

Charakterisierung panglialer Kommunikationsmechanismen im
Bulbus olfactorius 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

ANTONIA BENITA BEIERSDORFER

Hamburg, 2019

Tag der Disputation: 06.03.2020

Erster Gutachter: Prof. Dr. Christian Lohr

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Frank Kirchhoff

Prüfungsvorsitz: Jun.-Prof. Dr. Esther Diekhof

„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker
er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.“

Maria Sklodowska

(1867-1934)

Inhaltsverzeichnis

I Abkürzungsverzeichnis	1
II Abbildungsverzeichnis	4
III Zusammenfassung	5
IV Abstract	7
1. Einleitung	8
1.1 Das olfaktorische System der Vertebraten	8
1.1.1 Die Geruchstransduktion im olfaktorischen Epithel	8
1.1.2 Der zelluläre Aufbau und synaptische Organisation im <i>Bulbus olfactorius</i>	10
1.2 Funktionelle Heterogenität von Gliazellen	16
1.2.1 Astrozyten modulieren die synaptische Übertragung an dreiteiligen Synapsen	17
1.2.2 Astrozyten vermitteln neurometabolische und neurovaskuläre Kopplung	20
1.3 Ca ²⁺ als ubiquitäres Signalmolekül	23
1.4 Interzelluläre Kommunikation in glialen Netzwerken	25
1.5 Die Funktion von Astrozyten im <i>Bulbus olfactorius</i>	27
1.6 Axon-OEC-Interaktion in der olfaktorischen Nervenfaserschicht	29
1.6.1 Ca ²⁺ - abhängige Signalwege in OECs	30
1.7 Zielsetzung	32
2. AMPA Receptor-Mediated Ca ²⁺ transients in Mouse Olfactory Ensheathing Cells	33
3. Panglial gap junctions between astrocytes and olfactory ensheathing cell mediate transmission of calcium transients and neurovascular coupling	47
4. Sublamina-specific organization of the blood brain barrier in the mouse olfactory nerve layer	67
5. Diskussion	86
5.1 Endogene Glutamat-Freisetzung induziert AMPA-Rezeptor vermittelte Ca ²⁺ -Transienten in OECs	86
5.2 OECs und Astrozyten sind in panglialen Netzwerken organisiert	91
5.3 Die Ca ²⁺ -abhängige Kommunikation in panglialen OEC-AC-Netzwerken	95
5.4 Die physiologische Relevanz panglialer OEC-AC-Netzwerke– eine Rolle bei der räumlichen Kaliumpufferung	99
5.5 Die Rolle von OECs bei der neurometabolischen Versorgung im ONL	103
5.6 OECs vermitteln neurovaskuläre Kopplung im ONL	106
5.7 Die PNS-ZNS Übergangszone - OECs und ihre Interaktionspartner	113

Inhaltsverzeichnis

6. Referenzen	115
V Eidesstattliche Versicherung	132
VI DANKE	133

I Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
20-HETE	Hydroxyeicosatetraenoin-Säure
AA	Arachidonsäure
AC	Astrozyten
AMPA	Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANLSH	Astrozyt-Neuron-Lactat-Shuttle-Hypothese
AQP	Aquaporin
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(<i>o</i> -aminophenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
BBB	Blut-Hirn-Schranke, <i>blood brain barrier</i>
BC	Basalzelle, <i>basal cell</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BL	Basallamina
BLBP	<i>Brain lipid-binding protein</i>
CA1-Region	<i>Cornu Ammonis</i> Region 1
Ca ²⁺	Calciumionen
CAM	Zell-Adhäsionsmoleküle, <i>cell adhesion molecule</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB ⁺	Calbindin-positiv
CBX	Carbenoxolon
CCK	Cholecystokinin
CICR	Ca ²⁺ -induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung, <i>calcium induced calcium release</i>
Cl ⁻	Chloridionen
CNG-Kanäle	<i>cyclic nucleotide gated channels</i>
CP	Siebbeinplatte, <i>cribriform plate</i>
CR ⁺	Calretinin-positiv
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Cx	Connexin
DAG	Diacylglycerol
DHPG	(<i>S</i>)-3,5-Dihydroxyphenylglycine
EC	Endothelzellen
EET	Epoxyeicosatriensäure
EPL	Externe plexiforme Schicht, <i>external plexiform layer</i>
ER	endoplasmatische Retikulum
eTC	Externe Büschelzelle, <i>external tufted cell</i>
TC	Büschelzelle, <i>tufted cell</i>
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GC	Körnerzellen, <i>granule cells</i>
GCL	Körnerzellschicht, <i>granule cell layer</i>
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GFAP	Saures Gliafaserprotein, <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GL	Glomerularschicht, <i>glomerular layer</i>
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GLT-1	Glutamat-Transporter 1
GLUT	Glukose-Transporter

Abkürzungsverzeichnis

G _{olf}	olfaktorisches G-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
H ⁺	Protonen
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IPL	Interne plexiforme Schicht, <i>internal plexiform layer</i>
kDa	Kilodalton
Kir-Kanäle	einwärts-rectifizierende Kalium-Kanäle
L	Lumen
LDH	Lactatdehydrogenase
LOT	Lateraler olfaktorischer Trakt, <i>lateral olfactory tract</i>
LTP	Langzeitpotenzierung
MC	Mitralzelle, <i>mitral cell</i>
MCL	Mitralzellschicht, <i>mitral cell layer</i>
MCT	Monocarboxylat-Transporter
mGluR	Metabotrope Glutamatrezeptoren
mM	Millimolar
MPEP	2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride
Na ⁺	Natriumionen
NGF	Nervenwachstumsfaktor, <i>nerve growth factor</i>
NGFI-A	Nervenwachstumsfaktor-induzierten Faktor A
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NP-EGTA	6,9-Dioxa-3,12-diazatetradecanedioic acid, 3,12-bis(carboxymethyl)-4-(2-nitrophenyl)
NPY	Neuropeptid Y
NT	Neurotrophin
OB	<i>Bulbus olfactorius, olfactory bulb</i>
OBP	Duftstoff-bindende Proteine, <i>odorant binding proteins</i>
OC	Oligodendrozyt
OEC	Olfaktorische Hüllgliazelle, <i>olfactory ensheathing cell</i>
OEC _i	Innere olfaktorische Hüllgliazelle <i>inner olfactory ensheathing cell</i>
OEC _o	Äußere olfaktorische Hüllgliazelle, <i>outer olfactory ensheathing cell</i>
OM-OEC	<i>Olfactory mucosa olfactory ensheathing cell</i>
ONL	Olfaktorische Nervenfaserschicht, <i>olfactory nerve layer</i>
ONL _i	Innere olfaktorische Nervenfaserschicht, <i>inner olfactory nerve layer</i>
ONL _o	Äußere olfaktorische Nervenfaserschicht, <i>outer olfactory nerve layer</i>
OPC	Oligodendrozyten-Vorläuferzelle, <i>oligodendrocyte precursor cell</i>
ORN	Olfaktorische Rezeptorneurone, <i>olfactory sensory neurons</i>
p	postnataler Tag
PC	Perizyt
PDGFRβ	<i>Platelet-derived growth factor receptor β</i>
PGC	periglomeruläre Zellen, <i>periglomerular cells</i>
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLP	Proteolipidprotein
PNS	Peripheres Nervensystem
PVC	Parvalbumin-Interneurone
ROC	Rezeptor-gesteuerter Kanal, <i>receptor-operated channel</i>
sAC	<i>Short axon cell</i>
SC	Stützzelle, <i>supporting cells</i>
SMC	Glatte Muskelzelle, <i>smooth muscle cell</i>

Abkürzungsverzeichnis

SOC	Speicher-gesteuerter Kanal, <i>Store-operated channel</i>
SOCE	Speicher-gesteuerter Calcium-Einstrom, <i>Store-operated calcium entry</i>
tACPD	(±)-1-Aminocyclopentane- <i>trans</i> -1,3-dicarboxylic acid
TC	Büschelzellen, <i>tufted cells</i>
TH ⁺	Tyrosinhydroxylase-positiv
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TTX	Tetrodotoxin
u.a.	unter anderem
VOC	Spannungs-gesteuerter Kanal, <i>voltage-operated channel</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
α -SMA	α -Aktin, <i>α-smooth muscle actin</i>

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Zelluläre Organisation des olfaktorischen Epithels und Projektionen der olfaktorischen Rezeptorneurone in den OB.....	10
Abbildung 2 Zelluläre Organisation im <i>Bulbus olfactorius</i>	12
Abbildung 3 Dreiteilige Synapse und Modulation synaptischer Übertragung	18
Abbildung 4 Organisation der Blut-Hirn-Schranke	21
Abbildung 5 Weiterleitung interzellulärer Ca ²⁺ -Wellen in glialen Netzwerken	27
Abbildung 6 Bidirektionale Propagation panglialer Ca ²⁺ -Signale im OEC-AC-Netzwerk.....	99
Abbildung 7 OECs vermitteln neurometabolische Kopplung in der ONL	106
Abbildung 8 Mechanismen zur neurovaskulären Kopplung in der ONL und GL.....	112

III Zusammenfassung

Das olfaktorische System umfasst ein hochspezialisiertes System, welches die lebenslange Ausdifferenzierung und Axogenese der olfaktorischen Rezeptorneurone sowie deren Integration in bestehende neuronale Netzwerke erlaubt. Die Basis dieser speziellen Eigenschaften bildet mutmaßlich die komplexe interzelluläre Kommunikation unterschiedlicher Zellpopulationen im *Bulbus olfactorius*, u.a. der exklusiv im olfaktorischen System vorkommenden olfaktorischen Hüllgliazellen (OECs). In dieser Arbeit wurde die interzelluläre Kommunikation der Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone und OECs (Kapitel 1) sowie die pangliale Interaktion zwischen OECs und Astrozyten (Kapitel 2) mittels Ca^{2+} -Imaging und Elektrophysiologie untersucht. Darüber hinaus wurde die Interaktion von OECs mit dem lokalen Blutgefäßsystem geprüft und die zelluläre Organisation der Blut-Hirn-Schranke in der olfaktorischen Nervenfaserschicht mit Hilfe von Immunhistochemie charakterisiert (Kapitel 3). Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit konnten die folgenden Erkenntnisse gewonnen werden:

- I. Die extrasynaptische Glutamatfreisetzung der Axone der olfaktorischen Rezeptorneurone induziert AMPA-Rezeptor-vermittelte Ca^{2+} -Transienten in OECs. Diese basieren vermutlich auf dem direkten Ca^{2+} -Einstrom durch die Aktivierung Ca^{2+} -permeabler AMPA-Rezeptoren. Das entstehende Ca^{2+} -Signal wird mittels Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern amplifiziert (Kapitel 1).
- II. OECs und Astrozyten sind in panglialen *gap-junction*-gekoppelten Netzwerken organisiert, welche den direkten Transfer von elektrischen Signalen erlauben. Darüber hinaus dient die Propagation von Ca^{2+} -Transienten innerhalb des Netzwerks der interzellulären Kommunikation. Der Transfer von Ca^{2+} -Transienten von Astrozyten zu OECs vermittelt die Vasokonstriktion eines OEC-assoziierten Blutgefäßes (Kapitel 2).
- III. Die olfaktorische Nervenfaserschicht (ONL) weist sublaminäre Unterschiede bezüglich der zellulären Organisation der Blut-Hirn-Schranke auf. Während OECs im äußeren ONL direkt mit Blutgefäßen in Kontakt stehen, umhüllen astrozytäre Endfüßchen entsprechende Blutgefäße im inneren ONL. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Ca^{2+} -Transienten in OECs des äußeren ONL Vasokonstriktionen assoziierter Blutgefäße vermitteln, während Ca^{2+} -Transienten in OECs des inneren ONL keinen Einfluss auf den Blutgefäßdurchmesser nehmen (Kapitel 3).

IV Abstract

The olfactory system is a highly specialized system allowing the lifelong differentiation and axogenesis of olfactory sensory neurons as well as their integration into existing cellular networks within the olfactory bulb. These properties are highly promoted by olfactory ensheathing cells (OECs) and complex communication mechanisms between OECs and other cell populations of the system. This study focusses on intercellular communication of axons of olfactory sensory neurons and OECs (Chapter 1) as well as panglial interaction between OECs and astrocytes (Chapter 2) using Ca^{2+} imaging and electrophysiology. Additionally, this study investigates the interaction of OECs and the local vasculature as well as the cellular organization of the blood brain barrier in the olfactory nerve layer by immunohistochemistry. Based on the results of this thesis the following insights were obtained:

- I. Ectopic glutamate release by the axons of olfactory sensory neurons induces AMPA receptor-mediated Ca^{2+} transients in OECs. AMPA receptor-mediated Ca^{2+} transients in OECs presumably originate from a direct Ca^{2+} influx by activation of Ca^{2+} -permeable AMPA receptors. The Ca^{2+} response is amplified by Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores (Chapter 1).
- II. OECs and astrocytes are organized in panglial gap junction-coupled networks, enabling the transfer of electrical signals. Additionally, Ca^{2+} transients are transferred within the network, establishing panglial communication between OECs and astrocytes. Panglial Ca^{2+} transients in OECs result in vasoconstriction of associated blood vessels in the olfactory nerve layer (Chapter 2).
- III. The cellular organization of the blood brain barrier in the olfactory nerve layer shows sublamina-specific differences. Whereas OECs are part of the blood brain barrier in the outer sublamina of the ONL, astrocyte endfeet enwrap blood vessels in the inner ONL. Moreover, Ca^{2+} signaling in OECs mediate local vasoconstriction of blood vessels only in the outer ONL, whereas Ca^{2+} wave propagation in OECs of the inner ONL does not affect blood vessel diameter (Chapter 3).

1. Einleitung

1.1 Das olfaktorische System der Vertebraten

Die Wahrnehmung von Gerüchen ist für die meisten Vertebraten von zentraler Bedeutung. So ermöglicht die Interpretation der Gerüche aus der Umwelt die Suche und Bewertung von Nahrungsquellen, das Erkennen von Gefahren, die Partnersuche und –wahl sowie die intraspezifische und interspezifische Kommunikation. Das olfaktorische System stellt ein hochspezialisiertes System dar, welches es erlaubt, kleinste Mengen von über tausend organischen Verbindungen wahrzunehmen und zu unterscheiden (Firestein, 2001). Der *Bulbus olfactorius* (OB) ist die erste zentralnervöse Verarbeitungsebene eingehender Geruchsinformationen und gliedert sich in unterschiedliche komplexe zelluläre Schaltkreise, welche einer ersten Prozessierung der Geruchsinformation dienen.

1.1.1 Die Geruchstransduktion im olfaktorischen Epithel

Die Detektion olfaktorischer Signale beginnt am olfaktorischen Epithel (OE), welches sich im Dach der Nasenhöhle befindet. Über die Atemluft gelangen die Duftmoleküle an das OE, in dem die olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) lokalisiert sind. ORNs sind bipolare Neurone, welche als primäre Sinneszellen einen apikalen Dendriten in das OE und ein Axon in den *Bulbus olfactorius* projizieren (Abbildung 1). Der Dendrit endet in einer kolbenartigen Verdickung, an deren Ende sich zahlreiche Zilien befinden. Diese tragen die Geruchsrezeptoren für die tatsächliche Geruchstransduktion. Die im olfaktorischen Epithel liegenden Bowman-Drüsen (*Glandula olfactoria*) sondern Mukus ab, welcher das Epithel als Schicht bedeckt. Die dort vorhandenen *odorant binding proteins* (OBPs) begünstigen die Löslichkeit hydrophober Geruchsmoleküle und deren Transport zu den jeweiligen Rezeptoren (Tegoni *et al.*, 2000). Neben den olfaktorischen Rezeptorneuronen befinden sich noch zwei weitere Zelltypen im Epithel, die Stützzellen und die Basalzellen. Während die Stützzellen die ORNs im Epithel einbetten, differenzieren Basalzellen zu ORNs und ersetzen diese nach Apoptose im Epithel. Das olfaktorische Epithel der Vertebraten besitzt etwa sechs bis zehn Millionen ORNs, welche jeweils nur einen Rezeptortyp tragen (Buck und Axel, 1991; Lewcock und Reed, 2004). Die

Genfamilie der olfaktorischen Rezeptoren ist die größte der Vertebraten und umfasst bei Mäusen 1.296 Gene, wobei 80% potentiell funktionell sind und 20% Pseudogene darstellen (Zhang und Firestein, 2002). Menschen besitzen hingegen lediglich 500-750 und Fische 100 Gene, die für olfaktorische Rezeptoren kodieren (Buck, 1996; Mombaerts, 1999). Bei allen Geruchsrezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, welche eine intrazelluläre Signalkaskade initiieren. Die Aktivierung des Rezeptors resultiert zunächst in der Aktivierung des G-Proteins des speziellen G_{olf} Typs (olfaktorisches G-Protein). Dabei wird ein an der α -Untereinheit gebundenes Guanosindiphosphat (GDP) durch ein Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt, so dass sich die α -Untereinheit von der β/γ Untereinheit löst und die Adenylatzyklase III aktiviert wird. Diese setzt Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) um (Sklar *et al.*, 1986). Intrazellulär steigt die cAMP Konzentration an, wobei cAMP-aktivierte Kationenkanäle geöffnet werden. Das Öffnen dieser sogenannten CNG-Kanäle (*cyclic nucleotide gated channels*) ermöglicht den Einstrom von Natriumionen (Na^+) und Calciumionen (Ca^{2+}) und somit eine initiale Depolarisation der Zellmembran (Nakamura und Gold, 1987; Liman und Buck, 1994). Darüber hinaus werden Ca^{2+} -abhängige Chloridkanäle geöffnet. Aufgrund der hohen intrazellulären Chlorid (Cl^-)-Konzentration führt das Öffnen der Ca^{2+} -abhängigen Chloridkanäle zu einem Cl^- -Ausstrom und zu einer Verstärkung der Depolarisation. Das Überschreiten des Schwellenpotentials löst schließlich ein Aktionspotential aus, welches entlang der Axone der ORNs in die erste zentralnervöse Verarbeitungsebene geleitet wird, dem OB. Diese Form der Signaltransduktion ermöglicht die Transformation eines chemischen Signals (Geruchsmoleküle) in ein elektrisches Signal (Firestein, 1992).

Die im olfaktorischen Epithel lokalisierten ORNs befinden sich in dauerhaftem Kontakt zur Atemluft, welche mit Partikeln und Pathogenen belastet ist. Daher haben ORNs eine klar definierte Lebensdauer und werden je nach Spezies alle vier bis acht Wochen von Basalzellen aus dem olfaktorischen Epithel ersetzt (Graziadei und Graziadei, 1979; Ramon-Cueto und Valverde, 1995). Folglich ist ein gezieltes Axonwachstum der ausdifferenzierten ORNs in den OB, die Erneuerung von synaptischen Verbindungen und die Integration in das vorhandene bulbäre Netzwerk unumgänglich. Diese Form der adulten Neurogenese und die damit verbundene wiederkehrende Überwindung der PNS-ZNS-Barriere findet nur im olfaktorischen System statt. Es wird vermutet, dass olfaktorische Hüllgliazellen (OECs), welche die ORN-Axone umhüllen und exklusiv im olfaktorischen System vorkommen, maßgeblich am Axon-

Längenwachstum und der Sortierung der Axone beteiligt sind (Doucette, 1990; Doucette, 1993; Ramon-Cueto und Valverde, 1995).

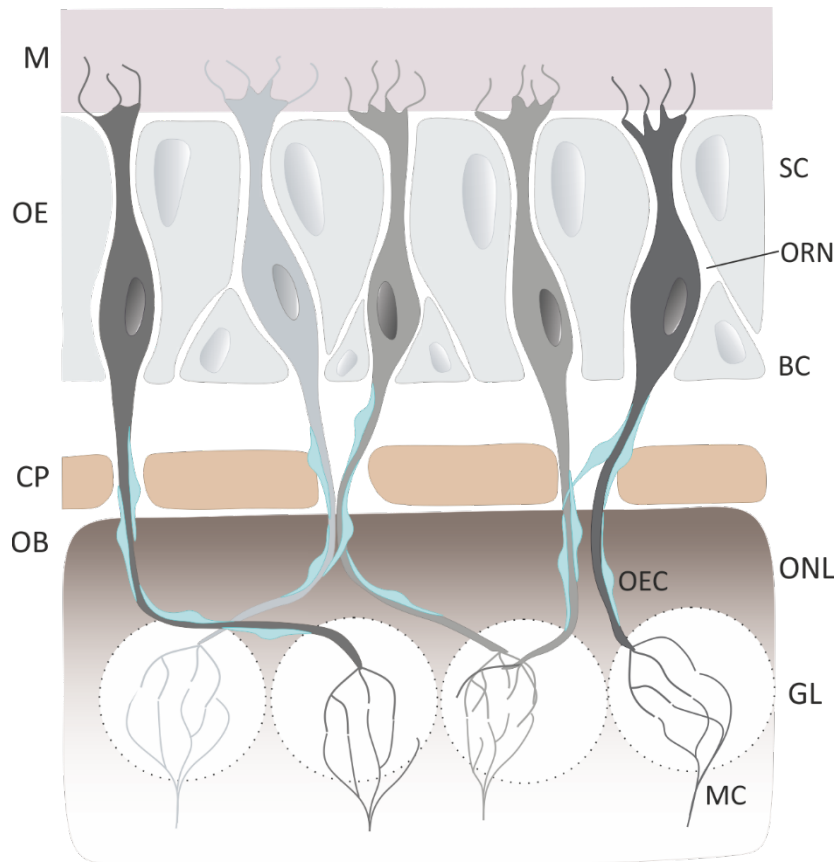


Abbildung 1 Zelluläre Organisation des olfaktorischen Epithels und Projektionen der olfaktorischen Rezeptorneurone in den OB

Die Duftstoffrezeptoren befinden sich an den Zilien der ORNs, welche in der Mukusschicht (M) lokalisiert sind. Die ORNs sind im olfaktorischen Epithel lokalisiert, wo sie von Stützzellen (engl. *supporting cells*, SC) und Basalzellen (engl. *basal cells*, BC) umgeben sind. Die Axone der ORNs projizieren durch die Siebbeinplatte (engl. *cribriform plate*, CP) in den *Bulbus olfactorius* (OB). Die zu Faszikeln gebündelten Axone werden von spezialisierten Gliazellen, den olfaktorischen Hüllgliazellen (OECs) auf ihrem Weg vom OE in den OB umhüllt und begleitet. Die ORN-Axone passieren die äußerste Schicht im OB, die olfaktorische Nervenfaserschicht (ONL), und projizieren u.a. auf die apikalen Dendriten der Mitralzellen (MC) in der Glomerularschicht (GL).

1.1.2 Der zelluläre Aufbau und synaptische Organisation im *Bulbus olfactorius*

Der *Bulbus olfactorius* ist eine Ausstülpung des Vorderhirns und weist, wie andere kortikale Strukturen, einen laminaren Aufbau auf (Shiple und Ennis, 1996). Es handelt sich jedoch um einen sogenannten Allocortex mit 3 Zellschichten, die deutlich durch neuropilhaltige Lagen begrenzt werden. Die äußerste Schicht wird als olfaktorische Nervenfaserschicht (engl.

olfactory nerve layer, ONL) bezeichnet. Dort verlaufen die zu Faszikeln gebündelten Axone der ORN. Diese unmyelinisierten Axone werden sowohl peripher als auch im ONL von OECs umhüllt und begleitet (Abbildung 1; 1.6). Schließlich münden die Axone in sphärischen, neuropilhaltigen Strukturen, den sogenannten Glomeruli (50-100 µm Durchmesser), in der Glomerularschicht (engl. *glomerular layer*, GL), wo sie mit den apikalen Dendriten der Projektionsneurone, der Mitral- und Büschelzellen Synapsen ausbilden (Firestein, 2001). Die Axone eines jeden olfaktorischen Rezeptortyps konvergiert dabei auf jeweils nur ein bis drei bestimmte Glomeruli von den insgesamt ungefähr 2000 Glomeruli pro OB. Die Stimulation eines Geruchsrezeptortyps aktiviert demnach selektiv nur einzelne Glomeruli. Dabei werden die nachgeschalteten bis zu 30 Mitral- und 80 Büschelzellen pro Glomerulus ebenfalls selektiv aktiviert (Shepherd, 1972; Shipley *et al.*, 2004). Durch diese spezielle synaptische Verschaltung ergibt sich ein geruchsspezifisches Aktivitätsmuster der Glomeruli und der nachstehenden Projektionsneurone. Die eingehende olfaktorische Information wird anschließend in komplexen lokalen Schaltkreisen im GL (1.1.2.1) und der nachstehenden externen plexiformen Schicht (1.1.2.2) (engl. *external plexiform layer*, EPL) zum ersten Mal zentralnervös prozessiert (Abbildung 2). Die Axone der Projektionsneurone, welche sich in der internen plexiformen Schicht befinden, formen den lateralen olfaktorischen Trakt (engl. *lateral olfactory tract*, LOT) und projizieren in den olfaktorischen Cortex, wo die sensorische Information weiter verarbeitet wird (Rotermund *et al.*, 2019). Zur Integration der sensorischen Informationen bedarf es komplexer lokaler Schaltkreise, sodass im Folgenden genauer auf die synaptische Verschaltung des GLs und des EPLs eingegangen wird (Abbildung 2).

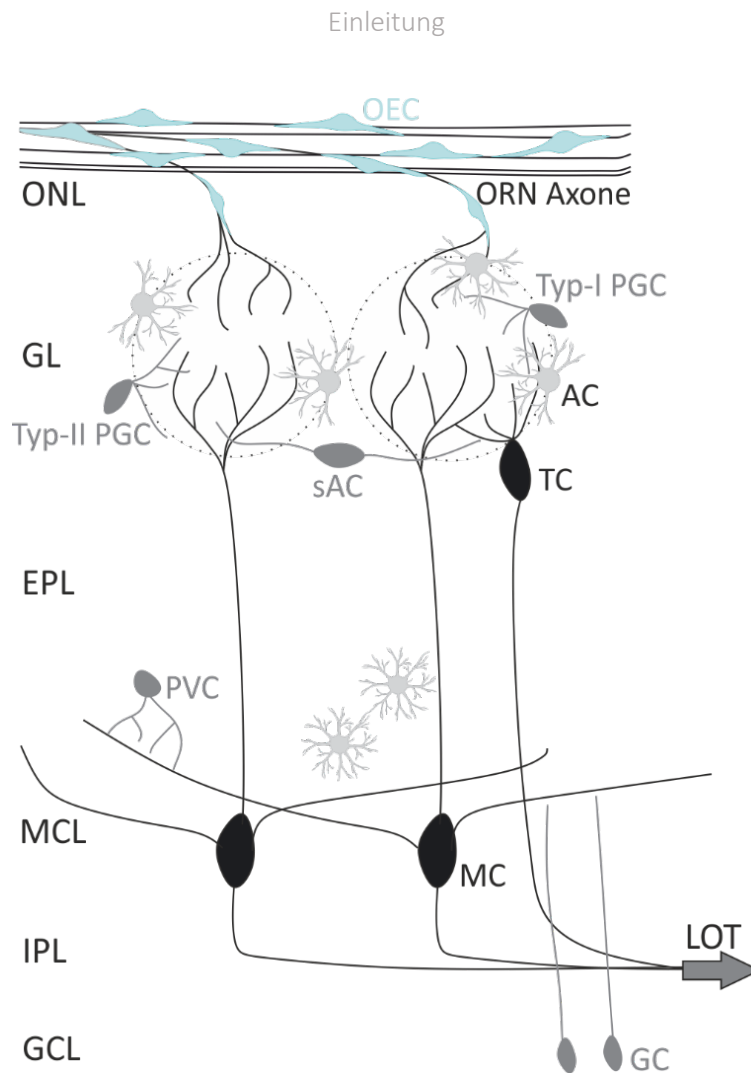


Abbildung 2 Zelluläre Organisation im *Bulbus olfactorius*

Die Axone der ORNs verlassen das OE, passieren die ONL (olfaktorische Nervenfaserschicht) und projizieren auf die apikalen Dendriten der Mitral (MC)- und Büschelzellen (TC) in der Glomerularschicht (GL). In der GL wird die eingehende Information von unterschiedlichen Interneuronpopulationen (periglomeruläre Zellen, PGC; *short axon* Zellen, sAC) und Astrozyten (AC) vorprozessiert. Die EPL (externe plexiforme Schicht) bildet die zweite Verarbeitungsebene, wobei weitere Interneurone (Parvalbumin Interneurone, PVC; Körnerzellen, GC) dendrodendritische Synapsen mit den lateralen Dendriten der Projektionsneurone ausbilden. Die Somata der GC befinden sich dabei in der GCL (Körnerzellschicht), wobei die Dendriten in EPL ragen. In der IPL (interne plexiforme Schicht) verlaufen die Axone von MC und TC, bilden den lateralen olfaktorischen Trakt (LOT) und projizieren in den olfaktorischen Kortex.

1.1.2.1 Die synaptische Organisation des Glomerulus

Das glomeruläre Netzwerk besteht neben den eingehenden Axonen der ORNs und den apikalen Dendriten der Projektionsneuronen aus unterschiedlichen Interneuronpopulationen, sowie Astrozyten. Die Somata der Interneurone und Astrozyten liegen dabei hauptsächlich an den Grenzen der Glomeruli und projizieren ihre Dendriten und Ausläufer in den jeweiligen

Glomerulus (Bailey und Shipley, 1993; Shipley und Ennis, 1996) (Abbildung 2). Die Subpopulationen der Neurone in der GL können entsprechend ihrer Morphologie, ihrer synaptischen Konnektivität, ihren elektrophysiologischen Eigenschaften und der Expression verschiedener Markerproteine unterschieden werden. Basierend auf der Morphologie der juxtaglomerulären Neurone wurden ursprünglich drei Populationen klassifiziert, die periglomerulären Zellen (engl. *periglomerular cells*, PGC), die *short axon-* Zellen (engl. *short axon cells*, sAC) und die externen Büschelzellen (engl. *external tufted cells*, eTC) (Pinching und Powell, 1971). Die PGCs (Soma-Durchmesser: 5-10 μm) projizieren präferiert lediglich in einen Glomerulus, ebenso wie die größeren eTCs (Soma-Durchmesser: 10-15 μm). Die sACs sind eher unterhalb des Glomerulus lokalisiert und deren Ausläufer projizieren in mehrere Glomeruli. Der Soma-Durchmesser der sACs beträgt 8-12 μm (Shipley und Ennis, 1996). Die PGs bilden die größte Population der Neurone in der GL, und werden anhand der synaptischen Organisation in zwei Subtypen unterteilt. Die PG-Zellen vom Typ-I, welche direkte synaptische Eingänge von den ORNs erhalten und die PG-Zellen vom Typ II, welche lediglich mit dem glomerulären Netzwerk assoziiert sind (Parrish-Aungst *et al.*, 2007; Nagayama *et al.*, 2014). Hinsichtlich der Expression von spezifischen Markerproteinen, kommen drei Populationen von periglomerulären Interneuronen vor: Die Tyrosinhydroxylase-positiven (TH^+), die Calbindin-positiven (CB^+) und die Calretinin-positiven (CR^+). Die Tyrosinhydroxylase katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt von L-Tyrosin zu L-Dihydroxyphenylalanin zur Biosynthese von Dopamin. TH-positive juxtaglomeruläre Neurone gehören zu den PG-Zellen vom Typ I und synthetisieren Dopamin als Neurotransmitter. Nahezu alle TH^+ -PG-Zellen exprimieren darüber hinaus das für die γ -Aminobuttersäure (GABA)-Synthese essentielle Enzym Glutamat-Decarboxylase (GAD), und sind demnach zusätzlich GABAerg (Kosaka und Kosaka, 2005; 2007; Batista-Brito *et al.*, 2008). Die ebenfalls GABAergen CB^+ und CR^+ PG-Zellen gehören zu den PG-Zellen vom Typ II, und erhalten keine direkten synaptischen Eingänge von den ORNs (Nagayama *et al.*, 2014). Immunhistochemische Studien zeigen, dass 69% aller Interneurone in der GL sowohl Dopamin als auch GABA als Neurotransmitter verwenden, wobei weitere 4% rein dopaminerg sind (Kosaka *et al.*, 1985; Gall *et al.*, 1987). Dopaminerge PG-Zellen regulieren präsynaptisch die Eingänge der ORN-Axone auf die Projektionsneurone (Ennis *et al.*, 2001): Die neuronale Aktivität der ORNs induziert die Freisetzung von Glutamat und ATP an den Axonterminalen (Berkowicz *et al.*, 1994; Rieger *et al.*, 2007), woraufhin PG-Zellen vom Typ I monosynaptisch über ionotrope Glutamatrezeptoren, der Subtypen AMPA und NMDA, erregt

werden. Diese setzen dann ihrerseits Dopamin und/oder GABA als Neurotransmitter frei. Die Aktivierung präsynaptischer D2-Rezeptoren und GABA_B-Rezeptoren initiiert eine Inhibition der Glutamatfreisetzung aus den Axonterminalen (Nickell *et al.*, 1991; Nickell *et al.*, 1994; Koster *et al.*, 1999; Ennis *et al.*, 2001). Die glutamatergen Eingänge, welche die Mitral- und Büschelzellen von den ORNs über ihre apikalen Dendriten erhalten, können so entscheidend moduliert werden (Hsia *et al.*, 1999). Dieser Mechanismus wird als präsynaptische Inhibition bezeichnet. Darüber hinaus kann die GABA-Freisetzung der PG-Zellen auch direkt GABA_A-Rezeptor vermittelt Mitral- und Büschelzellen inhibieren (Wachowiak und Shipley, 2006). Des Weiteren können PG-Zellen vom Typ II, sekundär über glutamaterge Neurotransmission der Büschelzellen erregt werden, was wiederum die Freisetzung von GABA zur Folge hat und zur Inhibition der Mitral- und Büschelzellen führt (Hayar *et al.*, 2004; Wachowiak und Shipley, 2006). Diese komplexen neuronalen Schaltkreise, sowie das enge Zusammenspiel von Exzitation und Inhibition tragen vermutlich maßgeblich zur Kontrastverschärfung eingehender Geruchsinformationen bei (Yokoi *et al.*, 1995). Die Somata der eTCs sind im unteren Drittel der GL lokalisiert (Nagayama *et al.*, 2014). eTCs sind überwiegend glutamaterg, wobei einige Subpopulationen nachweislich ebenfalls GABA und die Peptidhormone, Cholecystokin (CCK) und Vasopressin als Neurotransmitter verwenden (Liu und Shipley, 1994; Tobin *et al.*, 2010).

Die dritte Population der juxtaglomerulären Neurone bilden die superfiziellen sACs. Diese dienen der Quervernetzung unterschiedlicher Glomeruli und können je nach Subtyp bis zu 50 Glomeruli innervieren. Bei sACs handelt es sich um GABAerge und dopaminerge Interneurone, wobei auch mindestens eine glutamaterge Population beschrieben ist (Aungst *et al.*, 2003; Kiyokage *et al.*, 2010). Die sACs werden zwar nicht direkt von den ORNs erregt, können aber sekundär über TC erregt werden und die synaptische Übertragung distaler Glomeruli beeinflussen (Wachowiak und Shipley, 2006).

1.1.2.2 Die synaptische Organisation in der externen plexiformen Schicht

Der Glomerularschicht folgt die zweite Ebene der Informationsverarbeitung in der externen plexiformen Schicht (engl. *external plexiform layer*, EPL). Die lateralen Dendriten der Mitral- und Büschelzellen befinden sich in horizontaler Ausrichtung in der EPL. Darüber hinaus weist die EPL eine Vielzahl von lokalen Interneuronen auf. Die Depolarisation der Projektionsneurone erstreckt sich bis in die horizontalen lateralen Dendriten, und führt schließlich zum Öffnen

spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und zur dendritischen Freisetzung von Glutamat. Dieses erregt AMPA- und NMDA-Rezeptoren, welche sich an den Dendriten umliegender Interneurone befinden. Diese schütten ihrerseits dendritisch GABA aus, welches GABA_A -Rezeptor-vermittelt Mitralzellen inhibiert. Dieser Mechanismus wird als laterale Inhibition bezeichnet (Jahr und Nicoll, 1982; Isaacson und Strowbridge, 1998; Egger und Urban, 2006). Die Mehrheit dieser dendrodendritischen, reziproken Synapsen wird zwischen Mitralzellen und Körnerzellen (engl. *granule cell*, GC) gebildet. Die Somata der Körnerzellen sind in der innersten Schicht des *Bulbus olfactorius*, der Körnerzellschicht (engl. *granule cell layer*, GCL), lokalisiert und erstrecken ihre Dendriten durch die interne plexiforme Schicht (engl. *internal plexiform layer*, IPL), in die EPL. Die axonlosen Körnerzellen bilden die größte Population lokaler Interneurone im *Bulbus olfactorius* (Abraham *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2018). Darüber hinaus befinden sich noch weitere Interneurone in der EPL, welche überwiegend GABAerg sind. Diese können wiederum in unterschiedliche Subtypen entsprechend der Expression der Markerproteine, CB und CR sowie Parvalbumin (PV), unterteilt werden (Nagayama *et al.*, 2014). Nahezu alle EPL-Interneurone sind CR-positiv, wobei ein Drittel zusätzlich PV-positiv ist. Diese sogenannten PV⁺-Zellen bilden ebenfalls reziproke Synapsen mit Mitralzellen aus (Kato *et al.*, 2013; Nagayama *et al.*, 2014). Im Vergleich zur MC-GC-Synapse ist bei der MC-PV-Synapse die Exzitation der PV-Zellen über Ca^{2+} -permeable AMPA-Rezeptoren gegeben (Kato *et al.*, 2013). Die laterale Inhibition scheint vor allem bei der Geruchsdiskriminierung und der Kontrastverschärfung eine zentrale Rolle zu spielen (Yokoi *et al.*, 1995; Abraham *et al.*, 2010). Die Axone der Projektionsneurone projizieren schließlich entlang des LOTs in unterschiedliche Teile des olfaktorischen Cortex, wie dem anterioren olfaktorischen Nucleus, der *Tenia Tecta*, dem olfaktorischen Tuberkel und dem piriformen Cortex zur weiteren Verarbeitung der sensorischen Information (Gottfried, 2006; Rotermund *et al.*, 2019).

Der komplexe zelluläre Aufbau des *Bulbus olfactorius* und das enge Zusammenspiel von synaptischer Exzitation und Inhibition, bildet die Basis zur Verarbeitung eingehender Geruchsinformationen. Allerdings spielen bei der Modulation eingehender Informationen nicht nur die Eigenschaften unterschiedlicher Neuron-Populationen eine Rolle, sondern ebenfalls die von Gliazellen. Im Folgenden wird zunächst allgemein auf die Funktionen von Gliazellen (1.2), im Besonderen auf die Funktion von Astrozyten (1.2.1-1.2.2, 1.4, 1.5), eingegangen, und schließlich auf die Eigenschaften der exklusiv im olfaktorischen System vorkommenden OECs (1.6).

1.2 Funktionelle Heterogenität von Gliazellen

Gliazellen (*glia* – Leim, *griechisch*) stellen mit ungefähr 65% aller Zellen die größte Zellpopulation des adulten murinen ZNS dar (Allen und Barres, 2009). Trotz dieses prominenten Anteils wurde ihnen lange Zeit eine untergeordnete, eher unterstützende Funktion in der neuronalen Signalverarbeitung und Weiterleitung zugesprochen. Heute ist bekannt, dass Gliazellen eine hohe Heterogenität aufweisen und unterschiedlichste Funktionen erfüllen, die weit über eine rein unterstützende Funktion für Neurone hinausgehen. Im ZNS unterscheidet man zwischen den Makrogliazellen, zu denen Oligodendrozyten und Astrozyten gehören, und den Mikrogliazellen (Haydon, 2001). Makrogliazellen entstammen, wie Neurone, dem Neuroektoderm und sind folglich Bestandteil des ZNS (Verkhratsky und Kettenmann, 1996). Die zentrale Aufgabe der Oligodendrozyten besteht in der Isolation von Axonen über eine lipidhaltige Proteinschicht, die Myelinscheide, und somit der Begünstigung einer schnellen Aktionspotential-Leitgeschwindigkeit. Ein Oligodendrozyt kann dabei mehrere Axone myelinisieren, wohingegen Schwann-Zellen, als Analogon im peripheren Nervensystem (PNS), jeweils nur ein Axon myelinisieren (Simons und Trotter, 2007). Die zweite Population von Makrogliazellen, die Astrozyten, erfüllen vielfältige Aufgaben. Zu diesen gehören die Modulation synaptischer Übertragung (1.2.1), die Aufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt (1.2.1), die Kontrolle der extrazellulären Ionenhomöostase (1.4), sowie die Kontrolle des lokalen Blutflusses (1.2.2).

Mikrogliazellen sind mesodermalen Ursprungs und wandern früh in der Entwicklung über die Blutzirkulation ins ZNS ein (Verkhratsky und Kettenmann, 1996; Allen und Barres, 2009). Folglich sind sie aus entwicklungsbiologischer Sicht nicht Bestandteil des ZNS, gewährleisten allerdings als Teil des Immunsystems lebenswichtige Hirnfunktionen. So überprüfen sie das ZNS konstant auf Beschädigungen und Infektionen und phagozytieren Zellrückstände und Pathogene. In der Entwicklung spielen sie darüber hinaus eine große Rolle bei der Umstrukturierung von synaptischen Verbindungen, wobei sie nicht verwendete Verbindungen ebenfalls phagozytieren (Allen und Barres, 2009).

1.2.1 Astrozyten modulieren die synaptische Übertragung an dreiteiligen Synapsen

Astrozyten weisen eine annähernd sternförmige (*astros* – Stern, *griechisch*) Morphologie auf und besitzen fünf bis zehn primäre Ausläufer, welche sich in unzählige kleine Ausläufer verzweigen. Ein Astrozyt erreicht ein durchschnittliches Gesamtvolumen von ungefähr $66000 \mu\text{m}^3$ (Bushong *et al.*, 2002). Klassischerweise unterteilt man Astrozyten in protoplasmatische Astrozyten, welche sich in der grauen Substanz befinden, und in fibröse Astrozyten, welche sich in der weißen Substanz befinden. Insgesamt sind Astrozyten jedoch eine sehr heterogene Population, welche sich zwischen und innerhalb der verschiedenen Hirnareale unterscheiden. In der grauen Substanz sind sie oft an synaptischen Verschaltungsstellen lokalisiert und modulieren maßgeblich die synaptische Übertragung zwischen prä- und postsynaptischen Neuronen. Im *Stratum radiatum* der hippocampalen CA1-Region sind 60% der Synapsen mit astrozytären Ausläufern assoziiert (Ventura und Harris, 1999). Ein einziger Astrozyt kann dabei bis zu 140000 Synapsen beeinflussen (Bushong *et al.*, 2002). Dieser zelluläre Aufbau wird als dreiteilige Synapse (*tripartite synapse*) bezeichnet (Araque *et al.*, 1999). Kommt es zur präsynaptischen, vesikulären Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt, erregen diese die entsprechenden postsynaptischen Rezeptoren, was je nach Rezeptor und nachstehender Signalkaskade eine Depolarisation oder Hyperpolarisation der postsynaptischen neuronalen Membran initiiert (Abbildung 3). Assoziierte Astrozyten exprimieren ebenfalls eine Vielzahl an Rezeptoren, welche in Folge der Neurotransmitterfreisetzung simultan erregt werden können. Diese Erregung geht zumeist mit einem astrozytären intrazellulären Ca^{2+} -Signal einher, welches die Freisetzung von sogenannten Gliotransmittern evoziert. Gliotransmitter sind extrazelluläre Signalmoleküle, welche in Gliazellen synthetisiert oder gespeichert werden und in Folge eines Stimulus freigesetzt werden (Parpura und Zorec, 2010). Sowohl prä- als auch postsynaptisch können entsprechende Rezeptoren für den freigesetzten Gliotransmitter lokalisiert sein, welche die ursprüngliche Neurotransmission auf unterschiedliche Weise modulieren können (Allen und Barres, 2009). So kann zum einen die Präsynapse inhibiert werden, was eine reduzierte Neurotransmitterfreisetzung zur Folge hat. Zum anderen kann die postsynaptische Membran stärker erregt oder inhibiert werden. Die Organisation von Astrozyten in großen funktionellen Netzwerken ermöglicht darüber hinaus die Modulation distaler Synapsen (Bezzi und Volterra, 2001).

Einleitung

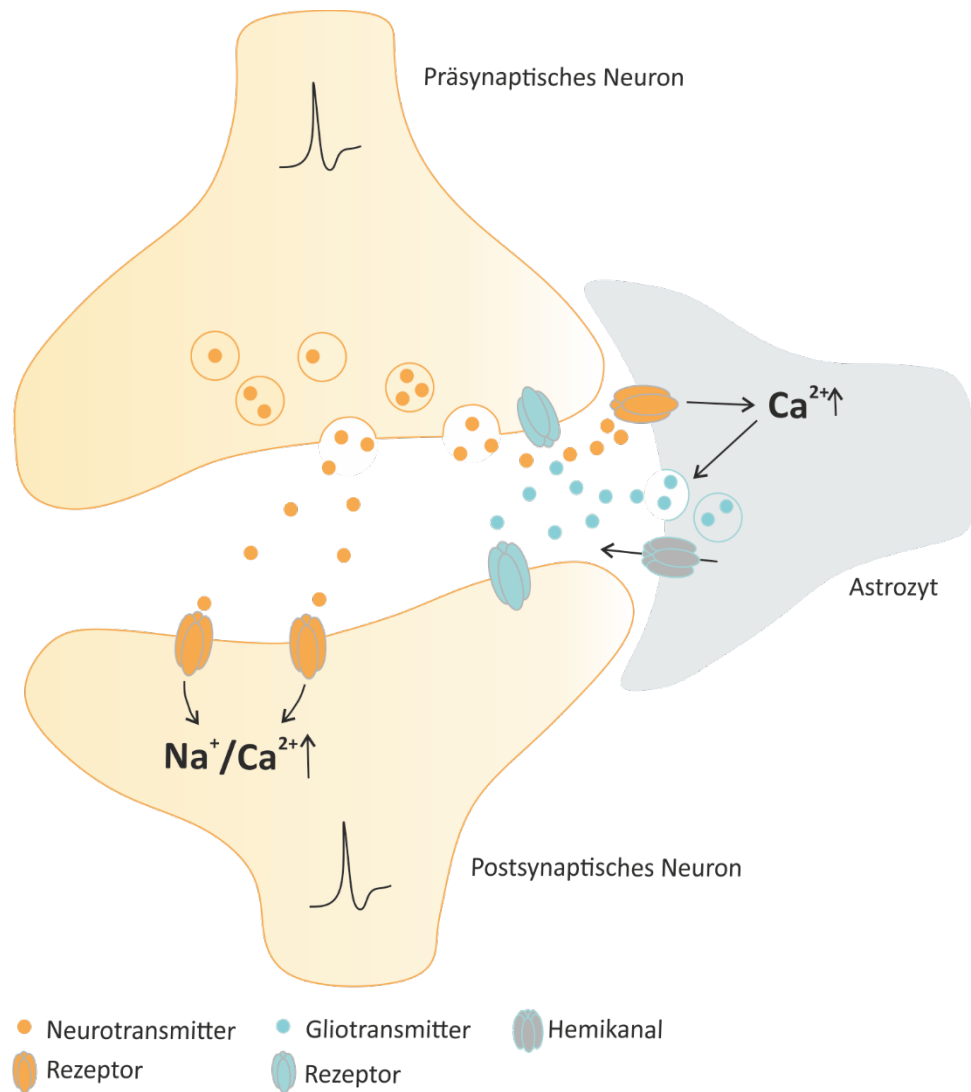


Abbildung 3 Dreiteilige Synapse und Modulation synaptischer Übertragung

Die Exzitation des präsynaptischen Neurons führt zur Exozytose von Neurotransmittern, welche im synaptischen Spalt an die entsprechenden Rezeptoren an der postsynaptischen Membran binden. Die Aktivierung dieser initiiert die Erregung der Postsynapse und die Signalweiterleitung. Simultan binden präsynaptisch freigesetzte Neurotransmitter an Rezeptoren assoziierter Astrozyten. Dies führt in der Regel zu einem astrozytären intrazellulären Ca^{2+} Signal, welches die Transmission von Gliotransmittern initiiert. Freigesetzte Gliotransmitter können schließlich Rezeptoren aktivieren, die sowohl prä-, als auch postsynaptisch lokalisiert sein können. Zwei prominente Freisetzungsmechanismen in Astrozyten sind dabei die Ca^{2+} -abhängige Exozytose und die Freisetzung über Hemikanäle. Die sekundären Prozesse können die synaptische Übertragung maßgeblich modulieren. Basierend auf Allen und Barres (2009).

Die astrozytäre Eigenschaft, Gliotransmitter freizusetzen, wurde erstmals von Shain *et al.* beschrieben, welche die Freisetzung der Aminosäure Taurin nach einer β -adrenergen Stimulation in einer astrozytären Primärkultur nachwiesen (Shain *et al.*, 1984). Folgend wurden viele weitere Gliotransmitter identifiziert. Zu diesen gehören Glutamat (Parpura *et al.*, 1994; Araque *et al.*, 1998; Bezzi *et al.*, 1998), D-Serin (Mothet *et al.*, 2000), GABA (Kozlov *et al.*, 2006),

ATP (Guthrie *et al.*, 1999; Coco *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003) sowie verschiedene Neuropeptide, Wachstumsfaktoren (Martin, 1992; Ciccarelli *et al.*, 1999) und der Tumornekrose-Faktor TNF α (Stellwagen und Malenka, 2006). Die mechanische oder elektrische Stimulation von Astrozyten induziert beispielsweise zunächst ein Ca²⁺-Signal in Astrozyten und einen folgenden langsamen Glutamat-abhängigen Einwärtsstrom in assoziierten Neuronen einer hippocampalen Ko-Kultivierung (Araque *et al.*, 1998). Auch konnte gezeigt werden, dass die Gliotransmission mittels D-Serin, dem endogenen Agonist der Glycin-Bindestelle des NMDA-Rezeptors, maßgeblich zur Etablierung der Langzeitpotenzierung (LTP) in Kultur und akuten Hippocampus-Schnitten beiträgt (Yang *et al.*, 2003; Henneberger *et al.*, 2010). Es sind unterschiedliche Mechanismen zur Freisetzung von Gliotransmittern bekannt. So kann die Freisetzung über Ca²⁺-abhängige Exozytose von Vesikeln (Bezzi *et al.*, 2004; Montana *et al.*, 2006; Jourdain *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2017) und Lysosomen (Zhang *et al.*, 2007) erfolgen. Darüber hinaus ist die Freisetzung über Hemikanäle (Kang *et al.*, 2008), P2X₇-Rezeptoren (Suadicani *et al.*, 2006), und volumenregulierte Anion-Kanäle beschrieben (Lee *et al.*, 2010; Sahlender *et al.*, 2014). Neben der Modulation synaptischer Transmission spielen Astrozyten an dreiteiligen Synapsen im Recycling von Neurotransmittern eine entscheidende Rolle. Um eine schnelle Entfernung entsprechender Signalmoleküle, wie z.B. Glutamat aus dem synaptischen Spalt zu gewährleisten, exprimieren Astrozyten eine Vielzahl von Transportsystemen, welche die Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt transportieren. Anschließend können sie intrazellulär enzymatisch umgebaut werden, sodass die Stoffwechselprodukte schließlich dem präsynaptischen Neuron zur erneuten Synthese des Neurotransmitters zur Verfügung gestellt werden können (Bak *et al.*, 2006).

1.2.2 Astrozyten vermitteln neurometabolische und neurovaskuläre Kopplung

Neben den bereits erwähnten Funktionen stellen Astrozyten als Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke (engl. *blood brain barrier*, BBB) ein wichtiges zelluläres Bindeglied zwischen dem Blutgefäßsystem und den Neuronen dar. Die BBB ist eine physiologische Barriere, welche Diffusion und Transport unterschiedlicher Substanzen aus dem Blutkreislauf ins ZNS kontrolliert. Während kleine lipophile Substanzen und Gase, wie O₂ und CO₂, die Blut-Hirn-Schranke leicht passieren können, müssen Nährstoffe und Aminosäuren mittels spezialisierter Transportsysteme transportiert werden (Ballabh *et al.*, 2004; Abbott *et al.*, 2010). Klassischerweise besteht die BBB aus drei zellulären Komponenten, den Endothelzellen, den Perizyten und den Astrozyten. Benachbarte Endothelzellen sind dabei über *tight junctions* verbunden, welche die physikalische Barriere der BBB bilden (Abbott *et al.*, 2006). Die zelluläre Organisation der BBB ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt. Perizyten sind kontraktile Zellen, welche der Basallamina der Endothelzellen aufliegen. Sie stabilisieren das Blutgefäß und tragen zum Blutgefäßwachstum (Angiogenese) bei. Darüber hinaus phagozytieren sie Zellüberreste. Es wird vermutet, dass die Expression von kontraktile Proteinen, wie α -Aktin, es Perizyten zusätzlich ermöglicht den Blutfluss aktiv zu regulieren (Hirschi und D'Amore, 1996; Peppiatt *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2014; Attwell *et al.*, 2016). Den Perizyten liegen wiederum Astrozyten-Endfüßchen auf. Sie bilden eine durchgehende und überlappende Hülle um die Blutgefäße, welche <20 nm bis 300 nm dick sein kann (Mathiisen *et al.*, 2010).

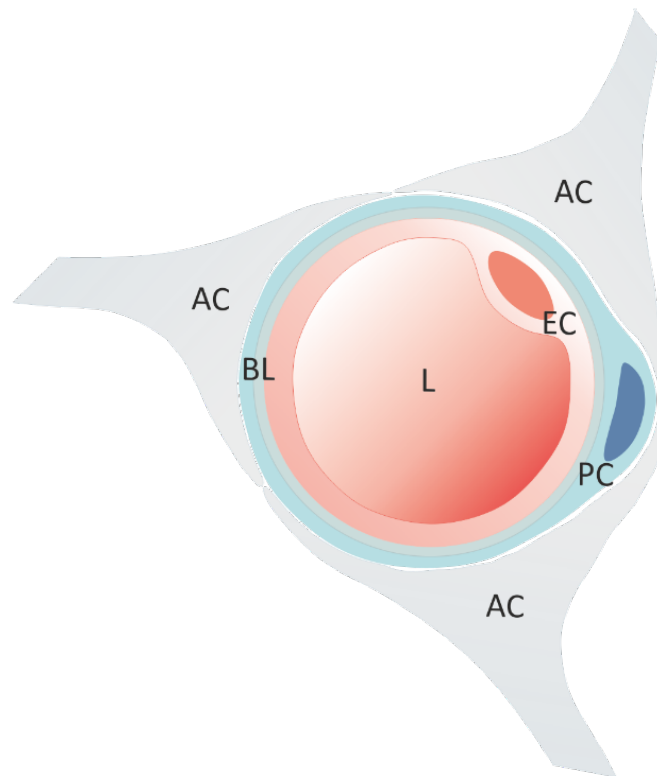


Abbildung 4 Organisation der Blut-Hirn-Schranke

Das Lumen (L) der Kapillare ist umschlossen von Endothelzellen (EC). Auf der darüber liegenden Basallamina (BL) liegen Perizyten (PC) auf. Die astrozytären Endfüßchen (AC) bilden das zelluläre Bindeglied zwischen dem Blutgefäßsystem und dem lokalen zellulären Netzwerk.

Die Neuronale Informationsverarbeitung und Weiterleitung hat einen hohen Energiebedarf, der ungefähr 20% des Gesamtenergie-Umsatzes des Körpers umfasst (Harris *et al.*, 2012). Die intermediäre Position von Astrozyten, welche zum einen an synaptischen Verschaltungsstellen und zum anderen an dem Blutgefäßsystem lokalisiert sind, ermöglicht die Adaptation der Glukose-Aufnahme an den Energiebedarf der aktiven Neurone. Die Astrozyt-Neuron-Lactat-Shuttle-Hypothese (ANLSH) beschreibt dabei einen Mechanismus, bei dem Astrozyten Glukose als Energielieferant aus dem perivaskulären Raum aufnehmen, zu Lactat verstoffwechseln und dieses naheliegenden Neuronen zur ATP-Gewinnung zur Verfügung stellen (Belanger *et al.*, 2011a).

Erhöhte neuronale Aktivität an glutamatergen Synapsen und die damit einhergehende vermehrte Freisetzung von Glutamat induziert einen erhöhten astrozytären Glutamat-Transport. Astrozyten exprimieren den Glutamat-Transporter 1 (GLT-1), und den Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST) (Bak *et al.*, 2006). Sowohl GLT-1 als auch GLAST stellen Antiporter

dar, welche neben Glutamat, Na^+ und H^+ in die Zelle transportieren und K^+ hinaus. Um die intra- und extrazelluläre Ionenhomöostase aufrecht erhalten zu können, bedingt die erhöhte Akkumulation von intrazellulären Na^+ bzw. von extrazellulären K^+ , eine gesteigerte Aktivität der Na^+/K^+ ATPase, welche 3 Na^+ hinaus und 2 K^+ hinein transportiert. Dies hat wiederum einen erhöhten ATP-Verbrauch zur Folge und initiiert die Aufnahme von Glukose aus dem perivaskulären Raum über den Glukose-Transporter-1 (GLUT-1) und eine erhöhte Glykolyserate in Astrozyten (Bittner *et al.*, 2011). Glukose kann nun entweder in Form von Glykogen gespeichert oder zu Pyruvat verstoffwechselt werden (Glykolyse) (Belanger *et al.*, 2011a; Escartin und Rouach, 2013). Pyruvat wird anschließend entweder in den astrozytären Tricarbonsäurezyklus eingeschleust, oder durch die Katalyse der Lactatdehydrogenase 5 (LDH5) zu Lactat verstoffwechselt. Lactat kann nun über Monocarboxylat-Transporter (MCT) transportiert und der Präsynapse zur Verfügung gestellt werden (Magistretti *et al.*, 1994; Pellerin *et al.*, 2007). Diese synthetisiert ihrerseits Pyruvat aus dem gewonnenen Lactat. In dem folgenden Tricarbonsäurezyklus und der anschließenden oxidativen Phosphorylierung kann schließlich ATP in den Mitochondrien gewonnen werden. Erhöhte neuronale Aktivität führt also zu einer erhöhten Glukoseaufnahme der entsprechenden Regionen (Belanger *et al.*, 2011b). Darüber hinaus kann die astrozytäre Glukoseaufnahmerate über die Modulation des zerebralen Blutflusses reguliert werden. Dabei fördert eine Vasodilatation (Blutgefäßerweiterung) eine erhöhte Glukoseaufnahme, wobei eine Vasokonstriktion (Blutgefäßverengung) mit einer geringeren Glukoseaufnahme assoziiert ist (Attwell *et al.*, 2010). Der Prozess, bei dem neuronale Aktivität direkten Einfluss auf lokalen Blutfluss nimmt, wird als neurovaskuläre Kopplung bezeichnet (Leybaert, 2005; Belanger *et al.*, 2011b; Escartin und Rouach, 2013). Studien an akuten Hirnschnitten zeigen, dass die endogene Glutamatfreisetzung mGluR-vermittelte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten induziert, wodurch assoziierte Arteriolen dilatieren (Zonta *et al.*, 2003; Filosa *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist bekannt, dass im cerebralen Cortex adulter Mäuse der Ca^{2+} -Einstrom über ATP-sensitive P2X-Rezeptoren in Astrozyten ebenfalls eine Dilatation assoziierter Blutgefäße initiiert (Mishra *et al.*, 2016). Die Ca^{2+} -abhängige Produktion der Phospholipase A_2 (PLA₂) oder Phospholipase D_2 (PLD₂) katalysiert die Synthese von Arachidonsäure (AA) im astrozytären Endfüßchen, welches zu den dilatationsaktiven Produkten Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Epoxyeicosatriensäure (EET) metabolisiert wird (Gordon *et al.*, 2007; Carmignoto und Gomez-Gonzalo, 2010; Mishra *et al.*, 2016). Die Freisetzung von PGE₂ und EET aktiviert K^+ -Kanäle, wobei der folgende K^+ -Ausstrom die glatten

Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC), welche die Gefäßwand der Arteriole bilden, hyperpolarisiert. Die entstandene Hyperpolarisation begünstigt die Entspannung der SMC und resultiert in einer Dilatation des Blutgefäßes (Gordon *et al.*, 2007). Vergleichbare Studien zeigen weiterhin, dass mGluR-vermittelte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten über die Produktion von AA ebenfalls Vasokonstriktionen initiieren (Mulligan und MacVicar, 2004). Dabei wird AA zu 20-Hydroxyeicosatetraenoin-Säure (20-HETE) metabolisiert. Diese Synthese initiiert die Inhibition von K^+ -Kanäle in glatten Muskelzellen, was entsprechend zu einer Vasokonstriktion führt (Gebremedhin *et al.*, 2000). Weiterhin führt eine erhöhte extrazelluläre K^+ Konzentration, zur Hyperpolarisation von glatten Muskelzellen und zur Vasodilatation (Filosa *et al.*, 2006; Filosa und Blanco, 2007).

1.3 Ca^{2+} als ubiquitäres Signalmolekül

Ca^{2+} reguliert eine Vielzahl an intra-und interzellulären Prozessen in eukaryotischen Zellen. Zu ersteren zählen u.a. die Transkription und die posttranslationale Proteinmodifikation sowie Ca^{2+} -regulierte Apoptose (McConkey und Orrenius, 1996; Flavell und Greenberg, 2008). Neben unterschiedlichen intrazellulären Prozessen ist auch die interzelluläre Kommunikation im ZNS maßgeblich von Ca^{2+} als Signalmolekül abhängig: In Neuronen ist die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Folge einer ausreichend starken Depolarisation und leitet die präsynaptische Exozytose von Neurotransmittern ein. Die Kommunikation innerhalb glialer Netzwerke erfolgt sowohl über die Ca^{2+} -abhängige Exozytose von Gliotransmittern als auch über direkten Austausch von Ca^{2+} über Zell-Zell-Verbindungen, sogenannte *gap junctions* (Haydon, 2001). All diese Prozesse unterliegen einer stark regulierten Ca^{2+} -Homöostase, bei der die ruhende zytosolische Ca^{2+} -Konzentration <150 nM beträgt (Verkhratsky und Kettenmann, 1996). Extrazellulär liegt eine Ca^{2+} -Konzentration von 1-2 mM vor, wobei die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher eine Konzentration von 0,1-1 mM aufweisen (Deitmer *et al.*, 2009). Dementsprechend entsteht ein chemischer Gradient über der Zellmembran und dem Zytosol sowie über der Membran intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher und dem Zytosol. Folglich kann ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zum einen aus dem extrazellulären Milieu oder aus intrazellulären Speichern erfolgen. Der schnelle und reversible Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wird als Ca^{2+} -Signal bezeichnet. Ca^{2+} -Signale können mittels chemischer oder genetischer Ca^{2+} -Indikatoren und konfokaler Laserrastermikroskopie untersucht werden.

Sie gelten bei elektrisch nicht erregbaren Zellen, wie Gliazellen, als eine hervorragende Möglichkeit um zelluläre Aktivität zu untersuchen. Ein direkter Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum kann über Ca^{2+} -permeable Rezeptor-gesteuerte Ionenkanäle (*receptor-operated channels*, ROC) erfolgen. Zu diesen gehören z.B. ionotrope NMDA-Rezeptoren und Ca^{2+} -permeablen AMPA-Rezeptoren. Beide binden Glutamat als endogenen Liganden. Außerdem kann eine entsprechende Membrandepolarisation spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle öffnen und einen Ca^{2+} -Einstrom initiieren (*voltage-operated channels*, VOC). Darüber hinaus können sogenannte *store operated* Ca^{2+} -Kanäle, geöffnet werden, um Ca^{2+} zur Befüllung von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern bereitzustellen. Die Aktivierung metabotroper Rezeptoren ist oft mit einer Phospholipase C (PLC) vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern assoziiert. Zu den wichtigsten Speicherorganellen gehören das endoplasmatische Retikulum (ER), Mitochondrien, Lysosomen und Kalziosomen (Deitmer *et al.*, 2009). Das G-Protein des Rezeptors stimuliert die Aktivität der PLC, wobei die sekundären Messenger Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP_3) entstehen. IP_3 aktiviert Ca^{2+} -permeable IP_3 -Rezeptoren, welche in der Organellenmembran des ERs lokalisiert sind, und induziert die Freisetzung von Ca^{2+} aus den Speichern. Darüber hinaus sind die ER der meisten Zellen mit Ryanodinrezeptoren (Ry-R) ausgestattet, welche Ca^{2+} oder zyklische ADP-Ribose als Liganden binden. Die initiale Ca^{2+} -Freisetzung aus den Speichern initiiert also eine Verstärkung des Ca^{2+} -Signals über Ry-R, ein Mechanismus der als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (engl. *calcium-induced calcium release*, CICR) bezeichnet wird (Sitsapesan *et al.*, 1995; Verkhratsky und Shmigol, 1996). Um die hohe Ca^{2+} -Konzentration der Speicherorganellen aufrecht zu erhalten oder nach einem entsprechenden Ca^{2+} -Signal wiederherzustellen, transportieren Ca^{2+} -ATPasen des sarkoplasmatischen endoplasmatischen Retikulums (SERCA), welche in die ER-Membran eingelassen sind, Ca^{2+} unter ATP-Verbrauch in das ER. Simultan transportieren Ca^{2+} -ATPasen und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher der Plasmamembran Ca^{2+} nach außen. Daher muss der zuvor geleerte Ca^{2+} -Speicher neben dem zytosolisch verfügbaren Ca^{2+} ebenfalls mit extrazellulären Ca^{2+} über SOC befüllt werden. Dieser Prozess wird als *store-operated calcium entry* (SOCE) bezeichnet (Verkhratsky und Parpura, 2014).

1.4 Interzelluläre Kommunikation in glialen Netzwerken

Astrozyten sind untereinander über *gap junctions* vernetzt und bilden komplexe zelluläre Netzwerke. Dabei lagert sich jeweils ein Connexon (Hemikanal), der in die Plasmamembran eines Astrozyten eingelassen ist, mit einem Connexon eines benachbarten Astrozyten zu einem *gap junction* zusammen, wodurch eine direkte Verbindung beider Zytoplasmen geschaffen wird. Ein Connexon weist eine hexametrische Struktur auf und besteht aus sechs Untereinheiten, den Connexinen. Die Connexone/*gap junctions* weisen eine unselektive Permeabilität für K^+ , Na^+ und Ca^{2+} auf und begünstigen den Transfer dieser Ionen zwischen benachbarten Astrozyten. Dieser Mechanismus wird als elektrische Kopplung bezeichnet (Pannasch *et al.*, 2011), da über den Ionenfluss zwischen den Zellen auch z.B. eine Depolarisation von Zelle zu Zelle übertragen werden kann. Darüber hinaus können andere Signalmoleküle, Metabolite und Aminosäuren mit einer Größe von bis zu 1,2 kDa über *gap junctions* ausgetauscht werden (Biochemische Kopplung) (Giaume und Theis, 2010; Theis und Giaume, 2012; Pannasch und Rouach, 2013). Bei Säugetieren sind über 20 Connexin-Isoformen bekannt, wobei mindestens zwölf davon von unterschiedlichen Genen kodiert werden (Bennett *et al.*, 1994; Willecke *et al.*, 2002). Connexone können dabei eine homomerische Struktur aufweisen und aus Connexinen desselben Typs bestehen, oder aus unterschiedlichen Connexinen aufgebaut sein (heteromerisch). *Gap junctions* können ebenso aus Connexonen eines Connexintyps (homotypisch) oder unterschiedlicher Connexine (heterotypisch) bestehen (Bruzzone *et al.*, 1996; Orthmann-Murphy *et al.*, 2008). Die Differenzierung der Connexin-Isoformen erfolgt über das postulierte Molekulargewicht, welches namensgebend für die jeweilige Isoform ist (Willecke *et al.*, 2002). Astrozyten exprimieren hauptsächlich Connexin 43 (Cx43, Gen: *Gja1*), Connexin 30 (Cx30, Gen: *Gjb6*) und Connexin 26 (Cx26, Gen: *Gjb2*) (Dermietzel *et al.*, 1989; Nagy *et al.*, 2001; Nagy *et al.*, 2003b; Orthmann-Murphy *et al.*, 2007; Orthmann-Murphy *et al.*, 2008). Oligodendrozyten hingegen exprimieren Connexin 32 (Cx32, Gen: *Gjb1*) und Connexin 47 (Cx47, Gen: *Gjb2*) (Dermietzel *et al.*, 1989; Nagy *et al.*, 2003a; Odermatt *et al.*, 2003). Neben rein astrozytären Netzwerken (A-A Netzwerke), die in der Regel über homotypische Cx43-Cx43 oder Cx30-Cx30 *gap junctions* geknüpft werden, existieren auch gliale Netzwerke aus Astrozyten und Oligodendrozyten (A-O Netzwerke) (Orthmann-Murphy *et al.*, 2008; Rash, 2010; Griemsmann *et al.*, 2015; Augustin *et al.*, 2016; Moshrefi-Ravasdjani *et al.*, 2017; Meyer *et al.*, 2018; Wadle *et al.*, 2018). Diese werden als pangliale Netzwerke bezeichnet und besitzen aufgrund der unterschiedlichen Connexinexpressionsprofile von

Astrozyten und Oligodendrozyten heterotypische *gap junctions* (Orthmann-Murphy *et al.*, 2008).

Zu den bekannten Funktionen astrozytärer und panglialer Netzwerke zählen die Versorgung distaler Neurone mit Glukose oder Lactat (Rouach *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2018). Darüber hinaus spielen gliale Netzwerke eine zentrale Rolle bei der Regulation der extrazellulären K^+ -Homöostase. Die neuronale Repolarisation erfordert das Öffnen von K^+ -Kanälen, sodass K^+ ausströmt und sich extrazellulär anreichert. Um eine geringe extrazelluläre K^+ -Konzentration zu gewährleisten, ist eine schnelle Entfernung von K^+ essentiell. Astrozyten weisen üblicherweise ein Ruhemembranpotential von ungefähr -90 mV auf. Dies liegt nahe des K^+ -Umkehrpotentials, sodass die Anreicherung von extrazellulären K^+ zum K^+ -Einstrom über einwärts-rectifizierende K^+ -Kanäle (Kir-Kanäle) führt. K^+ kann nun durch das gliale Netzwerk an weniger aktive Regionen umverteilt werden. Dieser Mechanismus wird als räumliche Kaliumpufferung (engl. *spatial potassium buffering*) bezeichnet.

Des Weiteren erfolgt die interzelluläre Kommunikation in astrozytären Netzwerken über die Generierung sogenannter Ca^{2+} -Wellen. Dabei kann durch unterschiedliche Stimuli ein Ca^{2+} -Signal in einer Initiatorzelle ausgelöst werden, welche dieses Signal an ihre Nachbarzellen und schließlich an das gesamte Netzwerk weiterleitet (Cornell-Bell und Finkbeiner, 1991). Die Initiation solcher Ca^{2+} -Wellen kann die Folge unterschiedlicher Stimuli sein. Zu diesen zählen die Applikation von Glutamat, neuronale Aktivität, elektrische sowie mechanische Stimulationen (Cornell-Bell *et al.*, 1990; Charles *et al.*, 1991; Dani *et al.*, 1992). Erstmals beschrieben wurden Ca^{2+} -Wellen in kultivierten hippocampalen Astrozyten. Die Applikation von Glutamat initiiert eine Ca^{2+} -Welle, die mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von 19 $\mu\text{m/s}$ propagiert und bis zu 59 Astrozyten umfasst (Cornell-Bell *et al.*, 1990). Darüber hinaus konnten astrozytäre Ca^{2+} -Wellen bereits *in-situ* und *in-vivo* im Hippocampus beschrieben werden (Dani *et al.*, 1992; Kuga *et al.*, 2011). Es sind mehrere Mechanismen zur Weiterleitung der Ca^{2+} -Signale zwischen benachbarten Astrozyten bekannt. Zum einen ist ein direkter Transfer von Ca^{2+} oder IP_3 über *gap junctions* möglich (Boitano *et al.*, 1992; Charles *et al.*, 1992). Zum anderen kann die Kommunikation über extrazelluläre Signalkaskaden erfolgen (Hassinger *et al.*, 1996). Das Ca^{2+} -Signal der Initiatorzelle induziert dabei die Freisetzung von Gliotransmittern, welche an entsprechende Rezeptoren benachbarter Astrozyten binden und ihrerseits ein Ca^{2+} -Signal initiieren. Guthrie *et al.* zeigten, dass ATP als extrazelluläres Signalmolekül die Weiterleitung

von Ca^{2+} -Wellen begünstigt (Guthrie *et al.*, 1999). Dabei können Astrozyten ATP vesikulär, über Hemikanäle oder auch Ca^{2+} -unabhängig über Volumen-regulierte Anionkanäle freisetzen (Stout *et al.*, 2002; Bowser und Khakh, 2007; Anselmi *et al.*, 2008; Fujii *et al.*, 2017). Es wird vermutet, dass die *gap junction*-vermittelte Signalweiterleitung eher zwischen benachbarten, proximalen Astrozyten erfolgt, während die Signalweiterleitung über einen extrazellulären Messenger eher entferntere, distale Astrozyten anspricht (Haydon, 2001; Fujii *et al.*, 2017). Die Propagation von Ca^{2+} -Wellen astrozytärer Netzwerke und die einhergehende Freisetzung von Gliotransmittern kann maßgeblich die synaptische Übertragung distaler Regionen beeinflussen (Leybaert und Sanderson, 2012; Pannasch und Rouach, 2013). Im Folgenden sind die Mechanismen zur Propagation interzellulärer Ca^{2+} -Wellen zusammengefasst (Abbildung 5).

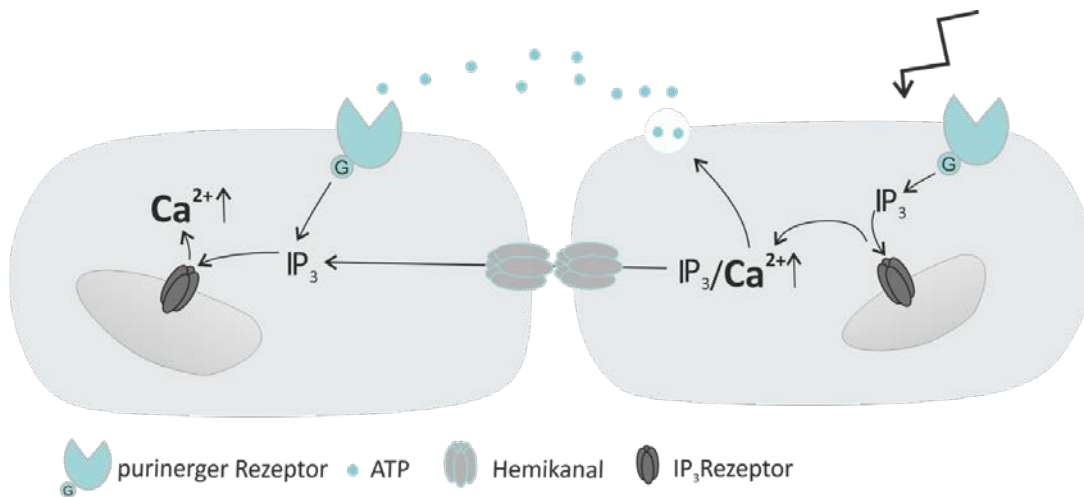


Abbildung 5 Weiterleitung interzellulärer Ca^{2+} -Wellen in glialen Netzwerken

Ein externer Stimulus (Pfeil) induziert ein Ca^{2+} -Signal in einer Initiatorzelle über einen Gq-vermittelten Signalweg, welcher mit einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern einhergeht. Die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration vermittelt zum einen die vesikuläre Freisetzung von ATP, welches purinerge Rezeptoren benachbarter Zellen erregt. Zum anderen kann Ca^{2+} oder IP_3 *gap junctions* passieren und über die Ca^{2+} - oder IP_3 -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern ein Ca^{2+} -Signal in benachbarten Zellen initiieren. Basierend auf Haydon (2001).

1.5 Die Funktion von Astrozyten im *Bulbus olfactorius*

Astrozyten sind in fast allen Schichten des *Bulbus olfactorius* lokalisiert, wobei die äußere ONL keine astrozytären Strukturen aufweist und in der inneren ONL lediglich vereinzelt astrozytäre Ausläufer zu finden sind. Die Somata dieser Astrozyten sind dabei in der darunter liegenden GL lokalisiert. In den tieferen Schichten des OBs, wie dem EPL, IPL und GCL, weisen Astrozyten eine im weitesten Sinne klassische sternförmige Morphologie auf - im Gegensatz zu der Mehrheit

der Astrozyten des GLs. Diese zeichnen sich durch einen kegelförmigen Aufbau aus, wobei das Soma sich am Apex des Kegels befindet und die Ausläufer in das Zentrum eines Glomerulus projizieren (uniglomerular) (Bailey und Shipley, 1993). Darüber hinaus sind die Astrozyten eines Glomerulus über *gap junctions* verbunden, sodass sie eine funktionelle Einheit bilden (Roux *et al.*, 2011). Neuronale Aktivität der ORNs induziert Ca^{2+} -Signale in Astrozyten, die über glutamaterge und purinerge Rezeptoren vermittelt werden (Doengi *et al.*, 2008). ATP-induzierte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten sind P2Y_1 -Rezeptor vermittelt, wobei ATP schnell aufgrund der hohen Aktivität von lokalen Ektonukleotidasen zu ADP, AMP und schließlich zu Adenosin hydrolysiert wird (Langer *et al.*, 2008). Adenosin wiederum evoziert A_{2A} -Rezeptor-vermittelte Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten (Doengi *et al.*, 2008). Zusätzlich initiiert die Freisetzung von Glutamat aus den ORN-Axonterminalen in juvenilen Tieren Ca^{2+} -Signale in Astrozyten über mGluR_5 und ionotrope Ca^{2+} -permeable AMPA-Rezeptoren (Droste *et al.*, 2017). Otsu *et al.* zeigten allerdings, dass die Expression von mGluR_5 in juxtaglomerulären Astrozyten während der frühen postnatalen Entwicklung herunter reguliert wird und somit in adulten Mäusen keine mGluR_5 -vermittelten Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten mehr messbar sind (Otsu *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2013). AMPA-Rezeptor-vermittelte Ca^{2+} -Transienten hingegen persistieren bis ins adulte Stadium (Droste *et al.*, 2017). Über die Auswirkungen dieser komplex regulierten glialen Ca^{2+} -Transienten ist nur sehr wenig bekannt. Unterschiedliche *in-vivo* Studien am OB konnten jedoch zeigen, dass die Applikation von Duftstoffen, Glutamat-vermittelte Ca^{2+} -Transienten in juxtaglomerulären Astrozyten initiiert, welche die Vasodilatation assoziierter Kapillaren zur Folge haben (Petzold *et al.*, 2008; Otsu *et al.*, 2015). Welche Funktionen Astrozyten bei der Modulation des neuronalen glomerulären Netzwerks einnehmen, ist ebenso noch nicht verstanden. Es konnte aber bereits Hemikanal-abhängige ATP-Freisetzung von Astrozyten gezeigt werden, die Membranoszillationen von Mitralzellen modulieren (Roux *et al.*, 2015). Darüber hinaus führt eine mechanische Stimulation von Astrozyten zur Freisetzung von GABA, was wiederum inhibitorisch auf Mitralzellen wirkt (Kozlov *et al.*, 2006).

1.6 Axon-OEC-Interaktion in der olfaktorischen Nervenfaserschicht

Die hochspezialisierten OECs entstammen der Neuralleiste und werden daher oft als periphere Gliazellen klassifiziert (Barraud *et al.*, 2010). OECs umhüllen und begleiten die ORN-Axone auf ihrem gesamten Weg von der Peripherie in den OB. Demnach befinden sie sich sowohl in der *Lamina Propria* (Teil der Riechschleimhaut) als auch in der äußersten Schicht des OBs, der ONL, welche als Übergangszone von PNS zu ZNS bezeichnet wird (Doucette, 1984; 1991). OECs sekretieren eine Vielzahl an neurotrophen Faktoren, welche axonales Wachstum und Sprossung fördern. Zu diesen zählen NGF (*nerve growth factor*), GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) und NT-3,4,5 (Neurotrophin) (Key *et al.*, 1996; Woodhall *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2015). Diese Mediatoren fungieren als Leitsignale und werden überwiegend von Zielstrukturen freigesetzt, die über einen Konzentrationsgradienten chemotaktisch die Orientierung der Axone und das gezielte Wachstum unterstützen. Darüber hinaus exprimieren OECs unterschiedliche Zell-Adhäsionsmoleküle (CAMs, *cell adhesion molecule*), welche als klassische Regulatoren der axonalen Zielfindung gelten (Crandall *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2015). CAMs werden üblicherweise auf der Zelloberfläche exprimiert und können sowohl homophile (also von CAM zu CAM desselben Typs) als auch heterophile Verbindungen (also zwischen CAM und CAMs eines anderen Typs) eingehen. Auf diese Weise schaffen sie eine zeitlich und räumlich regulierte Adhäsion zwischen den Axonen und ihrem extrazellulären Milieu (Kamiguchi, 2006). Zu den CAMs, welche bereits auf OECs nachgewiesen werden konnten, gehören Galectin-1,3 und 4, Sema3A (Semaphorin) sowie β -Laminin (Tenne-Brown *et al.*, 1998; St John und Key, 1999; Schwarting *et al.*, 2000). Puche und Key (1996) konnten zeigen, dass in Galectin-1-*knock out* Mäusen eine Subpopulation von ORN-Axonen nicht in den ausgewiesenen Zielort im dorsocaudalen OB einwächst und folglich Galectin-1 eine essentielle Rolle in der zielgerichteten Wegleitung von ORN-Axonon spielt (Puche und Key, 1995). Ebenso werden Npn-1⁺ ORN-Axone, die üblicherweise Glomeruli medialer und lateraler Regionen des OB innervieren, in Sema3A-defizienten Mäusen fehlgeleitet, sodass sie in ventralen Glomeruli terminieren (Schwarting *et al.*, 2000). Npn-1 (Neuropilin) stellt dabei die Liganden-bindende Untereinheit des Sema3A-Rezeptors dar (Goshima *et al.*, 1999). Darüber hinaus phagozytieren OECs ORN-Axone nach der Apoptose (Wewetzer *et al.*, 2005; He *et al.*, 2014). Zusätzlich exprimieren OECs den Makrophagen-spezifischen Marker OX-42 und phagozytieren Bakterien (Lankford *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2008). Sie teilen somit essentielle Eigenschaften mit Mikrogliazellen.

Die regenerativen Eigenschaften von OECs sind darüber hinaus von großem Interesse für die Behandlung und Regeneration nach Rückenmarksläsionen. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer Rückenmarksläsion oder der Durchtrennung peripherer Nervenbahnen bei Ratten die Transplantation von kultivierten OECs zur Wiederherstellung der Motorfunktion führt (Ramon-Cueto und Nieto-Sampedro, 1994; Li *et al.*, 1997; 1998; Li *et al.*, 2003). Dabei förderten OECs die erneute neuronale Verschaltung zwischen PNS und ZNS (Keyvan-Fouladi *et al.*, 2002). Allerdings stellen OECs funktionell eine sehr heterogene Zellpopulation dar, welche vermutlich nicht gleichermaßen geeignet für einen therapeutischen Einsatz bei Rückenmarksläsionen sind (Yang *et al.*, 2015). Entsprechend ihrer Lage können sie in zwei Populationen unterteilt werden. Die OM-OECs (*olfactory mucosa*) und OB-OECs (*olfactory bulb*). In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich OB-OECs charakterisiert, welche im Folgenden als OECs bezeichnet werden. OB-OECs können wiederum entsprechend ihrer Lokalisation im OB, der Expression von Markerproteinen und unterschiedlicher Funktionen in mindestens zwei Subpopulationen unterteilt werden (Thyssen *et al.*, 2013; Au *et al.*, 2002). Im äußeren Teil der ONL (ONL_o) finden hauptsächlich das Längenwachstum und eine grobe Sortierung der ORN Axone statt, wohingegen in der inneren ONL (ONL_i) die Sortierung entsprechend des Duftstoffrezeptors in den jeweiligen Glomerulus erfolgt. Dementsprechend werden OECs, welche in der äußeren ONL lokalisiert sind, als äußere OECs (OEC_o) bezeichnet und jene die in der inneren ONL lokalisiert sind als innere OECs (OEC_i). Äußere und innere OECs unterscheiden sich in der Expression von p75 NTR. Während äußere OECs immunopositiv für den an Wachstumsprozessen beteiligten Neurotrophin-Rezeptor p75 sind, sind innere OECs positiv für Neuropeptid Y (NPY) (Au *et al.*, 2002).

1.6.1 Ca²⁺- abhängige Signalwege in OECs

Ca²⁺ gilt als einer der wichtigsten Signalmoleküle in der interzellulären Kommunikation. Hayat *et al.* konnten zeigen, dass Ca²⁺-Signale in OECs maßgeblich zum Neuritenwachstum in einer Retinalganglien-OEC-Kokultur beitragen, und somit eine funktionell relevante Rolle in der Axogenese der ORN zu spielen scheinen (Hayat *et al.*, 2003). Darüber hinaus ist bekannt, dass die extrasynaptische Neurotransmitterfreisetzung von Glutamat und ATP entlang der ORN-Axone Ca²⁺-Signale in OECs der äußeren ONL induziert. Diese Ca²⁺-Signale sind P2Y1- und mGluR1-vermittelt und initiieren die Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Rieger *et al.*, 2007; Thyssen *et al.*, 2010; Lohr *et al.*, 2011). Ca²⁺-Transienten in OECs der äußeren ONL

können darüber hinaus Vasokonstriktionen benachbarter Blutgefäße induzieren (Thyssen *et al.*, 2010). Zusätzlich reagieren OEC_o auf eine Vielzahl von weiteren Neurotransmittern, wie Dopamin und Noradrenalin, mit einem intrazellulären Ca²⁺-Signal. Demnach scheinen Ca²⁺-abhängige Kommunikationswege zwischen ORN-Axonon, OECs und dem lokalen Blutgefäßsystem von zentraler Bedeutung für Kommunikation und Metabolismus zu sein. Weder die endogene Neurotransmitterfreisetzung der ORN noch die Applikation von Neurotransmittern induziert hingegen Ca²⁺-Signale in OECs der inneren ONL (Thyssen *et al.*, 2013). Allerdings propagieren innere OECs spontane Ca²⁺-Wellen. Der Transfer des Ca²⁺-Signals zwischen benachbarten Zellen ist dabei abhängig von *gap junctions*, wobei das Signal maßgeblich über die Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung verstärkt wird (Stavermann *et al.*, 2012; Stavermann *et al.*, 2015). Die Präsenz von OECs, sowohl im ZNS und als auch im PNS, ihre axonwachstumsfördernde Eigenschaften sowie die Interaktion mit unterschiedlichen Zellpopulationen des ZNS und PNS könnten demnach Schlüsselemente zum Verständnis der regenerativen Fähigkeiten von OECs und der damit verbundenen Neurogenese im adulten olfaktorischen System darstellen

1.7 Zielsetzung

Eine Besonderheit des Riechsystems stellt die Fähigkeit zur adulten Neurogenese dar, bei der zeitlebens abgestorbene ORNs von neuronalen Stammzellen im OE ersetzt werden, indem diese zu olfaktorischen Rezeptorneuronen ausdifferenzieren. Im Zuge dieser Differenzierung wachsen deren Axone von der Peripherie ins ZNS ein und integrieren schließlich in das zentralnervöse Netzwerk. Außerhalb des OB ist die Regeneration von peripheren Neuriten zwar grundsätzlich auch im adulten Organismus möglich, allerdings verhindert die Ausbildung einer astrozytären Vernarbung nach einer Verletzung im Rückenmark das erneute Einwachsen ins ZNS (Raisman, 2001; Rolls *et al.*, 2009). Es wird vermutet, dass die kontinuierliche Überwindung der PNS-ZNS Barriere der regenerierten ORNs im Riechsystem von den hiesigen OECs begünstigt wird. Die Basis dieser besonderen Eigenschaften der OECs ist dabei vermutlich die komplexe Kommunikation zwischen OECs und unterschiedlichen zellulären Komponenten im *Bulbus olfactorius* (ZNS), z.B. Astrozyten und Neuronen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung von Ca^{2+} -abhängigen Signalwegen von OECs und ihrer zellulären Interaktion mit ORN-Axonen (Kapitel 1) sowie juxtaglomerulären Astrozyten (Kapitel 2). Darüber hinaus soll untersucht werden, wie die Blut-Hirn-Schranke im ONL, der Übergangszone zwischen PNS und ZNS, organisiert ist. Studien zeigen, dass neuronale Aktivität der ORNs ATP- und Glutamatvermittelte Ca^{2+} -Transienten in OECs induziert, welche mit der Vasokonstriktion assoziierter Blutgefäße einhergehen (Rieger *et al.*, 2007; Thyssen *et al.*, 2010; Lohr *et al.*, 2011). Im äußeren ONL sind keine astrozytären Ausläufer vorhanden, sodass sich die Frage stellt, inwieweit OECs anstelle von Astrozyten an der Blut-Hirn-Schranke im ONL beteiligt sind und somit zum Schutz des ZNS vor schädlichen Substanzen aus der Peripherie beitragen könnten (Kapitel 3). All diese Aspekte können zu einem detaillierten Verständnis der OEC-Physiologie und der damit verbundenen besonderen Eigenschaft des Riechsystems, der regenerativen Axogenese über die PNS-ZNS Barriere hinweg, beitragen.

2. AMPA Receptor-Mediated Ca²⁺ transients in Mouse Olfactory Ensheathing Cells

Antonia Beiersdorfer and Christian Lohr

Front. Cell. Neurosci.-Non-Neuronal Cells. 13:451. doi: 10.3389/fncel.2019.00451

Anteilerklärung

Alle im Kapitel 1 dargestellten Experimente wurden von Antonia Beiersdorfer eigenständig geplant, durchgeführt und ausgewertet. Die erste Version des Manuskriptes wurde von A. Beiersdorfer verfasst. Die zusätzlichen Experimente, die nach erster Begutachtung erforderlich waren, wurden ebenfalls von A. Beiersdorfer durchgeführt und ausgewertet. Die Überarbeitung des ursprünglichen Manuskriptes erfolgte durch A. Beiersdorfer und Prof. Dr. Christian Lohr.

Datum und Ort

Unterschrift Betreuer

Prof. Dr. Christian Lohr



AMPA Receptor-Mediated Ca²⁺ Transients in Mouse Olfactory Ensheathing Cells

Antonia Beiersdorfer* and Christian Lohr*

Division of Neurophysiology, University of Hamburg, Hamburg, Germany

Ca²⁺ signaling in glial cells is primarily triggered by metabotropic pathways and the subsequent Ca²⁺ release from internal Ca²⁺ stores. However, there is upcoming evidence that various ion channels might also initiate Ca²⁺ rises in glial cells by Ca²⁺ influx. We investigated AMPA receptor-mediated inward currents and Ca²⁺ transients in olfactory ensheathing cells (OECs), a specialized glial cell population in the olfactory bulb (OB), using whole-cell voltage-clamp recordings and confocal Ca²⁺ imaging. By immunohistochemistry we showed immunoreactivity to the AMPA receptor subunits GluA1, GluA2 and GluA4 in OECs, suggesting the presence of AMPA receptors in OECs. Kainate-induced inward currents were mediated exclusively by AMPA receptors, as they were sensitive to the specific AMPA receptor antagonist, GYKI53655. Moreover, kainate-induced inward currents were reduced by the selective Ca²⁺-permeable AMPA receptor inhibitor, NASPM, suggesting the presence of functional Ca²⁺-permeable AMPA receptors in OECs. Additionally, kainate application evoked Ca²⁺ transients in OECs which were abolished in the absence of extracellular Ca²⁺, indicating that Ca²⁺ influx via Ca²⁺-permeable AMPA receptors contribute to kainate-induced Ca²⁺ transients. However, kainate-induced Ca²⁺ transients were partly reduced upon Ca²⁺ store depletion, leading to the conclusion that Ca²⁺ influx via AMPA receptor channels is essential to trigger Ca²⁺ transients in OECs, whereas Ca²⁺ release from internal stores contributes in part to the kainate-evoked Ca²⁺ response. Endogenous glutamate release by OSN axons initiated Ca²⁺ transients in OECs, equally mediated by metabotropic receptors (glutamatergic and purinergic) and AMPA receptors, suggesting a prominent role for AMPA receptor mediated Ca²⁺ signaling in axon-OEC communication.

Keywords: olfactory ensheathing cells, AMPA receptor, calcium, patch clamp, GluA2

OPEN ACCESS

Edited by:

Hajime Hirase,
University of Copenhagen, Denmark

Reviewed by:

Didier De Saint Jan,
Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS), France
Koji Shibasaki,
Gunma University, Japan

*Correspondence:

Antonia Beiersdorfer
antonia.beiersdorfer@uni-hamburg.de
Christian Lohr
christian.lohr@uni-hamburg.de

Specialty section:

This article was submitted to
Non-Neuronal Cells,
a section of the journal
Frontiers in Cellular Neuroscience

Received: 08 July 2019

Accepted: 20 September 2019

Published: 04 October 2019

Citation:

Beiersdorfer A and Lohr C (2019)
AMPA Receptor-Mediated Ca²⁺
Transients in Mouse Olfactory
Ensheathing Cells.
Front. Cell. Neurosci. 13:451.
doi: 10.3389/fncel.2019.00451

INTRODUCTION

Ca²⁺ signaling in glial cells is involved in various intercellular processes such as the release of gliotransmitters, modulation of synaptic transmission, long-range Ca²⁺ wave propagation, and neurovascular coupling (Haydon, 2001; Carmignoto and Gomez-Gonzalo, 2010). Moreover, intracellular processes such as apoptosis, transcription as well as posttranslational modification are regulated by Ca²⁺ signaling (McConkey and Orrenius, 1997; Flavell and Greenberg, 2008). In glial cells, rises of intracellular Ca²⁺ are predominantly triggered by Ca²⁺ release from internal Ca²⁺ stores induced by metabotropic pathways (Deitmer et al., 1998; Verkhratsky et al., 1998), while

Ca²⁺ influx was reported in rare cases in specialized astrocyte-like glial cells such as cerebellar Bergmann glia and retinal Müller glia (Burnashev et al., 1992; Muller et al., 1992; Wakakura and Yamamoto, 1994). However, more recent studies suggest that astroglial cells of different regions of the brain also express ligand-gated ion channels that may trigger Ca²⁺ responses via Ca²⁺ influx from the extracellular space (Schipke et al., 2001; Lalo et al., 2006; Mishra et al., 2016; Droste et al., 2017). In addition, store-operated channels as well as transient receptor potential (TRP) channels contribute to Ca²⁺ signaling in astrocytes (Singaravelu et al., 2006; Rungta et al., 2016; Belkacemi et al., 2017; Rakers et al., 2017; Toth et al., 2019). These studies indicate that Ca²⁺ influx might play a previously underestimated role in glial cell physiology and function. Olfactory ensheathing cells (OECs) represent a specialized population of glial cells, exclusively located in the olfactory nerve layer (ONL) in the olfactory bulb (OB) and the peripheral olfactory mucosa (Su and He, 2010; Lohr et al., 2014). They support growth and guidance of axons of olfactory sensory neurons (OSN) from the olfactory epithelium (OE) into the main OB (Graziadei and Graziadei, 1979; Doucette, 1984; Yang et al., 2015). It is assumed, that OECs generate an environment allowing the lifelong re-growth and re-integration of axons into the cellular network after degeneration by the expression of different neurite growth factors and cell adhesion molecules (Crandall et al., 2000; Woodhall et al., 2001; Cao et al., 2007; Yang et al., 2015). In addition, studies showed that Ca²⁺ signaling in OECs is a critical regulator for neurite outgrowth in OEC/retinal ganglion cell (RGC) co-cultures, suggesting a prominent role for Ca²⁺ signaling in OEC-axon interaction (Hayat et al., 2003). Extrasynaptic release of glutamate and ATP by OSN axons initiates Gq-mediated Ca²⁺ release from internal stores in OECs via mGluR1 and P2Y1 receptors (Rieger et al., 2007; Thyssen et al., 2010). Montague and Greer (1999) investigated the distribution of the ionotropic AMPA receptor subunits, GluA1, GluA2/3 and GluA4 in the ONL and found expression by nerve-associated glial cells. However, whether OECs exhibit functional AMPA receptors, which might conduct membrane currents and mediate Ca²⁺ influx is not known. We performed whole-cell voltage-clamp recordings, showing that kainate application induced AMPA receptor-mediated inward currents in OECs, which are partly mediated by Ca²⁺-permeable AMPA receptors. Kainate also induced Ca²⁺ transients that depended on Ca²⁺ influx via the receptor channel itself, but additionally comprised Ca²⁺ release from internal stores. Electrical stimulation of OSN axons evoked Ca²⁺ transients mediated by metabotropic receptors as well as Ca²⁺-permeable AMPA receptors, suggesting a role for AMPA receptor-mediated Ca²⁺ signaling in axon-OEC communication.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Olfactory Bulb Preparation

Mice of the GLAST-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl}, PLP-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} (age: p28–60) and NMRI (age: p18–p21; Naval Medical Research Institute) strains (Leone et al., 2003; Mori et al., 2006; Madisen et al., 2010) were kept at

the institutional animal facility of the University of Hamburg. These mice expressed Cre recombinase under control of the promoters of the glutamate/aspartate transporter EAAT1 (GLAST; expressed by OECs and astrocytes) and the proteolipid protein (PLP; expressed by OECs and oligodendrocytes), respectively (Droste et al., 2017; Beiersdorfer et al., 2019). Animal rearing and all experimental procedures were performed according to the European Union's and local animal welfare guidelines (GZ G21305/591-00.33; Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Hamburg, Germany). To induce reporter expression in GLAST-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} and PLP-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mice, tamoxifen (Carbolution Chemicals GmbH, St. Ingbert, Germany) was dissolved in 8% ethanol/92% Mygliol[®]812 (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) and injected intraperitoneally for three consecutive days (starting p21; 100 mg/kg bodyweight). Animals were analyzed 7–12 days after the first injection. OBs were prepared as described previously (Stavermann et al., 2012). Both OBs were removed from the opened head in cool preparation solution (molarities in mM: 83 NaCl, 1 NaH₂PO₄ × 2H₂O, 26.2 NaHCO₃, 2.5 KCl, 70 sucrose, 20 D-(+)-glucose, and 2.5 MgSO₄ × 7 H₂O). Standard artificial cerebrospinal fluid (ACSF) for experiments and storage of the preparations consisted of (molarities in mM): 120 NaCl, 2.5 KCl, 1 NaH₂PO₄ × 2H₂O, 26 NaHCO₃, 2.8 D-(+)-glucose, 1 MgCl₂, and 2 CaCl₂. Preparation solution and ACSF were continuously perfused with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂) to maintain the pH of 7.4 and to supply oxygen.

Reagents

The compounds (2S,3S,4S)-3-(Carboxymethyl)-4-(prop-1-en-2-yl)pyrrolidine-2-carboxylic acid (kainic acid, agonist of AMPA/kainate receptors), (S)-α-Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid, 4-(8-Methyl-9H-1,3-dioxolo [4,5-h][2,3]benzodiazepin-5-yl)-benzenamine hydrochloride (GYKI53655, antagonist of AMPA receptors), (E)-ethyl 1,1a,7,7a-tetrahydro-7-(hydroxyimino) cyclopropa[b]chromene-1a-carboxylate (CPCCOEt, antagonist of mGluR₁), 2-methyl-6-(phenylethynyl) pyridine (MPER, antagonist of mGluR₅), 2'-deoxy-N6-methyladenosine 3',5'-bisphosphate (MRS2179, antagonist of P2Y₁), 4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo [2,3-α][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl) pheno (ZM241385, antagonist of A_{2A} receptors), (R)-(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine (SCH23390, antagonist of D1-like dopamine receptors) and carbenoxolone disodium salt (CBX; inhibiting gap junctions) were obtained from Abcam (Cambridge, United Kingdom). The reagents D-2-amino-5-phosphonovaleric acid (D-APV; antagonist of NMDA receptors), N-[3-[[4-[(3-aminopropyl)amino]butyl]amino]propyl]-1-naphthaleneacetamide trihydrochloride (Naspm trihydrochloride antagonist of Ca²⁺-permeable AMPA receptors) and tetrodotoxin (TTX; inhibiting voltage-gated sodium channels) were received from Alomone labs (Jerusalem, Israel). All reagents were stored as stock solutions corresponding to the manufacturer's instructions and added to ACSF directly before the experiment. Drugs were applied via the perfusion

system driven by a peristaltic pump (Reglo MS4/12, Ismatec, Wertheim, Germany).

Electrophysiology and Analysis

For electrophysiological experiments, OB slices (220 μm , horizontal) of GLAST-Cre^{ERT2} \times tdTomato^{fl/fl} mice were prepared using a vibratome (Leica VT1200S, Nußloch, Germany). Slices were transferred into a recording chamber and continuously superfused with ACSF via the perfusion system. The experiments were performed at room temperature. Whole-cell voltage-clamp recordings (Multiclamp 700B, Molecular Devices) were performed on OECs, identified by tdTomato expression (excited at 543 nm, emission 553–618 nm), and the distinct localization in the ONL (Au et al., 2002). Recordings were digitized (Digidata 1440A, Molecular Devices) at 10–20 kHz and filtered (Bessel filter 2 kHz). The holding potential was -80 mV, achieved by current injection of -35.14 ± 13.5 pA on average. Patch pipettes had a resistance of 4–7 M Ω when filled with internal solution containing (mM): 105 K-gluconate, 30 KCl, 10 HEPES, 10 phosphocreatine, 4 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP, 0.3 EGTA, and pH = 7.43. For visualization of the recorded OEC, ATTO-488 carboxy (20 μM , ATTO-Tech GmbH, Siegen, Germany) was added to the internal solution before the experiments. Agonists were applied via the perfusion system for 30 s. Antagonists were applied via the perfusion system 10 min prior to agonist application. The flow rate of the perfusion system amounted to approximately 2 mL/min. The experimental bath was oval in shape and had a diameter of 2.1 cm, the bath volume amounted to 1 mL. Therefore, agonist and antagonist concentrations continuously increased in the experimental bath, until the final concentration is reached. Vice versa, agonists were slowly washed out, accounting for long lasting effects. Kainate-induced inward currents in OECs were analyzed by measuring amplitude the currents.

Ca²⁺ Imaging and Analysis

For Ca²⁺ imaging experiments, GLAST-Cre^{ERT2} \times tdTomato^{fl/fl} and NMRI mice were used. Whole OBs were glued onto coverslips, transferred into a recording chamber and the coverslip secured with a U-shaped platinum wire. For multi-cell bolus loading (Stosiek et al., 2003), a glass pipette with a resistance of ~ 3.5 M Ω (when filled with ACSF) was filled with 200 μM Fluo-8 AM (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) in ACSF, made from a 4 mM stock solution (dissolved in DMSO and 20% pluronic acid). After inserting the injection pipette into the ONL, the Ca²⁺ indicator was pressure-injected with 0.7 bar for 30 s into the tissue (PDES-01 AM, NPI electronic GmbH, Tamm, Germany), followed by an incubation of 20 min. Changes in the cytosolic Ca²⁺ concentration in OECs were detected by the fluorescence of Fluo-8 (excitation: 488 nm; emission: 500–530 nm) using a confocal microscope (eC1, Nikon, Düsseldorf, Germany). Images were acquired at a time rate of one frame every 3 s. A similar perfusion system and flow rate was used as described above. However, the experimental bath for Ca²⁺ imaging experiments was differently shaped (diameter 1 cm,

volume 1.9 mL) resulting in differences in the kinetics of wash-in and wash-out of drugs between the electrophysiological and Ca²⁺ imaging experiments. To analyze changes in cytosolic Ca²⁺ in single cell somata, regions of interest (ROIs) were defined using Nikon EZ-C1 3.90 software. OECs were identified by GLAST promoter-driven tdTomato expression in GLAST-Cre^{ERT2} \times tdTomato^{fl/fl} mice in most experiments. In wild type mice, OECs were identified by their distinct localization in the ONL. The changes in Ca²⁺ were recorded throughout the experiments as relative changes in Fluo-8 fluorescence (ΔF) with respect to the resting fluorescence, which was normalized to 100%. Quantification of the Ca²⁺ transients was achieved by calculating the amplitude of ΔF .

Statistics

All values are stated as mean values \pm standard error of the mean. The number of experiments is given as $n = x$, where x is the number of analyzed cells. At least 3 animals were analyzed for each set of experiments. Statistical significance was estimated by comparing three means using Friedmann ANOVA and the Wilcoxon *post hoc* test for paired data, and for comparing two means using the Mann–Whitney *U*-Test, with the error probability p (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry on OBs of PLP-Cre^{ERT2} \times tdTomato^{fl/fl} mice (\geq P28) was performed as described before (Droste et al., 2017). After dissection, the OBs were kept for 1 h at room temperature (RT) in formaldehyde (4% in PBS, pH 7.4). Afterward, 100 μm thick sagittal slices were prepared with a vibratome (VT1000S, Leica, Nußloch, Germany) and incubated for 1 h in blocking solution (10% normal goat serum (NGS), 0.5% Triton X-100 in PBS) at RT. Subsequently, the slices were incubated for 48 h at 4°C with the following primary antibodies: Guinea pig anti-GluA1 (Alomone labs; 1:200); rabbit anti-GluA2 (Millipore, 1:200); rabbit anti-GluA4 (Millipore; 1:200). To validate the specificity of the GluA antibodies we used cerebellar slices as control, since the distribution of GluA subunits is well documented in this brain area (Supplementary Figure S1). Moreover, the antibodies against GluA1 and GluA4 have been validated in glia-specific GluA1 and GluA4 double knockout mice before (Saab et al., 2012). In our control experiments, the GluA2 antibody only labeled cells known to express GluA2, but not cells that lack GluA2 such as Bergmann glial cells (Burnashev et al., 1992; Muller et al., 1992; Saab et al., 2012), as shown before for the used antibody (Droste et al., 2017). Hence, we consider the used antibodies as efficient and specific. The antibodies were diluted in 1% NGS, 0.05% TritonX-100 in PBS. Slices were incubated in PBS with the following secondary antibodies for 24 h at 4°C: goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific; 1:1000) or goat anti-guinea pig Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific; 1:1000). Moreover, Hoechst 33342 (5 μM ; Molecular Probes, Eugene, OR, United States) was added to stain nuclei. Slices were mounted on slides using self-hardening embedding medium (Immu-Mount, Thermo Fisher Scientific). Immunohistological stainings were analyzed using a confocal microscope (Nikon eC1). Confocal

images were adjusted for brightness and contrast using ImageJ and Adobe Photoshop CS6.

RESULTS

Distribution of GluA Subunits in the ONL

AMPA receptors constitute of four subunits (GluA1-GluA4), which form complex heteromeric cation channels, activated by glutamate or selective receptor agonists such as AMPA and kainate (Steinhauser and Gallo, 1996). The composition of the subunits is especially critical to determine the Ca^{2+} permeability of the channel. Thus, GluA2-lacking AMPA receptors show a high permeability for Ca^{2+} whereas GluA2-containing AMPA receptors are impermeable for Ca^{2+} (Hollmann et al., 1991). The OB is divided into several clearly distinguishable layers (Figures 1A,B) and immunoreactivity against GluA1, GluA2/3, and GluA4 demonstrated a wide distribution of these subunits in all layers, while mRNA expression analyses showed low amounts of GluA3 in the OB (Montague and Greer, 1999; Horning et al., 2004). We aimed to analyze the distribution of GluA1, GluA2, and GluA4 specifically in the ONL by immunohistochemistry using PLP-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mice. The *plp* gene encodes for the PLP, expressed by oligodendrocytes, and its slice variant DM20, expressed by oligodendrocytes and OECs, enabling the specific identification of oligodendrocytes and OECs by Cre-recombinase-driven tdTomato expression (Griffiths et al., 1995; Dickinson et al., 1997). OECs are present exclusively in the ONL, whereas oligodendrocytes are located in the glomerular layer (GL) and deeper layers but not in the ONL (Figures 1C,D; Doucette, 1990, 1991). Therefore, PLP-Cre^{ERT2}-driven tdTomato expression in the ONL is assumed to be restricted to OECs (Figures 1C,D; Beiersdorfer et al., 2019; Piantanida et al., 2019). GluA1 immunoreactivity was widely distributed in the entire ONL, colocalizing intensely with tdTomato-expressing OECs (Figures 1E,F). Homogenous GluA2 immunoreactivity was detected in the ONL, with scattered colocalization with tdTomato-positive OECs (Figures 1G,H). In the GL, GluA2-positive juxtglomerular cells were present (Figure 1G, arrow; Droste et al., 2017). Additionally, GluA4 immunoreactivity was found in the ONL, however, it sparsely colocalized with tdTomato-positive OEC somata (Figures 1I,J). At higher magnification, GluA4 immunoreactivity was found in close approximation of tdTomato-expressing OECs, likely indicating GluA4 located in cell processes of OECs (Figure 1J, see arrowheads). The results suggest that OECs express GluA1 and GluA2, while GluA4 appears not to be present in OEC somata but presumably in cell processes.

Kainate Induces AMPA Receptor-Mediated Inward Currents in OECs

Functional AMPA/kainate receptors have been investigated in macroglial cells, namely astrocytes and oligodendrocyte precursor cells in gray and white matter as well as microglial cells (Burnashev et al., 1992; Muller et al., 1992; Jabs et al., 1994; Seifert and Steinhauser, 1995; Noda et al., 2000; Zonouzi

et al., 2011; Hoft et al., 2014; Droste et al., 2017). Based on our immunohistochemical data, we suggested that OECs in the ONL might also express functional AMPA receptors. Therefore, we performed electrophysiological recordings in OECs in acute OB slices of GLAST-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mice. OECs were identified by GLAST promoter-driven tdTomato expression in the ONL (Figure 2A). Additionally, a voltage-step protocol was applied to characterize the I/V relationship of the recorded cell. All OECs analyzed showed a characteristic linear I/V relationship (Figures 2B,C; Rela et al., 2010; Beiersdorfer et al., 2019). We used kainate to agonize AMPA/kainate receptors, since kainate induced a non-desensitizing AMPA receptor-mediated inward current in acutely isolated hippocampal glial cells (Seifert and Steinhauser, 1995). Kainate application (100 μM , 30 s) induced a prominent slowly rising and long lasting inward current with a mean amplitude of 231.5 ± 58.9 pA (at -80 mV holding potential) in OECs (Figure 2D). To specifically isolate kainate-induced responses in OECs, all experiments were performed in the presence of the gap junction inhibitor carbenoxolone (CBX, 100 μM) to avoid intercellular panglial communication to juxtglomerular astrocytes that respond to kainate and might interfere with recordings in OECs (Droste et al., 2017; Beiersdorfer et al., 2019). Additionally, neuronal activity was suppressed by inhibiting voltage-gated sodium channels by tetrodotoxin (TTX, 1 μM). Application of GYKI53655 (100 μM), a selective AMPA receptor antagonist, significantly reduced kainate-induced inward currents in OECs by $88.8 \pm 3.2\%$ of the control ($n = 5$; $p = 0.022$), suggesting that the kainate-induced response is mainly mediated by AMPA receptors in OECs (Figures 2D,E). To further characterize the AMPA receptor subtype involved in kainate-induced inward currents, GluA2-lacking Ca^{2+} -permeable AMPA receptors were inhibited by the selective antagonist, NASPM (100 μM) (Koiike et al., 1997). NASPM reduced kainate-mediated inward currents in OECs significantly by $63.9 \pm 2.7\%$ of the control ($n = 6$; $p = 0.019$), suggesting that OECs exhibit functional Ca^{2+} -permeable AMPA receptors (Figures 2F,G).

Kainate-Mediated Ca^{2+} Transients in OECs Depend on Extracellular Ca^{2+}

Kainate-induced Ca^{2+} transients in Bergmann glial cells of the cerebellum result from Ca^{2+} influx directly through the AMPA receptor channel (Burnashev et al., 1992; Muller et al., 1992). However, AMPA/kainate receptors may also activate metabotropic pathways (Wang et al., 1997; Rozas et al., 2003; Takago et al., 2005). We performed confocal Ca^{2+} imaging experiments to investigate the source of Ca^{2+} that fuels Ca^{2+} transients in OECs in response to kainate application. The Ca^{2+} indicator Fluo-8 AM was pressure injected into OB *in-toto* preparations of GLAST-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mice (Figures 3A,B). Experiments were performed in the presence of CBX and TTX to suppress indirect effects. Kainate application induced Ca^{2+} transients in OECs with a mean amplitude of $107.8 \pm 5.3\%$ ΔF . GYKI 53655 (100 μM), an AMPA receptor antagonist, greatly reduced kainate-evoked Ca^{2+} transients in OECs by $84.0 \pm 6.1\%$ of the control ($n = 27$; $p = 5.93 \times 10^{-6}$), showing that kainate-evoked Ca^{2+} transients are mediated by

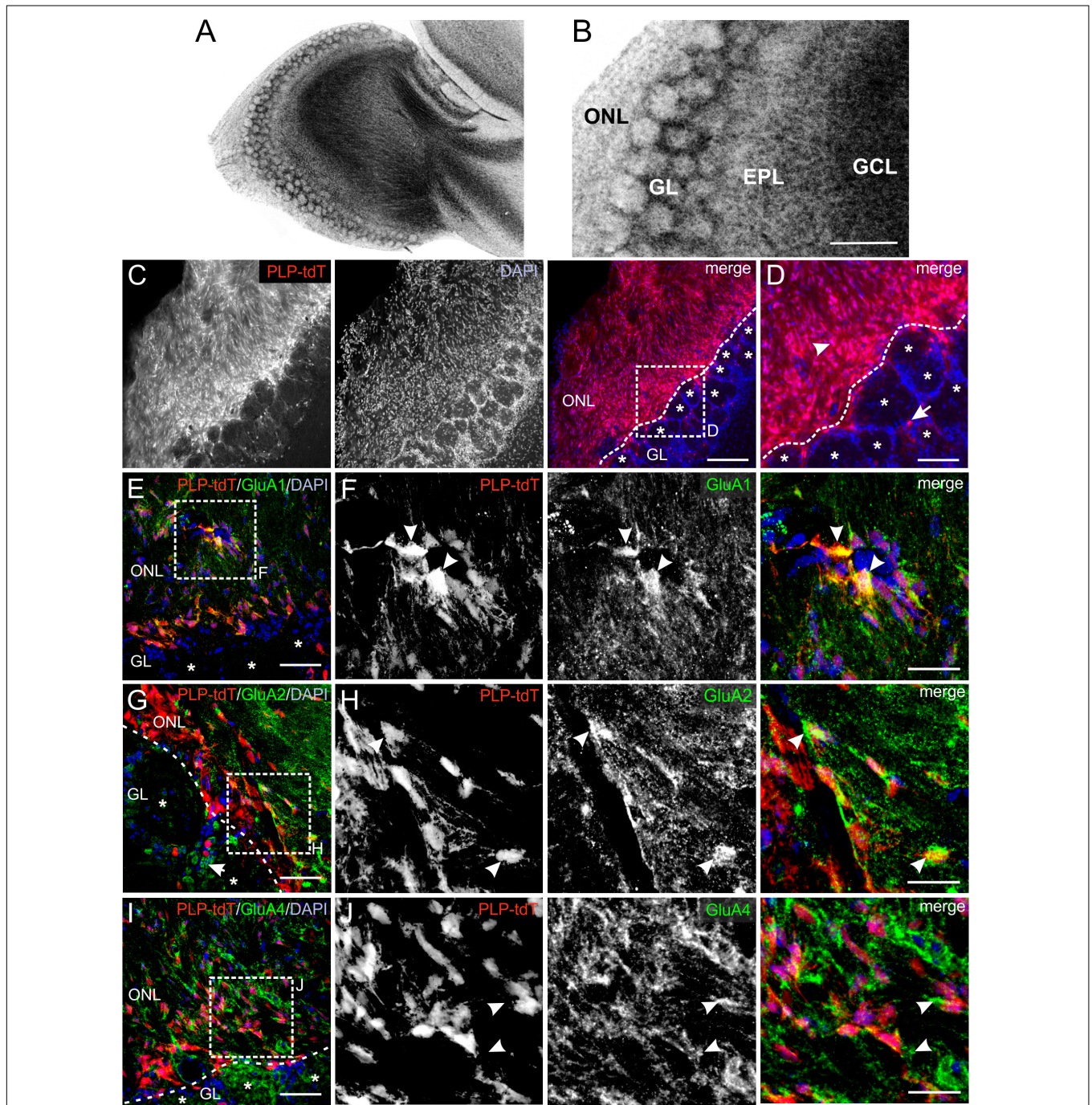
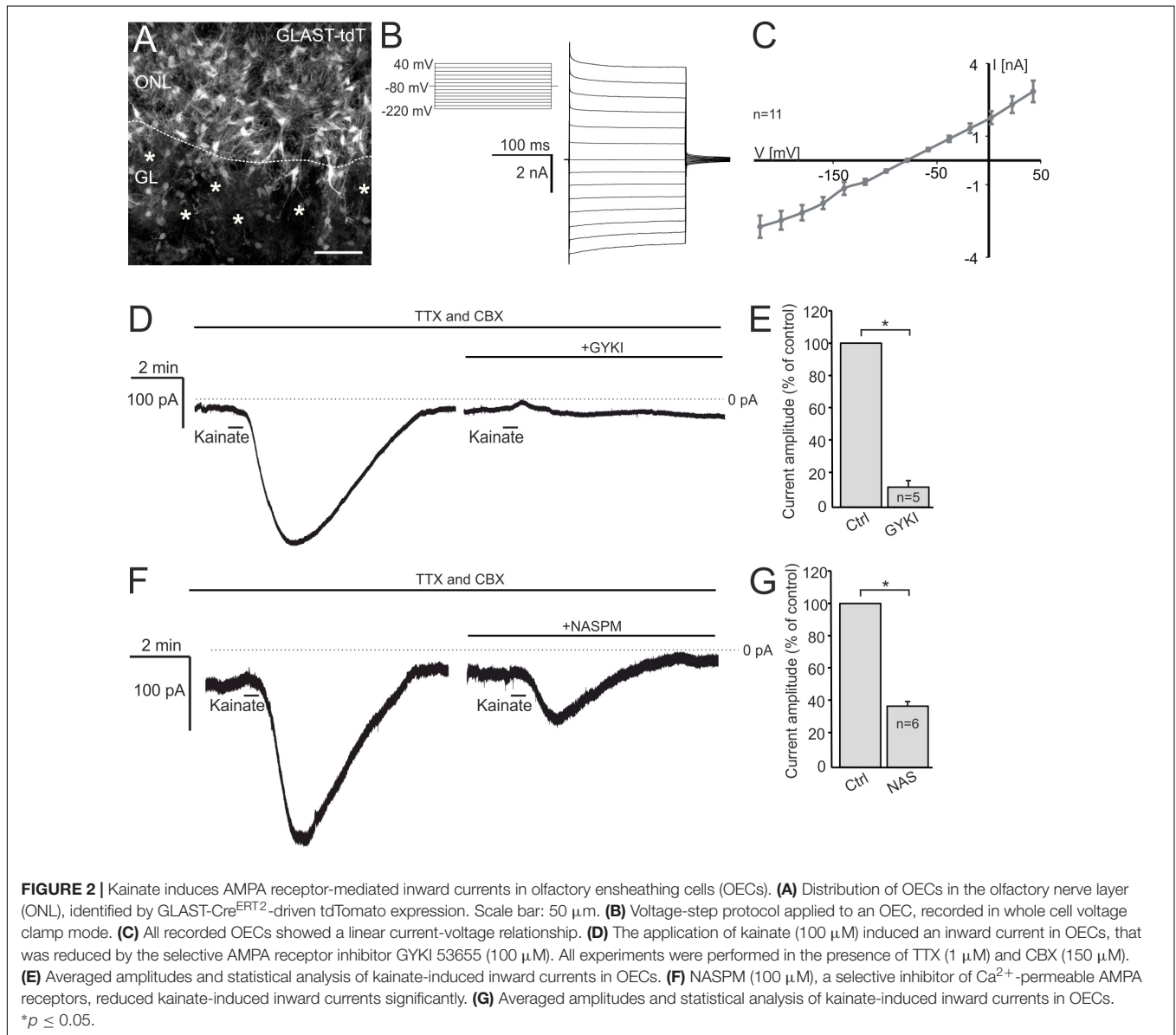


FIGURE 1 | Distribution of AMPA receptor subunits in the olfactory nerve layer (ONL). **(A)** Laminar organization of the olfactory bulb. Nuclei were stained with Hoechst (5 μ M). **(B)** The ONL, glomerular layer (GL), external plexiform layer (EPL) and granule cell layer (GCL) are clearly distinguishable. Scale bar: 200 μ m. **(C)** Distribution of PLP-Cre-dependent tdTomato expression in the ONL and GL. Olfactory ensheathing cells (OECs) are located in the ONL, whereas tdTomato-expressing oligodendrocytes are located in the GL. Nuclei are stained with Dapi (5 μ M; blue). The assumed border between the ONL and GL is indicated by the dotted line. Glomeruli are marked by asterisks. Scale bar: 150 μ m. **(D)** Magnified view from (C). OECs are located in the ONL (arrowhead) and oligodendrocytes (arrow) in the GL visualized by PLP-Cre-dependent tdTomato expression (red). Scale bar: 50 μ m. **(E)** Distribution of GluA1 immunoreactivity (green) in the ONL of PLP-Cre^{ERT2} \times tdTomato^{fl/fl} mice (red). Nuclei are stained with Dapi (blue). Glomeruli are marked by asterisks. Scale bar: 50 μ m. **(F)** Magnified view from (E). GluA1 immunostaining (green) colocalize with tdTomato-expressing OECs (red) in the ONL (arrowheads). Scale bar: 25 μ m. **(G)** Distribution of GluA2 immunoreactivity (green) in the ONL of PLP-Cre^{ERT2} \times tdTomato^{fl/fl} mice (red). GluA2 is widely distributed in the ONL, as well as in the GL. Nuclei are stained with Dapi (blue). Glomeruli are marked by asterisks. Scale bar: 50 μ m. **(H)** Magnified view from (G). GluA2 immunoreactivity colocalizes with tdTomato-expressing OECs (red) in the ONL (arrowheads). Scale bar: 25 μ m. **(I)** Distribution of GluA4 immunoreactivity (green) in the ONL of PLP-Cre^{ERT2} \times tdTomato^{fl/fl} mice (red). Nuclei are stained with Dapi (blue). Glomeruli are marked by asterisks. Scale bar: 50 μ m. **(J)** Magnified view from (I). GluA4 immunoreactivity (green) is sparsely colocalized with tdTomato-positive OEC somata (red), but is localized adjacent to OEC somata (arrowheads). Scale bar: 25 μ m.



AMPA receptors (Figures 3C,D). Removal of extracellular Ca²⁺ reduced kainate-induced Ca²⁺ transients by $91.9 \pm 2.3\%$ ($n = 43$; $p = 1.16 \times 10^{-8}$). Kainate-evoked Ca²⁺ responses recovered after readdition of extracellular Ca²⁺, the average amplitude reached $122.0 \pm 18.3\%$ of the control ($p = 0.16$) (Figures 3E,F). To estimate the impact of intracellular Ca²⁺ stores on kainate-induced Ca²⁺ transients in OECs, we applied cyclopiazonic acid (CPA, 20 μM) to inhibit Ca²⁺ uptake into Ca²⁺ stores via SERCA (sarcolemmal/endoplasmic reticulum calcium ATPase). Kainate-induced Ca²⁺ transients were significantly reduced by $57.6 \pm 4.2\%$ upon Ca²⁺ store depletion ($n = 70$; $p = 8.18 \times 10^{-8}$) (Figures 3G,H). Our results suggest that Ca²⁺ influx via AMPA receptor channels is essential to trigger Ca²⁺ transients in OECs, whereas Ca²⁺ release from internal stores is a secondary effect as a result of the kainate-evoked Ca²⁺ influx. To verify that the AMPA-evoked membrane current and associated Ca²⁺

influx was not elicited by a preceding Ca²⁺ increase, we evoked a Ca²⁺ transient by application of ADP and recorded membrane currents. ADP induced a large Ca²⁺ increase but failed to elicit membrane currents, demonstrating that Ca²⁺-dependent membrane conductances are negligible in OECs (Supplementary Figure S2).

Endogenous Glutamate Release Induces AMPA Receptor-Mediated Ca²⁺ Transients in OECs

Electrical stimulation of OSN axons evokes ectopic release of glutamate and ATP, which initiates mGluR1 and P2Y1 receptor-mediated Ca²⁺ rises in OECs (Berkowicz et al., 1994; Rieger et al., 2007; Thyssen et al., 2010). Here, we showed that OECs express functional Ca²⁺-permeable AMPA receptors

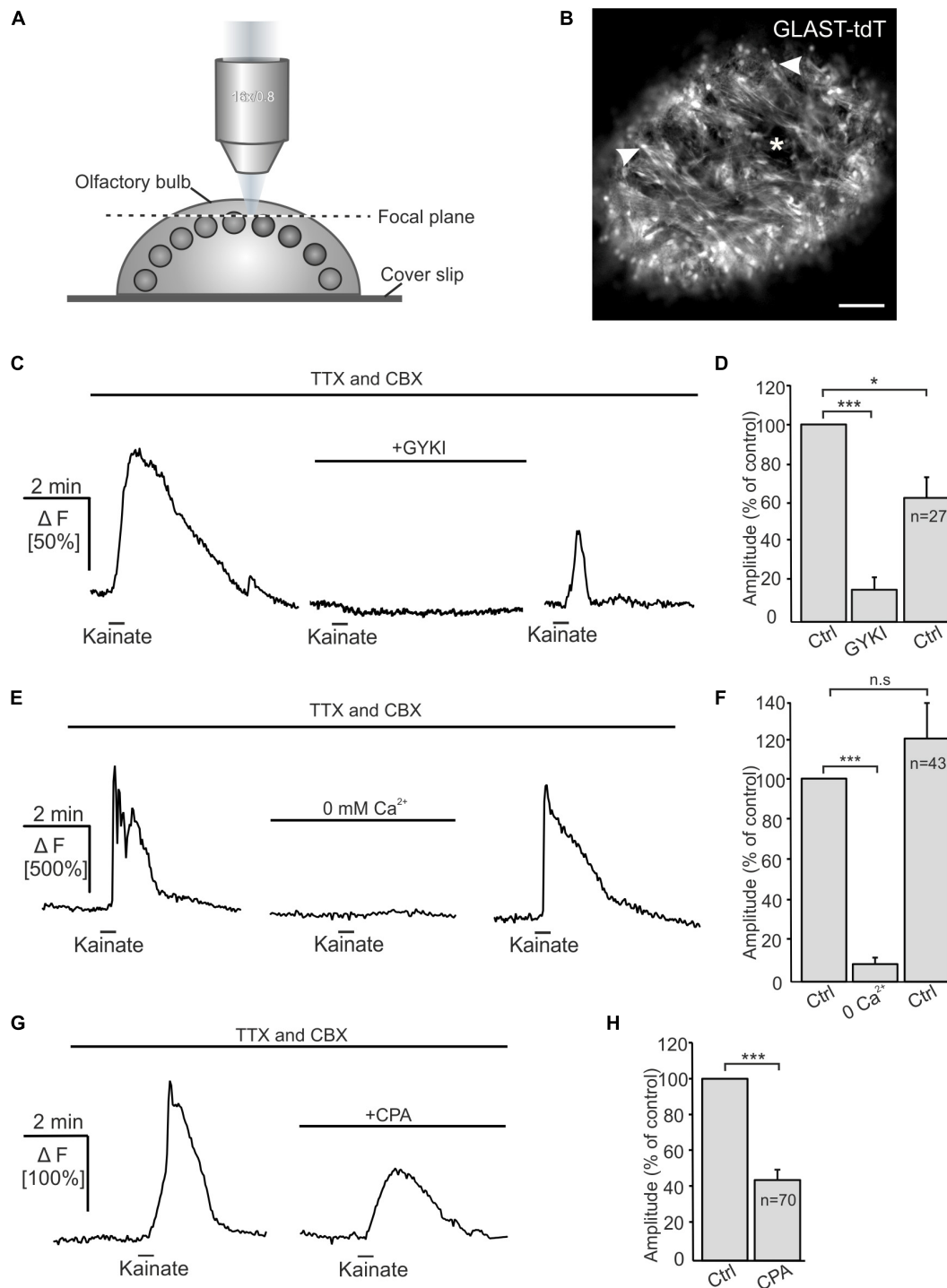


FIGURE 3 | Kainate-induced Ca^{2+} transients in olfactory ensheathing cells (OECs) depend on extracellular Ca^{2+} and intracellular Ca^{2+} stores. **(A)** Schematic illustration of the experimental set up of Ca^{2+} imaging experiments. Olfactory bulb (OB) *in-toto* preparations of GLAST-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mice were fixed and placed under the confocal microscope. Fluo-8 was pressure injected into the tissue. The focal plane as seen in panel **(B)** is indicated by the dotted line. **(B)** Confocal image of tdTomato-expressing OECs in an OB *in-toto* preparation. Arrowheads highlight OEC somata located in the ONL. One glomerulus is indicated by an asterisk. Scale bar: 100 μ m. **(C)** Kainate-induced Ca^{2+} transients in OECs in the presence of TTX (1 μ M) and CBX (150 μ M) were reduced by GYKI 53655 (100 μ M). **(D)** GYKI 53655 significantly reduced kainate-mediated Ca^{2+} transients. **(E)** Withdrawal of extracellular Ca^{2+} abolished kainate-induced Ca^{2+} transients in OECs completely. Restitution of extracellular Ca^{2+} caused a recovery of kainate-induced Ca^{2+} transients in OECs. **(F)** Averaged amplitudes and statistical analysis of kainate-mediated Ca^{2+} transients. **(G)** Upon intracellular Ca^{2+} store depletion by CPA (20 μ M) kainate-induced Ca^{2+} transients were significantly reduced. **(H)** Averaged amplitudes and statistical analysis of the effect of CPA on kainate-mediated Ca^{2+} transients. *** $p \leq 0.001$; * $p \leq 0.05$. n.s.: not significant.

which may also contribute to Ca^{2+} transients in response to neuronal activity. We endogenously released glutamate upon electrical stimulation of OSN axons (20 Hz, 2 s) and recorded Ca^{2+} transients in Fluo-8-loaded OECs in wild type animals. Electrical stimulation of OSN axons induced Ca^{2+} transients in OECs with an amplitude of $51.8 \pm 5.0\% \Delta F$ ($n = 46$). By eliminating purinergic (MRS2179), dopaminergic (SCH23390) and mGluR1-mediated Ca^{2+} transients (CPCCOEt) as well as possible indirect NMDA-mediated neuronal responses (D-APV), the mean amplitude of stimulation-induced Ca^{2+} transients in OECs were significantly reduced to $61.0 \pm 9.3\%$ of the control ($p = 3.68 \times 10^{-4}$). Additional inhibition of Ca^{2+} -permeable AMPA receptors by the selective antagonist NASPM further reduced the mean amplitude to 30.6 ± 5.8 ($p = 1.36 \times 10^{-5}$) of the control. NBQX almost completely abolished stimulation-induced Ca^{2+} transients in OECs and the amplitude further decreased significantly to $13.01 \pm 3.3\%$ of the control ($p = 0.002$). Receptor inhibition was reversible and stimulation-induced Ca^{2+} transients in OECs recovered after wash out (Figure 4). The results indicate that endogenous glutamate release triggers AMPA receptor-mediated Ca^{2+} responses in OECs, suggesting a possible role for AMPA receptors in axon-OEC communication.

DISCUSSION

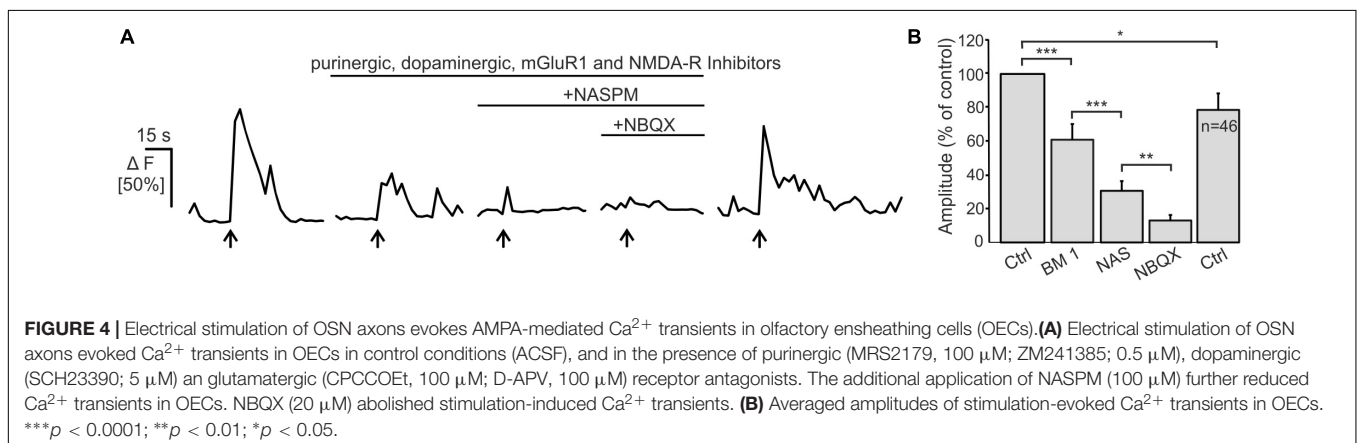
In the present study, we investigated the role of AMPA receptors in OEC physiology and axon-OEC communication. Kainate induced inward currents and Ca^{2+} transients in OECs that were partially mediated by the GluA2-lacking Ca^{2+} -permeable AMPA receptor subtype. Endogenous glutamate release initiated AMPA receptor-mediated Ca^{2+} transients in OECs, indicating the relevance of AMPA receptors for axon-OEC communication.

We showed clear GluA1 and GluA2 immunoreactivity in the ONL colocalized with tdTomato-expressing OECs, while GluA4 immunoreactivity rarely colocalized with tdTomato in OECs. However, in the present study tdTomato was predominantly localized in OEC somata, limiting the detection of OEC processes, in which GluA4 might be enriched, as it has been demonstrated in a study

by Montague and Greer (1999), showing strong GluA4 immunoreactivity in cell processes of presumed olfactory nerve-associated glial cells. Therefore, the results of our and other studies suggest the presence of at least three of four GluA subunits in OECs.

While the presence of GluA2 in OECs argues against Ca^{2+} permeability of the AMPA receptors, our physiological data implies the involvement of Ca^{2+} influx via Ca^{2+} -permeable AMPA receptors. AMPA receptor-dependent Ca^{2+} influx could either be conducted by Ca^{2+} -permeable AMPA receptors or by voltage-gated Ca^{2+} channels activated by AMPA receptor-mediated depolarization (Porter and McCarthy, 1995). However, OECs do not generate voltage-dependent Ca^{2+} influx, e.g., via voltage-gated Ca^{2+} channels, ruling out that a depolarization by AMPA receptors is causative for the kainate-evoked Ca^{2+} signals (Thyssen et al., 2010). In addition, both kainate-evoked membrane currents and Ca^{2+} transients were largely reduced by NASPM, a selective blocker of Ca^{2+} -permeable AMPA receptors (Koike et al., 1997). Hence, taking into account that on the one hand side OECs show immunoreactivity to the GluA2 subunit and on the other hand side the current and Ca^{2+} responses are NASPM-sensitive, the results suggest that OECs express both Ca^{2+} -permeable as well as Ca^{2+} -impermeable AMPA receptors. This is confirmed by the NASPM-insensitive but GYKI-sensitive fraction of kainate-evoked inward currents. In addition to Ca^{2+} influx via Ca^{2+} -permeable AMPA receptors, Ca^{2+} release from internal stores contributes to AMPA receptor-mediated Ca^{2+} transients. OECs generate prominent Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) and even a small Ca^{2+} increase generates a fast and large Ca^{2+} transient by CICR (Stavermann et al., 2012). Thus, Ca^{2+} influx through AMPA receptors upon kainate application could induce CICR that boosts the Ca^{2+} increase and accounts for the fast rising kinetics of the Ca^{2+} signal as compared to the rising phase of the kainate-evoked membrane current. We conclude that Ca^{2+} influx is the initial Ca^{2+} signal that triggers subsequent internal Ca^{2+} release such as CICR, as shown by the entire suppression of the Ca^{2+} signal by external Ca^{2+} withdrawal but only partial reduction upon Ca^{2+} store depletion.

Ca^{2+} signaling in OECs may serve different functions. In other glial cells such as astrocytes, increases in the cytosolic Ca^{2+}



concentration has been reported to evoke release of so-called gliotransmitters that affect nearby neurons and synapses, but also release of vasoactive substances such as prostaglandins and arachidonic acid (Bazargani and Attwell, 2016; Guerra-Gomes et al., 2017). OECs enwrap blood vessels in the ONL (Herrera et al., 2005) and respond to neurotransmitters extrasynaptically released from axons of OSN with Ca^{2+} signals (Rieger et al., 2007; Thyssen et al., 2010; this study). Increases in intracellular Ca^{2+} in OECs results in constriction of adjacent capillaries (Thyssen et al., 2010). Hence, Ca^{2+} signals evoked by glutamate release from axons in the ONL and subsequent activation of Ca^{2+} -permeable AMPA receptors may lead to vasoresponses that adjust blood flow to the metabolic demand upon action potential firing, a mechanism termed neurovascular coupling.

In summary, our results show that release of glutamate from axons of OSN results in Ca^{2+} transients in OECs that are partially mediated by AMPA receptors. AMPA receptor-mediated Ca^{2+} transients were due to Ca^{2+} influx, most likely through Ca^{2+} -permeable AMPA receptors themselves, and subsequent Ca^{2+} release from internal Ca^{2+} stores.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding authors.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by GZ G21305/591-00.33; Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Hamburg, Germany.

REFERENCES

- Au, W. W., Treloar, H. B., and Greer, C. A. (2002). Sublaminar organization of the mouse olfactory bulb nerve layer. *J. Comp. Neurol.* 446, 68–80. doi: 10.1002/cne.10182
- Bazargani, N., and Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat. Neurosci.* 19, 182–189. doi: 10.1038/nn.4201
- Beiersdorfer, A., Scheller, A., Kirchhoff, F., and Lohr, C. (2019). Panglial gap junctions between astrocytes and olfactory ensheathing cells mediate transmission of Ca^{2+} transients and neurovascular coupling. *Glia* 67, 1385–1400. doi: 10.1002/glia.23613
- Belkacemi, T., Niermann, A., Hofmann, L., Wissenbach, U., Birnbaumer, L., Leidinger, P., et al. (2017). TRPC1- and TRPC3-dependent Ca^{2+} signaling in mouse cortical astrocytes affects injury-evoked astrogliosis in vivo. *Glia* 65, 1535–1549. doi: 10.1002/glia.23180
- Berkowicz, D. A., Trombley, P. Q., and Shepherd, G. M. (1994). Evidence for glutamate as the olfactory receptor cell neurotransmitter. *J. Neurophysiol.* 71, 2557–2561. doi: 10.1152/jn.1994.71.6.2557
- Burnashev, N., Khodorova, A., Jonas, P., Helm, P. J., Wisden, W., Monyer, H., et al. (1992). Calcium-permeable AMPA-kainate receptors in fusiform cerebellar glial cells. *Science* 256, 1566–1570. doi: 10.1126/science.1317970
- Cao, L., Zhu, Y. L., Su, Z., Lv, B., Huang, Z., Mu, L., et al. (2007). Olfactory ensheathing cells promote migration of Schwann cells by secreted nerve growth factor. *Glia* 55, 897–904. doi: 10.1002/glia.20511
- Carmignoto, G., and Gomez-Gonzalo, M. (2010). The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling. *Brain Res. Rev.* 63, 138–148. doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.11.007

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AB and CL designed the experiments and wrote the manuscript. AB performed the experiments and analyzed the data.

FUNDING

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (LO779/10 and SFB 1328 TP-A07).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. C. Rakete and M. Fink for technical assistance. We also thank A. Scheller and F. Kirchhoff for providing transgenic animals.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00451/full#supplementary-material>

FIGURE S1 | Control stainings of the cerebellum to validate the specificity of anti-GluA antibodies. GluA1 was detected in Purkinje neurons (arrowhead) and Bergmann glial cells (arrow), GluA2 in Purkinje neurons and GluA4 in Bergmann glial cells, in line with published data. Scale bars: 50 μm .

FIGURE S2 | ADP evokes Ca^{2+} transients but not membrane currents. **(A)** The application of kainate (100 μM) induced an inward current in OECs, whereas the application of ADP (100 μM) did not. **(B)** Average current amplitudes of kainate and ADP-induced currents in OECs. **(C)** Application of kainate and ADP induced Ca^{2+} transients in OECs. **(D)** Average amplitudes of kainate- and ADP-evoked Ca^{2+} transients.

- Crandall, J. E., Dibble, C., Butler, D., Pays, L., Ahmad, N., Kostek, C., et al. (2000). Patterning of olfactory sensory connections is mediated by extracellular matrix proteins in the nerve layer of the olfactory bulb. *J. Neurobiol.* 45, 195–206. doi: 10.1002/1097-4695(200012)45:4<195::aid-neu1>3.0.co;2-y
- Deitmer, J. W., Verkhratsky, A. J., and Lohr, C. (1998). Calcium signalling in glial cells. *Cell Calcium* 24, 405–416. doi: 10.1016/s0143-4160(98)90063-x
- Dickinson, P. J., Griffiths, I. R., Barrie, J. M., Kyriakides, E., Pollock, G. F., and Barnett, S. C. (1997). Expression of the dm-20 isoform of the plp gene in olfactory nerve ensheathing cells: evidence from developmental studies. *J. Neurocytol.* 26, 181–189. doi: 10.1023/a:1018584013739
- Doucette, J. R. (1984). The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *Anat. Rec.* 210, 385–391. doi: 10.1002/ar.1092100214
- Doucette, R. (1990). Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia* 3, 433–449. doi: 10.1002/glia.440030602
- Doucette, R. (1991). PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve. *J. Comp. Neurol.* 312, 451–466. doi: 10.1002/cne.903120311
- Droste, D., Seifert, G., Seddar, L., Jadtke, O., Steinhauser, C., and Lohr, C. (2017). Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in mouse olfactory bulb astrocytes. *Sci. Rep.* 7:44817. doi: 10.1038/srep44817
- Flavell, S. W., and Greenberg, M. E. (2008). Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 563–590. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125631
- Graziadei, G. A., and Graziadei, P. P. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J. Neurocytol.* 8, 197–213. doi: 10.1007/bf01175561

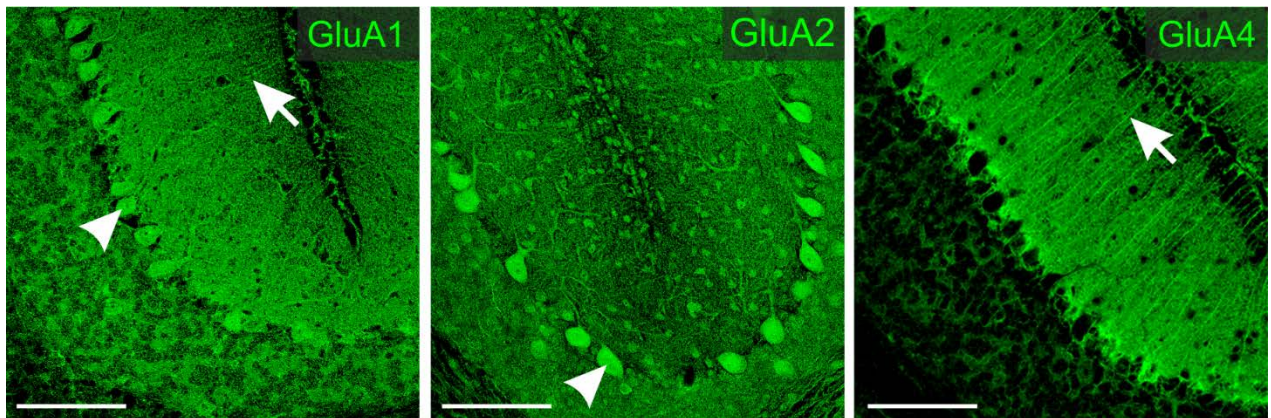
- Griffiths, I. R., Dickinson, P., and Montague, P. (1995). Expression of the proteolipid protein gene in glial cells of the post-natal peripheral nervous system of rodents. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 21, 97–110. doi: 10.1111/j.1365-2990.1995.tb01035.x
- Guerra-Gomes, S., Sousa, N., Pinto, L., and Oliveira, J. F. (2017). Functional roles of astrocyte calcium elevations: from synapses to behavior. *Front. Cell Neurosci.* 11:427. doi: 10.3389/fncel.2017.00427
- Hayat, S., Wigley, C. B., and Robbins, J. (2003). Intracellular calcium handling in rat olfactory ensheathing cells and its role in axonal regeneration. *Mol. Cell. Neurosci.* 22, 259–270. doi: 10.1016/s1044-7431(03)00051-4
- Haydon, P. G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 185–193. doi: 10.1038/35058528
- Herrera, L. P., Casas, C. E., Bates, M. L., and Guest, J. D. (2005). Ultrastructural study of the primary olfactory pathway in *Macaca fascicularis*. *J. Comp. Neurol.* 488, 427–441. doi: 10.1002/cne.20588
- Hoft, S., Griemsmann, S., Seifert, G., and Steinhauser, C. (2014). Heterogeneity in expression of functional ionotropic glutamate and GABA receptors in astrocytes across brain regions: insights from the thalamus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369, 20130602. doi: 10.1098/rstb.2013.0602
- Hollmann, M., Hartley, M., and Heinemann, S. (1991). Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252, 851–853. doi: 10.1126/science.1709304
- Horning, M. S., Kwon, B., Blakemore, L. J., Spencer, C. M., Goltz, M., Houpt, T. A., et al. (2004). Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor subunit expression in rat olfactory bulb. *Neurosci. Lett.* 372, 230–234. doi: 10.1016/j.neulet.2004.09.044
- Jabs, R., Kirchhoff, F., Kettenmann, H., and Steinhauser, C. (1994). Kainate activates Ca(2+)-permeable glutamate receptors and blocks voltage-gated K+ currents in glial cells of mouse hippocampal slices. *Pflugers. Arch.* 426, 310–319. doi: 10.1007/bf00374787
- Koike, M., Iino, M., and Ozawa, S. (1997). Blocking effect of 1-naphthyl acetyl spermine on Ca(2+)-permeable AMPA receptors in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* 29, 27–36. doi: 10.1016/s0168-0102(97)00067-9
- Lalo, U., Pankratov, Y., Kirchhoff, F., North, R. A., and Verkhratsky, A. (2006). NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 26, 2673–2683. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4689-05.2006
- Leone, D. P., Genoud, S., Atanasoski, S., Grausenburger, R., Berger, P., Metzger, D., et al. (2003). Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 22, 430–440. doi: 10.1016/s1044-7431(03)00029-0
- Lohr, C., Grosche, A., Reichenbach, A., and Hirnet, D. (2014). Purinergic neuron-glia interactions in sensory systems. *Pflugers Arch.* 466, 1859–1872. doi: 10.1007/s00424-014-1510-6
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., et al. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* 13, 133–140. doi: 10.1038/nn.2467
- McConkey, D. J., and Orrenius, S. (1997). The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 357–366. doi: 10.1006/bbrc.1997.7409
- Mishra, A., Reynolds, J. P., Chen, Y., Gourine, A. V., Rusakov, D. A., and Attwell, D. (2016). Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nat. Neurosci.* 19, 1619–1627. doi: 10.1038/nn.4428
- Montague, A. A., and Greer, C. A. (1999). Differential distribution of ionotropic glutamate receptor subunits in the rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 405, 233–246. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19990308)405:2<233:aid-cne7<3.0.co;2-a
- Mori, T., Tanaka, K., Buffo, A., Wurst, W., Kuhn, R., and Gotz, M. (2006). Inducible gene deletion in astroglia and radial glia—a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia* 54, 21–34. doi: 10.1002/glia.20350
- Muller, T., Moller, T., Berger, T., Schnitzer, J., and Kettenmann, H. (1992). Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science* 256, 1563–1566. doi: 10.1126/science.1317969
- Noda, M., Nakanishi, H., Nabekura, J., and Akaike, N. (2000). AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *J. Neurosci.* 20, 251–258. doi: 10.1523/jneurosci.20-01-00251.2000
- Piantanida, A. P., Acosta, L. E., Brocardo, L., Capurro, C., Greer, C. A., and Relat, L. (2019). Selective Cre-mediated gene deletion identifies connexin 43 as the main connexin channel supporting olfactory ensheathing cell networks. *J. Comp. Neurol.* 527, 1278–1289. doi: 10.1002/cne.24628
- Porter, J. T., and McCarthy, K. D. (1995). GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligands with increases in [Ca²⁺]_i. *Glia* 13, 101–112. doi: 10.1002/glia.440130204
- Rakers, C., Schmid, M., and Petzold, G. C. (2017). TRPV4 channels contribute to calcium transients in astrocytes and neurons during peri-infarct depolarizations in a stroke model. *Glia* 65, 1550–1561. doi: 10.1002/glia.23183
- Relat, L., Bordey, A., and Greer, C. A. (2010). Olfactory ensheathing cell membrane properties are shaped by connectivity. *Glia* 58, 665–678. doi: 10.1002/glia.20953
- Rieger, A., Deitmer, J. W., and Lohr, C. (2007). Axon-glia communication evokes calcium signaling in olfactory ensheathing cells of the developing olfactory bulb. *Glia* 55, 352–359. doi: 10.1002/glia.20460
- Rozas, J. L., Paternain, A. V., and Lerma, J. (2003). Noncanonical signaling by ionotropic kainate receptors. *Neuron* 39, 543–553. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00436-7
- Rungta, R. L., Bernier, L. P., Dissing-Olesen, L., Groten, C. J., LeDue, J. M., Ko, R., et al. (2016). Ca(2+) transients in astrocyte fine processes occur via Ca(2+) influx in the adult mouse hippocampus. *Glia* 64, 2093–2103. doi: 10.1002/glia.23042
- Saab, A. S., Neumeyer, A., Jahn, H. M., Cupido, A., Simek, A. A., Boele, H. J., et al. (2012). Bergmann glial AMPA receptors are required for fine motor coordination. *Science* 337, 749–753. doi: 10.1126/science.1221140
- Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Matyash, M., Nolte, C., Kettenmann, H., and Kirchhoff, F. (2001). Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *FASEB J.* 15, 1270–1272. doi: 10.1096/fj.00-0439fje
- Seifert, G., and Steinhauser, C. (1995). Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca²⁺ permeability. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1872–1881. doi: 10.1111/j.1460-9568.1995.tb00708.x
- Singaravelu, K., Lohr, C., and Deitmer, J. W. (2006). Regulation of store-operated calcium entry by calcium-independent phospholipase A2 in rat cerebellar astrocytes. *J. Neurosci.* 26, 9579–9592. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2604-06.2006
- Stavermann, M., Buddrus, K., St John, J. A., Ekberg, J. A., Nilius, B., Deitmer, J. W., et al. (2012). Temperature-dependent calcium-induced calcium release via InsP3 receptors in mouse olfactory ensheathing glial cells. *Cell Calcium* 52, 113–123. doi: 10.1016/j.ceca.2012.04.017
- Steinhauser, C., and Gallo, V. (1996). News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci.* 19, 339–345. doi: 10.1016/0166-2236(96)10043-6
- Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K., and Konnerth, A. (2003). In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 7319–7324. doi: 10.1073/pnas.1232232100
- Su, Z., and He, C. (2010). Olfactory ensheathing cells: biology in neural development and regeneration. *Prog. Neurobiol.* 92, 517–532. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.08.008
- Takago, H., Nakamura, Y., and Takahashi, T. (2005). G protein-dependent presynaptic inhibition mediated by AMPA receptors at the calyx of Held. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 7368–7373. doi: 10.1073/pnas.0408514102
- Thyssen, A., Hirnet, D., Wolburg, H., Schmalzing, G., Deitmer, J. W., and 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, 15258–15263. doi: 10.1073/pnas.1003501107
- Toth, A. B., Hori, K., Novakovic, M. M., Bernstein, N. G., Lambot, L., and Prakriya, M. (2019). CRAC channels regulate astrocyte Ca(2+) signaling and gliotransmitter release to modulate hippocampal GABAergic transmission. *Sci. Signal.* 12:eaaw5450. doi: 10.1126/scisignal.aaw5450
- Verkhratsky, A., Orkand, R. K., and Kettenmann, H. (1998). Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol. Rev.* 78, 99–141. doi: 10.1152/physrev.1998.78.1.99
- Wakakura, M., and Yamamoto, N. (1994). Cytosolic calcium transient increase through the AMPA/kainate receptor in cultured Muller cells. *Vision Res.* 34, 1105–1109. doi: 10.1016/0042-6989(94)90293-3
- Wang, Y., Small, D. L., Stanimirovic, D. B., Morley, P., and Durkin, J. P. (1997). AMPA receptor-mediated regulation of a Gi-protein in cortical neurons. *Nature* 389, 502–504. doi: 10.1038/39062
- Woodhall, E., West, A. K., and Chuah, M. I. (2001). Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell

- line-derived neurotrophic factor and their receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 88, 203–213. doi: 10.1016/s0169-328x(01)00044-4
- Yang, H., He, B. R., and Hao, D. J. (2015). Biological roles of olfactory ensheathing cells in facilitating neural regeneration: a systematic review. *Mol. Neurobiol.* 51, 168–179. doi: 10.1007/s12035-014-8664-2
- Zonouzi, M., Renzi, M., Farrant, M., and Cull-Candy, S. G. (2011). Bidirectional plasticity of calcium-permeable AMPA receptors in oligodendrocyte lineage cells. *Nat. Neurosci.* 14, 1430–1438. doi: 10.1038/nn.2942

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.

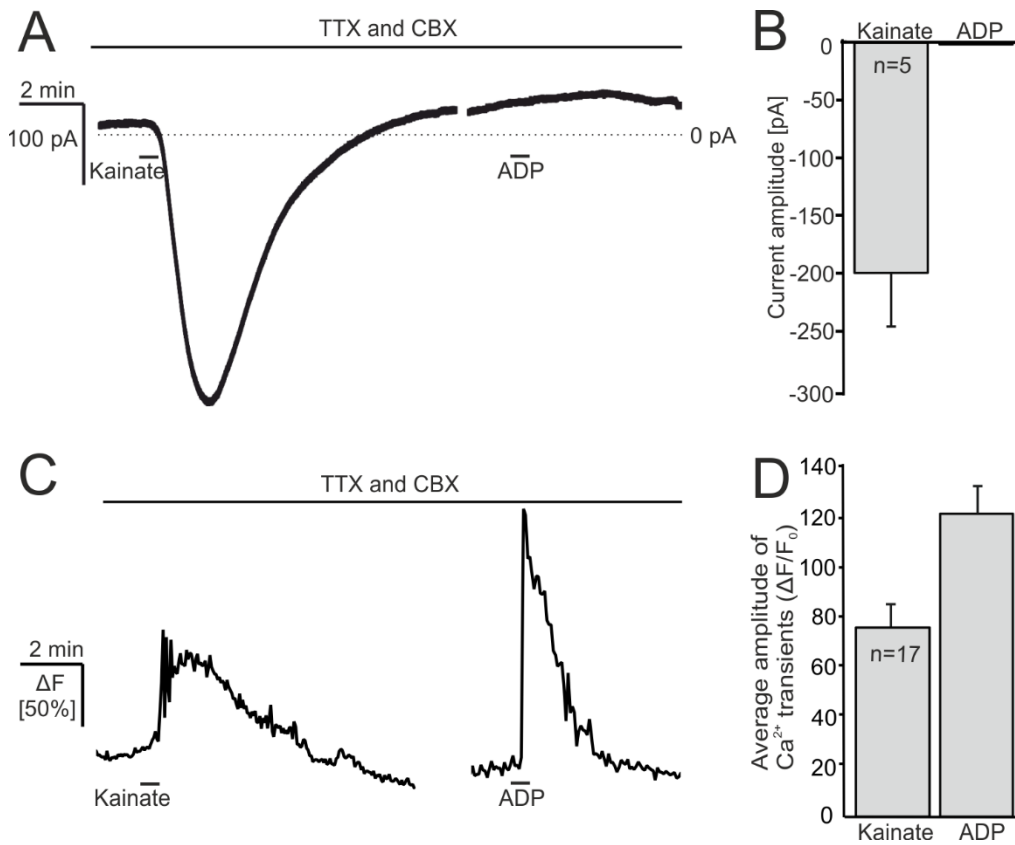
Copyright © 2019 Beiersdorfer and Lohr. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that 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.

Supporting information



Suppl. Fig. 1 Control stainings of the cerebellum to validate the specificity of anti-GluA antibodies.

GluA1 was detected in Purkinje neurons (arrowhead) and Bergmann glial cells (arrow), GluA2 in Purkinje neurons and GluA4 in Bergmann glial cells, in line with published data. Scale bars: 50 μm .



Suppl. Fig. 2 ADP evokes Ca^{2+} transients but not membrane currents.

(A) The application of kainate (100 μM) induced an inward current in OECs, whereas the application of ADP (100 μM) did not. **(B)** Average current amplitudes of kainate and ADP-induced currents in OECs. **(C)** Application of kainate and ADP induced Ca^{2+} transients in OECs. **(D)** Average amplitudes of kainate- and ADP-evoked Ca^{2+} transients.

3. Panglial gap junctions between astrocytes and olfactory ensheathing cell mediate transmission of calcium transients and neurovascular coupling

Antonia Beiersdorfer, Anja Scheller, Frank Kirchhoff, Christian Lohr

Glia 2019;67: 1385-1400. doi: 10.1002/glia.23613

Anteilserklärung

Alle im Kapitel 2 dargestellten Experimente wurden von Antonia Beiersdorfer in Absprache mit Prof. Dr. Christian Lohr geplant, durchgeführt und ausgewertet. Die Abbildungen sowie die erste Version des Manuskripts wurden von A. Beiersdorfer angefertigt. Dr. Anja Scheller und Prof. Dr. Frank Kirchhoff stellten die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mauslinien zur Verfügung. Die zusätzlichen Experimente, die nach erster Begutachtung erforderlich waren, wurden ebenfalls von A. Beiersdorfer durchgeführt und ausgewertet. Die Überarbeitung des ursprünglichen Manuskriptes e A. Beiersdorfer und C. Lohr. Sowohl das ursprüngliche als auch das revidierte Manuskript wurden von A. Scheller und F. Kirchhoff überarbeitet und kommentiert.

Datum und Ort

Unterschrift Betreuer

Prof. Dr. Christian Lohr

RESEARCH ARTICLE

Panglial gap junctions between astrocytes and olfactory ensheathing cells mediate transmission of Ca²⁺ transients and neurovascular coupling

Antonia Beiersdorfer¹  | Anja Scheller²  | Frank Kirchhoff²  | Christian Lohr¹ ¹Division of Neurophysiology, University of Hamburg, Hamburg, Germany²Molecular Physiology, Center for Integrative Physiology and Molecular Medicine (CIPMM), University of Saarland, Homburg, Germany**Correspondence**Christian Lohr, Division of Neurophysiology, University of Hamburg, Hamburg, Germany.
Email: christian.lohr@uni-hamburg.de**Funding information**

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/Award Numbers: FOR 2289 TP-P9, LO 779/10, LO 779/11, SFB 1328 TP-A07, SFB 894 TP-A12, SPP 1757 KI503/12; H2020 Future and Emerging Technologies, Grant/Award Number: Pro-Act Neurofibers; European Commission

Abstract

Astrocytes are arranged in highly organized gap junction-coupled networks, communicating via the propagation of Ca²⁺ waves. Astrocytes are gap junction-coupled not only to neighboring astrocytes, but also to oligodendrocytes, forming so-called panglial syncytia. It is not known, however, whether glial cells in panglial syncytia transmit information using Ca²⁺ signaling. We used confocal Ca²⁺ imaging to study intercellular communication between astrocytes and olfactory ensheathing glial cells (OECs) in in-toto preparations of the mouse olfactory bulb. Our results demonstrate that Ca²⁺ transients in juxtglomerular astrocytes, evoked by local photolysis of "caged" ATP and "caged" tACPD, led to subsequent Ca²⁺ responses in OECs. This transmission of Ca²⁺ responses from astrocytes to OECs persisted in the presence of neuronal inhibition, but was absent when gap junctional coupling was suppressed with carbenoxolone. When Ca²⁺ transients were directly evoked in OECs by puff application of DHPG, they resulted in delayed Ca²⁺ responses in juxtglomerular astrocytes, indicating that panglial transmission of Ca²⁺ signals occurred in a bidirectional manner. In addition, panglial transmission of Ca²⁺ signals from astrocytes to OECs resulted in vasoconstriction of OEC-associated blood vessels in the olfactory nerve layer. Our results demonstrate functional transmission of Ca²⁺ signals between different classes of glial cells within gap junction-coupled panglial networks and the resulting regulation of blood vessel diameter in the olfactory bulb.

KEYWORDS

astrocyte, calcium signaling, gap junction, neurovascular coupling, olfactory ensheathing cell, panglial network, syncytium

1 | INTRODUCTION

Astrocytes are organized in highly specialized networks, modulating synaptic transmission and contributing to tissue homeostasis (Giaume, 2010). Astrocytes communicate with each other by intercellular propagation of Ca²⁺ waves (Deitmer, Verkhratsky, & Lohr, 1998; Scemes & Giaume, 2006). The communication mechanisms underlying the interactions within functional astrocytic networks include Ca²⁺-dependent release of gliotransmitters, in particular ATP, as well as gap junctional coupling between neighboring cells (Charles, 2005; Haydon, 2001). However, astrocytes are also coupled to oligodendrocytes, the myelinating glial cells of the CNS, thereby forming

so-called oligodendrocyte–astrocyte or panglial syncytia (Claus et al., 2018; Fasciani et al., 2018; Griemsmann et al., 2015; Meyer et al., 2018; Rash et al., 1997; Theis, Sohl, Eiberger, & Willecke, 2005; Wasseff & Scherer, 2011). During neuronal activity, panglial syncytia play a crucial role in distributing potassium ions released by axons within the network to maintain extracellular ion homeostasis (Nagy & Rash, 2000; Nualart-Marti, Solsona, & Fields, 2013; Theis et al., 2005). Ca²⁺ transients that propagate from astrocytes to oligodendrocytes have only been shown in cell culture (Parys, Cote, Gallo, De Koninck, & Sik, 2010), whereas spread of Na⁺ from astrocytes to oligodendrocytes has been demonstrated also in brain slices (Augustin et al., 2016; Moshrefi-Ravasdjani, Hammel, Kafitz, & Rose, 2017). While the

spread of K^+ and Na^+ in panglial networks and its homeostatic and metabolic functions have been described in brain tissue, it is not known whether signaling molecules such as Ca^{2+} , IP_3 and other second messengers are transmitted in panglial networks in native tissue and hence panglial coupling contributes to glial information processing in the brain.

In addition to astrocytes, olfactory ensheathing cells (OECs), a specialized population of glial cells in the olfactory bulb (OB), are coupled by gap junctions and propagate intercellular Ca^{2+} waves (Stavermann et al., 2015). Although cell bodies of astrocytes and OECs are spatially separated and organized in distinct networks, both respond to axon stimulation of olfactory sensory neurons (OSN) and the subsequent neurotransmitter release (glutamate and ATP) with Ca^{2+} transients (Lohr, Grosche, Reichenbach, & Hirnet, 2014). This study addresses the question whether OECs and astrocytes communicate with each other via Ca^{2+} signaling in panglial networks. We performed confocal Ca^{2+} imaging to study intercellular communication of OECs and astrocytes in in-toto preparations of mouse olfactory bulbs that maintain intact structural and functional relationships of glial cells. The results show that Ca^{2+} transients in astrocytes in the glomerular layer (GL) led to delayed Ca^{2+} responses in OECs in the olfactory nerve layer (ONL), which depend on gap junctional coupling. This transmission of Ca^{2+} signals from astrocytes to OECs induces vasoconstriction of OEC-associated blood vessels in the ONL.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals and olfactory bulb in-toto preparation

Colonies of NMRI (Naval Medical Research Institute) mice (age: postnatal days 10–20; p10–p20) and GLAST-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mice (age: p31–p52) (Madisen et al., 2010; Mori et al., 2006) were maintained in the institutional animal facility of the University of Hamburg. Cx43kiEGFP mice (Degen et al., 2012) for immunohistological stainings were reared at the animal facility of the University of Bonn (generously provided by C. Steinhäuser). PLP-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} × hGFAP-EGFP^{GfEC} mice (Hirrlinger et al., 2005; Leone et al., 2003) were reared at the University of Saarland. Animal rearing and all experimental procedures were performed according to the European Union's and local animal welfare guidelines (GZ G21305/591–00.33; Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Hamburg, Germany and Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz in Saarbrücken, Germany; animal license number: 34/2016). To induce tdTomato reporter expression in GLAST-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} and PLP-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} × hGFAP-EGFP mice, tamoxifen (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) was dissolved in ethanol and wheat germ oil (Sigma Aldrich) and injected intraperitoneally for three consecutive days (starting p21; 100 mg/kg bodyweight). Animals were analyzed 8–11 days after the first injection. In-toto preparations of the olfactory bulb were prepared as described (Stavermann et al., 2012). Each olfactory bulb was removed from the opened head in cooled preparation solution (see below), glued onto small coverslips (the lateral surface of the olfactory bulb facing upwards) and stored for 45 min in carbogen-gassed ACSF at 30°C for recovery. Standard artificial cerebrospinal fluid (ACSF)

consisted of (in mM): 120 NaCl, 2.5 KCl, 1 NaH₂PO₄ × 2H₂O, 26 NaHCO₃, 2.8 D-(+)-glucose, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂. The preparation solution consisted of (in mM) 83 NaCl, 1 NaH₂PO₄ × 2H₂O, 26.2 NaHCO₃, 2.5 KCl, 70 sucrose, 20 D-(+)-glucose, 2.5 MgSO₄ × 7 H₂O. Both solutions were continuously gassed with carbogen (95% O₂, 5% CO₂) to maintain the pH of 7.4 and to supply oxygen.

2.2 | Reagents

The reagents (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG, agonist of mGluR_{1/5}), (E)-ethyl 1,1a,7,7a-tetrahydro-7-(hydroxyimino)cyclopropa[b]chromene-1a-carboxylate (CPCCOEt, antagonist of mGluR₁), 2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine (MPEP, antagonist of mGluR₅), 2'-deoxy-N⁶-methyladenosine 3',5'-bisphosphate (MRS2179, antagonist of P2Y₁), 6-amino-N-cyclohexyl-N,3-dimethylthiazolo[3,2-a]benzimidazole-2-carboxamide (YM298198; antagonist of mGluR₁), 2-(2-furanyl)-7-[3-(4-methoxyphenyl)propyl]-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine (SCH442416, antagonist of A_{2A} receptors) and (R)-(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine (SCH23390, antagonist of D1-like dopamine receptors) were obtained from Abcam (Cambridge, United Kingdom). Carbenoxolone disodium salt (CBX; inhibiting gap junctions) was purchased from Sigma Aldrich. The reagents D-2-amino-5-phosphonovaleric acid (D-APV; antagonist of NMDA receptors), 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX; antagonist of AMPA receptors) and tetrodotoxin (TTX; inhibiting voltage-gated sodium channels) were received from Alomone labs (Jerusalem, Israel). The "caged" agonists (1S,3R)-1-(2-nitrophenyl)ethylcarboxyamino-cyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (caged tACPD; agonist of mGlu receptors of the groups 1 and 2) and adenosine 5'-triphosphate, P3-(1-[4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl]ethyl) ester, diammonium salt (DMNPE-caged ATP, agonist of P2 receptors) were obtained from Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom). All reagents were stored as stock solutions corresponding to the manufacturer's instructions and added to ACSF directly before the experiment. The drug application to the preparations occurred via the perfusion system.

2.3 | Ca²⁺ imaging

Whole bulbs were transferred into a recording chamber and secured with a platinum grid. During all experiments, the temperature of the perfusion saline was adjusted to 30°C. For multi-cell bolus loading (Stosiek, Garaschuk, Holthoff, & Konnerth, 2003), a glass pipette with a resistance of ~3 MΩ (when filled with ACSF) was filled with 200 μM Fluo-4 AM (Thermo Fisher, Darmstadt, Germany) or Fluo-8 AM (Biomol, Germany) in ACSF, made from a 4 mM stock solution (dissolved in DMSO and 20% pluronic acid). After inserting the injection pipette into the ONL, the Ca²⁺ indicator was pressure-injected with 0.7 bar for 30 s into the tissue (PDES-01 a.m., NPI electronic GmbH, Tamm, Germany), followed by an incubation of 20 min at 30°C. Changes in the cytosolic Ca²⁺ concentration in OECs and juxtglomerular cells (JGCs) were detected by the fluorescence of Fluo-4 (excitation: 488 nm; emission: 500–530 nm) using a confocal microscope (eC1, Nikon, Düsseldorf, Germany). Images were acquired at a time rate of one frame every 3 s. For puff application of DHPG we used a glass

pipette with a resistance of ~ 2.5 M Ω filled with DHPG (500 μ M in ACSF). After placing the pipette near to the ONL, DHPG was pressure-applied onto the ONL at 0.1 bar for 5 s. The photolysis of caged tACPD (1 mM) and caged ATP (2 mM) were executed by pressure application into one glomerulus via a glass pipette (~ 2.5 M Ω) at 0.1 bar for 500–1,000 ms followed by irradiation with a 405-nm laser for 6 s, resulting in “uncaging” of the agonist and thus the release of the active substance. The illuminated spot (~ 200 μ m²) was placed within the glomerulus, in which the agonists had been injected before. Fluo-4 fluorescence was recorded before and immediately after photolysis of the agonists. All other drugs were applied via the perfusion system.

2.4 | Measurement of vasoconstriction

After bulk loading with Fluo-8 AM, a micropipette with a resistance of 7–8 M Ω was filled with 1 μ M sulforhodamine 101 (SR101; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, United States) diluted in ACSF and inserted into a blood vessel located in the olfactory nerve layer. SR101 was pressure injected with 0.1 bar, 30 s into the blood vessel, resulting in an immediate labeling of the blood vessel network throughout the OB (Thyssen et al., 2010). SR101 excitation occurred by a helium-neon laser (excitation 543 nm; emission 553–618 nm) of the confocal microscope. Vasoconstriction was measured as decrease of SR101 fluorescence in regions of interest (ROI) covering the entire cross section of the blood vessel.

2.5 | Analysis of Ca²⁺ imaging data

To analyze Ca²⁺ changes in single cell somata, regions of interest (ROIs) were defined using Nikon EZ-C1 3.90 software. Since more than 95% of cell somata in the ONL belong to OECs (Au, Treloar, & Greer, 2002; Thyssen et al., 2010), such somata were defined as OECs. Cells localized around glomeruli were addressed as JGCs and comprise astrocytes and interneurons (Doengi et al., 2009; Doengi, Deitmer, & Lohr, 2008). In some experiments, juxtglomerular astrocytes were identified by tdTomato expression using GLAST-Cre^{ERT2} \times tdTomato^{fl/fl} mice. The changes in Ca²⁺ were recorded throughout the experiments as relative changes in Fluo-4 fluorescence (ΔF) with respect to the resting fluorescence, which was normalized to 100%. Quantification of the Ca²⁺ transients was achieved by calculating the amplitude of ΔF . All values are stated as mean values \pm standard error of the mean. The number of experiments is given as $n = x/y$, where x is the number of analyzed cells and y is the number of animals used for a given set of experiments, which was ≥ 3 . Statistical significance was estimated by comparing two means using the Mann–Whitney U -Test or, for paired data, the Wilcoxon-Test or Student's t -test, with the error probability p (* $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$).

2.6 | Dye coupling experiments and electrophysiological pair recordings

For dye coupling experiments, olfactory bulb slices (220 μ m, horizontal) of PLP-Cre^{ERT2} \times tdTomato^{fl/fl} mice and GLAST-Cre^{ERT2} \times tdTomato^{fl/fl} mice, respectively, were prepared using a vibratome (Leica VT1200S).

Slices were placed in a recording chamber, continuously perfused with carbogen-gassed ACSF and whole-cell voltage-clamp recordings were performed on OECs and astrocytes. OECs were identified by their tdTomato expression in PLP-Cre^{ERT2} \times tdTomato^{fl/fl} mice. Astrocytes were identified by tdTomato expression in GLAST-Cre^{ERT2} \times tdTomato^{fl/fl} mice, their linear current–voltage relationships (De Saint Jan & Westbrook, 2005) and their location in the glomerular layer. tdTomato was excited at 543 nm. Recordings were digitized (Digidata 1440A, Molecular Devices) at 10–20 kHz and filtered (Bessel filter 2 kHz; Schulz et al., 2018). The holding potential was -80 mV. Patch pipettes had a resistance of 4–7 M Ω when filled with internal solution containing (mM): 105 K-gluconate, 30 KCl, 10 HEPES, 10 phosphocreatine, 4 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP, 0.3 EGTA, and pH = 7.43. The tracers biocytin (5 mg/mL, TRC, Toronto, Canada) and ATTO-488 carboxy (20 μ M, ATTO-Tech GmbH, Siegen, Germany) were added to the internal solution before the experiments. OECs were loaded for 45–60 min in voltage clamp mode. Afterwards cells were fixed in formalin (4% paraformaldehyde in phosphate buffered solution containing [mM]: 130 NaCl, 7 Na₂HPO₄, 3 NaH₂PO₄; pH 7.4) at 4°C and additionally stained by immunohistochemistry. Whole-cell pair-recordings of OECs and astrocytes were performed using PLP-Cre^{ERT2} \times tdTomato^{fl/fl} \times hGFAP-EGFP mice. OECs were identified by tdTomato expression, whereas astrocytes were identified by EGFP expression. To characterize functional gap junctional coupling, the flow of currents induced by a series of depolarizing and hyperpolarizing voltage steps (-220 to 40 mV, 20 mV increment) in either astrocytes or OECs was analyzed in the corresponding cell.

2.7 | Immunohistochemistry

Immunohistochemistry on olfactory bulbs of NMRI mice (P14), Cx43kiECFP mice (P14) and PLP-Cre^{ERT2} \times tdTomato^{fl/fl} mice ($>P30$) was performed as described (Droste et al., 2017). After dissection, the olfactory bulbs were kept for 1 h at room temperature (RT) in formalin (4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4). Subsequently, 150 μ m thick sagittal slices were prepared with a vibratome (VT1000S, Leica, Nussloch, Germany) and incubated for 1 h in blocking solution (10% normal goat serum [NGS], 0.5% Triton X-100 in PBS) at RT. Afterwards, the slices were incubated for 48 h at 4°C with the following primary antibodies: rabbit anti-S100B (Dako, Hamburg, Germany; 1:1000); rabbit anti-GFAP (Dako, 1:1000); chicken anti-GFP (which also labels ECFP; Synaptic Systems, Göttingen, Germany; 1:500). The antibodies were diluted in 1% NGS, 0.05% Triton X-100 in PBS. Slices were incubated in PBS with the following secondary antibodies for 24 hr at 4°C: goat anti-rabbit Alexa 488 (Thermo Fisher; 1:1000); goat anti-rabbit Alexa 555 (Thermo Fisher; 1:1000), goat anti-mouse Alexa 405 (Thermo Fisher; 1:1000) goat anti-chicken Alexa 488 (Abcam; 1:1000). Additionally, Hoechst 33342 (5 μ M; Molecular Probes, Eugene, USA) was added to stain nuclei. Biocytin labeling was visualized by Alexa488-conjugated streptavidin (Biozol, 1:200). Subsequently, the slices were mounted on slides using self-hardening embedding medium (Immu-Mount, Thermo Fisher). Immunohistological stainings were analyzed using a confocal microscope (Nikon eC1). Confocal images were enhanced for brightness and contrast using ImageJ and Adobe Photoshop CS6.

3 | RESULTS

3.1 | Distribution of olfactory bulb glial cells

We used PLP-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mice for specific identification of OECs and to analyze the distribution of OECs, oligodendrocytes and astrocytes in the ONL and GL by immunohistochemistry. The *plp* gene encodes for both, the principle myelin protein proteolipid protein PLP1 of oligodendrocytes and its splice variant DM20, which is expressed by oligodendrocytes and OECs (Griffiths, Dickinson, & Montague, 1995). PLP1⁻/DM20⁺ OECs are restricted to the ONL, where they enwrap bundles of unmyelinated axons, while PLP1⁺/DM20⁺ oligodendrocytes are found in deeper layers such as the GL and external plexiform layer (EPL) forming myelin sheaths around axons of mitral and tufted cells (Dickinson et al., 1997). Hence, tdTomato-positive cells in the ONL of PLP-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mice were regarded as OECs (Figure 1). OECs only weakly express GFAP, in contrast to astrocytes in the GL (Au et al., 2002; Thyssen et al., 2013). Thus, we aimed to visualize astrocytes by anti-GFAP staining. GFAP-positive astrocytes were located throughout the GL, which can be distinguished from the ONL by glomerular structures (Figure 1a). Although somata of astrocytes were almost exclusively located in the GL and deeper layers, some astrocytic processes projected into the ONL, where they intermingled with processes of OECs (Figure 1b). In addition, GFAP-positive processes in the ONL were frequently associated with penetrating arterioles, which are ensheathed by astrocytic endfeet throughout the ONL (Figure 1a). In summary, OEC cell bodies can be identified by their location in the ONL and

reporter expression in PLP-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mice, whereas astroglial cell bodies can be identified by their location in the GL (and deeper layers) and expression of GFAP.

3.2 | Astrocytes and OECs are coupled via gap junctions

Astrocytes are arranged in highly organized networks throughout the nervous system (Giaume, Koulakoff, Roux, Holcman, & Rouach, 2010; Giaume & McCarthy, 1996; Giaume & Venance, 1998; Houades, Koulakoff, Ezan, Seif, & Giaume, 2008). In the olfactory bulb, astrocytes that contribute to a single glomerulus are coupled via gap-junctions, forming a distinct functional unit (Roux, Benchenane, Rothstein, Bonvento, & Giaume, 2011). Moreover, OECs in the ONL show high connectivity and propagation of gap junction-dependent Ca²⁺ waves (Rela, Bordey, & Greer, 2010; Stavermann et al., 2015). Hence, both populations of olfactory bulb glial cells are gap junction-coupled within each population, and we asked whether gap-junctional coupling does also occur between those two different populations of glial cells. We performed dye coupling experiments in GLAST-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mice, with tdTomato expression in both astrocytes and OECs (Figure 2a). Using the patch-clamp technique in acute OB slices, tdTomato-positive astrocytes, additionally identified by distinct electrophysiological properties (De Saint Jan & Westbrook, 2005; Roux et al., 2011) and localization in the GL, were loaded with the gap junction-permeable tracer biocytin (molecular weight 372.5 D). Furthermore, the patch pipette solution contained the fluorescent dye Atto-488 carboxy to visualize the pipette tip and to confirm the identity of the recorded

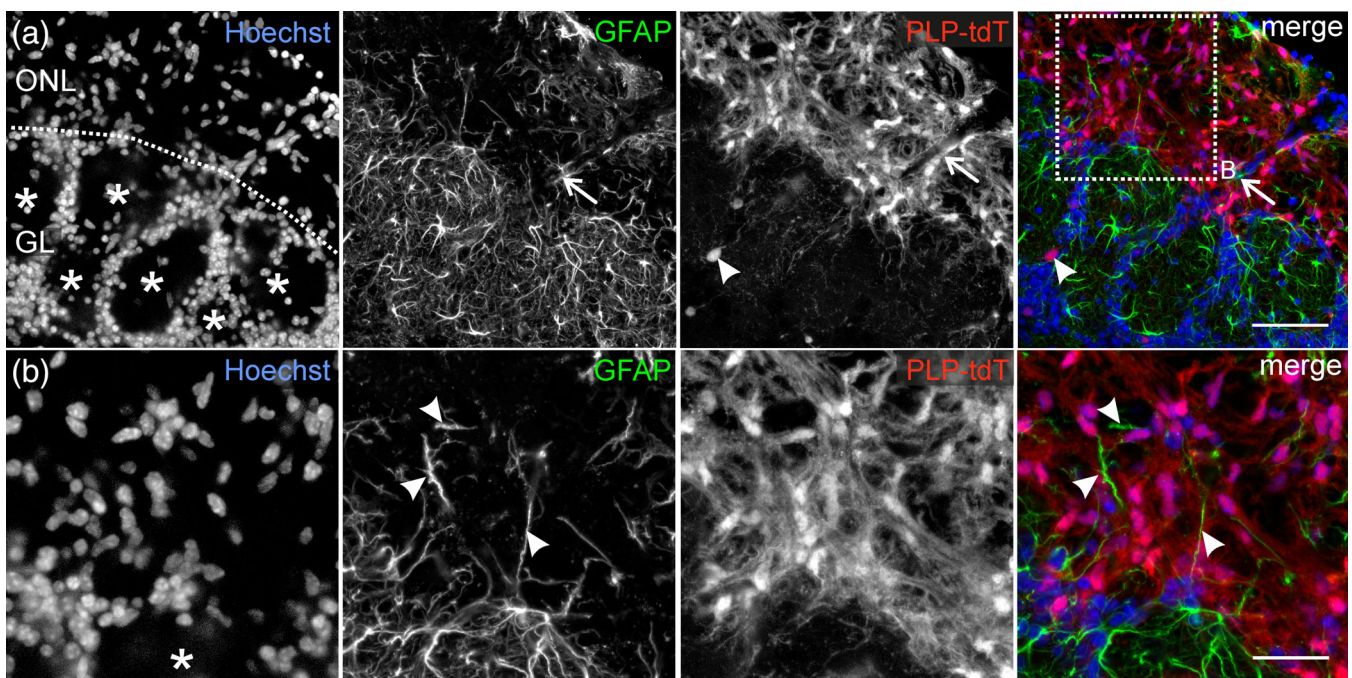


FIGURE 1 Distribution of glial cell types in the olfactory bulb. (a) Nuclei (blue) are stained with Hoechst for illustration of the lamination. GL, glomerular layer; ONL, olfactory nerve layer. Individual glomeruli are indicated by asterisks. Anti-GFAP staining (green) shows astrocytes. Cell bodies of astrocytes are located in the GL and around a penetrating arteriole (arrow) crossing the ONL. OECs are labeled by tdTomato in PLP-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mice (red) and are located in the ONL. Single oligodendrocytes expressing tdTomato can be found in the GL (arrowhead). Scale bar: 50 μm. (b) Magnified view from (a), highlighting some astrocytic processes (arrowheads) projecting from the GL (asterisks) into the ONL. Scale bar: 25 μm

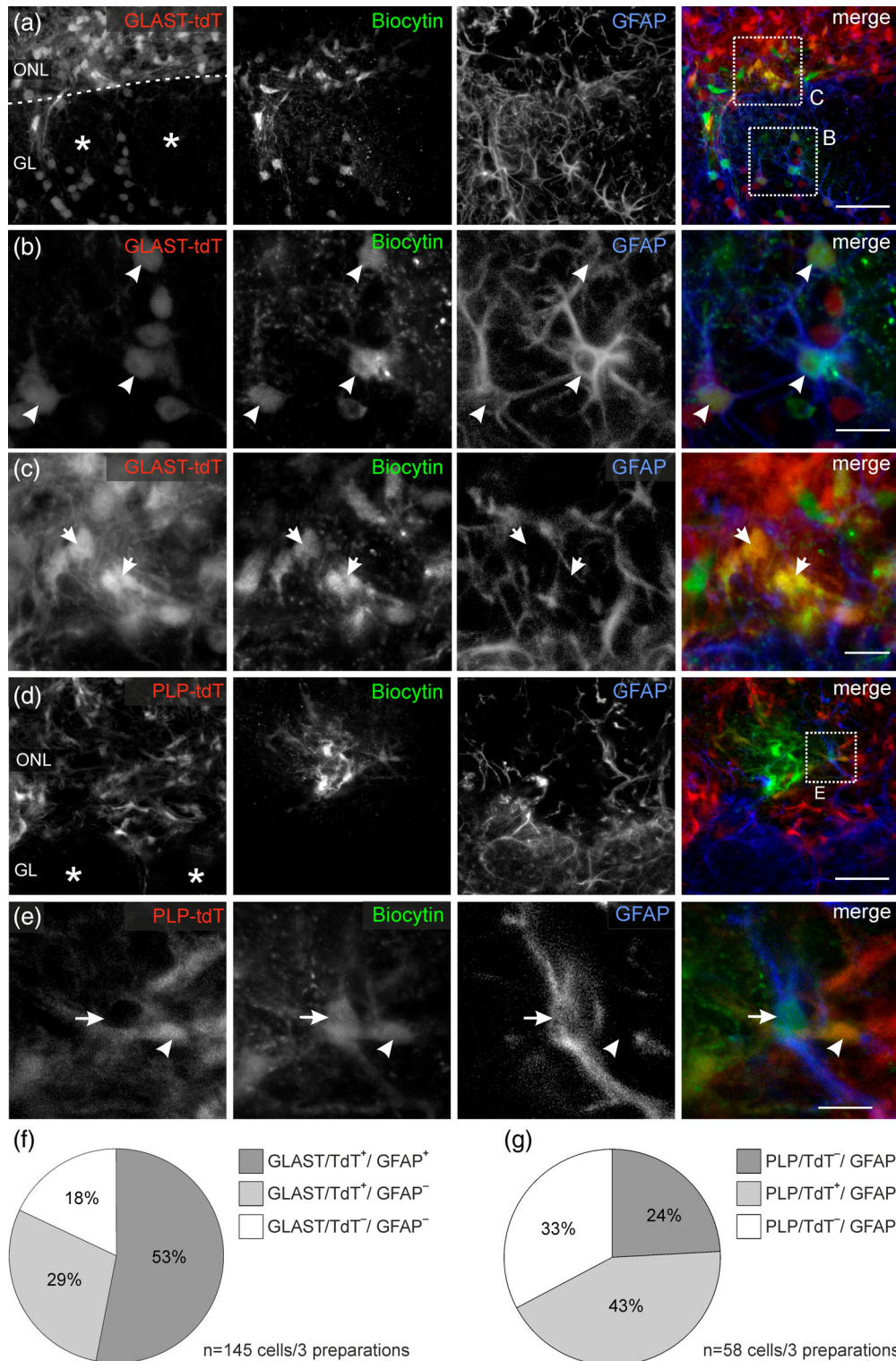


FIGURE 2 Olfactory bulb astrocytes and OECs form gap-junction coupled networks. (a) OECs in the ONL as well as astrocytes in the GL show GLAST-Cre^{ERT2}-induced tdTomato expression (red). Loading of a single astrocyte in the GL with the gap junction-permeable tracer biocytin results in spreading of the tracer within the cellular network, as visualized by post-hoc staining with streptavidin-Alexa488 (green). Anti-GFAP staining highlights astrocytes (blue). Scale bar: 50 μ m. (b) Magnified view from (a), showing a biocytin-filled tdTomato- and GFAP-positive astrocyte (arrowhead). Scale bar: 10 μ m. (c) Magnified view from (a), showing biocytin-filled tdTomato-positive, but GFAP-negative OECs (arrows). Scale bar: 10 μ m. [d] Glial network visualized by loading of biocytin (green) into an individual OEC, identified by tdTomato expression induced by PLP-Cre^{ERT2} expression (red). Anti-GFAP staining is shown in blue. Scale bar: 50 μ m. (e) Magnified view from "d", showing biocytin-filled tdTomato-positive OECs (arrowhead) and a biocytin-filled GFAP-positive astrocyte (arrow). Scale bar: 10 μ m. (f) Quantification of astrocytes and OECs contributing to the network in GLAST-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mice. (g) Quantification of OECs and astrocytes contributing to the network in PLP-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mice

cell. With a molecular weight of about 1 kD, Atto-488 carboxy did not pass through gap junctions sufficiently to stain coupled cells, resulting in a single Atto-488 carboxy-filled cell. After cells were recorded for approximately 40 min to allow for diffusion of biocytin into gap junction-coupled cells, brain slices were fixed in formalin and biocytin was visualized by streptavidin (Figure 2a). In addition, anti-GFAP staining was used to distinguish between astrocytes and OECs post-fixation. The loading of an individual astrocyte with biocytin resulted in the spread of the gap junction-permeable tracer into neighboring tdTomato-positive astrocytes that also showed anti-GFAP labeling (Figure 2b). However, some biocytin-labeled tdTomato-positive glial cells were localized within the ONL and lacked anti-GFAP staining, presumably representing OECs (Figure 2c). To distinguish between astrocytes and OECs more precisely, we took advantage of PLP-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mice. OECs, identified by PLP-promotor driven tdTomato expression and localization in the ONL, were loaded with biocytin (Figure 2d). Anti-GFAP staining was performed to identify astrocytes post-fixation (Figure 2d). Loading of an individual OEC with biocytin resulted in the spread of the gap-junction permeable tracer into neighboring tdTomato-positive OECs (Figure 2e, arrowhead), as well as into GFAP-positive astrocytes, lacking tdTomato fluorescence (Figure 2e, arrow). We were also interested in the size of the network of dye-coupled cells. When loading an individual astrocyte with biocytin, the total number of coupled cells within the network amounted to an average of 48 ± 2 cells ($n = 3$ preparations). Of these, 53% were tdTomato- and GFAP-positive, thus representing astrocytes and 29% tdTomato-positive and GFAP-negative, representing OECs. 18% of the dye-coupled cells were tdTomato-negative and could not be unequivocally identified (Figure 2f). When loading an individual OEC with biocytin, the average network size amounted to 19 ± 5 coupled cells ($n = 3$ preparations) with 43% of the dye-coupled cells being OECs, (tdTomato-positive and GFAP-negative). Astrocytes represented 24% of the cells (tdTomato-negative and GFAP-positive) and 33% of the coupled cells lacked tdTomato as well as GFAP, and therefore, could not be classified (Figure 2g). In summary, our results indicate gap-junctional coupling of astrocytes and OECs.

3.3 | Astrocytes and OECs are electrically coupled

To analyze the flow of electrical current within the panglial network, we performed whole-cell patch-clamp recordings of glial cell pairs in transgenic PLP-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} × hGFAP-EGFP mice (tdTomato: OECs; EGFP: astrocytes) (Figure 3a,b). Adjacent OECs and astrocytes were recorded at a holding potential of -80 mV. A series of voltage steps (-220 to 40 mV) in 20 mV increments for 200 ms each step was applied to either one cell (stimulated cell), whereas the resulting currents were measured in the other cell (receiving cell). Electrical coupling was detected in four out of 10 pair recordings. A hyperpolarizing voltage step to -220 mV in OECs led to a large inward current of 4.0 ± 1.0 nA ($n = 4$) and resulted in an outward current of 35.0 ± 23.6 pA ($n = 4$) in astrocytes (Figure 3c,d). A hyperpolarizing voltage step to -220 mV in astrocytes led to a large inward current of 4.1 ± 1.8 nA ($n = 4$), which was transmitted via gap junctions to the receiving OEC and compensated by an outward current of 50.4 ± 37.9 pA ($n = 4$), indicating that panglial gap junction coupling of astrocytes and OECs shows no rectification (Figure 3e,f). Both cell types showed a linear current-voltage relationship

(Figure 3d,f). In the presence of the gap junction inhibitor carbenoxolone (CBX, $100 \mu\text{M}$) a hyperpolarizing voltage step to -220 mV in astrocytes led to an inward current of 3.6 ± 1.5 nA, whereas the compensated outward current in OECs was reduced to 7.4 ± 3.0 pA ($n = 4$) (Figure 3e,f). However, six out of 10 pairs of astrocytes and OECs showed no flow of current and thus no electrical coupling (Supp. Figure 1). Our results indicate functional gap junction coupling between a subset of astrocytes and OECs.

3.4 | Juxtglomerular astrocytes and OEC express Cx43

Cx43 is one of the most abundantly expressed connexins in astrocytes (Scemes, Suadicani, Dahl, & Spray, 2007). Therefore, we performed immunohistological stainings taking advantage of Cx43kiEGFP reporter mice, where ECFP expression is controlled by the Cx43 locus, and tested whether not only astrocytes, but also OECs may express Cx43. Cx43-expressing cells were located in the ONL and the GL (Figure 4a,b). Furthermore, the immunoreactivity of GFAP in the GL was co-localized with ECFP, indicating that juxtglomerular astrocytes express Cx43 (Figure 4b, see arrowheads). Additionally, we found ECFP in S100B-positive OECs in the ONL (Figure 4a, see arrowheads), concluding that both olfactory bulb glial cell populations express Cx43.

3.5 | Astrocytes and OECs transmit Ca²⁺ signals in a bidirectional way

We performed confocal Ca²⁺ imaging using in-toto preparations of OBs to investigate the transmission of Ca²⁺ among the panglial network of astrocytes and OECs in wild type mice. The Ca²⁺ indicator Fluo-4 AM was pressure-injected into the tissue, resulting in loading of different cell populations in the OB with Fluo-4 (Figure 5a,b) (Stavermann et al., 2012). The ONL comprises OECs and axons of olfactory sensory neurons, but lacks neuronal cell bodies (Doucette, 1990, 1991). Hence, in a confocal optical section of the olfactory bulb, OECs can be identified by their localization in the ONL (Stavermann et al., 2012; Stavermann et al., 2015; Thyssen et al., 2013) (Figure 5c). Since some astrocytes might be located along the border between ONL and GL, cells in this region were excluded from analysis (Figure 5b,c). Astrocytes in the GL cannot be distinguished from periglomerular neurons solely by their location. Therefore, juxtglomerular cells imaged during our experiments may include both astrocytes and neurons. To suppress neuronal Ca²⁺ signaling, which is mainly evoked by glutamatergic excitation and action potential firing, TTX ($1 \mu\text{M}$), NBQX ($20 \mu\text{M}$), and D-APV ($100 \mu\text{M}$) were added to the ACSF. Under these conditions, Ca²⁺ responses evoked in the GL by the mGluR agonist tACPD are attributed to astrocytes and Ca²⁺ signaling in juxtglomerular cells are referred to as “astrocytic” in the following. OECs respond to neurotransmitters such as glutamate, ATP and dopamine (Thyssen et al., 2010; Thyssen et al., 2013). To suppress direct neurotransmitter-evoked Ca²⁺ transients in OECs and thus isolate gap junction-mediated transmission of Ca²⁺ signals between astrocytes and OECs, we blocked neurotransmitter receptors in OECs (dopaminergic: SCH23390, $5 \mu\text{M}$; purinergic: MRS 2179, $100 \mu\text{M}$, and SCH442416, $100 \mu\text{M}$; mGluR₁: CPCOEt, $100 \mu\text{M}$). We performed local photolysis of “caged” tACPD, a biologically inactive

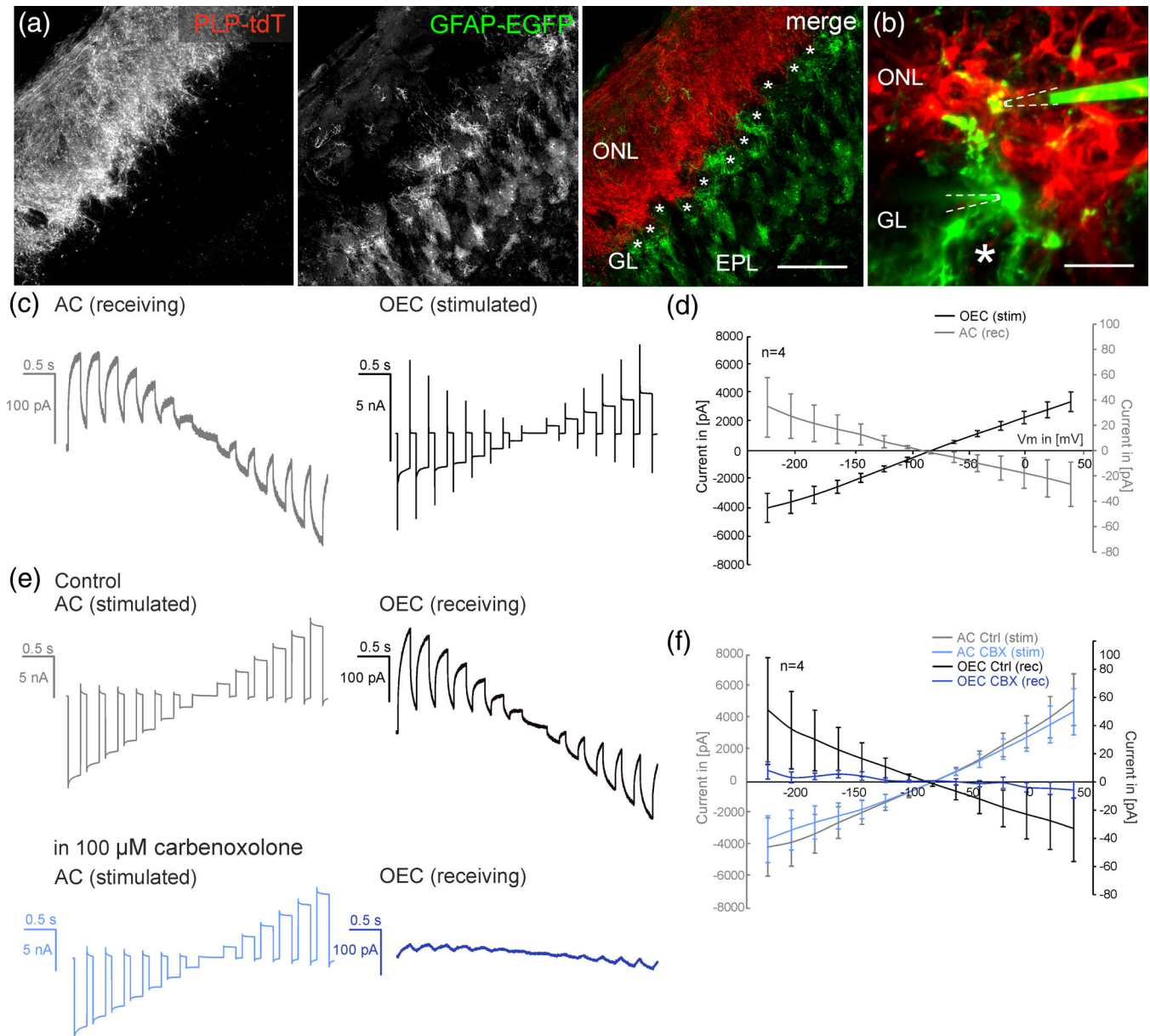


FIGURE 3 Electrical coupling between astrocytes and OECs in double-transgenic mice. (a) Distribution of OECs and astrocytes in PLP-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} × hGFAP-EGFP mice. tdTomato-expressing OECs (red) are located in the ONL, whereas EGFP-expressing astrocytes (green) are located in the GL and EPL. Glomeruli are marked by asterisks. Scale bar: 100 μm. (b) Confocal image of a brain slice used for whole-cell pair recordings. Dashed lines indicate location of patch pipettes. The asterisk indicates a glomerulus. Scale bar: 30 μm. (c) Paired voltage-clamp recording of an OEC (black trace) and an astrocyte (grey trace). A series of voltage steps (−220 to 40 mV) was applied to an OEC, while the astrocyte (receiving cell) was clamped to a holding potential of −80 mV. Hyperpolarizing voltage steps in the stimulated OEC (stim) were recorded as outward currents in the receiving astrocyte (rec), whereas depolarizing voltage steps were recorded as inward currents. [d] IV plots corresponding to recordings as shown in (c). Current responses of the stimulated cell are shown on the left ordinate, whereas current responses of the receiving cell are shown on the right ordinate. (e) Same pair of OEC and astrocyte as in (c). Hyperpolarizing voltage steps induced in the astrocyte led to inward currents (grey trace) compensated by outward currents in the receiving OEC (black trace). In the presence of the gap junction inhibitor carbenoxolone (CBX, 100 μM), hyperpolarizing voltage steps induced inward currents in the stimulated astrocyte (light blue trace), while compensating outward currents in the receiving OEC were reduced (dark blue trace). (f) IV plots corresponding to the recordings shown in (e). Current responses of the stimulated astrocyte in control (ctrl, grey) and in the presence of CBX (light blue) are shown on the left ordinate, whereas the current responses of the OEC in control (ctrl, black) and in the presence of CBX (dark blue) are shown on the right ordinate

yet photoactivatable agonist of metabotropic glutamate receptors. Caged tACPD was pressure-injected into the GL evoking a small decrease in fluorescence due to tissue movement in some experiments (Figure 5e). We photo-released tACPD by illumination with a 405-nm diode laser within one glomerulus to induce Ca²⁺ transients directly in adjacent juxtglomerular astrocytes by activating mGluR₅.

Local uncaging of tACPD induced Ca²⁺ responses in juxtglomerular astrocytes within the first image frame after photostimulation (3 s) and, with a delay of 24.7 ± 1.7 s (n = 35/6), in OECs (Figure 5d,e). The amplitude of tACPD-induced Ca²⁺ signals in juxtglomerular cells reached 158.4 ± 10.0% ΔF (n = 88/6), whereas the amplitude of the delayed Ca²⁺ transient in OECs reached 62.2 ± 4.9% ΔF

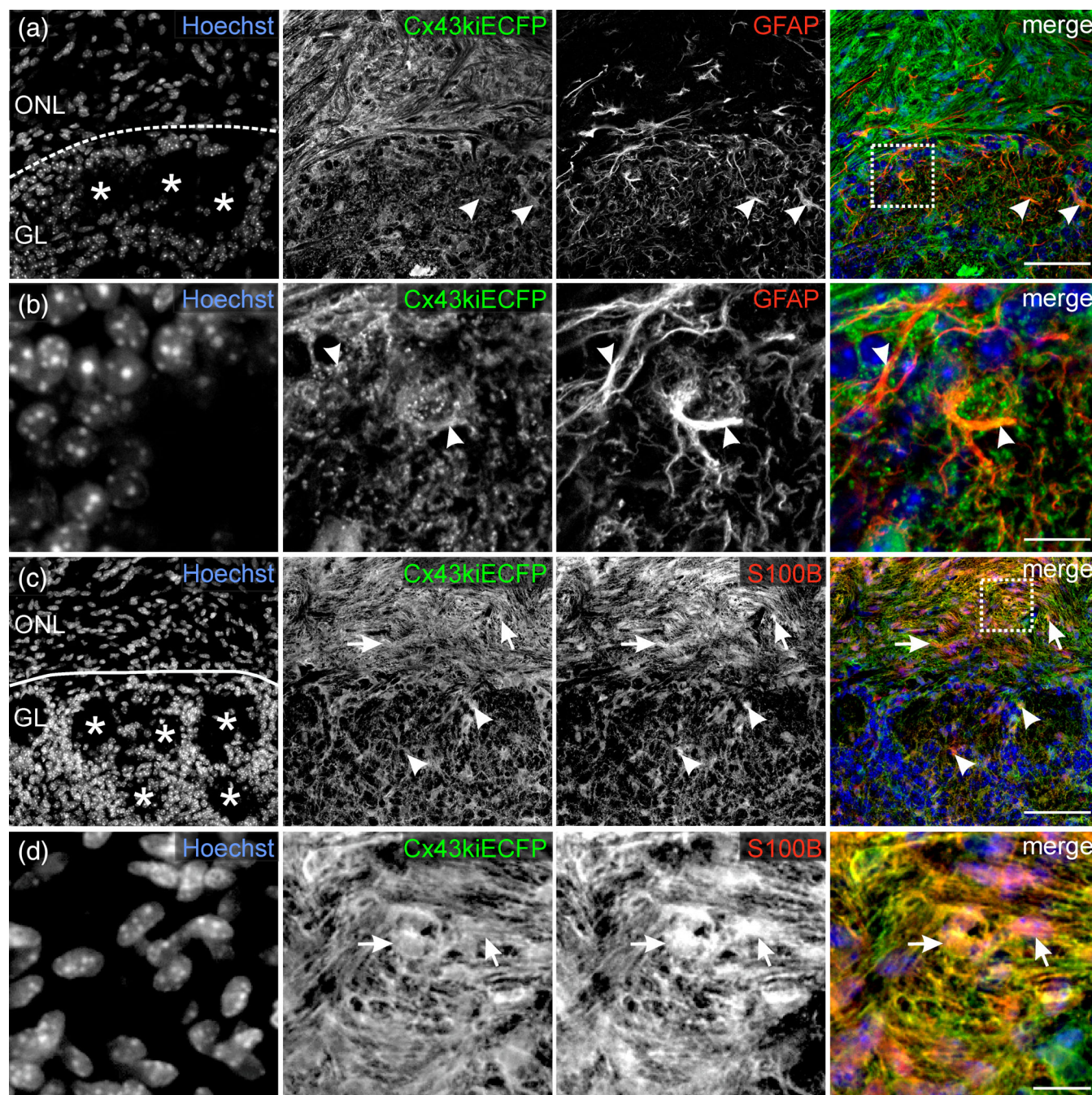


FIGURE 4 Cx43-dependent ECFP expression in olfactory bulb glial cells. (a) Nuclear staining with Hoechst allows for clear discrimination of the ONL and GL. Glomeruli are marked by asterisks. Anti-GFAP staining highlights astrocytes also expressing ECFP controlled by the Cx43 locus in Cx43kiECFP mice (arrowheads). (b) Enlarged view of the preparation shown in (a) as indicated by the square. GFAP-positive cell processes colocalize with ECFP (arrowheads) (c, d) S100B-positive OECs in the ONL (arrows) and astrocytes in the GL (arrowheads) both colocalizing with ECFP. Scale bars: a and c, 30 μm ; b and d, 7 μm

($n = 35/6$). tACPD-induced Ca^{2+} responses in juxtglomerular cells were reduced by the mGlu $_5$ antagonist, MPEP (5 μM) by $92.6 \pm 3.2\%$ compared with the control ($n = 41/3$; $p = 2.51 \times 10^{-8}$), confirming the involvement of mGlu $_5$ (Figure 5f,g). These results suggest that Ca^{2+} transients in juxtglomerular astrocytes mediated by mGlu $_5$ are transmitted to OECs and result in delayed Ca^{2+} responses in OECs.

As action potential-dependent neurotransmitter release was suppressed by TTX in our experiments, we hypothesized that tACPD might predominantly stimulate astrocytes, which then could evoke delayed Ca^{2+} responses in OECs. To confirm the stimulation of astrocytes in

our Ca^{2+} imaging experiments, we aimed to identify astrocytes in the GL and used GLAST-Cre $^{\text{ERT2}}$ \times tdTomato $^{\text{fl/fl}}$ mice (Figure 6a). However, as opposed to previous experiments in which juvenile NMRI mice (p10-p20) were examined, here we used young adult GLAST-Cre $^{\text{ERT2}}$ \times tdTomato $^{\text{fl/fl}}$ mice (p31-p52), required by the post-weaning tamoxifen injection protocol. This makes tACPD an inappropriate agonist to induce Ca^{2+} signaling in astrocytes since astrocytic mGlu $_5$ receptors are down-regulated during postnatal development in the olfactory bulb (Otsu et al., 2015; Sun et al., 2013). Therefore, we took advantage of the glial sensitivity to purines (Doengi et al., 2008) and photo-released

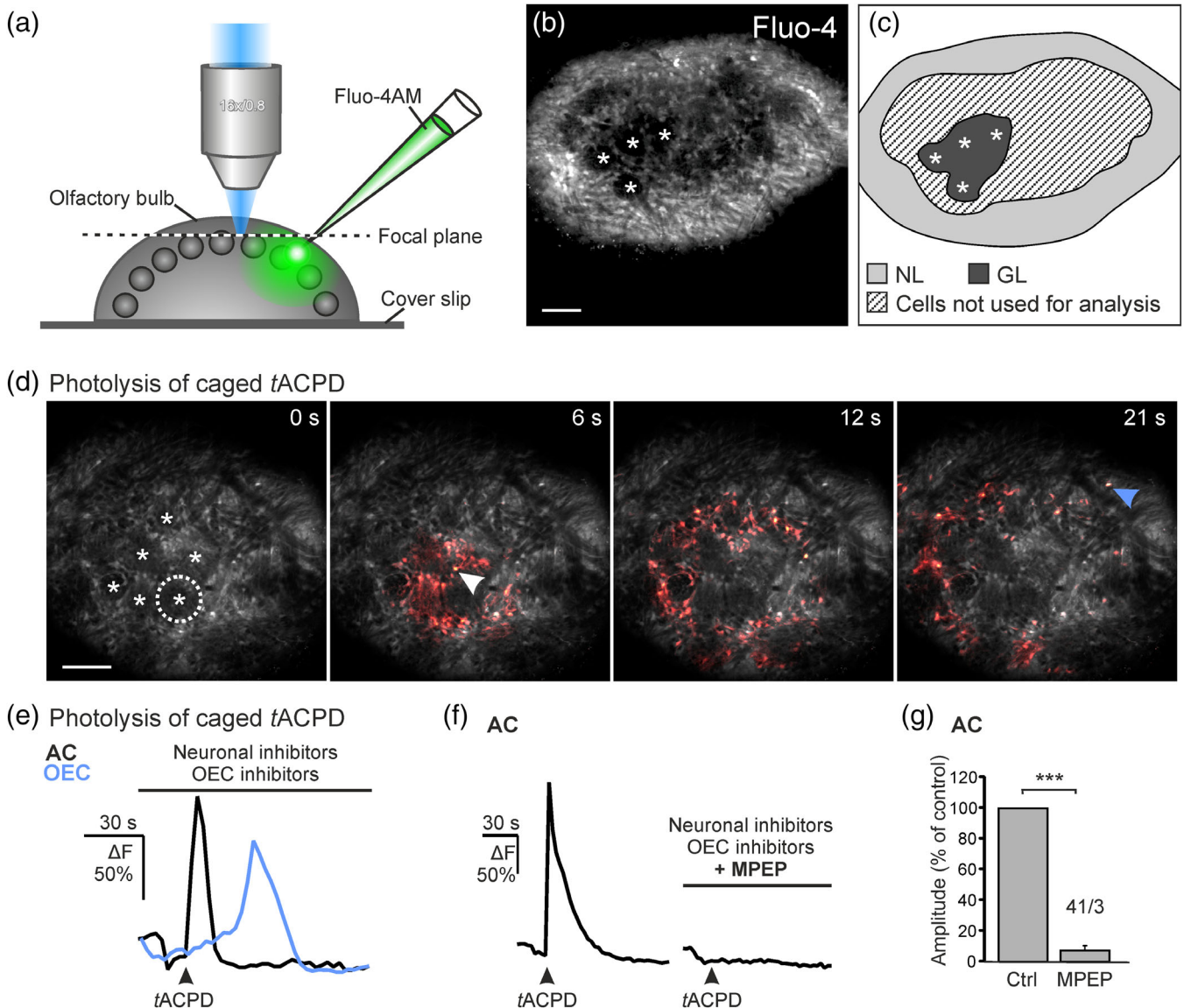


FIGURE 5 mGluR5 receptor activation in the GL induces delayed Ca^{2+} signals in OECs. (a) Schematic drawing of the experimental set-up. In-toto preparations of the olfactory bulb were glued onto a coverslip and Fluo-4 AM was injected into the tissue under visual control of the confocal microscope. The dotted line indicates the focal plane in (b). (b) Confocal image after Fluo-4 injection. Cells were brightly loaded with Fluo-4. Glomeruli are indicated by asterisks. Scale bar: 50 μm . (c) Regions considered for analysis, due to the distinct localization in the ONL and GL. In the border region between ONL and GL, cells could not be clearly identified and hence were not taken for analysis (shaded area). Asterisks represent the location of glomeruli as depicted in (b). (d) Image sequence of Ca^{2+} signals evoked by photolysis of caged tACPD (1 mM) in a single glomerulus (indicated by the dotted circle). Ca^{2+} responses around this glomerulus were detected within few seconds after uncaging (6 s, white arrow), whereas Ca^{2+} responses in OECs occurred delayed (21 s, blue arrow). Scale bar: 50 μm . The experiment was performed in the presence of antagonists for neurotransmitter receptors of neurons and OECs (see text for detail). (e) Ca^{2+} signaling in a juxtglomerular astrocyte (black trace, cell indicated by white arrow in [d]), and the delayed Ca^{2+} responses in OECs (blue trace, blue arrow in [d]) after photolysis of tACPD. Note the decrease in fluorescence before photolysis, which is due to pressure injection of the caged compound. (f, g) Ca^{2+} responses in juxtglomerular cells evoked by photolysis of caged tACPD were inhibited in the presence of the mGluR₅ antagonist (MPEP, 5 μM). Results were averaged from 41 cells in three animals ($n = 41/3$)

caged ATP within a single glomerulus to induce Ca^{2+} responses in astrocytes. A putative neuronal contribution was minimized by a cocktail of TTX and glutamate receptor antagonists (D-APV, NBQX, MPEP, and CPCOEt). Direct dopaminergic stimulation of OECs was suppressed by the dopamine receptor antagonist SCH23390. Under these conditions, photo-release of ATP induced Ca^{2+} responses in juxtglomerular cells, the majority of which were tdTomato-positive and hence astrocytes (Suppl. Figure 2). Since only 70% of astrocytes of this brain region expressed tdTomato in GLAST-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mice

(Suppl. Figure 2) (Jahn et al., 2018), the fraction of astrocytes of all juxtglomerular cells responding to ATP might be underestimated. Upon photolysis of caged ATP, Ca^{2+} transients were recorded in astrocytes within one to two image frames (3–6 s) and, with a delay of 45.1 ± 4.2 s ($n = 45/3$), in OECs (Figure 6b,c). ATP-induced Ca^{2+} responses in astrocytes amounted to $80.9 \pm 4.3\% \Delta F$ ($n = 89/3$). The amplitude of delayed Ca^{2+} responses in OEC reached $68.2 \pm 5.4\% \Delta F$ ($n = 45/3$). These results indicate that similar to tACPD-mediated stimulation in juvenile mice, ATP triggers Ca^{2+} signals in astrocytes that are transmitted to

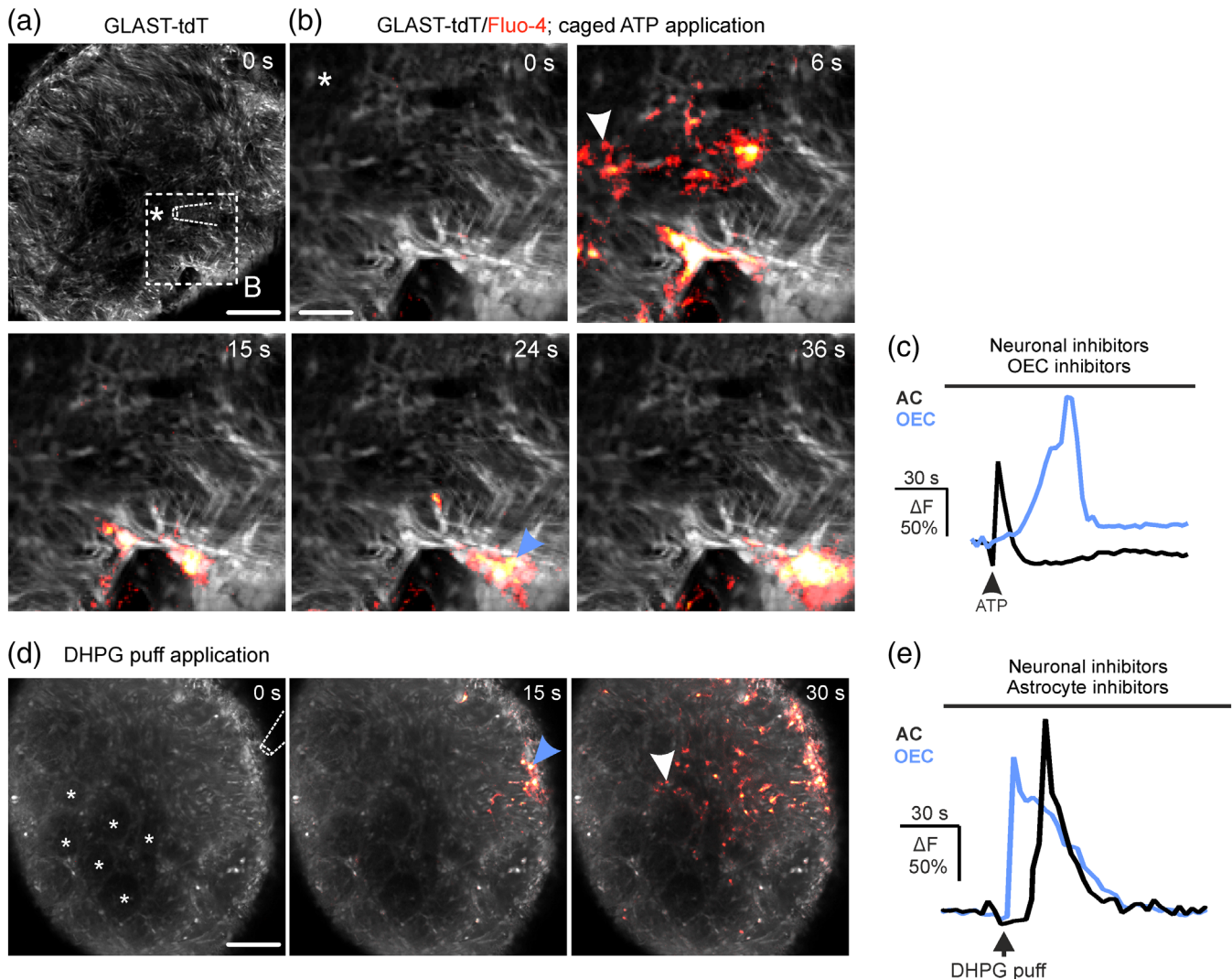


FIGURE 6 Bidirectional transmission of Ca²⁺ signaling between astrocytes and OECs. (a) Position of puff pipette for application of caged ATP in an olfactory bulb of a GLAST-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} mouse. Astrocytes and OECs express tdTomato. Caged ATP was puffed into a single glomerulus (asterisk) and ATP was released by direct photo-activation (405-nm laser). The square was magnified in (b). Scale bar: 100 μm. (b) Image sequence of Ca²⁺ signals evoked by photolysis of caged ATP (2 mM). Astrocytes and OECs were identified by tdTomato fluorescence (greyscale) and Ca²⁺ signals were analyzed by changes in Fluo-4 fluorescence (red). Ca²⁺ responses in tdTomato-positive astrocytes in the GL were detected a few seconds after uncaging (white arrowhead). Ca²⁺ responses in tdTomato-positive OECs in the ONL occurred delayed (blue arrowhead). Scale bar: 30 μm. (c) ATP-induced Ca²⁺ transients in astrocytes (black trace, white arrowhead in [b]) and OECs (blue trace and blue arrowhead in [b]) in the presence of inhibitors for neuronal and OEC neurotransmitter receptors. (d) Image sequence of Ca²⁺ signals evoked by puff application of DHPG (500 μM) onto the ONL. The position of the application pipette is indicated at the top. Glomeruli are marked with asterisks. Scale bar: 100 μm. (e) Ca²⁺ signals in OECs induced by DHPG puff application (blue trace, blue arrow in d) and delayed Ca²⁺ responses in astrocytes (black trace, white arrow in d). Experiments were performed in the presence of antagonists for neuronal and astrocytic receptors (see text for detail). ****p* < .005

OECs in young adult mice. We further asked whether this astrocyte-OEC interaction is able to occur also in reverse direction, that is, from OEC to astrocyte. To induce Ca²⁺ signaling in OECs we pressure-applied the mGluR_{1/5} agonist DHPG from a micropipette (5 s; DHPG concentration in the pipette solution was 500 μM) onto a small area (approximately 20 μm radius) of the ONL, directly stimulating OECs via mGluR₁ (Rieger, Deitmer, & Lohr, 2007; Thyssen et al., 2010). We recorded Ca²⁺ changes in OECs and juxtglomerular astrocytes. During these experiments, direct stimulation of mGluR₅ in astrocytes and neurons by DHPG was suppressed by MPEP. Standard antagonists were used as before, except for the absence of mGluR₁ antagonist CPCCOEt to allow for direct stimulation of OECs. Pressure application of DHPG induced Ca²⁺ transients in a small number of OECs in the vicinity of the application

pipette tip and, with a delay of 23.7 ± 0.7 s ($n = 101/4$), in astrocytes (Figure 6d,e). The amplitude of DHPG-induced Ca²⁺ signals amounted to $65.9 \pm 11.4\%$ ($n = 16/4$) ΔF in OECs and to $50.6 \pm 4.2\%$ ($n = 101/4$) ΔF in astrocytes. Our results suggest that juxtglomerular astrocytes communicate with OECs via transmission of Ca²⁺ signaling in a bidirectional way.

3.6 | Intercellular Ca²⁺ signaling between astrocytes and OECs requires gap junction coupling

The mechanisms underlying the transmission of Ca²⁺ waves within glial networks include the Ca²⁺-dependent release of gliotransmitters and/or gap junctional coupling (Leybaert, Paemeleire, Strahonja, & Sanderson,

1998; Schipke, Boucsein, Ohlemeyer, Kirchhoff, & Kettenmann, 2002; Venance, Stella, Glowinski, & Giaume, 1997). To study the involvement of gap junctions in panglial Ca^{2+} signaling, we investigated the influence of the gap junction inhibitor carbenoxolone (CBX, 150 μM) on the communication between juxtglomerular astrocytes and OECs. In the presence of CBX, tACPD-induced Ca^{2+} transients in astrocytes were only weakly reduced by $17.0 \pm 17.3\%$ ($n = 88/6$; $p = 6.12 \times 10^{-5}$), indicating that the largest part of tACPD-evoked Ca^{2+} transients in astrocytes was evoked directly (Figure 7a,c). In contrast, the amplitude of Ca^{2+} signals in OECs was reduced by $74.1 \pm 8.0\%$ ($n = 35/6$; $p = 1.53 \times 10^{-6}$) and hence greatly dependent on gap junctional coupling (Figure 7a,b; Movie1_SupplInf.avi). Photo-release of caged ATP in young adult GLAST-Cre \times tdTomato^{fl/fl} mice induced Ca^{2+} responses in astrocytes within few seconds and delayed Ca^{2+} responses in OECs. In the presence of CBX, the amplitude of the Ca^{2+} responses in astrocytes was slightly reduced by $11.4 \pm 7.3\%$ ($n = 89/3$; $p = 3.03 \times 10^{-4}$), whereas the amplitude of the Ca^{2+} transients in OECs was strongly reduced by $91.8 \pm 2.6\%$ ($n = 45/3$; $p = 7.88 \times 10^{-9}$) (Figure 7d-f). We also tested the effect of CBX on the transmission of Ca^{2+} signals from OECs to astrocytes. Therefore, we recorded the delayed Ca^{2+} responses in astrocytes evoked by mGluR₁ stimulation of OECs by pressure application of DHPG (Figure 7g, i). CBX reduced the amplitude of DHPG-induced Ca^{2+} transients in astrocytes by $75.1 \pm 5.0\%$ ($n = 101/4$; $p = 6.08 \times 10^{-13}$) (Figure 7g,i). CBX, however, reduced DHPG-evoked Ca^{2+} responses in OECs only by $21.8 \pm 14.2\%$ ($n = 16/4$; $p = .49$) (Figure 7g,h). These experiments provide evidence that transmission of Ca^{2+} signals between juxtglomerular astrocytes and OECs requires panglial gap junctional coupling in juvenile as well as in young adult mice.

3.7 | Panglial Ca^{2+} signaling mediates vasoconstriction in the ONL

The regulation of cerebral blood flow greatly depends on glial Ca^{2+} signaling, induced by neuronal activity (Carmignoto & Gomez-Gonzalo, 2010; Zonta et al., 2003). In the ONL, OECs are tightly associated with blood vessels, whereas astrocytes contact blood vessels in the GL (Petzold, Albeanu, Sato, & Murthy, 2008; Thyssen et al., 2010) (Figure 8a). Moreover, extrasynaptically released glutamate and ATP by OSN axons induce Ca^{2+} transients in OECs, resulting in subsequent vasoconstriction of adjacent blood vessels (Thyssen et al., 2010). To test whether panglial transmission of Ca^{2+} signals between astrocytes and OECs is sufficient to regulate local blood flow in the ONL, we performed photolysis of tACPD in a distinct glomerulus, thereby initiating Ca^{2+} responses in juxtglomerular cells, and delayed Ca^{2+} responses in OECs (Figure 8b,c). Blood vessels were visualized by sulforhodamine 101 injection (SR101) and neuronal activity was minimized as described above. Delayed tACPD-induced Ca^{2+} responses in OECs resulted in vasoconstriction of associated blood vessels (Figure 8d,f). The blood vessel diameter decreased by $13.8 \pm 3.7\%$ ΔF ($n = 5/3$). Vasoconstriction was reversible and could be elicited repeatedly (Suppl. Figure 2). Inhibiting gap junctional coupling by CBX reduced tACPD-induced Ca^{2+} responses in OECs by $87.5 \pm 5.5\%$ ($n = 7/3$; $p = .015$) and completely suppressed vasoconstriction ($n = 5/3$; $p = .015$) (Figure 8d-f). Our results demonstrate that panglial Ca^{2+} signaling between astrocytes and OECs triggers vasoconstriction in the ONL.

4 | DISCUSSION

In the present study, we investigated panglial transmission of Ca^{2+} signals between two different glial cell populations in the mouse olfactory bulb, astrocytes and olfactory ensheathing cells. Local activation of mGluR₅ and P2Y₁ and/or A2A receptors (Doengi et al., 2008) in the glomerular layer evoked Ca^{2+} responses in juxtglomerular astrocytes that resulted in delayed Ca^{2+} responses in OECs. Vice versa, local Ca^{2+} responses in OECs elicited upon activation of mGluR₁ were transmitted to juxtglomerular astrocytes. This bidirectional Ca^{2+} wave propagation relies on gap junctional coupling between the two glial cell populations and shows functional communication in panglial networks involving Ca^{2+} signaling.

4.1 | Astrocyte stimulation evokes delayed Ca^{2+} responses in OECs independent of neuronal activity

In the olfactory bulb, astrocytes respond to neuronal release of glutamate and ATP with Ca^{2+} transients via activation of P2Y₁/A2A and mGluR₅ (Doengi et al., 2008; Thyssen et al., 2010; Thyssen et al., 2013). Here, we photo-released caged forms of tACPD (agonist of mGluR₅) and ATP (agonist of P2Y₁) within a single glomerulus to trigger Ca^{2+} transients in juxtglomerular astrocytes. Since tACPD and ATP can also excite olfactory bulb neurons which might drive neuronal network activity (Fischer, Rotermund, Lohr, & Hirnet, 2012; Otsu et al., 2015; Rotermund et al., 2018), we suppressed neuronal activity with TTX and antagonists of ionotropic glutamate receptors as well as mGluR₁. Hence, photolysis of caged tACPD and ATP resulted in Ca^{2+} responses in juxtglomerular astrocytes with negligible neuronal activity. Using GLAST-Cre^{ERT2} \times tdTomato^{fl/fl} mice, we confirmed that the majority of juxtglomerular cells responding to ATP with Ca^{2+} transients were astrocytes. These Ca^{2+} transients evoked delayed Ca^{2+} responses in OECs in the nerve layer. The results suggest direct panglial transmission of Ca^{2+} transients from astrocytes to OECs without contribution of neurons, since neuronal activity was blocked (see above) and the nerve layer lacks neuronal processes projecting from deeper layers of the olfactory bulb (Diaz et al., 2013; Imai, 2014), whereas we have demonstrated astrocyte projections into the nerve layer. Direct interaction between OECs and astrocytes in the absence of neuronal activation was confirmed by experiments using puff application of DHPG onto the nerve layer. This locally stimulated OECs, but did not stimulate astrocytes and neurons in the glomerular layer at least 50 μm distant from the pia mater (e.g., Figure 3a) and thus inaccessible for a short (5 s) DHPG puff application. Hence, delayed Ca^{2+} transients in astrocytes resulting from Ca^{2+} transients in OECs upon puff application of DHPG occurred independently of neuronal stimulation. In summary, our results demonstrate that Ca^{2+} responses in astrocytes evoked by local neurotransmitter application result in Ca^{2+} transients in OECs and vice versa.

4.2 | Panglial Ca^{2+} signaling of astrocytes and OECs depends on gap junctions

The propagation of intercellular Ca^{2+} waves induced by various stimuli within glial networks has been reported in multiple areas of the brain

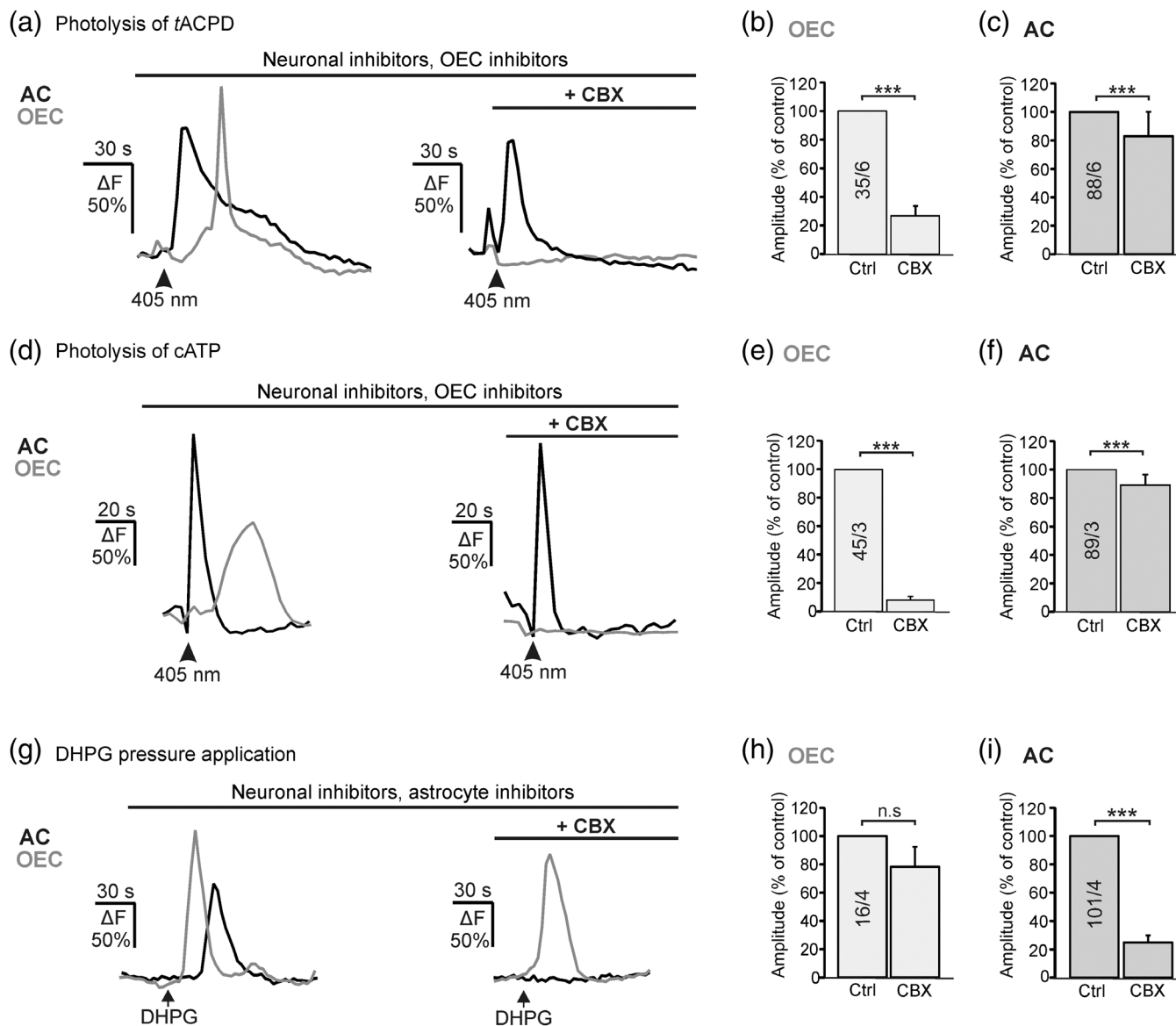


FIGURE 7 Gap junctions mediate transmission of Ca^{2+} signals between OECs and astrocytes. (a) Induction of Ca^{2+} transients in astrocytes (black trace) via the photolysis of caged *t*ACPD resulted in delayed Ca^{2+} responses in OECs (grey trace) that were suppressed by CBX (150 μM). (b) *t*ACPD-evoked Ca^{2+} transients in OECs were much stronger affected by CBX than in astrocytes (c). (d) Ca^{2+} transients in astrocytes evoked by photolysis of caged ATP resulted in CBX-sensitive Ca^{2+} transients in OECs. (e) CBX largely inhibited ATP-induced Ca^{2+} transients in OECs, whereas Ca^{2+} transients in astrocytes were only reduced by 17% (f). (g) Ca^{2+} transients in OECs (grey trace) evoked by local pressure application of DHPG onto the ONL resulted in delayed Ca^{2+} transients in astrocytes (black trace) suppressed by CBX. (h) Ca^{2+} transients in OECs evoked by pressure application of DHPG were not affected by CBX, while Ca^{2+} transients in astrocytes induced by DHPG were significantly reduced (i). *** $p < .005$; n.s.: not significant

and in cell culture (Charles, Merrill, Dirksen, & Sanderson, 1991; Cornell-Bell, Finkbeiner, Cooper, & Smith, 1990; Scemes & Giaume, 2006). The mechanisms underlying Ca^{2+} wave propagation are release of gliotransmitters (ATP) and/or gap junctional coupling between neighboring cells, allowing for exchange of signaling molecules such as IP_3 or Ca^{2+} (Leybaert et al., 1998; Schipke et al., 2002; Venance et al., 1997). In the present experiments, Ca^{2+} signal propagation between astrocytes and OECs was sensitive to carbenoxolone (CBX), a rather unspecific inhibitor of gap junctions which could also block gliotransmitter release by P2X_7 receptors, pannexin-1, or gap junction hemichannels (Kang et al., 2008; Suadicani, Brosnan, & Scemes, 2006). Hence, Ca^{2+} signaling between astrocytes and OECs could be due to gap junctional coupling

and/or gliotransmission. Gliotransmitters released by olfactory bulb astrocytes involve GABA, glutamate as well as ATP (Kozlov, Angulo, Audinat, & Charpak, 2006; Roux et al., 2015). However, OECs do not respond to GABA (Thyssen et al., 2013), and known glutamatergic as well as purinergic receptors in OECs have been inhibited throughout all our experiments. Thus, intercellular Ca^{2+} signal transmission between OECs and astrocytes is independent of extracellular hemichannel-mediated gliotransmission, but rather relies on gap junctional coupling. Indeed, OECs and astrocytes are electrically and dye-coupled and Cx43kiECFP reporter mice showed that juxtglomerular astrocytes as well as OECs can express Cx43. This observation was further substantiated by our and other immunostainings (Piantanida et al., 2019;

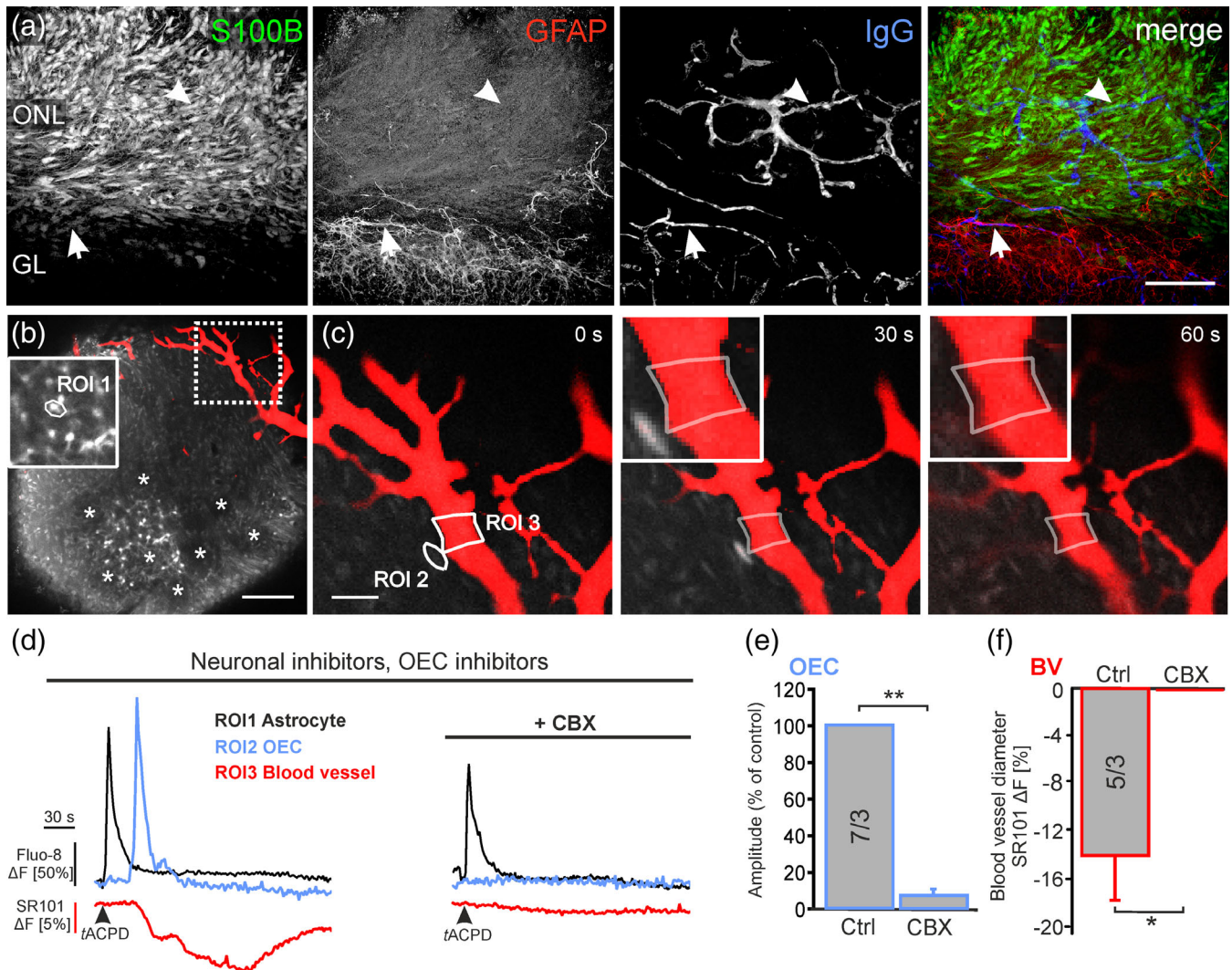


FIGURE 8 Panglial transmission of Ca^{2+} signals mediates vasoconstriction in the ONL. (a) Cellular organization of the vasculature and glial cells in the ONL. S100B-positive OECs (green) are located in the ONL, where they ensheath blood vessels (arrowheads). Goat anti-mouse secondary antibodies (goat anti-mouse Alexa 405, blue) were employed to stain blood vessels by detection of mouse IgGs in non-perfused brain tissue. Anti-GFAP staining (red) shows astrocytic processes surrounding blood vessels in the GL (arrows). Scale bar: 50 μm . (b) In-toto preparation of the OB. Cells were loaded with Fluo-4 (greyscale) and blood vessels injected with SR101 (red). The application pipette filled with caged tACPD was placed in the glomerular layer. Glomeruli are marked with asterisks. In the inset, ROI 1 represents an astrocyte selected for analysis of Ca^{2+} signaling, shown at the time point a few seconds after photo-activation of tACPD. Scale bar: 100 μm . (c) Image sequence of panglial Ca^{2+} signaling in an OEC evoked by local photolysis of tACPD in the glomerular layer (0, 30, and 60 s after photolysis of tACPD). The images show a magnification of the ONL, as indicated by the dotted rectangle in (b). ROI 2 represents an OEC in which panglial Ca^{2+} signaling was recorded. Note the Fluo-4 fluorescence increase at 30 s. In ROI 3, the SR101 fluorescence was recorded as a measure of the blood vessel diameter. The inset depicts the ROI, in which SR101 fluorescence was analyzed, at higher magnification. Scale bar: 30 μm . (d) Ca^{2+} transients in an astrocyte (black trace; ROI 1 in b) and an OEC (blue trace; ROI 2 in c) as well as changes in SR101 fluorescence (red trace; ROI 3 in c) evoked by photolysis of tACPD. Experiments were performed in the presence of inhibitors of neuronal and OEC neurotransmitter receptors as described in the text. (e) Ca^{2+} transients in OECs and (f) vasoconstriction were suppressed by CBX. * $p < .05$; ** $p < .01$

Rela et al., 2010; Roux et al., 2011; Theofilas, Steinhauser, Theis, & Derouiche, 2017). Hence, astrocytes and OECs might form homotypic gap junctions by Cx43, in contrast to panglial coupling between astrocytes and oligodendrocytes, in which heterotypic gap junctions are built between Cx43 (astrocyte) and Cx47 (oligodendrocyte) or between Cx30 (astrocyte) and Cx32 (oligodendrocyte) (Orthmann-Murphy, Freidin, Fischer, Scherer, & Abrams, 2007). Our dye-coupling experiments show that small molecules may diffuse between astrocytes and OECs, which may include metabolites such as glucose, but also signaling molecules such as IP_3 and Ca^{2+} . While it is generally accepted

that mainly IP_3 is exchanged through gap junctions between astrocytes, it has been shown that diffusion of Ca^{2+} alone through gap junctions is sufficient to drive Ca^{2+} waves in OECs, suggesting low Ca^{2+} buffer capacity in OECs (Stavermann et al., 2015).

Our results expand and further confirm observations that gap junctions are not only formed between glial cells of the same class, but also between different classes such as astrocytes and oligodendrocytes or astrocytes and OECs, thereby establishing panglial networks. In contrast to astrocytes and oligodendrocytes, OECs are of neural crest origin and are considered to be a part of the peripheral

nervous system (Nazareth et al., 2019). Hence, astrocyte-OEC panglial networks bridge the PNS-CNS transitional zone, which might support the ingrowth of regenerating axons of sensory neurons from the olfactory epithelium into the olfactory bulb.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Steinhäuser and G. Seifert (University of Bonn, Bonn, Germany), Ueli Suter (ETH, Zurich, Switzerland) and Hongkui Zeng (Allen Institute for Brain Science, Seattle, Washington, USA) for providing transgenic animals. We thank A. C. Rakete, O. Drozd, and A. Theil for technical assistance. This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (LO 779/10, LO 779/11 and SFB 1328 TP-A07 to C.L.; SFB 894 TP-A12, SPP 1757/KI 503/12 to F.K. and FOR 2289 TP-P9 to A.S. and F.K.) and the European Commission (H2020-FET ProAct Neurofibres #732344 to F.K.). The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Antonia Beiersdorfer  <https://orcid.org/0000-0003-0976-005X>

Anja Scheller  <https://orcid.org/0000-0001-8955-2634>

Frank Kirchhoff  <https://orcid.org/0000-0002-2324-2761>

Christian Lohr  <https://orcid.org/0000-0001-6518-6422>

REFERENCES

- Au, W. W., Treloar, H. B., & Greer, C. A. (2002). Sublaminar organization of the mouse olfactory bulb nerve layer. *The Journal of Comparative Neurology*, 446(1), 68–80.
- Augustin, V., Bold, C., Wadle, S. L., Langer, J., Jabs, R., Philippot, C., ... Stephan, J. (2016). Functional anisotropic panglial networks in the lateral superior olive. *Glia*, 64(11), 1892–1911. <https://doi.org/10.1002/glia.23031>
- Carmignoto, G., & Gomez-Gonzalo, M. (2010). The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.007>
- Charles, A. (2005). Reaching out beyond the synapse: Glial intercellular waves coordinate metabolism. *Science's STKE*, 2005(270), pe6. <https://doi.org/10.1126/stke.2702005pe6>
- Charles, A. C., Merrill, J. E., Dirksen, E. R., & Sanderson, M. J. (1991). Intercellular signaling in glial cells: Calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron*, 6(6), 983–992.
- Claus, L., Philippot, C., Griemsmann, S., Timmermann, A., Jabs, R., Henneberger, C., ... Steinhäuser, C. (2018). Barreloid borders and neuronal activity shape panglial gap junction-coupled networks in the mouse thalamus. *Cerebral Cortex*, 28(1), 213–222. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw368>
- Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S., & Smith, S. J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: Long-range glial signaling. *Science*, 247(4941), 470–473.
- De Saint Jan, D., & Westbrook, G. L. (2005). Detecting activity in olfactory bulb glomeruli with astrocyte recording. *The Journal of Neuroscience*, 25(11), 2917–2924. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5042-04.2005>
- Degen, J., Dublin, P., Zhang, J., Dobrowolski, R., Jokwitz, M., Karram, K., ... Theis, M. (2012). Dual reporter approaches for identification of Cre efficacy and astrocyte heterogeneity. *The FASEB Journal*, 26(11), 4576–4583. <https://doi.org/10.1096/fj.12-207183>
- Deitmer, J. W., Verkhratsky, A. J., & Lohr, C. (1998). Calcium signalling in glial cells. *Cell Calcium*, 24(5–6), 405–416.
- Diaz, D., Gomez, C., Munoz-Castaneda, R., Baltanas, F., Alonso, J. R., & Weruaga, E. (2013). The olfactory system as a puzzle: Playing with its pieces. *Anatomical Record (Hoboken)*, 296(9), 1383–1400. <https://doi.org/10.1002/ar.22748>
- Dickinson, P. J., Griffiths, I. R., Barrie, J. M., Kyriakides, E., Pollock, G. F., & Barnett, S. C. (1997). Expression of the dm-20 isoform of the plp gene in olfactory nerve ensheathing cells: Evidence from developmental studies. *Journal of Neurocytology*, 26(3), 181–189.
- 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. *The FASEB Journal*, 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 Ca²⁺ 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/10.1073/pnas.0809513106>
- Doucette, R. (1990). Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia*, 3(6), 433–449. <https://doi.org/10.1002/glia.440030602>
- Doucette, R. (1991). PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve. *The Journal of Comparative Neurology*, 312(3), 451–466. <https://doi.org/10.1002/cne.903120311>
- Droste, D., Seifert, G., Seddar, L., Jädtker, O., Steinhäuser, C., & Lohr, C. (2017). Ca²⁺-permeable AMPA receptors in mouse olfactory bulb astrocytes. *Scientific Reports*, 7, 44817. <https://doi.org/10.1038/srep44817>
- Fasciani, I., Pluta, P., Gonzalez-Nieto, D., Martinez-Montero, P., Molano, J., Paino, C. L., ... Barrio, L. C. (2018). Directional coupling of oligodendrocyte connexin-47 and astrocyte connexin-43 gap junctions. *Glia*, 66(11), 2340–2352. <https://doi.org/10.1002/glia.23471>
- 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>
- Giaume, C. (2010). Astroglial wiring is adding complexity to neuroglial networking. *Frontiers in Neuroenergetics*, 2. <https://doi.org/10.3389/fnene.2010.00129>
- Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., & Rouach, N. (2010). Astroglial networks: A step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(2), 87–99. <https://doi.org/10.1038/nrn2757>
- Giaume, C., & McCarthy, K. D. (1996). Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends in Neurosciences*, 19(8), 319–325.
- Giaume, C., & Venance, L. (1998). Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia*, 24(1), 50–64.
- Griemsmann, S., Hoft, S. P., Bedner, P., Zhang, J., von Staden, E., Beinhauer, A., ... Steinhäuser, C. (2015). Characterization of panglial gap junction networks in the thalamus, neocortex, and hippocampus reveals a unique population of glial cells. *Cerebral Cortex*, 25(10), 3420–3433. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu157>
- Griffiths, I. R., Dickinson, P., & Montague, P. (1995). Expression of the proteolipid protein gene in glial cells of the post-natal peripheral nervous system of rodents. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 21(2), 97–110.
- Haydon, P. G. (2001). GLIA: Listening and talking to the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(3), 185–193. <https://doi.org/10.1038/35058528>
- Hirrlinger, P. G., Scheller, A., Braun, C., Quintela-Schneider, M., Fuss, B., Hirrlinger, J., & Kirchhoff, F. (2005). Expression of reef coral fluorescent proteins in the central nervous system of transgenic mice. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 30(3), 291–303. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.08.011>
- Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., & Giaume, C. (2008). Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *The Journal of Neuroscience*, 28(20), 5207–5217. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5100-07.2008>
- Imai, T. (2014). Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 35, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.07.012>
- Jahn, H. M., Kasakow, C. V., Helfer, A., Michely, J., Verkhratsky, A., Maurer, H. H., ... Kirchhoff, F. (2018). Refined protocols of tamoxifen injection for inducible DNA recombination in mouse astroglia. *Scientific Reports*, 8(1), 5913. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24085-9>

- Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., & Nedergaard, M. (2008). Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *The Journal of Neuroscience*, 28(18), 4702–4711. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5048-07.2008>
- Kozlov, A. S., Angulo, M. C., Audinat, E., & Chrapak, S. (2006). Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 10058–10063. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603741103>
- Leone, D. P., Genoud, S., Atanasoski, S., Grausenburger, R., Berger, P., Metzger, D., ... Suter, U. (2003). Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 22(4), 430–440.
- Leybaert, L., Paemeleire, K., Strahonja, A., & Sanderson, M. J. (1998). Inositol-trisphosphate-dependent intercellular calcium signaling in and between astrocytes and endothelial cells. *Glia*, 24(4), 398–407.
- Lohr, C., Grosche, A., Reichenbach, A., & Hirnet, D. (2014). Purinergic neuron-glia interactions in sensory systems. *Pflügers Archiv*, 466(10), 1859–1872. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1510-6>
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., ... Zeng, H. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature Neuroscience*, 13(1), 133–140. <https://doi.org/10.1038/nn.2467>
- Meyer, N., Richter, N., Fan, Z., Siemonsmeier, G., Pivneva, T., Jordan, P., ... Kettenmann, H. (2018). Oligodendrocytes in the mouse corpus callosum maintain axonal function by delivery of glucose. *Cell Reports*, 22(9), 2383–2394. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.022>
- Mori, T., Tanaka, K., Buffo, A., Wurst, W., Kuhn, 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>
- Moshrefi-Ravasdjani, B., Hammel, E. L., Kafitz, K. W., & Rose, C. R. (2017). Astrocyte sodium signalling and panglial spread of sodium signals in brain white matter. *Neurochemical Research*, 42(9), 2505–2518. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2197-9>
- Nagy, J. I., & Rash, J. E. (2000). Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 32(1), 29–44.
- Nazareth, L., Chen, M., Shelper, T., Shah, M., Tello Velasquez, J., Walkden, H., ... Ekberg, J. A. K. (2019). Novel insights into the glia limitans of the olfactory nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 527, 1228–1244. <https://doi.org/10.1002/cne.24618>
- Nualart-Martí, A., Solsona, C., & Fields, R. D. (2013). Gap junction communication in myelinating glia. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828(1), 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.01.024>
- Orthmann-Murphy, J. L., Freidin, M., Fischer, E., Scherer, S. S., & Abrams, C. K. (2007). Two distinct heterotypic channels mediate gap junction coupling between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *The Journal of Neuroscience*, 27(51), 13949–13957. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3395-07.2007>
- Otsu, Y., Couchman, K., Lyons, D. G., Collot, M., Agarwal, A., Mallet, J. M., ... Chrapak, S. (2015). Calcium dynamics in astrocyte processes during neurovascular coupling. *Nature Neuroscience*, 18(2), 210–218. <https://doi.org/10.1038/nn.3906>
- Parys, B., Cote, A., Gallo, V., De Koninck, P., & Sik, A. (2010). Intercellular calcium signaling between astrocytes and oligodendrocytes via gap junctions in culture. *Neuroscience*, 167(4), 1032–1043. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.004>
- 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>
- Piantanida, A. P., Acosta, L. E., Brocardo, L., Capurro, C., Greer, C. A., & Rela, L. (2019). Selective Cre-mediated gene deletion identifies connexin 43 as the main connexin channel supporting olfactory ensheathing cell networks. *The Journal of Comparative Neurology*, 527, 1278–1289. <https://doi.org/10.1002/cne.24628>
- Rash, J. E., Duffy, H. S., Dudek, F. E., Bilhartz, B. L., Whalen, L. R., & Yasumura, T. (1997). Grid-mapped freeze-fracture analysis of gap junctions in gray and white matter of adult rat central nervous system, with evidence for a "panglial syncytium" that is not coupled to neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 388(2), 265–292.
- Rela, L., Bordey, A., & Greer, C. A. (2010). Olfactory ensheathing cell membrane properties are shaped by connectivity. *Glia*, 58(6), 665–678. <https://doi.org/10.1002/glia.20953>
- Rieger, A., Deitmer, J. W., & Lohr, C. (2007). Axon-glia communication evokes calcium signaling in olfactory ensheathing cells of the developing olfactory bulb. *Glia*, 55(4), 352–359. <https://doi.org/10.1002/glia.20460>
- Rotermund, N., Winandy, S., Fischer, T., Schulz, K., Fregin, T., Alstedt, N., ... Hirnet, D. (2018). Adenosine A1 receptor activates background potassium channels and modulates information processing in olfactory bulb mitral cells. *The Journal of Physiology*, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 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. *The Journal of Neuroscience*, 35(46), 15339–15352. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0861-15.2015>
- Scemes, E., & Giaume, C. (2006). Astrocyte calcium waves: What they are and what they do. *Glia*, 54(7), 716–725. <https://doi.org/10.1002/glia.20374>
- Scemes, E., Suadicani, S. O., Dahl, G., & Spray, D. C. (2007). Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biology*, 3(3), 199–208. <https://doi.org/10.1017/S1740925X08000069>
- Schipke, C. G., Boucsein, C., Ohlemeyer, C., Kirchhoff, F., & Kettenmann, H. (2002). Astrocyte Ca²⁺ waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *The FASEB Journal*, 16(2), 255–257. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0514fje>
- Schulz, K., Rotermund, N., Grzelka, K., Benz, J., Lohr, C., & Hirnet, D. (2018). Adenosine A1 receptor-mediated attenuation of reciprocal dendro-dendritic inhibition in the mouse olfactory bulb. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 435. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00435>
- 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>
- Stavermann, M., Meuth, P., Doengi, M., Thyssen, A., Deitmer, J. W., & Lohr, C. (2015). Calcium-induced calcium release and gap junctions mediate large-scale calcium waves in olfactory ensheathing cells in situ. *Cell Calcium*, 58(2), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.05.003>
- Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K., & Konnerth, A. (2003). In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), 7319–7324. <https://doi.org/10.1073/pnas.123223100>
- Suadicani, S. O., Brosnan, C. F., & Scemes, E. (2006). P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *The Journal of Neuroscience*, 26(5), 1378–1385. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3902-05.2006>
- Sun, W., McConnell, E., Pare, J. F., Xu, Q., Chen, M., Peng, W., ... Nedergaard, M. (2013). Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. *Science*, 339(6116), 197–200. <https://doi.org/10.1126/science.1226740>
- Theis, M., Sohl, G., Eiberger, J., & Willecke, K. (2005). Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends in Neurosciences*, 28(4), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.02.006>
- Theofilas, P., Steinhilber, C., Theis, M., & Derouiche, A. (2017). Morphological study of a connexin 43-GFP reporter mouse highlights glial heterogeneity, amacrine cells, and olfactory ensheathing cells. *Journal of Neuroscience Research*, 95(11), 2182–2194. <https://doi.org/10.1002/jnr.24055>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), 15258–15263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003501107>
- Thyssen, A., Stavermann, M., Buddrus, K., Doengi, M., Ekberg, J. A., St John, J. A., ... Lohr, C. (2013). Spatial and developmental heterogeneity



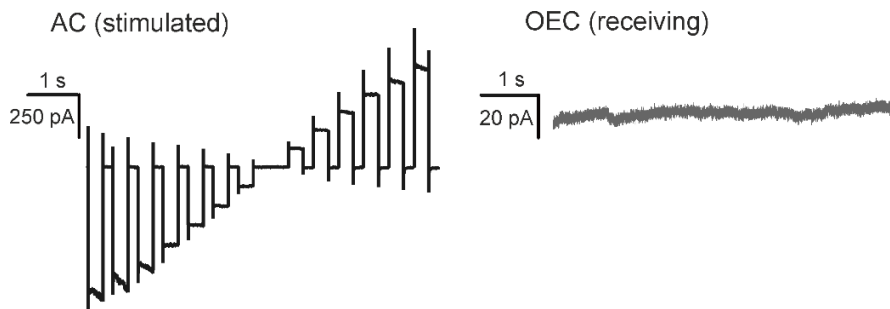
- of calcium signaling in olfactory ensheathing cells. *Glia*, 61(3), 327–337. <https://doi.org/10.1002/glia.22434>
- Venance, L., Stella, N., Glowinski, J., & Giaume, C. (1997). Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 17(6), 1981–1992.
- Wasseff, S. K., & Scherer, S. S. (2011). Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte: Astrocyte and oligodendrocyte–Oligodendrocyte gap junction coupling. *Neurobiology of Disease*, 42(3), 506–513. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.03.003>
- Zonta, M., Angulo, M. C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K. A., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature Neuroscience*, 6(1), 43–50. <https://doi.org/10.1038/nn980>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

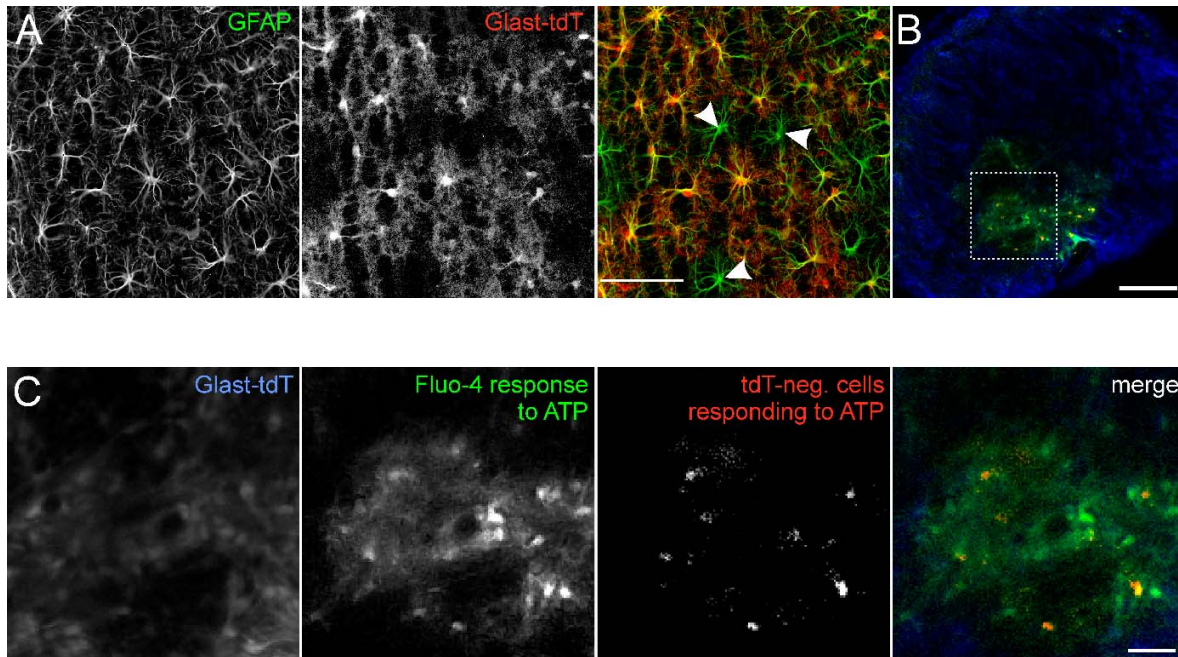
How to cite this article: Beiersdorfer A, Scheller A, Kirchhoff F, Lohr C. Panglial gap junctions between astrocytes and olfactory ensheathing cells mediate transmission of Ca²⁺ transients and neurovascular coupling. *Glia*. 2019;67: 1385–1400. <https://doi.org/10.1002/glia.23613>

Supporting information

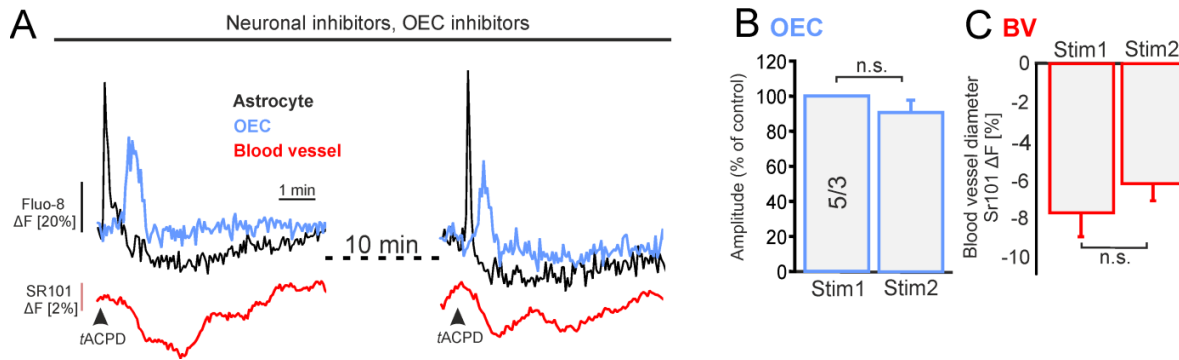


Supplementary figure 1: Paired recording of an astrocyte and an OEC not electrically coupled.

Paired voltage clamp recordings of an astrocyte (black trace) and an OEC (grey trace) not showing electrical coupling. The series of voltage steps in the astrocyte induced inward and outward currents according to the applied potential, however the corresponding OEC shows no direct flow of current and this no gap junctional coupling.



Supplementary figure 2: The majority of juxtglomerular cells responding to ATP are astrocytes (A) Anti-GFAP staining (green) of the olfactory bulb in a GLAST-Cre^{ERT2} x tdTomato^{fl/fl} mouse. Ten days after induction of Cre recombination by tamoxifen injection, 70 +/- 7 % of all GFAP-positive astrocytes (n = 90) expressed tdTomato (red). Arrowheads point to tdTomato-negative astrocytes. Scale bar: 50 μ m. (B) Olfactory bulb *in-toto* preparation. Cells responding to photoactivation of caged ATP with an increase in Fluo-4 fluorescence are depicted in green. A comparison between ATP-responsive cells and tdTomato expression reveals tdTomato-negative cells responding to ATP (red). Asterisks indicate glomeruli. Scale bar: 100 μ m. (C) Magnification from (B). The majority of cells responding to ATP with an increase in Fluo-4 fluorescence were tdTomato-positive and hence identified as astrocytes. Scale bar: 30 μ m.



Supplementary figure 3: Panglial calcium signaling reliably evokes vasoresponses. (A) Repetitive stimulation of calcium signaling in astrocytes (black trace) by photoactivation of caged *tACPD* induced calcium transients in OECs (blue trace) and constriction of OEC-associated blood vessels (red trace). (B) No significant difference (n. s.) in calcium transient amplitudes in OECs and (C) vasoconstriction was found between the first and the second stimulation.

Movie1_SuppInf.avi: The movie shows calcium signaling evoked by caged *tACPD* in juxtglomerular astrocytes under control conditions (left) and in the presence of carbenoxolone (right).

4. Sublamina-specific organization of the blood brain barrier in the mouse olfactory nerve layer

Antonia Beiersdorfer, Hartwig Wolburg, Janine Grawe, Anja Scheller, Frank Kirchhoff,
Christian Lohr

Glia-doi: 10.1002/glia.23744

Anteilserklärung

Die in Kapitel 3 dargestellten Experimente wurden anteilig von Antonia Beiersdorfer durchgeführt. Die Planung und Organisation des Projektes wurde von A. Beiersdorfer und Christian Lohr vorgenommen. Die Experimente dargestellt in den Fig. 2a und b, 3 sowie 5a wurden von A. Beiersdorfer durchgeführt und ausgewertet. Alle elektronenmikroskopischen Daten wurden von Dr. Hartwig Wolburg erhoben und ausgewertet. Die Ergebnisse aus Fig. 1 und 4a-e sind im Rahmen der Bachelorarbeiten von A. Beiersdorfer, Janine Grawe und Melissa Malekpour entstanden. Die Bachelorarbeit von M. Malekpour wurde von A. Beiersdorfer ko-betreut. Dr. Maren Stavermann und Prof. Dr. Christian Lohr führten die Experimente dargestellt in Fig. 6 durch. Dr. Anja Scheller und Prof. Dr. Frank Kirchhoff stellten die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mauslinien zur Verfügung. Die Färbung dargestellt in Fig. 5b wurde von der technischen Angestellten Frau Anne Catrin Rakete unter Anleitung von A. Beiersdorfer durchgeführt. Die konfokalen Fluoreszenzbilder wurden von A. Beiersdorfer aufgenommen und ausgewertet.

Die erste Version des Manuskriptes wurde von A. Beiersdorfer angefertigt und von allen Autoren überarbeitet. Die Revision des ursprünglichen Manuskriptes nach Begutachtung erfolgte durch A. Beiersdorfer, alle Autoren überarbeiteten das revidierte Manuskript.




Datum und Ort

Unterschrift Betreuer

Prof. Dr. Christian Lohr

RESEARCH ARTICLE

Sublamina-specific organization of the blood brain barrier in the mouse olfactory nerve layer

Antonia Beiersdorfer¹  | Hartwig Wolburg² | Janine Grawe¹ | Anja Scheller³ | Frank Kirchhoff³  | Christian Lohr¹ 

¹Division of Neurophysiology, University of Hamburg, Hamburg, Germany

²Institute of Pathology and Neuropathology, University of Tübingen, Tübingen, Germany

³Molecular Physiology, Center for Integrative Physiology and Molecular Medicine (CIPMM), University of Saarland, Homburg, Germany

Correspondence

Antonia Beiersdorfer, Division of Neurophysiology, University of Hamburg, Martin-Luther-King-Pl. 3, Hamburg 20146, Germany.
Email: antonia.beiersdorfer@uni-hamburg.de

Funding information

Christian Lohr, Grant/Award Numbers: LO 779/11, SFB 1328 TP-A07; Frank Kirchhoff, Grant/Award Numbers: FOR 2289 TP-P9, H2020-FET ProAct Neurofibres #732344, SPP 1757/KI 503/12

Abstract

Astrocytes constitute the main glial component of the mammalian blood brain barrier (BBB). However, in the olfactory bulb (OB), the olfactory nerve layer (ONL) is almost devoid of astrocytes, raising the question which glial cells are part of the BBB. We used mice expressing EGFP in astrocytes and tdTomato in olfactory ensheathing cells (OECs), a specialized type of glial cells in the ONL, to unequivocally identify both glial cell types and investigate their contribution to the BBB in the olfactory bulb. OECs were located exclusively in the ONL, while somata of astrocytes were located in deeper layers and extended processes in the inner sublamina of the ONL. These processes surrounded blood vessels and contained aquaporin-4, an astrocytic protein enriched at the BBB. In the outer sublamina of the ONL, in contrast, blood vessels were surrounded by aquaporin-4-negative processes of OECs. Transcardial perfusion of blood vessels with lanthanum and subsequent visualization by electron microscopy showed that blood vessels enwrapped by OECs possessed intact tight junctions. In acute olfactory bulb preparations, injection of fluorescent glucose 6-NBDG into blood vessels resulted in labeling of OECs, indicating glucose transport from the perivascular space into OECs. In addition, Ca²⁺ transients in OECs in the outer sublamina evoked vasoconstriction, whereas Ca²⁺ signaling in OECs of the inner sublamina had no effect on adjacent blood vessels. Our results demonstrate that the BBB in the inner sublamina of the ONL contains astrocytes, while in the outer ONL OECs are part of the BBB.

KEYWORDS

astrocytes, blood brain barrier, neurovascular coupling, olfactory ensheathing cells

1 | INTRODUCTION

The blood brain barrier (BBB) controls as selective barrier transport and diffusion of a plethora of substances from the blood stream into the CNS and vice versa. While transport of nutrients over the BBB is fostered, the entry of noxious substances is blocked. The BBB of capillaries typically consists of endothelial cells (ECs), pericytes, and astrocyte endfeet (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley,

2010; Ballabh, Braun, & Nedergaard, 2004). ECs build up the blood vessel wall, are connected with each other by tight junctions to maintain the barrier function and transport glucose from the blood into the perivascular space (Wolburg & Lippoldt, 2002; Zhao, Nelson, Betsholtz, & Zlokovic, 2015). Pericytes support the development of the BBB and stabilize the capillary wall (Bell et al., 2010; Brown et al., 2019; Daneman, Zhou, Kebede, & Barres, 2010). Astrocyte endfeet are mainly involved in metabolic exchange between blood

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2019 The Authors. *Glia* published by Wiley Periodicals, Inc.

and neural tissue as well as ion and water regulation. Neuronal information processing consumes about 20% of the total glucose and oxygen demands of the body (Escartin & Rouach, 2013; Harris, Jolivet, & Attwell, 2012). Therefore, efficient metabolic support of neurons is essential. As a cellular component of the BBB, astrocytes take up glucose from the perivascular space, metabolize it and provide lactate to surrounding neurons (Pellerin et al., 2007). In addition, local neuronal activity induces Ca^{2+} signaling in perivascular astrocytes, followed by vasoresponses and changes in local blood flow, a mechanism named neurovascular coupling (Filosa, Bonev, & Nelson, 2004; Gordon, Mulligan, & MacVicar, 2007; Mulligan & MacVicar, 2004; Takano et al., 2006; Zonta et al., 2003). This mechanism is closely associated with a change in glucose supply (neurometabolic coupling; Attwell et al., 2010; Leybaert, 2005). In the olfactory bulb, 2-deoxyglucose autoradiography studies have shown high glucose consumption in the olfactory nerve layer (ONL), an area that harbors thousands of unmyelinated axons of olfactory sensory neurons (OSN), but lacks astrocytic somata (Au, Treloar, & Greer, 2002; Benson, Burd, Greer, Landis, & Shepherd, 1985; Sharp, Kauer, & Shepherd, 1977; Shepherd, 2003). The lack of astrocyte somata and low abundance of astrocytic processes raises the question how the BBB is established in the ONL. A specialized population of glial cell, so-called olfactory ensheathing cells (OECs), is present in the ONL, supporting axonal growth and guidance during development and adult neuroregeneration (Lohr, Grosche, Reichenbach, & Hirnet, 2014). The ONL is divided into an outer and an inner sublamina with physiologically different subpopulations of OECs (Doucette, 1990, 1991; Thyssen et al., 2013). Nonsynaptic release of glutamate and ATP from OSN axons induce Ca^{2+} transients in OECs of the outer ONL, triggering vasoresponses of associated blood vessels, while OECs of the inner ONL lack glutamate- or ATP-evoked Ca^{2+} transients (Rotermund, Schulz, Hirnet, & Lohr, 2019; Thyssen et al., 2010; Thyssen et al., 2013). This indicates intimate structural and functional links between OECs and blood vessels at least in the outer ONL. Hence, this study addresses the question how OECs in the different sublaminae contribute to the BBB. To investigate the cellular components of the BBB in the ONL, we performed electron microscopy studies and immunofluorescence staining using markers for astrocytes (GFAP), astrocyte endfeet (aquaporin 4; AQP4), OECs (S100B) and pericytes (PDGFR β) in wildtype and transgenic mice expressing tdTomato in OECs (PLP-Cre^{ERT2} x tdTomato^{fl/fl} mice) in OECs and EGFP in astrocytes (hGFAP-EGFP). The results show that blood vessels in the outer ONL are devoid of GFAP- and AQP4-positive structures, but are covered by S100B- and PLP-tdTomato-positive OECs. In contrast, blood vessels in the inner ONL and the glomerular layer (GL) are covered by GFAP- and AQP4-positive cell processes of astrocytes. Pericytes are present in all layers. The results suggest that OECs but not astrocytes contact the BBB in the outer sublamina of the ONL, while in the inner sublamina and in deeper layers the BBB has the typical structure as described in other parts of the brain, comprising astrocyte endfeet. Hence, the BBB in the mammalian brain does not inevitably require the contribution of astrocytes.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Animals

Colonies of NMRI (Naval Medical Research Institute) mice (age: post-natal days 09–12; p09–p12) and PLP-Cre^{ERT2} x tdTomato^{fl/fl} and hGFAP-EGFP^{GfEC} mice (p28–p42) (Hirrlinger et al., 2005; Leone et al., 2003; Madisen et al., 2010) were obtained from the institutional animal facility at the University of Hamburg. To induce tdTomato expression in PLP-Cre^{ERT2} x tdTomato^{fl/fl} mice, tamoxifen (Carbolution Chemicals GmbH, St.Ingbert, Germany) was dissolved in 8% ethanol/92% Mygliol[®]812 (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) and injected intraperitoneally for three consecutive days (starting p21; 100 mg/kg bodyweight). Only heterozygous PLP-Cre^{ERT2} and hGFAP-EGFP mice were used in this study. Animals were analyzed 10–14 days after the first injection. Animal rearing and dissection was performed according to the European Union's and local animal welfare guidelines (GZ G21305/591-00.33; Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Hamburg, Germany).

2.2 | Immunohistochemistry

The olfactory bulbs were prepared and kept at room temperature (RT) in 4% formalin in phosphate buffered solution (PBS) containing (in mM): 130 NaCl, 7 Na₂HPO₄, 3 NaH₂PO₄. Afterward 100–150 μm thick sagittal or frontal tissue slices were prepared using a vibratome (VT1000S, Leica, Nussloch, Germany) following 1 hr incubation in blocking solution (10% normal goat serum, 0.5% Triton X-100 in PBS) at RT. Subsequently slices were incubated for 48 hr at 4°C with the primary antibody solution (antibodies were diluted in 1% NGS, 0.05% TritonX100 in PBS). The following antibodies were used: rabbit anti-S100B (1:1,000, Dako), mouse anti-S100B (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), rabbit anti-AQP4 (1:1,000, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany), chicken anti-GFAP (1:1,000, Abcam, Cambridge UK), rat anti-PDGFR β (1:100, eBioscience, San Diego, CA), chicken anti-GFP (1:500, Abcam), rabbit anti-ZO-1 (1/200, Invitrogen, Carlsbad, CA). Slices were incubated with the following secondary antibodies for 24 hr at 4°C: goat anti-rabbit Alexa 488 (1:1,000 in PBS; Thermo Fisher, Darmstadt, Germany), goat anti-rabbit Alexa 555 (1:1,000 in PBS; Thermo Fisher), goat anti-chicken Alexa 488 (1:1,000 in PBS; Abcam), goat anti-rat Alexa 488 (1:1,000 in PBS, Abcam). Goat anti-mouse secondary antibodies (Alexa 405 and Alexa 555; 1:1,000, Thermo Fisher) were employed to stain blood vessels by the detection of mouse IgGs. Additionally, Hoechst 33342 or DAPI (each 5 μM ; Molecular Probes, Eugene, OR) was added to stain nuclei. Slices were mounted on slides using a self-hardening embedding medium (Immu-Mount, Thermo Fisher). Immunohistological stainings were analyzed using a confocal microscope Nikon eC1. Z-Stacks were taken in 100 nm step sizes and 2,048 x 2,048 pixel. Deconvolutions of the z-stacks were established using the Huygens Essential program. Moreover, image z-stacks were projected using an average projection tool in ImageJ and adjusted to contrast and brightness using Adobe Photoshop CS6.

2.3 | Ultrathin section electron microscopy

NMRI mice were transcardially perfused with either 2.4% glutaraldehyde and 2% lanthanum nitrate in HMSS or solely with 2.4% glutaraldehyde in HMSS. The olfactory bulbs were prepared and postfixed in the identical fixative for at least 4 hr. Preparations were stored in cacodylate. The olfactory bulbs were postfixed in 1% OsO₄, following hydration in an ethanol series (50, 70, 96, 100%). To enhance the contrast 70% ethanol was saturated with uranyl acetate. Dehydration was completed in propylene oxide. The preparations were embedded in Araldite (Serva, Heidelberg, Germany). Ultrathin sections were prepared using a FCR Reichert Ultracut ultramicrotome (Leica, Bensheim, Germany), following the mounting on pioloform-coated copper grids, contrasted with lead citrate. The sections were analyzed using an EM10A electron microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.4 | Ca²⁺ imaging and data analysis

In-toto preparations of the olfactory bulb were prepared as described in previous studies (Stavermann et al., 2012; Thyssen et al., 2010). Animals were sacrificed and both olfactory bulbs were removed from the opened head in cooled preparation solution (see below), glued onto small coverslips and stored for 45 min in carbogen-gassed ACSF at 30°C for recovery. Standard artificial cerebrospinal fluid (ACSF) consisted of (in mM): 120 NaCl, 2.5 KCl, 1 NaH₂PO₄·x2H₂O, 26 NaHCO₃, 2.8 D-(+)-glucose, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂. The preparation solution consisted of (in mM) 83 NaCl, 1 NaH₂PO₄·x2H₂O, 26.2 NaHCO₃, 2.5 KCl, 70 saccharose, 20 D-(+)-glucose, 2.5 MgSO₄ ·x7H₂O. Both solutions were continuously gassed with carbogen (95% O₂, 5% CO₂) to maintain the pH of 7.4 and to supply oxygen. Whole bulbs were transferred into a recording chamber and fixed with a platinum grid. The preparations were continuously perfused with ACSF (at RT) via a perfusion system. For multi-cell bolus loading a glass pipette with a resistance of ~3 MΩ was filled with 200 μM Fluo-4 AM in ACSF, made from a 4 mM stock solution (dissolved in DMSO and 20% pluronic acid) (Stosiek, Garaschuk, Holthoff, & Konnerth, 2003). The injection pipette was inserted onto the ONL, following the pressure-injection of the Ca²⁺ indicator with 0.7 bar for 30 s into the tissue (PDES-01 AM, npi electronic GmbH, Tamm, Germany). After an incubation of 20 min. Ca²⁺ signals in OECs were detected by the fluorescence of Fluo-4 (excitation: 488 nm, emission: 500–530 nm) using a confocal microscope (eC1, Nikon, Düsseldorf, Germany). Images were acquired at a time rate of one frame every 3–5 s. To analyze Ca²⁺ changes in single cell somata, regions of interest (ROIs) were defined, using Nikon EZ-C1 3.90 FreeViewer software. Cells located in the ONL were defined as OECs (Au et al., 2002; Thyssen et al., 2010). Changes in cytosolic Ca²⁺ were recorded throughout the experiments as relative changes in Fluo-4 fluorescence (ΔF) with respect to the resting fluorescence, which was normalized to 100%.

2.5 | Visualization of blood vessels and glucose uptake

After bulk loading with Fluo-4 AM, a micropipette with a resistance of 7–8 MΩ (when filled with ACSF) was loaded with 1 μM sulforhodamine 101 (SR101; Santa Cruz Biotechnology) diluted in ACSF and inserted into a blood vessel located in the ONL. SR101 was pressure injected (0.1 bar, 30 s) into the blood vessel, resulting in an immediate labeling of the blood vessel network throughout the olfactory bulb (Figure S1). SR101 was excited by a helium-neon laser (excitation 543 nm, emission: 553–618 nm) of the confocal microscope. Vasoconstriction was measured as the decrease of the SR101 fluorescence in a region of interest, covering the entire cross sections of a blood vessel segment of ~10–20 μm length. The fluorescent non-hydrolyzable glucose analog, 6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino)-6-deoxyglucose (6-NBDG, 100 μM in ACSF; Thermo Fisher) was injected into the blood vessels similar to SR101 to visualize glucose uptake into glial cells. 6-NBDG was excited by a 488-nm argon laser.

3 | RESULTS

3.1 | Glial distribution in the ONL

We aimed to analyze the glial organization of the BBB in the ONL using immunohistology. OECs are strongly S100B-positive, whereas astrocytes, in particular in neonatal brains, show less immunoreactivity against S100B (Au et al., 2002; Raponi et al., 2007; Thyssen et al., 2013) (Figure 1a,b). Astrocytes in the GL, however, express high amounts of GFAP, whereas OECs are GFAP-negative (Au et al., 2002; Doengi, Deitmer, & Lohr, 2008; Doucette, 1984; Thyssen et al., 2013) (Figure 1a–e). We did not perfuse the blood vessel system during fixation, hence blood vessels contain endogenous antibodies including IgG. Blood vessels were detected by goat anti-mouse IgG antibodies labeled with Alexa Fluor 405, enabling the visualization of the dense vascular network of the olfactory bulb (Doengi et al., 2009). (Figure 1b–e). S100B-positive OECs are exclusively located in the ONL. In the outer ONL, S100B-positive OEC somata and processes are in close contact to blood vessels (Figure 1d). GFAP-positive somata of astrocytes are located throughout all layers of the olfactory bulb, except the ONL. However, few GFAP-positive astrocytic processes project into the inner ONL, intermingling with blood vessels (Au et al., 2002; Bailey & Shipley, 1993; Petzold, Albeanu, Sato, & Murthy, 2008; Rieger, Deitmer, & Lohr, 2007; Figure 1e).

Although S100B expression is lower in OB astrocytes compared to OECs in mice of an age up to 2 weeks, mature astrocytes contain similar amounts of S100B as OECs, suggesting that S100B might not be an ideal marker to distinguish between OECs and astrocytes (Beiersdorfer, Scheller, Kirchhoff, & Lohr, 2019). Therefore, we took advantage of PLP-Cre^{ERT2} × tdTomato^{fl/fl} × hGFAP-EGFP^{GfEC} mice, in

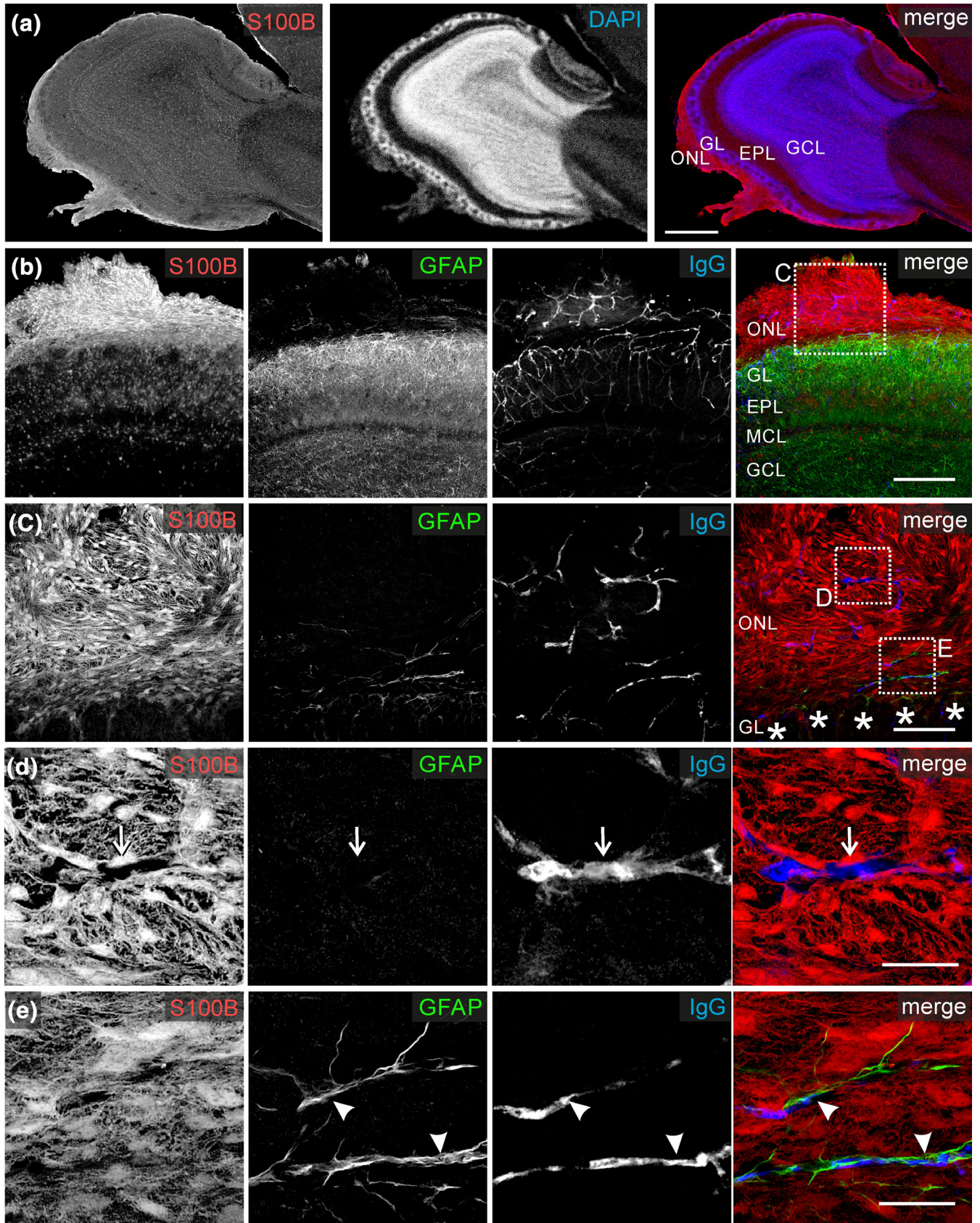


FIGURE 1 Legend on next page.

which OECs express tdTomato controlled by the PLP promotor and astrocytes express EGFP controlled by the hGFAP promotor (Hirrlinger et al., 2005; Leone et al., 2003; Madisen et al., 2010). The cytosolic expression of the fluorescent reporters in OECs and astrocytes enabled the visualization of the entire cell, in contrast to, for example, GFAP antibody staining that only labels major cell processes. tdTomato-expressing OECs are located in the entire ONL (Figure 2a). Oligodendrocytes are located in the GL, but not the ONL which only contains unmyelinated axons (Dickinson et al., 1997). Hence, tdTomato-expressing cells located in the GL are addressed as oligodendrocytes. EGFP-expressing astrocytes are present in the GL and extend processes in the inner ONL (Beiersdorfer et al., 2019) (Figure 2a). In particular, blood vessels are ensheathed by GFP-expressing astrocytes in the inner ONL, whereas tdTomato-expressing OECs contact the same blood vessel in the outer ONL (Figure 2b). Our results suggest that OECs might contact the BBB in the outer ONL, whereas in the inner ONL and deeper layers, blood vessels are surrounded by astrocytes. To verify that in the outer ONL OECs tightly enwrap blood vessels, we performed ultrastructural studies (Figure 2c,d). EM images showed the cellular elements of the BBB in the ONL of a mouse at an age of 9 days (P9). ECs form the blood vessel wall and are surrounded by a thin (<50 nm) basal lamina. Moreover, OECs surround the blood vessels with their processes as shown by immunohistochemistry. Similar results have been found in juvenile mice (P21; Figure S2).

3.2 | Astrocytic endfeet are part of the BBB in the inner ONL

AQP4 is a member of the water-channel protein family of aquaporins and is supposed to be exclusively expressed in astrocyte endfeet in the brain (Nielsen et al., 1997; Rash & Yasumura, 1999; Simard, Arcuino, Takano, Liu, & Nedergaard, 2003; Wolburg, Wolburg-Buchholz, Fallier-Becker, Noell, & Mack, 2011). Located at the border between blood vessels and the neuropil, AQP4 channels provide osmotic balance and homeostasis within the CNS (Nico et al., 2001). In the GL of the OB, a dense network of AQP4-positive astrocyte endfeet has been investigated, while the literature lacks information about AQP4 in the ONL (Petzold et al., 2008). We aimed to analyze the expression of AQP4 in the ONL and its contribution to the BBB. In addition, we stained for GFAP to identify astrocytes. The vasculature was visualized by the detection of mouse IgGs. AQP4 is highly

expressed within the GL, however, AQP4 immunoreactivity was not restricted to astrocyte endfeet surrounding blood vessels, but appears to label most of the astrocyte structures (Figure 3a; Petzold et al., 2008). AQP4 expression can also be detected in the inner ONL around blood vessels, on astroglial endfeet (Figure 3b). In addition, AQP4-positive structures are frequently found in the outer ONL, neither associated with the vasculature nor contributing to GFAP-positive astrocytes (Figure 3c). In the entire ONL, immunoreactivity of AQP4 does not co-localize with tdTomato-expressing OECs in PLP-Cre^{ERT2} x tdTomato^{fl/fl} mice (Figure 3d).

3.3 | Pericytes are part of the BBB in the ONL

As a cellular component of the BBB, pericytes fulfill a whole repertoire of functions, including stabilization of the vasculature, angiogenesis, macrophage-like function, and regulation of endothelial cell proliferation (Hamilton, Attwell, & Hall, 2010; Hirschi & D'Amore, 1996; Lai & Kuo, 2005). In in-vivo studies of the ONL, Chaigneau, Oheim, Audinat, and Charpak (2003) did not find any capillaries, but arterioles as defined by the vessel diameter (<6 μm for capillaries). In the GL, on the other hand, a dense capillary network was analyzed in that study. In contrast, Halasz, Ljungdahl, and Hokfelt (1979) reported capillaries in EM studies of the ONL. We investigated the distribution of pericytes in the ONL by immunohistochemistry using anti-PDGFRβ (platelet-derived growth factor receptor β), a marker for pericytes (Armulik, Mae, & Betsholtz, 2011; Attwell, Mishra, Hall, O'Farrell, & Dalkara, 2016; Winkler et al., 2018; Winkler, Bell, & Zlokovic, 2010). Our results show PDGFRβ-positive pericytes located around blood vessels in the ONL and GL (Figure 4a). Co-staining with anti-S100B showed an envelope of OECs around PDGFRβ-positive pericytes in the outer ONL (Figure 4b,c). In the inner ONL and the GL, in contrast, PDGFRβ-positive pericytes were enwrapped by AQP4-positive astrocyte processes (Figure 4d,e). It should be emphasized that there are no ideal markers exclusively labeling pericytes independent of area, developmental stage, or experimental conditions (Armulik et al., 2011; Gerhardt & Betsholtz, 2003). Different studies suggest PDGFRβ expression in developing vascular smooth muscle cells (vSMC) restricted to arterioles, as well as endothelial cells and neurons (Hellstroem, Kalen, Lindahl, Abramsson, & Betsholtz, 1999; Lindahl et al., 1997; Smits et al., 1991). However, ultrastructural analyses verified the existence of pericytes around blood vessels in the ONL and showed that the cross section of the blood vessel walls were built by

FIGURE 1 Distribution of glial cells and blood vessels in the olfactory nerve layer (ONL) of neonatal mice. (a) Overview of the olfactory bulb. Olfactory ensheathing cells (OECs) in the olfactory nerve layer (ONL) and astrocytes in the glomerular layer (GL), external plexiform layer (EPL), and granule cell layer (GCL) are S100B-positive (red). Nuclei are stained with DAPI. Scale bar: 500 μm. (b) At higher magnification, OECs in the ONL are strongly S100B-positive (red), whereas astrocytes in the GL, EPL, and GCL show weaker expression of S100B. GFAP-positive astrocytes are localized throughout the GL, EPL, and GCL (green). The vascular network, visualized by immunostaining of mouse IgGs (blue), extends throughout all layers of the olfactory bulb. Scale bar: 200 μm. (c) Magnified detail from (b). Asterisks indicate glomeruli. Scale bar: 50 μm. (d) Magnified detail of the outer ONL, as indicated in (c). S100B-positive OECs are closely associated with blood vessels in the outer ONL, lacking GFAP-positive structures (arrows). Scale bar: 15 μm (e) Magnified detail of the inner ONL as indicated in (c). GFAP-positive astrocytes are closely associated with blood vessels (arrowheads). Scale bar: 15 μm

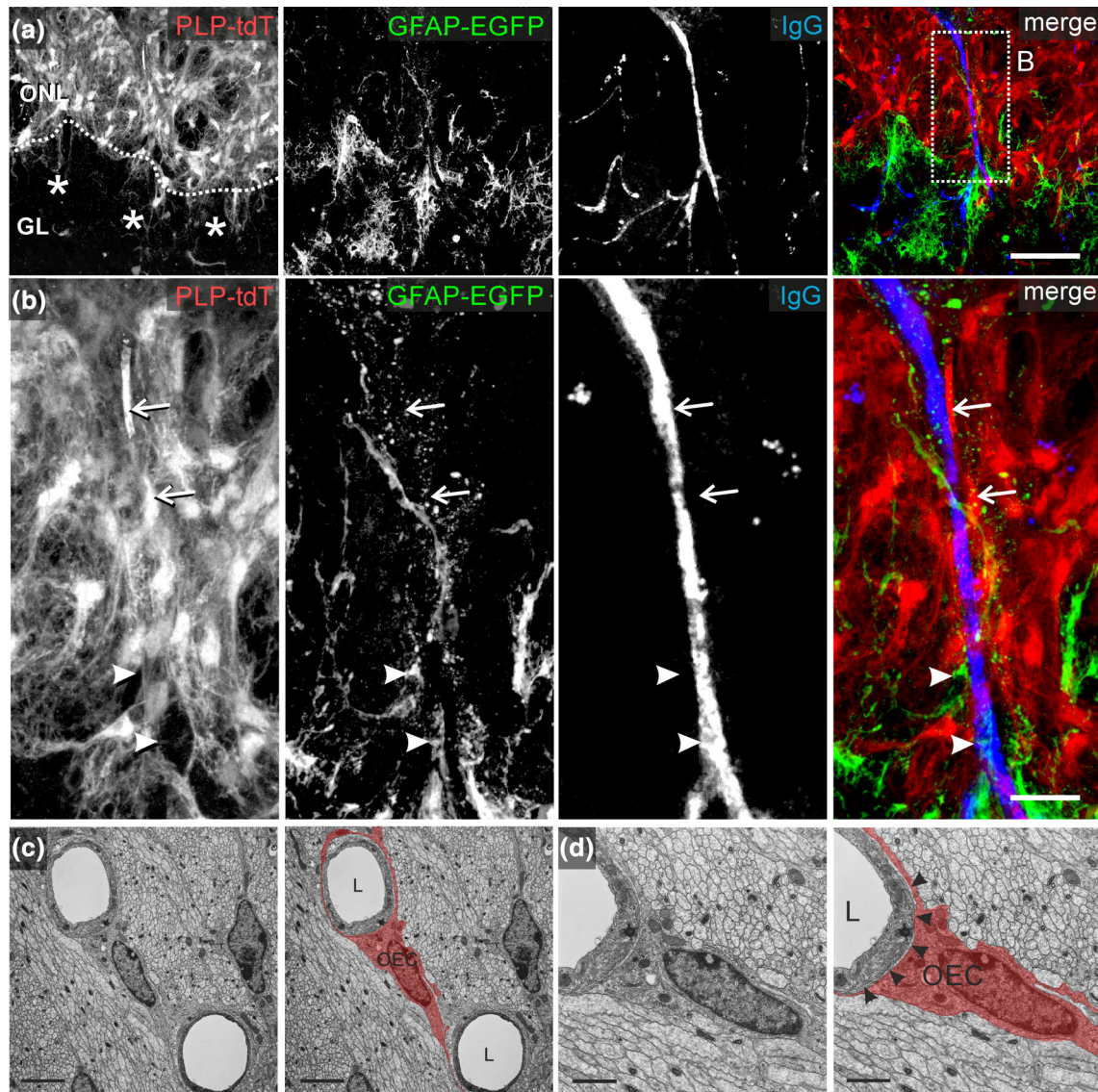


FIGURE 2 Organization of the blood brain barrier (BBB) in PLP-Cre^{ERT2}/tdT x GFAP-EGFP mice (a) tdTomato-expressing olfactory ensheathing cells (OECs; red) are located in the olfactory nerve layer (ONL). Cell bodies of EGFP-expressing astrocytes (green) are located in the glomerular layer (GL). Immunostaining against mouse IgG outlines the vascular network (blue) in the GL and ONL. One blood vessel crosses the entire ONL and finally enters one glomerulus. Scale bar: 50 μ m (b) Magnified detail as indicated in (a). EGFP-expressing astrocytes are tightly associated with the blood vessel located in the inner ONL (arrows), while tdTomato-expressing OECs are in close contact to the same blood vessel as it proceeds in the outer ONL (arrowhead). Scale bar: 20 μ m (c) Electron micrograph of the BBB in the ONL. Blood vessels (lumen, L) located in the ONL are ensheathed by OECs. One OEC is highlighted in red in the right panel. Scale bar: 2 μ m. (d) Magnified detail from (c). OEC processes are separated from the blood vessel by a thin layer of basal lamina (arrowheads). Scale bar: 1 μ m

one to two endothelial cells, typical for capillaries (Joost et al., 2019; Figure 4f,g and Figure S2). Hence, our results demonstrate pericytes associated with capillaries in the ONL.

3.4 | Selective permeability of the blood brain barrier in the ONL

One function of the BBB is a selectivity filter for molecular exchange between brain tissue and blood; For example, entry of noxious substances into the brain parenchyma is restricted, whereas nutrients are

actively transported into brain tissue. Glucose, the main source of energy in the brain, is transported across endothelial cells via glucose transporters 1 (GLUT-1), released into the extracellular space, where it is taken up by astrocytes, metabolized into lactate and provided to neurons (Barros & Deitmer, 2010; Simpson, Carruthers, & Vannucci, 2007; Zhao et al., 2015). 2-deoxyglucose autoradiography studies have shown high glucose consumption in the ONL (Benson et al., 1985; Sharp et al., 1977). Since our previous results showed that OECs ensheath not only OSN axons, but also blood vessels in the ONL and thereby might link both structures together (Thyssen et al., 2010), we asked whether OECs might take up glucose from the

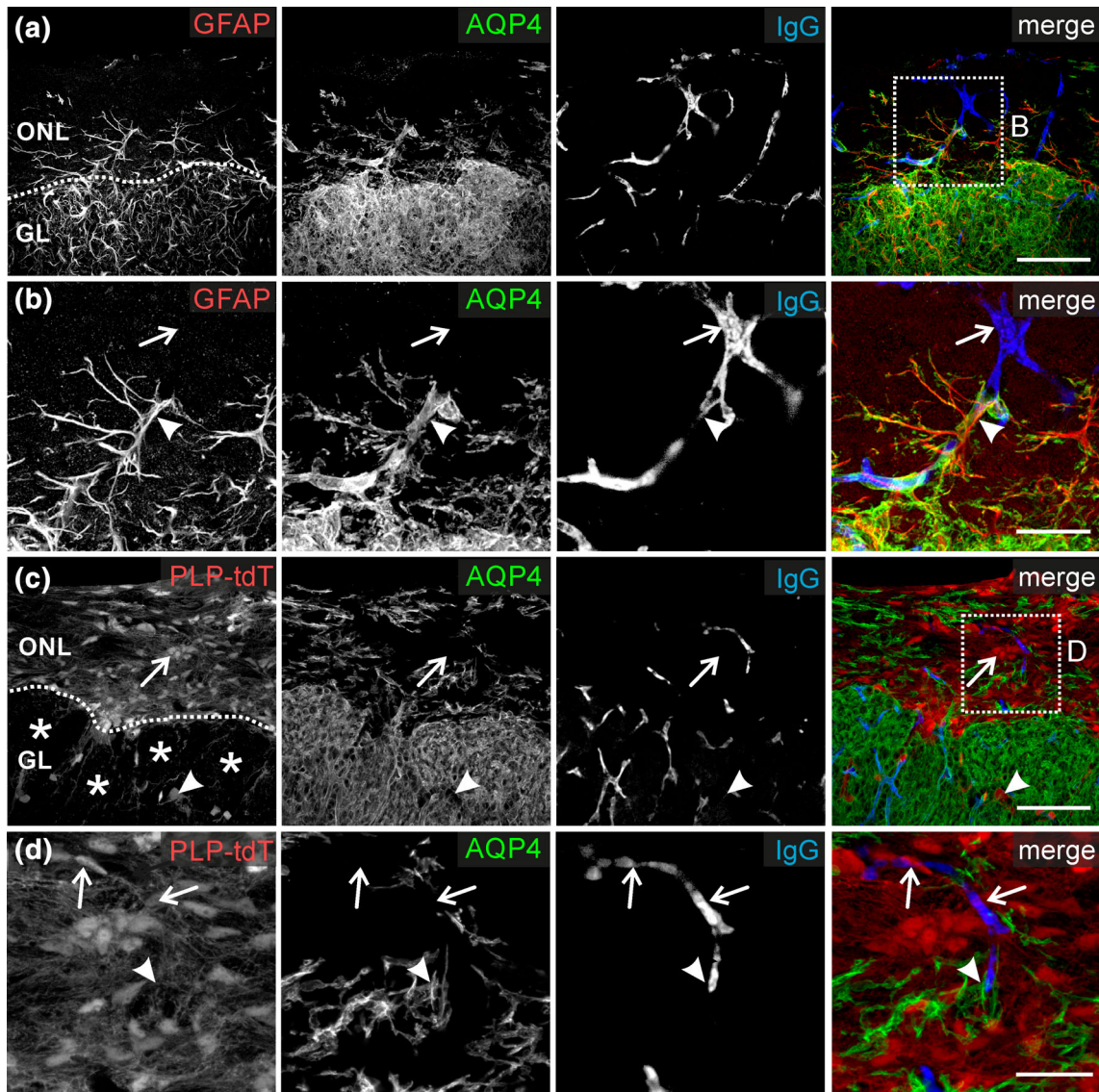


FIGURE 3 Astrocytic endfeet surround blood vessels in the inner olfactory nerve layer (ONL). (a) GFAP-positive astrocytes (red) co-localize with AQP4 immunoreactivity (green). Blood vessels are immunostained against mouse IgG (blue). Scale bar: 50 μ m. (b) Magnified detail from (a). GFAP and AQP4 immunostaining colocalize in the inner ONL. One blood vessel extends from the glomerular layer (GL) to the ONL and is ensheathed by AQP4- and GFAP-positive astrocytic endfeet in the inner ONL (arrowhead), while it is devoid of AQP4- and GFAP-expressing glial processes in the outer ONL (arrows). Scale bar: 20 μ m. (c) PLP-driven tdTomato expression (red) in olfactory ensheathing cells (OECs) in the ONL (arrow) and oligodendrocytes in the GL (arrowhead). Scale bar: 50 μ m. (d) Magnified detail from (c). Blood vessels located in the GL and inner ONL are ensheathed by AQP4-positive astrocytic endfeet (arrowhead), whereas tdTomato-expressing OECs are associated with blood vessels located in the outer ONL (arrow). Scale bar: 20 μ m

perivascular space to provide energy to OSN axons. To monitor glucose uptake into glial cells in previous studies, the fluorescent non-hydrolyzable glucose analog 6-NBDG has been used in the cerebellum and hippocampus in situ as well as in the somatosensory cortex in vivo (Barros et al., 2009; Chuquet, Quilichini, Nimchinsky, & Buzsaki, 2010; Jakoby et al., 2014). We used 6-NBDG to visualize glucose uptake in olfactory bulb in-toto preparations of PLP-Cre^{ERT2} x tdTomato^{fl/fl} mice, enabling identification of OECs by tdTomato expression. Under optical control, 6-NBDG was pressure-injected into a large blood vessel located in the lateral ONL, resulting in loading of 6-NBDG into the blood vessel network (Figure 5a). OECs located

close to a 6-NBDG-filled blood vessel, but at least 100 μ m apart from the injection site, were analyzed. tdTomato-positive OECs adjacent to blood vessels were labeled by 6-NBDG within 3–5 min after injection of 6-NBDG into blood vessels, indicating glucose uptake by OECs from the extracellular space close to blood vessels (Figure 5a). Interestingly, OECs which were not directly associated with blood vessels, but near 6-NBDG-loaded perivascular OECs, were also labeled by 6-NBDG, confirming previous results of gap junction coupling between OECs (Piantanida et al., 2019; Rela, Bordey, & Greer, 2010). We did not find apparent labeling of axon bundles by 6-NBDG, suggesting that there is little uptake of glucose by axons in the ONL.

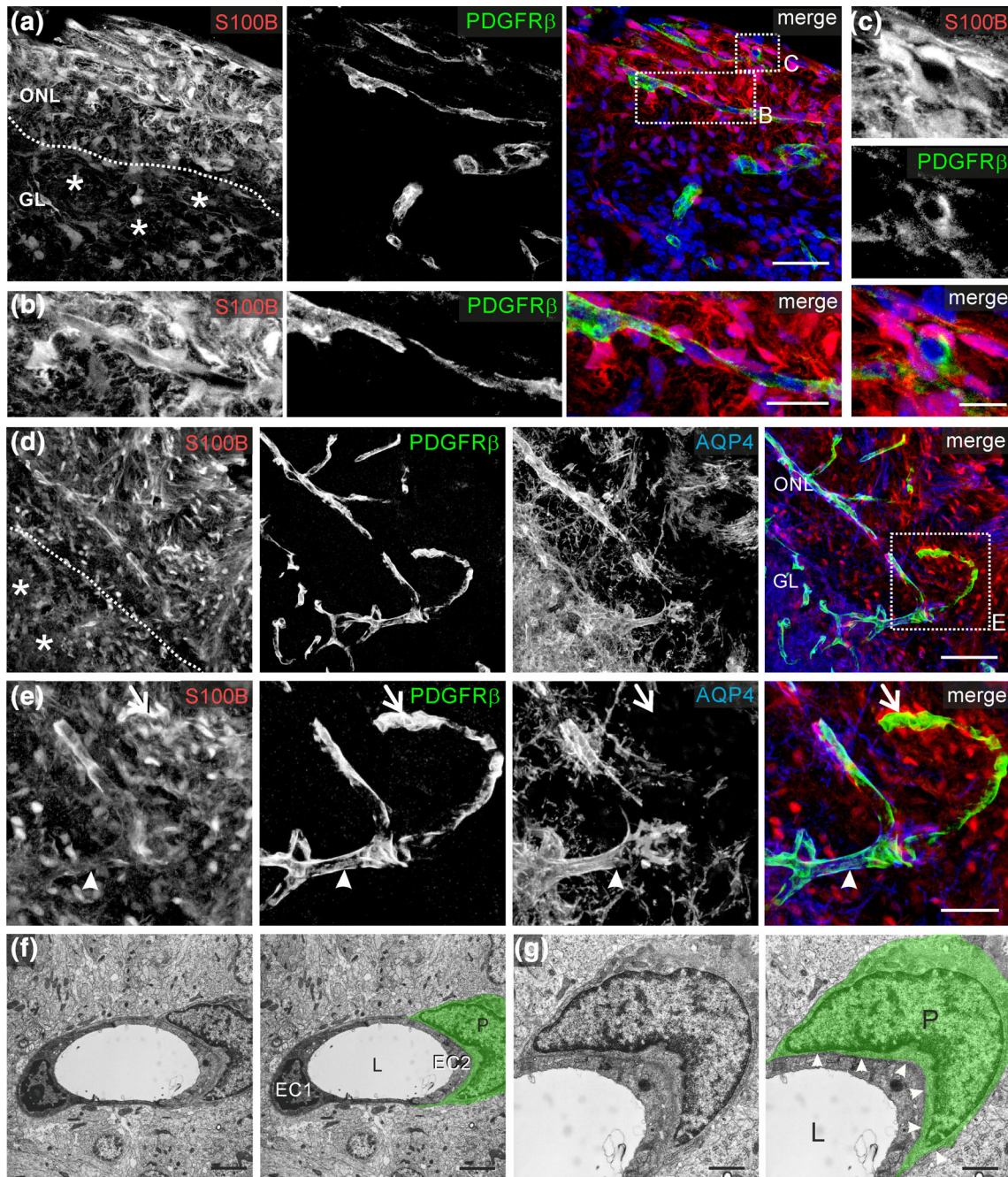
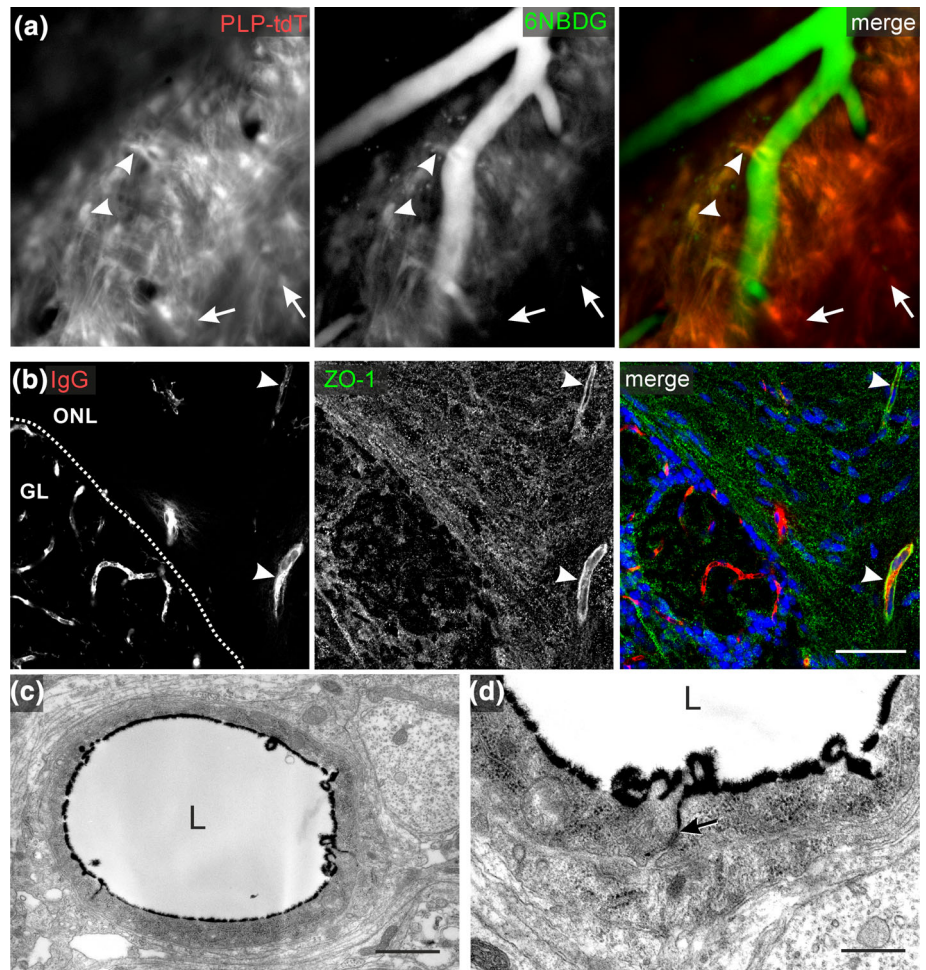


FIGURE 4 Pericytes are part of the blood brain barrier (BBB) in the inner and outer olfactory nerve layer (ONL). (a) S100B (red) and PDGFR β immunoreactivity (green) in the ONL and the glomerular layer (GL). Nuclei were counterstained with Hoechst in the merged image (blue). Scale bar: 50 μ m. (b) The magnified detail from (a) depicts a longitudinal section of a blood vessel tightly ensheathed by PDGFR β -positive pericytes (green) and S100B-positive olfactory ensheathing cells (OECs; red) in the ONL. Scale bar: 25 μ m. (c) Magnified details from (a), showing a cross section of a blood vessel ensheathed by PDGFR β -positive pericytes (green) and S100B-positive OECs (red) in the ONL. Scale bar: 12.5 μ m. (d) S100B (red), PDGFR β (green) and AQP4 (blue) immunoreactivity in the GL and ONL (green). Scale bar: 50 μ m. (e) Magnified detail of the ONL as indicated in (d). A blood vessel is ensheathed by PDGFR β -positive pericytes and AQP4-positive astrocytic endfeet in the inner ONL (arrowhead), but lacks AQP4-positive ensheathment in the outer ONL (arrow). Scale bar: 25 μ m. (f) Electron micrograph of the BBB in the ONL. A pericyte (green outline in right panel) is directly located on a blood vessel composed by two endothelial cells (EC1 and EC2). L, lumen. Scale bar: 2 μ m. (g) At higher magnification, the basal lamina is visible (arrowheads). Scale bar: 1 μ m

Endothelial cells are connected by tight junctions, which maintain the barrier function by controlling paracellular diffusion of substances from the blood stream into the CNS (Abbott et al., 2010). To investigate the presence of the cytoplasmic tight junction protein, ZO-1

(zonula occludens 1) at the BBB in the ONL, we performed immunofluorescent staining in NMRI mice (Wolburg et al., 2008; Wolburg & Lippoldt, 2002; Figure 5b). The vasculature was visualized by the detection of mouse IgGs. Blood vessels located in the entire ONL

FIGURE 5 Selective permeability of the blood brain barrier (BBB) in the olfactory nerve layer (ONL). (a) PLP promotor-driven tdTomato expression (red) in the ONL in an in-toto preparation. The fluorescent glucose analog 6-NBDG (green) was pressure-injected into a blood vessel and spread within the vascular network. tdTomato-positive OECs located close to the blood vessels took up 6-NBDG (arrowheads), while distant olfactory ensheathing cells (OECs) were not labeled by 6-NBDG (arrows). Scale bar: 5 μ m. (b) ZO-1 immunoreactivity (green) in the ONL and the GL. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue, in merged image) and blood vessels were immunostained against mouse IgG (red). Blood vessels in the ONL are ensheathed by ZO-1-positive tight junctions. Scale bar: 50 μ m. (c) Lanthanum nitrate was transcardially perfused before fixation and visualized by the black precipitation in electron micrographs. Scale bar: 1 μ m. (d) Magnified detail from (c). Endothelial tight junctions limited diffusion of lanthanum nitrate out of the blood vessel (arrow). Scale bar: 0.5 μ m



showed immunoreactivity against ZO-1, substantiating the presence of tight junctions between adjacent endothelial cells at the BBB in the ONL. Interestingly, blood vessels in the GL often showed less ZO-1 immunoreactivity. To analyze the impermeability for noxious substances of the BBB in the ONL, we perfused NMRI mice transcardially with 2% lanthanum nitrate in glutaraldehyde. In electron micrographs, lanthanum nitrate is detected as a black precipitate (Figure 5c). In case of leakage of the BBB, lanthanum nitrate diffused across the inter-endothelial cleft into the sub-endothelial space, as it has been shown for blood vessels in the olfactory lamina propria (Wolburg et al., 2008). In the ONL, in contrast, lanthanum diffused only a small distance between the endothelial cells, until further diffusion was prevented by tight junctions, indicating an intact and impermeable BBB (Figure 5(d); Figure S2).

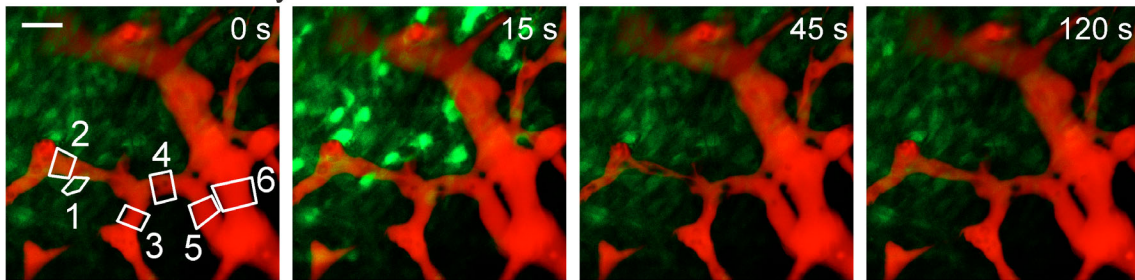
3.5 | Ca^{2+} signaling in OECs triggers vasoresponses in the outer ONL

The ONL harbors at least two subpopulations of OECs differing in the expression pattern of marker proteins, physiological properties and their localization in the inner and outer ONL, respectively (Au et al., 2002; Honore et al., 2012; Rela et al., 2010; Rela, Piantanida,

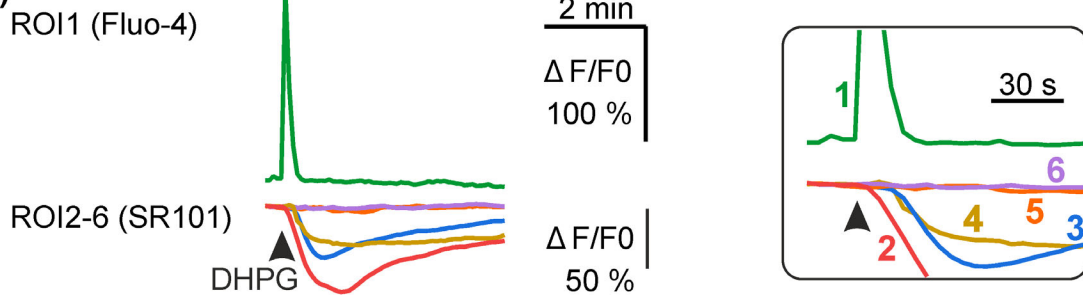
Bordey, & Greer, 2015; Thyssen et al., 2013). Release of glutamate and ATP from OSN axons initiates Ca^{2+} responses in OECs in the outer ONL, but not in OECs of the inner ONL, which instead propagate spontaneous Ca^{2+} waves that do not include OECs of the outer nerve layer (Stavermann et al., 2015; Thyssen et al., 2013). Since our results demonstrate differences in the morphological relationship of blood vessels and OECs between the outer and inner ONL, we asked whether both subpopulations of OECs differ in their ability to initiate vasoresponses. Therefore, we performed Ca^{2+} imaging experiments using in-toto preparations of the olfactory bulb in which blood vessels were visualized by SR101 injection. The Ca^{2+} indicator Fluo-4 AM was pressure-injected into the ONL, resulting in labeling of OECs with Fluo-4. Ca^{2+} transients in OECs of the outer ONL were induced by focal pressure application of the mGluR agonist DHPG (100 μ M) onto the ONL (Thyssen et al., 2010). DHPG induced Ca^{2+} responses in OECs of the outer ONL with an amplitude of $127.1 \pm 10.1\% \Delta F$ ($n = 35$), followed by a decrease in SR101 fluorescence by $25.3 \pm 3.3\%$ ($n = 18$) in associated blood vessels, indicating vasoconstriction (see ROI 2 in Figure 6a,b and Movie S1). Adjacent branches of the capillaries responded with a delay (see ROIs 3 and 4), whereas no vasoresponses could be observed in distal capillaries and upstream arterioles (see ROIs 5 and 6). Spontaneous Ca^{2+} signals occurring during Ca^{2+} wave propagation in OECs of the inner sublamina



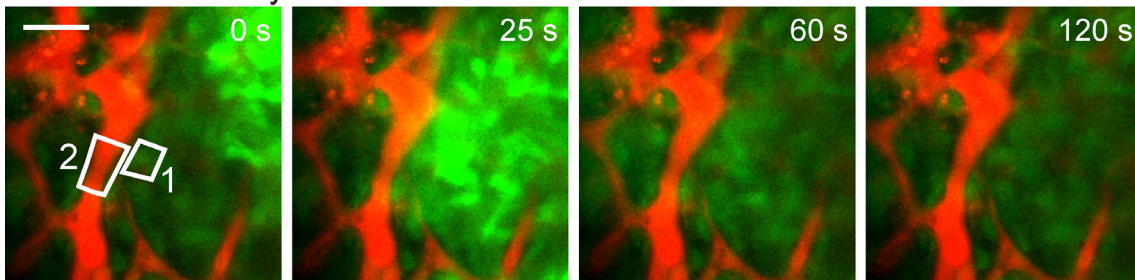
(a) Outer nerve layer



(b)



(c) Inner nerve layer



(d)

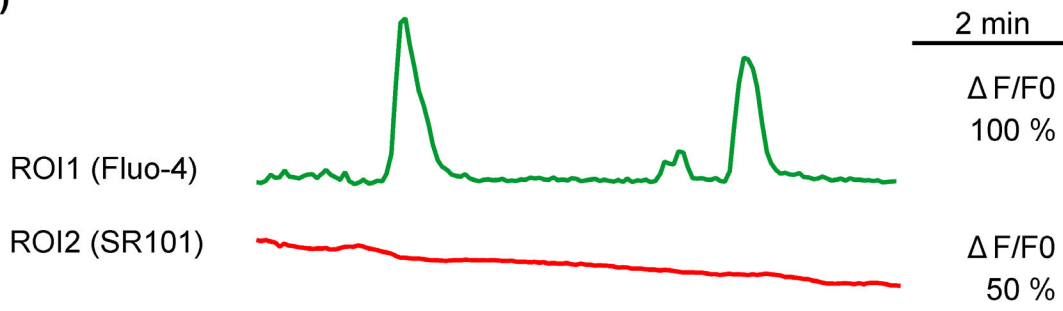


FIGURE 6 Ca^{2+} signaling in olfactory ensheathing cells (OECs) mediates vasoconstriction in the outer olfactory nerve layer (ONL). (a) Blood vessels located in the outer ONL are injected with SR101 (red) and associated OECs are loaded with Fluo-4 (green). Image sequence of DHPG-induced Ca^{2+} transients in OECs, followed by a decrease in SR101 fluorescence, indicating vasoconstriction. DHPG was pressure-applied from a micropipette located at the left border of the image. Scale bar: 20 μm . (b) ROI1 (as indicated in (a)) represents an OEC selected for analysis. SR101 fluorescence was measured in ROI2 to 6 (as indicated in (a)). The inset represents the time course of Ca^{2+} signaling in OECs and the following vasoconstriction in different sections of the vascular tree from higher-order capillaries (ROI2-4), primary capillary (ROI 5), and upstream arteriole (ROI 6; see also Movie S1). The capillary directly adjacent to OECs responding to DHPG stimulation responded first and with the strongest constriction (ROI2), followed by adjoining capillary sections (ROIs 3 and 4). No changes in vascular tone could be observed in distant capillaries and the upstream arteriole (ROIs 5 and 6). (c) Image sequence of a spontaneous Ca^{2+} wave propagating in OECs of the inner ONL. Scale bar: 10 μm . (d) ROI1 represents the OEC selected for analysis in (c). SR101 fluorescence was measured in ROI2 as indicated in (c). Spontaneous Ca^{2+} wave propagation in OECs (represented by ROI1) is not followed by a change in blood vessel diameter (ROI2; see also Movie S2)

(Stavermann et al., 2015), in contrast, did not trigger vasoconstriction of associated blood vessels (Figure 6c,d; Movie S2).

The results show that Ca^{2+} responses in OECs of the outer sublamina are capable to trigger local changes in blood vessel diameter. In the inner ONL, on the other hand, vasoresponses were not evoked by Ca^{2+} signals in OECs, supporting the notion that there are functional differences between the two subpopulation of OECs regarding the gliovascular interface.

4 | DISCUSSION

In the present study, we investigated the cellular organization of the BBB in the ONL, using electron microscopy and immunofluorescence staining. Our results showed that in the outer sublamina of the ONL, S100B-, and PLP-tdTomato-positive OECs were closely associated with the vasculature, whereas GFAP- and AQP4-positive astrocyte processes were sparse and not joint with blood vessels. In contrast, astrocytic endfeet in the inner sublamina of the ONL enwrapped blood vessels abundantly, indicating that there are cellular differences in the organization of the BBB within the two sublaminae of the ONL (Figure 7).

4.1 | OECs and astrocytes are part of the BBB at the CNS-PNS transitional zone

The ONL consists of incoming axons of olfactory sensory neurons and OECs, which support growth and guidance of axons from the

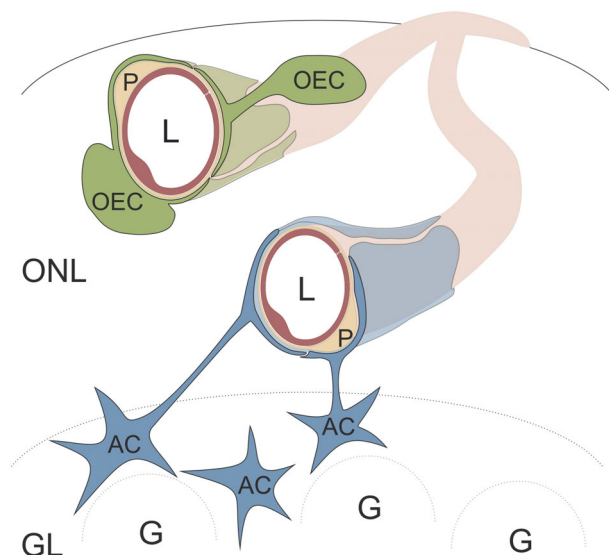


FIGURE 7 Blood brain barrier in the mouse olfactory nerve layer. Capillaries in the outer sublamina of the olfactory nerve layer (ONL) are covered by pericytes (P) and processes of olfactory ensheathing cells (OECs). In the inner sublamina of the ONL, capillaries are covered by pericytes and endfeet of astrocytes (AC), the somata of which are located in the glomerular layer (GL) comprising glomeruli (G). L, lumen of capillary. Illustration by SciGraphics

periphery into the CNS (Doucette, 1990, 1991). Therefore, the ONL represents the CNS-PNS transitional zone, in which the exact borders of CNS and PNS are still under debate (Barnett & Riddell, 2004; Doucette, 1991; Windus et al., 2010). The glia limitans covers the CNS and controls the diffusion of substances into the CNS in combination with the BBB. Recently, Nazareth et al. (2019) have suggested that the glia limitans consists of astrocytes alone, thus at least the outer sublamina of the ONL remains PNS, since astrocytes are absent in the outer ONL (Au et al., 2002; Doucette, 1991). However, the blood nerve barrier (BNB), which is the counterpart to the BBB in the PNS, significantly differs in the cellular organization by lacking a glial compartment (Kanda, 2013). Here, we show that in the outer sublamina of the ONL, S100B-, and PLP-tdtomato positive OECs are in close contact to the vasculature, whereas in the inner sublamina, GFAP- and AQP4-positive astrocytes are part of the BBB (Figures 1 and 2). Similar results were obtained in an ultrastructural study in macaques, showing the association of OECs with local blood vessels (Herrera, Casas, Bates, & Guest, 2005). In contrast, blood vessels of a larger diameter that penetrate the entire ONL (penetrating arterioles) are intensely covered by astrocytes (Doengi et al., 2009; Petzold et al., 2008). Our results suggest that the vasculature in both sublaminae of the ONL is associated with glial cells, in contrast to the BNB in the PNS. OECs originate from the neural crest, share Schwann cell properties and are therefore considered peripheral glial cells (Barraud et al., 2010; Doucette, 1991; Nazareth et al., 2019). However, OECs are also gap junction-coupled to astrocytes that project into the ONL, forming one functional unit (Beiersdorfer et al., 2019). In addition, OECs in the ONL contribute to the glial limitans and the BBB, considering the entire ONL being part of the CNS (Boyd, Skihar, Kawaja, & Doucette, 2003; Doucette, 1991; Herrera et al., 2005; Windus et al., 2010). Furthermore, the BBB and the BNB differ in their permeability properties in means of lanthanum diffusion. Our results show that the vasculature in the ONL is impermeable for lanthanum, a hallmark for the BBB, in contrast to the BNB in the sural nerve and the olfactory lamina propria (MacKenzie, Ghabriel, & Allt, 1987; Wolburg et al., 2008). Taken together, OECs share properties of peripheral and central glial cells, resulting in blurring of the PNS-CNS transitional zone in the ONL and thereby enabling the entry of axons through the olfactory nerve into the brain, a process that is suppressed in other parts of the CNS (Smith, Falone, & Frank, 2012).

4.2 | OECs mediate neurovascular and neurometabolic coupling in the outer ONL

Neuronal activity mediates Ca^{2+} transients in astrocytes, initiating the production and release of vasoactive substances, such as arachidonic acid and prostaglandins, causing a change in arteriole diameter (Filosa et al., 2004; Gordon et al., 2007; Mulligan & MacVicar, 2004; Zonta et al., 2003). In the olfactory bulb, odor stimulation evoked Ca^{2+} transients in perivascular astrocytic endfeet resulting in vasodilatation of arterioles of the inner ONL in vivo (Petzold et al., 2008). We show that ectopic release of glutamate and ATP by OSN axons induced



Ca²⁺ responses in OECs of the outer ONL, resulting in subsequent vasoconstrictions of neighboring blood vessels (Thyssen et al., 2010; Figure 6a,b), while spread of Ca²⁺ waves in OECs of the inner ONL did not influence blood vessel diameter (Figure 6c,d). These findings are in accordance to our histological data, showing that in the outer sublamina, OECs are closely associated with blood vessels, whereas in the inner ONL the vasculature is devoid of OECs but enwrapped by astrocyte endfeet. The results indicate that the two subpopulations of OECs in the inner and outer sublamina not only differ in the presumed interaction with regrowing axons but also in their interaction with the vasculature. In the mouse olfactory bulb, odor stimulation results in dilation of capillaries in the vicinity of glomeruli with odor-dependent synaptic activity; however, capillary dilation was preceded by dilation of up-stream arterioles more than 100 μm apart located in the external and mitral cell layer (Rungta, Chaigneau, Osmanski, & Charpak, 2018). The dilation, possibly mediated by potassium-dependent back-propagating hyperpolarization along the endothelium, was widespread and comprised the entire tree of arteriole, first and higher order capillaries (Longden, Hill-Eubanks, & Nelson, 2016; Longden & Nelson, 2015; Rungta et al., 2018). On the contrary, we showed local constriction of capillaries triggered by Ca²⁺ transients in OECs without previous vasoresponses of upstream capillaries and arterioles (Figure 6a,b; Thyssen et al., 2010). Local constriction of capillaries points to contractility of pericytes, which are present in the ONL (Figure 3). However, it is yet unclear whether pericytes in the brain are able to actively contract (Alarcon-Martinez et al., 2018; Hall et al., 2014; Hill et al., 2015; Vanlandewijck & Betsholtz, 2018). Retrograde hyperpolarization of upstream arterioles, as described above, is caused by accumulation of extracellular potassium after neuronal activity, which activates inward-rectifier K⁺ channels producing a fast hyperpolarization of the endothelium (Longden et al., 2017). However, in our experimental conditions, neuronal activity and the subsequent enrichment of external K⁺ is lacking, which might account for differences between our study and Rungta et al. (2018). In summary, the present and previous studies show that the mechanism that links neuronal activity to hyperemia is complex and OECs should be included in the models of neurovascular coupling in the olfactory bulb, although future experiments have to unravel the definite role OECs and possible intermediates play therein.

Neuronal information processing is a highly energy-consuming mechanism. To meet those needs, transport of nutrients across the BBB is essential. 2-deoxyglucose studies show high energy consumption in the ONL, an area that lacks cell bodies of astrocytes that classically provide metabolic support to neurons (Giaume, Koulakoff, Roux, Holcman, & Rouach, 2010; Sharp et al., 1977). Our results demonstrate that axon-associated OECs are in close contact to the vasculature, thereby adopting the ideal position to supply metabolites to axons. Additionally, OECs exhibit the ability to take up glucose from the perivascular space (Figure 5a). This result is confirmed by early 2-deoxyglucose studies that suggest glucose uptake in glial cells of the ONL (Benson et al., 1985). Moreover, a morphological study shows the expression of glucose transporter-1 (GLUT-1) in OECs of the lamina propria (Nunez-Parra et al., 2011), supporting the notion

that OECs possess the molecular machinery for glucose uptake at the BBB.

Our study shows that OECs in the outer ONL are part of a functional BBB, a hallmark exclusively attributed to astrocytes so far. Functional properties of perivascular OECs comprise glucose uptake and neurovascular coupling, capillaries in the ONL are surrounded by pericytes, and tight junctions between endothelial cells efficiently shield the neural parenchyma from noxious substances. Hence, the OEC-based BBB in the ONL shares the most important properties of the BBB in the rest of the brain.

ACKNOWLEDGMENT

We thank A.C. Rakete, A.Theil, M. Malekpour, and J. Benz for technical assistance. We thank M. Schweizer for preparing the mice for the EM study. We are grateful to G. Frommer-Kästle for the skillful preparation of ultrathin sections. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (LO 779/11 and SFB 1328 TP-A07 to CL; SFB 894 TP-A12, SPP 1757/KI 503/12 to FK and FOR 2289 TP-P9 to AS and FK) and the European Commission (H2020-FET ProAct Neurofibres #732344 to FK).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Antonia Beiersdorfer  <https://orcid.org/0000-0003-0976-005X>

Frank Kirchhoff  <https://orcid.org/0000-0002-2324-2761>

Christian Lohr  <https://orcid.org/0000-0001-6518-6422>

REFERENCES

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Alarcon-Martinez, L., Yilmaz-Ozcan, S., Yemisci, M., Schallek, J., Kilic, K., Can, A., ... Dalkara, T. (2018). Capillary pericytes express alpha-smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *eLife*, 7, 34861. <https://doi.org/10.7554/eLife.34861>
- Armulik, A., Mae, M., & Betsholtz, C. (2011). Pericytes and the blood-brain barrier: Recent advances and implications for the delivery of CNS therapy. *Therapeutic Delivery*, 2(4), 419–422.
- Attwell, D., Buchan, A. M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B. A., & Newman, E. A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, 468(7321), 232–243. <https://doi.org/10.1038/nature09613>
- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C. N., O'Farrell, F. M., & Dalkara, T. (2016). What is a pericyte? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(2), 451–455. <https://doi.org/10.1177/0271678X15610340>
- Au, W. W., Treloar, H. B., & Greer, C. A. (2002). Sublaminar organization of the mouse olfactory bulb nerve layer. *The Journal of Comparative Neurology*, 446(1), 68–80.

- Bailey, M. S., & Shipley, M. T. (1993). Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: Morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *The Journal of Comparative Neurology*, 328(4), 501–526. <https://doi.org/10.1002/cne.903280405>
- Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.12.016>
- Barnett, S. C., & Riddell, J. S. (2004). Olfactory ensheathing cells (OECs) and the treatment of CNS injury: Advantages and possible caveats. *Journal of Anatomy*, 204(1), 57–67. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2004.00257.x>
- Barraud, P., Seferiadis, A. A., Tyson, L. D., Zwart, M. F., Szabo-Rogers, H. L., Ruhrberg, C., ... Baker, C. V. (2010). Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(49), 21040–21045. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012248107>
- Barros, L. F., Courjaret, R., Jakoby, P., Loaiza, A., Lohr, C., & Deitmer, J. W. (2009). Preferential transport and metabolism of glucose in Bergmann glia over Purkinje cells: A multiphoton study of cerebellar slices. *Glia*, 57(9), 962–970. <https://doi.org/10.1002/glia.20820>
- Barros, L. F., & Deitmer, J. W. (2010). Glucose and lactate supply to the synapse. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.10.002>
- Beiersdorfer, A., Scheller, A., Kirchoff, F., & Lohr, C. (2019). Panglial gap junctions between astrocytes and olfactory ensheathing cells mediate transmission of Ca(2+) transients and neurovascular coupling. *Glia*, 67(7), 1385–1400. <https://doi.org/10.1002/glia.23613>
- Bell, R. D., Winkler, E. A., Sagare, A. P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., & Zlokovic, B. V. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron*, 68(3), 409–427. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.043>
- Benson, T. E., Burd, G. D., Greer, C. A., Landis, D. M., & Shepherd, G. M. (1985). High-resolution 2-deoxyglucose autoradiography in quick-frozen slabs of neonatal rat olfactory bulb. *Brain Research*, 339(1), 67–78.
- Boyd, J. G., Skihar, V., Kawaja, M., & Doucette, R. (2003). Olfactory ensheathing cells: Historical perspective and therapeutic potential. *Anatomical Record. Part B, New Anatomist*, 271(1), 49–60. <https://doi.org/10.1002/ar.b.10011>
- Brown, L. S., Foster, C. G., Courtney, J. M., King, N. E., Howells, D. W., & Sutherland, B. A. (2019). Pericytes and neurovascular function in the healthy and diseased brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 282. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00282>
- Chaigneau, E., Oheim, M., Audinat, E., & Charpak, S. (2003). Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), 13081–13086. <https://doi.org/10.1073/pnas.2133652100>
- Chuquet, J., Quilichini, P., Nimchinsky, E. A., & Buzsaki, G. (2010). Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. *The Journal of Neuroscience*, 30(45), 15298–15303. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0762-10.2010>
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 468(7323), 562–566. <https://doi.org/10.1038/nature09513>
- Dickinson, P. J., Griffiths, I. R., Barrie, J. M., Kyriakides, E., Pollock, G. F., & Barnett, S. C. (1997). Expression of the dm-20 isoform of the plp gene in olfactory nerve ensheathing cells: Evidence from developmental studies. *Journal of Neurocytology*, 26(3), 181–189. <https://doi.org/10.1023/a:1018584013739>
- 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. *The FASEB Journal*, 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/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>
- Doucette, R. (1990). Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia*, 3(6), 433–449. <https://doi.org/10.1002/glia.440030602>
- Doucette, R. (1991). PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve. *The Journal of Comparative Neurology*, 312(3), 451–466. <https://doi.org/10.1002/cne.903120311>
- Escartin, C., & Rouach, N. (2013). Astroglial networking contributes to neuro-metabolic coupling. *Frontiers in Neuroenergetics*, 5, 4. <https://doi.org/10.3389/fnene.2013.00004>
- Filosa, J. A., Bonev, A. D., & Nelson, M. T. (2004). Calcium dynamics in cortical astrocytes and arterioles during neurovascular coupling. *Circulation Research*, 95(10), e73–e81. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000148636.60732.2e>
- Gerhardt, H., & Betsholtz, C. (2003). Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and Tissue Research*, 314(1), 15–23. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0745-x>
- Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., & Rouach, N. (2010). Astroglial networks: A step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(2), 87–99. <https://doi.org/10.1038/nrn2757>
- Gordon, G. R., Mulligan, S. J., & MacVicar, B. A. (2007). Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia*, 55(12), 1214–1221. <https://doi.org/10.1002/glia.20543>
- Halasz, N., Ljungdahl, A., & Hokfelt, T. (1979). Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb III. Autoradiographic localization of [3H] GABA. *Brain Research*, 167(2), 221–240.
- Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. A., ... Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, 508(7494), 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature13165>
- Hamilton, N. B., Attwell, D., & Hall, C. N. (2010). Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: A component of neurovascular coupling in health and disease. *Frontiers in Neuroenergetics*, 2, 5. <https://doi.org/10.3389/fnene.2010.00005>
- Harris, J. J., Jolivet, R., & Attwell, D. (2012). Synaptic energy use and supply. *Neuron*, 75(5), 762–777. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.019>
- Hellstroem, M., Kalen, M., Lindahl, P., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 126(14), 3047–3055.
- Herrera, L. P., Casas, C. E., Bates, M. L., & Guest, J. D. (2005). Ultrastructural study of the primary olfactory pathway in *Macaca fascicularis*. *The Journal of Comparative Neurology*, 488(4), 427–441. <https://doi.org/10.1002/cne.20588>
- Hill, R. A., Tong, L., Yuan, P., Murikinati, S., Gupta, S., & Grutzendler, J. (2015). Regional blood flow in the Normal and ischemic brain is controlled by arteriolar smooth muscle cell contractility and not by capillary pericytes. *Neuron*, 87(1), 95–110. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.001>
- Hirrlinger, P. G., Scheller, A., Braun, C., Quintela-Schneider, M., Fuss, B., Hirrlinger, J., & Kirchoff, F. (2005). Expression of reef coral fluorescent proteins in the central nervous system of transgenic mice. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 30(3), 291–303. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.08.011>
- Hirschi, K. K., & D'Amore, P. A. (1996). Pericytes in the microvasculature. *Cardiovascular Research*, 32(4), 687–698.

- Honore, A., Le Corre, S., Derambure, C., Normand, R., Duclos, C., Boyer, O., ... Guerout, N. (2012). Isolation, characterization, and genetic profiling of subpopulations of olfactory ensheathing cells from the olfactory bulb. *Glia*, 60(3), 404–413. <https://doi.org/10.1002/glia.22274>
- Jakoby, P., Schmidt, E., Ruminot, I., Gutierrez, R., Barros, L. F., & Deitmer, J. W. (2014). Higher transport and metabolism of glucose in astrocytes compared with neurons: A multiphoton study of hippocampal and cerebellar tissue slices. *Cerebral Cortex*, 24(1), 222–231. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs309>
- Joost, E., Jordao, M. J. C., Mages, B., Prinz, M., Bechmann, I., & Krueger, M. (2019). Microglia contribute to the glia limitans around arteries, capillaries and veins under physiological conditions, in a model of neuroinflammation and in human brain tissue. *Brain Structure & Function*, 224(3), 1301–1314. <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01834-8>
- Kanda, T. (2013). Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 84(2), 208–212. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-302312>
- Lai, C. H., & Kuo, K. H. (2005). The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 50(2), 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.07.004>
- Leone, D. P., Genoud, S., Atanasoski, S., Grausenburger, R., Berger, P., Metzger, D., ... Suter, U. (2003). Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 22(4), 430–440.
- Leybaert, L. (2005). Neurobarrier coupling in the brain: A partner of neurovascular and neurometabolic coupling? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25(1), 2–16. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600001>
- Lindahl, P., Karlsson, L., Hellstrom, M., Gebre-Medhin, S., Willetts, K., Heath, J. K., & Betsholtz, C. (1997). Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development. *Development*, 124(20), 3943–3953.
- Lohr, C., Grosche, A., Reichenbach, A., & Hirnet, D. (2014). Purinergic neuron-glia interactions in sensory systems. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 466(10), 1859–1872. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1510-6>
- Longden, T. A., Dabertrand, F., Koide, M., Gonzales, A. L., Tykocki, N. R., Brayden, J. E., ... Nelson, M. T. (2017). Capillary K(+) sensing initiates retrograde hyperpolarization to increase local cerebral blood flow. *Nature Neuroscience*, 20(5), 717–726. <https://doi.org/10.1038/nn.4533>
- Longden, T. A., Hill-Eubanks, D. C., & Nelson, M. T. (2016). Ion channel networks in the control of cerebral blood flow. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(3), 492–512. <https://doi.org/10.1177/0271678X15616138>
- Longden, T. A., & Nelson, M. T. (2015). Vascular inward rectifier K⁺ channels as external K⁺ sensors in the control of cerebral blood flow. *Microcirculation*, 22(3), 183–196. <https://doi.org/10.1111/micc.12190>
- MacKenzie, M. L., Ghabriel, M. N., & Allt, G. (1987). The blood-nerve barrier: An in vivo lanthanum tracer study. *Journal of Anatomy*, 154, 27–37.
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., ... Zeng, H. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature Neuroscience*, 13(1), 133–140. <https://doi.org/10.1038/nn.2467>
- Mulligan, S. J., & MacVicar, B. A. (2004). Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature*, 431(7005), 195–199. <https://doi.org/10.1038/nature02827>
- Nazareth, L., Chen, M., Shelper, T., Shah, M., Tello Velasquez, J., Walkden, H., ... Ekberg, J. A. K. (2019). Novel insights into the glia limitans of the olfactory nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 527(7), 1228–1244. <https://doi.org/10.1002/cne.24618>
- Nico, B., Frigeri, A., Nicchia, G. P., Quondamatteo, F., Herken, R., Errede, M., ... Roncali, L. (2001). Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 7), 1297–1307.
- Nielsen, S., Nagelhus, E. A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., & Ottersen, O. P. (1997). Specialized membrane domains for water transport in glial cells: High-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *The Journal of Neuroscience*, 17(1), 171–180.
- Nunez-Parra, A., Cortes-Campos, C., Bacigalupo, J., Garcia Mde, L., Nualart, F., & Reyes, J. G. (2011). Expression and distribution of facilitative glucose (GLUTs) and monocarboxylate/H⁺ (MCTs) transporters in rat olfactory epithelia. *Chemical Senses*, 36(9), 771–780. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjr052>
- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A. K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., & Magistretti, P. J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: An update. *Glia*, 55(12), 1251–1262. <https://doi.org/10.1002/glia.20528>
- 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>
- Piantanida, A. P., Acosta, L. E., Brocardo, L., Capurro, C., Greer, C. A., & Rela, L. (2019). Selective Cre-mediated gene deletion identifies connexin 43 as the main connexin channel supporting olfactory ensheathing cell networks. *The Journal of Comparative Neurology*, 527(7), 1278–1289. <https://doi.org/10.1002/cne.24628>
- Raponi, E., Agenes, F., Delphin, C., Assard, N., Baudier, J., Legraverend, C., & Deloulme, J. C. (2007). S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia*, 55(2), 165–177. <https://doi.org/10.1002/glia.20445>
- Rash, J. E., & Yasumura, T. (1999). Direct immunogold labeling of connexins and aquaporin-4 in freeze-fracture replicas of liver, brain, and spinal cord: Factors limiting quantitative analysis. *Cell and Tissue Research*, 296(2), 307–321.
- Rela, L., Bordey, A., & Greer, C. A. (2010). Olfactory ensheathing cell membrane properties are shaped by connectivity. *Glia*, 58(6), 665–678. <https://doi.org/10.1002/glia.20953>
- Rela, L., Piantanida, A. P., Bordey, A., & Greer, C. A. (2015). Voltage-dependent K⁺ currents contribute to heterogeneity of olfactory ensheathing cells. *Glia*, 63(9), 1646–1659. <https://doi.org/10.1002/glia.22834>
- Rieger, A., Deitmer, J. W., & Lohr, C. (2007). Axon-glia communication evokes calcium signaling in olfactory ensheathing cells of the developing olfactory bulb. *Glia*, 55(4), 352–359. <https://doi.org/10.1002/glia.20460>
- Rotermund, N., Schulz, K., Hirnet, D., & Lohr, C. (2019). Purinergic signaling in the vertebrate olfactory system. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 112. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00112>
- Rungta, R. L., Chaigneau, E., Osmanski, B.-F., & Charpak, S. J. N. (2018). Vascular compartmentalization of functional hyperemia from the synapse to the pia. *99(2)*, 362–375. e364.
- Sharp, F. R., Kauer, J. S., & Shepherd, G. M. (1977). Laminar analysis of 2-deoxyglucose uptake in olfactory bulb and olfactory cortex of rabbit and rat. *Journal of Neurophysiology*, 40(4), 800–813. <https://doi.org/10.1152/jn.1977.40.4.800>
- Shepherd, G. M. (2003). The single capillary and the active brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), 12535–12536. <https://doi.org/10.1073/pnas.2336089100>
- Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q. S., & Nedergaard, M. (2003). Signaling at the gliovascular interface. *The Journal of Neuroscience*, 23(27), 9254–9262.

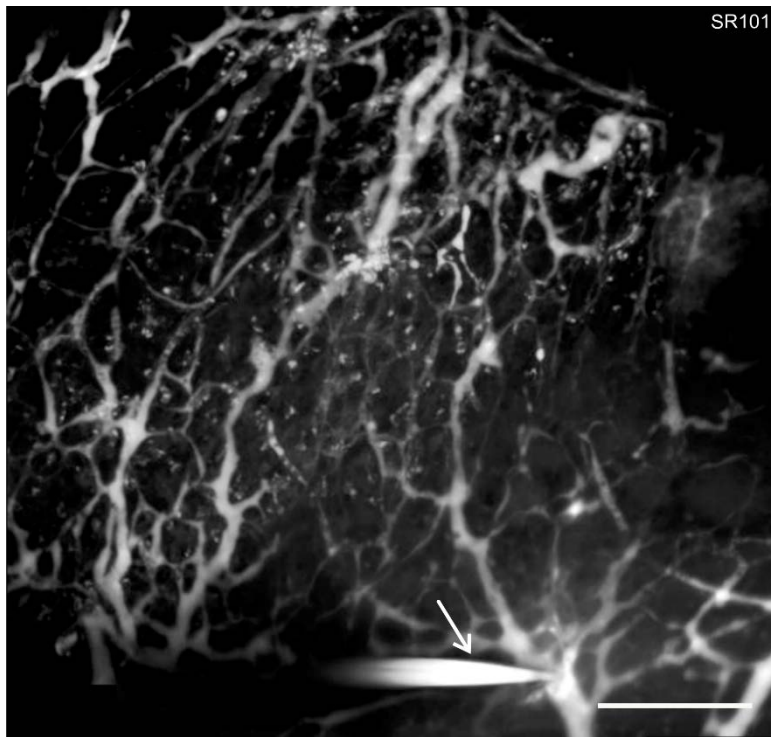
- Simpson, I. A., Carruthers, A., & Vannucci, S. (2007). Supply and demand in cerebral energy metabolism: The role of nutrient transporters. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(11), 1766–1791.
- Smith, G. M., Falone, A. E., & Frank, E. (2012). Sensory axon regeneration: Rebuilding functional connections in the spinal cord. *Trends in Neurosciences*, 35(3), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.10.006>
- Smits, A., Kato, M., Westermark, B., Nister, M., Heldin, C. H., & Funa, K. (1991). Neurotrophic activity of platelet-derived growth factor (PDGF): Rat neuronal cells possess functional PDGF beta-type receptors and respond to PDGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(18), 8159–8163. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.18.8159>
- 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>
- Stavermann, M., Meuth, P., Doengi, M., Thyssen, A., Deitmer, J. W., & Lohr, C. (2015). Calcium-induced calcium release and gap junctions mediate large-scale calcium waves in olfactory ensheathing cells in situ. *Cell Calcium*, 58(2), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.05.003>
- Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K., & Konnerth, A. (2003). In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), 7319–7324. <https://doi.org/10.1073/pnas.1232232100>
- Takano, T., Tian, G. F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., & Nedergaard, M. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature Neuroscience*, 9(2), 260–267. <https://doi.org/10.1038/nn1623>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), 15258–15263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003501107>
- Thyssen, A., Stavermann, M., Buddrus, K., Doengi, M., Ekberg, J. A., St John, J. A., ... Lohr, C. (2013). Spatial and developmental heterogeneity of calcium signaling in olfactory ensheathing cells. *Glia*, 61(3), 327–337. <https://doi.org/10.1002/glia.22434>
- Vanlandewijck, M., & Betsholtz, C. (2018). Single-cell mRNA sequencing of the mouse brain vasculature. *Methods in Molecular Biology*, 1846, 309–324. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8712-2_21
- Windus, L. C., Lineburg, K. E., Scott, S. E., Claxton, C., Mackay-Sim, A., Key, B., & St John, J. A. (2010). Lamellipodia mediate the heterogeneity of central olfactory ensheathing cell interactions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(10), 1735–1750. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0280-3>
- Winkler, E. A., Bell, R. D., & Zlokovic, B. V. (2010). Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling. *Molecular Neurodegeneration*, 5, 32. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-32>
- Winkler, E. A., Birk, H., Burkhardt, J. K., Chen, X., Yue, J. K., Guo, D., ... Lawton, M. T. (2018). Reductions in brain pericytes are associated with arteriovenous malformation vascular instability. *Journal of Neurosurgery*, 129(6), 1464–1474. <https://doi.org/10.3171/2017.6.JNS17860>
- Wolburg, H., & Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation. *Vascular Pharmacology*, 38(6), 323–337.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Fallier-Becker, P., Noell, S., & Mack, A. F. (2011). Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 287, 1–41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386043-9.00001-3>
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Sam, H., Horvat, S., Deli, M. A., & Mack, A. F. (2008). Epithelial and endothelial barriers in the olfactory region of the nasal cavity of the rat. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(1), 127–140. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0410-2>
- Zhao, Z., Nelson, A. R., Betsholtz, C., & Zlokovic, B. V. (2015). Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier. *Cell*, 163(5), 1064–1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.067>
- Zonta, M., Angulo, M. C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K. A., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature Neuroscience*, 6(1), 43–50. <https://doi.org/10.1038/nn980>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

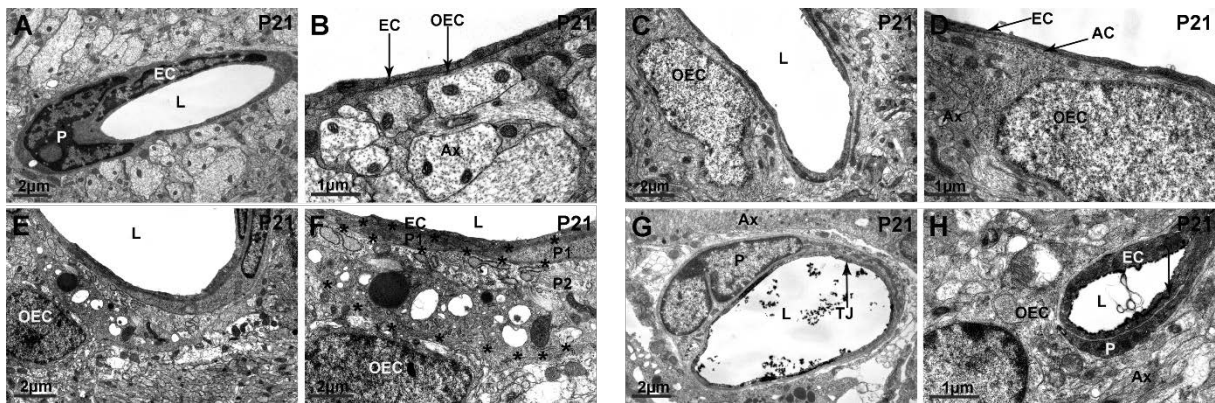
How to cite this article: Beiersdorfer A, Wolburg H, Grawe J, Scheller A, Kirchhoff F, Lohr C. Sublamina-specific organization of the blood brain barrier in the mouse olfactory nerve layer. *Glia*. 2019;1–15. <https://doi.org/10.1002/glia.23744>

Supporting information



Suppl. Fig. 1 Blood vessels in olfactory bulb *in-toto* preparation pressure-injected with sulforhodamin 101 (SR101). The injection pipette is visible at the bottom of the image (arrow).

Scale bar: 100 μm .



Suppl. Fig. 2 Electron microscopical analysis of the olfactory bulb of the mouse at postnatal day 21 (P21). In principle, there is no difference to the situation observed at postnatal day 9 concerning the cellular equipment or the blood-brain barrier tightness. **(A)** Capillary profile in the outer ONL consisting of an endothelial cell (EC) and a pericyte (P). L, vessel lumen. Scale bar: 2 μm . **(B)** Detail of A, showing an extremely thin layer of cytoplasm between the endothelial cells and the nerve fiber profiles (axons; Ax). This thin cytoplasm belongs to an OEC whose cell body was not encountered in this section plane. Note that the subendothelial basal lamina can rarely be seen. Scale bar: 1 μm . **(C)** Perivascular aspect of the ONL of the olfactory bulb Scale bar: 2 μm . The OEC seems to contact the blood vessel (lumen L); however, as shown in **(D)** at higher magnification, there is another cell process in between the OEC as shown in C and the endothelium (EC), presumably an astrocyte endfoot (AC). Scale bar: 1 μm . Probably, both AC and OEC ensheath the blood vessel. At the neuronal pole, the AC and OEC have contact with the axonal fiber bundles without forming a basal lamina. This is important for ruling out that these cells are pericytes. **(E)** An OEC is approaching a blood vessel (L). Scale bar: 2 μm . **(F)** Detail of E. At higher magnification, a pericyte (P1) lies directly beneath the endothelial cell (EC) surrounded by a basal lamina (chain of asterisks in the upper part of the picture). The cell which lies beyond the pericyte basal lamina directed away from the vessel is not a neuron and not an

OEC, because we find another basal lamina (chain of asterisks in the middle of the picture). Therefore, this cell has to be identified as a second pericyte (P2). Scale bar: 2 μm . **(G)** Lanthanum-labeled blood vessel (lumen L) at the outer surface of the olfactory bulb in direct neighborhood to the border of the axon bundles (Ax). The tight junctions (TJs) are really tight by protecting the perivascular space from diffusion of the tracer from the vessel lumen. Scale bar: 2 μm . **(H)** Lanthanum-labelled blood vessel (lumen L) in the ONL of the olfactory bulb in direct neighborhood to a pericyte and an OEC. The arrow points to the tight junction avoiding the diffusion of the tracer into the subendothelial space. Scale bar: 1 μm .

Suppl. movie 1

DHPG-induced Ca^{2+} signaling in OECs in the outer ONL and subsequent local vasoconstriction.

Suppl. movie 2

Spontaneous Ca^{2+} wave in OECs in the inner ONL does not induce vasoresponses.

5. Diskussion

Gliazellen sind eine sehr heterogene Zellpopulation im murinen Nervensystem und erfüllen unterschiedlichste Funktionen sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen. Olfaktorische Hüllgliazellen begünstigen adulte Axogenese und Integration in das bestehende bulbäre Netzwerk, was durch komplexe Interaktionsmechanismen mit unterschiedlichen Zellpopulationen ermöglicht wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen ORN-Axonon und OECs (Kapitel 1), OECs und juxtglomerulären Astrozyten (Kapitel 2), sowie zwischen OECs und dem lokalen Blutgefäßssystem untersucht (Kapitel 3). Es konnte gezeigt werden, dass die elektrische Stimulation der ORN-Axone und die resultierende extrasynaptische Freisetzung von Glutamat und ATP, neben metabotropen Signalkaskaden, AMPA-Rezeptor-vermittelte Ca^{2+} -Transienten in OECs initiiert (Kapitel 1). Darüber hinaus sind OECs und juxtglomeruläre Astrozyten in panglialen *gap junction*-gekoppelten Netzwerken organisiert, welche den Austausch des Signalmoleküls Ca^{2+} zwischen den unterschiedlichen Gliazellpopulationen möglich macht (Kapitel 2). Pangliale sowie initiale Ca^{2+} -Transienten in OECs vermitteln darüber hinaus die Konstriktion von Blutgefäßen im äußeren ONL (Kapitel 2,3).

5.1 Endogene Glutamat-Freisetzung induziert AMPA-Rezeptor vermittelte Ca^{2+} -Transienten in OECs

Die Freisetzung von Glutamat an den ORN-Axonterminalen induziert AMPA- und mGluR_5 -vermittelte Ca^{2+} -Transienten in juxtglomerulären Astrozyten (Berkowicz *et al.*, 1994; Otsu *et al.*, 2015; Droste *et al.*, 2017). Immunocytochemische Studien deuten allerdings nicht nur auf eine Immunoreaktivität auf Glutamat im GL an den Axonterminalen hin, sondern ebenfalls in der ONL, was für eine zusätzliche Freisetzung von Glutamat entlang der Axone spricht (Sassoè-Pognetto *et al.*, 1993; Yoo *et al.*, 2006). *In-situ* Studien an akuten OB Schnitten bestätigen die extrasynaptische vesikuläre Freisetzung von Glutamat und dem Ko-Transmitter ATP entlang der ORN-Axone (Thyssen *et al.*, 2010; Lohr *et al.*, 2011) und dass diese Ca^{2+} -Transienten in axon-assoziierten OECs induziert. Purinerge P2Y_1 -Rezeptoren sowie glutamaterge mGluR_1 -

Rezeptoren vermitteln dabei die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern über eine Gq-abhängige Signalkaskade in neonatalen Mäusen (p00-p08) (Rieger *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit (Kapitel 1) wurde die glutamaterge Axon-OEC-Interaktion an juvenilen Mäusen (p18-p22) untersucht. Die Ergebnisse aus Kapitel 1 zeigen, dass neben metabotropen Signalkaskaden und der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern ebenfalls AMPA-Rezeptor-vermittelte Ca^{2+} -Transienten zur Axon-OEC-Interaktion in juvenilen Mäusen beitragen. AMPA-Rezeptoren sind Heteromere, welche aus unterschiedlichen Kompositionen der vier möglichen Untereinheiten (GluA1-GluA4) bestehen (Steinhäuser und Gallo, 1996). Die Komposition der Untereinheiten bestimmt dabei maßgeblich die Ionen-Leitfähigkeit des Kanals (Hollmann *et al.*, 1991). So begünstigt das Fehlen der GluA2-Untereinheit die Kanal-Permeabilität für Ca^{2+} . Die hier durchgeführte immunhistochemische Untersuchung der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in der ONL zeigt die Lokalisation der Untereinheiten GluA1 und GluA2 in OECs, was den Ergebnissen von Montague und Greer entspricht (Montague und Greer, 1999) (Kapitel 1, Fig.1). Zusätzlich konnten diese die GluA4 Untereinheit an Ausläufern axon-assoziiierter Gliazellen detektieren (Montague und Greer, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde zwar keine Ko-Lokalisation zwischen der GluA4-Untereinheit und OEC-Somata gefunden, allerdings befanden sich GluA4-positive Strukturen in unmittelbarer Nähe von tdT-exprimierenden OECs in der PLP-Cre^{ERT2}tdT-Mauslinie. Folglich könnte die GluA4-Untereinheit ebenfalls an den Ausläufern der OECs vorhanden sein. Untersuchungen der mRNA-Expression der AMPA-Rezeptor Untereinheiten im OB zeigen, dass die GluA1- und GluA2-Untereinheiten am stärksten exprimiert sind, wobei die GluA3 Untereinheit nur schwach exprimiert ist, sodass diese in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurde (Horning *et al.*, 2004). Neben der immunhistochemischen Charakterisierung konnten anhand elektrophysiologischer Ableitungen AMPA-Rezeptor-vermittelte Einströme in OECs analysiert werden. Um AMPA-Rezeptor-vermittelte Effekte in OECs bestmöglich zu isolieren, und neuronalen Einfluss weitestgehend zu unterbinden, wurden alle Experimente (mit Ausnahme der Stimulationsexperimente der ORN-Axone) unter Inhibition spannungsgesteuerter Na^+ -Kanäle mit Tetrodotoxin (TTX) durchgeführt. Darüber hinaus wurde interzelluläre Kommunikation innerhalb glialer Netzwerke durch die Inhibition von *gap junctions* mittels Carbenoxolon (CBX) unterbunden. AMPA-Rezeptor-vermittelte Einströme konnten durch einen selektiven

Antagonisten für Ca^{2+} -permeable AMPA-Rezeptoren reduziert werden. Die Ergebnisse aus Kapitel 1 zeigen demnach die Funktionalität von AMPA-Rezeptoren in OECs und deuten auf eine Ca^{2+} -Leitfähigkeit des Kanals hin (Kapitel 1, Fig. 2). Die Zusammensetzung der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten und entsprechender AMPA-Rezeptor-vermittelter Ströme in anderen Gliazellpopulationen, wie z.B. Astrozyten, sind sehr divers und u.a. abhängig vom Hirnareal. Bergmann-Gliazellen sind wohl die prominentesten Vertreter von Gliazellen mit Ca^{2+} -permeablen AMPA-Rezeptoren und zeigen robuste AMPA-Rezeptor-vermittelte einwärtsrektifizierende Ströme (Burnashev *et al.*, 1992; Muller *et al.*, 1992). Folglich ist im Cerebellum die mRNA-Expression der GluA2-Untereinheit in Astrozyten/Bergmann-Gliazellen signifikant geringer als die der Untereinheiten GluA1 und GluA4, welche deutlich durch immunhistologische Färbungen nachweisbar sind (Saab *et al.*, 2012; Mölders *et al.*, 2018). Astrozyten des Hippocampus und des Neocortex zeigen hingegen keine bzw. geringe AMPA-Rezeptor-vermittelten Ströme und eine sehr geringe mRNA-Expression der Untereinheiten GluA1 und GluA4 (Matthias *et al.*, 2003; Lalo *et al.*, 2006). In beiden Arealen ist die GluA2-Untereinheit in Astrozyten dominant (Mölders *et al.*, 2018). In Astrozyten des *Bulbus olfactorius* wiederum konnten immunhistochemisch die Untereinheiten GluA1 und GluA4, sowie geringe Mengen von GluA2 nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten neben AMPA-Rezeptor-vermittelten Einstromen auch AMPA-Rezeptor-vermittelte Ca^{2+} -Transienten analysiert werden, welche ausschließlich auf dem Einstrom extrazellulären Ca^{2+} über Ca^{2+} -permeable AMPA-Rezeptoren basieren (Droste *et al.*, 2017). Im Gegensatz dazu sind AMPA-Rezeptor-vermittelte Ca^{2+} -Transienten in OECs zwar initial abhängig von extrazellulärem Ca^{2+} , da der Entzug von extrazellulärem Ca^{2+} diese Signale vollständig unterdrückte, allerdings führte das Leeren intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Ca^{2+} -Signale. Dies spricht für eine Beteiligung intrazellulärer Speicher an AMPA-Rezeptor-vermittelten Ca^{2+} -Transienten in OECs (Kapitel 1, Fig. 3). Zwar ist bekannt, dass die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren zur Aktivierung von G_i -Proteinen in kortikalen Neuronen führt und eine intrazelluläre Signalkaskade initiiert, diese ist allerdings unabhängig von dem Na^+ oder Ca^{2+} -Einstrom durch den Rezeptorkanal (Wang *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit könnte das AMPA-Rezeptor-vermittelte Ca^{2+} -Signal in OECs demnach durch einen direkten Ca^{2+} -Einstrom durch den Rezeptorkanal initiiert und über einen

zellulären Mechanismus, der zur Verstärkung eines bestehenden Ca^{2+} -Signals beiträgt, dem *Ca²⁺-induced Ca²⁺release* (CICR), amplifiziert werden. Alternativ könnte ebenfalls die Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration, durch einen AMPA-Rezeptor-vermittelten Na^+ -Einstrom, in OECs genügen, um den Aktivitätsmodus des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) zu modulieren. Im sogenannten *reverse mode* kehrt sich die Transportrichtung des NCX um, sodass Na^+ hinaus und Ca^{2+} hinein transportiert wird, was schließlich zu dem gemessenen Ca^{2+} -Anstieg führen könnte (Blaustein und Lederer, 1999). Ein geringer Ca^{2+} -Anstieg könnte dabei reichen, um CICR zu initiieren und zu einem großen Ca^{2+} -Signal zu führen. Vergleichbares konnte bereits in Astrozyten des Neocortex gezeigt werden. Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren initiierte einen Na^+ -Einstrom und den Transport von Ca^{2+} über den reversen NCX ins Zytosol (Ziemens *et al.*, 2019). Auch Astrozyten des *Bulbus olfactorius* zeigen reverse NCX-initiierte Ca^{2+} -Transienten in Folge der Aktivierung von Na^+ -abhängigen GABA-Transportern und die Amplifizierung des Ca^{2+} -Signals über CICR (Doengi *et al.*, 2009). In beiden Fällen führt der Anstieg von intrazellulären Ca^{2+} oder IP_3 zur Aktivierung von IP_3 -Rezeptoren (IP_3 -R) und/oder Ryanodin-Rezeptoren (Ry-R), welche die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern initiieren (CICR). Experimente an OEC-Kulturen zeigen in OECs zwar IP_3 -R aber keine Ry-R (Hayat *et al.*, 2003; Stavermann *et al.*, 2012). Dennoch konnten Stavermann *et al.* zeigen, dass OECs der inneren ONL CICR-abhängige Ca^{2+} -Wellen generieren, wobei ein geringer Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} ausreicht, um CICR über IP_3 -R zu initiieren. Weder Ry-R noch ein Anstieg intrazellulären IP_3 sind hierbei von Nöten (Stavermann *et al.*, 2015).

Die dargestellten Ergebnisse sowie die Erkenntnisse anderer Studien lassen den Schluss zu, dass OECs AMPA-Rezeptoren mit unterschiedlichen Untereinheiten exprimieren, von denen einige eine erhöhte Permeabilität für Ca^{2+} aufweisen. Die Aktivierung dieser Ca^{2+} -permeablen AMPA-Rezeptoren könnte einen direkten Ca^{2+} -Einstrom durch den Kanal initiieren, was die Amplifizierung des Ca^{2+} -Transienten in OECs über CICR zur Folge hat. Andere mögliche Signalwege zur Entstehung des AMPA-Rezeptor-vermittelten Ca^{2+} -Signals können basierend auf den dargestellten Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass neuronale Aktivität der ORNs, neben metabotropen Signalkaskaden, auch AMPA-Rezeptor-vermittelte Ca^{2+} -Transienten in OECs induziert und somit AMPA-Rezeptoren eine entscheidene Rolle in der Kommunikation zwischen ORN-Axonen und OECs zu spielen

scheinen (Kapitel 1, Fig.4). Die elektrische Stimulation von Axonen im *Corpus Callosum* resultierte ebenfalls in der extrasynaptischen Freisetzung von Glutamat und einem folgenden AMPA-Rezeptor vermittelten Einstrom in *oligodendrocyte precursor cells* (OPCs). Es handelte sich dabei allerdings ausschließlich um Ca^{2+} -impermeable AMPA-Rezeptoren, da die stimulations-induzierten Einströme nicht sensitiv für Inhibitoren Ca^{2+} -permeabler AMPA-Rezeptoren waren (Kukley *et al.*, 2007; Ziskin *et al.*, 2007). Welche Rolle Glutamat-induzierte Ca^{2+} -Transienten in OECs bei der Interaktion mit ORN-Axonen spielen ist nicht genauer beschrieben. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass die Inhibition von Ca^{2+} -Signalen in OECs, mithilfe des Ca^{2+} -Chelators BAPTA, in einer Ko-Kultur von Retinalganglienzellen und OECs die OEC-abhängige Steigerung des Neuritenwachstums verringerte und Ca^{2+} als Signalmolekül in OECs eine entscheidende Rolle in der Förderung des Axonwachstums einnimmt (Hayat *et al.*, 2003). Von daher ist es denkbar, dass Glutamat-induzierte Ca^{2+} -Signale die Ca^{2+} -abhängige Transkription unterschiedlicher Faktoren induzieren und so zu den wachstumsfördernden Eigenschaften von OECs beitragen. Hinweise auf einen solchen Mechanismus liefern Arbeiten an anderen Gliazellen: So initiiert die Applikation von Glutamat und Glutamatrezeptoragonisten die Expression von *immediate early genes*, wie *fos* und *jun*, in astroglialen Kulturen (Condorelli *et al.*, 1993). Die Ca^{2+} -abhängige Transkription kann dabei über ionotrope und metabotrope Signalkaskaden erfolgen (Gallo und Ghiani, 2000). Vergleichbares konnte bereits in einer *in-situ* Studie im Sehnerv gezeigt werden. Sowohl die elektrische Stimulation der Axone des Sehnervs als auch die Applikation von Glutamat initiierte die Ca^{2+} -abhängigen Expression von *c-fos*, *jun* sowie dem Nervenwachstumsfaktor-induzierten Faktor A (NGFI-A) in Astrozyten (Mack *et al.*, 1994). OECs exprimieren eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, u.a BDNF, und Zelladhäsionsmolekülen, welche Axogenese fördern und die Integration in das bestehende Netzwerk gewährleisten (Key *et al.*, 1996; Crandall *et al.*, 2000; Woodhall *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2015). Die Ca^{2+} -abhängigen Signalwege zur Regulation der BDNF-Transkription sind vor allem in Neuronen gut verstanden: Der Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element-binding protein*) ist hier im inaktiven Zustand an den BDNF-Promotor gebunden. Kommt es zur Membrandepolarisation und einem entsprechenden Ca^{2+} -Einstrom, werden Ca^{2+} -regulierte Kinasen aktiviert, welche CREB phosphorylieren und so die Transkription von BDNF einleiten (Shieh *et al.*, 1998; West *et al.*, 2001). In Neuronen wird der entscheidende Ca^{2+} -Einstrom zur Initiation der oben genannten Signalkaskade maßgeblich von

spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen vom L-Typ vermittelt und nicht über einen Ca^{2+} -Einstrom über den NMDA-Rezeptor (Ghosh *et al.*, 1994). Wie Zafra *et al.* zeigen, initiiert auch die Aktivierung von AMPA/Kainat-Rezeptoren in neuronalen hippocampalen Kulturen erhöhte BDNF- und NGF- mRNA-Konzentrationen, welche ebenfalls maßgeblich von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen abhängen (Zafra *et al.*, 1990). Sowohl Studien in OEC-Kultur als auch in akuten OB-Schnitten zeigen jedoch, dass OECs keine spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle exprimieren (Hayat *et al.*, 2003; Thyssen *et al.*, 2010), was auf einen abweichenden Signalweg hinweist. Dieser könnte beispielsweise auf der Amplifizierung des initialen AMPA-Rezeptor-vermittelten Ca^{2+} -Signal über CICR basieren. Es ist also denkbar, dass in OECs AMPA-Rezeptor-vermittelte Ca^{2+} -Transienten maßgeblich zur Transkription unterschiedlicher Faktoren beitragen, welche die speziellen regenerativen Eigenschaften dieser Zellpopulation begünstigen.

Neben der möglichen Modulation intrazellulärer Prozesse, wie Transkription oder Translation, spielen glutamaterge Ca^{2+} -Transienten in OECs eine entscheidende Rolle in der interzellulären Kommunikation, sowohl mit Astrozyten (Kapitel 2) als auch mit naheliegenden Blutgefäßen (Kapitel 3). Im folgenden wird die Organisation und physiologische Relevanz panglialer Netzwerke (5.2-5.4) sowie die Interaktion mit dem Blutgefäßsystem (5.5-5.6) diskutiert.

5.2 OECs und Astrozyten sind in panglialen Netzwerken organisiert

Pangliale Netzwerke, bestehend aus Astrozyten und Oligodendrozyten, konnten bereits im Hippocampus, Thalamus, Neocortex sowie dem *Corpus Callosum* beschrieben werden (Griemsmann *et al.*, 2015; Claus *et al.*, 2018; Meyer *et al.*, 2018). Dabei wurden Astrozyten über die Expression unterschiedlicher Reporterproteine identifiziert und elektrophysiologisch abgeleitet. Die Intrazellulärlösung der Ableitpipette war zusätzlich mit einem *tracer* versehen, welcher *gap junction*-permeabel ist und sich im glialen Netzwerk verteilt. Diese sogenannten *tracer*- oder *dye coupling*-Experimente ermöglichen die Analyse der Organisation und Größe glialer Netzwerke. Sowohl OECs als auch juxtglomeruläre Astrozyten sind innerhalb ihrer jeweiligen Population in *gap junction*-gekoppelten Netzwerken organisiert. Dabei weisen OECs vornehmlich im inneren ONL eine erhöhte interzelluläre Konnektivität auf, wohingegen

Astrozyten ein astrozytäres Netzwerk jeweils begrenzt auf einen Glomerulus bilden (Rela *et al.*, 2010; Roux *et al.*, 2011; Stavermann *et al.*, 2015).

In der vorliegenden Arbeit sollten interzelluläre Kommunikationsmechanismen zwischen OECs und Astrozyten untersucht und die Möglichkeit panglialer OEC-AC-Netzwerke überprüft werden. Zur genaueren Untersuchung der glialen Netzwerke im OB wurden *dye coupling*-Experimente im ONL und GL durchgeführt (Kapitel 2, Fig.2). Dafür wurden zum einen die Mauslinie PLP-Cre^{ERT2} x tdT und zum anderen die Mauslinie GLAST-Cre^{ERT2} x tdT verwendet. Bei ersterer kontrolliert der Promotor des Proteolipidproteins (*plp*) die Expression der Cre-Rekombinase, welche wiederum nach dem Cre-loxP-Prinzip die Expression des Reporterproteins, tdTomato (tdT) initiiert. Neben Oligodendrozyten und Schwann-Zellen exprimieren OECs die PLP-Spleißvariante, DM20, sodass OECs spezifisch über die Reporterexpression und ihre Lage im ONL identifiziert werden konnten (Griffiths *et al.*, 1995; Dickinson *et al.*, 1997). Piantanida *et al.* zeigten, dass es sich bei der PLP-Cre^{ERT2}-Linie um eine hocheffiziente Treiber-Linie handelt, bei der mehr als 90% der OECs im ONL das Reporterprotein tdT exprimieren (Piantanida *et al.*, 2019). Das Beladen eines OECs mit einem *tracer* resultierte in der vorliegenden Arbeit in einer durchschnittlichen Gesamtnetzwerkgröße von ungefähr 20 Zellen, von denen 43% OECs und 24% Astrozyten darstellten (Kapitel 2, Fig. 2G). Zur Identifikation von Astrozyten wurde der universelle astrozytäre Marker *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) verwendet (Eng, 1985). 33% der Zellen des Netzwerks konnte hingegen nicht weiter klassifiziert werden, da sie weder GFAP- noch tdT-positiv waren. Da bei der Mauslinie PLP-Cre^{ERT2} x tdT über 90% der OECs im ONL von der Rekombination mittels Cre betroffen sind, ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei allen nicht zu identifizierenden Zellen um OECs handelt (Piantanida *et al.*, 2019). Im GL ist die höchste Dichte an GFAP-positiven Astrozyten im gesamten OB vorhanden (Bailey und Shipley, 1993). Allerdings könnten dennoch GFAP-negative Astrozyten, wie sie z.B. im Hippocampus vorkommen (Walz und Lang, 1998), Bestandteil des panglialen OEC-AC-Netzwerks sein, was in der Analyse der zellulären Bestandteile ohne Hinzuziehen weiterer Markerproteine jedoch nicht berücksichtigt werden konnte. Darüber hinaus ist es möglich, dass andere Zellpopulationen Teil des panglialen Netzwerks im OB sind. Im *Corpus Callosum* konnte gezeigt werden, dass neben Astrozyten und Oligodendrozyten auch *oligodendrocyte precursor cells* (OPCs) Teil panglialer Netzwerke sein

können (Maglione *et al.*, 2010). OPCs sind auch in der Glomerularschicht des OB lokalisiert (Rungta *et al.*, 2018). Obwohl OPCs der Oligodendrozytenlinie entstammen und folglich PLP-Promotor-abhängige Cre-Aktivität zeigen müssten, ist eine Subpopulationen von OPCs beschrieben, welche keine PLP-abhängige Cre-Rekombination zeigt (Mallon *et al.*, 2002). Demzufolge ist nicht auszuschließen, dass tdT-negative OPCs sowie tdT-positive OPCs im OB Teil der hier untersuchten panglialen Netzwerke sein könnten. Im Hippocampus, Thalamus und dem somatosensorischen Cortex hingegen konnten weder OPCs noch Mikrogliazellen oder Neurone als Teil glialer Netzwerke identifiziert werden (Houades *et al.*, 2008; Griemsmann *et al.*, 2015). Das Beladen eines Astrozyten in GLAST-Cre^{ERT2} x tdT Mäusen resultierte in einem mehr als doppelt so großen Netzwerk von durchschnittlich 48 Zellen im Vergleich zu der Beladung eines OEC (Kapitel 2, Fig.2). Unterschiede in der Transfereffizienz, abhängig von der jeweils beladenen Zellpopulation, wurden auch in der Retina gefunden. Hampson *et al.* zeigten, dass *Lucifer yellow* präferiert von Astrozyten zu Oligodendrozyten transferiert wird, und weniger in umgekehrter Richtung (Hampson *et al.*, 1993). Im Hippocampus und Thalamus hingegen waren keine Unterschiede der Netzwerkgröße abhängig vom beladenen Zelltyp auszumachen (Griemsmann *et al.*, 2015). Nach Beladung eines Astrozyten waren von durchschnittlich 48 Zellen im OEC-AC-Netzwerk 53% Astrozyten (tdT- und GFAP-positiv) und 29% OECs (nur tdT-positiv, Lage im ONL). Jedoch konnte hier ein Teil der Zellen des Netzwerks nicht genauer klassifiziert werden, da sie weder tdT- noch GFAP-positiv waren. Die immunhistochemische Charakterisierung der GLAST-Cre^{ERT2} x tdT Mauslinie zeigt, dass ungefähr 70% der Astrozyten im *Bulbus olfactorius* tdTomato exprimieren (Kapitel 2, Suppl. Fig.2). Eine vergleichbare Rekombinationsrate der GLAST-Cre^{ERT2}-Linie von mindestens 80% konnte mittels qRT-PCR im Cerebellum und Cortex ermittelt werden (Jahn *et al.*, 2018). Der Anteil nicht klassifizierbarer Zellen ist allerdings im Vergleich zu den *dye coupling*-Experimenten mit Beladung einer OEC nur etwa halb so groß, woraus man bei den Experimenten mit OEC-Beladung schließen könnte, dass ungefähr die Hälfte der dort nicht klassifizierbaren Zellen entweder OECs oder Astrozyten sind. Im Vergleich zu AC-OC-Netzwerken, welche eine Gesamtnetzwerkgröße von bis 133 Zellen aufweisen (Griemsmann *et al.*, 2015), sind die OEC-AC-Netzwerke des OBs deutlich kleiner, was auf eher vereinzelte Zell-Zellverbindungen zwischen OECs und Astrozyten schließen lässt.

Astrozyten exprimieren vornehmlich Cx43 und Cx30, wohingegen Oligodendrozyten Cx29, Cx32 und Cx47 exprimieren (Dermietzel *et al.*, 1989; Dermietzel *et al.*, 1990; Nagy und Rash, 2000; Nagy *et al.*, 2001; Kleopa *et al.*, 2004; Orthmann-Murphy *et al.*, 2008). Aufgrund der unterschiedlichen Connexinexpressionsprofile handelt es sich bei AC-OC-Netzwerken in der Regel um heterotypische *gap junction*-gekoppelte Netzwerke, welche über verschiedene Connexin-Isoformen aufgebaut sind (Orthmann-Murphy *et al.*, 2008). Allerdings bildet nicht jede Connexin-Kombination von Astrozyten und Oligodendrozyten funktionelle *gap junctions*. Elektrophysiologische Studien zeigen, dass heterotypische *gap junctions* bestehend aus Cx32 (OC) und Cx30 (AC) funktionell sind, im Gegensatz zu solchen aus Cx32 (OC) und Cx43 (AC) (White *et al.*, 1995; Dahl *et al.*, 1996). Darüber hinaus bilden die Kombinationen Cx47/Cx43, Cx43/Cx32 und Cx47/Cx30 funktionelle *gap junctions* (Orthmann-Murphy *et al.*, 2008). In Kultur wurden die Connexine 26,32,37,43 und 46 in OECs nachgewiesen (Barnett *et al.*, 2001). *In-situ* hingegen konnte das Vorhandensein von Cx32, welches überwiegend in myelinisierenden Gliazellen wie Oligodendrozyten und Schwann-Zellen vorkommt, nicht verifiziert werden (Scherer *et al.*, 1995; Rela *et al.*, 2010).

Diese (Kapitel 2) und andere Studien zeigen, dass OECs das astrozytäre Connexin 43 exprimieren (Rash *et al.*, 2005; Rela *et al.*, 2010; Theofilas *et al.*, 2017). Der konditionelle PLP-Cre^{ERT2}-induzierte Cx43-*knock-out* hatte in einer elektrophysiologischen Studie an OECs einen vergleichbaren Effekt wie die globale Inhibition von *gap junctions*/Hemikanälen mit MFA. In der selben Studie konnte gezeigt werden, dass der *knock out* von Cx43 in OECs nicht zur Hochregulierung von Cx30 führt, und so kein kompensatorischer Effekt anderer Connexine in diesen *knock out* Tieren zu vermuten ist (Piantanida *et al.*, 2019). Dies lässt darauf schließen, dass gliale Netzwerke innerhalb von OECs primär über Cx43 geknüpft werden. OECs zeigen also hinsichtlich der exprimierten Connexine einen vergleichbaren Phänotyp wie Astrozyten und weniger wie Schwann-Zellen oder Oligodendrozyten. Immunhistochemische Studien zeigen, dass neben OECs auch Astrozyten im OB Cx43 und Cx30 exprimieren (Roux *et al.*, 2011). Das Expressionsmuster von Cx43^{kieCFP} Mäusen, welche in dieser und anderen Arbeiten verwendet wurden, bestätigt darüber hinaus, dass Cx43 in Astrozyten des GLs vorhanden ist (Kapitel 2, Fig. 4) (Degen *et al.*, 2012). In Astrozyten-spezifischen Cx43- und Cx30-defizienten Mäusen konnte in *dye coupling*-Experimenten keine Verteilung des *tracers* erreicht und somit kein astrozytäres

Netzwerk nachgewiesen werden (Roux *et al.*, 2011). Cx30 und Cx43 scheinen demnach die relevanten Connexine sowohl für die Etablierung von OEC-OEC Netzwerken im ONL als auch für die Etablierung astrozytärer Netzwerke im GL zu sein. Es ist bekannt, dass Cx43 und Cx30 keine funktionellen heterotypischen *gap junctions* ausbilden können (Orthmann-Murphy *et al.*, 2007), sodass im OEC-AC Netzwerk vermutlich homotypischen *gap junctions*, aus entweder Cx43 oder Cx30 die molekulare Basis zur interzellulären Kommunikation zwischen OECs und Astrozyten bilden.

5.3 Die Ca²⁺-abhängige Kommunikation in panglialen OEC-AC-Netzwerken

Die Verbindung der Zytoplasmen benachbarter Zellen über die durchgängige Pore der *gap junctions* erlaubt die Diffusion unterschiedlicher Ionen, wie K⁺, Na⁺ und Ca²⁺, sowie von Signalmolekülen, wie IP₃, cAMP und cGMP, in zellulären Netzwerken (Bevans *et al.*, 1998; Goldberg *et al.*, 2004; Kanaporis *et al.*, 2008; Giaume und Theis, 2010; Theis und Giaume, 2012). Die Propagation von Ca²⁺-Wellen in glialen Netzwerken unterliegt zwei Hauptmechanismen. Zum einen der oben beschriebenen interzellulären Diffusion von Signalmolekülen über *gap junctions* und zum anderen einem parakrinen Mechanismus, bei dem extrazelluläre Signalmoleküle wie ATP freigesetzt und benachbarte Zellen über entsprechende Rezeptoren erregt werden (Haydon, 2001). Beide Mechanismen können dabei separat oder in Kombination auftreten (Jorgensen *et al.*, 1997; Schipke *et al.*, 2002; Stavermann *et al.*, 2015). Darüber hinaus konnte in kultivierten Cx43-*knock out* Astrozyten des Rückenmarks gezeigt werden, dass die Reduktion der *gap junction*-Kommunikation zu einer Verstärkung des extrazellulären Mechanismus führt, da die entsprechenden Cx43-*knock out* Astrozyten sensitiver auf die Agonisten ATP und UTP reagierten (Scemes *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Ca²⁺-vermittelte Kommunikation innerhalb des OEC-AC-Netzwerkes untersucht werden (Kapitel 2). Die lokale photolytische Freisetzung des mGluR-Agonisten (Gruppe 1 und 2) *t*ACPD im GL induzierte zunächst Ca²⁺-Transienten in juxtglomerulären Zellen und mit einer zeitlichen Verzögerung von 25 s in OECs (Kapitel 2, Fig.5). Der selektive mGluR₅-Rezeptorantagonist MPEP inhibierte *t*ACPD-induzierte Ca²⁺-Transienten in juxtglomerulären Zellen sowie in OECs, sodass davon ausgegangen werden

kann, das mGluR₅-Rezeptoren das initiale Ca²⁺-Signal in juxtglomerulären Zellen vermitteln (Kapitel 2, Fig.5). Obwohl neben juxtglomerulären Astrozyten unterschiedliche Interneuronpopulationen des *Bulbus olfactorius* mGluR₅ exprimieren und *in-vivo* Experimente zeigen, dass die Druckapplikation von tACPD Ca²⁺-Transienten sowohl in Astrozyten als auch Neuronen induziert, ist davon auszugehen, dass der größte Anteil des tACPD-induzierten Ca²⁺-Signals von Astrozyten stammt. Zum einen fanden die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente unter Inhibition neuronaler Aktivität statt und zum anderen zeigten Otsu *et al.*, dass tACPD-induzierte Ca²⁺-Transienten in Neuronen nahezu vollständig von mGluR₁ abhängen (Otsu *et al.*, 2015), welche in den vorliegenden Experimenten inhibiert wurden. In Anwesenheit des *gap junction*/Hemikanal-Inhibitors CBX initiierte die photolytische Freisetzung von tACPD zwar nach wie vor mGluR₅-vermittelte Ca²⁺-Transienten in Astrozyten, allerdings waren die über das Netzwerk vermittelten Ca²⁺-Transienten in OECs verzögert und signifikant reduziert. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass t-ACPD über mGluR₅-Rezeptoren in Astrozyten Ca²⁺-Transienten auslöst, die dann über das gliale Netzwerk an OECs weiter gegeben werden, und dass *gap junctions*/Hemikanäle essentiell für die Propagation des Ca²⁺-Signals zwischen Astrozyten und OECs sind (Kapitel 2, Fig.7 A-C). Allerdings handelt es sich bei CBX um einen eher unspezifischen Antagonisten zur Inhibition von *gap junctions*, da ebenfalls Hemikanäle sowie Pannexine inhibiert werden (Kang *et al.*, 2008). Darüber hinaus sind purinerge P2X₇-Rezeptoren ebenso sensitiv für CBX (Suadicani *et al.*, 2006). Mehrere Studien beschrieben außerdem die Freisetzung von ATP über Cx43-Hemikanäle in C6-, N2A- und HeLa-Zellen sowie *in-situ* in hippocampalen und bulbären Astrozyten (Cotrina *et al.*, 1998; Stout *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2008; Roux *et al.*, 2015). Somit wäre auch eine parakrine Gliotransmission über die Öffnung von Hemikanälen/Pannexinen oder P2X₇-Rezeptoren bei der Weiterleitung des Ca²⁺-Signals denkbar (Suadicani *et al.*, 2006). Dafür sprächen Untersuchungen an mechanisch-induzierten Ca²⁺-Wellen in einer astrozytären Kultur, die zeigen, dass der Amplifizierungsmechanismus des Ca²⁺-Signals einer ATP-Freisetzung über die P2X₇-Pore unterliegt. Der Mechanismus ist dabei unabhängig von Cx43-Hemikanälen, allerdings sensitiv für CBX (Suadicani *et al.*, 2006). Die Charakterisierung der Reportermauslinie P2X₇-EGFP zeigte zwar das P2X₇-Rezeptoren im *Bulbus olfactorius* vorhanden sind (Kaczmarek-Hajek *et al.*, 2018), allerdings konnten P2X₇-Rezeptoren nicht in Astrozyten nachgewiesen werden (Hormanns, 2017, unveröffentlicht). OECs reagieren grundsätzlich auf die Applikation oder endogene

Freisetzung von ATP via P2Y₁-Rezeptoren und einer nachstehenden Gq-vermittelten Signalkaskade mit einem Ca²⁺-Signal (Rieger *et al.*, 2007). Allerdings scheint es unwahrscheinlich, dass dies eine Rolle bei der hier untersuchten Ca²⁺-Signal-Propagation zwischen Astrozyten und OECs spielt, da die sowohl von OECs als auch von Astrozyten exprimierten purinergen Rezeptoren (P2Y₁ und adenosinerge A_{2A}-Rezeptoren) inhibiert wurden. Neben ATP könnten jedoch auch andere Gliotransmitter freigesetzt werden, die parakrine Wirkung entfalten und so zur Propagation von Ca²⁺-Wellen führen. Beispielsweise konnte in hippocampalen Astrozyten die Freisetzung von Glutamat und Aspartat über Hemikanäle beschrieben werden (Ye *et al.*, 2003). Im OB initiiert die mechanische Stimulation von Astrozyten die Freisetzung von Glutamat und GABA, was zum einen die synchrone Inhibition von Mitral- und Körnerzellen und zum anderen die selektive Exzitation von Körnerzellen zur Folge hat (Kozlov *et al.*, 2006). Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit AMPA-Rezeptoren, welche initial Ca²⁺-Transienten in OECs auslösen könnten (siehe Kapitel 1), inhibiert, wie auch die bereits erwähnten mGluR₁-Rezeptoren. Gegen GABA als parakrines Signalmolekül spricht, dass eine Hemikanal-vermittelte GABA-Freisetzung aus Astrozyten nicht beschrieben ist. Diese erfolgt vielmehr über GABA-Transporter und der simultanen Aufnahme von Glutamat (Héja *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011) und ein solcher Mechanismus wäre demnach nicht sensitiv für CBX. Ferner reagieren OECs nicht auf die Applikation von GABA mit einem Ca²⁺-Signal (Thyssen *et al.*, 2013).

Zur genaueren Identifizierung von Astrozyten wurden Experimente an der GLAST-Cre^{ERT2} x tdT Mauslinie durchgeführt, bei der OECs und Astrozyten tdT exprimieren (Mori *et al.*, 2006). Aufgrund der Tamoxifeninduktion konnten für diese Experimente allerdings nur Tiere, die älter als p21 waren, herangezogen werden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Expression von mGlu₅-Rezeptoren in Astrozyten des OBs im Verlauf der postnatalen Entwicklung herunter reguliert wird, schien die Photolyse von tACPD in diesen Tieren nicht geeignet zur Initiation der mGlu₅-vermittelten Ca²⁺-Signale in Astrozyten zur Untersuchung des glialen Netzwerks (Sun *et al.*, 2013; Otsu *et al.*, 2015). Stattdessen wurde eine Photolyse von *caged*-ATP in der GL durchgeführt. ATP sowie die Abbauprodukte ADP und Adenosin induzieren P2Y₁- und A_{2A}-Rezeptor-vermittelte Ca²⁺-Transienten in Astrozyten des OBs (Doengi *et al.*, 2008). Die Photolyse von *caged*-ATP resultierte in Ca²⁺-Transienten in tdT-positiven Astrozyten der GL und

mit einer Zeitverzögerung von 45 s in tdT-positiven OECs in der ONL. Die Photoapplikation von ATP initiiert darüber hinaus eine erhöhte neuronale Netzwerkaktivität, wie elektrophysiologische Ableitungen an Mitralzellen zeigen (Fischer *et al.*, 2012). Diese konnte allerdings zum einen mit TTX und zum anderen mit glutamatergen Antagonisten inhibiert werden (Fischer *et al.*, 2012), sodass auch unter den hier vorliegenden experimentellen Bedingungen (Kapitel 2) neuronaler Einfluss auf die ATP-induzierten Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten und OECs ausgeschlossen werden kann. Vergleichbar mit den Experimenten an juvenilen Wildtyp-Mäusen reduzierte CBX die zeitverzögert auftretenden Ca^{2+} -Transienten in OECs höchst signifikant.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Propagation von Ca^{2+} -Wellen in panglialen Netzwerken bestehend aus OECs und Astrozyten möglich ist. In kortikalen Primärkulturen konnte erstmals der Transfer von Ca^{2+} -Transienten von Astrozyten zu Oligodendrozyten nachgewiesen werden (Parys *et al.*, 2010). Auch hier konnte die Ca^{2+} -Wellen-Propagation mit CBX inhibiert werden. Darüber hinaus handelt es sich hierbei um eine bidirektionale Interaktion bei der das initiale Ca^{2+} -Signal sowohl in Astrozyten als auch in Oligodendrozyten ausgelöst werden kann, welches schließlich in die andere Zellpopulation propagiert (Parys *et al.*, 2010). Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit zeigen ebenfalls eine bidirektionale Kommunikation zwischen Astrozyten und OECs (Kapitel 2, Fig.6). Die Induktion eines initialen Ca^{2+} -Signals in OECs mittels Applikation des mGluR_1 -Agonisten DHPG löste mit einer vergleichbaren Zeitverzögerung Ca^{2+} -Transienten in juxtaglomerulären Astrozyten aus, wie die ATP-induzierten Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten letztlich zu Ca^{2+} -Transienten in OECs führten. Die Bidirektionalität des Mechanismus unterstützt weiterhin die Hypothese, dass es sich hierbei um einen Mechanismus handelt, der auf dem Transfer von Ca^{2+} und/oder IP_3 über die direkte Zell-Zell Verbindung zwischen Astrozyten und OECs basiert. Die folgende Abbildung 6 zeigt eine Zusammenfassung des beschriebenen Mechanismus zur Propagation panglialer Ca^{2+} -Signale im OEC-AC Netzwerk.

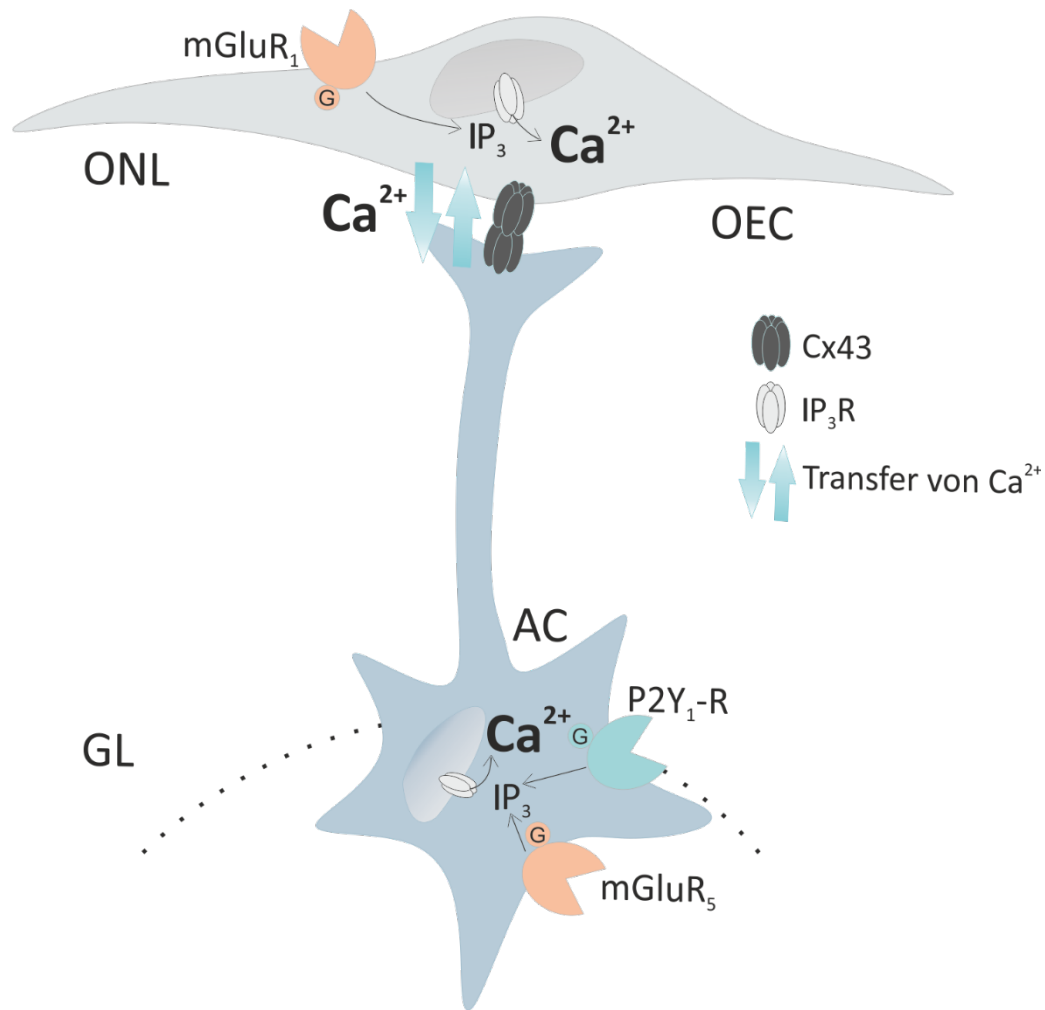


Abbildung 6 Bidirektionale Propagation panglialer Ca^{2+} -Signale im OEC-AC-Netzwerk

Initiale Ca^{2+} -Transienten in OECs und Astrozyten induzieren die Propagation von Ca^{2+} -Signalen im panglialen OEC-AC Netzwerk. Die Druckapplikation des mGluR₁-Agonisten DHPG induziert Ca^{2+} -Signale in OECs und den *gap junction*-vermittelten Transfer von Ca^{2+} in Astrozyten. Die Aktivierung von purinergen P2Y₁-Rezeptoren und glutamatergen mGluR₅-Rezeptoren induziert Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten über metabotrope Signalkaskaden und initiiert ein sekundäres *gap-junction*-vermitteltes Ca^{2+} -Signal in OECs.

5.4 Die physiologische Relevanz panglialer OEC-AC-Netzwerke– eine Rolle bei der räumlichen Kaliumpufferung

Neuronale Aktivität moduliert maßgeblich die *gap junction*-vermittelte Interaktion in astrozytären Netzwerken. So verglichen Rouach *et al.* die Organisation astrozytärer Netzwerke in einer rein astrozytären Kultur mit einer Neuron-Astrozyten-Ko-Kultur und zeigten, dass in Anwesenheit von Neuronen und spontaner synaptischer Aktivität das Vorkommen astrozytärer

Netzwerke um 71% erhöht ist, sich mechanisch-induzierte Ca^{2+} -Wellen weiter ausbreiten und die Expression von Cx43 hochreguliert wird (Rouach *et al.*, 2000). Die Größe astrozytärer Netzwerke im GL ist sowohl nach pharmakologischer Inhibition neuronaler Aktivität als auch nach der Deprivation der sensorischen Eingänge (unilateraler nasaler Verschluss) ebenfalls hochsignifikant reduziert, sodass man davon ausgehen kann, dass auch im *Bulbus olfactorius*, neuronale Aktivität eine essentielle modulatorische Rolle für die Organisation glialer Netzwerke spielt (Roux *et al.*, 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die aktivitätsabhängige Modulation astrozytärer Netzwerke im GL von der extrazellulären K^+ -Konzentration abhängt (Enkvist und McCarthy, 1994; De Pina-Benabou *et al.*, 2001; Roux *et al.*, 2011). Die artifizielle Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration (imitierte neuronale Aktivität) wirkte der TTX-induzierten Modulation der Netzwerkgröße entgegen (Roux *et al.*, 2011). Folglich erfordert eine erhöhte neuronale Aktivität ein höheres Maß an räumlicher Kaliumpufferkapazität und daher größere und/oder effizientere gliale Netzwerke. Ob die erhöhte neuronale Aktivität ebenfalls die Kopplungseffizienz panglialer Netzwerke bestehend aus OECs und Astrozyten moduliert und diese eine relevante Rolle in räumlicher K^+ -Pufferung spielen, ist nicht bekannt.

Die räumliche Umverteilung von K^+ von sehr aktiven Regionen (mehr K^+_{ex}) zu weniger aktiven Regionen (weniger K^+_{ex}) gehört zu den prominentesten Funktionen astroglialer und panglialer Netzwerke in weißer und grauer Substanz (Rash, 2010). Die Propagation eines Aktionspotentials hat die kurzzeitige Erhöhung extrazellulärem K^+ von ungefähr 1 mM über der K^+ -Konzentration im Ruhezustand von 3 mM zur Folge (Adelman und Fitzhugh, 1975; Walz, 2000). Messungen im *Bulbus olfactorius* mittels K^+ -sensitiver Elektroden zeigen, dass die größte Anreicherung an extrazellulärem K^+ in Folge der Stimulation der ORN-Axone im GL stattfindet und bis zu 8 mM erreichen kann (Khayari *et al.*, 1988). Auch im ONL findet eine transiente Erhöhung des extrazellulären K^+ auf 4 mM statt, sodass sowohl im GL als auch im ONL eine schnelle räumliche K^+ -Pufferung stattfinden muss, um eine neuronale Überregung zu vermeiden (Khayari *et al.*, 1988). Es ist bekannt, dass neuronale Aktivität und die daraus resultierende Anreicherung extrazellulären K^+ , zum einen astrozytäre Netzwerke im GL moduliert, und zum anderen Kir4.1-vermittelt K^+ in Astrozyten einströmt, was eine entsprechende Umverteilung des K^+ gewährleistet (De Saint Jan und Westbrook, 2005; Roux *et al.*, 2011). Im ONL sind OECs direkt mit den ORN-Axonon assoziiert, detektieren neuronale Aktivität und

wären somit prädestiniert, um die extrazelluläre K^+ -Homöostase im ONL zu kontrollieren (Kapitel 1; Rieger *et al.*, 2007).

Darüber hinaus zeigen elektrophysiologische Paarableitungen von OECs und Astrozyten in dieser Arbeit (Kapitel 2, Fig.3), dass eine elektrische Kopplung dieser Zellpopulationen besteht und so der Transfer und die Umverteilung von Ionen, wie z.B. K^+ , innerhalb des panglialen Netzwerks möglich ist. Rela *et al.* zeigten des Weiteren, dass OECs Hyperpolarisations-induzierte Ba^{2+} -sensitive Einströme zeigen, welche Kir-vermittelt sein könnten (Rela *et al.*, 2015). Die einwärts-gleichrichtenden K^+ -Kanäle (Kir-Kanäle) sind essentiell zur Aufrechterhaltung des charakteristisch negativen Membranpotentials von Gliazellen und der räumlichen K^+ -Pufferung. Allerdings konnte der Subtyp Kir4.1, welcher von Astrozyten (auch im OB), Müller-Gliazellen und Oligodendrozyten exprimiert wird und als prominentester Kir-Kanal in der glialen räumlichen K^+ -Pufferung gilt, nicht in OECs dokumentiert werden (Kofuji *et al.*, 2000; Higashi *et al.*, 2001; Kofuji *et al.*, 2002; Rela *et al.*, 2015). Jedoch konnten immunhistochemisch *small conductance* Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle (SK3) in OECs nachgewiesen werden (Fujita *et al.*, 2003), welche durch den Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} reguliert werden (Kaczorowski und Garcia, 1999). Da in dieser und anderen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass neuronale Aktivität über unterschiedliche Signalkaskaden Ca^{2+} -Transienten in OECs induziert, wäre eine Beteiligung von SK3 an der räumlichen K^+ -Pufferung im ONL denkbar (Kapitel 1; Rieger *et al.*, 2007; Thyssen *et al.*, 2010).

Die durch neuronale Aktivität erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration spielt auch noch in einem anderen Zusammenhang eine wichtige Rolle. MacVicar *et al.* zeigten, dass die elektrische Stimulation des optischen Nerven nicht nur in einem Anstieg an extrazellulärem K^+ sondern auch in einer Zunahme des astrozytären Zellvolumens (*astrocyte swelling*) aufgrund der simultanen Diffusion von K^+ und H_2O in die astrozytären Endfüßchen resultiert (Macvicar *et al.*, 2002). Folglich ist neben der Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase ebenfalls die Kontrolle der osmotischen Homöostase und der entsprechenden Umverteilung von H_2O von zentraler Bedeutung. Es ist bekannt, dass mit jedem K^+ mindestens 350 H_2O Moleküle in das gliale Endfüßchen transportiert werden muss, um die entsprechende osmotische Balance aufrecht zu erhalten (Rash, 2010). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass OECs direkt mit Blutgefäßen in der äußeren ONL assoziiert sind und zur zellulären Organisation der Blut-Hirn-Schranke

beitragen. Astrozyten hingegen bilden die Blut-Hirn-Schranke in der inneren ONL und GL (Kapitel 3, Fig. 1-2). Die zelluläre Lokalisation beider Gliazellpopulationen scheint demnach ideal, um sowohl die Ionen als auch die osmotische Homöostase im ONL und GL zu kontrollieren, K^+ und H_2O im panglialen Netzwerk umzuverteilen und ins Blutgefäßsystem abzugeben. Spezialisierte Wasserkanäle, sogenannte Aquaporine, erlauben dabei die Diffusion ins Zellinnere und die simultane Abgabe mit K^+ an weniger aktive Regionen oder ins Blutgefäßsystem.

Aquaporin 4 (AQP4), ein Subtyp der Aquaporine, ist in hohem Maß in astrozytären Endfüßchen lokalisiert und trägt maßgeblich zur Regulation der Wasserhomöostase des Gehirns bei (Nielsen *et al.*, 1997; Nico *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Kir.4.1 und AQP4 in astrozytären Endfüßchen kolokalisiert sind (Nagelhus *et al.*, 1999; Masaki *et al.*, 2010). In der vorgelegten Arbeit wurde gezeigt, dass AQP4 auch in astrozytären Endfüßchen im GL lokalisiert sind (Kapitel 3). Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Petzold *et al.* überein, die ebenfalls AQP4 immunhistochemisch im GL nachwiesen (Petzold *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte AQP4-Immunoreaktivität nicht nur an astrozytären Endfüßchen detektiert werden, welche direkt Blutgefäßen aufliegen, sondern im gesamten Neuropil des Glomerulus, wo aufgrund von hoher neuronaler Aktivität eine besonders effiziente Regulation der K^+ - und H_2O -Homöostase stattfinden muss (Kapitel 3; Fig.3 A-B). AQP4 konnte immunhistochemisch nicht in OECs nachwiesen werden, welche in der PLP-Cre^{ERT2}tdT Mauslinie über die tdT Expression identifiziert wurden (Kapitel 3, Fig.3 C-D). Dies stimmt mit einer weiteren Studie überein, die ebenfalls keine AQP4-Immunoreaktivität in OECs feststellen konnten (Wolburg *et al.*, 2008). AQP4-positive Strukturen im inneren ONL waren in der Regel mit GFAP-positiven Strukturen assoziiert und können demnach Astrozyten zugeordnet werden, die in den inneren ONL projizieren (Kapitel 3, Fig.3 A-B). Hingegen zeigen sowohl OM-OECs als auch OB-OECs AQP1-Immunoreaktivität *in-vivo* und *in-vitro* (Shields *et al.*, 2010). AQP1 gehört zur selben Subfamilie von Aquaporinen wie AQP4, zeigt vergleichbare Permeabilitätseigenschaften und wird von Schwann-Zellen exprimiert, einer Gliazellpopulation, mit der OECs viele molekulare Eigenschaften teilen (Gao *et al.*, 2006).

5.5 Die Rolle von OECs bei der neurometabolischen Versorgung im ONL

Neuronale Informationsverarbeitung erfordert einen enormen Energieaufwand. Ungefähr 20% der aufgenommenen Glukose und Sauerstoff werden für diese Prozesse benötigt, obwohl das Gehirn nur etwa 2% der Körpermasse ausmacht (Iadecola und Nedergaard, 2007; Harris et al., 2012; Escartin und Rouach, 2013). 2-Deoxyglucose–Autoradiographie-Studien zeigen, dass in sehr neuropilhaltigen Regionen mit hoher synaptischer Aktivität, wie z.B. dem GL im *Bulbus olfactorius*, ein erhöhter Glukose-Verbrauch stattfindet (Sharp et al., 1977; Benson et al., 1985). Eine essentielle Funktion von Astrozyten besteht in der Detektion neuronaler Aktivität, welche in der Folge eine erhöhte Energiebereitstellung auslöst: die Glukose-Aufnahme über den astrozytären Glukosetransporter 1 (GLUT-1, 45-kDa Isoform) aus dem perivaskulären Raum. Glukose wird anschließend zu Lactat metabolisiert und über Monocarboxylat-Transporter (MCT) naheliegenden Neuronen zur Verfügung gestellt (siehe ANLSH) (Pellerin und Magistretti, 1994; Belanger et al., 2011a). Darüber hinaus wird Glukose auch über neuronale Glukosetransporter 3 (GLUT-3) direkt von Neuronen aus dem perivaskulären Raum aufgenommen (Kacem et al., 1998). Neben dem erhöhten Glukoseverbrauch im GL konnte ebenfalls ein erhöhter Glukoseverbrauch im ONL detektiert werden (Sharp et al., 1977; Benson et al., 1985). Der ONL besteht aus tausenden unmyelinisierten Axonen und assoziierten OECs, allerdings beherbergt er nur vereinzelt astrozytäre Ausläufer, welche klassischerweise die metabolische Versorgung begünstigen (Doucette, 1991).

Die Ergebnisse dieser Arbeit (Kapitel 3) zeigen, dass OECs in der äußeren Sublamina der ONL direkt mit Blutgefäßen assoziiert sind und den glialen Bestandteil der BBB ausmachen. Die klassische zelluläre Organisation der BBB, wobei astrozytäre Endfüßchen den Blutgefäßen aufliegen, kann hingegen in der inneren Sublamina der ONL sowie den tieferen histologischen Schichten des OBs wiedergefunden werden. OECs in der äußeren ONL besitzen also, vergleichbar mit Astrozyten anderer Regionen, eine intermediäre Position, wobei sie zum einen neuronale Aktivität detektieren und zum anderen mit dem Blutgefäßsystem assoziiert sind. Um festzustellen, ob Glukose von OECs aus dem perivaskulären Raum aufgenommen werden kann, wurde in dieser Arbeit das fluoreszierende nicht-hydrolysierbare Glukose-Derivat (6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-6-deoxyglucose; 6-NBDG) *in-situ* in *in-toto* Präparaten des OB in ein Blutgefäß in der ONL injiziert. Üblicherweise transportieren Endothelzellen

Glukose über GLUT-1-Transporter (55 kDa Isoform) aus dem Lumen des Blutgefäßes in den perivaskulären Raum, wo es anschließend von assoziierten Astrozyten aufgenommen werden kann (Zhao *et al.*, 2015). In den hier durchgeführten Experimenten sollte also die Glukose-Aufnahme Blutgefäß-assoziiierter OECs aus dem perivaskulären Raum analysiert werden. Um OECs *in-situ* identifizieren zu können, wurden die Experimente an der PLP-Cre^{ERT2} x tdT Linie durchgeführt, bei der OECs tdTomato exprimieren. Die Ergebnisse zeigten, dass tdT-positive OECs das fluoreszierende Glukose-Derivat aufnehmen. Es wird darüber hinaus deutlich, dass vor allem jene OECs, die in der Nähe von 6-NBDG-beladenen Blutgefäßen liegen, 6-NBDG aufnehmen, wohingegen weit entfernte OECs keine Aufnahme des 6-NBDG zeigten (Kapitel 3, Fig. 5). Studien im Cerebellum und Hippocampus zeigen, dass 6-NBDG zwar grundsätzlich nicht nur von Gliazellen, sondern ebenfalls von Neuronen und anderen Zellpopulationen aufgenommen wird, die entsprechende Glukose-Transporter exprimieren, Gliazellen aber einen deutlich schnelleren Glukose-Transport zeigen (Barros *et al.*, 2009; Jakoby *et al.*, 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte keine Aufnahme von 6-NBDG der ORN-Axone detektiert werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die 6-NBDG-Aufnahme in der ONL hauptsächlich in OECs stattfindet. Im Hippocampus spiegelt die 6-NBDG-Aufnahme überwiegend die Glukose-Transporteraktivität wieder, wobei einfache Diffusion nur geringfügig an der 6-NBDG-Aufnahme beteiligt ist (Jakoby *et al.*, 2014). Basierend darauf ist davon auszugehen, dass auch die 6-NBDG-Aufnahme in OECs abhängig von Glukose-Transportern ist. Histologische Studien in der *Lamina propria* suggerieren die Expression von GLUT-1 sowohl in Endothelzellen also auch in OM-OECs (Hussar *et al.*, 2002; Nunez-Parra *et al.*, 2011). Allerdings wurden OM-OECs lediglich aufgrund ihrer Morphologie identifiziert, ohne die zusätzliche Identifikation mithilfe von zelltypspezifischen Markerproteinen. Die eigene immunhistochemische Detektion von GLUT-1 im OB zeigt jedoch, dass neben Astrozyten und Endothelzellen auch OECs GLUT-1 positiv sind (unveröffentlichte Daten). Somit könnte GLUT-1 nicht nur in Astrozyten, sondern auch in OECs essentiell zur Glukose-Aufnahme aus dem perivaskulären Raum im ONL beitragen.

Die Organisation in glialen Netzwerken trägt ebenfalls maßgeblich zur neurometabolischen Versorgung bei (Giaume *et al.*, 2010; Boison und Steinhauser, 2018). Im *Stratum radiatum* des Hippocampus konnte gezeigt werden, dass die Beladung eines Astrozyten mit 6-NBDG über

eine Ableitpipette, zur Verteilung des Glukose-Derivates im astroglialen Netzwerk über *gap junctions* führt (Rouach *et al.*, 2008). Darüber hinaus ist die Effizienz des Glukose-Derivat-Transfers innerhalb des Netzwerks unmittelbar abhängig von neuronaler Aktivität, da dieser Effekt durch die Zunahme neuronale Aktivität verstärkt und durch Inhibition neuronaler Aktivität reduziert werden kann (Rouach *et al.*, 2008). Auch in der vorliegenden Arbeit wäre eine Verteilung des Glucose-Derivats im lokalen OEC-Netzwerk denkbar. In den durchgeführten Experimenten waren sowohl OECs, die direkt mit dem entsprechenden Blutgefäß assoziiert waren, 6-NBGD-positiv als auch jene, die zwar in der näheren Umgebung lokalisiert waren, allerdings scheinbar keinen direkten Kontakt zum Endothelium aufwiesen. Die 6-NBDG-Aufnahme dieser OECs könnte auf der Verteilung des Glukose-Derivats über *gap junctions* basieren. In Abbildung 7 wird der postulierte Mechanismus vereinfacht zusammengefasst. Es müssten allerdings weitere Experimente durchgeführt werden, bei denen z.B. einzelne OECs mit 6-NBDG geladen werden, um eine mögliche Verteilung im Netzwerk und die Rolle dieser bei der neurometabolischen Versorgung im ONL genauer zu untersuchen. Ebenfalls interessant wäre, inwiefern auch OEC-Netzwerke durch erhöhte neuronale Aktivität im ONL moduliert werden können. Auch könnte die Organisation in panglialen Netzwerken von OECs und Astrozyten eine entscheidende Rolle bei diesen Prozessen spielen. So tragen pangliale Netzwerke bestehend aus Oligodendrozyten und Astrozyten essentiell zur metabolischen Unterstützung von myelinisierten Axonen bei (Saab *et al.*, 2013). In diesem Modell wird davon ausgegangen, dass Astrozyten über GLUT-1-Transporter Glukose aus dem perivaskulären Raum aufnehmen, zu Lactat metabolisieren, über *gap junctions* an Oligodendrozyten verteilen, welche schließlich das Lactat über MCT-Transporter den Axonen zur Verfügung stellen (Wiesinger *et al.*, 1997; Nave und Werner, 2014). Eine Studie im *Corpus Callosum* zeigte, dass die Deprivation von extrazellulärer Glukose zu reduzierter neuronaler Feldaktivität (compound action potentials, CAP) führt, wobei die Dialyse von Glukose in einen Oligodendrozyten die Reduktion der CAPs kompensieren konnte. In *Cx47-knock out*-Mäusen hingegen konnte die Beladung von Glukose in einen Oligodendrozyten die Reduktion von CAP nach extrazellulärer Glukose Deprivation nicht kompensieren, was die Relevanz von *gap junctions* in der neurometabolischen Versorgung unterstreicht (Meyer *et al.*, 2018).

Im Gegensatz zu den panglialen Netzwerken anderer Hirnregionen, wo lediglich Astrozyten direkt an der BBB beteiligt sind und Oligodendrozyten nicht mit dem Blutgefäßsystem assoziiert sind, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass sowohl OECs als auch Astrozyten im *Bulbus olfactorius* an der BBB beteiligt sind und potentiell direkt Glukose aus dem perivaskulären Raum aufnehmen. Zusammenfassend ist es möglich, dass die sublaminar-spezifische Gliederung der BBB in der ONL, sowie die Organisation von OECs und Astrozyten in panglialen Netzwerken zur effizienten neurometabolischen Versorgung im *Bulbus olfactorius* beitragen.

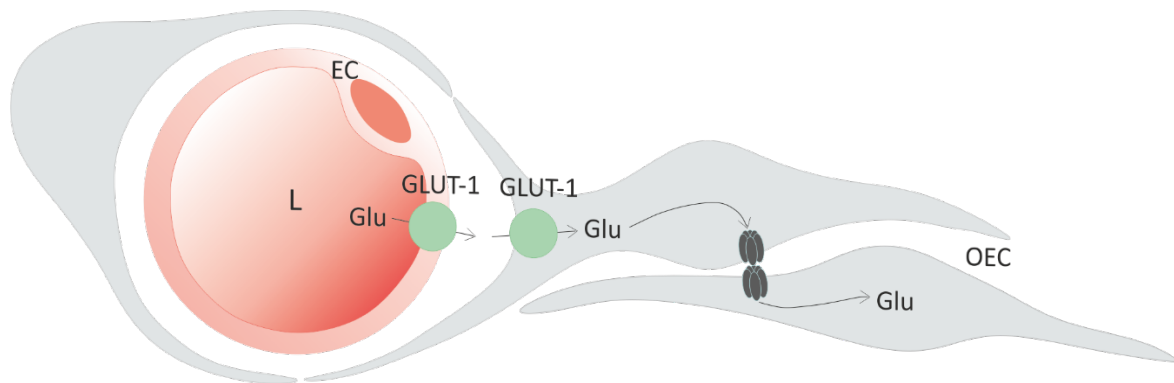


Abbildung 7 OECs vermitteln neurometabolische Kopplung in der ONL

Endothelzellen (EC) transportieren Glukose (Glu) aus dem Lumen (L) des Blutgefäßes in den perivaskulären Raum, wo sie schließlich über Glucose-Transporter (GLUT) von OECs aufgenommen werden kann. Glucose und/oder Lactat wird schließlich im glialen Netzwerk verteilt.

5.6 OECs vermitteln neurovaskuläre Kopplung im ONL

Eine hohe energetische Nachfrage in Folge erhöhter neuronaler Aktivität kann ebenfalls über die Veränderung des Blutflusses bedient werden. Die Erhöhung des Blutflusses ist dabei die Folge einer schnellen Dilatation der Arteriole, was die adäquate Versorgung ansässiger Neurone mit Sauerstoff und Metaboliten begünstigt (Haydon und Carmignoto, 2006). Neuronale Aktivität induziert dabei Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten. Diese setzen vasoaktive Substanzen wie Arachidonsäure, Prostaglandine und Epoxyeicosatriensäure frei, was wiederum die Dilatation oder Konstriktion der glatten Muskelzellen der Arteriole bedingt (Zonta *et al.*, 2003; Filosa *et al.*, 2004; Mulligan und MacVicar, 2004; Haydon und Carmignoto, 2006; Gordon *et al.*, 2007). Studien am Cortex *in-situ* und *in-vivo* zeigen, dass die endogene Glutamatfreisetzung oder die Applikation spezifischer Agonisten mGluR-vermittelte Ca^{2+} -

Signale in Astrozyten induziert, welches die Vasodilatation einer assoziierten Arteriole zur Folge hat (Zonta *et al.*, 2003; Filosa *et al.*, 2004). Auch im *Bulbus olfactorius* konnte gezeigt werden, dass mGluR-vermittelte Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten der GL essentiell für die Blutgefäßregulation sind (Petzold *et al.*, 2008; Otsu *et al.*, 2015). Darüber hinaus tragen neben Rezeptor-vermittelte Signalkaskaden auch Glutamat- und GABA-Transporter-vermittelte Signale entscheidend zur neurovaskulären Kopplung in der GL bei (Gurden *et al.*, 2006; Doengi *et al.*, 2009). In der ONL sind OECs direkt mit ORN-Axonon assoziiert, detektieren neuronale Aktivität und vermitteln Vasokonstriktionen naheliegender Blutgefäße (Thyssen *et al.*, 2010). In dieser Studie führte sowohl die globale Applikation von ATP und die folgenden P2Y_1 -vermittelten Ca^{2+} -Transienten in OECs als auch die lokale Initiation eines Ca^{2+} -Signals einer Blutgefäß-assozierten OEC mit Hilfe der Photolyse von NP-EGTA zu einer Vasokonstriktion (Thyssen *et al.*, 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen darüber hinaus, dass neben histologischen sublaminären Unterschieden in der ONL ebenfalls funktionelle Unterschiede hinsichtlich der Blutgefäßregulation zu finden sind (Kapitel 3). Morphologisch konnte gezeigt werden, dass OECs des äußeren ONLs direkt mit Blutgefäßen assoziiert sind und zur Organisation der BBB beitragen. Im inneren ONL hingegen bilden astrozytäre Ausläufer den glialen Bestandteil der BBB (Kapitel 3, Fig.1-2, 7). In physiologischen Experimenten induzierte die lokale Druckapplikation von DHPG Ca^{2+} -Transienten in OECs der äußeren ONL und eine lokale Vasokonstriktion. Die Induktion einer interzellulären Ca^{2+} -Welle von inneren OECs hingegen konnte keine Veränderung des Blutgefäßdurchmessers initiieren (Kapitel 3, Fig.6). Die dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass die OEC-Subpopulationen im OB nicht nur die bekannten Unterschiede bezüglich ihrer Expressionsmuster und Axon-Interaktion zeigen, sondern ebenfalls Unterschiede in der Interaktion mit dem Blutgefäßsystem aufweisen. Da lediglich OECs der äußeren ONL auf die endogene Freisetzung der Neurotransmitter Glutamat und ATP aus den ORN-Axonon mit Ca^{2+} -Transienten reagieren (Thyssen *et al.*, 2013), ist es wahrscheinlich, dass es sich bei den OECs, welche AMPA-Rezeptor vermittelte Ca^{2+} -Transienten zeigen (Kapitel 1), ebenfalls um äußere OECs handelt. Ob AMPA-Rezeptor vermittelte Ca^{2+} -Transienten, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, ebenfalls Vasokonstriktionen assoziierter Blutgefäße initiieren und somit in Folge neuronaler Aktivität die metabolischen Bedürfnisse des zellulären Netzwerks adaptieren können, ist demnach ebenfalls zu vermuten.

In den vorliegenden Experimenten wurden in Folge von Ca^{2+} -Transienten in OECs in der Regel Vasokonstriktionen gemessen, was klassischerweise zu einer geringeren glialen Glukose-Aufnahmerate führt (Attwell *et al.*, 2010). Dies wäre als Folge erhöhter neuronaler Aktivität ein eher unerwartetes Ergebnis. Die Ergebnisse unterschiedlicher Studien zeigen allerdings, dass die Veränderung des Blutgefäßdurchmessers abhängig von den experimentellen Bedingungen und dem Metabolismus des Gewebes stark variiert (Gordon *et al.*, 2007). So induzierte die Applikation eines mGluR-Agonisten in akuten Hirnschnitten Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten und darauf folgende eine Vasokonstriktion (Mulligan und MacVicar, 2004). Die zusätzliche Inhibition der Stickstoffmonoxid-Synthese hingegen initiierte eine Vasodilatation (Zonta *et al.*, 2003; Gordon *et al.*, 2007). Darüber hinaus bestimmt die O_2 -Verfügbarkeit im Gewebe maßgeblich die Form der Blutgefäßregulation. Während unter einer geringen O_2 -Verfügbarkeit (20% O_2 , 5% CO_2) mGluR-vermittelte Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten eine Vasodilatation assoziierter Arteriolen initiiert, induzieren mGluR-vermittelte Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten unter hoher O_2 -Verfügbarkeit (95% O_2 , 5% CO_2) eine Vasokonstriktion im Hippocampus und Neocortex (Gordon *et al.*, 2008). In den vorliegenden Experimenten wurde mit einer hohen O_2 -Verfügbarkeit (95% O_2 , 5% CO_2) gearbeitet, welche präferiert Vasokonstriktionen initiiert (Gordon *et al.*, 2008). Folglich könnte eine Veränderung der hier vorliegenden experimentellen Bedingungen bezüglich der NO- und/oder O_2 -Verfügbarkeit zu dem gegenteiligen Resultat führen und eine Vasodilatation in der ONL initiieren. Der Vergleich von *in-vivo* und *in-situ* Studien zeigt ebenfalls deutliche Unterschiede der neurovaskulären Kopplung im *Bulbus olfactorius*. *In-vivo* Studien zeigen, dass geruchsinduzierte neuronale Aktivität in der GL zur Vasodilatation assoziierter Kapillaren führt (Chaigneau *et al.*, 2007; Petzold *et al.*, 2008; Tiret *et al.*, 2009), wohingegen Experimente *in-situ*, vergleichbar mit den hier durchgeführten Experimenten, Vasokonstriktionen zeigen (Doengi *et al.*, 2009). *In-vivo* geht der Vasodilatation lokaler Kapillaren eine Vasodilatation vorgeschalteter Kapillaren höherer Ordnung und Arteriolen voraus, welche eine große Entfernung zum aktivierten Glomerulus aufweisen (Rungta *et al.*, 2018). Es handelt sich demnach um einen Mechanismus, bei dem die lokale Veränderung des Blutgefäßdurchmessers auf Kapillarebene das passive Resultat des veränderten Blutflusses größerer Blutgefäße wie Arteriolen darstellt. Grundsätzlich umfasst eine solche Dilatation einen großen Bereich des lokalen vaskulären Systems mit sowohl Arteriolen als auch Kapillaren. Die Anreicherung von extrazellulärem K^+ als Folge neuronaler

Aktivität initiiert dabei die Kir2.1-vermittelte Hyperpolarization des Endotheliums lokaler Kapillaren. Dies induziert eine schnelle über *gap junctions* propagierende retrograde Hyperpolarization in benachbarte Endothelzellen und initiiert schließlich die Dilatation von glatten Muskelzellen an Arteriolen höherer Ordnung. Die Dilatation der Arteriole hat die passive Dilatation der lokalen Kapillaren zur Folge (Longden und Nelson, 2015; Longden *et al.*, 2016; Longden *et al.*, 2017). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass DHPG-induzierte Ca^{2+} -Transienten in OECs lokale Veränderungen assoziierter Blutgefäße zur Folge haben. Es konnte hingegen keine Veränderung des Blutgefäßdurchmessers entfernterer Arteriolen analysiert werden (Kapitel 3, Fig. 6). Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Mechanismus zur neurovaskulären Kopplung in der GL scheint es sich bei dem untersuchten Mechanismus im ONL um eine sehr lokale Veränderung des Blutflusses in Folge von Ca^{2+} -Transienten in OECs zu handeln. In den Experimenten dieser Arbeit wurden allerdings gezielte Ca^{2+} -Transienten in OECs evoziert ohne eine erhöhte neuronale Netzwerkaktivität, sodass nicht davon ausgegangen werden kann, dass eine erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration besteht, die notwendig ist, um den oben beschriebenen, Kir2.1-vermittelten Mechanismus einzuleiten.

Ob es sich bei den untersuchten Blutgefäßen dieser Arbeit um Kapillaren oder Blutgefäße höherer Ordnung handelt und welche kontraktile Elemente die tatsächliche Veränderung des Blutflusses initiieren, ist nicht bekannt. Arteriolen sind mit einer kontinuierlichen Hülle aus glatten Muskelzellen umgeben, welche durch Konstriktion und Dilatation den Blutfluss regulieren, während Blutgefäße niedriger Ordnung wie präkapillare Arteriolen und Kapillaren Perizyten unterschiedlicher Morphologien aufweisen (Hartmann *et al.*, 2015; Attwell *et al.*, 2016). Chaigneau *et al.* untersuchten die Arborisierung des Blutgefäßsystems im dorsalen OB *in-vivo* und zeigten, dass in der superfizialen ONL hauptsächlich große Arterien und Venen verlaufen, welche sich schließlich in zahlreiche Gefäße verzweigen. Kapillaren wurden anhand ihres Durchmessers von $> 6 \mu\text{m}$ definiert und konnten erst 100-150 μm unterhalb der Oberfläche des OBs in der GL lokalisiert werden (Chaigneau *et al.*, 2003). Andere Studien hingegen definieren Kapillaren über einen Innendurchmesser von $>10 \mu\text{m}$ (Attwell *et al.*, 2016). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser und einer anderen Arbeit zeigen, dass Blutgefäße mit einem Innendurchmesser von $2.5 - 8 \mu\text{m}$ in der ONL vorhanden sind und demnach per Definition als Kapillare klassifiziert werden können (Halasz *et al.*, 1979). Auch *in-*

situ weisen die untersuchten Blutgefäße in der Regel einen geringeren Innendurchmesser als 10 µm auf (Kapitel 3, Fig.6). Elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass Perizyten an der BBB in der ONL lokalisiert sind, was wiederum ein Argument für das Vorhandensein von Kapillaren in der ONL darstellt. Darüber hinaus konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass PDGFRβ (*platelet-derived growth factor receptor β*) in der ONL vorhanden ist (Kapitel 3, Fig.4). PDGFRβ wird in unterschiedlichen Studien als Perizyten-spezifischer Marker eingesetzt, wohingegen bereits gezeigt werden konnte, dass PDGFRβ ebenfalls in glatten Muskelzellen an Arteriolen, in Endothelzellen sowie Neuronen vorkommt (Smits *et al.*, 1991; Winkler *et al.*, 2010; Armulik *et al.*, 2011; Attwell *et al.*, 2016; Winkler *et al.*, 2018). Die Charakterisierung einer PDGFRβ-Cre x tdTomato-Mauslinie zeigt weiterhin die PDGFRβ-Cre-abhängige tdTomato-Expression in blutgefäßassoziierten Perizyten im OB (Hartmann *et al.*, 2015). Basierend auf den elektronenmikroskopischen Ergebnissen sowie der immunhistochemischen und Cre-abhängigen Detektion von PDGFRβ kann davon ausgegangen werden, dass Perizyten in der ONL an Kapillaren lokalisiert sind. Im Gegensatz zu der Interpretation von Chaigneau *et al.* zeigen also zahlreiche Studien, einschließlich der hier vorgelegten Arbeit, dass in der ONL Kapillaren lokalisiert sind. Im Gegensatz zu der Studie von Chaigneau *et al.*, in der der dorsale OB *in-vivo* untersucht wurde, wurden die vorliegenden Experimente in der ONL des lateralen OB *in situ* durchgeführt. Da nicht auszuschließen ist, dass sich die vaskuläre Arborisierung in den unterschiedlichen Regionen des OB unterscheidet, könnte dies ein Grund für die Diskrepanzen zwischen den Studien darstellen. Es wird vermutet, dass Perizyten, neben der Regulation der Endothelzell-Proliferation, Stabilisierung der Blutgefäße sowie Regulation der Angiogenese, als kontraktile Elemente aktiv den Blutgefäßdurchmesser auf Kapillarebene kontrollieren (Hirschi und D'Amore, 1996; Lai und Kuo, 2005; Peppiatt *et al.*, 2006; Daneman *et al.*, 2010; Hamilton *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2014). Experimente an akuten Schnittpräparaten in der Retina und dem Cerebellum zeigen, dass die elektrische Stimulation von Perizyten eine lokale Konstriktion der assoziierten Kapillare initiiert. An Kapillarabschnitten, an denen keine Perizyten lokalisiert sind, hat die Stimulation keinen Effekt auf den Kapillardurchmesser. Darüber hinaus initiiert die Perfusion von ATP eine Perizyten-induzierte Konstriktion der Kapillare (Peppiatt *et al.*, 2006). Es wird postuliert, dass neuronale Aktivität zunächst die gliale Freisetzung von ATP initiiert, welches als Vasokonstriktor fungiert und die P2X₇-Rezeptor-vermittelte Konstriktion von Perizyten zur Folge hat (Kawamura *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu zeigen *in-vivo* Experimente

am somatosensorischen Cortex, dass Blutgefäßregulation ausschließlich an Blutgefäßen erfolgt, die glatte Muskelzellen besitzen, nicht aber an Perizyten-assoziierten Kapillaren (Hill *et al.*, 2015). Ebenso kontrovers sind die Ergebnisse zur Expression von kontraktile Proteinen in Perizyten, welche die Voraussetzung für eine Perizyten-abhängige Regulation des Blutflusses bilden. Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass α -smooth muscle actin (α -SMA) in Perizyten vorhanden ist, während eine Einzelzelltranskriptomanalyse zeigt, dass α -SMA von glatten Muskelzellen aber nicht von Perizyten exprimiert wird (Fernandez-Klett *et al.*, 2010; Alarcon-Martinez *et al.*, 2018; Vanlandewijck und Betsholtz, 2018). Ob es sich bei dem untersuchten Mechanismus dieser Arbeit tatsächlich um eine lokale Blutgefäßregulation handelt, bei der neuronale Aktivität Ca^{2+} -Transienten in OECs induziert, was die Aktivierung und Konstriktion von Perizyten initiiert, ist nicht abschließend geklärt. Die folgende Abbildung 8 fasst den postulierten Mechanismus zur neurovaskulären Kopplung im ONL zusammen.

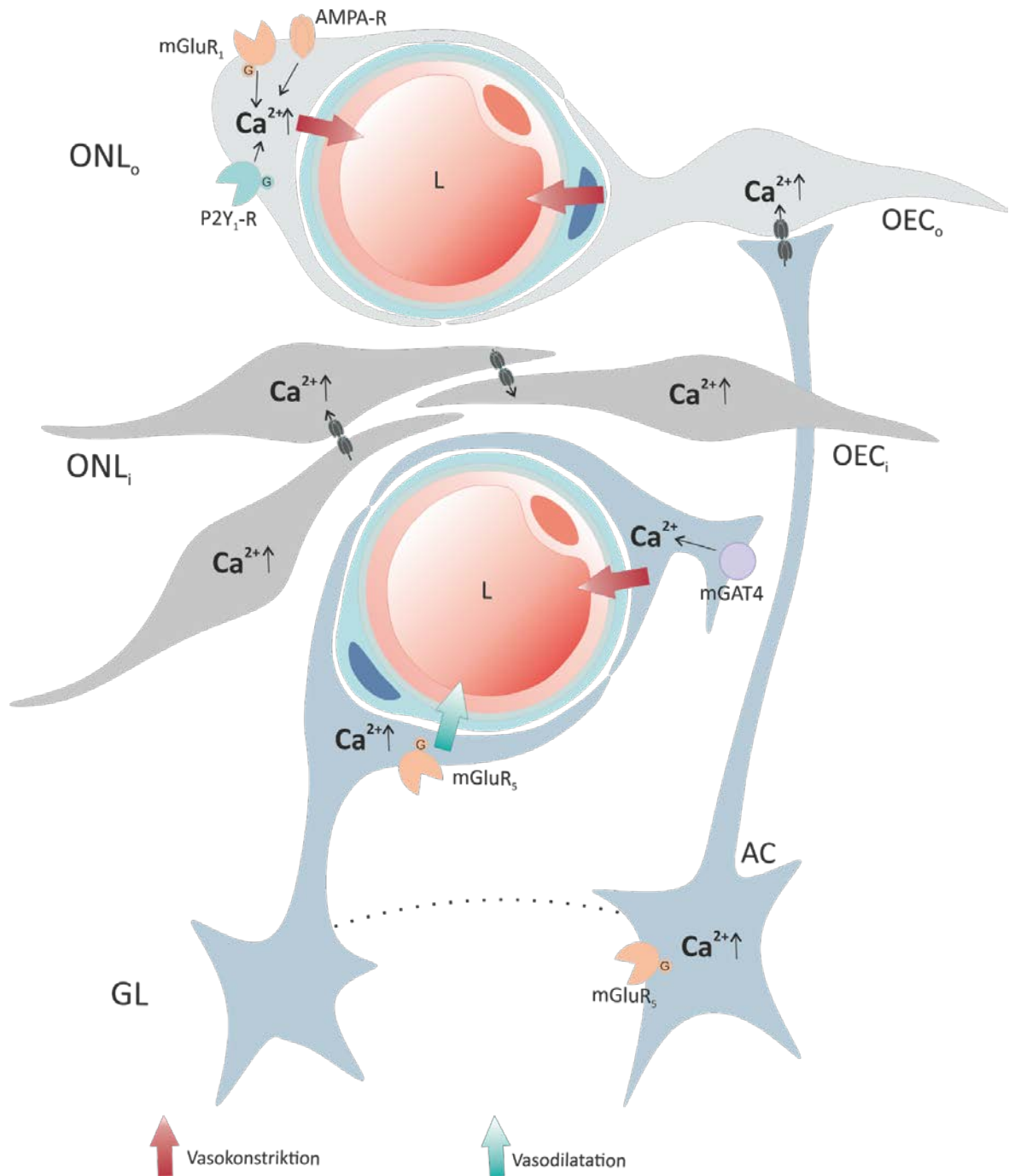


Abbildung 8 Mechanismen zur neurovaskulären Kopplung in der ONL und GL

In der äußeren ONL (ONL_o) sind OECs direkt mit dem Blutgefäßsystem assoziiert, wohingegen astrozytäre Ausläufer in die innere ONL (ONL_i) projizieren und dort an der BBB beteiligt sind. Initiale mGluR₁-, P2Y₁- und vermutlich AMPA-Rezeptor-vermittelte Ca²⁺-Transienten in äußeren OECs induzieren Vasokonstriktionen assoziierter Blutgefäße, wobei die charakteristischen interzellulären Ca²⁺-Wellen innerer OECs keine Veränderung des Blutflusses induzieren (Thyssen *et al.*, 2010; Kapitel 3). Pangliale Ca²⁺-Transienten, induziert in juxtaglomerulären Astrozyten, initiieren wiederum Vasokonstriktionen im ONL_o (Kapitel 2). Glutamaterge Rezeptoren und GABA-Transporter (mGAT-4) initiieren Vasodilatation bzw. Vasokonstriktionen im GL (Doengi *et al.*, 2009; Otsu *et al.*, 2015; Petzold *et al.*, 2008).

5.7 Die PNS-ZNS Übergangszone - OECs und ihre Interaktionspartner

Üblicherweise ist nach einer Verletzung von sensorischen Axonen das erneute Einwachsen ins ZNS über die PNS-ZNS-Grenzen hinweg im Rahmen des Regenerationsprozesses stark limitiert (Smith *et al.*, 2012). So führt eine Läsion der Spinalganglien in adulten Nagern zur Degeneration zahlreicher Axone, welche im Rückenmark terminieren. Die Axonregeneration ist allerdings aufgrund unterschiedlicher Mechanismen stark eingeschränkt. Einer dieser Mechanismen stellt die Formation der sogenannten glialen Vernarbung dar, welche den Ort der Verletzung vom ZNS abschirmt. Dabei reagieren Astrozyten, welche an der Übergangszone lokalisiert sind und auch als *glia limitans* bezeichnet werden, in Form von erhöhter Proliferation, einer hypertrophen Morphologie, einer erhöhten Expression von GFAP und der Sekretion von Zytokinen (Sofroniew, 2009). Neben der reaktiven Astroglieose findet eine verstärkte Schwann-Zell-Proliferation sowie die Rekrutierung von Makrophagen statt. Die Generierung dieser molekularen Umgebung scheint dabei maßgeblich die eingeschränkte axonale Regeneration zu bestimmen (Filous *et al.*, 2010).

Der ONL im *Bulbus olfactorius* stellt ebenfalls eine solche PNS-ZNS-Übergangszone dar, welche neu auswachsende sensorische ORN-Axone allerdings zeitlebens passieren können, ohne die Initiation der oben genannten Prozesse (Barnett und Riddell, 2004; Doucette, 1991, Windus *et al.*, 2010). Mutmaßlich handelt es sich im olfaktorischen System bei den Prozessen des Axonwachstums, der Integration in bestehende zelluläre Netzwerke sowie der simultanen Prävention reaktiver Astroglieose um exklusive Prozesse, welche ein komplexes, stark reguliertes Zusammenspiel unterschiedlicher Zellpopulationen bedarf. Es ist bekannt das ORN-Axone über die extrasynaptische Freisetzung von Glutamat und ATP Ca^{2+} -Transienten in OECs initiieren und so eine direkte Interaktion zwischen ORN-Axonen und OECs stattfindet (Thyssen *et al.*, 2010). Neben den metabotropen Rezeptoren konnte allerdings in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass ebenfalls ionotrope AMPA-Rezeptoren Ca^{2+} -Transienten in OECs in Folge neuronaler Aktivität induzieren (Kapitel 1). Es besteht also eine enge Ca^{2+} -abhängige Kommunikation zwischen ORN-Axonen und OECs des äußeren ONLs. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals die Interaktion von OECs und Astrozyten in panglialen Netzwerken an der PNS-ZNS Übergangszone und den direkten Transfer von Ca^{2+} -Transienten innerhalb dieser Netzwerke (Kapitel 2). Inwiefern diese Form der interzellulären

Kommunikation zwischen den unterschiedlichen Gliazellpopulationen aus ZNS (Astrozyten) und PNS (OECs, zumindest aus entwicklungsbiologischer Sicht), zur Prävention von glialer Vernarbung im OB beiträgt, ist spekulativ. Zudem konnte gezeigt werden, dass OECs im äußeren ONL direkt mit dem Blutgefäßsystem assoziiert sind und zu einer dichten BBB beitragen, welche das ZNS vor Krankheitserregern und Toxinen aus der Peripherie schützt. Darüber hinaus kann vermutet werden, dass OECs an der BBB die metabolischen Bedürfnisse des lokalen zellulären Netzwerks detektieren, zur Glukoseversorgung beitragen und den Blutfluss dementsprechend regulieren (Kapitel 3).

6. Referenzen

- Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., und Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37(1), 13-25.
- Abbott, N.J., Ronnback, L., und Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7(1), 41-53.
- Abraham, N.M., Egger, V., Shimshek, D.R., Renden, R., Fukunaga, I., Sprengel, R., et al. (2010). Synaptic inhibition in the olfactory bulb accelerates odor discrimination in mice. *Neuron* 65(3), 399-411.
- Adelman, W.J., und Fitzhugh, R. (1975). "Solutions of the Hodgkin-Huxley equations modified for potassium accumulation in a periaxonal space," in *Membranes, Ions, and Impulses*. Springer, 11-28.
- Alarcon-Martinez, L., Yilmaz-Ozcan, S., Yemisci, M., Schallek, J., Kilic, K., Can, A., et al. (2018). Capillary pericytes express alpha-smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *Elife* 7.
- Allen, N.J., und Barres, B.A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457(7230), 675-677.
- Anselmi, F., Hernandez, V.H., Crispino, G., Seydel, A., Ortolano, S., Roper, S.D., et al. (2008). ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca²⁺ signals across the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(48), 18770-18775.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., und Haydon, P.G. (1998). Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10(6), 2129-2142.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., und Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22(5), 208-215.
- Armulik, A., Mae, M., und Betsholtz, C. (2011). Pericytes and the blood-brain barrier: recent advances and implications for the delivery of CNS therapy. *Ther Deliv* 2(4), 419-422.
- Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B.A., und Newman, E.A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468(7321), 232-243.
- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C.N., O'Farrell, F.M., und Dalkara, T. (2016). What is a pericyte? *J Cereb Blood Flow Metab* 36(2), 451-455.
- Au, W.W., Treloar, H.B., und Greer, C.A. (2002). Sublaminar organization of the mouse olfactory bulb nerve layer. *J Comp Neurol* 446(1), 68-80.
- Augustin, V., Bold, C., Wadle, S.L., Langer, J., Jabs, R., Philippot, C., et al. (2016). Functional anisotropic panglial networks in the lateral superior olive. *Glia* 64(11), 1892-1911.
- Aungst, J.L., Heyward, P.M., Puche, A.C., Karnup, S.V., Hayar, A., Szabo, G., et al. (2003). Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature* 426(6967), 623-629.
- Bailey, M.S., und Shipley, M.T. (1993). Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *J Comp Neurol* 328(4), 501-526.
- Bak, L.K., Schousboe, A., und Waagepetersen, H.S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 98(3), 641-653.
- Ballabh, P., Braun, A., und Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16(1), 1-13.

- Barnett, S.C., Thompson, R.J., Lakatos, A., and Pitts, J. (2001). Gap junctional communication and connexin expression in cultured olfactory ensheathing cells. *J Neurosci Res* 65(6), 520-528.
- Barraud, P., Seferiadis, A.A., Tyson, L.D., Zwart, M.F., Szabo-Rogers, H.L., Ruhrberg, C., et al. (2010). Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(49), 21040-21045.
- Barros, L.F., Courjaret, R., Jakoby, P., Loaiza, A., Lohr, C., and Deitmer, J.W. (2009). Preferential transport and metabolism of glucose in Bergmann glia over Purkinje cells: a multiphoton study of cerebellar slices. *Glia* 57(9), 962-970.
- Batista-Brito, R., Close, J., Machold, R., and Fishell, G. (2008). The distinct temporal origins of olfactory bulb interneuron subtypes. *J Neurosci* 28(15), 3966-3975.
- Belanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P.J. (2011a). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14(6), 724-738.
- Belanger, M., Yang, J., Petit, J.M., Laroche, T., Magistretti, P.J., and Allaman, I. (2011b). Role of the glyoxalase system in astrocyte-mediated neuroprotection. *J Neurosci* 31(50), 18338-18352.
- Bennett, M.V., Zheng, X., and Sogin, M.L. (1994). The connexins and their family tree. *Soc Gen Physiol Ser* 49, 223-233.
- Benson, T.E., Burd, G.D., Greer, C.A., Landis, D.M., and Shepherd, G.M. (1985). High-resolution 2-deoxyglucose autoradiography in quick-frozen slabs of neonatal rat olfactory bulb. *Brain Res* 339(1), 67-78.
- Berkowicz, D.A., Trombley, P.Q., and Shepherd, G.M. (1994). Evidence for glutamate as the olfactory receptor cell neurotransmitter. *J Neurophysiol* 71(6), 2557-2561.
- Bevans, C.G., Kordel, M., Rhee, S.K., and Harris, A.L. (1998). Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J Journal of Biological Chemistry* 273(5), 2808-2816.
- Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., et al. (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391(6664), 281-285.
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhauser, C., Pilati, E., et al. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7(6), 613-620.
- Bezzi, P., and Volterra, A. (2001). A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Op in neurobio* 11(3), 387-394.
- Bittner, C.X., Valdebenito, R., Ruminot, I., Loaiza, A., Larenas, V., Sotelo-Hitschfeld, T., et al. (2011). Fast and reversible stimulation of astrocytic glycolysis by K⁺ and a delayed and persistent effect of glutamate. *J Neurosci* 31(12), 4709-4713.
- Blaustein, M.P., and Lederer, W.J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79(3), 763-854.
- Boison, D., and Steinhauser, C. (2018). Epilepsy and astrocyte energy metabolism. *Glia* 66(6), 1235-1243.
- Boitano, S., Dirksen, E.R., and Sanderson, M.J. (1992). Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science* 258(5080), 292-295.
- Bowser, D.N., and Khakh, B.S. (2007). Vesicular ATP is the predominant cause of intercellular calcium waves in astrocytes. *J Gen Physiol* 129(6), 485-491.
- Bruzzone, R., White, T.W., and Paul, D.L. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238(1), 1-27.
- Buck, L., and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65(1), 175-187.

- Buck, L.B. (1996). Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu Rev Neurosci* 19, 517-544.
- Burnashev, N., Khodorova, A., Jonas, P., Helm, P.J., Wisden, W., Monyer, H., et al. (1992). Calcium-permeable AMPA-kainate receptors in fusiform cerebellar glial cells. *Science* 256(5063), 1566-1570.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22(1), 183-192.
- Cao, L., Su, Z., Zhou, Q., Lv, B., Liu, X., Jiao, L., et al. (2006). Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes olfactory ensheathing cells migration. *Glia* 54(6), 536-544.
- Cao, L., Zhu, Y.L., Su, Z., Lv, B., Huang, Z., Mu, L., et al. (2007). Olfactory ensheathing cells promote migration of Schwann cells by secreted nerve growth factor. *Glia* 55(9), 897-904.
- Carmignoto, G., und Gomez-Gonzalo, M. (2010). The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling. *Brain Res Rev* 63(1-2), 138-148.
- Chaigneau, E., Oheim, M., Audinat, E., und Charpak, S. (2003). Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(22), 13081-13086.
- Chaigneau, E., Tiret, P., Lecoq, J., Ducros, M., Knopfel, T., und Charpak, S. (2007). The relationship between blood flow and neuronal activity in the rodent olfactory bulb. *J Neurosci* 27(24), 6452-6460.
- Charles, A.C., Merrill, J.E., Dirksen, E.R., und Sanderson, M.J. (1991). Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6(6), 983-992.
- Charles, A.C., Naus, C.C., Zhu, D., Kidder, G.M., Dirksen, E.R., und Sanderson, M.J. (1992). Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells. *J Cell Biol* 118(1), 195-201.
- Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Bruno, V., Battaglia, G., D'alimonte, I., D'onofrio, M., et al. (1999). Activation of A1 adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S-100 β protein from cultured astrocytes. *Glia* 27(3), 275-281.
- Claus, L., Philippot, C., Griemsmann, S., Timmermann, A., Jabs, R., Henneberger, C., et al. (2018). Barreloid Borders and Neuronal Activity Shape PANGIAL Gap Junction-Coupled Networks in the Mouse Thalamus. *Cereb Cortex* 28(1), 213-222.
- Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., et al. (2003). Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem* 278(2), 1354-1362.
- Condorelli, D.F., Dell'Albani, P., Amico, C., Kaczmarek, L., Nicoletti, F., Lukasiuk, K., et al. (1993). Induction of primary response genes by excitatory amino acid receptor agonists in primary astroglial cultures. *J Neurochem* 60(3), 877-885.
- Cornell-Bell, A.H., und Finkbeiner, S.M. (1991). Ca²⁺ waves in astrocytes. *Cell Calcium* 12(2-3), 185-204.
- Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., und Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247(4941), 470-473.
- Cotrina, M.L., Lin, J.H.-C., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., et al. (1998). Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *J Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(26), 15735-15740.
- Crandall, J.E., Dibble, C., Butler, D., Pays, L., Ahmad, N., Kostek, C., et al. (2000). Patterning of olfactory sensory connections is mediated by extracellular matrix proteins in the nerve layer of the olfactory bulb. *J Neurobiol* 45(4), 195-206.

- Dahl, E., Manthey, D., Chen, Y., Schwarz, H.J., Chang, Y.S., Lalley, P.A., et al. (1996). Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *J Biol Chem* 271(30), 17903-17910.
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A.A., und Barres, B.A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 468(7323), 562-566.
- Dani, J.W., Chernjavsky, A., und Smith, S.J. (1992). Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8(3), 429-440.
- De Pina-Benabou, M.H., Srinivas, M., Spray, D.C., und Scemes, E. (2001). Calmodulin kinase pathway mediates the K⁺-induced increase in Gap junctional communication between mouse spinal cord astrocytes. *J Neurosci* 21(17), 6635-6643.
- De Saint Jan, D., und Westbrook, G. (2005). Detecting activity in olfactory bulb glomeruli with astrocyte recording. *J Neurosci* 25(11), 2917-2924.
- Degen, J., Dublin, P., Zhang, J., Dobrowolski, R., Jokwitz, M., Karram, K., et al. (2012). Dual reporter approaches for identification of Cre efficacy and astrocyte heterogeneity. *FASEB J* 26(11), 4576-4583.
- Deitmer, J.W., Singaravelu, K., und Lohr, C. (2009). "Calcium ion signaling in astrocytes," in *Astrocytes in (Patho) Physiology of the Nervous System*. Springer, 201-224.
- Dermietzel, R., Hwang, T.K., und Spray, D.S. (1990). The gap junction family: structure, function and chemistry. *Anat Embryol (Berl)* 182(6), 517-528.
- Dermietzel, R., Traub, O., Hwang, T.K., Beyer, E., Bennett, M.V., Spray, D.C., et al. (1989). Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(24), 10148-10152.
- Dickinson, P.J., Griffiths, I.R., Barrie, J.M., Kyriakides, E., Pollock, G.F., und Barnett, S.C. (1997). Expression of the dm-20 isoform of the plp gene in olfactory nerve ensheathing cells: evidence from developmental studies. *J Neurocytol* 26(3), 181-189.
- Doengi, M., Deitmer, J.W., und 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.
- Doengi, M., Hirnet, D., Coulon, P., Pape, H.C., Deitmer, J.W., und Lohr, C. (2009). GABA uptake-dependent Ca²⁺ signaling in developing olfactory bulb astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(41), 17570-17575.
- Doucette (1984). The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *Anat Rec* 210(2), 385-391.
- Doucette (1990). Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia* 3(6), 433-449.
- Doucette (1991). PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve. *J Comp Neurol* 312(3), 451-466.
- Doucette, R. (1993). Glial cells in the nerve fiber layer of the main olfactory bulb of embryonic and adult mammals. *Microsc Res Tech* 24(2), 113-130.
- Droste, D., Seifert, G., Seddar, L., Jadtke, O., Steinhauser, C., und Lohr, C. (2017). Ca²⁺-permeable AMPA receptors in mouse olfactory bulb astrocytes. *Sci Rep* 7, 44817.
- Egger, V., und Urban, N.N. (2006). Dynamic connectivity in the mitral cell-granule cell microcircuit. *Semin Cell Dev Biol* 17(4), 424-432.
- Eng, L.F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Journal of neuroimmunology* 8, 203-214.
- Enkvist, M., und McCarthy, K.D. (1994). Astroglial gap junction communication is increased by treatment with either glutamate or high K⁺ concentration. *J of Neurochemistry* 62(2), 489-495.

- Ennis, M., Zhou, F.M., Ciombor, K.J., Aroniadou-Anderjaska, V., Hayar, A., Borrelli, E., et al. (2001). Dopamine D2 receptor-mediated presynaptic inhibition of olfactory nerve terminals. *J Neurophysiol* 86(6), 2986-2997.
- Escartin, C., und Rouach, N. (2013). Astroglial networking contributes to neurometabolic coupling. *Front Neuroenergetics* 5, 4.
- Fernandez-Klett, F., Offenhauser, N., Dirnagl, U., Priller, J., und Lindauer, U. (2010). Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(51), 22290-22295.
- Filosa, J.A., und Blanco, V.M. (2007). Neurovascular coupling in the mammalian brain. *Exp Physiol* 92(4), 641-646.
- Filosa, J.A., Bonev, A.D., und Nelson, M.T. (2004). Calcium dynamics in cortical astrocytes and arterioles during neurovascular coupling. *Circ Res* 95(10), e73-81.
- Filosa, J.A., Bonev, A.D., Straub, S.V., Meredith, A.L., Wilkerson, M.K., Aldrich, R.W., et al. (2006). Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat Neurosci* 9(11), 1397-1403.
- Filous, A.R., Miller, J.H., Coulson-Thomas, Y.M., Horn, K.P., Alilain, W.J., und Silver, J. (2010). Immature astrocytes promote CNS axonal regeneration when combined with chondroitinase ABC. *Dev Neurobiol* 70(12), 826-841.
- Firestein, S. (1992). Electrical signals in olfactory transduction. *Curr Opin Neurobiol* 2(4), 444-448.
- Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413(6852), 211-218.
- Fischer, T., Rotermund, N., Lohr, C., und 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.
- Flavell, S.W., und Greenberg, M.E. (2008). Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31, 563-590.
- Fujii, Y., Maekawa, S., und Morita, M. (2017). Astrocyte calcium waves propagate proximally by gap junction and distally by extracellular diffusion of ATP released from volume-regulated anion channels. *Sci Rep* 7(1), 13115.
- Fujita, A., Takeuchi, T., Hanai, J., und Hata, F. (2003). Expression of the small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, SK3, in the olfactory ensheathing glial cells of rat brain. *J Cell tissue research* 313(2), 187-193.
- Gall, C.M., Hendry, S.H., Seroogy, K.B., Jones, E.G., und Haycock, J.W. (1987). Evidence for coexistence of GABA and dopamine in neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 266(3), 307-318.
- Gallo, V., und Ghiani, C. (2000). Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *TiPs* 21(7), 252-258.
- Gao, H., He, C., Fang, X., Hou, X., Feng, X., Yang, H., et al. (2006). Localization of aquaporin-1 water channel in glial cells of the human peripheral nervous system. *Glia* 53(7), 783-787.
- Gebremedhin, D., Lange, A.R., Lowry, T.F., Taheri, M.R., Birks, E.K., Hudetz, A.G., et al. (2000). Production of 20-HETE and its role in autoregulation of cerebral blood flow. *Circ Res* 87(1), 60-65.
- Ghosh, A., Carnahan, J., und Greenberg, M.E. (1994). Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263(5153), 1618-1623.
- Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., und Rouach, N. (2010). Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 11(2), 87-99.

- Giaume, C., und Theis, M. (2010). Pharmacological and genetic approaches to study connexin-mediated channels in glial cells of the central nervous system. *Brain Res Rev* 63(1-2), 160-176.
- Goldberg, G.S., Valiunas, V., und Brink, P. (2004). Selective permeability of gap junction channels. *Biochimica et Biophysica Acta* 1662(1-2), 96-101.
- Gordon, G.R., Choi, H.B., Rungta, R.L., Ellis-Davies, G.C., und MacVicar, B.A. (2008). Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456(7223), 745-749.
- Gordon, G.R., Mulligan, S.J., und MacVicar, B.A. (2007). Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia* 55(12), 1214-1221.
- Goshima, Y., Hori, H., Sasaki, Y., Yang, T., Kagoshima-Maezono, M., Li, C., et al. (1999). Growth cone neuropilin-1 mediates collapsin-1/Sema III facilitation of antero- and retrograde axoplasmic transport. *J Neurobiol* 39(4), 579-589.
- Gottfried, J.A. (2006). "Smell: central nervous processing," in *Taste and smell*. Karger Publishers, 44-69.
- Graziadei, G.A., und Graziadei, P.P. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol* 8(2), 197-213.
- Griemsmann, S., Hoft, S.P., Bedner, P., Zhang, J., von Staden, E., Beinbauer, A., et al. (2015). Characterization of Panglial Gap Junction Networks in the Thalamus, Neocortex, and Hippocampus Reveals a Unique Population of Glial Cells. *Cereb Cortex* 25(10), 3420-3433.
- Griffiths, I., Dickinson, P., und Montague, P. (1995). Expression of the proteolipid protein gene in glial cells of the post-natal peripheral nervous system of rodents. *BNS* 21(2), 97-110.
- Gurden, H., Uchida, N., und Mainen, Z.F. (2006). Sensory-evoked intrinsic optical signals in the olfactory bulb are coupled to glutamate release and uptake. *Neuron* 52(2), 335-345.
- Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V., Charles, A.C., und Kater, S.B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19(2), 520-528.
- Halasz, N., Ljungdahl, A., und Hokfelt, T. (1979). Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb III. Autoradiographic localization of [3H]GABA. *Brain Res* 167(2), 221-240.
- Hall, C.N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N.B., Mishra, A., Sutherland, B.A., et al. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* 508(7494), 55-60.
- Hamilton, N.B., Attwell, D., und Hall, C.N. (2010). Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front Neuroenergetics* 2.
- Hampson, E., Munro, M.N., und Vaney, D.I. (1993). Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia. *J Science* 262(5136), 1072-1074.
- Harris, J.J., Jolivet, R., und Attwell, D. (2012). Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75(5), 762-777.
- Hartmann, D.A., Underly, R.G., Grant, R.I., Watson, A.N., Lindner, V., und Shih, A.Y. (2015). Pericyte structure and distribution in the cerebral cortex revealed by high-resolution imaging of transgenic mice. *Neurophotonics* 2(4), 041402.
- Hassinger, T.D., Guthrie, P.B., Atkinson, P.B., Bennett, M.V., und Kater, S.B. (1996). An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23), 13268-13273.
- Hayar, A., Karnup, S., Ennis, M., und Shipley, M.T. (2004). External tufted cells: a major excitatory element that coordinates glomerular activity. *J Neurosci* 24(30), 6676-6685.

- Hayat, S., Wigley, C.B., und Robbins, J. (2003). Intracellular calcium handling in rat olfactory ensheathing cells and its role in axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci* 22(2), 259-270.
- Haydon, P.G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2(3), 185-193.
- Haydon, P.G., und Carmignoto, G. (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* 86(3), 1009-1031.
- He, B.R., Xie, S.T., Wu, M.M., Hao, D.J., und Yang, H. (2014). Phagocytic removal of neuronal debris by olfactory ensheathing cells enhances neuronal survival and neurite outgrowth via p38MAPK activity. *Mol Neurobiol* 49(3), 1501-1512.
- Héja, L., Barabás, P., Nyitrai, G., Kékesi, K.A., Lasztóczy, B., Tóke, O., et al. (2009). Glutamate uptake triggers transporter-mediated GABA release from astrocytes. *PLoS one* 4(9), e7153.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H., und Rusakov, D.A. (2010). Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463(7278), 232-236.
- Higashi, K., Fujita, A., Inanobe, A., Tanemoto, M., Doi, K., Kubo, T., et al. (2001). An inwardly rectifying K⁺ channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(3), C922-C931.
- Hill, R.A., Tong, L., Yuan, P., Murikinati, S., Gupta, S., und Grutzendler, J. (2015). Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes. *Neuron* 87(1), 95-110.
- Hirschi, K.K., und D'Amore, P.A. (1996). Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 32(4), 687-698.
- Hollmann, M., Hartley, M., und Heinemann, S. (1991). Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252(5007), 851-853.
- Horning, M.S., Kwon, B., Blakemore, L.J., Spencer, C.M., Goltz, M., Houpt, T.A., et al. (2004). Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor subunit expression in rat olfactory bulb. *Neurosci Lett* 372(3), 230-234.
- Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., und Giaume, C. (2008). Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* 28(20), 5207-5217.
- Hsia, A.Y., Vincent, J.D., und Lledo, P.M. (1999). Dopamine depresses synaptic inputs into the olfactory bulb. *J Neurophysiol* 82(2), 1082-1085.
- Hussar, P., Tserentsoodol, N., Koyama, H., Yokoo-Sugawara, M., Matsuzaki, T., Takami, S., et al. (2002). The glucose transporter GLUT1 and the tight junction protein occludin in nasal olfactory mucosa. *Chem Senses* 27(1), 7-11.
- Iadecola, C., und Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 10(11), 1369-1376.
- Isaacson, J.S., und Strowbridge, B.W. (1998). Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS. *Neuron* 20(4), 749-761.
- Jahn, H.M., Kasakow, C.V., Helfer, A., Michely, J., Verkhatsky, A., Maurer, H.H., et al. (2018). Refined protocols of tamoxifen injection for inducible DNA recombination in mouse astroglia. *Sci Rep* 8(1), 5913.
- Jahr, C.E., und Nicoll, R.A. (1982). An intracellular analysis of dendrodendritic inhibition in the turtle in vitro olfactory bulb. *J Physiol* 326, 213-234.
- Jakoby, P., Schmidt, E., Ruminot, I., Gutierrez, R., Barros, L.F., und Deitmer, J.W. (2014). Higher transport and metabolism of glucose in astrocytes compared with neurons: a multiphoton study of hippocampal and cerebellar tissue slices. *Cereb Cortex* 24(1), 222-231.

- Jorgensen, N.R., Geist, S.T., Civitelli, R., und Steinberg, T.H. (1997). ATP- and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. *J Cell Biol* 139(2), 497-506.
- Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., et al. (2007). Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci* 10(3), 331-339.
- Kacem, K., Lacombe, P., Seylaz, J., und Bonvento, G. (1998). Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 23(1), 1-10.
- Kaczmarek-Hajek, K., Zhang, J., Kopp, R., Grosche, A., Rissiek, B., Saul, A., et al. (2018). Re-evaluation of neuronal P2X7 expression using novel mouse models and a P2X7-specific nanobody. *Elife* 7.
- Kaczorowski, G.J., und Garcia, M.L. (1999). Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *J Current opinion in chemical biology* 3(4), 448-458.
- Kanaporis, G., Mese, G., Valiuniene, L., White, T.W., Brink, P.R., und Valiunas, V. (2008). Gap junction channels exhibit connexin-specific permeability to cyclic nucleotides. *JGP* 131(4), 293-305.
- Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., et al. (2008). Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci* 28(18), 4702-4711.
- Kato, H.K., Gillet, S.N., Peters, A.J., Isaacson, J.S., und Komiyama, T. (2013). Parvalbumin-expressing interneurons linearly control olfactory bulb output. *Neuron* 80(5), 1218-1231.
- Kawamura, H., Sugiyama, T., Wu, D.M., Kobayashi, M., Yamanishi, S., Katsumura, K., et al. (2003). ATP: a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *J Physiol* 551(Pt 3), 787-799.
- Key, B., Treloar, H.B., Wangerek, L., Ford, M.D., und Nurcombe, V. (1996). Expression and localization of FGF-1 in the developing rat olfactory system. *J Comp Neurol* 366(2), 197-206.
- Keyvan-Fouladi, N., Li, Y., und Raisman, G. (2002). How do transplanted olfactory ensheathing cells restore function? *Brain Res Brain Res Rev* 40(1-3), 325-327.
- Khayari, A., Math, F., und Davrainville, J. (1988). Electrical stimulation of primary olfactory nerve induces two types of variations in the extracellular potassium activity within the glomerulus of the rat olfactory bulb in vivo. *J Brain research* 457(1), 188-191.
- Kiyokage, E., Pan, Y.Z., Shao, Z., Kobayashi, K., Szabo, G., Yanagawa, Y., et al. (2010). Molecular identity of periglomerular and short axon cells. *J Neurosci* 30(3), 1185-1196.
- Kleopa, K.A., Orthmann, J.L., Enriquez, A., Paul, D.L., und Scherer, S. (2004). Unique distributions of the gap junction proteins connexin29, connexin32, and connexin47 in oligodendrocytes. *Glia* 47(4), 346-357.
- Kofuji, P., Biedermann, B., Siddharthan, V., Raap, M., Iandiev, I., Milenkovic, I., et al. (2002). Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. *Glia* 39(3), 292-303.
- Kofuji, P., Ceelen, P., Zahs, K.R., Surbeck, L.W., Lester, H.A., und Newman, E. (2000). Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci* 20(15), 5733-5740.
- Kosaka, K., und Kosaka, T. (2005). synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anat Sci Int* 80(2), 80-90.
- Kosaka, K., und Kosaka, T. (2007). Chemical properties of type 1 and type 2 periglomerular cells in the mouse olfactory bulb are different from those in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 1167, 42-55.

- Kosaka, T., Hataguchi, Y., Hama, K., Nagatsu, I., und Wu, J.Y. (1985). Coexistence of immunoreactivities for glutamate decarboxylase and tyrosine hydroxylase in some neurons in the periglomerular region of the rat main olfactory bulb: possible coexistence of gamma-aminobutyric acid (GABA) and dopamine. *Brain Res* 343(1), 166-171.
- Koster, N.L., Norman, A.B., Richtand, N.M., Nickell, W.T., Puche, A.C., Pixley, S.K., et al. (1999). Olfactory receptor neurons express D2 dopamine receptors. *J Comp Neurol* 411(4), 666-673.
- Kozlov, A.S., Angulo, M.C., Audinat, E., und Charpak, S. (2006). Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(26), 10058-10063.
- Kuga, N., Sasaki, T., Takahara, Y., Matsuki, N., und Ikegaya, Y. (2011). Large-scale calcium waves traveling through astrocytic networks in vivo. *J Neurosci* 31(7), 2607-2614.
- Kukley, M., Capetillo-Zarate, E., und Dietrich, D. (2007). Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat Neurosci* 10(3), 311.
- Lai, C.H., und Kuo, K.H. (2005). The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte. *Brain Res Brain Res Rev* 50(2), 258-265.
- Lalo, U., Pankratov, Y., Kirchhoff, F., North, R.A., und Verkhratsky, A. (2006). NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 26(10), 2673-2683.
- Langer, D., Hammer, K., Koszalka, P., Schrader, J., Robson, S., Zimmermann, H.J.C., et al. (2008). Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res* 334(2), 199.
- Lankford, K.L., Sasaki, M., Radtke, C., und Kocsis, J.D. (2008). Olfactory ensheathing cells exhibit unique migratory, phagocytic, and myelinating properties in the X-irradiated spinal cord not shared by Schwann cells. *Glia* 56(15), 1664-1678.
- Lee, M., McGeer, E.G., und McGeer, P.L. (2011). Mechanisms of GABA release from human astrocytes. *J Glia* 59(11), 1600-1611.
- Lee, S., Yoon, B.-E., Berglund, K., Oh, S.-J., Park, H., Shin, H.-S., et al. (2010). Channel-mediated tonic GABA release from glia. *330(6005)*, 790-796.
- Leung, J.Y., Chapman, J.A., Harris, J.A., Hale, D., Chung, R.S., West, A.K., et al. (2008). Olfactory ensheathing cells are attracted to, and can endocytose, bacteria. *Cell Mol Life Sci* 65(17), 2732-2739.
- Lewcock, J.W., und Reed, R.R. (2004). A feedback mechanism regulates monoallelic odorant receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(4), 1069-1074.
- Leybaert, L. (2005). Neurobarrier coupling in the brain: a partner of neurovascular and neurometabolic coupling? *J Cereb Blood Flow Metab* 25(1), 2-16.
- Leybaert, L., und Sanderson, M.J. (2012). Intercellular Ca(2+) waves: mechanisms and function. *Physiol Rev* 92(3), 1359-1392.
- Li, Y., Field, P.M., und Raisman, G. (1997). Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* 277(5334), 2000-2002.
- Li, Y., Field, P.M., und Raisman, G. (1998). Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells. *J Neurosci* 18(24), 10514-10524.
- Li, Y., Sauve, Y., Li, D., Lund, R.D., und Raisman, G. (2003). Transplanted olfactory ensheathing cells promote regeneration of cut adult rat optic nerve axons. *J Neurosci* 23(21), 7783-7788.
- Liman, E.R., und Buck, L.B. (1994). A second subunit of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel confers high sensitivity to cAMP. *Neuron* 13(3), 611-621.

- Liu, W.L., und Shipley, M.T. (1994). Intrabulbar associational system in the rat olfactory bulb comprises cholecystinin-containing tufted cells that synapse onto the dendrites of GABAergic granule cells. *J Comp Neurol* 346(4), 541-558.
- Lohr, C., Thyssen, A., und Hirnet, D. (2011). Extrasynaptic neuron-glia communication: The how and why. *Commun Integr Biol* 4(1), 109-111.
- Longden, T.A., Dabertrand, F., Koide, M., Gonzales, A.L., Tykocki, N.R., Brayden, J.E., et al. (2017). Capillary K(+)-sensing initiates retrograde hyperpolarization to increase local cerebral blood flow. *Nat Neurosci* 20(5), 717-726.
- Longden, T.A., Hill-Eubanks, D.C., und Nelson, M.T. (2016). Ion channel networks in the control of cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 36(3), 492-512.
- Longden, T.A., und Nelson, M.T. (2015). Vascular inward rectifier K⁺ channels as external K⁺ sensors in the control of cerebral blood flow. *Microcirculation* 22(3), 183-196.
- Mack, K.J., Kriegler, S., Chang, S., und Chiu, S. (1994). Transcription factor expression is induced by axonal stimulation and glutamate in the glia of the developing optic nerve. *J Molecular brain research* 23(1-2), 73-80.
- Macvicar, B.A., Feighan, D., Brown, A., und Ransom, B. (2002). Intrinsic optical signals in the rat optic nerve: role for K⁺ uptake via NKCC1 and swelling of astrocytes. *J Glia* 37(2), 114-123.
- Magistretti, P.J., Sorg, O., Naichen, Y., Pellerin, L., de Rham, S., und Martin, J.L. (1994). Regulation of astrocyte energy metabolism by neurotransmitters. *Ren Physiol Biochem* 17(3-4), 168-171.
- Maglione, M., Tress, O., Haas, B., Karram, K., Trotter, J., Willecke, K., et al. (2010). Oligodendrocytes in mouse corpus callosum are coupled via gap junction channels formed by connexin47 and connexin32. *Glia* 58(9), 1104-1117.
- Mallon, B.S., Shick, H.E., Kidd, G.J., und Macklin, W. (2002). Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development. *J Neurosci* 22(3), 876-885.
- Martin, D. (1992). Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *J Glia* 5(2), 81-94.
- Masaki, H., Wakayama, Y., Hara, H., Jimi, T., Unaki, A., Iijima, S., et al. (2010). Immunocytochemical studies of aquaporin 4, Kir4. 1, and α 1-syntrophin in the astrocyte endfeet of mouse brain capillaries. *Acta Histochemica et Cytochemica* 43(4), 99-105.
- Mathiisen, T.M., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., und Ottersen, O.P. (2010). The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* 58(9), 1094-1103.
- Matthias, K., Kirchhoff, F., Seifert, G., Hüttmann, K., Matyash, M., Kettenmann, H., et al. (2003). Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 23(5), 1750-1758.
- McConkey, D.J., und Orrenius, S. (1996). The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J Leukoc Biol* 59(6), 775-783.
- Meyer, N., Richter, N., Fan, Z., Siemonsmeier, G., Pivneva, T., Jordan, P., et al. (2018). Oligodendrocytes in the Mouse Corpus Callosum Maintain Axonal Function by Delivery of Glucose. *Cell Rep* 22(9), 2383-2394.
- Mishra, A., Reynolds, J.P., Chen Y., Gourine A. V., Rusakow, D.A., Atwell, D. (2016). Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not arterioles. *Nat. Neurosci.* 19(12), 1619-1627.
- Mölders, A., Koch, A., Menke, R., und Klöcker, N. (2018). Heterogeneity of the astrocytic AMPA-receptor transcriptome. *Glia* 66(12), 2604-2616.

- Mombaerts, P. (1999). Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. *Annu Rev Neurosci* 22, 487-509.
- Montague, A.A., und Greer, C.A. (1999). Differential distribution of ionotropic glutamate receptor subunits in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 405(2), 233-246.
- Montana, V., Malarkey, E.B., Verderio, C., Matteoli, M., und Parpura, V. (2006). Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia* 54(7), 700-715.
- Mori, T., Tanaka, K., Buffo, A., Wurst, W., Kuhn, R., und Gotz, M. (2006). Inducible gene deletion in astroglia and radial glia--a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia* 54(1), 21-34.
- Moshrefi-Ravasdjani, B., Hammel, E.L., Kafitz, K.W., und Rose, C.R. (2017). Astrocyte Sodium Signaling and Panglial Spread of Sodium Signals in Brain White Matter. *Neurochem Res* 42(9), 2505-2518.
- Mothet, J.P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O., Jr., Linden, D.J., Ferris, C.D., et al. (2000). D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9), 4926-4931.
- Muller, T., Moller, T., Berger, T., Schnitzer, J., und Kettenmann, H. (1992). Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science* 256(5063), 1563-1566.
- Mulligan, S.J., und MacVicar, B.A. (2004). Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431(7005), 195-199.
- Nagayama, S., Homma, R., und Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits* 8, 98.
- Nagelhus, E.A., Horio, Y., Inanobe, A., Fujita, A., Haug, F.m., Nielsen, S., et al. (1999). Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 26(1), 47-54.
- Nagy, J.I., Ionescu, A.V., Lynn, B.D., und Rash, J.E. (2003a). Connexin29 and connexin32 at oligodendrocyte and astrocyte gap junctions and in myelin of the mouse central nervous system. *J Comp Neurol* 464(3), 356-370.
- Nagy, J.I., Ionescu, A.V., Lynn, B.D., und Rash, J.E. (2003b). Coupling of astrocyte connexins Cx26, Cx30, Cx43 to oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: Implications from normal and connexin32 knockout mice. *Glia* 44(3), 205-218.
- Nagy, J.I., Li, X., Rempel, J., Stelmack, G., Patel, D., Staines, W.A., et al. (2001). Connexin26 in adult rodent central nervous system: demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43. *J Comp Neurol* 441(4), 302-323.
- Nagy, J.I., und Rash, J.E. (2000). Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res Rev* 32(1), 29-44.
- Nakamura, T., und Gold, G.H. (1987). A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325(6103), 442-444.
- Nave, K.A., und Werner, H.B. (2014). Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 503-533.
- Nickell, W.T., Behbehani, M.M., und Shipley, M.T. (1994). Evidence for GABAB-mediated inhibition of transmission from the olfactory nerve to mitral cells in the rat olfactory bulb. *Brain Res Bull* 35(2), 119-123.
- Nickell, W.T., Norman, A.B., Wyatt, L.M., und Shipley, M.T. (1991). Olfactory bulb DA receptors may be located on terminals of the olfactory nerve. *Neuroreport* 2(1), 9-12.
- Nico, B., Frigeri, A., Nicchia, G.P., Quondamatteo, F., Herken, R., Errede, M., et al. (2001). Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier. *J Cell Sci* 114(Pt 7), 1297-1307.

- Nielsen, S., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., und Ottersen, O.P. (1997). Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 17(1), 171-180.
- Nunez-Parra, A., Cortes-Campos, C., Bacigalupo, J., Garcia Mde, L., Nualart, F., und Reyes, J.G. (2011). Expression and distribution of facilitative glucose (GLUTs) and monocarboxylate/H⁺ (MCTs) transporters in rat olfactory epithelia. *Chem Senses* 36(9), 771-780.
- Odermatt, B., Wellershaus, K., Wallraff, A., Seifert, G., Degen, J., Euwens, C., et al. (2003). Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS. *J Neurosci* 23(11), 4549-4559.
- Orthmann-Murphy, J.L., Abrams, C.K., und Scherer, S.S. (2008). Gap junctions couple astrocytes and oligodendrocytes. *J Mol Neurosci* 35(1), 101-116.
- Orthmann-Murphy, J.L., Freidin, M., Fischer, E., Scherer, S.S., und Abrams, C.K. (2007). Two distinct heterotypic channels mediate gap junction coupling between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *J Neurosci* 27(51), 13949-13957.
- Otsu, Y., Couchman, K., Lyons, D.G., Collot, M., Agarwal, A., Mallet, J.M., et al. (2015). Calcium dynamics in astrocyte processes during neurovascular coupling. *Nat Neurosci* 18(2), 210-218.
- Pannasch, U., und Rouach, N. (2013). Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends Neurosci* 36(7), 405-417.
- Pannasch, U., Vargova, L., Reingruber, J., Ezan, P., Holcman, D., Giaume, C., et al. (2011). Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(20), 8467-8472.
- Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jęftinija, K., Jęftinija, S., und Haydon, P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369(6483), 744-747.
- Parpura, V., und Zorec, R., (2010). Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res. Rev.* 63 (1-2) 83-92.
- Parrish-Aungst, S., Shipley, M.T., Erdelyi, F., Szabo, G., und Puche, A.C. (2007). Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 501(6), 825-836.
- Parys, B., Côté, A., Gallo, V., De Koninck, P., und Sík, A.J.N. (2010). Intercellular calcium signaling between astrocytes and oligodendrocytes via gap junctions in culture. *167(4)*, 1032-1043.
- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., et al. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55(12), 1251-1262.
- Pellerin, L., und Magistretti, P.J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22), 10625-10629.
- Peppiatt, C.M., Howarth, C., Mobbs, P., und Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 443(7112), 700-704.
- Petzold, G.C., Albeanu, D.F., Sato, T.F., und Murthy, V.N. (2008). Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron* 58(6), 897-910.
- Piantanida, A.P., Acosta, L.E., Brocardo, L., Capurro, C., Greer, C.A., und Relá, L. (2019). Selective Cre-mediated gene deletion identifies connexin 43 as the main connexin channel supporting olfactory ensheathing cell networks. *J Comp Neurol* 527(7), 1278-1289.
- Pinching, A.J., und Powell, T.P. (1971). The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9(2), 347-377.

- Puche, A.C., und Key, B. (1995). Identification of cells expressing galectin-1, a galactose-binding receptor, in the rat olfactory system. *J Comp Neurol* 357(4), 513-523.
- Raisman, G. (2001). Olfactory ensheathing cells—another miracle cure for spinal cord injury? *J Nature Reviews Neuroscience* 2(5), 369.
- Ramon-Cueto, A., und Nieto-Sampedro, M. (1994). Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Exp Neurol* 127(2), 232-244.
- Ramon-Cueto, A., und Valverde, F. (1995). Olfactory bulb ensheathing glia: a unique cell type with axonal growth-promoting properties. *Glia* 14(3), 163-173.
- Rash, J. (2010). Molecular disruptions of the panglial syncytium block potassium siphoning and axonal saltatory conduction: pertinence to neuromyelitis optica and other demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroscience* 168(4), 982-1008.
- Rash, J.E., Davidson, K.G., Kamasawa, N., Yasumura, T., Kamasawa, M., Zhang, C., et al. (2005). Ultrastructural localization of connexins (Cx36, Cx43, Cx45), glutamate receptors and aquaporin-4 in rodent olfactory mucosa, olfactory nerve and olfactory bulb. *J Neurocyt* 34(3-5), 307-341.
- Rela, L., Bordey, A., und Greer, C.A. (2010). Olfactory ensheathing cell membrane properties are shaped by connectivity. *Glia* 58(6), 665-678.
- Rela, L., Piantanida, A.P., Bordey, A., und Greer, C.A. (2015). Voltage-dependent K⁺ currents contribute to heterogeneity of olfactory ensheathing cells. *Glia* 63(9), 1646-1659.
- Rieger, A., Deitmer, J.W., und Lohr, C. (2007). Axon-glia communication evokes calcium signaling in olfactory ensheathing cells of the developing olfactory bulb. *Glia* 55(4), 352-359.
- Rolls, A., Shechter, R., und Schwartz, M. (2009). The bright side of the glial scar in CNS repair. *J Nature Reviews Neuroscience* 10(3), 235.
- Rotermund, N., Schulz, K., Hirnet, D., und Lohr, C. (2019). Purinergic Signaling in the Vertebrate Olfactory System. *Front Cell Neurosci* 13, 112.
- Rouach, N., Glowinski, J., und Giaume, C. (2000). Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J Cell Biol* 149(7), 1513-1526.
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., und Giaume, C. (2008). Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322(5907), 1551-1555.
- Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J.D., Bonvento, G., und Giaume, C. (2011). Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(45), 18442-18446.
- Roux, L., Madar, A., Lacroix, M.M., Yi, C., Benchenane, K., und Giaume, C. (2015). Astroglial Connexin 43 Hemichannels Modulate Olfactory Bulb Slow Oscillations. *J Neurosci* 35(46), 15339-15352.
- Rungta, R.L., Chaigneau, E., Osmanski, B.-F., und Charpak, S. (2018). Vascular compartmentalization of functional hyperemia from the synapse to the pia. *Neuron* 99(2), 362-375.
- Saab, A.S., Neumeier, A., Jahn, H.M., Cupido, A., Simek, A.A., Boele, H.J., et al. (2012). Bergmann glial AMPA receptors are required for fine motor coordination. *Science* 337(6095), 749-753.
- Saab, A.S., Tzvetanova, I.D., und Nave, K.A. (2013). The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. *Curr Opin Neurobiol* 23(6), 1065-1072.
- Sahlender, D.A., Savtchouk, I., und Volterra, A. (2014). What do we know about gliotransmitter release from astrocytes? *Phil. Trans.Soc. B* 369(1654), 20130592.

- Sassoè-Pognetto, M., Cantino, D., Panzanelli, P., di Cantogno Verdun, L., Giustetto, M., Margolis, F.L., et al. (1993). Presynaptic co-localization of carnosine and glutamate in olfactory neurones. *Neuroreport* 5(1), 7-10.
- Scemes, E., Suadicani, S.O., und Spray, D.C. (2000). Intercellular communication in spinal cord astrocytes: fine tuning between gap junctions and P2 nucleotide receptors in calcium wave propagation. *Journal of Neuroscience* 20(4), 1435-1445.
- Scherer, S.S., Deschênes, S.M., Xu, Y.-t., Grinspan, J.B., Fischbeck, K.H., und Paul, D. (1995). Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *Neuron* 15(12), 8281-8294.
- Schipke, C.G., Boucsein, C., Ohlemeyer, C., Kirchhoff, F., und Kettenmann, H. (2002). Astrocyte Ca²⁺ waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB J* 16(2), 255-257.
- Schwarting, G.A., Kostek, C., Ahmad, N., Dibble, C., Pays, L., und Puschel, A.W. (2000). Semaphorin 3A is required for guidance of olfactory axons in mice. *J Neurosci* 20(20), 7691-7697.
- Schwarz, Y., Zhao, N., Kirchhoff, F., und Bruns, D. (2017). Astrocytes control synaptic strength by two distinct v-SNARE-dependent release pathways. *Nat Neurosci* 20(11), 1529-1539.
- Shain, W.G., Martin, D. (1984). Activation of β -adrenergic receptors stimulates taurine release from glial cells. *Cell Mol. Neurobiol* 4(2), 191-196.
- Sharp, F.R., Kauer, J.S., und Shepherd, G.M. (1977). Laminal analysis of 2-deoxyglucose uptake in olfactory bulb and olfactory cortex of rabbit and rat. *J Neurophysiol* 40(4), 800-813.
- Shepherd, G.M. (1972). Synaptic organisation of the mammalian olfactory bulb. *Phys. rev.* 52:864-917.
- Shieh, P.B., Hu, S.-C., Bobb, K., Timmusk, T., und Ghosh, A. (1998). Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 20(4), 727-740.
- Shields, S.D., Moore, K.D., Phelps, P.E., und Basbaum, A. (2010). Olfactory ensheathing glia express aquaporin 1. *J Comp Neurol* 518(21), 4329-4341.
- Shiple, M.T., und Ennis, M. (1996). Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol* 30(1), 123-176.
- Shiple, M., Ennis, M., Puche, A. (2004). The rat nervous system; Chapter 29-olfactory system, 3rd Edition
- Simons, M., und Trotter, J. (2007). Wrapping it up: the cell biology of myelination. *J Current opinion in neurobiology* 17(5), 533-540.
- Sitsapesan, R., McGarry, S.J., und Williams, A. (1995). Cyclic ADP-ribose, the ryanodine receptor and Ca²⁺ release. *TIPS* 16(11), 386-391.
- Sklar, P.B., Anholt, R.R., und Snyder, S.H. (1986). The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. Differential stimulation by distinct classes of odorants. *J Biol Chem* 261(33), 15538-15543.
- Smith, G.M., Falone, A.E., und Frank, E. (2012). Sensory axon regeneration: rebuilding functional connections in the spinal cord. *Trends Neurosci* 35(3), 156-163.
- Smits, A., Kato, M., Westermark, B., Nister, M., Heldin, C.H., und Funai, K. (1991). Neurotrophic activity of platelet-derived growth factor (PDGF): Rat neuronal cells possess functional PDGF beta-type receptors and respond to PDGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(18), 8159-8163.
- Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32(12), 638-647.
- St John, J.A., und Key, B. (1999). Expression of galectin-1 in the olfactory nerve pathway of rat. *Brain Res Dev Brain Res* 117(2), 171-178.
- Stavermann, M., Buddrus, K., St John, J.A., Ekberg, J.A., Nilius, B., Deitmer, J.W., et al. (2012). Temperature-dependent calcium-induced calcium release via InsP3 receptors in mouse olfactory ensheathing glial cells. *Cell Calcium* 52(2), 113-123.

- Stavermann, M., Meuth, P., Doengi, M., Thyssen, A., Deitmer, J.W., und Lohr, C. (2015). Calcium-induced calcium release and gap junctions mediate large-scale calcium waves in olfactory ensheathing cells in situ. *Cell Calcium* 58(2), 215-225.
- Steinhäuser, C., und Gallo, V. (1996). News on glutamate receptors in glial cells. *Neurosci Lett* 19(8), 339-345.
- Stellwagen, D., und Malenka, R.C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* 440(7087), 1054-1059.
- Stout, C.E., Costantin, J.L., Naus, C.C., und Charles, A.C. (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 277(12), 10482-10488.
- Suadicani, S.O., Brosnan, C.F., und Scemes, E. (2006). P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J Neurosci* 26(5), 1378-1385.
- Sun, W., McConnell, E., Pare, J.-F., Xu, Q., Chen, M., Peng, W., et al. (2013). Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. *Science* 339(6116), 197-200.
- Takahashi, H., Yoshihara, S., und Tsuboi, A. (2018). The Functional Role of Olfactory Bulb Granule Cell Subtypes Derived From Embryonic and Postnatal Neurogenesis. *Front Mol Neurosci* 11, 229.
- Tegoni, M., Pelosi, P., Vincent, F., Spinelli, S., Campanacci, V., Grolli, S., et al. (2000). Mammalian odorant binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1482(1-2), 229-240.
- Tenne-Brown, J., Puche, A.C., und Key, B. (1998). Expression of galectin-1 in the mouse olfactory system. *Int J Dev Biol* 42(6), 791-799.
- Theis, M., und Giaume, C. (2012). Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res* 1487, 88-98.
- Theofilas, P., Steinhäuser, C., Theis, M., und Derouiche, A. (2017). Morphological study of a connexin 43-GFP reporter mouse highlights glial heterogeneity, amacrine cells, and olfactory ensheathing cells. *J Neurosci Res* 95(11), 2182-2194.
- Thyssen, A., Hirnet, D., Wolburg, H., Schmalzing, G., Deitmer, J.W., und 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.
- Thyssen, A., Stavermann, M., Buddrus, K., Doengi, M., Ekberg, J.A., St John, J.A., et al. (2013). Spatial and developmental heterogeneity of calcium signaling in olfactory ensheathing cells. *Glia* 61(3), 327-337.
- Tiret, P., Chaigneau, E., Lecoq, J., und Charpak, S. (2009). Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Methods Mol Biol* 489, 81-91.
- Tobin, V.A., Hashimoto, H., Wacker, D.W., Takayanagi, Y., Langnaese, K., Caquineau, C., et al. (2010). An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition. *Nature* 464(7287), 413-417.
- Vanlandewijck, M., und Betsholtz, C. (2018). Single-Cell mRNA Sequencing of the Mouse Brain Vasculature. *Methods Mol Biol* 1846, 309-324.
- Ventura, R., und Harris, K.M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19(16), 6897-6906.
- Verkhatsky, A., und Kettenmann, H. (1996). Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci* 19(8), 346-352.
- Verkhatsky, A., und Parpura, V. (2014). Store-operated calcium entry in neuroglia. *Neurosci Bull* 30(1), 125-133.
- Verkhatsky, A., und Shmigol, A. (1996). Calcium-induced calcium release in neurones. *Cell Calcium* 19(1), 1-14.
- Wachowiak, M., und Shipley, M.T. (2006). Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* 17(4), 411-423.

- Wadle, S.L., Augustin, V., Langer, J., Jabs, R., Philippot, C., Weingarten, D.J., et al. (2018). Anisotropic Panglial Coupling Reflects Tonotopic Organization in the Inferior Colliculus. *Front Cell Neurosci* 12, 431.
- Walz, W. (2000). Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *J Neurochemistry* 36(4-5), 291-300.
- Walz, W., und Lang, M.K. (1998). Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. *J Neuroscience letters* 257(3), 127-130.
- Wang, Y., Small, D.L., Stanimirovic, D.B., Morley, P., und Durkin, J. (1997). AMPA receptor-mediated regulation of a G i-protein in cortical neurons. *Nature* 389(6650), 502.
- West, A.E., Chen, W.G., Dalva, M.B., Dolmetsch, R.E., Kornhauser, J.M., Shaywitz, A.J., et al. (2001). Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20), 11024-11031.
- Wewetzer, K., Kern, N., Ebel, C., Radtke, C., und Brandes, G. (2005). Phagocytosis of O4+ axonal fragments in vitro by p75-neonatal rat olfactory ensheathing cells. *Glia* 49(4), 577-587.
- White, T.W., Paul, D.L., Goodenough, D.A., und Bruzzone, R. (1995). Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol Biol Cell* 6(4), 459-470.
- Wiesinger, H., Hamprecht, B., und Dringen, R. (1997). Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia* 21(1), 22-34.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., et al. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383(5), 725-737.
- Winkler, E.A., Bell, R.D., und Zlokovic, B.V. (2010). Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling. *Mol Neurodegener* 5, 32.
- Winkler, E.A., Birk, H., Burkhardt, J.K., Chen, X., Yue, J.K., Guo, D., et al. (2018). Reductions in brain pericytes are associated with arteriovenous malformation vascular instability. *J Neurosurg* 129(6), 1464-1474.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Sam, H., Horvat, S., Deli, M.A., und Mack, A.F. (2008). Epithelial and endothelial barriers in the olfactory region of the nasal cavity of the rat. *Histochem Cell Biol* 130(1), 127-140.
- Woodhall, E., West, A.K., und Chuah, M. (2001). Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors. *Mol Brain Res* 88(1-2), 203-213.
- Yang, H., He, B.R., und Hao, D.J. (2015). Biological roles of olfactory ensheathing cells in facilitating neural regeneration: a systematic review. *Mol Neurobiol* 51(1), 168-179.
- Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., et al. (2003). Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25), 15194-15199.
- Ye, Z.-C., Wyeth, M.S., Baltan-Tekkok, S., und Ransom, B.R. (2003). Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Journal of Neuroscience* 23(9), 3588-3596.
- Yokoi, M., Mori, K., und Nakanishi, S. (1995). Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(8), 3371-3375.
- Yoo, K.Y., Hwang, I., Lee, J., Cho, J., Kim, S., Jung, J.Y., et al. (2006). Immunohistochemical localization of glutamate in the gerbil main olfactory bulb using an antiserum directed against glutamate. *Anat. Histol. Embryol.* 35(2), 93-96.

- Zafra, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H., und Lindholm, D. (1990). Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J* 9(11), 3545-3550.
- Zhang, J.M., Wang, H.K., Ye, C.Q., Ge, W., Chen, Y., Jiang, Z.L., et al. (2003). ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40(5), 971-982.
- Zhang, X., und Firestein, S. (2002). The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci* 5(2), 124-133.
- Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., et al. (2007). Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol* 9(8), 945-953.
- Zhao, Z., Nelson, A.R., Betsholtz, C., und Zlokovic, B.V. (2015). Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell* 163(5), 1064-1078.
- Ziemens, D., Oschmann, F., Gerkau, N.J., und Rose, C.R. (2019). Heterogeneity of Activity-Induced Sodium Transients between Astrocytes of the Mouse Hippocampus and Neocortex: Mechanisms and Consequences. *J Neurosci* 39(14), 2620-2634.
- Ziskin, J.L., Nishiyama, A., Rubio, M., Fukaya, M., und Bergles, D.E. (2007). Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. *Nat Neurosci* 10(3), 321-330.
- Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.A. Pozzan, T., et al. (2003). Neuron to astrocyte signaling is central to the dynamic of brain microcirculation. *Nat. Neurosci* 6(1), 43-50.

V Eidesstattliche Versicherung

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

Datum und Ort

Unterschrift Antonia Benita Beiersdorfer

VI DANKE

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian Lohr für die Bereitstellung dieses interessanten Projektes, sein Vertrauen in mich und die langjährige Unterstützung in jeder Phase meiner Abschlussarbeiten bedanken. Danke, dass ich mich in deinem Arbeitskreis wissenschaftlich und persönlich entwickeln durfte.

Ich danke Prof. Dr. Frank Kirchhoff für die Bereitschaft das Zweitgutachten dieser Arbeit anzufertigen, sowie für die Überlassung der in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mäuse. Auch Dr. Anja Scheller sei an dieser Stelle herzlichst gedankt, für jegliche Unterstützung in Maus- und Tamoxifen-Fragen.

Danke Danni, für die sorgfältige Korrektur dieser Arbeit, die langjährige Organisation der Tierzucht und deine immer offen stehende Tür.

Danke Anne Catrin (*alias* ACR), für alle anfallenden Genotypisierungen und Immunhistos, für viele aufmunternde Worte, Kaffeepausen und Unterstützung wann immer ich sie brauchte.

Tina, Natalie, Timo und Damian- Jede Ära geht wohl mal zu Ende,... Ich danke euch für die tolle Zeit, die in jeder Hinsicht immer besonders bleiben wird. Danke für die offenen Ohren, Not-Süßigkeiten, Timos Cocktails, Spaß mit Trockeneis, Down-Under Abenden, Halloween-und Seminarraum-Parties, und so viele gemeinsame Erinnerungen. Ich hatte wirklich das Glück mit Freunden arbeiten zu dürfen. Ich werde euch sehr vermissen.

Tina und Natalie- wir werden immer die *sisterhood of Ω* bleiben.

Auch möchte ich mich bei den Studentinnen, Olivia, Janina und Kristina bedanken, die ich in ihren Bachelorarbeiten betreuen durfte. Es hat mir viel Spaß gemacht mit euch zu arbeiten.

Auch bei allen anderen aktuellen und ehemaligen Kollegen, möchte ich mich herzlich für das tolle Arbeitsklima bedanken. Ich bin jeden Tag in den letzten Jahren gerne zur Arbeit gekommen. Besonders danke ich Finja, Doro und David für die schöne Zeit im „neuen“ Doktoranden/Masterbüro mit vielen Gesprächen, die den Arbeitsalltag ungemein bereichert haben. Danke auch an die AG Burmester und Diekhof für viele schöne gemeinsame Abende.

Kathrin- was soll ich sagen. Danke, dass du immer da warst!

Danke, liebe Nathalie für deine Unterstützung, Wein und für die Mühe, die du dir beim Korrigieren dieser Arbeit gegeben hast.

Ich danke meinen Eltern, Oma und Opa sowie Monika und Matthias für jegliche Unterstützung und ihr Verständnis, dass ich zuletzt wenig Zeit hatte.

Paul, du hast mich immer unterstützt, ermutigt und an mich geglaubt - egal bei was. Ich danke dir für alles <3.