K⁺ channels in excitable cells. *Journal of cellular and molecular medicine* 8:22-30.
- Shafa F, Shineh SN, Bidanjiri A (1981) Development of spontaneous activity in the olfactory bulb neurons of postnatal rat. *Brain research* 223:409-412.
- Shepherd GM (1972) Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiological reviews* 52:864-917.
- Shi SR, Shi Y, Taylor CR (2011) Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 59:13-32.

- Shimizu H, Ichishita H, Tateishi M, Umeda I (1975) Characteristics of the amino acid receptor site mediating formation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in mammalian brains. *Molecular pharmacology* 11:223-231.
- Shindou T, Mori A, Kase H, Ichimura M (2001) Adenosine A(2A) receptor enhances GABA(A)-mediated IPSCs in the rat globus pallidus. *The Journal of physiology* 532:423-434.
- Shiple M, Ennis M, Puche A (2004) The rat nervous system; olfactory system.
- Shiple MT, Ennis M (1996) Functional organization of olfactory system. *Journal of neurobiology* 30:123-176.
- Shirley CH, Coddington EJ, Heyward PM (2010) All-or-none population bursts temporally constrain surround inhibition between mouse olfactory glomeruli. *Brain research bulletin* 81:406-415.
- Simon J, Webb TE, Barnard EA (1997) Distribution of [³⁵S]dATP alpha S binding sites in the adult rat neuraxis. *Neuropharmacology* 36:1243-1251.
- Spehr M, Munger SD (2009) Olfactory receptors: G protein-coupled receptors and beyond. *Journal of neurochemistry* 109:1570-1583.
- Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD, Reppert SM (1992) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Molecular endocrinology* 6:384-393.
- Stocker M (2004) Ca(2+)-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nature reviews Neuroscience* 5:758-770.
- Tabata T, Kawakami D, Hashimoto K, Kassai H, Yoshida T, Hashimotodani Y, Fredholm BB, Sekino Y, Aiba A, Kano M (2007) G protein-independent neuromodulatory action of adenosine on metabotropic glutamate signalling in mouse cerebellar Purkinje cells. *The Journal of physiology* 581:693-708.
- Taliani S, Pugliesi I, Bellandi M, La Motta C, Da Settimo F (2010) A3 receptor ligands: past, present and future trends. *Current topics in medicinal chemistry* 10:942-975.
- Thyssen A, Hirnet D, Wolburg H, Schmalzing G, Deitmer JW, Lohr C (2010) Ectopic vesicular neurotransmitter release along sensory axons mediates neurovascular coupling via glial calcium signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:15258-15263.
- Thyssen A, Stavermann M, Buddrus K, Doengi M, Ekberg JA, St John JA, Deitmer JW, Lohr C (2013) Spatial and developmental heterogeneity of calcium signaling in olfactory ensheathing cells. *Glia* 61:327-337.
- Tian C, Zhu R, Zhu L, Qiu T, Cao Z, Kang T (2014) Potassium channels: structures, diseases, and modulators. *Chemical biology & drug design* 83:1-26.
- Torres B, Zambon AC, Insel PA (2002) P2Y11 receptors activate adenylyl cyclase and contribute to nucleotide-promoted cAMP formation in MDCK-D(1) cells. A mechanism for nucleotide-mediated autocrine-paracrine regulation. *The Journal of biological chemistry* 277:7761-7765.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1998) N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. *Biochemistry* 37:14845-14851.
- Trombley PQ, Shepherd GM (1993) Synaptic transmission and modulation in the olfactory bulb. *Current opinion in neurobiology* 3:540-547.
- Vennekens R, Menigoz A, Nilius B (2012) TRPs in the Brain. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 163:27-64.

- Vulchanova L, Abbracchio MP, Riedel M, Wang J, Buell G, Suupredant A, North RA, Edel R (1996) Differential distribution of two ATP-gated ion channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:8063-8067.
- Wachowiak M, Shipley MT (2006) Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Seminars in cell & developmental biology* 17:411-423.
- Wall MJ, Dale N (2013) Neuronal transporter and astrocytic ATP exocytosis underlie activity-dependent adenosine release in the hippocampus. *The Journal of physiology* 591:3853-3871.
- Wang C, Ohno K, Furukawa T, Ueki T, Ikeda M, Fukuda A, Sato K (2005) Differential expression of KCC2 accounts for the differential GABA responses between relay and intrinsic neurons in the early postnatal rat olfactory bulb. *The European journal of neuroscience* 21:1449-1455.
- Weisman GA, Woods LT, Erb L, Seye CI (2012) P2Y receptors in the mammalian nervous system: pharmacology, ligands and therapeutic potential. *CNS & neurological disorders drug targets* 11:722-738.
- Wellis DP, Kauer JS (1993) GABAA and glutamate receptor involvement in dendrodendritic synaptic interactions from salamander olfactory bulb. *The Journal of physiology* 469:315-339.
- Willhite DC, Nguyen KT, Masurkar AV, Greer CA, Shepherd GM, Chen WR (2006) Viral tracing identifies distributed columnar organization in the olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:12592-12597.
- Wilson DA (2009) Olfaction as a model system for the neurobiology of mammalian short-term habituation. *Neurobiology of learning and memory* 92:199-205.
- Witt RM, Galligan MM, Despinoy JR, Segal R (2009) Olfactory behavioral testing in the adult mouse. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Wu LG, Saggau P (1997) Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends in neurosciences* 20:204-212.
- Yang N-J (2008) Physiological roles of A1 and A2A adenosine receptors. *Dissertation Karolinska Institute, Stockholm*.
- Yokoi M, Mori K, Nakanishi S (1995) Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:3371-3375.
- Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S (2003) ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40:971-982.
- Zhao Q, Wu BL (2012) Ice breaking in GPCR structural biology. *Acta pharmacologica Sinica* 33:324-334.
- Zhu Y, Kimelberg HK (2001) Developmental expression of metabotropic P2Y(1) and P2Y(2) receptors in freshly isolated astrocytes from rat hippocampus. *Journal of neurochemistry* 77:530-541.
- Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 362:299-309.
- Zimmermann H (2006) Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 452:573-588.

zur Nedden S, Hawley S, Pentland N, Hardie DG, Doney AS, Frenguelli BG (2011) Intracellular ATP influences synaptic plasticity in area CA1 of rat hippocampus via metabolism to adenosine and activity-dependent activation of adenosine A1 receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:6221-6234.

VI Anhang

1: Strukturformel von *caged*-ATP

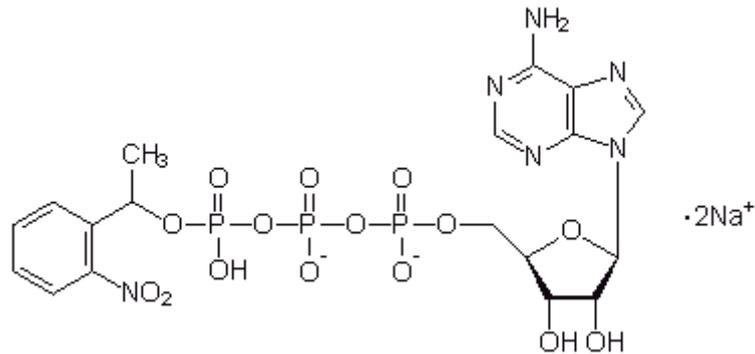


Abbildung 45 | Strukturformel von Adenosine 5'-triphosphate, P³-1-(2-Nitrophenyl)ethyl Ester

2: Sondensequenz, Lage der Sonden und Antikörper

Sequenz des A₁-Rezeptors: NCBI - Ensembl, Transcript: Adora1-202
ENSMUST00000086465

Legende: introns, EXONS, translatierte Region, WT Primer, Alomone Lab anti A₁ R Antikörper, Primer A₁ R-Sonden, A₁ R-Sondensequenz, /// ungefährender Transkriptionsstopp in der A₁-Rezeptor-knockout-Maus

```
.....cgccccgccccgccccctccccctcccggtgctgagagcccgattgtcACTCAGCTCCCGCGCCGGGGGCGACGAAGGCGCCGGCGCCAG
AGTGGAGTCTCGGCTGGCTACCACCCCTTGACATAACTGGTAGCCCTGGGTTCCCTGGCATCCTCTGAGGGAGCGACTGCC
AAGGTTTTGAGGCTGGGGATACTGGCTAGACAGTTCAGGTGCCAGGCGCTCTGCCAGCTTTGGTGTGACCTTGgtaagtctgtg
gctcagttcgtgca.....cccaccgcaggtctcctgaccacagGTGCTGGCCTCGCGCCCGAGGCGCCTGTCTGCTGATGTGCCAGCTCCTG
CCCACCATGCCCGCTACATCTCGGCCTTCCAGGCTGCCTACATTGGCATCGAGGTGCTCATTGCCTTGGTCTCTGTGCCCGAA
TGTACTGGTGATTTGGGCTGTGAAGGTGAACCAGGCACTTCGCGATGTACCTTCTGCTTTCATCGTATCCCTGGCGGTAGCTGATG
TGGCTGTTGGCGCCCTGGTCATCCCACTGGCCATCCTTATCAACATTGGGCCACAGACCTACTTCCACACCTGCCTCTGGTGGCCT
GTCCTGTCCTCATCCTACCCAGAGCTCCATCCTGGCTCTGCTTGTATTGCTGTGGATCGGTACCTCCGAGTCAAGATCCCTCTCC
Ggtgagttcatagcagccaaggtac.....catacctgtccttttccctacag///GTACAAGACAGTGGTGACTCAGCGGGCGGCGAGCAGTGGCC
ATAGCCGGCTGCTGGATTCTCCCTTGTGGTAGGCCTGACACCCATGTTTGGCTGGAACAACCTGAGTGAGGTGGAACAAGCCT
GGATGCCAACGGCAGTGTGGGGAGCCCGTGATCAAGTGTGAGTTCGAGAAGGTTATCAGCATGGAGTACATGGTCTACTTCA
ACTTCTTCGTCTGGGTGCTGCCGCATTGCTCCTCATGGTCTTATCTACCTGGAGGTCTTCTACCTGATCCGCAAGCAGCTCAACA
AAAAGGTGTGAGCCTCCTCTGGTGACCCCCAGAAGTACTACGGGAAGGAGCTCAAGATCGCCAAGTCGCTGGCCCTCATCCTCTT
CCTCTTGGCCCTCAGCTGGCTACCGCTACACATCTTGAATGCATCACCTCTTCTGCCCCACCTGCCAGAAACCCAGCATCCTCATC
TACATTGCCATCTTCTCACACACGGCAACTCGGCCATGAACCCCATCGTCTATGCCTTCCGAATCCACAAGTCCGGGTACCTTT
CTGAAGATTTGGAACGACCACTCCGATGCCAGCCCAAGCCCCCATTGAGGAAGATATCCAGAGGAGAAAGCTGATGACTAG
```

GCTCTGCCTTGTCCATCTACCCACACCCAGTGGCTCTCTGTCAACCCCCATGCTCCTCCTGTTCCCCCTGTCCACTGTTCTCC
TCAGCCTTCCCAGCTGGGCTGTGGGCTGTGGACACCAGGGAGGCTCTGAAGGATGCCATGGAACAGGGCCCCCTTCTGTAAGGAG
CTGGCTGCCCTGTACCTTGGGGACCTGAGGAGGTTTGGAGTTGGGGCAGGCCATAGCAGGGAATTGGGTGCCCTCAGGTGAGAG
GAGAGTCTTGTGTGCATCATTCTGGCTGTTCTCTGAGCAGTTCAGAGAGCTGGGGTTAGAATATTCTGGCTCCTCAGTCAGACA
GGGGAGCCTACTATTAGGTGTTGGTGGCCCAAGGGACCACTTCAAAGTGAAGGACAGTCCCTTAGAGGTGGATGAATAGAG
AGAAATGGATATGCCGCGCTTCGCTGTCTCTCTGTTCTCTAGGAGAAGATAGTAAAAACACAGGGAAGGAGACCTCGGCCCTC
CTCCAAGGATTGTGTTCTTGGCCACGCGGGTGTCTCTGACCCCGAGAAGCCAGGGTTATACTTGGGAGACACAGAAAGAATG
GGTCCAGGGATTGTCTCACATTTGCTCTATTACACGCCTGGGACTCCAGTGGGCCATAAAGTCTTGGGAATAAAAAATAGTGC
AGAAGGTGCTGGCTCACATAGCCAGCAGGGAGCAGCACTGAGCCCTTCTGCCCTGAACCTCTGGGAGTCTCCAATGCAATTT
TCTGTCTGGGCCACCAAGCTTCACTCACTCTCAGAGCAGGCTGGACTCTCTGAGGGACACCATCTCTGCTTCCAAGCCCCAGG
AGAAGAGCTTCCCAGGAAGTACAACCTTGGGAGCATGCTGCTGAGGGGGGAGGAGGGAGAGGAAAGCATCTAAGAAGAT
CCCAGGTGCTCCTGGGCACCTCTGGTGTGCCAGAAGTGTAAAGACCAGACCAGACCAGACCAGACCAGACCAGACCAGACC
AAAGGAGACTGCTGTTCAAGTGTGAGAAAGTGCCTTGGTGGCATTAAATATCCAAAAGGCTCTGGAGGTGGCTTTAGCTCAG
GAGCTGTGTTGCAAATAGAGTGTAGGCTTTTGTGGAGGTCTCAGGTGGGACCAATCCATGTTCTGCTGAGCCTGGATGTCTTCTT
GTATGGACAGCAGGCAGGGGAGGGTGTCAAGTCTCCCTCCTTGGGTGTGAATATTGACTCCAAGTCTTGATTCCAGGCTCTTCC
TTCAGTTGGAGGTAAGGTGTCCCTGGCTCTCAAGGAGGACCTATGTCTAATAAAAGATTGTGAAGCCCTGTGGGGAGTGGGGT
CTGGACCCCAGCACTGCCAGAGGGCAACCAAAACCTCAGCGGAGAAGATGTAATGGTGGGGTGGAGGGGAAGCTGGGA
GAGGGCTGTGGAGGCAGATGGAAAGTCCAGAGATGGTGTGTCTGTTGCTATAGTTACACATTTAGGGTAGCACATTGTGAATCA
GAAAGCAAGATCCAGAACACTCACATGTCTAAAAAAGAAAGAAAGAAAAAAGAAAAAATGCCCGTGTCTATGTGAGA
CCCTTCTGCTGGCAGCTTTTCTAATCTTGATAGTGTCTCCCTTCATAGTAACATAGTATTGTTCCATCCGTCATGACACTCATTGCC
ACAGAAACCCCATGCTATAACACCACACACCTTTATTTGAATACTTCTCATAACAGTGTACAACCTCTGAAGAGGGTGCAGTCTCTG
CCCTTCTGGGCCCTTGAACCCAGAAGGTATGGCCTGGGGCCTGCCAGGCTGATCCTGGGTCTGGACCCAGCGTCTGATGGA
GGGGCCTGCAGGTAAGAGACCCCGCCCATTCGCTGTTCTATGGTCTTGGGGATTCTGGGGTCTGATCCTCAGGTCTGC
AGGACTTGGTGGATAGTGTCTTCTGCTGCTGGTATGTGACCAAGCTGTAGAAGAGATAGTGGGGAGTGGGTAGAGAAACCA
CCTCCACCCTTCTCAGTCTTCTCAGGCTCAATTTCAAAGCTGGGCTCTGCCAGTGCAGCTCTGGAGACTTGATAGTTACCC
AGAGCCTCAGAACCACCAACGAGGAAGGGAGAGCAAGGACTGGGTCCCTACTTCTAATGAGGGAAAAGAATGCTGTTTACA
GTCACTCAGAGCCAAGCCAGATGCTGACCTGTGACCACCACCAGAGTACCCATCCCTTCTGGACTCCCCAGCATGACCCAGT
GCTACACTGTCTTACCAAATAAACATGCATGCTCTGTCTTTTGTACAAAAATGGTACCCAGATCTGCTACTGCTTCTCTGC
CCTCCCTCCTGTCTCCAGTGACATTTTATGCCTGGGAGGTGGATTCTTCTCTCGCAATCTTCTTTGACACCACACTCTCAGTAG
AGGTAAGTGAAGGAGTAGGTCCAGCCACTCACCTGTCTCTTGTCCAGTCTCTGCCTCTGTTGCTCTTTAGTGTGTGGCAGAAGC
TGTAAGAGATACTACACGTTAGAGCTTTGGGGGAAGACAGGAGGGAAACGGAGAGGTTTGAAGTCAAGAATTTCCAGCACCCCAG
TCCCCAATAGAAAGAATCTTCCACTTAGAAAGTACACAAACAGTCTTGGACCCCTCCCTACCTTTTCTGCTCCAGTTTCA
CTCTGAACACTACATAGTCCAGTCCCAAGAGGGACTCAGTCTGTCCACTACAGCAGGGTGTGAGGGCACCCCTCCGACTCCCA
CCTTTAACCTCCAGCCGACAATCCACAGAGGCCTCCCTAGCACGTTGATGGCCTTGAAGTGTAGACCCAGAATCAAAGGGC
TGGGCTTCCGGATCTCCAGGGTGCAGACCCCTTGTCTGGAGACGGCACGGTACTTGGGGTACCCTGGATGTCCATCTGTTTTT
ATCCAGATGATCTTGGGCTGGAAGCAAAGTCAAGGAGGGTAATGAAGTTAGAACAGCTCTCAAGAGAACTTTTATTCTCTGT
CCACCCTCCAGCCAGCCAGGGCCCTGACCTTAGGTGATGCTCGGACGCTGCAGAAAAGTGCCTGTCTATAGCCAGGAGTGG
AGGTATGGTCAAGCCAGGGGCTGGGTGAACGAGGGCGCTTCTGAGAAGTCTCGCTCAATAAACTCTAGGTTTGGCAGTAATATC
TAGGTTCAAGGGGAGAAATTTAGGTTATAGGGATGCAGGAGGCTTCCGAAGACTGGCCTCAACCCAAAATTTGAGACATTAACC
TGGTCAACACATGAAGACATCAGAGAAAAGCCTCGCTGAGCAGGGCTGAGGCTGATCAGGAGGTGAACAGAGAGGAGTGGGCA
GGAAAACCTGAGCCACGGAGGATTGCGGCAAGAGGGGACATCACATTCATTTCTGTCTGCTCTGAGACCTGAGTGGCTTTCC
TTTTTAAACAAAAATGCTCACGGCTGTGACACTCTGGCTGATGTTAAAGAGTATGGCTTCTAGGGTGAAGTGGCTCAGCG
GGTGAAGGTGCTTGTACCAAGCTTACCACCCTGAGTTCAGTCCCTGGGACCCACGGGTAGAAGGAGAGACTGACATGTTGT
CCTTAGACTTACACATGCACGTGTGCATGTGAACACACACTCACACCAATAAATGTAATAAAATGagtagtaatgaagtgtgcttcc
aggtgtggcgtgctgcatgctgtgt.....

3: DIG-markierte Sonden; Dokumentation der Sondenherstellung

Um zu überprüfen ob DIG-markierte UTPs in die Sondensequenz der RNA-Sonden für die durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen eingebaut wurden, wurden die Sonden mit Hilfe eines

Dot-Blots überprüft (Abbildung 46 B). Nach dem *labeling* der RNA-Sonden mit DIG-markierten UTPs wurden die RNA-Sonden mittels einer RNA-Gelelektrophorese auf ihre Integrität hin überprüft. Eine einzelne distinkte Bande zeigt an, dass die RNA-Sonden nicht degradiert sind. *Sens*- und *antisens*-Sonden sollten ungefähr die gleiche Laufhöhe aufweisen (Abbildung 46 A).

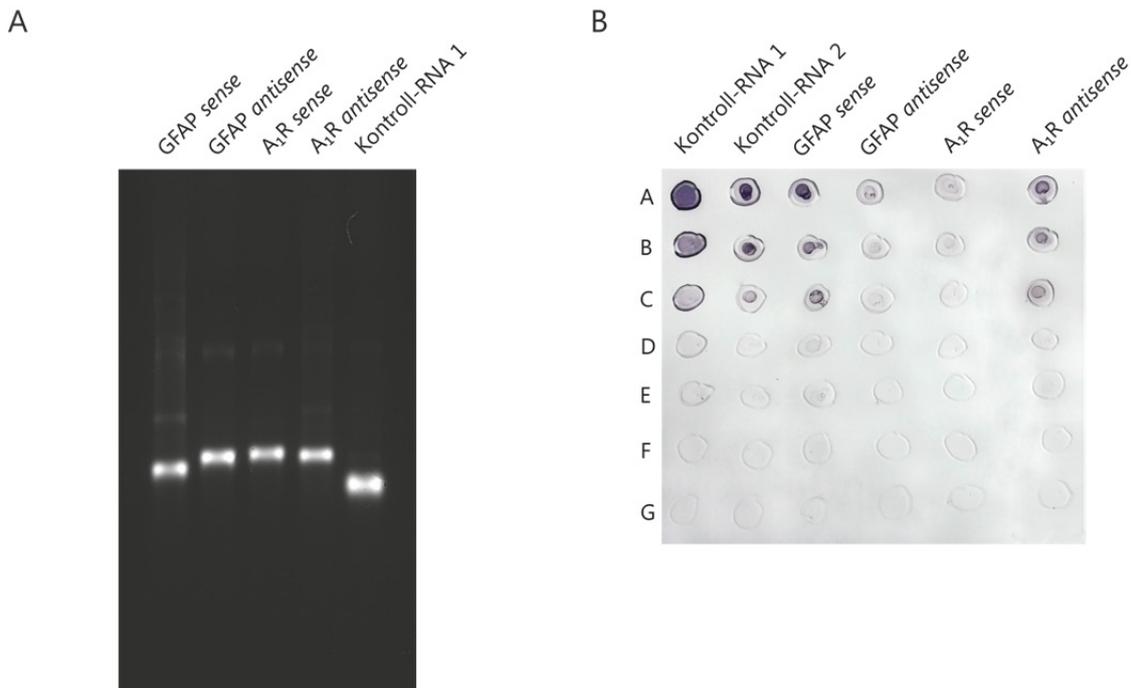


Abbildung 46 | Dot-Blot zur Kontrolle einer DIG-Markierung der A_1 R-Sonden und Kontrolle der Integrität der RNA-Sonden [A] RNA-Gel. Alle getesteten RNA-Proben zeigen eine eindeutige Bande, was darauf hindeutet, dass die RNA nicht degradiert ist. [B] Bei allen DIG-markierten Sonden zeigt sich nach dem *labeling* ein Farbumschlag beim *Dot-Blot*; DIG-markierte UTPs wurden in die Sondensequenz eingebaut. Verdünnung (ng/ μ l): Kontroll-RNA: 10; 5; 1; 0,1; 0,05; 0,01; 0,001 Sonden: 100, 50, 10, 1, 0,5, 0,1, 0,01

4: Radioaktiv markierte *in situ*-Hybridisierung des A_{2A} -Rezeptors

Neben *in situ*-Hybridisierungen gegen A_1 -Rezeptor-*mRNA* mit DIG- und radioaktiv markierten Sonden wurden im Rahmen dieser Arbeit auch *in situ*-Hybridisierungen gegen A_{2A} -Rezeptor-*mRNA* mit radioaktiv markierten Sonden durchgeführt. Abbildung 47 zeigt eine sagittale Übersicht und mehrere Details des olfaktorischen Bulbus nach *in situ*-Hybridisierung des A_{2A} -Rezeptors. Der olfaktorische Bulbus weist die stärkste Färbung im gesamten Gehirn auf (Abbildung 47 A oben). Im Detail (Abbildung 47 B und C) ist eine deutliche Bindung der Sonde (schwarz) im Bereich der Mitralzellschicht, der Körnerzellschicht und der glomerulären Schicht sowie an vereinzelt Zellen in der äußeren plexiformen Schicht zu erkennen. Die *sens*-Sonde (Negativkontrolle) zeigt keine Bindung im Gewebe (Abbildung 47 A unten, D). Neben der abgebildeten *in situ*-Hybridisierung in

Gewebe einer 15 Tage alten Maus wurden zusätzlich *in situ*-Hybridisierungen des A_{2A} -Rezeptors in Geweben einer acht Tage alte Maus sowie eines adulten Tieres durchgeführt. Das Bindungsmuster unterschied sich in den untersuchten drei Individuen nicht zwischen den Altersgruppen.

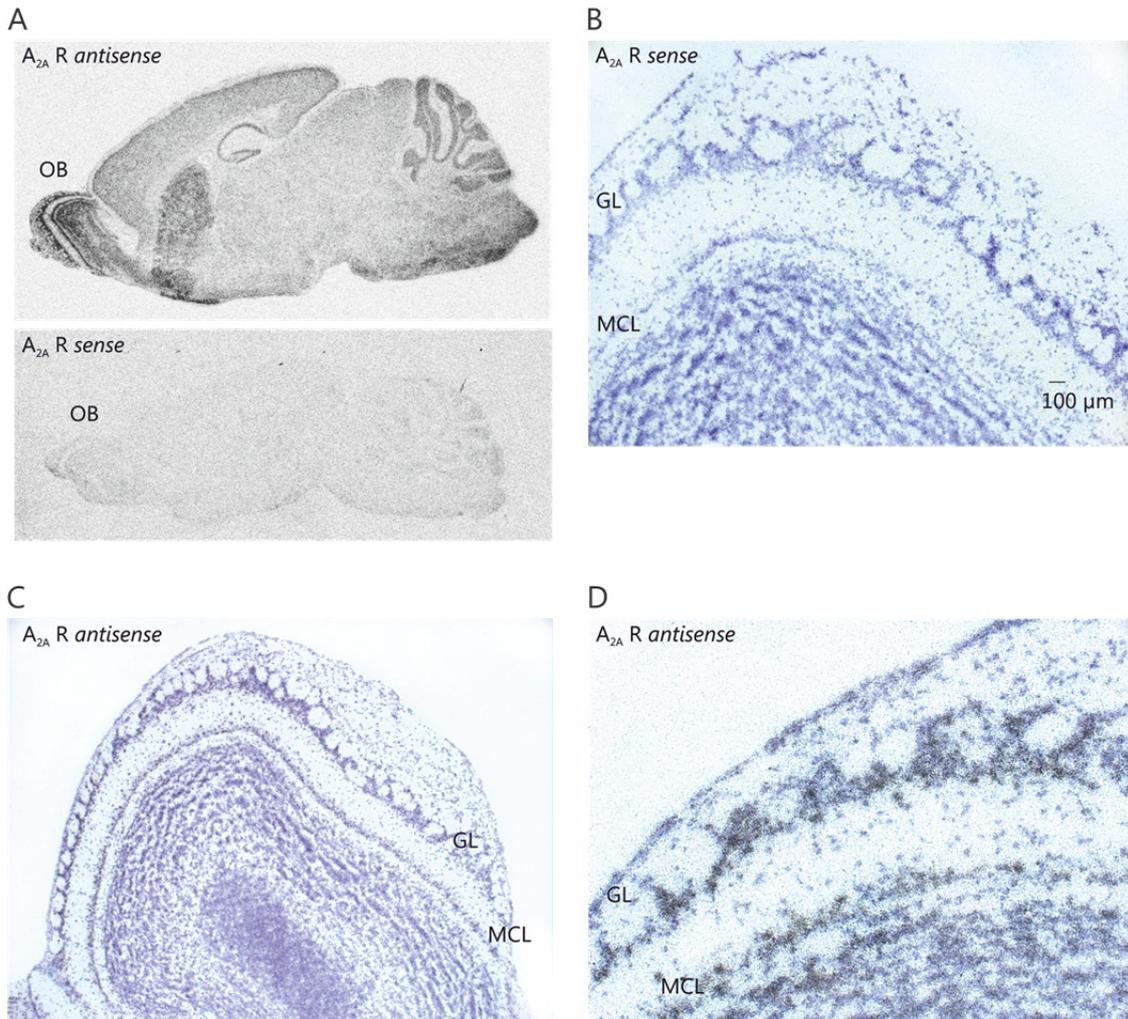


Abbildung 47 | *In situ*-Hybridisierung des A_{2A} -Rezeptors mit radioaktiv markierten Sonden. *In situ*-Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden im *Bulbus olfactorius* der Maus (schwarz) (NMRI, P15). [A] oben; Übersicht sagittal *antisense*-Sonde, unten Übersicht sagittal *sense*-Sonde (Negativkontrolle) [B] Detail *Bulbus olfactorius sense*-Sonde (Negativkontrolle) [C] Detail *Bulbus olfactorius antisense*-Sonde [D]; Detail *Bulbus olfactorius antisense*-Sonde. Blau; Hämalan-Färbung der Zellkerne, schwarz; Bindung der Sonde. GL = Glomerularschicht, MCL = Mitralzellschicht, OB = olfaktorischer Bulbus

5: Ausführliche Tabelle; durchgeführte Pharmakologie an Kaliumkanälen

Die von Adenosin ausgelöste Hyperpolarisation von Mitralzellmembranen wird vermutlich über die Öffnung eines Kaliumkanals vermittelt. Um den Typ des Adenosin-modulierten Kaliumkanals in Mitralzellen einzugrenzen, wurden verschiedene Großgruppen von Kaliumkanälen

pharmakologisch untersucht. Tabelle 8 zeigt die in Säugetieren vorkommenden Kaliumkanäle und führt auf, welche Kaliumkanalblocker im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Eine ‚1‘ bedeutet, dass der entsprechende Kanal von dem jeweiligen Blocker inhibiert wird, eine ‚0‘, dass der Kanal insensitive gegenüber dem Blocker ist. Nach dem Ausschlussprinzip lässt eine Kombination der Pharmakologie und Informationen aus der Spalte ‚Info‘ darauf schließen, welche Kanäle bereits als Interaktionspartners des A₁-Rezeptors in Mitralzellen ausgeschlossen werden können (-) und welche noch in Frage kommen (+). Pharmakologisch noch nicht erfasst und eigenständig funktionell sind die Gruppen der 2-P-Kaliumkanäle und der *small* und *intermediate conductance*-K_{Ca} (Tabelle 8).

Tabelle 8 | Kaliumkanäle der Maus; Pharmakologie Legende: + = kann nicht als Interaktionspartner des A₁-Rezeptors in Mitralzellen ausgeschlossen werden, - = kann als Interaktionspartner des A₁-Rezeptors in Mitralzellen ausgeschlossen werden, 0 = nicht sensitiv, 1 = sensitiv, n.f.oio = *not functional on its own*, M-S = M-Strom

+/-	Bezeichnung	Pharmakologie					Info
		TEA	4-Ap	Barium	XE 991	E-4031	
2-P-Kaliumkanäle (4 TM)							
+	K2p1.1 TWIK-1	0	0	0	0	0	
+	K2p2.1 TREK-1	0	0	0	0	0	
+	K2p3.1 TASK-1	0	0	0	0	0	
+	K2p4.1 TRAAK	0	0	0	0	0	
+	K2p5.1 TASK-2	0	0	0	0	0	
+	K2p6.1 TWIK-2	0	0	0	0	0	
+	K2p7.1 TWIK-2.1	0	0	0	0	0	
+	K2p9.1 TASK-3	0	0	0	0	0	
+	K2p10.1 TREK-2	0	0	0	0	0	
+	K2p12.1 THIK-2	0	0	0	0	0	
+	K2p13.1 THIK-1	0	0	0	0	0	
+	K2p15.1 TASK-5	0	0	0	0	0	
+	K2p16.1 TALK-1	0	0	0	0	0	
+	K2p17.1 TALK-2	0	0	0	0	0	
+	K2p18.1 TRESK	0	0	0	0	0	
Einwärts rektifizierende Kaliumkanäle (2 TM)							
-	Kir 1.1	0	0	1	0	0	
-	Kir 2.1	0	0	1	0	0	
-	Kir 2.2	0	0	1	0	0	
-	Kir 2.3	0	0	1	0	0	
-	Kir 2.4	0	0	1	0	0	
-	Kir 3.1 GIRK	0	0	1	0	0	
-	Kir 3.2 GIRK	0	0	1	0	0	
-	Kir 3.3 GIRK	0	0	1	0	0	
-	Kir 3.4 GIRK	0	0	1	0	0	
-	Kir 4.1	0	0	1	0	0	
-	Kir 4.2	0	0	1	0	0	
-	Kir 5.1	0	0	1	0	0	
-	Kir 6.1 K _{ATP}	0	0	1	0	0	
-	Kir 6.2 K _{ATP}	0	0	1	0	0	
-	Kir 7.1	0	0	1	0	0	

Spannungsabhängige Kaliumkanäle (6 TM)								
-	Kv1.1		1	1	0	0	0	
-	Kv1.2		0	1	0	0	0	
-	Kv1.3		1	1	0	0	0	
-	Kv1.4	Ka, A-Type	0	1	0	0	0	
-	Kv1.5		0	1	0	0	0	
-	Kv1.6		1	1	0	0	0	
-	Kv1.7		0	1	0	0	0	
-	Kv1.8		0	1	1	0	0	
-	Kv2.1		1	0	0	0	0	
-	Kv2.2		1	0	0	0	0	
-	Kv3.1		1	1	0	0	0	
-	Kv3.2		1	1	0	0	0	
-	Kv3.3	A-Type	1	1	0	0	0	
-	Kv3.4	A-Type	1	0	0	0	0	
-	Kv4.1	A-Type	1	1	0	0	0	
-	Kv4.2	A-Type	0	1	0	0	0	
-	Kv4.3	A-Type	0	1	0	0	0	
-	Kv5.1		0	0	0	0	0	n.f.oio
-	Kv6.1	<i>modifier</i>	0	0	0	0	0	n.f.oio
-	Kv6.2	<i>modifier</i>	0	0	0	0	0	n.f.oio
-	Kv6.3	<i>modifier</i>	0	0	0	0	0	n.f.oio
-	Kv6.4	<i>modifier</i>	0	0	0	0	0	n.f.oio
-	Kv7.1	KCNQ1	0	0	0	1	0	
-	Kv7.2	KCNQ2, M-S	1	0	0	1	0	
-	Kv7.3	KCNQ3, M-S	0	0	0	1	0	
-	Kv7.4	KCNQ4	1	0	0	1	0	
-	Kv7.5	KCNQ5	0	0	0	1	0	
-	Kv8.1	<i>modifier</i>	0	0	0	0	0	n.f.oio
-	Kv8.2	<i>modifier</i>	0	0	0	0	0	n.f.oio
-	Kv9.1	<i>modifier</i>	0	0	0	0	0	n.f.oio
-	Kv9.2	<i>modifier</i>	0	0	0	0	0	n.f.oio
-	Kv9.3	<i>modifier</i>	0	0	0	0	0	n.f.oio
-	Kv10.1	Eag1	0	0	0	0	1	
-	Kv10.2	Eag2	0	0	0	0	1	
-	Kv11.1	Erg1 (herg)	0	0	0	0	1	
-	Kv11.2	Erg2	0	0	0	0	1	
-	Kv11.3	Erg3	0	0	0	0	1	
-	Kv12.1	Elk1	0	0	1	0	1	
-	Kv12.2	Elk2	0	0	0	0	1	
-	Kv12.3	Elk3	0	0	1	0	1	
-	Kca 1.1	Maxi K _{Ca} , K _{Na}	1	0	0	0	0	
+	Kca 2.1	SK _{Ca}	0	0	0	0	0	
+	Kca 2.2	SK _{Ca}	0	0	0	0	0	
+	Kca 2.3	SK _{Ca}	0	0	0	0	0	
+	Kca 3.1	IK _{Ca}	0	0	0	0	0	
-	Kca 4.1	Maxi K _{Ca}	1	0	0	0	0	
-	Kca 4.2	Maxi K _{Ca}	1	0	0	0	0	
-	Kca 5.1	Maxi K _{Ca}	1	0	0	0	0	

Für die Erstellung der Tabelle 8 wurden folgende Literaturquellen verwendet: Kaczorowski und Garcia, 1999; Schwarz und Bauer, 2004; Bayliss und Barrett, 2008; Alexander et al., 2013; Tian et al., 2014

VII Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den

Natalie Rotermund

VIII Danke

Das Schreiben einer Doktorarbeit ist ein einnehmender, spannender und herausfordernder Prozess, welcher der Unterstützung von Kollegen, Freunden und der Familie bedarf.

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Christian Lohr, für die Möglichkeit danken diese Dissertation anfertigen zu können, für die vielen interessanten Diskussionen, sein Vertrauen in mich und eine Zeit die mir viel gegeben hat und auf die ich nicht hätte verzichten wollen.

Mein herzlicher Dank geht an Herrn Prof. Dr. Jürgen Schwarz für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens für diese Arbeit.

Sehr dankbar bin ich auch Dr. Daniela Hirnet, die mir die Tür zur Welt der Elektrophysiologie geöffnet hat und die ein wunderbarer Mensch ist, den ich sehr schätze.

Des Weiteren danke ich der Abteilung Tierphysiologie und der Emmy-Noether Gruppe um Annika für die Unterstützung bei der Etablierung der *in situ*-Hybridisierung und für viele nette persönliche Gespräche und Erlebnisse. Der DFG danke ich für die finanzielle Unterstützung meines Projekts.

Allen meinen lieben gegenwärtigen und ehemaligen Kollegen der Abteilung Neurophysiologie danke ich ganz besonders; für die angenehme Arbeitsatmosphäre und dafür, dass sie mir den Alltag sehr versüßt haben. Es war schön, Zeit mit euch zu verbringen. Gerne erinnere ich mich zum Beispiel an die besondere Zeit mit Kristina und Janet, daran wie Torsten mir das erste Mal eine Patchpipette in die Hand gab und mir über die Zeit ein echter Freund geworden ist, an viele beruhigende Gespräche mit Anne Catrin, an Melanie, die beste Bachelorkandidatin der Welt, und an die Zeit mit Tina, mit Laufrunden bei denen wir meistens Spaß hatten und an viele weitere Gemeinsamkeiten.

Meinen Freunden außerhalb der Uni danke ich dafür, dass sie mein Leben auf unterschiedlichste Weise bereichern.

Von ganzem Herzen danke ich auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Robi; ihr seid wundervoll und meine Heimat. Heiner, du fehlst mir und wirst immer einen Platz in meinem Herzen haben.

Cornelia und Alfons möchte ich dafür danken, dass sie mich so liebevoll aufgenommen haben.

Simon, ich bin überglücklich, dass du Teil meines Lebens bist!

Vielen Dank