

**P2Y₁R-vermittelte Signalwege im *Bulbus olfactorius* und
ihre Bedeutung in der Neuroinflammation**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Anna Lena Seemann

aus

Hamburg

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Manuel A. Frieese

Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Thomas Oertner

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Thomas Oertner

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Matthias Kneussel

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Tim Magnus

Datum der mündlichen Prüfung: 06.11.2025

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Purinrezeptoren und purinerge Signalwege	1
1.1.1 Überblick mit Fokus auf das Zentrale Nervensystem.....	1
1.1.2 Der P2Y ₁ -Rezeptor	3
1.2 <i>Bulbus olfactorius</i>	3
1.2.1 Struktur und Funktion	3
1.2.2 Bedeutung purinerger Signalwege im <i>Bulbus olfactorius</i> mit Fokus auf den P2Y ₁ -Rezeptor.....	6
1.3 Multiple Sklerose	8
1.3.1 Klinischer Überblick	8
1.3.2 Ätiologie und Pathophysiologie.....	10
1.3.3 Der Geruchssinn in der Multiplen Sklerose.....	14
1.3.4 Bedeutung purinerger Rezeptoren in der Multiplen Sklerose mit Fokus auf den P2Y ₁ -Rezeptor.....	15
1.3.5 Die Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis als Tiermodell der Multiplen Sklerose.....	18
1.4 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	20
2 Materialien.....	22
2.1 Elektrophysiologie: Laborgeräte und Patchclamp Messstand	22
2.2 Elektrophysiologie: Materialien für Tierversuche	23
2.3 Elektrophysiologie: Gebrauchslösungen	24
2.4 Elektrophysiologie: Substanzen.....	25
2.5 Elektrophysiologie: Software.....	26

2.6	Primäre Neuronenkulturen: Laborgeräte.....	26
2.7	Primäre Neuronenkulturen: Materialien.....	26
2.8	Primäre Neuronenkulturen: Antikörper.....	28
2.9	Primäre Neuronenkulturen: Software.....	28
3	Methoden.....	29
3.1	Elektrophysiologie	29
3.1.1	Versuchstiere	29
3.1.1.1	Astrozytäre P2Y ₁ R-KO-Mäuse.....	29
3.1.1.2	Neuronale P2Y ₁ R-KO-Mäuse.....	29
3.1.1.3	Globale P2Y ₁ R-KO-Mäuse	30
3.1.1.4	Genotypisierung	30
3.1.1.5	Experimentelle Autoimmunenenzephalomyelitis (EAE)	31
3.1.2	Präparation der akuten Hirnschnitte.....	32
3.1.3	Patchclamp Versuchsaufbau	33
3.1.4	<i>Spot laser</i> induzierte lokale ATP-Applikation	34
3.1.5	ATP <i>uncaging</i> Versuche in astrozytären P2Y ₁ R-KO-Mäusen.....	35
3.1.6	ATP <i>uncaging</i> Versuche in neuronalen P2Y ₁ R-KO-Mäusen.....	36
3.1.7	ATP <i>uncaging</i> Versuche in globalen P2Y ₁ R-KO-Mäusen.....	36
3.1.8	Versuche in der experimentellen Autoimmunenenzephalomyelitis.....	37
3.1.8.1	ATP <i>uncaging</i>	37
3.1.8.2	Strom-Spannungs-Kennlinie	37
3.1.9	Auswertung der ATP <i>uncaging</i> Versuche	38
3.2	Primäre Neuronenkulturen	39
3.2.1	Versuchstiere	39
3.2.2	Präparation und Inkubation	39
3.2.3	Immuncytochemie.....	40

3.2.3.1	Fixierung und Färbung.....	40
3.2.3.2	Bildakquisition	41
3.2.3.3	Auswertung.....	42
3.2.4	<i>Calcium imaging</i>	43
3.2.4.1	Auswertung.....	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Elektrophysiologie	45
4.1.1	Die lokale ATP-Applikation im Bereich des primären Dendriten führt zu einer Depolarisation in Mitralzellen.....	45
4.1.2	Der neuronale P2Y ₁ -Rezeptor ist an der Vermittlung der ATP-abhängigen Mitralzelldepolarisation beteiligt	48
4.1.3	In transgenen 129/Sv-Mäusen mit einem globalen P2Y ₁ R-KO zeigt sich keine signifikante Reduktion der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation	54
4.1.4	Die Inhibition glutamaterger Rezeptoren führt zu einer Reduktion der indirekt vermittelten ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation.....	57
4.1.5	P2Y ₁ -vermittelte Signalwege sind in der chronischen EAE verändert....	59
4.1.6	Weitere beobachtete Veränderungen elektrophysiologischer Eigenschaften in der EAE	63
4.2	Primäre Neuronenkulturen	64
4.2.1	Die Charakterisierung primärer Neuronenkulturen aus dem <i>Bulbus olfactorius</i> zeigte einige signifikante Unterschiede zu kortikalen Kulturen.....	65
4.2.2	<i>Calcium imaging</i> : In einem Glutamatstressmodell konnte keine Neuroprotektion durch P2Y ₁ -Inhibition beobachtet werden	72
5	Diskussion.....	74
5.1	Allgemeine Aspekte in Hinblick auf die ATP <i>uncaging</i> Versuche und ihre Auswertung.....	74
5.2	P2Y ₁ -rezeptorabhängige Effekte auf die neuronale Aktivität in Mitralzellen des <i>Bulbus olfactorius</i>	76

5.2.1	ATP <i>uncaging</i> in astrozytären P2Y ₁ R-KO-Mäusen	76
5.2.2	ATP <i>uncaging</i> in neuronalen P2Y ₁ R-KO-Mäusen.....	78
5.2.3	ATP <i>uncaging</i> in transgenen 129/Sv-Mäusen mit globalem P2Y ₁ R-KO..	80
5.2.4	Beteiligung glutamaterger Mechanismen an der indirekten Vermittlung der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation	81
5.3	Die Veränderung P2Y ₁ -rezeptorabhängiger Signalwege im <i>Bulbus olfactorius</i> in der Neuroinflammation.....	83
5.4	Verwendung primärer Neuronenkulturen des <i>Bulbus olfactorius</i> zur Untersuchung P2Y ₁ -rezeptorvermittelter Effekte unter Stressbedingungen	85
6	Zusammenfassung	89
7	Summary	90
8	Literaturverzeichnis	91
9	Erklärung des Eigenanteils.....	99
10	Eidesstattliche Versicherung	100
11	Danksagung.....	101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: spontane Oszillationen des Ruhemembranpotentials einer Mitralzelle ..	45
Abbildung 2: Induktion einer Mitralzelldepolarisation durch lokale ATP-Photolyse im zugehörigen Glomerulus	47
Abbildung 3: Charakteristika der beschriebenen Mitralzelldepolarisation in einer C57Bl/6-Kohorte	48
Abbildung 4: Hypothese zur indirekten Vermittlung der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation.....	49
Abbildung 5: ATP <i>uncaging</i> in astrozytären P2Y ₁ R-KO-Mäusen.....	50
Abbildung 6: ATP <i>uncaging</i> in neuronalen P2Y ₁ R-KO-Mäusen	51
Abbildung 7: ATP <i>uncaging</i> in neuronalen P2Y ₁ R-KO-Mäusen unter P2Y ₁ R-Inhibition mittels MRS2179.....	53
Abbildung 8: ATP <i>uncaging</i> in globalen P2Y ₁ R-KO-Mäusen	54
Abbildung 9: ATP <i>uncaging</i> in globalen P2Y ₁ R-KO-Mäusen unter P2Y ₁ R-Inhibition mittels MRS2179.....	56
Abbildung 10: Glutamat ist an der indirekten Vermittlung der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation beteiligt	58
Abbildung 11: ATP <i>uncaging</i> in der akuten und chronischen EAE	60
Abbildung 12: glutamatabhängiger Anteil der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation in der akuten und chronischen EAE.....	62
Abbildung 13: Strom-Spannungs-Kennlinie von Mitralzellen in der akuten EAE.....	64
Abbildung 14: Astrozytenzahl in primären Neuronenkulturen des Cortex und des <i>Bulbus olfactorius</i>	66
Abbildung 15: Reelin-positive Zellen in primären Neuronenkulturen des Cortex und des <i>Bulbus olfactorius</i>	67
Abbildung 16: Doublecortin-positive Zellen in primären Neuronenkulturen des Cortex und des <i>Bulbus olfactorius</i>	68
Abbildung 17: Calbindin-positive Zellen in primären Neuronenkulturen des Cortex und des <i>Bulbus olfactorius</i>	69
Abbildung 18: Calretinin-positive Zellen in primären Neuronenkulturen des Cortex und des <i>Bulbus olfactorius</i>	70

Abbildung 19: Tyrosinhydroxylase-positive Zellen in primären Neuronenkulturen des Cortex und des <i>Bulbus olfactorius</i>	71
Abbildung 20: <i>Calcium imaging</i> in primären Neuronenkulturen des <i>Bulbus olfactorius</i>	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte (Elektrophysiologie).....	22
Tabelle 2: Patchclamp Messstand	23
Tabelle 3: Materialien für Tierversuche (Elektrophysiologie)	23
Tabelle 4: Materialien für EAE	24
Tabelle 5: Präparierlösung.....	24
Tabelle 6: ACSF	24
Tabelle 7: Intrazellulärlösung	25
Tabelle 8: Begasung (Elektrophysiologie).....	25
Tabelle 9: Substanzen (Elektrophysiologie).....	25
Tabelle 10: Software (Elektrophysiologie).....	26
Tabelle 11: Laborgeräte (primäre Neuronenkultur).....	26
Tabelle 12: Materialien für Tierversuche (primäre Neuronenkultur)	26
Tabelle 13: Materialien für primäre Neuronenkulturen	27
Tabelle 14: Materialien für Immuncytochemie.....	27
Tabelle 15: Materialien für <i>calcium imaging</i>	27
Tabelle 16: Virus für <i>calcium imaging</i>	27
Tabelle 17: Primärantikörper.....	28
Tabelle 18: Sekundärantikörper	28
Tabelle 19: Software (primäre Neuronenkulturen).....	28
Tabelle 20: für astrozytäres P2Y ₁ R-KO verwendete transgene Mauslinien	29
Tabelle 21: für neuronales P2Y ₁ R-KO verwendete transgene Mauslinien.....	30
Tabelle 22: für globales P2Y ₁ R-KO verwendete transgene Mauslinie.....	30
Tabelle 23: für Genotypisierungen verwendete Primer	31
Tabelle 24: EAE-Score	32
Tabelle 25: immuncytochemische Färbungen	41

Abkürzungsverzeichnis

AAV7	Adeno-assoziiertes Virus 7
ABC-Transporter	<i>ATP binding cassette transporter</i>
AC	<i>astrocyte</i> (Astrozyt)
ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i> (artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit)
ADP	Adenosindiphosphat
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i> (Integral)
cATP	DMNPE- <i>caged</i> -ATP
CB	Calbindin
CFA	<i>complete Freund's adjuvant</i> (komplettes Freund'sches Adjuvans)
CR	Calretinin
DCX	Doublecortin
EAAT1	<i>excitatory amino acid transporter 1</i> (s. Glast)
EAAT2	<i>excitatory amino acid transporter 2</i>
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
Eno2	neuronenspezifische Enolase 2
E-NPP	Ektonucleotidpyrophosphatase/phosphodiesterase
E-NTPDase	Ektonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase
EPL	<i>external plexiform layer</i> (externe plexiforme Schicht)
GCL	<i>granule cell layer</i> (Körnerzellschicht)
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GL	<i>glomerular layer</i> (Glomerularschicht)
Glast	<i>glutamate aspartate transporter</i> (s. EAAT1)
IP3	Inositoltriphosphat
IPL	<i>internal plexiform layer</i> (interne plexiforme Schicht)
JGN	<i>juxtaglomerular neuron</i> (juxtaglomeruläres Neuron)
KO	Knockout
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MAP2	<i>microtubule associated protein 2</i>

MBP	<i>myelin basic protein</i>
MC	<i>mitral cell</i> (Mitralzelle)
MCL	<i>mitral cell layer</i> (Mitralzellschicht)
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
MOG	<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i> (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein)
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
ONL	<i>olfactory nerve layer</i> (olfaktorische Nervenfaserschicht)
ORN	<i>olfactory receptor neuron</i> (olfaktorisches Rezeptorneuron)
PFA	Paraformaldehyd
PLC β	Phospholipase C β
PLP	<i>proteolipid protein</i>
S100B	<i>S100 calcium binding protein B</i>
TH	Tyrosinhydroxylase
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
WT	Wildtyp
XTP	Xanthosintriphosphat
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Purinrezeptoren und purinerge Signalwege

1.1.1 Überblick mit Fokus auf das Zentrale Nervensystem

Die Erforschung von extrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) als Neurotransmitter geht bis in die 1970er Jahre zurück (Burnstock, 2020). Inzwischen ist ein komplexes System purinerner Rezeptoren identifiziert worden, die entweder durch ATP oder durch seine Abbauprodukte Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosin aktiviert werden (Huang *et al.*, 2021). Teilweise haben auch die Pyrimidinnukleotide Uridintriphosphat (UTP) und Uridindiphosphat (UDP) eine agonistische Wirkung (Huang *et al.*, 2021).

Grob werden die Purinrezeptoren anhand ihrer Bindungspartner in zwei Gruppen eingeteilt: die adenosinbindenden P1-Rezeptoren und die P2-Rezeptoren, die durch die Bindung von ATP, ADP, UTP oder UDP aktiviert werden (Ralevic and Burnstock, 1998).

Die Gruppe der P1-Rezeptoren besteht aus vier bekannten Subtypen: dem A₁-, A_{2A}-, A_{2B}- und A₃-Rezeptor (Ralevic and Burnstock, 1998). Diese Rezeptoren sind metabotrope G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Borea *et al.*, 2018). Hierbei treten der A₁- und der A₃-Rezeptor bevorzugt G_{i/o}-Protein-gekoppelt auf (Fredholm *et al.*, 2001). Der A_{2A}- sowie der A_{2B}-Rezeptor dagegen entfalten ihre Wirkung durch eine bevorzugte Kopplung an ein G_s-Protein (Fredholm *et al.*, 2001).

Zwar kommen alle vier Adenosinrezeptorsubtypen im Zentralen Nervensystem (ZNS) vor, jedoch kommen dem A₁- und dem A_{2A}-Rezeptor aufgrund der höheren Expressionslevel die größte Bedeutung zu (Borea *et al.*, 2018).

Die P2-Rezeptoren werden weiter in zwei Subgruppen unterteilt. Es werden P2X- von P2Y-Rezeptoren unterschieden (Ralevic and Burnstock, 1998).

Bei den P2X-Rezeptoren handelt es sich um Liganden-gesteuerte Kationenkanäle, die eine Permeabilität für Na⁺, K⁺ oder Ca²⁺ aufweisen (Di Virgilio *et al.*, 2018). Die Rezeptoraktivierung erfolgt durch ATP (Huang *et al.*, 2021). Derzeit sind sieben verschiedene Subtypen, die P2X₁-P2X₇-Rezeptoren, bekannt (Burnstock, 2007). Alle sieben Subtypen sind im ZNS nachgewiesen (Burnstock, 2008, 2020; Huang *et al.*, 2021).

Bei den P2Y-Rezeptoren handelt es sich dagegen um metabotrope G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Ralevic and Burnstock, 1998). In Säugetieren sind derzeit acht Subtypen bekannt: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ und P2Y₁₄ (Huang *et al.*, 2021; von

Kügelgen, 2021). Diese unterscheiden sich in ihrer Bindungsaffinität zu den verschiedenen Nukleotiden ATP, ADP, UTP und UDP sowie in ihrer intrazellulären G-Protein-Kopplung (Burnstock, 2020; Huang *et al.*, 2021). Im Zentralen Nervensystem werden u.a. die Subtypen P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ und P2Y₁₂ exprimiert (Burnstock, 2020; Huang *et al.*, 2021).

Die Freisetzung von ATP in den Extrazellulärraum erfolgt aus synaptischen und sekretorischen Vesikeln, teilweise gemeinsam mit verschiedenen anderen Neurotransmittern wie beispielsweise GABA, Noradrenalin oder Glutamat (Abbracchio *et al.*, 2009). Die vesikuläre Freisetzung scheint sowohl aus Neuronen (Pankratov *et al.*, 2007; Abbracchio *et al.*, 2009) als auch aus Astrozyten zu erfolgen (Bowser and Khakh, 2007; Abbracchio *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2025). Darüber hinaus sind auch verschiedene andere Mechanismen der Nukleotidfreisetzung wie beispielsweise *ATP binding cassette transporter* (ABC-Transporter), Connexin- oder Pannexinhemikanäle, spannungsgesteuerte Anionenkanäle und P2X₇-Rezeptoren bekannt (Abbracchio *et al.*, 2009).

Das so freigesetzte extrazelluläre ATP wird schnell durch Ektonukleotidasen hydrolysiert und schrittweise in ADP, Adenosinmonophosphat (AMP) und Adenosin umgesetzt (Abbracchio *et al.*, 2009). Ektonukleotidasen können ebenfalls in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Vier große Gruppen sind die Ektonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen (E-NTPDasen), die Ektonukleotidpyrophosphatase/phosphodiesterasen (E-NPPs), die alkalischen Phosphatasen und die Ekto-5'-Nukleotidase (Zimmermann, Zebisch and Sträter, 2012). Alle genannten Gruppen werden auch im Gehirn exprimiert (Fields and Burnstock, 2006). Während E-NTPDasen wie beispielsweise CD39 und E-NPPs die Umsetzung von ATP und ADP zu AMP katalysieren, erfolgt die weitere Spaltung von AMP zu Adenosin durch die Ekto-5'-Nukleotidase, die auch als CD73 bezeichnet wird (Abbracchio *et al.*, 2009; Zimmermann, Zebisch and Sträter, 2012). Substrate der alkalischen Phosphatase sind Nukleosidtri-, -di- sowie -monophosphate (Abbracchio *et al.*, 2009).

Durch die Spaltung extrazellulärer Nukleotide regulieren die Ektonukleotidasen die Verfügbarkeit der Bindungspartner purinerger Rezeptoren (Zimmermann, Zebisch and Sträter, 2012) und nehmen ebenfalls eine wichtige Rolle in dem System purinerger Signalwege ein (Zimmermann, Zebisch and Sträter, 2012).

1.1.2 Der P2Y₁-Rezeptor

Im Fokus dieser Arbeit steht der P2Y₁-Rezeptor. Der wichtigste endogene Ligand dieses metabotropen Rezeptors ist ADP (Jacobson *et al.*, 2009), das in den meisten Spezies ein potenterer Agonist ist als ATP (Burnstock, 2007).

Intrazellulär ist der P2Y₁-Rezeptor bevorzugt mit einem G_q-Protein assoziiert (Huang *et al.*, 2021; von Kügelgen, 2021). Eine Rezeptoraktivierung führt daher zu einer Aktivierung der Phospholipase C β (PLC β) und einer Erhöhung von Inositoltriphosphat (IP₃) mit der Folge einer Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (Burnstock, 2007; Huang *et al.*, 2021).

Lokalisiert ist der P2Y₁-Rezeptor peripher u.a. in Thrombozyten, epithelialen und endothelialen Zellen, Immunzellen und Osteoklasten (Burnstock, 2008).

Im Zentralen Nervensystem ist der P2Y₁-Rezeptor einer der P2Y-Rezeptoren mit dem höchsten Vorkommen (Miras-Portugal *et al.*, 2019). Hier ist er u.a. im *Hippocampus*, *Cerebellum* und Rückenmark lokalisiert (Huang *et al.*, 2021). Auch im *Bulbus olfactorius* konnte das Vorhandensein des P2Y₁-Rezeptors gezeigt werden (Simon, Webb and Barnard, 1997; Rotermund *et al.*, 2019). Der P2Y₁-Rezeptor ist u.a. auf Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten lokalisiert (Miras-Portugal *et al.*, 2019).

Im Rahmen der Forschung stehen verschiedene pharmakologische Substanzen zur Modulation der Rezeptoraktivität zur Verfügung. MRS2365 ist ein potenter und selektiver Rezeptoragonist (Chhatiwala *et al.*, 2004; Burnstock, 2007). Im Gegensatz hierzu ermöglichen MRS2179, MRS2279 und MRS2500 eine selektive Inhibition des P2Y₁-Rezeptors (Burnstock, 2007).

1.2 *Bulbus olfactorius*

1.2.1 Struktur und Funktion

Der *Bulbus olfactorius* ist eine Struktur, die sich kranial am Mausgehirn befindet und entwicklungsgeschichtlich Teil des *Telencephalon* ist (Schröder, Moser and Huggenberger, 2020). Histologisch ist er schichtförmig strukturiert (Nagayama, Homma and Imamura, 2014). Von außen nach innen unterscheidet man die olfaktorische Nervenfaserschicht (ONL), die Glomerularschicht (GL), die externe plexiforme Schicht (EPL), die Mitralzellschicht (MCL), die interne plexiforme Schicht (IPL) und die Körnerzellschicht (GCL) (Nagayama, Homma and Imamura, 2014).

Funktionell ist der *Bulbus olfactorius* Teil des olfaktorischen Systems und erhält seine afferenten Informationen aus dem Riechepithel (Rotermund *et al.*, 2019). Hier sind die olfaktorischen Rezeptorneurone lokalisiert, auf denen die Geruchsrezeptoren exprimiert werden (Nagayama, Homma and Imamura, 2014). Es ist eine Vielzahl verschiedener Geruchsrezeptoren bekannt. So konnten im Mausgenom etwa 1000 verschiedene potentiell funktionelle Geruchsrezeptorgene identifiziert werden (Zhang and Firestein, 2002). Jedes Rezeptorneuron exprimiert jedoch ausschließlich einen einzigen Rezeptortyp (Mori and Sakano, 2024). Die Axone der Rezeptorneurone lagern sich zu Faszikeln zusammen, den sogenannten *Fila olfactoria*, und ziehen durch die *Lamina cribrosa* des *Os ethmoidale* zum *Bulbus olfactorius* (Crespo *et al.*, 2019). Hier durchqueren sie zunächst die äußerste histologische Schicht, die olfaktorische Nervenfaserschicht (Schröder, Moser and Huggenberger, 2020). Innerhalb des olfaktorischen Nerven (Crespo *et al.*, 2019) und der olfaktorischen Nervenfaserschicht des *Bulbus olfactorius* existieren spezielle Gliazellen, die sogenannten olfaktorischen Hüllgliazellen, die die Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone umhüllen (Crespo *et al.*, 2019; Zhao, Hu and Liu, 2024).

Die Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone enden in der Glomerularschicht (Nagayama, Homma and Imamura, 2014). Diese besteht aus rundlichen Strukturen, den sogenannten Glomeruli, innerhalb derer die olfaktorischen Rezeptorneurone u.a. Synapsen mit den primären Dendriten der Mitralzellen und *tufted* Zellen, den glutamatergen Projektionsneuronen des *Bulbus olfactorius*, bilden (Nagayama, Homma and Imamura, 2014; Crespo *et al.*, 2019). Hierbei sind die einzelnen Glomeruli jeweils spezifisch für einen Geruchsrezeptor, d.h. in einen Glomerulus projizieren ausschließlich olfaktorische Rezeptorneurone mit derselben Geruchsrezeptorexpression (Mori and Sakano, 2024). Dies führt zu einem geruchsstoffspezifischen Aktivierungsmuster verschiedener Glomeruli (Mori and Sakano, 2024).

Sowohl Mitralzellen als auch *tufted* Zellen weisen einen einzelnen primären Dendriten auf, der sich innerhalb eines Glomerulus verzweigt (Nagayama, Homma and Imamura, 2014).

Die Somata dieser Zellen liegen in tiefer gelegenen Schichten des *Bulbus olfactorius*. Während die Somata der Mitralzellen in der Mitralzellschicht lokalisiert sind, finden sich die der *tufted* Zellen hingegen größtenteils in der externen plexiformen Schicht

(Nagayama, Homma and Imamura, 2014). Beide Zellpopulationen können in weitere Subgruppen eingeteilt werden.

Die *tufted* Zellen können anhand der Lokalisation ihrer Somata innerhalb der externen plexiformen Schicht unterschieden werden (Imamura, Ito and LaFever, 2020). Interne *tufted* Zellen befinden sich in der tiefen externen plexiformen Schicht, mittlere *tufted* Zellen in der intermediären externen plexiformen Schicht und externe *tufted* Zellen in der superfiziellen externen plexiformen Schicht oder der Glomerularschicht (Imamura, Ito and LaFever, 2020).

Die Somata der Mitralzellen liegen in der Mitralzellschicht, anhand der Lokalisation sekundärer Dendriten können zwei verschiedene Mitralzellsubpopulationen unterschieden werden (Imamura, Ito and LaFever, 2020). Sekundäre Dendriten der Typ I Mitralzellen verzweigen sich in der tiefen externen plexiformen Schicht, während die der Typ II Mitralzellen bis in die intermediäre externe plexiforme Schicht reichen (Imamura, Ito and LaFever, 2020).

Neben den olfaktorischen Rezeptorneuronen, Mitralzellen und *tufted* Zellen sind auch weitere Neuronenpopulationen an der Informationsverarbeitung innerhalb der Glomeruli beteiligt, die größtenteils nicht in Regionen außerhalb des *Bulbus olfactorius* projizieren (Nagayama, Homma and Imamura, 2014). Diese lassen sich unter dem Oberbegriff der juxtaglomerulären Zellen zusammenfassen (Nagayama, Homma and Imamura, 2014). Man unterscheidet u.a. periglomeruläre Zellen und superfizielle *short axon* Zellen, von denen ebenfalls jeweils mehrere verschiedene Subpopulationen existieren (Nagayama, Homma and Imamura, 2014). In Abhängigkeit des jeweiligen Subtyps variiert auch die Neurotransmitterfreisetzung, die meisten Subtypen setzen entweder GABA oder Dopamin frei (Nagayama, Homma and Imamura, 2014).

Auch externe *tufted* Zellen werden zu den juxtaglomerulären Zellen gezählt (Nagayama, Homma and Imamura, 2014). Ein Teil der externen *tufted* Zellen fungiert wie die periglomerulären Zellen und die superfiziellen *short axon* Zellen ausschließlich als Interneuron und projiziert nicht in Regionen außerhalb des *Bulbus olfactorius* (Nagayama, Homma and Imamura, 2014).

In der Glomerularschicht befinden sich zudem glomeruläre Astrozyten, deren Somata um die Glomeruli herum angeordnet sind, während sich ihre Fortsätze in das Zentrum der Glomeruli ausbreiten (Zhao, Hu and Liu, 2024). Auch für diese Astrozyten sind

Interaktionen mit Neuronen des glomerulären Netzwerks beschrieben (Zhao, Hu and Liu, 2024).

Innerhalb der an die Glomerularschicht angrenzenden externen plexiformen Schicht existieren ebenfalls verschiedene Interneuronenpopulationen wie beispielsweise die von Gehuchten-Zellen, innere Horizontalzellen oder große *short axon* Zellen (Nagayama, Homma and Imamura, 2014). Die meisten dieser Zellen sind GABAerg und stehen in reziprokem synaptischem Kontakt mit Mitralzellen (Nagayama, Homma and Imamura, 2014).

Zudem formen in der externen plexiformen Schicht sekundäre Dendriten von Mitralzellen und *tufted* Zellen reziproke Synapsen mit Dendriten sogenannter Körnerzellen (Nagayama, Homma and Imamura, 2014). Bei Körnerzellen handelt es sich um axonlose inhibitorische Interneurone, deren Somata in der Körnerzellschicht unterhalb der Mitralzellschicht und der internen plexiformen Schicht lokalisiert sind (Nagayama, Homma and Imamura, 2014). Ihre Dendriten reichen bis in die externe plexiforme Schicht (Nagayama, Homma and Imamura, 2014).

Die Körnerzellschicht beherbergt darüber hinaus verschiedene Typen ebenfalls GABAerger tiefer *short axon* Zellen (Nagayama, Homma and Imamura, 2014).

Die Efferenzen des *Bulbus olfactorius*, also die Axone der Projektionsneurone, bilden den *Tractus olfactorius lateralis* (Imamura, Ito and LaFever, 2020) und projizieren neben anderen Strukturen u.a. in den *Nucleus olfactorius anterior*, den piriformen Cortex, die Amygdala und den entorhinalen Cortex (Schröder, Moser and Huggenberger, 2020).

1.2.2 Bedeutung purinerger Signalwege im *Bulbus olfactorius* mit Fokus auf den P2Y₁-Rezeptor

Das Auftreten von ATP als Cotransmitter ist in vielen Regionen des Nervensystems nachgewiesen (Rotermund *et al.*, 2019). Im *Bulbus olfactorius* wird ATP nach elektrischer Stimulation der Axone olfaktorischer Rezeptorneurone simultan mit Glutamat aus den Axonendigungen im Bereich der Glomerularschicht sowie entlang der Axone innerhalb der Nervenfaserschicht freigesetzt (Thyssen *et al.*, 2010; Rotermund *et al.*, 2019). Astrozyten stellen eine weitere Quelle extrazellulären ATPs im *Bulbus olfactorius* dar (Roux *et al.*, 2015; Rotermund *et al.*, 2019).

Die im Vergleich zu anderen Hirnregionen besonders hohe Aktivität von Ectonukleotidasen im *Bulbus olfactorius* lässt eine wichtige Rolle der Spaltprodukte des

freigesetzten ATPs als Transmittermolekül im *Bulbus olfactorius* vermuten (Rotermund *et al.*, 2019).

Hierzu passend konnte auch die Anwesenheit verschiedener purinerger Rezeptoren im *Bulbus olfactorius* nachgewiesen werden (Lohr *et al.*, 2014; Rotermund *et al.*, 2019).

So konnte die Expression aller vier Adenosinrezeptoren (A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3) im *Bulbus olfactorius* gezeigt werden (Rotermund *et al.*, 2019). In Hinblick auf den A_1 - sowie den A_{2A} -Rezeptor ist der *Bulbus olfactorius* in der Maus im Vergleich zu anderen Regionen sogar eine der Hirnregionen mit der höchsten Expression (Rotermund *et al.*, 2019).

Aus der Gruppe der P2X-Rezeptoren konnten bisher die Subtypen P2X₂, P2X₄, P2X₅ und P2X₆ im *Bulbus olfactorius* nachgewiesen werden (Rotermund *et al.*, 2019). Diese sind auf Mitralzellen und *tufted* Zellen lokalisiert, ein Vorkommen auf Gliazellen des *Bulbus olfactorius* ist bisher nicht bekannt (Rotermund *et al.*, 2019).

Darüber hinaus konnte auch die Anwesenheit des P2Y₁-Rezeptors im *Bulbus olfactorius* gezeigt werden (Simon, Webb and Barnard, 1997; Rotermund *et al.*, 2019). Ein besonders hohes Vorkommen scheint hier in der Glomerularschicht vorzuliegen (Simon, Webb and Barnard, 1997; Rotermund *et al.*, 2019).

Verschiedene Forschungsarbeiten der letzten Jahrzehnte konnten zeigen, dass purinerge Signalwege im *Bulbus olfactorius* u.a. Einfluss auf neurogliale Interaktionen nehmen, eine neuromodulatorische Wirkung haben und an der Vermittlung der neurovaskulären Kopplung beteiligt sind (Rotermund *et al.*, 2019). Für den P2Y₁-Rezeptor, der im Fokus dieser Arbeit steht, werden diese Funktionen im Folgenden etwas detaillierter beschrieben.

Es konnte beobachtet werden, dass der P2Y₁-Rezeptor in Astrozyten des *Bulbus olfactorius* eine Erhöhung des intrazellulären Calciums vermittelt (Rotermund *et al.*, 2019). Verschiedene Forschungsarbeiten geben Hinweise darauf, dass die P2Y₁-abhängige intrazelluläre Calciumerhöhung in Astrozyten u.a. an der neurovaskulären Kopplung, also der Modulation des Vasotonus in Abhängigkeit der neuronalen Aktivität, beteiligt ist (Rotermund *et al.*, 2019).

Auch in einer P75-Neurotrophinrezeptor positiven Subpopulation olfaktorischer Hüllgliazellen in der äußeren Nervenfaserschicht des *Bulbus olfactorius* konnte eine P2Y₁-rezeptorabhängige Calciumerhöhung gezeigt werden (Rotermund *et al.*, 2019).

Auch diese Zellen scheinen an einer Vermittlung der neurovaskulären Kopplung beteiligt zu sein (Rotermund *et al.*, 2019).

Die Freisetzung von ATP im Bereich des Glomerulus führt zudem zu einer Exzitation von Mitralzellen, die teilweise P2Y₁-rezeptorabhängig ist (Schulz, 2018). Diese scheint nicht durch eine direkte P2Y₁-Rezeptoraktivierung auf der Mitralzelle selbst vermittelt zu sein, sondern ist vermutlich von einer bisher nicht identifizierten Subpopulation P2Y₁-rezeptorexprimierender Interneurone abhängig (Schulz, 2018; Rotermund *et al.*, 2019).

1.3 Multiple Sklerose

1.3.1 Klinischer Überblick

Mit weltweit ca. 2.8 Millionen Betroffenen (Walton *et al.*, 2020) ist die Multiple Sklerose (MS) die häufigste Autoimmunerkrankung des Zentralen Nervensystems (Hemmer and Gehring, 2024). Sowohl innerhalb Deutschlands (Holstiege *et al.*, 2022) als auch weltweit (Walton *et al.*, 2020) konnte in den letzten Jahren ein Anstieg der Prävalenz beobachtet werden, wobei hier u.a. auch eine verbesserte Diagnosestellung und Therapie als Ursachen diskutiert werden (Walton *et al.*, 2020). Das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose liegt bei 32 Jahren (Walton *et al.*, 2020). Frauen sind weltweit etwa doppelt so häufig betroffen wie Männer (Walton *et al.*, 2020), in Deutschland waren im Jahr 2019 sogar etwa 72% aller MS-Patienten weiblich (Holstiege *et al.*, 2022). Häufige Symptome im Rahmen einer MS-Erkrankung betreffen die Motorik, das sensorische System, das Sehen oder auch Funktionen des autonomen Nervensystems (Compston and Coles, 2008). Je nach betroffenem Hirnareal können jedoch beispielsweise auch cerebelläre Symptome, Schmerzen, kognitive Symptome oder Fatigue auftreten (Compston and Coles, 2008).

Anhand der zeitlichen Entwicklung der Symptome werden verschiedene Verlaufsformen unterschieden (Lublin and Reingold, 1996; Lublin *et al.*, 2014). Mit etwa 85% die häufigste Form ist die schubförmig remittierende MS (Lublin and Reingold, 1996; Dendrou, Fugger and Friese, 2015; Hemmer and Gehring, 2024). Sie zeichnet sich durch das Auftreten neurologischer Defizite in Form von abgrenzbaren Schüben aus, zwischen den einzelnen Schüben kommt es zu einer vollständigen oder teilweisen Rückbildung der Symptome (Lublin and Reingold, 1996). Im weiteren Verlauf kann die schubförmig remittierende MS in eine sekundär progrediente MS übergehen. Dies betrifft etwa 80%

der Patienten innerhalb der ersten zwei Jahrzehnte nach Diagnosestellung (Dendrou, Fugger and Friese, 2015). Die sekundär progrediente MS zeichnet sich durch das Auftreten einer schubunabhängigen Progression aus, ggf. können zusätzlich aufgesetzte Schübe auftreten (Lublin and Reingold, 1996; Lublin *et al.*, 2014; Hemmer and Gehring, 2024). Mit etwa 10% deutlich seltener tritt die primär progrediente Form der MS auf (Dendrou, Fugger and Friese, 2015), bei der von Beginn an eine schubunabhängige Progression zu beobachten ist, vereinzelt Schübe können auch bei dieser Verlaufsform auftreten (Lublin and Reingold, 1996; Lublin *et al.*, 2014; Hemmer and Gehring, 2024). Die Diagnosestellung erfolgt anhand der McDonald Kriterien (Thompson, Banwell, *et al.*, 2018). Um eine MS diagnostizieren zu können, müssen die Kriterien der zeitlichen sowie räumlichen Dissemination des Auftretens MS-typischer Befunde erfüllt sein (Thompson, Banwell, *et al.*, 2018).

Das Kriterium der zeitlichen Dissemination kann klinisch oder radiologisch gesichert werden. Im MRT kann der Nachweis einer zeitlichen Dissemination ein- oder zweizeitig erfolgen (Hemmer and Gehring, 2024). Darüber hinaus kann auch der Nachweis liquorspezifischer oligoklonaler Banden zur Erfüllung des Kriteriums der zeitlichen Dissemination verwendet werden (Thompson, Banwell, *et al.*, 2018; Hemmer and Gehring, 2024).

Der Nachweis einer räumlichen Dissemination erfolgt über das Vorliegen MS-typischer Läsionen in mindestens zwei von vier MS-typischen Lokalisationen im MRT, als MS-typisch lokalisiert gelten hierbei periventrikuläre, kortikale/juxtakortikale, infratentorielle und spinale Läsionen (Thompson, Banwell, *et al.*, 2018; Hemmer and Gehring, 2024).

Zudem sollte das Vorliegen einer anderen Erklärung für die aufgetretenen Symptome ausgeschlossen werden (Thompson, Banwell, *et al.*, 2018; Hemmer and Gehring, 2024). 2024 erfolgte eine Überarbeitung der oben genannten Kriterien. U.a. wurde hier der *Nervus opticus* als fünfte MS-typische Lokalisation definiert (Hemmer and Gehring, 2024; Dugue, 2025). Zudem sollen künftig im Rahmen der MRT-Bildgebung das Zentrale Venenzeichen sowie paramagnetische Ringläsionen als Teil der Kriterien berücksichtigt werden und intrathekal produzierte freie Kappa-Leichtketten sollen als Alternative zu liquorspezifischen oligoklonalen Banden Anwendung finden können (Hemmer and

Gehring, 2024; Dugue, 2025). Eine rein klinische Diagnosestellung soll nicht mehr möglich sein (Hemmer and Gehring, 2024; Dugue, 2025).

Die Therapie der Multiplen Sklerose umfasst die akute Schubtherapie und die langfristige immunmodulierende Therapie (Hemmer and Gehring, 2024). Darüber hinaus spielen auch die Anpassung des Lebensstils sowie die symptomatische Therapie eine Rolle (Hemmer and Gehring, 2024). Auf eine detaillierte Diskussion der komplexen Therapie der MS wird an dieser Stelle aufgrund der fehlenden Relevanz für die vorliegende Arbeit verzichtet. Entsprechende Informationen finden sich beispielsweise in der aktuellen Leitlinie zur Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose (Hemmer and Gehring, 2024).

1.3.2 Ätiologie und Pathophysiologie

Pathophysiologisch ist die MS durch das Auftreten konfluierender Läsionen im Bereich des Zentralen Nervensystems gekennzeichnet, innerhalb derer es zu einer Demyelinisierung und Schädigung von Oligodendrozyten kommt (Dendrou, Fugger and Friese, 2015). Klinische Schübe korrelieren mit dem Auftreten fokaler Inflammation und Demyelinisierung, oft im Bereich der weißen Substanz (Dendrou, Fugger and Friese, 2015).

Im weiteren Verlauf kommt es mehr und mehr auch zu einer axonalen Schädigung und einer zunehmenden Hirnatrophie (Dendrou, Fugger and Friese, 2015), was klinisch einer Progression neurologischer Defizite entspricht (Dendrou, Fugger and Friese, 2015).

Im Bereich fokaler Herde formen Astrozyten sklerotische Narben (Dendrou, Fugger and Friese, 2015).

Die pathophysiologischen Mechanismen, die zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Multiplen Sklerose führen, sind noch nicht vollständig verstanden (Attfield *et al.*, 2022). Zwar ist das Vorhandensein einer antigenspezifischen Immunreaktion gegen verschiedene ZNS-Antigene in der MS gut belegt (Attfield *et al.*, 2022). So konnten beispielsweise Immunreaktionen gegen verschiedene Epitope des Myelins wie *proteolipid protein* (PLP) und *myelin basic protein* (MBP) in MS-Patienten nachgewiesen werden (Attfield *et al.*, 2022). Die Bedeutung dieser antigenspezifischen Immunreaktion für die Pathogenese der Erkrankung ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (Attfield *et*

al., 2022). Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass diese die alleinige Ursache einer MS-Erkrankung darstellt (Attfield *et al.*, 2022).

Klar ist jedoch, dass inflammatorische Prozesse in allen Stadien der Erkrankung eine Rolle spielen (Dendrou, Fugger and Friese, 2015). Diese sind jedoch in den akuten Stadien deutlich ausgeprägter als während der chronischen Phase der MS (Dendrou, Fugger and Friese, 2015).

Bereits sehr früh im Krankheitsverlauf zeigen sich ausgedehnte inflammatorische Infiltrate bestehend aus CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und Monozyten im Zentralen Nervensystem von Patienten mit schubförmiger MS (Attfield *et al.*, 2022). Durch die hieraus folgende Schädigung von Oligodendrozyten entstehen die für die MS typischen Läsionen, welche größtenteils in der weißen Substanz lokalisiert sind (Attfield *et al.*, 2022). Seltener treten auch kortikale Läsionen im Bereich der grauen Substanz auf (Attfield *et al.*, 2022). Dies legt das Auftreten eines Nervenzellverlusts, einem Merkmal der Krankheitsprogression, auch bereits in frühen Erkrankungsstadien nahe (Attfield *et al.*, 2022). Quantitativ bilden in diesen frühen Stadien Makrophagen die häufigste infiltrierende Immunzellpopulation, gefolgt von CD8⁺ T-Zellen (Dendrou, Fugger and Friese, 2015). CD4⁺ T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen liegen in geringerer Zahl vor (Dendrou, Fugger and Friese, 2015). Die ZNS-Läsionen gehen zudem mit einer Störung der Bluthirnschranke einher (Dendrou, Fugger and Friese, 2015; Attfield *et al.*, 2022).

In späteren Stadien der Erkrankung treten neue inflammatorische Läsionen seltener auf (Attfield *et al.*, 2022). Aktive Läsionen können jedoch in chronisch aktive Läsionen übergehen (Attfield *et al.*, 2022). Diese zeigen sich als demyelinisierte Plaques mit einem hypozellulären Zentrum und einem Saum aus Makrophagen oder Mikroglia (Attfield *et al.*, 2022).

Zudem sind zunehmend Läsionen in der grauen Substanz zu beobachten (Attfield *et al.*, 2022). Diese können in Assoziation mit ektopen Lymphfollikeln auftreten, die sich im Bereich der Meningen an der Hirnoberfläche ausbilden können und B-Zellen sowie CD8⁺ T-Zellen enthalten (Attfield *et al.*, 2022).

Auch neurodegenerative Prozesse sind ein wichtiges Charakteristikum in der Pathophysiologie der MS (Attfield *et al.*, 2022; Woo, Engler and Friese, 2024). Neurodegeneration innerhalb der grauen Substanz wird nach derzeitiger Auffassung als wichtiges Korrelat der klinischen Progression der Erkrankung betrachtet (Woo, Engler

and Friese, 2024). In den letzten Jahren konnte in verschiedenen klinischen Studien gezeigt werden, dass eine von der Schubaktivität unabhängige Progression auch in frühen Stadien der schubförmigen MS beobachtet werden kann, was für das Auftreten neurodegenerativer Prozesse bereits in frühen Krankheitsstadien spricht (Woo, Engler and Friese, 2024). Auf molekularer Ebene sind verschiedene Mechanismen bekannt, die an der Neurodegeneration in der MS beteiligt sind (Woo, Engler and Friese, 2024).

Eine wichtige Rolle spielt in diesem Zusammenhang die Exzitotoxizität. Diese ist u.a. durch ein erhöhtes Vorliegen von extrazellulärem Glutamat bedingt, das aus untergehenden Neuronen, infiltrierenden Immunzellen sowie proinflammatorischen Gliazellen freigesetzt wird (Woo, Engler and Friese, 2024). In der Folge kommt es durch verschiedene Mechanismen wie u.a. einer vermehrten Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums, der neben anderen Faktoren an der Vermittlung der neurotoxischen Effekte des Glutamats beteiligt ist (Woo, Engler and Friese, 2024).

Weitere Mechanismen, die eine Rolle im Rahmen der Neurodegeneration in der Multiplen Sklerose zu spielen scheinen, umfassen u.a. mitochondriale Pathologien, epigenetische Dysregulationen, Störungen des neuronalen Transports und Proteinaggregation (Woo, Engler and Friese, 2024). Es kommt zudem zu einer Aktivierung verschiedener Formen des programmierten Zelltods wie beispielsweise Ferroptose oder Nekroptose (Woo, Engler and Friese, 2024).

Ätiologisch ist der Auslöser, der zur Entstehung einer MS-Erkrankung führt, noch nicht vollständig geklärt (Dendrou, Fugger and Friese, 2015; Reich, Lucchinetti and Calabresi, 2018). In den letzten Jahren konnten dennoch einige Risikofaktoren identifiziert werden, die mit dem Auftreten der Erkrankung assoziiert sind (Attfield *et al.*, 2022).

Passend zu der Beobachtung, dass Verwandte ersten Grades von MS-Patienten ein im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöhtes Risiko für eine eigene MS-Erkrankung haben (Reich, Lucchinetti and Calabresi, 2018), konnten inzwischen mehr als 200 genetische Varianten identifiziert werden, die mit einem erhöhten MS-Risiko einhergehen, von denen die meisten mit dem Immunsystem assoziiert sind (Reich, Lucchinetti and Calabresi, 2018).

Eine große Gruppe der identifizierten Risikogene stellen HLA-assoziierte Gene dar (Attfield *et al.*, 2022). Hierbei führen HLA Klasse II-Allele zu einer Erhöhung des Erkrankungsrisikos, während HLA Klasse I-Allele eher mit einem protektiven Effekt assoziiert zu sein scheinen (Moutsianas *et al.*, 2015; Attfield *et al.*, 2022). Aus dieser Gruppe ist die HLA-DRB1*15:01 Variante mit einer *odds ratio* von 3.92 die relevanteste (Moutsianas *et al.*, 2015).

Über die HLA-Allele hinaus ist eine Vielzahl weiterer genetischer Varianten bekannt, die einen Risikofaktor für eine MS-Erkrankung darstellen. Die meisten dieser Allele stehen ebenfalls in Verbindung zum Immunsystem (Attfield *et al.*, 2022). Genetische Risikofaktoren, die den Krankheitsverlauf beeinflussen, konnten bisher jedoch nicht identifiziert werden (Reich, Lucchinetti and Calabresi, 2018).

Nicht nur die Genetik, sondern auch verschiedene Umweltfaktoren haben einen Einfluss auf das MS-Risiko (Attfield *et al.*, 2022).

Gut belegt ist insbesondere der Einfluss von EBV-Infektionen. In einer Kohorte amerikanischer Militärangehöriger zeigte sich eine 32-fache Erhöhung des MS-Risikos nach einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (Bjornevik *et al.*, 2022). Eine Arbeit konnte Hinweise auf ein mögliches molekulares Mimikry zwischen dem EBV-Antigen EBNA1 und dem Zelladhäsionsmolekül GlialCAM in der MS zeigen (Lanz *et al.*, 2022), das im ZNS u.a. von Oligodendrozyten exprimiert wird (Favre-Kontula *et al.*, 2008). Ein solches molekulares Mimikry wäre also als mögliche mechanistische Erklärung der Assoziation von EBV-Infektionen mit dem MS-Risiko denkbar (Lanz *et al.*, 2022).

Epidemiologisch ist global eine Assoziation der MS-Prävalenz mit dem geografischen Breitengrad zu beobachten, wobei die MS-Prävalenz mit zunehmender Nähe zum Äquator sinkt (Simpson *et al.*, 2011). Verschiedene Arbeiten konnten eine Korrelation des MS-Risikos mit der Sonneneinstrahlung einer Region herstellen (Pierrot-Deseilligny and Souberbielle, 2017). Ein möglicher Faktor, der diese Korrelation vermitteln könnte, ist Vitamin D (Pierrot-Deseilligny and Souberbielle, 2017). Verschiedene Studien konnten Hinweise auf eine Korrelation zwischen einem Vitamin-D-Mangel und/oder einer ungenügenden Sonnenexposition in frühen Lebensabschnitten und einem erhöhten MS-Risiko zeigen (Pierrot-Deseilligny and Souberbielle, 2017).

Darüber hinaus haben auch verschiedene Faktoren des Lebensstils wie beispielsweise Adipositas, Ernährung und Nikotinabusus (Reich, Lucchinetti and Calabresi, 2018;

Thompson, Baranzini, *et al.*, 2018; Attfield *et al.*, 2022) einen Einfluss auf das MS-Erkrankungsrisiko.

1.3.3 Der Geruchssinn in der Multiplen Sklerose

Inzwischen ist belegt, dass Störungen des Geruchssinnes im Rahmen einer Multiplen Sklerose auftreten können (Joseph and De Luca, 2016). Eine Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2016 gibt die Frequenz olfaktorischer Störungen in MS-Patienten im Rahmen psychophysischer Testungen mit etwa 35.6% an, wobei starke Schwankungen zwischen verschiedenen Studien zu beobachten waren (Joseph and De Luca, 2016). Eine andere Arbeit berichtet ebenfalls, dass die Angaben zur Prävalenz olfaktorischer Funktionsstörungen zwischen verschiedenen Studien stark schwanken, die Häufigkeit in robusteren Studien wird hier jedoch mit etwa 20-45% angegeben (Lucassen *et al.*, 2016). Eine olfaktorische Dysfunktion kann bereits früh im Krankheitsverlauf auftreten und kann teilweise sogar bereits bei Patienten mit einem Klinisch Isolierten Syndrom nachgewiesen werden (Lutterotti *et al.*, 2011).

Bei Analyse der olfaktorischen Funktion im Krankheitsverlauf konnte im Rahmen einer Übersichtsarbeit beobachtet werden, dass in den analysierten Studien Marker der akuten Neuroinflammation wie beispielsweise das Auftreten von Schüben oder die Verdickung der retinalen Nervenfaserschicht am ehesten mit einem erhöhten Geruchsschwellenwert korrelierten, während Marker der Neurodegeneration wie das Serum Neurofilament eher mit einer verminderten Fähigkeit zur Geruchsidentifikation und -diskriminierung korrelierten (Todd *et al.*, 2023).

In der progressiven MS zeigte sich in einer Studie zudem eine Korrelation zwischen einer olfaktorischen Dysfunktion bei Beobachtungsbeginn und einer höheren durchschnittlichen monatlichen Progressionsrate in den folgenden zehn Jahren (da Silva *et al.*, 2020). In diesem Kontext wird die Möglichkeit der Verwendung klinischer olfaktorischer Testungen als Prognoseparameter im Kontext der MS diskutiert (da Silva *et al.*, 2020).

Als elektrophysiologisches Korrelat der klinischen olfaktorischen Dysfunktion konnte zudem in verschiedenen Studien eine Alteration olfaktorisch evozierter Potentiale in der MS gezeigt werden (Joseph and De Luca, 2016).

Anatomisch betrachtet ist das olfaktorische System sehr komplex aufgebaut und von der Funktion verschiedener Strukturen innerhalb und außerhalb des ZNS abhängig (Joseph and De Luca, 2016). Der Anteil der einzelnen Strukturen an Einschränkungen der Riechfunktion ist schwer zu bestimmen (Joseph and De Luca, 2016). Im Folgenden wird etwas genauer auf den *Bulbus olfactorius*, der im Fokus dieser Arbeit steht, eingegangen.

Für diese Region konnten mehrere Studien eine Volumenreduktion in MS-Patienten mittels MRT-Untersuchungen nachweisen (Joseph and De Luca, 2016). Eine Korrelation dieser Volumenreduktion mit der Erkrankungsdauer konnte gezeigt werden (Tanik *et al.*, 2015).

In einer pathologischen Studie, die den *Bulbus olfactorius* und den *Tractus olfactorius* betrachtete, konnte zudem eine Demyelinisierung im Bereich dieser Regionen in etwa 70% der untersuchten MS-Patienten nachgewiesen werden (DeLuca *et al.*, 2015). Einhergehend hiermit zeigte sich auch eine axonale Schädigung, die mit dem Grad der Demyelinisierung sowie der parenchymalen Inflammation korrelierte (DeLuca *et al.*, 2015).

Insgesamt lässt sich also sagen, dass inzwischen sowohl die olfaktorische Dysfunktion als potentielle Manifestation der MS sowie auch die mögliche pathophysiologische Beteiligung des *Bulbus olfactorius* im Rahmen der Erkrankung belegt sind.

1.3.4 Bedeutung purinerger Rezeptoren in der Multiplen Sklerose mit Fokus auf den P2Y₁-Rezeptor

Die Rolle verschiedener purinerger Rezeptoren im Rahmen der MS-Erkrankung ist inzwischen belegt (Burnstock, 2016; Laketa and Lavrnja, 2024). So scheinen beispielsweise der P2X₇-, P2X₄-, P2Y₁₂-, A₁- und A_{2A}-Rezeptor eine Rolle in der MS bzw. der EAE zu spielen (Burnstock, 2008; Laketa and Lavrnja, 2024).

Da der Fokus dieser Arbeit auf dem P2Y₁-Rezeptor liegt, konzentriert sich auch dieses Kapitel im Folgenden auf diesen Rezeptor.

In der EAE, dem Tiermodell der Multiplen Sklerose, konnte im lumbosakralen Rückenmark eine Reduktion der Expression des P2Y₁-Rezeptors auf mRNA-Ebene bei Beginn sowie auf dem Höhepunkt der akuten Erkrankung nachgewiesen werden (Jakovljevic *et al.*, 2017). Auf Proteinebene zeigte sich eine Reduktion des P2Y₁-

Rezeptors sowohl während des Höhepunktes der akuten EAE als auch in der Erholungsphase 30 Tage nach Immunisierung (Jakovljevic *et al.*, 2017).

In einer in vitro Studie konnte zudem in Oligodendrozyten-Progenitorzellen aus Ratten eine regulatorische Bedeutung des P2Y₁-Rezeptors für die Funktion dieser Zellen nachgewiesen werden (Agresti *et al.*, 2005). In der Zellkultur zeigte sich hier, dass der P2Y₁-Rezeptor an der Regulation der Zellmigration von Oligodendrozyten-Progenitorzellen beteiligt ist (Agresti *et al.*, 2005). Zudem konnten in cerebellären Schnittkulturen Hinweise auf eine Modulation der Entwicklung reiferer Zellstadien durch ATP und den P2Y-Rezeptoragonisten ADP β S gezeigt werden (Agresti *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang wird eine potentielle Rolle des P2Y₁-Rezeptors für Remyelinisierungsprozesse im Kontext inflammatorischer demyelinisierender Erkrankungen des ZNS wie der MS diskutiert (Agresti *et al.*, 2005).

Darüber hinaus finden sich in der Literatur wenig Informationen, die sich konkret auf die Rolle des P2Y₁-Rezeptors in der Multiplen Sklerose oder ihrem Tiermodell, der EAE, beziehen. Ergebnisse verschiedener Forschungsarbeiten mit Bezug auf andere neurologische Erkrankungen haben jedoch gezeigt, dass der P2Y₁-Rezeptor eine komplexe Rolle in der Neurodegeneration einnimmt (Rodrigues, Figueira and Marques, 2022). In diesem Zusammenhang finden sich in der Literatur sowohl Hinweise auf P2Y₁-rezeptorvermittelte neuroprotektive Effekte als auch Belege für eine neurodegenerative Funktion des Rezeptors, wobei sich insgesamt eher ein neurodegenerativer Effekt abzeichnet (Rodrigues, Figueira and Marques, 2022).

So existieren beispielsweise mehrere Forschungsarbeiten, die den P2Y₁-Rezeptor in verschiedenen Schlaganfall-/Ischämie-Modellen untersucht haben (Förster and Reiser, 2015; Rodrigues, Figueira and Marques, 2022). Verschiedene Studien zeigten hier einen neuroprotektiven Effekt durch die Applikation von P2Y₁-Rezeptorantagonisten und in P2Y₁-Rezeptor KO-Mäusen (Rodrigues, Figueira and Marques, 2022).

Auch für das Schädel-Hirn-Trauma konnte eine Studie sowohl in hippocampalen Schnittkulturen als auch in einem Tiermodell traumatischer Hirnverletzungen einen neuroprotektiven Effekt des P2Y₁-Antagonisten MRS2179 nachweisen (Choo *et al.*, 2013).

In einem Mausmodell der Alzheimererkrankung konnte zudem gezeigt werden, dass die Inhibition des P2Y₁-Rezeptors zu einer Reduktion krankheitsassoziiierter astroglialer und

neuronaler Hyperaktivität sowie einer Verbesserung des räumlichen Lernens und Gedächtnisses führt (Delekate *et al.*, 2014; Reichenbach *et al.*, 2018).

Im Gegensatz hierzu zeigten sich jedoch insbesondere in verschiedenen in vitro Modellen wie beispielsweise oxidativem Stress und Sauerstoff-Glucose-Deprivation teilweise auch Hinweise auf einen neuroprotektiven Effekt P2Y₁-rezeptorvermittelter Signalwege (Förster and Reiser, 2015).

Der Einfluss des P2Y₁-Rezeptors auf die neuronale Schädigung im Rahmen verschiedener ZNS-Erkrankungen ist also komplex. Insgesamt zeigt die Evidenzlage jedoch in Richtung einer Zunahme der neuronalen Schädigung durch P2Y₁-Rezeptoraktivierung (Rodrigues, Figueira and Marques, 2022). Auf molekularer Ebene sind einige pathophysiologische Mechanismen bekannt, die die Förderung neuronaler Schädigung durch P2Y₁-Rezeptoraktivierung erklären könnten.

Der P2Y₁-Rezeptor kontrolliert astrozytäre Funktionen, wodurch er an der Vermittlung intrazellulärer Calciumerhöhungen, der Freisetzung inflammatorischer Cytokine sowie einer Freisetzung von Glutamat mit der Folge der Förderung von Übererregbarkeit und neuronaler Schädigung beteiligt zu sein scheint (Kuboyama *et al.*, 2011; Rodrigues, Figueira and Marques, 2022).

Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass in einem Modell traumatischer Hirnschädigung eine Verminderung der P2Y₁-Rezeptorexpression auf Astrozyten mit einer verstärkten astrozytären Narbenbildung und Neuroprotektion einhergeht (Shinozaki *et al.*, 2017; Rodrigues, Figueira and Marques, 2022).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des P2Y₁-Rezeptors zu einer Modulation der glutamatinduzierten NMDA-rezeptorvermittelten Exzitotoxizität führt (Simões *et al.*, 2018; Rodrigues, Figueira and Marques, 2022). Mutmaßlich wird dieser Effekt über eine subzelluläre Erhöhung der NMDA-Rezeptordichte im Bereich des Axons mit der Folge eines Calpain-vermittelten axonalen Cytoskelettschadens vermittelt (Simões *et al.*, 2018; Rodrigues, Figueira and Marques, 2022).

Auch wenn in Hinblick auf die genauen Effekte und molekularen Schädigungsmechanismen noch einiges unklar ist, weist die Gesamtheit der oben beschriebenen Daten auf eine Beteiligung des P2Y₁-Rezeptors im Rahmen verschiedener ZNS-Erkrankungen mit neurodegenerativen und/oder neuroinflammatorischen Komponenten hin.

1.3.5 Die Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis als Tiermodell der Multiplen Sklerose

Die Ursprünge der Experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) reichen bereits viele Jahrzehnte zurück (Rivers, Sprunt and Berry, 1933; Rivers and Schwentker, 1935; Constantinescu *et al.*, 2011). Ursprünglich entstand das Modell im Kontext der Erforschung impfassoziiertes Enzephalitiden im Rahmen der Rabiesimpfung (Rivers, Sprunt and Berry, 1933; Rivers and Schwentker, 1935; Constantinescu *et al.*, 2011). Heute ist es das am häufigsten genutzte Tiermodell der Multiplen Sklerose (Dedoni *et al.*, 2023).

Inzwischen existiert eine Vielzahl verschiedener Varianten des EAE-Modells (Rangachari and Kuchroo, 2013; Robinson *et al.*, 2014; Glatigny and Bettelli, 2018).

Anhand der Induktion der Autoimmunität können aktive EAE-Modelle von passiven EAE-Modellen unterschieden werden. Im Falle der aktiven EAE erfolgt eine direkte Immunisierung des Versuchstieres mit myelinspezifischen Antigenen (Stromnes and Goverman, 2006a). Verwendete Antigene sind beispielsweise MBP, PLP oder Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) (Glatigny and Bettelli, 2018). Im Gegensatz hierzu erfolgt bei der passiven EAE zunächst die Immunisierung eines Spendertieres, aus welchem myelinreaktive T-Zellen gewonnen werden, die anschließend einem Empfängertier injiziert werden und hier die EAE auslösen (Stromnes and Goverman, 2006b).

Die Induktion der EAE ist in einer Vielzahl verschiedener Spezies möglich (Baxter, 2007). Die am häufigsten verwendete Spezies ist die Maus (Robinson *et al.*, 2014). Hier ist die Suszeptibilität sowie der Phänotyp der induzierten EAE abhängig vom genutzten Mausstamm und dem verwendeten Antigen (Bittner *et al.*, 2014; Glatigny and Bettelli, 2018).

Insgesamt finden sich in der Literatur also Beschreibungen einer Vielzahl heterogener EAE-Modelle (Constantinescu *et al.*, 2011; Rangachari and Kuchroo, 2013; Robinson *et al.*, 2014; Glatigny and Bettelli, 2018). Je nach Fragestellung können die verschiedenen Modelle zur Abbildung und Untersuchung verschiedener Aspekte der MS verwendet werden (Constantinescu *et al.*, 2011; Rangachari and Kuchroo, 2013; Glatigny and Bettelli, 2018).

Der folgende Abschnitt bezieht sich daher auf das in dieser Arbeit verwendete EAE-Modell, für das C57Bl/6-Mäuse aktiv mit dem MOG₃₅₋₅₅-Peptid immunisiert wurden.

Hierbei handelt es sich um ein sehr weit verbreitetes und gut reproduzierbares EAE-Modell (Bittner *et al.*, 2014). Im Rahmen der Immunisierung wird MOG₃₅₋₅₅ in Kombination mit komplettem Freund'schem Adjuvans verwendet und zusätzlich erfolgt die intraperitoneale Injektion von Pertussistoxin am Tag der Immunisierung sowie zwei Tage später (Bittner *et al.*, 2014).

Die folgende Autoimmunenzephalomyelitis zeigt in der Regel einen monophasischen Verlauf. Die klinischen Symptome beginnen etwa zwischen dem 9. und 14. Tag nach Immunisierung. Nach Erreichen eines Höhepunktes zeigt sich eine unvollständige Rückbildung der Symptome und die Erkrankung erreicht eine chronische Plateauphase (Bittner *et al.*, 2014).

Das Verteilungsmuster wird durch prominente Rückenmarksläsionen bestimmt (Bittner *et al.*, 2014). Klinisch kommt es daher typischerweise zu einer aufsteigenden schlaffen Lähmung, die zunächst den Schwanz betrifft und sich anschließend auf die Hinterläufe sowie je nach individueller Ausprägung der Krankheitssymptome auch auf die Vorderläufe ausdehnt (Bittner *et al.*, 2014). In verschiedenen Studien konnten jedoch auch Veränderungen in anderen Regionen des Zentralen Nervensystems nachgewiesen werden (Kuerten *et al.*, 2007; Hamilton *et al.*, 2019; Voskuhl and MacKenzie-Graham, 2022). Auch für den in dieser Arbeit untersuchten *Bulbus olfactorius* konnte eine Immunzellinfiltration im Rahmen der EAE gezeigt werden (Schubert *et al.*, 2025). Zudem zeigte sich in Verhaltensexperimenten eine funktionelle Beeinträchtigung des Geruchssinnes in der EAE (Schubert *et al.*, 2025).

Insgesamt stellt die EAE ein sehr nützliches Tiermodell im Rahmen der MS-Forschung dar, auch wenn einige signifikante Unterschiede bestehen (Robinson *et al.*, 2014). Die EAE bildet die humane Erkrankung nicht in all ihren Aspekten vollständig ab und es gibt einige Limitationen, die bei Verwendung dieses Modells zu beachten sind (Procaccini *et al.*, 2015).

Ein wesentlicher Unterschied besteht in der Induktion der Erkrankung. Während die Multiple Sklerose spontan entsteht und ggf. über Jahre hinweg latent verlaufen kann, erfolgt die Induktion der EAE immer künstlich und die Symptome setzen einige Tage bis Wochen nach der Immunisierung ein (Dedoni *et al.*, 2023). In der EAE gibt es zudem ein

bekanntes Zielantigen, während in der MS kein einheitliches Zielantigen bekannt ist (Constantinescu *et al.*, 2011) und die pathophysiologische Abhängigkeit der Erkrankung allein von einer antigenspezifischen Immunreaktion aktuell eher unwahrscheinlich erscheint (Attfield *et al.*, 2022). Außerdem ist zu beachten, dass die im Rahmen der aktiven Immunisierung zusätzlich zum Zielantigen verabreichten Adjuvantien wie CFA und Pertussistoxin selbst ebenfalls einen Einfluss auf die Immunreaktion haben (Bittner *et al.*, 2014; Robinson *et al.*, 2014).

Ein weiterer wesentlicher Unterschied liegt zudem im Verteilungsmuster der Neuroinflammation. Während in der EAE der Fokus der Inflammation meist im Rückenmark lokalisiert ist, zeigt sich in der Multiplen Sklerose oft eine dominante Inflammation im Gehirn (Dendrou, Fugger and Friese, 2015).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Eine Vielzahl wissenschaftlicher Daten der letzten Jahrzehnte legen nahe, dass purinerge Signalwege im *Bulbus olfactorius* eine zentrale Rolle einnehmen. Dennoch sind in Hinblick auf die genauen Funktionsweisen purinerger Signalwege im *Bulbus olfactorius* noch viele Fragen offen. Dies gilt auch für den P2Y₁-Rezeptor, einen hauptsächlich ADP-bindenden G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Das erste Ziel dieser Arbeit besteht daher darin, die Beteiligung des P2Y₁-Rezeptors im Rahmen neuronaler Netzwerke innerhalb des *Bulbus olfactorius* mithilfe von Patchclamp-Versuchen in akuten Hirnschnitten zu untersuchen. Der Fokus liegt hierbei auf den Effekten P2Y₁-rezeptorvermittelter Signalwege auf Mitralzellen, den Projektionsneuronen des *Bulbus olfactorius*.

Darüber hinaus ist inzwischen auch eine Rolle des P2Y₁-Rezeptors in verschiedenen neurologischen Erkrankungen belegt. Auch für die Multiple Sklerose gibt es Hinweise auf mögliche Alterationen P2Y₁-rezeptorvermittelter Signalwege im Rahmen der Erkrankung.

Aufgrund der gut belegten Rolle purinerger Signalwege im *Bulbus olfactorius* sowie der beobachteten Beteiligung des Geruchssinnes und des *Bulbus olfactorius* in der Multiplen Sklerose soll in dieser Arbeit der *Bulbus olfactorius* als Modellregion genutzt werden, um Veränderungen P2Y₁-rezeptorvermittelter Signalwege unter neuroinflammatorischen Bedingungen zu untersuchen.

Hierfür soll einerseits die Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis, ein Tiermodell der MS, im Rahmen physiologischer Messungen in akuten Hirnschnitten genutzt werden. Andererseits soll für die weitere Untersuchung P2Y₁-rezeptovermittelter Effekte in vitro ein Glutamatstressmodell in primären Neuronenkulturen aus dem *Bulbus olfactorius* zur Anwendung kommen.

2 Materialien

2.1 Elektrophysiologie: Laborgeräte und Patchclamp Messstand

Tabelle 1: Laborgeräte (Elektrophysiologie)

Gerät	Modell/Firma
Binokular	Wild M7, Heerburg AG, Schweiz
Clean Bench	Air Clean 600 PCR Workstation, Starlab, Hamburg
Elektronikrührer	Variomag® Mono, USA
Feinwaage	ALJ 220-4NM, Kern GmbH, Großmaischeld
Gelkammer	Typ Mini 180V/200 mA/ 12 W, Thermo Fischer Scientific, USA
Heizblock	AccuBlock™ Digital Dry Bath, Labnet International Inc., USA
Heizrührplatten	IKAMAG RH, IKA Combimag RCT, IKamag RCT, Jahnke & Kunkel GmbH und Co. KG, Staufen
Thermocycler	Mastercycler gradient, eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	5008, Tec, Dormagen
Millipore-Filtersystem	Milli-QPLUS PF, Merck Millipore, USA
Osmometer	Osmomat 3000basic, GONOTEC GmbH, Berlin
pH-Elektrode	pH electrode BlueLine, SI Analytics, Mainz
pH-Messgerät	PB-11, Sartorius AG, Göttingen
Stromgeber	PowerPac Basic 300V/400 mA/75 W, Bio Rad, USA
Thermocycler	Arktik Thermal Cycler, Thermo Fischer Scientific, USA
Tischzentrifuge	PicoFuge® Mikrozentrifuge, Stratagene, USA
Vakuumzentrifuge	Savant SpeedVac SC110, Thermo Scientific, USA
Vibratom	Leica VT 1200 S, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Vortexer	Mixer Uzusio VTX 3000 L, Harmony, LMS Laboratory & Medical Supplies CO., LTD., Japan
Waage	PBC, Kern GmbH, Großmaischeld

Tabelle 2: Patchclamp Messstand

Gerät	Modell/Firma
Analog-Digitalwandler	Axon CNS Digidata 1440 A, Molecular Devices, USA
Vorverstärker	Axon current clamp and voltage clamp Headstage CV7B
Faradaykäfig	Science Products, Hofheim
Laserraster-Mikroskop (konfokal)	Nikon-C1-SHV, Nikon, Japan
Laser	Diodenlaser (405nm), Argonlaser (488nm), Helium- Neon-Laser (543nm), Melles Griot, Bensheim D-Eclipse C1, Nikon, Japan
Laserdiode	LuxX® 375-70, Omicron Laserage Laserprodukte GmbH, Rodgau, bezogen über Acal BFi Germany GmbH, Gröbenzell
Mikromanipulatorsystem	Patch Star, Scientifica, Großbritannien
Mikropipettenpuller	P-97 Flaming/Brown micropipette puller, Sutter Instruments, USA
Mikroskop	Leica DM LFS, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar
Objektiv	Nikon LWD 16x/0,80 W, Japan
Patchclamp Verstärker	Axon CNS Multiclamp 700B, Molecular Devices, USA
Pumpensystem	Ismatec, IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
Schläuche für Perfusionssystem	Tygon-Schlauch ST, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Tisch, schwingungsgedämpft	TMC, USA
Videokamera	Digital Sight DS Qi1MC, Nikon, Japan

2.2 Elektrophysiologie: Materialien für Tierversuche

Tabelle 3: Materialien für Tierversuche (Elektrophysiologie)

Substanz	Firma
Isofluran (Forene®)	Abbot
Tamoxifen	Sigma-Aldrich

Tabelle 4: Materialien für EAE

Substanz	Firma
Isofluran	Baxter
MOG ₃₅₋₅₅ Peptid, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK	peptides and elephants
Freund's Adjuvans, inkomplett	BD Difco
Mycobacterium tuberculosis	BD Difco
Pertussistoxin, aus Bordetella pertussis	Merck Millipore
DietGel® Recovery	Clear H ₂ O

2.3 Elektrophysiologie: Gebrauchslösungen

Tabelle 5: Präparierlösung

Substanz	Endkonzentration in mM
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

Tabelle 6: ACSF

Substanz	Endkonzentration in mM
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

Tabelle 7: Intrazellulärlösung
Substanz

Substanz	Endkonzentration in mM
NaCl	10
K-Gluconat	105
K3-Citrat	20
HEPES	10
EGTA	0.2
MgCl ₂	0.5
CaCl ₂	0.08
KOH	nach Bedarf zur Einstellung des pH-Wertes
Mg-ATP	3
Na-GTP	0.5

Tabelle 8: Begasung (Elektrophysiologie)

Gas	Firma
Gasgemisch 5% CO ₂ /95% O ₂	Linde, Westfalen

2.4 Elektrophysiologie: Substanzen

Tabelle 9: Substanzen (Elektrophysiologie)

Substanz	Bezug
DMNPE- <i>caged</i> -ATP	Tocris
NPE- <i>caged</i> -XTP	Jena Bioscience
DPCPX	Sigma
ZM241385	Sigma
MRS2179	Abcam
NBQX	Tocris, AL
D-APV	Tocirs
CPCCOEt	Abcam
TTX	RDS, AL
DMSO	Sigma-Aldrich

2.5 Elektrophysiologie: Software

Tabelle 10: Software (Elektrophysiologie)

Software	Firma
Nikon EZ-C1 Viewer	Nikon, Japan
Omicron Control Center v 2.1.4	Omicron Laserage Laserprodukte GmbH, Rodgau
pClamp 10 Software Suite	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
LabChart 8	ADInstruments, Dunedin, New Zealand
Microsoft Excel	Microsoft, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, LLC, Boston, USA
BioRender	BioRender, Toronto, Canada

2.6 Primäre Neuronenkulturen: Laborgeräte

Tabelle 11: Laborgeräte (primäre Neuronenkultur)

Gerät	Firma
Wild M3Z Stereomikroskop	Leica
Zellkultur Hood	Thermo Scientific
Zentrifuge (Multifuge 3 S-R)	Heraeus
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Science Services
Lichtmikroskop	Nikon
Inkubator	Thermo Scientific
LSM900 confocal laser scanning microscope	Zeiss
(Immuncytochemie)	
LSM700 confocal laser scanning microscope	Zeiss
(calcium imaging)	
CO2Module S1	PeCon/Zeiss
TempModule S1	PeCon/Zeiss
Heating Insert	PeCon

2.7 Primäre Neuronenkulturen: Materialien

Tabelle 12: Materialien für Tierversuche (primäre Neuronenkultur)

Material	Firma
CO ₂ /O ₂ Gasgemisch (20% Sauerstoff in Kohlenstoff)	SOL Group
CO ₂	SOL Group

Tabelle 13: Materialien für primäre Neuronenkulturen

Material	Firma
DPBS, w/o: Ca, w/o: Mg	PAN-Biotech
Poly-D-Lysine-hydrobromid	Sigma-Aldrich
HBSS, ohne Calcium, ohne Magnesium	ThermoFisher
DMEM-F12	ThermoFisher
FBS (fetal bovine serum)	Pan-Biotech
PNGM™ Primary Neuron Growth Medium	Lonza
BulletKit®	
Trypsin-EDTA (0.05%), phenolrot	ThermoFisher
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich

Tabelle 14: Materialien für Immuncytochemie

Material	Firma
24-well Platte	Greiner
Deckgläser Stärke 1 rund, Ø: 12mm	Carl Roth
Adhäsionsobjektträger Superfrost® Plus	Carl Roth
Eselserum (NDS)	Sigma/Merck
Triton-X® 100	Sigma-Aldrich
ROTI®Mount FluorCare DAPI	Carl Roth
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth
PBS	Pan-Biotech

Tabelle 15: Materialien für *calcium imaging*

Material	Firma
MRS2179	Tocris
L-Glutamatsäure	Sigma-Aldrich
Ionomycin calcium salt	Alomone
μ-Dish 35 mm Quad	Ibidi

Tabelle 16: Virus für *calcium imaging*

Virus	Plasmid	AAV-Produktion
AAV7-hSyn-GCamp6f	Addgene, ID 100837	UKE Vector Facility

2.8 Primäre Neuronenkulturen: Antikörper

Tabelle 17: Primärantikörper

Antikörper	host Spezies	Klonalität	Firma (Katalognummer)
Anti-MAP2	Maus	monoklonal	Abcam (ab11268)
Anti-MAP2	Huhn	polyklonal	Abcam (ab5392)
Anti-GFAP	Huhn	polyklonal	Millipore (AB5541)
Anti-S100B	Huhn	polyklonal	Synaptic Systems (287006)
Anti-Reelin	Maus	monoklonal	Merck Millipore (MAB5364)
Anti-DCX	Hase	polyklonal	Abcam (ab18723)
Anti-Calbindin	Huhn	polyklonal	Synaptic Systems (214006)
Anti-Calretinin	Huhn	polyklonal	Synaptic Systems (214106)
Anti-Tyrosinhydroxylase	Hase	polyklonal	Sigma-Aldrich (AB152)

Tabelle 18: Sekundärantikörper

Zielspezies	Fluoreszenz	host Spezies	Firma (Katalognummer)
Huhn	Alexa488	Esel	Jackson (703-545-155)
Maus	Alexa555	Esel	Abcam (ab150110)
Hase	Alexa647	Esel	Abcam (ab181347)

2.9 Primäre Neuronenkulturen: Software

Tabelle 19: Software (primäre Neuronenkulturen)

Software	Firma
ZEN black	Zeiss
ZEN blue	Zeiss
Fiji (ImageJ)	(Schindelin <i>et al.</i> , 2012)
R	The R Project for Statistical Computing
R Studio	Posit Software
Microsoft Excel	Microsoft
GraphPad Prism	GraphPad Software

3 Methoden

3.1 Elektrophysiologie

3.1.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere für die elektrophysiologischen Experimente wurden mit Ausnahme der im Rahmen der EAE-Versuche verwendeten Tiere in einer offenen Tierhaltung gehalten.

3.1.1.1 Astrozytäre P2Y₁R-KO-Mäuse

Hierbei handelte es sich um eine transgene Mauslinie auf dem Hintergrund des C57Bl/6-Stammes. Das astrozytäre Knockout des P2Y₁Rs basierte auf dem Cre/loxP-System. Es wurde durch die Verpaarung der untenstehenden Mauslinien generiert. Tiere der KO-Gruppe hatten den Genotyp *Glast CreERT2 +/-*, *P2Y1 flx/flx*. Die Kontrollgruppe bestand aus Tieren mit dem Genotyp *Glast CreERT2 -/-* *P2Y1 flx/flx* oder *Glast CreERT2 +/-* *P2Y1 wt/wt*. Einige Tiere trugen zudem das Allel des Reporters *TdTomato*.

Bei der hier verwendeten *CreERT2* handelte es sich um eine durch Tamoxifenbindung induzierbare Cre-Rekombinase. Die Tamoxifeninjektion zur Induktion des Knockouts erfolgte in Tieren der KO-Gruppe sowie Tieren der Kontrollgruppe an 3 Tagen in einer täglichen Dosis von 1mg/10g Körpergewicht 3-6 Wochen vor dem Versuch.

Tabelle 20: für astrozytäres P2Y₁R-KO verwendete transgene Mauslinien

Mauslinie	Spezifikation	Bezug
Glast CreERT2	Slc1a3tm1(cre/ERT2)Mgoe	M. Götz, München, MGI:3830051
P2Y ₁ flx	Gen: p2ry1 (MGI 105049); Zitat: (Jahn <i>et al.</i> , 2018)	Christian Gachet, Strasbourg, France, INSERM U949
TdTomato	B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm14 (CAGtdTomato)Hze/J	Jax - #007908

3.1.1.2 Neuronale P2Y₁R-KO-Mäuse

Hierbei handelte es sich ebenfalls um eine transgene Mauslinie auf dem Hintergrund des C57Bl/6-Stammes. Das neuronale Knockout des P2Y₁Rs basierte auf dem Cre/loxP-System und wurde durch die Verpaarung der drei untenstehenden Mauslinien generiert. Tiere der KO-Gruppe hatten den Genotyp *Eno Cre +/-*, *P2Y1 flx/flx*. Die Kontrollgruppe

bestand aus Tieren mit dem Genotyp $\text{Eno Cre}^{-/-} \text{P2Y}_1 \text{ flx/flx}$. Alle Tiere trugen zudem hetero- oder homozygot das gefloxt Allel des Reporters TdTomato.

Tabelle 21: für neuronales $\text{P2Y}_1\text{R-KO}$ verwendete transgene Mauslinien

Mauslinie	Spezifikation	Bezug
Eno Cre	STOCK Tg(Eno2-cre)39Jme/J	Jax - #005938
$\text{P2Y}_1 \text{ flx}$	Gen: p2ry1 (MGI 105049); Zitat: (Jahn <i>et al.</i> , 2018)	Christian Gachet, Strasbourg, France, INSERM U949
TdTomato	B6;129S6- Gt(ROSA)26Sortm14(CAGtdTomato) Hze/J	Jax - #007908

3.1.1.3 Globale $\text{P2Y}_1\text{R-KO-Mäuse}$

Hierbei handelte es sich um eine transgene Mauslinie auf Hintergrund des Stammes 129/Sv mit konstitutivem KO des P2Y_1 -Rezeptors. Die verwendete Mauslinie ist unten aufgeführt. Die Kontrollgruppe bestand aus 129/Sv-Wildtyp-Tieren mit gleichem genetischem Hintergrund.

Die in dieser Arbeit gemessene Kohorte wurde aus dem Labor von PD Dr. Heike Franke an der Universität Leipzig bezogen.

Tabelle 22: für globales $\text{P2Y}_1\text{R-KO}$ verwendete transgene Mauslinie

Mauslinie	Spezifikation	Bezug
$\text{P2Y}_1 \text{ KO}$	Gen: p2ry1 (MGI 105049); Zitat: (Fabre <i>et al.</i> , 1999)	Beverly Koller, Durham, USA

3.1.1.4 Genotypisierung

Die Genotypisierungen der globalen $\text{P2Y}_1\text{R-KO-Mäuse}$ erfolgte im Labor von Dr. Franke an der Universität Leipzig. Die Genotypisierungen der übrigen transgenen Mäuse wurden von Anne Catrin Rakete durchgeführt. Hierbei wurden unten aufgeführte Primer verwendet.

Tabelle 23: für Genotypisierungen verwendete Primer

Mauslinie	Primer
Glast	GAGGCACTTGGCTAGGCTCTGAGGA
	GAGGAGATCCTGACCGATCAGTTGG
	GGTGTACGGTCAGTAAATTGGACAT
Eno2 (Cre)*	AAACGTTGATGCCGGTGAACGTGC
	TAACATTCTCCCACCGTCAGTACG
P2Y ₁ flx	CCTGCGCGTCCTGTTGTGTAAC
	CAGCAGCGGCGAGAGACTCAGC
TdTomato	AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA
	CCGAAAATCTGTGGGAAGTC
	GGCATTAAAGCAGCGTATCC
	CTGTTCTGTACGGCATGG

* im Falle der Eno2-Linie wurde auf die Cre-Rekombinase getestet

3.1.1.5 Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis (EAE)

Die Induktion der Experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis erfolgte in weiblichen C57Bl/6-Mäusen, die bis kurz vor dem Versuch in einer SPF-Tierhaltung gehalten wurden.

Zur Immunisierung wurden 200µg des MOG₃₅₋₅₅ Peptids in komplettem Freund'schem Adjuvans (CFA; Zusammensetzung: inkomplettes Freund'sches Adjuvans + 4mg/ml Mycobacterium tuberculosis) verwendet und subkutan im Bereich der Flanken verabreicht. Zusätzlich wurden am Tag der Immunisierung sowie am zweiten Tag nach erfolgter Immunisierung jeweils 200ng Pertussistoxin intraperitoneal injiziert.

Im Anschluss wurde der Gesundheitszustand der Tiere ab dem 6. Tag nach Injektion täglich kontrolliert und die Ausprägung der Krankheitssymptome anhand des untenstehenden Scores quantifiziert und dokumentiert. Tiere ab einem Score von 4 wurden aus dem Versuch genommen. Im Versuch wurden Tiere mit einem maximalen Score im Krankheitsverlauf zwischen 2.75 und 3.5 verwendet.

Die Immunisierungen sowie die tägliche Bestimmung des EAE-Scores wurden durch Dr. Charlotte Schubert durchgeführt.

Experimente, die sich auf die akute Phase der EAE beziehen, wurden am 13.-16. Tag nach Immunisierung durchgeführt. Experimente, die sich auf die chronische Phase der EAE

beziehen, fanden am 29.-30. Tag nach Immunisierung statt. Zum Zeitpunkt des Versuchs waren die Mäuse zwischen 11 und 17 Wochen alt.

Die Kontrollgruppe bestand aus gesunden C57Bl/6-Mäusen gleichen Alters. Diese ist zudem Grundlage der in Abbildung 3 und Abbildung 10 gezeigten Graphen.

Die in dieser Arbeit gezeigte Analyse der Strom-Spannungs-Kennlinie in der akuten EAE enthält zusätzlich zu den oben genannten Tieren die Daten einer zweiten Kohorte von EAE-Tieren und gesunden Kontrollen, die von Janine Gierke gemessen wurden.

Tabelle 24: EAE-Score

Score	Merkmal
0	Keine Krankheitssymptome
0.5	Leichte Schwanzlähmung, Schwanz verliert beim Klettern den Kontakt
1.0	Komplette Schwanzlähmung
1.25	Beim Klettern: Hinterbeine werden hauptsächlich sequentiell eingesetzt, aber verlieren manchmal den Kontakt
1.5	Beim Klettern: Hinterbeine rutschen manchmal ab und werden gemeinsam versetzt (Hoppeln)
1.75	Beim Klettern: Gemeinsames Versetzen der Hinterbeine wirkt wie kurzes Abrutschen
2.0	Beim Klettern: Hinterbeine verlieren beide kurz den Kontakt
2.25	Beim Klettern: Hinterbeine verlieren den Kontakt über einen längeren Zeitraum
2.5	Beim Klettern: Hinterbeine können keinen Kontakt zum Gitter herstellen
2.75	Verstärkte Hinterbeinschwäche, Tier watschelt deutlich
3.0	Hinterbeine wirken zusätzlich steif
3.25	Ein Hinterbein ist komplett gelähmt, aber Tier im Käfig mobil
3.5	Beide Hinterbeine sind komplett gelähmt, aber Tier im Käfig mobil
3.75	Sporadische Seitenlage der Hinterläufe, aber Tier im Käfig mobil
4.0	Hinterbeinlähmung + Vorderbeinschwäche, das Tier kann sich allein nicht mehr zum Futter bewegen

3.1.2 Präparation der akuten Hirnschnitte

Es erfolgte zunächst eine inhalative Anästhesie mittels Isofluran, bevor die Mäuse dekapitiert wurden. Anschließend erfolgte die Präparation des Mauskopfes in einem Bad aus eisgekühlter Präparationslösung, deren Zusammensetzung obenstehender

Tabelle zu entnehmen ist. Das Flüssigkeitsbad wurde während der Präparation kontinuierlich mit einem Gasgemisch aus 5% CO₂ und 95% O₂ begast.

Zunächst wurde die Haut über der Schädelkalotte entfernt. Anschließend wurde diese mittels eines Schnitts entlang der *Sutura sagittalis* eröffnet und so weit entfernt, dass die Cortexhemisphären sowie die beiden *Bulbi olfactorii* freilagen. Mittels eines koronaren Schnittes im Bereich des Frontallappens wurden die *Bulbi olfactorii* unter Mitnahme des frontalen Anteils der Cortexhemisphären vom übrigen Gehirn getrennt. Anschließend wurden sie unter vorsichtiger Durchtrennung der *Fila olfactoria* entlang der *Lamina cribrosa* aus der verbliebenen Schädelkalotte herausgelöst.

Unter Verwendung eines Vibratoms wurden im Anschluss in horizontaler Schnittführung 220µm dicke Schnitte hergestellt. Auch dies erfolgte in einem eisgekühlten Bad aus Präparationslösung unter kontinuierlicher Begasung mit 5% CO₂/95% O₂.

Nach beendeter Präparation wurden die fertigen Schnitte für mindestens 30 Minuten bei 30°C in einem begasten (5% CO₂/95% O₂) Bad aus ACSF inkubiert, bevor sie bei Raumtemperatur in einem ebenfalls kontinuierlich begasten (5% CO₂/95% O₂) ACSF-Bad bis zu ihrer experimentellen Verwendung innerhalb einiger Stunden nach der Präparation aufbewahrt wurden. Die detaillierte Zusammensetzung der artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) ist in obenstehender Tabelle beschrieben.

3.1.3 Patchclamp Versuchsaufbau

Die technischen Bestandteile des verwendeten Patchclamp Messstandes können der obenstehenden Tabelle entnommen werden.

Während des Experiments lagen die akuten Hirnschnitte in einem Bad aus ACSF, das zur Sicherstellung der kontinuierlichen Begasung mit 5% CO₂/95% O₂ an ein Perfusionssystem angeschlossen wurde. Hierüber wurde die Badflüssigkeit kontinuierlich ausgetauscht und durch ACSF aus einem kontinuierlich begasten Behälter ersetzt. Zur Fixierung der akuten Hirnschnitte innerhalb des Versuchsbades wurde ein mit Nylonfäden bespanntes Platindrahtgestell verwendet.

Mithilfe des auf den Computer übertragenen Bildes des Durchlichtmikroskops wurde die Mitralzellschicht aufgesucht und eine Mitralzelle für den Versuch ausgewählt.

Die verwendeten Patchpipetten hatten einen Öffnungswiderstand von etwa 3.5-6 MΩ. Nach Erzeugung eines Überdrucks innerhalb der Pipette wurde diese langsam auf die

Mitralzelle zubewegt, bis ein Kontakt zur Zellmembran durch einen Widerstandsanstieg an der Pipettenspitze signalisiert wurde. Durch Lösen des Überdrucks und Erzeugung eines geringgradigen Unterdrucks entstand eine Abdichtung zwischen der Pipettenspitze und der Zellmembran mit einem Widerstand von über 2 GΩ. Zur Herstellung einer intrazellulären („*whole cell*“) Ableitung wurde anschließend die Zellmembran geöffnet.

Als Intrazellulärlösung wurde in allen Versuchen dieser Arbeit eine Kaliumgluconatlösung mit einem *liquid junction potential* von -18mV verwendet, deren Zusammensetzung obenstehender Tabelle entnommen werden kann. Darüber hinaus wurde stets der grün fluoreszierende Farbstoff Atto488 hinzugegeben, um die abgeleitete Mitralzelle mit ihren Fortsätzen anzufärben und unter dem konfokalen Mikroskop sichtbar zu machen.

In allen elektrophysiologischen Versuchen dieser Arbeit wurden der als Extrazellulärlösung im Versuchsbad verwendeten ACSF zusätzlich stets 1μM des A₁-Rezeptorantagonisten DPCPX sowie 0.1μM des A_{2A}-Rezeptorantagonisten ZM241385 hinzugefügt, um eine Verzerrung der Ergebnisse durch Adenosineffekte zu vermeiden. Während aller elektrophysiologischen Messungen verblieben diese Adenosinrezeptorantagonisten jeweils über die gesamte Dauer des Messprotokolls im Versuchsbad.

Zu Beginn und am Ende der Messungen sowie an kritischen Punkten innerhalb des Messprotokolls erfolgte jeweils die Bestimmung des Serienwiderstandes. Alle Zellen mit einem Serienwiderstand über 20MΩ oder einer Erhöhung des Serienwiderstandes im Laufe der Messung von >20% des Ausgangswertes wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Das *liquid junction potential* der verwendeten Intrazellulärlösung von -18mV ist in den Angaben und Darstellungen der Daten innerhalb dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

3.1.4 Spot laser induzierte lokale ATP-Applikation

Ziel dieser Versuche war die lokale ATP-Freisetzung im Bereich des jeweiligen Glomerulus, innerhalb dessen sich der primäre Dendrit der abgeleiteten Mitralzelle verzweigte. Die Messungen erfolgten im *current clamp* mit einem Zielwert für das Ruhemembranpotential zwischen -50 und -60mV.

Zunächst wurde der in der Intrazellulärlösung enthaltene Farbstoff Atto488 genutzt, um die Mitralzelle mit ihren Zellfortsätzen unter dem konfokalen Mikroskop zu betrachten. Einige Minuten nach Beginn der intrazellulären Ableitung waren die Zellfortsätze auf diese Weise gut darstellbar. Dies wurde genutzt, um den primären Dendriten der Mitralzelle aufzusuchen und seinen Verlauf bis zu seiner Verzweigung im zugehörigen Glomerulus zu verfolgen. Auf den so identifizierten Glomerulus wurde anschließend ein *spot laser* mit einer Wellenlänge von 375nm und einem beleuchteten Zielareal von etwa 25 x 25µm ausgerichtet.

Anschließend wurde das System zur kontinuierlichen Perfusion des Versuchsbades gestoppt und DMNPE-*caged*-ATP (cATP) in einer Endkonzentration von 100µM in das Versuchsbad pipettiert. Bis zum Beginn des Versuchs wurde das DMNPE-*caged*-ATP als hochkonzentrierte Lösung in DMSO in aliquotierter Form aufbewahrt. Unmittelbar vor dem Pipettieren in das Versuchsbad erfolgte eine Verdünnung in ACSF.

Für die in Abbildung 2 gezeigten Messspuren wurden abweichend 50µM DMNPE-*caged*-ATP bzw. 50µM NPE-*caged*-Xanthosintriphosphat (XTP) verwendet.

Um eine gleichmäßige Verteilung der *caged*-Substanz innerhalb des Versuchsbades sicherzustellen, wurde 2 Minuten gewartet, bevor die Photolyse durch Anschalten des 375nm *spot laser* für eine Zeitdauer von 100ms und mit einer Laserleistung von 35mW induziert wurde. Die photolytische Freisetzung aktiven ATPs aus DMNPE-*caged*-ATP wird im Folgenden auch als *uncaging* oder ATP *uncaging* bezeichnet.

Unmittelbar vor jeder Photolyse erfolgte die Kontrolle des Serienwiderstandes.

Im Anschluss wurde eine weitere Minute gewartet, bevor das System zur Perfusion des Versuchsbades wieder eingeschaltet wurde.

3.1.5 ATP *uncaging* Versuche in astrozytären P2Y₁R-KO-Mäusen

Für diese Versuche wurden die oben beschriebenen transgenen C57/Bl6-Mäuse mit einem astrozytenspezifischen Knockout des P2Y₁-Rezeptors verwendet. Ziel war der quantitative Vergleich der durch ATP-Photolyse ausgelösten Mitralzelldepolarisation in den astrozytären P2Y₁R-KO-Mäusen und der entsprechenden Kontrollgruppe.

Hierzu erfolgte eine ATP-Photolyse nach oben beschriebenem Schema in dem standardmäßig verwendeten Versuchsbad aus ACSF mit DPCPX und ZM241385.

3.1.6 ATP uncaging Versuche in neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen

Für diese Versuche wurden die oben beschriebenen transgenen C57/Bl6-Mäuse mit einem neuronenspezifischen Knockout des P2Y₁-Rezeptors und die entsprechende Kontrollgruppe verwendet.

Das Versuchsprotokoll umfasste insgesamt drei photolytische ATP-Applikationen.

Zunächst erfolgte eine ATP-Applikation in dem standardmäßig verwendeten Versuchsbad aus ACSF, DPCPX und ZM241385. Zum einen diente diese dem quantitativen Vergleich der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation zwischen KO-Tieren und der Kontrollgruppe. Zum anderen wurde diese Applikation als Bezugsgröße für die folgenden ATP-Applikationen verwendet, die während der Auswertung auf diese erste Applikation normalisiert wurden.

Vor der zweiten photolytischen ATP-Applikation wurde über das Perfusionssystem zusätzlich der P2Y₁-Rezeptorantagonist MRS2179 über insgesamt 8 Minuten in das Versuchsbad eingewaschen, sodass im Hirnschnitt über einen Zeitraum von mindestens 5 Minuten eine Endkonzentration von 100µM herrschte. Die zweite ATP-Applikation erfolgte also unter Einfluss von MRS2179.

Im Anschluss hieran wurde das MRS2179 über 12 Minuten mittels Perfusionssystem aus dem Versuchsbad ausgewaschen, bevor eine dritte photolytische ATP-Applikation erfolgte. Dies diente der Kontrolle der Reversibilität potentieller Effekte des MRS2179 auf die Mitralzelldepolarisation.

3.1.7 ATP uncaging Versuche in globalen P2Y₁R-KO-Mäusen

In diesen Experimenten wurden die oben beschriebenen transgenen 129/Sv-Mäuse mit globalem P2Y₁R-KO und eine entsprechende Kontrollgruppe aus 129/Sv-Wildtyp-Mäusen mit gleichem genetischem Hintergrund verwendet.

Auch hier erfolgten insgesamt drei photolytische ATP-Freisetzen. Das verwendete Messprotokoll war analog zu dem der oben beschriebenen neuronalen P2Y₁R-KO-Mäuse.

3.1.8 Versuche in der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis

3.1.8.1 ATP *uncaging*

Das hier verwendete Messprotokoll bestand aus insgesamt drei photolytischen ATP-Freisetzungen. Die erste Photolyse erfolgte unter den oben beschriebenen Standardbedingungen in einem Versuchsbad aus ACSF, DPCPX und ZM241385.

Im Anschluss hieran wurde über das Perfusionssystem eine Kombination verschiedener Glutamaterezeptorantagonisten über eine Zeitdauer von 8 Minuten eingewaschen, sodass das Versuchsbad während des zweiten ATP *uncaging* NBQX in einer Konzentration von 10 μ M, D-APV in einer Konzentration von 50 μ M und CPCCOEt in einer Konzentration von 100 μ M enthielt.

Vor dem dritten ATP *uncaging* erfolgte das zusätzliche Einwaschen von Tetrodotoxin (TTX) über 5 Minuten. Während des dritten ATP *uncaging* enthielt das Versuchsbad zusätzlich zu den oben genannten Glutamaterezeptorantagonisten also auch Tetrodotoxin in einer Konzentration von 0.5 μ M.

3.1.8.2 Strom-Spannungs-Kennlinie

Die Messungen zur Ermittlung der Strom-Spannungs-Kennlinie erfolgten im *voltage clamp*. Als Ausgangspunkt der Messungen wurden die abgeleiteten Mitralzellen auf ein Membranpotential von -50mV geklemmt. Hiervon ausgehend wurden mehrere Spannungssprünge von -100mV bis +20mV mit einer schrittweisen Erhöhung der Spannung angelegt. Die Dauer der Spannungssprünge betrug jeweils 500ms. Die Schrittgröße betrug jeweils 15mV, sodass Messungen bei -100mV, -85mV, -70mV, -55mV, -40mV, -25mV, -10mV, +5mV und +20mV erfolgten.

Die Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Daniela Hirnet. Es wurde die Clampfit10 Software verwendet. Die gemessenen Ströme wurden auf die jeweilige Kapazität der abgeleiteten Zelle normalisiert. Aufgrund der in Patchclamp-Versuchen generell niedrigen Stichprobenzahl und der damit verbundenen Schwierigkeit in Hinblick auf die Annahme einer Normalverteilung wurde, wenn möglich und nicht anders angegeben, der nicht parametrische Mann-Whitney-Test zur Auswertung der elektrophysiologischen Daten verwendet. Auch die hier besprochenen Daten zur Strom-Spannungs-Kennlinie in der akuten EAE wurden auf diese Weise analysiert. Die

statistische Testung sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe von GraphPad Prism.

3.1.9 Auswertung der ATP *uncaging* Versuche

Die Auswertung der ATP *uncaging* Versuche erfolgte in der Clampfit10 Software. Zunächst wurde die Baseline des Membranpotentials vor Beginn der Photolyse bestimmt. Hierfür erfolgten drei Messungen im Bereich der sogenannten *downstates*, den Tiefpunkten des oszillierenden Ruhemembranpotentials von Mitralzellen. Der Mittelwert der drei erhobenen Messwerte wurde als Baseline festgelegt.

Im Allgemeinen wurde zur Quantifizierung der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation das Depolarisationsintegral (AUC) verwendet. Dieses wurde anhand der Messspur zwischen dem Zeitpunkt der ATP-Photolyse und dem Ende der induzierten Mitralzelldepolarisation bei Wiedererreichen der Baseline bestimmt.

Bei zusätzlicher Bestimmung des Depolarisationspeak wurde hierfür der höchste Punkt innerhalb der gemessenen Mitralzelldepolarisation bestimmt. Bei im Rahmen der Depolarisation beobachteten Aktionspotentialen wurden diese für die Bestimmung des Depolarisationspeaks nicht berücksichtigt. Der angegebene Peak entspricht also nicht der Peakamplitude möglicher Aktionspotentiale, sondern dem höchsten Punkt dazwischen.

Bei Angabe der Depolarisationsdauer wurde die Zeit vom Beginn der ATP-Photolyse bis zum Ende der folgenden Mitralzelldepolarisation bestimmt.

Die statistische Testung der ungepaarten Daten erfolgte wie oben beschrieben mittels Mann-Whitney-Test. Für die Analyse gepaarter Datensätze wurde aufgrund der zum Teil sehr niedrigen Stichprobenzahl, die die Durchführung des nicht-parametrischen Wilcoxon-Tests zum Teil nicht zuließ, einheitlich ein gepaarter T-Test verwendet. Dies gilt für die Analyse des MRS2179-Effekts in den neuronalen und globalen P2Y₁R-KO-Mäusen sowie die in Abbildung 10 gezeigte Analyse des Effekts von Glutamaterezeptorantagonisten und Tetrodotoxin auf die ATP-induzierte Mitralzelldepolarisation. Die Durchführung der statistischen Analyse sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe von GraphPad Prism.

3.2 Primäre Neuronenkulturen

3.2.1 Versuchstiere

Die Präparation aller in dieser Arbeit verwendeten primären Neuronenkulturen erfolgte aus embryonalen C57Bl/6-Mäusen, die aus einer SPF-Tierhaltung stammten.

3.2.2 Präparation und Inkubation

Nach terminierter Verpaarung erfolgte die Präparation der Embryonen im Stadium E16.5. Nach Anästhesie des tragenden Muttertieres mittels eines CO₂/O₂ Gasgemisches und anschließender Euthanasie mittels CO₂ wurden die Embryonen aus dem Muttertier entnommen. In einem Bad aus eisgekühltem HBSS wurden die Fruchthöhlen eröffnet, die Embryonen entnommen und dekapitiert. Zur Präparation der Gehirne wurde zunächst der sich entwickelnde Schädelknochen von okzipital nach rostral eröffnet und teilweise entfernt. Anschließend wurde das nun freiliegende Gehirn inklusive der *Bulbi olfactorii* aus dem Schädel herausgelöst und bis zur weiteren Präparation in eisgekühltem HBSS gelagert. Die weitere Präparation erfolgte unter einem Stereomikroskop. Hier wurden zunächst die Meningen von den *Bulbi olfactorii* und so weit möglich von den Cortexhemisphären gelöst. Für die Herstellung der *Bulbus olfactorius* Kulturen wurden nun die *Bulbi olfactorii* vom übrigen Gehirn getrennt und in eisgekühltem HBSS gelagert. Zur Herstellung der Cortexkulturen wurden die beiden Hemisphären jeweils vom Hirnstamm abgetrennt, ggf. verbliebene Überreste der Meningen vollständig gelöst und anschließend ein Teil des Cortex für die weitere Verarbeitung isoliert.

Die folgenden Schritte wurden für die *Bulbus olfactorius* Kulturen sowie für die Cortexkulturen in identischer Weise durchgeführt.

Es erfolgte zunächst der enzymatische Verdau des Gewebes durch 6-minütige Inkubation in Trypsin/EDTA bei 37°C. Anschließend wurde das Trypsin/EDTA zunächst gegen 5ml DMEM-F12/10%FBS und anschließend gegen 1ml HBSS ausgetauscht. Hierin wurde das Gewebe durch Auf- und Abpipettieren dissoziiert. Anschließend erfolgte eine 2-minütige Zentrifugation bei 550g. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet zunächst in 1 ml PNGM resuspendiert, bevor entsprechend der ursprünglichen Gewebemenge weiteres PNGM hinzugegeben wurde. Die Zellzahl der so hergestellten

Zellsuspension wurde mittels Trypanblaufärbung und einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Anschließend erfolgte die Ausplattierung in die jeweiligen Zellkulturplatten. Alle Platten wurden mindestens zwei Stunden vor der Präparation mit Poly-D-Lysin beschichtet und anschließend zweimalig gewaschen, bevor das Zellkulturmedium für die Ausplattierung der Primärneurone vorgelegt wurde. In allen Versuchen wurde PNGM als Zellkulturmedium verwendet. Die Kulturen für die immuncytochemischen Färbungen wurden mit einer Dichte von 80 000 Zellen/cm² in Zellkulturplatten mit 24 Feldern ausplattiert, die jeweils ein Deckglas enthielten. Für die *calcium imaging* Versuche wurden die Kulturen mit einer Dichte von 150 000 Zellen/cm² in ein „µ-Dish 35 mm Quad“ der Firma Ibidi ausplattiert.

Bis zur Verwendung im Experiment wurden die Neuronenkulturen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.2.3 Immuncytochemie

Für die immuncytochemischen Färbungen zum Vergleich der *Bulbus olfactorius* Kulturen mit den kortikalen Kulturen wurden aus den Embryonen vier tragender Muttertiere jeweils der *Bulbus olfactorius* sowie der Cortex präpariert und wie oben beschrieben zur Herstellung primärer Neuronenkulturen genutzt.

3.2.3.1 Fixierung und Färbung

Die Kulturen wurden am 14.-15. Tag in vitro durch etwa 15-minütige Inkubation in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurden die fixierten Kulturen zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie bis zur weiteren Verarbeitung einige Tage bis Wochen in PBS bei 4°C gelagert wurden.

Zu Beginn des Färbeprozesses wurden die fixierten Kulturen zunächst durch 2.5-minütige Inkubation mit 0.5% Triton permeabilisiert. Nach anschließendem Waschen mit PBS erfolgte eine 30-minütige Inkubation in zehnprozentigem Eselserum (*normal donkey serum*, NDS).

Die Primärantikörper wurden ebenfalls in 10% NDS gelöst und anschließend für etwa 1.5-2 Stunden bei Raumtemperatur auf die Kulturen gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation der ebenfalls in 10% NDS gelösten Sekundärantikörper für etwa 1 weitere Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss

wurden die Kulturen zunächst zweimal mit PBS sowie im Anschluss einmalig mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor die Kulturen auf Objektträgern eingedeckt wurden. Der anschließende Trocknungsprozess sowie die Aufbewahrung erfolgten unter Schutz vor Lichteinstrahlung.

Tabelle 25: immuncytochemische Färbungen

Primärantikörper (Antigen, <i>host</i> Spezies)	Konzentr.	Sekundärantikörper (<i>target</i> Spezies, Fluoreszenz, <i>host</i> Spezies)	Konzentr.
1. Färbung			
Anti-MAP2, Maus	1:1000	Anti-Maus, Alexa555, Esel	1:600
Anti-GFAP, Huhn	1:500	Anti-Huhn, Alexa488, Esel	1:600
Anti-S100B, Huhn	1:500	Anti-Huhn, Alexa488, Esel	1:600
2. Färbung			
Anti-MAP2, Maus	1:1000	Anti-Maus, Alexa555, Esel	1:600
Anti-Calbindin, Huhn	1:500	Anti-Huhn, Alexa488, Esel	1:600
3. Färbung			
Anti-MAP2, Maus	1:1000	Anti-Maus, Alexa555, Esel	1:600
Anti-Calretinin, Huhn	1:500	Anti-Huhn, Alexa488, Esel	1:600
Anti-Doublecortin, Hase	1:600	Anti-Hase, Alexa647, Esel	1:600
4. Färbung			
Anti-MAP2, Huhn	1:500	Anti-Huhn, Alexa488, Esel	1:600
Anti-Tyrosin- hydroxylase, Hase	1:600	Anti-Hase, Alexa647, Esel	1:600
5. Färbung			
Anti-MAP2, Huhn	1:500	Anti-Huhn, Alexa488, Esel	1:600
Anti-Reelin, Maus	1:200	Anti-Maus, Alexa555, Esel	1:600

3.2.3.2 Bildakquisition

Die Bildaufnahme erfolgte mit dem oben aufgeführten konfokalen Mikroskop in Kombination mit einem 20x Objektiv. Anhand der jeweiligen neuronalen Färbung mittels MAP2-Antikörper wurden in jeder Kultur fünf Bildausschnitte zur Aufnahme ausgewählt, um einen möglichst repräsentativen Eindruck der jeweiligen Kultur festzuhalten. Erst nach Auswahl des aufzunehmenden Bildausschnittes anhand der MAP2-Färbung erfolgte auch die Darstellung der weiteren Antikörperfärbungen unter dem Mikroskop.

Anschließend erfolgte die Aufnahme aller vier Kanäle in den ausgewählten Ausschnitten als *z-stack* unter Verwendung der *airyscan* Funktion des Mikroskops.

3.2.3.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mithilfe der Fiji-Software. Aus den aufgenommenen *z-stacks* wurden für jeden Bildausschnitt und jeden Kanal die jeweils 3 hellsten Aufnahmen optisch ausgewählt. Diese wurden anschließend unter Berechnung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität in ein Bild umgewandelt. Die so erstellten Bilder der Einzelkanäle wurden anschließend zusammengefügt, sodass für jeden aufgenommenen Bildausschnitt ein Bild entstand, das für die Auswertung genutzt wurde.

Als Bezugsgröße für die weitere Auswertung aller Färbungen wurde in jedem Bild zunächst die Zahl MAP2-positiver Zellen bestimmt.

Die Auswertung der mittels GFAP und S100B angefärbten Astrozyten erfolgte ebenfalls durch eine Zählung der Zellzahl. Berücksichtigt wurden hierbei lediglich die Astrozyten, deren Zellkerne sich innerhalb des aufgenommenen Bildausschnittes befanden.

Im Rahmen der Auswertung der Anfärbungen von Reelin, Doublecortin, Calbindin, Calretinin und Tyrosinhydroxylase bestanden zum Teil starke Unterschiede in der Stärke der Anfärbung verschiedener Zellen. Zudem konnte in einigen Färbungen eine schwache unspezifische Anfärbung aller Neurone beobachtet werden. Daher wurde für die Auswertung dieser Marker für jeden einzelnen Marker individuell ein Grenzwert der *mean fluorescence intensity* (MFI) festgelegt. Gezählt wurden anschließend ausschließlich Zellen, die eine *mean fluorescence intensity* oberhalb dieses Grenzwertes aufwiesen, sich zudem von einer möglichen unspezifischen Anfärbung aller Neurone abhoben und eine Positivität für MAP2 aufwiesen.

Auf diese Weise wurden jeweils alle 5 in einer Kultur aufgenommenen Bildausschnitte ausgewertet. Anschließend wurde die Gesamtzahl der in den 5 Bildausschnitten der jeweiligen Kultur gezählten Zellen, die eine Positivität für den jeweiligen Marker (GFAP/S100B, Reelin, Doublecortin, Calbindin, Calretinin oder Tyrosinhydroxylase) sowie MAP2 aufwiesen, auf die Gesamtzahl der in den 5 Bildausschnitten dieser Kultur gezählten MAP2-positiven Zellen normalisiert. So wurde für jeden Marker in jeder Kultur

ein Durchschnittswert des Anteils positiver Neurone an der Gesamtzahl MAP2-positiver Neurone bestimmt. Diese Werte bildeten die Grundlage für die weitere Auswertung. Die anschließende statistische Auswertung mittels T-Test (zweiseitig, ungepaart) sowie die Erstellung der Graphen erfolgte in Graphpad Prism. Die in dieser Arbeit abgebildeten repräsentativen Bildausschnitte wurden mithilfe von Fiji zusammengestellt.

3.2.4 Calcium imaging

Für die *calcium imaging* Versuche wurden *Bulbus olfactorius* Kulturen verwendet, die zuvor in ein „µ-Dish 35 mm Quad“ der Firma Ibidi ausplattiert wurden. Etwa am 5.-8. Tag in vitro erfolgte die Transduktion mithilfe eines AAV7-Vektors, der die Sequenz des Calciumindikators GCamp6f unter Kontrolle des Promotors Synapsin enthielt (AAV7-hSyn-GCamp6f). Hierbei wurde eine *multiplicity of infection* (MOI) von 20 000 Kapsiden/Zelle verwendet.

Während des Versuchs wurden die Kulturen in einer Kammer unter dem konfokalen Mikroskop platziert, die zur Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur von 37°C und 5% CO₂ diente.

Unter Verwendung eines 20x Objektivs erfolgte anschließend die serielle Bildaufnahme mit einer Frequenz von einem Bild alle 0.39s.

Das Messprotokoll begann mit der Aufzeichnung der intrazellulären Calciumsignale im Ruhezustand über mindestens 5 Minuten. Im Anschluss hieran erfolgte in der Versuchsgruppe eine Vorbehandlung mit dem P2Y₁-Rezeptorantagonisten MRS2179 in einer Konzentration von 100µM. In Kulturen der Kontrollgruppe wurde stattdessen ein identisches Volumen des Zellkulturmediums PNGM appliziert. Nach weiteren 5 Minuten erfolgte die Glutamatapplikation zur Induktion des neuronalen Stresses. In dieser Arbeit wurde hierfür eine Konzentration von 50µM verwendet. 15 Minuten nach Glutamatapplikation wurde Ionomycin in einer Konzentration von 8µM hinzugegeben, um eine maximale Erhöhung des intrazellulären Calciums zu induzieren, die im Rahmen der Auswertung zur Normalisierung genutzt wurde.

3.2.4.1 Auswertung

Die Auswertung der *calcium imaging* Versuche erfolgte mittels eines R-basierten Skripts, das freundlicherweise von Dr. Marcel Seungsu Woo zur Verfügung gestellt wurde.

Mithilfe des Skripts wurde zunächst die MFI (*mean fluorescence intensity*) jeder einzelnen Zelle mithilfe der Fiji-Software analysiert. Diese wurde auf die nach Ionomycinapplikation gemessene maximale Fluoreszenzintensität normalisiert. Anschließend wurde die AUC (*area under the curve*) bestimmt. Für die weitere statistische Analyse wurde die gepoolte AUC aller Zellen der jeweiligen Kultur verwendet. Ein Datenpunkt entspricht also einer primären Neuronenkultur.

Die statistische Analyse mittels T-Test (zweiseitig, ungepaart) und Erstellung des Graphen erfolgte in Graphpad Prism. Der gezeigte beispielhafte Bildausschnitt wurde mit Fiji erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Elektrophysiologie

4.1.1 Die lokale ATP-Applikation im Bereich des primären Dendriten führt zu einer Depolarisation in Mitralzellen

Ein Effekt glomerulärer ATP-Freisetzung auf die neuronale Netzwerkaktivität im *Bulbus olfactorius* konnte bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden (Fischer *et al.*, 2012; Schulz, 2018). Die lokale Freisetzung von ATP im Bereich des Glomerulus führte in Vordaten unseres Labors zu einer Depolarisation in Mitralzellen (Schulz, 2018).

Dieser Effekte sollte in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht werden. Hierfür musste zunächst der Versuchsaufbau repliziert werden.

In akuten Hirnschnitten erfolgte die intrazelluläre Ableitung einer Mitralzelle im *current clamp* mit einem Zielwert für das Ruhemembranpotential zwischen -50 und -60 mV. Für die weitere Messung verwendet wurden ausschließlich solche Mitralzellen, die unter Standardbedingungen im Ruhezustand Oszillationen des Ruhemembranpotentials, die sogenannten *up-* und *downstates*, aufwiesen. Diese variierten in Form und Größe und in einigen Zellen konnten zusätzlich Aktionspotentialbursts während der *upstates* beobachtet werden. Unter Einfluss der zu einem späteren Zeitpunkt in dieser Arbeit verwendeten Glutamatrezeptorantagonisten konnte in den meisten der gemessenen Mitralzellen ein Sistieren dieser spontanen Membranpotentialschwankungen beobachtet werden. Ein Beispiel für eine solche Grundaktivität einer Mitralzelle unter Standardbedingungen ist in untenstehender Abbildung gezeigt.

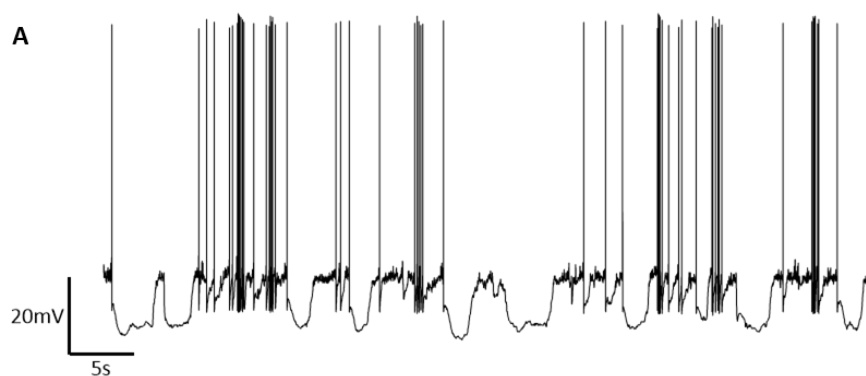


Abbildung 1: spontane Oszillationen des Ruhemembranpotentials einer Mitralzelle

A Beispielhafte Darstellung der Grundaktivität einer Mitralzelle im *current clamp*. Es können spontane Oszillationen des Ruhemembranpotentials, die sogenannten *up-* und *downstates*,

beobachtet werden. Diese Zelle zeigt zudem teilweise Aktionspotentialbursts im Rahmen der *upstates*.

Die in diesen Versuchen verwendete Intrazellulärlösung enthielt Atto488, einen grün fluoreszierenden Farbstoff, der dazu diente, die abgeleitete Mitralzelle mit ihren Fortsätzen unter dem konfokalen Mikroskop darstellen zu können. Auf diese Weise konnte der primäre Dendrit der Mitralzelle vom Soma ausgehend bis zu seiner Verzweigung im zugehörigen Glomerulus verfolgt werden (Abb. 2B).

Anschließend wurde DMNPE-*caged*-ATP in die Badlösung pipettiert. Unter physiologischen Bedingungen wird extrazelluläres ATP schnell enzymatisch gespalten (Abbraccio *et al.*, 2009). *Caged*-Substanzen sind durch die Bindung an eine durch Photolyse abspaltbare Gruppe zunächst biologisch inaktiv (Ellis-Davies, 2007). Bei Belichtung kommt es dann zu einem schnellen Konzentrationsanstieg der biologisch aktiven Substanz (Ellis-Davies, 2007). Auf diese Weise kann der Zeitpunkt der Freisetzung aktiv gesteuert werden (Ellis-Davies, 2007).

In dieser Arbeit wurde die Photolyse von DMNPE-*caged*-ATP durch einen *spot laser* induziert. Dieser wurde auf die Verzweigungen des primären Mitralzellendriten ausgerichtet und ermöglichte so eine lokale ATP-Freisetzung im Bereich des zugehörigen Glomerulus (Abb. 2A).

Nach photolytischer Spaltung von DMNPE-*caged*-ATP zeigte sich eine Depolarisation der abgeleiteten Mitralzelle (Abb. 2C). Dies entspricht den existierenden Vordaten (Schulz, 2018).

In einem beispielhaften Kontrollexperiment erfolgte in gleicher Weise die Photolyse von NPE-*caged*-XTP. Die hierbei entstehenden Spaltprodukte konnten keine Mitralzelldepolarisation auslösen (Abb. 2D). Eine unspezifische Verursachung der DMNPE-*caged*-ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation erscheint daher sehr unwahrscheinlich. Da auch in bestehenden Vordaten unseres Labors bereits die spezifische Auslösung der Depolarisation durch purinabhängige Mechanismen belegt werden konnte (Schulz, 2018), wurde die Photolyse von NPE-*caged*-XTP nicht in einer größeren Kohorte wiederholt.

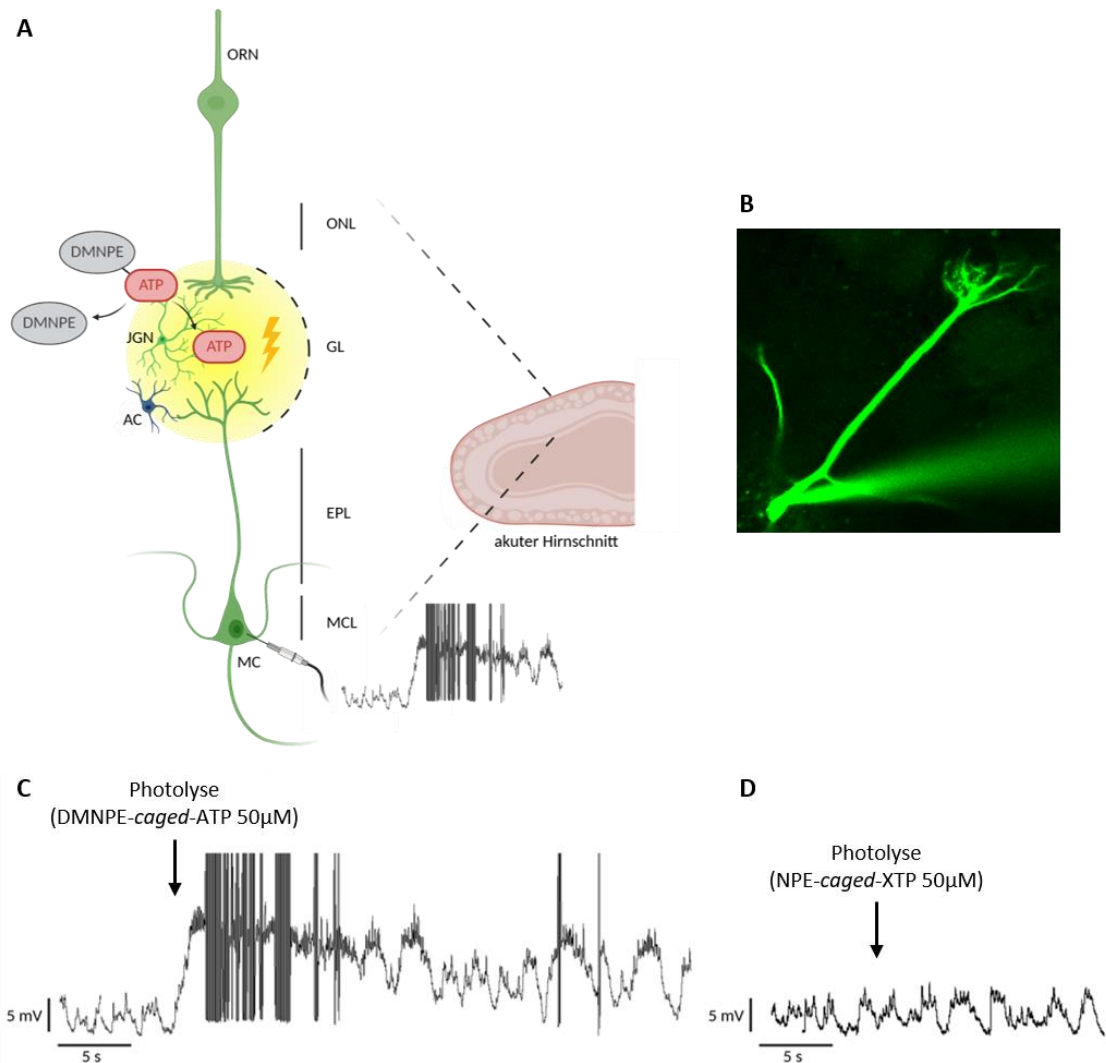


Abbildung 2: Induktion einer Mitralzelldepolarisation durch lokale ATP-Photolyse im zugehörigen Glomerulus

A Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Es erfolgt lokal im Bereich der Verzweigung des primären Dendriten innerhalb des Glomerulus eine *spot laser* induzierte Photolyse von DMNPE-caged-ATP, während die zugehörige Mitralzelle intrazellulär abgeleitet wird. ONL = olfaktorische Nervenfaserschicht; GL = Glomerularschicht; EPL = externe plexiforme Schicht; MCL = Mitralzellschicht; ORN = olfaktorisches Rezeptorneuron; MC = Mitralzelle; JGN = juxtaglomeruläres Neuron; AC = Astrozyt. (Die Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt). **B** Darstellung einer Mitralzelle sowie der Verzweigungen ihres primären Dendriten unter dem konfokalen Mikroskop mittels Atto488 in der Intrazellulärlösung. **C** Mitralzelleableitung (*current clamp*) zum Zeitpunkt der lokalen Photolyse von DMNPE-caged-ATP. Die ATP-Freisetzung führt zu einer deutlichen Mitralzelldepolarisation (zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde nicht die gesamte Amplitude der Aktionspotentiale dargestellt). **D** Ableitung (*current clamp*) derselben Mitralzelle (s. C) während der Kontrollapplikation von NPE-caged-XTP. Durch die Photolyse von NPE-caged-XTP wird keine Mitralzelldepolarisation ausgelöst.

Die quantitative Auswertung der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation einer im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Kohorte aus C57Bl/6-Wildtyp-Mäusen ergab ein mittleres Depolarisationsintegral von $59710 \text{ mV} \times \text{s}$ (SEM = $6186 \text{ mV} \times \text{s}$) und einen

mittleren Depolarisationspeak von 8.6mV (SEM = 0.7mV). In den folgenden Versuchen dieser Arbeit wurde in der Regel, sofern nicht anders angegeben, das Depolarisationsintegral (AUC) ausgewertet.

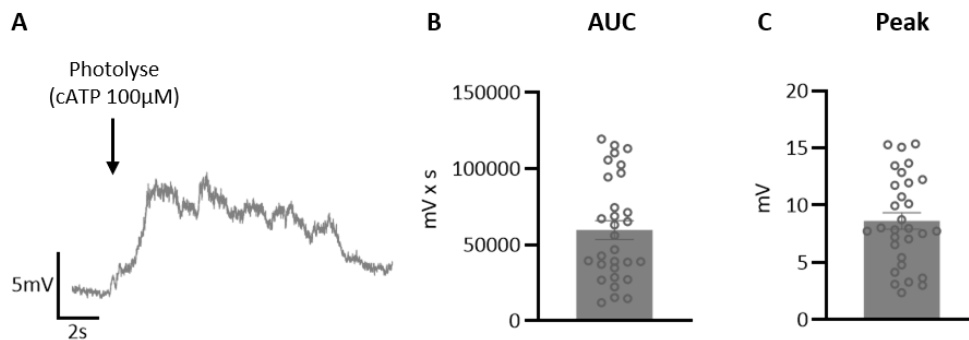


Abbildung 3: Charakteristika der beschriebenen Mitralzelldepolarisation in einer C57Bl/6-Kohorte

A Beispielhafte Darstellung der Messspur einer Mitralzelle während des ATP *uncaging*. **B** Graphische Darstellung des gemessenen Integrals der Mitralzelldepolarisation nach ATP *uncaging* im zugehörigen Glomerulus (cATP 100µM) in einer C57Bl/6-Kohorte. Der Mittelwert lag bei 59710mV x s (SEM = 6186mV x s; $n = 30$ Zellen aus 13 Tieren). **C** Graphische Darstellung des gemessenen Depolarisationspeaks. Der Mittelwert lag bei 8.6mV (SEM = 0.7mV; $n = 30$ Zellen aus 13 Tieren).

Vordaten aus unserem Labor haben eine teilweise Abhängigkeit der oben beschriebenen Mitralzelldepolarisation von P2Y₁-rezeptorabhängigen Mechanismen gezeigt (Schulz, 2018). Die photolytische Freisetzung von ADP aus der *caged*-Substanz NPE-ADP sowie des P2Y₁- und P2Y₁₂-rezeptorspezifischen Agonisten MeSADP aus der *caged*-Substanz MRS2703 führte im *voltage clamp* zu einem ATP-induzierten Einstrom, wobei jedoch mit zunehmender Spezifität des Rezeptoragonisten die Größe des Einstroms sank (Schulz, 2018). Die Applikation des spezifischen P2Y₁-Rezeptorantagonisten MRS2179 führte zudem zu einer hochsignifikanten und reversiblen Reduktion der ATP-abhängigen Mitralzelldepolarisation (Schulz, 2018).

4.1.2 Der neuronale P2Y₁-Rezeptor ist an der Vermittlung der ATP-abhängigen Mitralzelldepolarisation beteiligt

Die zugrundeliegenden Mechanismen der in den oben genannten Vordaten beschriebenen teilweisen Abhängigkeit der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation von P2Y₁-rezeptorvermittelten Effekten sollten im Folgenden näher untersucht werden. Aus Voruntersuchungen innerhalb unseres Labors geht bereits hervor, dass die Vermittlung des P2Y₁-Rezeptoreffekts auf die ATP-induzierte Mitralzelldepolarisation

indirekt erfolgt (Schulz, 2018). Aus den bestehenden Vordaten (Schulz, 2018) wurde die den folgenden Versuchen dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese abgeleitet. Hiernach kommt es durch die glomeruläre Freisetzung von ATP und die anschließende Entstehung des ATP-Abbauprodukts ADP zu einer direkten Aktivierung einer P2Y₁R-exprimierenden Zellpopulation. Diese wiederum aktiviert anschließend die Mitralzelle, was zu der in den ATP *uncaging* Versuchen beobachteten Depolarisation führt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche dienten der weiteren Untersuchung dieser Signalwege mit dem Ziel der Identifikation beteiligter Zelltypen und Neurotransmitter. Um eine potentielle Beteiligung von Astrozyten sowie Neuronen zu untersuchen, wurden daher astrozyten- sowie neuronenspezifische P2Y₁R-KO-Mauslinien in ATP *uncaging* Versuchen verwendet.

Die den folgenden Experimenten zugrundeliegende Hypothese ist in untenstehender Abbildung mechanistisch dargestellt.

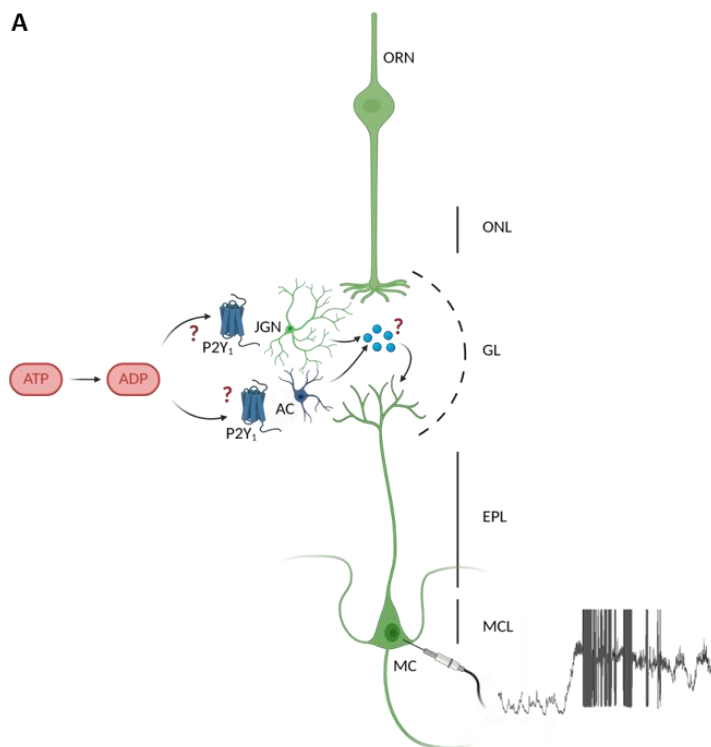


Abbildung 4: Hypothese zur indirekten Vermittlung der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation

A Vordaten legen eine indirekte Vermittlung der nach glomerulärer ATP-Freisetzung beobachteten Mitralzelldepolarisation nahe (Schulz, 2018). Hieraus wurde die den folgenden Versuchen zugrundeliegende Hypothese abgeleitet. Die Freisetzung von ATP führt zur Entstehung des Abbauprodukts ADP, das P2Y₁R-exprimierende Zellen zu aktivieren scheint.

Hierbei könnte es sich potentiell um neuronale oder astrozytäre Zellpopulationen handeln. Diese wiederum übertragen die nach ATP-Photolyse beobachtete Depolarisation durch Neurotransmitterfreisetzung auf Mitralzellen. (Die Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com erstellt).

Die Beteiligung astrozytärer Mechanismen wurde in der oben beschriebenen transgenen Mauslinie mit induzierbarem astrozytärem P2Y₁R-KO untersucht. Es erfolgte die Durchführung des ATP *uncaging* auf oben beschriebene Weise in der standardmäßig verwendeten Extrazellulärlösung aus ACSF, DPCPX und ZM241385. Gemessen wurden 4 Zellen aus 2 Tieren in der Kontrollgruppe sowie 12 Zellen aus 4 Tieren in der KO-Gruppe. Die große Differenz dieser *n*-Zahlen war u.a. auf durch die Versuchstierzucht bedingte Faktoren zurückzuführen. Bei Vergleich des Depolarisationsintegrals (AUC) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0.4462$). Der Mittelwert der bestimmten AUC lag in der Kontrollgruppe bei 67721 mV x s (SEM = 18941 mV x s) und in der KO-Gruppe bei 51704 mV x s (SEM = 8505 mV x s).

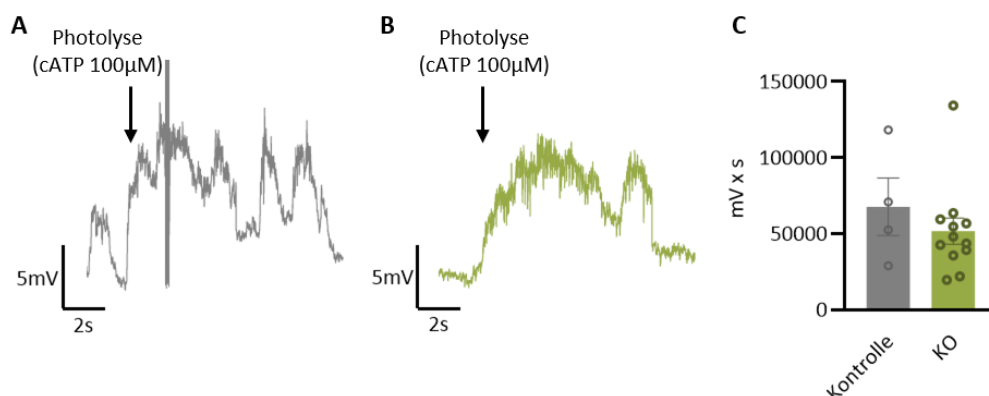


Abbildung 5: ATP *uncaging* in astrozytären P2Y₁R-KO-Mäusen

A Beispielhafte Darstellung der Messspur einer Zelle der Kontrollgruppe (zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde nicht die gesamte Amplitude der Aktionspotentiale dargestellt). **B** Beispielhafte Darstellung der Messspur einer Zelle aus einem astrozytären P2Y₁R-KO-Tier. **C** Der Vergleich des Depolarisationsintegrals (AUC) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen astrozytären P2Y₁R-KO-Mäusen und der Kontrollgruppe ($p = 0.4462$; $n = 4$ Zellen aus 2 Tieren vs. 12 Zellen aus 4 Tieren).

Analog hierzu wurden anschließend auch die oben beschriebenen neuronalen P2Y₁R-KO-Mäuse zur Durchführung von ATP *uncaging* Versuchen verwendet, um die neuronale Komponente in der indirekten Vermittlung der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation zu evaluieren. Zunächst erfolgte ein einfaches ATP *uncaging* unter Standardbedingungen (ACSF + DPCPX + ZM241385). Gemessen wurden in diesen Versuchen 11 Zellen aus 3 Tieren in der Kontrollgruppe und 13 Zellen aus 4 neuronalen

P2Y₁R-KO-Tieren. Die mittlere AUC in der Kontrollgruppe lag bei 90293mV x s (SEM = 11217mV x s). In der Gruppe neuronaler P2Y₁R-KO-Tiere betrug die mittlere AUC 33800mV x s (SEM = 8719mV x s). Dies entspricht einer signifikanten Reduktion des Depolarisationsintegrals (AUC) in der neuronalen P2Y₁R-KO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0.0007$).

Auch die durchschnittliche Depolarisationsdauer war in den neuronalen P2Y₁R-KO-Tieren signifikant verkürzt ($p = 0.0012$). Durchschnittlich betrug sie in der Kontrollgruppe 10.7s (SEM = 1.0s) und in der neuronalen P2Y₁R-KO-Gruppe 5.7s (SEM = 1.1s).

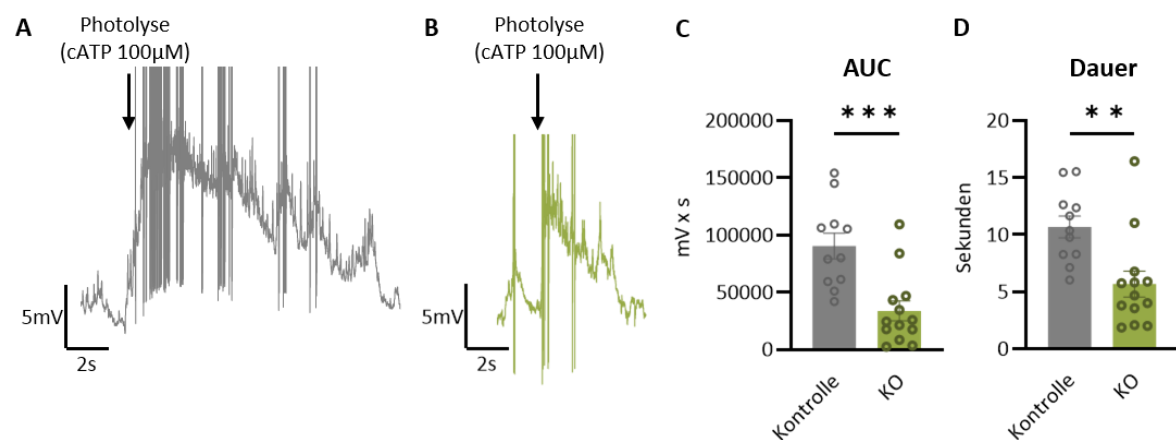


Abbildung 6: ATP uncaging in neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen

A Beispielhafte Darstellung der Messspur einer Zelle der Kontrollgruppe (zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde nicht die gesamte Amplitude der Aktionspotentiale dargestellt). **B** Beispielhafte Darstellung der Messspur einer Zelle aus einem neuronalen P2Y₁R-KO-Tier (zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde nicht die gesamte Amplitude der Aktionspotentiale dargestellt). **C** In neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion des Depolarisationsintegrals (AUC) unter Standardbedingungen ($p = 0.0007$; $n = 11$ Zellen aus 3 Tieren vs. 13 Zellen aus 4 Tieren). **D** Auch die Depolarisationsdauer war in neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert ($p = 0.0012$; $n = s.o.$).

Im Anschluss hieran sollte darüber hinaus der Einfluss des P2Y₁-Rezeptorantagonisten MRS2179 auf die ATP-induzierte Mitralzelldepolarisation in den neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen und der zugehörigen Kontrollgruppe untersucht werden. Hierzu wurde nach dem oben beschriebenen ATP uncaging unter Standardbedingungen (ACSF + DPCPX + ZM241385) über das Perfusionssystem zusätzlich MRS2179 in einer Konzentration von 100µM in das Versuchsbad eingewaschen und anschließend erneut ATP mittels uncaging appliziert. Anschließend wurde das MRS2179 wieder aus dem Versuchsbad ausgewaschen (*washout*) und ein erneutes ATP uncaging unter Standardbedingungen durchgeführt. Das erste ATP uncaging diente hierbei als Kontrollapplikation und als

Bezugsgröße für die Normalisierung des Depolarisationsintegrals (AUC) der folgenden beiden ATP-Applikationen. Gemessen wurden für diese Versuche 5 Zellen aus 2 Tieren in der Kontrollgruppe und 6 Zellen aus 2 neuronalen P2Y₁R-KO-Tieren.

Nach Applikation des P2Y₁-Rezeptorantagonisten MRS2179 konnte in beiden Gruppen keine signifikante Reduktion des Depolarisationsintegrals (AUC) beobachtet werden (Kontrolle: $p = 0.1609$; neuronales P2Y₁R-KO: $p = 0.1793$).

Nach Normalisierung des unter Einfluss von MRS2179 gemessenen Depolarisationsintegrals (AUC) auf die Kontrollapplikation lag dieses in der Kontrollgruppe durchschnittlich bei 0.805 (SEM = 0.11) und in den neuronalen P2Y₁R-KO-Tieren durchschnittlich bei 1.555 (SEM = 0.867).

Nach *washout* von MRS2179 lag das normalisierte Depolarisationsintegral in der Kontrollgruppe bei 0.854 (SEM = 0.086) und in der KO-Gruppe bei 1.721 (SEM = 0.955).

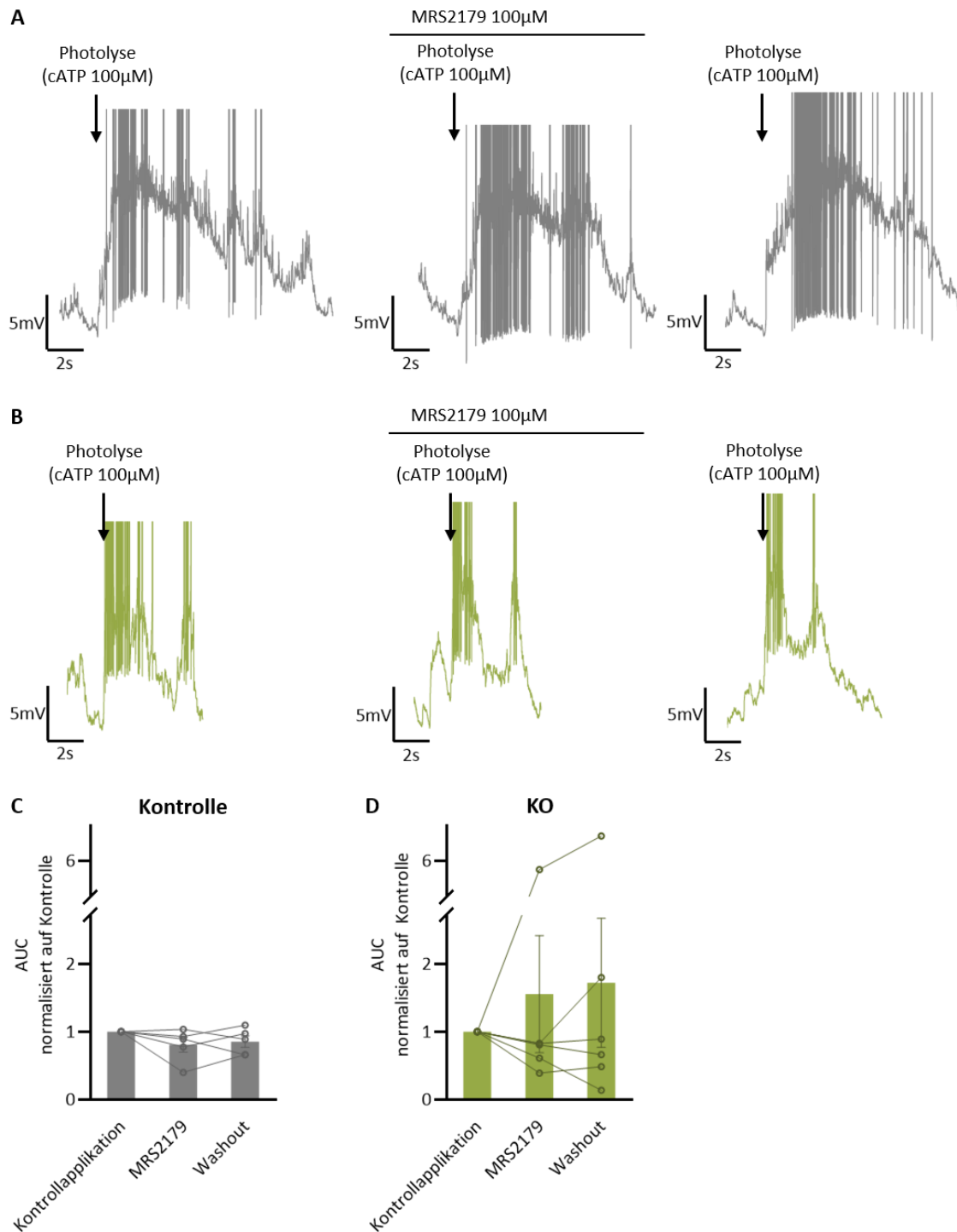


Abbildung 7: ATP uncaging in neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen unter P2Y₁R-Inhibition mittels MRS2179

A Beispielhafte Darstellung der Messspuren einer Zelle der Kontrollgruppe unter Standardbedingungen, in MRS2179 (100 μ M) und nach Auswaschen von MRS2179 (zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde nicht die gesamte Amplitude der Aktionspotentiale dargestellt). **B** Beispielhafte Darstellung der Messspuren einer Zelle aus einem neuronalen P2Y₁R-KO-Tier unter Standardbedingungen, in MRS2179 (100 μ M) und nach Auswaschen von MRS2179 (zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde nicht die gesamte Amplitude der Aktionspotentiale dargestellt). **C** Graphische Darstellung des auf die Kontrollapplikation normalisierten Depolarisationsintegrals (AUC) in der Kontrollgruppe. Die Applikation von MRS2179 führte zu keiner signifikanten Reduktion der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation

($p = 0.1609$; $n = 5$ Zellen aus 2 Tieren). **D** Graphische Darstellung des auf die Kontrollapplikation normalisierten Depolarisationsintegrals (AUC) in neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen. Die Applikation von MRS2179 führte zu keiner signifikanten Reduktion der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation ($p = 0.1793$; $n = 6$ Zellen aus 2 Tieren).

4.1.3 In transgenen 129/Sv-Mäusen mit einem globalen P2Y₁R-KO zeigt sich keine signifikante Reduktion der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation

Zur Ergänzung der oben aufgeführten Daten sollte in dieser Arbeit das ATP *uncaging* auch in transgenen Mäusen mit einem globalen Knockout des P2Y₁-Rezeptors durchgeführt werden. Im Gegensatz zu allen anderen Experimenten dieser Arbeit, in denen ausschließlich Wildtyptiere oder transgene Tiere des Stammes C57Bl/6 verwendet wurden, handelte es sich hierbei um transgene Tiere auf dem Hintergrund des Stammes 129/Sv.

In den 129/Sv-Tieren mit globalem P2Y₁R-KO konnte unter Standardbedingungen (ACSF + DPCPX + ZM241385) im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Reduktion der AUC der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation beobachtet werden ($p = 0.4561$). Gemessen wurden hierfür 9 Zellen aus 6 globalen P2Y₁R-KO-Mäusen und 11 Zellen aus 5 Tieren in der Kontrollgruppe. Der Mittelwert der AUC lag hierbei in der Kontrollgruppe bei 55887mV x s (SEM = 16243mV x s) und in der P2Y₁R-KO-Gruppe bei 39704mV x s (SEM = 14233mV x s).

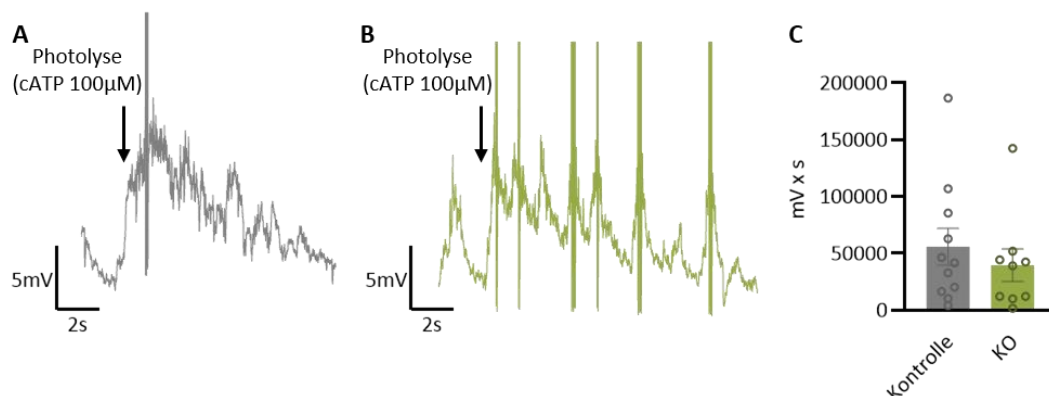


Abbildung 8: ATP *uncaging* in globalen P2Y₁R-KO-Mäusen

A Beispielhafte Darstellung der Messspur einer Zelle der Kontrollgruppe (zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde nicht die gesamte Amplitude der Aktionspotentiale dargestellt). **B** Beispielhafte Darstellung der Messspur einer Zelle aus einem globalen P2Y₁R-KO-Tier (zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde nicht die gesamte Amplitude der Aktionspotentiale dargestellt). **C** Der Vergleich des Depolarisationsintegrals (AUC) zeigte keinen signifikanten

Unterschied zwischen globalen P2Y₁R-KO-Mäusen und der Kontrollgruppe ($p = 0.4561$; $n = 11$ Zellen aus 5 Tieren vs. 9 Zellen aus 6 Tieren).

Anschließend wurde zudem die P2Y₁R-Abhängigkeit der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation in den 129/Sv-Mäusen mit globalem P2Y₁R-KO und der zugehörigen Kontrollgruppe untersucht.

Hierfür wurde nach Durchführung des ATP *uncaging* unter den in dieser Arbeit verwendeten Standardbedingungen (ACSF + DPCPX + ZM241385) der P2Y₁R-Antagonist MRS2179 in einer Konzentration von 100µM zusätzlich in das Versuchsbad eingewaschen. Unter diesen Bedingungen erfolgte ein erneutes ATP *uncaging*, bevor im Anschluss hieran MRS2179 wieder aus dem Versuchsbad ausgewaschen wurde (*washout*) und der Versuch durch ein erneutes ATP *uncaging* unter den beschriebenen Standardbedingungen beendet wurde. Das erste ATP *uncaging* diente hierbei als Kontrollapplikation. Das bei den zwei folgenden ATP-Applikationen in MRS2179 und nach Auswaschen des MRS2179 gemessene Depolarisationsintegral (AUC) wurde im Rahmen der Auswertung jeweils auf diese Kontrollapplikation normalisiert.

Gemessen wurden für diese Versuche 5 Zellen aus 2 Tieren in der Kontrollgruppe und 5 Zellen aus 5 Tieren in der KO-Gruppe. Nach Applikation des P2Y₁-Rezeptorantagonisten MRS2179 zeigte sich weder in der Kontrollgruppe noch in den P2Y₁R-KO-Tieren eine signifikante Reduktion des Depolarisationsintegrals (Kontrolle: $p = 0.1585$; globales P2Y₁R-KO: $p = 0.1037$).

Nach Normalisierung auf die Kontrollapplikation lag der Mittelwert der AUC unter Einfluss von MRS2179 in der Kontrollgruppe bei 0.998 (SEM = 0.656) und in der KO-Gruppe bei 0.581 (SEM = 0.146).

Nach *washout* von MRS2179 lag das normalisierte Depolarisationsintegral in der Kontrollgruppe durchschnittlich bei 2.200 (SEM = 1.444) und in der KO-Gruppe durchschnittlich bei 0.579 (SEM = 0.147).

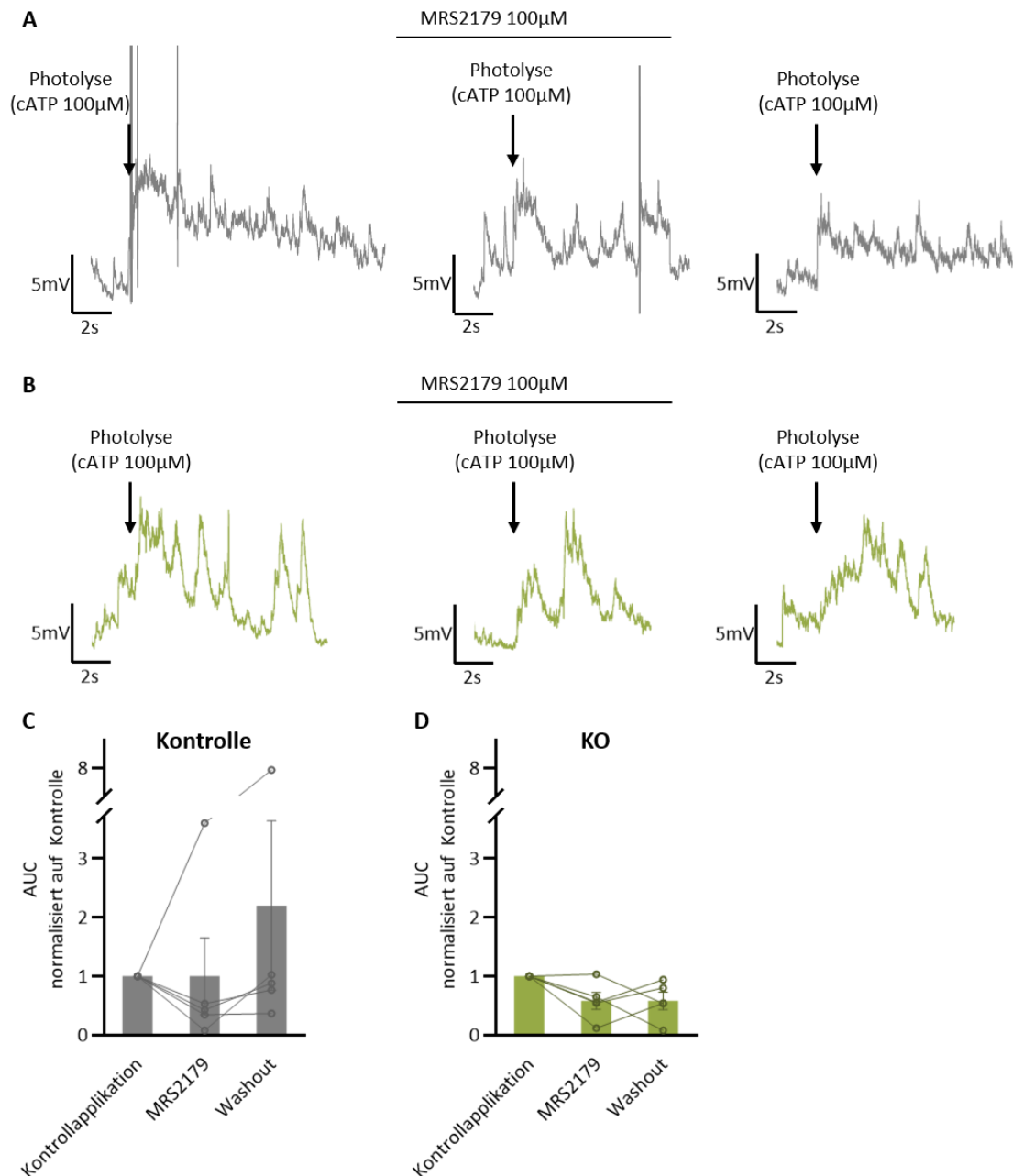


Abbildung 9: ATP uncaging in globalen P2Y₁R-KO-Mäusen unter P2Y₁R-Inhibition mittels MRS2179

A Beispielhafte Darstellung der Messspuren einer Zelle der Kontrollgruppe unter Standardbedingungen, in MRS2179 (100μM) und nach Auswaschen von MRS2179 (zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde nicht die gesamte Amplitude der Aktionspotentiale dargestellt). **B** Beispielhafte Darstellung der Messspuren einer Zelle aus einem globalen P2Y₁R-KO-Tier unter Standardbedingungen, in MRS2179 (100μM) und nach Auswaschen von MRS2179. **C** Graphische Darstellung des auf die Kontrollapplikation normalisierten Depolarisationsintegrals (AUC) in der Kontrollgruppe. Die Applikation von MRS2179 führte zu keiner signifikanten Reduktion der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation ($p = 0.1585$; $n = 5$ Zellen aus 2 Tieren). **D** Graphische Darstellung des auf die Kontrollapplikation normalisierten Depolarisationsintegrals (AUC) in globalen P2Y₁R-KO-Mäusen. Die Applikation von MRS2179

föhrte zu keiner signifikanten Reduktion der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation ($p = 0.1037$; $n = 5$ Zellen aus 5 Tieren).

4.1.4 Die Inhibition glutamaterger Rezeptoren föhrt zu einer Reduktion der indirekt vermittelten ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation

Ausgehend von oben beschriebener Hypothese, nach der die ATP-induzierte Mitralzelldepolarisation indirekt vermittelt wird, stellt sich weiterhin die Frage, welche Neurotransmitter an der Übertragung der Erregung von der direkt durch ATP aktivierten P2Y₁-tragenden Zellpopulation auf die Mitralzelle beteiligt sind.

In dieser Arbeit wurde daher in einer Kohorte von C57Bl/6-Mäusen der Einfluss des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat auf die nach glomerulärer ATP-Applikation gemessene Mitralzelldepolarisation untersucht.

Hierfür erfolgte zunächst ein ATP *uncaging* unter Standardbedingungen (ACSF + DPCPX + ZM241385), bevor anschließend NBQX (10µM), D-APV (50µM) und CPCCOEt (100µM) über das Perfusionssystem in das Versuchsbad eingewaschen wurden, um AMPA- und NMDA-Rezeptoren sowie den metabotropen Glutamatrezeptor 1 zu blockieren. Unter diesen Bedingungen erfolgte ein zweites ATP *uncaging*. Im Anschluss wurde zusätzlich Tetrodotoxin (0.5µM) in das Versuchsbad eingewaschen und ein letztes ATP *uncaging* durchgeführt. Gemessen wurden in diesen Versuchen 23 Zellen aus 12 Tieren.

Die Applikation der beschriebenen Zusammensetzung glutamaterger Rezeptorantagonisten föhrte in dieser Kohorte zu einer signifikanten Reduktion des Integrals (AUC) der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation ($p < 0.0001$). Die mittlere AUC der ATP-Kontrollapplikation vor Einwaschen glutamaterger Rezeptorantagonisten betrug in dieser Kohorte 64272mV x s (SEM = 7333mV x s). Nach Einwaschen der Glutamatrezeptorantagonisten reduzierte sich das Depolarisationsintegral (AUC) auf durchschnittlich 21405mV x s (SEM = 3674mV x s).

Es wurde der relative glutamatabhängige Anteil der AUC ermittelt, indem das Depolarisationsintegral des ATP *uncagings* unter Einfluss glutamaterger Blocker zunächst auf die vorangegangene Kontrollapplikation normalisiert wurde. Anschließend wurde dieser Wert von 1 subtrahiert. Der relative glutamatabhängige Anteil an der AUC betrug durchschnittlich 0.657 (SEM = 0.038), also etwa 65.7% des Ausgangswertes (AUC der Kontrollapplikation).

Die zusätzliche Applikation von Tetrodotoxin (TTX) führte zu einer weiteren signifikanten Reduktion des Depolarisationsintegrals (AUC) im Vergleich zur alleinigen Applikation glutamaterger Rezeptorantagonisten ($p = 0.0012$). Nach zusätzlichem Einwaschen von TTX in das Versuchsbad lag das mittlere Depolarisationsintegral bei $8522 \text{ mV} \times \text{s}$ (SEM = $1526 \text{ mV} \times \text{s}$). Dies entsprach einer durchschnittlichen Reduktion auf etwa 15.2% des Ausgangswertes (AUC der Kontrollapplikation).

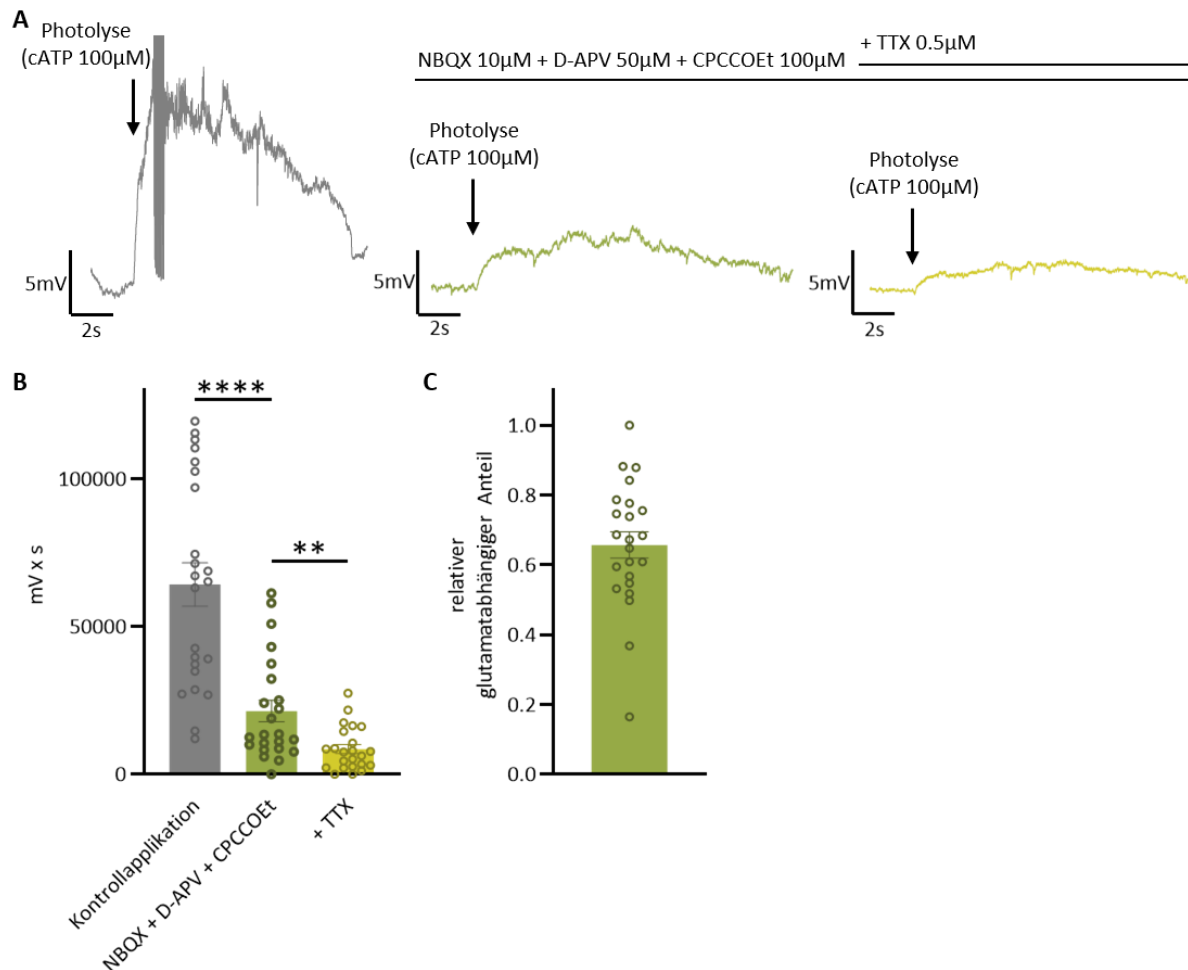


Abbildung 10: Glutamat ist an der indirekten Vermittlung der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation beteiligt

A Beispielhafte Darstellung der Messspuren einer Mitralzelle unter Standardbedingungen, in Glutamatrezeptorantagonisten und bei zusätzlicher TTX-Applikation (zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde nicht die gesamte Amplitude der Aktionspotentiale dargestellt). **B** Die Applikation von Glutamatrezeptorantagonisten führte zu einer signifikanten Reduktion des Integrals (AUC) der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation ($p < 0.0001$, $n = 23$ Zellen aus 12 Tieren). Das anschließende zusätzliche Einwaschen von TTX führte zu einer weiteren signifikanten Reduktion im Vergleich zu der alleinigen Applikation glutamaterger Rezeptorantagonisten ($p = 0.0012$, $n = \text{s.o.}$). **C** Darstellung des relativen glutamatabhängigen Anteils am Depolarisationsintegral (AUC). Für diese Darstellung wurde die in Glutamatrezeptorantagonisten gemessene AUC auf die unter Standardbedingungen gemessene

AUC normalisiert. Der hierbei ermittelte Wert wurde anschließend von 1 subtrahiert ($n = 23$ Zellen aus 12 Tieren).

4.1.5 P2Y₁-vermittelte Signalwege sind in der chronischen EAE verändert

Im nächsten Schritt erfolgte die Untersuchung der oben beschriebenen P2Y₁-rezeptorabhängigen Signalwege im *Bulbus olfactorius* unter neuroinflammatorischen Bedingungen. Hierfür wurde die Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis, ein Tiermodell der Multiplen Sklerose, verwendet. Es wurden sowohl Tiere in der akuten als auch der chronischen Phase der Erkrankung untersucht.

Zunächst erfolgte ein ATP *uncaging* unter den in dieser Arbeit verwendeten Standardbedingungen (ACSF + DPCPX + ZM241385). Gemessen wurden für diese Versuche 30 Zellen aus 13 Tieren in der Kontrollgruppe, 22 Zellen aus 9 Tieren mit akuter EAE und 22 Zellen aus 7 Tieren mit chronischer EAE.

In der akuten EAE unterschied sich das unter Standardbedingungen (ACSF + DPCPX + ZM241385) gemessene Depolarisationsintegral (AUC) nicht signifikant von der Kontrollgruppe ($p = 0.4565$). Die mittlere AUC lag in der Kontrollgruppe bei 59710mV x s (SEM = 6186mV x s) und in der akuten EAE bei 68308mV x s (SEM = 8375mV x s).

Auch in der chronischen EAE konnte im Vergleich zu oben genannter Kontrollgruppe unter Standardbedingungen (ACSF + DPCPX + ZM241385) kein signifikanter Unterschied in Hinblick auf das Depolarisationsintegral (AUC) festgestellt werden ($p = 0.9196$). Der Mittelwert der gemessenen AUC betrug in der chronischen EAE 52776mV x s (SEM = 4125mV x s).

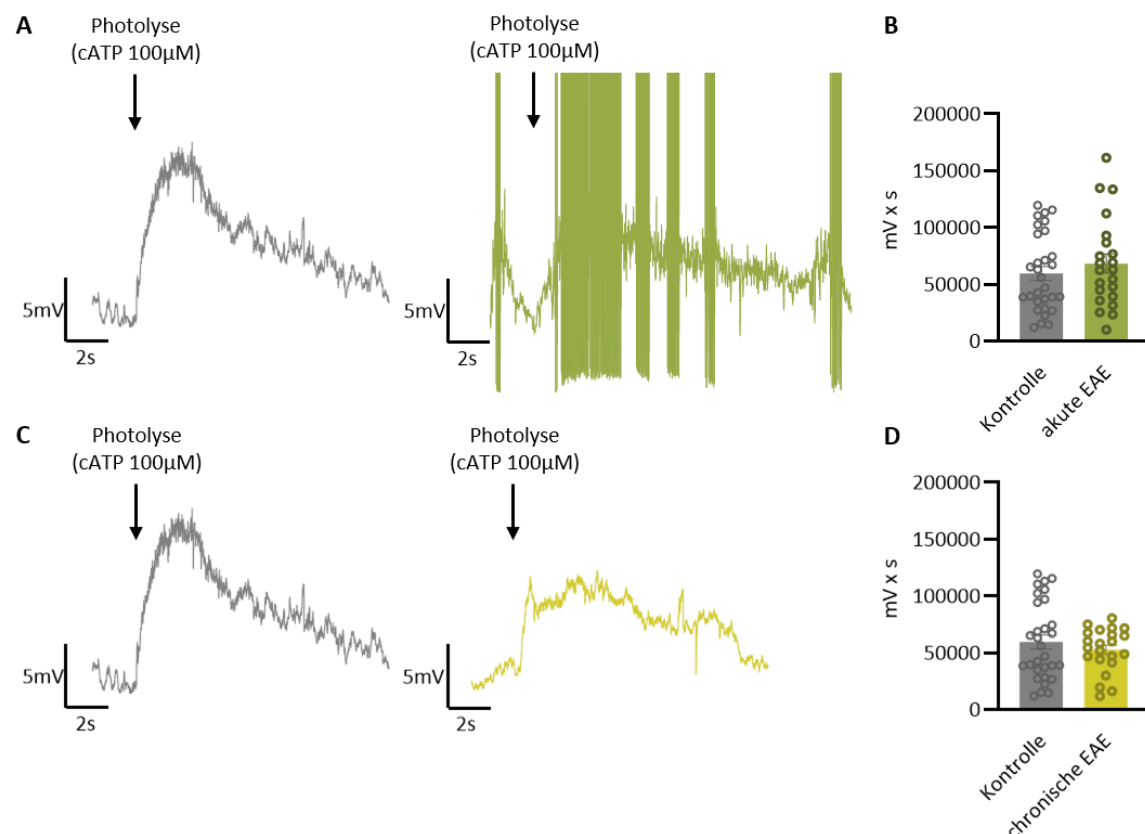


Abbildung 11: ATP *uncaging* in der akuten und chronischen EAE

A Beispielhafte Darstellung der Messspuren einer Zelle der Kontrollgruppe (grau) sowie einer Zelle aus einem Tier mit akuter EAE (grün). **B** Die quantitative Auswertung des Depolarisationsintegrals (AUC) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der gesunden Kontrollgruppe und der akuten EAE ($p = 0.4565$; $n = 30$ Zellen aus 13 Tieren vs. 22 Zellen aus 9 Tieren). **C** Beispielhafte Darstellung der Messspuren einer Zelle der Kontrollgruppe (grau) sowie einer Zelle aus einem Tier mit chronischer EAE (hellgrün). **D** Auch die quantitative Auswertung des Depolarisationsintegrals in der Kohorte chronischer EAE-Tiere ergab keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0.9196$; $n = 30$ Zellen aus 13 Tieren vs. 22 Zellen aus 7 Tieren).

Darüber hinaus sollte außerdem die glutamatabhängige Komponente der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation unter neuroinflammatorischen Bedingungen untersucht werden. Hierfür erfolgte im Anschluss an das oben beschriebene ATP *uncaging* unter Standardbedingungen (ACSF + DPCPX + ZM241385) die Applikation von NBQX, D-APV und CPCCOEt über die Extrazellulärlösung im Versuchsbad. Die in Glutamaterezeptorantagonisten gemessene AUC wurde auf die AUC der Kontrollapplikation normalisiert. Um den glutamatabhängigen Anteil zu bestimmen, wurde diese normalisierte AUC anschließend von 1 subtrahiert. Gemessen wurden in diesen Experimenten 25 Zellen aus 13 gesunden Kontrolltieren, 17 Zellen aus 9 Tieren mit akuter EAE und 18 Zellen aus 7 Tieren mit chronischer EAE.

Der Mittelwert des relativen glutamatabhängigen Anteils am Depolarisationsintegral (AUC) betrug in der Kontrollgruppe 0.645 (SEM = 0.036). Im Vergleich hierzu zeigte sich in der akuten EAE keine signifikante Veränderung ($p = 0.4463$). Der durchschnittliche glutamatabhängige Anteil betrug hier 0.694 (SEM = 0.04).

Bei Vergleich der chronischen EAE mit der Kontrollgruppe zeigte sich dagegen eine signifikante Reduktion des glutamatabhängigen Anteils am Depolarisationsintegral ($p = 0.0343$). Der mittlere glutamatabhängige Anteil betrug hier 0.495 (SEM = 0.061).

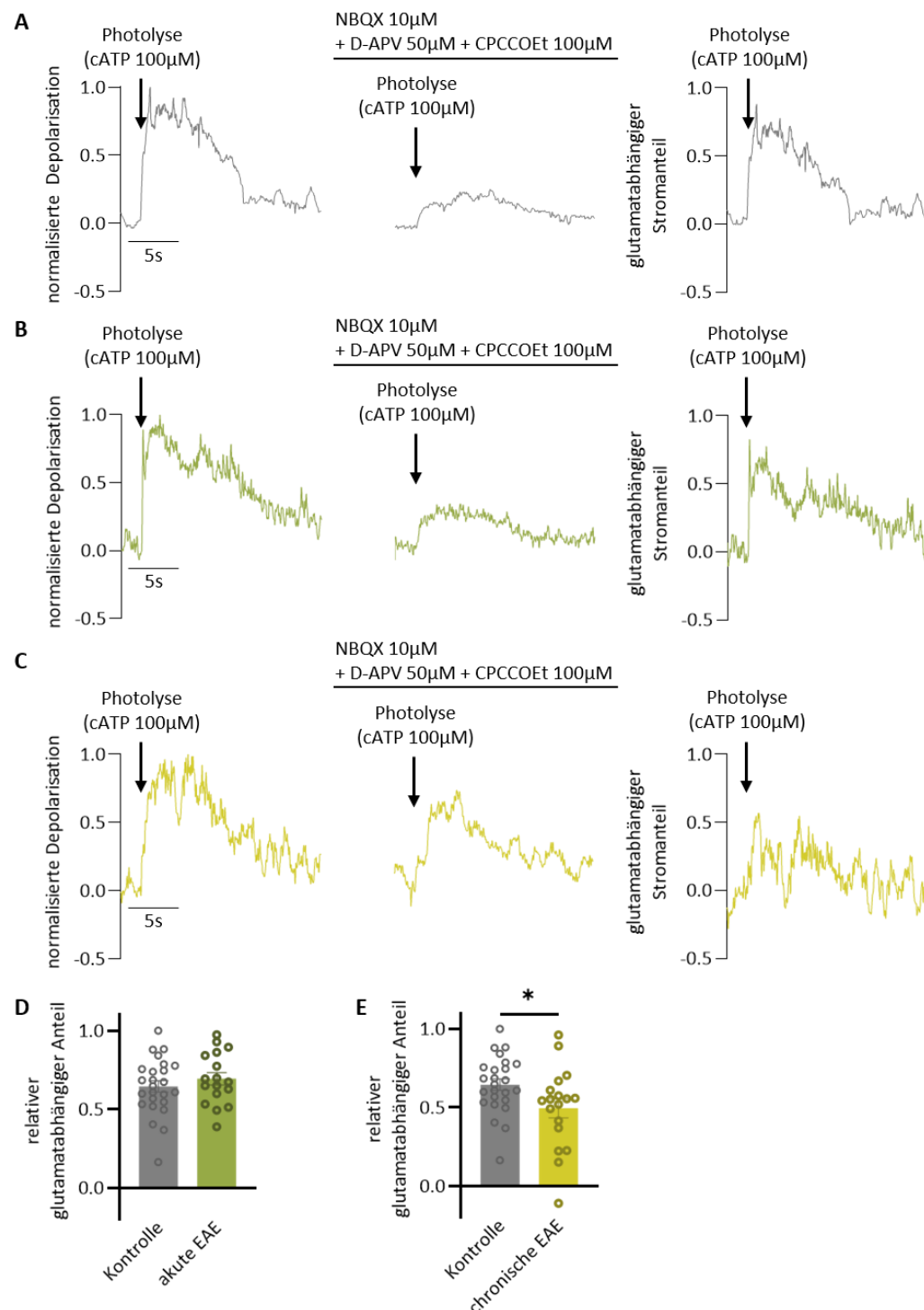


Abbildung 12: glutamatabhängiger Anteil der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation in der akuten und chronischen EAE

A Beispielhafte Darstellung der Messspuren einer Zelle der Kontrollgruppe unter Standardbedingungen (links) und in Glutamaterezeptorantagonisten (mittig). Zur Verbesserung der Anschaulichkeit wurden die Aktionspotentiale unter Verwendung eines digitalen *low pass* Filters herausgefiltert und die Messspuren anschließend auf das Maximum der Kontrollapplikation normalisiert. Rechts ist der glutamatabhängige Stromanteil dargestellt. **B** Beispielhafte Darstellung der Messspuren einer Zelle aus einem Tier mit akuter EAE (Darstellung analog zu A). **C** Beispielhafte Darstellung der Messspuren einer Zelle aus einem Tier mit chronischer EAE (Darstellung analog zu A). **D** Quantitative Auswertung des relativen glutamatabhängigen Anteils am Depolarisationsintegral (AUC) in der Kontrollgruppe und der

akuten EAE. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0.4463$; $n = 25$ Zellen aus 13 Tieren vs. 17 Zellen aus 9 Tieren). **E** Quantitative Auswertung des relativen glutamatabhängigen Anteils am Depolarisationsintegral (AUC) in der Kontrollgruppe und der chronischen EAE. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich in der chronischen EAE eine signifikante Reduktion ($p = 0.0343$; $n = 25$ Zellen aus 13 Tieren vs. 18 Zellen aus 7 Tieren).

4.1.6 Weitere beobachtete Veränderungen elektrophysiologischer Eigenschaften in der EAE

In der akuten EAE konnten zudem weitere Veränderungen elektrophysiologischer Eigenschaften beobachtet werden. In den hier gezeigten Versuchen wurde die Strom-Spannungs-Kennlinie von Mitralzellen in einer gesunden Kontrollgruppe und einer Kohorte akuter EAE-Tiere untersucht. Die Messungen erfolgten im *voltage clamp*. Nacheinander wurden mehrere Spannungssprünge von jeweils 0.5s Dauer angelegt. Die angelegte Spannung wurde dabei schrittweise um jeweils 15mV erhöht und umfasste insgesamt einen Bereich von -100mV bis +20mV. Die in diesem Protokoll gemessenen Ströme wurden im Anschluss auf die jeweilige Kapazität der Mitralzelle normalisiert.

Ein Teil der Messungen (19 Zellen der Kontrollgruppe, 19 Zellen der EAE-Gruppe) wurde von Janine Gierke durchgeführt und die in diesem Abschnitt gezeigten Daten wurden als Teil des Papers „Neuroinflammation causes mitral cell dysfunction and olfactory impairment in a multiple sclerosis model“ bereits publiziert (Schubert *et al.*, 2025).

Insgesamt umfasst die untenstehende Analyse 39 Zellen aus 25 gesunden Kontrolltieren sowie 43 Zellen aus 20 Tieren mit akuter EAE.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich in der akuten EAE eine signifikante Erhöhung der Stromdichte des Einstroms bei -100mV, -85mV und -70mV ($p = 0.0003$ bei -100mV; 0.0012 bei -85mV und 0.0241 bei -70mV).

Bei -100mV lag der Mittelwert der bestimmten Stromdichte in der gesunden Kontrollgruppe bei -4.55pA/pF (SEM = 0.27pA/pF) und in der akuten EAE bei -5.64pA/pF (SEM = 0.28pA/pF).

Die durchschnittliche Stromdichte bei -85mV betrug in der Kontrollgruppe -3.23pA/pF (SEM = 0.19pA/pF) und in der akuten EAE -3.92pA/pF (SEM = 0.19pA/pF).

Bei einem angelegten Spannungssprung auf -70mV lag der Mittelwert der Stromdichte in der gesunden Kontrollgruppe bei -2.00pA/pF (SEM = 0.13pA/pF) und in der akuten EAE bei -2.32pA/pF (SEM = 0.13pA/pF).

Bei angelegten Spannungssprüngen zwischen -55mV und +20mV konnte jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen gesunder Kontrollgruppe und akuter EAE beobachtet werden ($p = 0.9338$ bei -55mV; 0.3178 bei -40mV; 0.3455 bei -25mV; 0.3455 bei -10mV; 0.2252 bei +5mV; 0.3747 bei +20mV).

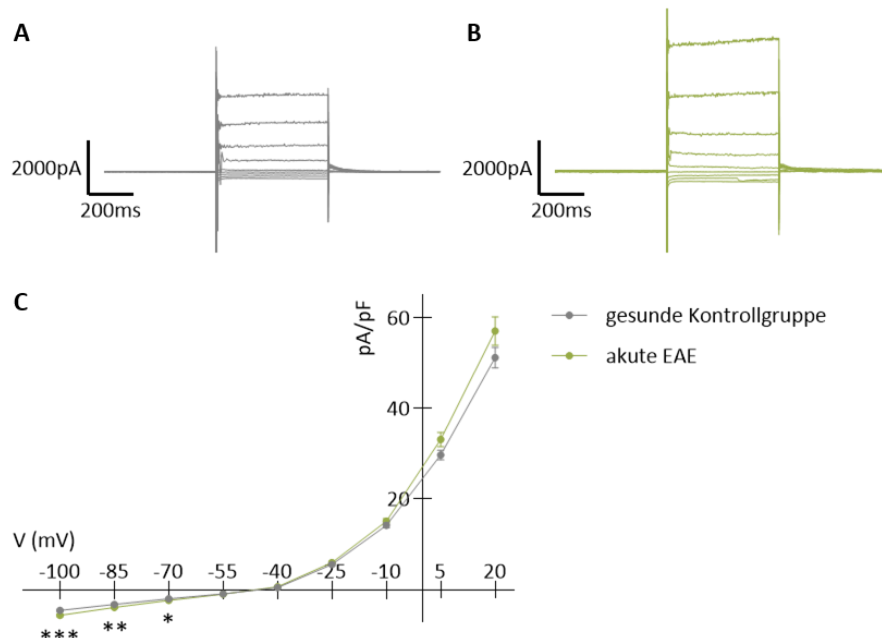


Abbildung 13: Strom-Spannungs-Kennlinie von Mitralzellen in der akuten EAE

A Beispielhafte Darstellung der Messspuren einer Mitralzelle aus der gesunden Kontrollgruppe im *voltage clamp* bei Anlegen mehrerer Spannungssprünge zwischen -100mV und +20mV mit einer schrittweisen Erhöhung der Spannung um jeweils 15mV (zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde nicht die gesamte Amplitude der Aktionspotentiale dargestellt). **B** Beispielhafte Darstellung der Messspuren einer Mitralzelle aus einem Tier mit akuter EAE (Messprotokoll analog zu A; zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurde nicht die gesamte Amplitude der Aktionspotentiale dargestellt). **C** Graphische Darstellung der bestimmten Stromdichte (in pA/pF) von Mitralzellen in Bezug zur angelegten Spannung in der gesunden Kontrollgruppe und der akuten EAE. In der akuten EAE zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Stromdichte des Einstroms bei -100mV, -85mV und -70mV ($p = 0.0003$; 0.0012 und 0.0241 ; $n = 39$ Zellen aus 25 Tieren vs. 43 Zellen aus 20 Tieren).

4.2 Primäre Neuronenkulturen

Die oben beobachteten Veränderungen der P2Y₁-rezeptorvermittelten Signalwege in der chronischen EAE sollten in einem *in vitro* Modell weiter analysiert werden. Hierfür wurden primäre Neuronenkulturen aus dem *Bulbus olfactorius* hergestellt, charakterisiert und anschließend in einem Glutamatstressmodell untersucht.

4.2.1 Die Charakterisierung primärer Neuronenkulturen aus dem *Bulbus olfactorius* zeigte einige signifikante Unterschiede zu kortikalen Kulturen

Um die im Folgenden verwendeten primären Neuronenkulturen des *Bulbus olfactorius* zunächst zu charakterisieren, wurden verschiedene immunocytochemische Färbungen durchgeführt. Hierfür wurden aus 3-4 tragenden Mäusen jeweils primäre Neuronenkulturen aus dem Cortex sowie dem *Bulbus olfactorius* hergestellt und mittels verschiedener immunocytochemischer Färbungen miteinander verglichen. Es erfolgte eine astrozytäre Färbung (GFAP, S100B) zur Quantifizierung der in den Kulturen enthaltenen Astrozyten sowie Färbungen der neuronalen Marker Reelin, Doublecortin, Calbindin, Calretinin und Tyrosinhydroxylase. Bezugsgröße war jeweils die mittels MAP2-Färbung bestimmte Gesamtzahl der Neurone.

Um die in den Kulturen enthaltene Zahl an Astrozyten zu bestimmen, wurden Antikörper gegen GFAP und S100B verwendet. Gleichzeitig erfolgte eine neuronale Färbung unter Verwendung eines Antikörpers gegen MAP2. Die Zahl GFAP/S100B-positiver Astrozyten wurde für die Auswertung auf die mittels MAP2-Färbung bestimmte Gesamtzahl der Neurone normalisiert. Gefärbt wurden jeweils 3 Kulturen aus 3 Bioreplikaten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der relativen Astrozytenzahl in primären Neuronenkulturen des *Bulbus olfactorius* im Vergleich zu kortikalen Kulturen ($p = 0.8370$). Die auf MAP2 normalisierte Astrozytenzahl lag in kortikalen Kulturen durchschnittlich bei 0.336 (SEM = 0.074) und in Kulturen des *Bulbus olfactorius* durchschnittlich bei 0.367 (SEM = 0.121).

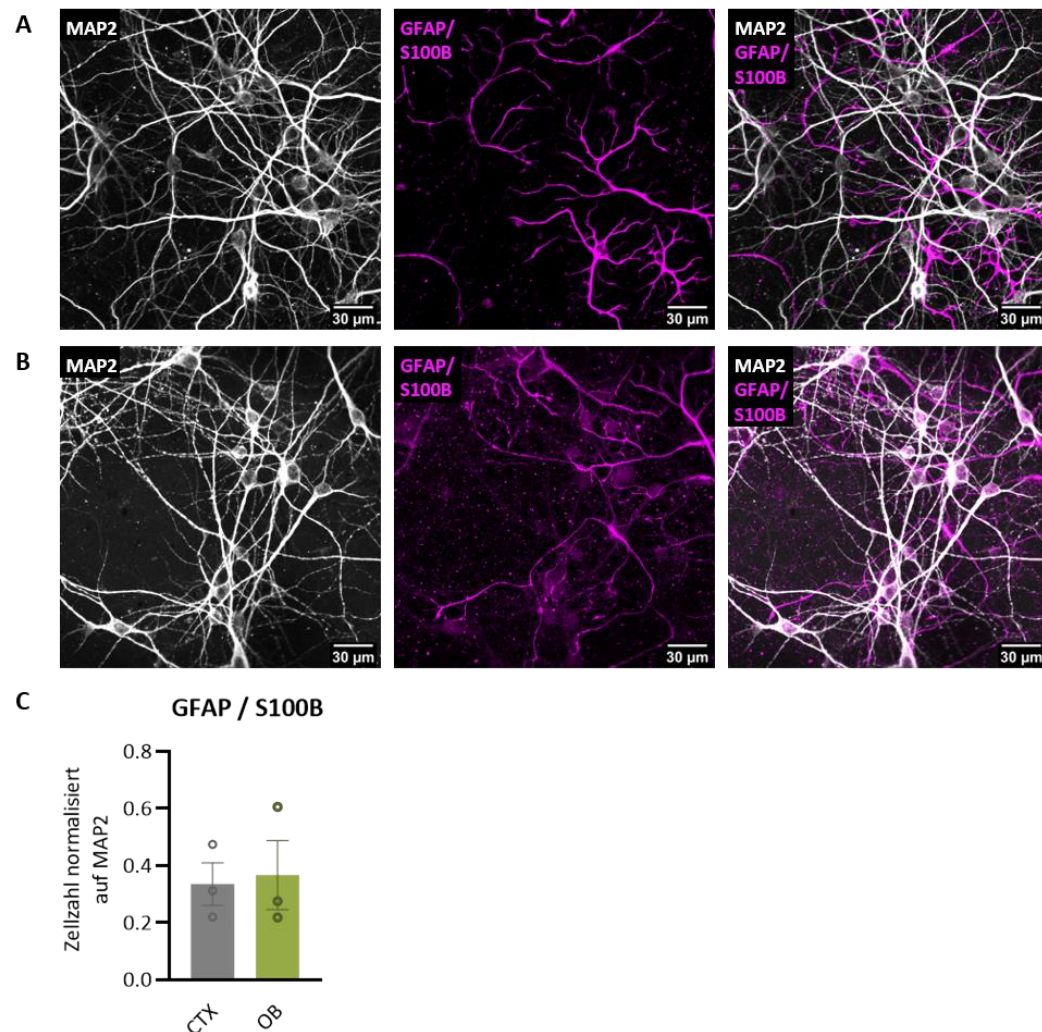


Abbildung 14: Astrozytenzahl in primären Neuronenkulturen des Cortex und des *Bulbus olfactorius*

A Beispielhafte Darstellung von Mikroskopaufnahmen einer primären Neuronenkultur des Cortex (MAP2 = *microtubule associated protein 2*; GFAP = *glial fibrillary acidic protein*; S100B = *S100 calcium binding protein B*). **B** Beispielhafte Darstellung von Mikroskopaufnahmen einer primären Neuronenkultur des *Bulbus olfactorius* (MAP2 = *microtubule associated protein 2*; GFAP = *glial fibrillary acidic protein*; S100B = *S100 calcium binding protein B*). **C** Quantitative Auswertung der Astrozytenzahl in primären Neuronenkulturen des Cortex und des *Bulbus olfactorius*. Die Zahl GFAP/S100B-positiver Zellen wurde auf die Zahl MAP2-positiver Zellen normalisiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der relativen Astrozytenzahl in Kulturen des *Bulbus olfactorius* im Vergleich zu kortikalen Kulturen ($p = 0.8370$; $n =$ je 3 Kulturen aus 3 Bioreplikaten).

Der erste analysierte neuronale Marker war Reelin. Es wurden je 4 Kulturen aus dem Cortex und dem *Bulbus olfactorius* gefärbt. Die Zahl Reelin-positiver Neurone wurde auf die mittels MAP2-Färbung bestimmte Gesamtzahl der im jeweiligen Bildausschnitt vorhandenen Neurone normalisiert. In Kulturen des *Bulbus olfactorius* zeigte sich ein signifikant höherer Anteil Reelin-positiver Zellen an der Gesamtheit der MAP2-positiven Zellen ($p = 0.0003$). Durchschnittlich lag der Anteil Reelin-positiver Neurone in den

kortikalen Kulturen bei 0.042 (SEM = 0.015) und in den Kulturen aus dem *Bulbus olfactorius* bei 0.367 (SEM = 0.040).

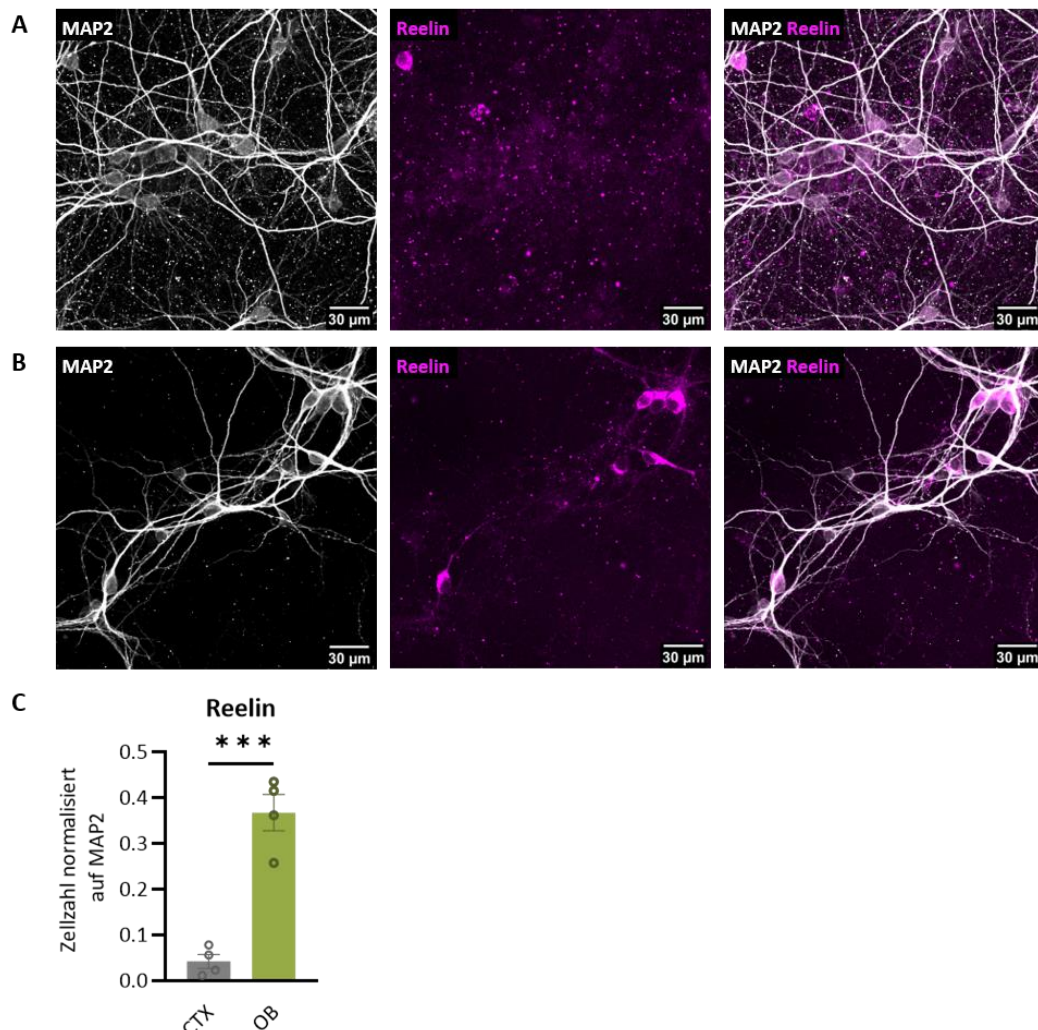


Abbildung 15: Reelin-positive Zellen in primären Neuronenkulturen des Cortex und des *Bulbus olfactorius*

A Beispielhafte Darstellung von Mikroskopaufnahmen einer primären Neuronenkultur des Cortex (MAP2 = *microtubule associated protein 2*; Reelin). **B** Beispielhafte Darstellung von Mikroskopaufnahmen einer primären Neuronenkultur des *Bulbus olfactorius* (MAP2 = *microtubule associated protein 2*; Reelin). **C** Quantitative Auswertung Reelin-positiver Zellen in primären Neuronenkulturen des Cortex und des *Bulbus olfactorius*. Die Zahl Reelin-positiver Neurone wurde auf die Gesamtzahl MAP2-positiver Zellen normalisiert. In Kulturen des *Bulbus olfactorius* zeigte sich ein signifikant höherer Anteil Reelin-positiver Zellen im Vergleich zu kortikalen Kulturen ($p = 0.0003$; $n =$ je 4 Kulturen aus 4 Bioreplikaten).

In analoger Weise erfolgte auch die Analyse von Doublecortin (DCX) in primären Neuronenkulturen aus dem Cortex und dem *Bulbus olfactorius*. Auch hier erfolgte die Normalisierung der Anzahl Doublecortin-positiver Neurone auf die Gesamtzahl MAP2-positiver Zellen. Es wurden jeweils 4 Kulturen aus 4 Bioreplikaten untersucht. Die normalisierte Zahl Doublecortin-positiver Zellen in Kulturen des *Bulbus olfactorius* zeigte

keinen signifikanten Unterschied zu dem in kortikalen Kulturen ($p = 0.0787$). In kortikalen Kulturen betrug der relative Anteil Doublecortin-positiver Zellen an der Gesamtzahl MAP2-positiver Zellen 0.060 (SEM = 0.019) und in Kulturen aus dem *Bulbus olfactorius* 0.118 (SEM = 0.020).

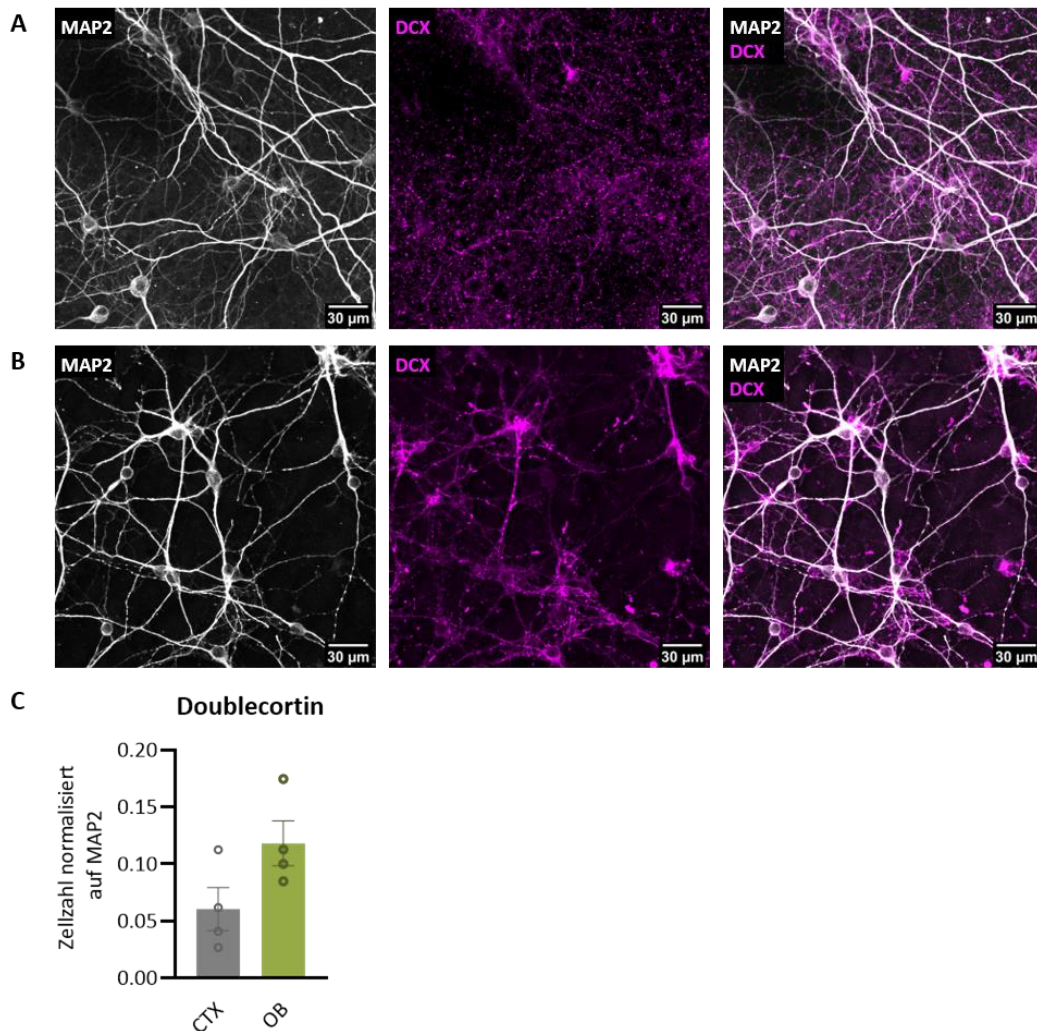


Abbildung 16: Doublecortin-positive Zellen in primären Neuronenkulturen des Cortex und des *Bulbus olfactorius*

A Beispielhafte Darstellung von Mikroskopaufnahmen einer primären Neuronenkultur des Cortex (MAP2 = *microtubule associated protein 2*; DCX = Doublecortin). **B** Beispielhafte Darstellung von Mikroskopaufnahmen einer primären Neuronenkultur des *Bulbus olfactorius* (MAP2 = *microtubule associated protein 2*; DCX = Doublecortin). **C** Quantitative Auswertung Doublecortin-positiver Zellen in primären Neuronenkulturen des Cortex und des *Bulbus olfactorius*. Die Zahl Doublecortin-positiver Neurone wurde auf die Gesamtzahl MAP2-positiver Zellen normalisiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen kortikalen Kulturen und Kulturen aus dem *Bulbus olfactorius* ($p = 0.0787$; $n =$ je 4 Kulturen aus 4 Bioreplikaten).

Der nächste untersuchte Marker war Calbindin (CB). Hierfür wurden jeweils 4 Kulturen aus dem Cortex und dem *Bulbus olfactorius* gefärbt und analysiert. In primären Neuronenkulturen des *Bulbus olfactorius* zeigte sich im Vergleich zu kortikalen Kulturen

ein signifikant niedrigerer Anteil Calbindin-positiver Zellen an der mittels MAP2-Färbung bestimmten Gesamtzahl aller Neurone ($p = 0.0182$). Im Durchschnitt lag der Anteil der Calbindin-positiven Neurone in kortikalen Kulturen bei 0.350 (SEM = 0.059) und in Kulturen des *Bulbus olfactorius* bei 0.121 (SEM = 0.040).

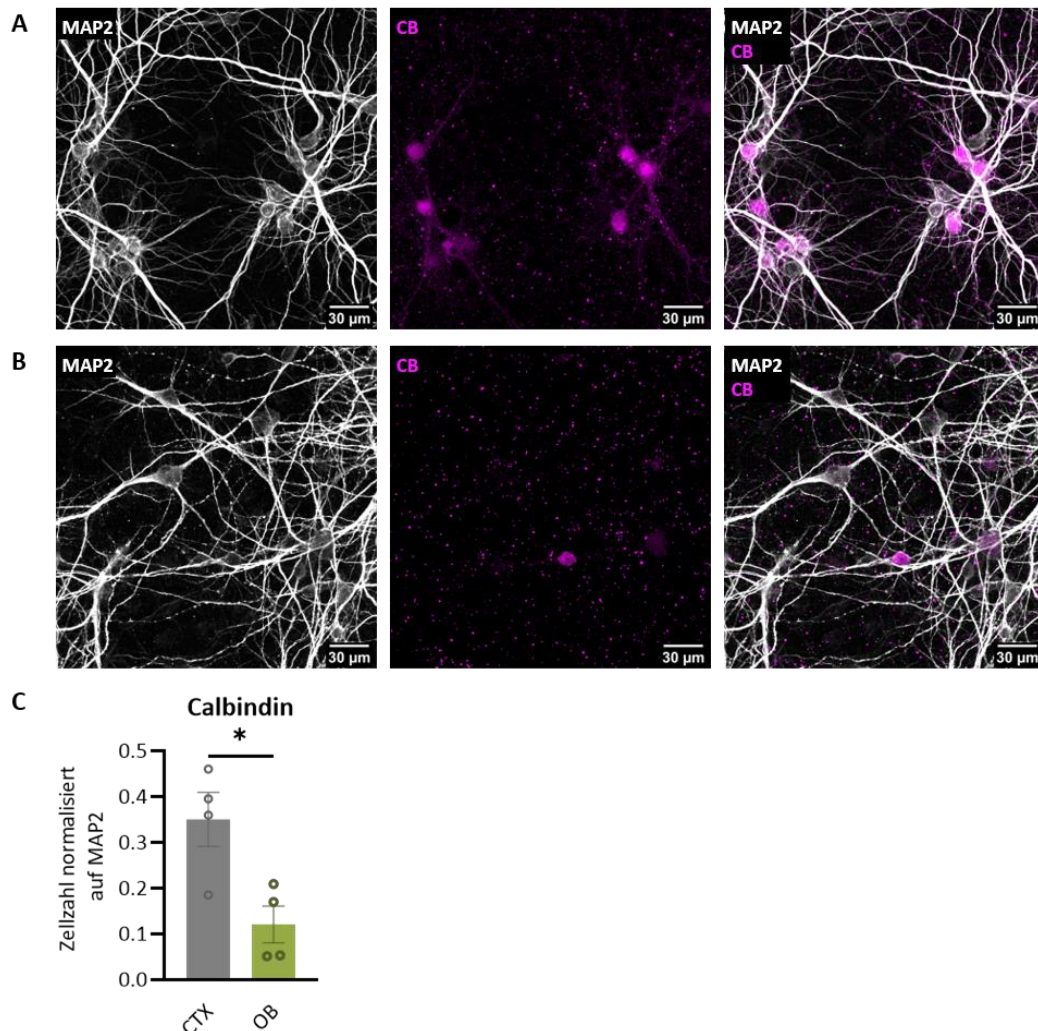


Abbildung 17: Calbindin-positive Zellen in primären Neuronenkulturen des Cortex und des *Bulbus olfactorius*

A Beispielhafte Darstellung von Mikroskopaufnahmen einer primären Neuronenkultur des Cortex (MAP2 = *microtubule associated protein 2*; CB = Calbindin). **B** Beispielhafte Darstellung von Mikroskopaufnahmen einer primären Neuronenkultur des *Bulbus olfactorius* (MAP2 = *microtubule associated protein 2*; CB = Calbindin). **C** Quantitative Auswertung Calbindin-positiver Zellen in primären Neuronenkulturen des Cortex und des *Bulbus olfactorius*. Die Zahl Calbindin-positiver Zellen wurde auf die Gesamtzahl MAP2-positiver Zellen normalisiert. In Kulturen des *Bulbus olfactorius* zeigte sich ein signifikant niedrigerer Anteil Calbindin-positiver Zellen im Vergleich zu kortikalen Kulturen ($p = 0.0182$; $n =$ je 4 Kulturen aus 4 Bioreplikaten).

Die Analyse des Markers Calretinin (CR) erfolgte in analoger Weise. Auch hier wurde die Zahl Calretinin-positiver Neurone auf die Gesamtzahl MAP2-positiver Zellen normalisiert. Gefärbt wurden jeweils 4 Kulturen des *Bulbus olfactorius* und Cortex aus 4

Bioreplikaten. Die Kulturen des *Bulbus olfactorius* zeigten eine signifikante Erhöhung der normalisierten Zahl Calretinin-positiver Zellen im Vergleich zu den kortikalen Kulturen ($p = 0.0004$). Der mittlere normalisierte Anteil Calretinin-positiver Zellen lag in den kortikalen Kulturen bei 0.028 (SEM = 0.011) und in den Kulturen aus dem *Bulbus olfactorius* bei 0.207 (SEM = 0.023).

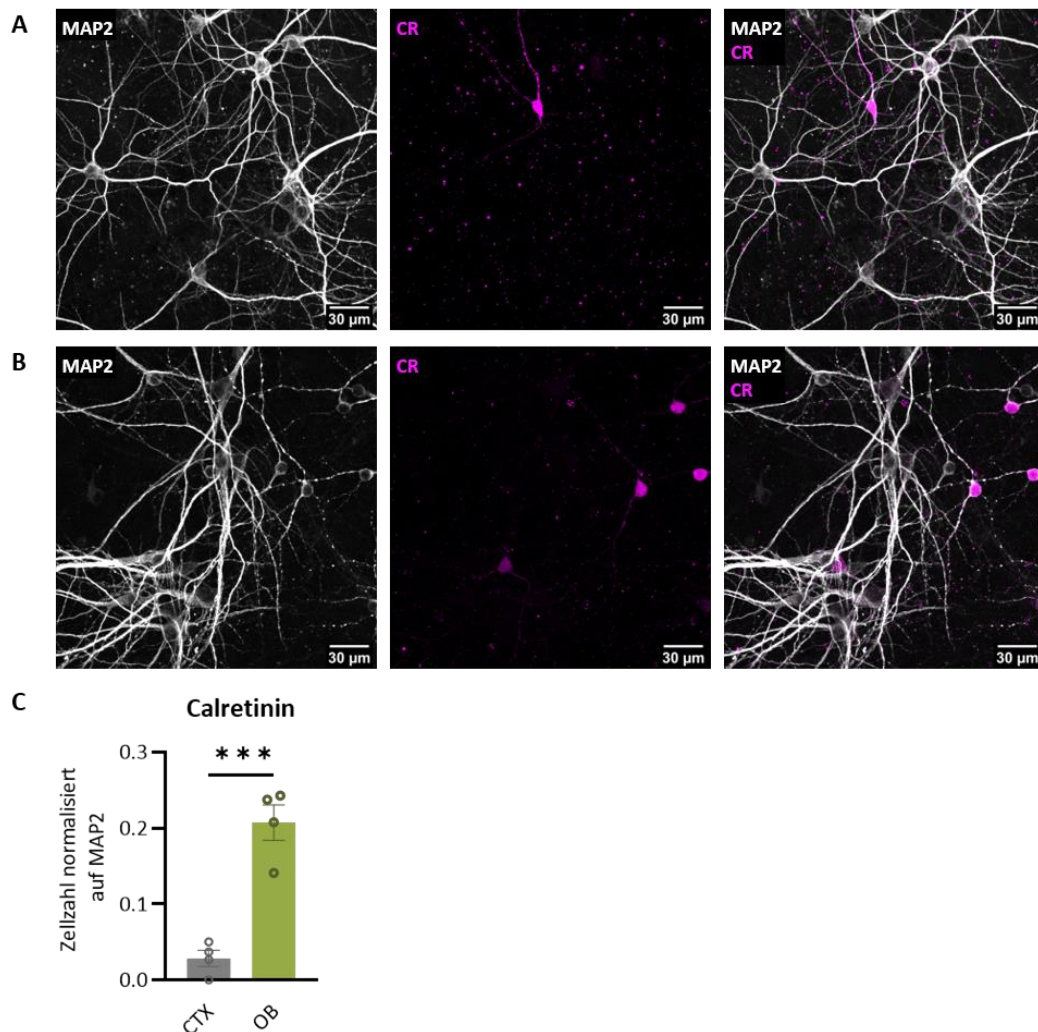


Abbildung 18: Calretinin-positive Zellen in primären Neuronenkulturen des Cortex und des *Bulbus olfactorius*

A Beispielhafte Darstellung von Mikroskopaufnahmen einer primären Neuronenkultur des Cortex (MAP2 = *microtubule associated protein 2*; CR = Calretinin). **B** Beispielhafte Darstellung von Mikroskopaufnahmen einer primären Neuronenkultur des *Bulbus olfactorius* (MAP2 = *microtubule associated protein 2*; CR = Calretinin). **C** Quantitative Auswertung Calretinin-positiver Zellen in primären Neuronenkulturen des Cortex und des *Bulbus olfactorius*. Die Zahl Calretinin-positiver Neurone wurde auf die Gesamtzahl MAP2-positiver Zellen normalisiert. In Kulturen des *Bulbus olfactorius* zeigte sich ein signifikant höherer Anteil Calretinin-positiver Zellen im Vergleich zu kortikalen Kulturen ($p = 0.0004$; $n =$ je 4 Kulturen aus 4 Bioreplikaten).

Der letzte betrachtete Marker war die Tyrosinhydroxylase (TH). Auch die Zahl Tyrosinhydroxylase-positiver Neurone wurde im Rahmen der Auswertung auf die

Gesamtzahl MAP2-positiver Zellen normalisiert. Untersucht wurden jeweils 3 Kulturen aus 3 Bioreplikaten. In Kulturen des *Bulbus olfactorius* zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen im Vergleich zu kortikalen Kulturen ($p = 0.0112$). In den aufgenommenen Bildausschnitten kortikaler Kulturen konnten keine Tyrosinhydroxylase-positiven Zellen beobachtet werden. Der auf die Zahl MAP2-positiver Zellen normalisierte Anteil Tyrosinhydroxylase-positiver Neurone in Kulturen aus dem *Bulbus olfactorius* betrug durchschnittlich 0.039 (SEM = 0.009).

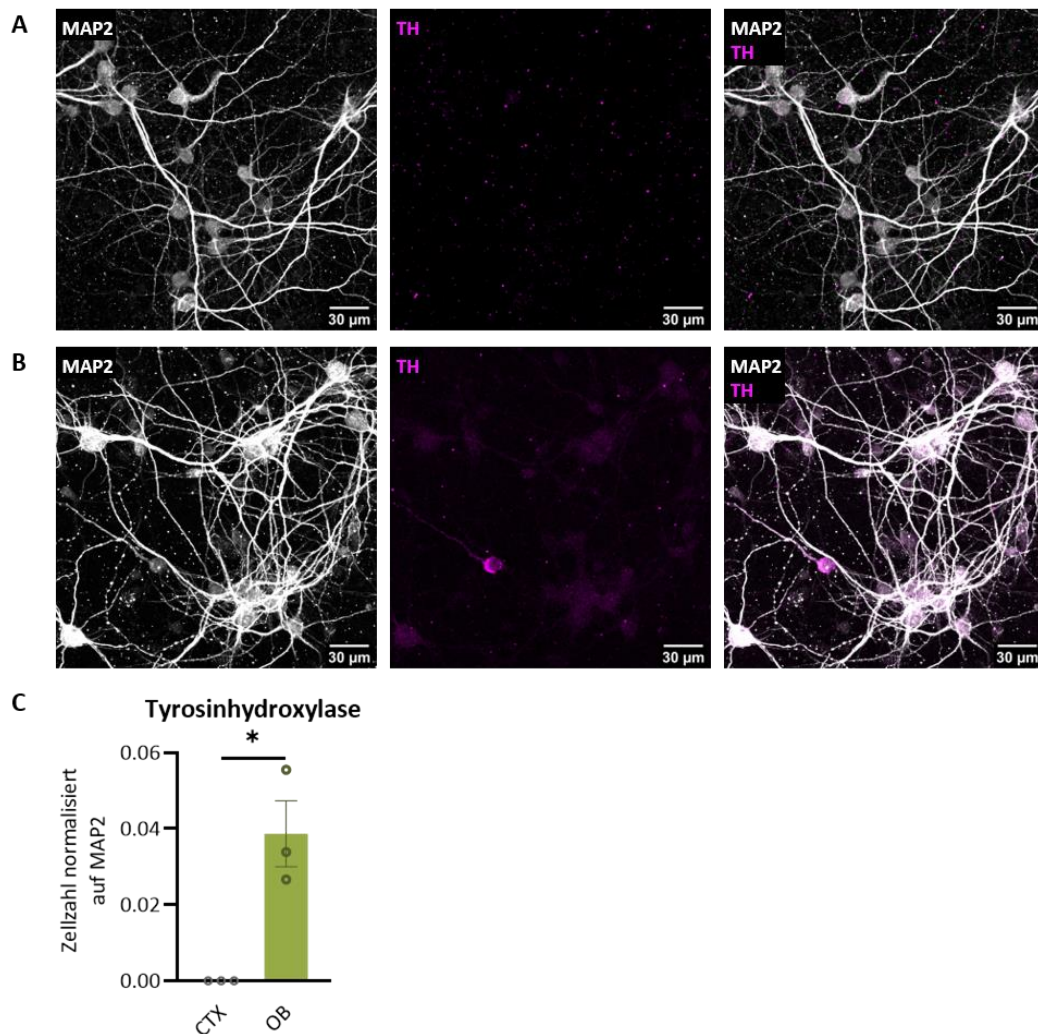


Abbildung 19: Tyrosinhydroxylase-positive Zellen in primären Neuronenkulturen des Cortex und des *Bulbus olfactorius*

A Beispielhafte Darstellung von Mikroskopaufnahmen einer primären Neuronenkultur des Cortex (MAP2 = *microtubule associated protein 2*; TH = Tyrosinhydroxylase). **B** Beispielhafte Darstellung von Mikroskopaufnahmen einer primären Neuronenkultur des *Bulbus olfactorius* (MAP2 = *microtubule associated protein 2*; TH = Tyrosinhydroxylase). **C** Quantitative Auswertung Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen in primären Neuronenkulturen des Cortex und des *Bulbus olfactorius*. Die Zahl Tyrosinhydroxylase-positiver Neurone wurde auf die Gesamtzahl MAP2-positiver Zellen normalisiert. In Kulturen des *Bulbus olfactorius* zeigte sich ein signifikant höherer

Anteil Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen im Vergleich zu kortikalen Kulturen ($p = 0.0112$; $n =$ je 3 Kulturen aus 3 Bioreplikaten).

Insgesamt zeigen diese Versuche, dass sich primäre Neuronenkulturen des *Bulbus olfactorius* in einigen ihrer Eigenschaften signifikant von kortikalen Kulturen unterscheiden. Zwar zeigten die Versuche dieser Arbeit keinen signifikanten Unterschied in der relativen Anzahl enthaltener Astrozyten, in Hinblick auf die neuronalen Marker Reelin, Calbindin, Calretinin und Tyrosinhydroxylase konnten jedoch signifikante Unterschiede beobachtet werden. Die normalisierte Zahl Doublecortin-positiver Neurone zeigte sich in dieser Arbeit nicht signifikant unterschiedlich.

4.2.2 *Calcium imaging*: In einem Glutamatstressmodell konnte keine Neuroprotektion durch P2Y₁-Inhibition beobachtet werden

Die oben beschriebenen primären Neuronenkulturen aus dem *Bulbus olfactorius* wurden verwendet, um potentielle neuroprotektive Effekte einer P2Y₁-Rezeptorinhibition in einem in vitro Glutamatstressmodell mittels *calcium imaging* zu untersuchen.

Nach vorherigem Einbringen des Calciumindikators GCamp6f durch Transduktion der Neuronenkulturen mithilfe eines AAV7-Vektors (AAV7-hSyn-GCamp6f) erfolgte am Versuchstag die kontinuierliche Aufzeichnung intrazellulärer Calciumsignale.

Im Ruhezustand zeigten die primären Neurone aus dem *Bulbus olfactorius* spikeförmige Oszillationen des intrazellulären Calciumlevels. Nach mindestens 5-minütiger Aufzeichnung dieser Grundaktivität als Baseline der Messung erfolgte entweder die Applikation des P2Y₁-Rezeptorantagonisten MRS2179 oder die Kontrollapplikation des Zellkulturmediums PNGM, bevor weitere 5 Minuten später die Induktion neuronalen Stresses durch Glutamatapplikation erfolgte. Ziel dieses Versuchs war die Untersuchung der Auswirkungen einer P2Y₁-Rezeptorinhibition auf den glutamatinduzierten Anstieg des intrazellulären Calciums in Neuronen.

In diesem Versuchsaufbau zeigte sich jedoch kein Unterschied in Hinblick auf den glutamatinduzierten intrazellulären Calciumanstieg zwischen den mit MRS2179 vorbehandelten Kulturen und der Kontrollgruppe ($p = 0.7647$). Gemessen wurden jeweils 9 Kulturen aus 4 Bioreplikaten in der MRS2179-Gruppe sowie der Kontrollgruppe. Die mittlere normalisierte AUC lag in der MRS2179-Gruppe bei 8.23 (SEM = 1.14) und in der Kontrollgruppe bei 7.78 (SEM = 0.96).

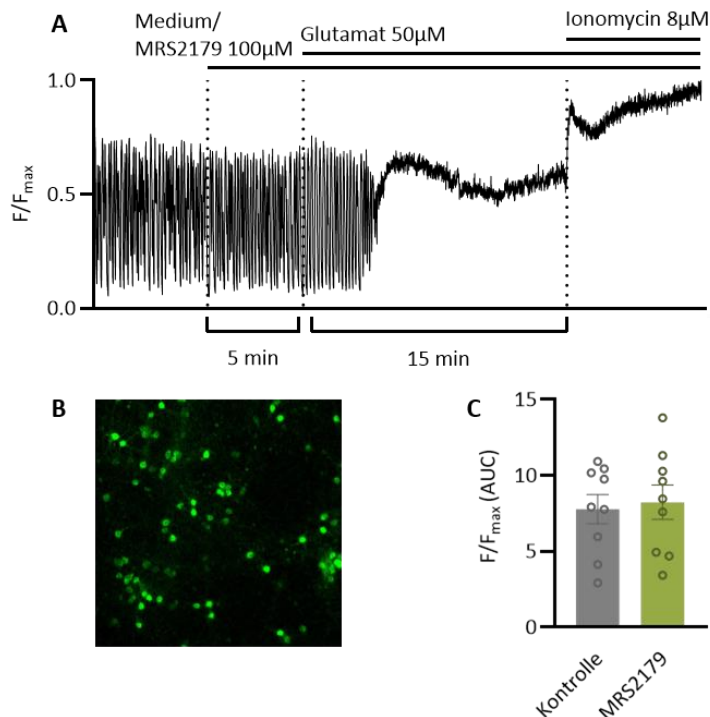


Abbildung 20: Calcium imaging in primären Neuronenkulturen des *Bulbus olfactorius*

A Darstellung des Versuchsprotokolls anhand der Messspur eines Neurons. Nach Aufzeichnung der Grundaktivität erfolgte die Applikation von MRS2179 (100 μ M) oder die kontrollweise Applikation einer äquivalenten Menge des Zellkulturmediums PNGM (gezeigt ist hier beispielhaft eine Zelle aus einer Kultur der Kontrollgruppe). 5 Minuten später erfolgte die Induktion neuronalen Stresses durch die Applikation von Glutamat (50 μ M). Nach weiteren 15 Minuten wurde Ionomycin (8 μ M) appliziert. **B** GCamp6f exprimierende Primärneurone aus dem Bulbus olfactorius nach Transduktion mithilfe eines AAV7-Vektors (AAV7-hSyn-GCamp6f). Gezeigt ist eine Kultur vor Beginn des Versuchs. **C** Quantitative Auswertung des glutamatinduzierten Calciumanstiegs. Nach vorhergehender Applikation des P2Y₁-Rezeptorantagonisten MRS2179 zeigte sich kein Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0.7647$, $n =$ jeweils 9 Kulturen aus 4 Bioreplikaten).

5 Diskussion

5.1 Allgemeine Aspekte in Hinblick auf die ATP *uncaging* Versuche und ihre Auswertung

Wie bereits in Vordaten beschrieben (Schulz, 2018), konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Mitralzellen mit einer Depolarisation auf die photolytische Freisetzung von ATP im zugehörigen Glomerulus reagieren.

Schon bei optischer Betrachtung während der Experimente fiel auf, dass die ATP-induzierte Mitralzelldepolarisation in ihrer Größe, Form und Dauer eine große Variabilität aufwies. Auch konnte beobachtet werden, dass verschiedene Mitralzellen sich in Hinblick auf die im Rahmen der Depolarisation induzierten Aktionspotentiale unterschieden. Während in einigen Mitralzellen ausgeprägte Aktionspotentialbursts induziert wurden, zeigten andere nur wenige oder gar keine Aktionspotentiale im Rahmen der ATP-induzierten Depolarisation.

Diese große Variabilität stellte insbesondere im Rahmen der nachfolgenden Auswertung eine Herausforderung dar. Alle in dieser Arbeit zur Quantifizierung der Depolarisation genutzten Parameter, also das Depolarisationsintegral (AUC), der Depolarisationspeak sowie die Depolarisationsdauer, wiesen eine relativ große Streuung auf. Als einheitliche Methode zur Auswertung innerhalb dieser Arbeit wurde das Depolarisationsintegral (AUC) ausgewählt, da dieses aufgrund des Einflusses sowohl der Depolarisationsamplitude als auch der Depolarisationsdauer beispielsweise im Vergleich zur alleinigen Betrachtung des Depolarisationspeaks eine bessere Erfassung der Größe der Depolarisation in ihrer Gesamtheit ermöglichte. Nur an einzelnen Stellen der Arbeit wurde zusätzlich die quantitative Auswertung anderer Parameter gezeigt.

Trotz der Vorteile des Depolarisationsintegrals in der Quantifizierung der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation gegenüber anderen Parametern wie dem Depolarisationspeak oder der Depolarisationsdauer war auch bei Auswertung des Depolarisationsintegrals immer noch eine große Streuung der Ergebnisse zu sehen. Hierfür sind verschiedene Gründe denkbar.

Im Rahmen der Auswertung stellte sich die Frage der Interaktion des bestimmten Depolarisationsintegrals mit der Grundaktivität der gemessenen Mitralzellen. Diese weisen im Ruhezustand spontane Oszillationen des Ruhemembranpotentials auf, die sogenannten *up-* und *downstates* (Abb. 1). Zum Zeitpunkt der *spot laser* induzierten

ATP-Photolyse befanden sich die Mitralzellen in unterschiedlichen Phasen dieser spontanen Membranpotentialschwankungen. Inwiefern spontane *upstates* zum im Rahmen der Auswertung bestimmten Depolarisationsintegral beitrugen, konnte anhand der angewendeten Methode in der Auswertung nicht evaluiert werden. Zukünftig könnte es daher interessant sein, eine quantitative Analyse der Grundaktivität der Mitralzellen durchzuführen und diese in die Auswertung einzubeziehen.

Darüber hinaus stellt sich außerdem die Frage, welchen potentiellen Einfluss die Phasenlage des oszillierenden Membranpotentials zum Zeitpunkt der Induktion der Photolyse auf die Erregbarkeit der Mitralzelle durch das freigesetzte ATP haben könnte. Bereits vor vielen Jahren konnte gezeigt werden, dass Mitralzellen auf die elektrische Stimulation des olfaktorischen Nerven während des *upstate* im Vergleich zum *downstate* eher mit einem Aktionspotential reagieren (Heyward *et al.*, 2001). Es wäre daher denkbar, dass sich auch die Reaktion der Mitralzelle auf die Stimulation durch ATP in Abhängigkeit des Membranpotentials zum Zeitpunkt der Photolyse unterscheidet.

Ein weiterer zu beachtender Aspekt ist außerdem die potentielle Heterogenität der gemessenen Mitralzellen. In verschiedenen Arbeiten konnten mittels *RNA sequencing* drei verschiedene Cluster von Mitralzellen/*tufted* Zellen im *Bulbus olfactorius* identifiziert werden (Tepe *et al.*, 2018; Schubert *et al.*, 2025). Bei weiterer Analyse konnten hieraus drei Mitralzellcluster bestimmt werden (Schubert *et al.*, 2025). Eine Unterscheidung verschiedener Mitralzellsubpopulationen im Rahmen der Patchclamp-Experimente dieser Arbeit erfolgte jedoch nicht und wäre methodisch zudem schwer umsetzbar. Es ist daher möglich, dass die hier im Rahmen der verschiedenen Versuche jeweils zu einer Kohorte zusammengefassten Messungen aus Mitralzellen verschiedener Cluster stammen. Die Relevanz der Einteilung von Mitralzellen in verschiedene Cluster für die Versuche dieser Arbeit ist zum aktuellen Zeitpunkt unklar. Potentielle Unterschiede der verschiedenen Cluster in Hinblick auf elektrophysiologische Eigenschaften oder die Reaktion auf die in dieser Arbeit durchgeführte ATP-Photolyse sind denkbar und sollten in weiteren Versuchen evaluiert werden.

Insgesamt erscheint es sehr wahrscheinlich, dass die Größe und Form der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation von einer Reihe verschiedener Faktoren beeinflusst

wird, die noch nicht vollständig bekannt sind und zu der beobachteten Streuung der Ergebnisse beitragen.

5.2 P2Y₁-rezeptorabhängige Effekte auf die neuronale Aktivität in Mitralzellen des *Bulbus olfactorius*

5.2.1 ATP uncaging in astrozytären P2Y₁R-KO-Mäusen

Die aus Vordaten unseres Labors (Schulz, 2018) bekannte indirekte Vermittlung der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation wurde in dieser Arbeit weiter untersucht. Neben anderen Aspekten sollte auch die Beteiligung astrozytärer Mechanismen evaluiert werden. In periglomerulären Astrozyten des *Bulbus olfactorius* ist das Vorhandensein von P2Y₁-Rezeptoren beschrieben (Rotermund *et al.*, 2019). In kultivierten Astrozyten aus dem Rückenmark konnte außerdem gezeigt werden, dass der P2Y₁-Rezeptor an der Vermittlung einer ATP-abhängigen Glutamatfreisetzung aus diesen Zellen beteiligt sein könnte (Zeng *et al.*, 2008). Eine astrozytäre Beteiligung an der indirekten Vermittlung der beobachteten ATP-induzierten, P2Y₁-abhängigen Mitralzelldepolarisation erschien daher zunächst gut vorstellbar.

Für die Untersuchung einer solchen möglichen astrozytären Beteiligung wurden transgene Mäuse mit einem durch Tamoxifen induzierbaren Knockout des P2Y₁Rs in Astrozyten verwendet. Die Deletion des P2Y₁-Gens basierte auf dem Cre/loxP-System: In den KO-Tieren war also das für P2Y₁ kodierende Gen von zwei loxP-Sequenzen flankiert und das Genom enthielt zusätzlich die Sequenz der CreERT2, einer durch Tamoxifenbindung aktivierbaren Cre-Rekombinase, unter der Kontrolle des Glast-Promotors.

Bei Durchführung des ATP *uncaging* in diesen astrozytären P2Y₁R-KO-Mäusen konnte in dieser Arbeit im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Reduktion des Integrals der induzierten Mitralzelldepolarisation gezeigt werden. Eine astrozytäre Beteiligung an den Mechanismen, die zu der beschriebenen indirekt vermittelten, P2Y₁-abhängigen Mitralzelldepolarisation führen, konnte in den Versuchen dieser Arbeit also nicht belegt werden.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse müssen jedoch einige Aspekte berücksichtigt werden. Zunächst muss die Zahl der gemessenen Zellen beachtet werden. Bei diesen Versuchen umfasste die Kontrollgruppe lediglich 4 gemessene Zellen, was in diesem Fall

u.a. auf durch die Versuchstierzucht bedingte Faktoren zurückzuführen war. Diese sehr geringe *n*-Zahl in Kombination mit der im Rahmen der ATP *uncaging* Versuche allgemein beobachteten großen Streuung der Ergebnisse erschwert das Herausarbeiten kleinerer potentieller Unterschiede zwischen den Gruppen.

Darüber hinaus müssen auch die verwendeten astrozytären P2Y₁R-KO-Tiere genauer betrachtet werden.

In den *Bulbus olfactorius* wandern auch im adulten Zustand im Rahmen der adulten Neurogenese kontinuierlich Neurone aus der Ventrikular-Subventrikularzone ein (Lim and Alvarez-Buylla, 2016). Neurale Stammzellen in der Ventrikular-Subventrikularzone, die sogenannten Typ B1 Zellen, exprimieren ebenfalls Glast (Lim and Alvarez-Buylla, 2016). Dies musste in dieser Arbeit bei der Verwendung des Glast-Promotors zur Induktion eines astrozytenspezifischen Knockouts im *Bulbus olfactorius* beachtet werden. Nach der stufenweisen Entwicklung von Neuroblasten aus den neuralen Stammzellen benötigen diese Neuroblasten etwa 5-9 Tage, um entlang des rostralen Migrationsstroms in den *Bulbus olfactorius* einzuwandern (Chen *et al.*, 2023). Hier werden einige der Neurone aus der adulten Neurogenese zu juxtaglomerulären Zellen innerhalb der Glomerularschicht (Nagayama, Homma and Imamura, 2014) und damit der Schicht, in der im Rahmen dieser Arbeit das ATP *uncaging* durchgeführt wurde. Weitaus größer ist der Anteil von Neuronen aus der adulten Neurogenese jedoch innerhalb der Körnerzellschicht (Nagayama, Homma and Imamura, 2014). Bei der Wahl des Zeitintervalls zwischen Tamoxifeninduktion und Experiment für diese Arbeit musste also bedacht werden, dass nach einer gewissen Latenzzeit mutmaßlich nicht mehr ausschließlich Astrozyten von dem beabsichtigten P2Y₁R-KO betroffen sind, sondern mutmaßlich auch die im Rahmen der adulten Neurogenese in den *Bulbus olfactorius* eingewanderten Neurone. Auf der anderen Seite sollte in dieser Arbeit jedoch auch ausreichend Zeit für den Abbau des vor Induktion des Knockouts vorhandenen P2Y₁-Proteins in Astrozyten zur Verfügung stehen. Beide Faktoren mussten also berücksichtigt und gegeneinander abgewogen werden. In dieser Arbeit erfolgten die Versuche 3-6 Wochen nach Tamoxifenapplikation.

Darüber hinaus ist zudem bekannt, dass es in Glast-CreERT2-Mäusen auch ohne Tamoxifeninjektion in einem gewissen Umfang zu einer Rekombination kommt (Kasakow, 2018).

Eine zentrale Frage für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit ist zudem, wie groß der Anteil der Astrozyten in Glast-CreERT2-Mäusen ist, in denen durch dieses System ein P2Y₁R-KO induziert werden kann. Eine Arbeit, in der Astrozyten mittels *magnetic activated cell sorting* (MACS) isoliert wurden, konnte zeigen, dass bei Untersuchung 3 Wochen nach Tamoxifeninjektion die Anzahl der die loxP-Sequenz tragenden („geflochten“) P2Y₁-Allele auf DNA-Ebene im Cortex auf 40% der Kontrollgruppe und im Cerebellum auf 70% der Kontrollgruppe reduziert war (Kasakow, 2018). Auf mRNA-Ebene zeigte sich jeweils etwa eine 50%ige Reduktion der die loxP-Sequenz tragenden P2Y₁-Allele (Kasakow, 2018). Auch wenn diese Daten keine konkreten Informationen in Bezug auf den in dieser Arbeit untersuchten *Bulbus olfactorius* liefern, so zeigen sie doch, dass auch nach Induktion des KOs eine relevante Anzahl gefloxter P2Y₁-Allele in Astrozyten verbleibt. Diese unvollständige Rekombination in Kombination mit der großen Streuung der Ergebnisse im Rahmen der ATP *uncaging* Versuche sowie der geringen Stichprobenzahl der Patchclamp-Experimente lässt die Frage aufkommen, inwieweit die Versuchsbedingungen eine zuverlässige Untersuchung potentieller Effekte zuließen.

Insgesamt lässt sich also sagen, dass die in dieser Arbeit verwendeten Glast-CreERT2-Mäuse einige Unsicherheiten und Schwierigkeiten aufweisen. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten konnten zwar keine astrozytäre Beteiligung an der indirekten, P2Y₁-abhängigen Vermittlung der untersuchten ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation zeigen, aufgrund der oben beschriebenen Problematiken hinsichtlich der verwendeten astrozytären P2Y₁R-KO-Mäuse lässt sich eine solche allein anhand dieser Daten jedoch auch nicht sicher ausschließen.

5.2.2 ATP *uncaging* in neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen

Auch die Rolle neuronaler Zellpopulationen in der indirekten, P2Y₁-abhängigen Vermittlung der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation sollte in dieser Arbeit evaluiert werden. Hierfür wurden die oben beschriebenen neuronalen P2Y₁R-KO-Mäuse verwendet. Diese basierten ebenfalls auf dem Cre/loxP-System, d.h. das für P2Y₁ kodierende Gen wurde von zwei loxP-Sequenzen flankiert. Die Cre-Expression erfolgte hier unter Kontrolle des Eno2-Promotors.

Die Versuche dieser Arbeit konnten zeigen, dass in diesen neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen das Integral (AUC) der durch ATP *uncaging* induzierten Mitralzelldepolarisation signifikant reduziert ist. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung neuronaler Zellpopulationen an der Vermittlung der P2Y₁-abhängigen ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation. In Einklang hiermit zeigten sich in anderen Daten unseres Labors Hinweise auf eine Subpopulation juxtaglomerulärer Neurone, die in dieser Hinsicht relevant sein könnten (Schulz, 2018).

Zwar lag in den neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Reduktion vor, allerdings konnte im Durchschnitt auch in den neuronalen P2Y₁R-KO-Tieren noch eine Mitralzelldepolarisation durch ATP-Photolyse im Bereich des zugehörigen Glomerulus induziert werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass neben P2Y₁-tragenden Neuronen auch andere P2Y₁-exprimierende Zellpopulationen in Teilen an der Vermittlung der Mitralzelldepolarisation beteiligt sein könnten. Eine Möglichkeit wären in dieser Hinsicht beispielsweise die oben bereits diskutierten Astrozyten. Auch eine zusätzliche Beteiligung anderer Subtypen der P2-Rezeptorfamilie wäre denkbar.

Im Anschluss sollte in der vorliegenden Arbeit auch der Effekt des P2Y₁-Rezeptorantagonisten MRS2179 auf das Integral (AUC) der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation in neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen und einer entsprechenden Kontrollgruppe untersucht werden.

Die unter Standardbedingungen beobachtete Reduktion des Depolarisationsintegrals in neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen sowie die in unserem Labor bereits erhobenen Vordaten (Schulz, 2018) legten die Erwartung nahe, durch die Applikation von MRS2179 in der Kontrollgruppe im Gegensatz zum neuronalen P2Y₁R-KO eine signifikante Reduktion des Depolarisationsintegrals (AUC) erreichen zu können, die nach Auswaschen des Rezeptorantagonisten reversibel ist. Entgegen der Erwartungen konnte jedoch weder in der Kontrollgruppe noch im neuronalen P2Y₁R-KO eine signifikante Reduktion des Depolarisationsintegrals durch die Applikation von MRS2179 erreicht werden.

Eine potentielle Erklärung hierfür könnte in der sehr geringen *n*-Zahl dieser Messungen begründet liegen. Gemessen wurden hier lediglich 5 Zellen in der Kontrollgruppe und 6 Zellen aus neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen. In Kombination mit der oben bereits diskutierten ausgeprägten Streuung der Ergebnisse der ATP *uncaging* Versuche könnte

dies ein Grund für den fehlenden Effekt von MRS2179 auf die Mitralzelldepolarisation in der Kontrollgruppe sein.

5.2.3 ATP uncaging in transgenen 129/Sv-Mäusen mit globalem P2Y₁R-KO

Bei Durchführung der ATP *uncaging* Versuche in transgenen 129/Sv-Mäusen mit globalem P2Y₁R-KO zeigte sich unter Standardbedingungen im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Tieren mit gleichem genetischem Hintergrund kein signifikanter Unterschied in Hinblick auf die Größe des bestimmten Integrals der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation.

Diese Ergebnisse überraschten zunächst, da Vordaten aus unserem Labor deutlich die P2Y₁-Abhängigkeit der beobachteten Mitralzelldepolarisation gezeigt haben (Schulz, 2018) und auch die oben beschriebenen Daten aus den neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen für eine wichtige Rolle des P2Y₁Rs sprechen. Diese widersprüchlichen Ergebnisse sollten in künftigen Experimenten kritisch analysiert werden. Es gibt mehrere mögliche Begründungen, die die vermeintliche Widersprüchlichkeit dieser Daten zu den bestehenden Vordaten (Schulz, 2018) erklären könnten.

Eine mögliche Erklärung könnte beispielsweise in dem verwendeten Mausstamm begründet liegen. Während alle anderen Experimente dieser Arbeit entweder in C57Bl/6-Wildtyp-Tieren oder in transgenen Mauslinien auf Hintergrund dieses Stammes durchgeführt wurden, handelte es sich bei den globalen P2Y₁R-KO-Mäusen um eine transgene Linie auf dem Hintergrund des Stammes 129/Sv. Bereits vor vielen Jahren konnten Studien Unterschiede in der Genexpression im Zentralen Nervensystem zwischen C57Bl/6-Mäusen und 129SvEv-Mäusen zeigen (Sandberg *et al.*, 2000; Pavlidis and Noble, 2001). Darüber hinaus konnten auch Hinweise auf Unterschiede in der olfaktorischen Sensitivität zwischen C57Bl/6-Mäusen und 129/S1-Tieren beobachtet werden (Lee *et al.*, 2003). Vergleichende Daten zwischen C57Bl/6- und 129/Sv-Mäusen, die sich konkret auf elektrophysiologische Versuche im *Bulbus olfactorius* oder die dortige Purinrezeptorexpression beziehen, lassen sich allerdings nicht finden.

Eine in künftigen Experimenten zu untersuchende Möglichkeit wäre beispielsweise ein Unterschied in der Expression der verschiedenen Purinrezeptorsubtypen zwischen C57Bl/6- und 129/Sv-Mäusen im *Bulbus olfactorius*. Dies könnte dazu führen, dass die

nach ATP-Photolyse beobachtete Mitralzelldepolarisation in 129/Sv-Mäusen primär von einem anderen P2-Rezeptorsubtyp abhängt als in C57Bl/6-Mäusen.

Eine andere mögliche Erklärung der fehlenden Reduktion der Mitralzelldepolarisation in den globalen P2Y₁R-KO-Mäusen könnte in einer kompensatorischen Hochregulation anderer P2Y-Rezeptorsubtypen begründet liegen, die die Funktion des in diesen Tieren konstitutiv global fehlenden P2Y₁-Rezeptors übernehmen. Auch dies ist eine Hypothese, die in weiteren Versuchen untersucht werden sollte.

Bei Testung des Effekts von MRS2179, einem P2Y₁R-Antagonisten, auf die beobachtete Mitralzelldepolarisation in den transgenen 129/Sv-Mäusen mit globalem P2Y₁R-KO konnte in dieser Arbeit weder in der Kontrollgruppe noch in der KO-Gruppe eine signifikante Reduktion der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation durch MRS2179 beobachtet werden.

Wie auch in den oben beschriebenen analogen Versuchen in den neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen muss auch hier bei Interpretation dieser Ergebnisse die geringe *n*-Zahl beachtet werden. Gemessen wurden in diesem Fall lediglich jeweils 5 Zellen in der Kontrollgruppe und im globalen P2Y₁R-KO.

Auch für den fehlenden Effekt von MRS2179 in der Kontrollgruppe dieser Versuche könnte der oben bereits diskutierte mögliche Unterschied durch Verwendung eines anderen Mausstammes eine mögliche Erklärung darstellen. Auch dies sollte in weiterführenden Versuchen kritisch untersucht werden.

5.2.4 Beteiligung glutamaterger Mechanismen an der indirekten Vermittlung der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation

Aus Vordaten unseres Labors war bereits bekannt, dass die nach ATP-Photolyse in Mitralzellen beobachtete Depolarisation indirekt über P2Y₁-abhängige Mechanismen vermittelt wird (Schulz, 2018). Die aus diesen Daten abgeleitete und den Experimenten dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese war also, dass P2Y₁-exprimierende Zellen durch das nach der Photolyse zur Verfügung stehende ATP und dessen Abbauprodukt ADP aktiviert werden und diese Aktivierung anschließend auf die abgeleitete Mitralzelle übertragen. Während die oben diskutierten Versuche in neuronalen P2Y₁R-KO-Mäusen bereits nahelegen, dass P2Y₁R-exprimierende Neuronenpopulationen an diesen Mechanismen beteiligt sind, bleibt die Frage bestehen, über welche Neurotransmitter

die Übertragung der Aktivierung auf die Mitralzellen erfolgt. Diese Arbeit sollte daher die Beteiligung glutamaterger Mechanismen an der Vermittlung der untersuchten Mitralzelldepolarisation evaluieren.

In einer Kohorte aus C57Bl/6-Wildtyp-Tieren zeigte sich nach Applikation der Glutamaterezeptorantagonisten NBQX, D-APV und CPCCOEt eine Reduktion des nach ATP-Photolyse gemessenen Depolarisationsintegrals (AUC) im Vergleich zur Kontrollphotolyse unter Standardbedingungen. Der glutamatabhängige Anteil betrug im Durchschnitt 65.7%. Diese Ergebnisse sprechen für eine relevante Beteiligung von Glutamat an der Übertragung der ATP-induzierten Aktivierung auf Mitralzellen.

In Kombination mit den oben beschriebenen Daten der Versuche in neuronalen P2Y₁R-KO-Tieren könnte hieraus als naheliegende Hypothese eine ATP-induzierte, P2Y₁-rezeptorvermittelte Glutamatfreisetzung aus einer neuronalen Subpopulation abgeleitet werden.

Trotz des großen Einflusses der applizierten Glutamaterezeptorantagonisten war auch nach glutamaterger Inhibition im Durchschnitt noch eine relevante ATP-induzierte Depolarisation in den abgeleiteten Mitralzellen zu beobachten. Es wäre daher gut denkbar, dass neben glutamatergen Mechanismen auch andere Neurotransmitter eine Rolle in der Vermittlung der beobachteten Mitralzelldepolarisation spielen. Die Identifikation solcher beteiligter Neurotransmitter scheint jedoch schwierig zu sein. Im Rahmen anderer Experimente unseres Labors wurde bereits der Einfluss verschiedener Rezeptorantagonisten auf die ATP-induzierte Mitralzelldepolarisation untersucht (Schulz, 2018). Verwendet wurden in diesem Rahmen u.a. Antagonisten gegen Subtypen dopaminerger, serotonerger, histaminerger, noradrenerger und acetylcholinерger Rezeptoren (Schulz, 2018). Hier konnte jedoch keine signifikante Reduktion der Mitralzelldepolarisation durch die verwendeten Rezeptorantagonisten festgestellt werden (Schulz, 2018). Lediglich die Applikation von Carbenoxolon, einem Hemikanalblocker, führte zu einer signifikanten Reduktion der Mitralzelldepolarisation (Schulz, 2018). Auch hier konnte jedoch weiterhin eine relevante Mitralzelldepolarisation beobachtet werden (Schulz, 2018). Es könnte also gut sein, dass Hemikanäle gemeinsam mit glutamatergen Mechanismen an der Vermittlung der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation beteiligt sind. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass

darüber hinaus weitere Mechanismen eine Rolle spielen, die bisher nicht identifiziert werden konnten. Hierfür sind weitere Versuche erforderlich.

Die in diesen Versuchen nachfolgend zusätzlich zu den Glutamatrezeptorantagonisten erfolgte Applikation von TTX führte zu einer weiteren deutlichen Reduktion der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation auf ca. 15% des in der Kontrollapplikation unter Standardbedingungen gemessenen Wertes. Durch die Blockade spannungsgesteuerter Natriumionenkanäle blockiert TTX in Neuronen die Auslösung von Aktionspotentialen. Die deutliche Reduktion der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation in TTX belegt also die starke Abhängigkeit der ausgelösten Depolarisation von der Aktivität vorgeschalteter Neurone. Dies unterstützt die in Vordaten (Schulz, 2018) bereits nahegelegte indirekte Vermittlung der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation.

Jedoch kann auch in TTX in den meisten abgeleiteten Mitralzellen noch eine geringe Restdepolarisation beobachtet werden. Die Vermittlung dieser verbliebenen Depolarisation sollte in weiteren Versuchen analysiert werden. Denkbar wäre beispielsweise eine geringgradige direkte Aktivierung der Mitralzelle durch das freigesetzte ATP. Diese könnte beispielsweise über eine mögliche geringgradige Expression des P2Y₁-Rezeptors oder eines anderen Subtyps der P2Y-Familie auf Mitralzellen vermittelt werden. Dies muss jedoch in weiteren Versuchen untersucht werden.

5.3 Die Veränderung P2Y₁-rezeptorabhängiger Signalwege im *Bulbus olfactorius* in der Neuroinflammation

Neben der Untersuchung der Mechanismen, die unter physiologischen Bedingungen an der Vermittlung der ATP-induzierten, P2Y₁-abhängigen Mitralzelldepolarisation beteiligt sind, lag der Fokus dieser Arbeit auch auf der Untersuchung der Veränderung dieser P2Y₁-rezeptorabhängigen Signalwege unter neuroinflammatorischen Bedingungen. Als Modell wurde für diese Versuche die Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis (EAE), ein Tiermodell der Multiplen Sklerose, in ihrer akuten und chronischen Phase verwendet.

Bei Verwendung dieses Modells im Rahmen der ATP *uncaging* Versuche und der Interpretation der Ergebnisse sollten einige Aspekte berücksichtigt werden.

Eine Beteiligung der Mitralzellen des *Bulbus olfactorius* im Rahmen der EAE ist belegt. So zeigten sich in einer Arbeit mittels *RNA sequencing* beispielsweise Veränderungen der Expression verschiedener Ionenkanäle in Mitralzellen im Rahmen der akuten EAE (Schubert *et al.*, 2025).

Darüber hinaus zeigen die in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen der Strom-Spannungs-Kennlinie von Mitralzellen in der akuten EAE den Einfluss der Neuroinflammation auf die Mitralzellpopulation auch auf funktioneller Ebene.

Neben diesen zellulären Veränderungen konnte in der oben bereits genannten Arbeit mittels *RNA sequencing* auch eine Reduktion der Zellzahl in 2 von 3 Mitralzellclustern im Rahmen der akuten EAE beobachtet werden (Schubert *et al.*, 2025). Auch immunhistochemisch zeigte sich eine Reduktion Reelin-positiver Zellen innerhalb der Mitralzellschicht im Rahmen der akuten und auch der chronischen EAE (Schubert *et al.*, 2025).

Insgesamt legen diese Daten also eine Schädigung von Mitralzellen im Rahmen der EAE nahe. Bei Verwendung akuter Hirnschnitte aus EAE-Tieren für Patchclamp-Versuche sollte daher aber auch die Möglichkeit einer Selektion weniger stark von der Neuroinflammation betroffener Mitralzellen im Rahmen des Präparationsprozesses und der anschließenden Lagerung bis zum Versuch in Betracht gezogen werden, da es in diesem Rahmen möglicherweise zu einem vermehrten Zelltod von durch die EAE vorgeschädigten Mitralzellen kommen könnte. Zudem sind stabile Patchclamp-Ableitungen nur bei ausreichender Zellvitalität und Membranintegrität möglich, sodass durch die angewendete Messtechnik ein *bias* zugunsten vitaler Zellen besteht. Dies könnte in der Folge potentiell zu einer Unterschätzung möglicher Effekte der Neuroinflammation auf die untersuchten elektrophysiologischen Eigenschaften führen. In dieser Arbeit konnte bei Durchführung der *ATP uncaging* Versuche unter Standardbedingungen sowohl in der akuten als auch in der chronischen EAE keine signifikante quantitative Veränderung des Depolarisationsintegrals (AUC) im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe beobachtet werden.

Bei Bestimmung des glutamatabhängigen Anteils der Mitralzelldepolarisation zeigte sich jedoch eine signifikante Reduktion in der chronischen EAE im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. In der akuten EAE dagegen konnten in dieser Arbeit keine diesbezüglichen Veränderungen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse sind besonders interessant, da die durch erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentrationen bedingte Exzitotoxizität einen wichtigen Pathomechanismus der Neurodegeneration in der Multiplen Sklerose darstellt (Woo, Engler and Fries, 2024).

Frühere Arbeiten konnten bereits eine Interaktion der glutamatinduzierten Exzitotoxizität mit P2Y₁-abhängigen Signalwegen zeigen (Simões *et al.*, 2018; Xiong *et al.*, 2022). Die Ergebnisse dieser Studien in Hinblick auf die Rolle des P2Y₁-Rezeptors im Rahmen der glutamatinduzierten Exzitotoxizität waren hierbei jedoch nicht einheitlich. Während sich auf der einen Seite in Zellkulturversuchen eine neuroprotektive Funktion des Rezeptors zeigte (Xiong *et al.*, 2022), konnte in einer anderen Arbeit im Rahmen von *in vitro* sowie *in vivo* Versuchen eine Exazerbation des glutamatinduzierten neuronalen Zelltods durch Aktivierung des P2Y₁-Rezeptors beobachtet werden (Simões *et al.*, 2018). Diese Ergebnisse zeigen, wie komplex die Rolle des P2Y₁-Rezeptors im Rahmen der glutamatinduzierten Exzitotoxizität ist. Um diese zukünftig besser verstehen zu können, werden weitere Forschungsarbeiten benötigt.

Diese Arbeit konnte die Veränderung der Interaktion glutamaterger und P2Y₁-abhängiger Signalwege im *Bulbus olfactorius* im Rahmen der EAE beschreiben und hiermit einen kleinen Baustein zum besseren Verständnis der komplexen Zusammenhänge dieser beiden Signalwege unter pathologischen Bedingungen beitragen.

Auffallend ist, dass die beschriebenen Veränderungen der glutamatabhängigen Komponente der P2Y₁-rezeptorvermittelten Mitralzelldepolarisation in der EAE ausschließlich in der chronischen Phase der Erkrankung beobachtet werden konnte, während sich in der akuten EAE kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zeigte. Dies weist darauf hin, dass die beobachteten Veränderungen vermutlich erst mit einer gewissen Latenzzeit zum Erkrankungsbeginn auftreten.

5.4 Verwendung primärer Neuronenkulturen des *Bulbus olfactorius* zur Untersuchung P2Y₁-rezeptorvermittelter Effekte unter Stressbedingungen

In der Literatur finden sich nur wenige Informationen zu primären Neuronenkulturen des *Bulbus olfactorius*. Es war daher erforderlich diese Kulturen vor der weiteren

experimentellen Verwendung zu charakterisieren. Dies erfolgte in Form eines Vergleichs mit kortikalen primären Neuronenkulturen.

Zunächst erfolgte eine Quantifizierung der in den Kulturen enthaltenen Astrozyten. Diesbezüglich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen kortikalen Kulturen und Kulturen des *Bulbus olfactorius*. In beiden Fällen lag das Verhältnis von Astrozyten zu Neuronen bei etwas mehr als 1:3.

Die Analyse verschiedener neuronaler Marker ergab einige signifikante Unterschiede zwischen Kulturen des *Bulbus olfactorius* und kortikalen Kulturen.

Die Analyse von Reelin zeigte eine signifikante Erhöhung der Expression in Kulturen des *Bulbus olfactorius* gegenüber kortikalen Kulturen. Im *Bulbus olfactorius* werden durch Reelinantikörper Mitralzellen in der Mitralzellschicht sowie *tufted* Zellen innerhalb und angrenzend an die Glomerularschicht angefärbt (Schubert *et al.*, 2025). Im Embryonalstadium E16 zeigt sich im *Bulbus olfactorius* eine starke Expression von Reelin in Mitralzellen (Alcántara *et al.*, 1998). Es liegt also nahe, dass Reelin-positive Zellen innerhalb der primären Neuronenkulturen des *Bulbus olfactorius* ebenfalls diese Zellpopulationen repräsentieren. Die Beobachtung einer signifikanten Erhöhung Reelin-positiver Zellen gegenüber kortikalen Kulturen ist daher nicht überraschend.

Im Gegensatz hierzu zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der Zahl Doublecortin-positiver Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen primären Neuronenkulturen des *Bulbus olfactorius* im Vergleich zu kortikalen Kulturen. Jedoch konnte eine statistisch nicht signifikante Tendenz in Richtung einer höheren Anzahl Doublecortin-positiver Zellen in Kulturen des *Bulbus olfactorius* beobachtet werden. Im adulten *Bulbus olfactorius* ist Doublecortin ein Marker unreifer Neurone, die aus der Subventrikularzone in den *Bulbus olfactorius* einwandern (Schubert *et al.*, 2025). Allerdings wird Doublecortin bis mindestens zum Stadium E17 auch im Rahmen der neokortikalen Entwicklung exprimiert (Boekhorn, Karin, Sarabdjitsingh *et al.*, 2008). Bei Präparation im Stadium E16.5 ist eine Expression von DCX sowohl in kortikalen Primärneuronen als auch in Kulturen des *Bulbus olfactorius* daher nicht überraschend.

In Hinblick auf die Zahl Calretinin- und Calbindin-positiver Neurone konnten in dieser Arbeit signifikante Unterschiede zwischen primären Neuronenkulturen des *Bulbus olfactorius* und kortikalen Kulturen beobachtet werden. Die Zahl Calbindin-positiver Neurone zeigte sich hierbei in Kulturen des *Bulbus olfactorius* signifikant niedriger als in

Kulturen des Cortex, während die Zahl Calretinin-positiver Neurone in Primärneuronen des *Bulbus olfactorius* im Vergleich zu kortikalen Kulturen signifikant erhöht war. Im *Bulbus olfactorius* werden Calbindin und Calretinin jeweils in einer Subpopulation periglomerulärer Neurone exprimiert (Nagayama, Homma and Imamura, 2014). Hierbei machen Calretinin-positive Neurone etwa 30-44% der periglomerulären Neurone aus, Calbindin dagegen lediglich etwa 9.8-15% (Nagayama, Homma and Imamura, 2014).

Auch in Bezug auf die Tyrosinhydroxylase-positiver Neurone zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen primären Neuronenkulturen des *Bulbus olfactorius* und kortikalen Kulturen. Während in Primärneuronen des *Bulbus olfactorius* ein geringer Anteil Tyrosinhydroxylase-positiver Zellen beobachtet werden konnte, zeigte sich in den analysierten Ausschnitten kortikaler Kulturen keine spezifische Anfärbung von Neuronen durch einen Antikörper gegen die Tyrosinhydroxylase. Wie Calbindin und Calretinin wird auch die Tyrosinhydroxylase im *Bulbus olfactorius* in einer Subpopulation periglomerulärer Neurone exprimiert (Nagayama, Homma and Imamura, 2014). Diese machen etwa 12.6-20% der periglomerulären Neurone aus (Nagayama, Homma and Imamura, 2014). Darüber hinaus exprimiert im *Bulbus olfactorius* auch eine Subpopulation superfizieller *short axon* Zellen die Tyrosinhydroxylase (Nagayama, Homma and Imamura, 2014). Die Tyrosinhydroxylase-positiven Neurone des *Bulbus olfactorius* können den Neurotransmitter Dopamin freisetzen (Nagayama, Homma and Imamura, 2014).

Insgesamt konnte diese Arbeit die in der Literatur bisher nur wenig beschriebene Zusammensetzung primärer Neuronenkulturen des *Bulbus olfactorius* näher beschreiben und dabei einige signifikante Unterschiede zu kortikalen Primärneuronen feststellen.

Diese primären Neuronenkulturen des *Bulbus olfactorius* wurden im Anschluss verwendet, um Effekte einer P2Y₁-Rezeptorinhibition auf den intrazellulären Calciumanstieg im Rahmen eines Glutamatstressmodells zu untersuchen. Hier zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Applikation des P2Y₁-Rezeptorantagonisten MRS2179.

Bei Durchführung der Experimente ergaben sich einige Herausforderungen. Zuerst konnte beobachtet werden, dass die Reaktion der verschiedenen Kulturen auf die

Stressinduktion durch Glutamatapplikation stark variierte. In dieser Arbeit wurden zur Stressinduktion 50µM Glutamat verwendet. Diese Dosierung basierte auf vorab durchgeführten Testungen. Dennoch zeigte sich eine große Streuung der durch diese Dosierung verursachten intrazellulären Calciumerhöhung. Ein Grund hierfür könnten beispielsweise die in der Kultur enthaltenen Astrozyten sein. Wie die oben beschriebenen immuncytochemischen Färbungen zeigen konnten, enthielten die Kulturen des *Bulbus olfactorius* im Durchschnitt 0.367 Astrozyten pro MAP2-positivem Neuron. Es konnte jedoch auch beobachtet werden, dass dies in den analysierten Bioreplikaten mit Werten zwischen 0.219 und 0.607 erheblich schwankte. Astrozyten spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der Glutamathomöostase und können über die Glutamattransporter *excitatory amino acid transporter 1* (EAAT1, Glast) und *excitatory amino acid transporter 2* (EAAT2) Glutamat aus dem Extrazellulärraum aufnehmen (Duan *et al.*, 1999; Anderson and Swanson, 2000; Lee, Wheeler and Quintana, 2022). Die Variabilität der relativen Astrozytenzahl in den primären Neuronenkulturen des *Bulbus olfactorius* könnte daher eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede in der Toleranz der Kulturen gegenüber Glutamat darstellen.

Hinzu kommt außerdem, dass auch die Expression der in der Immuncytochemie analysierten neuronalen Marker teilweise eine erhebliche Streuung zwischen den verschiedenen Bioreplikaten aufwiesen. Diese Heterogenität der Kulturen könnte ebenfalls ein potentieller Faktor sein, der zu Unterschieden in Hinblick auf die Reaktion der Kulturen auf die Glutamatapplikation beitragen könnte.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass diese Arbeit in den durchgeführten *calcium imaging* Versuchen weder einen neuroprotektiven noch einen neurodegenerativen Effekt einer P2Y₁-Rezeptorinhibition im Rahmen eines Glutamatstressmodells feststellen konnte. Aufgrund der oben beschriebenen Aspekte lässt sich ein solcher allein auf Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente jedoch auch nicht sicher ausschließen und sollte daher in weiteren Versuchen erneut untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Die letzten Jahrzehnte haben gezeigt, dass extrazelluläres ATP und seine Abbauprodukte im *Bulbus olfactorius* als Neurotransmitter fungieren und hierbei wichtige Funktionen übernehmen. Diese extrazellulären Nukleotide entfalten ihre Wirkung über die Bindung an purinerge Rezeptoren wie z.B. den metabotropen P2Y₁-Rezeptor. In der Vergangenheit konnte zudem beobachtet werden, dass verschiedene ZNS-Pathologien mit krankheitsassoziierten Veränderungen purinerger Signalwege einhergehen.

In elektrophysiologischen Untersuchungen an Mitralzellen, Projektionsneuronen des *Bulbus olfactorius*, untersuchte diese Arbeit daher zum einen die Mechanismen P2Y₁-vermittelter Signalwege unter physiologischen Bedingungen sowie zum anderen deren Veränderung in der Experimentellen Autoimmunen Zephalomyelitis, einem Tiermodell der Multiplen Sklerose. Es konnte gezeigt werden, dass die lokale photolytische ATP-Freisetzung im zugehörigen Glomerulus zu einer Depolarisation in der abgeleiteten Mitralzelle führt, die mutmaßlich durch eine neuronale Subpopulation P2Y₁-exprimierender Zellen indirekt vermittelt wird. Diese Vermittlung ist teilweise glutamatabhängig. In der chronischen EAE konnte im Gegensatz zur akuten EAE eine Reduktion der glutamatabhängigen Komponente der ATP-induzierten Mitralzelldepolarisation beobachtet werden.

Um die beobachteten Veränderungen P2Y₁-rezeptorvermittelter Signalwege unter pathologischen Bedingungen weiter zu analysieren, wurden primäre Neuronenkulturen des *Bulbus olfactorius* hergestellt. Diese wiesen im Rahmen der durchgeführten Charakterisierung einige signifikante Unterschiede zu kortikalen Primärneuronen auf. Im Rahmen von *calcium imaging* Experimenten wurden diese Kulturen des *Bulbus olfactorius* glutamatinduziertem Stress ausgesetzt. Die vorherige Applikation des P2Y₁-Rezeptorantagonisten MRS2179 zeigte keinen Einfluss auf den glutamatinduzierten intrazellulären Calciumanstieg der Primärneurone.

Insgesamt konnte diese Arbeit einen kleinen Teil zum Verständnis der komplexen Vermittlung P2Y₁-abhängiger Signalwege im *Bulbus olfactorius* unter physiologischen Bedingungen beitragen und zeigen, dass die Interaktion glutamaterger und P2Y₁-abhängiger Mechanismen in der chronischen EAE verändert ist. Dies sollte zukünftig weiter untersucht werden, um die Bedeutung dieser Beobachtung im Rahmen der Pathophysiologie neuroinflammatorischer Erkrankungen besser verstehen zu können.

7 Summary

The past decades have shown that ATP and the products of its degradation exert important functions as neurotransmitters in the olfactory bulb. These extracellular nucleotides act on purinergic receptors one of which is the metabotropic P2Y₁ receptor. In addition to that, it has also been observed that some pathological conditions of the Central Nervous System are associated with changes in purinergic signalling pathways. Therefore, this thesis analysed P2Y₁ receptor mediated effects under healthy conditions as well as their changes during experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis, in electrophysiological recordings of mitral cells, the main output neurons of the olfactory bulb.

It could be shown that the local laser induced release of ATP in the associated glomerulus leads to a depolarisation in mitral cells, which is presumably indirectly mediated by a subpopulation of P2Y₁ receptor expressing neurons. The mediation partly depends on glutamate. In contrast to acute EAE, chronic EAE was associated with a decrease of the glutamate-dependent component of the ATP-induced mitral cell depolarisation.

In order to further investigate the observed changes in P2Y₁ receptor mediated pathways under pathological conditions, primary neuronal cultures of the olfactory bulb were prepared. Comparing these olfactory bulb cultures to primary neurons of the cortex significant differences could be shown. During calcium imaging experiments these olfactory bulb cultures were exposed to glutamate-induced neuronal stress. The previous application of the P2Y₁ receptor antagonist MRS2179 did not lead to changes in the glutamate-induced rise of intracellular calcium in the primary neurons.

All in all, this thesis was able to contribute a small part to the understanding of the complex P2Y₁ receptor dependent pathways in the olfactory bulb under healthy conditions and could show that the interaction of glutamatergic and P2Y₁ dependent mechanisms are altered during chronic EAE. Further experiments should be conducted in order to improve the understanding of the relevance of these findings in context of the pathophysiology of neuroinflammatory conditions.

8 Literaturverzeichnis

- Abbracchio, M. P. *et al.* (2009) 'Purinergic signalling in the nervous system: an overview', *Trends in Neurosciences*, 32(1), pp. 19–29. doi: 10.1016/j.tins.2008.10.001.
- Agresti, C. *et al.* (2005) 'ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors', *Brain Research Reviews*, 48(2), pp. 157–165. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.12.005.
- Alcántara, S. *et al.* (1998) 'Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse', *The Journal of Neuroscience*, 18(19), pp. 7779–7799. doi: 10.1523/jneurosci.18-19-07779.1998.
- Anderson, C. M. and Swanson, R. A. (2000) 'Astrocyte Glutamate Transport: Review of Properties, Regulation, and Physiological Functions', *Glia*, 32(1), pp. 1–14. doi: 10.1002/1098-1136(200010)32:1<1::AID-GLIA10>3.0.CO;2-W.
- Attfield, K. E. *et al.* (2022) 'The immunology of multiple sclerosis', *Nature Reviews Immunology*, 22, pp. 734–750. doi: 10.1038/s41577-022-00718-z.
- Baxter, A. G. (2007) 'The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis', *Nature Reviews Immunology*, 7, pp. 904–912. doi: 10.1038/nri2190.
- Bittner, S. *et al.* (2014) 'Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG35-55) Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 Mice', *Journal of Visualized Experiments*, (86), e51275. doi: 10.3791/51275.
- Bjornevik, K. *et al.* (2022) 'Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis', *Science*, 375, pp. 296–301. doi: 10.1126/science.abj8222.
- Boekhorn, Karin, Sarabdjitsingh, A. *et al.* (2008) 'Doublecortin (DCX) and Doublecortin-Like (DCL) Are Differentially Expressed in the Early But Not Late Stages of Murine Neocortical Development', *The Journal of Comparative Neurology*, 507, pp. 1639–1652. doi: 10.1002/cne.21646.
- Borea, P. A. *et al.* (2018) 'Pharmacology of adenosine receptors: The state of the art', *Physiological Reviews*, 98, pp. 1591–1625. doi: 10.1152/physrev.00049.2017.
- Bowser, D. N. and Khakh, B. S. (2007) 'Vesicular ATP Is the Predominant Cause of Intercellular Calcium Waves in Astrocytes', *The Journal of General Physiology*, 129(6), pp. 485–491. doi: 10.1085/jgp.200709780.
- Burnstock, G. (2007) 'Purine and pyrimidine receptors', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, pp. 1471–1483. doi: 10.1007/s00018-007-6497-0.
- Burnstock, G. (2008) 'Purinergic signalling and disorders of the central nervous system', *Nature Reviews Drug Discovery*, 7, pp. 575–590. doi: 10.1038/nrd2605.
- Burnstock, G. (2016) 'An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration', *Neuropharmacology*,

- 104, pp. 4–17. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.05.031.
- Burnstock, G. (2020) 'Introduction to Purinergic Signalling in the Brain', in Barańska, J. (eds) *Glioma Signaling. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1202, pp. 1–12. doi: 10.1007/978-3-030-30651-9_1.
- Chen, Y. *et al.* (2023) 'Olfactory bulb neurogenesis depending on signaling in the subventricular zone', *Cerebral Cortex*, 33, pp. 11102–11111. doi: 10.1093/cercor/bhad349.
- Chhatriwala, M. *et al.* (2004) 'Induction of Novel Agonist Selectivity for the ADP-Activated P2Y1 Receptor Versus the ADP-Activated P2Y12 and P2Y13 Receptors by Conformational Constraint of an ADP Analog', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(3), pp. 1038–1043. doi: 10.1124/jpet.104.068650.
- Choo, A. M. *et al.* (2013) 'Antagonism of purinergic signalling improves recovery from traumatic brain injury', *Brain*, 136(1), pp. 65–80. doi: 10.1093/brain/aws286.
- Compston, A. and Coles, A. (2008) 'Multiple sclerosis', *The Lancet*, 372(9648), pp. 1502–1517. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7.
- Constantinescu, C. S. *et al.* (2011) 'Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)', *British Journal of Pharmacology*, 164(4), pp. 1079–1106. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x.
- Crespo, C. *et al.* (2019) 'Cranial Pair I: The Olfactory Nerve', *The Anatomical Record*, 302, pp. 405–427. doi: 10.1002/ar.23816.
- Dedoni, S. *et al.* (2023) 'An overall view of the most common experimental models for multiple sclerosis', *Neurobiology of Disease*, 184, 106230. doi: 10.1016/j.nbd.2023.106230.
- Delekate, A. *et al.* (2014) 'Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model', *Nature Communications*, 5, 5422. doi: 10.1038/ncomms6422.
- DeLuca, G. C. *et al.* (2015) 'Olfactory Pathology in Central Nervous System Demyelinating Diseases', *Brain Pathology*, 25(5), pp. 543–551. doi: 10.1111/bpa.12209.
- Dendrou, C. A., Fugger, L. and Friese, M. A. (2015) 'Immunopathology of multiple sclerosis', *Nature Reviews Immunology*, 15, pp. 545–558. doi: 10.1038/nri3871.
- Duan, S. *et al.* (1999) 'Glutamate Induces Rapid Upregulation of Astrocyte Glutamate Transport and Cell-Surface Expression of GLAST', *The Journal of Neuroscience*, 19(23), pp. 10193–10200. doi: 10.1523/jneurosci.19-23-10193.1999.
- Dugue, A. (2025) 'The 2024 Revised McDonald Criteria: AAN 2025 Highlights', *Neurology American Medical Journal*, 2(1), pp. 26–29. doi: 10.33590/neurolamj/ZSFM1010.
- Ellis-Davies, G. C. R. (2007) 'Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology', *Nat Methods*, 4(8), pp. 619–628. doi: 10.1038/nmeth1072.

- Fabre, J.-E. *et al.* (1999) 'Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice', *Nature Medicine*, 5, pp. 1199–1202. doi: 10.1038/13522.
- Favre-Kontula, L. *et al.* (2008) 'GlialCAM, an Immunoglobulin-Like Cell Adhesion Molecule is Expressed in Glial Cells of the Central Nervous System', *Glia*, 56(6), pp. 633–645. doi: 10.1002/glia.20640.
- Fields, R. D. and Burnstock, G. (2006) 'Purinergic signalling in neuron-glia interactions', *Nature Reviews Neuroscience*, 7, pp. 423–436. doi: 10.1038/nrn1928.
- Fischer, T. *et al.* (2012) 'P2Y1 receptor activation by photolysis of caged ATP enhances neuronal network activity in the developing olfactory bulb', *Purinergic Signalling*, 8, pp. 191–198. doi: 10.1007/s11302-011-9286-z.
- Förster, D. and Reiser, G. (2015) 'Supportive or detrimental roles of P2Y receptors in brain pathology?—The two faces of P2Y receptors in stroke and neurodegeneration detected in neural cell and in animal model studies', *Purinergic Signalling*, 11, pp. 441–454. doi: 10.1007/s11302-015-9471-6.
- Fredholm, B. B. *et al.* (2001) 'International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors', *Pharmacological Reviews*, 53(4), pp. 527–552. doi: 10.1016/s0031-6997(24)01511-4.
- Glatigny, S. and Bettelli, E. (2018) 'Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS)', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8, a028977. doi: 10.1101/cshperspect.a028977.
- Hamilton, A. M. *et al.* (2019) 'Central nervous system targeted autoimmunity causes regional atrophy: a 9.4T MRI study of the EAE mouse model of Multiple Sclerosis', *Scientific Reports*, 9, 8488. doi: 10.1038/s41598-019-44682-6.
- Hemmer, B. and Gehring, K. (2024) 'Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose , Neuromyelitis-optica- Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen, S2k Leitlinie', *Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*, online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 18.06).
- Heyward, P. *et al.* (2001) 'Membrane Bistability in Olfactory Bulb Mitral Cells', *The Journal of Neuroscience*, 21(14), pp. 5311–5320. doi: 10.1523/jneurosci.21-14-05311.2001.
- Holstiege, J. *et al.* (2022) 'Trends in administrative prevalence of multiple sclerosis and utilization patterns of disease modifying drugs in Germany', *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 59, 103534. doi: 10.1016/j.msard.2022.103534.
- Huang, Z. *et al.* (2021) 'From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, 162. doi: 10.1038/s41392-021-00553-z.
- Imamura, F., Ito, A. and LaFever, B. J. (2020) 'Subpopulations of Projection Neurons in the Olfactory Bulb', *Frontiers in Neural Circuits*, 14, 561822. doi: 10.3389/fncir.2020.561822.

- Jacobson, K. A. *et al.* (2009) 'Development of selective agonists and antagonists of P2Y receptors', *Purinergic Signalling*, 5, pp. 75–89. doi: 10.1007/s11302-008-9106-2.
- Jahn, H. M. *et al.* (2018) 'Refined protocols of tamoxifen injection for inducible DNA recombination in mouse astroglia', *Scientific Reports*, 8, 5913. doi: 10.1038/s41598-018-24085-9.
- Jakovljevic, M. *et al.* (2017) 'Down-regulation of NTPDase2 and ADP-sensitive P2 Purinoceptors Correlate with Severity of Symptoms during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 333. doi: 10.3389/fncel.2017.00333.
- Joseph, A. and De Luca, G. C. (2016) 'Back on the scent: the olfactory system in CNS demyelinating diseases', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 87, pp. 1146–1154. doi: 10.1136/jnnp-2015-312600.
- Kasakow, C. V. (2018) *Astrocyte-specific gene recombination in vivo - Tamoxifen-induced and -independent recombination*. Universität des Saarlandes. Available at: <http://dx.doi.org/10.22028/D291-29948>.
- Kuboyama, K. *et al.* (2011) 'Astrocytic P2Y1 receptor is involved in the regulation of cytokine/chemokine transcription and cerebral damage in a rat model of cerebral ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(9), pp. 1930–1941. doi: 10.1038/jcbfm.2011.49.
- Kuerten, S. *et al.* (2007) 'MP4- and MOG:35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum', *Journal of Neuroimmunology*, 189, pp. 31–40. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.06.016.
- von Kügelgen, I. (2021) 'Molecular pharmacology of P2Y receptor subtypes', *Biochemical Pharmacology*, 187, 114361. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114361.
- Laketa, D. and Lavrnja, I. (2024) 'Extracellular Purine Metabolism—Potential Target in Multiple Sclerosis', *Molecular Neurobiology*, 61, pp. 8361–8386. doi: 10.1007/s12035-024-04104-9.
- Lanz, T. V. *et al.* (2022) 'Clonally Expanded B Cells in Multiple Sclerosis Bind EBV EBNA1 and GlialCAM', *Nature*, 603, pp. 321–327. doi: 10.1038/s41586-022-04432-7.
- Lee, A. W. *et al.* (2003) 'Marked differences in olfactory sensitivity and apparent speed of forebrain neuroblast migration in three inbred strains of mice', *Neuroscience*, 118, pp. 263–270. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00950-8.
- Lee, H. G., Wheeler, M. A. and Quintana, F. J. (2022) 'Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases', *Nature Reviews Drug Discovery*, 21, pp. 339–358. doi: 10.1038/s41573-022-00390-x.
- Li, H. *et al.* (2025) 'Astrocytes release ATP/ADP and glutamate in flashes via vesicular exocytosis', *Molecular Psychiatry*, 30, pp. 2475–2489. doi: 10.1038/s41380-024-02851-8.
- Lim, D. A. and Alvarez-Buylla, A. (2016) 'The Adult Ventricular–Subventricular Zone (V–SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8, a018820. doi: 10.1101/cshperspect.a018820.

- Lohr, C. *et al.* (2014) 'Purinergic neuron-glia interactions in sensory systems', *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 466, pp. 1859–1872. doi: 10.1007/s00424-014-1510-6.
- Lublin, F. D. *et al.* (2014) 'Defining the clinical course of multiple sclerosis. The 2013 revisions.', *Neurology*, 83(3), pp. 278–286. doi: 10.1212/WNL.0000000000000560.
- Lublin, F. D. and Reingold, S. C. (1996) 'Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey', *Neurology*, 46(4), pp. 907–911. doi: 10.1212/WNL.46.4.907.
- Lucassen, E. B. *et al.* (2016) 'Olfactory dysfunction in Multiple Sclerosis: A scoping review of the literature', *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 6, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.msard.2015.12.002.
- Lutterotti, A. *et al.* (2011) 'Olfactory threshold is impaired in early, active multiple sclerosis', *Multiple Sclerosis Journal*, 17(8), pp. 964–969. doi: 10.1177/1352458511399798.
- Miras-Portugal, M. T. *et al.* (2019) 'P2 receptor interaction and signalling cascades in neuroprotection', *Brain Research Bulletin*, 151(September 2018), pp. 74–83. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.12.012.
- Mori, K. and Sakano, H. (2024) 'Circuit formation and sensory perception in the mouse olfactory system', *Frontiers in Neural Circuits*, 18, 1342576. doi: 10.3389/fncir.2024.1342576.
- Moutsianas, L. *et al.* (2015) 'Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis', *Nature Genetics*, 47, pp. 1107–1113. doi: 10.1038/ng.3395.
- Nagayama, S., Homma, R. and Imamura, F. (2014) 'Neuronal organization of olfactory bulb circuits', *Frontiers in Neural Circuits*, 8, 98. doi: 10.3389/fncir.2014.00098.
- Pankratov, Y. *et al.* (2007) 'Quantal Release of ATP in Mouse Cortex', *The Journal of General Physiology*, 129(3), pp. 257–265. doi: 10.1085/jgp.200609693.
- Pavlidis, P. and Noble, W. S. (2001) 'Analysis of strain and regional variation in gene expression in mouse brain', *Genome Biology*, 2(10), p. research0042.1–0042.15. doi: 10.1186/gb-2001-2-10-research0042.
- Pierrot-Deseilligny, C. and Souberbielle, J. C. (2017) 'Vitamin D and multiple sclerosis: An update', *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 14, pp. 35–45. doi: 10.1016/j.msard.2017.03.014.
- Procaccini, C. *et al.* (2015) 'Animal models of Multiple Sclerosis', *European Journal of Pharmacology*, 759, pp. 182–191. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.042.
- Ralevic, V. and Burnstock, G. (1998) 'Receptors for Purines and Pyrimidines', *Pharmacological Reviews*, 50(3), pp. 413–492.
- Rangachari, M. and Kuchroo, V. K. (2013) 'Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology', *Journal of Autoimmunity*, 45, pp. 31–39. doi: 10.1016/j.jaut.2013.06.008.
- Reich, D. S., Lucchinetti, C. F. and Calabresi, P. A. (2018) 'Multiple Sclerosis', *New*

- England Journal of Medicine*, 378(2), pp. 169–180. doi: 10.1056/NEJMra1401483.
- Reichenbach, N. *et al.* (2018) 'P2Y1 receptor blockade normalizes network dysfunction and cognition in an Alzheimer's disease model', *Journal of Experimental Medicine*, 215(6), pp. 1649–1663. doi: 10.1084/jem.20171487.
- Rivers, T. M. and Schwentker, F. F. (1935) 'Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys', *Journal of Experimental Medicine*, 61(5), pp. 689–702. doi: 10.1084/jem.61.5.689.
- Rivers, T. M., Sprunt, D. H. and Berry, G. P. (1933) 'Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys', *Journal of Experimental Medicine*, 58(1), pp. 39–53. doi: 10.1084/jem.58.1.39.
- Robinson, A. P. *et al.* (2014) 'The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment', *Handbook of Clinical Neurology*, 122, pp. 173–189. doi: 10.1016/B978-0-444-52001-2.00008-X.
- Rodrigues, R. J., Figueira, A. S. and Marques, J. M. (2022) 'P2Y1 Receptor as a Catalyst of Brain Neurodegeneration', *NeuroSci*, 3, pp. 604–615. doi: 10.3390/neurosci3040043.
- Rotermund, N. *et al.* (2019) 'Purinergeric Signaling in the Vertebrate Olfactory System', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 112. doi: 10.3389/fncel.2019.00112.
- Roux, L. *et al.* (2015) 'Astroglial Connexin 43 Hemichannels Modulate Olfactory Bulb Slow Oscillations', *Journal of Neuroscience*, 35(46), pp. 15339–15352. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0861-15.2015.
- Sandberg, R. *et al.* (2000) 'Regional and strain-specific gene expression mapping in the adult mouse brain', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(20), pp. 11038–11043. doi: 10.1073/pnas.97.20.11038.
- Schindelin, J. *et al.* (2012) 'Fiji: An open-source platform for biological-image analysis', *Nature Methods*, 9(7), pp. 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Schröder, H., Moser, N. and Huggenberger, S. (2020) 'The Mouse Olfactory System', in *Neuroanatomy of the Mouse. An introduction*, pp. 319–331. doi: 10.1007/978-3-030-19898-5_14.
- Schubert, C. *et al.* (2025) 'Neuroinflammation causes mitral cell dysfunction and olfactory impairment in a multiple sclerosis model', *Journal of Neuroinflammation*, 22, 71. doi: 10.1186/s12974-025-03388-5.
- Schulz, K. (2018) *ATP und Adenosin als Modulatoren neuronaler Kommunikation im Bulbus olfactorius der Maus*. Universität Hamburg. Available at: <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/handle/ediss/7625>.
- Shinozaki, Y. *et al.* (2017) 'Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y1 Receptor Downregulation', *Cell Reports*, 19(6), pp. 1151–1164. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.047.
- da Silva, A. M. *et al.* (2020) 'Prognostic value of odor identification impairment in

- multiple sclerosis: 10-Years follow-up', *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 46, 102486. doi: 10.1016/j.msard.2020.102486.
- Simões, A. P. *et al.* (2018) 'Glutamate-induced and NMDA receptor-mediated neurodegeneration entails P2Y1 receptor activation', *Cell Death and Disease*, 9, 297. doi: 10.1038/s41419-018-0351-1.
- Simon, J., Webb, T. E. and Barnard, E. A. (1997) 'Distribution of [35S]dATP α S Binding Sites in the Adult Rat Neuraxis', *Neuropharmacology*, 36(9), pp. 1243–1251. doi: 10.1016/S0028-3908(97)00124-X.
- Simpson, S. *et al.* (2011) 'Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 82, pp. 1132–1141. doi: 10.1136/jnnp.2011.240432.
- Stromnes, I. M. and Goverman, J. M. (2006a) 'Active induction of experimental allergic encephalomyelitis', *Nature Protocols*, 1(4), pp. 1810–1819. doi: 10.1038/nprot.2006.285.
- Stromnes, I. M. and Goverman, J. M. (2006b) 'Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis', *Nature Protocols*, 1(4), pp. 1952–1960. doi: 10.1038/nprot.2006.284.
- Tanik, N. *et al.* (2015) 'Olfactory bulb and olfactory sulcus depths are associated with disease duration and attack frequency in multiple sclerosis patients', *Journal of the Neurological Sciences*, 358, pp. 304–307. doi: 10.1016/j.jns.2015.09.016.
- Tepe, B. *et al.* (2018) 'Single-Cell RNA-Seq of Mouse Olfactory Bulb Reveals Cellular Heterogeneity and Activity-Dependent Molecular Census of Adult-Born Neurons', *Cell Reports*, 25(10), pp. 2689–2703.e3. doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.034.
- Thompson, A. J., Banwell, B. L., *et al.* (2018) 'Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria', *The Lancet Neurology*, 17, pp. 162–173. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
- Thompson, A. J., Baranzini, S. E., *et al.* (2018) 'Multiple sclerosis', *The Lancet*, 391, pp. 1622–1636. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30481-1.
- Thyssen, A. *et al.* (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(34), pp. 15258–15263. doi: 10.1073/pnas.1003501107.
- Todd, L. L. *et al.* (2023) 'Longitudinal Olfactory Patterns in Multiple Sclerosis: A Scoping Review and Implication for Use in Management of Disease', *International Journal of MS Care*, 25(3), pp. 131–136. doi: 10.7224/1537-2073.2022-019.
- Di Virgilio, F. *et al.* (2018) 'Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment', *Nature Reviews Cancer*, 18, pp. 601–618. doi: 10.1038/s41568-018-0037-0.
- Voskuhl, R. R. and MacKenzie-Graham, A. (2022) 'Chronic experimental autoimmune encephalomyelitis is an excellent model to study neuroaxonal degeneration in multiple sclerosis', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 1024058. doi:

10.3389/fnmol.2022.1024058.

Walton, C. *et al.* (2020) 'Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition', *Multiple Sclerosis Journal*, 26(14), pp. 1816–1821. doi: 10.1177/1352458520970841.

Woo, M. S., Engler, J. B. and Friese, M. A. (2024) 'The neuropathobiology of multiple sclerosis', *Nature Reviews Neuroscience*, 25, pp. 493–513. doi: 10.1038/s41583-024-00823-z.

Xiong, Y. *et al.* (2022) 'Extracellular Adenosine Triphosphate Binding to P2Y1 Receptors Prevents Glutamate-Induced Excitotoxicity: Involvement of Erk1/2 Signaling Pathway to Suppress Autophagy', *Frontiers in Neuroscience*, 16, 901688. doi: 10.3389/fnins.2022.901688.

Zeng, J.-W. *et al.* (2008) 'Inhibition of ATP-Induced Glutamate Release by MRS2179 in Cultured Dorsal Spinal Cord Astrocytes', *Pharmacology*, 82, pp. 257–263. doi: 10.1159/000161063.

Zhang, X. and Firestein, S. (2002) 'The olfactory receptor gene superfamily of the mouse', *Nature Neuroscience*, 5(2), pp. 124–133. doi: 10.1038/nn800.

Zhao, D., Hu, M. and Liu, S. (2024) 'Glial cells in the mammalian olfactory bulb', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 18, 1426094. doi: 10.3389/fncel.2024.1426094.

Zimmermann, H., Zebisch, M. and Sträter, N. (2012) 'Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases', *Purinergic Signalling*, 8, pp. 437–502. doi: 10.1007/s11302-012-9309-4.

9 Erklärung des Eigenanteils

Die Präparation der akuten Hirnschnitte und die Durchführung der elektrophysiologischen Messungen dieser Arbeit erfolgten durch mich. Einzige Ausnahme hiervon bildet ein Teil der im Kapitel „Weitere beobachtete Veränderungen elektrophysiologischer Eigenschaften in der EAE“ gezeigten Daten. Hier stammen die Messungen von 19 Zellen der Kontrollgruppe sowie 19 Zellen der EAE-Gruppe von Janine Gierke.

Die Auswertung der Patchclamp-Versuche erfolgte in Eigenarbeit. Als Ausnahme hiervon erfolgte die Auswertung der Daten zur Strom-Spannungs-Kennlinie in der EAE in Zusammenarbeit mit Dr. Daniela Hirnet.

Die Genotypisierungen der globalen P2Y₁R-KO-Mäuse erfolgte in dem Labor von PD Dr. Heike Franke an der Universität Leipzig. Die Genotypisierungen der übrigen transgenen Mäuse wurden an der Universität Hamburg durch Anne Catrin Rakete durchgeführt.

Die Immunisierung der EAE-Tiere sowie das tägliche Erheben des EAE-Scores erfolgten durch Dr. Charlotte Schubert.

Die Präparation der primären Neuronenkulturen erfolgte durch mich. Die immunocytochemischen Färbungen, die anschließende Bildaufnahme am konfokalen Mikroskop sowie die Auswertung dieser Aufnahmen erfolgten in Eigenarbeit.

Die *calcium imaging* Versuche wurden durch mich durchgeführt. Die anschließende Auswertung erfolgte durch mich unter Verwendung eines von Dr. Marcel Seungsu Woo zur Verfügung gestellten R-Skripts.

Die Betreuung erfolgte durch Prof. Dr. Manuel Fries, Dr. Daniela Hirnet, Dr. Kristina Schulz und Dr. Charlotte Schubert.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum

Unterschrift

11 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Manuel Frieze für die Möglichkeit, an diesem spannenden und vielseitigen Projekt arbeiten zu dürfen, für die Betreuung sowie seine kontinuierliche Unterstützung.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Dr. Daniela Hirnet für die engagierte Betreuung und Begleitung aller Abschnitte dieser Arbeit.

Ich danke Dr. Charlotte Schubert und Dr. Kristina Schulz für ihre tatkräftige Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft und ihr stets offenes Ohr.

Außerdem möchte ich mich bei den beiden Arbeitsgruppen, in denen ich tätig sein durfte, für die freundliche Aufnahme und ihre Unterstützung bedanken: die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manuel Frieze am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg sowie die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Lohr an der Universität Hamburg.

Dem Graduiertenkolleg des Sonderforschungsbereichs 1328 danke ich für die spannenden Seminare, die bereichernden Angebote und ihre finanzielle Unterstützung. Darüber hinaus gilt mein Dank meinen Eltern sowie meinem Bruder für ihre kontinuierliche Unterstützung, Motivation und ihr Verständnis in allen Phasen dieser Arbeit.