

Katecholaminerge und adenosinerge cAMP-Signaltransduktion in
Astrozyten des olfaktorischen Bulbus der Maus (*Mus musculus L.*)

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

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

vorgelegt von

Jessica Sauer

Hamburg, 2025

Publikationsliste:

Diese Dissertation basiert auf drei wissenschaftlichen Arbeiten, die im Rahmen des Promotionsvorhabens entstanden sind. Die Arbeit wird als Monographie eingereicht, folgt inhaltlich jedoch dem Aufbau einer kumulativen Dissertation.

Die Publikationen im Einzelnen:

Sauer, J., Beiersdorfer, A., Schmidt, F. L., Nordbeck, M., Constantin, O., Hirnet, D., Gee, C.E. & Lohr, C. (2025). Crosstalk of noradrenergic Ca²⁺ and cAMP signaling in astrocytes of the murine olfactory bulb [Preprint]. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2025.11.10.687535>

von Kalben*, L., Sauer, J.*, Gee, C., Hirnet, D., & Lohr, C. (2024). Dopaminergic cAMP signaling in mouse olfactory bulb astrocytes. *Neurochemistry international*, 179, 105828. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105828> (*equal contribution)

Wendlandt, M., Kürten, A. J., Beiersdorfer, A., Schubert, C., Samad-Yazdtchi, K., Sauer, J., Pinto, M. C., Schulz, K., Friese, M. A., Gee, C. E., Hirnet, D., & Lohr, C. (2023). A2A adenosine receptor-driven cAMP signaling in olfactory bulb astrocytes is unaffected in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Frontiers in Immunology*, 14, 1273837. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1273837>

Crosstalk of noradrenergic Ca²⁺ and cAMP signaling in astrocytes of the murine olfactory bulb

Jessica Sauer, Antonia Beiersdorfer, Franz Lennart Schmidt, Mathias Nordbeck, Oana Constantin, Daniela Hirnet, Christine E. Gee, Christian Lohr

Auf bioRxiv veröffentlichter Preprint, doi: 10.1101/2025.11.10.687535

Anteilerklärung

Die erste Version des Manuskriptes wurde von mir verfasst und von allen Autoren überarbeitet. Die Planung und Organisation des Projektes wurden von mir und Prof. Dr. Christian Lohr vorgenommen.

Alle in Abbildung 1 H–K, 2 J–K, 3 B–G, 4 A–G, 5 C–J, 6 G–K sowie in den ergänzenden Abbildungen S1, S2 B und anteilig C, S4–S8, sowie in den ergänzenden Tabellen S1 und S2 dargestellten Experimente wurden von mir durchgeführt und ausgewertet. Die in Abbildung 2 A–I und S3 dargestellten Experimente wurden zu gleichen Anteilen von mir und Dr. Antonia Beiersdorfer durchgeführt. Die immunhistochemische Färbung, dargestellt in den Abbildungen 1 F & G, wurde von mir gemeinsam mit Mathias Nordbeck im Rahmen seiner Bachelorarbeit unter meiner Betreuung durchgeführt.

Die in Abbildung 6 A–F dargestellten immunhistochemischen Färbungen wurden unter meiner Betreuung von Franz Lennart Schmidt im Rahmen seiner Anstellung als studentische Hilfskraft durchgeführt.

Hamburg, 20.11.2025

Ort und Datum



Unterschrift Betreuer

Prof. Dr. Christian Lohr

Dopaminergic cAMP signaling in mouse olfactory bulb astrocytes

Levi von Kalben*, Jessica Sauer*, Christine E. Gee, Daniela Hirnet, Christian Lohr

Neurochem. Int. 179: 105828 doi: 10.1016/j.neuint.2024.105828 (*equal contribution)

Anteilerklärung

Experimente, die nach der ersten Begutachtung des Manuskripts erforderlich waren, wurden von mir durchgeführt und ausgewertet. Die Daten dieser Experimente sind in den Abbildungen 2 F sowie in den ergänzenden Abbildungen 1 und 3 zu sehen. Die erste Version des Manuskriptes wurde von Prof. Dr. Christian Lohr verfasst und von allen Autoren überarbeitet.

Hamburg, 20.11.2025

Ort und Datum



Unterschrift Betreuer

Prof. Dr. Christian Lohr

A_{2A} adenosine receptor-driven cAMP signaling in olfactory bulb astrocytes is unaffected in experimental autoimmune encephalomyelitis

Marina Wendlandt, Alina J. Kürten, Antonia Beiersdorfer, Charlotte Schubert, Kiana Samad-Yazdtchi, Jessica Sauer, M. Carolina Pinto, Kristina Schulz, Manuel A. Friese, Christine E. Gee, Daniela Hirnet und Christian Lohr

Front. Immunol. 14:1273837 doi: 0.3389/fimmu.2023.1273837

Anteilsklärung

Die immunhistochemische Färbung in Abbildung 1 D sowie weitere histochemische Färbungen wurden im Rahmen der Vorarbeiten zur Etablierung und Charakterisierung des AAVs von mir und zum Teil von Mathias Nordbeck im Rahmen seiner Bachelorarbeit unter meiner Betreuung angefertigt.

Die erste Version des Manuskriptes wurde von Prof. Dr. Christian Lohr verfasst und von allen Autoren überarbeitet. Die weiteren Experimente, die nach der ersten Begutachtung erforderlich waren, wurden von mir durchgeführt und ausgewertet. Die Daten dieser Experimente sind in der Abbildung 1 H zu sehen. Das Experiment, welches in den Abbildungen 4 C und 4 D zu sehen ist, wurde im Rahmen der Revision mehrfach von mir wiederholt.

Hamburg, 20.11.2025
Ort und Datum



Unterschrift Betreuer

Prof. Dr. Christian Lohr

Tag der Disputation: 26.02.2026

Erster Gutachter: Prof. Dr. Christian Lohr

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Oertner

„Doch Forschung strebt und ringt, ermüdend nie,
Nach dem Gesetz, dem Grund, Warum und Wie“

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis.....	I
II.	Abbildungsverzeichnis.....	V
III.	Zusammenfassung.....	VI
IV.	Abstract	VII
1.	Einleitung.....	1
1.1	Aufbau und Funktion des olfaktorischen Bulbus der Säugetiere.....	1
1.2	Gliazellen	5
1.2.1	Astrozyten	5
1.2.1.1	Neuron-Astrozyt-Interaktion	6
1.2.1.2	Calciumhomöostase.....	6
1.2.1.3	Blutfluss, Metabolismus und Homöostase	7
1.2.1.4	Astrozyten im olfaktorischen Bulbus	8
1.3	ATP und Adenosin als Neurotransmitter.....	9
1.4	Katecholamine als Neurotransmitter	11
1.4.1	Katecholaminsynthese	14
1.4.2	Dopaminerge Rezeptoren	16
1.4.3	Adrenerge Rezeptoren	17
1.5	Adenylatzyklen	18
1.6	Zielsetzung.....	20
2.	Crosstalk of noradrenergic Ca ²⁺ and cAMP signaling in astrocytes of the murine olfactory bulb	21
3.	Dopaminergic cAMP signaling in mouse olfactory bulb astrocytes.....	47
4.	A ₂ A adenosine receptor-driven cAMP signaling in olfactory bulb astrocytes is unaffected in experimental autoimmune encephalomyelitis.....	56
5.	Diskussion.....	71

5.1 Noradrenerge cAMP-Signale werden über α_1 -, α_2 - und β -Rezeptoren vermittelt	72
5.2 Rolle der Ca^{2+} -sensitiven Adenylatzyklasen AC1 und AC3 in der cAMP-Signalvermittlung	75
5.3 Indirekte Modulation der cAMP-Signalgebung durch α_{1A} - und α_{1D} -Rezeptoren	77
5.4 Dopaminerge cAMP-Signale werden überwiegend über die Familie der D_1 -Rezeptoren vermittelt.....	80
5.5 Adenosinerge cAMP-Signale werden über A_{2A} -Rezeptoren vermittelt und unterscheiden sich nicht im EAE-Modell.....	82
5.6 Kontextabhängige Hemmung der Adenylatzyklasen-Aktivität	84
5.7 Mögliche Auswirkungen der cAMP-Modulation auf die Funktion des olfaktorischen Bulbus.....	87
6. Literaturverzeichnis.....	93
Eidesstattliche Versicherung.....	i
Erklärung zur Verwendung generativer KI-Systeme	ii
Danksagung.....	iv

I. Abkürzungsverzeichnis

AADC	Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase
AAV	Adeno-assoziierte Viren
AC	Adenylatzyklase, engl. <i>adenylyl cyclase</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANLS	Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle
ATP	Adenosintriphosphat
ca.	circa
Ca ²⁺	Calciumionen
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calmodulin-abhängige Protein Kinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat, engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat, engl. <i>cyclic guanosine monophosphate</i>
Cl ⁻	Chloridionen
CNG	zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal, engl. <i>cyclic nucleotide-gated channel</i>
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CPA	Cyclopiazonsäure, engl. <i>cyclopiazonic acid</i>
DAG	Diacylglycerol
DAT	Dopamintransporter
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
E-NPPs	Ekto-5'-Nukleotid-pyrophosphatasen/phosphodiesterasen
E-NTPDasen	Ekto-Nukleosid-triphosphat-diphosphohydrolasen
EPAC	exchange protein directly activated by cAMP
EPL	äußere plexiforme Schicht, engl. <i>external plexiform layer</i>

ER	endoplasmatisches Retikulum
eTC	äußere <i>Tufted-Zelle</i> , engl. <i>external tufted cell</i>
Flamindo2	engl. fluorescent cAMP indicator 2 (Odaka et al., 2014)
GABA	γ -Aminobuttersäure
GC	Körnerzelle, engl. <i>granular cell</i>
GCL	Körnerzellschicht, engl. <i>granular cell layer</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GFAP	saures Gliafaserprotein, engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GL	Glomerularschicht, engl. <i>glomerular layer</i>
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GLT	Glutamattransporter
GTP	Guanosintriphosphat
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPL	innere plexiforme Schicht, engl. <i>internal plexiform layer</i>
K ⁺	Kaliumionen
K2P	Zwei-Porendomänen-Kaliumkanal
LC	<i>Locus coeruleus</i>
L-Dopa	L-Dihydroxyphenylalanin
LOCC	Ligandengesteuerte Calciumkanäle, engl. <i>ligand-operated calcium channels</i>
LOT	lateraler olfaktorischer Trakt
MAO	Monoaminoxidase
MC	Mitralzelle, engl. <i>mitral cell</i>
MCL	Mitralzellschicht, engl. <i>mitral cell layer</i>
mEPAC1	engl. membrane-bound exchange protein directly activated by cAMP 1
mGluR5	metabotroper Glutamatrezeptor 5
MS	Multiple Sklerose

MSCC	mechanosensitive Calciumkanäle, engl. <i>mechanosensitive calcium channels</i>
Na ⁺	Natriumionen
NAC	<i>Nucleus accumbens</i>
NAT	Noradrenalintransporter
NE	Noradrenalin, engl. <i>norepinephrine</i>
NKA	Natrium-Kalium-ATPase
NKCC	Natrium-Kalium-2Chlorid-Kotransporter
OB	olfaktorischer Bulbus
OCT3	organischer Kationentransporter 3
OEC	olfaktorischen Hüllgliazellen, engl. <i>olfactory ensheathing cells</i>
ONL	olfaktorische Nervenfaserschicht, engl. <i>olfactory nerve layer</i>
ORN	olfaktorisches Rezeptorneuron, engl. <i>olfactory receptor neuron</i>
PE	Phenylephrin
PGC	periglomeruläre Zellen, engl. <i>periglomerular cell</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PMAT	Plasmamembran-Monoamintransporter
PNMT	Phenylethanolamin-N-Methyltransferase
RF	Retikulärformation
sAC	short axon Zelle, engl. <i>short axon cell</i>
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums, engl. <i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SOCC	Speicher-gesteuerte Calciumkanäle, engl. <i>store-operated calcium channels</i>
TC	<i>Tufted-Zelle</i> , engl. <i>tufted cell</i>
TH	Tyrosinhydroxylase
VMAT2	vesikulärer Monoamintransporter 2

VNUT	vesikulärer Nukleotidtransporter
VOCC	Spannungsgesteuerte Calciumkanäle, engl. <i>voltage-operated calcium channels</i>
VTA	ventrales tegmentales Areal von Tsai
ZNS	zentrales Nervensystem

II. Abbildungsverzeichnis

Alle schematischen Abbildungen – bis auf Abbildung 1 – wurden mit BioRender.com unter Verwendung einer akademischen Lizenz erstellt.

Abbildung 1: Schematische Darstellung des geschichteten Aufbaus und der neuronalen Verschaltung im olfaktorischen Bulbus der Maus.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung katecholaminerger Zellgruppen im Sagittalschnitt des Mausgehirns.....	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung von Synthese, Freisetzung, zellulärer Aufnahme und Abbau von Dopamin und Noradrenalin in Neuronen und Astrozyten.....	15
Abbildung 4: Schematische Abbildung der intrazellulären Signalkaskaden nach Aktivierung der astrozytären adrenergen α_1-, α_2- und β-Rezeptoren sowie dopaminerger D_1- und adenosinerger A_{2A}-Rezeptoren in der Glomerularschicht des olfaktorischen Bulbus.....	74
Abbildung 5: Schematische Darstellung der intrazellulären Signalkaskaden nach Aktivierung der astrozytären α_{1A}- und α_{1D}-Rezeptoren in der Glomerularschicht des olfaktorischen Bulbus.....	79
Abbildung 6: Schematische Darstellung möglicher Auswirkungen der Aktivierung katecholaminerger und adenosinerger Rezeptoren in Astrozyten der Glomerularschicht des olfaktorischen Bulbus.....	92

III. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht astrozytäre cAMP-Signale in der Glomerularschicht des olfaktorischen Bulbus, die durch Noradrenalin (Kapitel 2), Dopamin (Kapitel 3) sowie Adenosin (Kapitel 4) induziert werden. Im olfaktorischen Bulbus und seiner Glomerularschicht findet die erste Integration der Geruchsinformationen in das zentrale Nervensystem statt. cAMP ist ein zentraler sekundärer Botenstoff, der unter anderem Genexpression und synaptische Transmission reguliert. Geeignete Indikatoren zur Untersuchung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen fehlten lange Zeit. Flamingo2 ermöglicht nun ihre Visualisierung.

Die Wirkung von Noradrenalin wird über drei Rezeptortypen vermittelt: α_1 -, α_2 - und β -Rezeptoren. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass über die Aktivierung der G_s -gekoppelten β -Rezeptoren positive cAMP-Signale induziert wurden. Eine Hemmung der Adenylatzyklasen-Aktivität erfolgte über α_2 -Rezeptoren, jedoch nur nach vorheriger Aktivierung der Adenylatzyklasen-Aktivität mit Forskolin. Zudem konnten cAMP-Signale auch indirekt über die Aktivierung von α_1 - und α_2 -Rezeptoren induziert werden. Die Applikation des α_1 -Rezeptor-Agonisten Phenylephrin führte zur Aktivierung von α_{1A} - und α_{1D} -Rezeptoren und somit zur intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. Das Ca^{2+} aktivierte anschließend die Ca^{2+} -sensitiven Adenylatzyklasen 1 und 3 und induzierte so den intrazellulären cAMP-Anstieg.

Dopaminerge Rezeptoren unterteilen sich in die D_1 - und D_2 -Rezeptorfamilien. Die Aktivierung G_s -gekoppelter D_1 -Rezeptoren führte zur Stimulation von Adenylatzyklasen und zur Generierung von cAMP-Signalen. Die erwartete Hemmung über die G_i -gekoppelten D_2 -Rezeptoren konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Adenosin entsteht extrazellulär durch den Abbau von freigesetztem ATP mittels Ektonukleotidasen. Über die Aktivierung von G_s -gekoppelten A_{2A} -Rezeptoren wurden cAMP-Signale induziert, während eine Hemmung über G_i -gekoppelte A_1 -Rezeptoren nicht beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass astrozytäre cAMP-Signale im olfaktorischen Bulbus durch verschiedene Transmittersysteme reguliert werden und damit eine zentrale Rolle in der lokalen Signaltransduktion der Glomerularschicht spielen könnten.

IV. Abstract

This study investigates astrocytic cAMP signals in the glomerular layer of the olfactory bulb that are induced by norepinephrine (Chapter 2), dopamine (Chapter 3), and adenosine (Chapter 4). The initial integration of olfactory information into the central nervous system occurs in the olfactory bulb and its glomerular layer. cAMP is a key second messenger that regulates, among other functions, gene expression and synaptic transmission. Suitable indicators for studying intracellular cAMP concentrations were lacking for a long time. Flamingo2 now enables their visualization.

The effects of norepinephrine are mediated via three receptor types: α_1 -, α_2 - and β -receptors. The results of this dissertation show that activation of G_s -coupled β -receptors induced positive cAMP signals. Adenylyl cyclase activity was inhibited via α_2 -receptors, but only after prior activation of adenylyl cyclase activity with forskolin. Furthermore, cAMP signals could also be induced indirectly via activation of α_1 - and α_2 -receptors. Application of the α_1 -agonist phenylephrine led to the activation of α_{1A} - and α_{1D} - receptors and thus to the intracellular release of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum. The Ca^{2+} then activated the Ca^{2+} -sensitive adenylyl cyclases 1 and 3 and induced intracellular cAMP increase.

Dopaminergic receptors are divided into the D_1 and D_2 receptor families. Activation of G_s -coupled D_1 receptors triggered the stimulation of adenylyl cyclases and thus cAMP signaling. However, the expected inhibition via G_i -coupled D_2 receptors could not be demonstrated.

Adenosine is produced extracellularly by the degradation of secreted ATP by ectonucleotidases. cAMP signals were induced via activation of G_s -coupled A_{2A} receptors, whereas inhibition via G_i -coupled A_1 receptors could not be observed.

In summary, the results show that astrocytic cAMP signals in the olfactory bulb are modulated by various transmitter systems and may play a central role in local signal transduction within the glomerular layer.

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion des olfaktorischen Bulbus der Säugetiere

Der Geruchssinn spielt eine zentrale Rolle in verschiedenen Bereichen des Lebens wie der Auswahl von Nahrung, dem Erkennen von Prädatoren und Beutetieren, aber auch bei der Fortpflanzung und dem Wiedererkennen von Artgenossen (Shiplely & Ennis, 1996). In der Nasenhöhle, im Bereich des Nasendaches, befindet sich das olfaktorische Epithel, in dem neben den olfaktorischen Rezeptorneuronen (engl. *olfactory receptor neuron*, ORN) auch Stütz- und Basalzellen eingebettet sind. Die ORNs sind bipolare Nervenzellen, deren Dendriten an der Oberfläche des Epithels in Zilien enden. ORNs exprimieren jeweils einen von etwa 1400 (Maus) bzw. 400 (Mensch) verschiedenen Geruchsrezeptortypen, die alle G-Protein gekoppelte Rezeptoren vom Typ G_{olf} sind (Qin et al., 2025).

Gelangen Geruchsmoleküle beim Einatmen in die Nasenhöhle, diffundieren sie durch die Mukusschicht des olfaktorischen Epithels und binden an den Geruchsrezeptor in den Zilien der ORNs. Die Bindung aktiviert das G_{olf} -Protein, wobei Guanosindiphosphat (GDP) an der α -Untereinheit durch Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt wird. Die aktivierte α -Untereinheit wiederum stimuliert dann die Adenylatzyklasen- (engl. *adenylyl cyclase*, AC) Isoform 3, wodurch der sekundäre Botenstoff (engl. *second messenger*) zyklisches Adenosinmonophosphat (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) gebildet wird. Ein Anstieg der cAMP-Konzentration führt zur Öffnung von zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen (engl. *cyclic nucleotide-gated channel*, CNG), was einen Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} zur Folge hat und somit zur Depolarisation der Zilienmembran führt. Die intrazellulär erhöhte Konzentration von Ca^{2+} führt zusätzlich zur Aktivierung von Ca^{2+} -aktivierten Chlorid-Kanälen, die zum Cl^- -Ausstrom führen und somit zur weiteren Depolarisation der Zilienmembran beitragen (Antunes & Simoes de Souza, 2016; Ronnett & Moon, 2002). Gleichzeitig aktivieren Ca^{2+} bzw. die Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CaMKII) negative Rückkopplungsmechanismen, die die CNG-Kanäle hemmen und somit zur Desensitisierung der Geruchsantwort führen (Leinders-Zufall et al., 1999).

Die unmyelinisierten Axone der ORNs durchqueren die Basallamina sowie die *Lamina cribrosa* des Siebbeins und treten gebündelt in das zentrale Nervensystem (ZNS) ein (Antunes & Simoes

de Souza, 2016; Ronnett & Moon, 2002). Dort bilden sie gemeinsam mit den olfaktorischen Hüllgliazellen (engl. *olfactory ensheathing cells*, OEC) die olfaktorische Nervenfaserschicht (ONL) des olfaktorischen Bulbus (OB) (Shipley & Ennis, 1996). Bei den OECs handelt es sich um spezialisierte Gliazellen, die nur in der ONL vorhanden sind. Sie umhüllen die unmyelinisierten Axone der ORN und lenken sie beim Einwandern durch die Siebbeinplatte in den OB durch die ONL bis in die nächstgelegene Schicht, die Glomerularschicht (engl. *glomerular layer*, GL) (Doucette, 1984; Su & He, 2010).

Der OB der Säugetiere liegt paarig angelegt rostral im Gehirn und ist Teil des Telencephalons. Das olfaktorische System beginnt sich beim Mausembryo bereits am 9. Tag *post conceptionem* zu formen und reift postnatal weiter (Tufo et al., 2022). Der OB ist ein hochspezialisierter Bereich zur Geruchsverarbeitung und besitzt einen laminaren Aufbau, der vom äußeren zum inneren Bereich aus folgenden sechs Schichtungen besteht: der ONL, der GL, der äußeren plexiformen Schicht (engl. *external plexiform layer*, EPL), der Mitralzellschicht (engl. *mitral cell layer*, MCL), der inneren plexiformen Schicht (engl. *internal plexiform layer*, IPL) und der Körnerzellschicht (engl. *granular cell layer*, GCL) (Kosaka & Kosaka, 2009; Shipley & Ennis, 1996). In Abbildung 1 ist der Aufbau des OB mit seiner spezifischen Schichtung zu sehen. Direkt hinter der ONL befindet sich die GL mit einzelnen Glomeruli, die eine sphärische Struktur mit Durchmesser von jeweils 80–160 µm besitzen. Im OB der Maus befinden sich ca. 2000–3000 Glomeruli pro OB (Shipley & Ennis, 1996). Die Glomeruli stellen den ersten Schritt der Geruchsinformationsverarbeitung dar, indem die Axone der ORNs Synapsen mit sekundären Projektionsneuronen sowie Interneuronen bilden. Bei Stimulation setzen die Axone der ORNs ektopisch Glutamat und Adenosintriphosphat (ATP) frei (Thyssen et al., 2010). ORNs, desselben Geruchsrezeptortyps projizieren dabei in spezifische Glomeruli innerhalb des OB (Bailey et al., 1999). Ein Geruchsstoff aktiviert also nur spezielle Glomeruli. Ein einzelner Glomerulus ist umgeben von juxtglomerulären Interneuronen und Astrozyten. Das Soma eines Astrozyten liegt dabei am Rand und erstreckt seine Ausläufer ins Innere eines einzelnen Glomerulus (Bailey & Shipley, 1993). Im neuropilhaltigen Inneren des Glomerulus befinden sich die Synapsen zwischen den ORNs und den apikalen Dendriten der beiden glutamatergen Projektionsneurone namens Mitralzellen (engl. *mitral cell*, MC) und *Tufted*-Zellen (engl. *tufted cell*, TC) sowie den Dendriten der juxtglomerulären Interneurone (Bailey et al., 1999; Nagayama et al., 2014; Rotermund et al., 2019).

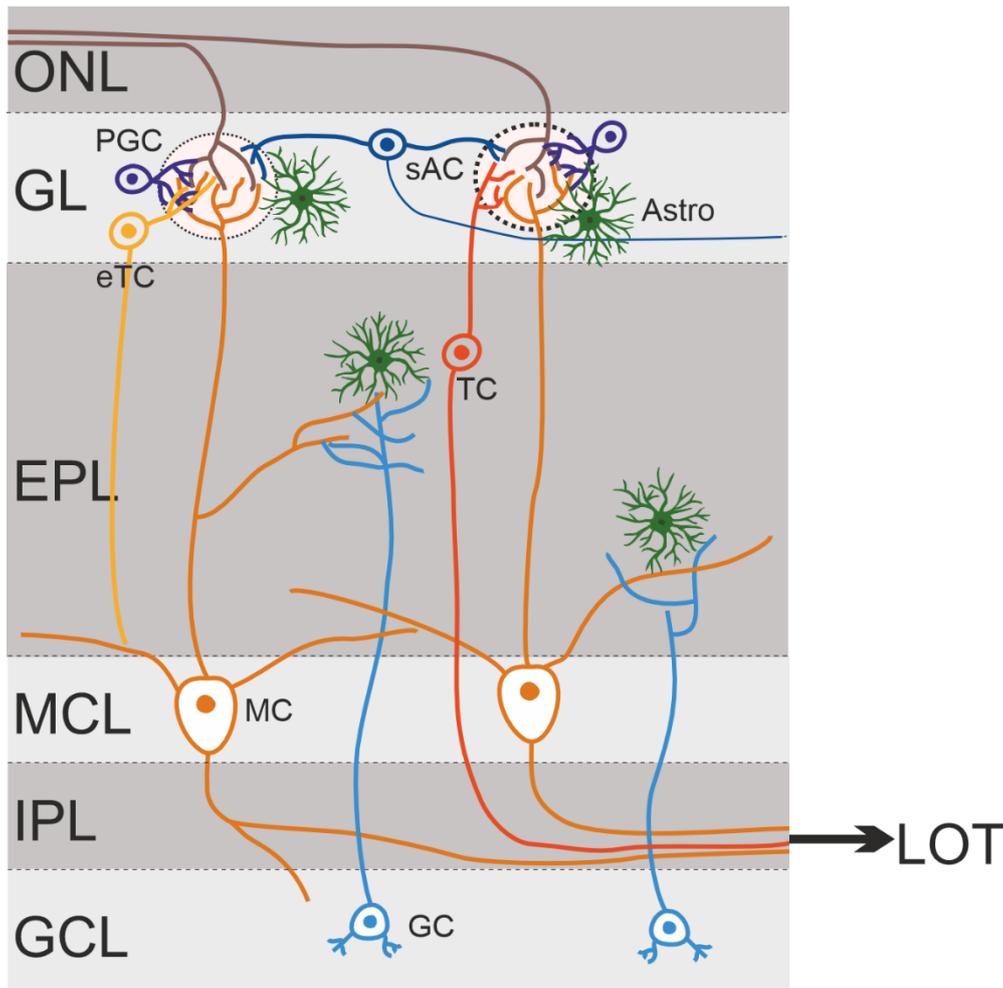


Abbildung 1: Schematische Darstellung des geschichteten Aufbaus und der neuronalen Verschaltung im olfaktorischen Bulbus der Maus

In der olfaktorischen Nervenschicht (ONL) erreichen die Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN, braun) das zentrale Nervensystem nach dem Durchtritt durch die Lamina cribrosa des Siebbeins. In den Glomeruli der Glomerularschicht (GL) bilden die ORNs Synapsen mit den glutamatergen Projektionsneuronen Mitral- (MC, orange) und Tufted-Zellen (TC, rot). In der ersten Stelle der Geruchsinformationsverarbeitung, der GL, sind weiterhin Astrozyten (Astro, grün) sowie die γ -Aminobuttersäure (GABA)-ergen periglomerulären Zellen (PGCs, violett) und die ebenfalls GABAergen short Axon cells (sACs, dunkelblau) beteiligt. Die sACs und Subpopulationen der PGCs schütten neben GABA ebenfalls auch Dopamin aus. Weiterhin wird die Signalverarbeitung von glutamatergen externen Tufted-Zellen (eTC, orange) moduliert. In der externen plexiformen Schicht (EPL) befinden sich die reziproken dendrodendritischen Synapsen der MCs mit den GABAergen Körnerzellen (GC, hellblau) sowie die Somata der TCs. Die Somata der MCs befinden sich in der Mitralzellschicht (MCL). In der internen plexiformen Schicht (IPL) verlaufen die Axone der MCL und TC zum lateralen olfaktorischen Trakt (LOT) und projizieren in tiefere Hirnregionen. In der Körnerzellschicht (GCL) befinden sich die Somata der GCs. Abbildung erstellt mit CorelDRAW.

Zu den juxtaglomerulären Interneuronen zählen die äußeren *Tufted-Zellen* (engl. *external tufted cell*, eTC), die interglomerulär verbindenden *short axon* Zellen (engl. *short axon cells*, sACs) sowie die periglomerulären Zellen (engl. *periglomerular cells*, PGC) (Hayar et al., 2004). Unter diesen besitzen die PGCs, deren primärer Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) ist, den kleinsten Zellkörper. Ihre Dendriten projizieren in der Regel zu einem einzigen

Glomerulus und verzweigen sich dort in einem begrenzten Bereich. Die sACs, die ebenfalls GABA als primären Neurotransmitter ausschütten, sind etwas größer als die PGCs und ihre Dendriten verlaufen zwischen benachbarten Glomeruli. Ihre Axone können sich über fünf bis sechs Glomeruli erstrecken und enden im interglomerulären Raum der GL. Sowohl sACs als auch Subpopulationen der PGCs setzen neben GABA auch Dopamin frei und modulieren damit die Signalverarbeitung innerhalb der Glomeruli (Maher & Westbrook, 2008; Nagayama et al., 2014; Vaaga et al., 2017). Schätzungsweise 10 % bis 16 % der Interneurone in der GL adulter Mäuse sind dopaminerg (Pignatelli & Belluzzi, 2017). Die eTCs besitzen innerhalb der Gruppe der juxtglomerulären Zellen die größten Zellkörper. Sie liegen in der GL zwischen den Glomeruli. Ihre Dendriten breiten sich voluminös innerhalb eines Glomerulus, seltener zweier Glomeruli, aus. Bei eTCs handelt es sich um glutamaterge Zellen (Zak & Schoppa, 2022).

In jedem Glomerulus befinden sich die Dendriten von etwa 50 TCs und 20 MCs. TCs weisen dabei eine höhere Sensitivität gegenüber Geruchsstimuli auf als MCs (Nagayama et al., 2014). Eine Besonderheit besteht darin, dass die meisten MCs überwiegend über TCs aktiviert werden und nur in geringem Maße direkt durch ORNs (Gire et al., 2012). Die Somata der TCs befinden sich in der EPL, während die großen Somata der MCs aufgereiht in der MCL lokalisiert sind. Die Axone beider Zelltypen verlaufen durch die EPL, bündeln sich in der fast zellfreien IPL und projizieren dann über den lateralen olfaktorischen Trakt (LOT) in tiefere Hirnregionen wie dem piriformen Kortex, der Amygdala und dem rostralen entorhinalen Kortex (Gottfried, 2006; Kosaka & Kosaka, 2009; Tufo et al., 2022). Die innerste Schicht des OB ist die GCL, die durch die zahlreichen Somata der GABAergen Körnerzellen (engl. *granular cell*, GC) gekennzeichnet ist (Kosaka & Kosaka, 2009). Diese bilden mit den sekundären Dendriten der MCs und TCs reziproke dendrodendritische Synapsen (Imamura et al., 2020). Dendrodendritische Synapsen, also Verbindungen zwischen den Dendriten zweier Neurone, sind von essenzieller Bedeutung für die Prozessierung von Geruchsstimuli. In reziproken dendrodendritischen Synapsen kommunizieren die beteiligten Neurone bidirektional miteinander: MCs schütten Glutamat aus, aktivieren somit die GCs und initiieren die laterale Inhibition. Die GCs wiederum schütten GABA aus und fördern dadurch die Synchronisation der MCs (Didier et al., 2001).

Eine Besonderheit des OB ist seine adulte Neurogenese, die im ZNS nur in wenigen Regionen vorkommt. Neben dem *Hippocampus* zählen hierzu die Subventrikularzone, aus der neue Interneurone für den OB entstehen, sowie das olfaktorische Riechepithel (Brann & Firestein, 2014). Neuronale Stammzellen aus der Subventrikularzone, die als Typ-B1-Zellen bezeichnet werden und Astrozyten ähneln, differenzieren zu neuronalen Vorläuferzellen aus und wandern über den rostralen Migrationsstrom in Richtung des OB. Dort integrieren sie sich in die GCL und reifen zu GCs aus (Jurkowski et al., 2020). Im olfaktorischen Riechepithel werden exzitatorische ORNs nachgebildet. Diese senden ihre Axone durch die Siebbeinplatte und integrieren sich in bestehende Glomeruli (Brann & Firestein, 2014).

1.2 Gliazellen

Im ZNS der Vertebraten finden sich verschiedene Gliazelltypen, die ihren Ursprung in der Embryonalentwicklung in verschiedenen Keimblättern haben. Während Makrogliazellen wie Astrozyten und Oligodendrozyten genau wie Neurone aus dem Neuroektoderm entstehen, stammen Mikrogliazellen vom Mesoderm ab (Verkhratsky et al., 1998). Lange Zeit wurde Gliazellen lediglich eine stützende Funktion zugeschrieben. Heute ist man sich jedoch ihrer aktiven Rolle in der Entwicklung des Gehirns und der neuronalen Signalverarbeitung bewusst (Lago-Baldaia et al., 2020). Gliazellen exprimieren zahlreiche Neurotransmitterrezeptoren und Ionenkanäle und reagieren auf neuronale Aktivität beispielsweise mit intrazellulären Ca^{2+} -Signalen (Bai et al., 2024; Deitmer et al., 1998).

1.2.1 Astrozyten

Astrozyten gehören zu den funktionell und morphologisch vielfältigsten Zellen des ZNS und wurden zuerst von Rudolf Virchow im 19. Jahrhundert beschrieben (Bai et al., 2024; Verkhratsky et al., 1998). Sie besitzen einen Durchmesser von ca. 40 bis 60 μ M (Bai et al., 2024). Im gesamten murinen ZNS besitzen Astrozyten einen Anteil von ca. 10 % bis 20 % (Sun et al., 2017). Zu ihren zentralen Aufgaben zählen die Aufrechterhaltung der Ionen-Homöostase, die Regulation der Blut-Hirn-Schranke sowie die Steuerung des lokalen Blutflusses (Sofroniew & Vinters, 2010; Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

Astrozyten bilden über *Gap junctions* – spezialisierten Zell-Zell-Kanäle aus Connexinen – ein funktionelles Netzwerk, das den Austausch von Ionen und Signalmolekülen ermöglicht (Roux et al., 2011). Im gesunden ZNS beansprucht jeder Astrozyt seine eigene, nicht überlappende Domäne und lediglich ihre Endfüßchen sind miteinander gekoppelt (Sofroniew & Vinters, 2010).

1.2.1.1 *Neuron-Astrozyt-Interaktion*

Astrozyten sind integraler Bestandteil der sogenannten *Tripartiten-Synapse*, bei der ihre Endfüßchen den synaptischen Spalt zwischen der präsynaptischen Terminale und dem postsynaptischen Neuron umschließen (Araque et al., 1999). Auf synaptische Aktivität reagieren Astrozyten mit intrazellulären Ca^{2+} -Signalen, die über metabotrope und ionotrope Rezeptoren vermittelt werden können (Volterra et al., 2014). Eine weitere Ca^{2+} -Quelle ist die Umkehr des astrozytären $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers bei erhöhten intrazellulären Na^+ -Konzentrationen, beispielsweise infolge der Neurotransmitteraufnahme (Doengi, 2009; Volterra et al., 2014). Diese Ca^{2+} -Signale können sich über die *Gap junctions* im glialen Netzwerk ausbreiten und sorgen so für einen Informationsaustausch (Bai et al., 2024; Deitmer et al., 1998). Die astrozytären Ca^{2+} -Signale treten sowohl im Soma als auch in Mikrodomänen auf und können die Freisetzung von Gliotransmittern auslösen (Volterra et al., 2014). Astrozyten reagieren auf neuronale Aktivität und modulieren diese durch die Freisetzung von Gliotransmittern wie ATP, Glutamat, GABA, Adenosin und D-Serin, die die entsprechenden neuronalen Rezeptoren aktivieren können (Halassa et al., 2007; Won et al., 2025).

1.2.1.2 *Calciumhomöostase*

Astrozyten erhalten eine niedrige zytosolische Ca^{2+} -Konzentration von 30–150 nM aufrecht, die in wenigen Millisekunden auf bis zu hunderte Nanomolar oder wenige Mikromolar ansteigen kann (Deitmer et al., 1998). Das Ca^{2+} kann dabei aus dem Extrazellulärraum oder internen Speichern stammen. Zu diesen Speichern zählen das endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien. Das endoplasmatische Retikulum verfügt über Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3)- und teilweise Ryanodin-Rezeptoren (Bai et al., 2024; Deitmer et al., 1998).

Aus den Mitochondrien kann Ca^{2+} während einer kurzzeitigen Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätsübergangspore ausströmen (Bai et al., 2024). Aus dem Extrazellulärraum kann Ca^{2+} über Ionenkanäle, die sich in der Zellmembran befinden, einströmen. Diese sind mechanosensitiv (engl. *mechanosensitive calcium channels*, MSCC), Spannungs- (engl. *voltage-operated calcium channels*, VOCC), Liganden- (engl. *ligand-operated calcium channels*, LOCC) oder Speicher- (engl. *store-operated calcium channels*, SOCC) gesteuert (Ahmadpour et al., 2021; Deitmer et al., 1998). Die Ca^{2+} -Konzentration im Soma und den peripheren Ausläufern der Astrozyten können sich unterscheiden. Während sie im Soma stärker von der Ca^{2+} -Ausschüttung aus internen Speichern abhängt, hängt sie in den Ausläufern der Astrozyten stärker vom Einstrom extrazellulären Ca^{2+} ab (Bazargani & Attwell, 2016). Die Rückführung zum Ca^{2+} -Basallevel erfolgt über den aktiven Transport des Ca^{2+} . Dies geschieht über $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, Ca^{2+} -ATPasen der Plasmamembran sowie die Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (engl. *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*, SERCA) (Ahmadpour et al., 2021; Deitmer et al., 1998).

1.2.1.3 Blutfluss, Metabolismus und Homöostase

Astrozytäre Endfüßchen umhüllen Kapillaren und bilden einen wesentlichen Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke, indem sie Perizyten und kapillarbildende Endothelzellen umgeben. Bei der neurovaskulären Kopplung reagieren Astrozyten auf neuronale Aktivität, indem sie vasodilatatorische Substanzen freisetzen, die den lokalen Blutfluss erhöhen (Lia et al., 2023). Dieser erhöhte Blutfluss wird beispielsweise für die Energieversorgung benötigt. Das Konzept des Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttles (ANLS) beschreibt, wie Astrozyten bei erhöhtem neuronalem Energiebedarf neuronal ausgeschüttetes Glutamat gemeinsam mit Glukose aus dem Blut aufnehmen und aus Letzterem durch Glykolyse Laktat produzieren und dieses in den Extrazellulärraum ausschütten. Das Laktat wird dann von den Neuronen mittels Monocarboxylat-Transporter intrazellulär aufgenommen und als Energiesubstrat zur ATP-Produktion genutzt (Magistretti & Pellerin, 1996; Mason, 2017).

Ein zentrales Element astrozytärer Funktion ist die Aufnahme und Umverteilung von Neurotransmittern und Ionen. Insbesondere die Aufnahme von Glutamat erfolgt über

spezifische Transporter wie dem Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST) und dem Glutamattransporter (GLT) in die Astrozyten, um toxische Extrazellulärkonzentrationen des Glutamats zu verhindern (Danbolt, 2001; Hertz & Zielke, 2004). Nach Aufnahme wird ein Drittel des Glutamats durch die astrozytenspezifische Glutaminsynthetase zu Glutamin umgewandelt und in den Extrazellulärraum ausgeschüttet. Das Glutamin wird anschließend von präsynaptischen Neuronen wieder aufgenommen und durch Glutaminase zu Glutamat rekonstruiert (Hertz & Zielke, 2004; Kettenmann & Verkhratsky, 2011; Magistretti & Pellerin, 1996; Mason, 2017). Ein weiterer Teil des Glutamats wird zu α -Ketoglutarat metabolisiert und in den Tricarbonsäurezyklus eingespeist. Diese Prozesse sind essenziell für den Glutamat-Glutamin-Zyklus und die Energieversorgung der Neurone (Hertz & Zielke, 2004).

Darüber hinaus regulieren Astrozyten die extrazelluläre K^+ -Konzentration durch Aufnahme, Speicherung und Wiederabgabe von K^+ , um neuronale Erregbarkeit zu modulieren (Hertz, 1965; Walz, 2000). Dies erfolgt über die Natrium-Kalium-ATPase (NKA), den Natrium-Kalium-2Chlorid-Kotransporter (NKCC) sowie über das astrozytäre Netzwerk, das K^+ passiv entlang von Konzentrationsgradienten verteilt (Bellot-Saez et al., 2017).

1.2.1.4 Astrozyten im olfaktorischen Bulbus

Eine aktive Rolle des Astrozytennetzwerks für die Geruchsverarbeitung im OB wurde bereits früh vermutet (Roux et al., 2011). Immunhistochemisch konnten in verschiedenen Schichten des OB von Ratten sechs Astrozyten-Subtypen unterschieden werden, die sich in Form und Verteilung unterscheiden. In der GL wurden drei Subtypen identifiziert: keilförmige (*engl. wedge-shape*) Astrozyten, die typisch für die GL sind, sowie halbkreisförmige (*engl. semi-circular*) und längliche (*engl. elongate*) Astrozyten (Bailey & Shipley, 1993). Mit zunehmendem Alter der Maus und wachsendem OB nehmen Größe und Komplexität der astrozytären Ausläufer in allen Schichten zu (Klein et al., 2020).

Astrozyten sind in der Lage sämtliche im ZNS vorkommenden Rezeptoren für Neurotransmitter und Neuromodulatoren zu exprimieren. Die Art der exprimierten Rezeptoren variiert dabei stark in Abhängigkeit vom neuronalen Umfeld (Verkhratsky et al., 2021). Diese Rezeptoren lassen sich in ionotrope und metabotrope Rezeptoren einteilen. Die Aktivierung ionotroper Rezeptoren führt je nach Subtyp zum Ein- und Ausstrom verschiedener

Ionen. So führt die Aktivierung ionotroper P2X-Rezeptoren zum Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum in den Astrozyten (Verkhatsky & Nedergaard, 2018). Metabotrope $\text{G}_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren aktivieren nach der Ligandenbindung die Phospholipase C (PLC), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und IP_3 spaltet. IP_3 diffundiert anschließend innerhalb der Zelle zum IP_3 -Rezeptor an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und induziert die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (Berridge, 2016). Astrozytäre Ca^{2+} -Signale spielen eine zentrale Rolle für die Kommunikation zwischen Astrozyten als auch zwischen diesen und Neuronen (Sofroniew & Vinters, 2010). In der GL des OB kommunizieren Astrozyten bevorzugt mit den Astrozyten desselben Glomerulus über Ca^{2+} -Wellen, die sich über *gap junctions* ausbreiten. Diese werden hauptsächlich von den beiden astroglialen Connexinen Cx43 und Cx30 gebildet (Roux et al., 2011). Dabei findet nicht nur eine Kommunikation der Astrozyten untereinander, sondern auch mit anderen Gliazellen wie OECs statt (Beiersdorfer et al., 2019).

ORNs setzen bei elektrischer Stimulation ektopisch ATP und Glutamat frei. Die freigesetzten Neurotransmitter führen dann über Ca^{2+} -Signale in OECs zu einer Vasokonstriktion der Blutgefäße (Thyssen et al., 2010). Bisher wurde gezeigt, dass Astrozyten im OB verschiedene ionotrope und metabotrope Rezeptoren exprimieren. Neben P2Y_1 -Rezeptoren, die auf die Applikation von ATP und ADP mit Ca^{2+} -Signalen reagieren, exprimieren sie auch adenosinerge A_{2A} -Rezeptoren (Doengi et al., 2008). Weiterhin exprimieren sie die dopaminergen Rezeptoren der Familien D_1 und D_2 (Fischer et al., 2020) sowie die adrenergen α_1 - und α_2 -Rezeptoren (Fischer et al., 2021) und ionotrope AMPA-Rezeptoren (Droste et al., 2017). In juvenilen Mäusen wurde zudem die Expression des metabotropen Glutamatrezeptors 5 (mGluR5) in Astrozyten des OB nachgewiesen (Otsu et al., 2015).

1.3 ATP und Adenosin als Neurotransmitter

ATP galt lange Zeit ausschließlich als intrazelluläre Energiewährung, bis entdeckt wurde, dass ATP und andere Purine erregend auf Neurone wirken können (Burnstock, 1976). Inzwischen ist auch die Rolle von ATP als Kotransmitter in vielen Neuronen sowie als bedeutender Gliotransmitter in Astrozyten anerkannt (Abbracchio et al., 2009; Burnstock, 1976).

ATP und andere Nukleotide werden über den Cl⁻-abhängigen vesikulären Nukleotidtransporter (VNUT) in sekretorische und synaptische Vesikel verpackt – sowohl in Neuronen (Sawada et al., 2008) als auch in Astrozyten (Oya et al., 2013). ATP tritt häufig als Kotransmitter mit weiteren Neurotransmittern wie Noradrenalin (NE, engl. *norepinephrine*), GABA oder Glutamat auf (Abbraccio et al., 2009). Nach der Ausschüttung wird es durch verschiedene Ektonukleotidasen schrittweise enzymatisch zu Adenosin abgebaut. Die Familien der Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen (E-NTPDasen; Synonym: CD39) und Ekto-5'-Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen (E-NPPs) hydrolysieren ATP zunächst zu Adenosindiphosphat (ADP) und dann zu Adenosinmonophosphat (AMP). Dieses wird wiederum durch die Ekto-5'-Nukleotidase (Synonym: CD73) zu Adenosin hydrolysiert. Alkalische Phosphatasen können ebenfalls Phosphatgruppen von Tri-, Di- oder Monophosphaten hydrolysieren (Abbraccio et al., 2009; Garcia-Gil et al., 2021; Zimmermann, 2000).

Purinozeptoren sind in nahezu allen Geweben von Säugetieren weit verbreitet und kommen in den verschiedensten Zelltypen vor. Die membranständigen Rezeptoren werden in zwei Hauptgruppen unterteilt: Die P1-Rezeptoren (A_{1,2A,2B,3}), bei denen es sich um metabotrope Adenosin-Rezeptoren handelt, sowie P2-Rezeptoren, die auf ATP und andere Nukleotide reagieren. Letztere untergliedern sich in die ionotropen P2X-Rezeptoren (P2X₁₋₇) und die metabotropen P2Y-Rezeptoren (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}) (Abbraccio et al., 2009).

P1-Rezeptoren sind entweder G_{i/o}- oder G_s-gekoppelt: A₁- und A₃- Rezeptoren hemmen über G_{i/o} die AC und damit die Bildung von cAMP, während A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptoren über G_s-Proteine die AC-Aktivität stimulieren. P2X-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die auf ATP reagieren und durchlässig für Na⁺, Ca²⁺ und K⁺ sind. Die P2Y-Rezeptoren werden funktionell in zwei Gruppen unterteilt: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ und P2Y₁₁-Rezeptoren sind G_{q/11}-gekoppelt und aktivieren über den PLC/IP₃-Weg die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern, während P2Y₁₂, P2Y₁₃ und P2Y₁₄ über G_{i/o} die AC-Aktivität hemmen. Die P2Y-Rezeptoren reagieren mit unterschiedlicher Sensitivität auf ATP, ADP, UTP oder UDP (Abbraccio et al., 2009).

Nach der Ausschüttung von ATP – sowohl als Neurotransmitter als auch als Kotransmitter – werden in der prä- und postsynaptischen Membran sowie den umliegenden Astrozyten P2-

Rezeptoren aktiviert. Das durch den ATP-Abbau entstehende Adenosin aktiviert seinerseits P1-Rezeptoren. In Astrozyten des OB konnte gezeigt werden, dass über die Aktivierung von P2Y₁- und A_{2A}-Rezeptoren durch ATP-Applikation PLC/IP₃-vermittelte Ca²⁺-Signale induziert wurden (Doengi, 2009). Für MCs konnte gezeigt werden, dass sie in Folge einer ATP-Freisetzung in der GL indirekt aktiviert werden und sich hierbei die neuronale Netzwerkaktivität erhöht (Fischer et al., 2012). Dieser Effekt beruht möglicherweise auf der Aktivierung von P2Y₁-Rezeptoren auf präsynaptischen, glutamatergen eTCs und erfolgt nicht über eine direkte Aktivierung der MCs selbst (Fischer et al., 2012).

Der Abbau von ATP durch Ektonukleotidasen führt schließlich zu Adenosin, das ebenfalls adenosinerge Rezeptoren aktivieren kann (Abbracchio et al., 2009). Adenosin wirkt an den A₁-Rezeptoren von MCs direkt und führt dort zu deren Hyperpolarisation durch eine erhöhte K⁺-Leitfähigkeit, welches zu einer Optimierung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses führt (Rotermund et al., 2018). Die Aktivierung von A₁-Rezeptoren durch Adenosin an den reziproken dendrodendritischen Synapsen führt zu einer verringerten Glutamatfreisetzung durch die MCs. Infolgedessen kommt es zu einer Abschwächung der dendrodendritischen Inhibition und somit einer Erhöhung der Aktivität der MCs (Schulz et al., 2017). Weiterhin zeigt eine Studie von Theparambil et al. (2024), dass über neuronal ausgeschüttetes Adenosin astrozytäre A_{2B}-Rezeptoren aktiviert werden und dies als wichtiger Mechanismus zur Regulation der Energieversorgung dient.

1.4 Katecholamine als Neurotransmitter

Die Entdeckung von Neurotransmittern in zentralnervösen und peripheren Systemen begann 1921 mit der Demonstration der chemischen Übertragung durch Acetylcholin im Vagusnerv durch Loewi (1921). Zwei Jahrzehnte später konnte von Euler (1945) NE in sympathisch innervierten Geweben nachweisen. Carlsson et al. (1962) identifizierten als Erste immunhistochemisch die beiden Katecholamine Dopamin und NE im Gehirn und spekulierten über die Existenz eigenständiger adrenerger Neurone. Im ZNS übernimmt NE Kernfunktionen in Prozessen wie Aufmerksamkeit, Lernen und Gedächtnis (Holland et al., 2021). Störungen im noradrenergen System sind mit kognitiven Defiziten bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson assoziiert (Holland et al., 2021). Dopamin wiederum spielt eine

entscheidende Rolle für Motivation, Belohnungsverarbeitung und zielgerichtetes Verhalten (Bromberg-Martin et al., 2010).

Die Identifikation und Lokalisation katecholaminerger und serotonerger Neurone im Hirnstamm von Ratten durch Dahlström and Fuxe (1964) legte später den Grundstein für die Erforschung katecholaminerger Neurone im ZNS. Zu den Katecholaminen zählen die drei 3,4-Dihydroxy-Derivate des Phenylethylamins: Dopamin, NE sowie Adrenalin. Sie werden dabei nicht nur im ZNS, sondern auch im peripheren Nervensystem ausgeschüttet (Molinoff & Axelrod, 1971).

Die systematische Kartierung katecholaminerger Nuclei erfolgte durch Dahlström and Fuxe (1964), die die katecholaminergen Neurone in Ratten in die Gruppen A1 bis A12 einteilten – von kaudal in der *Medulla oblongata* bis rostral im Diencephalon. Dies erleichtert die Zuordnung der Nuclei im Gehirn speziesübergreifend. Später wurden diese Gruppen durch Hokfelt et al. (1984) um A13 bis A17 sowie die adrenergen Neuronengruppen C1 und C2 ergänzt (Abbildung 2). Die Gruppen A1 bis A7 sind noradrenerg, während die Gruppen A8 bis A17 dopaminerg sind (Dahlström & Fuxe, 1964; Hokfelt et al., 1984). Die noradrenergen Gruppen A1–A2 und die adrenergen Gruppen C1–C2 sind in der ventrolateralen Medulla beziehungsweise der dorsomedialen Medulla miteinander assoziiert (Verney, 1999).

Im Mittelhirn enthalten die *Substantia nigra pars compacta* (SNpc; A9) und das *ventrale tegmentale Areal von Tsai* (VTA; A10) die wichtigsten dopaminerge Zellgruppen. Sie zählen zu der phylogenetisch ältesten Komponente des Neuronennetzwerks der Retikulärformation (RF) und projizieren unter anderem in limbische und frontale Hirnregionen (Bjorklund & Dunnett, 2007). Das VTA bildet Synapsen mit dem *Nucleus accumbens* (NAc), welcher bedeutend ist für die Ausbildung einer circadianen molekularen Uhr (Becker-Krail et al., 2022). Der OB besitzt mit dem dopaminergen Nucleus A16 eine große Anzahl dopaminerge Neurone (Bjorklund & Dunnett, 2007). Vergleichende Studien in verschiedenen Spezies zeigen, dass Dopamin und GABA von bestimmten Populationen der juxtglomerulären Interneurone gemeinsam ausgeschüttet werden. (Kosaka & Kosaka, 2016). Schätzungsweise 10 % bis 16 % der Interneurone in der GL adulter Mäuse sind dabei auch dopaminerg (Pignatelli & Belluzzi, 2017). Hierzu zählen die sACs und eine Subpopulation der PGCs in der EPL (Maher & Westbrook, 2008; Vaaga et al., 2017).

NE wird primär im *Locus coeruleus* (LC; A6) synthetisiert, der als noradrenerger Nucleus mit der höchsten Zelldichte in der Hirnstamm-RF der Hauptort für die NE-Synthese im Gehirn ist (Bucci et al., 2017). Der OB gehört zu den am dichtesten innervierten Zielregionen des LC: Mindestens 40 % der noradrenergen LC-Neurone von Ratten projizieren dorthin (Shipley et al., 1985). Dies sind zehn Mal mehr als im restlichen zerebralen Kortex (Shipley et al., 1985). Die Projektionen des LC münden dabei in allen Schichten des OB, wobei in der GCL sowie der IPL und der EPL hohe Innervationsdichten von noradrenergen Neuronen aus dem LC nachgewiesen wurden. In der MCL und der GL war die nachgewiesene Dichte zwar geringer, sie ist jedoch funktionell nicht zu vernachlässigen (McLean et al., 1989).

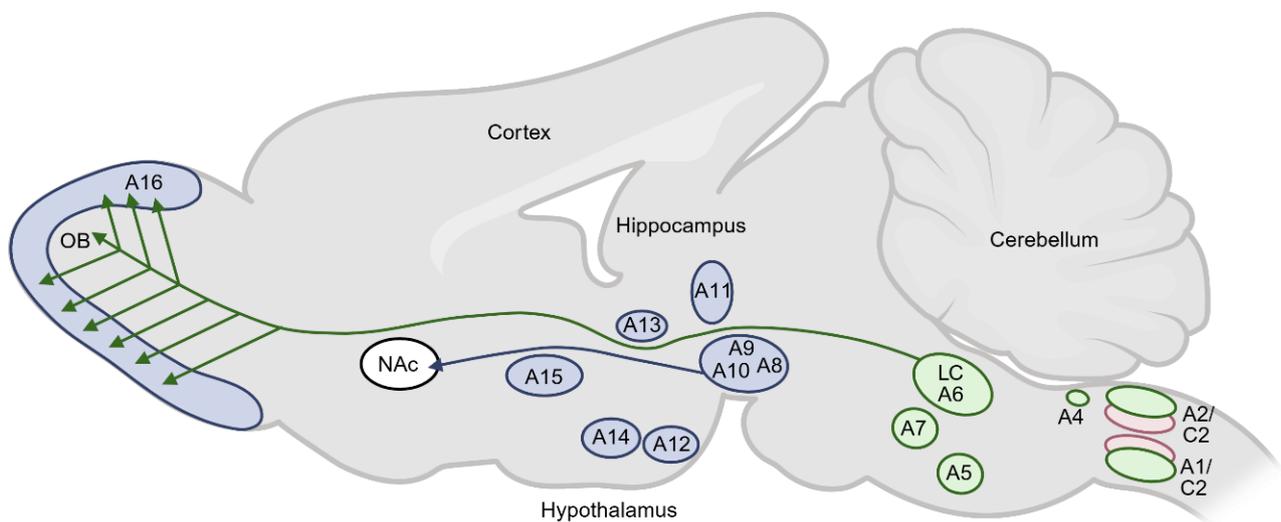


Abbildung 2: Schematische Darstellung katecholaminerger Zellgruppen im Sagittalschnitt des Mausgehirns

Schematische Darstellung der dopaminergen (A8–A16, blau) und noradrenergen (A1, A2, A4–A7; grün) Zellgruppen im Sagittalschnitt des Mausgehirns, basierend auf den Klassifikationen nach Dahlström und Fuxe (1964), Hökfelt et al. (1984) und Björklund & Dunnett (2007). Die wichtigsten noradrenergen Projektionen zum olfaktorischen Bulbus (OB) stammen aus dem Locus coeruleus (LC; A6), während dopaminerge Neurone vorwiegend lokal im OB selbst (A16) lokalisiert sind. Die Zellgruppen sind entlang der rostrokaudalen Achse angeordnet: von der Medulla oblongata (A1–A2, assoziiert mit den adrenergen Gruppen C1 und C2 (rot)), über den Pons (A4–A7), das Mittelhirn (A8–A10), das Diencephalon (A11–A15) bis zum Telencephalon (A16). Dargestellt sind ausschließlich in der Maus eindeutig nachgewiesene Neuronengruppen und Projektionen mit Relevanz für das olfaktorische System.

1.4.1 Katecholaminsynthese

Der Syntheseweg der Katecholamine beginnt mit der Aminosäure L-Tyrosin, die entweder durch Hydroxylierung von L-Phenylalanin oder der Hydrolyse von Proteinen gewonnen wird. Die Hydroxylierung des L-Tyrosins durch das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) führt zur Bildung von L-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa), dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Katecholaminsynthese (Nagatsu et al., 1964). L-Dopa kann dabei von den Neuronen sowohl extrazellulär aufgenommen als auch endogen im Zytosol der Zelle synthetisiert werden (Sulzer et al., 2000). Eine schematische Darstellung der Synthese, Freisetzung, Zellaufnahme und des Abbaus von Dopamin und NE ist in Abbildung 3 zu sehen, die den gesamten biochemischen Prozess zusammenfasst.

L-Dopa wird im Zytosol der Zelle durch das Enzym Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) decarboxyliert, wodurch Dopamin entsteht (Blaschko, 1942; Sulzer et al., 2000). Zusätzlich kann Dopamin auch über den Dopamintransporter (DAT) aus dem Extrazellulärraum aufgenommen werden (Sulzer et al., 2000). Das Dopamin wird dann durch den vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2) in synaptischen Vesikel und Endosomen transportiert, wo es akkumuliert wird. Zytosolisches Dopamin wird durch Monoaminoxidasen (MAO) in den Mitochondrien verstoffwechselt und abgebaut. Weiterhin können zytosolisches Dopamin sowie L-Dopa durch eine Eisen-katalysierte Oxidation zu Quinonen und Semiquinonen im Zytosol der Neurone oxidiert werden. Diese Quinone reagieren mit Cystein, Proteinen und Lipiden und werden in autophagische Lysosomen aufgenommen, wo sie als Neuromelanin gespeichert werden, welches sich mit dem Alter akkumuliert und für die Färbung katecholaminerger Neuronensomata sorgt (Sulzer et al., 2000).

Aus dem Dopamin wird in den synaptischen Vesikeln durch das Enzym Dopamin- β -Hydroxylase NE gebildet (Levin et al., 1960; Sulzer et al., 2000). Für diese Umwandlung benötigt die Dopamin- β -Hydroxylase Vitamin C als Koenzym (Menniti et al., 1986). In den Vesikeln können neben NE auch noch Dopamin enthalten sein (Ranjbar-Slamloo & Fazlali, 2020). NE kann in adrenergen Neuronen durch Methylierung, vermittelt über die Phenylethanolamin-N-Methyltransferase (PNMT), schließlich zu Adrenalin umgewandelt werden (Fuller, 1982). Die intrazellulären Katecholaminspiegel werden durch folgende Mechanismen reguliert: die Feedback-Hemmung der TH, den Abbau durch mitochondriale

Monoaminoxidasen, die Akkumulation von Dopamin mittels VMAT2 in Vesikeln sowie durch die Aufnahme von Dopamin aus dem Zytosol durch den DAT (Sulzer et al., 2000).

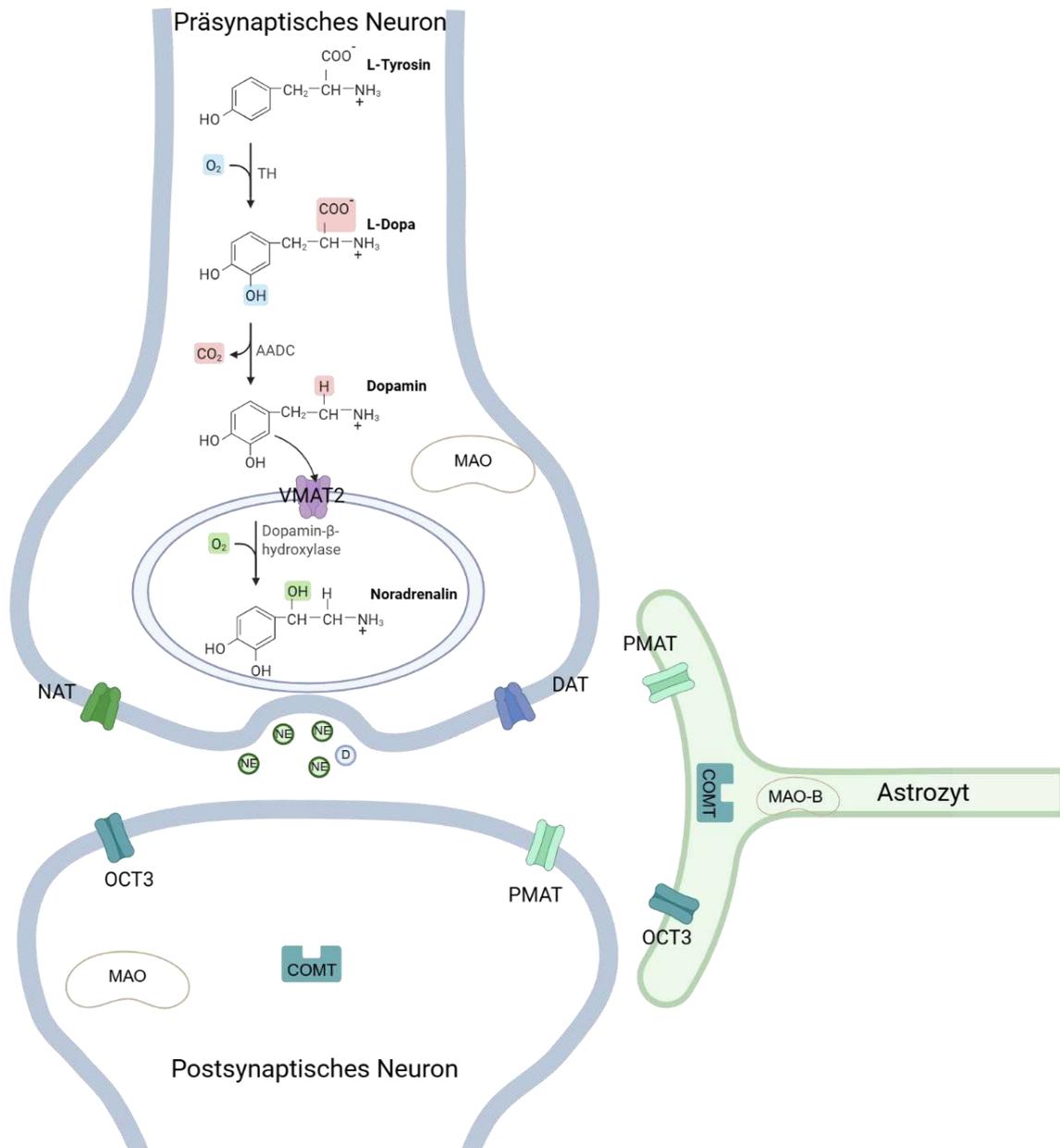


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Synthese, Freisetzung, zellulärer Aufnahme und Abbau von Dopamin und Noradrenalin in Neuronen und Astrozyten

Schematische Darstellung der Dopamin- (D) und Noradrenalin- (NE) Synthese im präsynaptischen Neuron sowie ihre Verpackung über den vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2) in Vesikel. Nach der Freisetzung in den synaptischen Spalt werden die Neurotransmitter über hochaffine Monoamintransporter – den Dopamintransporter (DAT) bzw. den Noradrenalintransporter (NAT) wieder in die präsynaptische Endigung rückaufgenommen. Dort erfolgt entweder eine erneute Verpackung in Vesikeln oder ein enzymatischer Abbau durch Monoaminoxidasen (MAO) in den Mitochondrien. Astrozyten und postsynaptische Neurone nehmen Monoamine über niederaffine Transporter wie den organischen Kationentransporter 3 (OCT3) oder den Plasmamembran-Monoamintransporter (PMAT) auf. In ihrem Zellinneren erfolgt dann der Abbau durch MOA – bei Astrozyten insbesondere MOA-B – sowie Catechol-O-Methyltransferasen (COMT).

Rezeptoren und ihre Subtypen für Dopamin und NE sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt und werden im Folgetext erläutert. Syntheseweg basierend auf einer Vorlage von Biorender.com nach Purves et al. (2018).

Mittels hochaffiner Transporter werden die Katecholamine wieder aus dem synaptischen Spalt in die präsynaptische Terminale aufgenommen – NE durch den Noradrenalintransporter (NAT) und Dopamin durch den DAT. Dopamin kann teilweise auch über den NAT aufgenommen werden (Kaenmaki et al., 2010; Ranjbar-Slamloo & Fazlali, 2020). Beide Neurotransmitter, Dopamin und NE, werden dann im präsynaptischen Neuron erneut in Vesikel verpackt. Astrozyten im OB sowie in anderen Hirnregionen wie dem Kortex exprimieren niederaffine Monoamintransporter, darunter den organischen Kationentransporter 3 (OCT3) sowie den Plasmamembran-Monoamintransporter (PMAT), über die sie Katecholamine aus dem Extrazellulärraum aufnehmen können (Engel et al., 2004; Petrelli et al., 2020; Sardar et al., 2023). Auch postsynaptische Neurone nehmen NE und Dopamin durch PMAT und OCT3 auf (Holleran et al., 2020). Nach der Katecholaminaufnahme in postsynaptische Neurone oder Astrozyten werden sie durch die MAO bzw. MAO-B in Astrozyten, oder die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) abgebaut (Kaenmaki et al., 2010; Levitt et al., 1982).

1.4.2 Dopaminerge Rezeptoren

Arvid Carlsson entdeckte Dopamin als eigenständigen Neurotransmitter in den 1950er Jahren – eine Entdeckung für die er später mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde (Iversen & Iversen, 2007). Keabian and Calne (1979) unterschieden die Dopamin-Rezeptortypen in zwei Gruppen: D₁-Rezeptoren, die ACs stimulieren und für die Produktion von cAMP sorgen, und D₂-Rezeptoren, die die Aktivität der ACs inhibieren. Im weiteren Verlauf wurden drei weitere Rezeptoren gefunden und die Rezeptorfamilien erweitert. Die Familie der G_s-gekoppelten D₁-Rezeptorfamilie umfasst die D₁- und D₅-Rezeptoren und die Familie der G_i-gekoppelten D₂-Rezeptoren die D₂-, D₃- und D₄-Rezeptoren (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Missale et al., 1998). Die einzelnen Rezeptoren der D₁- und D₂-Rezeptorfamilien besitzen einen hohen Homologiegrad innerhalb ihrer Transmembrandomänen (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). Die D₁-Rezeptorfamilie befindet sich dabei exklusiv postsynaptisch, während die Rezeptoren der D₂-Rezeptorfamilie sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert sind (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit steht die Terminologie D₁- und D₂-Rezeptoren jeweils für die entsprechende Rezeptorfamilie.

Für Astrozyten in der GL des OB konnte bereits in juvenilen Mäusen gezeigt werden, dass sie D₁- und D₂-Rezeptoren exprimieren und über diese Ca²⁺-Signale aus internen Speichern vermitteln, wobei bislang unklar ist, ob dies über Homo- oder Heteromere geschieht (Fischer et al., 2020).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Dopamin und NE kann Dopamin auch an adrenerge Rezeptoren binden und diese aktivieren – darunter sowohl α₁-Rezeptoren als auch α₂- und β-Rezeptoren (Lei, 2014). Diese Kreuzreaktivität könnte potenziell auch in astrozytären Signalwegen von essenzieller funktioneller Bedeutung sein (Koppel et al., 2018).

1.4.3 Adrenerge Rezeptoren

Eine erste Einteilung der adrenergen Rezeptoren, die durch die Katecholamine NE und Adrenalin gleichermaßen aktiviert werden, erfolgte durch Ahlquist (1948). Er unterschied die α- und β-Rezeptoren anhand der Reaktion auf die Applikation sechs verschiedener Amine in Versuchstieren (Ahlquist, 1948). Eine weitere Differenzierung von zwei verschiedenen β-Rezeptoren in die Subtypen β₁ und β₂ erfolgte 1967 (Lands et al., 1967). Der β₃-Rezeptor wurde später durch Bylund et al. (1994) ergänzt.

Die α-Rezeptorfamilie unterteilt sich ebenfalls in mehrere Subtypen: Zunächst erfolgte die Einteilung der α₂-Rezeptoren in die Subtypen α_{2A}, α_{2B} und α_{2C} (Bylund et al., 1994). Aufgrund einer bis dahin herrschenden Diskrepanz zwischen den pharmakologisch definierten und den rekombinanten α₁-Rezeptorsubtypen existiert seit 1995 die Klassifizierung der α₁-Rezeptoren in die Subtypen α_{1A}, α_{1B} und α_{1D} (Bylund et al., 1994; Hieble et al., 1995). Bei allen adrenergen Rezeptoren handelt es sich um metabotrope Rezeptoren, die mit verschiedenen G-Proteinen gekoppelt sind. Die α₁-Rezeptoren sind G_{q/11}-gekoppelt, die α₂-Rezeptoren G_i- und die β-Rezeptoren G_s-gekoppelt (Neves et al., 2002; Strosberg, 1993). Während die β-Rezeptoren also die ACs stimulieren, werden sie über die Aktivierung von α₂-Rezeptoren inhibiert. Die Aktivierung der G_{q/11}-gekoppelten α₁-Rezeptoren aktiviert den PLC/IP₃-Weg (Neves et al., 2002). Sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen besitzen Astrozyten α- und β-Rezeptoren (Rosenberg et al., 2023). Durch frühere Studien ist bekannt, dass Astrozyten in der GL im OB auf die Applikation von NE über α₁- und α₂-Rezeptoren mit Ca²⁺-Signalen reagieren (Fischer et al., 2021).

Darüber hinaus spielt NE nicht nur eine wichtige Rolle bei der Modulation neuronaler und glialer Aktivität, sondern nimmt in der Entwicklung der Astrozyten Einfluss auf ihre Morphologie und somit später auf das Verhalten adoleszenter Tiere. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des β -Rezeptors zu einer erhöhten Verzweigung der Astrozyten führte (Rosenberg et al., 2023). Dies verdeutlicht, dass noradrenerge Signalwege langfristige strukturelle Veränderungen in Astrozyten beeinflussen können.

1.5 Adenylatzyklen

cAMP wurde 1958 von Sutherland & Rall als zentraler intrazellulärer Botenstoff entdeckt (Sutherland & Rall, 1958). ACs katalysieren die Umwandlung von ATP zu cAMP und sind zentrale Effektoren zellulärer Signalwege. Der im Tier- und Pflanzenreich evolutionär konservierte sekundäre Botenstoff cAMP reguliert zahlreiche Prozesse wie Gedächtnisbildung, Stoffwechsel, Genregulation sowie Immunfunktionen (Serezani et al., 2008).

Bei Säugetieren existieren zehn verschiedene Isoformen der ACs. Während neun Isoformen (AC1–AC9) als transmembrane Proteine in der Plasmamembran verankert sind, liegt eine Isoform (AC10, oftmals sAC¹, engl. *soluble adenylyl cyclase*) gelöst im Zytoplasma und Nucleus vor (Devasani & Yao, 2022). Die Gene *ADCY1* bis *ADCY10* der einzelnen Isoformen liegen dabei jeweils auf verschiedenen Chromosomen vor und unterliegen daher einer Isoform-spezifischen Regulation (Devasani & Yao, 2022). In den verschiedenen Schichten des OB werden folgende AC-Isoformen exprimiert: AC1, AC2, AC3, AC5, AC6, AC7, AC8 und AC9. Dabei ist bekannt, dass alle diese AC-Isoformen auch generell in Astrozyten des ZNS exprimiert werden (Devasani & Yao, 2022). Bei Säugetieren spielt cAMP eine wichtige Rolle für die olfaktorische Signaltransduktion: Die Bindung eines Geruchsmoleküls an ein ORN im Riechepithel löst die Stimulation des G-Proteins G_{olf} aus, welches zur Stimulation der AC3 führt (Gancedo, 2013).

¹ In dieser Arbeit wird AC10 anstelle von sAC für die lösliche Adenylatzyklase verwendet, um eine Verwechslung mit der ebenfalls gebräuchlichen und hier verwendeten Abkürzung für *short axon cell* (sAC) zu vermeiden.

Die membrangebundenen AC-Isoformen bestehen jeweils aus zwei Transmembrandomänen mit je sechs α -Helices. Der N- und der C-Terminus sowie zwei zytoplasmatische Domänen C1 und C2 befinden sich alle im Zytoplasma der Zelle. Die Domänen C1 und C2 unterteilen sich weiterhin jeweils in zwei Subdomänen: Während die C1a und C2a katalytisch aktiv und hoch konserviert innerhalb der neun Transmembran-Isoformen sind, befinden sich die Subdomänen C1b und C2b auf der regulatorischen Seite (Dessauer et al., 2017; Devasani & Yao, 2022).

Die Regulation der ACs erfolgt Isoform-spezifisch. Während alle membrangebundenen Isoformen durch G_s stimuliert werden können, variiert ihre Hemmung über G_i sowie ihre weitere Modulation stark zwischen den Isoformen. Zusätzlich zur klassischen G_s/G_i -Vermittlung können ACs auch über den $\beta\gamma$ -Komplex des G-Proteins sowie durch Proteinkinasen oder über *exchange protein directly activated by cAMP* (EPAC) reguliert werden, an die das gebildete cAMP bindet (Devasani & Yao, 2022). Die Aktivität der AC10 hingegen wird nicht von G-Proteinen reguliert, sondern von intrazellulär vorliegendem Bicarbonat und Ca^{2+} (Litvin et al., 2003). Einige membranständige AC-Isoformen können ebenfalls durch intrazelluläres Ca^{2+} moduliert werden. Das gebildete cAMP wird intrazellulär durch Phosphodiesterasen abgebaut, deren Aktivität wiederum einer komplexen Regulation durch cAMP, zyklischem Guanosinmonophosphat (engl. *cyclic guanosine monophosphate*, cGMP), Ca^{2+} /Calmodulin (CaM) und verschiedenen Proteinkinasen unterliegen (Gancedo, 2013).

1.6 Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation untersucht die Reaktion von Astrozyten in der GL des OB auf die neuromodulatorischen Signalstoffe NE, Dopamin und Adenosin. Der Fokus liegt dabei insbesondere auf der intrazellulären Signalweiterleitung über cAMP – einem sekundären Botenstoff von zentraler Bedeutung, dessen Funktion in Astrozyten des OB bislang unzureichend charakterisiert ist.

Während für die Untersuchung von Ca^{2+} -Signalen seit langer Zeit sowohl chemische als auch genetisch kodierte Ca^{2+} -Indikatoren verfügbar waren (Lohr et al., 2021), mangelte es an cAMP-Sensoren. Mittels des genetisch kodierten cAMP-Indikators Flamingo2 (engl. *fluorescent cAMP indicator*) (Odaka et al., 2014) ist es nun möglich intrazelluläre cAMP-Signale in Zellen akuter Hirnschnitte zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Signalwege zu charakterisieren, über welche die Neuromodulatoren NE, Dopamin und Adenosin die cAMP-Dynamik in Astrozyten der GL beeinflussen. Aufbauend auf bisherigen Arbeiten, die NE-, Dopamin- und Adenosin-induzierte Ca^{2+} -Signale beschreiben (Doengi et al., 2008; Fischer et al., 2021; Fischer et al., 2020), liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Identifizierung der an der cAMP-Regulation beteiligten Rezeptoren sowie der nachgeschalteten Signalwege. Im Zentrum der Untersuchung steht die Frage, über welche G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ACs die beobachteten cAMP-Signale vermittelt werden, insbesondere im Hinblick auf die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung spezifischer AC-Isoformen. Zusätzlich wird untersucht, ob über die Aktivierung verschiedener G_i -Protein-gekoppelter Rezeptoren eine Reduktion der cAMP-Konzentration durch Inhibition der ACs hervorgerufen werden kann.

Die Effekte von NE, Dopamin und Adenosin auf die Induktion von cAMP-Signalen wurden in separaten Publikationen bzw. einem Manuskript dargestellt und im Rahmen dieser Dissertation kontextualisiert.

2. Crosstalk of noradrenergic Ca²⁺ and cAMP signaling in astrocytes of the murine olfactory bulb

Crosstalk of noradrenergic Ca²⁺ and cAMP signaling in astrocytes of the murine olfactory bulb

Jessica Sauer¹, Antonia Beiersdorfer^{1,2}, Franz Lennart Schmidt¹, Mathias Nordbeck^{1,3}, Oana Constantin⁴, Daniela Hirnet¹, Christine E. Gee⁴, Christian Lohr¹

¹Division of Neurophysiology, University of Hamburg, Germany

²Center for Translational Neuromedicine, University of Copenhagen, Denmark

³Sorbonne Université, Institut du Cerveau - Paris Brain Institute - ICM, Inserm, CNRS, APHP, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris, France

⁴Institute of Synaptic Physiology, ZMNH, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany

Abstract

Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and Ca²⁺ are ubiquitous second messengers that regulate gene expression, metabolism, and synaptic plasticity. Here, we identified a complex interplay between Ca²⁺ and cAMP signaling pathways in mouse olfactory bulb astrocytes. Norepinephrine (NE) elevated both Ca²⁺ and cAMP levels via α_1 and α_2 adrenergic receptors, whereas β receptors triggered only cAMP responses. The α_1 receptor agonist phenylephrine increased cAMP, but this effect was suppressed when Ca²⁺ elevations were blocked by Ca²⁺ depletion and removal of external Ca²⁺. We found that α_{1A} and α_{1D} receptors are key targets for phenylephrine, acting through Ca²⁺/calmodulin-dependent adenylyl cyclases AC1 and AC3 downstream of α_1 receptor activation. Moreover, α_2 receptor stimulation raised Ca²⁺ levels, thereby stimulating cAMP production, yet also reduced forskolin-induced cAMP elevations, indicating that α_2 receptors can both inhibit adenylyl cyclase via G_i and stimulate AC1/AC3 via Ca²⁺ signaling. Together, these findings reveal intricate crosstalk between noradrenergic Ca²⁺ and cAMP signaling in olfactory bulb astrocytes mediated by all three adrenergic receptor subtypes.

Key words: Norepinephrine, adenylyl cyclase, phenylephrine, cyclic adenosine monophosphate, Ca²⁺, astrocytes

Introduction

The locus coeruleus (LC) serves as the primary source of norepinephrine (NE) in the brain, where NE is synthesized in noradrenergic neurons by beta-hydroxylation of dopamine (Fuller, 1982). Notably, approximately 40 % of all LC neurons project to the olfactory bulb (OB), a number that is tenfold greater than projections to any other region of the cerebral cortex (Shipley et al., 1985). NE and its effects on neural dynamics in the OB are essential for the formation of stable and specific olfactory memories (Linster et al., 2020). NE enhances the contrast of weak neuronal sensory inputs in the OB by modulating mitral cell responses (Linster et al., 2011). The NE system plays a pivotal role in both health and disease. In Parkinson's Disease, for instance, not only does the substantia nigra degenerate, but so does the LC, with olfactory dysfunction being one of the early symptoms (Paredes-Rodriguez et al., 2020). In addition, dysfunction of astrocytes is also implicated in the onset of neurological disorders (Zhang et al., 2023). Astrocytes are multifunctional glial cells that play a crucial role in maintaining homeostasis of the central nervous system (CNS), modulating information processing at molecular, cellular and whole network levels, and mediating both beneficial and detrimental effects during neuropathological diseases (Escartin et al., 2021; Lohr, 2023; Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

Noradrenergic receptors were initially classified into α and β receptors, the α receptors being further subdivided into α_1 and α_2 receptors (Ahlquist, 1948; Lands et al., 1967). α_2 receptors are known to be coupled to G_i and inhibit adenylyl cyclase (AC) activity, whereas β receptors are coupled to G_s , leading to AC stimulation, and α_1 receptors are coupled to G_q , stimulating PLC/IP₃-dependent Ca^{2+} release from internal stores (Neves et al., 2002; Strosberg, 1993). Astrocytes throughout the brain exhibit Ca^{2+} transients following activation of α_1 receptors (Wahis & Holt, 2021). However, astrocytic processes in the OB are located in close proximity to noradrenergic fibers and respond to NE application with Ca^{2+} signaling not only via α_1 but also α_2 receptors (Fischer et al., 2021). Besides Ca^{2+} , cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is another ubiquitous second messenger, synthesized

from ATP by ACs. cAMP regulates a plethora of cellular functions such as gene transcription and translation. It plays significant roles in neurodevelopment and activity-dependent modifications of neuronal performance (Chen et al., 2022). Astrocytes respond to several neurotransmitters and other signaling molecules with increases in cAMP, including NE (Horvat et al., 2016; Oe et al., 2020), dopamine (von Kalben et al., 2024), adenosine (Theparambil et al., 2024; Wendlandt et al., 2023) and lactate (Vardjan et al., 2018). In astrocytes, cAMP signaling is involved in glucose metabolism (Choi et al., 2012; Hasel et al., 2017; Theparambil et al., 2024; Vardjan et al., 2018), local regulation of blood flow (Vittani et al., 2025), exocytosis (Vardjan & Zorec, 2015), synaptic plasticity (Sitjà-Roqueta et al., 2025) and behavior such as vigilance and memory formation (Oe et al., 2020; Shigetomi & Koizumi, 2023; Zhou et al., 2021; Zorec et al., 2015). To date, ten isoforms of ACs have been characterized in mammals. Nine of them are membrane bound, activated by G_s and inhibited by G_i (Devasani & Yao, 2022). Three of these AC isoforms (AC1, AC3, and AC8) are Ca^{2+} /CaM-stimulated, in addition to their activation by G_s (Chen et al., 2022). They could play a central role in the integration between Ca^{2+} and cAMP signaling, but direct evidence for this crosstalk is missing in astrocytes (Sobolczyk & Boczek, 2022). In addition, soluble adenylyl cyclase isoform 10 can be activated by Ca^{2+} and HCO_3^- , while being independent of G_s and G_i (Li et al., 2024). Ca^{2+} -dependent adenylyl cyclases enable functional interaction between both second messenger systems, however, no detailed study of Ca^{2+} /cAMP interactions on the single cell level exists in astrocytes.

In the present study, we investigated NE-induced cAMP and Ca^{2+} signals in astrocytes of the mouse OB, which is the first center of olfactory information processing (Rotermund et al., 2019). Although NE-induced cAMP signaling has been extensively studied in various cortical regions and in the hippocampus, noradrenergic cAMP signaling remains underexplored in astrocytes of the OB, despite its significant innervation by projections from the LC (Gao et al., 2016; Nomura et al., 2014; Oe et al., 2020; Shipley et al., 1985). To investigate cAMP dynamics in the olfactory bulb, we expressed the genetically encoded cAMP sensor Flamingo2 (Odaka et

al., 2014) in astrocytes and performed confocal cAMP imaging on acute olfactory bulb slices. Ca^{2+} was visualized by GCaMP6s and jRCaMP1a expressed by astrocytes. Our results demonstrate that NE induces cAMP signals in OB astrocytes via α_1 , α_2 , and β receptors, while Ca^{2+} signals were triggered by α_1 and α_2 receptors only. Notably, rises in the cAMP concentration via activation of α receptors were dependent on Ca^{2+} release from internal stores such as the ER, whereas cAMP signals induced via β receptors were entirely Ca^{2+} -independent. cAMP signals evoked by the α_1 agonist phenylephrine (PE) were blocked by antagonists of α_{1A} and α_{1D} subtypes and were suppressed by inhibitors of AC1 and AC3. We conclude that NE directly induces an increase in cAMP by activation of β receptors coupled to G_s , and indirectly by activation of α_1 and α_2 receptors leading to Ca^{2+} release from internal stores, thereby stimulating Ca^{2+} /CaM-dependent AC1 and AC3.

Results

Norepinephrine evokes cAMP signals in astrocytes of the olfactory bulb

To study NE-induced cAMP signaling in astrocytes of the OB we used the genetically encoded cAMP indicator Flamindo2 that consists of circularly permuted Citrine, a mutant of yellow fluorescent protein, fused with the cAMP binding domain of mouse EPAC1 (exchange protein directly activated by cAMP; Fig. 1A, B) (Odaka et al., 2014). We took advantage of AAV-driven Flamindo2 expression controlled by the astrocyte-specific *gfaABC1D*-promoter (Lee et al., 2008) after retro-bulbar injection and used brain slices including the olfactory bulb 3-6 weeks after virus injection (Fig. 1C-E). We confirmed that Flamindo2 is expressed exclusively in astrocytes by its co-localization with the astrocytic markers GFAP and S100B (Fig. 1F, G). Approximately 50 % of the astrocytes in the glomerular and external plexiform layer of the OB were transduced. Conformational changes in Flamindo2 upon cAMP binding decreases fluorescence (Odaka et al., 2014) (Fig. 1H). Note that subsequent Flamindo2 traces have been inverted ($-\Delta F$) to represent increases in cAMP more intuitively (Fig. 1I; see (Wendlandt et al., 2023)). The cAMP sensor Flamindo2 is pH-sensitive and NE-evoked fluorescence changes could be due to pH

changes rather than cAMP changes (Odaka et al., 2014). Therefore, we tested the effect of NE application on intracellular pH in astrocytes loaded with the pH indicator pHrodo Red (fig. s1A). Application of NE did not evoke changes in pH. In contrast, addition of 5 mM NH_4Cl evoked an acidification that was accompanied by a decrease in Flamindo2 fluorescence, confirming that Flamindo2 fluorescence is pH-sensitive. Our results indicate that NE-induced Flamindo2 fluorescence signals were not mediated by pH changes but reflect cAMP changes (fig. s1B).

To elucidate the dose/response relationship of NE-induced cAMP signals in astrocytes, we applied different concentrations of NE (Fig. 1J). Application of 1 to 30 μM NE led to a dose-dependent increase in cAMP signals with an EC_{50} of $1.72 \pm 0.19 \mu\text{M}$ (Fig. 1K; table s1). All astrocytes expressing Flamindo2 responded to concentrations of 10 μM and higher, and we applied 10 μM NE to induce maximal cAMP responses in OB astrocytes in further experiments

NE-induced cAMP signals are independent of neuronal activity and mediated via α_1 , α_2 , and β adrenergic receptors

Since NE increases the excitability of neurons in the OB (Linster et al., 2011), we used 0.5 μM tetrodotoxin (TTX) to suppress action potentials in neurons contributing to NE-evoked cAMP signaling in astrocytes. NE was able to induce increases in cAMP when action potentials were blocked with TTX, however, the amplitude of NE-evoked cAMP signals decreased from $37.0 \pm 1.3 \%$ $-\Delta F$ ($n = 92$) without TTX to $24.0 \pm 0.8 \%$ $-\Delta F$ ($n = 144$) with TTX, indicating some contribution from neurons (fig. s2A-C). To block any residual, TTX-insensitive neuronal effect, we assessed NE-induced cAMP responses in the additional presence of glutamatergic and GABAergic receptor inhibitors using a blocker mix (BM) consisting of TTX (0.5 μM), the NMDA receptor antagonist D-APV (50 μM), the AMPA receptor antagonist NBQX (10 μM), the GABA_A receptor antagonist gabazine (5 μM), and the GABA_B receptor antagonist CGP 55845 (10 μM). During BM application, the mean amplitude reached $102 \pm 3.8 \%$ of the response in TTX alone, which was not significantly different ($p = 0.206$; Wilcoxon), indicating that in the presence of TTX, NE directly increases astrocytic cAMP without a significant contribution from neuronal transmitter release (Fig. 2A)

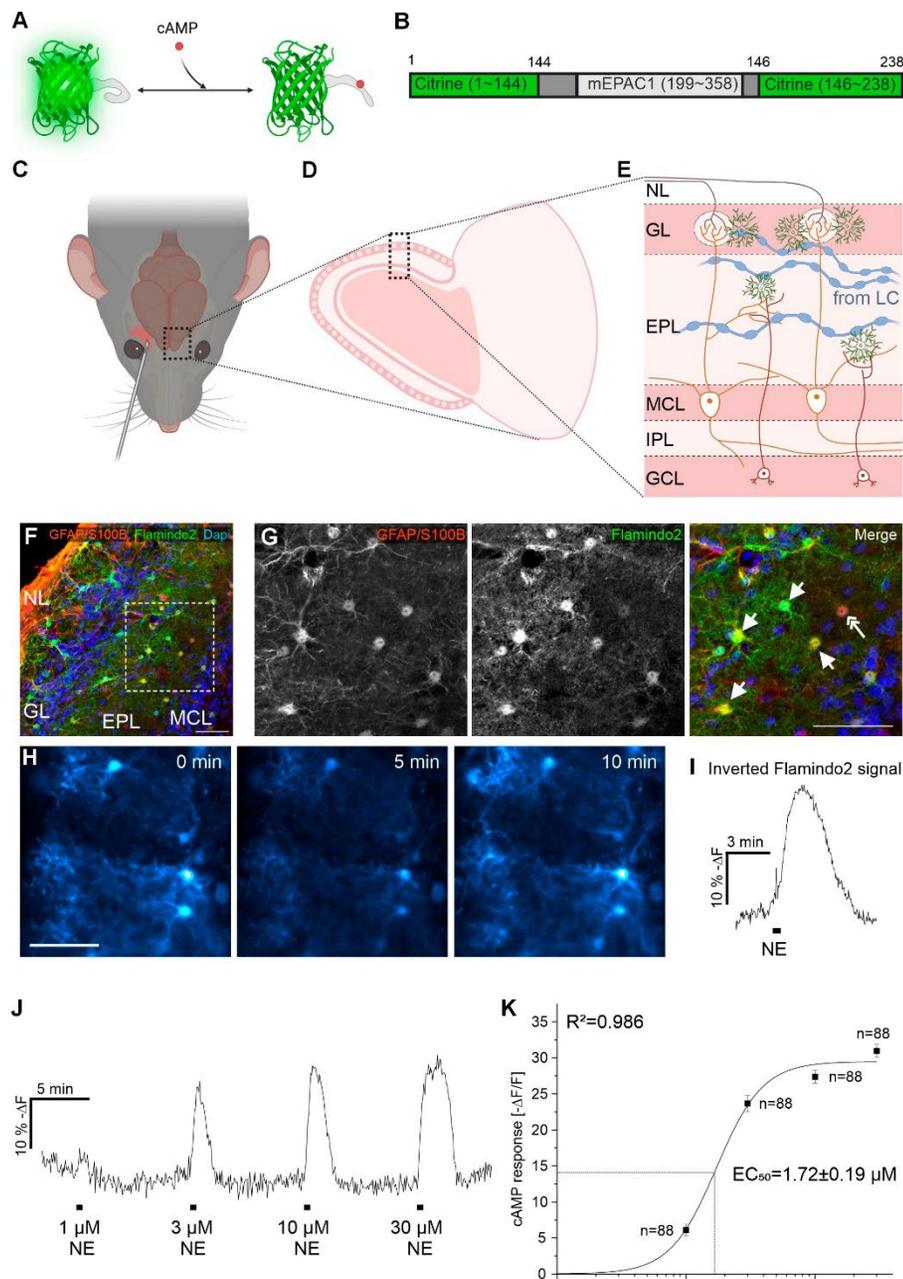


Fig. 1 Norepinephrine induces cAMP signals in astrocytes of the olfactory bulb

(A) Schematic structure of Flamindo2. Note the decrease in fluorescence upon binding of cAMP. (B) Flamindo2 is derived from the yellow fluorescent protein (YFP) mutant, Citrine, and includes the cAMP binding site of mouse EPAC1 (exchange protein directly activated by cAMP) (Odaka et al., 2014). (C) Adeno-associated viral vectors (AAVs) carrying the Flamindo2 gene were injected into the retro-bulbar sinus. (D) Structure of a sagittal slice of the olfactory bulb. (E) Simplified cellular organization of the olfactory bulb: Axons of sensory neurons in the olfactory epithelium enter the nerve layer (NL) and form synapses with mitral cells in the glomerular layer (GL). Dendrites of mitral cells extend through the external plexiform layer (EPL). Cell bodies of mitral cells are located in the mitral cell layer (MCL), their axons proceeding through the internal plexiform layer (IPL) towards the olfactory cortex. The granular cell layer (GCL) contains the cell bodies of granular cells. Centrifugal fibers from the locus coeruleus (LC) containing varicosities innervate the olfactory bulb. Mitral cells are shown in orange color, granular cells in red, and astrocytes in green, centrifugal fibers in blue. (F) Immunostaining against Flamindo2 (anti-GFP; green) confirms the expression of Flamindo2 in olfactory bulb astrocytes

labeled with anti-GFAP/anti-S100B (red). Nuclei were labeled with Dapi (blue). Scale bar: 50 μm (G) Magnified view of astrocytes in the olfactory bulb. Arrows indicating co-expression of Flamindo2 and GFAP/S100B, the double arrow indicates an astrocyte that is Flamindo2-negative. Scale bar: 50 μm . (H) Fluorescence of a Flamindo2-expressing olfactory bulb slice prior to (0 min) and during a 30 s application of 10 μM norepinephrine (NE) (5 min). Flamindo2 fluorescence recovered following NE washout (10 min). Scale bar: 50 μm . (I) Exemplary Flamindo2 fluorescence trace of a single astrocyte during NE application (10 μM , 30 s). Note the inverted vertical axis ($-\Delta F$) applied to better reflect the changes in astrocytic cAMP concentration. (J) Astrocytic cAMP signals evoked by a range of NE concentrations. (K) Dose-response-curve of norepinephrine-induced cAMP signals. Data from 3 mice.

We tested the involvement of α_1 , α_2 , and β adrenergic receptor subtypes by assessing the effect of subtype-specific antagonists on NE-induced cAMP signaling in

astrocytes in the presence of TTX and glutamatergic/GABAergic antagonists. The antagonists prazosin (10 μM , α_1 receptor) and rauwolscine (0.5 μM ,

α_2 receptor) significantly decreased NE-evoked astrocytic cAMP responses to $60 \pm 1.5\%$ ($n = 116$; Fig. 2B) and $43 \pm 1.7\%$ ($n = 167$; Fig. 2C) of their respective controls. The β receptor antagonist ICI 118,551 ($15 \mu\text{M}$) reduced the NE-induced cAMP responses to $38 \pm 1.2\%$ of the control ($n = 57$; Fig. 2D), whereas a combination of all three antagonists completely blocked NE-evoked increases in cAMP ($n = 79$; Fig. 2E). These results, summarized in Fig. 2F, suggest that all three noradrenergic receptor subtypes contribute to astrocytic cAMP. We next used subtype-specific agonists (in the presence of $0.5 \mu\text{M}$ TTX) to verify the results. $100 \mu\text{M}$ phenylephrine (PE; α_1 receptor agonist), $80 \mu\text{M}$ xylazine (α_2 receptor agonist) and $100 \mu\text{M}$ isoprenaline (β receptor agonist) increased cAMP in OB astrocytes (Fig. 2G, H). Isoprenaline induced the largest cAMP signals with an amplitude of $22.3 \pm 0.7\%$ $-\Delta\text{F}$ ($n = 86$ out of 87 cells), which were significantly larger than those induced by PE ($5.6 \pm 0.4\%$ $-\Delta\text{F}$, $n = 22$ out of 30 cells; $p < 0.001$) and xylazine ($10.6 \pm 0.7\%$ $-\Delta\text{F}$, $n = 33$ out of 66 cells; $p < 0.001$) (fig. s3). Whereas 99 % of the astrocytes responding to NE also increased cAMP in response to isoprenaline, only 73 % and 48 % of NE-responsive astrocytes responded to PE and xylazine, respectively (Fig. 2I). Since α_2 receptors are known to couple to G_i and inhibit cAMP production, the cAMP increase mediated by the α_2 receptor agonist xylazine was surprising. Interestingly, xylazine was also able to decrease $3 \mu\text{M}$ forskolin-induced cAMP production, indicating that α_2 receptors in OB astrocytes couple to the G_i adenylyl cyclase-inhibiting pathway in addition to stimulating cAMP production ($-17.7 \pm 0.7\%$ $-\Delta\text{F}$ from forskolin peak, $n = 173$, Fig. 2J, K).

NE-induced cAMP signals partly depend on Ca^{2+} signals

Our results indicate that in OB astrocytes, not only β -adrenergic receptors but also α_1 and α_2 receptors trigger cAMP production. Previously, we showed that α_1 and α_2 receptors increase Ca^{2+} in OB astrocytes (Fischer et al., 2021), raising the question whether NE-evoked Ca^{2+} activates ACs to increase cAMP. To investigate Ca^{2+}

and cAMP signals simultaneously, we combined the red fluorescent Ca^{2+} indicator jRCaMP1a with Flamingo2 (Fig. 3A, B). Since repetitive application of NE leads to diminishing Ca^{2+} transients (rundown) (Fischer et al., 2021), we first characterized the rundown of NE-induced cAMP signals (Fig. 3C). Initial applications of NE led to cAMP and Ca^{2+} signals with amplitudes of $24.0 \pm 0.8\%$ $-\Delta\text{F}$ for cAMP ($n=144$) and $31.5 \pm 2.3\%$ ΔF for Ca^{2+} ($n = 36$; Fig. 3C). Second applications resulted in cAMP and Ca^{2+} transients that were $92 \pm 1.9\%$ of the first response for cAMP ($n = 144$; $p < 0.001$) and $78 \pm 2.2\%$ of the first response for Ca^{2+} ($n = 36$; $p < 0.001$). NE-evoked Ca^{2+} signals consisted of two components; a fast, transient Ca^{2+} rise reflecting Ca^{2+} release from intracellular stores, and a sustained plateau phase reflecting activation of store-operated Ca^{2+} entry upon store depletion, the latter being best described by the area under the curve (Fischer et al., 2021). Therefore, we additionally calculated the area under the curve of the Ca^{2+} signals, which was reduced to $74 \pm 3.6\%$ of the first response upon a second application of NE ($n = 36$; Fig. 3C, G).

We used the second application of the rundown experiment in Fig. 3C as the control group and compared these Ca^{2+} and cAMP transients to the responses after pharmacological manipulation in the following experiments. To test whether Ca^{2+} is essential for cAMP signaling, we either omitted Ca^{2+} in the ACSF to prevent Ca^{2+} influx or inhibited the sarco-/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases (SERCA) with $20 \mu\text{M}$ cyclopiazonic acid (CPA) to deplete intracellular Ca^{2+} stores and suppress intracellular Ca^{2+} release. Ca^{2+} store depletion was visible by a moderate increase in cytosolic Ca^{2+} which was often accompanied by a slow increase in cAMP (fig. s4A). After application of Ca^{2+} -free ACSF for ten minutes, the peak Ca^{2+} response to NE was unaffected ($75 \pm 6.3\%$ of the first response. $n = 39$; $p > 0.05$ vs rundown control), while the area under the curve was significantly reduced to $25 \pm 3.4\%$ of the first response ($n = 39$; $p < 0.001$), confirming that the plateau phase but not the fast peak depends on Ca^{2+} influx (Fig. 3D, G).

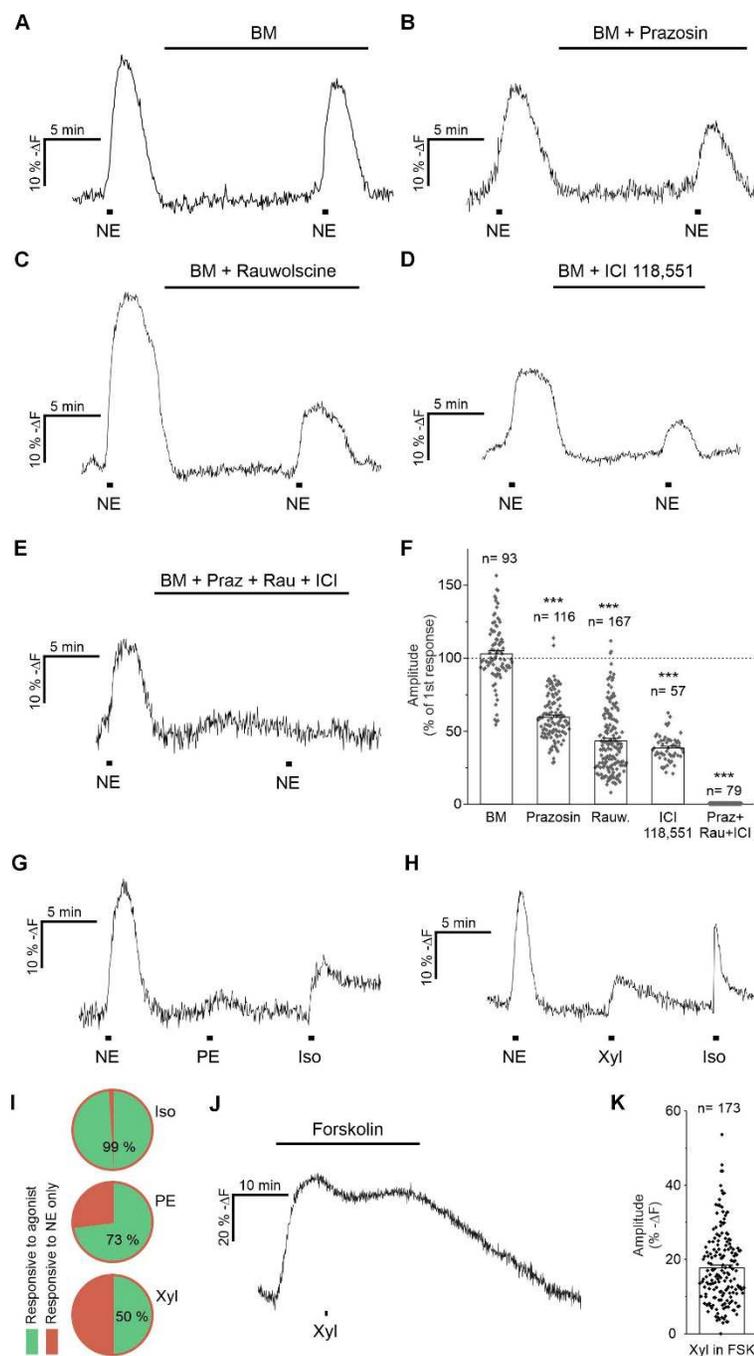


Fig. 2 Norepinephrine-induced cAMP signals are independent of neuronal activity and mediated by α_1 , α_2 and β adrenergic receptors

(A) Norepinephrine (NE)-induced cAMP signals in the presence of tetrodotoxin (TTX; first application) and TTX combined with glutamatergic and GABAergic inhibition in a blocker mix (BM) containing: 50 μ M DAPV (NMDA receptors), 10 μ M NBQX (AMPA receptors), 5 μ M Gabazine (GABA_A receptors), 10 μ M CGP 55845 (GABA_B receptors). **(B-E)** Inhibition of NE-induced cAMP signals by the noradrenergic antagonists **(B)** prazosin (α_1 ; 10 μ M), **(C)** rauwolscine (α_2 ; 0.5 μ M), **(D)** ICI 118,551 (β ; 15 μ M), and **(E)** the combination of all three antagonists. **(F)** Quantification of amplitudes of cAMP transients normalized to the amplitude of the first NE application. ***; $p < 0.001$, Kruskal Wallis ANOVA and Dunn's post hoc test. Data from 3 mice (prazosin), 3 mice (rauwolscine), 3 mice (ICI118,551) and 3 mice (Praz+Rau+ICI). **(G)** cAMP signals evoked by application of 10 μ M NE, 100 μ M phenylephrine (PE; α_1 agonist), 100 μ M isoprenaline (Iso; β agonist), and **(H)** 10 μ M NE, 80 μ M xylazine (Xyl; α_2 agonist) and 100 μ M Iso. **(I)** Fraction of astrocytes responding to Iso (total of 87 cells from 3 mice), PE (total of 30 cells from 3 mice) and Xyl (total of 66 cells from 3 mice). **(J)** Inhibitory effect of Xyl during elevation of cAMP levels upon adenylyl cyclase stimulation by 3 μ M forskolin. **(K)** Amplitudes of xylazine-evoked decreases in cAMP during application of forskolin. Data from 4 mice.

Depleting extracellular Ca^{2+} significantly reduced cAMP signals to 45 ± 4.6 % of the first response ($n = 79$; $p < 0.001$). Depleting intracellular Ca^{2+} stores by CPA almost entirely suppressed NE-evoked Ca^{2+} transients ($n = 42$) and significantly reduced cAMP signals to 65 ± 1.7 % of the first NE response ($n = 164$; $p < 0.001$, Fig. 3E, G). When Ca^{2+} -free ACSF and CPA were combined, NE-induced

Ca^{2+} signals were completely eliminated ($n = 47$; Fig. 3F, G) whereas cAMP signals with an amplitude of 22 ± 2.6 % of the first response persisted ($n = 217$; $p < 0.001$). Our results show that mechanisms whereby NE increases cAMP in OB astrocytes consists of a Ca^{2+} -dependent and a Ca^{2+} -independent component.

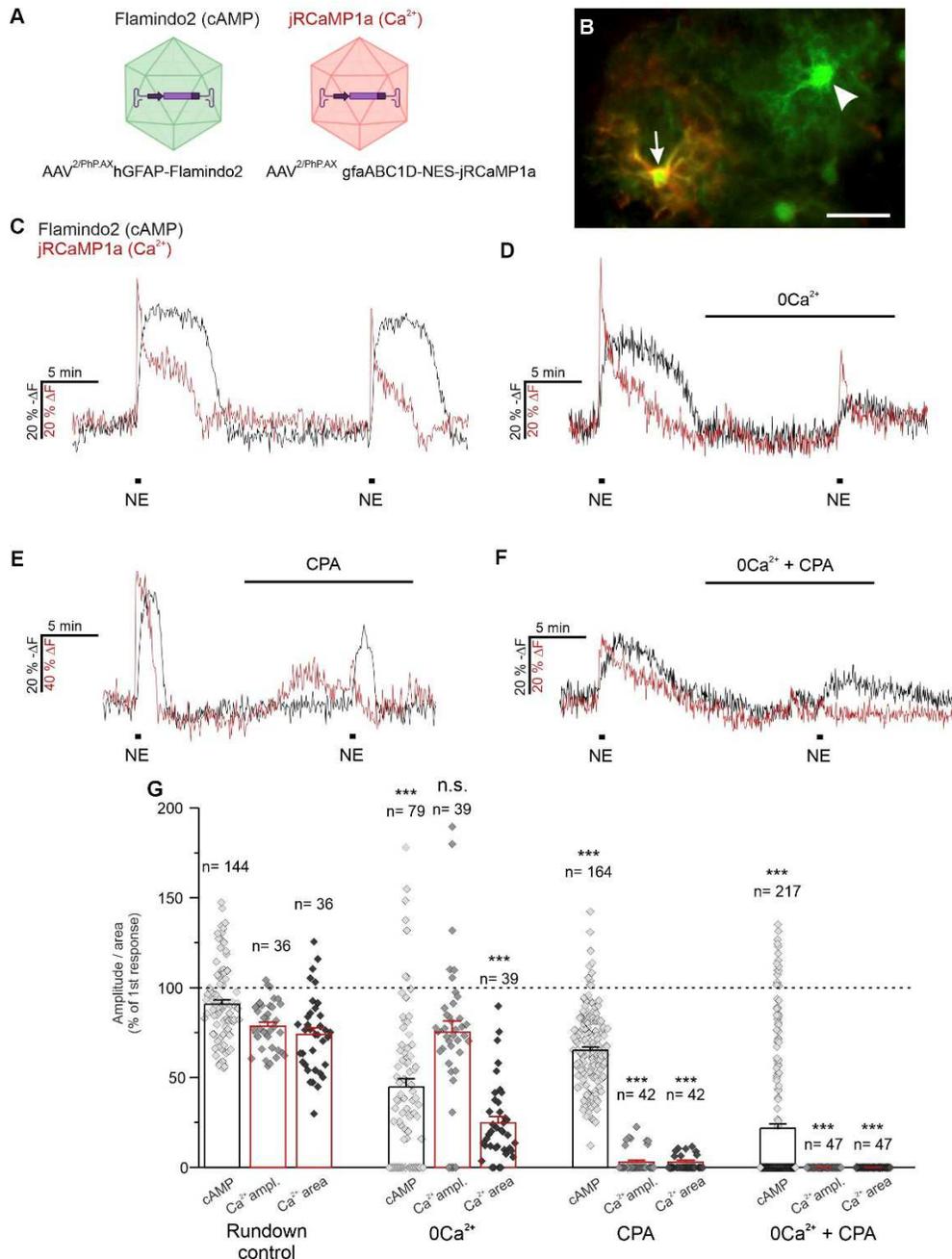


Fig. 3 Norepinephrine-induced cAMP signals are partly Ca²⁺-dependent

(A) Astrocytes were co-transduced with AAVs carrying Flamindo2 or jRCaMP1a for simultaneous cAMP and Ca²⁺ measurements. **(B)** Astrocytes in an acute brain slice co-transduced with Flamindo2 and jRCaMP1a (arrow) and Flamindo2 alone (arrowhead). Scale bar: 30 μ m. **(C)** cAMP (black) and Ca²⁺ signals (red) evoked by repetitive application of 10 μ M norepinephrine (NE) to determine rundown effects. **(D)** Effect of calcium-free ACSF (0Ca²⁺), **(E)** Ca²⁺ store depletion by 20 μ M cyclopiazonic acid (CPA), and **(F)** the combination of calcium-free ACSF and CPA on NE-evoked responses. **(G)** Quantification of cAMP and Ca²⁺ transients, compared to the corresponding response of the rundown experiment. For Ca²⁺ responses both the amplitude as well as the area under the curve were analysed. Note that most data points for Ca²⁺ amplitude and Ca²⁺ area with CPA and 0Ca²⁺/CPA have a value of zero and lie on the baseline. *** $p < 0.001$, n.s.: not significant, Kruskal Wallis ANOVA and Dunn's post hoc test. Some experiments were performed on mice only transduced with Flamindo2. Rundown control: 3 mice Flamindo2, 3 mice Flamindo2 + jRCaMP1a; 0Ca²⁺: 1 mouse Flamindo2, 3 mice Flamindo2 + jRCaMP1a; CPA: 3 mice Flamindo2, 3 mice Flamindo2 + jRCaMP1a; 0Ca²⁺ + CPA: 3 mice Flamindo2, 3 mice Flamindo2 + jRCaMP1a.

β receptors are known to directly stimulate adenylyl cyclases by G_s , suggesting that the Ca^{2+} -independent pathway is stimulated by β receptors. Indeed, the β receptor agonist isoprenaline failed to induce Ca^{2+} signals (fig. s4B, C). cAMP signals evoked by isoprenaline were not affected when Ca^{2+} stores were emptied by CPA, confirming that cAMP production by β receptors is Ca^{2+} -independent (fig. s4D-F).

PE-induced cAMP signals are Ca^{2+} -dependent

Activation of α_1 and α_2 receptors increases Ca^{2+} in OB astrocytes (Fischer et al., 2021) and canonically they are not linked to G_s proteins, suggesting that the Ca^{2+} -dependent increases in cAMP in our study is mediated by α_1 and α_2 receptors. Ca^{2+} -dependent cAMP signaling in OB astrocytes is best studied by selective activation of α_1 receptors by, e.g., PE, since α_2 receptors both increase cAMP and decrease adenylyl cyclase activity in OB astrocytes. PE at concentrations between 1 and 300 μ M led to dose-dependent cAMP signals with amplitudes ranging from 3.7 ± 0.5 % $-\Delta F$ (1 μ M PE) to 8.7 ± 0.5 % $-\Delta F$ (300 μ M PE; $n = 29$ –112; Fig. 4A; table s2). We calculated the EC_{50} to be 1.26 ± 0.33 μ M (Fig. 4B). For further experiments, we used 10 μ M PE to elicit robust sub-saturating cAMP signals. We applied PE twice in rundown experiments with intervals of 10 min (RD short) and 30 min (RD long) between the cAMP signals and compared these rundowns to any further experiment (fig. s5A-D). A second application of PE evoked cAMP responses in RD short of 84 ± 3.7 % of the first application ($n = 29$) and in RD long of 79 ± 5.7 % of the first application ($n = 40$).

To investigate the Ca^{2+} dependency of PE-induced cAMP signals, we blocked SERCA pumps with 20 μ M CPA to deplete Ca^{2+} stores (Fig. 4C). After depletion of Ca^{2+} stores by incubation of CPA for 10 min, PE-induced cAMP signals were significantly smaller compared to the corresponding rundown (RD short; $p < 0.001$) and averaged 24 ± 5.8 % ($n = 39$) of the first response, while PE-induced cAMP signals were entirely suppressed in the presence of CPA and Ca^{2+} -free ACSF (0 Ca^{2+} /CPA; Fig. 4C-E). Forskolin-induced cAMP signals, in contrast, were not affected by CPA, showing that CPA does not directly inhibit cAMP production by, e.g., blocking adenylyl cyclases (Fig. s6A-C). To confirm the involvement of intracellular Ca^{2+} release, we inhibited

IP₃ receptors with 100 μ M 2-APB, which blocks both IP₃ receptors and store-operated Ca^{2+} entry (Singaravelu et al., 2006; Stavermann et al., 2012). As 2-APB at concentrations above 50 μ M also stimulates TRPV4 channels and Ca^{2+} oscillations in OB astrocytes (Doengi et al., 2009), we co-applied 1 μ M of the selective TRPV4 antagonist HC-067047 with 2-APB for 30 min (Fischer et al., 2021). The PE-induced increase in cAMP vanished completely after blocking IP₃ receptors, indicating that Ca^{2+} release mediated by IP₃ receptors is required for cAMP production evoked by α_1 receptors ($n = 32$; Fig. 4F, G). In conclusion, our results demonstrate that PE-induced Ca^{2+} signals depend on the PLC/IP₃ pathway as well as Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum and trigger increases in cAMP.

α_{1A} and α_{1D} receptor subtypes increase Ca^{2+} and cAMP

The α_1 receptors are classified into the subtypes α_{1A} , α_{1B} , and α_{1D} (Bylund et al., 1994; Hieble et al., 1995). For further investigation of Ca^{2+} and cAMP signals induced by PE-application, we used specific antagonists for the different α_1 receptor subtypes. Due to the relatively low co-expression rate of combined jRCaMP1.0 and Flamingo2 AAVs in the previous experiments, we performed the following experiments for Ca^{2+} and cAMP imaging separately, using GLAST-CreERT2 x GCaMP6s^{fllox} mice for Ca^{2+} and AAV carrying Flamingo2 for cAMP (Fig. 5A, B).

Application of PE evoked Ca^{2+} transients in 95 % of all astrocytes ($n = 73$ out of 77), i.e. astrocytes that responded to application of NE, indicating that the majority of OB astrocytes express α_1 receptors linked to Ca^{2+} signaling (fig. s7A). PE-evoked cAMP signals, in contrast, occurred in 53 % of astrocytes only ($n = 71$ out of 133) in this set of experiments, suggesting that in some cells, α_1 receptors are not linked to cAMP production (fig. s7B, C). To study the contribution of α_{1A} receptors, we used the α_{1A} -specific antagonist RS100329, which had a bimodal effect on both Ca^{2+} and cAMP signals. 1 μ M RS100329 entirely blocked PE-induced Ca^{2+} signals in 88 % of astrocytes ($n = 23$ out of 26), while Ca^{2+} signals were only weakly reduced in the remaining 12 % of the astrocytes and, on average, did not differ significantly from the rundown experiment ($p > 0.05$; $n = 3$ out of 26; Fig. 5 C, I and fig. s8A, B).

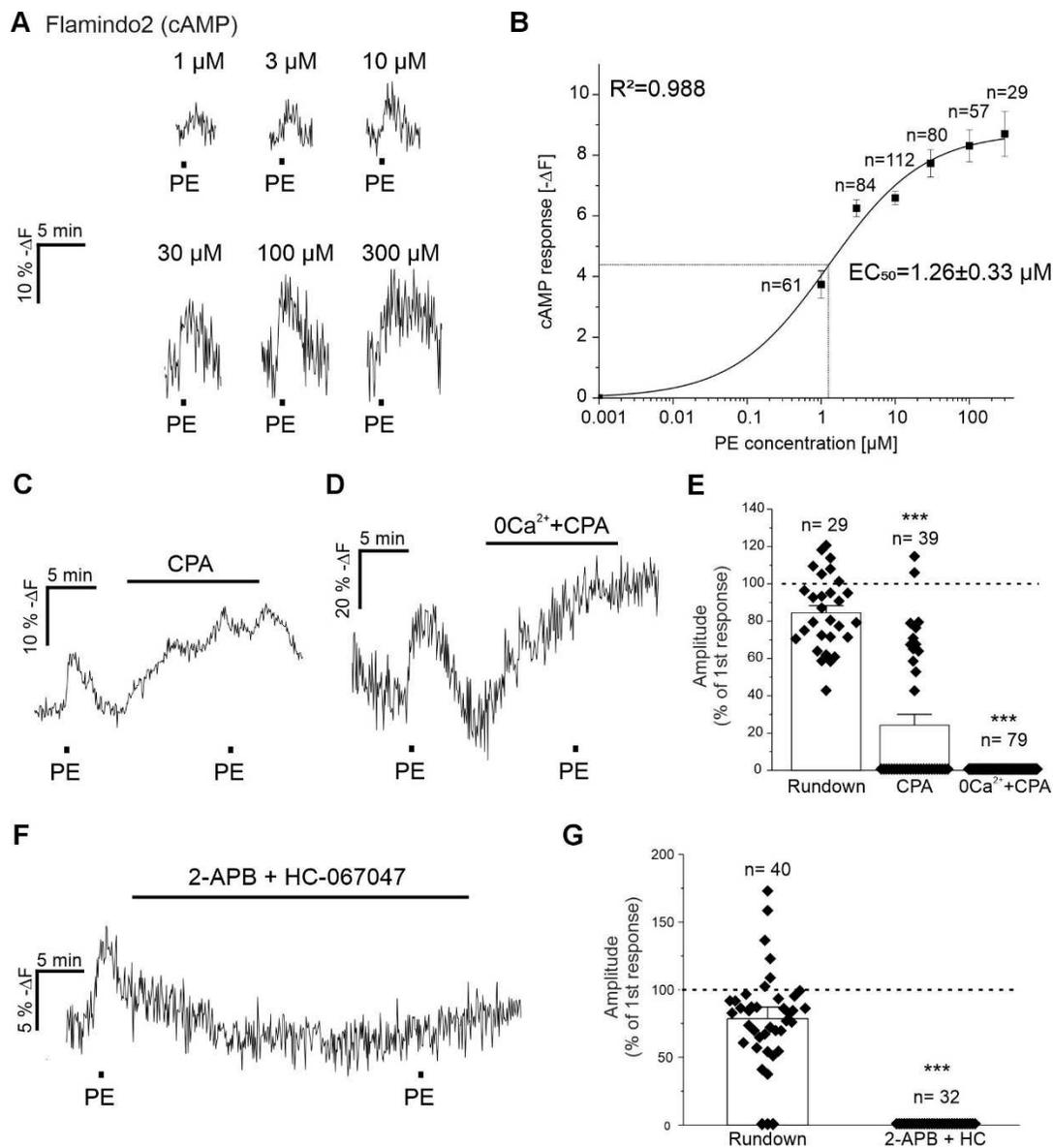


Fig. 4 α_1 receptor agonist phenylephrine induces Ca^{2+} -dependent cAMP signals

(A) cAMP signals in olfactory bulb astrocytes evoked by phenylephrine (PE) at concentrations ranging from 1 μ M to 300 μ M. **(B)** Dose-response curve of PE-induced cAMP signals. Experiments from 6 mice. **(C)** PE-induced cAMP signals in the presence of 20 μ M cyclopiazonic acid (CPA) and **(D)** the combination of calcium-free ACSF (0Ca²⁺) and CPA. **(E)** CPA and CPA/0Ca²⁺ significantly reduced the amplitude of PE-evoked cAMP signals when compared to the corresponding rundown experiment (***, $p < 0.001$, Kruskal Wallis ANOVA and Dunn's post hoc test). 3 mice for rundown experiments, 3 mice for CPA, 4 mice for 0Ca²⁺+CPA. **(F)** PE-induced cAMP signals were suppressed in the presence of the IP₃ receptor inhibitor 2-APB (100 μ M) and the TRPV4 inhibitor HC-067047 (1 μ M). **(G)** Quantification of the effect of 2-APB+HC-067047. ***, $p < 0.001$, Mann-Whitney U-Test; 7 mice for rundown long, 4 mice for 2-APB+HC.

In addition, RS100329 entirely blocked PE-induced cAMP signals in 75 % of the astrocytes ($n = 42$ out of 56) and resulted in PE-induced cAMP signals that did not differ significantly from the rundown experiment in the remaining 25 % of astrocytes ($n = 14$ out of 56; Fig. 5D, l). The α_{1D} receptor antagonist BMY7378 also had a

bimodal effect. 1 μ M BMY7378 completely blocked PE-induced Ca^{2+} signals in 14 % of the cells ($n = 9$ out of 66) and reduced Ca^{2+} signals to 36 ± 3.0 % of the initial amplitude in 86 % of the cells ($p < 0.001$; $n = 57$ out of 66; Fig. 5E, l). BMY7378 blocked PE-induced cAMP signals in 70 % of the cells ($n = 56$ out of 73) and reduced

cAMP signals to $55 \pm 6.9\%$ of the initial amplitude in the remaining 30% of the cells ($p = 0.171$; $n = 17$ out of 73; Fig. 5F, I). Combination of both blockers completely abolished both PE-induced Ca^{2+} ($n = 63$; Fig. 5G, I) and cAMP signals ($n = 29$; Fig. 5H, I). The complete inhibition of the second messengers by combination of α_{1A} and

α_{1D} antagonists indicates that α_{1B} does not play a significant role in olfactory bulb astrocytes. In summary, our results show that α_1 receptors, including α_{1A} and α_{1D} , induce Ca^{2+} signaling in virtually all astrocytes of the olfactory bulb, while cAMP signals are evoked in a subpopulation of astrocytes (Fig. 5J).

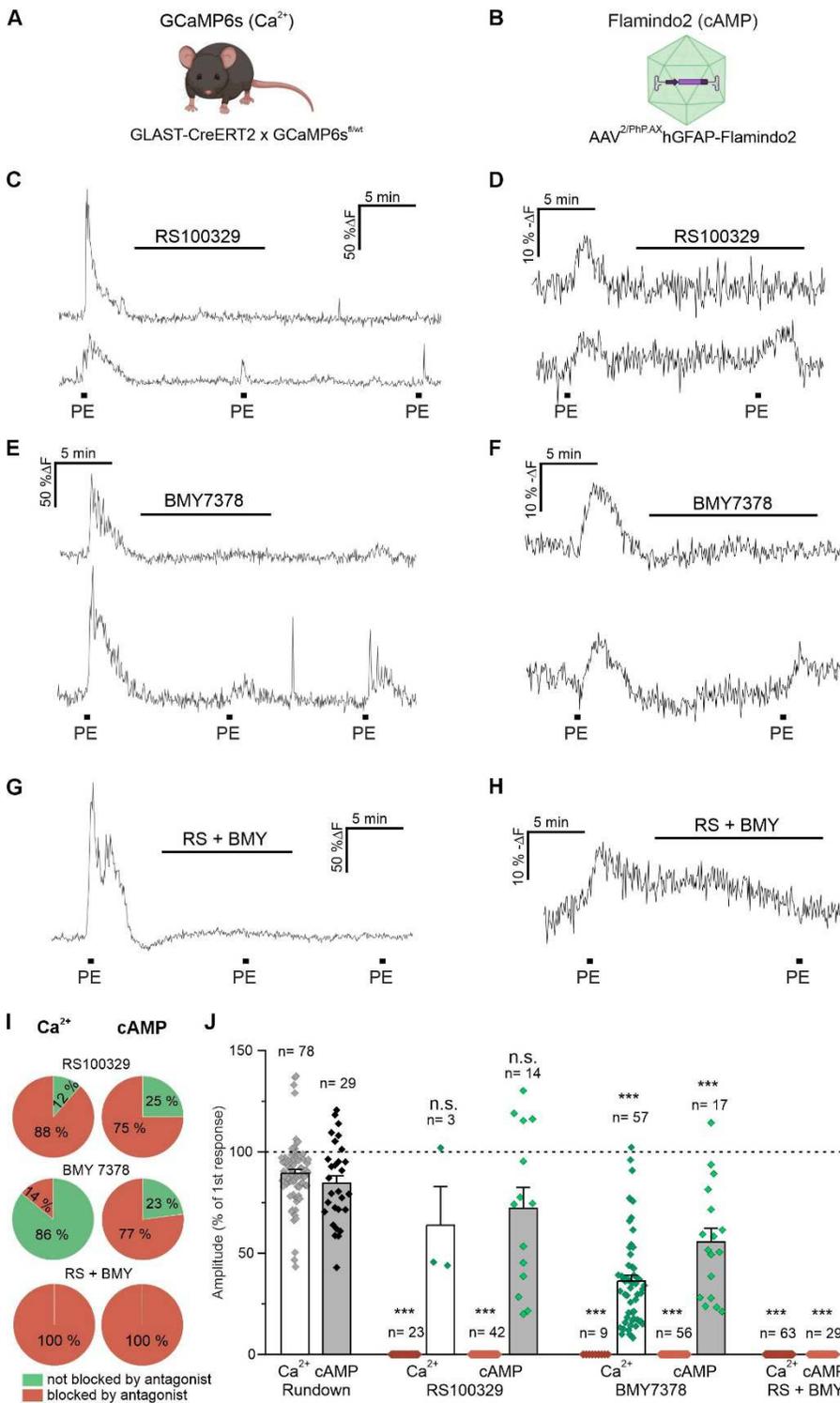


Fig. 5 Phenylephrine induces Ca^{2+} and cAMP signals via α_{1A} and α_{1D} receptor subtypes

(A) To visualize Ca^{2+} signaling in olfactory bulb astrocytes, GCaMP6s was expressed under control of the promoter of the astrocyte-specific glutamate-aspartate transporter (Glast). **(B)** Flamindo2 was introduced into wild type mice by AAV to visualize cAMP signaling. **(C)** Effect of RS100329 (α_{1A} ; 1 μM) on phenylephrine (PE)-induced Ca^{2+} signals and **(D)** cAMP signals. RS100329 entirely inhibited Ca^{2+} and cAMP signals in a subpopulation of astrocytes (upper traces), while Ca^{2+} and cAMP signals remained in other astrocytes (lower traces). **(E)** BMY7378 (α_{1D} ; 1 μM) blocked Ca^{2+} signals and **(F)** cAMP signals in some astrocytes (upper traces) and reduced Ca^{2+} and cAMP signals in the remaining astrocytes (lower traces). **(G)** The combination of RS100329 and BMY entirely inhibited PE-induced Ca^{2+} and **(H)** cAMP signals. **(I)** Fraction of responsive vs. non-responsive astrocytes in the presence of RS100329, BMY7378 and the combination of both. **(J)** Analysis of PE-induced Ca^{2+} and cAMP signals. Note that in the presence of RS100329 as well as BMY7378 two subpopulations of astrocytes could be identified, one with Ca^{2+} and cAMP transients entirely blocked by the antagonists and one with residual Ca^{2+} and cAMP transients in the presence of the antagonists. *** $p < 0.001$, n.s.= not significant; Kruskal Wallis ANOVA and Dunn's post hoc test. Ca^{2+} imaging: 4 mice for rundown, 3 mice for RS100329, 3 mice for BMY7378, 3 mice for RS100329 + BMY7378. cAMP imaging: 3 mice for rundown, 4 mice for RS100329, 3 mice for BMY7378, 4 mice for RS100329 + BMY7378.

Ca²⁺-induced cAMP signals are mediated by AC1 and AC3

Our results show that an increase in Ca²⁺ can lead to an increase in cAMP in OB astrocytes, suggesting the involvement of Ca²⁺-activated adenylyl cyclases. Three out of the ten AC isoforms can be activated by Ca²⁺/CaM: AC1, AC3 and AC8 (Devasani & Yao, 2022). We tested the presence and co-localization with astrocytes of AC1, AC3 and AC8 using antibody staining. We visualized astrocytes of the olfactory bulb with a combination of anti-GFAP and anti-S100B antibodies. Co-staining of astrocytes and AC1 (Fig. 6A, B) and AC3 (Fig. 6C, D), respectively, demonstrated co-localization in the olfactory bulb. For AC8, in contrast, no clear co-localization with astrocytes was found (Fig. 6E, F).

To test the contribution of Ca²⁺-activated AC1 and AC3 isoforms to cAMP signaling in OB astrocytes, we used the AC1-specific antagonist ST 034307, as well as NKY80, an antagonist of several adenylyl cyclases including AC3 (Brand et al., 2013; Brust et al., 2017). Blockage of AC1 with 10 μ M ST 034307 completely inhibited PE-induced cAMP responses in 69 % of the astrocytes (n=47 out of 68), while in the remaining 31 % of the astrocytes, the response did not differ significantly from the rundown experiment (n=21 out of 68; p=1; Fig. 6G, J). In addition, NKY80 (500 μ M) completely blocked cAMP signals in 59 % of the cells (n=24 out of 41), whereas in the remaining 41 % of the cells, the cAMP signal was not statistically different from the rundown experiment (n=17 out of 41; p=1; Fig. 6H, J). The combined blockage of AC1 and AC3 led to a total inhibition of the PE-induced cAMP signal (n=32; Fig. 6I-K). In our experiments, application of the AC inhibitors itself led to an increase in the cAMP concentration, which might result from them being a positive modulator of Ca²⁺-independent AC2 (Brust et al., 2017). In conclusion, our results suggest that stimulation of α_1 receptors by PE induces Ca²⁺-dependent cAMP signals in olfactory bulb astrocytes via activation of AC1 and AC3.

Discussion

In this study, we investigated the mechanisms by which NE evokes cAMP signaling in astrocytes of the

glomerular and external plexiform layers of the OB. Our data demonstrate that NE induces cAMP generation via all three adrenergic receptor classes, i.e., α_1 , α_2 , and β receptors. While β receptors evoke cAMP signals in all OB astrocytes in a Ca²⁺-independent manner by direct stimulation of G_s-proteins, α_1 -mediated cAMP responses as well as α_2 -mediated cAMP responses occur in a subpopulation of astrocytes and require intracellular Ca²⁺ rises to activate Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclases AC1 and AC3. These findings highlight a complex, receptor- and Ca²⁺-dependent regulation of cAMP signaling that has not been described in astrocytes before.

NE induces cAMP signals in astrocytes of the olfactory bulb via α_1 , α_2 , and β receptors

We determined an EC₅₀ of approximately 2 μ M for NE-induced cAMP responses in OB astrocytes and used 10 μ M for all further experiments, a concentration also applied in previous studies addressing Ca²⁺ signaling in olfactory bulb astrocytes and excitability of olfactory bulb neurons (Fischer et al., 2021; Zimnik et al., 2013). Importantly, suppression of neuronal activity and synaptic transmission only partly reduced NE-induced cAMP signals, suggesting that the remaining effect is a direct consequence of NE acting on astrocytes, independent of neuronal input. Astrocytes are known to participate in the “glutamate amplifies noradrenergic effects” (GANE) mechanism by releasing glutamate that triggers neuronal activity and hence further NE release (Mather et al., 2016; Wahis & Holt, 2021). As inhibiting neuronal activity decreased NE-evoked rises in cAMP, such a feedback loop also appears to exist in the olfactory bulb.

We found that agonists for α_1 , α_2 , and β receptors each induced cAMP elevations, indicating that all three receptor types contribute to cAMP signaling under resting conditions, which is in contrast to, e.g., hippocampal astrocytes in which β receptors increase cAMP, and only α_1 receptors increase Ca²⁺ (Oe et al., 2020). Given NE's binding affinities at these receptors ($\alpha_2 > \alpha_1 > \beta$; (Ramos & Arnsten, 2007)), even low NE levels could recruit α_2 and α_1 receptors, while higher concentrations are needed to activate β receptors.

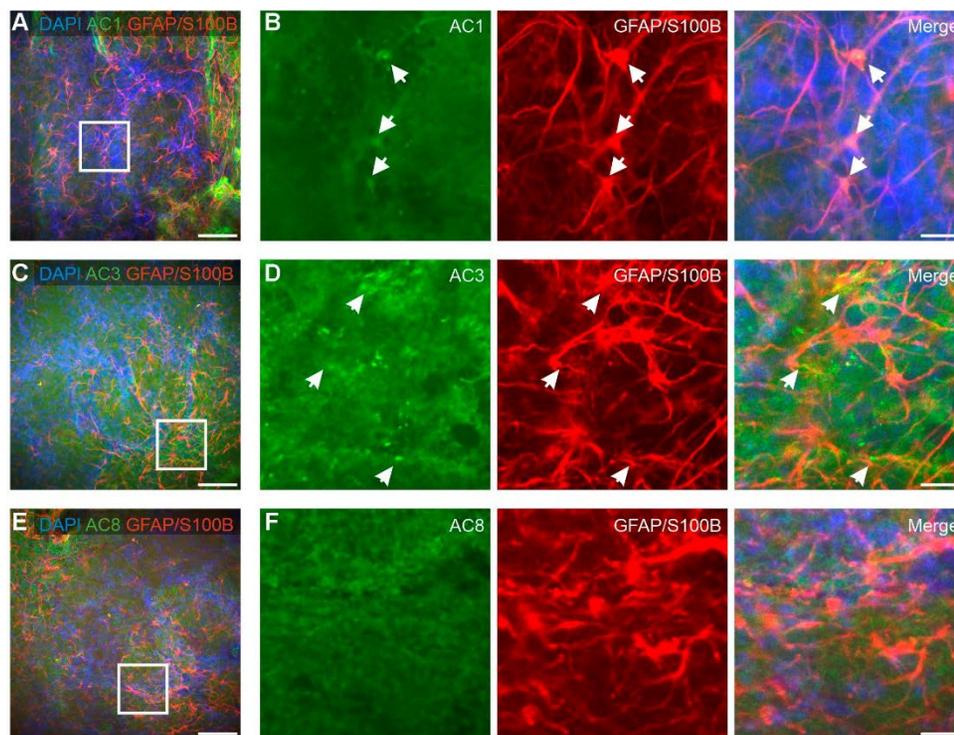
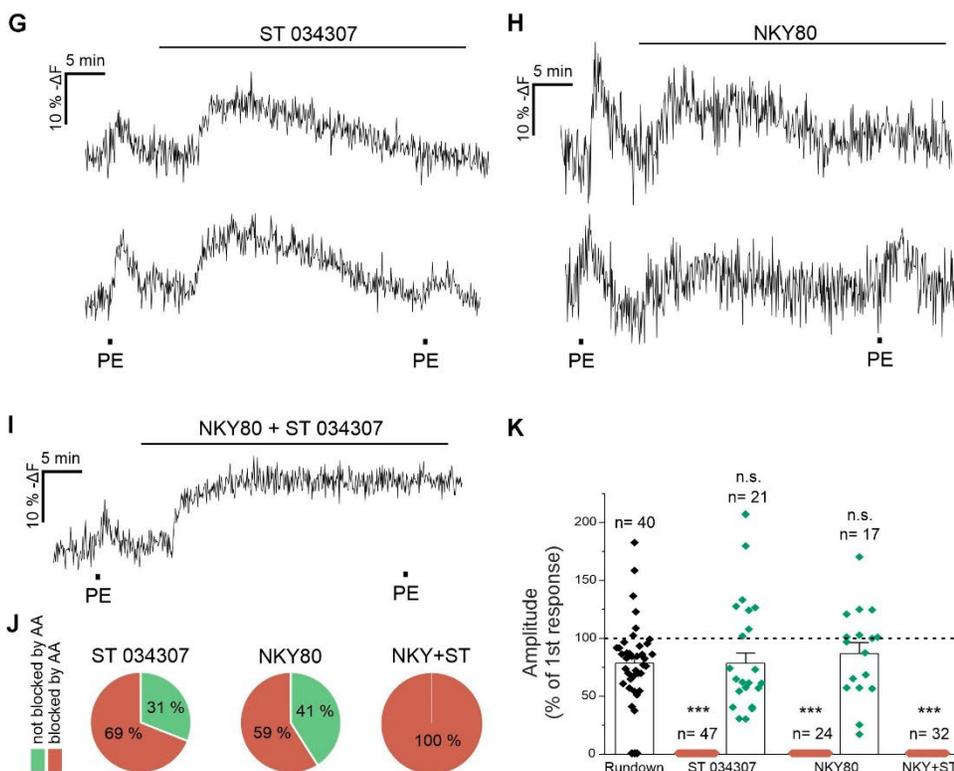


Fig. 6 Phenylephrine-induced cAMP signals are mediated via adenylyl cyclase subtypes 1 and 3

(A) Anti-GFAP/S100B immunostaining of astrocytes (red) and anti-adenylyl cyclase 1 immunostaining (AC1; green). Nuclei are stained with Dapi (blue). **(B)** Magnified view, with arrows pointing to astrocytes co-stained with GFAP/S100B and AC1 antibodies. **(C)** Immunostaining of astrocytes (red) and adenylyl cyclase 3 (AC3, green). **(D)** Magnified image, depicting astrocytes co-stained with GFAP/S100B and AC3 antibodies (arrows). **(E)** Immunostaining of astrocytes (red) and adenylyl cyclase 8 (AC8, green). **(F)** In the magnified view, no co-localization of GFAP/S100B and AC8 immunostaining was detected. Scale bars: A, C, E; 50 μ M. B, D, F; 10 μ M **(G)** Effect of the AC1 blocker ST 034307 (10 μ M) on phenylephrine (PE)-induced cAMP signals. ST 034307 entirely blocked cAMP transients in a subpopulation of astrocytes (upper trace), but had no significant effect on the cAMP transients in the remaining astrocytes (lower trace). **(H)** Effect of the AC3-blocker NKY80 (500 μ M) on PE-induced cAMP signals. In some astrocytes, NKY80 entirely inhibited cAMP transients (upper trace), while in the remaining astrocytes it had no significant effect on cAMP transients (lower trace). **(I)** Combination of ST 034307 and NKY80 completely blocked PE-induced cAMP signals. **(J)** Fraction of astrocytes



responding to NE vs. not responding to NE in the presence of ST 034307, NKY80 and the combination of ST 034307 and NKY80. **(K)** Analysis of the effects of the adenylyl cyclase inhibitors on PE-evoked cAMP signals. *** $p < 0.001$, n.s.= not significant; Kruskal Wallis ANOVA and Dunn's post hoc test. 7 mice for rundown, 5 mice for ST 034307, 5 mice for NKY80, 3 mice for ST 034307 + NKY80.

An unexpected result was the increase in cAMP evoked by α_2 receptor activation. Astrocytes in the cortex show opposing regulation of cAMP by α_2 and β receptors, starting from astrocytic cAMP resting state (Rosenberg et al., 2023), while in our experiments the α_2 agonist xylazine decreased cAMP only when ACs were pre-activated with forskolin. Hence, α_2 receptors bimodally regulate cAMP signals depending on the activation state of the astrocyte, increasing cAMP at resting cAMP levels and decreasing cAMP when ACs are already active and cAMP levels are elevated.

NE-induced and PE-induced cAMP signals differ in their Ca^{2+} dependency

Previous work has shown NE-induced Ca^{2+} transients in astrocytes via α_1 and α_2 receptors (Fischer et al., 2021), and we now extend these findings by demonstrating that NE-induced Ca^{2+} signals increase cAMP. SERCA inhibition with CPA reduced NE-induced cAMP signals by approximately 35 %. The residual cAMP responses were Ca^{2+} -independent and persisted even in Ca^{2+} -free extracellular solution, suggesting a direct activation of ACs by G_s proteins as described for signaling mediated by β receptors. In contrast to NE-evoked cAMP signals, PE-induced α_1 -mediated cAMP signals were entirely dependent on Ca^{2+} signaling. Although CPA alone did not fully block these responses, the combination of CPA with Ca^{2+} -free ACSF as well as IP_3 receptor antagonism entirely abolished cAMP generation. These results suggest that the initial ER-derived Ca^{2+} release and subsequent store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) are essential for PE-induced AC activation. Interestingly, while activation of α_1 receptors have previously been associated primarily with Ca^{2+} signaling in astrocytes of various brain regions, as shown *in vivo* in the cerebral cortex (Oe et al., 2020), cAMP responses to α_1 receptor activation have been reported in peripheral systems such as the uterine smooth muscle cells (Chen et al., 2018). Our data show that OB astrocytes also have α_1 receptor coupling to increases in cAMP via Ca^{2+} -dependent AC1 and AC3. This highlights functional diversity in α_1 -dependent signaling across brain regions and the linkage of the two second messenger pathways in astrocytes.

PE-induced cAMP signals require α_{1A} and α_{1D} receptors and subsequent activation of AC1 and AC3

We identified both α_{1A} and α_{1D} noradrenergic receptors as key mediators of PE-induced Ca^{2+} and cAMP signals in OB astrocytes. However, there is a discrepancy between Ca^{2+} and cAMP signaling regarding the cell fractions that are sensitive to inhibition of α_{1A} versus α_{1D} receptors (Fig. 5I). Blocking α_{1A} receptors completely inhibited PE-induced Ca^{2+} signals in 88 % of cells, whereas blocking α_{1D} receptors entirely blocked PE-induced Ca^{2+} signals in only 14 % of the cells, suggesting that both astrocyte populations complete each other, with α_{1A} being sufficient to elicit a Ca^{2+} rise in the majority of astrocytes. PE-induced cAMP signals were entirely blocked by inhibition of α_{1A} receptors in 75 % of the cells, a fraction similar to that found in Ca^{2+} imaging experiments. Inhibition of α_{1D} receptors by BMY 7378 suppressed cAMP signals in about 80 % of the astrocytes, a cell fraction much larger compared to the fraction of astrocytes in which Ca^{2+} signaling was entirely inhibited by BMY 7378. However, Ca^{2+} signals in astrocytes that were not entirely blocked by BMY 7378 were strongly attenuated, indicating that α_{1D} receptors, while not essential to evoke Ca^{2+} signals, augment Ca^{2+} signals induced by α_{1A} receptors. Consequently, attenuated PE-evoked Ca^{2+} signals in the presence of BMY 7378 were insufficient to stimulate Ca^{2+} -dependent ACs and failed to elicit measurable cAMP signals in the majority of astrocytes. Our data identified AC1 and AC3 as the primary ACs responsible for PE-induced cAMP production using the selective AC1 inhibitor ST034307 and the non-specific AC inhibitor NKY80. NKY80 is known to mainly inhibit AC5 and additionally AC2, AC3 and AC6, however, AC2, AC5 and AC6 are not activated via Ca^{2+} and thus not involved in Ca^{2+} -dependent cAMP signals as described in the present study (Brand et al., 2013; Brust et al., 2017; Onda et al., 2001). Soluble adenylyl cyclase AC10 is highly expressed in astrocytes in some brain regions such as the hippocampus and is Ca^{2+} -activated (Choi et al., 2012; Jaiswal & Conti, 2003), hence it could mediate PE-induced cAMP rises. However, neither ST034307 nor NKY80 have been reported to inhibit AC10, and the complete inhibition of PE-evoked cAMP signals by combined ST034307 and NKY80 strongly suggests that

not AC10, but AC1 and AC3 are the main Ca^{2+} -activated adenylyl cyclases in olfactory bulb astrocytes. Immunohistochemical data supported the presence of AC1 and AC3 in OB astrocytes. While prior studies emphasized AC8 expression in the entire OB by in situ hybridization (Choi et al., 2012; Jaiswal & Conti, 2003; Muglia et al., 1999), our data suggests that AC1 and AC3 are more relevant in OB astrocytes and AC8 might be expressed in other cell types. While we observed AC8 immunostaining in the olfactory bulb, we did not find clear co-localization of AC8 and astrocyte markers, and lack of AC8-dependent cAMP signaling might be due to absence of AC8 in astrocytes.

Conclusion and implications

Together, our findings provide a comprehensive view of NE-induced cAMP signaling in OB astrocytes and reveal receptor-specific and Ca^{2+} -dependent as well as Ca^{2+} -independent signaling pathways. NE activates astrocytic cAMP production via α_1 , α_2 , and β receptors, with distinct downstream mechanisms. Increases in cAMP evoked by β receptors were Ca^{2+} -independent and employ the canonical G_s pathway, whereas PE-induced responses rely exclusively on intracellular Ca^{2+} signaling and require combined $\alpha_{1A/D}$ receptor activation for full activation of Ca^{2+} -dependent AC1/AC3. Activation of α_2 receptors also elicits both Ca^{2+} and cAMP rises, suggesting they employ the same signaling mechanism involving Ca^{2+} -dependent stimulation of AC1 and AC3, however, when cAMP levels are elevated, α_2 receptors inhibit cAMP production by G_i . These results underscore the complex integration and tuning of cAMP and Ca^{2+} signaling in astrocytes and, in consideration of the importance of both Ca^{2+} and cAMP for metabolic interaction as well as synaptic plasticity, indicate that both second messenger systems strongly interact to optimize neuronal performance.

Material and methods

Animal handling

Mice were held in the animal facility of the Institute of Cell and Systems Biology (University of Hamburg, Hamburg, Germany) at a 12 h light/12 h dark cycle with food and water *ad libitum*. Animal handling and all experiments were approved by the local authorities

(Behörde für Justiz und Verbraucherschutz, Lebensmittel und Veterinärwesen Hamburg; N010/2022) and followed German and European laws. To express the cAMP sensor Flamindo2 in astrocytes, C57Bl/6J wild type mice of both sexes at an age range from 4 to 16 weeks at the time of injection were used. They were injected with endotoxin-free recombinant adeno-associated viruses AAV^{2/PhP.eB}hGFAP-Flamindo2 or AAV^{2/PhP.AX}hGFAP-Flamindo2 (Odaka et al., 2014; Wendlandt et al., 2023). The capsid plasmid PhP-AX (Addgene #195218) was kindly provided by Viviana Gradinaru and Xinhong Chen (Jang et al., 2023) and the capsid plasmid PhP.eB (Addgene #103005) was a gift from V. Gradinaru (Chan et al., 2017). All AAVs were produced at the vector facility of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf (Hamburg, Germany). 70 μl virus suspension containing 1×10^{11} vg was injected i.v. into the retro-bulbar sinus under isoflurane-anesthesia (Fig. 1A). Experiments were performed 3 to 6 weeks after injection. For experiments with simultaneous cAMP and Ca^{2+} imaging, 1×10^{11} vg AAV^{2/PhP.AX} gfaABC1D-NES-jRCaMP1a (addgene # 171120, Lohr et al., 2021) was co-injected to image astrocytic Ca^{2+} . For Ca^{2+} imaging without cAMP imaging, GLAST-CreERT2 x GCaMP6s^{fl/wt} mice (Chen et al., 2013; Mori et al., 2006) at an age range between 6 and 21 weeks were injected intraperitoneal three days in a row with tamoxifen (Carbolution Chemicals, St. Ingbert, Germany), 10 mg/ml in Miglyol (Caelo, Hilden, Germany) at 10 $\mu\text{l/g}$ mouse weight. Imaging was conducted between 7 and 12 days after the first tamoxifen injection.

Solutions and drugs

Artificial cerebrospinal fluid (ACSF) used during experiments contained (mM): 120 NaCl, 26 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 2.5 KCl, 2.8 D-glucose, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂. For the preparation of the OBs and brain slicing, Ca^{2+} -reduced ACSF was used containing (in mM): 83 NaCl, 26.2 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 2.5 KCl, 70 sucrose, 20 D-glucose, 0.5 CaCl₂, 2.5 MgSO₄. For experiments in Ca^{2+} -free conditions (0Ca²⁺), ACSF was used containing (mM): 120 NaCl, 26 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 2.5 KCl, 2.8 D-glucose, 3 MgCl₂, 0.5 EGTA. All components were obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany).

The following drugs were used: (R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride
3-[(1R)-1-hydroxy-2-

(methylamino)ethyl]phenol;hydrochloride; Abcam, Cambridge, United Kingdom), 2-APB (2-diphenylboranyloxyethanamine; Calbiochem, Darmstadt, Germany), BMY7378 (8-[2-[4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]ethyl]-8-azaspiro[4.5]decane-7,9-dione; dihydrochloride; Hello Bio, Bristol, United Kingdom), CGP 55845 hydrochloride (benzyl-[(2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]amino]-2-hydroxypropyl]phosphinic acid; hydrochloride; Hello Bio), Cyclopiazonic acid ((2R,3S,9R)-5-acetyl-4-hydroxy-8,8-dimethyl-7,16-diazapentacyclo[9.6.1.02,9.03,7.015,18]octadeca-1(17),4,11(18),12,14-pentaen-6-one; Hello Bio), D-AP5 ((2R)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid; Alomone Labs, Jerusalem, Israel), Norepinephrine bitartrate (4-[[1R)-2-amino-1-hydroxyethyl]benzene-1,2-diol; 2,3-dihydroxybutanedioic acid; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Forskolin (((3R,4aR,5S,6S,6aS,10S,10aR,10bS)-3-ethenyl-6,10,10b-trihydroxy-3,4a,7,7,10a-pentamethyl-1-oxo-5,6,6a,8,9,10-hexahydro-2H-benzo[f]chromen-5-yl]acetate; Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA), Gabazine (4-[6-imino-3-(4-methoxyphenyl)pyridazin-1-yl]butanoic acid; Abcam), HC-067047 (2-methyl-1-(3-morpholin-4-ylpropyl)-5-phenyl-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]pyrrole-3-carboxamide; Calbiochem), ICI 118,551 hydrochloride ((2R,3S)-1-[(7-methyl-2,3-dihydro-1H-inden-4-yl)oxy]-3-(propan-2-ylamino)butan-2-ol;hydrochloride; Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom), Isoprenaline hydrochloride (4-[1-hydroxy-2-(propan-2-ylamino)ethyl]benzene-1,2-diol;hydrochloride; Abcam), NBQX (disodium;6-nitro-7-sulfamoylbenzo[f]quinoxaline-2,3-diolate; Alomone Labs), NKY80 (2-amino-7-(furan-2-yl)-7,8-dihydro-6H-quinazolin-5-one; Tocris Bioscience), Prazosin hydrochloride ([4-(4-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-2-yl)piperazin-1-yl]-(furan-2-yl)methanone;hydrochloride; Tocris Bioscience), Rauwolscine hydrochloride (methyl (1S,15S,18S,19S,20S)-18-hydroxy-1,3,11,12,14,15,16,17,18,19,20,21-dodecahydroyohimban-19-carboxylate;hydrochloride; Tocris Bioscience), RS100329 hydrochloride (5-methyl-3-[3-[4-[2-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenyl]piperazin-1-yl]propyl]-1H-pyrimidine-2,4-dione;hydrochloride;

Tocris Bioscience), ST 034307 (6-chloro-2-(trichloromethyl)chromen-4-one; Tocris Bioscience), tetrodotoxin citrate ((1R,5R,6R,7R,9S,11S,12S,13S,14S)-3-amino-14-(hydroxymethyl)-8,10-dioxo-2,4-diazatetracyclo[7.3.1.17,11.01,6]tetradec-3-ene-5,9,12,13,14-pentol; Hello Bio), Xylazine (N-(2,6-dimethylphenyl)-5,6-dihydro-4H-1,3-thiazin-2-amine;hydrochloride; Merck). Stock solutions of drugs were prepared as stated by the manufacturer. Stocks solutions were diluted in ACSF and applied via the perfusion system.

Preparation of acute brain slices

Mice were anesthetized with isoflurane (5% v/v in oxygen) and decapitated. OBs were quickly dissected in chilled Ca²⁺-reduced ACSF. 220 µm sagittal slices of OBs (Fig. 1 B, C) were prepared using a vibratome (VT1200S, Leica, Bensheim, Germany), stored in ACSF at 30 °C for 30 min, and then kept at room temperature until the start of the experiment. Solutions were steadily gassed with carbogen (95% O₂, 5% CO₂).

Confocal Imaging

After transferring slices to the recording chamber, imaging was performed with a confocal microscope (eC1, Nikon, Düsseldorf, Germany). Flamingo 2 was excited at 488 nm and emission detected from 500 to 530 nm. Images of astrocytes located in the glomerular and external plexiform layers (see Fig. 1C) (Lohr et al., 2014) were acquired at a rate of one frame every 5 s. Noradrenergic agonists were applied for 30 s via the perfusion system, using a peristaltic pump and a pump speed of 2.35 ml/min. Antagonists were incubated for 10 min before agonists were applied, except inhibitors of adenylyl cyclases (ACs) which were incubated for 30 min. Similar settings were used to image intracellular Ca²⁺ using GCaMP6s. For simultaneous imaging of cAMP and Ca²⁺, Flamingo2 was excited at 488 nm and jRCaMP1b was excited at 543 nm and emission collected between 553 and 618 nm. For H⁺ (pH) measurements, acute slices were incubated with 10 µM pHrodo Red AM and 100 µM PowerLoad (both from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 30 min and the same optical parameters were used for pHrodo Red imaging as for jRCaMP1b.

Immunohistochemistry

Immunohistological staining was performed as described before (Beiersdorfer et al., 2020). Brains were fixed in 4 % Roti-Histofix (Roth, Karlsruhe, Germany) for 1 h and washed three times in PBS (in mM): 130 NaCl, 7 Na₂HPO₄, 3 NaH₂PO₄, pH adjusted to 7.4. OBs were sliced into 150 µm sagittal slices by a vibratome (VT1000, Leica, Bensheim, Germany). Antigen retrieval was performed in TE buffer (containing in mM: 10 Tris-HCl, 1 EDTA, 0.05 % Tween; pH adjusted to 9.0) at 95–98 °C for 15–20 min. Following a cooling period of 35–40 min, slices were incubated in blocking solution (5 % normal goat serum (NGS, Cell Signaling Technology) and 0.5 % Triton X-100 in PBS). After blocking, slices were incubated with primary antibodies for 48 h at room temperature diluted in primary antibody solution (blocking solution 1:10 in PBS), three times washed in PBS and subsequently incubated in secondary antibodies (dilution: 1:1000 in PBS) at 4 °C for 24 h. Afterwards slices were washed 3 X in PBS, and embedded on microscope slides (Thermo Fisher Scientific) with Shandon Immu-Mount (Thermo Fisher Scientific) and cover-slipped (Carl Roth). Images were captured by confocal microscope (eC1, Nikon, Düsseldorf, Germany) and processed using Fiji ImageJ (<http://imagej.org>) and GIMP2.0 (<https://www.gimp.org>). Schematic drawings were prepared with Biorender (www.biorender.com; license numbers GK28ZAAYM, GP28ZAAVAO, ZS28ZAAMUV).

The following antibodies were used: Rabbit anti-ADCY1 (1:200; 55067-1-AP; Proteintech, Rosemont, Illinois, USA), rabbit anti-ADCY3 (1:200; 19492-1-AP; Proteintech), rabbit anti-ADCY8 (1:200; 55065-1-AP; Proteintech), rabbit anti-GFAP (1:500; Z0334 429-2; Dako, Agilent Technologies, Glostrup, Denmark), chicken anti-GFP (1:500; NB100-1614; Novus Biologicals, Centennial, Colorado, USA), rabbit anti-S100B (1:500; Z0311; Dako). Secondary antibodies: Goat anti-chicken Alexa 488 (1:1000; Invitrogen), goat anti-chicken Alexa 555 (1:1000; Invitrogen (part of Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA), goat anti-rabbit Alexa 488 (1:1000; Invitrogen), goat anti-rabbit Alexa 555 (1:1000; Invitrogen). Nuclear stain: DAPI (5 µM; A1001 ; Applichem, Darmstadt, Germany).

Data analysis and statistics

Imaging data was analyzed by marking cells as regions of interest (ROIs) in EZ-C1Viewer software (Nikon) and extracting data to Excel (Microsoft, USA) and Origin Pro 9.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). The intensity of basal fluorescence F was set to 100 % and relative changes of fluorescence were measured (ΔF). Signals with relative changes below 3 % ΔF did not stand out significantly against noise and were excluded from further analysis. In contrast to GCaMP6s and pHrodo Red, which increase their fluorescence with an increasing concentration of the respective ion, an increase in the intracellular cAMP concentration is reflected by a decrease in Flamingo2 fluorescence (Odaka et al., 2014) and we depict fluorescence traces inverted ($-\Delta F$) to better illustrate actual cAMP changes. Traces represent one single exemplary cell. All values are stated as mean values \pm standard error of the mean. The number n corresponds to the number of analyzed cells. Each set of experiments was carried out on brain slices prepared from at least three animals. A sigmoidal fit was used to analyze the dose-response relationship of NE-evoked cAMP transients (Origin Pro 9.1). The following tests were used for evaluation of statistical significance: Outliers were identified and dismissed by Grubbs test. Wilcoxon signed rank test was used for paired data, Mann-Whitney-U test for independent data. For comparisons involving more than two groups, the Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's post hoc test was applied for independent data, and the Friedmann ANOVA followed by Wilcoxon signed-rank post hoc test for paired data. Significant differences were assumed with error probabilities $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Acknowledgements

We thank AC Rakete (University of Hamburg) for excellent technical assistance. Financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft is gratefully acknowledged (SFB 1328 TP A07, 404539526, and A16, 404644007).

Contributions

Study design: JS, DH, CEG, CL. Methodology: JS, OC, DH, CEG, CL. Experiments: JS, AB, FLS, MN. Data analysis: JS,

AB, FLS, MN. Writing and figure design: JS, AB, CEG, CL.
All authors edited and approved the manuscript.

References

- Ahlquist, R. P. (1948). A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol*, 153(3), 586–600. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1948.153.3.586>
- Beiersdorfer, A., Wolburg, H., Grawe, J., Scheller, A., Kirchhoff, F., & Lohr, C. (2020). Sublamina-specific organization of the blood brain barrier in the mouse olfactory nerve layer. *Glia*, 68(3), 631–645. <https://doi.org/10.1002/glia.23744>
- Brand, C. S., Hocker, H. J., Gorfe, A. A., Civasotto, C. N., & Dessauer, C. W. (2013). Isoform selectivity of adenylyl cyclase inhibitors: characterization of known and novel compounds. *J Pharmacol Exp Ther*, 347(2), 265–275. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208157>
- Brust, T. F., Alongkronrusmee, D., Soto-Velasquez, M., Baldwin, T. A., Ye, Z., Dai, M., Dessauer, C. W., van Rijn, R. M., & Watts, V. J. (2017). Identification of a selective small-molecule inhibitor of type 1 adenylyl cyclase activity with analgesic properties. *Sci Signal*, 10(467). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aah5381>
- Bylund, D. B., Eikenberg, D. C., Hieble, J. P., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P., Molinoff, P. B., Ruffolo, R. R., Jr., & Trendelenburg, U. (1994). International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*, 46(2), 121–136.
- Chan, K. Y., Jang, M. J., Yoo, B. B., Greenbaum, A., Ravi, N., Wu, W. L., Sánchez-Guardado, L., Lois, C., Mazmanian, S. K., Deverman, B. E., & Gradinaru, V. (2017). Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat Neurosci*, 20(8), 1172–1179. <https://doi.org/10.1038/nn.4593>
- Chen, J., Ding, Q., An, L., & Wang, H. (2022). Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclases as therapeutic targets for psychiatric and neurodevelopmental disorders. *Front Pharmacol*, 13, 949384. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.949384>
- Chen, T. W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., Schreiter, E. R., Kerr, R. A., Orger, M. B., Jayaraman, V., Looger, L. L., Svoboda, K., & Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>
- Chen, X., Meroueh, M., Mazur, G., Rouse, E., Hundal, K. S., Stamatkin, C. W., & Obukhov, A. G. (2018). Phenylephrine, a common cold remedy active ingredient, suppresses uterine contractions through cAMP signalling. *Sci Rep*, 8(1), 11666. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30094-5>
- Choi, H. B., Gordon, G. R., Zhou, N., Tai, C., Rungta, R. L., Martinez, J., Milner, T. A., Ryu, J. K., McLarnon, J. G., Tresguerres, M., Levin, L. R., Buck, J., & MacVicar, B. A. (2012). Metabolic communication between astrocytes and neurons via bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase. *Neuron*, 75(6), 1094–1104. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.032>
- Devasani, K., & Yao, Y. (2022). Expression and functions of adenylyl cyclases in the CNS. *Fluids Barriers CNS*, 19(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12987-022-00322-2>
- Doengi, M., Hirnet, D., Coulon, P., Pape, H. C., Deitmer, J. W., & Lohr, C. (2009). GABA uptake-dependent Ca²⁺ signaling in developing olfactory bulb astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(41), 17570–17575. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809513106>
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhauser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W. T., Cohen-Salmon, M.,...Verkhatsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*, 24(3), 312–325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>
- Fischer, T., Prey, J., Eschholz, L., Rotermund, N., & Lohr, C. (2021). Norepinephrine-Induced Calcium Signaling and Store-Operated Calcium Entry in Olfactory Bulb Astrocytes. *Front Cell Neurosci*, 15, 639754. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.639754>
- Fuller, R. W. (1982). Pharmacology of brain epinephrine neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 22, 31–55. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.22.040182.000335>
- Gao, V., Suzuki, A., Magistretti, P. J., Lengacher, S., Pollonini, G., Steinman, M. Q., & Alberini, C. M. (2016). Astrocytic β 2-adrenergic receptors mediate hippocampal long-term memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(30), 8526–8531. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605063113>
- Hasel, P., Dando, O., Jiwaji, Z., Baxter, P., Todd, A. C., Heron, S., Márkus, N. M., McQueen, J., Hampton, D. W., Torvell, M., Tiwari, S. S., McKay, S., Eraso-Pichot, A., Zorzano, A., Masgrau, R., Galea, E., Chandran, S., Wyllie, D. J. A., Simpson, T. I., & Hardingham, G. E. (2017). Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism. *Nat Commun*, 8, 15132. <https://doi.org/10.1038/ncomms15132>
- Hieble, J. P., Bylund, D. B., Clarke, D. E., Eikenburg, D. C., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P., & Ruffolo, R. R., Jr. (1995). International Union of Pharmacology. X.

- Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev*, 47(2), 267–270.
- Horvat, A., Zorec, R., & Vardjan, N. (2016). Adrenergic stimulation of single rat astrocytes results in distinct temporal changes in intracellular Ca(2+) and cAMP-dependent PKA responses. *Cell Calcium*, 59(4), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.01.002>
- Jaiswal, B. S., & Conti, M. (2003). Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(19), 10676–10681. <https://doi.org/10.1073/pnas.1831008100>
- Jang, M. J., Coughlin, G. M., Jackson, C. R., Chen, X., Chuapoco, M. R., Vendemiatti, J. L., Wang, A. Z., & Gradinaru, V. (2023). Spatial transcriptomics for profiling the tropism of viral vectors in tissues. *Nat Biotechnol*, 41(9), 1272–1286. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01648-w>
- Lands, A. M., Arnold, A., McAuliff, J. P., Luduena, F. P., & Brown, T. G., Jr. (1967). Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, 214(5088), 597–598. <https://doi.org/10.1038/214597a0>
- Lee, Y., Messing, A., Su, M., & Brenner, M. (2008). GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia*, 56(5), 481–493. <https://doi.org/10.1002/glia.20622>
- Li, H. L., Verhoeven, A., & Elferink, R. O. (2024). The role of soluble adenylyl cyclase in sensing and regulating intracellular pH. *Pflugers Arch*, 476(4), 457–465. <https://doi.org/10.1007/s00424-024-02952-x>
- Linster, C., Midroit, M., Forest, J., Thenaisie, Y., Cho, C., Richard, M., Didier, A., & Mandairon, N. (2020). Noradrenergic Activity in the Olfactory Bulb Is a Key Element for the Stability of Olfactory Memory. *J Neurosci*, 40(48), 9260–9271. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1769-20.2020>
- Linster, C., Nai, Q., & Ennis, M. (2011). Nonlinear effects of noradrenergic modulation of olfactory bulb function in adult rodents. *J Neurophysiol*, 105(4), 1432–1443. <https://doi.org/10.1152/jn.00960.2010>
- Lohr, C. (2023). Role of P2Y receptors in astrocyte physiology and pathophysiology. *Neuropharmacology*, 223, 109311. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109311>
- Lohr, C., Grosche, A., Reichenbach, A., & Hirnet, D. (2014). Purinergic neuron-glia interactions in sensory systems. *Pflugers Arch*, 466(10), 1859–1872. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1510-6>
- Mather, M., Clewett, D., Sakaki, M., & Harley, C. W. (2016). Norepinephrine ignites local hotspots of neuronal excitation: How arousal amplifies selectivity in perception and memory. *Behav Brain Sci*, 39, e200. <https://doi.org/10.1017/S0140525X15000667>
- Mori, T., Tanaka, K., Buffo, A., Wurst, W., Kühn, R., & Götz, M. (2006). Inducible gene deletion in astroglia and radial glia—a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia*, 54(1), 21–34. <https://doi.org/10.1002/glia.20350>
- Muglia, L. M., Schaefer, M. L., Vogt, S. K., Gurtner, G., Imamura, A., & Muglia, L. J. (1999). The 5'-flanking region of the mouse adenylyl cyclase type VIII gene imparts tissue-specific expression in transgenic mice. *J Neurosci*, 19(6), 2051–2058. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-06-02051.1999>
- Neves, S. R., Ram, P. T., & Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science*, 296(5573), 1636–1639. <https://doi.org/10.1126/science.1071550>
- Nomura, S., Bouhadana, M., Morel, C., Faure, P., Cauli, B., Lambolez, B., & Hepp, R. (2014). Noradrenalin and dopamine receptors both control cAMP-PKA signaling throughout the cerebral cortex. *Front Cell Neurosci*, 8, 247. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00247>
- Odaka, H., Arai, S., Inoue, T., & Kitaguchi, T. (2014). Genetically-encoded yellow fluorescent cAMP indicator with an expanded dynamic range for dual-color imaging. *PLoS One*, 9(6), e100252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100252>
- Oe, Y., Wang, X., Patriarchi, T., Konno, A., Ozawa, K., Yahagi, K., Hirai, H., Tsuboi, T., Kitaguchi, T., Tian, L., McHugh, T. J., & Hirase, H. (2020). Distinct temporal integration of noradrenaline signaling by astrocytic second messengers during vigilance. *Nat Commun*, 11(1), 471. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14378-x>
- Onda, T., Hashimoto, Y., Nagai, M., Kuramochi, H., Saito, S., Yamazaki, H., Toya, Y., Sakai, I., Homcy, C. J., Nishikawa, K., & Ishikawa, Y. (2001). Type-specific regulation of adenylyl cyclase. Selective pharmacological stimulation and inhibition of adenylyl cyclase isoforms. *J Biol Chem*, 276(51), 47785–47793. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107233200>
- Paredes-Rodriguez, E., Vegas-Suarez, S., Morera-Herreras, T., De Deurwaerdere, P., & Miguez, C. (2020). The Noradrenergic System in Parkinson's Disease. *Front Pharmacol*, 11, 435. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00435>
- Ramos, B. P., & Arnsten, A. F. (2007). Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol Ther*, 113(3), 523–536. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.11.006>
- Rosenberg, M. F., Godoy, M. I., Wade, S. D., Paredes, M. F., Zhang, Y., & Molofsky, A. V. (2023). β -Adrenergic Signaling Promotes Morphological Maturation of Astrocytes in Female Mice. *J Neurosci*, 43(50), 8621–8636. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0357-23.2023>
- Rotermund, N., Schulz, K., Hirnet, D., & Lohr, C. (2019). Purinergic Signaling in the Vertebrate Olfactory System. *Front Cell Neurosci*, 13, 112. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00112>
- Shigetomi, E., & Koizumi, S. (2023). The role of astrocytes in behaviors related to emotion and motivation. *Neurosci*

- Res, 187, 21–39. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2022.09.015>
- Shipley, M. T., Halloran, F. J., & de la Torre, J. (1985). Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res*, 329(1-2), 294–299. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90537-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90537-2)
- Singaravelu, K., Lohr, C., & Deitmer, J. W. (2006). Regulation of store-operated calcium entry by calcium-independent phospholipase A2 in rat cerebellar astrocytes. *J Neurosci*, 26(37), 9579–9592. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2604-06.2006>
- Sitjà-Roqueta, L., Ngum, N. M., Zherebtsov, E. A., Küçükerden, M., Givèhchi, M., Bova, V., Delicata, F., Anaya-Cubero, E., Santamaria, E., Fernández-Irigoyen, J., Conde-Berriozabal, S., Castañé, A., Sokolovski, S., Rafailov, E., Rodríguez, M. J., Alberch, J., Dalkara, D., Möglich, A., Bykov, A.,...Masana, M. (2025). Photoactivated adenylyl cyclase in cortical astrocytes promotes synaptic potentiation and reveals alterations in Huntington's disease. *iScience*, 28(11), 113640. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2025.113640>
- Sobolczyk, M., & Boczek, T. (2022). Astrocytic Calcium and cAMP in Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci*, 16, 889939. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.889939>
- Stavermann, M., Buddrus, K., St John, J. A., Ekberg, J. A., Nilius, B., Deitmer, J. W., & Lohr, C. (2012). Temperature-dependent calcium-induced calcium release via InsP3 receptors in mouse olfactory ensheathing glial cells. *Cell Calcium*, 52(2), 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.04.017>
- Strosberg, A. D. (1993). Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Sci*, 2(8), 1198–1209. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020802>
- Theparambil, S. M., Kopach, O., Braga, A., Nizari, S., Hosford, P. S., Sagi-Kiss, V., Hadjihambi, A., Konstantinou, C., Esteras, N., Gutierrez Del Arroyo, A., Ackland, G. L., Teschemacher, A. G., Dale, N., Eckle, T., Andrikopoulos, P., Rusakov, D. A., Kasparov, S., & Gourine, A. V. (2024). Adenosine signalling to astrocytes coordinates brain metabolism and function. *Nature*, 632(8023), 139–146. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07611-w>
- Vardjan, N., Chowdhury, H. H., Horvat, A., Velebit, J., Malnar, M., Muhič, M., Kreft, M., Krivec Š, G., Bobnar, S. T., Miš, K., Pirkmajer, S., Offermanns, S., Henriksen, G., Storm-Mathisen, J., Bergersen, L. H., & Zorec, R. (2018). Enhancement of Astroglial Aerobic Glycolysis by Extracellular Lactate-Mediated Increase in cAMP. *Front Mol Neurosci*, 11, 148. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00148>
- Vardjan, N., & Zorec, R. (2015). Excitable Astrocytes: Ca(2+)- and cAMP-Regulated Exocytosis. *Neurochem Res*, 40(12), 2414–2424. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1545-x>
- Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiol Rev*, 98(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Vittani, M., Herlo, R., Wang, X., Christensen, M. D. B., Vo, C. T., Mishima, T., Kusk, P., Konno, A., Hirai, H., Tsuboi, T., Kitaguchi, T., Kjaerby, C., Asiminas, A., Yokoyama, T., Sakamoto, M., Nedergaard, M., & Hirase, H. (2025). Cerebral blood flow is modulated by astrocytic cAMP elevation independently of IP(3)R2-mediated Ca(2+) signaling in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 122(27), e2422069122. <https://doi.org/10.1073/pnas.2422069122>
- von Kalben, L., Sauer, J., Gee, C., Hirnet, D., & Lohr, C. (2024). Dopaminergic cAMP signaling in mouse olfactory bulb astrocytes. *Neurochem Int*, 179, 105828. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105828>
- Wahis, J., & Holt, M. G. (2021). Astrocytes, Noradrenaline, α 1-Adrenoreceptors, and Neuromodulation: Evidence and Unanswered Questions. *Front Cell Neurosci*, 15, 645691. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.645691>
- Wendlandt, M., Kürten, A. J., Beiersdorfer, A., Schubert, C., Samad-Yazdtchi, K., Sauer, J., Pinto, M. C., Schulz, K., Friese, M. A., Gee, C. E., Hirnet, D., & Lohr, C. (2023). A(2A) adenosine receptor-driven cAMP signaling in olfactory bulb astrocytes is unaffected in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front Immunol*, 14, 1273837. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1273837>
- Zhang, Y. M., Qi, Y. B., Gao, Y. N., Chen, W. G., Zhou, T., Zang, Y., & Li, J. (2023). Astrocyte metabolism and signaling pathways in the CNS. *Front Neurosci*, 17, 1217451. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1217451>
- Zhou, Z., Okamoto, K., Onodera, J., Hiragi, T., Andoh, M., Ikawa, M., Tanaka, K. F., Ikegaya, Y., & Koyama, R. (2021). Astrocytic cAMP modulates memory via synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(3). <https://doi.org/10.1073/pnas.2016584118>
- Zimnik, N. C., Treadway, T., Smith, R. S., & Araneda, R. C. (2013). α (1A)-Adrenergic regulation of inhibition in the olfactory bulb. *J Physiol*, 591(7), 1631–1643. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.248591>
- Zorec, R., Horvat, A., Vardjan, N., & Verkhratsky, A. (2015). Memory Formation Shaped by Astroglia. *Front Integr Neurosci*, 9, 56. <https://doi.org/10.3389/fnint.2015.00056>

Supplementary Materials for

Crosstalk of noradrenergic Ca²⁺ and cAMP signaling in astrocytes of the murine olfactory bulb

Jessica Sauer, Antonia Beiersdorfer, Franz Lennart Schmidt, Mathias Nordbeck, Oana Constantin, Daniela Hirnet,
Christine Gee, Christian Lohr*

*Corresponding author: christian.lohr@uni-hamburg.de

Figure s1

Figure s2

Figure s3

Figure s4

Figure s5

Figure s6

Figure s7

Figure s8

Table s1

Table s2

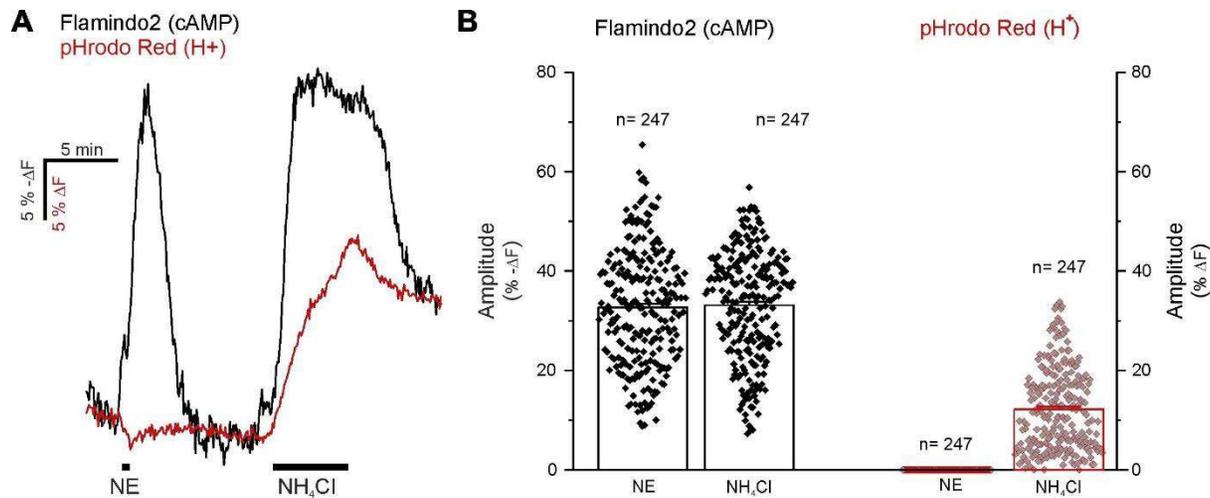


Fig. s1. Effect of pH changes on Flamingo2 fluorescence. (A) Changes in cAMP (black) and H⁺ (red) concentrations induced by norepinephrine (NE) and NH₄Cl. Note that the Flamingo2 trace is inverted ($-\Delta F$) and Flamingo2 fluorescence decreases upon acidification by NH₄Cl. (B) Quantification of cAMP and H⁺ changes. The results demonstrate pH sensitivity of Flamingo2, however, application of NE fails to evoke pH shifts, indicating that NE-evoked changes in Flamingo2 fluorescence are not pH-dependent. Data from 4 mice.

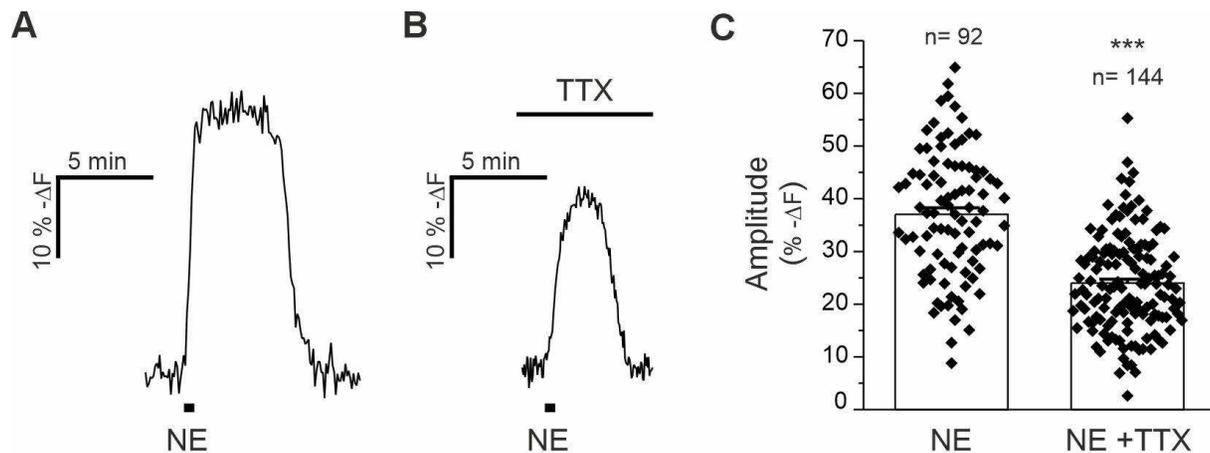


Fig. s2. Tetrodotoxin (TTX) reduces NE-evoked cAMP responses in OB astrocytes. (A) Bath application of norepinephrine (NE, 10 μ M) for 30 s resulted in transient increases in cAMP in the absence (control) and in (B) the presence of 0.5 μ M TTX. (C) NE-evoked increases in cAMP were significantly reduced by TTX. *** $p < 0.001$, Mann-Whitney U-test; data from 6 mice for control (NE), 6 mice for TTX (NE + TTX).

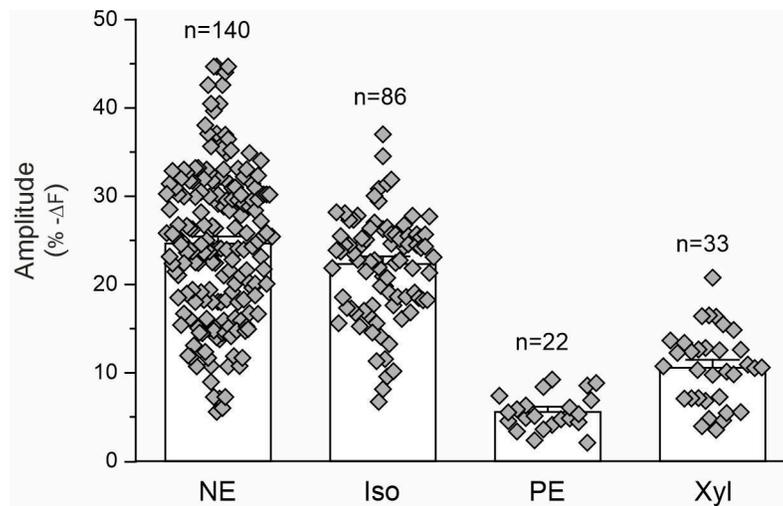


Fig. s3. Amplitudes of cAMP responses evoked by various adrenergic agonists in OB astrocytes. Bath application of norepinephrine (NE, 10 μ M; data from 6 mice), isoprenaline (Iso, 100 μ M; data from 3 mice), phenylephrine (PE, 100 μ M; data from 4 mice) and xylazine (Xyl, 80 μ M; data from 3 mice) evoked increases in the cAMP concentration.

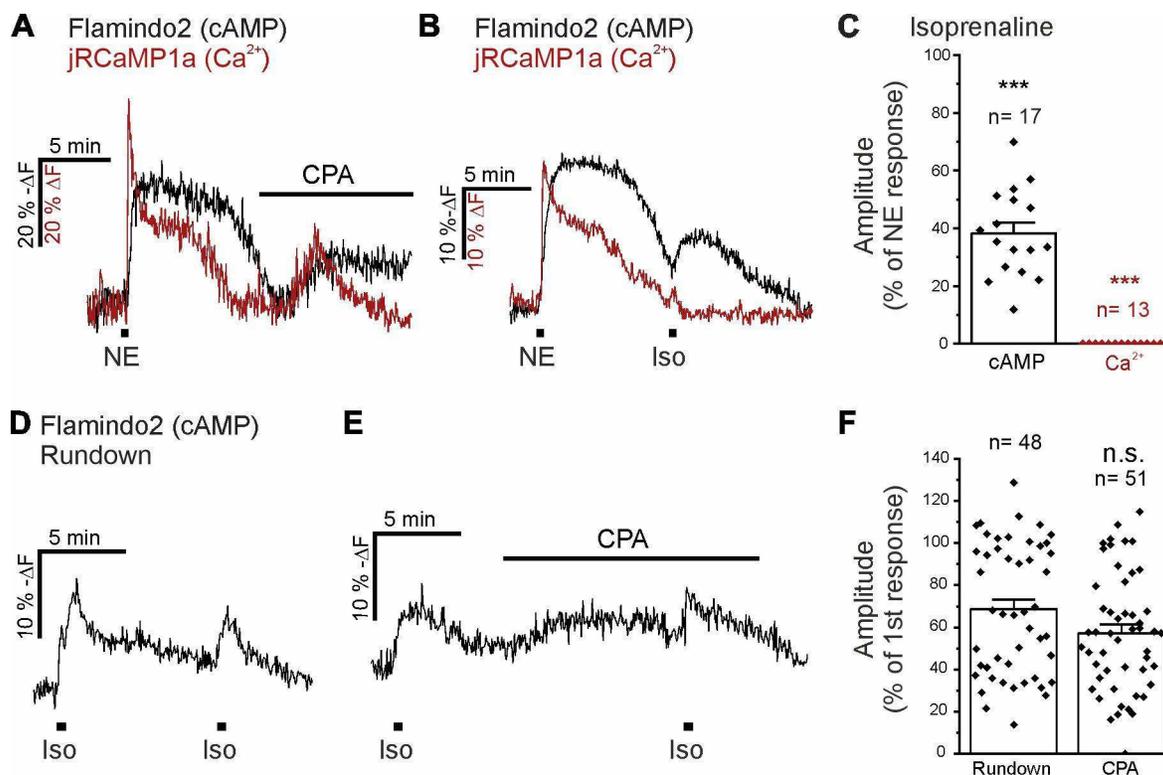


Fig. s4. Cyclopiazonic acid and isoprenaline induced cAMP signals in olfactory bulb astrocytes. (A) Depletion of intracellular Ca^{2+} stores by cyclopiazonic acid is visible by a moderate increase in jRCaMP1a fluorescence (red trace) and accompanied by an increase in Flamindo2 fluorescence (black trace), indicating a rise in cAMP. Norepinephrine (NE, 10 μ M) was applied as a control to test for vital Ca^{2+} and cAMP signaling. (B) NE evoked both cAMP (black trace) and Ca^{2+} signals (red trace), whereas isoprenaline (Iso, 100 μ M) induced only cAMP signals. (C) Analysis of the Iso-induced cAMP and Ca^{2+} signals, normalized to the amplitude of the NE-evoked response which was set to 100%. *** $p < 0.001$, Mann-Whitney-U test. Rundown control: Data from 3 mice Flamindo2, 3 mice Flamindo2 + jRCaMP1a; Iso: data from 2 mice Flamindo2 + jRCaMP1a. (D) cAMP signals evoked by repetitive application of Iso as a rundown experiment. (E) Effect of 20 μ M cyclopiazonic acid (CPA) on Iso-evoked cAMP

signals. (F) In the presence of CPA, Iso-evoked cAMP responses were not significantly altered compared to the corresponding rundown experiment. n.s. not significant, Mann-Whitney-U test; rundown: data from 3 mice; CPA: data from 3 mice.

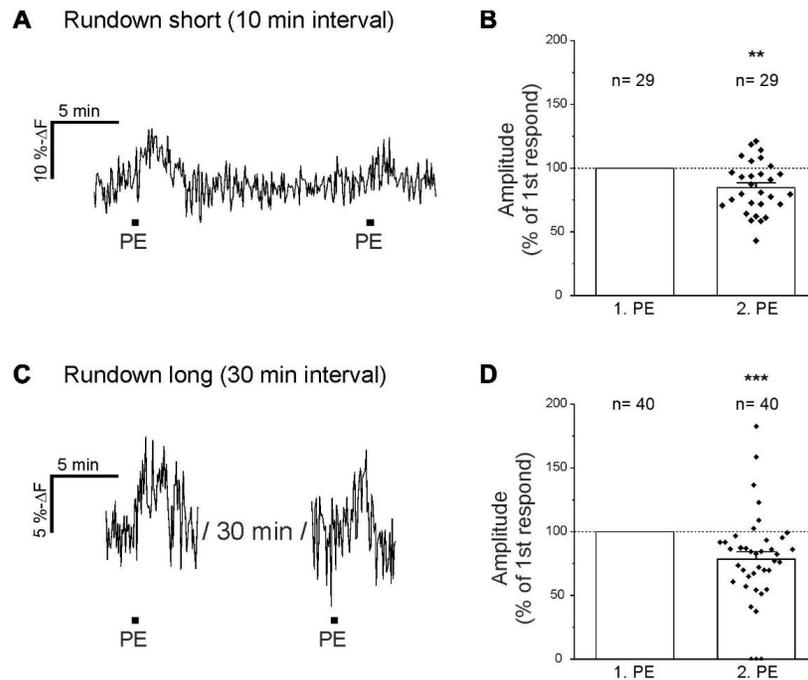


Fig. s5 Phenylephrine rundown experiments. (A) Phenylephrine (PE)-induced cAMP signals evoked by two PE applications with intervals of 10 minutes (rundown short). (B) A second application of PE evoked significantly smaller responses compared to the first application. $**p < 0.01$, Mann-Whitney-U test, data from 3 mice. (C) PE applications with intervals of 30 minutes (rundown long). (D) A second application of PE evoked significantly smaller responses compared to the first application. $***p < 0.001$, Mann-Whitney-U test; data from 7 mice.

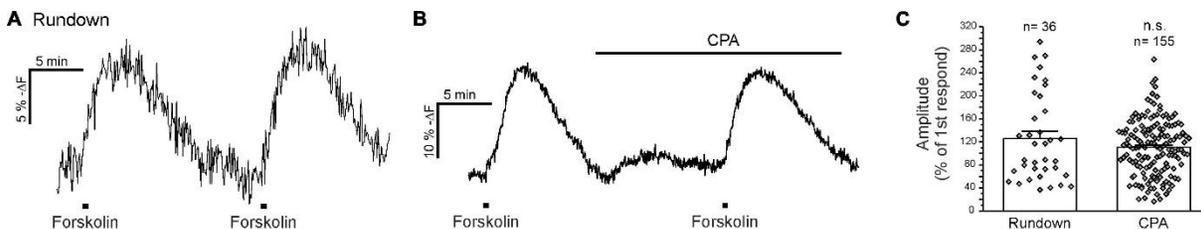


Fig. s6 Cyclopiazonic acid has no effect on adenylyl cyclase activity. (A) Astrocytic cAMP signals evoked by repetitive application of 3 μ M forskolin. (B) Forskolin-evoked cAMP transients before and in the presence of 20 μ M cyclopiazonic acid (CPA). (C) CPA has no significant effect on forskolin-evoked cAMP increases n.s. not significant, Mann-Whitney-U test, data from 4 mice for rundown, 5 mice for CPA.

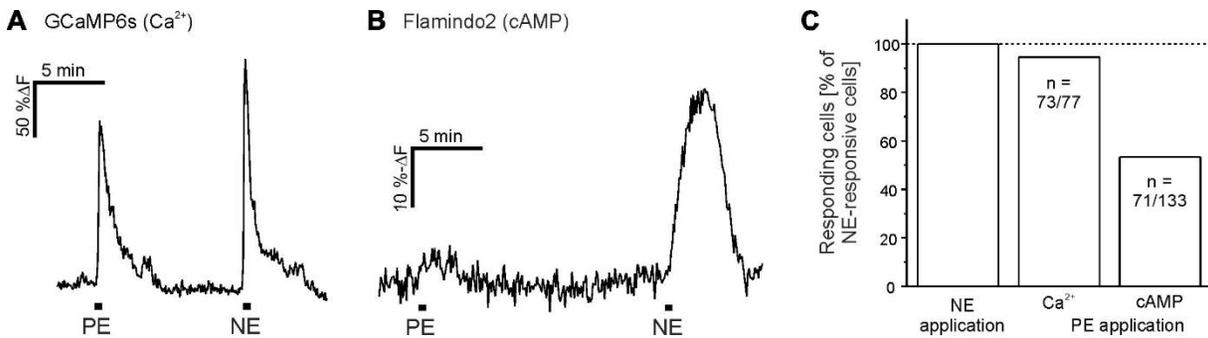


Fig. s7 Ca^{2+} and cAMP signaling induced by phenylephrine and norepinephrine. (A) Phenylephrine (PE)- and norepinephrine (NE)-induced Ca^{2+} and (B) cAMP signals. (C) Fraction of responding astrocytes. While virtually all astrocytes responded to NE and PE with Ca^{2+} transients, only 53 % of astrocytes (71 out of 133) responded to PE application with an increase in cAMP. Data from 3 mice for Ca^{2+} , 3 mice for cAMP.

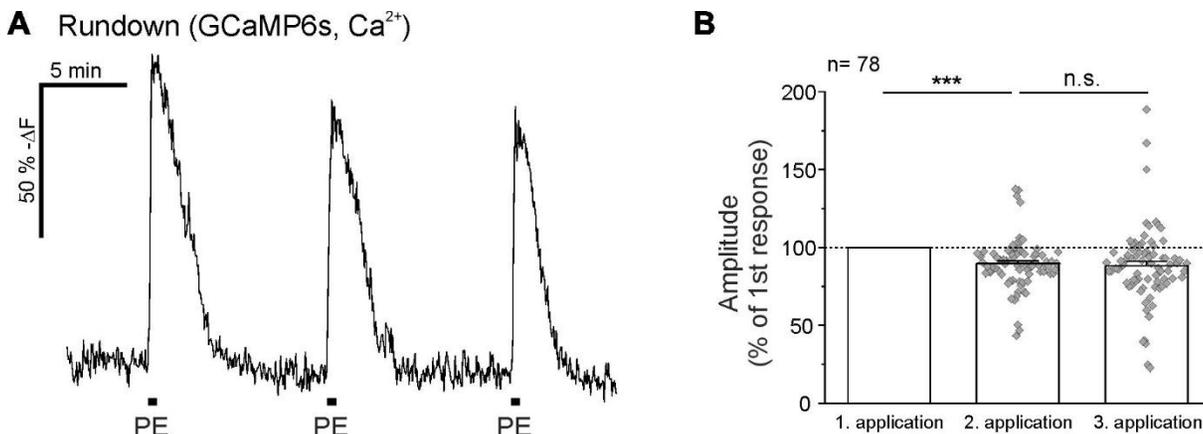


Fig. s8 Rundown of three phenylephrine (PE)-induced Ca^{2+} signals. (A) Ca^{2+} signals in olfactory bulb astrocytes evoked by repetitive PE-applications. (B) Analysis of the Ca^{2+} signal amplitudes, normalized to the amplitude of the first response. n.s.=not significant, ***, $p < 0.001$. Friedmann ANOVA and Wilcoxon signed-rank post hoc test, data from 4 mice.

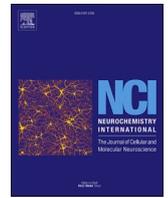
Table s1. Amplitudes of norepinephrine-induced cAMP signals in astrocytes at concentrations ranging from 1–30 μM (raw values for dose-response curve in Fig.1J). Data from 3 mice.

Concentration norepinephrine	Mean amplitudes \pm SEM (% $-\Delta\text{F}$)	n
1 μM	6.1 \pm 0.8	88
3 μM	23.7 \pm 1.1	88
10 μM	27.4 \pm 0.9	88
30 μM	31.0 \pm 0.9	88

Table s2. Amplitudes of phenylephrine-induced cAMP signals in astrocytes at concentrations ranging from 1–300 μ M (raw values for dose-response curve in Fig. 4B). Data from 6 mice.

Concentration phenylephrine	Mean amplitudes \pm SEM (% $-\Delta F$)	n
1 μ M	3.7 \pm 0.5	61
3 μ M	6.3 \pm 0.3	84
10 μ M	6.6 \pm 0.2	112
30 μ M	7.7 \pm 0.4	80
100 μ M	8.3 \pm 0.5	57
300 μ M	8.7 \pm 0.7	29

3. Dopaminergic cAMP signaling in mouse olfactory bulb astrocytes



Dopaminergic cAMP signaling in mouse olfactory bulb astrocytes

Levi von Kalben^{a,1}, Jessica Sauer^{a,1}, Christine Gee^b, Daniela Hirnet^a, Christian Lohr^{a,*}

^a Institute of Cell and Systems Biology of Animals, University of Hamburg, Hamburg, Germany

^b Institute of Synaptic Physiology, Center for Molecular Neurobiology Hamburg, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Dopamine
D1 receptor
Astrocytes
Olfactory bulb
Cyclic adenosine monophosphate

ABSTRACT

Cyclic AMP (cAMP) is an important second messenger in virtually all animal cell types, including astrocytes. In the brain, it modulates energy metabolism, development and synaptic plasticity. Dopamine receptors are G protein-coupled receptors that affect cAMP production by adenylyl cyclases. They are divided into two subgroups, D1-like receptors linked to G_s proteins stimulating cAMP production and D2-like receptors linked to G_{i/o} proteins inhibiting cAMP production. In the present study, we investigated the effect of dopamine receptor activation on cAMP dynamics in astrocytes of the mouse olfactory bulb, the brain region with the largest population of dopaminergic neurons. Using the genetically encoded cAMP sensor Flamingo2 we visualized changes in the cytosolic cAMP concentration and showed that dopamine application results in a transient increase in cAMP. This cAMP increase could be mimicked by the D1-like receptor agonist A 68930 and was inhibited by the D1-like receptor antagonist SCH 23390, whereas D2-like receptor ligands had no effect on the astrocytic cAMP concentration. Thus, olfactory bulb astrocytes express D1-like receptors that are linked to cAMP production.

1. Introduction

Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is a ubiquitous second messenger that is involved in the orchestration of molecular and biochemical processes throughout the animal kingdom (Gancedo, 2013). In mammals, cAMP is produced from adenosine triphosphate (ATP) by adenylyl cyclases (ACs), a family of ten. One of the isoforms is soluble while nine are membrane anchored (Devasani and Yao, 2022). AC activity is under control of several G protein-coupled receptors, with G_s proteins stimulating, and G_{i/o} proteins inhibiting ACs (Devasani and Yao, 2022). Hence, the combination of G_s- and G_{i/o}-coupled receptors with particular ACs in a given cell determines cAMP signaling properties and function. In the nervous system, cAMP signaling is involved in learning and memory formation as well as neuronal development (Nguyen and Woo, 2003; Nicol and Gaspar, 2014). In glial cells such as astrocytes, cAMP signaling has been shown to regulate gene expression, glycogenolysis, extracellular K⁺ clearance and immune responses to neuroinflammation (Horvat and Vardjan, 2019; Zhou et al., 2019).

Astrocytes in the olfactory bulb have been studied extensively in terms of Ca²⁺ signaling. Olfactory bulb astrocytes express receptors for glutamate, GABA, norepinephrine, ATP and adenosine that mediate

Ca²⁺ release from internal stores (Rotermund et al., 2019). In addition, Ca²⁺ increases upon activation of D1 and D2-like dopamine receptors, which are canonically linked to AC stimulation and inhibition, respectively (Fischer et al., 2020). Much less is known about cAMP signaling in olfactory bulb astrocytes, thus we imaged astrocytic cAMP signals in olfactory bulb brain slices in response to stimulation of dopaminergic receptors. We found that activation of D1-like receptors increased the cytosolic cAMP concentration in olfactory bulb astrocytes whereas stimulation of D2-like receptors, usually coupled to G_{i/o} proteins, had no effect on resting cAMP levels nor on cAMP levels elevated due to application of forskolin, an activator of ACs. Our results show that dopaminergic signaling in olfactory bulb astrocytes is linked to cAMP signaling via D1-like receptors.

2. Material and methods

2.1. Animal handling and preparation of brain slices

All experiments were performed as described before (Wendlandt et al., 2023). Experiments were performed on 6–16 week old C57Bl/6J wild type mice of both sexes (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME,

Abbreviations: AC, adenylyl cyclase; ATP, adenosine triphosphate; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; GABA, gamma amino butyric acid.

* Corresponding author.

E-mail address: christian.lohr@uni-hamburg.de (C. Lohr).

¹ These authors contributed equally to the study.

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105828>

Received 1 May 2024; Received in revised form 20 July 2024; Accepted 4 August 2024

Available online 10 August 2024

0197-0186/© 2024 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

USA). Mice were held in the animal facility of the Institute of Cell and Systems Biology (University of Hamburg). Mice were kept in a 12/12 light/dark cycle and had access to food and water *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with German law, the directive 2010/63/EU and were approved by the local ethics committee and the Behörde für Justiz und Verbraucherschutz, Lebensmittel und Veterinärwesen Hamburg (N 010/2021). We used endotoxin-free recombinant adeno-associated viruses AAV^{2/PhP.eB}₁hGFAP-Flamindo2 to express the genetically encoded cAMP sensor Flamindo2 in astrocytes. Virus suspensions (70 μ l virus suspension containing 1.0 to 1.2 $\times 10^{11}$ viral genomes) were diluted with sterile saline and injected i.v. into the orbital sinus of isoflurane-anesthetized mice. Three to four weeks after virus injection, mice were anesthetized using isoflurane (5% v/v in oxygen) and decapitated. Brains were quickly dissected and transferred into chilled Na⁺/Ca²⁺-reduced in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) (in mM: NaCl, 83; NaHCO₃, 26.2; NaH₂PO₄, 1; KCl, 2.5; sucrose, 70; D-glucose, 20; CaCl₂, 0.5; MgSO₄, 2.5) that was continuously gassed with carbogen (95% O₂/5% CO₂; buffered to pH 7.4 with CO₂/bicarbonate) during the entire preparation procedure and 220 μ m thick slices of the bulbs were cut using a vibratome.

2.2. Confocal cAMP imaging and data analysis

Brain slices were placed in ACSF (in mM: NaCl, 120; NaHCO₃, 26; NaH₂PO₄, 1; KCl, 2.5; D-glucose, 2.8; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1) in an experimental chamber and changes in the intracellular cAMP concentration were visualized by the genetically encoded cAMP indicator Flamindo2 that was excited at 488 nm. Fluorescence was collected between 500 and

530 nm using a confocal microscope (eCl1, Nikon). Time series of images were recorded at a frame rate of 1 frame every 5 s. Data were evaluated with Nikon EZ-C1 Viewer (Nikon), processed using Excel (Microsoft, USA) and statistical tests were applied with Origin Pro 9.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Flamindo2-expressing astrocytes in the glomerular layer were marked by a region of interest (ROI) and the mean fluorescence intensity within the ROI was measured throughout the time series. The mean fluorescence intensity (F) was normalized to the basal fluorescence intensity at rest which was set to 100%, hence changes in fluorescence intensity are stated as ΔF in %. Since an increase in the cAMP concentration in astrocytes is reported as a decrease in Flamindo2 fluorescence, we inverted the fluorescence traces in the figures to render perception of the results more intuitively. All data values are given as mean \pm standard error of the mean (SEM) with n representing the number of astrocytes analyzed. For each set of experiments, at least three animals were used. Means were tested for statistical differences using the Mann-Whitney-U test. For multiple comparisons the Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's post hoc test was used. Statistical differences were indicated with *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001.

3. Results

3.1. Dopamine-evoked cAMP responses in olfactory bulb astrocytes

We used Flamindo2-expressing astrocytes in the glomerular layer of acute olfactory bulb brain slices to study dopaminergic cAMP signaling (Fig. 1A). As shown before (Wendlandt et al., 2023), Flamindo2 was

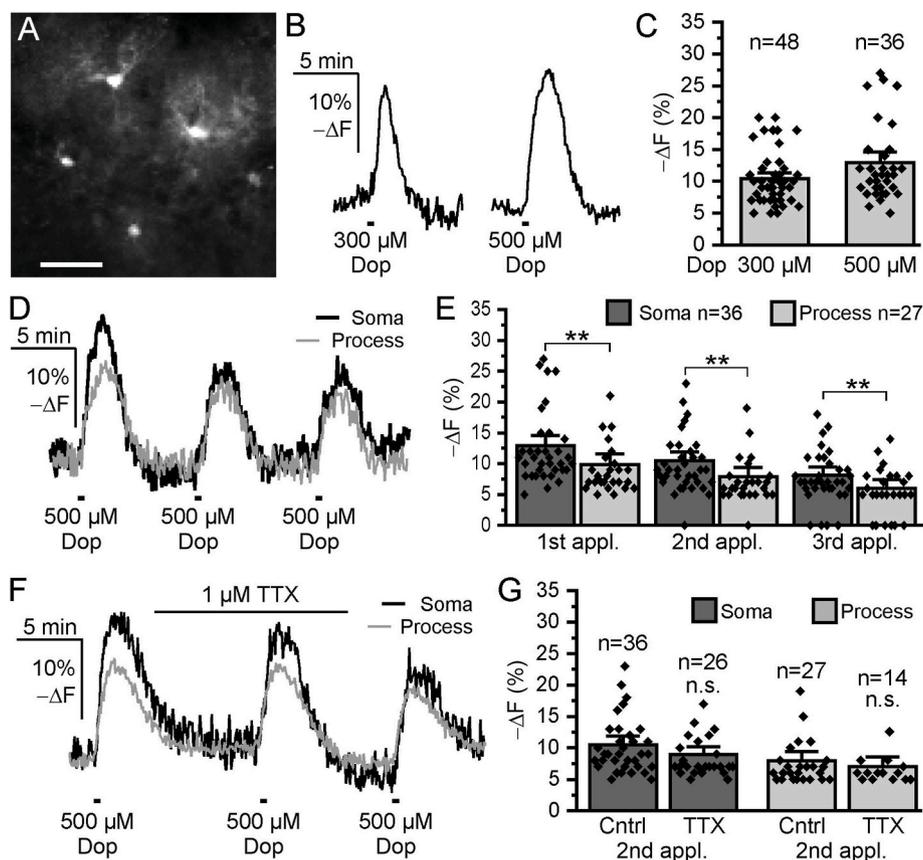


Fig. 1. Dopamine increases the cAMP concentration in olfactory bulb astrocytes. A) Olfactory bulb astrocytes in the glomerular layer expressing the cAMP sensor Flamindo2. Scale bar: 25 μ m. B) Increases in cAMP evoked by dopamine (Dop). C) The cAMP responses evoked by 300 μ M and 500 μ M dopamine were not significantly different. D) Repetitive application of dopamine evoked cAMP responses in somata (black trace) and cell processes (light gray trace). E) The cAMP responses in cell processes (light gray bars) were significantly smaller than those in somata (dark gray bars). **p < 0.01. F) Dopamine-evoked cAMP responses in the absence and presence of the neurotoxin tetrodotoxin (TTX). G) Suppression of neuronal activity with TTX had no significant effect (n.s.) on dopamine-evoked cAMP responses when compared to the corresponding (second) application of control experiments in the absence of TTX.

exclusively expressed by astrocytes (Suppl. Fig. 1). Bath application of 300 μM and 500 μM dopamine evoked cAMP responses of $10.4 \pm 0.6\%$ $-\Delta\text{F}$ ($n = 48$) and $12.9 \pm 1.1\%$ $-\Delta\text{F}$ ($n = 36$) (Fig. 1B and C), respectively, as recorded in somata of astrocytes. The response amplitude between both concentrations was not significantly different and we used 500 μM dopamine in all further experiments since this concentration evoked slightly larger responses compared to 300 μM . In total, 92 % of Flamindo2-expressing astrocytes responded to bath application of 500 μM dopamine (Suppl. Figs. 2A–C). We applied dopamine repetitively with an interval of 10 min and analyzed cAMP responses in somata and cell processes separately (Fig. 1D; see also Suppl. Figs. 2D and E). The cAMP response in somata evoked by the first application of 500 μM dopamine (see above) was significantly larger than in cell processes with an amplitude of $9.9 \pm 1.1\%$ $-\Delta\text{F}$ ($n = 27$) (Fig. 1E). The responses in both the somata and the cell processes decreased in amplitude from one dopamine application to the next, however, this decrease was not significant. We could not detect any differences in the response onset between somata and cell processes. To rule out an indirect stimulation of astrocytes by dopamine-evoked neuronal neurotransmitter release, we suppressed neuronal activity with tetrodotoxin (TTX, Fig. 1F). Since responses evoked by dopamine in the presence of TTX were not significantly different from the corresponding dopamine application in control experiments (2nd application, Fig. 1G; somata $10.4 \pm 1.0\%$ $-\Delta\text{F}$, $n = 36$ vs $9.0 \pm 0.8\%$ $-\Delta\text{F}$, $n = 26$; cell processes $7.9 \pm 1.0\%$ $-\Delta\text{F}$, $n = 27$ vs $7.0 \pm 1.0\%$ $-\Delta\text{F}$, $n = 14$) olfactory bulb astrocytes seem to express dopamine receptors that are linked to AC activation.

3.2. D1-like dopaminergic receptors mediate cAMP responses in olfactory bulb astrocytes

We generated a pharmacological profile of the dopaminergic

responses by analyzing cAMP signals in the somata of the astrocytes. Since D1-like dopaminergic receptors are known to stimulate ACs, we tested the effect of the D1-like receptor antagonist SCH 23390 (10 μM) incubated for 10 min (Fig. 2A). SCH 23390 reduced the dopamine-evoked cAMP responses by $87 \pm 3\%$ of the control before application of SCH 23390 ($n = 51$) (Fig. 2B), indicating that dopamine mainly acts via D1-like receptors. This was confirmed by the stimulatory effect of A 68930 (50–100 μM), a D1-like receptor agonist (Fig. 2C and Suppl. Figs. 3A and B). 50 μM of A 68930 induced cAMP signals with an amplitude of $7.3 \pm 0.7\%$ $-\Delta\text{F}$ ($n = 12$) upon a first application. A second application produced cAMP signals that were not significantly different, while responses by a third application were significantly smaller compared to the first application, suggesting desensitization of the receptors and/or downstream components of the signaling pathway (Fig. 2D). Virtually all cells that responded to dopamine also responded to A 68930 with an increase in cAMP (Suppl. Figs. 3A and B). To test for D2-like receptors that are linked to inhibition of ACs and hence a decrease in cAMP, we used the D2-selective agonist quinpirole (1–20 μM). We reasoned that we might see an effect of inhibiting ACs on cAMP levels only if the ACs were pre-stimulated with 10 μM forskolin. However, neither at resting cAMP levels nor at elevated cAMP levels was quinpirole able to reduce the cAMP concentration (Fig. 2E and F). The results show that dopamine increases the cAMP concentration in olfactory bulb astrocytes by D1-like dopaminergic receptors, but fails to decrease the cAMP concentration by stimulation of D2-like receptors. It has been shown that dopamine is able to activate beta-adrenergic receptors that increase cAMP levels (Lei, 2014) and we tested the beta-adrenergic antagonist ICI 118.551 on dopamine-evoked cAMP signals in olfactory bulb astrocytes (Suppl. Fig. 3). 15 μM ICI 118.551 reduced dopaminergic cAMP transients by $28.5 \pm 3.7\%$ ($n = 37$), indicating that the activation of beta-adrenergic receptors had only a minor

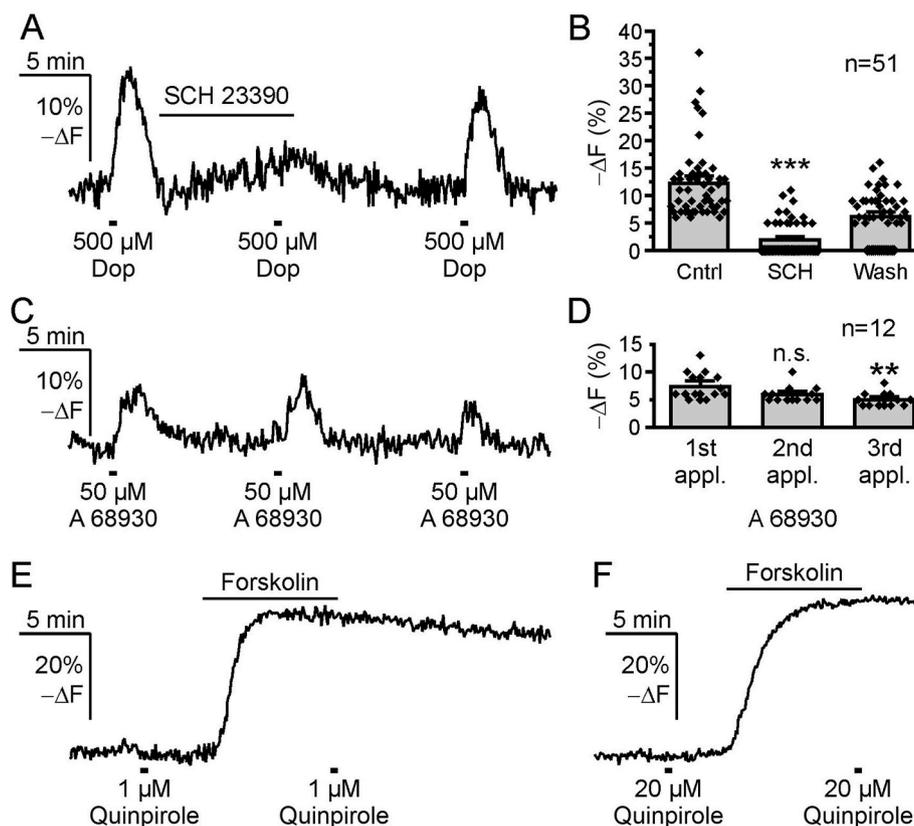


Fig. 2. D1-like receptors mediate increases in the cAMP concentration. A) Effect of the D1-like dopamine receptor antagonist SCH 23390 (10 μM). B) SCH 23390 greatly reduced dopamine-evoked cAMP responses. $***p < 0.001$. C) Repetitive application of the D1-like agonist A 68930. D) Repetitive application of A 68930 evoked cAMP responses with slightly descending amplitude. n.s. not significant, $**p < 0.01$. E) The D2-like agonist quinpirole failed to reduce the cAMP concentration even when cAMP was elevated by the AC activator forskolin (10 μM) at a concentration of 1 μM and F) 20 μM .

contribution to the dopamine-evoked cAMP signals we recorded.

4. Discussion

Our results show an increase in cAMP levels evoked by dopamine receptors with a D1-like pharmacological profile in mouse olfactory bulb astrocytes. In contrast, we did not find any indication of D2-like receptors linked to AC inhibition and hence cAMP decrease. The potent D2-like-specific agonist quinpirole at a concentration of 20 μM which is several orders of magnitude higher than the EC_{50} values at D2-like receptors failed to reduce the cAMP concentration in astrocytes even when the cAMP level was raised by stimulating the ACs with forskolin, questioning the presence of D2-like receptors in olfactory bulb astrocytes. This finding is in contrast to our recent report that olfactory bulb astrocytes generate increases in cytosolic Ca^{2+} triggered by D2-like receptor activation in juvenile mice with an age up to three weeks (Fischer et al., 2020). Mice in the present study were six weeks and older. Hence, down-regulation of D2-like receptors during adolescent development might account for the differences in these two studies with respect to the presence of D2-like receptor-dependent signaling. Alternatively, D2 receptors might not form Gi-coupled homomers in the olfactory bulb and exist only as calcium mobilizing D1/D2 heteromers (Chun et al., 2013). Distinguishing between these possibilities warrants further investigation. In Fischer et al. (2020) we found that only high concentrations of 300–500 μM of dopamine were able to fully activate dopaminergic Ca^{2+} signaling (with an EC_{50} of 76 μM) and we used dopamine in the same concentration range in the present study. Since neurons expressing dopamine transporters are found at high density in the mouse olfactory bulb (Banerjee et al., 2015), efficient dopamine uptake might result in much lower dopamine concentrations at the receptors in the tissue, which could explain the high concentrations needed to fully activate dopamine receptors in our studies. High concentrations of dopamine might also stimulate beta-adrenergic receptors (Lei, 2014), as verified by the small but significant inhibiting effect of beta-adrenergic antagonists on the dopaminergic cAMP signals in our study. We found smaller amplitudes of dopamine-evoked, cAMP-dependent fluorescence changes in astrocyte processes compared to the soma, suggesting that cAMP is more efficiently generated in the soma due to, e.g., a higher concentration of dopamine receptors or other components of the AC-cAMP signaling pathway. However, we cannot exclude that in regions of interest covering cell processes, a larger number of pixels from structures not expressing Flamindo2 (that are thus non-fluorescent and do not contribute to fluorescence changes) are included in the region of interest, leading to an apparently smaller amplitude of changes in the mean fluorescence signal compared to the soma.

Dopamine plays an important role in information processing in the olfactory bulb which in mice harbors the largest population of dopaminergic neurons in the brain (Cave and Baker, 2009). D2-like receptors located on synaptic terminals of afferent sensory fibers in the glomeruli of the olfactory bulb lead to inhibition of voltage-gated Ca^{2+} channels and thereby regulate glutamate release (Ennis et al., 2001). In addition, D1-like receptors expressed by external tufted cells potentiate I_h currents leading to depolarisation and feed-forward excitation of the neuronal network (Liu et al., 2013). Thereby, dopamine significantly shapes the input signal into the olfactory bulb. Dopaminergic neurons and fibers are mostly restricted to the glomerular layer with only few extensions into the external plexiform layer (Liu et al., 2013) and thus we focussed on astrocytes in this olfactory bulb subregion. Our results show that not only olfactory bulb neurons but also astrocytes are prone to dopaminergic stimulation and might contribute to dopaminergic modulation of the neuronal network. Olfactory bulb astrocytes have been shown to affect both mitral and granule cells by release of glutamate and GABA (Kozlov et al., 2006). In addition, ATP is released by olfactory bulb astrocytes and rapidly degraded to adenosine, which modulates mitral cells by activating 2-pore domain K^+ channels. The adenosine also attenuates dendro-dendritic reciprocal inhibition between mitral and

granule cells by suppression of presynaptic voltage-gated Ca^{2+} channels (Rotermund et al., 2019). As we now demonstrate that dopamine not only increases astrocytic calcium (Fischer et al., 2020) but also cAMP, it will be interesting to study further whether cAMP modulates release of ATP, glutamate and GABA from olfactory bulb astrocytes and accounts for some of the effects of dopamine on synaptic plasticity and neuronal coding of odor information (Ennis et al., 2001; Liu et al., 2013). In the hippocampus, cAMP signaling in astrocytes is involved in synaptic plasticity and memory formation (Oe et al., 2020; Zhou et al., 2021), demonstrating the important role astrocytic cAMP signaling plays in neuronal function. In addition, cAMP signaling has been shown to affect the metabolic state of astrocytes, leading to an increase in glycolysis, intracellular lactate levels, and support of neurons with lactate (Theparambil et al., 2024; Vardjan et al., 2018). Hence, dopaminergic neurons might communicate metabolic demands of active glomeruli to astrocytes by addressing dopamine-dependent cAMP signaling.

Funding

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft [SFB 1328 A07, 404539526, and A16, 404644007]

CRediT authorship contribution statement

Levi von Kalben: Writing – review & editing, Visualization, Validation, Investigation. **Jessica Sauer:** Writing – review & editing, Investigation. **Christine Gee:** Writing – review & editing, Resources, Methodology, Funding acquisition. **Daniela Hirnet:** Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Funding acquisition. **Christian Lohr:** Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Funding acquisition, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

We thank A. C. Rakete for technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

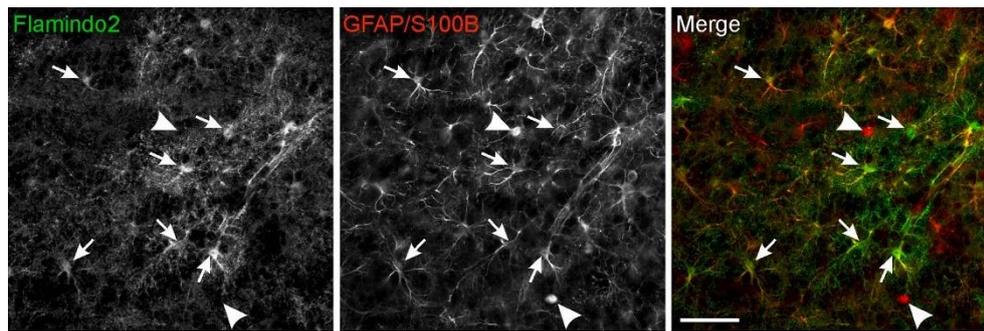
Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105828>.

References

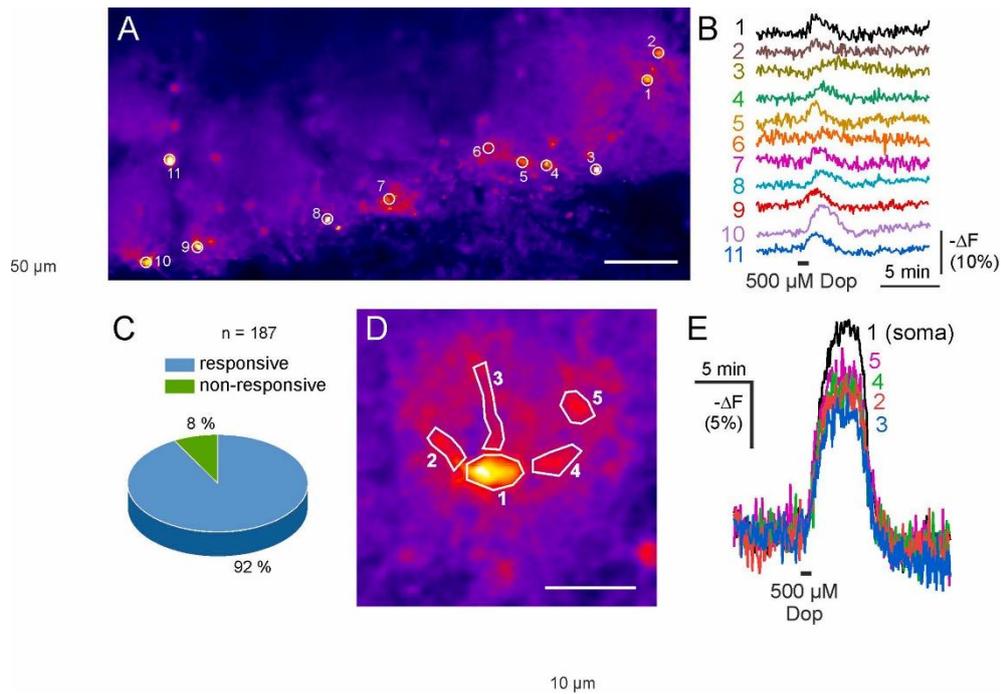
- Banerjee, A., Marbach, F., Anselmi, F., Koh, M.S., Davis, M.B., Garcia da Silva, P., Delevich, K., Oyibo, H.K., Gupta, P., Li, B., Albeanu, D.F., 2015. An interglomerular circuit gates glomerular output and implements gain control in the mouse olfactory bulb. *Neuron* 87, 193–207. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.019>.
- Cave, J.W., Baker, H., 2009. Dopamine systems in the forebrain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 651, 15–35. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0322-8_2.
- Chun, L.S., Free, R.B., Doyle, T.B., Huang, X.P., Rankin, M.L., Sibley, D.R., 2013. D1-D2 dopamine receptor synergy promotes calcium signaling via multiple mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 84, 190–200. <https://doi.org/10.1124/mol.113.085175>.
- Devasani, K., Yao, Y., 2022. Expression and functions of adenylyl cyclases in the CNS. *Fluids Barriers CNS* 19, 23. <https://doi.org/10.1186/s12987-022-00322-2>.
- Ennis, M., Zhou, F.M., Ciombor, K.J., Aroniadou-Anderjaska, V., Hayar, A., Borrelli, E., Zimmer, L.A., Margolis, F., Shipley, M.T., 2001. Dopamine D2 receptor-mediated presynaptic inhibition of olfactory nerve terminals. *J. Neurophysiol.* 86, 2986–2997. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.6.2986>.
- Fischer, T., Scheffler, P., Lohr, C., 2020. Dopamine-induced calcium signaling in olfactory bulb astrocytes. *Sci. Rep.* 10, 631. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57462-4>.

- Gancedo, J.M., 2013. Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life. *Biol. Rev. Camb. Phil. Soc.* 88, 645–668. <https://doi.org/10.1111/brv.12020>.
- Horvat, A., Vardjan, N., 2019. Astroglial cAMP signalling in space and time. *Neurosci. Lett.* 689, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.06.025>.
- Kozlov, A.S., Angulo, M.C., Audinat, E., Charpak, S., 2006. Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10058–10063. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603741103>.
- Lei, S., 2014. Cross interaction of dopaminergic and adrenergic systems in neural modulation. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 6, 137–142.
- Liu, S., Plachez, C., Shao, Z., Puche, A., Shipley, M.T., 2013. Olfactory bulb short axon cell release of GABA and dopamine produces a temporally biphasic inhibition-excitation response in external tufted cells. *J. Neurosci.* 33, 2916–2926. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3607-12.2013>.
- Nguyen, P.V., Woo, N.H., 2003. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog. Neurobiol.* 71, 401–437. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2003.12.003>.
- Nicol, X., Gaspar, P., 2014. Routes to cAMP: shaping neuronal connectivity with distinct adenylate cyclases. *Eur. J. Neurosci.* 39, 1742–1751. <https://doi.org/10.1111/ejn.12543>.
- Oe, Y., Wang, X., Patriarchi, T., Konno, A., Ozawa, K., Yahagi, K., Hirai, H., Tsuboi, T., Kitaguchi, T., Tian, L., McHugh, T.J., Hirase, H., 2020. Distinct temporal integration of noradrenaline signaling by astrocytic second messengers during vigilance. *Nat. Commun.* 11, 471. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14378-x>.
- Rotermund, N., Schulz, K., Hirnet, D., Lohr, C., 2019. Purinergic signaling in the vertebrate olfactory system. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 112. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00112>.
- Theparambil, S.M., Kopach, O., Braga, A., Nizari, S., Hosford, P.S., Sagi-Kiss, V., Hadjihambi, A., Konstantinou, C., Esteras, N., Gutierrez Del Arroyo, A., Ackland, G. L., Teschemacher, A.G., Dale, N., Eckle, T., Andrikopoulos, P., Rusakov, D.A., Kasparov, S., Gourine, A.V., 2024. Adenosine signalling to astrocytes coordinates brain metabolism and function. *Nature* 632, 139–146. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07611-w>.
- Vardjan, N., Chowdhury, H.H., Horvat, A., Velebit, J., Malnar, M., Muhić, M., Kreft, M., Krivec, Š.G., Bobnar, S.T., Miš, K., Pirkmajer, S., Offermanns, S., Henriksen, G., Storm-Mathisen, J., Bergersen, L.H., Zorec, R., 2018. Enhancement of astroglial aerobic glycolysis by extracellular lactate-mediated increase in cAMP. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 148. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00148>.
- Wendlandt, M., Kurten, A.J., Beiersdorfer, A., Schubert, C., Samad-Yazdtchi, K., Sauer, J., Pinto, M.C., Schulz, K., Friese, M.A., Gee, C.E., Hirnet, D., Lohr, C., 2023. A(2A) adenosine receptor-driven cAMP signaling in olfactory bulb astrocytes is unaffected in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front. Immunol.* 14, 1273837. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1273837>.
- Zhou, Z., Ikegaya, Y., Koyama, R., 2019. The astrocytic cAMP pathway in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20030779>.
- Zhou, Z., Okamoto, K., Onodera, J., Hiragi, T., Andoh, M., Ikawa, M., Tanaka, K.F., Ikegaya, Y., Koyama, R., 2021. Astrocytic cAMP modulates memory via synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016584118>.

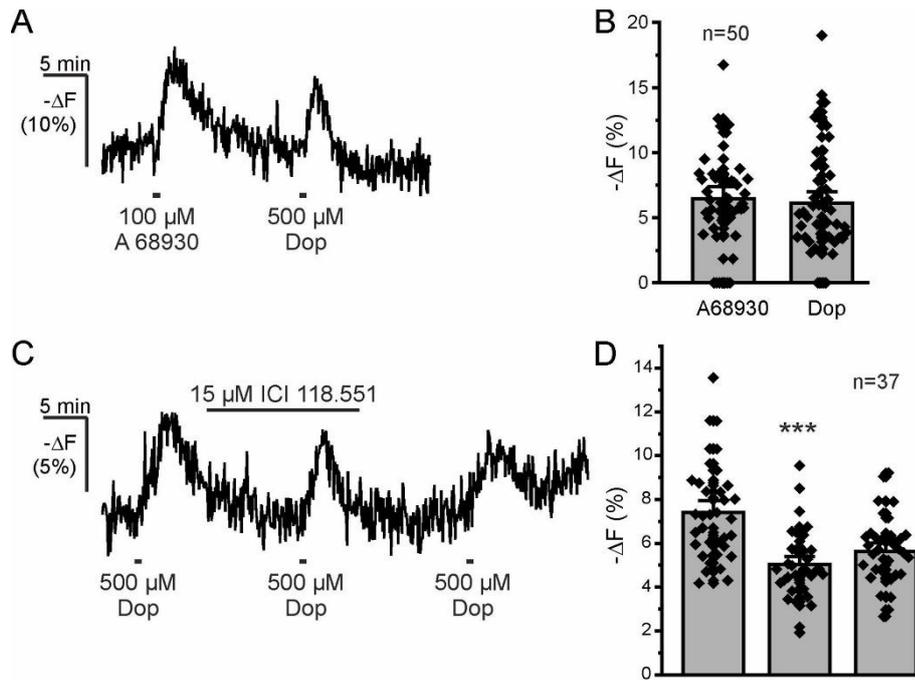
5. Supplement



Supplementary Fig. 1. Flamindo2 expression in olfactory bulb astrocytes. Flamindo2 was visualized by anti-GFP antibody staining (left, green channel). Astrocytes were identified by a combination of anti-GFAP/anti-S100B antibodies (middle, red). For antibody staining, acute brain slices were fixed for 1 h in 4% formaldehyd in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) after an imaging experiment. After blocking unspecific binding sites with 5% normal goat serum in PBS for 1 h, slices were incubated with anti-GFP (1:500; chicken, #132 006, Synaptic Systems, Göttingen, Germany), anti GFAP (1:500; rabbit, Z0334, Dako, Hamburg, Germany) and anti-S100 (1:500; rabbit, Z0311, Dako) over night. Secondary antibodies (Alexa Fluor 488 goat anti-chicken, #Ab150173, Abcam, Cambridge, UK; Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit, #A21429, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) were incubated over night, slices mounted in Shandon Immu-Mount (Life-Technologies) and images recorded using a confocal microscope (Nikon eC1). All cells expressing Flamindo2 (arrows) were also labeled by GFAP/S100B antibodies, while some GFAP/S100B-positive cells were Flamindo2-negative (arrowheads), indicating that all Flamindo2-expressing cells were astrocytes, but not all astrocytes expressed Flamindo2. Scale bar: 50 μm .



Supplementary Fig. 2. Dopamine-evoked increases in the cAMP concentration in olfactory bulb astrocytes. A) Flamindo2-expressing astrocytes in an acute mouse olfactory brain slice. Regions of interest (1–11) indicate regions in which fluorescence traces depicted in B) were recorded. Scale bar: 50 μm . B) Responses of Flamindo2-expressing astrocytes to dopamine. All but one cell (ROI 6) responded to bath application of 500 μM dopamine (30 s). C) 92 % of Flamindo2-expressing astrocytes responded to application of dopamine with an increase in the cAMP concentration. D) Regions of interest covering the cell body (1) and several cell processes (2–5) of an individual Flamindo2-expressing astrocyte. Scale bar: 10 μm . E) Traces of dopamine-evoked fluorescence changes as recorded in the regions of interest in D).



Supplementary Fig. 3. Effect of the D1-like receptor-specific agonist A 68930 and the beta-adrenergic antagonist ICI 118.551 on cAMP signaling in olfactory bulb astrocytes. A) The D1-like agonist A 68930 and dopamine evoked increases in cAMP in olfactory bulb astrocytes. B) The mean amplitudes of increase in cAMP were not significantly different between 100 μM A 68930 and 500 μM dopamine. C) Effect of the beta-adrenergic antagonist ICI 118.551 on dopamine-evoked cAMP transients. D) 15 μM of ICI 118.551 significantly reduced dopamine-evoked cAMP transients (***p* < 0.001).

4. A₂A adenosine receptor-driven cAMP signaling in olfactory bulb astrocytes is unaffected in experimental autoimmune encephalomyelitis



OPEN ACCESS

EDITED BY

Santina Bruzzone,
University of Genoa, Italy

REVIEWED BY

Carola Ledderose,
University of California, San Diego,
United States
Nicholas John Geraghty,
University of Wollongong, Australia

*CORRESPONDENCE

Christian Lohr
✉ christian.lohr@uni-hamburg.de

RECEIVED 07 August 2023

ACCEPTED 06 November 2023

PUBLISHED 23 November 2023

CITATION

Wendlandt M, Kürten AJ, Beiersdorfer A, Schubert C, Samad-Yazdtchi K, Sauer J, Pinto MC, Schulz K, Friese MA, Gee CE, Hirnet D and Lohr C (2023) A_{2A} adenosine receptor-driven cAMP signaling in olfactory bulb astrocytes is unaffected in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front. Immunol.* 14:1273837. doi: 10.3389/fimmu.2023.1273837

COPYRIGHT

© 2023 Wendlandt, Kürten, Beiersdorfer, Schubert, Samad-Yazdtchi, Sauer, Pinto, Schulz, Friese, Gee, Hirnet and Lohr. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

A_{2A} adenosine receptor-driven cAMP signaling in olfactory bulb astrocytes is unaffected in experimental autoimmune encephalomyelitis

Marina Wendlandt¹, Alina J. Kürten¹, Antonia Beiersdorfer¹, Charlotte Schubert², Kiana Samad-Yazdtchi¹, Jessica Sauer¹, M. Carolina Pinto³, Kristina Schulz¹, Manuel A. Friese², Christine E. Gee³, Daniela Hirnet¹ and Christian Lohr^{1*}

¹Division of Neurophysiology, University of Hamburg, Hamburg, Germany, ²Institute of Neuroimmunology and Multiple Sclerosis (INIMS), University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ³Institute of Synaptic Physiology, Center for Molecular Neurobiology Hamburg, Hamburg, Germany

Introduction: The cyclic nucleotide cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is a ubiquitous second messenger, which is known to play an important anti-inflammatory role. Astrocytes in the central nervous system (CNS) can modulate inflammation but little is known about the significance of cAMP in their function.

Methods: We investigated cAMP dynamics in mouse olfactory bulb astrocytes in brain slices prepared from healthy and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice.

Results: The purinergic receptor ligands adenosine and adenosine triphosphate (ATP) both induced transient increases in cAMP in astrocytes expressing the genetically encoded cAMP sensor *Flamindo2*. The A_{2A} receptor antagonist ZM241385 inhibited the responses. Similar transient increases in astrocytic cAMP occurred when olfactory receptor neurons were stimulated electrically, resulting in ATP release from the stimulated axons that increased cAMP, again via A_{2A} receptors. Notably, A_{2A}-mediated responses to ATP and adenosine were not different in EAE mice as compared to healthy mice.

Discussion: Our results indicate that ATP, synaptically released by afferent axons in the olfactory bulb, is degraded to adenosine that acts on A_{2A} receptors in astrocytes, thereby increasing the cytosolic cAMP concentration. However, this pathway is not altered in the olfactory bulb of EAE mice.

KEYWORDS

cyclic adenosine monophosphate, astrocyte, purinergic signaling, adenosine, olfactory bulb, cAMP imaging, experimental autoimmune encephalomyelitis, neuroinflammation

1 Introduction

Astrocytes are the most abundant glial cells in the mammalian central nervous system. They fulfill a variety of functions in development, homeostasis and physiology of the brain, including extracellular K^+ and neurotransmitter clearance, metabolic support of neurons, neurovascular coupling and synaptic plasticity (1, 2). In addition to the multifaceted functions of astrocytes in brain homeostasis and performance, it becomes increasingly clear that astrocytes play a pivotal role in the initiation and progression of mental and neurological disorders such as depression, Alzheimer's disease, stroke and epilepsy (3–7). In a neuroinflammatory environment as found in multiple sclerosis (MS), astrogliosis has been described, leading to astrocyte activation, hypertrophy, release of cytokines and increased glutamate release (6, 8–12). Reactive astrogliosis is affected by purinergic signaling and, in turn, modulates purinergic signaling in other cell types (13). For example, in reactive astrocytes in mouse models of epilepsy and stroke, $P2Y_1$ receptor-mediated Ca^{2+} signaling is elevated (14, 15) resulting in increased release of cytokines and chemokines (16, 17).

Most astrocyte functions are triggered or modulated by Ca^{2+} signaling (2, 18). Much less is known about the equally important and ubiquitous second messenger, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) (19). cAMP is generated by adenylyl cyclases, a family of intracellular enzymes which may be stimulated by one group of G proteins (G_s proteins) and inhibited by another group of G proteins (G_i proteins) (20). Hence, the concentration of cAMP in cells may be controlled by a combination of G_s - and G_i -coupled receptors. Downstream of cAMP production are cAMP-dependent proteins such as cAMP-dependent protein kinase A (PKA), exchange protein activated by cAMP (EPAC), and two types of ion channels, namely cyclic nucleotide-gated (CNG) and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) ion channels (21). In astrocytes, several neurotransmitter receptors linked either to G_s or G_i have been described, however, only few studies visualized cAMP dynamics in this cell type due to the relatively recent development of suitable single-wavelength genetically encoded cAMP indicators and the lack of chemical cAMP indicators (22–24).

In the present study, we aimed to visualize cAMP signals in astrocytes in the olfactory bulb, one of the brain regions that is first affected in neurodegenerative disorders (25, 26). We expressed the genetically encoded cAMP indicator Flamindo2 (27) in astrocytes and imaged cAMP in acute brain slices of olfactory bulbs from healthy mice and mice suffering from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model for multiple sclerosis (MS). Our results show that neuronal release of adenosine-triphosphate (ATP) and degradation to adenosine results in transient increases of the intracellular cAMP concentration mediated by A_{2A} adenosine receptors in olfactory bulb astrocytes. Increases in cAMP were significantly larger in somata compared to cell processes. No difference between astrocyte cAMP signals in healthy control mice and mice with EAE could be detected. Our results indicate that A_{2A} receptors in olfactory bulb astrocytes trigger cAMP signals that are not affected by neuroinflammation.

2 Materials and methods

2.1 Animals

All imaging experiments were performed on 6–16 weeks old C57Bl/6J wild type mice of both sexes (for EAE see below) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Mice were held in the animal facilities of the Institute of Cell and Systems Biology (University of Hamburg) and the University Medical Center Hamburg-Eppendorf (UKE). Mice were kept in a 12/12 light/dark cycle and had access to food and water *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with German law, the directive 2010/63/EU and were approved by the local ethics committee and the Behörde für Justiz und Verbraucherschutz, Lebensmittel und Veterinärwesen Hamburg.

2.2 Virus injection, Flamindo2 and GRAB_{ATP1.0} expression

To express the genetically encoded cAMP indicator Flamindo2 specifically in astrocytes, we used endotoxin-free recombinant adeno-associated viruses AAV^{2/PhP.eB}hGFAP-Flamindo2 and AAV^{2/PhP.AX}hGFAP-Flamindo2 that were prepared at the UKE vector facility. The plasmid pAAV-hGFAP-Flamindo2 was a gift provided by Hajime Hirase, pAAV-gfaABC1D-GRAB_{ATP1.0} Addgene #167579 was a gift from Yulong Li, the capsid plasmid PhP-AX Addgene #195218 was kindly provided by Viviana Gradinaru and Xinhong Chen and the capsid plasmid PhP.eB Addgene #103005 was a gift from V. Gradinaru (27–30). Virus suspensions were diluted with sterile saline and injected i.v. into the orbital sinus of isoflurane-anesthetized mice. Each animal received a total volume of 70 μ l virus suspension containing 1×10^{11} viral genomes (quantified by qPCR for WPRE sequence).

2.3 Solutions

Experiments were performed in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) that contained (in mM): NaCl, 120; NaHCO₃, 26; NaH₂PO₄, 1; KCl, 2.5; D-glucose, 2.8; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1. For preparation of brain slices, Na⁺- and Ca²⁺-reduced ACSF was used (in mM): NaCl, 83; NaHCO₃, 26.2; NaH₂PO₄, 1; KCl, 2.5; CaCl₂, 0.5; MgSO₄, 2.5. In Na⁺- and Ca²⁺-reduced ACSF, D-glucose was increased to 20 mM and sucrose was added (70 mM) to compensate for reduced Na⁺ concentration and maintain osmolarity. The purinergic ligands ATP and adenosine were purchased from Merck/Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), N-Cyclopentyladenosine (N⁶-CPA), 2-Chloro-N-cyclopentyl-2'-methyladenosine (MeCCPA), 4-[2-[(6-Amino-9-b-D-ribofuranosyl-9H-purin-2-yl)thio]ethyl]benzenesulfonic acid ammonium salt (PSB 0777) from Bio-technie (Wiesbaden, Germany), forskolin and 4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl) [1,2,4]triazolo [2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino] ethyl) phenol (ZM241385) from Abcam (Cambridge, UK) and tetrodotoxin (TTX) from Biozol (Hamburg, Germany). Stock

solutions were prepared according to the manufacturer's instructions, dissolved in ACSF at the final concentrations given in the results section and applied with the perfusion system.

2.4 Preparation of brain slices

Mice were anesthetized using isoflurane (5% v/v in oxygen) and decapitated. Brains were quickly dissected and transferred into chilled Ca^{2+} -reduced ACSF that was continuously gassed with carbogen (95% O_2 /5% CO_2 ; buffered to pH 7.4 with CO_2 /bicarbonate) during the entire preparation procedure. Two hundred micrometer thick slices of the bulbs were cut using a vibratome (VT1200S, Leica). Slices were stored in ACSF gassed with carbogen in darkness for 30 min at 30°C and then at room temperature until starting experiments.

2.5 Confocal cAMP imaging and electrical stimulation

Changes in the intracellular cAMP concentration were visualized by the genetically encoded cAMP indicator Flamindo2, based on the circular permuted fluorescent protein citrine and the cAMP binding domain of mEPAC1 (27). Binding of cAMP to the cAMP binding site decreases the fluorescence intensity of citrine, hence an increase in cAMP concentration is reflected by a decrease in fluorescence intensity. Flamindo2 was excited at 488 nm and fluorescence was collected between 500 and 530 nm using a confocal microscope (eC1, Nikon). Time series of images were recorded at a frame rate of 1 frame every 3-5 seconds. To visualize increases in the extracellular ATP concentration, we expressed the EGFP-based fluorescent ATP sensor GRAB_{ATP1.0} in astrocytes, which was excited at 488 nm and emitted light in the range of 500-530 nm (30). Increases in extracellular ATP were evoked by electrical stimulation of axons of olfactory receptor neurons that release ATP at their axon terminals. To stimulate these axons and trigger action potentials, a glass micropipette (GC150TF-10, Harvard Apparatus, USA) pulled with a patch-pipette puller (Flaming/Brown P97, Sutter Instruments, Novato, CA, USA) with electrical resistance of 1-3 M Ω was inserted into the olfactory nerve layer of a brain slice and trains of electrical pulses (0.1 ms pulse width, 2.3 mA amplitude, 20 Hz for 10 s) were applied (Digitimer DS3, Digitimer Ltd, Hertfordshire, England).

2.6 Immunohistochemistry

Successful infection and astrocyte-specific expression of Flamindo2 was verified by co-immunolabeling of Flamindo2 and astrocytic markers. Since Flamindo2 is based on citrine, a yellow-fluorescent variant of GFP, we used anti-GFP (chicken, #132 006, Synaptic Systems, Göttingen, Germany) to visualize Flamindo2 and a combination of anti-GFAP (rabbit, Z0334, Dako, Hamburg,

Germany) and anti-S100 (rabbit, Z0311, Dako) to visualize astrocytes, all primary antibodies were used at a concentration of 1:500. Free floating slices (220 μm thick) were cut from brains fixed with 4% formalin using a vibratome (VT1000, Leica, Bensheim, Germany). Slices were rinsed with PBS (in mM: NaCl, 130; Na_2HPO_4 , 7; NaH_2PO_4 , 3) and blocked with 10% normal goat serum (NGS) and 0.5% Triton X-100 in PBS for one hour. Primary antibodies were incubated in 1.0% NGS and 0.05% Triton X-100 in PBS at 4°C for 36 hours. Secondary antibodies (Alexa Fluor 488 goat anti-chicken, #Ab150173, Abcam, Cambridge, UK; Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit, #A21429, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) were incubated in PBS at 4°C overnight. After rinsing in PBS slices were mounted in Shandon Immu-Mount (Life Technologies GmbH) and recorded using a confocal microscope (eC1, Nikon, Düsseldorf, Germany). Since both Flamindo2 and Alexa Fluor 488 emission was recorded in the same range of wavelengths (500-530 nm), both signals add up to optimize the visualization of Flamindo2-expressing cells.

2.7 Experimental autoimmune encephalomyelitis

Mice were acclimatized two weeks before EAE induction in the experimental housing facility. EAE induction was performed as described before (31). Briefly, 13 to 14-week-old female C57Bl/6J mice were anesthetized with isoflurane (1% to 2% v/v in oxygen). Immunization was performed by a subcutaneous injection into the two lateral sides of the lower back area. Injections consisted of 200 μg myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide (MOG35–55, peptides & elephants GmbH, Hennigsdorf, Germany) in saline mixed with complete Freund's adjuvant (CFA, BD Difco) containing 4 mg/ml heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* (BD Difco). On the day of immunization and two days later, 250 ng pertussis toxin (Merck Millipore) in 100 μl PBS was injected intraperitoneally. Control mice were not treated. Animals were weighed and scored daily for the presence of neurological signs from day 7 to the day of preparation. Mice were scored for clinical signs by the following system: 0: no clinical deficits; 1: tail weakness; 2: hind limb paresis; 3: partial hind limb paralysis; 3.5: full hind limb paralysis; 4: full hind and forelimb paralysis or plegia. Animals that reached a score of 4, or scored 3.5 for more than 7 days, or lost \geq 25% of starting weight were euthanized according to the regulations of the local Animal Welfare Act. At the peak of the disease, the mean EAE score was 2.8 ± 1.16 .

2.8 Data analysis and statistics

Data were evaluated with Nikon EZ-C1 Viewer (Nikon), processed using Excel (Microsoft, USA) and statistical tests were applied with Origin Pro 9.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). The expression of Flamindo2 was highest in astrocytes in the glomerular layer. We therefore only analyzed astrocytes in the glomerular layer.

Somata of Flamindo2-expressing astrocytes were marked by a region of interest (ROI) and the mean fluorescence intensity within the ROI was measured throughout the time series. In a subset of experiments, cell processes were analyzed in addition to somata. The mean fluorescence intensity (F) was normalized to the basal fluorescence intensity at rest which was set to 100%, hence changes in fluorescence intensity are stated as ΔF in %. Since an increase in the cAMP concentration in astrocytes is reported as a decrease in Flamindo2 fluorescence, we inverted the fluorescence traces in the figures to render perception of the results more intuitively.

Fluorescence changes of less than 5% ΔF were in the range of noise and were not counted as responses. All data values are given as mean \pm standard error of the mean (SEM) with *n* representing the number of astrocytes analyzed. For each set of experiments, at least three animals were used. Means were tested for statistical differences using the Mann-Whitney-U test. For multiple comparisons the Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's *post hoc* test was used. Statistical differences were indicated with **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001. Bar graphs and the sigmoidal fit of the dose-response curve were prepared using OriginPro 9.1. Bar graphs represent means + SEM. They were overlaid by the entire population of single data points that were normalized to the mean of the first application/stimulation.

3 Results

3.1 Adenosine increases the cAMP concentration in olfactory bulb astrocytes

The olfactory bulb is the most rostral part of the mouse brain and receives afferent input from olfactory receptor neurons (ORNs) located in the olfactory epithelium in the nasal cavity (Figure 1A) (32). Axons of ORNs terminate in the glomerular layer of the olfactory bulb where they release both ATP and glutamate as neurotransmitters (33) (Figure 1B). Astrocytes respond to glutamate and ATP as well as to adenosine derived from ATP with Ca^{2+} signaling, however, whether glutamate, ATP or its degradation product adenosine stimulates cAMP signaling in olfactory bulb astrocytes has not been shown before.

To investigate cAMP signaling and visualize cAMP dynamics in astrocytes of the olfactory bulb, we used the genetically encoded cAMP indicator Flamindo2. We expressed Flamindo2 in astrocytes by injection of AAV carrying the Flamindo2 gene (Figure 1C). Flamindo2 expression was under control of the *gfaABC1D* promoter to assure astrocyte-specific expression (34). We verified specific expression in astrocytes by co-labeling of Flamindo2 and astrocytes using anti-GFP and combined anti-GFAP/S100B immunostaining, respectively. Approximately 50% of astrocytes in the glomerular layer expressed Flamindo2 (Figure 1D).

Purinergic signaling is strongly involved in a plethora of neurological diseases (35) and we focused on the contribution of purinoceptors in cAMP signaling in olfactory bulb astrocytes. Adenosine activates both G_s -coupled receptors that stimulate

adenylyl cyclases and hence increase the intracellular cAMP concentration and G_i -coupled receptors that inhibit adenylyl cyclases and thereby decrease the cAMP concentration (36). We applied adenosine to acute brain slices and detected a decrease in Flamindo2 fluorescence in glomerular astrocytes, indicative for an increase in cAMP concentration (Figure 1E). To better reflect the changes in cAMP concentration, we inverted the Y axis ($-\Delta F$) (Figure 1F). We applied different concentrations of adenosine between 3 and 300 μM and plotted the results in a dose-response chart (Figures 1G, H). The results show an EC_{50} value of 12.8 μM , as extrapolated from the sigmoidal fit, and that at 300 μM adenosine the response is close to saturation. For the following experiments, we used 30 μM adenosine, which evokes large non-saturating responses. Repetitive application of adenosine (10 min interval) resulted in cAMP transients with a small yet significant decrease in amplitude (Figure 2A). The first application of adenosine evoked a cAMP response with a mean amplitude of $42.5 \pm 1.6\%$ $-\Delta F$ (*n* = 238). The amplitude of the responses induced by the second and third applications decreased to 75.8% (*p* < 0.001) and 59.6% (*p* < 0.001) compared to the first application (Figure 2B). Inhibition of voltage-gated Na^+ channels with tetrodotoxin (TTX) and thus suppression of neuronal activity had no effect on the adenosine-induced cAMP signals, indicating that the responses in astrocytes did not depend on neuronal neurotransmitter release but were directly evoked in astrocytes (Figures 2C, D).

3.2 A_{2A} adenosine receptors mediate cAMP signals in astrocytes

Both A_1 and A_{2A} receptors are the main adenosine receptors expressed in the olfactory bulb and modulating neuronal performance (31, 37, 38). Olfactory bulb astrocytes express A_{2A} receptors that mediate an increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration (39). The canonical pathway downstream of A_{2A} receptor stimulation is activation of adenylyl cyclase resulting in an increase in the cAMP concentration. Therefore, we first tested the effect of the A_{2A} receptor antagonist ZM241385 on adenosine-mediated cAMP increases in olfactory bulb astrocytes in acute brain slices. ZM241385 entirely blocked adenosine-evoked cAMP transients in the majority of astrocytes, indicating that A_{2A} receptors are the main drivers of adenosine-induced cAMP signals (Figures 3A, E). This was confirmed by the agonistic effect of PSB0777, a highly specific A_{2A} receptor agonist (40) (Figures 3B, E). The PSB0777-evoked increase in cAMP was blocked by ZM241385. It is interesting that in some astrocytes the inhibition by ZM241385 was incomplete, which might be due to local concentration gradients and being outcompeted by the agonist, or might indicate that some astrocytes express an additional adenylyl cyclase-activating adenosine receptor such as A_{2B} (Figure 3E). Another widely expressed adenosine receptor found in astrocytes is the A_1 receptor, that is linked to G_i and hence triggers a decrease in cAMP concentration by inhibiting adenylyl cyclases (41). The A_1 receptor agonist N^6 -CPA, however, neither decreased the cAMP concentration in olfactory bulb astrocytes at resting conditions nor

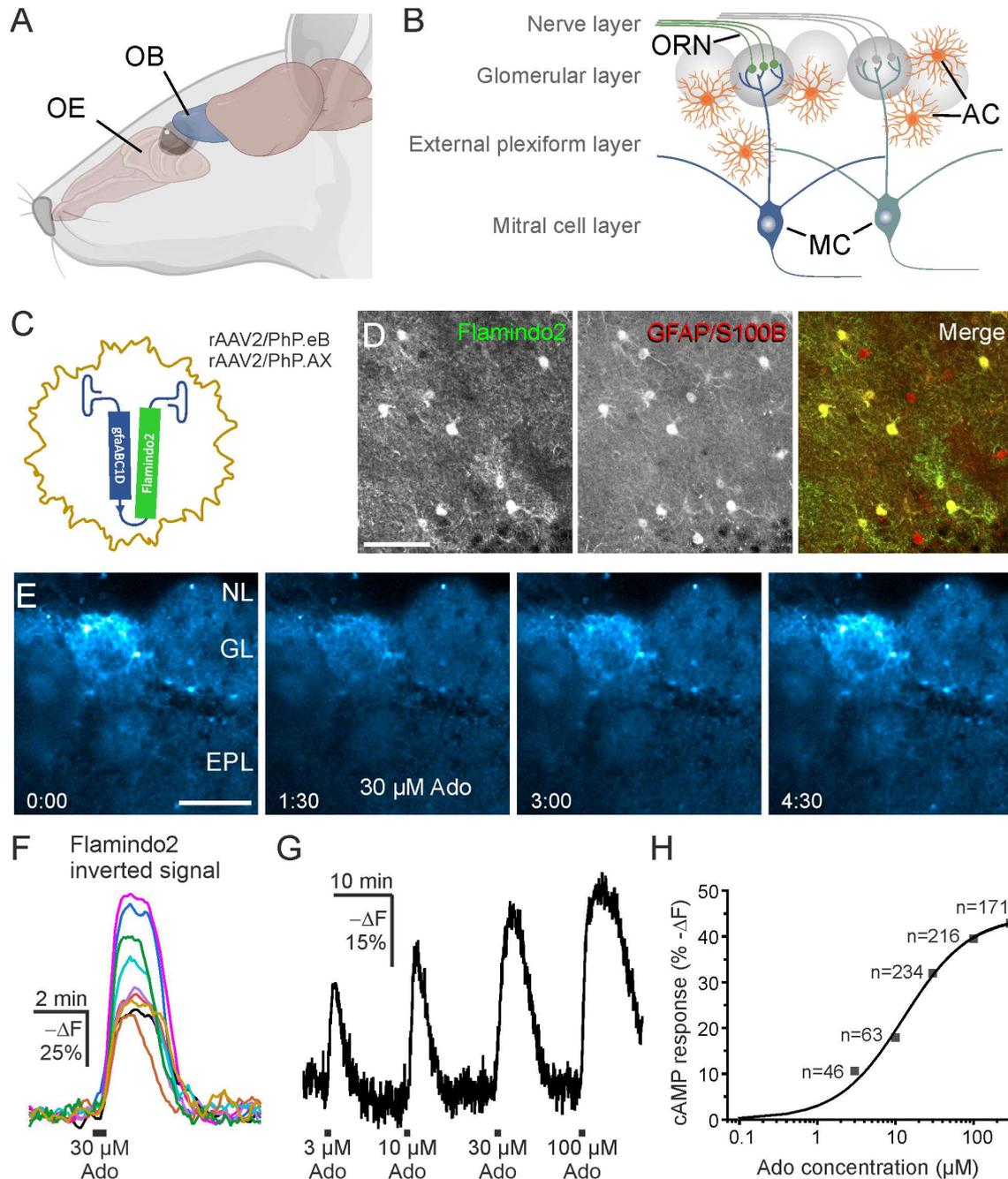


FIGURE 1

Adenosine increases cAMP in olfactory bulb astrocytes. (A) Location of olfactory bulb (OB) relative to the nose and olfactory epithelium (OE). (B) Organization of the OB. Input axons from olfactory receptor neurons (ORN) in the olfactory epithelium form synapses onto neurites of the mitral cells (MC) in the glomerular layer. AC, astrocytes. (C) Recombinant adeno associated viral vectors rAAV^{2/PhP.eB}_{gfaABC1D-Flamindo2} or rAAV^{2/PhP.AX}_{gfaABC1D-Flamindo2} were used to transduce OB astrocytes with the cAMP indicator Flamindo2 following i.v. injection. (D) Antibody staining verified that Flamindo2 (anti-GFP, left panel) was expressed in astrocytes (anti-GFAP/anti-S100B, middle panel). The right panel depicts merged images of Flamindo2 (green) and astrocyte (red) channels. Note absence of green-only astrocytes. Scale bar 50 μ M. (E) Image series of Flamindo2 fluorescence immediately before (0:00 min:s), during (1:30 min:s) and at later time points after 30 s bath application of 30 μ M adenosine (Ado). Scale bar 100 μ M. (F) Sample traces from multiple ROIs with astrocytes as in (E). Note that the Y scale is inverted as decreased Flamindo2 fluorescence indicates increasing cAMP. (G) Flamindo2 fluorescence with increasing concentrations of adenosine ($n = 46$ –234). (H) Concentration-response relationship of cAMP (Flamindo2 fluorescence change) vs. adenosine concentration. Data values were fitted using a function for a sigmoidal curve. (A) created using Biorender.

after increasing the cAMP concentration by the adenylyl cyclase activator forskolin (Figures 3C, F). Since N^6 -CPA possesses only weak adenosine receptor subtype selectivity, we additionally applied the highly selective and effective A_1 receptor agonist MeCCPA (42).

MeCCPA also failed to induce a decrease in cAMP concentration (Figure 3D). Thus, in the majority of astrocytes adenosine elicits cAMP responses by stimulating A_{2A} receptors, while A_1 receptors are not involved.

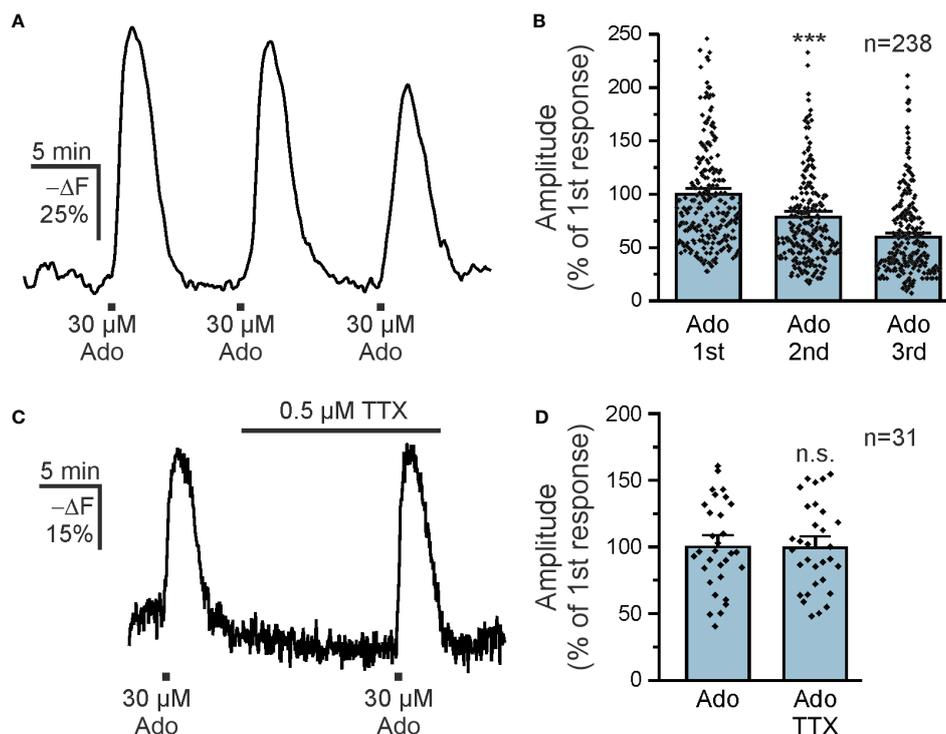


FIGURE 2

Adenosine directly increases astrocytic cAMP. (A) Repetitive applications of 30 μM adenosine repeatedly increased astrocytic cAMP ($n = 238$). (B) Quantification of experiments as in (A) indicates a small but significant decrease in the successive responses to adenosine. $***p < 0.001$, Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons. (C) Adenosine-induced cAMP responses in astrocytes in the absence and presence of tetrodotoxin (TTX) to inhibit neuronal spiking ($n = 31$). (D) Quantification of experiments as in (C). n.s., not significant, Mann-Whitney-U test.

3.3 Adenosine derived from synaptically released ATP drives cAMP signaling in astrocytes

The main source of extracellular adenosine in the CNS is synaptically released ATP that is degraded by ectonucleotidases, although alternative release mechanisms have also been proposed (43–45). The olfactory bulb receives input from axons of ORNs that are synaptically connected to mitral and tufted cells as well as to some interneurons (32). In the developing olfactory bulb, we have shown that release of ATP from ORN axons and subsequent degradation to adenosine leads to A_{2A} receptor activation and Ca^{2+} signaling in astrocytes of the glomerular layer (39). Therefore, we were interested in whether adenosine could be generated from ATP released from ORN axons and stimulate cAMP signaling in astrocytes in adult mice. We first tested the effect of bath-applied ATP on cAMP in astrocytes of acute brain slices of the olfactory bulb. Application of 30 μM ATP resulted in an increase in intracellular cAMP in astrocytes of the glomerular layer (Figure 4A). The mean amplitude of the ATP-evoked cAMP rise was $23.5 \pm 1.2\%$ $-\Delta F$ ($n = 81$), which decreased slightly upon repetitive ATP application. The second and third application of ATP resulted in cAMP signals with 79% and 73% ($n = 57$), respectively, when compared to the first application. The ATP-induced cAMP transients were entirely inhibited by ZM241385 ($n = 23$), indicating that ATP-evoked cAMP signals were mediated

by adenosine acting on A_{2A} adenosine receptors (Figure 4B). We used the genetically encoded extracellular ATP sensor $\text{GRAB}_{\text{ATP1.0}}$, introduced into astrocytes by AAV injection, to visualize changes in extracellular ATP (30). We electrically stimulated ORN axons in the nerve layer of the olfactory bulb and could detect an increase in extracellular ATP in the glomerular layer (Figure 4C). We calibrated the $\text{GRAB}_{\text{ATP1.0}}$ signal by applying ATP at different concentrations via the perfusion system. When compared to the calibration values, the peak of ATP increases evoked by electrical stimulation of axons amounted to values between 3 and 10 μM (Figure 4D). On average, the extracellular ATP concentration reached 3.6 μM during axon stimulation (10 slices from 4 animals). We next assessed whether ATP released from ORN axons is able to increase cAMP in astrocytes of the glomerular layer. Electrical stimulation of ORN axons resulted in an increase in astrocytic cAMP of $25.2 \pm 1.6\%$ $-\Delta F$ ($n = 76$) (Figure 4E). The cAMP response evoked by a second stimulation was significantly smaller and amounted to $43.3 \pm 1.8\%$ compared to the first application ($n = 76$; $p < 0.001$). When the second stimulation was applied in the presence of ZM241385, no cAMP transients could be measured in the majority of astrocytes (82 out of 89 cells) (Figure 4F), while in 7 cells ZM241385 had no effect. In summary, our results show that adenosine produced from bath-applied and synaptically released ATP results in ZM241385-sensitive increases of intracellular cAMP in olfactory bulb astrocytes (Figure 4G).

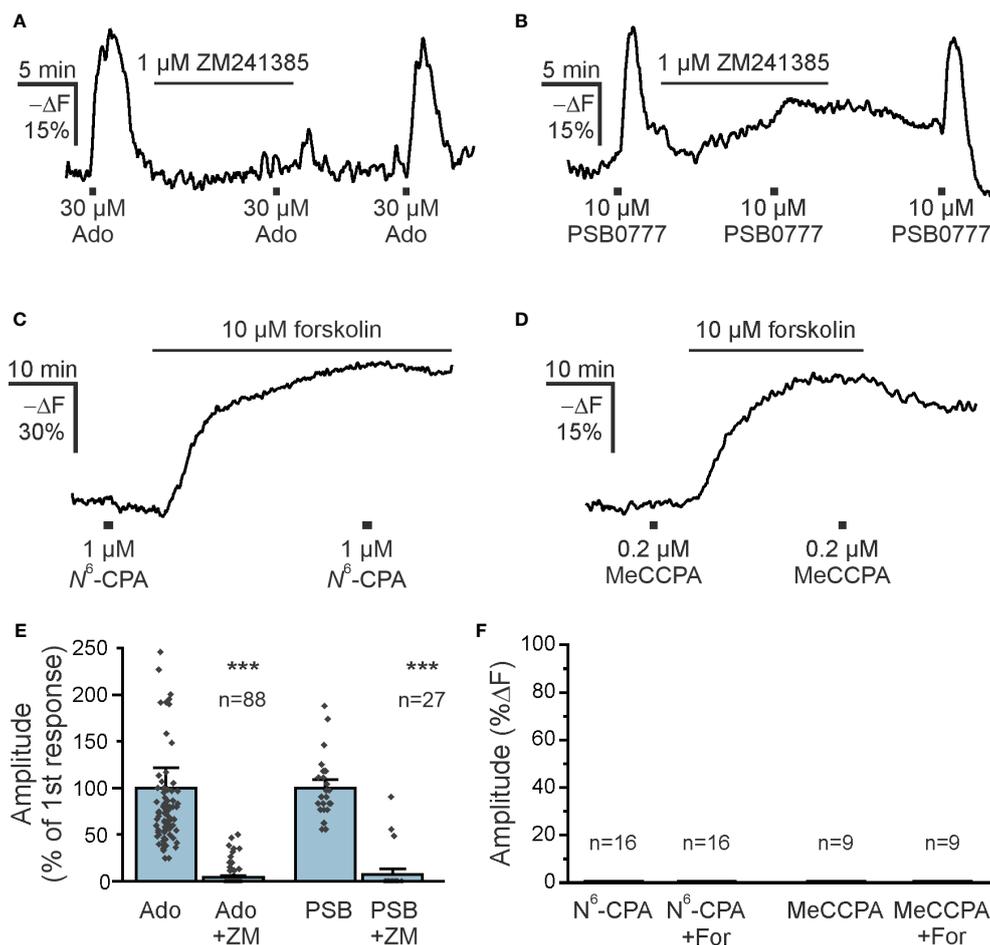


FIGURE 3

A_{2A} adenosine receptors increase astrocytic cAMP (A) The adenosine A_{2A} receptor antagonist ZM241385 inhibits adenosine-induced cAMP increases in astrocytes (n = 88). (B) Increases in astrocytic cAMP in response to the specific A_{2A} receptor agonist PSB0777 are inhibited by ZM241385 (n = 27). (C, D) The adenosine A₁ receptor agonists N⁶-CPA (n = 16) and MeCCPA (n = 9) did not affect astrocytic cAMP either alone, or after stimulation of adenylyl cyclases by forskolin. (E) Quantification of the effect of ZM241385 (ZM) on cAMP responses evoked by adenosine (Ado) and PSB0777 (PSB). ***p < 0.001, Mann-Whitney-U test. (F) Quantification of experiments as in (C, D). N⁶-CPA and MeCCPA had no effect on the cAMP concentration. For, forskolin.

3.4 Adenosine-evoked cAMP transients are not altered in experimental autoimmune encephalomyelitis

The role of A_{2A} receptors in astrocytes in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease is well described (46–48). Less is known about astrocytic A_{2A} receptors in neuroinflammation and we used EAE mice as a model to study purinergic signaling in neuroinflammation. Purinergic signaling in astrocytes is able to mediate both pro- and anti-inflammatory responses and we were interested in whether purinergic cAMP signaling in astrocytes is altered in olfactory bulb astrocytes in the acute phase of EAE. We applied adenosine, the A_{2A}-specific agonist PSB0777 and ATP and compared cAMP responses in astrocytes in acute slices of healthy control mice with those of mice suffering from EAE at the peak of the disease, i.e. day 14 to 16 post immunization. To gain additional information of the cAMP responses, we analyzed cAMP signals in somata and cell processes of olfactory bulb astrocytes separately (Figure 5A). The amplitude of cAMP rises in somata was

significantly larger compared to the cell processes using either adenosine or ATP (Supplementary Table 1; Figures 5B, C). Similar results were found in brain slices from animals with EAE (Figures 5D, E; Supplementary Table 1). We compared the amplitudes of the cAMP responses between healthy mice and mice with EAE but did not detect any significant differences, regardless whether we tested the different agonists or whether either values from somata or cell processes were compared (Figure 5F). Hence, at least in olfactory bulb astrocytes, EAE appears not to have a major impact on purinergic cAMP signaling.

4 Discussion

In the present study, we investigated the contribution of purinergic signaling to cAMP dynamics in olfactory bulb astrocytes. Our results show that ATP released from afferent axons is degraded to adenosine that stimulates A_{2A} adenosine receptors in astrocytes of the glomerular layer. A_{2A} receptor activation results in an increase in intracellular cAMP. This cAMP response was not altered in amplitude in mice suffering from EAE.

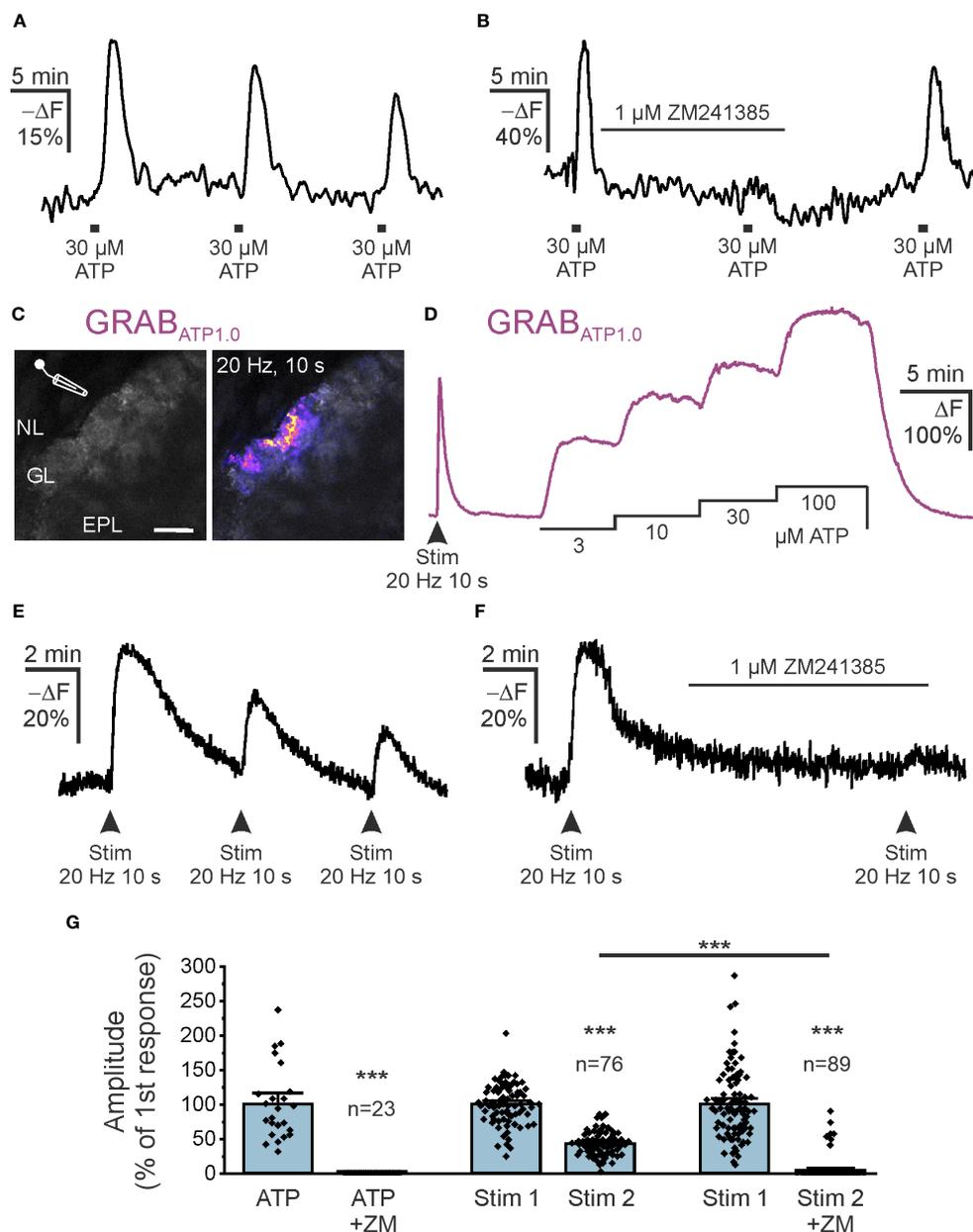


FIGURE 4

Synaptically released ATP increases astrocytic cAMP via adenosine A_{2A} receptors. (A) Flamingo2-indicated astrocytic cAMP responses to bath application of ATP ($n = 76$). (B) The adenosine A_{2A} receptor antagonist ZM241385 inhibits cAMP responses to exogenous ATP ($n = 23$). (C) Expression of the extracellular ATP sensor $GRAB_{ATP1.0}$ ($GRAB_{ATP}$) in olfactory bulb astrocytes and position of electrode used to stimulate neurons. NL, nerve layer; GL, glomerular layer; EPL, external plexiform layer. Scale bar 50 μ M. The right panel highlights the $GRAB_{ATP1.0}$ response to electrical stimulation of ORN axons in the NL (20 Hz for 10 s) ($n = 10$ slices from 4 animals). (D) Exemplary responses of $GRAB_{ATP}$ to stimulation of ORN axons and dose-response relationship. Note that neuronal stimulation increases $GRAB_{ATP}$ fluorescence corresponding to more than 10 μ M ATP. (E) Flamingo2 fluorescence changes demonstrate increased astrocytic cAMP in response to repeated neuronal stimulation. (F) ZM241385 inhibits stimulation-induced increases in astrocytic cAMP ($n = 89$). (G) Quantification of experiments as in B, E and F normalized to the first responses to neuronal stimulation. Both responses by bath application of ATP and by neuronal stimulation were inhibited by ZM241385 (ZM). *** $p < 0.001$, Mann-Whitney-U test.

4.1 Olfactory bulb astrocytes express A_{2A} receptors linked to adenylyl cyclase stimulation

Bath application of adenosine reliably evoked cAMP transients in olfactory astrocytes that were not affected when neuronal activity was blocked using TTX, indicating that adenosine directly stimulated astrocytes. Adenosine-induced cAMP increases were

entirely blocked by ZM241385, an A_{2A} -preferring adenosine receptor antagonist (49), in the majority of astrocytes. However, at the concentration used (1 μ M), ZM241385 could also inhibit other subtypes of adenosine receptors. Therefore, we applied the selective A_{2A} agonist PSB0777 to verify the presence of A_{2A} receptors in olfactory bulb astrocytes (40). PSB0777 also evoked increases in cAMP, indicating the presence of A_{2A} in olfactory bulb astrocytes. In addition, in some astrocytes, ZM241385 reduced

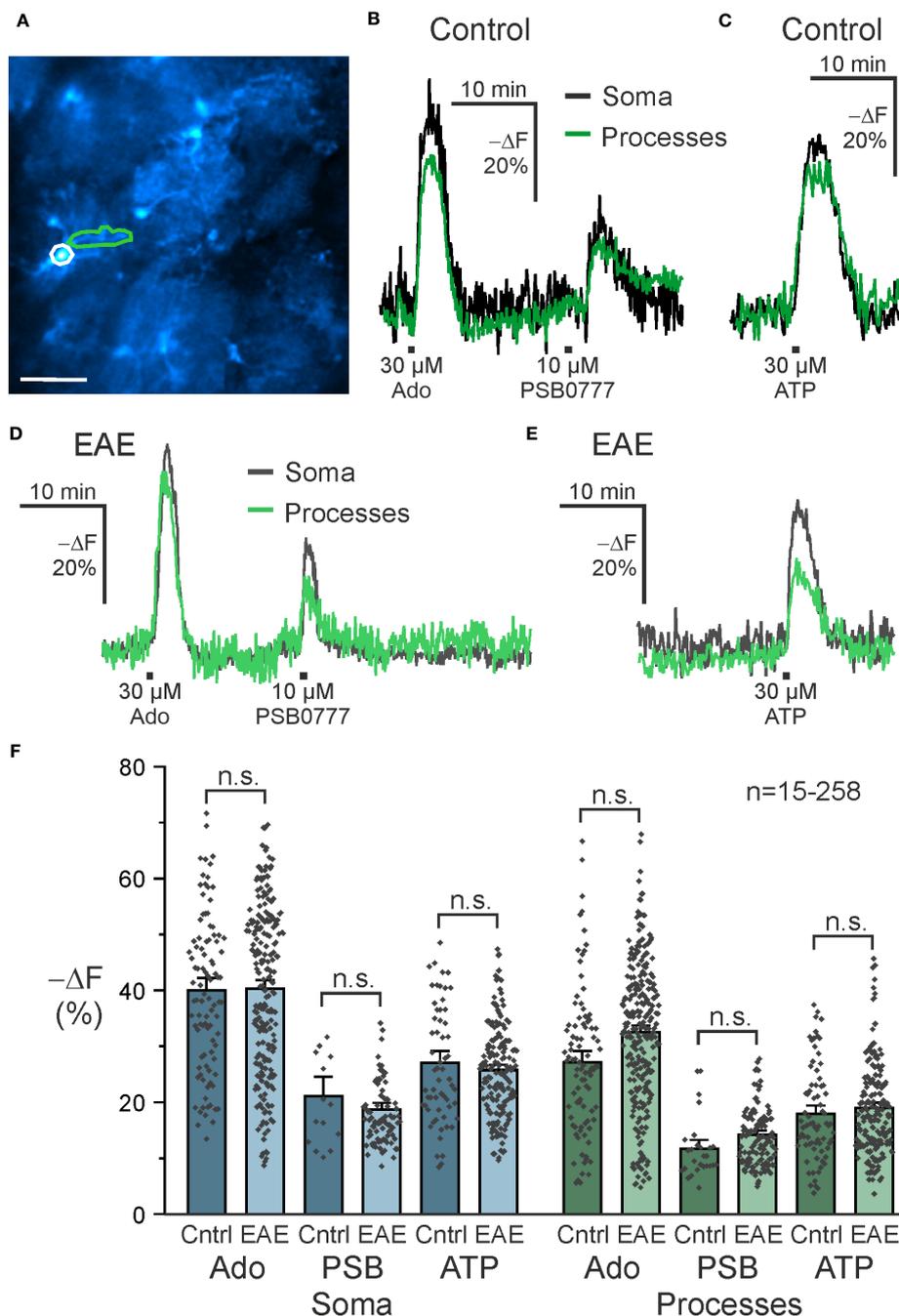


FIGURE 5

A_{2A} -mediated increases in astrocytic cAMP are unaffected in EAE. (A) Astrocytes expressing the cAMP indicator Flamindo2 with example soma (white) and process (green) regions of interest indicated. Scale bar 50 μ M. (B) Exemplary responses to adenosine (Ado) (soma: $n = 97$; processes: $n = 95$), the specific A_{2A} receptor agonist PSB0777 (soma: $n = 15$; processes: $n = 27$), and (C) ATP (soma: $n = 61$; processes: $n = 75$) in control mice and (D, E) experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice (Ado, soma: $n = 221$; processes: $n = 258$; PSB0777, soma: $n = 88$; processes: $n = 125$; ATP, soma: $n = 173$; processes: $n = 189$). (F) Quantification of experiments as in B-E. Mean \pm SEM and individual peak responses are shown. n.s., not significant, Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons.

adenosine-evoked cAMP responses only partially, which could suggest the contribution of another adenosine receptor such as the A_{2B} receptor. However, this is unlikely as cAMP responses evoked by the A_{2A} -selective antagonist PSB0777 were also only partially reduced by ZM241385 in some cells favoring an incomplete inhibition of the A_{2A} receptor. A_1 receptors are linked to inhibition of adenylyl cyclase and hence lead to a reduction of the

cAMP concentration, thereby counteracting A_{2A} receptors. In our study, we applied two A_1 receptor agonists, N^6 -CPA and MeCCPA, that did not decrease the cAMP concentration. Even when the resting cAMP concentration was artificially increased by the adenylyl cyclase activator forskolin, stimulation of A_1 receptors had no effect on the cAMP concentration, indicating that glomerular astrocytes do not express A_1 receptors linked to

adenylyl cyclase inhibition. We cannot exclude the contribution of A_3 receptors to adenosinergic cAMP dynamics in the astrocytes (50, 51), but the strong effect of ZM241385 on adenosine-evoked cAMP signals suggests that A_{2A} receptors are the main players in purinergic cAMP signaling in these cells. We found an EC_{50} value of 12.8 μM of the adenosinergic cAMP response, which is about twentyfold higher than published EC_{50} values of A_{2A} receptor activation. However, adenosine is rapidly degraded to inosine by extracellular adenosine deaminase or taken up by adenosine transporters (52), hence the adenosine concentration reaching astrocytic A_{2A} receptors may be much lower than the adenosine concentration in the perfusion saline. In summary, our results indicate that glomerular astrocytes express A_{2A} receptors that stimulate adenylyl cyclase and increase the cAMP concentration. Astrocytes in the olfactory bulb have been shown to affect neuronal performance and mediate neurovascular coupling in the olfactory bulb, mostly triggered by Ca^{2+} signaling (53–58). Which role astrocytic cAMP signaling plays in the olfactory bulb neuronal network still needs to be shown.

4.2 Synaptic release of ATP in the glomerular layer leads to A_{2A} receptor activation and cAMP signaling in astrocytes

In the developing mouse olfactory bulb, it has been shown that axons of ORNs release ATP that triggers Ca^{2+} signaling in two types of glial cells, namely astrocytes and olfactory ensheathing cells, by activation of P2Y_1 receptors (39, 59, 60). In addition, in the glomerular layer ATP is degraded to adenosine that stimulates Ca^{2+} signals in developing astrocytes via A_{2A} receptors (39). We now studied the effect of ATP release on astrocytes in olfactory bulbs of adult mice. Using the fluorescent ATP sensor GRAB_{ATP} we were able to visualize extracellular ATP and to prove that also in adult mice, ORNs release ATP at their terminals in the glomerular layer. The peak of the extracellular ATP increase was approximately 10 μM which was in the range of the concentrations of ATP and adenosine used in the present study for bath application. Responses in cAMP evoked by both bath-applied ATP and synaptically released ATP were entirely blocked by ZM241385 in the majority of astrocytes, indicating that synaptically released ATP is degraded to adenosine that stimulates A_{2A} receptors, while other adenosine receptors or P2Y receptors play only a minor role in purinergic cAMP signaling in olfactory bulb astrocytes.

4.3 A_{2A} -mediated cAMP signaling in olfactory bulb astrocytes is not affected in EAE

In neuroinflammation, astrocytes undergo a severe morphological transformation, hallmarked by proliferation, growth of cell processes and up-regulation of the expression of intermediate filaments such as glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin (6, 61–63). In addition, in a neuroinflammatory and neurodegenerative environment, purinergic Ca^{2+} signaling can be enhanced (15, 64, 65).

We checked whether also purinergic cAMP signaling might be affected by neuroinflammation in the olfactory bulb. We studied neuroinflammation in EAE, a model for MS, since it has been shown that astrocytes are involved in pathogenesis and progression of the disease in the spinal cord and brain of both MS and EAE (8, 10). For example, inhibition of A_{2A} receptors in EAE ameliorated neurological and behavioral deficits in diseased mice (66, 67). We did not find any differences between A_{2A} -mediated cAMP signals in olfactory bulb astrocytes of healthy mice compared to mice suffering from EAE, indicating that adenosinergic cAMP signaling in astrocytes is not up- or down-regulated in EAE in this brain region. A_{2A} receptors on other cell types or pathways downstream of cAMP in olfactory bulb astrocytes are therefore more likely contributing to disease severity in EAE. We can also not exclude an involvement of astrocytic A_{2A} -dependent cAMP signaling in other brain regions or in the spinal cord in EAE. Furthermore, other components of the purinergic transmitter system could be affected by EAE and differences in the amount of extracellular adenosine and in the expression levels of ATP-degrading enzymes could also account for an impact on purinergic signaling in EAE but have not been addressed in the present study (68). Several studies have shown an important role of A_{2A} receptors in EAE. Of note, A_{2A} receptors can have both beneficial and exacerbating effects on the severity of EAE. A_{2A} stimulation inhibits lymphocyte proliferation and release of proinflammatory cytokines that promote MS progression, while inhibition of A_{2A} in EAE mice attenuated the progression of EAE and A_{2A} -deficient mice developed a more severe acute phase of EAE (66, 67, 69, 70). In other neurological diseases and disease models, an up-regulation of A_{2A} in astrocytes and contribution of A_{2A} to the disease progression has been demonstrated (46–48). In a mouse model of Alzheimer's disease (AD), up-regulation of A_{2A} receptors in hippocampal astrocytes was shown which can lead to dysregulation of gene expression and connexin43-dependent gliotransmitter release in astrocytes (71–73). In addition, in an animal model of chronic cerebral hypoperfusion inducing neuroinflammation, activation of astrocytic A_{2A} receptors reduced the pro-inflammatory signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)/Chitinase 3-like-1 (YKL-40) pathway, resulting in decreased release of pro-inflammatory cytokines (74). These examples imply that A_{2A} receptors in astrocytes play an important role in neurodegeneration and neuroinflammation, however, the role of astrocytic A_{2A} receptors in MS and EAE needs still to be elucidated. Our results indicate that A_{2A} receptors in olfactory bulb astrocytes significantly contribute to cAMP dynamics but do not provide evidence for dysregulation of A_{2A} receptor expression and function in EAE.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The animal study was approved by Behörde für Justiz und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg

Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen Billstraße 80a 20539 Hamburg Germany. The study was conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements.

Author contributions

MW: Formal Analysis, Writing – review & editing, Investigation. AK: Formal Analysis, Investigation, Writing – review & editing. AB: Formal Analysis, Investigation, Writing – review & editing, Conceptualization, Supervision. CS: Conceptualization, Formal Analysis, Investigation, Supervision, Writing – review & editing. KS-Y: Formal Analysis, Investigation, Writing – review & editing. JS: Writing – review & editing, Data curation, Formal Analysis. MP: Writing – review & editing, Investigation, Methodology. KS: Supervision, Writing – review & editing. MF: Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing – review & editing. CG: Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing – review & editing, Methodology. DH: Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing – review & editing, Investigation. CL: Conceptualization, Data curation, Formal Analysis, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Supervision, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB1328, 335447717 project A07, 404539526, and A16, 404644007 to CG, CL, DH, and MF.

References

- Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* (2018) 362(6411):181–5. doi: 10.1126/science.aat0473
- Verkhatsky A, Parpura V, Vardjan N, Zorec R. Physiology of astroglia. *Adv Exp Med Biol* (2019) 1175:45–91. doi: 10.1007/978-981-13-9913-8_3
- Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci* (2021) 24(3):312–25. doi: 10.1038/s41593-020-00783-4
- Han RT, Kim RD, Molofsky AV, Liddelow SA. Astrocyte-immune cell interactions in physiology and pathology. *Immunity* (2021) 54(2):211–24. doi: 10.1016/j.immuni.2021.01.013
- Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in alzheimer's disease. *Lancet Neurol* (2015) 14(4):388–405. doi: 10.1016/S1474-4422(15)70016-5
- Patani R, Hardingham GE, Liddelow SA. Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration. *Nat Rev Neurol* (2023) 19(7):395–409. doi: 10.1038/s41582-023-00822-1
- Zhao YF, Verkhatsky A, Tang Y, Illes P. Astrocytes and major depression: The purinergic avenue. *Neuropharmacology* (2022) 220:109252. doi: 10.1016/j.neuropharm.2022.109252
- Brambilla R. The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* (2019) 137(5):757–83. doi: 10.1007/s00401-019-01980-7
- Fliegert R, Heeren J, Koch-Nolte F, Nikolaev VO, Lohr C, Meier C, et al. Adenine nucleotides as paracrine mediators and intracellular second messengers in immunity and inflammation. *Biochem Soc Trans* (2019) 47(1):329–37. doi: 10.1042/BST20180419
- Yi W, Schluter D, Wang X. Astrocytes in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: Star-shaped cells illuminating the darkness of CNS autoimmunity. *Brain Behav Immun* (2019) 80:10–24. doi: 10.1016/j.bbi.2019.05.029
- Lee HG, Wheeler MA, Quintana FJ. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. *Nat Rev Drug Discovery* (2022) 21(5):339–58. doi: 10.1038/s41573-022-00390-x
- Linnerbauer M, Wheeler MA, Quintana FJ. Astrocyte crosstalk in CNS inflammation. *Neuron* (2020) 108(4):608–22. doi: 10.1016/j.neuron.2020.08.012
- Illes P, Verkhatsky A. Purinergic neuron-glia signalling in cognitive-related pathologies. *Neuropharmacology* (2016) 104:62–75. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.08.005
- Álvarez-Ferradas C, Morales JC, Wellmann M, Nualart F, Roncagliolo M, Fuenzalida M, et al. Enhanced astroglial Ca²⁺ signaling increases excitatory synaptic strength in the epileptic brain. *Glia* (2015) 63(9):1507–21. doi: 10.1002/glia.22817

Acknowledgments

Technical support by Anne C. Rakete and Mathias Nordbeck (University of Hamburg) is gratefully acknowledged. We also acknowledge Ingke Braren of the UKE virus vector facility, who prepared the AAVs, Hajime Hirase for the Flamindo2 plasmid, Yulong Li for the GRAB_{ATP} plasmid and Vivianna Gradinaru and Xinhong Li for the AAV serotypes.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The author(s) declared that they were an editorial board member of Frontiers, at the time of submission. This had no impact on the peer review process and the final decision.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1273837/full#supplementary-material>

15. Lohr C. Role of P2Y receptors in astrocyte physiology and pathophysiology. *Neuropharmacology* (2023) 223:109311. doi: 10.1016/j.neuropharm.2022.109311
16. He T, Yang GY, Zhang Z. Crosstalk of astrocytes and other cells during ischemic stroke. *Life (Basel)* (2022) 12(6):910. doi: 10.3390/life12060910
17. Shen XY, Gao ZK, Han Y, Yuan M, Guo YS, Bi X. Activation and role of astrocytes in ischemic stroke. *Front Cell Neurosci* (2021) 15:755955. doi: 10.3389/fncel.2021.755955
18. Lohr C, Beiersdorfer A, Fischer T, Hirnet D, Rotermund N, Sauer J, et al. Using genetically encoded calcium indicators to study astrocyte physiology: A field guide. *Front Cell Neurosci* (2021) 15:690147. doi: 10.3389/fncel.2021.690147
19. Vardjan N, Zorec R. Excitable astrocytes: ca(2+)- and cAMP-regulated exocytosis. *Neurochem Res* (2015) 40(12):2414–24. doi: 10.1007/s11064-015-1545-x
20. Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* (2009) 459(7245):356–63. doi: 10.1038/nature08144
21. Gancedo JM. Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life. *Biol Rev Camb Philos Soc* (2013) 88(3):645–68. doi: 10.1111/brv.12020
22. Horvat A, Vardjan N. Astroglial cAMP signalling in space and time. *Neurosci Lett* (2019) 689:5–10. doi: 10.1016/j.neulet.2018.06.025
23. Reuschle AK, Jakobsen E, Mertz C, Bak LK. Aspects of astrocytic cAMP signaling with an emphasis on the putative power of compartmentalized signals in health and disease. *Glia* (2019) 67(9):1625–36. doi: 10.1002/glia.23622
24. Sobolczyk M, Boczek T. Astrocytic calcium and cAMP in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* (2022) 16:889939. doi: 10.3389/fncel.2022.889939
25. Bhatia-Dey N, Heinbockel T. The olfactory system as marker of neurodegeneration in aging, neurological and neuropsychiatric disorders. *Int J Environ Res Public Health* (2021) 18(13):6976. doi: 10.3390/ijerph18136976
26. Fatuzzo I, Nicolini GF, Zoccali F, Cavalcanti L, Bellizzi MG, Riccardi G, et al. Neurons, nose, and neurodegenerative diseases: olfactory function and cognitive impairment. *Int J Mol Sci* (2023) 24(3):2117. doi: 10.3390/ijms24032117
27. Odaka H, Arai S, Inoue T, Kitaguchi T. Genetically-encoded yellow fluorescent cAMP indicator with an expanded dynamic range for dual-color imaging. *PLoS One* (2014) 9(6):e100252. doi: 10.1371/journal.pone.0100252
28. Chan KY, Jang MJ, Yoo BB, Greenbaum A, Ravi N, Wu WL, et al. Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat Neurosci* (2017) 20(8):1172–9. doi: 10.1038/nn.4593
29. Chen X, Wolfe DA, Bindu DS, Zhang M, Taskin N, Goertsen D, et al. Functional gene delivery to and across brain vasculature of systemic AAVs with endothelial-specific tropism in rodents and broad tropism in primates. *Nat Commun* (2023) 14(1):3345. doi: 10.1038/s41467-023-38582-7
30. Wu Z, He K, Chen Y, Li H, Pan S, Li B, et al. A sensitive GRAB sensor for detecting extracellular ATP in vitro and in vivo. *Neuron* (2022) 110(5):770–82.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2021.11.027
31. Schubert C, Schulz K, Trager S, Plath AL, Omriouate A, Rosenkranz SC, et al. Neuronal adenosine A(1) receptor is critical for olfactory function but unable to attenuate olfactory dysfunction in neuroinflammation. *Front Cell Neurosci* (2022) 16:912030. doi: 10.3389/fncel.2022.912030
32. Rotermund N, Schulz K, Hirnet D, Lohr C. Purinergic signaling in the vertebrate olfactory system. *Front Cell Neurosci* (2019) 13:112. doi: 10.3389/fncel.2019.00112
33. Lohr C, Grosche A, Reichenbach A, Hirnet D. Purinergic neuron-glia interactions in sensory systems. *Pflugers Arch* (2014) 466(10):1859–72. doi: 10.1007/s00424-014-1510-6
34. Lee Y, Messing A, Su M, Brenner M. GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* (2008) 56(5):481–93. doi: 10.1002/glia.20622
35. Illes P, Ulrich H, Chen JF, Tang Y. Purinergic receptors in cognitive disturbances. *Neurobiol Dis* (2023) 185:106229. doi: 10.1016/j.nbd.2023.106229
36. Burnstock G, Fredholm BB, Verkhratsky A. Adenosine and ATP receptors in the brain. *Curr Top Med Chem* (2011) 11(8):973–1011. doi: 10.2174/156802611795347627
37. Rotermund N, Winandy S, Fischer T, Schulz K, Fregin T, Alstedt N, et al. Adenosine A(1) receptor activates background potassium channels and modulates information processing in olfactory bulb mitral cells. *J Physiol* (2018) 596(4):717–33. doi: 10.1113/JP275503
38. Schulz K, Rotermund N, Grzelka K, Benz J, Lohr C, Hirnet D. Adenosine A(1) receptor-mediated attenuation of reciprocal dendro-dendritic inhibition in the mouse olfactory bulb. *Front Cell Neurosci* (2017) 11:435. doi: 10.3389/fncel.2017.00435
39. Doengi M, Deitmer JW, Lohr C. New evidence for purinergic signaling in the olfactory bulb: A2A and P2Y1 receptors mediate intracellular calcium release in astrocytes. *FASEB J* (2008) 22(7):2368–78. doi: 10.1096/fj.07-101782
40. El-Tayeb A, Michael S, Abdelrahman A, Behrenswerth A, Gollos S, Nieber K, et al. Development of polar adenosine A2A receptor agonists for inflammatory bowel disease: synergism with A2B antagonists. *ACS Med Chem Lett* (2011) 2(12):890–5. doi: 10.1021/ml200189u
41. Liu G, Zhang W, Guo J, Kong F, Zhou S, Chen S, et al. Adenosine binds predominantly to adenosine receptor A1 subtype in astrocytes and mediates an immunosuppressive effect. *Brain Res* (2018) 1700:47–55. doi: 10.1016/j.brainres.2018.06.021
42. Franchetti P, Cappellacci L, Marchetti S, Trincavelli L, Martini C, Mazzoni MR, et al. 2'-C-Methyl analogues of selective adenosine receptor agonists: synthesis and binding studies. *J Med Chem* (1998) 41(10):1708–15. doi: 10.1021/jm9707737
43. Beamer E, Kuchukulla M, Boison D, Engel T. ATP and adenosine—Two players in the control of seizures and epilepsy development. *Prog Neurobiol* (2021) 204:102105. doi: 10.1016/j.pneurobio.2021.102105
44. Camici M, Garcia-Gil M, Tozzi MG. The inside story of adenosine. *Int J Mol Sci* (2018) 19(3):784. doi: 10.3390/ijms19030784
45. Schladlich IS, Winzer R, Stabernack J, Tolosa E, Magnus T, Rissiek B. The role of the ATP-adenosine axis in ischemic stroke. *Semin Immunopathol* (2023) 45(3):347–65. doi: 10.1007/s00281-023-00987-3
46. Cunha RA. How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? *J Neurochem* (2016) 139(6):1019–55. doi: 10.1111/jnc.13724
47. Gao Z. Adenosine A(2A) receptor and glia. *Int Rev Neurobiol* (2023) 170:29–48. doi: 10.1016/bs.irn.2023.08.002
48. Lopes CR, Cunha RA, Agostinho P. Astrocytes and adenosine A(2A) receptors: active players in Alzheimer's disease. *Front Neurosci* (2021) 15:666710. doi: 10.3389/fnins.2021.666710
49. Poucher SM, Keddie JR, Singh P, Stogdall SM, Caulkett PW, Jones G, et al. The in vitro pharmacology of ZM 241385, a potent, non-xanthine A2a selective adenosine receptor antagonist. *Br J Pharmacol* (1995) 115(6):1096–102. doi: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb15923.x
50. Abbraccio MP, Ceruti S, Brambilla R, Barbieri D, Camurri A, Franceschi C, et al. Adenosine A3 receptors and viability of astrocytes. *Drug Dev Res* (1998) 45(3-4):379–86. doi: 10.1002/(SICI)1098-2299(199811/12)45:3/4<379::AID-DDR38>3.0.CO;2-Y
51. Bjorklund O, Shang M, Tonazzini I, Dare E, Fredholm BB. Adenosine A1 and A3 receptors protect astrocytes from hypoxic damage. *Eur J Pharmacol* (2008) 596(1-3):6–13. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.08.002
52. Boison D, Chen JF, Fredholm BB. Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death Differ* (2010) 17(7):1071–82. doi: 10.1038/cdd.2009.131
53. Beiersdorfer A, Scheller A, Kirchhoff F, Lohr C. Pangliar gap junctions between astrocytes and olfactory ensheathing cells mediate transmission of Ca(2+) transients and neurovascular coupling. *Glia* (2019) 67(7):1385–400. doi: 10.1002/glia.23613
54. Doengi M, Hirnet D, Coulon P, Pape HC, Deitmer JW, Lohr C. GABA uptake-dependent Ca(2+) signaling in developing olfactory bulb astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106(41):17570–5. doi: 10.1073/pnas.0809513106
55. Kozlov AS, Angulo MC, Audinat E, Charpak S. Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) 103(26):10058–63. doi: 10.1073/pnas.0603741103
56. Otsu Y, Couchman K, Lyons DG, Collot M, Agarwal A, Mallet JM, et al. Calcium dynamics in astrocyte processes during neurovascular coupling. *Nat Neurosci* (2015) 18(2):210–8. doi: 10.1038/nn.3906
57. Petzold GC, Albeanu DF, Sato TF, Murthy VN. Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron* (2008) 58(6):897–910. doi: 10.1016/j.neuron.2008.04.029
58. Ung K, Tepe B, Pekarek B, Arenkiel BR, Deneen B. Parallel astrocyte calcium signaling modulates olfactory bulb responses. *J Neurosci Res* (2020) 98(8):1605–18. doi: 10.1002/jnr.24634
59. Rieger A, Deitmer JW, Lohr C. Axon-glia communication evokes calcium signaling in olfactory ensheathing cells of the developing olfactory bulb. *Glia* (2007) 55(4):352–9. doi: 10.1002/glia.20460
60. Thyssen A, Hirnet D, Wolburg H, Schmalzing G, Deitmer JW, Lohr C. Ectopic vesicular neurotransmitter release along sensory axons mediates neurovascular coupling via glial calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107(34):15258–63. doi: 10.1073/pnas.1003501107
61. Jang B, Kim MJ, Lee YJ, Ishigami A, Kim YS, Choi EK. Vimentin citrullination probed by a novel monoclonal antibody serves as a specific indicator for reactive astrocytes in neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* (2020) 46(7):751–69. doi: 10.1111/nan.12620
62. Tatomir A, Beltrand A, Nguyen V, Boodhoo D, Mekala A, Cudrici C, et al. RGC-32 regulates generation of reactive astrocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front Immunol* (2020) 11:608294. doi: 10.3389/fimmu.2020.608294
63. Voronkov DN, Stavrovskaya AV, Potapov IA, GusChina AS, Olshanskiy AS. Glial reaction in a neuroinflammatory model of parkinson's disease. *Bull Exp Biol Med* (2023) 174(5):693–8. doi: 10.1007/s10517-023-05772-8
64. Deleate A, Fuchtemeier M, Schumacher T, Ulbrich C, Foddiss M, Petzold GC. Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat Commun* (2014) 5:5422. doi: 10.1038/ncomms6422
65. Nikolic L, Shen W, Nobili P, Virenque A, Ulmann L, Audinat E. Blocking TNFalpha-driven astrocyte purinergic signaling restores normal synaptic activity during epileptogenesis. *Glia* (2018) 66(12):2673–83. doi: 10.1002/glia.23519
66. Chen Y, Zhang ZX, Zheng LP, Wang L, Liu YF, Yin WY, et al. The adenosine A(2A) receptor antagonist SCH58261 reduces macrophage/microglia activation and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Neurochem Int* (2019) 129:104490. doi: 10.1016/j.neuint.2019.104490

67. Zheng W, Feng Y, Zeng Z, Ye M, Wang M, Liu X, et al. Choroid plexus-selective inactivation of adenosine A(2A) receptors protects against T cell infiltration and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* (2022) 19(1):52. doi: 10.1186/s12974-022-02415-z
68. Duarte-Silva E, Ulrich H, Oliveira-Giacomelli A, Hartung HP, Meuth SG, Peixoto CA. The adenosinergic signaling in the pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Front Immunol* (2022) 13:946698. doi: 10.3389/fimmu.2022.946698
69. Martins TB, Rose JW, Jaskowski TD, Wilson AR, Husebye D, Seraj HS, et al. Analysis of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine serum concentrations in patients with multiple sclerosis by using a multiplexed immunoassay. *Am J Clin Pathol* (2011) 136(5):696–704. doi: 10.1309/AJCP7UBK8IBVMVNR
70. Mills JH, Kim DG, Krenz A, Chen JF, Bynoe MS. A2A adenosine receptor signaling in lymphocytes and the central nervous system regulates inflammation during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* (2012) 188(11):5713–22. doi: 10.4049/jimmunol.1200545
71. Faivre E, Coelho JE, Zornbach K, Malik E, Baqi Y, Schneider M, et al. Beneficial effect of a selective adenosine A(2A) receptor antagonist in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci* (2018) 11:235. doi: 10.3389/fnmol.2018.00235
72. Madeira D, Dias L, Santos P, Cunha RA, Canas PM, Agostinho P. Association between adenosine A(2A) receptors and connexin 43 regulates hemichannels activity and ATP release in astrocytes exposed to amyloid-beta peptides. *Mol Neurobiol* (2021) 58(12):6232–48. doi: 10.1007/s12035-021-02538-z
73. Paiva I, Carvalho K, Santos P, Cellai L, Pavlou MAS, Jain G, et al. A(2A) R-induced transcriptional deregulation in astrocytes: An *in vitro* study. *Glia* (2019) 67(12):2329–42. doi: 10.1002/glia.23688
74. Yuan J, Chen L, Wang J, Xia S, Huang J, Zhou L, et al. Adenosine A2A receptor suppressed astrocyte-mediated inflammation through the inhibition of STAT3/YKL-40 axis in mice with chronic cerebral hypoperfusion-induced white matter lesions. *Front Immunol* (2022) 13:841290. doi: 10.3389/fimmu.2022.841290

5. Supplement

Supplementary Table 1. Differences in amplitude of cAMP transients evoked by adenosine, PSB0777 and ATP between somata and cell processes in control mice and EAE mice, as tested with Mann-Whitney-U test. All mean \pm SEM values in % $-\Delta F$.

Control	Soma			Processes			p=
	Mean	SEM	N=	Mean	SEM	N=	
Ado	40.1	1.47	97	27.1	1.36	95	3.714E-9
PSB	20.6	2.08	15	11.7	1.04	27	2.635E-4
ATP	27.1	1.41	61	17.9	0.98	75	8.354E-7
EAE							
Ado	40.3	1.01	221	32.5	0.83	258	1.386E-8
PSB	18.6	0.77	88	14.2	0.52	125	2.294E-7
ATP	25.8	0.65	173	19.0	0.61	189	4.690E-14

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beleuchtet die Rolle von cAMP-Signalen in Astrozyten der GL des OB der Maus. Die GL stellt den Ort der ersten Verarbeitungsebene dar, in der spezifische olfaktorische Informationen, die von den ORNs stammen, verschaltet und moduliert werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, wie verschiedene neuromodulatorische Systeme – das noradrenerge (Kapitel 2), das dopaminerge (Kapitel 3) sowie das adenosinerge System (Kapitel 4) – zur intrazellulären cAMP-Dynamik in Astrozyten beitragen und über welche Rezeptoren diese neuromodulatorischen Systeme reguliert werden.

Zur Visualisierung intrazellulären cAMPs im Zytoplasma wurde in dieser Arbeit der genetisch kodierte cAMP Indikator Flamindo2 von Odaka et al. (2014) verwendet. Er basiert auf dem gelben Fluorophor Citrin, der mit der cAMP Bindungsdomäne von mEPAC1 (engl. *membrane-bound exchange protein directly activated by cAMP 1*) fusioniert ist. Flamindo2 weist ein Extinktionsmaximum von 504 nm und ein Emissionsmaximum von 523 nm auf. Die Fluoreszenz nimmt bei zunehmender cAMP-Konzentration ab (Odaka et al., 2014). In unseren Experimenten wurde Flamindo2 unter dem Astrozyten-spezifischen gfaABC1D-Promoter exprimiert (Lee et al., 2008) und anschließend in Adeno-assoziierten Viren (AAV) kapsidiert. Dieser Promoter reguliert die Transkription des Gens, das für die verkürzte Version des astrozytenspezifischen sauren Gliafaserproteins (GFAP, engl. *glial fibrillary acidic protein*)-kodiert. Wir konnten mittels immunhistochemischer Färbungen eine Transduktionsrate von ca. 50 % aller Astrozyten der GL und EPL feststellen, wobei keine Transduktion nicht-astrozytärer Zelltypen beobachtet wurde. Dies stimmt überein mit den Beobachtungen von Lee et al. (2008), dass der 681 bp lange gfaABC1D-Promoter eine starke und astrozytenspezifische Expression von Transgenen in Astrozyten des OB bei Mäusen ermöglicht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen Neuromodulatoren über unterschiedliche Rezeptoren und Signalkaskaden direkte und teils indirekte Effekte auf die Aktivität der ACs und somit der cAMP-Produktion in den Astrozyten ausüben. Diese Diskussion betrachtet im Folgenden insbesondere die verschiedenen Rezeptoren, über die diese Signalwege vermittelt werden und die potenziellen Interaktionen dieser. Zudem werden die möglichen

physiologischen Bedeutungen für die Funktion des OB sowie Mechanismen, die eine kontextabhängige Modulation der cAMP-Signale in Astrozyten ermöglichen könnten, erörtert.

5.1 Noradrenerge cAMP-Signale werden über α_1 -, α_2 - und β -Rezeptoren vermittelt

In Kapitel 2 konnte gezeigt werden, dass die Badapplikation von NE cAMP-Signale in den Astrozyten der GL des OB induzierte. Die pharmakologische Inhibition von α_1 -, α_2 - und β -Rezeptoren reduzierte das NE-induzierte cAMP-Signal höchst signifikant. Dies deutet auf eine Signaltransduktion über alle adrenergen Rezeptoren hin (Abbildung 4). Darüber hinaus zeigte die Badapplikation der Agonisten für jeweils die α_1 -, α_2 - oder β -Rezeptoren ebenfalls astrozytäre cAMP-Signale. Es ist bekannt, dass adrenerge α_1 -Rezeptoren $G_{q/11}$, α_2 -Rezeptoren G_i -gekoppelt und β -Rezeptoren G_s -gekoppelt sind (Neves et al., 2002). Während die Aktivierung von $G_{q/11}$ über den PLC/IP₃-Weg zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt, wirkt eine Aktivierung von G_s stimulierend bzw. G_i inhibierend auf die membranständigen ACs und somit auf die intrazelluläre cAMP-Produktion (Abbraccio et al., 2009; Berridge, 2016). Bei der Applikation von NE war also ein NE-induziertes cAMP-Signal über die β -Rezeptoren zu erwarten, wohingegen die über α -Rezeptoren vermittelten Signale zusätzlich auftraten, obwohl dies nicht im Einklang mit den bisherigen Erwartungen stand.

NE zeigt unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den adrenergen Rezeptortypen: am stärksten an α_2 -Rezeptoren, schwächer an α_1 -Rezeptoren und am schwächsten an β -Rezeptoren (Ramos & Arnsten, 2007). In unseren Experimenten war die Amplitude der Antworten beim β -Rezeptor-Agonisten Isoprenalin am größten und mit dem α_1 -Rezeptor-Agonisten Phenylephrin (PE) am kleinsten. Weiterhin differierte die Anzahl der reagierenden Astrozyten stark: Während 99 % der Zellen, die auf die Applikation von NE mit cAMP-Signalen reagiert hatten, auch auf die Applikation des β -Rezeptor-Agonisten Isoprenalin reagierten, waren es für den α_1 -Rezeptor-Agonisten PE nur noch 73 % und für den α_2 -Rezeptor-Agonisten Xylazin lediglich 50 % der Zellen.

In späteren Experimenten (siehe 5.2) konnten wir feststellen, dass die Aktivierung der α -Rezeptoren die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration induzierte, welches dann Ca^{2+} -sensitive AC Isoformen aktivierte. Es bleibt somit unklar, ob die beobachteten Differenzen auf einer unterschiedlichen Rezeptorexpression der adrenergen Rezeptoren in

Astrozyten beruhen oder auf eine unterschiedliche Expression der AC-Isoformen zurückzuführen sind.

Während die cAMP-Erhöhung über β -Rezeptoren zu erwarten war, war der Anstieg der cAMP-Konzentration, ausgelöst durch die Aktivierung der α -Rezeptoren, zunächst unerwartet. Insbesondere die G_i -gekoppelten α_2 -Rezeptoren hätten nach bisherigem Kenntnisstand eher zu einer Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Hemmung der ACs führen sollen (Neves et al., 2002). So wurde beispielsweise im Kortex die Hemmung der ACs nach Aktivierung der α_2 -Rezeptoren gezeigt (Rosenberg et al., 2023). Die Signalwege nach der Rezeptoraktivierung scheinen also regional unterschiedlich organisiert zu sein und darüber hinaus von den Aktivitätsniveaus der ACs in der jeweiligen Zelle abzuhängen (siehe 5.6).

In Zellkultur wurde bereits früh gezeigt, dass die Aktivierung von α_2 -Rezeptoren neben der Inhibierung der ACs auch den PLC/IP₃-Signalweg aktiviert (Cotecchia et al., 1990). Dies wurde für Astrozyten der GL im murinen OB ebenfalls nachgewiesen (Fischer et al., 2021). Im Gegensatz zu den α_2 -Rezeptoren sind die α_1 -Rezeptoren dafür bekannt, klassischerweise den PLC/IP₃-Signalweg zu aktivieren (Neves et al., 2002). Dieser Signalweg wurde für Astrozyten in der GL im OB der Maus ebenfalls bereits nachgewiesen (Fischer et al., 2021). Da experimentell über die Aktivierung von α_1 -Rezeptoren cAMP-Signale induziert werden konnten, wurde zunächst untersucht, welche Rolle Ca²⁺ bei der Induktion der cAMP-Signale an diesem Rezeptor spielt. Die Kombination von AAV-gfaABC1D-RCaMP und AAV-gfaABC1D-Flamindo2 zeigte, dass NE-induzierte Ca²⁺- und cAMP-Signale zeitgleich auftraten (Kapitel 2, Abbildung 3 C–G). Durch Blockade der SERCA mittels Cyclopiazonsäure (engl. *cyclopiazonic acid*, CPA) wurden die NE-induzierten cAMP-Signale um ca. 35 % reduziert. Da auch die Kombination von CPA mit einer Ca²⁺-freien ACSF weiterhin zu cAMP-Signalen führte, ist davon auszugehen, dass diese über β -Rezeptoren ausgelöst wurden. Die genauere Untersuchung der cAMP-Induktion über α_1 -Rezeptoren zeigte, dass diese abhängig von Ca²⁺ aus internen Speichern über den PLC/IP₃-Weg induziert wurden (Kapitel 2, Abbildung 4 C–G). Die Blockade der IP₃-Rezeptoren sowie die Kombination von CPA und Ca²⁺-freier ACSF führten dazu, dass kein cAMP-Signal mehr mittels α_1 -Rezeptor Agonist PE induziert werden konnte. Wir konnten also experimentell zeigen, dass über die Aktivierung der α_1 -Rezeptoren über den PLC/IP₃-Weg sowohl Ca²⁺ intrazellulär freigesetzt wird als auch cAMP-Signale induziert werden. Es wäre sinnvoll dieselben Experimente für die α_2 -Rezeptoren mit dem Agonisten Xylazin zu

wiederholen, um zu demonstrieren, dass auch hier die positiven cAMP-Signale mittels Ca^{2+} induziert werden, das zuvor über den PLC/ IP_3 -Weg freigesetzt wurde.

Konträr zu unseren Ergebnissen wurde in Myozyten des Rattenherzes von Gallego et al. (2005) eine Kopplung der α_1 -Rezeptoren an G_s -Proteine gezeigt. In der Literatur finden sich weitere experimentelle Studien mit verschiedenen Ergebnissen zur Aktivierung von α_1 -Rezeptoren: *In vivo* wurde von Oe et al. (2020) in Mäusen gezeigt, dass kortikale Astrozyten auf Aktivierung des α_1 -Rezeptors lediglich mit Ca^{2+} , nicht aber mit cAMP-Signalen reagierten. Außerhalb des ZNS in glatten Muskelzellen des murinen Uterus konnten Chen et al. (2018) PE-induzierte cAMP-Signale nachweisen. Je nach weiterer intrazellulärer Signalkaskade und dem Vorhandensein von Ca^{2+} -sensitiven ACs (siehe 5.2) kann PE über den α_1 -Rezeptor also lediglich Ca^{2+} - oder zusätzlich auch cAMP-Signale induzieren.

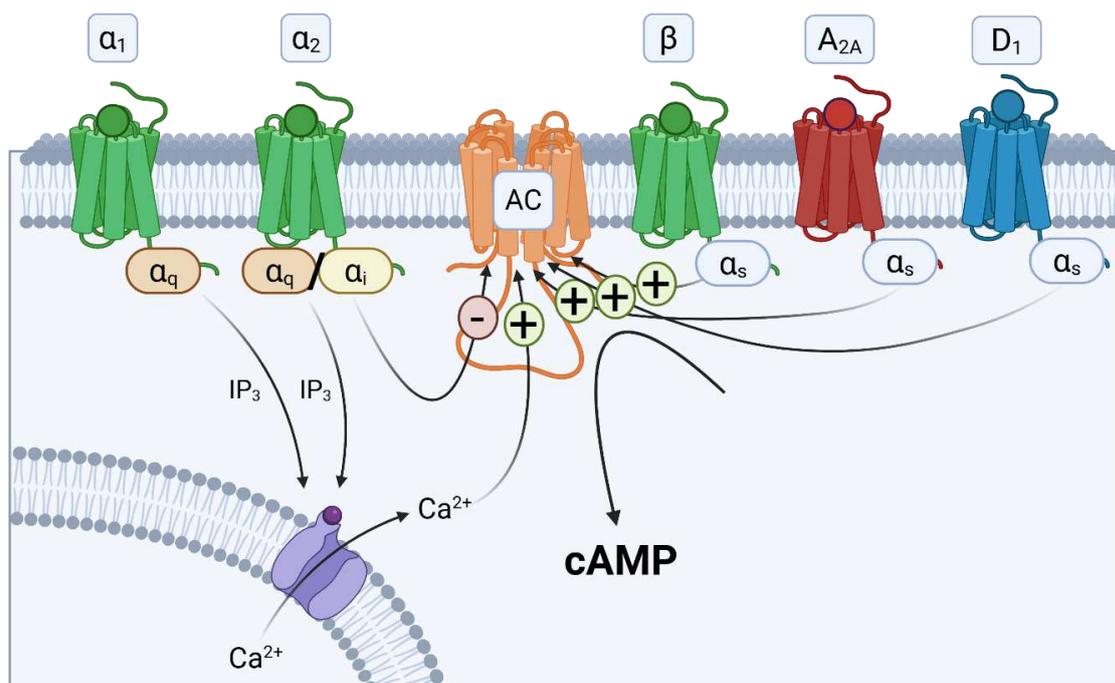


Abbildung 4: Schematische Abbildung der intrazellulären Signalkaskaden nach Aktivierung der astrozytären adrenergen α_1 -, α_2 - und β -Rezeptoren sowie dopaminergere D_1 - und adenosinergere A_{2A} -Rezeptoren in der Glomerularschicht des olfaktorischen Bulbus

Adrenerge β -Rezeptoren, adenosinergere A_{2A} - und dopaminergere D_1 -Rezeptoren aktivieren über G_s -gekoppelte Signalwege die Adenylatzyklasen (ACs) und fördern dadurch Bildung von cAMP. Die G_q -gekoppelte α_1 - und α_2 -Rezeptoren aktivieren die Phospholipase C, welches zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) führt. Die resultierende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann die Ca^{2+} -sensitiven AC-Isoformen aktivieren und so zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führen. Die α_2 -Rezeptoren sind zudem auch G_i -gekoppelt und können die Aktivität der ACs hemmen – in unseren Experimenten jedoch nur nach vorheriger Aktivierung der ACs durch Forskolin und nicht aus dem astrozytären AC-Ruhezustand heraus.

5.2 Rolle der Ca²⁺-sensitiven Adenylatzyklasen AC1 und AC3 in der cAMP-Signalvermittlung

Der Nachweis, dass die über α_1 -Rezeptoren induzierten cAMP-Signale vom intrazellulär freigesetzten Ca²⁺ abhängen, das über den PLC/IP₃ -Weg freigesetzt wurde, initiierte eine genauere Untersuchung der AC-Subtypen in den Astrozyten der GL im OB. Insgesamt existieren fünf membranständige AC-Isoformen (1, 3, 5, 6 und 8) sowie die AC10, die über Ca²⁺ moduliert werden können (Devasani & Yao, 2022). Da die AC-Isoformen 5 und 6 von Ca²⁺ inhibiert werden (Devasani & Yao, 2022), wir aber eine steigende cAMP-Konzentration nachgewiesen haben, konzentrierten sich die weiteren Experimente auf die AC-Isoformen, die von Ca²⁺ aktiviert werden (1, 3, 8, 10) (Devasani & Yao, 2022).

Die AC10-Isoform liegt im Zytoplasma oder den Mitochondrien der Zelle vor und wird von Bicarbonat-Ionen und Ca²⁺ stimuliert. Sie reagiert weiterhin un sensitiv auf die Regulation über G-Protein gekoppelte Rezeptoren sowie Forskolin (Tresguerres et al., 2011). Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die AC10 überwiegend in Hoden und Leber exprimiert wird (Tresguerres et al., 2011). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass sie auch in Astrozyten exprimiert wird und ihre Aktivierung die Glykolyse anregt und zur vermehrten Ausschüttung von Lactat führt, welches den umliegenden Neuronen als Energiequelle dient (Choi et al., 2012). Die AC10 benötigt sehr hohe Ca²⁺-Konzentrationen zur Aktivierung mit einem EC₅₀ von rund 750 μ M Ca²⁺ in Kombination mit Bicarbonat (Litvin et al., 2003). Diese Konzentration ist deutlich höher als jene, die in lebenden Zellen gefunden werden kann (Bagur & Hajnoczky, 2017). Lediglich in Mikrodomänen sind Ca²⁺-Konzentrationen dieser Größenordnung möglich (Litvin et al., 2003). In weiteren Versuchen schlossen wir daher aus, dass die cAMP-Signale über die AC10 entstanden sein könnten und konzentrierten uns auf die membranständigen Ca²⁺-sensitiven ACs.

Die Ca²⁺-aktivierbaren, membranständigen ACs 1, 3 und 8 besitzen eine unterschiedliche Sensitivität Ca²⁺ gegenüber: Die AC1 ist fünffach sensitiver gegenüber Ca²⁺-Ionen als die AC3 und die AC8 (Devasani & Yao, 2022). Expressionsdaten für die einzelnen AC-Isoformen lagen leider nicht zelltypspezifisch für den OB vor. In der GL des OB wurde in einer Studie von Nicol et al. (2005) über alle Entwicklungsstufen hinweg eine starke bis moderate Expression der AC1 nachgewiesen. In AC3-Knockout Mäusen wurde ein um mehr als 50 % vermindertes Volumen des OB nachgewiesen (Luo et al., 2015). Dies unterstreicht noch einmal die Wichtigkeit dieser

AC-Isoform für den OB. In situ Hybridisierungsdaten zeigen für die AC8 eine starke Expression im OB, jedoch nicht in den Randbereichen der GL und ONL (Muglia et al., 1999).

In unseren Experimenten wiesen wir die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der AC1 und AC3 in Astrozyten der GL im OB nach. Dies geschah zum einen mit den Blockern ST 034307 für die AC1 sowie NKY80 für die AC3. Die gewählte Konzentration des NKY80 von 500 μM (EC_{50} für AC3 = 132 μM (Onda et al., 2001)) blockiert allerdings neben der AC3 ebenfalls auch die AC1 zu ca. 70 % (Brand et al., 2013; Onda et al., 2001). Es existiert aktuell kein Blocker, der spezifisch nur die AC3 blockiert. Der Einsatz des AC1-Blockers ST 034307 blockierte das PE-induzierte cAMP-Signal in 69 % der Astrozyten und der AC3- (und teils AC1-) Blocker NKY80 in 59 % der Astrozyten. Zellen, die nicht blockiert waren, zeigten unter dem Einsatz der jeweiligen Blocker dabei Amplituden, die sich statistisch nicht signifikant zu denen ohne Blockereinsatz unterschieden. Die Kombination der beiden Blocker schließlich führte dazu, dass kein PE-induziertes cAMP-Signal mehr nachweisbar war. Da NKY80 teilweise auch die AC1 blockierte, ist davon auszugehen, dass die jeweiligen Astrozyten das cAMP-Signal entweder über die Aktivierung der AC1 oder der AC3 induzierten. Das Vorhandensein der AC1 und AC3 wurde durch immunhistochemische Färbungen bestätigt. Eine Blockade von lediglich der AC1 durch die Kombination beider Blocker ist daher unwahrscheinlich.

Für die AC8 existiert ebenfalls wie für die AC3 bisher kein spezifischer Blocker. Konträr zu unseren Ergebnissen wurde in einer Studie mit AC8 KO-Mäusen aufgezeigt, dass in der Membranfraktion aus einem Zellhomogenat des OB keine AC-Aktivität durch Stimulation mit Ca^{2+} ausgelöst werden konnte (Schaefer et al., 2000). Es wird jedoch vermutet, dass die Konzentration von freigesetztem Ca^{2+} aus dem ER für die Aktivierung der AC8 nicht ausreichend wäre und diese Isoform nur über den SOCE und dadurch entstehenden Ca^{2+} -Mikrodomänen mit höherer Konzentration aktiviert werden kann (Chen et al., 2022; Martin et al., 2009). In einer früheren Studie von Fischer et al. (2021) wurde gezeigt, dass NE Ca^{2+} -Signale über die Aktivierung der α -Rezeptoren vermittelt und dass in der späten Phase dieser Ca^{2+} -Antwort der SOCE beteiligt ist. Dennoch bleibt unklar, ob der über SOCE vermittelte Ca^{2+} -Anstieg in den Astrozyten der GL im OB ausreicht, um die AC8 unter physiologischen Bedingungen zu aktivieren und ob diese Isoform in den Astrozyten der GL überhaupt exprimiert wird. Es sind lediglich Zelltyp-unspezifische Expressionsdaten vorhanden, die eine starke Expression der AC8 im OB nachweisen (Muglia et al., 1999). Da die Blockade der AC1

und AC3 ausreichte, um das cAMP-Signal, das über α_1 -Rezeptoren in den Astrozyten induziert wurde, komplett zu blockieren, kann hier immerhin die Aktivierung der AC8, aber nicht dessen Vorhandensein ausgeschlossen werden.

Um das Vorhandensein der AC1 und AC3 und die Abwesenheit der AC8 in den Astrozyten der GL des OB zu bekräftigen, führten wir immunhistochemische Färbungen von Sagittalschnitten des OB mit Anti-AC1, Anti-AC3 und Anti-AC8 durch (Kapitel 2, Abbildung 6 A–F). Während Ko-Färbungen von Astrozyten und Anti-AC1 sowie Anti-AC3 erkennbar waren, so war dies bei Anti-AC8 nicht der Fall, sodass erneut bestätigt wurde, dass die PE-induzierten cAMP-Signale durch die Aktivierung der AC1 und AC3 mittels Ca^{2+} in den Astrozyten entstanden sein müssen.

Ca^{2+} -abhängige ACs bieten ein großes Potenzial synaptische Übertragung zu modulieren. Die beiden sekundären Botenstoffe Ca^{2+} und cAMP regulieren verschiedenste zelluläre Grundfunktionen wie Gentranskription und Wachstum, aber auch synaptische Plastizität und Gliotransmission bei Astrozyten (Sobolczyk & Boczek, 2022). Es stellt sich nun die Frage nach der Funktion eines *Crosstalks* der beiden sekundären Botenstoffe. Durch die unterschiedliche Affinität der adrenergen Rezeptoren zu NE (α_2 -Rezeptoren > α_1 -Rezeptoren > β -Rezeptoren (Ramos & Arnsten, 2007)) führt eine Freisetzung einer mittleren NE-Konzentration über α_1 -Rezeptoren üblicherweise zu einem schnellen, aber kurz anhaltenden Ca^{2+} -Signal, während höhere NE-Konzentrationen über die Aktivierung der β -Rezeptoren zu langanhaltenden cAMP-Signalen führen. Durch den *Crosstalk* von Ca^{2+} und cAMP könnten in diesem Fall schon geringere Konzentrationen von NE, das durch den LC ausgeschüttet wird, zu langanhaltenden cAMP-Signalen führen. Die Amplituden dieser cAMP-Signale fallen jedoch geringer aus als jene bei gleicher NE-Konzentration über β -Rezeptoren induzierten cAMP-Signale (vgl. 5.1).

5.3 Indirekte Modulation der cAMP-Signalgebung durch α_{1A} - und α_{1D} -Rezeptoren

Die α_1 -Rezeptoren werden in folgende Subtypen untergliedert: α_{1A} , α_{1B} und α_{1D} (Bylund et al., 1994; Hieble et al., 1995). Die Expression der α_1 -Rezeptor-Subtypen im OB der Ratte wurde auf mRNA-Ebene untersucht, wobei eine starke Expression für α_{1A} - und α_{1D} -Rezeptoren, jedoch nur eine moderate für die α_{1B} -Rezeptoren festgestellt wurde (Day et al., 1997). Obwohl alle drei Rezeptor-Subtypen $G_{q/11}$ -gekoppelt sind, können sie jeweils mit unterschiedlichen

Proteinen interagieren und somit verschiedene Signalkaskaden aktivieren (Nalepa et al., 2013).

Zimnik et al. (2013) konnten in ihren Experimenten bereits zeigen, dass die α_{1A} -Rezeptoren im OB eine wichtige Rolle spielen. Die Aktivierung der α_{1A} -Rezeptoren von GCs führt zur Verstärkung der inhibierenden Wirkung der dendrodendritischen Synapsen zwischen GCs und MCs. Für Astrozyten des Hippocampus konnten Lefton et al. (2025) zeigen, dass es durch Aktivierung von α_{1A} -Rezeptoren zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kam, dem eine Ausschüttung von ATP folgte. Welche Rolle die Subtypen der α_1 -Rezeptoren an den Astrozyten der GL im OB spielen, war bisher nicht untersucht.

In unseren Experimenten blockierte der α_{1A} -Antagonist RS100329 die mittels α_1 -Rezeptor-Agonisten PE-induzierten Ca^{2+} -Signale in 88 % der Astrozyten und die PE-induzierten cAMP-Signale in 75 % der Astrozyten. In den übrigen Zellen unterschieden sich die Amplituden der Signale nicht signifikant zum *Rundown*. Der Einsatz des α_{1D} -Antagonisten BMY7378 blockierte die PE-induzierten Ca^{2+} -Signale in 14 % der Zellen und reduzierte sie in den übrigen Zellen signifikant. Die PE-induzierten cAMP-Signale blockierte der α_{1D} -Antagonist in 70 % der Zellen und reduzierte das induzierte cAMP-Signal in den übrigen Zellen wiederum nicht signifikant. Die Kombination der beiden Blocker für α_{1A} - und α_{1D} -Rezeptoren schließlich führte dazu, dass PE weder Ca^{2+} - noch cAMP-Signale induzierte. Um die Spezifität der Subtypen-Antagonisten sicherzustellen, wurden für beide Blocker wie bei Zacharia et al. (2013) jeweils Konzentrationen von 1 μM verwendet.

Es ist auffällig, dass die Ca^{2+} -Signale auf den ersten Blick scheinbar entweder über α_{1A} -Rezeptoren oder über α_{1D} -Rezeptoren induziert werden. Da die Blockade der α_{1D} -Rezeptoren jedoch in den Astrozyten, die weiterhin ein Ca^{2+} -Signal haben, auch zu einer signifikanten Amplitudenreduktion des PE-induzierten Ca^{2+} -Signals führte, ist eine Koexpression der beiden Rezeptorsubtypen in den allermeisten Astrozyten in der GL des OB am wahrscheinlichsten.

Die cAMP-Signale hingegen werden durch die Blockade eines der beiden Rezeptorsubtypen in etwa gleich vielen Astrozyten komplett blockiert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die meisten Astrozyten beide Rezeptorsubtypen exprimieren. Während die Aktivierung der α_{1A} -Rezeptoren zu starken Ca^{2+} -Signalen führt, scheint die Aktivierung der α_{1D} -Rezeptoren zu der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung lediglich etwas zu addieren. Schlussendlich werden durch das intrazellulär freigesetzte Ca^{2+} die Ca^{2+} -sensitiven ACs, AC1 und AC3 aktiviert (Abbildung 5).

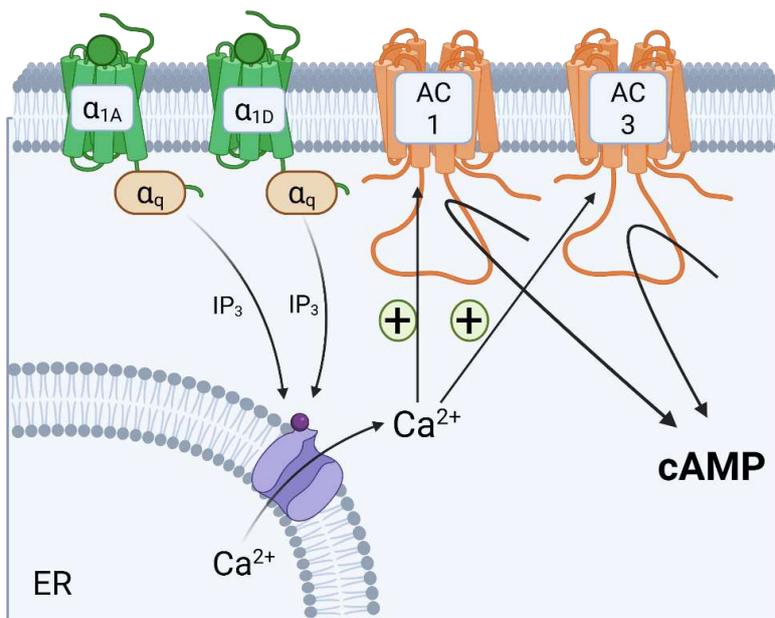


Abbildung 5: Schematische Darstellung der intrazellulären Signalkaskaden nach Aktivierung der astrozytären α_{1A} - und α_{1D} -Rezeptoren in der Glomerularschicht des olfaktorischen Bulbus

Die Aktivierung der astrozytären G_q -gekoppelten α_{1A} - und α_{1D} -Rezeptoren aktiviert die Phospholipase C, welches zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) in den Intrazellulärraum führt. Dieses freigesetzte Ca^{2+} aktiviert dann die Ca^{2+} -sensitiven Adenylatzyklase (AC)-Isoformen AC1 und AC3, welches die Produktion von cAMP induziert.

Die unterschiedliche Sensitivität der AC-Isoformen gegenüber Ca^{2+} könnte eine Erklärung für den großen Anteil an Zellen bieten, in denen die cAMP-Signale durch einen der beiden Blocker blockiert wurden. Die AC1 ist fünffach sensitiver gegenüber der Aktivierung durch Ca^{2+} als die AC8 oder die AC3 (Devasani & Yao, 2022). Es ist denkbar, dass die gleichzeitige Aktivierung von α_{1A} - und α_{1D} -Rezeptoren zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt, die einen gewissen Schwellenwert überschreitet, der für die Aktivierung der weniger Ca^{2+} -sensitiven AC3 erforderlich ist. In Astrozyten, die die Ca^{2+} -sensitivere AC1 gemeinsam mit den α_{1A} -Rezeptoren exprimieren, genügt bereits die Aktivierung dieses Rezeptorsubtyps, um ein cAMP-Signal zu generieren. Wird dagegen die weniger Ca^{2+} -sensitive AC3 in den jeweiligen

Astrozyten exprimiert, scheint die Aktivierung von α_{1A} - und α_{1D} -Rezeptoren notwendig zu sein, um den Ca^{2+} -Schwellenwert für die Aktivierung der AC3 zu erreichen und eine cAMP-Antwort hervorzurufen.

5.4 Dopaminerge cAMP-Signale werden überwiegend über die Familie der D_1 -Rezeptoren vermittelt

Der OB wird stark von der dopaminergen Neuronengruppe A16 innerviert (Hokfelt et al., 1984). In der GL und der EPL des OB befinden sich TH-positive Interneurone (Fischer et al., 2020). Die TH katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Synthese von L-Dopa aus L-Tyrosin und somit der gesamten Katecholaminsynthese (Nagatsu et al., 1964). Im nächsten Schritt wird dann aus L-Dopa Dopamin synthetisiert (Blaschko, 1942). Das Expressionslevel der TH ist dabei stark aktivitätsabhängig. Cigola et al. (1998) wiesen nach, dass eine Forskolin-induzierte cAMP-Erhöhung in primären Zellkulturen zu einer 1,5 bis 1,6-fachen Zunahme TH-positiver Neurone führte.

In der GL wurde immunhistochemisch nachgewiesen, dass die Dendriten der TH-positiven Neurone sich in räumlicher Nähe zu Astrozyten befinden (Fischer et al., 2020). Zu den TH-positiven Interneuronen zählen die PGCs und die sACs, die neben GABA auch Dopamin ausschütten (Nagayama et al., 2014). Während PGCs zu einem Glomerulus projizieren, projizieren die sACs zu fünf bis sechs benachbarten Glomeruli (Nagayama et al., 2014). Eine weitere Dopamin-Quelle für den OB könnten die Afferenzen des LC sein. Für Neurone des LC, die den *Hippocampus* innervieren, wurde gezeigt, dass diese neben NE auch Dopamin ausschütten und somit nicht nur rein noradrenerg sind (Kempadoo et al., 2016).

Es wurde weiterhin bereits gezeigt, dass Astrozyten in der GL des juvenilen murinen OB sowohl die dopaminergen D_1 - als auch D_2 -Rezeptoren exprimieren und ihre Aktivierung zu Ca^{2+} -Signalen führt (Fischer et al., 2020). Mittels pharmakologischer Inhibition von D_1 - und D_2 -Rezeptoren konnten wir zeigen, dass Dopamin über D_1 -Rezeptoren cAMP-Signale in Astrozyten des OB auslöste (Abbildung 4). Über die Aktivierung der D_2 -Rezeptoren jedoch war weder eine cAMP-Erniedrigung noch Erhöhung ersichtlich (Kapitel 3, Abbildung 2 A–F). Dabei ist bekannt, dass D_1 -Rezeptoren G_s -gekoppelt und D_2 -Rezeptoren G_i -gekoppelt sind (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Missale et al., 1998). Im folgenden Abschnitt wird auf die G_s -gekoppelten

D₁-Rezeptoren näher eingegangen. Alle im Rahmen dieser Studie untersuchten G_i-gekoppelten Rezeptoren (α_2 -, D₂- und A₁-Rezeptoren) werden gesammelt in Kapitel 5.6 aufgegriffen.

Obwohl mittels Agonisten-Einsatz lediglich über D₁-Rezeptoren induzierte cAMP-Signale nachgewiesen werden konnten, führte der Einsatz des D₁-Rezeptor Antagonisten SCH 23390 nicht in allen Astrozyten zu einer kompletten Blockade des Dopamin-induzierten Signals. In 29 % der Zellen verblieb ein cAMP-Signal. Spätere Experimente mit dem β -Rezeptor-Antagonisten ICI 118,551 zeigten eine Reduktion der Amplitude der dopaminergen cAMP-Signale um ca. ein Drittel der Amplitudenhöhe der Kontrolle (Kapitel 3, Ergänzungsabbildung 3). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Dopamin und NE, die sich lediglich um eine Hydroxy-Gruppe unterscheiden, konnte bereits gezeigt werden, dass Dopamin auch adrenerge Rezeptoren aktivieren kann (Lei, 2014). Für zukünftige Experimente empfiehlt es sich, den D₁-Rezeptor Antagonisten SCH 23390 mit dem β -Rezeptor-Antagonisten ICI 118,551 zu kombinieren, um die komplette Blockade des Dopamin-induzierten Signals über D₁- und β -Rezeptoren gesichert nachzuweisen. Vor dem Hintergrund unserer experimentellen Ergebnisse, die eine cAMP-Signalvermittlung über α -Rezeptoren belegen (Kapitel 2), ist nicht auszuschließen, dass auch Dopamin eine Aktivierung von α -Rezeptoren bewirkt hat.

Eine selektive Blockade der Freisetzung der Neurotransmitter GABA und Dopamin durch Lyons-Warren et al. (2023) ergab, dass der Verlust von GABA oder Dopamin die Spontanaktivität von MCs erhöhen. Sie zeigten, dass die Kotransmission von GABA und Dopamin benötigt werden, um die Aktivität der MCs so zu regulieren, dass die Geruchserkennung und -unterscheidung optimal verläuft, indem weniger Glomeruli aktiviert werden (Lyons-Warren et al., 2023). Im präfrontalen Kortex konnte durch Petrelli et al. (2020) gezeigt werden, dass Astrozyten die Dopamin-Homöostase beeinflussen können. Sie besitzen zwar keine TH und können Dopamin daher nicht synthetisieren, können es dafür aber über den OCT3 und den für die dort lokalisierten Astrozyten nachgewiesenen VMAT2 transportieren und über die MAO-B abbauen (Petrelli et al., 2020). Astrozyten in der GL können also über die Regulation der extrazellulären Dopamin-Konzentration Einfluss auf den Grad der Hemmung der MCs und somit der Geruchserkennung und -differenzierung nehmen.

5.5 Adenosinerge cAMP-Signale werden über A_{2A}-Rezeptoren vermittelt und unterscheiden sich nicht im EAE-Modell

Im OB kann ATP aus verschiedenen Quellen stammen. Die elektrische Stimulation der ORNs führt zur Freisetzung von ATP und Glutamat (Thyssen et al., 2010). Astrozyten setzen über Connexin 43-Hemikanäle ebenfalls ATP als Antwort auf spontane MC-Aktivität frei (Roux et al., 2015). Ektonukleotidasen führen dann extrazellulär zum Abbau des ATPs zu Adenosin. Bei den Adenosinrezeptoren werden die G_{i/o}-gekoppelten A₁- und A₃-Rezeptoren sowie die G_s-gekoppelten A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptoren unterschieden (Abbraccio et al., 2009). Unsere Ergebnisse zeigen, dass Astrozyten sowohl auf die Applikation von ATP, als auch von Adenosin über den A_{2A}-Rezeptor mit cAMP-Signalen reagierten (Abbildung 4).

Es ist bereits bekannt, dass die Stimulation von ORNs zur Kotransmission von Glutamat und ATP führt (Thyssen et al., 2010). Durch eine elektrische Stimulation der Axone in der ONL des OB initiierten wir eine synaptische Freisetzung von ATP. Dass es sich bei dem freigesetzten Neurotransmitter um ATP handelte, wiesen wir mittels GRAB_{ATP1.0} auf den Astrozyten nach. Die elektrische Stimulation löste ebenfalls astrozytäre cAMP-Signale über A_{2A}-Rezeptoren aus. Adenosinerge A_{2A} und A_{2B}-Rezeptoren sind G_s-gekoppelt (Abbraccio et al., 2009). Unter den bislang bekannten P2Y-Rezeptoren gibt es keine bekannten G_s-gekoppelten Rezeptoren. P2Y_{1,2,4,6,11} sind G_{q/11}-gekoppelt und P2Y_{12,13,14} G_{i/o}-gekoppelt (Abbraccio et al., 2009). Es war daher zu erwarten, dass positive cAMP-Signale durch G_s-gekoppelte Adenosinrezeptoren wie A_{2A}- oder A_{2B}-Rezeptoren vermittelt werden, nachdem Adenosin appliziert wurde bzw. das ATP extrazellulär mittels Ektonukleotidasen zu Adenosin abgebaut worden ist. Unsere Experimente zeigten, dass die Adenosin-induzierten cAMP-Signale mit dem A_{2A}-Rezeptor spezifischen Antagonisten ZM 241385 (Poucher et al., 1995) in den meisten Zellen komplett blockiert wurden und nur in wenigen Zellen ein höchst signifikant kleineres Signal auftrat. Dies zeigte sich ebenfalls bei den Stimulations-Experimenten. Der mögliche Einfluss von A_{2B}-Rezeptoren auf das Adenosin-induzierte cAMP-Signal kann daher nicht ausgeschlossen werden. In weiteren Experimenten wäre es interessant gewesen, den Abbau von ATP durch Ektonukleotidase-Hemmer wie beispielsweise ARL 67156, der die Hydrolyse von ATP verhindert, zu umgehen (Levesque et al., 2007). Dies könnte den endgültigen Beweis liefern, dass zwar ATP freigesetzt wird, aber nur das Adenosin, das durch Ektonukleotidase-Aktivität daraus entsteht, ein cAMP-Signal in den Astrozyten auslöst.

Die adenosinergen A_{2A}-Rezeptoren werden von geringeren Adenosin-Konzentrationen (im nanomolaren Bereich) aktiviert, während A_{2B}-Rezeptoren höhere Adenosin-Konzentrationen (im mikromolaren Bereich) für ihre Aktivierung benötigen (De Filippo et al., 2020). Die von uns verwendeten Konzentrationen von 30 µM Adenosin bzw. 30 µM ATP besaßen Konzentrationen, die beide Rezeptorsubtypen aktivieren sollten. Extrazelluläres Adenosin wird entweder in umliegende Zellen per Transporter aufgenommen und dort zu AMP phosphoryliert oder mittels Adenosin-Deaminase zu Inosin abgebaut (Garcia-Gil et al., 2021). Die Adenosinkonzentration an den Rezeptoren wird also deutlich geringer als die per Badperfusion applizierte gewesen sein. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sie ausreichend wäre, um sowohl A_{2A}- als auch A_{2B}-Rezeptoren zu aktivieren. Die Anwendung des A_{2A}-Rezeptor Agonisten PSB0777 bestätigte das Vorhandensein jener Rezeptoren. Das durch PSB0777 induzierte cAMP-Signal ließ sich ebenfalls durch den Einsatz des spezifischen Antagonisten blockieren. *In-situ*-Hybridisierungsdaten zeigen eine starke Expression von A_{2A}-Rezeptoren in allen Schichten des OB (Rotermund et al., 2018). Für die Expression der A_{2B}-Rezeptoren im OB liegen aktuell leider keine Studien vor.

ATP und Adenosin stellen wichtige endogene Signalmoleküle bei Immunantworten und in entzündlichen Prozessen dar (Bours et al., 2006). Ihre Rezeptoren werden ebenfalls auf den verschiedenen Immunzellen exprimiert (Bours et al., 2006). Das Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) ist ein etabliertes Modell zur Untersuchung der multiplen Sklerose (MS). MS ist eine entzündlich-demyelinisierende Erkrankung beim Menschen (Constantinescu et al., 2011). EAE ist gekennzeichnet durch Inflammation, Demyelinisierung, Axonverlust und Gliose, ausgelöst durch den Eintritt reaktiver T-Lymphozyten in das ZNS (Constantinescu et al., 2011).

In einer Studie von Stekic et al. (2024) in Ratten konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer Hochregulierung der Expression der A₁-Rezeptoren in MCs und TCs im OB im EAE-Modell kam. Zudem kam es zu einer Überexpression vom ATP-abbauenden Enzym CD73 sowie A_{2B}-, A₃- und P2X₄-Rezeptoren in den Mikroglia-Zellen des OB (Stekic et al., 2024). Diese Überexpression CD73 würde im Umkehrschluss zu einer sehr hohen extrazellulären Adenosin-Konzentration durch den schnellen ATP-Abbau führen. Weiterhin konnten in Verhaltenstests eine Verschlechterung der olfaktorischen Wahrnehmung sowie ängstliches Verhalten der an EAE-erkrankten Versuchstiere gezeigt werden (Stekic et al., 2024). Schubert et al. (2025) zeigten

ebenfalls olfaktorische Defizite der an EAE-erkrankten Mäuse und zwar bereits in frühen Krankheitsstadien. Weiterhin zeigten sie in ihrer Studie die Degeneration von sACs sowie MCs und TCs im Zuge der EAE-Erkrankung. Bei MCs konnten sie zudem mittels Zelltranskriptom-Sequenzierung eine Hochregulierung bestimmter K^+ -Kanäle unter EAE-Bedingungen nachweisen und diese veränderte K^+ -Leitfähigkeit experimentell bestätigen (Schubert et al., 2025).

Wir untersuchten, ob es eine Veränderung der cAMP-Signale, die über die A_{2A} -Rezeptoren in der GL im OB ausgelöst wurden, im EAE-Modell gab. Die induzierten cAMP-Signale unterschieden sich zwischen gesunden und an EAE leidenden Tieren nicht. Obwohl wir experimentell keine Änderung an den Signalamplituden feststellen konnten, wäre es jedoch möglich, dass im EAE-Modell weitere Veränderungen der adenosinergen Signalübertragung stattgefunden haben, die von unseren Experimenten nicht detektiert wurden. Zum einen wurden nur Astrozyten untersucht, zum anderen konnten wir experimentell über die Aktivierung der A_1 -Rezeptoren keine intrazelluläre Änderung der cAMP-Konzentration und somit der AC-Aktivität nachweisen. Eine mögliche Hochregulation der A_1 -Rezeptoren in den Astrozyten wie sie von Stekic et al. (2024) im EAE Modell in MCs und TCs nachgewiesen wurde, konnten wir somit nicht zeigen.

Im nächsten Kapitel wird insbesondere auf alle in dieser Arbeit untersuchten G_i -gekoppelten Rezeptoren wie die A_1 -Rezeptoren eingegangen.

5.6 Kontextabhängige Hemmung der Adenylatzyklasen-Aktivität

Unsere Experimente zeigten, dass ausgehend vom Ruhezustand der astrozytären AC-Aktivität weder nach der Aktivierung der $G_{i/o}$ -gekoppelten A_1 - (Kapitel 4, Abbildung 3 C), D_2 - (Kapitel 3, Abbildung 2 E & F) noch α_2 -Rezeptoren (Kapitel 2, Abbildung 2 H) eine Hemmung der AC-Aktivität und somit ein Absinken der cAMP-Konzentration beobachtet werden konnte. Die einzelnen Applikationen der beiden verschiedenen A_1 -Rezeptor Agonisten N^6 -CPA und MeCCPA und die des D_2 -Rezeptor Agonisten Quinpirol in zwei verschiedenen Konzentrationen (1 μ M und 20 μ M) konnten weder im Ruhezustand der Astrozyten eine cAMP-Veränderung auslösen, noch nach Aktivierung der ACs mit Forskolin. Für die Aktivierung der ACs wurde

Forskolin per Badapplikation appliziert, bis ein stetiges cAMP-Signal erreicht wurde. Daraufhin wurde der jeweilige Agonist gemeinsam mit Forskolin appliziert. Der α_2 -Rezeptor-Agonist Xylazin hingegen führte im astrozytären Ruhezustand zu einer Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration und nach einer Aktivierung der ACs mit Forskolin zu einer Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Hemmung der ACs (Kapitel 2, Abbildung 2 H–K).

Es ist bekannt, dass alle membranständigen ACs über G_s stimuliert werden können, jedoch nur die ACs 1, 3, 5, 6, und 8 über G_i inhibiert werden. Weiterhin kann Forskolin alle membranständigen ACs bis auf die AC 9 aktivieren (Chen et al., 2022). Da die untersuchten Astrozyten in allen drei Einzelstudien in derselben Messregion im murinen OB lagen, ist jedoch von einer ähnlichen konstitutionellen AC-Zusammensetzung auszugehen. In weiteren Experimenten könnte in denselben Astrozyten untersucht werden wie diese auf die Applikation von Agonisten für die G_i -gekoppelten Rezeptoren ohne und mit Forskolin-Einsatz reagieren, um sicher zu gehen, dass dieselben Astrozyten mit denselben ACs unterschiedlich auf die Aktivierung der verschiedenen G_i -gekoppelten Rezeptorwege reagieren.

Es wäre jedoch von großer Bedeutung, die Expression von D_2 - und A_1 -Rezeptoren in den Astrozyten der GL des adulten, murinen OB nachzuweisen. In den Experimenten von Fischer et al. (2020) wurden Ca^{2+} -Signale, die über D_2 -Rezeptoren vermittelt wurden, nachgewiesen. In dieser Studie wurden jedoch juvenile Mäuse bis P21 verwendet, während in unseren hier behandelten drei Studien akute Hirnschnitte von adulten Mäusen ab dem Alter von frühestens neun Wochen Verwendung fanden. Möglicherweise könnten die dopaminergen D_2 -Rezeptoren im Laufe der Entwicklung herunterreguliert werden. Dies wurde durch Rani and Kanungo (2006) für 20 Wochen alte Mäuse im Vergleich zu 15 bzw. 45 Tage alten Mäusen für den zerebralen Kortex und die Kleinhirnrinde gezeigt.

Weiterhin ist durch eine Studie von Chun et al. (2013) bereits bekannt, dass Dopaminrezeptoren auch D_1 - D_2 -Heterooligomere bilden, deren Aktivierung über den PLC/IP₃-Weg intrazelluläre Ca^{2+} -Signale auslöst. Dies würde ebenfalls erklären, warum keine AC-hemmende Aktivität nach der Aktivierung von D_2 -Rezeptoren gezeigt werden konnte, wenn diese als Heterooligomere vorlagen und somit nicht $G_{i/o}$ -gekoppelt waren. Obwohl über die Aktivierung der D_2 -Rezeptoren nachweislich intrazelluläres Ca^{2+} über den PLC/IP₃-Weg

freigesetzt wird (Fischer et al., 2020) und wir für die adrenergen α_1 -Rezeptoren aufzeigen konnten, dass das intrazellulär freigesetzte Ca^{2+} die Ca^{2+} -sensitiven AC-Isoformen aktiviert und dadurch cAMP-Signale auslöst, konnten wir auch keine Stimulation der ACs über die Aktivierung der D_2 -Rezeptoren erwirken. Dies könnte bekräftigen, dass keine D_2 -Rezeptoren vorhanden waren oder aber bedeuten, dass in den Astrozyten, die D_2 -Rezeptoren exprimieren, keine Ca^{2+} -sensitiven ACs oder nur die weniger Ca^{2+} -sensitive AC3 exprimiert wird.

Durch Rotermund et al. (2018) ist mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen, dass A_1 -Rezeptoren in der GL des OB in Mäusen exprimiert werden. Insgesamt ist die Expression in der GL aber deutlich schwächer als die der A_{2A} -Rezeptoren. Zudem gibt es keinen Zelltyp-spezifischen Nachweis für die Expression der A_1 -Rezeptoren in Astrozyten in der GL (Rotermund et al., 2018). Expressionsdaten von *Adora1*, das für die A_1 -Rezeptoren kodiert, zeigen, dass Astrozyten im Kortex A_1 -Rezeptoren exprimieren (Hackett, 2018). Astrozyten des OB waren allerdings nicht Untersuchungsbestandteil dieser Studie, sodass hierzu keine Daten vorliegen. Astrozyten können ebenfalls die $\text{G}_{i/o}$ -gekoppelten A_3 -Rezeptoren exprimieren (Abbracchio et al., 1998). Eine mögliche Expression von A_3 -Rezeptoren in den Astrozyten der GL und der dadurch vermittelten Hemmung der ACs wurde von uns nicht experimentell geprüft.

Der α_2 -Rezeptor-Agonist Xylazin zeigte ein interessantes experimentelles Verhalten: Die Applikation im astrozytären Ruhezustand führte zu einer Aktivierung der ACs und einem positivem cAMP-Signal, während die ACs nach vorheriger Aktivierung mittels Forskolin gehemmt wurden. Fischer et al. (2021) konnte bereits zeigen, dass in den Astrozyten der GL über den PLC/ IP_3 -Weg vermittelte Ca^{2+} -Signale auch über α_2 -Rezeptoren induziert werden konnten. Wie in den Ergebnissen in Kapitel 2 bereits für α_1 -Rezeptoren gezeigt, kann die erhöhte interne Ca^{2+} -Konzentration Ca^{2+} -sensitive AC-Isoformen aktivieren und somit zu einem positiven cAMP-Signal führen. Nach Aktivierung der ACs via Forskolin beobachteten wir eine Reduktion der cAMP-Konzentration und somit eine Hemmung der AC-Aktivität nach der Applikation von Xylazin. Dies deutet darauf hin, dass die über den α_2 -Rezeptor induzierte G_i -vermittelte Hemmung der ACs ein aktiviertes Ausgangsniveau erfordert, um detektierbar zu sein. Übereinstimmend mit unserer Beobachtung konnten Cotecchia et al. (1990) in Zellkultur ebenfalls eine Hemmung der AC-Aktivität über α_2 -Rezeptoren nach Aktivierung der ACs mit

Forskolin zeigen. Pirnat et al. (2021) berichteten, dass die cAMP-Konzentration in kultivierten Astrozyten aus verschiedenen Kulturen im Gegensatz zur Ca^{2+} -Konzentration relativ konstant ist und im Ruhezustand ungefähr $0,6 \mu\text{M}$ beträgt. Eine Stimulation mit $100 \mu\text{M}$ NE führte dabei in allen untersuchten Astrozytenkulturen zu einem vergleichbaren Amplitudenanstieg (Pirnat et al., 2021). Dagegen stellten Vardjan et al. (2016) zuvor fest, dass Astrozyten aus primärer Zellkultur aus dem Kortex eine cAMP-Basalkonzentration von $4 \mu\text{M}$ mit einer Spanne von $1\text{--}10 \mu\text{M}$ aufwiesen. Odaka et al. (2014) zeigten in ihrer Charakterisierung des Flamingo2-Sensors, dass schon geringe cAMP-Konzentrationen von ca. $0,3 \mu\text{M}$ ausgehend von einem niedrigen cAMP-Basallevel mit einem Signalverlust von ca. 10% visualisiert werden können. Der Sensor ist also in der Lage bereits eine Reduktion geringer cAMP-Konzentrationen abzubilden.

Unsere Ergebnisse zeigen insgesamt, dass die G_i -gekoppelten Rezeptoren in der GL des OB kontextabhängig auf die AC-Aktivität und somit die cAMP-Konzentration einwirken. Insbesondere die duale Wirkung der α_2 -Rezeptor Aktivierung zeigt deutlich, dass die cAMP-Antwort vom AC-Aktivierungszustand und der intrazellulären Konzentration sowie der zellulären Ausstattung an AC-Isoformen abhängig ist.

5.7 Mögliche Auswirkungen der cAMP-Modulation auf die Funktion des olfaktorischen Bulbus

Mithilfe unserer Experimente konnte gezeigt werden, dass NE, Dopamin und Adenosin die cAMP-Konzentration in Astrozyten der GL im OB durch Aktivierung der ACs erhöhen können. Dabei werden die ACs über die Aktivierung der G_s -Proteine über β -Rezeptoren sowie D_1 - und A_{2A} -Rezeptoren direkt und über α_1 - und α_2 -Rezeptoren indirekt über das intrazellulär freigesetzte Ca^{2+} stimuliert.

Astrozyten spielen eine aktive Rolle bei der Prozessierung von Gerüchen. Sie modulieren sowohl die Detektion als auch die Diskriminierung verschiedener Gerüche abhängig von ihrer intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Ung et al., 2020). Weiterhin fungieren sie als wichtige Effektoren in neuromodulatorischen Netzwerken. Im murinen *Hippocampus* induziert NE durch die Aktivierung astrozytärer α_{1A} -Rezeptoren eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung, die wiederum zur ATP-Freisetzung durch die Astrozyten führt, welches extrazellulär zu Adenosin

metabolisiert wird und dann an präsynaptischen A_1 -Rezeptoren bindet und die Neurotransmitterfreisetzung behindert (Lefton et al., 2025). Dieser Mechanismus ist sowohl im murinen *Hippocampus* nachgewiesen worden (Lefton et al., 2025) als auch in Zebrafischlarven (Chen et al., 2025), wo das Adenosin allerdings an A_{2B} -Rezeptoren bindet und das Schwimmverhalten der Larven beeinflusst. Im präfrontalen Kortex zeigten Pittolo et al. (2022) die Aktivierung von Astrozyten mittels Dopamin über α_1 -Rezeptoren. Die hierdurch gezeigte intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung führte ebenfalls zur Ausschüttung von ATP (Pittolo et al., 2022).

Bei den oben beschriebenen Mechanismen ist Ca^{2+} als wichtiger Botenstoff an der Gliotransmitterfreisetzung beteiligt. Welche Rolle nun die Erhöhung der cAMP-Konzentration im OB spielen könnte, ist aktueller Gegenstand der Forschung. Die Rolle von cAMP als Botenstoff in Astrozyten des *Hippocampus* kann synaptische Plastizität induzieren und damit das Gedächtnis modulieren (Zhou et al., 2021). Bei synaptischer Plastizität handelt es sich um eine aktivitätsabhängige Veränderung der Stärke einer neuronalen Verbindung (Magee & Grienberger, 2020). Zhou et al. (2021) wiesen *in vivo* nach, dass Astrozyten, deren cAMP-Produktion mittels optogenetischer Techniken angeregt wurde, das Gedächtnis modulierten. Dabei förderte der cAMP-Anstieg vor der Gedächtnisbildung die Lernleistung, jener während der Gedächtnisbildung beeinträchtigte jedoch die Gedächtnisretention (Zhou et al., 2021).

Bisher wurden β -Rezeptoren als die wichtigsten Rezeptoren für die Regulation der intrazellulären cAMP-Konzentrationen in Astrozyten angesehen (Zhou et al., 2019). Durch unsere Experimente wurde nun gezeigt, dass über α -Rezeptoren ebenfalls cAMP-Signale ausgelöst werden können. Die Amplituden dieser Signale fielen zwar geringer aus als die über β -Rezeptoren induzierten cAMP-Signale, dafür besitzen α_2 - und α_1 -Rezeptoren eine größere Sensitivität gegenüber NE und werden daher schon bei geringeren Konzentrationen aktiviert (Ramos & Arnsten, 2007). Der OB wird stark von Projektionen des LC innerviert, die sich bis in die GL erstrecken (Eckmeier & Shea, 2014; Fischer et al., 2021; McLean et al., 1989; Shipley et al., 1985). Für den präfrontalen Kortex wurde bereits gezeigt, dass die Stimulation der Neurone des LC nicht nur zur Ausschüttung von NE, sondern ebenfalls zur Ausschüttung von Dopamin führten (Devoto et al., 2005). Weiterhin wird Dopamin auch von den dopaminergen Neuronen der Gruppe A16 im OB freigesetzt (Bjorklund & Dunnett, 2007). Die sACs und eine Subpopulation von etwa 20 % der PGCs in der GL schütten nicht nur GABA sondern auch

Dopamin aus (Halász et al., 1981; Maher & Westbrook, 2008; Vaaga et al., 2017). Das hier freigesetzte Dopamin wäre ebenfalls in der Lage, die dopaminergen und adrenergen Rezeptoren der umliegenden Astrozyten zu aktivieren (Lei, 2014).

Wenn nun die Katecholamine NE und Dopamin gleichzeitig in der GL im OB ausgeschüttet würden, so aktivieren sie sowohl dopaminerge als auch adrenerge Rezeptoren (Lei, 2014). Die Aktivierung der drei adrenergen sowie der dopaminergen D₁-Rezeptoren ruft einen starken Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in den Astrozyten hervor. Dabei ist es experimentell herausfordernd, die Signalkaskade der cAMP-Signale, die über die Aktivierung der α_1 -Rezeptoren erfolgt, zu untersuchen. Diesen geht immer ein Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration voraus. Obwohl bisher nicht genauer untersucht, wird dies bei der Aktivierung der α_2 -Rezeptoren wahrscheinlich ebenfalls der Fall sein. Im Folgenden werden mögliche Auswirkungen des intrazellulären cAMP-Anstiegs betrachtet.

Guttenplan et al. (2025) wiesen in *Drosophila melanogaster* als Reaktion auf NE in Astrozyten das so genannte „Gating“ nach: Als Reaktion auf das NE-Homologon Tyramin, reagierten die Astrozyten nachfolgend auch auf die weiteren Neurotransmitter Dopamin, Glutamat und Acetylcholin, auf die sie zuvor keine Reaktion zeigten. Dieser Mechanismus ist an die AC-hemmende G_i-Signalkaskade über α_2 -Rezeptoren gekoppelt und in der Tierwelt konserviert. Er wurde von ihnen ebenfalls in kultivierten Astrozyten von Ratten nachgewiesen (Guttenplan et al., 2025). Durch diesen Mechanismus könnten die Astrozyten der GL als Folge auf die Aktivierung der α_2 -Rezeptoren durch NE auch auf die Applikation von Dopamin mit stärkeren cAMP-Signalen reagieren. Eine stärkere Reaktion auf Glutamat und Acetylcholin würde zu einer erhöhten Ca²⁺-Konzentration führen, die je nach zellulärer AC-Isoformausrüstung voraussichtlich zu einem intrazellulären Anstieg der cAMP-Konzentration führt (Takata et al., 2011; Verkhatsky & Nedergaard, 2018). Der starke Anstieg intrazellulären cAMPs ist mit verschiedenen potenziellen Effekten verbunden: Zum einen auf die Genexpression (Paco et al., 2016; Schlag et al., 1998), zum anderen auf die neurovaskuläre Kopplung (Vittani et al., 2025) oder über eine extrazelluläre Ausschüttung des cAMPs mit möglicherweise Wirkung auf umliegende Zellen (Rosenberg & Dichter, 1989; Sayner et al., 2019).

Bereits 1998 wurde durch Schlag et al. (1998) in kultivierten Astrozyten nachgewiesen, dass cAMP-Analoga zu einer höheren Expressionsrate der Glutamat-Transporter GLT-1, GLAST,

EAAC1 und EAAT4 führte. In kultivierten Astrozyten wurde von Paco et al. (2016) nachgewiesen, dass die cAMP-induzierte Genregulation die Reifung von Astrozyten fördert. Sie untersuchten die Regulation einzelner Gene und stellten fest, dass ca. ein Viertel der hochregulierten Gene für den Zellmetabolismus und ca. ein weiteres Viertel für die Expression verschiedener Transporter kodieren. Dabei handelt es sich insbesondere um Transporter für Neurotransmitter wie Glutamat, Glycin und Katecholamine (Paco et al., 2016). Eine höhere Expressionsrate von Transportern in Astrozyten der GL im OB könnte dazu führen, dass das von den ORNs ausgeschüttete Glutamat schneller aus dem synaptischen Spalt aufgenommen werden kann. Dies würde die Dauer der postsynaptischen Aktivierung von MCs und TCs zeitlich begrenzen.

Die Aufnahme von Glutamat durch Astrozyten hat weiterhin Einfluss auf die neurovaskuläre Kopplung und führt unabhängig von Ca^{2+} zur Vasodilatation wie von Petzold et al. (2008) *in vivo* in Kapillaren der GL von Mäusen gezeigt. Astrozyten reagieren unter anderem auf neuronale Aktivität, indem sie vasodilatatorische Substanzen freisetzen, die den lokalen Blutfluss erhöhen (Lia et al., 2023). Kürzlich zeigten Vittani et al. (2025), dass eine Erhöhung der cAMP-Konzentration in Astrozyten unabhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine Vasodilatation der Blutkapillaren auslöst. In dieser *in vivo* Studie in Mäusen wurde mithilfe optogenetischer Techniken die gezielte cAMP-Produktion in Astrozyten mit einer AAV-vermittelten bPAC-Expression durch Licht stimuliert. Arteriolen wurden mit Alb-Scarlett markiert und die Veränderungen der Arteriolendurchmesser nach bPAC-Stimulation quantifiziert (Vittani et al., 2025). Die Erhöhung des lokalen Blutflusses sorgt für eine bessere Energieversorgung der Neurone über das ANLS der Astrozyten und ebenfalls der Astrozyten selbst (Magistretti & Pellerin, 1996; Mason, 2017). Insgesamt steht dadurch mehr ATP für Prozesse wie den astrozytären Glutamat-Glutamin-Zyklus sowie die Aufnahme von extrazellulärem K^+ durch die Astrozyten zur Verfügung, was den Neuronen ermöglicht, länger hochfrequent zu feuern (Hertz, 1965; Hertz & Zielke, 2004; Walz, 2000). Durch all diese Prozesse könnte sich die Signalübertragung von ORNs und MCs sowie TCs deutlich verbessern.

Der starke Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in den Astrozyten könnte auch zum Ausschütten von cAMP in den Extrazellulärraum führen, wie es bereits von Rosenberg and Dichter (1989) in kultivierten kortikalen Astrozyten von Ratten gezeigt wurde. Im peripheren Nervensystem wurde die Freisetzung von cAMP in extrazellulären Vesikeln von Endothelzellen

der Lungengefäße beschrieben (Sayner et al., 2019). Durch extrazelluläre Phosphodiesterasen wird das cAMP dann zunächst zu AMP und dann zu Adenosin abgebaut (Rosenberg & Dichter, 1989). Das extrazelluläre cAMP könnte die adenosinergen A₁-Rezeptoren der MCs aktivieren. Dies würde zu einer Hyperpolarisation der MCs durch die Aktivierung von Hintergrund-K⁺-Kanälen aus der Familie der Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle (K2P-Kanäle) führen (Rotermund et al., 2018). Die Hyperpolarisation mündet schlussendlich in einem besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis, indem die neuronale Spontanaktivität herabgesetzt wird, während die induzierte neuronale Aktivierung gleichbleibend ist (Rotermund et al., 2018). Die möglicherweise von cAMP induzierten Prozesse sind in der Abbildung 6 schematisch zusammengefasst.

Perspektivisch wäre es interessant, *in vivo* den LC zu stimulieren und sich die Auswirkungen der Stimulation in der GL anzuschauen. Hierbei sind insbesondere die Wirkungsweisen des freigesetzten NEs und Dopamins sowie ihre Wirkung auf Astrozyten und Neurone in den Glomeruli von Interesse.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die beiden sekundären Botenstoffe Ca²⁺ und cAMP miteinander agieren und dass die Aktivierung von G_q-gekoppelten Rezeptoren ebenfalls cAMP-Signale auslösen kann. Damit wird die Grundlage geschaffen, den *Crosstalk* zwischen den beiden Signalwegen in zukünftigen Studien vertieft zu untersuchen.

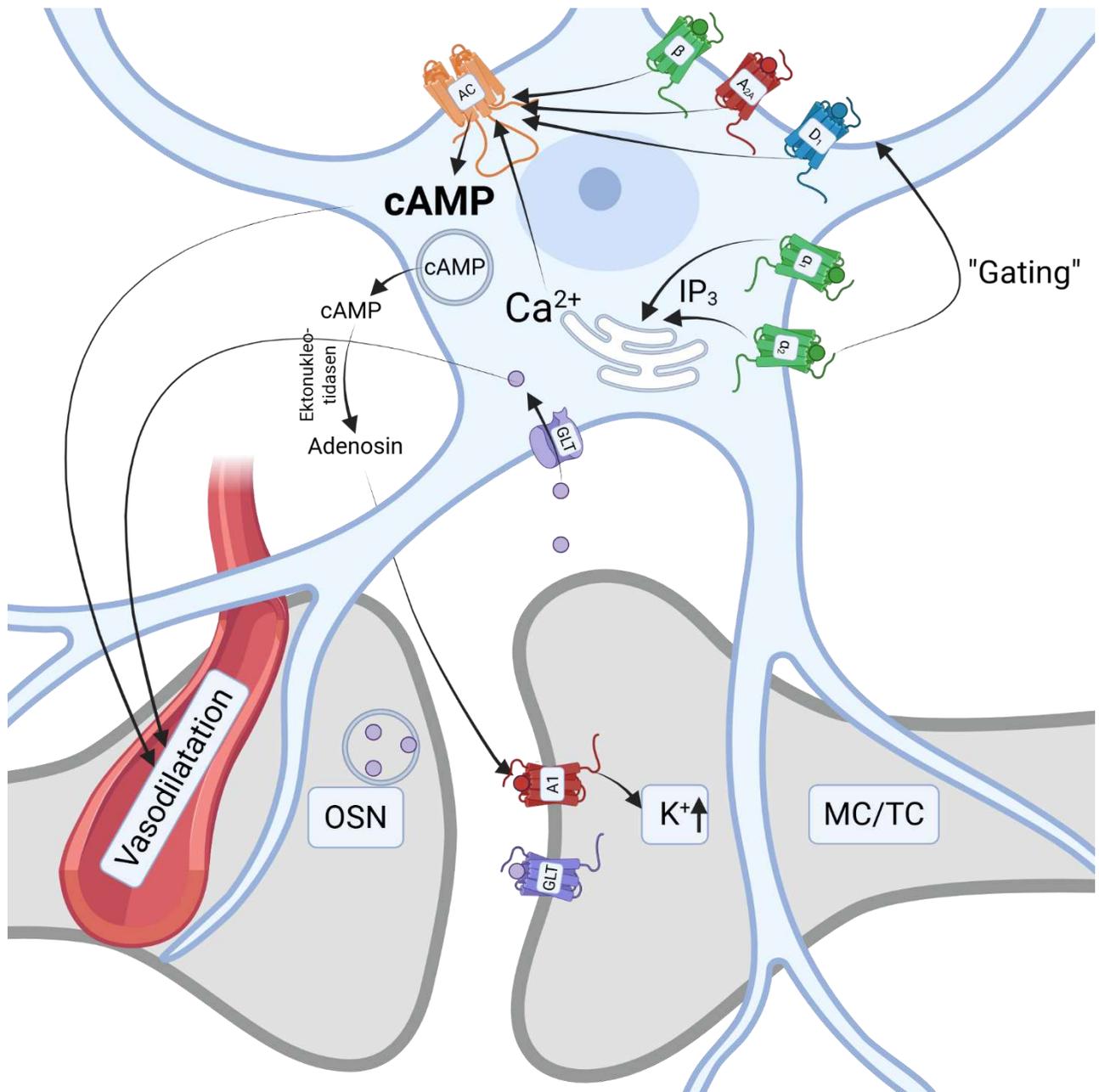


Abbildung 6: Schematische Darstellung möglicher Auswirkungen der Aktivierung katecholaminerger und adenosinergischer Rezeptoren in Astrozyten der Glomerularschicht des olfaktorischen Bulbus

Die Aktivierung der G_s -gekoppelten adrenergen (grün) β -, dopaminergen (blau) D_1 - und adenosinergen (rot) A_{2A} -Rezeptoren in Astrozyten führt zur Aktivierung der Adenylatzyklen (ACs) und somit zu einem intrazellulären cAMP-Anstieg. Die Aktivierung von α_2 -Rezeptoren bedingt das so genannte „Gating“ wodurch die anderen Rezeptoren sensitiver gegenüber ihrer Aktivierung werden. Zudem führt die Aktivierung der adrenergen α_1 - und α_2 -Rezeptoren über den intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom zu einer Aktivierung Ca^{2+} -sensitiver ACs und trägt somit zum intrazellulären cAMP-Anstieg bei. Dieses könnte direkt eine Vasodilatation bedingen oder indirekt über die Aufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt zwischen olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORNs) und Mitral- und Tufted-Zellen (MCs und TCs). Durch hohe intrazelluläre astrozytäre cAMP-Level wird die Expression von Glutamattransportern verstärkt und somit auch die Glutamataufnahme aus dem synaptischen Spalt. Weiterhin kann das cAMP vesikulär ausgeschüttet und dort durch Ektonucleotidasen zu Adenosin abgebaut werden. Dieses könnte dann über A_1 -Rezeptoren an MCs und TCs wirken und durch einen verstärkten K^+ -Einstrom das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessern.

6. Literaturverzeichnis

- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., & Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci*, 32(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001>
- Abbracchio, M. P., Ceruti, S., Brambilla, R., Barbieri, D., Camurri, A., Franceschi, C., Giammarioli, A. M., Jacobson, K. A., Cattabeni, F., & Malorni, W. (1998). Adenosine A3 receptors and viability of astrocytes. *Drug Development Research*, 45(3-4), 379–386. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2299\(199811/12\)45:3/4<379::Aid-ddr38>3.0.Co;2-y](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2299(199811/12)45:3/4<379::Aid-ddr38>3.0.Co;2-y)
- Ahlquist, R. P. (1948). A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*, 153(3), 586–600. <https://doi.org/doi:10.1152/ajplegacy.1948.153.3.586>
- Ahmadpour, N., Kantroo, M., & Stobart, J. L. (2021). Extracellular Calcium Influx Pathways in Astrocyte Calcium Microdomain Physiology. *Biomolecules*, 11(10), 1467. <https://doi.org/10.3390/biom11101467>
- Antunes, G., & Simoes de Souza, F. M. (2016). Olfactory receptor signaling. *Methods Cell Biol*, 132, 127–145. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.11.003>
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences*, 22(5), 208–215. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01349-6).
- Bagur, R., & Hajnoczky, G. (2017). Intracellular Ca(2+) Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol Cell*, 66(6), 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.028>
- Bai, Y., Zhou, Z., Han, B., Xiang, X., Huang, W., & Yao, H. (2024). Revisiting astrocytic calcium signaling in the brain. *Fundam Res*, 4(6), 1365–1374. <https://doi.org/10.1016/j.fmre.2023.11.021>
- Bailey, M. S., Puche, A. C., & Shipley, M. T. (1999). Development of the olfactory bulb: Evidence for glia-neuron interactions in glomerular formation. *The Journal of Comparative Neurology*, 415(4), 423–448. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19991227\)415:4<423::Aid-cne2>3.0.Co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19991227)415:4<423::Aid-cne2>3.0.Co;2-g)
- Bailey, M. S., & Shipley, M. T. (1993). Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *J Comp Neurol*, 328(4), 501–526. <https://doi.org/10.1002/cne.903280405>
- Bazargani, N., & Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat Neurosci*, 19(2), 182–189. <https://doi.org/10.1038/nn.4201>
- Beaulieu, J. M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*, 63(1), 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
- Becker-Krail, D. D., Walker, W. H., 2nd, & Nelson, R. J. (2022). The Ventral Tegmental Area and Nucleus Accumbens as Circadian Oscillators: Implications for Drug Abuse and Substance Use Disorders. *Front Physiol*, 13, 886704. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.886704>

- Beiersdorfer, A., Scheller, A., Kirchhoff, F., & Lohr, C. (2019). Panglial gap junctions between astrocytes and olfactory ensheathing cells mediate transmission of Ca²⁺ transients and neurovascular coupling. *Glia*, 67(7), 1385–1400. <https://doi.org/10.1002/glia.23613>
- Bellot-Saez, A., Kekesi, O., Morley, J. W., & Buskila, Y. (2017). Astrocytic modulation of neuronal excitability through K(+) spatial buffering. *Neurosci Biobehav Rev*, 77, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.03.002>
- Berridge, M. J. (2016). The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol Rev*, 96(4), 1261–1296. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2016>
- Bjorklund, A., & Dunnett, S. B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci*, 30(5), 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.006>
- Blaschko, H. (1942). The activity of l(-)-dopa decarboxylase. *J Physiol*, 101(3), 337–349. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1942.sp003988>
- Bours, M. J., Swennen, E. L., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N., & Dagnelie, P. C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*, 112(2), 358–404. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.013>
- Brand, C. S., Hocker, H. J., Gorfe, A. A., Cavasotto, C. N., & Dessauer, C. W. (2013). Isoform selectivity of adenylyl cyclase inhibitors: characterization of known and novel compounds. *J Pharmacol Exp Ther*, 347(2), 265–275. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208157>
- Brann, J. H., & Firestein, S. J. (2014). A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. *Front Neurosci*, 8, 182. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00182>
- Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2010). Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*, 68(5), 815–834. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.022>
- Bucci, D., Busceti, C. L., Calierno, M. T., Di Pietro, P., Madonna, M., Biagioni, F., Ryskalin, L., Limanaqi, F., Nicoletti, F., & Fornai, F. (2017). Systematic Morphometry of Catecholamine Nuclei in the Brainstem. *Front Neuroanat*, 11, 98. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00098>
- Burnstock, G. (1976). Purinergic receptors. *J Theor Biol*, 62(2), 491–503. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(76\)90133-8](https://doi.org/10.1016/0022-5193(76)90133-8)
- Bylund, D. B., Eikenberg, D. C., Hieble, J. P., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P., Molinoff, P. B., Ruffolo Jr, R. R., & Trendelenburg, U. (1994). International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*, 46(2), 121–136.
- Carlsson, A., Falck, B., & Hillarp, N. A. (1962). Cellular localization of brain monoamines. *Acta physiologica Scandinavica Suppl.*, 56(196), 1–28.
- Chen, A. B., Duque, M., Rymbek, A., Dhanasekar, M., Wang, V. M., Mi, X., Tocquer, L., Narayan, S., Legorreta, E. M., Eddison, M., Yu, G., Wyart, C., Prober, D. A., Engert, F., & Ahrens, M. B. (2025). Norepinephrine changes behavioral state through astroglial purinergic signaling. *Science*, 388(6748), 769–775. <https://doi.org/doi:10.1126/science.adq5233>

- Chen, J., Ding, Q., An, L., & Wang, H. (2022). Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclases as therapeutic targets for psychiatric and neurodevelopmental disorders. *Front Pharmacol*, *13*, 949384. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.949384>
- Chen, X., Meroueh, M., Mazur, G., Rouse, E., Hundal, K. S., Stamatkin, C. W., & Obukhov, A. G. (2018). Phenylephrine, a common cold remedy active ingredient, suppresses uterine contractions through cAMP signalling. *Sci Rep*, *8*(1), 11666. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30094-5>
- Choi, H. B., Gordon, G. R., Zhou, N., Tai, C., Rungta, R. L., Martinez, J., Milner, T. A., Ryu, J. K., McLarnon, J. G., Tresguerres, M., Levin, L. R., Buck, J., & MacVicar, B. A. (2012). Metabolic communication between astrocytes and neurons via bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase. *Neuron*, *75*(6), 1094–1104. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.032>
- Chun, L. S., Free, R. B., Doyle, T. B., Huang, X. P., Rankin, M. L., & Sibley, D. R. (2013). D1-D2 dopamine receptor synergy promotes calcium signaling via multiple mechanisms. *Mol Pharmacol*, *84*(2), 190–200. <https://doi.org/10.1124/mol.113.085175>
- Cigola, E., Volpe, B., Lee, J., Franzen, L., & Baker, H. (1998). Tyrosine hydroxylase expression in primary cultures of olfactory bulb: role of L-type calcium channels. *J Neurosci.*, *18*(19), 7638–7649. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-19-07638.1998>.
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*, *164*(4), 1079–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x>
- Cotecchia, S., Kobilka, B. K., Daniel, K. W., Nolan, R. D., Lapetina, E. Y., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., & Regan, J. W. (1990). Multiple second messenger pathways of alpha-adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(1), 63–69. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)40195-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)40195-6)
- Dahlström, A., & Fuxe, K. (1964). EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta physiologica Scandinavica*, 1–55.
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, *65*(1), 1–105. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(00\)00067-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0301-0082(00)00067-8)
- Day, H. E. W., Campeau, S., Watson, S. J., & Akil, H. (1997). Distribution of α 1a-, α 1b- and α 1d-adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *13*(2), 115–139. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(97\)00042-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-0618(97)00042-2)
- De Filippo, E., Hinz, S., Pellizzari, V., Deganutti, G., El-Tayeb, A., Navarro, G., Franco, R., Moro, S., Schiedel, A. C., & Muller, C. E. (2020). A(2A) and A(2B) adenosine receptors: The extracellular loop 2 determines high (A(2A)) or low affinity (A(2B)) for adenosine. *Biochem Pharmacol*, *172*, 113718. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113718>
- Deitmer, J., Verkhratsky, A., & Lohr, C. (1998). Calcium signalling in glial cells. *Cell Calcium*, *24*(5-6), 405–416. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(98\)90063-x](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(98)90063-x).
- Dessauer, C. W., Watts, V. J., Ostrom, R. S., Conti, M., Dove, S., & Seifert, R. (2017). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. Cl. Structures and Small Molecule Modulators of Mammalian Adenylyl Cyclases. *Pharmacol Rev*, *69*(2), 93–139. <https://doi.org/10.1124/pr.116.013078>

- Devasani, K., & Yao, Y. (2022). Expression and functions of adenylyl cyclases in the CNS. *Fluids Barriers CNS*, 19(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12987-022-00322-2>
- Devoto, P., Flore, G., Saba, P., Fa, M., & Gessa, G. L. (2005). Co-release of noradrenaline and dopamine in the cerebral cortex elicited by single train and repeated train stimulation of the locus coeruleus. *BMC Neurosci*, 6, 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-6-31>
- Didier, A., Carleton, A., Bjaalie, J. G., Vincent, J.-D.-., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J., & Lledo, P.-M. (2001). A dendrodendritic reciprocal synapse provides a recurrent excitatory connection in the olfactory bulb. *PNAS*, 98(11), 6441–6446. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.101126398>
- Doengi, M., Deitmer, J. W., & Lohr, C. (2008). New evidence for purinergic signaling in the olfactory bulb: A2A and P2Y1 receptors mediate intracellular calcium release in astrocytes. *FASEB J*, 22(7), 2368–2378. <https://doi.org/10.1096/fj.07-101782>
- Doengi, M., Hirnet, D., Coulon, P., Pape, H. C., Deitmer, J. W., & Lohr, C. (2009). GABA uptake-dependent Ca(2+) signaling in developing olfactory bulb astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(41), 17570–17575. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0809513106>
- Doucette, J. R. (1984). The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *The Anatomical Record*, 210(2), 385–391. <https://doi.org/10.1002/ar.1092100214>
- Droste, D., Seifert, G., Seddar, L., Jadtke, O., Steinhauser, C., & Lohr, C. (2017). Ca(2+)-permeable AMPA receptors in mouse olfactory bulb astrocytes. *Sci Rep*, 7, 44817. <https://doi.org/10.1038/srep44817>
- Eckmeier, D., & Shea, S. D. (2014). Noradrenergic plasticity of olfactory sensory neuron inputs to the main olfactory bulb. *J Neurosci*, 34(46), 15234–15243. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0551-14.2014>
- Engel, K., Zhou, M., & Wang, J. (2004). Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J Biol Chem*, 279(48), 50042–50049. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407913200>
- Fischer, T., Prey, J., Eschholz, L., Rotermund, N., & Lohr, C. (2021). Norepinephrine-Induced Calcium Signaling and Store-Operated Calcium Entry in Olfactory Bulb Astrocytes. *Front Cell Neurosci*, 15, 639754. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.639754>
- Fischer, T., Rotermund, N., Lohr, C., & Hirnet, D. (2012). P2Y1 receptor activation by photolysis of caged ATP enhances neuronal network activity in the developing olfactory bulb. *Purinergic Signal*, 8(2), 191–198. <https://doi.org/10.1007/s11302-011-9286-z>
- Fischer, T., Scheffler, P., & Lohr, C. (2020). Dopamine-induced calcium signaling in olfactory bulb astrocytes. *Sci Rep*, 10(1), 631. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57462-4>
- Fuller, R. W. (1982). Pharmacology of brain epinephrine neurons. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22, 31–55. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.22.040182.000335>
- Gallego, M., Setien, R., Puebla, L., Boyano-Adanez Mdel, C., Arilla, E., & Casis, O. (2005). alpha1-Adrenoceptors stimulate a Galphas protein and reduce the transient outward K+ current via a

- cAMP/PKA-mediated pathway in the rat heart. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(3), C577–585. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00124.2004>
- Gancedo, J. M. (2013). Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 88(3), 645–668. <https://doi.org/10.1111/brv.12020>
- Garcia-Gil, M., Camici, M., Allegrini, S., Pesì, R., & Tozzi, M. G. (2021). Metabolic Aspects of Adenosine Functions in the Brain. *Front Pharmacol*, 12, 672182. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.672182>
- Gire, D. H., Franks, K. M., Zak, J. D., Tanaka, K. F., Whitesell, J. D., Mulligan, A. A., Hen, R., & Schoppa, N. E. (2012). Mitral cells in the olfactory bulb are mainly excited through a multistep signaling path. *J Neurosci*, 32(9), 2964–2975. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5580-11.2012>
- Gottfried, J. A. (2006). Smell: Central Nervous Processing. In T. Hummel & A. Welge-Lüssen (Eds.), *Taste and Smell: An Update*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-01351-1>
- Guttenplan, K. A., Maxwell, I., Santos, E., Borchardt, L. A., Manzo, E., Abalde-Atristain, L., Kim, R. D., & Freeman, M. R. (2025). GPCR signaling gates astrocyte responsiveness to neurotransmitters and control of neuronal activity. *Science*, 388(6748), 763–768. <https://doi.org/doi:10.1126/science.adq5729>
- Hackett, T. A. (2018). Adenosine A(1) Receptor mRNA Expression by Neurons and Glia in the Auditory Forebrain. *Anat Rec (Hoboken)*, 301(11), 1882–1905. <https://doi.org/10.1002/ar.23907>
- Halassa, M. M., Fellin, T., & Haydon, P. G. (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med*, 13(2), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.12.005>
- Halász, N., Johansson, O., Hökfelt, T., Ljungdahl, Å., & Goldstein, M. (1981). Immunohistochemical identification of two types of dopamine neuron in the rat olfactory bulb as seen by serial sectioning. *J Neurocytol*, 10, 251–259. <https://doi.org/doi.org/10.1007/BF01257970>
- Hayar, A., Karnup, S., Ennis, M., & Shipley, M. T. (2004). External tufted cells: a major excitatory element that coordinates glomerular activity. *J Neurosci*, 24(30), 6676–6685. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1367-04.2004>
- Hertz, L. (1965). Possible Role of Neuroglia: A Potassium-Mediated Neuronal – Neuroglial – Neuronal Impulse Transmission System. *Nature*, 206, 1091–1094. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/2061091a0>
- Hertz, L., & Zielke, H. R. (2004). Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci*, 27(12), 735–743. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.10.008>
- Hieble, J. P., Bylund, D. B., D.E., C., Eikenburg, D. C., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P., & Ruffolo Jr, R. R. (1995). International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacological Reviews*, 47(2), 267–270.
- Hökfelt, T., Everitt, B. J., Theodorsson-Norheim, E., & Goldstein, M. (1984). Occurrence of neurotensinlike immunoreactivity in subpopulations of hypothalamic, mesencephalic, and medullary catecholamine neurons. *J Comp Neurol*, 222(4), 543–559. <https://doi.org/10.1002/cne.902220407>

- Holland, N., Robbins, T. W., & Rowe, J. B. (2021). The role of noradrenaline in cognition and cognitive disorders. *Brain*, *144*(8), 2243–2256. <https://doi.org/10.1093/brain/awab111>
- Holleran, K. M., Rose, J. H., Fordahl, S. C., Benton, K. C., Rohr, K. E., Gasser, P. J., & Jones, S. R. (2020). Organic cation transporter 3 and the dopamine transporter differentially regulate catecholamine uptake in the basolateral amygdala and nucleus accumbens. *The European journal of neuroscience*, *52*(11), 4546–4562. <https://doi.org/doi.org/10.1111/ejn.14927>
- Imamura, F., Ito, A., & LaFever, B. J. (2020). Subpopulations of Projection Neurons in the Olfactory Bulb. *Front Neural Circuits*, *14*, 561822. <https://doi.org/10.3389/fncir.2020.561822>
- Iversen, S. D., & Iversen, L. L. (2007). Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci*, *30*(5), 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.002>
- Jurkowski, M. P., Bettio, L., E, K. W., Patten, A., Yau, S. Y., & Gil-Mohapel, J. (2020). Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. *Front Cell Neurosci*, *14*, 576444. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.576444>
- Kaenmaki, M., Tammimaki, A., Myohanen, T., Pakarinen, K., Amberg, C., Karayiorgou, M., Gogos, J. A., & Mannisto, P. T. (2010). Quantitative role of COMT in dopamine clearance in the prefrontal cortex of freely moving mice. *J Neurochem*, *114*(6), 1745–1755. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06889.x>
- Kebabian, J. W., & Calne, D. B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature*, *277*, 93–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/277093a0>
- Kempadoo, K. A., Mosharov, E. V., Choi, S. J., Sulzer, D., & Kandel, E. R. (2016). Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(51), 14835–14840. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616515114>
- Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2011). [Neuroglia--living nerve glue]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, *79*(10), 588–597. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1281704> (Neuroglia, der lebende Nerven Kitt.)
- Klein, M., Lohr, C., & Droste, D. (2020). Age-Dependent Heterogeneity of Murine Olfactory Bulb Astrocytes. *Front Aging Neurosci*, *12*, 172. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00172>
- Koppel, I., Jaanson, K., Klasche, A., Tuvikene, J., Tiirik, T., Parn, A., & Timmusk, T. (2018). Dopamine cross-reacts with adrenoceptors in cortical astrocytes to induce BDNF expression, CREB signaling and morphological transformation. *Glia*, *66*(1), 206–216. <https://doi.org/10.1002/glia.23238>
- Kosaka, T., & Kosaka, K. (Eds.). (2009). *Olfactory Bulb Anatomy*. Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01686-7>.
- Kosaka, T., & Kosaka, K. (2016). Neuronal organization of the main olfactory bulb revisited. *Anat Sci Int*, *91*(2), 115–127. <https://doi.org/10.1007/s12565-015-0309-7>
- Lago-Baldaia, I., Fernandes, V. M., & Ackerman, S. D. (2020). More Than Mortar: Glia as Architects of Nervous System Development and Disease. *Front Cell Dev Biol*, *8*, 611269. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.611269>

- Lands, A. M., Arnold, A., McAuliff, J. P., Luduena, F. P., & Brown, T. G. J. (1967). Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, 214(5088), 597–598. <https://doi.org/10.1038/214597a0>
- Lee, Y., Messing, A., Su, M., & Brenner, M. (2008). GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia*, 56(5), 481–493. <https://doi.org/10.1002/glia.20622>
- Lefton, K. B., Wu, Y., Dai, Y., Okuda, T., Zhang, Y., Yen, A., Rurak, G. M., Walsh, S., Manno, R., Myagmar, B.-E., Dougherty, J. D., Samineni, V. K., Simpson, P. C., & Papouin, T. (2025). Norepinephrine signals through astrocytes to modulate synapses. *Science*, 388(6748), 776–783. <https://doi.org/doi:10.1126/science.adq5480>
- Lei, S. (2014). Cross interaction of dopaminergic and adrenergic systems in neural modulation. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.*, 6(3), 137–142.
- Leinders-Zufall, T., Ma, M., & Zufall, F. (1999). Impaired odor adaptation in olfactory receptor neurons after inhibition of Ca²⁺/calmodulin kinase II. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(14), RC19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-14-j0005.1999>
- Levesque, S. A., Lavoie, E. G., Lecka, J., Bigonnesse, F., & Sevigny, J. (2007). Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. *Br J Pharmacol*, 152(1), 141–150. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707361>
- Levin, E. Y., Levenberg, B., & Kaufman, S. (1960). The Enzymatic Conversion of 3,4-Dihydroxyphenylethylamine to Norepinephrine. *Journal of Biological Chemistry*, 235(7), 2080–2086. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)69366-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)69366-4)
- Levitt, P., Pintar, J. E., & Breakefield, X. O. (1982). Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(20), 6385–6389. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.20.6385>
- Lia, A., Di Spiezio, A., Speggorin, M., & Zonta, M. (2023). Two decades of astrocytes in neurovascular coupling. *Front Netw Physiol*, 3, 1162757. <https://doi.org/10.3389/fnetp.2023.1162757>
- Litvin, T. N., Kamenetsky, M., Zarifyan, A., Buck, J., & Levin, L. R. (2003). Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem*, 278(18), 15922–15926. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212475200>
- Loewi, O. (1921). Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch.*, 189, 239–242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01738910>
- Lohr, C., Beiersdorfer, A., Fischer, T., Hirnet, D., Rotermund, N., Sauer, J., Schulz, K., & Gee, C. E. (2021). Using Genetically Encoded Calcium Indicators to Study Astrocyte Physiology: A Field Guide. *Front Cell Neurosci*, 15, 690147. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.690147>
- Luo, J., Chen, X., Pan, Y. W., Lu, S., Xia, Z., & Storm, D. R. (2015). The type 3 adenylyl cyclase is required for the survival and maturation of newly generated granule cells in the olfactory bulb. *PLoS One*, 10(3), e0122057. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122057>
- Lyons-Warren, A. M., Tantry, E. K., Moss, E. H., Kochukov, M. Y., Belfort, B. D. W., Ortiz-Guzman, J., Freyberg, Z., & Arenkiel, B. R. (2023). Co-transmitting interneurons in the mouse olfactory bulb

- regulate olfactory detection and discrimination. *Cell Rep*, 42(12), 113471. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113471>
- Magee, J. C., & Grienberger, C. (2020). Synaptic Plasticity Forms and Functions. *Annu Rev Neurosci*, 43, 95–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-090919-022842>
- Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (1996). Cellular bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging: evidence for a prominent role of astrocytes. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 6(1), 50–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/cercor/6.1.50>
- Maher, B. J., & Westbrook, G. L. (2008). Co-transmission of dopamine and GABA in periglomerular cells. *J Neurophysiol*, 99(3), 1559–1564. <https://doi.org/10.1152/jn.00636.2007>
- Martin, A. C., Willoughby, D., Ciruela, A., Ayling, L. J., Pagano, M., Wachten, S., Tengholm, A., & Cooper, D. M. (2009). Capacitative Ca²⁺ entry via Orai1 and stromal interacting molecule 1 (STIM1) regulates adenylyl cyclase type 8. *Mol Pharmacol*, 75(4), 830–842. <https://doi.org/10.1124/mol.108.051748>
- Mason, S. (2017). Lactate Shuttles in Neuroenergetics-Homeostasis, Allostasis and Beyond. *Front Neurosci*, 11, 43. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00043>
- McLean, J. H., Shipley, M. T., Nickell, W. T., Aston-Jones, G., & Reyher, C. K. (1989). Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat. *J Comp Neurol*, 285(3), 339–349. <https://doi.org/10.1002/cne.902850305>
- Menniti, F. S., Knoth, J., & Diliberto, E. J. (1986). Role of ascorbic acid in dopamine beta-hydroxylation. The endogenous enzyme cofactor and putative electron donor for cofactor regeneration. *Journal of Biological Chemistry*, 261(36), 16901–16908. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)75974-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)75974-2)
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews*, 78, 189–225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
- Molinoff, P. B., & Axelrod, J. (1971). Biochemistry of Catecholamines. *Annu Rev Biochem*, 40, 465–500. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.40.070171.002341>
- Muglia, L. M., Schaefer, M. L., Vogt, S. K., Gurtner, G., Imamura, A., & Muglia, L. J. (1999). The 5'-flanking region of the mouse adenylyl cyclase type VIII gene imparts tissue-specific expression in transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(6), 2051–2058. <https://doi.org/https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-06-02051.1999>
- Nagatsu, T., Levitt, M., & Udenfriend, S. (1964). Tyrosine Hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 239(9), 2910–2917. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)93832-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)93832-9)
- Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits*, 8, 98. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00098>
- Nalepa, I., Kreiner, G., Bielawski, A., Rafa-Zablocka, K., & Roman, A. (2013). alpha1-Adrenergic receptor subtypes in the central nervous system: insights from genetically engineered mouse models. *Pharmacol Rep*, 65(6), 1489–1497. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(13\)71509-3](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(13)71509-3)

- Neves, S. R., Ram, P. T., & Iyengar, R. (2002). G Protein Pathways. *Science*, 296(5573), 1636–1639. <https://doi.org/10.1126/science.107155>
- Nicol, X., Muzerelle, A., Bachy, I., Ravary, A., & Gaspar, P. (2005). Spatiotemporal localization of the calcium-stimulated adenylate cyclases, AC1 and AC8, during mouse brain development. *J Comp Neurol*, 486(3), 281–294. <https://doi.org/10.1002/cne.20528>
- Odaka, H., Arai, S., Inoue, T., & Kitaguchi, T. (2014). Genetically-encoded yellow fluorescent cAMP indicator with an expanded dynamic range for dual-color imaging. *PLoS One*, 9(6), e100252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100252>
- Oe, Y., Wang, X., Patriarchi, T., Konno, A., Ozawa, K., Yahagi, K., Hirai, H., Tsuboi, T., Kitaguchi, T., Tian, L., McHugh, T. J., & Hirase, H. (2020). Distinct temporal integration of noradrenaline signaling by astrocytic second messengers during vigilance. *Nat Commun*, 11(1), 471. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14378-x>
- Onda, T., Hashimoto, Y., Nagai, M., Kuramochi, H., Saito, S., Yamazaki, H., Toya, Y., Sakai, I., Homcy, C. J., Nishikawa, K., & Ishikawa, Y. (2001). Type-specific regulation of adenylyl cyclase. Selective pharmacological stimulation and inhibition of adenylyl cyclase isoforms. *J Biol Chem*, 276(51), 47785–47793. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107233200>
- Otsu, Y., Couchman, K., Lyons, D. G., Collot, M., Agarwal, A., Mallet, J. M., Pfrieder, F. W., Bergles, D. E., & Charpak, S. (2015). Calcium dynamics in astrocyte processes during neurovascular coupling. *Nat Neurosci*, 18(2), 210–218. <https://doi.org/10.1038/nn.3906>
- Oya, M., Kitaguchi, T., Yanagihara, Y., Numano, R., Kakeyama, M., Ikematsu, K., & Tsuboi, T. (2013). Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 438(1), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.043>
- Paco, S., Hummel, M., Pla, V., Sumoy, L., & Aguado, F. (2016). Cyclic AMP signaling restricts activation and promotes maturation and antioxidant defenses in astrocytes. *BMC Genomics*, 17, 304. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2623-4>
- Petrelli, F., Dallerac, G., Pucci, L., Cali, C., Zehnder, T., Sultan, S., Lecca, S., Chicca, A., Ivanov, A., Asensio, C. S., Gundersen, V., Toni, N., Knott, G. W., Magara, F., Gertsch, J., Kirchhoff, F., Deglon, N., Giros, B., Edwards, R. H., ... Bezzi, P. (2020). Dysfunction of homeostatic control of dopamine by astrocytes in the developing prefrontal cortex leads to cognitive impairments. *Mol Psychiatry*, 25(4), 732–749. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0226-y>
- Petzold, G. C., Albeanu, D. F., Sato, T. F., & Murthy, V. N. (2008). Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron*, 58(6), 897–910. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.029>
- Pignatelli, A., & Belluzzi, O. (2017). Dopaminergic Neurons in the Main Olfactory Bulb: An Overview from an Electrophysiological Perspective. *Front Neuroanat*, 11, 7. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00007>
- Pirnat, S., Bozic, M., Dolanc, D., Horvat, A., Tavcar, P., Vardjan, N., Verkhatsky, A., Zorec, R., & Stenovec, M. (2021). Astrocyte arborization enhances Ca(2+) but not cAMP signaling plasticity. *Glia*, 69(12), 2899–2916. <https://doi.org/10.1002/glia.24076>

- Pittolo, S., Yokoyama, S., Willoughby, D. D., Taylor, C. R., Reitman, M. E., Tse, V., Wu, Z., Etchenique, R., Li, Y., & Poskanzer, K. E. (2022). Dopamine activates astrocytes in prefrontal cortex via alpha1-adrenergic receptors. *Cell Rep*, 40(13), 111426. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111426>
- Poucher, S. M., Keddie, J. R., Singh, P., Stoggall, S. M., Caulkett, P. W., Jones, G., & Coll, M. G. (1995). The in vitro pharmacology of ZM 241385, a potent, non-xanthine A2a selective adenosine receptor antagonist. *British journal of pharmacology*, 115(6), 1096–1102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb15923.x>
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., & White, L. E. (2018). *Neuroscience* (6th ed.). Oxford University Press.
- Qin, H., He, Y., Fu, H., Wang, K., Bin, Y., Xu, C., Wu, F., Wei, J., Fang, J., & Yan, W. (2025). Recent Advances in Mammalian Olfactory Receptor Function and Structure. *Sensory Neuroscience*, 1(1). <https://doi.org/10.1002/sen2.70000>
- Ramos, B. P., & Arnsten, A. F. T. (2007). Adrenergic Pharmacology and Cognition: Focus on the Prefrontal Cortex. *Pharmacol Ther*, 113(3), 523–536.
- Rani, M., & Kanungo, M. S. (2006). Expression of D2 dopamine receptor in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 344(3), 981–986. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.075>
- Ranjbar-Slamloo, Y., & Fazlali, Z. (2020). Dopamine and Noradrenaline in the Brain; Overlapping or Dissociate Functions? *Front Mol Neurosci*, 12, 334. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00334>
- Ronnett, G. V., & Moon, C. (2002). G proteins and olfactory signal transduction. *Annu Rev Physiol*, 64, 189–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.082701.102219>
- Rosenberg, M. F., Godoy, M. I., Wade, S. D., Paredes, M. F., Zhang, Y., & Molofsky, A. V. (2023). beta-Adrenergic Signaling Promotes Morphological Maturation of Astrocytes in Female Mice. *J Neurosci*, 43(50), 8621–8636. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0357-23.2023>
- Rosenberg, P. A., & Dichter, M. A. (1989). Extracellular cAMP accumulation and degradation in rat cerebral cortex in dissociated cell culture. *J Neurosci*, 9(8), 2654–2663. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-08-02654.1989>
- Rotermund, N., Schulz, K., Hirnet, D., & Lohr, C. (2019). Purinergic Signaling in the Vertebrate Olfactory System. *Front Cell Neurosci*, 13, 112. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00112>
- Rotermund, N., Winandy, S., Fischer, T., Schulz, K., Fregin, T., Alstedt, N., Buchta, M., Bartels, J., Carlstrom, M., Lohr, C., & Hirnet, D. (2018). Adenosine A(1) receptor activates background potassium channels and modulates information processing in olfactory bulb mitral cells. *J Physiol*, 596(4), 717–733. <https://doi.org/10.1113/JP275503>
- Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J. D., Bonvento, G., & Giaume, C. (2011). Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(45), 18442–18446. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107386108>
- Roux, L., Madar, A., Lacroix, M. M., Yi, C., Benchenane, K., & Giaume, C. (2015). Astroglial Connexin 43 Hemichannels Modulate Olfactory Bulb Slow Oscillations. *J Neurosci*, 35(46), 15339–15352. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0861-15.2015>

- Sardar, D., Cheng, Y. T., Woo, J., Choi, D. J., Lee, Z. F., Kwon, W., Chen, H. C., Lozzi, B., Cervantes, A., Rajendran, K., Huang, T. W., Jain, A., Arenkiel, B. R., Maze, I., & Deneen, B. (2023). Induction of astrocytic Slc22a3 regulates sensory processing through histone serotonylation. *Science*, 380(6650), eade0027. <https://doi.org/10.1126/science.ade0027>
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A., & Moriyama, Y. (2008). Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), 5683–5686. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800141105>
- Sayner, S. L., Choi, C. S., Maulucci, M. E., Ramila, K. C., Zhou, C., Scruggs, A. K., Yarbrough, T., Blair, L. A., King, J. A., Seifert, R., Kaefer, V., & Bauer, N. N. (2019). Extracellular vesicles: another compartment for the second messenger, cyclic adenosine monophosphate. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 316(4), L691–L700. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00282.2018>
- Schlag, B. D., Vondrasek, J. R., Munir, M., Kalandadze, A., Zeleniaia, O. A., Rothstein, J. D., & Robinson, M. B. (1998). Regulation of the glial Na⁺-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Mol Pharmacol*, 53(3), 355–369. <https://doi.org/10.1124/mol.53.3.355>
- Schubert, C., Schulz, K., Sonner, J. K., Hadjilaou, A., Seemann, A. L., Gierke, J., Vieira, V., Meurs, N., Woo, M. S., Lohr, C., Morellini, F., Hirnet, D., & Friese, M. A. (2025). Neuroinflammation causes mitral cell dysfunction and olfactory impairment in a multiple sclerosis model. *J Neuroinflammation*, 22(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12974-025-03388-5>
- Schulz, K., Rotermund, N., Grzelka, K., Benz, J., Lohr, C., & Hirnet, D. (2017). Adenosine A(1) Receptor-Mediated Attenuation of Reciprocal Dendro-Dendritic Inhibition in the Mouse Olfactory Bulb. *Front Cell Neurosci*, 11, 435. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00435>
- Serezani, C. H., Ballinger, M. N., Aronoff, D. M., & Peters-Golden, M. (2008). Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 39(2), 127–132. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0091TR>
- Shiple, M. T., & Ennis, M. (1996). Functional organization of olfactory system. *Journal of Neurobiology*, 30(1), 123–176. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4695\(199605\)30:1<123::Aid-neu11>3.0.Co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4695(199605)30:1<123::Aid-neu11>3.0.Co;2-n)
- Shiple, M. T., Halloran, F. J., & de la Torre, J. (1985). Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Research*, 329(1-2), 294–299. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90537-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90537-2)
- Sobolczyk, M., & Boczek, T. (2022). Astrocytic Calcium and cAMP in Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci*, 16, 889939. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.889939>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Stekic, A., Dragic, M., Stanojevic, J., Zaric Kontic, M., Stevanovic, I., Zeljkovic Jovanovic, M., Mihajlovic, K., & Nedeljkovic, N. (2024). Impaired olfactory performance and anxiety-like behavior in a rat model of multiple sclerosis are associated with enhanced adenosine signaling in the olfactory bulb via A(1)R, A(2B)R, and A(3)R. *Front Cell Neurosci*, 18, 1407975. <https://doi.org/10.3389/fncel.2024.1407975>

- Strosberg, A. D. (1993). Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Science*, 2(8), 1198–1209. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020802>
- Su, Z., & He, C. (2010). Olfactory ensheathing cells: biology in neural development and regeneration. *Prog Neurobiol*, 92(4), 517–532. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.08.008>
- Sulzer, D., Bogulavsky, J., Larsen, K., Behr, G., Karatekin, E., Kleinman, M., Turro, N., Krantz, D., Edwards, R., Greene, L., & Zecca, L. (2000). Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(22), 11869–11874. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.22.11869>.
- Sun, W., Cornwell, A., Li, J., Peng, S., Osorio, M. J., Aalling, N., Wang, S., Benraiss, A., Lou, N., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2017). SOX9 Is an Astrocyte-Specific Nuclear Marker in the Adult Brain Outside the Neurogenic Regions. *J Neurosci*, 37(17), 4493–4507. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3199-16.2017>
- Sutherland, E. W., & Rall, T. W. (1958). Fractionation and Characterization of a Cyclic Adenine Ribonucleotide Formed by Tissue Particles. *Journal of Biological Chemistry*, 232(2), 1077–1091. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)77423-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)77423-7)
- Takata, N., Mishima, T., Hisatsune, C., Nagai, T., Ebisui, E., Mikoshiba, K., & Hirase, H. (2011). Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *J Neurosci*, 31(49), 18155–18165. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5289-11.2011>
- Theparambil, S. M., Kopach, O., Braga, A., Nizari, S., Hosford, P. S., Sagi-Kiss, V., Hadjihambi, A., Konstantinou, C., Esteras, N., Gutierrez Del Arroyo, A., Ackland, G. L., Teschemacher, A. G., Dale, N., Eckle, T., Andrikopoulos, P., Rusakov, D. A., Kasparov, S., & Gourine, A. V. (2024). Adenosine signalling to astrocytes coordinates brain metabolism and function. *Nature*, 632(8023), 139–146. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07611-w>
- Thyssen, A., Hirnet, D., Wolburg, H., Schmalzing, G., Deitmer, J. W., & Lohr, C. (2010). Ectopic vesicular neurotransmitter release along sensory axons mediates neurovascular coupling via glial calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(34), 15258–15263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003501107>
- Tresguerres, M., Levin, L. R., & Buck, J. (2011). Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney Int*, 79(12), 1277–1288. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.95>
- Tufo, C., Poopalasundaram, S., Dorrego-Rivas, A., Ford, M. C., Graham, A., & Grubb, M. S. (2022). Development of the mammalian main olfactory bulb. *Development*, 149(3). <https://doi.org/10.1242/dev.200210>
- Ung, K., Tepe, B., Pekarek, B., Arenkiel, B. R., & Deneen, B. (2020). Parallel astrocyte calcium signaling modulates olfactory bulb responses. *J Neurosci Res*, 98(8), 1605–1618. <https://doi.org/10.1002/jnr.24634>
- Vaaga, C. E., Yorgason, J. T., Williams, J. T., & Westbrook, G. L. (2017). Presynaptic gain control by endogenous cotransmission of dopamine and GABA in the olfactory bulb. *J Neurophysiol*, 117(3), 1163–1170. <https://doi.org/10.1152/jn.00694.2016>
- Vardjan, N., Horvat, A., Anderson, J. E., Yu, D., Croom, D., Zeng, X., Luznik, Z., Kreft, M., Teng, Y. D., Kirov, S. A., & Zorec, R. (2016). Adrenergic activation attenuates astrocyte swelling induced by hypotonicity and neurotrauma. *Glia*, 64(6), 1034–1049. <https://doi.org/10.1002/glia.22981>

- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiol Rev*, 98(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Verkhatsky, A., Orkand, R. K., & Kettenmann, H. (1998). Glial Calcium: Homeostasis and Signaling Function. *Physiological Reviews*, 78(1), 99–141. <https://doi.org/doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.99>
- Verkhatsky, A., Parpura, V., Li, B., & Scuderi, C. (2021). Astrocytes: The Housekeepers and Guardians of the CNS. *Adv Neurobiol*, 26, 21–53. https://doi.org/10.1007/978-3-030-77375-5_2
- Verney, C. (1999). Distribution of the catecholaminergic neurons in the central nervous system of human embryos and fetuses. *Microscopy Research and Technique*, 46(1), 24–47. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0029\(19990701\)46:1<24::Aid-jemt3>3.0.Co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0029(19990701)46:1<24::Aid-jemt3>3.0.Co;2-e)
- Vittani, M., Herlo, R., Wang, X., Christensen, M. D. B., Vo, C. T., Mishima, T., Kusk, P., Konno, A., Hirai, H., Tsuboi, T., Kitaguchi, T., Kjaerby, C., Asiminas, A., Yokoyama, T., Sakamoto, M., Nedergaard, M., & Hirase, H. (2025). Cerebral blood flow is modulated by astrocytic cAMP elevation independently of IP(3)R2-mediated Ca(2+) signaling in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 122(27), e2422069122. <https://doi.org/10.1073/pnas.2422069122>
- Volterra, A., Liaudet, N., & Savtchouk, I. (2014). Astrocyte Ca(2)(+) signalling: an unexpected complexity. *Nat Rev Neurosci*, 15(5), 327–335. <https://doi.org/10.1038/nrn3725>
- von Euler, U. S. (1945). A Sympathomometric Pressor Substance in Animal Organ Extracts. *Nature*, 156, 18–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/156018b0>
- Walz, W. (2000). Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochemistry International*, 36(4-5), 291–300. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(99\)00137-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0197-0186(99)00137-0)
- Won, W., Bhalla, M., Lee, J. H., & Lee, C. J. (2025). Astrocytes as Key Regulators of Neural Signaling in Health and Disease. *Annu Rev Neurosci*. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-112723-035356>
- Zacharia, J., Mauban, J. R., Raina, H., Fisher, S. A., & Wier, W. G. (2013). High vascular tone of mouse femoral arteries in vivo is determined by sympathetic nerve activity via alpha1A- and alpha1D-adrenoceptor subtypes. *PLoS One*, 8(6), e65969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065969>
- Zak, J. D., & Schoppa, N. E. (2022). Neurotransmitter regulation rather than cell-intrinsic properties shapes the high-pass filtering properties of olfactory bulb glomeruli. *J Physiol*, 600(2), 393–417. <https://doi.org/10.1113/JP282374>
- Zhou, Z., Ikegaya, Y., & Koyama, R. (2019). The Astrocytic cAMP Pathway in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030779>
- Zhou, Z., Okamoto, K., Onodera, J., Hiragi, T., Andoh, M., Ikawa, M., Tanaka, K. F., Ikegaya, Y., & Koyama, R. (2021). Astrocytic cAMP modulates memory via synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(3). <https://doi.org/10.1073/pnas.2016584118>
- Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 362(4-5), 299–309. <https://doi.org/10.1007/s002100000309>

Zimnik, N. C., Treadway, T., Smith, R. S., & Araneda, R. C. (2013). alpha(1A)-Adrenergic regulation of inhibition in the olfactory bulb. *J Physiol*, 591(7), 1631–1643. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.248591>

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt zu haben.

Sofern im Zuge der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift generative Künstliche Intelligenz (gKI) basierte elektronische Hilfsmittel verwendet wurden, versichere ich, dass meine eigene Leistung im Vordergrund stand und dass eine vollständige Dokumentation aller verwendeten Hilfsmittel gemäß der Guten wissenschaftlichen Praxis vorliegt. Ich trage die Verantwortung für eventuell durch die gKI generierte fehlerhafte oder verzerrte Inhalte, fehlerhafte Referenzen, Verstöße gegen das Datenschutz- und Urheberrecht oder Plagiate.

Datum und Ort

Unterschrift

Jessica Sauer

Erklärung zur Verwendung generativer KI-Systeme

Bei der Erstellung der Arbeit habe ich die folgenden auf künstlicher Intelligenz (KI) basierten Systeme benutzt:

1. Perplexity
2. ChatGPT (GPT-4o Mini und GPT-5)

Ich erkläre weiterhin, dass ich

mich aktiv über die Leistungsfähigkeit und Beschränkungen der oben genannten KI-Systeme informiert habe,

die aus den oben angegebenen KI-Systemen übernommenen Passagen gekennzeichnet habe,

überprüft habe, dass die mithilfe der oben genannten KI-Systeme generierten und von mir übernommenen Inhalte faktisch richtig sind,

mir bewusst bin, dass ich als Autor:in dieser Arbeit die Verantwortung für die in ihr gemachten Angaben und Aussagen trage.

Die oben genannten KI-Systeme habe ich wie im Folgenden dargestellt eingesetzt.

Arbeitsschritt	Eingesetzte(s) KI-System(e)	Beschreibung der Verwendungsweise
Generierung von Ideen und Konzeption der Arbeit	---	---
Literatursuche	Perplexity ChatGPT	Als Suchmaschine
Literaturanalyse	---	---
Literaturverwaltung und Zitationsmanagement	---	---
Auswahl von Methoden und Modellen	---	---
Datensammlung und -analyse	---	---
Generierung von Programmcodes	---	---
Erstellung von Visualisierungen	---	---
Interpretation und Validierung	---	---

Strukturierung des Texts der Arbeit	---	---
Formulierung des Texts der Arbeit	---	---
Übersetzen des Texts der Arbeit	---	---
Redigieren des Texts	---	---
Vorbereitung der Präsentation des Texts	---	---
Sonstiges	ChatGPT	Korrekturlesen einzelner Abschnitte auf Rechtschreibung und Zeichensetzung

Datum und Ort

Unterschrift

Jessica Sauer

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christian Lohr für die Betreuung meines Dissertationsvorhabens. Ich schätze dein immer offenes Ohr und die wertvollen Ratschläge sehr. Dank deiner Ermutigung konnte ich nicht nur meine eigenen Perspektiven in die Arbeit einfließen lassen, sondern auch meine Forschungsinteressen vertiefen. Dies hat nicht nur meine Dissertation bereichert, sondern auch meine Entwicklung als Wissenschaftlerin nachhaltig geprägt. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Thomas Oertner herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie allen Mitgliedern der Prüfungskommission.

Dr. Daniela Hirnet danke ich für den bereichernden wissenschaftlichen Austausch und die fortwährende Unterstützung und Dr. Christine Gee danke ich für den intensiven Austausch in unseren Meetings. Allen Mitarbeitenden der Tierhaltung gilt mein Dank für die Aufzucht und Pflege meiner Versuchstiere.

Meiner Freundin und Mentorin Toni danke ich dafür, dass du mir sowohl fachlich als auch mental immer eine große Stütze warst. Danke für alles, Toni! Ebenso danke ich meinen Mitdoktorandinnen Fatemeh, Insa, Jenni und Shiva sowie meinen liebsten Büronachbarinnen Anne Catrin und Jenny von Herzen. Ihr wart immer für mich da! Lieben Dank auch dir, liebe Anna Lena, dass wir uns gegenseitig ein Stück auf dieser Reise begleiten durften.

Meiner Familie möchte ich von Herzen danken, dass ihr mir immer Mut gemacht habt, meinen Weg nicht aus den Augen zu verlieren. Meinem Mann Markus sowie meinen Kindern Jonte und Insa danke ich dafür, dass ihr immer für mich da wart und mich stets ermutigt habt. Meiner Mama, meiner Schwester und meinen Schwiegereltern gilt mein Dank für die fortwährende Unterstützung. Ohne euch, liebe Familie, hätte ich es nicht schaffen können. Ein lieber Dank geht ebenfalls an alle Familienmitglieder, die mich viel zu früh auf meinem Weg verlassen mussten, besonders an meinen Papa und Christian.

All meinen Freundinnen danke ich für die kontinuierliche emotionale Unterstützung auf dieser spannenden Reise.

Zum Schluss möchte ich auch den Tieren danken, die für diese Forschung ihr Leben gegeben haben. Ihr Beitrag wird in Dankbarkeit und mit tiefem Respekt gewürdigt.

Vielen Dank an alle! Ohne euch wäre es mir nicht möglich gewesen!