

Aus dem Institut für Zoologie am Grindel – Abteilung Neurophysiologie  
Universität Hamburg

ATP und Adenosin als Modulatoren neuronaler  
Kommunikation im *Bulbus olfactorius* der Maus

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften (*Dr. rer. nat.*)

am Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik,  
Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

**KRISTINA SCHULZ**

aus Hamburg

Hamburg im Januar 2018



Erster Gutachter: Prof. Dr. Christian Lohr  
Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Veronica Egger  
Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Jörg Ganzhorn

Tag der Disputation: 07.03.2018  
Vorsitzender: Prof. Dr. Andreas Schmidt-Rhaesa

*„Die Wissenschaft ist der Verstand der Welt, die Kunst ihre Seele“*

Maksim Gorki, 1868 - 1936

# I INHALTSVERZEICHNIS

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VIII
III ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	XI
IV ZUSAMMENFASSUNG .....	XIII
IV ABSTRACT .....	XIV
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das purinerge Transmittersystem .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Die P2-Rezeptorfamilie .....	2
1.1.2 Die P1-Rezeptorfamilie .....	3
1.1.3 ATP und Adenosin als Modulatoren synaptischer Transmission .....	4
<b>1.2 Das olfaktorische System der Mammalia .....</b>	<b>7</b>
1.2.1 Die erste Ebene der Verarbeitung: das glomeruläre Netzwerk .....	10
1.2.2 Die zweite Ebene der Verarbeitung: die externe plexiforme Schicht.....	12
<b>1.3 Zielsetzung und Fragestellung .....</b>	<b>15</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Materialien .....</b>	<b>17</b>
2.1.1 Geräte .....	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien und weitere Materialien .....	18
2.1.3 <i>Software</i> .....	19
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Gebrauchslösungen .....	19
2.2.2 Chemikalien und pharmakologisch aktive Substanzen.....	21
2.2.3 Das Cre/loxP-System in Mäusen.....	24
2.2.4 Versuchstiere.....	25
2.2.5 Präparation der olfaktorischen <i>Bulbi</i> und Herstellung akuter Schnittpräparate.....	28
<b>2.3 Die <i>patch clamp</i>-Technik.....</b>	<b>28</b>
2.3.1 Messstände .....	29
2.3.2 Herstellung einer <i>patch clamp</i> -Ableitung in der Ganzzellkonfiguration .....	30
2.3.3 Applikation der Pharmaka über die Badlösung .....	32
2.3.4 Applikation photoaktivierbarer Neurotransmitter .....	33
2.3.5 Extrazelluläre elektrische Stimulation von ORN-Axonon .....	34
<b>2.4 <i>Calcium imaging</i> mit dem genetischen Calciumindikator GCaMP6s .....</b>	<b>34</b>
<b>2.5 Genotypisierung .....</b>	<b>36</b>
<b>2.6 Immunhistochemie .....</b>	<b>38</b>
<b>2.7 Auswertung und Quantifizierung der Messgrößen .....</b>	<b>40</b>
2.7.1 Datenanalyse und -auswertung.....	40
2.7.2 Verwendete Vorzeichenkonventionen für elektrophysiologische Daten .....	40
2.7.3 Quantifizierung elektrophysiologischer Messgrößen .....	40
2.7.4 Auswertung der Calciummessungen .....	42
<b>2.8 Statistik .....</b>	<b>43</b>

<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	44
<b>3.1 ATP als Neuromodulator im <i>Bulbus olfactorius</i></b> .....	44
3.1.1 <i>Laserspot</i> -Photolyse von <i>caged</i> ATP induziert synaptische Aktivität sowie eine Depolarisation in Mitralzellen.....	44
3.1.2 Die ATP-induzierte Antwort in Mitralzellen ist unabhängig von GABAerger und glutamaterger Neurotransmission.....	48
3.1.3 Die Wirkung von ATP wird über P2Y <sub>1</sub> -Rezeptoren vermittelt.....	49
3.1.4 Mitralzellen und externale <i>tufted</i> -Zellen reagieren uniform auf die glomeruläre Photoapplikation von ATP.....	52
3.1.5 Die ATP-induzierte Antwort in Mitralzellen und externalen <i>tufted</i> -Zellen ist größtenteils indirekt und wird neuronal vermittelt.....	53
3.1.6 Eine Subpopulation von juxtaglomerulären Zellen wird P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor-vermittelt aktiviert.....	61
3.1.7 Direkter Einfluss von ATP auf die Membraneigenschaften von Mitralzellen.....	67
3.1.7.1 Die direkte Wirkung von ATP auf Mitralzellen ist ebenfalls P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor-abhängig.....	68
3.1.7.2 ADP vermittelt die Öffnung einer Kationenleitfähigkeit in Mitralzellen.....	70
3.1.8 Immunhistochemischer Nachweis des P2Y <sub>1</sub> -Rezeptors im <i>Bulbus olfactorius</i> .....	73
3.1.9 Endogener Einfluss von ATP im <i>Bulbus olfactorius</i> .....	76
3.1.9.1 Differenzierte purinerge Modulation stimulationsinduzierter Calciumsignale in juxtaglomerulären Neuronen.....	76
3.1.9.2 Untersuchung des endogenen Einflusses von ATP auf den stimulationsinduzierten <i>output</i> von Mitralzellen.....	80
3.1.9.3 Untersuchung des endogenen tonischen Einflusses von P2Y <sub>1</sub> -Rezeptoren auf Netzwerkdynamiken im Ruhezustand.....	84
3.1.10 Immunhistochemischer Nachweis des vesikulären Nukleotid-Transporters VNUT im <i>Bulbus olfactorius</i> .....	87
3.1.10.1 Charakterisierung VNUT-immunreaktiver Zellen.....	89
<b>3.2 Adenosin als Modulator synaptischer Transmission im <i>Bulbus olfactorius</i></b> .....	91
3.2.1 Adenosin A <sub>1</sub> -Rezeptoren vermitteln eine Reduktion der rekurrenten Inhibition in Mitralzellen.....	91
3.2.2 Adenosin moduliert Calciumströme in Mitralzellen.....	95
3.2.3 Adenosin beeinflusst unterschiedliche Typen von reziproken Synapsen.....	101
3.2.3.1 Einfluss von Adenosin auf die synaptische Transmission zwischen Mitral- und Körnerzellen.....	101
3.2.3.2 Einfluss von Adenosin auf die synaptische Transmission zwischen Mitralzellen und Parvalbumin-Interneuronen.....	102
<b>4. DISKUSSION</b> .....	104
<b>4.1 ATP als Neuromodulator im <i>Bulbus olfactorius</i></b> .....	104
4.1.1 Die Aktivierung von P2Y <sub>1</sub> -Rezeptoren erhöht die Netzwerkaktivität im <i>Bulbus olfactorius</i> .....	104
4.1.2 P2-Rezeptoren.....	105
4.1.3 Eine Subpopulation juxtaglomerulärer Interneurone wird P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor-vermittelt aktiviert und moduliert die Netzwerkaktivität im <i>Bulbus olfactorius</i> .....	108
4.1.4 Physiologische Relevanz der ATP-induzierten Neuromodulation.....	112
4.1.5 Die Photoapplikation von ATP öffnet eine unspezifische Kationenleitfähigkeit in Mitralzellen.....	119
4.1.6 VNUT wird in einer Subpopulation juxtaglomerulärer Neurone exprimiert.....	121

<b>4.2 Adenosin als Modulator synaptischer Transmission im <i>Bulbus olfactorius</i></b> .....	124
4.2.1 Adenosin A <sub>1</sub> -Rezeptoren vermitteln eine Modulation der synaptischen Transmission an reziproken Synapsen im <i>Bulbus olfactorius</i> .....	124
4.2.2 Adenosin inhibiert Calciumströme in Mitralzellen .....	125
<b>5. REFERENZEN</b> .....	131
<b>VI. ANHANG</b> .....	142
VI.1 Strukturformeln der verwendeten <i>caged</i> Substanzen .....	142
VI.2 Einfluss des Laserlichts auf die Membraneigenschaften von Mitralzellen .....	142
VI.3 Einfluss der tdTomato-Expression auf die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen.....	143
VI.4 Untersuchung der Spezifität des verwendeten Antikörpers gegen den P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor ..	144
<b>VII EIDESTÄTTLICHE VERSICHERUNG</b> .....	146
<b>VIII DANKE</b> .....	147

## II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ω	Ohm, abgeleitete SI-Einheit des elektrischen Widerstands
°C	Grad Celsius
4-AP	4-Aminopyridine
A	Ampere, SI-Basiseinheit der elektrischen Stromstärke
A <sub>1</sub> R KO	A <sub>1</sub> -Rezeptor <i>knock out</i>
ACSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
Ado	Adenosin
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolephosphonsäure
Aqua <sub>deion</sub>	deionisiertes Reinstwasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CNG	<i>cyclic nucleotide-gated</i>
cpGFP	<i>circularly permuted GFP</i> , zyklisch permutiertes GFP
Cre	<i>causes recombination</i> , katalysiert Rekombinasereaktionen
Cs	Cäsium
Ctrl	<i>Control</i> , Kontrolle
CTZ	Cyclothiazid
DAG	Diacylglycerol
DAPV	D(-)2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPL	<i>external plexiform layer</i> , externe plexiforme Schicht
ERT2	humaner Estrogenrezeptor
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (Latein: und andere)
eTC	<i>external tufted cell</i> , externale <i>tufted</i> -Zelle
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i> , γ-Aminobuttersäure
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GIRK	<i>G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel</i> , G-Protein gekoppelter, G-Protein-gekoppelter, einwärts- rektifizierender Kaliumkanal
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HVACC	<i>high voltage activated calcium channels</i>
I	elektrische Stromstärke
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat

K	Kalium
K-Gluconat	Kaliumgluconat
KO	<i>knock out</i>
L	Liter
LJP	<i>liquid junction potential</i>
LOT	<i>lateral olfactory tract</i>
<i>loxP</i>	<i>locus of crossover (x-over)</i>
M	Molar
M/t-Zellen	Mitral- und externale <i>tufted</i> -Zellen
Mg	Magnesium
Mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge
n	Stichprobenumfang
n.s.	nicht signifikant
Na	Natrium
NGS	<i>normal goat serum</i>
NMDA	n-Methyl-D-Aspartat
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i> , Maus-Modellorganismus
NSE	neuronenspezifische Enolase
OEC	<i>olfactory ensheathing cell</i> , olfaktorische Hüllgliazelle
OH	Hydroxid
ORN	olfaktorische Rezeptorneurone
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P	Postnataltag
P2Y <sub>1</sub> KO	P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor <i>knock out</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pcdh21	Protocadherin 21
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PG	periglomerulär
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
RI	rekurrente Inhibition
ROI	<i>region of interest</i>
s	Sekunde, Basiseinheit der Zeit
S	Siemens, SI-Basiseinheit des elektrischen Leitwertes
s.	siehe
sog.	sogenannte
sSA-Zelle	<i>superficial short axon</i> -Zelle
t	Zeit
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEA	Tetraethylammonium
TH	Tyrosin-Hydroxylase
TNAP	<i>tissue non-specific alkaline phosphatase</i> , gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
U	elektrische Spannung
V	Volt, abgeleitete SI-Einheit der elektrischen Spannung

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

VACC	<i>voltage activated calcium channels</i> , spannungsaktivierte Calciumkanäle
vgl.	vergleiche
VNUT	vesikulärer Nukleotid-Transporter
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

### III ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

#### a. Abbildungen

<b>Abbildung 1:</b> Zusammenspiel der Bestandteile des purinergen Transmittersystems. ....	4
<b>Abbildung 2:</b> Organisation des neuronalen Netzwerks im <i>Bulbus olfactorius</i> . ....	9
<b>Abbildung 3:</b> Cre-Rekombinase-vermittelte Genmanipulation in Mäusen. ....	25
<b>Abbildung 4:</b> Charakteristika bulbärer Projektionsneurone. ....	32
<b>Abbildung 5:</b> Struktur und Funktionsweise des Calciumindikators GCaMP. ....	36
<b>Abbildung 6:</b> Quantifizierung elektrophysiologischer Messwerte. ....	42
<b>Abbildung 7:</b> Photolyse von <i>caged</i> ATP erhöht die Netzwerkaktivität im <i>Bulbus olfactorius</i> . ....	47
<b>Abbildung 8:</b> <i>Off target uncaging</i> . ....	48
<b>Abbildung 9:</b> Die ATP-induzierte Depolarisation von Mitralzellen ist unabhängig von glutamaterger oder GABAerger Neurotransmission. ....	49
<b>Abbildung 10:</b> Der ATP-induzierte Effekt in Mitralzellen ist P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor-vermittelt. ....	51
<b>Abbildung 11:</b> Beteiligung weiterer P2-Rezeptoren am ATP-induzierten Effekt in Mitralzellen. ....	52
<b>Abbildung 12:</b> Vergleich der ATP-Antwort von Mitralzellen und externalen <i>tufted</i> -Zellen. ....	53
<b>Abbildung 13:</b> Die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen und externalen <i>tufted</i> -Zellen ist TTX-sensitiv. ....	54
<b>Abbildung 14:</b> Intrazellulärer Einfluss des Na <sub>v</sub> -Antagonisten QX-314 auf die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen. ....	55
<b>Abbildung 15:</b> Untersuchung der GCaMP6s-Expression unter dem M/t-zellspezifischen Promotor <i>Pcdh21</i> . ....	57
<b>Abbildung 16:</b> TTX inhibiert ATP-induzierte Calciumsignale in M/t-Zellen. ....	58
<b>Abbildung 17:</b> Pharmakologische Charakterisierung des ATP-induzierten Effekts in Mitralzellen. ....	61
<b>Abbildung 18:</b> Untersuchung der GCaMP6s-Expression unter dem neuronenspezifischen <i>Eno</i> -Promotor. ....	63
<b>Abbildung 19:</b> ATP-induzierte Calciumsignale in juxtaglomerulären Neuronen werden nicht durch TTX inhibiert. ....	64
<b>Abbildung 20:</b> Korrelation der Calciumsignale von juxtaglomerulären Neuronen und der Depolarisation von Mitralzellen bei Photoapplikation von ATP. ....	66
<b>Abbildung 21:</b> Vergleich ATP-induzierter Antworten von juxtaglomerulären Neuronen und Mitralzellen. ....	68
<b>Abbildung 22:</b> Die TTX-insensitive ATP-Antwort von Mitralzellen ist P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor-vermittelt. ....	69
<b>Abbildung 23:</b> ATP und ADP lösen einen vergleichbaren, P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor-vermittelten Einstrom in Mitralzellen aus. ....	70
<b>Abbildung 24:</b> ADP führt zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit von Mitralzellmembranen. ....	71
<b>Abbildung 25:</b> Abhängigkeit ADP- bzw. ATP-induzierter Effekte vom Membranpotential der Mitralzelle. ....	73
<b>Abbildung 26:</b> Untersuchung des P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor-Expressionsmusters im <i>Bulbus olfactorius</i> . ....	75
<b>Abbildung 27:</b> Kontrolleexperiment zur Untersuchung des <i>run downs</i> stimulationsinduzierter Calciumsignale in juxtaglomerulären Neuronen. ....	77
<b>Abbildung 28:</b> Modulation stimulationsinduzierter Calciumsignale in juxtaglomerulären Neuronen durch den P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor-Antagonisten MRS2179. ....	79

**Abbildung 29:** Modulation stimulationsinduzierter Antworten in Mitralzellen durch den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten MRS2179.....82

**Abbildung 30:** Modulation stimulationsinduzierter Calciumsignale in Mitralzellen durch den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten MRS2179. ....83

**Abbildung 31:** Tonsicher purinerg Einfluss auf die Membraneigenschaften von Mitralzellen. ....86

**Abbildung 32:** VNUT-immunreaktive Zellen in einer Übersichtsdarstellung des *Bulbus olfactorius*. ....87

**Abbildung 33:** VNUT wird in Neuronen der Glomerularschicht exprimiert. ....88

**Abbildung 34:** Molekulare Eigenschaften VNUT-immunreaktiver juxtaglomerulärer Zellen. 90

**Abbildung 35:** Rekurrente Inhibition in Mitralzellen. ....93

**Abbildung 36:** Einfluss eines intakten *tufts* auf die Größe der rekurrenten Inhibition von Mitralzellen. ....94

**Abbildung 37:** Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptoren verringern die rekurrente Inhibition in Mitralzellen. ....95

**Abbildung 38:** Untersuchung des Einflusses von Adenosin auf Calciumströme in Mitralzellen. ....97

**Abbildung 39:** Zusammensetzung der Calciumströme in Mitralzellen. ....98

**Abbildung 40:** Einfluss von Adenosin auf die verschiedenen Calciumstromsubtypen in Mitralzellen. .... 100

**Abbildung 41:** Adenosin moduliert die synaptische Übertragung zwischen Mitral- und Körnerzellen. .... 102

**Abbildung 42:** Adenosin moduliert die synaptische Übertragung zwischen Mitralzellen und Parvalbumin-Interneuronen..... 103

**Abbildung 43:** Hypothetisches Modell zur neuromodulatorischen Wirkung von ATP auf Netzwerkebene..... 115

**Abbildung 44:** Hypothetisches Modell der adenosinergen Modulation reziproker Synapsen in Mitralzellen..... 128

**Abbildung 45:** Strukturformeln verschiedener *caged* Substanzen. .... 142

**Abbildung 46:** Einfluss des Laserlichts auf die Membraneigenschaften von Mitralzellen.. 143

**Abbildung 47:** Einfluss der tdTomato-Expression auf die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen. .... 144

**Abbildung 48:** Untersuchung des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Expressionsmusters im *Cerebellum*. ... 145

*b. Tabellen*

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der Extrazellulärlösungen für physiologische Experimente...20

**Tabelle 2:** Interne Lösung „Kaliumgluconat“ .....21

**Tabelle 3:** Interne Lösungen „Cs-Hochchlorid“ .....21

**Tabelle 4:** Pharmakologisch aktive Substanzen.....22

**Tabelle 5:** Cre-Mauslinien. ....26

**Tabelle 6:** *loxP*-Mauslinien. ....27

**Tabelle 7:** F1-Genotypen. ....27

**Tabelle 8:** Primersequenzen für Genotypisierungen (beginnend mit 5'-Ende). ....37

**Tabelle 9:** Primärantikörper.....38

**Tabelle 10:** Sekundärantikörper.....38

## IV ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Rolle von ATP als Neuromodulator (I) sowie von Adenosin als Modulator synaptischer Transmission (II) im *Bulbus olfactorius* untersucht und folgende Erkenntnisse mithilfe der *patch clamp*-Technik sowie Calciummessungen gewonnen:

I. Die lokale Photoapplikation von ATP in einem Glomerulus führte zu einer Zunahme synaptischer Eingänge sowie einer Depolarisation in Mitralzellen und externalen *tufted*-Zellen (M/*t*-Zellen). Die Depolarisation war unabhängig von glutamaterger und GABAerger Neurotransmission, aber größtenteils sensitiv gegenüber TTX und damit eine indirekte Antwort der M/*t*-Zellen. Es konnte eine Subpopulation juxtaglomerulärer Neurone identifiziert werden, die via P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren direkt auf die Photoapplikation von ATP reagierten und vermutlich die nachfolgende, exzitatorische Netzwerkantwort sowie die Depolarisation der M/*t*-Zellen initiierten. Bei der endogenen Freisetzung von ATP in Folge elektrischer Stimulation olfaktorischer Rezeptorneurone konnte eine differenzierte Modulation neuronaler Calciumsignale in der Glomerularschicht gezeigt werden. In Stimulationsversuchen führte die P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängige Neuromodulation im glomerulären Netzwerk insgesamt zu einem inhibitorischen Effekt auf den stimulationsinduzierten *output* von Mitralzellen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch die Netzwerkdynamiken im Ruhezustand P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängig moduliert werden, was eine tonische Freisetzung von ATP nahelegt. Darüber hinaus konnte ein direkter Effekt von ATP und ADP auf Mitralzellen nachgewiesen werden, da beide Purine zu einem P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Einstrom in Mitralzellen führten, der vermutlich durch die Modulation einer unspezifischen Kationenleitfähigkeit induziert wird.

II. Im *Bulbus olfactorius* ist die Aktivität ATP-abbauender Enzyme besonders hoch, sodass auch die ATP-Hydrolyseendprodukte wie Adenosin mutmaßlich die integrativen Eigenschaften von Neuronen beeinflussen. Tatsächlich ist bereits bekannt, dass die Transmission an reziproken, dendrodendritischen Synapsen durch Adenosin moduliert und die rekurrente Inhibition von Mitralzellen durch eine Reduzierung der Glutamatausschüttung aus Mitralzellen verringert wird. In dieser Arbeit wurden die grundlegenden Mechanismen dieser Neuromodulation untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Glutamatausschüttung durch eine Inhibition von N- und P/Q-Typ-Calciumkanälen in Folge der Aktivierung von Adenosinrezeptoren des Typ A<sub>1</sub> reduziert wird. Darüber hinaus wirkte Adenosin sowohl auf NMDA- als auch AMPA-Rezeptor-vermittelte rekurrente Inhibition, was auf eine adenosinerge Modulation reziproker Synapsen zwischen Mitral- und Körnerzellen als auch Parvalbumin-Interneuronen hindeutet.

## IV ABSTRACT

Regarding the role of ATP as a neuromodulator (I) and adenosine as a modulator of synaptic transmission (II) in the olfactory bulb, the following insights were obtained in this study by using whole cell patch clamp recordings and calcium imaging techniques:

I. Spatiotemporally defined photolysis of caged ATP in a glomerulus, a specific processing unit in the olfactory bulb, resulted in an increase in synaptic inputs and a depolarization in mitral- and tufted cells (M/t cells) independent of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. The depolarization was mostly sensitive to TTX, suggesting that most of the response of M/t cells is indirect. A subset of juxtglomerular neurons could be identified as selectively activated by photoapplication of ATP via P2Y<sub>1</sub> receptors, presumably being the trigger of the population response and the depolarization in M/t cells. Endogenous release of ATP due to electrical stimulation of olfactory receptor neurons resulted in a differentiated modulation of calcium signaling in juxtglomerular neurons. The stimulation-induced P2Y<sub>1</sub> receptor-dependent neuromodulation in the glomerular network led to an overall inhibitory effect on mitral cell output. Additionally, resting network dynamics were also modulated by P2Y<sub>1</sub> receptor activation, suggesting a tonic release of ATP in the bulbar network. Furthermore, mitral cells were directly modulated by ATP as well as ADP since both purines caused a P2Y<sub>1</sub> receptor-mediated inward current, possibly due to a modulation of unspecific cation channels in mitral cells.

II. In the olfactory bulb, enzymes involved in ATP-breakdown show a high activity, indicating a substantial role for ATP metabolites such as adenosine in modulating the information processing properties of neurons. Indeed, adenosine affects transmission at reciprocal dendrodendritic synapses by reducing glutamate release from mitral cells resulting in a decrease of recurrent inhibition in the mitral cell itself. This study enquires the underlying mechanism of this neuromodulatory action, showing that the reduction of glutamate release is due to A<sub>1</sub> receptor-dependent inhibition of N- and P/Q-type calcium channels. In addition, adenosine attenuated both NMDA and AMPA receptor-mediated recurrent inhibition, suggesting that reciprocal synapses between mitral cells and granule cells as well as parvalbumin interneurons are targeted by adenosinergic neuromodulation.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 DAS PURINERGE TRANSMITTERSYSTEM

Purine wie Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) sowie seine Metabolite Adenosin-5'-Diphosphat (ADP) und Adenosin gehörten mutmaßlich zu den ersten verfügbaren Molekülen in der biochemischen Evolution (Calvin, 1969; Trams, 1981). In nahezu allen Lebensformen übernehmen sie vielfältige Funktionen, beispielsweise als universelle Energieträger oder Grundbaustein der Nukleinsäuren. Aufgrund ihres frühgeschichtlichen und ubiquitären Vorkommens wird außerdem vermutet, dass Purinderivate in der Evolution neurochemischer Transmitter bereits an den ursprünglichsten Signaltransmissionsmechanismen beteiligt waren (Trams, 1981; Burnstock, 1996). So gibt es Hinweise darauf, dass ATP schon in eher primitiven Organisationsformen wie Bakterien (Lawanson und Sholeye, 1976), Algen (Williamson, 1975; Shimmen und Tazawa, 1977), Diatomeen (Komoda *et al.*, 1983) und Myxomyzeten (Ogihara, 1982) extrazellulär wirken kann.

Das heutige Verständnis purinerges Signaltransmission basiert in erster Linie auf der Forschungsarbeit von Geoffrey Burnstock. Diese begann in den 1970er Jahren im peripheren Nervensystem des Meerschweinchens, wo ATP als Neurotransmitter aus „nicht-cholinergen, nicht-adrenergen Fasern“ identifiziert wurde (Burnstock, 1972). Kurze Zeit später wurde ATP auch als Ko-Transmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) nachgewiesen und das Vorhandensein eigener purinerges Rezeptoren postuliert (Burnstock, 1976). Damit war das Konzept der purinerges Signaltransmission entstanden, was jedoch auf erhebliche Skepsis stieß. Nichtsdestotrotz setzte sich mit der Zeit der Gedanke durch, dass Purine und auch Pyrimidine die neuronale Kommunikation als extrazelluläre Signalmoleküle entscheidend beeinflussen, sodass auf diesem Gebiet heutzutage eine vielfältige und intensive Forschung betrieben wird.

Die purinerges Signaltransmission weist einige Besonderheiten auf. Im Gegensatz zu klassischen Transmittersystemen zur neuronalen Kommunikation sowie para- oder autokrinen Transmission ist purinerges Signaltransmission in nahezu allen Geweben omnipräsent. So wird ATP zum Beispiel als alleiniger oder als Ko-Transmitter zusammen mit dem hauptsächlichen Transmitter der betreffenden Synapse in vermutlich allen Nerven des peripheren sowie zentralen Nervensystems freigesetzt (Burnstock und Verkhratsky, 2009). Des Weiteren ist ATP ein wichtiger Gliotransmitter (Färber und Kettenmann, 2006; Fields und Burnstock, 2006) und wirkt auch in nicht-neuronalem Gewebe als extrazelluläres Signalmolekül (Burnstock und Verkhratsky, 2009). Einzigartig ist außerdem die Vielzahl an Freisetzungsmechanismen für Purine und Pyrimidine (vgl. Abbildung 1). Hierzu zählen Exozytose, sowie Diffusion über Transmembranproteine und -transporter (Bodin und

Burnstock, 2001). Des Weiteren wird ATP über geschädigte Plasmamembranen freigesetzt und ist damit ein wichtiger Indikator für Zelltod (Burnstock, 2007a, 2008). Eine weitere Besonderheit ergibt sich daraus, dass die Hydrolyse des Transmitters ATP nicht zur Terminierung der Transmission führt, sondern dass die ATP-Metabolite über die Aktivierung eigener purinergere Rezeptorklassen weitere Effekte auslösen können. Purine und Pyrimidine wirken dabei über die sogenannten P-Rezeptoren, die in zwei Klassen, die P2- und die P1-Rezeptoren (Burnstock, 1976), eingeteilt werden.

### 1.1.1 Die P2-Rezeptorfamilie

ATP als prominentester Transmitter des purinergen Systems entfaltet seine Wirkung über die Bindung an P2-Rezeptoren. P2-Rezeptoren unterliegen auf Grundlage ihrer Struktur und Transduktionsmechanismen einer weiteren Unterteilung in P2X- und P2Y-Rezeptoren (Khakh *et al.*, 2001). P2X-Rezeptoren werden ausschließlich Liganden-gesteuert durch ihren endogenen Agonisten ATP aktiviert und bilden unspezifische Kationenkanäle. Eine Bindung von ATP führt zu einer schnellen Konformationsänderung, sodass die Kanalpore durchlässig für Natrium-, Kalium- und Calciumionen wird (Samways *et al.*, 2014). Insgesamt gibt es sieben verschiedene P2X-Rezeptorsubtypen (P2X<sub>1</sub>–P2X<sub>7</sub>), deren Tertiärstruktur aus zwei membrandurchspannenden Domänen gebildet wird. Die verschiedenen Untereinheiten können sich zu Homo- oder Heteromeren assoziieren und so funktionelle Ionenkanäle formen (Kim *et al.*, 1997). Alle P2X-Rezeptoren sind im Organismus weit verbreitet, insbesondere auch in neuronalem Gewebe. Ein einzelnes Neuron kann dabei durchaus unterschiedliche P2X-Untereinheiten ko-exprimieren (Nicke *et al.*, 1998; North, 2002).

Besonders die ausgeprägte Calciumpermeabilität ist eine wichtige Eigenschaft der P2X-Rezeptoren (Edwards, 1994; Pankratov *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2001). Calciuminflux wird üblicherweise über spannungsgesteuerte Calciumkanäle oder NMDA-Rezeptoren vermittelt, in beiden Fällen wird dies jedoch durch eine Membrandepolarisation bedingt. P2X-Rezeptoren können hingegen bei Ruhemembranpotentialen aktiviert werden und bilden somit eine wichtige Grundlage für die Aktivierung Calcium-induzierter intrazellulärer Signalwege auch bei weniger depolarisierten Membranzuständen.

Die Rezeptorsubtypen der P2Y-Familie sind im Gegensatz zu P2X-Rezeptoren metabotrope, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, von denen bei Säugern acht Subtypen (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> und P2Y<sub>11-14</sub>) bekannt sind, die alle in neuronalem Gewebe vorkommen (Burnstock, 2006; Jacobson *et al.*, 2012; Burnstock, 2013). Wie auch bei anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wird die Tertiärstruktur der P2Y-Rezeptoren typischerweise aus sieben Transmembrandomänen gebildet (Illes und Ribeiro, 2004; Jacobson *et al.*, 2012). P2Y-Rezeptoren weisen ein breiteres Spektrum an endogenen Agonisten als P2X-

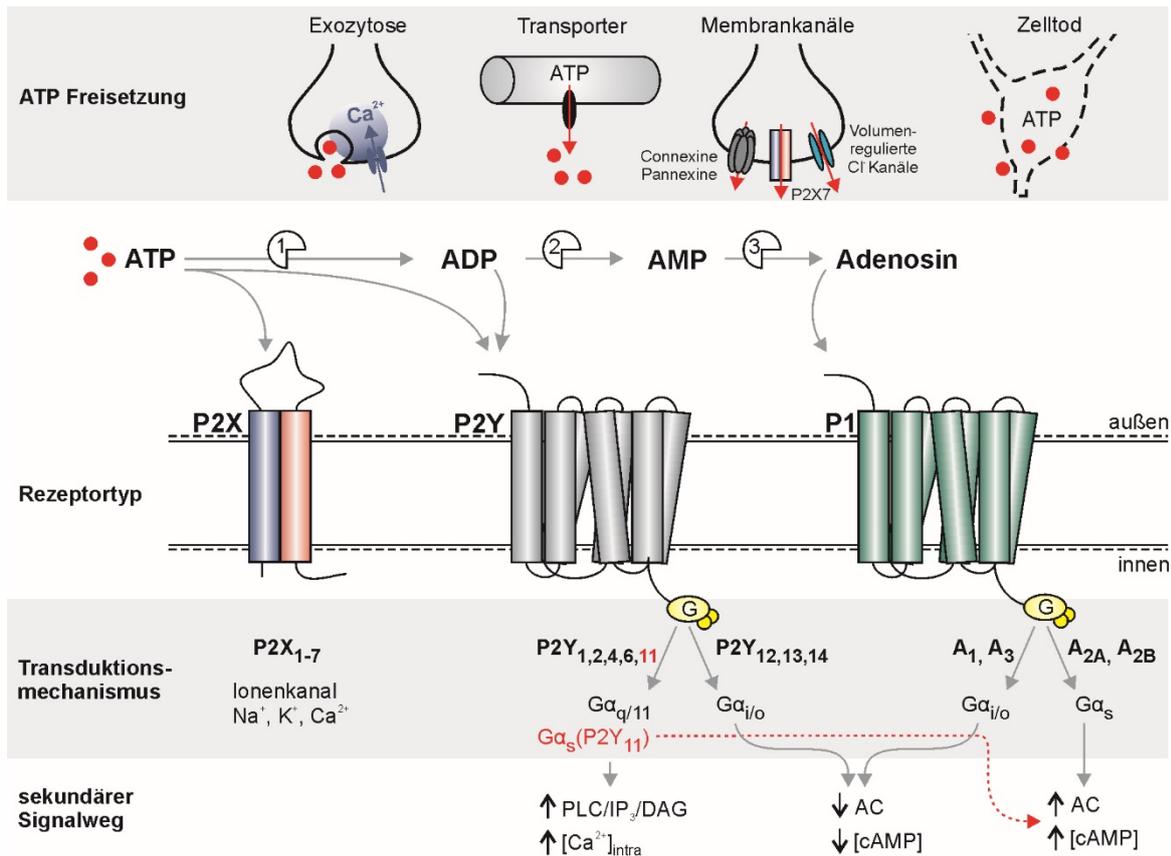
Rezeptoren auf. Neben ATP binden an einige Vertreter dieser Rezeptoren auch andere Adenin-Nukleotide, vor allem ADP. Der P2Y<sub>11</sub>-Subtyp kann neben ATP außerdem durch NAD<sup>+</sup> sowie NAADP<sup>+</sup> aktiviert werden (Burnstock, 2007b; Burnstock, 2008). Andere Vertreter sind zudem zusätzlich oder sogar ausschließlich affin für Pyrimidin-Nukleotide. So weist der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor eine gemischte Selektivität für Purine und Pyrimidine auf, während die Subtypen P2Y<sub>6</sub> und P2Y<sub>14</sub> selektiv für Uracil-Nukleotide sind.

Die P2Y-Rezeptor-aktivierten, intrazellulären Signalwege unterscheiden sich je nach G-Protein-Kopplung und unterteilen die P2Y-Rezeptoren abermals in zwei Gruppen. P2Y<sub>1</sub>-, P2Y<sub>2</sub>-, P2Y<sub>4</sub>-, P2Y<sub>6</sub>- und P2Y<sub>11</sub>-Rezeptoren sind überwiegend mit Gα<sub>q/11</sub>-Proteinen gekoppelt (Boyer *et al.*, 1994; Ralevic und Burnstock, 1998; Burnstock, 2006). Entsprechend wird die Phospholipase C (PLC) stimuliert, was in einer steigenden Konzentration an Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) resultiert und schließlich die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern mobilisiert. Die Gruppe der P2Y<sub>12</sub>-, P2Y<sub>13</sub>- und P2Y<sub>14</sub>-Rezeptoren ist bevorzugt mit einem Gα<sub>i/o</sub>-Protein gekoppelt (Burnstock, 2006; Boyer *et al.*, 1994). Die Aktivierung dieser Rezeptoren bewirkt eine Hemmung der Adenylatzyklase, was eine Herabsetzung des *second messengers* zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) zur Folge hat. Für P2Y<sub>11</sub>-Rezeptoren ist zusätzlich eine Kopplung an Gα<sub>s</sub>-Proteine beschrieben (Torres *et al.*, 2002). Durch die Stimulation der Adenylatzyklase kommt es hier zu einer intrazellulären Erhöhung von cAMP.

### 1.1.2 Die P1-Rezeptorfamilie

Auch P1-Rezeptoren sind klassische, G-Protein-gekoppelte, metabotrope Rezeptoren aus sieben Transmembrandomänen. Sie werden endogen durch das Nukleosid Adenosin aktiviert und ihrerseits in die Subtypen A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> und A<sub>3</sub> unterteilt. Die Aktivierung von A<sub>1</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptoren hemmt aufgrund einer Gα<sub>i/o</sub>-Protein-Kopplung die Adenylatzyklase und bedingt einen niedrigeren cAMP-Spiegel (Freissmuth *et al.*, 1991; Jockers *et al.*, 1994; Palmer *et al.*, 1995). A<sub>2A</sub>- und A<sub>2B</sub>-Rezeptoren sind typischerweise mit Gα<sub>s</sub>-Proteinen gekoppelt (Marala und Mustafa, 1993; Pierce *et al.*, 1992). Über die Aktivierung der Adenylatzyklase kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration (van Calker *et al.*, 1979), infolgedessen die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) stimuliert wird und weitere Effektorproteine moduliert werden. A<sub>1</sub>-, A<sub>2B</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptoren entfalten ihre Wirkung außerdem über eine Interaktion mit Gα<sub>q/11</sub>-Proteinen (Asano *et al.*, 1995; Gerwins und Fredholm, 1995; Palmer *et al.*, 1995; Linden *et al.*, 1999), sodass ihre Aktivierung letztendlich die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern induziert.

Abbildung 1 zeigt schematisch die durch P1- und P2-Rezeptoren vermittelten Signalwege und verdeutlicht die vielfältigen Wirkmechanismen puriniger Signaltransmission.



**Abbildung 1: Zusammenspiel der Bestandteile des purinergen Transmittersystems.** Nucleotide und Nucleoside werden exozytotisch oder über andere Mechanismen in den Extrazellularraum abgegeben. ATP bindet entweder an ionotrope P2X-Rezeptoren oder metabotrope P2Y-Rezeptoren. ATP wird von verschiedenen extrazellulären Enzymen zu ADP, AMP und Adenosin abgebaut (1: Ekto-NTPDase; 2: ATP-diphosphohydrolase; 3: Ekto-5'-Nucleotidase). ADP und Adenosin wirken dann über die Aktivierung von P2Y-Rezeptoren oder Adenosinrezeptoren (P1-Rezeptoren). P1- und P2Y-Rezeptoren aktivieren, je nach G-Protein-Kopplung, unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden. PLC, Phospholipase C; IP<sub>3</sub>, Inositoltrisphosphat, DAG, Diacylglycerin; AC, Adenylatcyclase; cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat.

### 1.1.3 ATP und Adenosin als Modulatoren synaptischer Transmission

In der purinergen Signaltransmission spielt neben der schnellen Neurotransmission über ATP-regulierte Ionenkanäle der Postsynapse (P2X-Rezeptoren) vor allem die Modulation der synaptischen Transmission anderer Neurotransmitter eine Rolle. So wirken Purine oftmals als sogenannte Neuromodulatoren, die nicht selber ein inhibitorisches oder exzitatorisches postsynaptisches Potential auslösen, sondern vielmehr die Wirkung postsynaptischer Potentiale beeinflussen.

Die Beeinflussung der präsynaptischen Transmitterfreisetzung ist dabei häufig Ziel einer solchen purinergen Neuromodulation und kann sowohl über die Aktivierung von P2X- als auch P2Y-Rezeptoren kontrolliert werden. Im Fall von P2X-Rezeptoren, die *per se*

calciumpermeabel sind, werden beispielsweise calciumabhängige Prozesse in der Präsynapse verstärkt, was unter anderem in einer Begünstigung der Neurotransmitterfreisetzung resultiert (Queiroz *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005). Über eine Modulation von spannungsaktivierten Calciumkanälen (*voltage activated calcium channel*, VACC) wirken P2Y-Rezeptoren hingegen überwiegend inhibitorisch auf die Transmitterfreisetzung (Queiroz *et al.*, 2003; Gerevich *et al.*, 2004; Lechner *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2005), wobei für P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren auch eine Begünstigung der Transmitterfreisetzung beschrieben ist (Chandaka *et al.*, 2011).

Purine kontrollieren aber nicht nur die präsynaptische Funktion von Zellen, sondern beeinflussen auch die Wirkung von Neurotransmittern an der Postsynapse. So modulieren postsynaptisch lokalisierte P2Y-Rezeptoren die Erregbarkeit von Neuronen häufig über eine Modulation von Ionenkanälen. Erhöht wird die Erregbarkeit der postsynaptischen Zelle dabei meist über eine Aktivierung von Kationen- oder eine Inhibition von Kaliumströmen (O'Grady *et al.*, 1996; Filippov *et al.*, 2006; Kawamura *et al.*, 2004; Filippov *et al.*, 2006). Eine Herabsetzung der Erregbarkeit von Neuronen wird zumeist über eine P2Y-Rezeptor-vermittelte Aktivierung von Kaliumströme bewirkt (Mosbacher *et al.*, 1998; Filippov *et al.*, 2004).

Auch Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sind häufig Ziel purinerger Neuromodulation. So werden beispielsweise postsynaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren durch die Aktivierung der  $\beta,\gamma$ -Untereinheit von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in Pyramidenzellen des präfrontalen Cortex inhibiert (Luthardt *et al.*, 2003; Guzman *et al.*, 2005). Außerdem wurde die Sensitivität postsynaptischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in Purkinje Zellen des Kleinhirns durch eine P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-induzierte, G $\alpha_q$ -vermittelte Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration erhöht (Saitow *et al.*, 2005). Interessanterweise können P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren auch die Aktivität anderer purinerger Rezeptoren beeinflussen. So wurde bereits gezeigt, dass P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren mit P2X-Rezeptoren interagieren, was zu einer Inhibition P2X-Rezeptor-vermittelter Ströme führte (Gerevich *et al.*, 2005; Gerevich *et al.*, 2007).

Werden postsynaptische P2X- oder P2Y-Rezeptoren durch ATP aktiviert, wird die Transmission unter anderem dadurch beendet, dass ATP enzymatisch hydrolysiert wird. ATP-abbauende Enzyme werden in unterschiedliche Gruppen eingeteilt, zu denen unter anderem die Ekto-5'-Nukleotidasen (CD73) sowie die Alkalischen Phosphatasen gehören. Alkalische Phosphatasen katalysieren den direkten Abbau zum Endprodukt Adenosin, über die Ekto-NTPDase bzw. ATP-diphosphohydrolyase wird ATP erst zu ADP und AMP hydrolysiert und anschließend über die Ekto-5'-Nukleotidase zu Adenosin abgebaut (Zimmermann, 2000). Die katalytische Effizienz der Ektonukleotidasen ist dabei so hoch, dass Adenosin innerhalb von 50 bis 100 ms nach der Freisetzung von ATP entstehen kann (Dunwiddie *et al.*, 1997). Hieraus wird deutlich, dass der beschriebene Katalyseweg nicht nur

dem Abbau von ATP, sondern auch der Bereitstellung von Adenosin als Neuromodulator dient. Neben dieser Form der Bereitstellung kann Adenosin auch über Transportmoleküle in den synaptischen Spalt entlassen werden (White und MacDonald, 1990).

Auch Adenosin beeinflusst synaptische Funktionen und moduliert damit neuronale Aktivität (Cunha, 2001; Ribeiro und Sebastião, 2010; Köles *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu ATP wirkt es allerdings ausschließlich neuromodulatorisch. Seine Wirkung entfaltet es aber ebenfalls über die Beeinflussung neurosekretorischer Prozesse an der Präsynapse oder über eine Modulation von Rezeptor- bzw. Kanaleigenschaften an der Postsynapse. In Neuronen sind hierfür vor allem die hoch affinen  $A_1$ - und  $A_{2A}$ -Rezeptoren verantwortlich. Ähnlich wie bei P2Y-Rezeptoren ist für  $A_1$ -Rezeptoren mehrfach eine direkte, G-Protein-vermittelte Interaktion mit VACCs beschrieben, die in einer Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung aufgrund eines reduzierten Calciuminflux in die Präsynapse resultiert (Mogul *et al.*, 1993; Yawo und Chuhma, 1993; Gonçalves und Queiroz, 2008). Ebenso kann Adenosin an der Postsynapse Effekte hervorrufen, indem eine Stimulation von  $A_1$ -Rezeptoren auch hier Kaliumkanäle aktiviert, sodass die postsynaptische Membran über eine erhöhte Kaliumleitfähigkeit hyperpolarisiert und die Erregbarkeit der Zelle herabgesetzt wird (Segal, 1982; Trussell und Jackson, 1985; Gerber *et al.*, 1989). Da  $A_1$ -Rezeptoren oftmals an exzitatorischen Synapsen exprimiert sind (Daly und Padgett, 1992; Goodman *et al.*, 1983), wirkt ihre Aktivierung eher dämpfend auf die neuronale Aktivität.  $A_1$ -Rezeptor-Agonisten sind daher aufgrund ihrer sedativen, antikonvulsiven und anxiolytischen Eigenschaften in der medizinischen Forschung von großer Bedeutung.

Adenosin wirkt jedoch nicht ausschließlich inhibitorisch. So führt die Aktivierung von  $A_{2A}$ -Rezeptoren zu einer Begünstigung der Transmitterfreisetzung. Eine  $A_{2A}$ -Rezeptor-vermittelte vermehrte Ausschüttung von Glutamat konnte beispielsweise im Hippocampus gezeigt werden, was entsprechend eine verstärkte exzitatorische Reaktion der postsynaptischen Zelle hervorrief (Okada *et al.*, 1992). Welche intrazellulären Signalwege hier beteiligt sind, ist allerdings noch nicht endgültig geklärt. Eine über die Proteinkinase C-vermittelte Modulation von VACCs scheint aber das letztendliche Ziel zu sein (Mogul *et al.*, 1993). An inhibitorischen Synapsen ist die Wirkung von Adenosin über  $A_1$ - oder  $A_{2A}$ -Rezeptoren weitaus weniger gut erforscht und in verschiedenen Hirnregionen sehr divers. Beide Rezeptortypen können die Transmitterfreisetzung, von beispielsweise GABA, entweder hemmen oder fördern (Cunha, 2001).

In vielen Hirngebieten und im peripheren Nervensystem sind die Wirkungen von Purinen durchaus gut untersucht, eher wenig ist darüber in sensorischen Systemen bekannt (Housley *et al.*, 2009; Lohr *et al.*, 2014). Der *Bulbus olfactorius* ist hierbei sicherlich eines der interessantesten Hirngebiete: er ist Ort der ersten zentralnervösen Analyse von Riechinformationen und beinhaltet ein komplexes, in mehreren Ebenen organisiertes

neuronales Netzwerk. Aufgrund der spezifischen Verbindungen dieses Netzwerkes eignet er sich außerordentlich gut, um neuronale Netzwerke, deren Dynamiken sowie synaptische Integration und Prozessierung zu untersuchen. Des Weiteren wird zunehmend deutlich, dass der olfaktorische *Bulbus* eine Hirnregion ist, in der erste präpathologische oder pathologische Charakteristika neurodegenerativer Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson und Multipler Sklerose sichtbar werden (Wilson *et al.*, 2009; Stephenson *et al.*, 2010; Cavaco *et al.*, 2015; DeLuca *et al.*, 2015). Die Kenntnis seiner Netzwerkdynamiken sowie der involvierten Transmittersysteme ist daher nicht nur wichtig, um die Prozessierung olfaktorischer Information besser zu verstehen, sondern auch um physiologische Veränderungen im Frühstadium verschiedener Krankheitsbilder zu erkennen.

Darüber hinaus ist die Aktivität extrazellulärer ATP-abbauender Enzyme im *Bulbus olfactorius* besonders hoch, was für eine bedeutende Rolle des purinergen Systems in diesem Hirngebiet spricht (Langer *et al.*, 2008). Da der Einfluss purinerner Signaltransmission auf neuronale Netzwerke in der vorliegenden Arbeit aus den genannten Gründen im *Bulbus olfactorius* untersucht wurde, wird im Folgenden detailliert auf den Aufbau und die neuronale Organisation des olfaktorischen Systems in Säugetieren eingegangen.

## 1.2 DAS OLFAKTORISCHE SYSTEM DER MAMMALIA

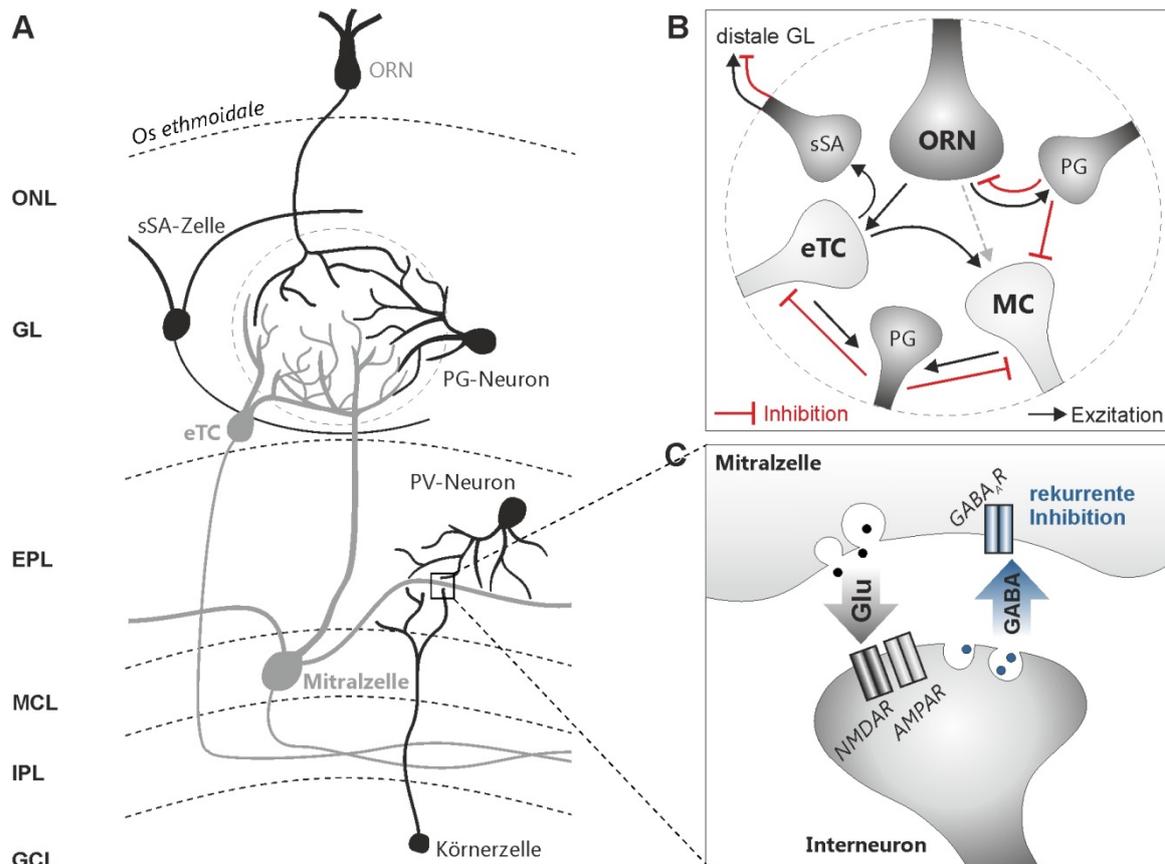
Säugetiere sind in der Lage, Duftmoleküle in kleinsten Mengen wahrzunehmen und zwischen unzähligen verschiedenen Substanzen zu unterscheiden. An der Detektion und Verarbeitung von Duftsignalen sind im olfaktorischen System der Mammalia unterschiedliche funktionelle Einheiten beteiligt. Das Sinnesepithel des Geruchssystems liegt in der Nasenhöhle, hier werden die Duftmoleküle detektiert. Die Information wird anschließend in den *Bulbus olfactorius* weitergeleitet, der an der vorderen Basis des Gehirns lokalisiert ist. Nach der Vorprozessierung im olfaktorischen *Bulbus* gelangen die Riechinformationen über den *Tractus olfactorius* zu höheren Verarbeitungszentren im *Telencephalon* und werden dort zu einem Sinneseindruck interpretiert (Shipley und Ennis, 1996). Getrennt vom olfaktorischen Hauptsystem gibt es zusätzlich das Vomeronasalorgan, welches an der Detektion von Pheromonsignalen beteiligt ist.

Die Wahrnehmung eines Geruchs beginnt im Riechepithel der Nasenhöhle. Beim Ein- und Ausatmen werden Duftmoleküle mit dem Luftstrom an das Epithel herangetragen und dort über olfaktorische Rezeptorneurone (ORN) detektiert. Neben den ORN sind im Riechepithel weitere Zelltypen vorhanden, zu denen unter anderem undifferenzierte Basalzellen und Stützzellen zählen. Basalzellen dienen der Regeneration des Epithels, indem sie regelmäßig

zu neuen ORN proliferieren und abgestorbene Zellen ersetzen. Die ORN selbst liegen eingebettet zwischen den Stützzellen und senden einen apikalen Fortsatz zur Oberfläche des Epithels. Dieser verdickt sich am Ende zu einem Kolben, der zahlreiche Zilien trägt, an denen die eigentliche Chemorezeption stattfindet. An den Zilien sind die Geruchsrezeptoren lokalisiert, von denen in Säugetieren bis zu 1000 verschiedene Typen evolviert sind. Die Genklasse der Geruchsrezeptoren stellt damit die größte Genfamilie im Erbgut der Säuger dar (Buck und Axel, 1991; Zhang und Firestein, 2002; Spehr und Munger, 2009; Adipietro *et al.*, 2012). Diese Vielfalt an Rezeptortypen trägt dazu bei, dass bis zu  $10^{12}$  Gerüche unterschieden werden können (Bushdid *et al.*, 2014). Jedes ORN exprimiert von diesen Rezeptoren allerdings nur einen einzigen Rezeptortyp, sodass verschiedene Duftmoleküle unterschiedliche ORN stimulieren und folglich jedes Duftmolekül ein individuelles Muster an aktivierten ORN hervorruft (Malnic *et al.*, 1999).

Bindet ein Duftmolekül an einen der metabotropen Geruchsrezeptoren, wird intrazellulär ein G-Protein vom Typ  $G_{\text{olf}}$  aktiviert. Hierdurch kommt es zu einer Stimulation der Adenylatzyklase III und die intrazelluläre cAMP-Konzentration wird erhöht. Das cAMP interagiert mit Kationenkanälen des CNG-Typ in der Zellmembran, sodass es in Folge einer Konformationsänderung zu einem  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom kommt. Hierdurch wird die Zelle initial depolarisiert und es öffnen sich  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Chloridkanäle. Aufgrund der hohen intrazellulären Chloridkonzentration in ORN kommt es zu einem Chloridausstrom, sodass die Membran weiter depolarisiert wird und beim Überschreiten des Schwellenpotentials schließlich Aktionspotentiale ausgelöst werden (Schild und Restrepo, 1998). Diese werden entlang der Axone der ORN weitergeleitet, welche über die Siebbeinplatte in den olfaktorischen *Bulbus* und damit das ZNS einwachsen.

Der *Bulbus olfactorius* ist primäres Zentrum für die Verschaltung und Weiterleitung olfaktorischer Informationen vom Riechepithel zu höheren Zentren im olfaktorischen Cortex und hat sich im Verlauf der Wirbeltierevolution als hoch konservierte Struktur ausgezeichnet (Satou *et al.*, 2005). Histologisch ist er in charakteristischen Schichten aufgebaut, von denen die äußere, die Nervenfaserschicht, aus den Axonen der ORN und einem speziellen Gliazelltyp, den sogenannten olfaktorischen Hüllgliazellen (*olfactory ensheathing cells*, OEC), gebildet wird. Auf ihrem Weg in den *Bulbus olfactorius* werden die Axone entsprechend des von den ORN exprimierten Geruchsrezeptortyps mithilfe der OEC zu Axonbündeln sortiert. Aus dieser Schicht gehen die Axonbündel ab und formen in der darauffolgenden Schicht zusammen mit weiteren Zelltypen stark neuropil-haltige, sphärische Strukturen – die sogenannten Glomeruli. An die Glomerularschicht schließt sich die externe plexiforme Schicht an, gefolgt von der Mitralzellschicht, der internen plexiformen Schicht und der am tiefsten gelegenen Körnerzellschicht. Die Prinzipalneurone des *Bulbus olfactorius* bilden Mitral- und *tufted*-Zellen, die über Synapsen mit zahlreichen Interneuronen verbunden sind. Abbildung 2A zeigt schematisch die neuronale Organisation im *Bulbus olfactorius*.



**Abbildung 2: Organisation des neuronalen Netzwerks im *Bulbus olfactorius*.**  
**A)** Olfaktorische Rezeptorneurone (ORN) projizieren in einen Glomerulus, wo sie über glutamaterge Synapsen mit Mitralzellen und externalen *tufted*-Zellen (eTC) verschaltet sind. Periglomeruläre Neurone (PG-Neuron) werden ebenfalls durch Aktivität der ORN erregt und wirken auf Mitralzellen und eTC über zumeist GABAerge Synapsen. Des Weiteren wird das neuronale Netzwerk in der Glomerularschicht (GL) von glutamatergen superfiziellen *short axon*-Zellen (sSA-Zelle) gebildet. Weitere GABAerge Eingänge erhalten Mitralzellen und eTC über Ihre lateralen Dendriten in der externen plexiformen Schicht (EPL) von Körnerzellen und Parvalbumin-Interneuronen (PV-Neuron). In der internen plexiformen Schicht (IPL) verlaufen die Axone der Mitralzellen und eTC. ONL, Nervenfaserschicht; MCL, Mitralzellschicht; GCL, Körnerzellschicht.  
**B)** Schematische Darstellung der gegenseitigen Wechselwirkungen der Neurone eines glomerulären Schaltkreises. **C)** Mechanismus der rekurrenten Inhibition in Mitralzellen.

Die Verarbeitung der Geruchsinformation beginnt damit, dass die Masse an teilweise tausendfach gleichzeitig eingehenden Signalen deutlich reduziert wird. Dafür weist das Geruchssystem eine extreme Konvergenz auf, beginnend mit den Projektionen von den ORN zu den Glomeruli. So laufen im Schnitt bis zu 10000 Axone in einem Glomerulus zusammen (Axel, 1995; Christie und Westbrook, 2003), wobei alle Axone der ORN, die denselben Geruchsrezeptortyp exprimieren, in einigen wenigen Glomeruli zusammengefasst werden. In einen Glomerulus projizieren wiederum nur ca. 20 Mitralzellen mit ihren primären

Dendriten. Da nur ORN, die den gleichen Rezeptortyp exprimieren, in denselben Glomerulus projizieren, wird ermöglicht, dass eine Mitralzelle immer nur Informationen von ORN gleicher Selektivität weitergibt. Durch diesen Mechanismus ergibt sich für verschiedene Gerüche ein charakteristisches Muster der Aktivität von ORN, Glomeruli sowie Mitralzellen. Diese geruchsspezifischen Aktivitätsmuster werden auch als *odor code* bezeichnet, der in den höheren Hirnzentren zu einer Geruchswahrnehmung interpretiert wird.

Um aus der von den ORN eingebrachten Information eine korrekte Geruchsinformation zu filtern, bedarf es allerdings einer komplizierten synaptischen Integration, die in den Glomeruli beginnt.

### 1.2.1 Die erste Ebene der Verarbeitung: das glomeruläre Netzwerk

Die Glomerularschicht bildet die erste Verarbeitungsebene, in der die von den ORN eingehenden Informationen synaptisch prozessiert werden. Die Glomeruli beinhalten die axonalen Endigungen der ORN, die apikalen Dendriten von Mitral- und *tufted*-Zellen sowie die Ausläufer verschiedener juxtaglomerulärer Zellen, zu denen sowohl Astrozyten als auch Neurone gehören. Umgeben sind die Glomeruli von den Somata dieser juxtaglomerulären Zellen, von denen die Neurone morphologisch sehr heterogen sind und in drei Typen unterteilt werden: Periglomeruläre Zellen (PG-Zellen), superfizielle *short axon*-Zellen (sSA-Zellen) und externale *tufted*-Zellen (eTC; Nagayama *et al.*, 2014). Letztere bilden eine Subpopulation der *tufted*-Zellen, die neben Mitralzellen zu den Prinzipalneuronen des olfaktorischen *Bulbus* zählen. Bei PG- und sSA-Zellen handelt es sich um lokale Interneurone, die keine anderen Hirnregionen innervieren. Untereinander bilden die Neuronentypen der Glomerularschicht komplexe, synaptische Netzwerke (Abbildung 2B).

eTC besitzen einen weit verzweigten primären Dendritenbaum (sog. *tuft*) und ein unverzweigtes Axon, welches vertikal durch die nachfolgende externe plexiforme Schicht läuft. Auffälliger als ihre Morphologie sind jedoch die physiologischen Eigenschaften der eTC. Aufgrund intrinsischer Membraneigenschaften sind sie in der Lage, rhythmische Salven von Aktionspotentialen (*bursts*) zu generieren und koordinieren als exzitatorisches Element maßgeblich die Aktivität des glomerulären Netzwerks (Hayar *et al.*, 2004b; Saint Jan *et al.*, 2009). Hierfür setzen sie als Transmitter hauptsächlich Glutamat frei, worüber die anderen Neuronentypen erregt werden. Über eine monosynaptische Verbindung zu den ORN erhalten sie selber ebenfalls glutamaterge Eingänge (Hayar *et al.*, 2004a), wobei sie in der Lage sind, besonders empfindlich auf diese Signale zu reagieren. So können eTC bereits bei mäßig bis schwachen Geruchssignalen aktiviert werden. Mitralzellen werden über eine exzitatorische Synapse zu den eTC hingegen meist erst in einem nachgeschalteten Prozess erregt, da ein monosynaptischer *input* von ORN nur durch besonders starke Signale möglich ist (Gire *et al.*, 2012; Igarashi *et al.*, 2012).

eTC und Mitralzellen weisen außerdem synaptische Verbindungen zu PG-Zellen auf (Wachowiak und Shipley, 2006). Diese stellen die in der Glomerularschicht am häufigsten vorkommende Neuronengruppe dar (Pinching und Powell, 1971). Sie bilden einen Dendritenbaum aus, der in der Regel in nur einen Glomerulus projiziert. Neben den Dendriten können sie auch ein Axon besitzen, welches im Interglomerularraum endet (Pinching und Powell, 1971). Histologische Studien zeigen, dass PG-Zellen positiv für die Tyrosin-Hydroxylase (TH), einem Enzym in der Katecholaminsynthese, sowie für GAD67, einer Glutamatdecarboxylase, sind und daher als Transmitter hauptsächlich GABA und Dopamin verwenden (Parrish-Aungst *et al.*, 2007; Nagayama *et al.*, 2014).

Das Neuropil eines Glomerulus weist eine komplexe subkompartimentelle Organisation auf. So sind innerhalb eines Glomerulus Zonen, in denen dendritische Aufzweigungen anderer Neurone sensorischen *input* von den ORN erhalten, klar von denjenigen Zonen abgegrenzt, in denen ORN-Axonendigungen ausgeschlossen sind. Anhand dieser Verschaltungen werden PG-Zellen in Typ I- und Typ II-Zellen eingeteilt: Typ I-Zellen erhalten sowohl direkten synaptischen *input* von den ORN als auch von Zellen aus dem Netzwerk des olfaktorischen *Bulbus* (Wachowiak und Shipley, 2006). Typ II-Zellen stehen hingegen nur mit verschiedenen bulbären Neuronentypen in Verbindung (Kosaka *et al.*, 1996; Kosaka *et al.*, 1998). Die Synapsen zwischen PG-Zellen und Mitralzellen sowie eTC sind dabei von besonderer Morphologie, da es sich um sogenannte dendrodendritische, reziproke Synapsen handelt, die eine rekurrente Inhibition des exzitatorischen Neurons hervorrufen und damit intraglomerulare Inhibition vermitteln. Der Mechanismus dendrodendritischer Synapsen wird im nächsten Abschnitt detailliert erläutert (siehe 1.2.2.). Typ I-PG-Zellen setzen bei Erregung durch die ORN GABA und Dopamin frei. Über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren inhibiert dies ebenfalls Mitralzellen und eTC. Zusätzlich werden aber auch präsynaptische GABA<sub>B</sub>- und Dopamin-D2-Rezeptoren an den Axonterminalen der ORN angesprochen, sodass die präsynaptische Freisetzung von Glutamat reduziert wird (Nickell *et al.*, 1994; Ennis *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2004).

sSA-Zellen bilden die dritte Neuronenpopulation im Glomerulus und erhalten nur von eTC synaptische Eingänge (Hayar *et al.*, 2004a). sSA-Zellen besitzen typischerweise lange neuronale Fortsätze, die keine *tufte* bilden. Dennoch können die Dendriten dieser Zellen mit bis zu 50 Glomeruli in Kontakt treten und ihre Axone können mit einer Länge von bis zu 1 mm extensive interglomeruläre Netzwerke bilden (Kosaka und Kosaka, 2011). sSA-Zellen sind überwiegend dopaminerg und GABAerg (Kiyokage *et al.*, 2010), allerdings gibt es vermutlich mindestens eine glutamaterge Subpopulation (Aungst *et al.*, 2003). Des Weiteren gibt es sSA-Zellen, deren Axon nur 50 bis 100 µm lang ist und deren Dendrit nicht in Kontakt mit den Glomeruli steht (Pinching und Powell, 1971). Da sSA-Zellen über ihr axonales Netzwerk interglomeruläre Verbindungen herstellen, führt die Erregung dieser Zellen in distalen Glomeruli - je nach Neurotransmitterausstattung - zur interglomerulären lateralen

Inhibition oder Exzitation verschiedener dort ansässiger Neuronentypen (Wachowiak und Shipley, 2006; Aungst *et al.*, 2003; Vaaga *et al.*, 2017).

### 1.2.2 Die zweite Ebene der Verarbeitung: die externe plexiforme Schicht

Die externe plexiforme Schicht ist die zweite Verarbeitungsebene im *Bulbus olfactorius* und der Glomerularschicht zeitlich sowie räumlich nachgeschaltet. Die in den Glomeruli prozessierte Geruchsinformation breitet sich in Form von Aktionspotentialen vertikal entlang der Dendriten der Prinzipalneurone aus, bis sie die Zellkörper in der externen plexiformen Schicht bzw. in der Mitralzellschicht erreicht. Bevor die Information an den Cortex weitergeleitet wird, wird sie allerdings nicht nur in der Glomerularschicht, sondern auch in der externen plexiformen Schicht über eine Reihe neuronaler Schaltkreise verarbeitet. Hierfür besitzen Mitralzellen und teilweise auch *tufted*-Zellen neben ihrem apikalen Dendriten einen weiteren dendritischen Komplex, die lateralen (sekundären) Dendriten (Macrides und Schneider, 1982). Über diese Dendriten wird die Information auch in horizontaler Ebene fortgeleitet, bis sie durch lokale inhibitorische Schaltkreise blockiert wird (Xiong und Chen, 2002). Solche synaptischen Verschaltungen in der externen plexiformen Schicht (und auch in der Glomerularschicht) sind typischerweise aus den Dendriten von Mitral- und *tufted*-Zellen sowie den dendritischen Fortsätzen lokaler Interneurone aufgebaut, weswegen sie als dendrodendritische Synapsen bezeichnet werden. Diese Synapsen bilden die morphologische Basis der sogenannten rekurrenten Inhibition (RI) im *Bulbus olfactorius* (Phillips *et al.*, 1963; Nicoll, 1969; Isaacson und Strowbridge, 1998).

Mitral- und *tufted*-Zellen besitzen entlang ihrer Dendriten neben spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanälen auch funktionelle Calciumkanäle, sodass bei horizontaler Verbreitung der Erregung calciumabhängig Glutamat freigesetzt wird. Dies wiederum wirkt über NMDA- und AMPA-Rezeptoren exzitatorisch auf umliegende Interneurone (Wellis und Scott, 1990), welche daraufhin GABA ausschütten. Über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren wird in der Folge die Mitralzelle über einen *feedback*-Mechanismus selbst inhibiert (Wellis und Kauer, 1993). Diese Synapsen werden daher auch als reziprok und die aus der synaptischen Übertragung folgende Inhibition der Mitralzelle als rekurrent bezeichnet (Abbildung 2C). Reziproke Synapsen in der externen plexiformen Schicht werden zwischen verschiedenen Neuronentypen ausgebildet, am intensivsten wurde die RI bisher aber zwischen Mitral- und Körnerzellen untersucht (Rall *et al.*, 1966; Jackowski *et al.*, 1978; Isaacson und Strowbridge, 1998; Shepherd *et al.*, 2007). Charakteristischerweise wird die Exzitation der Körnerzelle und die anschließende GABA-Freisetzung maßgeblich über den NMDA-Rezeptor-vermittelten Calciumstrom bedingt (Chen *et al.*, 2000; Halabisky *et al.*, 2000; Isaacson, 2001; Egger *et al.*, 2003). Des Weiteren sind reziproke Synapsen zwischen Mitralzellen und Parvalbumin-

exprimierenden Interneuronen beschrieben. Im Gegensatz zur Körnerzellsynapse vermitteln hier allerdings calciumpermeable AMPA-Rezeptoren die GABA-Freisetzung und damit die Inhibition der Mitralzelle (Kato *et al.*, 2013; Miyamichi *et al.*, 2013). Zu welchem Anteil welcher Interneurontyp an der RI einer Mitralzelle beteiligt ist, ist noch unklar. Daneben findet vor allem auch in der Glomerularschicht RI statt, die von GABAergen PG-Zellen vermittelt wird (Gire und Schoppa, 2009).

Neben GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren besitzen Mitralzellen außerdem Glutamatrezeptoren. Bei starker Erregung und entsprechend großen Mengen an freigesetztem Glutamat kommt es, neben der Initiierung der RI, auch zu einem Prozess der Autoexzitation, bei dem Glutamat aus der Zelle an NMDA-Autorezeptoren bindet und ein exzitatorisches postsynaptisches Potential in der Mitralzelle selbst ausgelöst wird (Isaacson, 1999; Salin *et al.*, 2001).

Die physiologische Relevanz der RI ist noch nicht abschließend geklärt. Reziproke Synapsen scheinen aber eine wichtige Funktion bei der Geruchsdiskriminierung, Kontrastverschärfung, Kontrolle des sensorischen *output* von Mitralzellen sowie der Synchronisation neuronaler Aktivität und der Feineinstellung von geruchsspezifischen Aktivitätsmustern zu übernehmen (Yokoi *et al.*, 1995; Abraham *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2013; Miyamichi *et al.*, 2013; Fukunaga *et al.*, 2014; Gschwend *et al.*, 2015).

In der externen plexiformen Schicht befinden sich nur wenige Zellkörper, unter anderem aber die Somata der verschiedenen Populationen von *tufted*-Zellen. Die bereits erwähnten eTC sind am Übergang zur oder bereits innerhalb der Glomerularschicht lokalisiert (Pinching und Powell, 1971), mittlere *tufted*-Zellen sind im oberen bis mittleren Bereich der externen plexiformen Schicht angeordnet und internale *tufted*-Zellen liegen mit ihren Somata nahe der Mitralzellschicht (Orona *et al.*, 1984; Shepherd, 2004). Die sekundären Dendriten der mittleren und tiefliegenden *tufted*-Zellen erstrecken sich in den oberen bis mittleren Lagen der externen plexiformen Schicht, in den tieferen Schichten der externen plexiformen Schicht sind hingegen keine dendritischen Fortsätze zu finden (Orona *et al.*, 1984). *Tufted*-Zellen sind den Mitralzellen sowohl morphologisch als auch physiologisch sehr ähnlich. Beide besitzen einen apikalen Dendriten, der in einen einzigen Glomerulus projiziert und sich dort zu einem *tuft* verzweigt. Ebenso gehen beide Zelltypen über ihre lateralen Dendriten dendrodendritische, reziproke Synapsen ein (Christie *et al.*, 2001). Zwischen Mitral- und *tufted*-Zellen gibt es aber durchaus einige Unterschiede. Zunächst können sie anhand der Lage ihrer Zellkörper deutlich voneinander unterschieden werden. Im Gegensatz zu *tufted*-Zellen liegen Mitralzellen direkt benachbart mit ihren Somata nebeneinander in einer Zellschicht. Man vermutet, dass Neurone, die nah beieinanderliegen, vermehrt über reziproke Synapsen miteinander interagieren, sodass eine Kommunikation zwischen Mitralzellen im Vergleich zu *tufted*-Zellen mutmaßlich verstärkt stattfindet (Kikuta *et al.*, 2013). Hinzu kommt, dass sich die sekundären Dendriten der Mitralzellen eher im unteren

Mittel sowie in den tieferen Schichten der externen plexiformen Schicht erstrecken und sich damit vom Verbreitungsmuster der lateralen Dendriten von *tufted*-Zellen unterscheiden (Mori *et al.*, 1983; Orona *et al.*, 1984). Des Weiteren innervieren die axonalen Projektionen von Mitral- und *tufted*-Zellen unterschiedliche Bereiche des olfaktorischen Cortex (Haberly und Price, 1977; Skeen und Hall, 1977; Scott *et al.*, 1980). Physiologisch gesehen generieren *tufted*-Zellen mit einer höheren Frequenz Aktionspotentiale (Nagayama *et al.*, 2004) und sprechen auf ein breiteres Spektrum an Düften an als Mitralzellen (Nagayama *et al.*, 2004; Kikuta *et al.*, 2013).

Mitralzellen selbst sind von ihrer Morphologie her sehr heterogen und haben dreieckige, runde oder spindelförmige Zellkörper. Physiologisch weisen eine Vielzahl von Mitralzellen biphasische Membranpotentialverläufe auf (Heyward *et al.*, 2001). Diese charakterisieren sich durch einen depolarisierten *upstate* sowie einen hyperpolarisierten *downstate*, in denen die Zelle während der *upstates* erregbarer für Signale der ORN ist. Durch diese Bistabilität ist es einer Zelle möglich, Zustände mit variierenden Erregungsschwellen und oszillatorischen Rhythmiken herzustellen (Llinás, 1988). Im Gegensatz zu *tufted*-Zellen, deren persistierende Aktivität auf intrinsischen Membraneigenschaften beruht (Heyward *et al.*, 2001; Hayar *et al.*, 2004b; Major und Tank, 2004), wird die Membranbistabilität von Mitralzellen vermutlich synaptisch über externe Faktoren gesteuert (Sanchez-Vives und McCormick, 2000; Shu *et al.*, 2003; Roux *et al.*, 2015).

Neben den Projektionsneuronen finden sich ebenfalls verschiedene Interneurontypen in der externen plexiformen Schicht. Hierzu zählen die bereits erwähnten Parvalbumin-positiven Interneurone, sowie *short axon*-Zellen, *Van Gehuchten*-Zellen und Somatostatin-immunreaktive Zellen (Shepherd, 2004; Schneider und Macrides, 1978; Nagayama *et al.*, 2014). Diese sind überwiegend GABAerg und an inhibitorischen Verschaltungen mit Mitral- und *tufted*-Zellen beteiligt.

Auf die Mitralzellschicht am innersten Ende der externen plexiformen Schicht folgt die interne plexiforme Schicht. Hier laufen die Axone von Mitral- und *tufted*-Zellen zum *lateral olfactory tract* (LOT) zusammen und werden in höhere Hirnzentren gesendet. Diese Schicht ist äußerst dünn und enthält nur wenige Zellsomata.

Die Somata der Körnerzellen sind in der Körnerzellschicht lokalisiert. Sie bilden die größte Population GABAerger lokaler Interneurone im *Bulbus olfactorius*. Ihre Dendriten erstrecken sich in der externen plexiformen Schicht und verzweigen sich dort in dendritische Dornen (*spines*). An diesen *spines* sind die synaptischen Endigungen lokalisiert, welche Bestandteil der oben beschriebenen reziproken Synapsen mit Mitral- und *tufted*-Zellen sind (Shepherd, 2004). Neben Körnerzellen befinden sich in der Körnerzellschicht zusätzlich tiefliegende *short axon*-Zellen, von denen es mehrere Subpopulationen gibt. Diese werden als *Blane*-Zellen, *Golgi*-Zellen, *Cajal*-Zellen und Horizontalzellen bezeichnet (Schneider und Macrides,

1978; Shepherd, 2004; Eyre *et al.*, 2008). Sie unterscheiden sich von Körnerzellen durch Dendriten, die nicht bis über die Mitralzellschicht hinausgehen, einen größeren Zellkörper und das Vorhandensein eines Axons. Die Axone dieser Zellen projizieren in unterschiedliche Schichten des *Bulbus olfactorius*, mitunter aber bis in die Glomerularschicht, wo sie axodendritische Synapsen mit PG-Zellen ausbilden (Eyre *et al.* 2008).

Die Beteiligung purinerge Signaltransmission an olfaktorischen Netzwerkdynamiken wird erst seit Kurzem untersucht und ist noch weitgehend unverstanden. Dabei gibt es einige histologische Hinweise, dass Purine eine wichtige Rolle bei der Informationsverarbeitung im *Bulbus olfactorius* spielen. Immunreaktivität findet sich sowohl gegen P2X-Rezeptoren (Collo *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 1997b; Lê *et al.*, 1998; Kanjhan *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2008) als auch P2Y-Rezeptoren, insbesondere gegen den P2Y<sub>1</sub>-Subtyp (Simon *et al.*, 1997b). Die physiologische Relevanz bulbärer purinerge Signaltransmission wurde bisher vor allem in Gliazellen untersucht. So ist bekannt, dass ATP als endogener Transmitter von den Axonen der ORN zusammen mit Glutamat sowohl synaptisch als auch extrasynaptisch freigesetzt wird (Thyssen *et al.*, 2010). In der Nervenfaserschicht aktiviert ATP P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren und führt zu einem Calciumsignal in OEC (Rieger *et al.*, 2007). In den Glomeruli wirkt synaptisch freigesetztes ATP auf benachbarte Astrozyten und induziert über die Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren die Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Speichern (Doengi *et al.*, 2008). Auch das ATP-Hydrolyseendprodukt Adenosin hat einen Effekt auf Gliazellen und evoziert über die Aktivierung von A<sub>2A</sub>-Rezeptoren Calciumsignale in juxtaglomerulären Astrozyten (Doengi *et al.*, 2008).

Welchen Einfluss Purine auf die neuronale Informationsverarbeitung nehmen, ist hingegen noch weitestgehend offen. Derzeit ist bekannt, dass ATP über die Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren eine Zunahme der neuronalen Netzwerkaktivität vermittelt (Fischer *et al.*, 2012). Des Weiteren moduliert Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelt die Membraneigenschaften von Mitralzellen und trägt so vermutlich zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses des sensorischen *output* bei (Rotermund *et al.*, 2017). Außerdem beeinflusst Adenosin den Kreislauf reziproker synaptischer Transmission, indem die Glutamatfreisetzung aus Mitralzellen reduziert wird, wie ich in meiner Masterarbeit zeigen konnte (Schulz, 2014).

### 1.3 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG

Purinerge Signaltransmission ist im olfaktorischen *Bulbus* offensichtlich von großer Bedeutung. ATP wird in diesem Hirngebiet als Ko-Transmitter freigesetzt, über seine Rolle ist allerdings noch wenig bekannt. ATP hat nachweislich einen Effekt auf Gliazellen (Rieger *et al.*, 2007; Doengi *et al.*, 2008). Daneben gibt es aber mittlerweile erste Erkenntnisse

darüber, dass auch Neurone durch purinerge Signalwege in ihrer Aktivität moduliert werden. Bisher ist bekannt, dass ATP via P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren die neuronale Netzwerkaktivität erhöht (Fischer *et al.*, 2012) und Adenosin die Membraneigenschaften von Mitralzellen sowie synaptische Transmission im *Bulbus olfactorius* beeinflusst (Schulz, 2014; Rotermund *et al.*, 2017). In dieser Arbeit soll sowohl die Wirkweise von ATP als auch von Adenosin als Modulator neuronaler Kommunikation im *Bulbus olfactorius* untersucht werden und folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- I. ATP als Neuromodulator: Die zugrundeliegenden Mechanismen der ATP-induzierten bulbären Netzwerkaktivierung sind noch nicht bekannt. Es soll daher insbesondere die Frage beantwortet werden, welche Neuronentypen funktionelle P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren exprimieren und damit durch ATP aktiviert werden. Des Weiteren soll ATP endogen freigesetzt werden und dessen Einfluss auf die Netzwerkaktivität untersucht werden.
  
- II. Adenosin als Modulator rekurrenter synaptischer Transmission: Es sollen die Mechanismen, die zur Adenosin-vermittelten Modulation reziproker synaptischer Übertragung führen, identifiziert werden.

Die Experimente in dieser Arbeit basieren auf Methoden der Elektrophysiologie, sowie *calcium imaging* und immunhistochemischen Färbungen. Mithilfe der Ergebnisse sollen neue Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie neuronale Netzwerkwerke durch purinerge Systeme beeinflusst werden können.

Ein Teil der Ergebnisse dieser Dissertation wurden unter folgendem Titel zur Veröffentlichung eingereicht:

**Schulz K**, Rotermund N, Grzelka K, Benz J, Lohr C, Hirnet D (2017). Adenosine A<sub>1</sub> receptor-mediated attenuation of reciprocal dendro-dendritic inhibition in the mouse olfactory bulb. *Front Cell Neurosci*. In press. doi:10.3389/fncel.2017.00435

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIALIEN

#### 2.1.1 Geräte

Folgende Geräte wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

##### *a. Laborgeräte*

Binokular:	Wild M7, Heerbrugg AG, Schweiz
Clean Bench:	AirClean 600 PCR Workstation, Starlab, Hamburg
Elektronikrührer:	Variomag® Mono, USA
Feinwaage:	ALJ 220-4NM, Kern GmbH, Großmaiseid
Gelkammer:	Typ Mini 180V/200 mA/ 12 W, Thermo Fisher Scientific, USA
Heizblock:	AccuBlock™ Digital Dry Bath, Labnet International Inc., USA
Heizrührplatten:	IKAMAG RH, IKA Combimag RCT, IKamag RCT, Jahnke & Kunkel GmbH und Co.KG, Staufen Mastercycler gradient, eppendorf, Hamburg
Mikrowelle:	5008, Tec, Dormagen
Millipore-Filtersystem:	Milli-Q <sub>PLUS</sub> PF, Merck Millipore, USA Olympus S2X10, Japan
Osmometer:	Osmomat 3000basic, GONOTEC GmbH, Berlin
pH-Elektrode:	pH electrode BlueLine, SI Analytics, Mainz
pH-Messgerät:	PB-11, Sartorius AG, Göttingen
Stromgeber:	PowerPac Basic 300 V/400 mA/75 W, Bio Rad, USA
Thermocycler:	Arktik Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, USA
Tischzentrifuge:	PicoFuge® Mikrozentrifuge, Stratagene, USA
Vakuumzentrifuge:	Savant SpeedVac SC110, Thermo Scientific, USA
Vibrator:	Leica VT 1200 S, Leica VT 1000S, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Vortexer:	Mixer Uzusio VTX 3000 L, Harmony, LMS Laboratory & Medical Supplies CO., LTD., Japan
Waage:	PCB, Kern GmbH, Großmaiseid

##### *b. Patch clamp-Technik und calcium imaging*

Analog-Digital-Wandler:	Axon CNS Digidata 1440 A, Molecular Devices, USA
-------------------------	--

Headstage:	Axon current clamp and voltage clamp Headstage CV7B
Faradaykäfig:	Science Products, Hofheim
Laser:	Diodenlaser (405 nm), Argonlaser (488 nm), Helium-Neon-Laser (543 nm); Melles Griot, Bensheim
Laserdiode:	D-Eclipse C1, Nikon, Japan LuxX® 375-70, Omicron Laserage Laserprodukte GmbH, Rodgau; bezogen über Acal BFi Germany GmbH, Gröbenzell
Laserraster-Mikroskop, konfokal:	Nikon-C1-SHV, Nikon, Japan
Mikromanipulatorsystem:	ROE-200, Sutter Instruments Patch Star, Scientifica, Großbritannien
Mikropipettenpuller:	P-97 Flaming/Brown micropipette puller, Sutter Instruments, USA
Mikroskop:	Leica DM LFS, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar
Objektive:	Nikon LWD, 16x/0,80 W, Japan Nikon Apo LWD 25x/1,10 W, Japan Nikon Plan Apo 10x/0,45 + Plan Fluor 40x/1,30 Oil
<i>patch clamp</i> -Verstärker:	EPC-9 Patch-Clamp Amplifier, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz Axon CNS Multiclamp 700 B, Molecular Devices, USA
Pumpensystem:	Ismatec, IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
Stimulator:	Digitimer DS3, Digitimer Ltd, England
Schläuche für Perfusionssystem:	Tygon-Schlauch ST, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Tisch, schwingungsgedämpft:	TMC, USA
Videokamera:	Digital Sight DS Qi1MC, Nikon, Japan

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien und weitere Materialien

Borosilikatglaskapillaren:	GC150TF-10, Harvard Apparatus, USA
Hahnbänke:	DISCOFIX®, Braun Melsungen AG, Melsungen
Pipetten:	Pipetman®, Gilson, Frankreich
Präparationsbesteck:	Dumont, Schweiz
Präparierschale, Füllung:	Sylgard ® 184 Silicone Elastomer, Hamburg
Rasierklagen:	Croma Blades, Feintechnik GmbH Eisfeld, Eisfeld
Skalpellklagen:	Schreiber ® Instrumente, Schreiber GmbH, Fridingen

Sofortkleber:	LOCTITE 454, Henkel & Cie.AG, Pratteln
Spritzenfilter:	Cameo 3N Syringe-Filter, Carl Roth, Karlsruhe
Tropfenregler:	Masterflow, Angiokard Medizintechnik GmbH und Co.KG, Friedeburg

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

### 2.1.3 Software

Folgende *software* wurde zur Datenaufzeichnung oder Bearbeitung und Auswertung genutzt:

Adobe Photoshop CS 6:	Adobe Systems Incorporated, San José, USA
CorelDRAW X5:	Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada
ImageJ:	Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
MiniAnalysis 6.0.7:	Synaptosoft Inc., Decatur, USA
Nikon EZ-C1 Viewer:	Nikon, Japan
Omicron Control Center v 2.1.4:	Omicron Laserage Laserprodukte GmbH, Rodgau
Origin 9.0 G:	Origin Lab Corporation, Northhampton, USA
Patchmaster:	HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz
pClamp 10 Software Suite:	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Review 5.0.2:	Bruyton, Seattle, USA

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 Gebrauchslösungen

#### a. Extrazellulärlösung

Die Lösung zur Präparation der olfaktorischen *Bulbi* und zur Herstellung der Hirnschnitte sowie die artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) wurden mit deionisiertem Reinstwasser (Aqua<sub>deion</sub>) entsprechend Tabelle 1 wöchentlich frisch angesetzt. Bis zu ihrer Verwendung wurden sie im Kühlschrank aufbewahrt und die ACSF vor Gebrauch auf Raumtemperatur äquilibriert. Die Präparierlösung wurde eisgekühlt verwendet. Zur Pufferung des pH-Wertes auf 7,4 und zur Sauerstoffversorgung wurden die Lösungen kontinuierlich mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast. Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind Tabelle 1 zu entnehmen. Für die Messungen im Rahmen des Adenosin-Projektes wurde die Osmolarität der ACSF bzw. ACSF 0 Mg<sup>2+</sup> mittels Mannitol auf 300 mOsmol eingestellt.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der Extrazellulärlösungen für physiologische Experimente.**

Substanz	Präparierlösung	Endkonzentration [mM]		
		ACSF	ACSF 0 Mg <sup>2+</sup>	ACSF 50 K <sup>+</sup>
NaCl	83	120	120	70
NaHCO <sub>3</sub>	26,2	26	26	26
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1	1	1	1
KCl	2,5	2,5	2,5	50
Saccharose	70	-	-	-
D-Glucose x H <sub>2</sub> O	20	2,8	2,8	2,8
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,5	2	2	2
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O*	2,5	-	-	-
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	-	1	-	1

### b. Intrazellulärlösungen für patch clamp-Experimente

Im Rahmen des ATP-Projektes wurde für alle Versuche, die im *current clamp*-Modus durchgeführt wurden, die intrazelluläre „Kaliumgluconat“-Lösung verwendet (Tabelle 2). Die Zusammensetzung dieser Lösung sollte weitestgehend den physiologischen Bedingungen der Mitralzellen entsprechen und erlaubt es den Zellen, ein physiologisches Membranpotential einzustellen. Das *liquid junction*-Potential (LJP) der Kaliumgluconat-Intrazellulärlösung beträgt -18 mV.

Um den Einfluss einer Substanz auf synaptische Ströme oder die Netzwerkaktivität zu untersuchen, wurde sowohl im Rahmen des ATP- als auch des Adenosin-Projektes eine Cäsium-basierte Intrazellulärlösung mit erhöhter Chloridkonzentration („Cs-Hochchlorid“, Tabelle 3) eingesetzt. Aufgrund der verringerten Kaliumleitfähigkeit durch Cäsium (sowie 4-Aminopyridine, 4-AP und Tetraethylammonium, TEA) konnte die Qualität der *patch clamp*-Ableitungen dahingehend verbessert werden, dass auch weiter entfernte Ströme, beispielsweise aus dem *tuft* der Mitralzelle, gemessen und postsynaptische Ströme verbessert dargestellt werden konnten. Durch den hohen Chloridgehalt wurde außerdem ein sehr niedriger Diffusionsgradient mit einem Umkehrpotential nahe 0 mV für Chloridionen aufgebaut. Hierdurch bestimmt nur der elektrische Gradient die Stromrichtung durch Chloridkanäle, sodass es bei einem Haltepotential von -70 mV zu einem Chloridausstrom kommt. Per Definition werden damit auch inhibitorische synaptische Eingänge als Einstrom sichtbar und werden, genauso wie exzitatorische Ströme, in den Messspuren nach unten dargestellt. Das LJP beider verwendeten Cäsium-basierten Intrazellulärlösungen beträgt 3 mV. Für die Ableitung synaptischer Ströme und von Calciumströmen im Rahmen des Adenosin-Projektes wurde eine Intrazellulärlösung mit erhöhter Chloridkonzentration verwendet, die zur Verstärkung rekurrenter synaptischer Transmission Na-Glutamat enthielt. Die Intrazellulärlösungen wurden entsprechend den Tabellen 2 und 3 unter Kühlung in Aqua<sub>deion</sub> angesetzt, à 500 µL aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Vor Gebrauch wurden

die Lösungen bei Raumtemperatur aufgetaut, mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor® 594 (10 µM, Invitrogen, Darmstadt) oder Atto 488 (10 µM, Atto Tec, Siegen) versetzt und über den Versuchstag kühl gelagert. Umkehrpotentiale wurden mithilfe der Nernst-Gleichung berechnet, LJP wurden mit dem *Plugin* „JPCalcWin“ für pClamp10 bestimmt.

**Tabelle 2: Interne Lösung „Kaliumgluconat“**

Substanz	Endkonzentration [mM]
NaCl	10
K-Gluconat	105
K <sub>3</sub> -Citrat	20
HEPES	10
EGTA	0,2
MgCl <sub>2</sub>	0,5
CaCl <sub>2</sub>	0,08
Mg-ATP	3
Na-GTP	0,5

**Tabelle 3: Interne Lösungen „Cs-Hochchlorid“**

Substanz	Endkonzentration [mM]	
	ATP-Projekt	Adenosin-Projekt
4-AP	5	5
CsCl	120	120
EGTA	0,2	1
HEPES	10	10
TEA-Cl	20	20
MgCl <sub>2</sub>	2	2
CaCl <sub>2</sub>	0,075	0,5
Na-ATP	2	2
Na-GTP	0,5	0,5
Na-Glutamat	-	10

### 2.2.2 Chemikalien und pharmakologisch aktive Substanzen

Die Bezugsquellen pharmakologisch aktiver Substanzen sind Tabelle 4 zu entnehmen. Von allen verwendeten pharmakologisch aktiven Substanzen wurde zunächst eine hochkonzentrierte Stammlösung entsprechend der Herstellerangaben in Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Aqua<sub>deion</sub> angesetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Bei Verwendung der Substanzen wurden diese bei Raumtemperatur aufgetaut, in gewünschter Konzentration in begaster ACSF verdünnt und über die Badperfusion appliziert (ausgenommen photoaktivierbare Substanzen, siehe 2.3.4.). Die Verdünnung erfolgte, wenn möglich, mindestens 1000-fach, um einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Zellen möglichst auszuschließen. Ausgenommen hiervon wird Cyclothiazid, welches in einer Konzentration

von 200  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurde, jedoch nur bis zu einer Konzentration von 100 mM in DMSO löslich war. Zur Anästhesie der Versuchstiere wurde pro Narkose ca. 1 mL Isofluran (Forene®) der Firma Abbot (Wiesbaden) verwendet. Das Carbogengas stammte von der Firma Linde (München).

**Tabelle 4: Pharmakologisch aktive Substanzen.**

Substanz	chemischer Name	Wirkung	Endkonzentration	Bezug
4-AP	4-Aminopyridine	K <sub>v</sub> -Inhibitor	5 mM <sub>intra</sub>	abcam
Adenosin	9- $\beta$ -D-Ribofuranosyladenine	P1R-Agonist	100 $\mu\text{M}$	Sigma
ARL67156	6-N,N-Diethyl-D- $\beta$ , $\gamma$ -dibromomethylene ATP trisodium salt	NTPDase-Inhibitor	100 $\mu\text{M}$	RDS
Asenapin maleat	(3aR*, 12bR*)-5-Chloro-2,3,3a, 12b-tetrahydro-2-methyl-1H-dibenz [2,3:6,7] oxepino[4,5-c]pyrrole maleate	5-HT <sub>1A,1B,2A,2B,2C,5A,6,7R</sub> -, D <sub>1,2L,2S,3,4R</sub> -, $\alpha$ <sub>1A,2A,2B,2C</sub> R-, H <sub>1+2</sub> R-Antagonist	0,5 $\mu\text{M}$	RDS
Carbenoxolon (CBX)	3 $\beta$ -Hydroxy-11-oxoolean-12-en-30-oic acid 3-hemisuccinate	Hemikanal-Antagonist	100 $\mu\text{M}$	Sigma
Clobenpropit	N-(4-Chlorobenzyl)-S-[3-(4(5)-imidazolyl)propyl]isothiourea dihydrobromide	H <sub>3+4</sub> R-Antagonist	5 $\mu\text{M}$	RDS
CPCCOEt	E)-Ethyl-1,1a,7,7a-tetrahydro-7-(hydroxyimino)cyclopropa[b]chromen-1a-carboxylat	mGlu <sub>1</sub> R-Antagonist	100 $\mu\text{M}$	abcam
Cyclothiazid (CTZ)	6-Chloro-3,4-dihydro-3-(norbornen-5-yl)-2H-1,2,4-benzothiadiazine-7-sulfonamide-1,1-dioxide	positiver, allosterischer Modulator von AMPAR	200 $\mu\text{M}$	abcam Enzo
DAPV	D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid	NMDAR-Antagonist	50 $\mu\text{M}$	Tocris, AL
DMNPE caged ATP	Adenosine 5'-triphosphate P <sup>n</sup> -[1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl] ester diammonium salt	P2R-Agonist	100 $\mu\text{M}$	RDS
DNBS	2,5-dimethoxy-N-(quinolin-3-yl) benzenesulfonamide	TNAP-Inhibitor	10 $\mu\text{M}$	Merck
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine	A <sub>1</sub> R-Antagonist	1 $\mu\text{M}$	Sigma
Mecamylamin	N,2,3,3-Tetramethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-amine hydrochloride	nAchRs-Antagonist	10 $\mu\text{M}$	AL
Methysergid maleat	[8 $\beta$ (S)]-9,10-Didehydro-N-[1-(hydroxymethyl)propyl]-1,6-dimethylergoline-8-carboxamide maleate	5-HT <sub>1</sub> R-, 5-HT <sub>2</sub> R-Antagonist	50 $\mu\text{M}$	RDS
MPEP	2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridin hydrochlorid	mGlu <sub>5</sub> R-Antagonist	5 $\mu\text{M}$	abcam
MRS2179	2' Deoxy-N6-methyladenosin 3',5' -bisphosphat tetranatrium	P2Y <sub>1</sub> R-Antagonist	100 $\mu\text{M}$	abcam
MRS2703*	2-(Methylthio)adenosine 5'-diphosphate-1-(3,4-dimethoxyphenyl)eth-1-yl phosphoester	P2Y <sub>1</sub> R-Agonist	20 $\mu\text{M}$	*
NASPM	N-[3-[[4-[(3-Aminopropyl)amino] butyl] amino]propyl]-1-naphthaleneacetamide trihydrochloride	Ca <sup>2+</sup> permeable AMPAR-Antagonist	50 $\mu\text{M}$	RDS, AL

NBQX	2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydro-benzof[quinoxaline-7-sulfonamide	AMPA-Antagonist	10 $\mu$ M	Tocris, AL
NPE caged ADP	Adenosine-5'-diphosphate, P2-(1-(2-nitrophenyl)-ethyl)-ester, Potassium salt	P2R-Agonist	100 $\mu$ M	Life tech.
NPE caged ATP	Adenosine-5'-(tetrahydrogen triphosphate), P <sup>III</sup> -(1-(2-nitrophenyl)ethyl) ester, disodium salt	P2R-Agonist	100 $\mu$ M	Life tech.
PPADS	Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid tetrasodium salt	P2R-Antagonist	100 $\mu$ M	RDS
Prazosin	[4-(4-Amino-6,7-dimethoxy-2-quinazoliny)-1-piperaziny]-2-furanylmethanone hydrochloride	$\alpha_1$ R- MT <sub>3</sub> R-Antagonist	1 $\mu$ M	abcam
QX-314	N-(2,6-Dimethylphenylcarbamoylmethyl) triethylammonium chloride	Na <sub>v</sub> -Inhibitor <sub>intra</sub>	3 mM	RDS, Axxora
Ranitidin	N-[2-[[[5-[(Dimethylamino)methyl]-2-furanyl]methyl]thio]ethyl]-N'-methyl-2-nitro-1,1-ethanediamine hydrochloride	H <sub>2</sub> R-Antagonist	2 $\mu$ M	RDS
SCH22390	(R)-(+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine	D <sub>1</sub> R-Antagonist	5 $\mu$ M	abcam
SCH442416	2-(2-Furanyl)-7-[3-(4-methoxyphenyl)propyl]-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo [1,5-c]pyrimidin-5-amine	A <sub>2A</sub> R-Antagonist	0,025 $\mu$ M	RDS
Scopolamin	( $\alpha$ S)- $\alpha$ -(Hydroxymethyl)benzeneacetic acid (1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,4 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,7 $\beta$ )-9-methyl-3-oxa-9-azatricyclo[3.3.1.0 <sub>2,4</sub> ]non-7-yl ester hydrobromide	mAChR-Antagonist	10 $\mu$ M	abcam
SDZ 205-557	4-Amino-5-chloro-2-methoxybenzoic acid 2-(diethylamino)ethyl ester hydrochloride	5-HT <sub>3</sub> R-,5-HT <sub>4</sub> R-Antagonist	10 $\mu$ M	Hello Bio
SR95531 (Gabazin)	6-Imino-3-(4-methoxyphenyl)-1(6H)-pyridazinebutanoic acid hydrobromide	GABA <sub>A</sub> R-Antagonist	5 $\mu$ M	RDS, AL
Sulpirid	(R,S)-(±)-5-Aminosulfonyl-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-2-methoxybenzamide	D <sub>2</sub> R-Antagonist	1 $\mu$ M	Sigma
Tamoxifen	(Z)-1-(p-Dimethylaminoethoxyphenyl)-1,2-diphenyl-1-butene, trans-2-[4-(1,2-Diphenyl-1-butenyl)phenoxy]-N,N-dimethylethylamine	Östrogenrezeptor-Modulator	100 mg/kg	Sigma
TEA	Tetraethylammonium	K <sup>+</sup> -Kanal-Inhibitor	20 mM <sub>intra</sub>	abcam
Tetrodotoxin (TTX)	Octahydro-12-(hydroxymethyl)-2-imino-5,9:7,10a-dimethano-10aH-[1,3]dioxocino[6,5-d]pyrimidine-4,7,10,11,12-pentol citrate	Na <sub>v</sub> -Inhibitor	0,5 - 1 $\mu$ M	RDS, AL
ZM241385	4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo [2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol	A <sub>2A</sub> R-Antagonist	0,1 $\mu$ M	Sigma

\*MRS2073: Synthetisiert von Tristan Gollnest (Arbeitskreis Chris Meier, Organische Chemie, Universität Hamburg). R, Rezeptor; AL, Alomone Labs über TMH Medizinhandel; RDS, RD Systems/Tocris, Life tech., Life technologies/Thermo Fisher

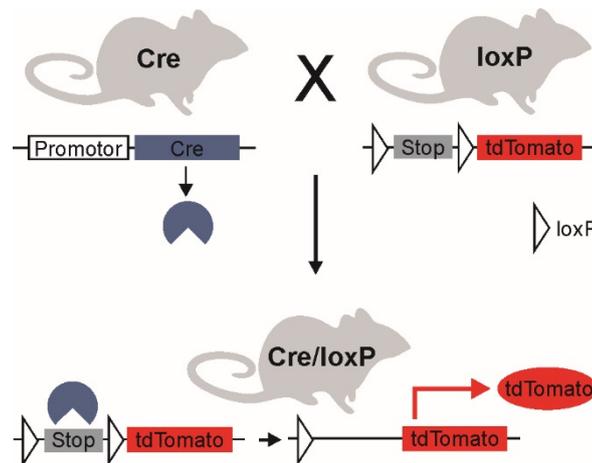
### 2.2.3 Das Cre/loxP-System in Mäusen

Das Cre/loxP-System ist ein Rekombinase-System zur genetischen Modifizierung spezifischer Zell- oder Gewebearten. Es besteht aus der Cre (für: *cyclization recombination* oder *causes recombination*), einem Enzym aus der Klasse der Rekombinasen, und den DNA Zielsequenzen der Cre, den loxP- (*locus of crossover P1*) Elementen. Die Cre katalysiert die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA zwischen diesen loxP-Elementen, welche kurze DNA Sequenzen aus 34 Basenpaaren darstellen und ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 stammen.

Um eine zell- oder gewebespezifische genetische Modifikation zu etablieren, werden entsprechend zwei genetisch unterschiedliche Mauslinien benötigt. Hierbei handelt es sich um die Cre-Treiberlinie und einen Mausstamm mit loxP-Elementen. Die Cre-Treibermauslinie trägt das Gen für die Cre-Rekombinase i.d.R. unter einem zellspezifischen oder gewebespezifischen Promotor. Beim zweiten Mausstamm sind vor und hinter dem Zielgen die loxP-Elemente eingefügt - dieses Gen ist dann „floxed“ (von: *flanked by loxP*). Wenn beide Mauslinien miteinander gekreuzt werden, haben ein Teil der Nachkommen sowohl das Cre-exprimierende Transgen als auch das mit loxP-Elementen flankierte Zielgen geerbt. In den Geweben bzw. Zellen, in denen die Cre-Rekombinase exprimiert wird, führt die Rekombinationsreaktion dazu, dass der floxed Genabschnitt aus der DNA rausgeschnitten und von der Zelle abgebaut wird. Wird so ein Gen oder Teile eines Gens funktionsunfähig, können mithilfe des Cre/loxP-Systems zellspezifische *knock out*-Mäuse hergestellt werden (Orban *et al.*, 1992; Nagy, 2000; Cox *et al.*, 2012).

Zur Generierung von Reportermauslinien werden transgene Tiere verwendet, die vor dem Reporter gen (z.B. fluoreszierende Proteine, genetische Calciumindikatoren) ein von loxP-Elementen flankiertes Stop-Codon tragen. Werden diese Mäuse mit einer Cre-Treiberlinie verpaart, wird das Stop-Codon von der Cre-Rekombinase herausgeschnitten, sodass das Reporter gen in den Zielzellen transkribiert und translatiert werden kann (Zuo, 2002; Gao *et al.*, 2004, Abbildung 3).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mauslinien werden mit dem Zusatz „-Cre“ für die Treibermauslinie und dem Index „fl/fl“ für die loxP-tragende Mauslinie gekennzeichnet.



**Abbildung 3: Cre-Rekombinase-vermittelte Genmanipulation in Mäusen.** Darstellung eines Reporterallels (tdTomato), dessen Expression durch eine Cre-vermittelte Deletion eines *loxP* markierten Stop-Codons induziert wird.

Um die Cre/*loxP*-vermittelte Genmutation zeitlich induzieren zu können, kann die Cre-Rekombinase so modifiziert werden, dass sie Liganden-aktivierbar ist (Feil *et al.*, 1996; Hayashi und McMahon, 2002). Typischerweise wird die Cre-Rekombinase hierzu mit Östrogenrezeptoren fusioniert, deren Ligand Tamoxifen ist. Der Cre/Östrogenrezeptor-Komplex wird durch ein Hitzeschockprotein (Hsp90) im Zytoplasma fixiert und erst durch die Bindung von Tamoxifen vom Hsp90 abgespalten und in den Nukleus überführt. Hier findet dann die Zusammenführung der Cre-Rekombinase mit der DNA statt, sodass *loxP*-markierte Gensequenzen modifiziert werden können. Die in dieser Arbeit verwendeten, induzierbaren Cre-Treibermauslinien werden durch das Kürzel „ERT2“ gekennzeichnet.

#### 2.2.4 Versuchstiere

Als Modellorganismus für diese Arbeit wurden verschiedene Zuchtlinien der Hausmaus (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) verwendet. Alle Versuchstiere stammen aus der Tierzucht der Arbeitsgruppe Neurophysiologie (Abteilung Tierphysiologie) der Universität Hamburg. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen in einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus bei Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Jungtiere wurden bis zum Postnataltag 21 (P21) bei der Mutter gehalten und anschließend in Geschlechtergruppen abgesetzt.

Für die Studien wurden für alle Experimente Mäuse beider Geschlechter verwendet. Im Rahmen des Adenosin Projektes wurden Tiere im Alter von P6 bis P13 verwendet; für das ATP-Projekt wurde mit Präparaten von Tieren ab P14 experimentiert. Für beide Projekte wurden verschiedene Mauslinien verwendet, deren Eigenschaften im Folgenden erläutert werden.

### a. NMRI-Mauslinie

Beim Zuchtstamm NMRI (*Naval Medical Research Institute*) handelt es sich um einen Auszuchtstamm mit breiter genetischer Variabilität. Die Tiere wurden ursprünglich von *Charles River* (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Im Rahmen des Adenosin-Projektes wurden, bis auf die Messungen an  $A_1$ -Rezeptor-*knock out*-Mäusen (siehe unten), ausschließlich Tiere der NMRI-Mauslinie verwendet. Im Rahmen des ATP-Projektes erfolgten alle Messungen im *voltage clamp*-Modus an NMRI-Mäusen, sowie die Untersuchung des direkten Effekts von ATP in Mitralzellen.

### b. C57BL/6 $A_1$ -Rezeptor-*knock out*-Mauslinie

$A_1$ -Rezeptor-*knock out*-Mäuse wurden ursprünglich freundlicherweise von Bertil B. Fredholm und Mattias Carlström (*Department of Physiology and Pharmacology*, Karolinska Institut) zur Verfügung gestellt. Für Experimente wurde jeweils die F1-Generation von P6 bis P14 verwendet. Die Elterntiere waren heterozygot, die F1-Generation wurde vor dem Experimentieren genotypisiert (Primer siehe Tabelle 8). Die Versuche wurden an homozygoten  $A_1$ -Rezeptor-*knock out*-Mäusen durchgeführt. Als Kontrollen wurden die homozygoten  $A_1$ -Rezeptor-Wildtyp-Wurfgeschwister herangezogen. Den  $A_1$ -Rezeptor-*knock out*-Mäusen fehlt ein großer Teil des  $A_1$ -Rezeptortranskripts, wodurch der  $A_1$ -Rezeptor nicht mehr funktionsfähig ist (Johansson *et al.*, 2001).

### c. Reportermauslinien

Die Experimente dieser Arbeit erforderten teilweise die Verwendung von Reportermausen. Diese wurden mithilfe des oben beschriebenen Cre/*loxP*-Systems zur zellspezifischen Expression der Reportergene tdTomato (rote Fluoreszenz) und GCaMP6s (Calciumindikator) hergestellt. Tabelle 5 und 6 schlüsseln die verwendeten Cre-Treiberlinien und Mauslinien mit *loxP*-markierten Gensequenzen auf.

**Tabelle 5: Cre-Mauslinien.**

Linie	Referenz	Bezug	Eigenschaften
Pcdh21-Cre	Nagai <i>et al.</i> (2005)	Thomas Jentsch <sup>1</sup>	Konstitutive Expression der Cre-Rekombinase in Prinzipalneuronen.
Eno2-CreERT2	Frugier <i>et al.</i> (2000)	Irm Hermans-Borgmeyer <sup>2</sup>	Induzierbare Expression der Cre-Rekombinase unter dem Promotor der neuronenspezifischen Enolase2 (Eno).

<sup>1</sup> Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin; <sup>2</sup> Transgene Maus Facility, UK Hamburg-Eppendorf, Hamburg

**Tabelle 6: *loxP*-Mauslinien.**

Linie	Genlokus	Promotor	Reporter	Referenz	Bezug	<i>loxP</i> Gen
tdTomato <sup>fl/fl</sup>	Rosa26	CAG	tdTomato	Madisen <i>et al.</i> (2010)	Frank Kirchhoff <sup>1</sup>	Rosa26-CAG-flox-stop-flox-tdTomato
GCaMP6s <sup>fl/fl</sup>	Rosa26	CAG	GCaMP6s	Chen <i>et al.</i> (2013)	Jackson Laboratory <sup>2</sup>	Rosa26-CAG-flox-stop-flox-GCaMP6s

<sup>1</sup> Universität des Saarlandes, Homburg; <sup>2</sup> The Jackson Laboratory, Sacramento, USA

Für die Experimente wurden Tiere der F1-Generation aus Verpaarungen von Cre-Treiberlinien mit *loxP*-Mauslinien verwendet. Welche Eigenschaften die für die Versuche verwendeten F1-Tiere aufwiesen, ist in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7: F1-Genotypen.**

Verpaarung	Eigenschaft F1-Generation	Bezeichnung F1-Generation
Pcdh21-Cre x tdTomato <sup>fl/fl</sup>	Rote Fluoreszenz in Mitral- und <i>tufted</i> -Zellen	Pcdh21 x tdT
Pcdh21-Cre x GCaMP6s <sup>fl/fl</sup>	GCaMP6s-Expression in Mitral- und <i>tufted</i> -Zellen	Pcdh21 x GCaMP6s
Eno2-CreERT2 x tdTomato <sup>fl/fl</sup>	Rote Fluoreszenz in Neuronen	Eno x tdT
Eno2-CreERT2 x GCaMP6s <sup>fl/fl</sup>	GCaMP6s-Expression in Neuronen	Eno x GCaMP6s

Soweit nicht anders gekennzeichnet, wurden alle *current clamp*-Messungen des ATP-Projektes mithilfe von Pcdh21 x tdT Reportermausen durchgeführt. Da die tdTomato-Expression keinen Einfluss auf die ATP-induzierten Effekte hatte (vgl. Anhang VI.3), wurden – wenn keine Fluoreszenzmarkierung von Mitral- und *tufted*-Zellen benötigt wurde - auch die Wurfgeschwister ohne entsprechendes Cre-Allel für die Versuche verwendet und die Ergebnisse in den Auswertungen zusammengefasst.

Um eine umfassende Expression der Reporter in neuronalem Gewebe zu erzielen, wurde die Treiberlinie Eno2-CreERT2 verwendet. Die Expression der Cre-Rekombinase ist in dieser Linie induzierbar und wurde durch intraperitoneale Injektion von Tamoxifen der F1-Tiere etabliert. Tamoxifen wurde in EtOH und Weizenkeimöl gelöst und die Tiere ab einem Alter von P21 drei Tage in Folge mit einer Dosis von 100 mg/kg gespritzt. Um eine ausreichende Expression des jeweiligen Proteins zu ermöglichen, wurde ab der ersten Injektion mindestens zehn Tage gewartet, bis die Tiere für Experimente verwendet wurden.

Um zu überprüfen, welche Individuen der F1-Generation das jeweils gewünschte Transgen tragen, wurden die Versuchstiere vor Verwendung i.d.R. genotypisiert (siehe Abschnitt 2.5).

### 2.2.5 Präparation der olfaktorischen *Bulbi* und Herstellung akuter Schnittpräparate

Für die elektrophysiologischen Messungen sowie für das *calcium imaging* wurden in dieser Arbeit ausschließlich akute Schnittpräparate des olfaktorischen *Bulbus* verwendet. *In-situ* Versuche haben den Vorteil, dass die Zellkonnektivität und Gewebestruktur größtenteils erhalten bleibt, das System experimentell aber dennoch gut zu kontrollieren ist.

Für die Präparation des *Bulbus olfactorius* wurden die Mäuse zunächst mit Isofluran anästhesiert und danach dekapitiert. Die Präparation erfolgte in eisgekühlter Präparierlösung unter ständiger Begasung mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) unter einem Binokular. Nach Entfernung der Kopfhaut erfolgte die Eröffnung der Schädelkapsel durch einen rostrocaudalen Schnitt entlang der *Sutura sagittalis*, um im Anschluss den Parietal- sowie Frontalknochen über dem Cortex und den olfaktorischen *Bulbi* mithilfe einer Pinzette zu entfernen. Die Cortexhemisphären wurden durch einen Sagittalschnitt voneinander getrennt, und durch einen koronaren Schnitt von etwa 3 mm caudal der freigelegten *Bulbi* vom restlichen Gewebe abgetrennt. Die *Bulbi* wurden zusammen mit einem Teil des frontalen Cortex aus der Schädelhöhle entnommen und mit der Hemisphären-Seite auf Agar geklebt. Die folgende Herstellung der Hirnschnitte erfolgte weiterhin in Carbogen-begaster, eisgekühlter Präparierlösung. Der Agar wurde an der ventralen Seite der *Bulbi* mit einer Rasierklinge abgeschrägt und diese mitsamt *Bulbus* auf den Präparateteller des Vibratoms geklebt. Die Rasierklinge traf transversal auf die *Bulbi*, sodass Horizontalschnitte mit einer Schnittdicke von 170 bis 250 µm hergestellt wurden. Die Schnitte wurden vor den Messungen für mindestens 30 Minuten bei 30°C in begaster ACSF inkubiert. Bevor die Schnittpräparate für Experimente verwendet wurden, kühlten diese mindestens weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur ab.

### 2.3 DIE *PATCH CLAMP*-TECHNIK

Mithilfe elektrophysiologischer Methoden ist es möglich, Neurone und neuronale Netzwerke auf ihre elektrischen Eigenschaften hin zu untersuchen. Nervenzellen besitzen die einzigartige Fähigkeit, Informationen weiterzuleiten oder zu erzeugen. Möglich wird dies, da biologische Membranen aufgrund eingelagerter Ionenkanäle und –transporter durchlässig für geladene Teilchen und damit leitfähig für elektrischen Strom sind. Mithilfe der *patch clamp*-Technik können dabei sowohl Ströme einzelner Ionenkanäle als auch makroskopische Strommuster gemessen werden. Die *patch clamp*-Technik beruht auf dem Prinzip der Spannungsklemme (*voltage clamp*). Durch das Anlegen einer Spannungsklemme kann sowohl das Membranpotential einer Zelle konstant gehalten als auch der dazu notwendige Strom gemessen werden. Um das Membranpotential auf einem bestimmten Wert zu halten, wird ein vorgegebenes Potential (Haltepotential) kontinuierlich mit dem tatsächlichen

Membranpotential der abgeleiteten Zelle verglichen und Differenzen durch einen dem Ionenfluss entgegengesetzten, in die Zelle injizierten kompensatorischen Strom ausgeglichen. Anhand der Eigenschaften dieses Stroms können elektrisch aktive Zellen grundlegend untersucht werden. Umgekehrt kann die Ableitung auch im *current clamp*-Modus (Stromklemme) erfolgen. In diesem Modus ist es möglich, das Membranpotential als Reaktion der Zelle auf verschiedene Stimuli abzuleiten. Weiterhin können die Ableitungen in unterschiedlichen Konfigurationen erfolgen. Die Versuche in dieser Arbeit wurden in der sog. Ganzzellkonfiguration durchgeführt (Numberger *et al.*, 1996).

### 2.3.1 Messstände

Für diese Arbeit wurden ein reiner *patch clamp*-Messstand (Leica) sowie ein kombinierter *patch clamp/calcium imaging*-Messstand (Nikon eC1) verwendet. Beide Aufbauten befanden sich auf schwingungsgedämpften Tischen und waren von einem Faradaykäfig umschlossen. Das jeweilige Durchlichtmikroskop befand sich fest montiert auf einem Kreuztisch und konnte über dem fixierten Versuchsbad bewegt werden. Die Versuchsbäder fassten ein Volumen von 1–1,5 mL und waren zwecks Perfusion an ein Pumpensystem angeschlossen. Der Leica-Messstand war mit einem 40x Objektiv, der Nikon-Messstand mit einem 25x Objektiv ausgestattet, bei dem über zwei Linsen zusätzliche eine zwei bzw. vierfache Vergrößerung eingestellt werden konnte. Über eine Videokamera wurde ein *live*-Bild des Präparats auf einen Computer außerhalb des Faradaykäfigs übertragen. Jeder Messstand war mit ein bis zwei Mess- bzw. Stimulationselektroden ausgestattet, welche über ein Mikromanipulatorsystem navigiert wurden. Als Messelektrode für *patch clamp*-Ableitungen wurde an beiden Messständen ein chlorierter Silberdraht verwendet. Die Referenzelektrode bestand entweder ebenfalls aus einem chlorierten Silberdraht oder einem chlorierten Silberpellet, die in die Badlösung tauchten.

Die *patch clamp*-Ableitungen wurden unter Verwendung eines EPC9 bzw. Axon 700B Verstärkers durchgeführt und mithilfe der PatchMaster (HEKA) bzw. pClamp (Molecular Devices) *software* sowie über einen Hauptverstärker mit anschließendem Analog-Digital-Wandler digitalisiert und aufgezeichnet.

Dem Nikon-Mikroskopaufbau war ein konfokales Laserrastermikroskop angeschlossen. Als Lichtquellen dienten ein Diodenlaser (405 nm), ein Argonlaser (488 nm) sowie ein Helium-Neon-Laser (543 nm). Die Strahlungsintensität der Laser konnte mithilfe von Filtern (ND 8 und 4) reguliert werden. Ebenfalls verfügte dieser Aufbau über eine 375 nm Laserdiode, die zur Applikation photoaktivierbarer Substanzen verwendet wurde. Die Aufzeichnung der Daten sowie die Ansteuerung der Systeme erfolgten über eine *software*.

### 2.3.2 Herstellung einer *patch clamp*-Ableitung in der Ganzzellkonfiguration

Zu Beginn der Messungen wurden die Schnittpräparate aus der Aufbewahrungskammer in das Versuchsbad überführt und mithilfe eines Nylon-bespannten, U-förmigen Platindrahts (*grid*) am Boden der Ableitungskammer fixiert. Die Schnitte wurden, soweit nicht anders angegeben, kontinuierlich mit Carbogen-begaster ACSF superfundiert. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die *patch*-Pipetten wurden mithilfe eines Horizontal-Pipettenziehgeräts aus Borosilikatglaskapillaren (Durchmesser: außen 1,5 mm, innen 1,17 mm) ausgezogen und mit einer gefilterten intrazellulären Lösung gefüllt. Für Mitralzellen wurden Pipetten mit einem Öffnungswiderstand von 1,5–3 M $\Omega$  verwendet, für eTC solche mit einem Widerstand von 4–6 M $\Omega$ .

Für die Ableitungen wurden Zellen ausgewählt, die gut im Zellverbund integriert waren und nicht zu nah an der Schnittoberfläche lagen. Um eine Ableitung vorzunehmen, wurde über einen Schlauch ein geringer Überdruck in der Glaselektrode erzeugt und die Pipettenspitze unter visueller Kontrolle an die abzuleitende Zelle herangeführt. Die Kontrolle des Pipettenwiderstands erfolgte über einen hochfrequenten Testpuls von 10 mV. Potentialdifferenzen zwischen Bad- und Pipettenlösung sowie schnelle kapazitative Ströme wurden automatisch über die *patch clamp software* kompensiert. Hierbei appliziert der Verstärker eine Serie kurzer Spannungspulse und verwendet die Stromantwort über die Membran um die Kompensation zu optimieren. Anschließend wurde die Pipettenspitze soweit an die Zellmembran herangeführt, bis eine Änderung des Widerstands an der Pipettenöffnung den Kontakt von Pipette und Membran anzeigte. Durch Lösen des Überdrucks und Anlegen eines leichten Unterdrucks wurde anschließend ein kleiner Membranfleck (*patch*) in die Pipettenspitze eingesaugt und die Ausbildung einer Gigaohmabdichtung, das sog. *gigaseal*, provoziert. Parallel zur Ausbildung des *gigaseals* wurde, abhängig von der verwendeten Intrazellulärlösung, ein Kommandopotential von -60 mV („Kaliumgluconat“) oder -70 mV („Cs-Hochchlorid“) angelegt. Nach Ausbildung des *gigaseals* wurden die schnellen, kapazitiven Transienten erneut automatisch kompensiert und die Membran unter der Pipettenspitze durch einen Druckpuls geöffnet, womit die Ganzzellkonfiguration hergestellt war. Ob die Zelle erfolgreich geöffnet wurde, konnte anhand der entstehenden kapazitiven Ströme im Bereich der Spannungssprungflanken kontrolliert werden. Der Zugang zur Zelle wurde anhand des Verhältnisses von Serienwiderstand zu Membranwiderstand beurteilt, wobei der Serienwiderstand höchstens ein Zehntel des Membranwiderstandes betrug. Nach Etablierung der Ganzzellkonfiguration wurde mindestens zwei Minuten gewartet, um einen stabilen Austausch zwischen Intrazellulärlösung und Zytosol zu gewährleisten. Zu Beginn der Messungen wurde die Vitalität der Zellen anhand der Stabilität des Haltestroms im *voltage clamp*-Modus sowie

anhand des Vorhandenseins typischer spannungsabhängiger Strommuster für den jeweiligen Zelltyp überprüft. Des Weiteren sollten die Zellen im *current clamp*-Modus ein negativeres Membranruhepotential als -40 mV (LJP korrigiert ca. -58 mV) aufweisen und in der Lage sein, spontan oder bei positiven Strominjektionen Aktionspotentiale zu generieren. Zellen, die nicht die beschriebenen Vitalitätsparameter aufwiesen, wurden von den Messungen ausgeschlossen.

#### a. Ableitungen an Mitralzellen

Mitralzellen konnten anhand ihrer Lage sowie Form der Somata üblicherweise problemlos identifiziert werden. In Pcdh21 x tdT Mäusen konnten Mitralzellen zusätzlich über die Mitral- und *tufted*-zellspezifische Expression von tdTomato im Fluoreszenzbild sichtbar gemacht werden. In Präparaten ohne den entsprechenden Reporter wurde die Morphologie der Zelle nach Etablierung der Ganzzellkonfiguration mittels des in der Intrazellulärlösung enthaltenen Farbstoffs Alexa 594 oder Atto 488 sichtbar gemacht und das Vorhandensein eines apikalen *tufts* überprüft (Abbildung 4A). Der Membranwiderstand lag bei Mitralzellen zwischen 100 und 300 M $\Omega$ , der Serienwiderstand war <20 M $\Omega$  und der Haltestrom bei einem Kommandopotential von -60 bis -70 mV zwischen -50 und -600 pA. Im Rahmen des ATP Projektes wurden nur Mitralzellen mit einem intakten apikalen *tuft* gemessen. Des Weiteren sollten die Zellen im *current clamp*-Modus biphasische Membranpotentialverläufe mit *up*- und *downstates* aufweisen; bzw. im *voltage clamp*-Modus sog. *population bursts* generieren (Abbildung 4C und D).

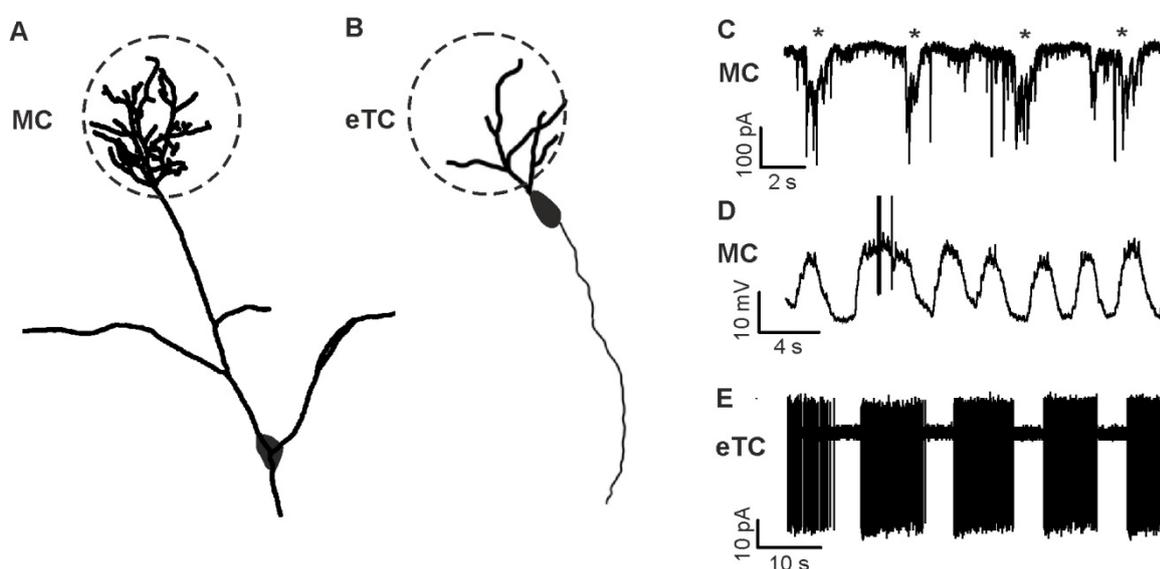
Im Rahmen des Adenosin-Projektes wurde zwar auf das Vorhandensein eines *tufts* kontrolliert, dies war aber nicht Voraussetzung für die weitere Durchführung des Experiments. Ebenso waren hier biphasische Membranpotentialverläufe und *population bursts* keine zwingende Voraussetzung.

#### b. Ableitungen an externalen *tufted*-Zellen

Zu den *tufted*-Zellen gehören eTC sowie mittlere und internale *tufted*-Zellen, die sich über verschiedene Schichten des olfaktorischen *Bulbus* verteilen. In dieser Arbeit wurde in erster Linie die Subpopulation der eTC untersucht. Wird daher im Ergebnisteil der Begriff *M/t*-Zellen verwendet, fasst dies entsprechend Mitralzellen und eTC zusammen. Wird nur der Begriff *tufted*-Zellen verwendet, umfasst dies die verschiedenen Subpopulationen der *tufted*-Zellen (externale, mittlere und internale).

Um eTC von vielen anderen Zelltypen im juxtaglomerulären Bereich zu unterscheiden, wurden für *patch clamp*-Messungen ausschließlich Pcdh21 x tdT Mäuse verwendet, die tatsächlich das Cre-Allel trugen. Anhand der roten Fluoreszenz in Mitral- und *tufted*-Zellen konnten eTC problemlos identifiziert und anhand ihrer Lage im basalen Bereich der Glomerularschicht von Mitralzellen unterschieden werden. Ebenfalls wurde die Morphologie

der Zelle mittels des in der Intrazellulärlösung enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffs sichtbar gemacht (Abbildung 4B). Der Membranwiderstand der eTC betrug 50 bis 200 M $\Omega$ , der Serienwiderstand <30 M $\Omega$  und der Haltestrom lag bei einem Kommandopotential von -60 mV bei -20 bis -200 pA. Des Weiteren wurde die Zelle vor dem Öffnen für kurze Zeit im *cell attached*-Modus abgeleitet und beobachtet, ob sie die für eTC typischen *bursts* von Aktionspotentialen generiert (Saint Jan *et al.*, 2009, Abbildung 4E). Wurden Paareleitungen an Mitralzellen und eTC vorgenommen, wurde zunächst die Ganzzellkonfiguration an einer Mitralzelle hergestellt. Mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes in der Intrazellulärlösung konnte anschließend der Zielglomerulus des apikalen *tufts* der Mitralzelle identifiziert und eine benachbarte eTC, die in denselben Glomerulus projizierte, abgeleitet werden.



**Abbildung 4: Charakteristika bulbärer Projektionsneurone.** **A)** Typische Zellmorphologie von Mitralzellen (MC). **B)** Typische Zellmorphologie von eTC. **C)** *Voltage clamp* Ganzzell-Ableitung einer Mitralzelle mit *population bursts* (\*). **D)** *Current clamp* Ganzzell-Ableitung einer Mitralzelle mit biphasischem Verlauf des Membranpotentials. **E)** Kontinuierliche *cell attached*-Aufnahme einer eTC, die rhythmische Salven von Aktionspotentialen (*bursts*) generiert.

### 2.3.3 Applikation der Pharmaka über die Badlösung

Die Schnittpräparate wurden während der gesamten Versuchsdauer über ein Pumpensystem mit Extrazellulärlösung mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,7 mL/Min superfundiert. Um einen schnellen Austausch verschiedener Lösungen zu ermöglichen, betrug das Badvolumen maximal 1–1,5 mL. Bis auf die photoaktivierbaren Substanzen (*caged* ATP, *caged* ADP, MRS2703, siehe 2.3.4.) wurden sämtliche Pharmaka über die Badperfusion in das Versuchsbad eingeleitet. Um zwischen Lösungen verschiedener Zusammensetzungen zu wechseln, wurde der Zulaufschlauch in Bechergläser mit

entsprechenden Lösungen umgehängt. Bis eine Substanz das Versuchsbad erreicht hat, vergingen ab dem Umhängen des Zulaufschlauches 90 Sekunden. Die Anwesenheit pharmakologisch aktiver Substanzen im Versuchsbad ist durch einen Balken in den Diagrammen bzw. Messspuren markiert. Die Länge des Balkens gibt die Zeit zwischen Beginn des Einwaschens und Beginn des Auswaschens an, wobei die eingestellte Endkonzentration der einzuwaschenden Lösung im Bad nach ca. 30 Sekunden erreicht war. Der Zeitpunkt, nachdem eine Substanz ausgewaschen und ihre Wirkung mutmaßlich wieder abgeklungen ist, wird als *wash* bezeichnet.

#### 2.3.4 Applikation photoaktivierbarer Neurotransmitter

Zu den heutzutage weit etablierten und häufig verwendeten photoaktivierbaren Biomolekülen zählen insbesondere Neurotransmitter. Die Moleküle werden durch photoreaktive Gruppen wie beispielsweise Nitrobenzol- oder Cumarinverbindungen chemisch dahingehend modifiziert, dass sie biologisch nicht aktiv sind (sog. *caging*). Durch die Bestrahlung mit einer spezifischen Wellenlänge wird die Schutzgruppe abgespalten (sog. *uncaging*) und die Aktivität des Moleküls nicht länger blockiert. Mithilfe solcher *caged*-Verbindungen und dem Einsatz von UV-Lampen oder Laserlicht ist es möglich, punktgenau und sehr schnell auch große Mengen eines Biomoleküls freizusetzen.

Auch die Applikation von ATP und ADP erfolgte in der vorliegenden Arbeit in Form der Photoapplikation. Hierbei handelte es sich um NPE-*caged* ADP und DMNPE- oder NPE-*caged* ATP sowie MRS2703 (vgl. Anhang VI.1). Die Substanzen wurden bei ausgeschaltetem Perfusionssystem direkt in das Versuchsbad pipettiert und waren so konzentriert, dass im Bad eine Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  erreicht wurde. Vor der Photolyse wurde zur ausreichenden Diffusion der *caged*-Substanz in der Badlösung vier Minuten gewartet. Die Photolyse wurde mithilfe einer 375 nm Laserdioden durchgeföhrt, die auf den zu beleuchtenden Bereich ausgerichtet wurde. Die Größe der beleuchteten Fläche betrug ca. 25 x 25  $\mu\text{m}$ . Das *uncaging* erfolgte mit einer Laserleistung von 35 mW und einer Dauer von 100 ms. Zur Vergleichbarkeit des durch die Photoapplikation induzierten Effekts erfolgte die Photolyse im *current clamp*-Modus bei einem Membranpotential von  $-55 \pm 5 \text{ mV}$  (LJP korrigiert ca.  $-70 \pm 5 \text{ mV}$ , bei biphasischen Membranpotentialverläufen gemessen am *downstate*). Die Auslösung des Laserstrahls wurde elektronisch über die *patch clamp software* angesteuert und ist in den Abbildungen durch eine Pfeilspitze markiert. Ob das Laserlicht alleine einen Einfluss auf die Zellen ausübte, wurde in regelmäßigen Tests überprüft (s. Anhang VI.2.).

### 2.3.5 Extrazelluläre elektrische Stimulation von ORN-Axonon

Die endogene Freisetzung von Neurotransmittern kann mithilfe elektrischer Stimulation von Neuronen evoziert werden. Im *Bulbus olfactorius* führt eine elektrische Stimulation von ORN-Axonon in der Nervenfaserschicht zur Freisetzung von Glutamat und ATP entlang der Axone und an den synaptischen Endigungen der ORN im Glomerulus (Doengi *et al.*, 2008; Thyssen *et al.*, 2010). Somit wird der neuronale physiologische Prozess beim Eintreffen eines Geruchssignals imitiert. Diese Methode wurde genutzt, um die Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren durch endogenes ATP zu evozieren. Hierfür wurde eine mit ACSF gefüllte Glaselektrode mit einem Öffnungswiderstand von 1–3 MΩ verwendet. Die Stimulationselektrode wurde in der Nervenfaserschicht in größtmöglicher Entfernung zur Glomerularschicht platziert, wenn sichtbar in der Nähe eines Axonbündels. Sollten parallel *patch clamp*-Ableitungen durchgeführt werden, wurde zunächst eine Mitralzelle im *current clamp*-Modus in der Ganzzellkonfiguration abgeleitet. Um die Position der Stimulationselektrode in der Nervenfaserschicht zu überprüfen wurde ein Testpuls (100 µs, 200 µA) appliziert. Löste dieser Testpuls zuverlässig und repetitiv Aktionspotentiale in der Mitralzelle aus, konnte davon ausgegangen werden, dass Axonbündel und apikaler Dendrit der abgeleiteten Mitralzelle denselben Glomerulus innervieren. Bei Calciummessungen wurde der Testpuls genutzt, um anhand eines Calciumsignals in juxtglomerulären Zellen den Zielglomerulus des stimulierten Axonbündels zu identifizieren. Im eigentlichen Experiment wurden die ORN-Axone mittels sog. *sniff cycle*-Stimulation stimuliert. Hierbei soll das Feuermuster der ORN-Axone während eines Atemzyklus imitiert werden. Die ORN-Axone wurden hierfür 200 ms mit einer Frequenz von 100 Hz (200 µA, Einzelpulsdauer 100 µs) stimuliert (Einatemphase). Im Anschluss an diesen *burst*-Stimulus erfolgte eine 300 ms lange Pause (Ausatemphase). Dieser Zyklus erfolgte insgesamt zehnmal, sodass die Dauer des gesamten Stimulationsprotokolls 5 s betrug. Um sicherzustellen, dass die stimulationsinduzierten Antworten in Mitralzellen bzw. juxtglomerulären Neuronen tatsächlich auf Aktionspotential-abhängiger Freisetzung von Neurotransmittern im Glomerulus beruhen, wurde am Ende jeder Messung TTX (Tetrodotoxin) appliziert. In allen ausgewerteten Messungen inhibierte TTX die evozierten Antworten, sodass eine direkte elektrische Stimulation der Zellen ausgeschlossen werden kann. Der Beginn der *sniff cycle*-Stimulation ist in den Abbildungen durch einen senkrechten Strich markiert.

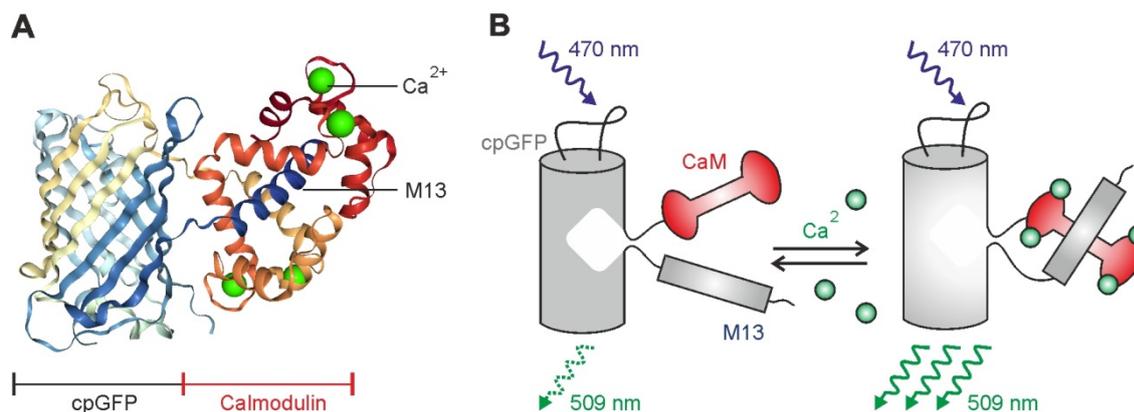
## 2.4 CALCIUM IMAGING MIT DEM GENETISCHEN CALCIUMINDIKATOR

### GCaMP6s

*Calcium imaging* beruht auf dem Prinzip, dass Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration durch fluoreszierende Calciumindikatoren sichtbar gemacht werden können. Somit kann unter anderem neuronale Aktivität mithilfe von *calcium imaging*

untersucht werden, da diese oft schnelle Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration hervorruft. So führen Aktionspotentiale in Neuronen zur Aktivierung spannungsaktivierter Calciumkanäle (*voltage activated calcium channels*, VACC) und damit zu Calciumtransienten im Zytosol der Zelle, die einen Zustand hoher Erregung repräsentieren. Der Anstieg der Calciumkonzentration wird durch Schließen der VACC beendet und das Calcium letztendlich durch intrazelluläre Pufferung des freien Calciums, die Rückführung in intrazelluläre Speicher und den Transport über die Zellmembran in den Extrazellulärraum durch  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und  $\text{Na}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher auf den Ruhewert zurückgeführt. Solche Calciumdynamiken können entweder mithilfe ionensensitiver Farbstoffmoleküle oder mithilfe von fluoreszierenden Reporterproteinen sichtbar gemacht werden. Zu solchen Biosensoren gehört unter anderem das sog. GCaMP, welches ursprünglich von Nakai *et al.* (2001) entwickelt wurde. GCaMP ist ein fusioniertes Protein aus zyklisch permutiertem GFP (*circularly permuted green fluorescent protein*, cpGFP), Calmodulin und M13 (Myosin-leichte-Ketten-Kinase). Sobald Calcium vorhanden ist und durch Calmodulin gebunden wird, ändert dies seine Konformation, sodass über bestimmte Proteindomänen weitere Zielproteine, unter anderem M13 gebunden werden. Dies wiederum führt zu einer Strukturänderung des GFP, was die Deprotonierung der GFP-Chromophorgruppe zur Folge hat und damit die Emission von Fluoreszenzlicht ermöglicht. Die Fluoreszenzintensität wird dabei durch die Komplexbildung des GCaMP mit Calcium erhöht - d.h. also, je höher die Calciumkonzentration, desto heller ist entsprechend die Fluoreszenz. Sinkt die Calciumkonzentration, geht das GCaMP wieder in seinen Grundzustand über und die Fluoreszenz nimmt ab (Nakai *et al.*, 2001). Abbildung 5 zeigt schematisch das Design eines GCaMP-basierten Calciumsensors am Beispiel von GCaMP6m.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Calciummessungen mit der genetisch kodierten GCaMP-Variante GCaMP6s (Chen *et al.*, 2013) durchgeführt und die gewünschte Zellspezifität der GCaMP6s-Expression über die Verpaarung mit einer entsprechenden Cre-Treibermauslinie erreicht (vgl. 2.2.4 Versuchstiere).



**Abbildung 5: Struktur und Funktionsweise des Calciumindikators GCaMP.** **A)** Kristallstruktur von GCaMP6m mit gebundenem Calcium (Ding *et al.*, 2014). **B)** Schematische Darstellung eines GCaMP-basierten Calciumindikators. GCaMP besteht aus zyklisch permutiertem GFP (cpGFP), welches zwischen Calmodulin (CaM) und einem M13-Protein inseriert ist. Durch Bindung von Calcium werden über eine Konformationsänderung des CaM-M13-Komplexes Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften des cpGFP induziert (modifiziert nach Broussard *et al.*, 2014).

Die olfaktorischen *Bulbi* wurden für Calciummessungen wie unter Abschnitt 2.2.5 präpariert, geschnitten und nach der Inkubationszeit im Wärmebad bzw. bei Raumtemperatur in die Perfusionskammer des Mikroskops überführt. Zur Untersuchung Calcium-abhängiger Veränderungen der GCaMP6s-Fluoreszenz wurden mithilfe des konfokalen Mikroskops Zeitserien aufgenommen, die die Veränderungen der Calciumkonzentration als Antwort auf die Applikation von Neurotransmittern bzw. auf die photolytische Freisetzung von Nukleotiden erfassten. Als Lichtquelle diente ein Argon-Ionenlaser mithilfe dessen GCaMP6s mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wurde, da diese dem Exzitationsmaximum des GFP-Chromophors von 470 nm am nächsten ist. Der Laser wurde mit 100 % seiner Leistung betrieben und das *pinhole* i.d.R. vollständig geöffnet. Dies hat zwar eine schlechtere axiale Auflösung zur Folge, begünstigt aber eine höhere Lichtausbeute. Der *gain* wurde so eingestellt, dass die GCaMP6s Fluoreszenzsignale deutlich sichtbar waren. Die Aufnahmen erfolgten bei einfachem digitalem Zoom mit einer Auflösung von 256 x 256 Pixeln. Die geringe Auflösung wurde zugunsten der *Scan-Rate* gewählt, sodass Zeitserien mit einer Geschwindigkeit von 580 ms pro Bild aufgenommen werden konnten. Das Emissionsmaximum von GCaMP6s liegt bei 509 nm und die Fluoreszenz wurde entsprechend über einen Bandpassfilter (500–530 nm) detektiert.

## 2.5 GENOTYPISIERUNG

Alle Genotypisierungen sowie die Entnahme der Gewebebiopsien wurden von Frau Anne Theil oder Frau Anne Catrin Rakete durchgeführt.

### a. Lösungen

Genotypisierungen der transgenen Mauslinien erfolgten mithilfe des REDEExtract-N-Amp Tissue PCR Kit der Firma Sigma Aldrich.

10 x TBE Puffer: 0,89 M TRIS, 0,89 M Borsäure, 0,02 M EDTA in Aqua<sub>deion</sub>

### b. Durchführung

Das Gewebestück der zu testenden Maus (Stanzbiopsie vom Mausohr) wurde nach Herstellerangaben extrahiert und mit dem Extrakt die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) folgendermaßen angesetzt:

Wasser	4 µL
REDEExtract	10 µL
Primer forward	1 µL
Primer reverse	1 µL
Gewebeextrakt	4 µL

Die Primersequenzen der genotypisierten Mauslinien sind in Tabelle 8 aufgelistet. Außer den zu testenden Proben wurden pro PCR eine Wasserkontrolle, sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle angesetzt. Die Primer wurden in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µL aufgefüllt. Für die Wasserkontrolle wurde anstatt des Gewebeextraktes das entsprechende Volumen H<sub>2</sub>O der Qualität HPLC pipettiert.

**Tabelle 8: Primersequenzen für Genotypisierungen (beginnend mit 5'-Ende).**

Mauslinie	Primer Sequenz <i>forward</i>	Primer Sequenz <i>reverse</i>
A <sub>1</sub> WT	TACATTGGCATCGAGGTCCTCATT	GAGCTCTGGGTGATGAGGAC
A <sub>1</sub> KO	GCGATACCGTAAAGCACGAG	CCGTGTTCCGGCTGTCAGCG
Pcdh21	CGCCGCAGTCACCCACAA	CCCCAGAAATGCCAGATTACGTAT
Eno2 (Cre*)	AAACGTTGATGCCGGTGAACGTGC	TAACATTCTCCCACCGTCAGTACG

\*um bei Eno2-Cre Verpaarungen Individuen mit dem gewünschten Genotyp zu identifizieren, wurde auf das Vorhandensein der Cre-Rekombinase überprüft.

Nach der PCR wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und die Banden nach dem Gel-Lauf in 1x TBE Puffer mittels Ethidiumbromidfärbung im Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht.

## 2.6 IMMUNHISTOCHEMIE

Für die Immunhistochemie wurden folgende Lösungen und Antikörper verwendet:

## a. Lösungen

4 % Paraformaldehyd (PFA):	Roti-Histofix, Carl Roth
1x PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> ):	130 mM NaCl, 7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt
Blockierlösung:	10 % NGS ( <i>native goat serum</i> ), 0,5 % Triton X-100 in PBS
Primärantikörperlösung:	1 % NGS, 0,05 % Triton X-100 in PBS
Eindeckmedium:	Shandon Immu-Mount, Thermo Fisher Scientific

## b. Antikörper

Tabelle 9: Primärantikörper.

Antigen	Spezies	Art	Verdünnung	Bezug
P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor	Kaninchen	polyklonal	1:100	Proteintech, 182731AP
VNUT	Meerschweinchen	polyklonal	1:500	Merck, ABN83
GFAP	Kaninchen	polyklonal	1:500	Dako, N1506
	Huhn			abcam, ab4674
S100β	Kaninchen	polyklonal	1:500	Dako, Z0311
Tyrosin-Hydroxylase	Maus	monoklonal	1:100	SySy, 213111
Calbindin D-28k	Huhn	polyklonal	1:200	SySy, 214006
Calretinin	Huhn	polyklonal	1:200	SySy, 214106
GFP	Huhn	polyklonal	1:500	Novus, NB100-1614

SySy, Synaptic Systems

Tabelle 10: Sekundärantikörper.

Sekundärantikörper	Spezies	Antigen	Verdünnung	Bezug
Alexa Fluor 488	Ziege	anti-rabbit IgG	1:1000	TFS, A11034
		anti-guinea pig IgG	1:1000	Sigma, SAB4600033
Alexa Fluor 555	Ziege	anti-chicken IgG	1:1000	abcam, ab150170
		anti-rabbit IgG	1:1000	TFS, A21428
		anti-mouse IgG	1:1000	TFS, A21424
Alexa Fluor 405	Ziege	anti-rabbit IgG	1:1000	TFS, A31556

TFS, Thermo Fisher Scientific

Die Zellkernfärbungen wurden mit Hoechst33342 (2,5–5 μM) durchgeführt.

### c. Durchführung

Nach der Präparation der olfaktorischen *Bulbi* (siehe 2.2.5) wurden diese zunächst eine Stunde in 4 % PFA bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die *Bulbi* 3x10 Minuten in PBS gewaschen, um das PFA möglichst vollständig zu entfernen. Mithilfe eines Vibratoms wurde das fixierte Gewebe mit einer Dicke von 100–150  $\mu\text{m}$  sagittal oder horizontal geschnitten. Nach dem Schneiden erfolgte eine einstündige Inkubation in 1 mL Blockierlösung (10 % NGS, 0,5 % Triton X-100, in PBS) bei Raumtemperatur, was der Permeabilisierung der Membran und der Sättigung unspezifischer Bindungsstellen dienen sollte. Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper in 200-500  $\mu\text{L}$  Antikörperlösung (1% NGS, 0,05 % Triton X-100 in PBS) in der gewünschten Verdünnung angesetzt, die Färbeschälchen mit Parafilm abgedichtet und bei 4°C 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 10 Minuten in PBS gewaschen. Im Anschluss folgte die Inkubation mit den jeweiligen Sekundärantikörpern und ggf. Hoechst33342 in PBS erneut bei 4°C für 24 Stunden. Abschließend wurden die Schnitte erneut 3 x 10 Minuten mit PBS gewaschen und auf Objektträger gezogen. Verwendet wurde hierbei ein selbstaushärtendes Eindeckmedium und Nagellack zur Fixierung des Deckgläschens auf dem Präparat.

Wurden Färbungen mit einem Sekundärantikörper gegen Maus-Immunglobuline (IgGs) durchgeführt, wurde das Versuchstier vor der Entnahme der olfaktorischen *Bulbi* perfundiert. Hiermit sollte sichergestellt werden, dass das Blutgefäßsystem des Tieres frei von körpereigenen IgGs ist, mit denen es ansonsten zu Kreuzreaktionen mit dem eigentlichen Epitop des Primärantikörpers kommen könnte. Hierfür erfolgte nach der Anästhesie die Eröffnung des Thorax und die Durchtrennung der Rippenbögen mithilfe einer Schere. Anschließend wurde der linke Ventrikel des Herzens mit einer Kanüle punktiert, sowie das rechte Atrium mit einem kleinen Schnitt eröffnet. Mithilfe eines Pumpensystems wurden die Blutgefäße über den Kanülenzugang im Herzen für 10 Minuten mit PBS durchspült. Danach wurde für weitere 10 Minuten 4 % PFA eingewaschen, um das Gewebe sofort zu fixieren. Im Anschluss wurden die olfaktorischen *Bulbi*, wie in 2.2.5 beschrieben, herauspräpariert und abermals für 30 Minuten in 4 % PFA fixiert. Die weitere Behandlung erfolgte anschließend wie im oberen Abschnitt erläutert.

### d. Aufnahmen der immunhistochemischen Färbungen und Bildbearbeitung

Die Aufnahmen der immunhistochemischen Färbungen wurden mithilfe des konfokalen Laserrastermikroskops (Nikon eC1, siehe 2.3.1) gemacht. Übersichtsaufnahmen wurden mit dem Objektiv Plan Apo (10x/0,45) und der *pinhole* Einstellung L (100  $\mu\text{m}$ ) aufgenommen, die Detailaufnahmen mit dem Objektiv Plan Fluor (40x/1,30) und *pinhole* M (60  $\mu\text{m}$ ) unter der Verwendung von Immersionsöl. Detailaufnahmen zeigen i.d.R. Bildprojektionen aus ca. zehn Bildern in einem Abstand von 0,5  $\mu\text{m}$  in der z-Ebene (*z stacks*). Alle Bilder wurden mit einer Auflösung von 2048 x 2048 Pixeln aufgenommen. Damit es bei Überlagerung der

Absorptionsspektren nicht zur Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffs mit mehreren Lasern kommt, wurden alle drei Kanäle getrennt voneinander aufgenommen (*frame lambda*). Der Verstärker (*gain*) wurde so eingestellt, dass gefärbte Strukturen deutlich dargestellt werden, jedoch nicht überstrahlen. Anschließend wurde mithilfe des Programms Photoshop eine Tonwertkorrektur aller drei Kanäle sowie ein Nachschärfen des Bildes vorgenommen.

## 2.7 AUSWERTUNG UND QUANTIFIZIERUNG DER MESSGRÖßEN

### 2.7.1 Datenanalyse und -auswertung

Die im Ergebnisteil dargestellten Messspuren sind beispielhafte, typische Ableitungen für das jeweilige Experiment. Die statistische Auswertung fasst jeweils die dazugehörige Gesamtstichprobe zusammen. Daten von *patch clamp*-Ableitungen, die mit der HEKA Technik generiert wurden, wurden zunächst mithilfe des Programms Bruxon Review in das Dateiformat *abf* konvertiert. Die Analyse und Auswertung aller *patch clamp*-Daten erfolgte dann mit Clampfit 10.2. Die Calciummessungen wurden mit dem Programm EZ-C1 Free Viewer ausgewertet. Die graphischen Darstellungen der elektrophysiologischen Messspuren, relativen Calciumkonzentrationsänderungen und statistischen Analysen wurden mithilfe von OriginPro 9.0G generiert und mittels der Graphiksoftware CoreIDRAW X5 optimiert. Fluoreszenzbilder von Calciumsignalen wurden mithilfe der Programme MacBiophotonics ImageJ und Photoshop CS6 bearbeitet.

### 2.7.2 Verwendete Vorzeichenkonventionen für elektrophysiologische Daten

In der Ganzzellkonfiguration steht die Innenseite der Zellmembran mit der Ableitelektrode in Verbindung, sodass Ströme aus der Pipette heraus auch über die Membran nach außen fließen. Unter Bedingungen der Spannungsklemme werden Ströme immer relativ zum Zytoplasma definiert. Hieraus ergibt sich, dass ein Fluss positiver Ionen in die Zelle hinein bzw. ein Strom von Anionen aus der Zelle heraus ein Einstrom ist und als negativer Strom nach unten dargestellt wird. Ströme positiver Ionen aus der Zelle heraus bzw. von Anionen in die Zelle hinein sind Ausströme und werden als positiver Strom nach oben aufgetragen (Hodgkin und Katz, 1949).

### 2.7.3 Quantifizierung elektrophysiologischer Messgrößen

#### *a. Quantifizierung von ATP-induzierten Einstromen und Depolarisationen*

Die Zunahme der Netzwerkaktivität in Folge der Photoapplikation von ATP wurde als Anzahl synaptischer *events* in einem Zeitrahmen von 3 Sekunden sowie über die Größe des Stromintegrals (*voltage clamp*) bzw. des Integrals der Depolarisation (*current clamp*)

quantifiziert - also derjenigen Fläche, die von der Strom- bzw. Potentialspur und der Basislinie umschlossen wird (Abbildung 6A und B). Im *voltage clamp*-Modus wurde die Basislinie dabei vom Haltestrom festgelegt; im *current clamp*-Modus vom Ruhemembranpotential, was im Bereich der *downstates* definiert wurde. Das Integral wurde beginnend mit Auslösung des Laserlichts für einen Zeitraum von 15 s (*voltage clamp*-Aufnahmen) bzw. 20 s (*current clamp*-Aufnahmen) gebildet. Um einen Effekt sicher auf die Photoapplikation von ATP zurückführen zu können, flossen nur Antworten in die Auswertung mit ein, die größer und/oder länger waren als spontan generierte *population bursts* bzw. die *upstates* bei biphasischen Membranpotentialverläufen. Um Veränderungen in der Größe der Einströme bzw. Depolarisationen durch pharmakologische Manipulation quantitativ zu vergleichen, wurde die jeweilige Kontrolle auf 100 % normiert. Säulendiagramme stellen entsprechend die prozentuale Größe zu diesem Kontrollwert dar.

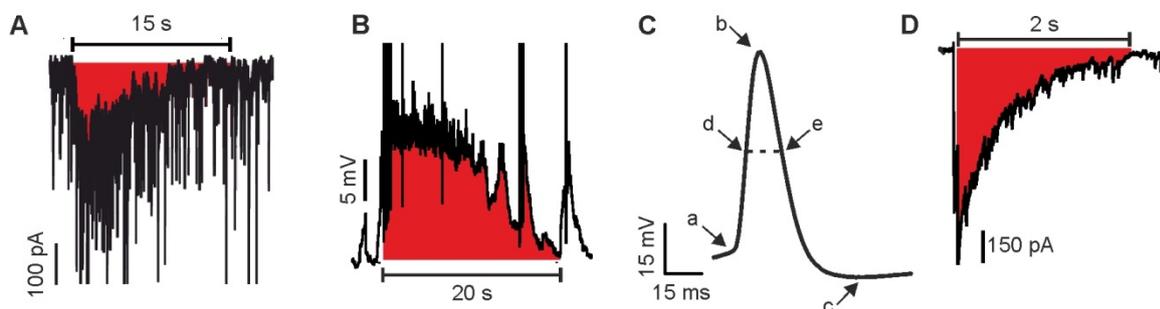
#### *b. Charakterisierung von Aktionspotentialen*

Die Kinetik eines Aktionspotentials wurde mithilfe verschiedener Messgrößen analysiert. Hierzu zählten das Schwellenpotential, die Amplitude der Depolarisation und der Nachhyperpolarisation (jeweils ausgehend vom Schwellenpotential gemessen), sowie die Dauer des gesamten Aktionspotentials und der Depolarisations- und Repolarisationsphase. Die Gesamtdauer wurde anhand der Halbwertsbreite zum Zeitpunkt der halbmaximalen Amplitude bestimmt. Die De- und Repolarisationsdauer wurden über die Anstiegszeit (*rise time*) und die Abfallzeit (*decay time*) bestimmt. Die Anstiegszeit entsprach der Zeit zwischen dem 10 %- und dem 90 %-Wert der maximalen Potentialamplitude ausgehend von der Basislinie (Schwellenpotential), die Abfallzeit entsprechend der Zeit zwischen dem 90 %- und dem 10 %-Wert. Abbildung 6C verdeutlicht die Vermessung der Aktionspotentiale.

#### *c. Quantifizierung der rekurrenten Inhibition*

Die RI wurde durch die Depolarisation einer Mitralzelle ausgelöst, was einen nachfolgenden Einstrom aus IPSCs zur Folge hatte. Da dieser durch die Aktivität verschiedener GABAerger Interneurone hervorgerufen wird, kann dieser Strom als Maß für die Stärke der RI herangezogen werden. Quantifiziert wurde der Strom, indem auch hier das Integral der Stromspur gebildet wurde (Abbildung 6D). Als Basislinie wurde ebenfalls der Haltestrom definiert und das Integral beginnend mit dem Ende des Spannungssprungs über einen Zeitraum von 2 Sekunden gebildet. Um die RI nach Applikation einer Substanz quantitativ zu bestimmen, diente der Mittelwert der letzten drei Integrale vor Eintreffen der Wirkung der jeweiligen Substanz als Kontrolle und wurde auf 100 % normiert. Säulen- oder Liniendiagramme stellen entsprechend den prozentualen Anteil der RI bezogen auf diesen Kontrollwert dar. Um den Effekt von Adenosin zu quantifizieren, wurde der Mittelwert aus den

drei aufeinanderfolgenden Werten, bei denen die Wirkung von Adenosin maximal war, errechnet und relativ zum Kontrollwert dargestellt.



**Abbildung 6: Quantifizierung electrophysiologischer Messwerte.** **A)** Quantifizierung von Einstömen anhand des Stromintegrals (rot). **B)** Quantifizierung von Depolarisationen anhand des Integrals der Potentialspur (rot). **C)** Auswertung von Aktionspotentialen. a, Schwellenpotential; b, höchster Wert der Depolarisation; a-b, Amplitude; c, tiefster Wert der Nachhyperpolarisation; a-c, Amplitude Nachhyperpolarisation; d, halbmaximale Amplitude; d-e, Halbwertsbreite. **D)** Quantifizierung der RI anhand des Integrals des rekurrenten postsynaptischen Stroms (rot).

Abweichende Auswertungen oder Auswertungen weiterer Messgrößen sind im Ergebnisteil zum jeweiligen Experiment beschrieben.

### 2.7.4 Auswertung der Calciummessungen

Zur Auswertung der am konfokalen Laserraster-Mikroskop aufgenommenen Zeitserien der Calciummessungen wurden mithilfe des Programms EZ-C1 Viewer (Nikon) sog. *regions of interest* (ROI) definiert. Die in diesen Bereichen detektierte Helligkeit wird vom Programm in allen Bildern einer Serie in Zahlenwerte zwischen 0 und 255 umgesetzt und der zeitliche Verlauf in einer Kurve dargestellt. Um die Messungen quantitativ auszuwerten, wurden die Zahlenwerte in einer Tabelle ausgegeben, die in Excel importiert wurde. Zu beachten ist, dass die Zellen schon im Ruhezustand unterschiedlich hell fluoreszieren können. Um dennoch eine Vergleichbarkeit zwischen den Zellen gewährleisten zu können, wurden alle gemessenen Fluoreszenzwerte einer Zelle (F) auf den jeweiligen Basiswert normiert. Dieser Basiswert entsprach der Ruhefluoreszenz der Zelle. Er wurde als Mittelwert aus den letzten fünf Messwerten vor Beginn der auszuwertenden Calciumantwort gebildet und als 100 % definiert. Man erhält somit Kurven oder Werte, die eine Änderung der Helligkeit ( $\% \Delta F$ ) und damit eine Änderung der Calciumkonzentrationen wiedergeben, ohne dass die zuvor beschriebenen Unterschiede in der Hintergrund- bzw. Ruhefluoreszenz zum Tragen kommen. Ausgewertet wurden nur Signale, deren Amplitude mindestens 5 % Fluoreszenzänderung anzeigten und somit deutlich größer waren als spontane Fluktuationen in der Basislinie. Außerdem wurden nur Signale ausgewertet, die zeitlich eindeutig der Applikation pharmakologischer Substanzen bzw. der elektrischen Stimulation zugeordnet

werden konnten. Der Stichprobenumfang  $n$  gibt bei Calciummessungen die Anzahl definierter ROIs/Anzahl verwendeter Versuchstiere an. Bei Darstellungen von Calciumsignalen anhand von Fluoreszenzbildern ist die basale Fluoreszenz in Grautönen dargestellt, während Fluoreszenzänderung in Rottönen erscheinen.

## 2.8 STATISTIK

Die statistische Auswertung sowie Erstellung der Diagramme erfolgte mit den Programmen EXCEL 2012/2016 und Origin 9.0. Abgebildete Balkendiagramme stellen hierbei das arithmetische Mittel der in der angegebenen Stichprobengröße ermittelten Werte dar. Wertepunkte in Liniendiagrammen stellen die gemittelten Werte der angegebenen Stichprobengröße pro Messpunkt dar. Als Streuungsmaß für die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert wurde der Standardfehler berechnet und als Fehlerindikator aufgetragen. Bei elektrophysiologischen Messgrößen gibt der Stichprobenumfang  $n$  die Anzahl untersuchter Zellen wieder, wobei die Daten immer aus mindestens drei Individuen gewonnen wurden.

Um zwei Mittelwerte gegeneinander auf Signifikanz zu testen, wurden neben der deskriptiven Statistik ebenfalls nichtparametrische Hypothesentests mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  durchgeführt. Für gepaarte Daten mit mehr als zwei Wertemengen wurde zunächst eine Friedman ANOVA, für ungepaarte Daten eine Kruskal-Wallis ANOVA durchgeführt. Bei  $n > 6$  erfolgte *posthoc* bei abhängigen Wertemengen ein Wilcoxon-Test, bei unabhängigen Wertemengen ein Mann-Whitney-U-Test; bei  $n < 6$  erfolgte *posthoc* ein *student's t*-Test. Für die Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) galt eine Änderung als signifikant, wenn  $p < 0,05$  (\*), als hochsignifikant, wenn  $p < 0,01$  (\*\*), und als höchstsignifikant, wenn  $p < 0,005$  (\*\*\*). Nicht signifikante Unterschiede werden mit dem Kürzel n.s. angegeben.

## 3. ERGEBNISSE

### 3.1 ATP ALS NEUROMODULATOR IM *BULBUS OLFACTORIUS*

ATP dient Zellen nicht nur als Energieträger, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der interzellulären Kommunikation. Im peripheren sowie zentralen Nervensystem kann ATP als alleiniger oder Ko-Transmitter freigesetzt werden und die neuronale Informationsverarbeitung beeinflussen (Burnstock, 2006). Im *Bulbus olfactorius* ist eine Wirkung von ATP auf Gliazellen schon länger bekannt (Doengi *et al.*, 2008; Thyssen *et al.*, 2010). Außerdem gibt es Hinweise, dass ATP auch auf Neurone wirkt und die neuronale Netzwerkaktivität im *Bulbus olfactorius* erhöht (Fischer *et al.*, 2012). Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Netzwerkaktivierung und ihre Folgen auf die neuronale Informationsverarbeitung sind bisher aber weitestgehend unbekannt und wurden in dieser Arbeit erstmals untersucht.

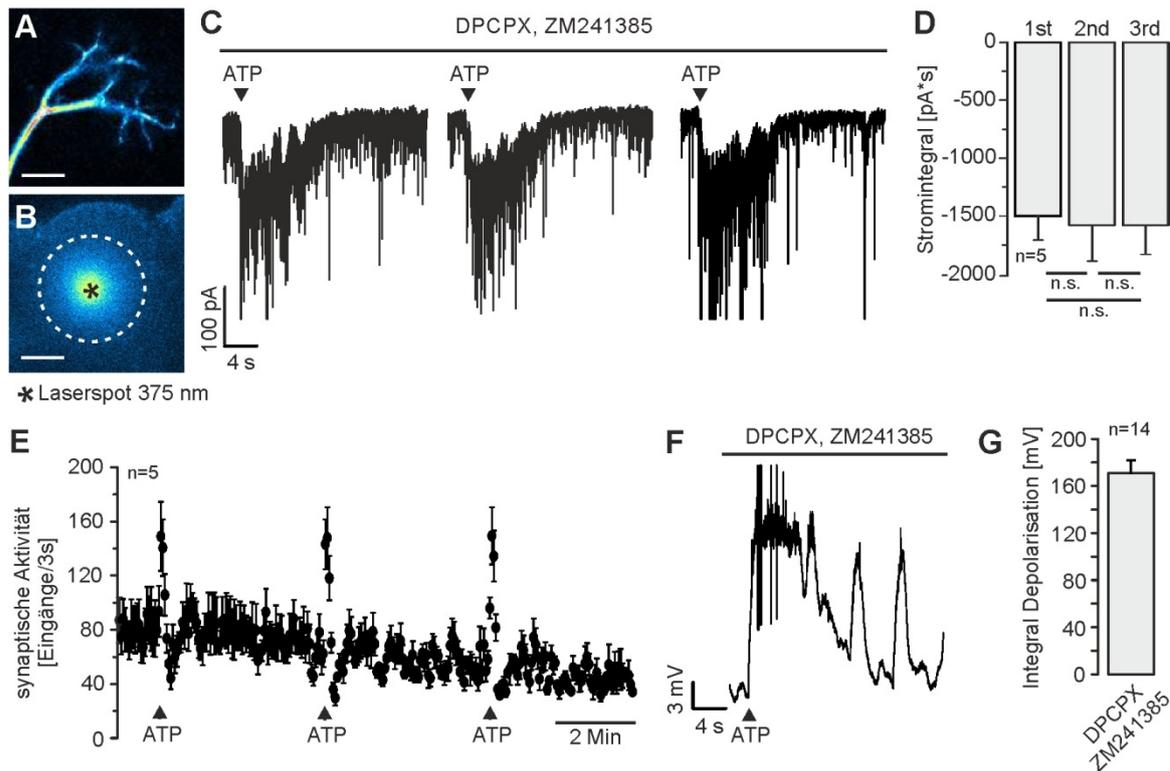
Aufgrund der hohen Aktivität ATP-abbauender Enzyme im *Bulbus olfactorius* und der damit einhergehenden schnellen Hydrolyse von ATP bedarf es bei der Untersuchung von ATP als Neurotransmitter spezieller Freisetzungskinetiken. Aus diesen Gründen wurde ATP mittels lokaler Photoapplikation aus sogenanntem *caged* ATP appliziert. Hierbei wird ein inertes Derivat von ATP (NPE- oder DMNPE-*caged* ATP) durch Bestrahlung mit UV-Licht gespalten, so dass biologisch aktives ATP entsteht. Diese Form der Applikation entspricht am ehesten der physiologischen Kinetik der Neurotransmitterfreisetzung und garantiert eine präzise räumliche sowie zeitliche Auflösung (Kaplan *et al.*, 1978; Giovannardi *et al.*, 1998; Ellis-Davies, 2007). Als Ort der Photolyse wurde die Glomerularschicht gewählt. Glomeruli bilden die erste Verarbeitungsebene im olfaktorischen *Bulbus*, in der die von den ORN eingehenden sensorischen Signale auf Mitral- und *tufted*-Zellen sowie PG-Zellen übertragen werden. Außerdem wird ATP endogen an den Axonterminalen der ORN in der Glomerularschicht zusammen mit Glutamat freigesetzt (Thyssen *et al.*, 2010). Fischer *et al.* (2012) zeigten zudem, dass ATP nicht nur bei globaler, sondern auch bei lokaler photolytischer Freisetzung im Glomerulus zu einer Zunahme der synaptischen Aktivität und einem Einstrom in Mitralzellen führte. Beides weist darauf hin, dass ATP bei der synaptischen Prozessierung der Geruchsinformation in den Glomeruli eine wichtige Rolle spielt.

#### 3.1.1 *Laserspot*-Photolyse von *caged* ATP induziert synaptische Aktivität sowie eine Depolarisation in Mitralzellen

Um den Einfluss von ATP auf das prozessierende neuronale Netzwerk des olfaktorischen *Bulbus* zu untersuchen, wurden die synaptischen Eingänge in Mitralzellen bei lokaler Photoapplikation von ATP im Glomerulus mittels *patch clamp*-Technik aufgenommen.

Mitralzellen sind mit nahezu allen anderen Neuronen des Netzwerkes verbunden und integrieren die Signale über zahlreiche synaptische Kreisläufe. Damit können Mitralzellen als Monitor für die Netzwerkaktivität im olfaktorischen *Bulbus* herangezogen und eine Modulation dieser Aktivität durch purinerge Mechanismen beurteilt werden. Aufgrund der hohen Aktivität der Ektonukleotidasen wird das photolytisch freigesetzte ATP mutmaßlich sehr schnell zu ADP und Adenosin abgebaut. Um eventuelle adenosinerge von ATP-vermittelten Effekten zu separieren, erfolgten die Experimente standardmäßig in Anwesenheit von Antagonisten für die Adenosinrezeptoren des Typ  $A_1$  und  $A_{2A}$  (DPCPX, 1  $\mu\text{M}$  und ZM241385, 0,1  $\mu\text{M}$ ).  $A_{2B}$ - und  $A_3$ -Rezeptoren sind im ZNS deutlich seltener vertreten als  $A_1$ - und  $A_{2A}$ -Rezeptoren (Taliani *et al.*, 2010; Burnstock *et al.*, 2011). Im *Allen Brain Atlas* ist zwar eine Expression von  $A_{2B}$ -Rezeptoren in der Glomerular-, Mitral- sowie Körnerzellschicht beschrieben, da  $A_{2B}$ - und auch  $A_3$ -Rezeptoren aber eine sehr geringe Affinität gegenüber Adenosin aufweisen, wurde auf eine Inhibition dieser Adenosin-Rezeptorsubtypen verzichtet. Um sowohl glutamaterge als auch GABAerge synaptische Eingänge abzuleiten, erfolgte die Messung in der Ganzzellkonfiguration bei einem Haltepotential von -70 mV und unter Verwendung einer Intrazellulärlösung mit erhöhter Chloridkonzentration. Bei den gegebenen Ionenverhältnissen lag das Chloridumkehrpotential bei ca. 3 mV und sowohl inhibitorische als auch exzitatorische Ströme wurden als Einstrom dargestellt. Um denjenigen Glomerulus zu visualisieren, in den die abgeleitete Mitralzelle ihren apikalen *tuft* projiziert, beinhaltete die Intrazellulärlösung den Fluoreszenzfarbstoff Atto 488 Hydrazid (10  $\mu\text{M}$ , Abbildung 7A). Nach Identifikation des Zielglomerulus wurde das Perfusionssystem gestoppt und *caged* ATP direkt in die Ableitungskammer pipettiert, sodass eine Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  im Bad vorlag. Zur ausreichenden Diffusion von *caged* ATP im Versuchsbad wurde vor der ersten bzw. zwischen wiederholter Photolyse vier Minuten gewartet. Die Laserdiode wurde auf den identifizierten Glomerulus ausgerichtet und die Photolyse durch Beleuchtung mit 375 nm Laserlicht (100 ms, 35 mW) lokal in dem entsprechenden Glomerulus durchgeführt (Abbildung 7B). Zunächst erfolgte die Photolyse unter Ableitung der Mitralzelle in der Spannungsklemme (*voltage clamp*). Wie zuvor bei Fischer *et al.* (2012) gezeigt, führte die Freisetzung von ATP zu einer Zunahme der synaptischen Eingänge in die gemessene Mitralzelle, was die Aktivierung von Zellen des glomerulären Netzwerkes widerspiegelt (Abbildung 7C und E). Die synaptischen Eingänge summierten sich zu einem Einstrom auf, welcher als Stromintegral quantifiziert wurde (Abbildung 7D). Die Photolyse konnte repetitiv durchgeführt werden und löste bei der ersten Applikation von ATP im Mittel einen Einstrom von  $-1500 \pm 206 \text{ pA}\cdot\text{s}$ , bei der zweiten Applikation einen Einstrom von  $-1578 \pm 310 \text{ pA}\cdot\text{s}$  und bei der dritten Applikation einen Einstrom von  $-1579 \pm 251 \text{ pA}\cdot\text{s}$  aus ( $n=5$ ). Die innerhalb einer Mitralzelle wiederholt ausgelösten Antworten waren gegeneinander nicht signifikant unterschiedlich. Es ist also davon auszugehen, dass unverbrauchtes *caged* ATP nach dem Lichtimpuls in den zuvor

beleuchteten Bereich diffundierte und zur erneuten Photolyse zur Verfügung stand. Des Weiteren deutet dies darauf hin, dass die Antworten keiner Desensibilisierung unterlagen. Anhand der Versuchsbedingungen konnte nicht unterschieden werden, ob es sich bei der ATP-induzierten Antwort in Mitralzellen um exzitatorische oder inhibitorische Ströme handelt. Die Versuche wurden daher in der Stromklemme (*current clamp*) wiederholt und die Veränderung des Membranpotentials bei Photoapplikation von ATP aufgezeichnet. Um eine Vergleichbarkeit des induzierten Effekts innerhalb und zwischen Zellen zu gewährleisten, erfolgte die Photolyse von *caged* ATP bei gleichzeitiger Ableitung der Mitralzelle im *current clamp*-Modus bei einem möglichst einheitlichen Membranpotential von  $-55 \pm 5$  mV, das ggf. mittels negativer Strominjektion eingestellt wurde. Für die Messungen im *current clamp*-Modus wurde eine Kaliumgluconat-basierte Intrazellulärlösung mit physiologischer Chloridkonzentration verwendet, bei der inhibitorische synaptische Ereignisse zu einer Hyperpolarisation und somit Hemmung führen. Daher können in den durchgeführten *current clamp*-Messungen exzitatorische und inhibitorische Effekte unterschieden werden. Abbildung 7F zeigt, dass die Photoapplikation von ATP eine prominente Membrandepolarisation in Mitralzellen auslöste, die über das Integral der Potentialspur quantifiziert wurde und im Mittel  $171 \pm 12$  mV\*s betrug (n=14, Abbildung 7G). Somit führt die ATP-induzierte Netzwerkaktivierung in der Summe offenbar zu einer Exzitation von Mitralzellen.

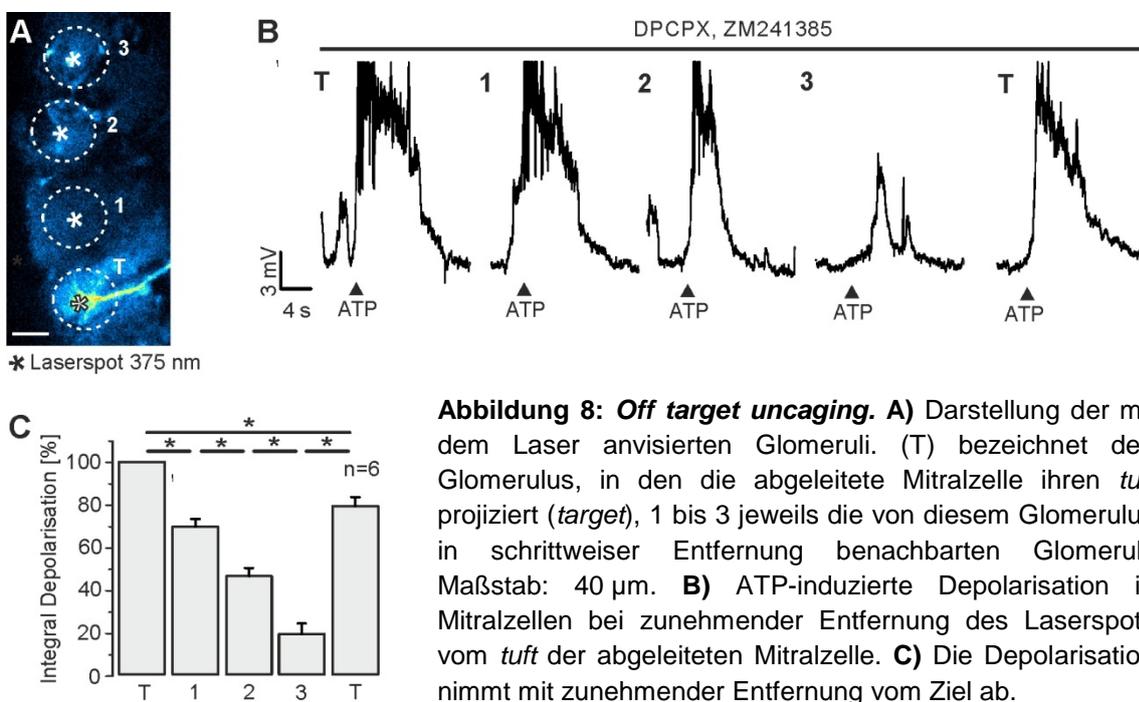


**Abbildung 7: Photolyse von *caged* ATP erhöht die Netzwerkaktivität im *Bulbus olfactorius*.** **A)** Fluoreszenzaufnahme des apikalen *tufts* einer mit Atto 488 (10  $\mu$ M) gefüllten Mitralzelle. Maßstab: 20  $\mu$ m. **B)** Lokale Illumination eines Glomerulus mittels 375 nm Laserspot. Maßstab: 40  $\mu$ m. **C)** Stromantwort einer Mitralzelle im *voltage clamp*-Modus ausgelöst durch Photoapplikation von ATP. Die repetitive Applikation von ATP führt zu erhöhter synaptischer Aktivität, die sich zu einem Einstrom aufsummiert. **D)** Größe der ATP-induzierten Einstrome, gemessen als Stromintegral. **E)** ATP erhöht die Frequenz synaptischer Eingänge in Mitralzellen. **F)** Im *current clamp*-Modus führt die Photolyse von *caged* ATP zu einer Membrandepolarisation in Mitralzellen. **G)** Größe der ATP-induzierten Depolarisation in Mitralzellen, gemessen als Integral der Potentialspur.

Um zu testen, ob die Aktivierung des Netzwerkes auf denjenigen Glomerulus beschränkt ist, in dem ATP freigesetzt wurde, erfolgte die Photolyse mit zunehmender Entfernung bezogen auf die abgeleitete Mitralzelle auch in benachbarten Glomeruli (sog. *off target uncaging*, Abbildung 8A). Im Zielglomerulus (*target*) löste ATP eine Depolarisation von  $166 \pm 21$  mV\*s (n=6) aus, führte aber auch bei Freisetzung in benachbarten Glomeruli noch zu einer Depolarisation der abgeleiteten Mitralzelle. Im Vergleich zum *target uncaging* wurde diese mit zunehmender Entfernung kleiner. So betrug die Depolarisation bei Photoapplikation von ATP im direkt benachbarten Glomerulus noch  $69 \pm 4$  % (n=6) der *target*-Applikation, im Abstand von zwei Glomeruli noch  $46 \pm 4$  % (n=6). Bei einem Abstand von drei Glomeruli wurde noch eine Depolarisation von  $19 \pm 5$  % (n=6) der *target*-Applikation ausgelöst. Die darauffolgende Photolyse im Zielglomerulus induzierte wieder eine Depolarisation von  $79 \pm 4$  % der ersten *target*-Applikation (n=6,  $p < 0,05$ , Abbildung 8B und C). Zu beachten ist,

dass die Auslösung des Laserlichts über die *patch clamp software* zeitlich gesteuert wurde. Die Applikation von ATP erfolgte daher teilweise auch während der *upstates*, wie bspw. in Abbildung 8B, Messspur (1) zu sehen. Auch in den folgenden Experimenten sind teilweise ATP-Applikationen während der *upstates* dargestellt.

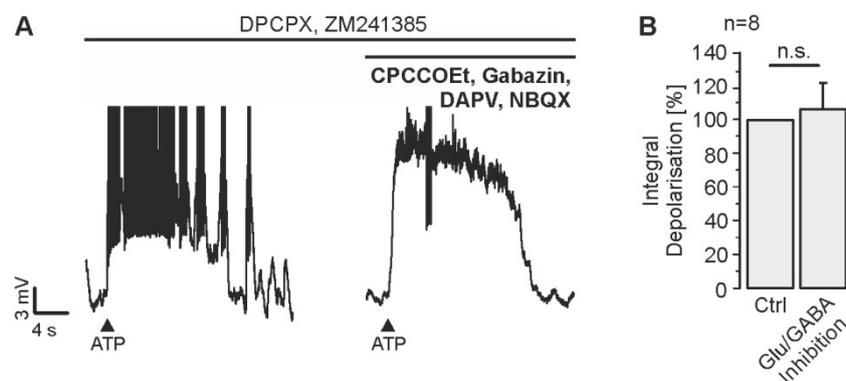
Zusammenfassend zeigt die Quantifizierung der ATP-induzierten Membrandepolarisationen zwar signifikante Unterschiede zum jeweils benachbarten Glomerulus. Allerdings blieb die Depolarisation erst bei einem Abstand von drei Glomeruli fast vollständig aus. Somit scheinen auch umliegende glomeruläre Netzwerke aktiviert zu werden, in denen die Photoapplikation von ATP nicht direkt erfolgte.



### 3.1.2 Die ATP-induzierte Antwort in Mitralzellen ist unabhängig von GABAerger und glutamaterger Neurotransmission

Die prinzipalen Transmittersysteme im *Bulbus olfactorius* beruhen auf GABAerger und glutamaterger Neurotransmission (Halász und Shepherd, 1983). Um eine Beteiligung dieser Neurotransmitter an der ATP-induzierten Netzwerkaktivierung und Depolarisation von Mitralzellen zu beurteilen, wurde die Photolyse von *caged* ATP zusätzlich zur Inhibition adenosinergischer Rezeptoren in Anwesenheit von Antagonisten ionotroper Glutamaterezeptoren (DAPV, 50  $\mu\text{M}$ ; NBQX 10  $\mu\text{M}$ ), metabotroper Glutamaterezeptoren des Typ  $\text{mGluR}_1$  (CPCCOEt, 100  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren (Gabazin, 5  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Die lokale Applikation von ATP im Glomerulus löste in Mitralzellen unter Kontrollbedingungen im Mittel

eine Depolarisation von  $174 \pm 16$  mV\*s ( $n=8$ ) aus. Diese blieb auch unter vollständiger Blockade glutamaterger und GABAerger Neurotransmission bestehen und wurde um  $6 \pm 16$  % nicht signifikant verstärkt ( $p=0,84$ , Abbildung 9A und B). Dieses Ergebnis zeigt, dass die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen nicht auf glutamaterge oder GABAerge Signalwege zurückgeführt werden kann. Um mögliche Einflüsse glutamaterger, GABAerger sowie adenosinerger Transmission dennoch *a priori* auszuschließen, wurden alle folgenden Messungen, soweit nicht anders angegeben, mit der hier beschriebenen Kombination von Antagonisten der genannten Transmissionswege durchgeführt.

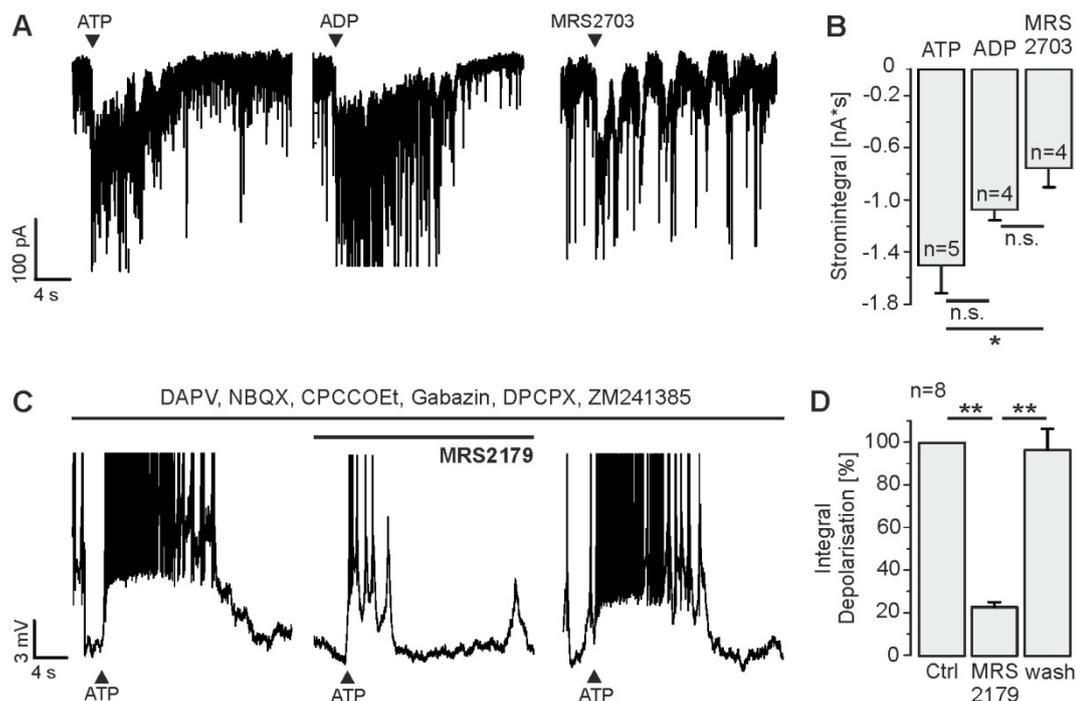


**Abbildung 9: Die ATP-induzierte Depolarisation von Mitralzellen ist unabhängig von glutamaterger oder GABAerger Neurotransmission.** **A)** ATP-induzierte Depolarisation einer Mitralzellen unter Kontrollbedingungen (links) und unter zusätzlicher Blockade von glutamaterger und GABAerger Transmission mittels CPCCOEt (100  $\mu$ M), Gabazin (5  $\mu$ M), DAPV (50  $\mu$ M) und NBQX (10  $\mu$ M). **B)** Die Inhibition glutamaterger oder GABAerger Neurotransmission hat keinen signifikanten Einfluss auf die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen. Glu, Glutamat.

### 3.1.3 Die Wirkung von ATP wird über P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt

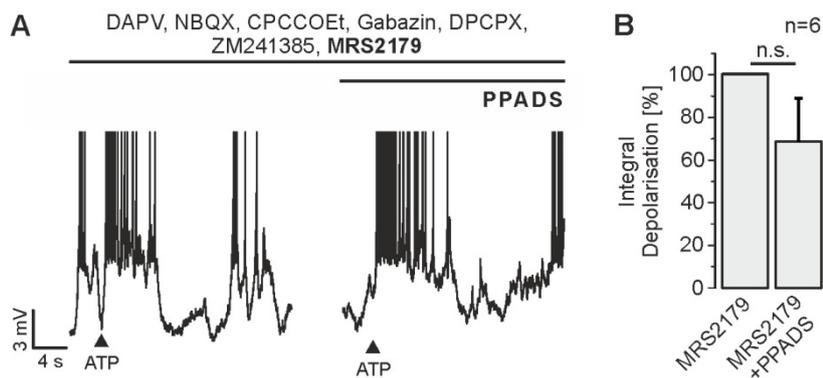
Fischer *et al.* (2012) applizierten ATP mittels großflächiger Photolyse in allen Schichten des olfaktorischen *Bulbus* gleichzeitig und zeigten, dass die ATP-induzierte Netzwerkaktivität auf einer Stimulation von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren beruht. Es sollte daher getestet werden, ob die ATP-induzierte Antwort auch bei lokaler Freisetzung von ATP im Glomerulus P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängig ist oder zumindest auf die Aktivierung von purinergen Rezeptoren zurückgeführt werden kann. Hierfür wurden abermals Mitralzellen abgeleitet und verschiedene Agonisten und Antagonisten von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren getestet, die in der Lage sind, die ATP-induzierte Antwort in Mitralzellen zu imitieren oder zu inhibieren. Neben ATP wurden zu diesem Zweck auch ADP und 2-MeSADP in ihrer *caged* Form appliziert (NPE-*caged* ADP, MRS2703). NPE-*caged* ADP wurde, wie *caged* ATP, so eingesetzt, dass eine Endkonzentration von 100  $\mu$ M im Versuchsbad erreicht wurde. 2-MeSADP bindet mit einer ca. zehnfach höheren Affinität an P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren als ATP, weswegen MRS2703 in einer geringeren

Konzentration eingesetzt wurde (20  $\mu\text{M}$ ; Waldo und Harden, 2004). Im Gegensatz zu ATP aktiviert ADP vor allem Rezeptorsubtypen der P2Y-Gruppe, aber keine P2X-Rezeptoren. Da MRS2703 bei Photolyse in den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-spezifischen Agonisten 2-MeSADP überführt wird, lässt sich damit eine Einordnung innerhalb der P2Y-Rezeptorsubtypen treffen. Abbildung 10A und B zeigen, dass sowohl ADP als auch 2-MeSADP unter Verwendung einer Intrazellulärlösung mit erhöhtem Chloridgehalt eine Zunahme der synaptischen Eingänge und einen Einstrom in Mitralzellen im *voltage clamp*-Modus auslösen und die Antworten vergleichbar mit der ATP-induzierten Aktivität sind. Mit zunehmender Spezifität der P2Y-Rezeptor-Agonisten wird die Antwort, gemessen als Integral des Einstroms, jedoch kleiner. So induzierte ATP im Mittel einen Einstrom von  $-1500 \pm 206 \text{ pA*s}$  (n=5), ADP einen Einstrom von  $-1156 \pm 204 \text{ pA*s}$  (n=4) und 2-MeSADP einen Einstrom von  $-755 \pm 138 \text{ pA*s}$  (n=4). Ein signifikanter Unterschied konnte allerdings nur zwischen der ATP- und der 2-MeSADP-induzierten Antwort festgestellt werden ( $p < 0,05$ ). Aufgrund dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass der Effekt von ATP größtenteils über P2Y-Rezeptoren und zumindest zum Teil von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt wird. Um dieses Ergebnis zu bekräftigen, wurde ATP in Anwesenheit des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 (100  $\mu\text{M}$ ) appliziert. Unter Kontrollbedingungen war die im *current clamp*-Modus gemessene Depolarisation in Mitralzellen im Mittel  $140 \pm 19 \text{ mV*s}$  (n=8) groß und wurde durch MRS2179 hochsignifikant und reversibel um  $77 \pm 2 \%$  verringert, war aber nicht vollständig blockiert (n=8,  $p < 0,01$ , Abbildung 10C und D). Trotzdem bestätigt dies, dass der Großteil des Effekts von ATP über die Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt wird.



**Abbildung 10: Der ATP-induzierte Effekt in Mitralzellen ist P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelt.**  
**A)** Stromantworten von Mitralzellen bei Photolyse von NPE-caged ATP (100 μM), NPE-caged ADP (100 μM) sowie MRS2703 (20 μM), welches durch Photolyse in den P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-spezifischen Agonisten 2-MeSADP überführt wird. **B)** Die Größe des Einstroms wird mit zunehmender Spezifität der P2Y-Rezeptor-Agonisten kleiner. **C)** Effekt des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 (100 μM) auf die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen. **D)** MRS2179 reduziert die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen hochsignifikant und reversibel.

ATP aktiviert neben einigen P2Y-Rezeptorsubtypen insbesondere auch P2X-Rezeptoren. Es war zu beobachten, dass ca. 20 % der ATP-induzierten Depolarisation MRS2179-insensitiv ist und daher eventuell auf die Aktivierung weiterer P2-Rezeptoren zurückgeführt werden kann. Ob dies der Fall ist, wurde mittels des unspezifischen P2-Rezeptor-Antagonisten PPADS (100 μM) getestet. Hierfür wurde die Photolyse von caged ATP in Anwesenheit von MRS2179 als Kontrolle durchgeführt, PPADS anschließend über die Badperfusion appliziert und die Photolyse wiederholt (Abbildung 11A). In Anwesenheit von MRS2179 betrug die ATP-induzierte Depolarisation im Mittel  $38 \pm 5$  mV\*s (n=6) und wurde durch zusätzliche Anwesenheit von PPADS nicht signifikant um  $32 \pm 20$  % reduziert (n=6, p=0,31, Abbildung 11B). Über welche Rezeptoren oder Mechanismen der MRS2179-insensitive Anteil der ATP-induzierten Depolarisation vermittelt wird, bleibt daher offen.



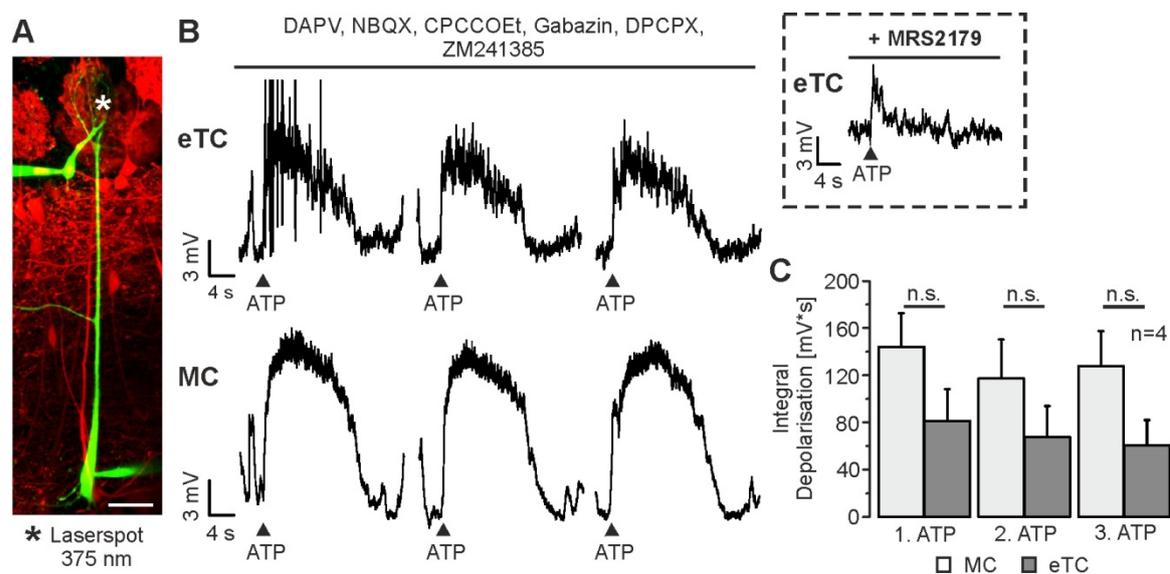
**Abbildung 11: Beteiligung weiterer P2-Rezeptoren am ATP-induzierten Effekt in Mitralzellen.** **A)** ATP-induzierte Depolarisation einer Mitralzellen in MRS2179 (links) und zusätzlicher Anwesenheit von PPADS (100  $\mu$ M, rechts), einem unspezifischen P2-Rezeptorantagonisten. **B)** PPADS hat keinen signifikanten Einfluss auf den MRS2179-insensitiven Anteil der ATP-induzierten Depolarisation.

### 3.1.4 Mitralzellen und externale *tufted*-Zellen reagieren uniform auf die glomeruläre Photoapplikation von ATP

Neben Mitralzellen bilden *tufted*-Zellen die zweite Population von Projektionsneuronen im olfaktorischen *Bulbus*. Da beide Zelltypen sehr ähnliche Eigenschaften aufweisen, sollte überprüft werden, ob *tufted*-Zellen ebenfalls durch ATP moduliert werden. Hierfür wurde die Subpopulation der eTC untersucht und ATP-induzierte Antworten in *patch clamp*-Paarableitungen von Mitralzellen und eTC verglichen. Aufgrund der Verwendung der transgenen Reportermauslinie *Pcdh21 x tdT*, die unter der Kontrolle des Mitral- und *tufted*-zellspezifischen Promotors *Pcdh21* das rot-fluoreszierende Protein *tdTomato* exprimieren, konnten eTC anhand ihrer roten Fluoreszenz und periglomerulären Lage identifiziert werden. Um zu bestätigen, dass beide Zellen in denselben Glomerulus projizieren, wurden sowohl Mitralzellen als auch eTC mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefüllt (Abbildung 12A) und der entsprechende Glomerulus mit dem Laser angesteuert.

Wie in Mitralzellen, konnte auch in eTC trotz Inhibition glutamaterger, GABAerger und adenosinerger Neurotransmission eine ATP-induzierte Depolarisation ausgelöst werden. Anhand der Paarableitungen von Mitralzellen und eTC lässt sich erkennen, dass die Depolarisationen beider Zellen in Folge repetitiver ATP-Applikationen eine sehr ähnliche Ausprägung aufwiesen (Abbildung 12B). In eTC war die Depolarisation bei der ersten Photolyse von *caged* ATP im Mittel  $102 \pm 17$  mV\*s groß, bei der zweiten Photolyse  $85 \pm 21$  mV\*s groß und betrug bei der dritten Photolyse  $76 \pm 15$  mV\*s (n=4). In den parallel abgeleiteten Mitralzellen war die Depolarisation bei der ersten Photoapplikation von ATP im Mittel  $144 \pm 28$  mV\*s groß, bei der zweiten  $117 \pm 33$  mV\*s groß und betrug bei der dritten Applikation noch  $128 \pm 30$  mV\*s (n=4). Damit war die Depolarisation in eTC zwar tendenziell

kleiner, unterschied sich aber nicht signifikant von der ATP-induzierten Depolarisation in den jeweiligen Mitralzellpartnern (n=4 Paare, p=0,39, Abbildung 12C). Des Weiteren hatte MRS2179 in eTC einen ähnlichen Effekt auf die ATP-induzierte Depolarisation wie in Mitralzellen und verminderte diese signifikant auf  $10 \pm 5 \%$  der Kontrolle ( $76 \pm 15 \text{ mV*s}$ , n=4, p<0.05, Abbildung 12B *inset*).

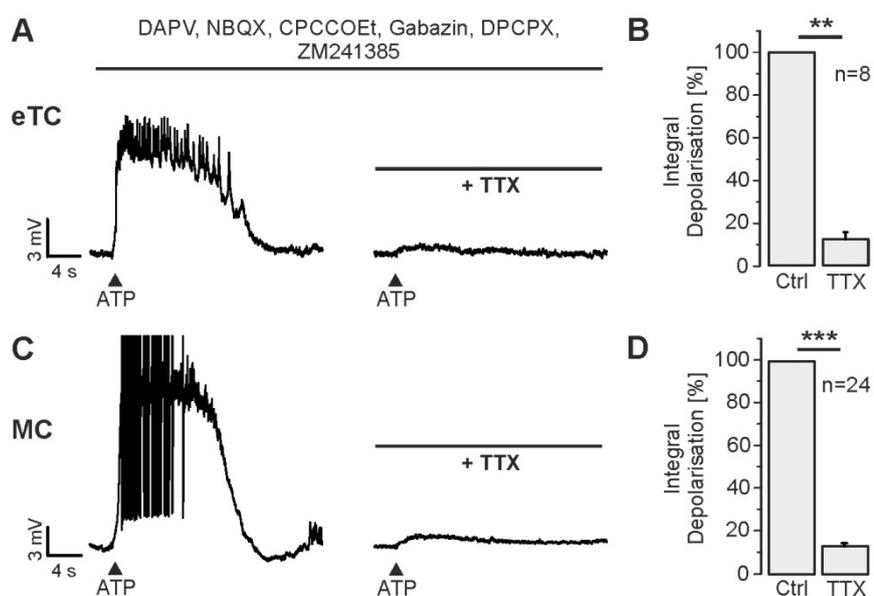


**Abbildung 12: Vergleich der ATP-Antwort von Mitralzellen und externen *tufted*-Zellen.**  
**A)** Fluoreszenzaufnahme eines simultan abgeleiteten Mitral- (MC) und eTC-Zellpaares. Die Zellen wurden über die Intrazellulärlösung mit Fluoreszenzfarbstoff (grün, Atto 488, 10 µm) gefüllt. Zur Identifikation von MC und eTC wurden Pcdh21 x tdT-Tiere verwendet, in denen diese Zellpopulationen einen roten Fluoreszenzmarker exprimieren. Maßstab: 50 µm.  
**B)** Potentialantworten in simultan abgeleiteten eTC (oben) und Mitralzellen (unten) bei wiederholter Photoapplikation von ATP. *Inset*: Die ATP-induzierte Depolarisation in eTC ist MRS2179-sensitiv (100 µm).  
**C)** Die Größe der ATP-induzierten Depolarisationen sind zwischen Mitralzellen und eTC nicht signifikant unterschiedlich.

### 3.1.5 Die ATP-induzierte Antwort in Mitralzellen und externen *tufted*-Zellen ist größtenteils indirekt und wird neuronal vermittelt

Obwohl die Neurotransmission im olfaktorischen *Bulbus* maßgeblich durch GABA und Glutamat bestimmt wird, konnte trotz Inhibition dieser synaptischen Transmissionswege eine prominente Depolarisation in Mitralzellen und eTC durch ATP induziert werden. Daher konnte vermutet werden, dass ATP Mitralzellen und eTC direkt erregt. Um diese Hypothese zu testen wurde Tetrodotoxin (TTX) eingesetzt. TTX ist ein selektiver Antagonist spannungsgesteuerter Natriumkanäle. Dadurch können in Neuronen keine Aktionspotentiale mehr ausgelöst werden, womit auch die Aktionspotential-abhängige Freisetzung von Neurotransmittern unterbunden und die neuronale Aktivität eines Netzwerks weitestgehend

inhibiert wird. Um also den direkten Effekt von ATP an Mitralzellen und eTC unabhängig von der Aktivierung des neuronalen Netzwerkes zu untersuchen, wurde die Photolyse von *caged* ATP in Anwesenheit von TTX (0,5  $\mu$ M) durchgeführt. Unter Kontrollbedingungen löste ATP in eTC eine Depolarisation von  $99 \pm 9$  mV\*s aus (n=8), in Mitralzellen betrug die Depolarisation  $150 \pm 10$  mV\*s (n=24). Unter der Wirkung von TTX wurde die ATP-induzierte Depolarisation sowohl in eTC als auch in Mitralzellen größtenteils unterdrückt und um  $88 \pm 4$  % (eTC, n=8,  $p < 0,01$ , Abbildung 13A und B) bzw.  $87 \pm 1$  % (Mitralzellen, n=24,  $p < 0,005$ , Abbildung 13C und D) höchstsignifikant reduziert.

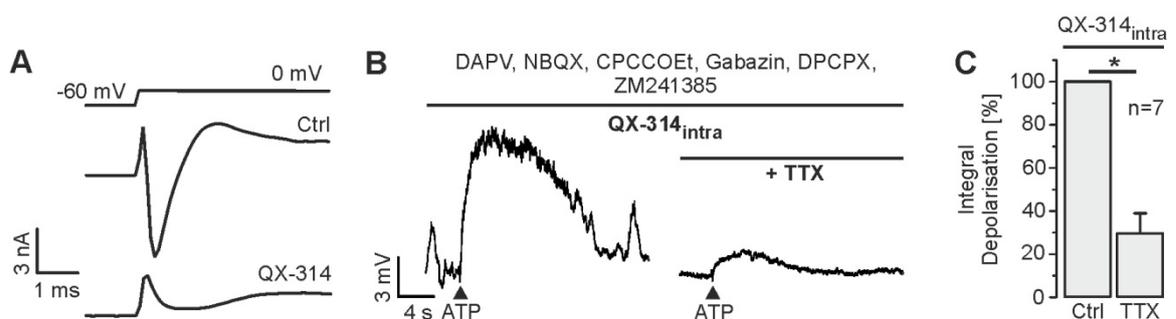


**Abbildung 13: Die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen und externen tufted-Zellen ist TTX-sensitiv.** **A)** ATP-induzierte Depolarisation in eTC unter Kontrollbedingungen (links) und unter dem Einfluss von TTX (0,5  $\mu$ M, rechts). **B)** TTX reduziert die ATP-Antwort in eTC hochsignifikant. **C)** ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen (MC) unter Kontrollbedingungen (links) und unter dem Einfluss von TTX (rechts). **D)** TTX reduziert die ATP-Antwort in Mitralzellen höchstsignifikant.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die Wirkung von TTX auf die ATP-Antwort in Mitralzellen und eTC tatsächlich in der Inhibition der neuronalen Netzwerkaktivität begründet ist oder vielmehr auf die Inhibition der Natriumkanäle der abgeleiteten Zelle selbst zurückgeht. Um gezielt Natriumkanäle in der abgeleiteten Zelle zu inhibieren, wurde QX-314 (3 mM) eingesetzt, ein Membran-impermeabler Inhibitor spannungsgesteuerter Natriumkanäle. QX-314 wurde der Intrazellulärlösung zugesetzt, wodurch sichergestellt wurde, dass von der Inhibition der Natriumkanäle tatsächlich nur die abgeleitete Zelle und nicht - wie bei TTX - das gesamte neuronale Netzwerk betroffen ist. Ob QX-314 ausreichend in der Zelle diffundiert ist und seine Wirkung entfaltet, wurde vor der Photolyse getestet.

Hierfür wurde nach Etablierung der Ganzzellkonfiguration in regelmäßigen Abständen ein depolarisierender Spannungssprung appliziert und der so evozierte Natriumstrom beobachtet (Abbildung 14A). Erst wenn dieser blockiert war, wurde in den *current clamp*-Modus umgeschaltet und das eigentliche Versuchsprotokoll durchgeführt.

Im Gegensatz zu der Wirkung von TTX konnte trotz Zugabe von QX-314 zur Intrazellulärlösung eine deutliche Depolarisation in Mitralzellen durch ATP ausgelöst werden. Diese war mit  $71 \pm 14 \text{ mV} \cdot \text{s}$  zwar höchstsignifikant kleiner als in der Kontrollgruppe ohne QX-314<sub>intra</sub> ( $p < 0,005$ , vgl. Abbildung 13C und D), konnte aber erneut erst durch TTX um  $70 \pm 9 \%$  signifikant reduziert und damit fast vollständig blockiert werden ( $n=7$ ,  $p < 0,05$ , Abbildung 14B und C).



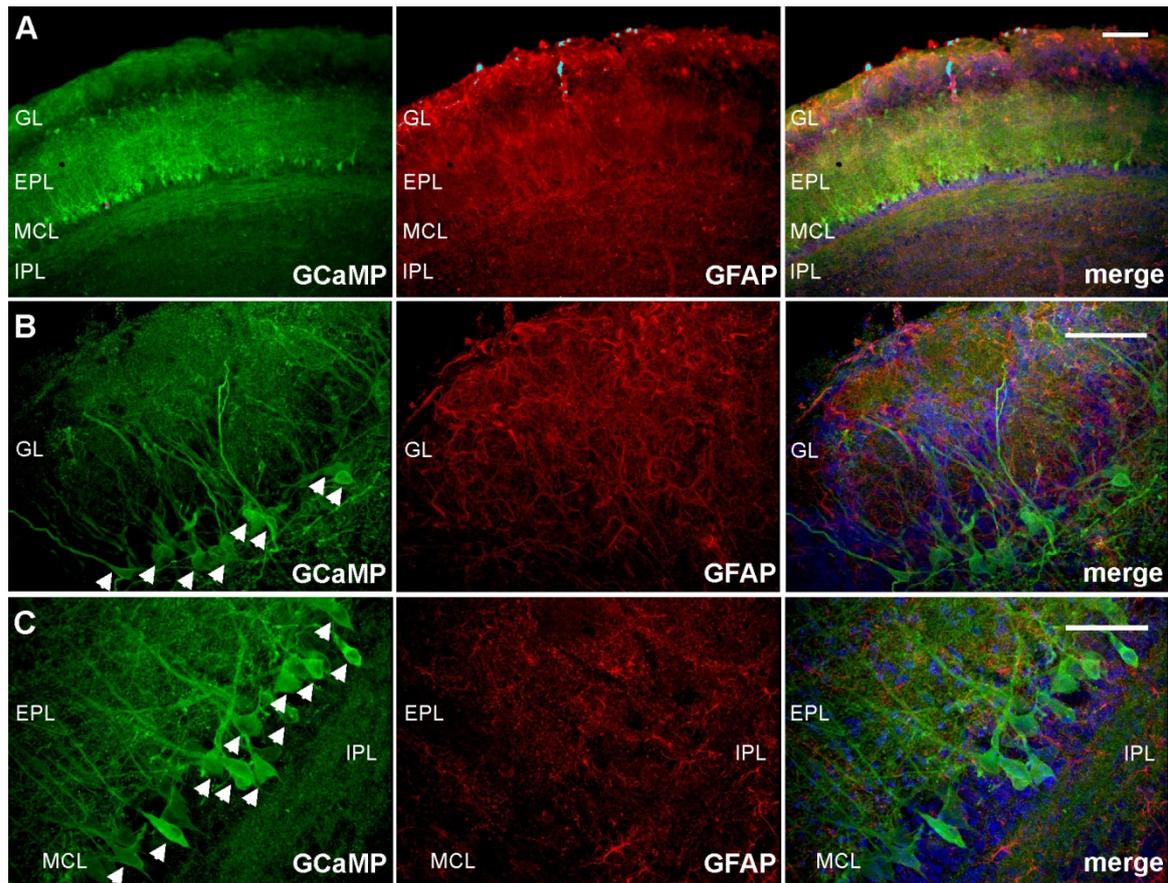
**Abbildung 14: Intrazellulärer Einfluss des Na<sub>V</sub>-Antagonisten QX-314 auf die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen.** **A)** Kontrolle der Wirkung von QX-314 (3 mM): ein Spannungssprung auf 0 mV (obere Spur) evoziert kurz nach Durchbruch der Zellmembran noch einen Natriumstrom in Mitralzellen (mittlere Spur), der durch Diffusion von QX-314 in die Zelle blockiert wird (untere Spur). **B)** ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen in Anwesenheit eines intrazellulären Inhibitors für spannungsgesteuerte Natriumkanäle (QX-314, links) und zusätzlicher Applikation von TTX (0,5 µM; rechts). **C)** TTX bewirkt auch bei Anwesenheit von QX-314 eine signifikante Inhibition der ATP-induzierten Depolarisation.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse aus Abbildung 13 und Abbildung 14, dass es einen weitaus größeren Effekt auf die ATP-induzierte Exzitation in Mitralzellen und eTC hat, wenn die Neurone des Netzwerkes daran gehindert werden, Aktionspotentiale zu generieren und Aktionspotential-abhängig Transmitter freizusetzen, als wenn die abgeleitete Zelle alleine von der Inhibition der Natriumkanäle mittels QX-314 betroffen ist. Dies spricht dafür, dass die ATP-induzierte Depolarisation sowohl in Mitralzellen als auch in eTC größtenteils indirekt ist und auf die Aktivierung präsynaptischer Neurone und die Summation zahlreicher synaptischer Potentiale zurückgeht. Weiterhin werden Mitralzellen und eTC offenbar gleichermaßen indirekt über sekundäre Signalwege aktiviert. Daher wird im Folgenden auf

beide Zelltypen als M/*t*-Zellen verwiesen und davon ausgegangen, dass die für Mitralzellen gewonnenen Erkenntnisse auch für eTC und umgekehrt gültig sind.

Mithilfe der Verwendung transgener Mäuse sollte überprüft werden, ob die Photoapplikation von ATP neben der Auslösung einer Membrandepolarisation auch zu einem Calciumsignal in M/*t*-Zellen führt. Hierfür wurden Mäuse verwendet, die unter dem M/*t*-zellspezifischen Promotor *Pcdh21* den genetisch kodierten Calciumindikator GCaMP6s exprimieren (*Pcdh21* x GCaMP6s-Mauslinie).

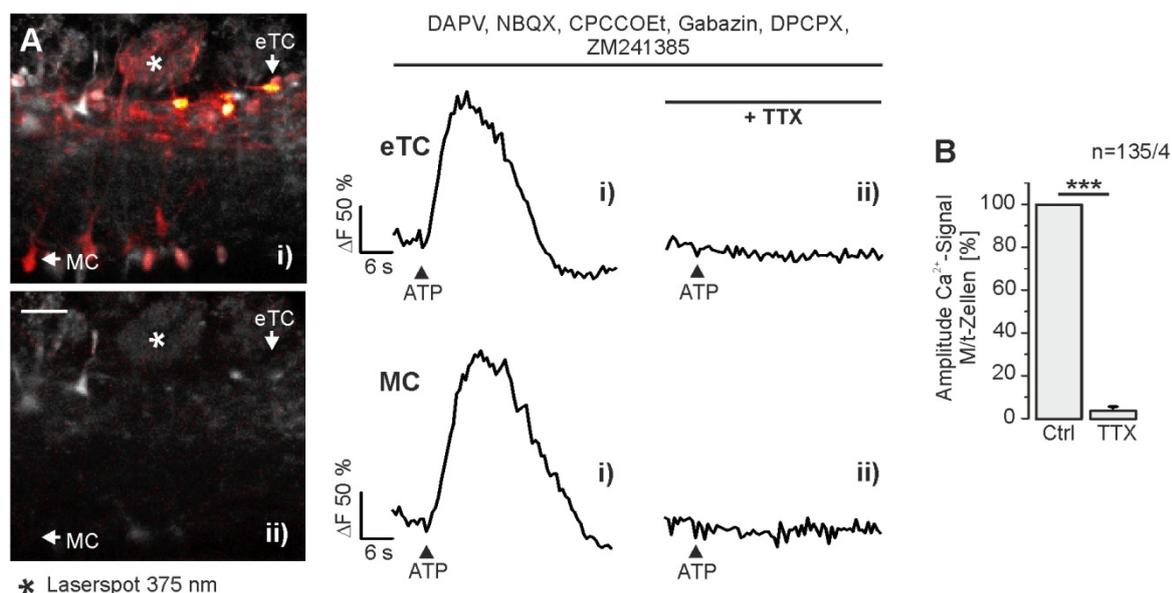
Zunächst aber wurde die Zellspezifität der GCaMP6s-Expression mithilfe von immunhistochemische Färbungen überprüft. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft von GFP und GCaMP6s wurde zur Detektion der GCaMP6s-Expression ein Antikörper gegen GFP verwendet. Um gliale Strukturen sichtbar zu machen, wurden zusätzlich Astrozyten über das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) immunmarkiert. In Abbildung 15A, B und C ist im grünen Kanal zu sehen, dass die GCaMP6s-Markierung tatsächlich in für M/*t*-Zellen typischen Mustern lokalisiert ist. Der rote Kanal zeigt denselben Ausschnitt, aufgrund der Immunfärbung gegen GFAP sind hier entsprechend astrozytäre Strukturen sichtbar. In den übereinander gelagerten Fluoreszenzaufnahmen (*merge*) ist im blauen Kanal außerdem eine Hoechst33342 Zellkernfärbung zu sehen. Eine Ko-Lokalisation von glialen Strukturen und GCaMP6s ist nicht zu erkennen.



**Abbildung 15: Untersuchung der GCaMP6s-Expression unter dem M/t-zellspezifischen Promotor Pcdh21.** Immunfärbungen aus horizontalen Gewebeschnitten einer Pcdh21 x GCaMP6s Maus (P22). Gezeigt wird pro Bildzeile jeweils der gleiche Gewebeausschnitt mit der Immunfärbung gegen GCaMP6s (grün) und das astrozytäre Protein GFAP (rot). In den übereinander gelagerten Aufnahmen (*merge*) ist in blau zusätzlich jeweils eine Zellkernfärbung dargestellt (Hoechst33342). **A)** Übersichtsdarstellung der verschiedenen Schichten des *Bulbus olfactorius*. Maßstab: 160 µm. **B)** Detailaufnahmen der Glomerularschicht (GL). Es ist eine deutliche Immunmarkierung gegen GCaMP6s in eTC (Pfeilspitzen) zu sehen. Maßstab: 75 µm. **C)** Detailaufnahme der Mitralzellschicht (MCL). Es ist eine deutliche Immunmarkierung gegen GCaMP6s in Mitralzellen (Pfeilspitzen) zu sehen. Maßstab: 75 µm. Eine Überlagerung von astrozytären Strukturen und GCaMP6s-markierten Zellen ist in keiner der Schichten erkennbar. EPL, externe plexiforme Schicht; IPL, interne plexiforme Schicht.

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse ist davon auszugehen, dass in physiologischen Messungen, die mithilfe der Pcdh21 x GCaMP6s-Mauslinie durchgeführt werden, exklusiv Calciumsignale in M/t-Zellen zu sehen sind. Diese Mauslinie wurde daher verwendet, um Calciumantworten in M/t-Zellen in Folge der Photoapplikation von ATP in akuten Hirnschnitten zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die glomeruläre Photoapplikation von ATP unter Kontrollbedingungen eine deutliche Zunahme der GCaMP6s-Fluoreszenz mit einer mittleren Amplitude der Calciumantwort von  $159 \pm 4 \Delta F \%$  in M/t-Zellen bewirkte ( $n=135/4$ ). TTX reduzierte die Amplitude der ATP-induzierten Calciumantwort in diesen

Zellen höchstsignifikant um  $97 \pm 1 \%$  und inhibierte die Antwort auf die Photoapplikation damit nahezu vollständig ( $n=135/4$ ,  $p<0,005$ , Abbildung 16A und B). Um ATP-induzierte Signalwege effektiv zu isolieren, wurden die Calciummessungen auch hier weitestgehend in synaptischer Isolation durchgeführt.



**Abbildung 16: TTX inhibiert ATP-induzierte Calciumsignale in M/t-Zellen.** **A)** Links sind Fluoreszenzaufnahmen (rot) ATP-induzierter Calciumsignale in Mitralzellen (MC) und eTC einer Pcdh21 x GCaMP6s-Maus unter Kontrollbedingungen (i, oben) und unter dem Einfluss von TTX (ii, 0,5 μM; unten) zu sehen. Die Pfeile markieren jeweils die Zellen, deren Messspuren in der Mitte dargestellt sind. Maßstab: 50 μM. **B)** TTX inhibiert ATP-induzierte Calciumsignale in M/t-Zellen höchstsignifikant.

Die bisherigen Experimente zeigen, dass sowohl die ATP-induzierte Depolarisation als auch das ATP-induzierte Calciumsignal von M/t-Zellen des *Bulbus olfactorius* abhängig von TTX-sensitiven, spannungsgesteuerten Natriumkanälen und demzufolge von Aktionspotential-abhängiger Neurotransmitterfreisetzung präsynaptischer Neurone ist. Jedoch spielen die Prinzipaltransmitter (Glutamat und GABA) für die Übertragung innerhalb des Netzwerks wohl keine Rolle (s. Abbildung 9).

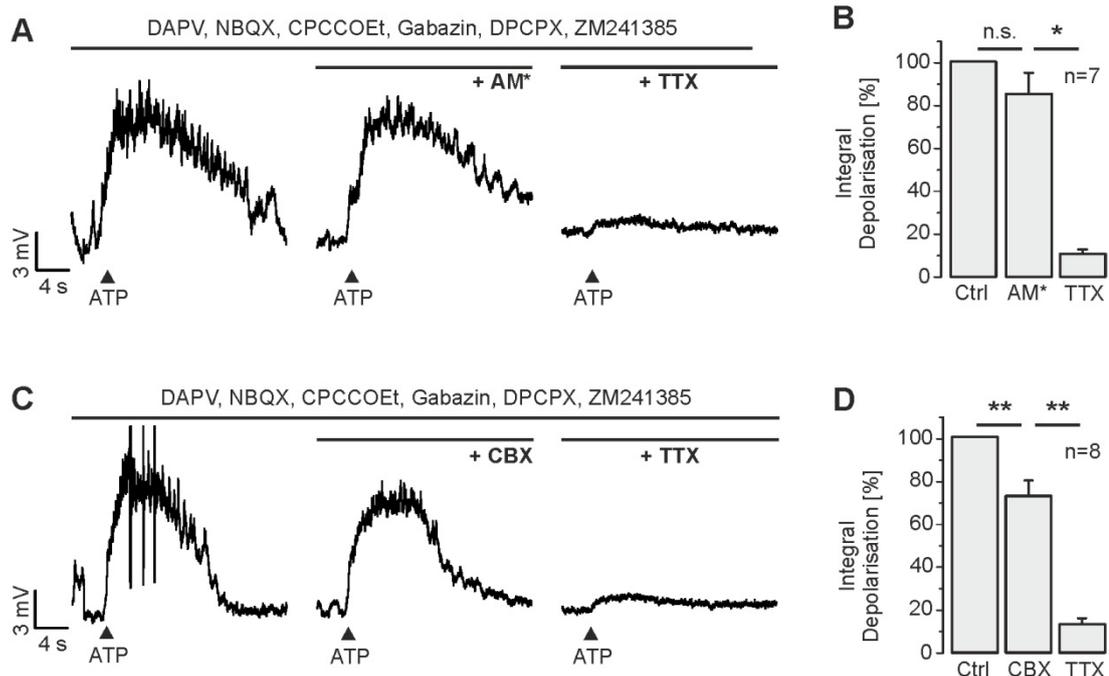
Neben den Prinzipaltransmittern gibt es nur vereinzelt Daten über weitere Neurotransmittersysteme, die im *Bulbus olfactorius* von Bedeutung sind. Für Dopamin, Serotonin, Histamin, Noradrenalin und Acetylcholin wurden jedoch Wirkungen im neuronalen bulbären Netzwerk beschrieben (Price und Powell, 1970; Olmos *et al.*, 1978; Luskin und Price, 1983; Trombley und Shepherd, 1993; Aquino-Miranda *et al.*, 2012; Rothermel *et al.*, 2014). Um zu testen, ob einer dieser Transmitter an der Übertragung des Effekts von ATP auf M/t-Zellen beteiligt ist, wurden die im olfaktorischen *Bulbus* beschriebenen

Rezeptorklassen und -subklassen der entsprechenden Transmittersysteme blockiert. Zur Antagonisierung dopaminerger Neurotransmission wurden SCH22390 (5  $\mu\text{M}$ ) und Sulpirid (1  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt, serotonerge Transmission wurde durch SDZ (10  $\mu\text{M}$ ) sowie Methysergid maleat (50  $\mu\text{M}$ ) blockiert, histaminerge Transmission durch Clobenpropit (5  $\mu\text{M}$ ) und Ranitidin (2  $\mu\text{M}$ ), adrenerge Transmission durch Prazosin (1  $\mu\text{M}$ ) sowie cholinerge Transmission durch Scopolamin (10  $\mu\text{M}$ ) und Mecamylamin (10  $\mu\text{M}$ ). Des Weiteren wurde Asenapin maleat eingesetzt (0,5  $\mu\text{M}$ ), was verschiedene Subklassen serotonerger, dopaminerger, adrenerger und histaminerger Rezeptoren inhibiert. Da außerdem der metabotrope Glutamatrezeptor des Typ  $\text{mGluR}_5$  auf Neuronen des *Bulbus olfactorius* funktionell nachgewiesen ist (Jian *et al.*, 2010), wurde dieser ebenfalls blockiert (MPEP, 5  $\mu\text{M}$ ). Zur detaillierten Beschreibung der Selektivität der hier beschriebenen Antagonisten siehe Abschnitt 2.2.2, Tabelle 4.

Abbildung 17A und B zeigen jedoch, dass sogar die Kombination aller oben beschriebenen Antagonisten die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen nur marginal beeinflusste. So löste die Kontrollapplikation von ATP im Mittel eine Depolarisation von  $126 \pm 14 \text{ mV} \cdot \text{s}$  aus ( $n=7$ ), die unter der Anwesenheit der genannten Antagonisten nicht signifikant um  $15 \pm 10 \%$  verringert wurde ( $n=7$ ,  $p=0,16$ ). Erst die zusätzliche Applikation von TTX reduzierte die ATP-induzierte Depolarisation signifikant, sodass diese noch  $11 \pm 2 \%$  der Kontrolle betrug ( $n=7$ ,  $p<0,05$ ). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass weder Glutamat, GABA, Dopamin, Serotonin, Histamin, Noradrenalin noch Acetylcholin als sekundäre Signalmoleküle bei der Übertragung des ATP-induzierten Effekts auf *M/t*-Zellen involviert sind.

Neben einer ATP-induzierten Aktivierung der *M/t*-Zellen über chemische Synapsen und damit der Beteiligung von Neurotransmittersystemen sind weitere Mechanismen denkbar, über die eine Aktivierung des glomerulären Netzwerkes stattfinden könnte. So ist auch in TTX eine kleine, unterschwellige Depolarisation in Folge der Photoapplikation von ATP zu sehen (vgl. Abbildung 13). Es ist anzunehmen, dass diese Depolarisation eine direkte, netzwerkunabhängige Antwort durch die Aktivierung von funktionellen  $\text{P2Y}_1$ -Rezeptoren auf *M/t*-Zellen ist (siehe hierzu auch Abschnitt 3.1.7). Der olfaktorische *Bulbus* ist ein Hirngebiet, welches durch das Zusammenspiel von intrinsischen Änderungen zellulärer Erregbarkeit mit externen Faktoren, übertragen durch chemische oder elektrische Synapsen, ausgeprägte Netzwerkdynamiken aufweist. Unter anderem ist bekannt, dass Mitralzellen eines Glomerulus über elektrische Synapsen miteinander gekoppelt sind, um die Synchronisation der Antworten bei sensorischen Eingängen zu unterstützen (Kosaka und Kosaka, 2004). Die innerhalb dieses Projektes gemessenen Mitralzellen wiesen biphasische Membranpotentialverläufe auf, welche sich durch einen depolarisierten *upstate* und einen hyperpolarisierten *downstate* kennzeichneten (Heyward *et al.*, 2001; Roux *et al.*, 2015). Während der *upstates* befinden sich die Mitralzellen in einem Zustand höchster Erregbarkeit,

bei dem eine geringe Depolarisation ausreichen könnte, um das Schwellenpotential zu überschreiten und die Generierung von Aktionspotentialen auszulösen. Es wäre also denkbar, dass ATP in einigen Mitralzellen eine solche initiale Depolarisation auslöste, die via *gap junctions* an gekoppelte Mitralzellen weitergegeben wurde und so die Exzitation des Netzwerkes ggf. bis hin zur Auslösung von Aktionspotentialen vermittelte. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Photolyse von *caged* ATP in Anwesenheit von Carbenoxolon (CBX, 100  $\mu$ M) durchgeführt, einem Inhibitor von *gap junctions*. ATP induzierte unter Kontrollbedingungen im Mittel eine Depolarisation von  $137 \pm 24$  mV\*s in Mitralzellen (n=8), die durch CBX hochsignifikant um  $27 \pm 7$  % verringert wurde (n=8,  $p < 0,01$ ). Ähnlich wie in den vorangegangenen Experimenten wurde die ATP-Antwort bei zusätzlicher Anwesenheit von TTX jedoch wesentlich stärker beeinflusst und die Depolarisation hochsignifikant um weitere  $63 \pm 2$  % inhibiert (n=8,  $p < 0,01$ , Abbildung 17C und D). Damit könnte ein Teil der neuronalen Exzitation tatsächlich durch elektrische Synapsen amplifiziert werden. Doch trotz der Anwesenheit von Antagonisten für elektrische Synapsen und chemische Synapsen für glutamaterge, GABAerge und adenosinerge Transmission löste die Photoapplikation von ATP unveränderlich eine prominente Depolarisation in Mitralzellen aus, was erneut auf eine Aktivierung präsynaptischer Neurone im juxtglomerulären Netzwerk hindeutet.



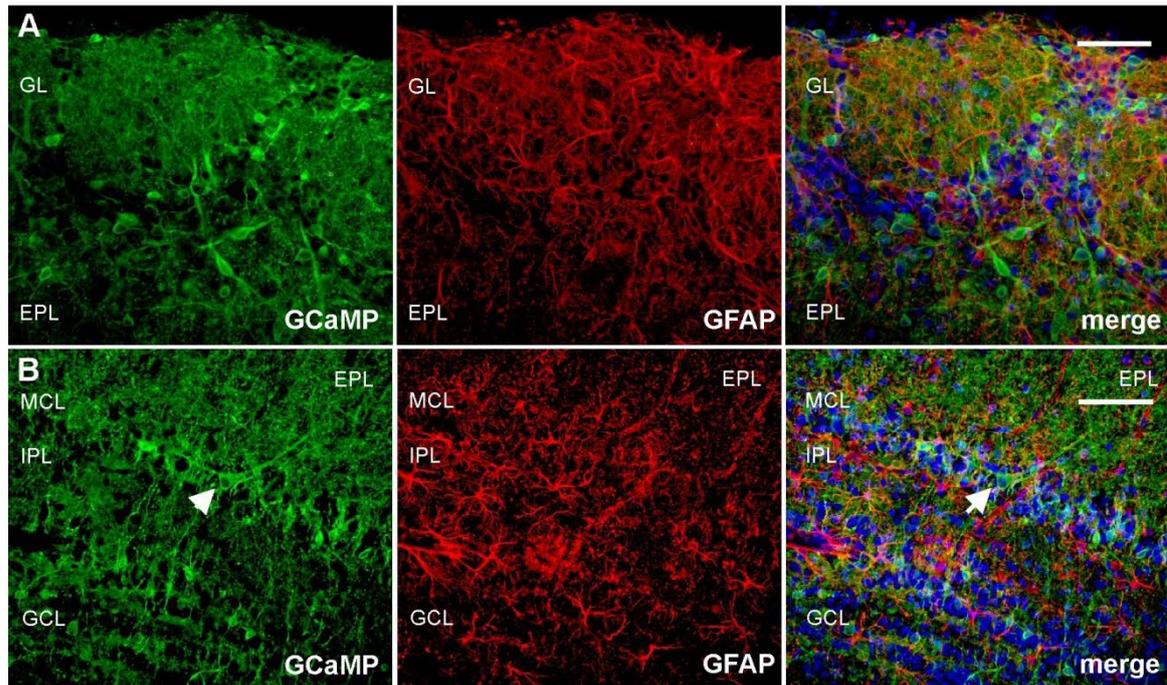
**Abbildung 17: Pharmakologische Charakterisierung des ATP-induzierten Effekts in Mitralzellen.** **A)** ATP-induzierte Depolarisation einer Mitralzelle unter Kontrollbedingungen (links), unter dem Einfluss verschiedener Antagonisten gegen adrenerge, serotonerge, histaminerge, dopaminerge sowie cholinerge Neurotransmission (Mitte) und unter der Wirkung von TTX (0,5  $\mu$ M; rechts). **B)** Die Kombination der Antagonisten (AM) reduziert die ATP-induzierte Depolarisation nicht signifikant und nicht in gleichem Ausmaß wie TTX. \*AM: SDZ (10  $\mu$ M), Asenapine maleat (0,5  $\mu$ M), Clobenpropit (5  $\mu$ M), Ranitidin (2  $\mu$ M), SCH22390 (5  $\mu$ M), Sulpirid (1  $\mu$ M), Prazosin (1  $\mu$ M), MPEP (5  $\mu$ M), Scopolamin (10  $\mu$ M), Mecamylamin (10  $\mu$ M). **C)** ATP-induzierte Depolarisation einer Mitralzelle unter Kontrollbedingungen (links), sowie dem Einfluss von Carbenoxolon (CBX, 100  $\mu$ M, Mitte) und TTX (0,5  $\mu$ M, rechts). **D)** Carbenoxolon reduziert die ATP-induzierte Depolarisation hochsignifikant, jedoch ist der zusätzliche Effekt von TTX signifikant größer.

### 3.1.6 Eine Subpopulation von juxtaglomerulären Zellen wird P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelt aktiviert

Aus den bisherigen Ergebnissen wird deutlich, dass ein Großteil des ATP-induzierten Effekts über einen indirekten, neuronalen Mechanismus auf M/*t*-Zellen übertragen wird, in dessen Signalweg die Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren eine Rolle spielt. Es stellte sich also die Frage, welche Zellen direkt auf ATP reagieren. Das Netzwerk eines Glomerulus wird aus unterschiedlichsten Zelltypen gebildet. Neben Mitralzellen und eTC projizieren noch andere Neuronentypen ihre Dendriten in einen oder mehrere Glomeruli und sind über synaptische Verschaltungen an der Prozessierung der eingehenden Geruchsinformation beteiligt. Hierzu zählt die Subpopulation der morphologisch und physiologisch sehr heterogenen, überwiegend GABAergen PG-Zellen sowie sSA-Zellen (Nagayama *et al.*, 2014). Elektrophysiologisch unterscheiden sich diese Neuronenpopulationen allerdings kaum

voneinander und sind zudem im Mikroskopbild morphologisch kaum von den ebenfalls um einen Glomerulus angesiedelten Astrozyten zu unterscheiden. Weitere Untersuchungen auf Einzelzellebene mit der *patch clamp*-Technik waren daher ungeeignet, um diejenigen Zellen zu finden, die direkt via P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren auf ATP reagieren. Zur Identifizierung dieser Neurone wurden daher Calciummessungen an akuten Hirnschnitten des *Bulbus olfactorius* von Eno x GCaMP6s-Mäusen durchgeführt. In diesen Mäusen sollte GCaMP6s umfassend in verschiedenen Subtypen bulbärer Neurone, insbesondere in Interneuronen, exprimiert werden.

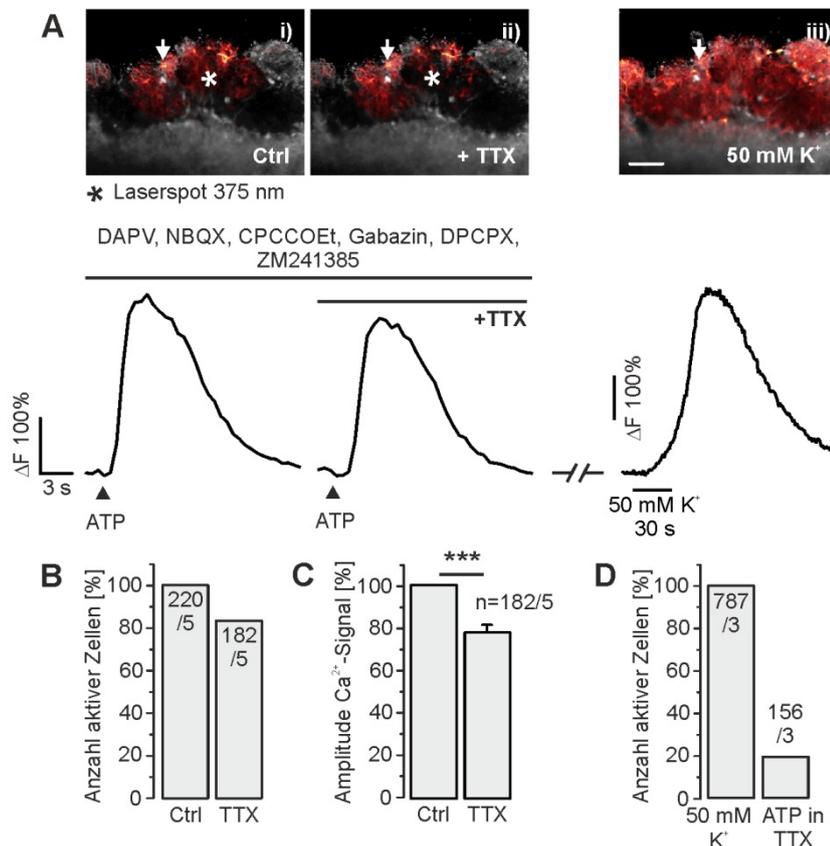
Um zunächst die Neuronenspezifität des Eno- (Enolase2) Promotors zu überprüfen wurden, wie zuvor (vgl. Abbildung 15), immunhistochemische Färbungen mittels GFP-Antikörpermarkierung gegen das GFP-Fusionsprotein GCaMP6s in Kombination mit einer Immunomarkierung des astrozytären Proteins GFAP durchgeführt. Abbildung 18A und B zeigen im grünen Kanal eine deutliche GCaMP6s-Immunmarkierung in Zellen der Glomerularschicht, Körnerzellschicht und vereinzelt in der Mitralzellschicht sowie eine Färbung neuropiler Strukturen in allen Schichten. In der Glomerularschicht sind hierbei juxtaglomeruläre Zellen gefärbt (Abbildung 18A). In der Mitralzellschicht sind vereinzelt Zellen gefärbt, die anhand ihrer Morphologie den Mitralzellen zuzuordnen sind (Abbildung 18B). Eine Ko-Lokalisation der GCaMP6s-Färbung (grün) mit der GFAP-Immunmarkierung (rot) ist in keiner der Schichten erkennbar (Abbildung 18A und B). Es ist also davon auszugehen, dass der Eno-Promotor und damit die GCaMP6s-Expression neuronenspezifisch ist.



**Abbildung 18: Untersuchung der GCaMP6s-Expression unter dem neuronenspezifischen Eno x GCaMP6s-Maus (P45) gegen GCaMP6s (grün) und das astrozytäre Protein GFAP (rot) mit zusätzlicher Zellkernfärbung (Hoechst33342, blau) in den überlagerten Aufnahmen (merge).** **A)** Detailaufnahme der Glomerularschicht (GL). Es ist eine deutliche Immunmarkierung gegen GCaMP6s in juxtaglomerulären Zellen zu sehen. Maßstab: 60 µm. **B)** Detailaufnahme der Mitralzellschicht (MCL), der internen plexiformen Schicht (IPL) sowie der Körnerzellschicht (GCL). Es ist eine deutliche Immunmarkierung gegen GCaMP6s in Körnerzellen zu sehen, Mitralzellen sind vereinzelt gefärbt (Pfeil). Eine Überlagerung von astrozytären Strukturen (rot) und GCaMP6s-markierten Zellen (grün) ist in keiner der Schichten erkennbar. EPL, externe plexiforme Schicht. Maßstab: 60 µm.

Calciummessungen in akuten Eno x GCaMP6s-Hirnschnitten zeigten, dass eine Vielzahl juxtaglomerulärer Neurone in Folge glomerulärer Photoapplikation von ATP mit einem Calciumsignal reagierten (Abbildung 19A). Um das P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelte Signal effizient zu isolieren, wurden auch diese Messungen unter Blockade glutamaterger, GABAerger und adenosinerger Transmission durchgeführt. Von insgesamt 220 Zellen, welche auf die Photoapplikation von ATP reagierten, löste ATP in 83 % auch in Anwesenheit von TTX noch ein Calciumsignal aus (Abbildung 19A und B). In diesen 182 Zellen löste die Photoapplikation von ATP in der Kontrolle ein Calciumsignal mit einer Amplitude von  $182 \pm 9 \% \Delta F$  aus, die in TTX zwar höchstsignifikant verringert war, aber immer noch zu  $77 \pm 4 \%$  bestehen blieb ( $n=182/5$ ,  $p<0,005$ , Abbildung 19C). Dies impliziert, dass ein Großteil der Neurone, die mit einem Calciumsignal auf die Photoapplikation von ATP reagierten, direkt durch ATP moduliert wurden.

Um den Anteil der ATP-sensitiven Neurone an der gesamten Neuronenpopulation abschätzen zu können, wurden in einem Teil der Experimente Messungen durchgeführt, in denen nach der ATP-Applikation 50 mM Kalium über die Badperfusion appliziert wurde. Durch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration wurde eine Depolarisation in allen Neuronen hervorgerufen, welche in GCaMP6s-exprimierenden Zellen durch ein Calciumsignal sichtbar war (Abbildung 19A). Auf die Badapplikation von 50 mM Kalium reagierten im Bildausschnitt insgesamt 787 Neurone in der Glomerularschicht mit einem Calciumsignal, während auf die Photoapplikation von ATP in TTX in denselben Präparaten 156 Zellen eine Calciumantwort zeigten. Somit wird der Anteil der GCaMP6s-exprimierenden juxtaglomerulären Neurone, die direkt durch ATP moduliert werden, auf 19 % geschätzt (Abbildung 19D).



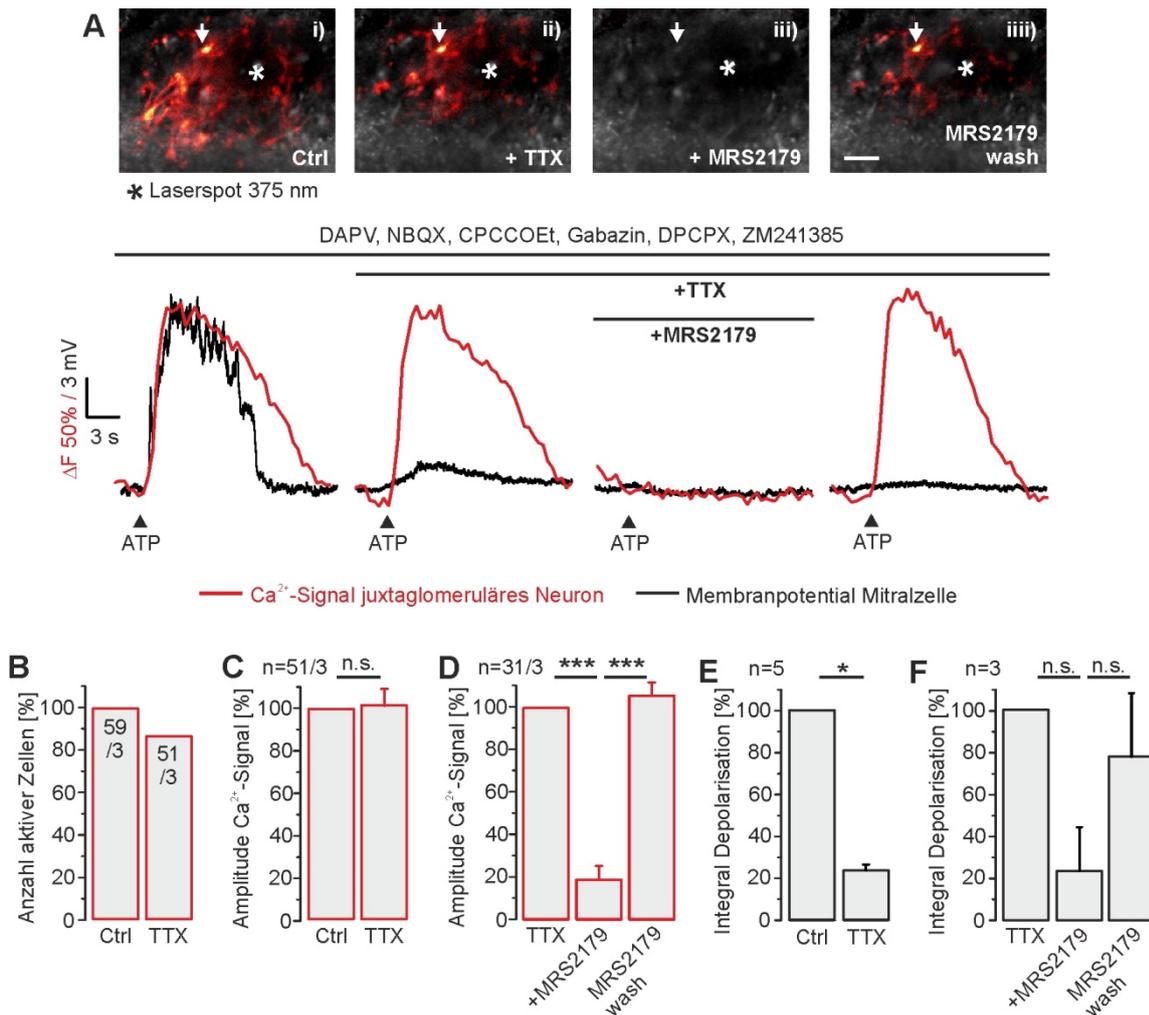
**Abbildung 19: ATP-induzierte Calciumsignale in juxtaglomerulären Neuronen werden nicht durch TTX inhibiert.** **A)** Oben sind Fluoreszenzaufnahmen ATP-induzierter Calciumsignale (rot) in juxtaglomerulären Neuronen einer *Eno x GCaMP6s*-Maus unter Kontrollbedingungen (i) und unter dem Einfluss von TTX (ii, 0,5  $\mu$ M) sowie Calciumsignale während der Badapplikation von 50 mM Kalium (iii) zu sehen. Der Pfeil markiert die Zelle, deren Messspur korrespondierend unten dargestellt ist. Maßstab: 60  $\mu$ m. **B)** Anteil der Zellen, die im Vergleich zur Kontrolle auch unter der Wirkung von TTX auf die Photoapplikation von ATP mit einem Calciumsignal reagiert haben. **C)** Amplitude des Calciumsignals derjenigen Zellen, die auch in TTX auf die Photoapplikation von ATP reagiert haben. **D)** Anteil der Zellen, die durch ATP aktiviert wurden an der Gesamtzahl aller aktivierbaren Neurone im Bildausschnitt, welche durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration sichtbar gemacht wurden.

Da GCaMP6s unter der Kontrolle des Eno-Promotors nur vereinzelt in M/t-Zellen exprimiert wird (vgl. Abbildung 18), wurden im Folgenden *current clamp*-Messungen an Mitralzellen parallel mit Calciummessungen an juxtaglomerulären Neuronen in Eno x GCaMP6s-Mäusen durchgeführt. Die Photoapplikation von ATP erfolgte abermals in dem Glomerulus, in den die Mitralzelle ihren apikalen *tuft* projiziert.

Unter Kontrollbedingungen reagierten in diesen Messungen insgesamt 59 juxtaglomeruläre Neurone auf die Freisetzung von ATP mit einem Calciumsignal (Abbildung 20A). Ähnlich wie zuvor blieb das Calciumsignal in einer Teilmenge dieser Neurone (86 %) auch in TTX bestehen (Abbildung 20B). In diesen 51 Zellen betrug die Amplitude der Calciumantwort bei der Kontrollapplikation  $111 \pm 7 \% \Delta F$  und wurde durch TTX nicht signifikant um  $1 \pm 8 \%$  vergrößert ( $n=51/3$ ,  $p=0,36$ , Abbildung 20C). In einem Teil der Experimente wurde ATP bei zusätzlicher Anwesenheit des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 appliziert. In diesen Messungen betrug die Amplitude des TTX-resistenten Calciumsignals im Mittel  $99 \pm 11 \% \Delta F$  ( $n=31/3$ ). MRS2179 blockierte das TTX-resistente Calciumsignal reversibel und nahezu vollständig, sodass die Amplitude der Calciumantwort um  $82 \pm 6 \%$  reduziert wurde ( $n=31/3$ ,  $p<0,005$ , Abbildung 20A und D).

In gleichzeitig abgeleiteten Mitralzellen wurde ohne Wirkung von TTX in der Kontrolle im Mittel eine Depolarisation von  $97 \pm 31 \text{ mV*s}$  ausgelöst ( $n=5$ ). Im Gegensatz zur Wirkung von TTX auf das ATP-induzierte Calciumsignal in juxtaglomerulären Neuronen wurde die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen durch TTX signifikant um  $76 \pm 3 \%$  reduziert und damit weitestgehend blockiert ( $n=5$ ,  $p<0,05$ , Abbildung 20A und E). Eine unterschwellige, TTX-insensitive Depolarisation blieb jedoch bestehen. In den Experimenten, in denen MRS2179 eingesetzt wurde, betrug diese im Mittel  $22 \pm 3 \text{ mV*s}$  ( $n=3$ ) und wurde durch den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten reversibel um  $77 \pm 21 \%$  reduziert ( $n=3$ , Abbildung 20F).

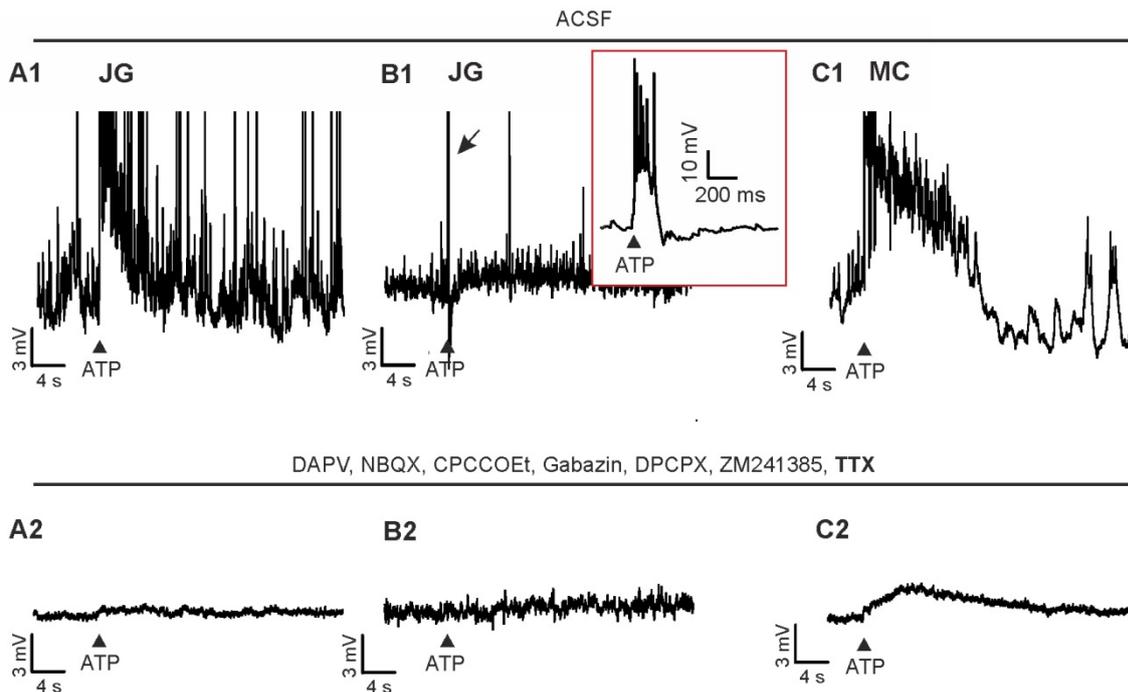
Zusammengefasst verdeutlichen die Experimente, dass eine Subpopulation juxtaglomerulärer Neurone direkt von ATP über einen spezifischen, P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Signalweg aktiviert wird und vermutlich in der Folge die Netzwerkantwort im Glomerulus und somit in Mitralzellen initiiert. Aufgrund der geringen Auflösung sind jedoch keine morphologischen Charakteristika, bestimmte Muster der dendritischen Projektionen oder Anordnung der Somata in bestimmten Lagen der Glomerularschicht zu erkennen. Die ATP-aktivierten Zellen können daher nicht mit Bestimmtheit einer näher definierten Subpopulation von juxtaglomerulären Neuronen zugeordnet werden.



**Abbildung 20: Korrelation der Calciumsignale von juxtaglomerulären Neuronen und der Depolarisation von Mitralzellen bei Photoapplikation von ATP.** **A)** Oben sind Fluoreszenzaufnahmen ATP-induzierter Calciumsignale (rot) in juxtaglomerulären Neuronen einer *Eno x GCaMP6s*-Maus unter Kontrollbedingungen (i), unter dem Einfluss von TTX (ii, 0,5  $\mu\text{M}$ ), MRS2179 (iii, 100  $\mu\text{M}$ ) sowie nach Auswaschen von MRS2179 (iiii) zu sehen. Unten sind die Calciumsignale der oben markierten Zelle (Pfeil) als Messspuren in rot zu sehen. In schwarz sind die Änderungen des Membranpotentials einer in den markierten Glomerulus (\*) projizierenden, simultan abgeleiteten Mitralzelle dargestellt. Maßstab: 60  $\mu\text{m}$ . **B)** Anteil juxtaglomerulärer Zellen, die auf die Freisetzung von ATP auch in TTX mit einem Calciumsignal reagiert haben. **C)** Die Amplitude des Calciumsignals der Zellen, die auch in TTX auf die Photoapplikation von ATP reagiert haben, wird durch TTX nicht beeinflusst. **D)** Das TTX-resistente, ATP-induzierte Calciumsignal in juxtaglomerulären Neuronen ist MRS2179-sensitiv. **E)** Die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen ist größtenteils TTX-sensitiv. **F)** Der TTX-insensitive Teil der ATP-induzierten Depolarisation wird durch MRS2179 weitestgehend inhibiert.

### 3.1.7 Direkter Einfluss von ATP auf die Membraneigenschaften von Mitralzellen

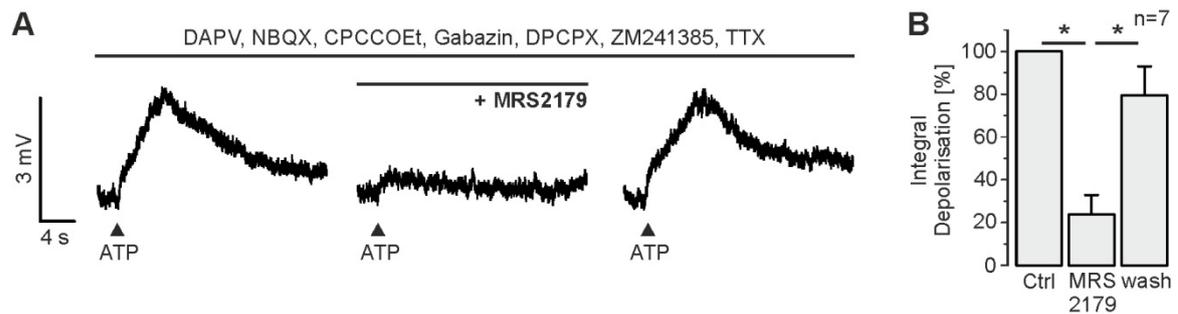
Die vorangegangenen Experimente zeigen, dass die Aktivierung von *M/t*-Zellen in Folge einer Photoapplikation von ATP hauptsächlich über einen sekundären Mechanismus ausgelöst wurde. Dennoch war zu beobachten, dass auch in TTX noch eine unterschwellige Depolarisation in *M/t*-Zellen vorhanden war, die vermutlich durch eine Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren hervorgerufen wurde. Da TTX indirekte Effekte verhindert, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass *M/t*-Zellen zum Teil auch selbst durch ATP in ihren Membraneigenschaften moduliert werden. Um auszuschließen, dass dieser mutmaßliche Effekt durch andere Mechanismen vermittelt wird – z.B. durch Aktionspotential-unabhängige Transmitterfreisetzung aus präsynaptischen Zellen (Brill *et al.*, 2016) – wurden ATP-induzierte Effekte auch in anderen Neuronentypen des olfaktorischen *Bulbus* analysiert. Für diese Versuche wurden *patch clamp*-Ableitungen an juxtglomerulären Neuronen in Hirschnitten von *Eno x tdT*-Mäusen durchgeführt. Die Zellen wurden mithilfe der neuronenspezifischen tdTomato-Expression in dieser Mauslinie identifiziert und die *patch clamp*-Ableitungen unter visueller Kontrolle hergestellt. In vier von insgesamt elf juxtglomerulären Neuronen löste ATP unter physiologischen Bedingungen (ACSF) eine Depolarisation aus. Abbildung 21 A1 und B1 zeigen die in diesen Zellen ausgelöste Antwort im Vergleich zu einer typischen ATP-induzierten Antwort in Mitralzellen (Abbildung 21 C1). Zwei der vier juxtglomerulären Zellen reagierten mit einer Mitralzell-ähnlichen Antwort (Abbildung 21 A1). In zwei Zellen fiel die Antwort jedoch deutlich kürzer und schneller aus (Abbildung 21 B1). Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurden die Antworten statistisch nicht ausgewertet. Dennoch zeigte sich, dass die Antwort in allen vier juxtglomerulären Neuronen in TTX vollständig inhibiert war (Abbildung 21 A2 und B2), was damit gegensätzlich zur ATP-Antwort von *M/t*-Zellen in TTX ist (Abbildung 21 C2). Es ist daher unwahrscheinlich, dass die TTX-insensitive ATP-evozierte Depolarisation durch Aktionspotential-unabhängige Freisetzung von Neurotransmittern bewirkt wird, wohingegen ein direkter Einfluss von ATP auf *M/t*-Zellen postuliert werden kann.



**Abbildung 21: Vergleich ATP-induzierter Antworten von juxtaglomerulären Neuronen und Mitralzellen.** **A1 bis C1)** ATP-induzierte Depolarisationen in juxtaglomerulären Neuronen (JG; links, Mitte) und Mitralzellen (rechts). Der Pfeil in B1 markiert die im *inset* vergrößert dargestellte Reaktion der Zelle aus B1 in Folge der Photoapplikation von ATP. **A2 bis C2)** Wirkung von TTX (0,5  $\mu$ M) auf die ATP-induzierte Depolarisation im jeweiligen Zelltyp.

### 3.1.7.1 Die direkte Wirkung von ATP auf Mitralzellen ist ebenfalls P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängig

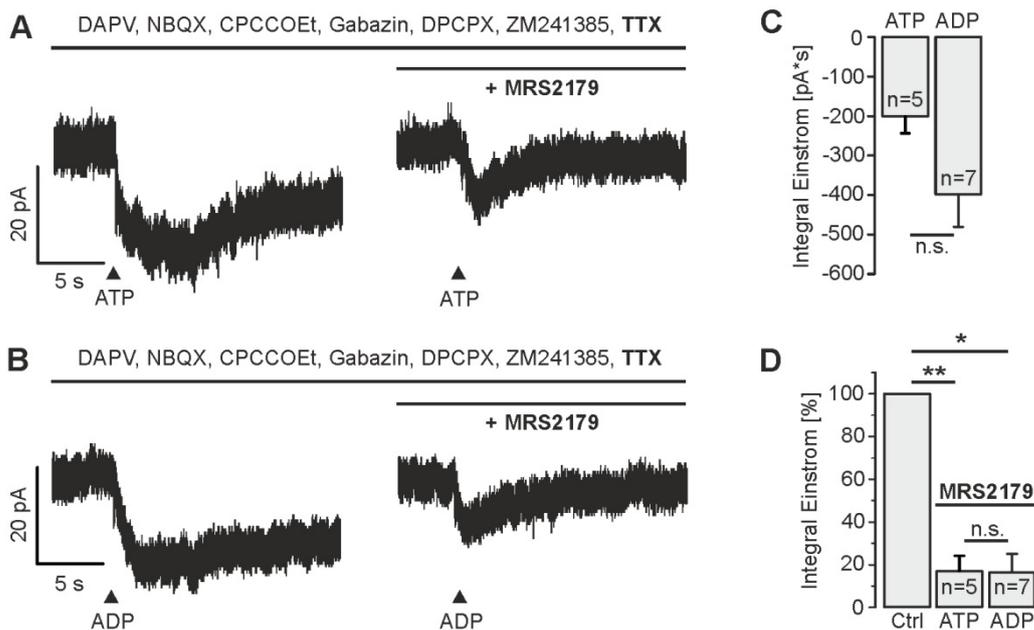
Aus Abbildung 20F wird ersichtlich, dass der TTX-insensitive Teil der ATP-Antwort in Mitralzellen vermutlich ebenfalls über P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt wird. Aufgrund der geringeren Stichprobenzahl konnte jedoch keine verlässliche Aussage getroffen werden. Da aber eine deutliche Tendenz erkennbar war, wurde im Folgenden mithilfe einer größeren Stichprobe getestet, ob die TTX-insensitive, direkte ATP-Antwort von M/*t*-Zellen tatsächlich in der Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren begründet ist. Zusätzlich zu TTX wurden auch bei diesen Versuchen Antagonisten glutamaterger (NBQX, DAPV, CPCCOEt), GABAerger (Gabazin), und adenosinerger (DPCPX, ZM241385) Transmission eingesetzt. Unter diesen Bedingungen löste die Photoapplikation von ATP in Mitralzellen im Mittel eine Depolarisation von  $24 \pm 7$  mV\*s aus, die in MRS2179 signifikant und reversibel um  $76 \pm 9$  % inhibiert wurde ( $n=7$ ,  $p<0,05$ , Abbildung 22A und B). Dies impliziert, dass auch die direkte Depolarisation von M/*t*-Zellen über eine Stimulation von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt wird.



**Abbildung 22: Die TTX-insensitive ATP-Antwort von Mitralzellen ist P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelt.** **A)** TTX-insensitive, ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen unter Kontrollbedingungen (links), unter dem Einfluss von MRS2179 (100 µM, Mitte) und nach dem Auswaschen von MRS2179 (rechts). **B)** MRS2179 reduziert die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen auch in TTX signifikant und reversibel.

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, dass M/*t*-Zellen auch direkt über P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in ihren elektrischen Eigenschaften moduliert werden. Dieser Effekt sollte im Folgenden genauer charakterisiert und insbesondere untersucht werden, welche Ionenleitfähigkeiten an dem depolarisierenden Effekt der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Aktivierung beteiligt sind. Zur Untersuchung der induzierten Leitfähigkeit sollten Versuche im *voltage clamp*-Modus mit dem P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-spezifischen Agonisten ADP durchgeführt werden. Dafür wurde zunächst überprüft, ob ADP in ähnlicher Weise die Membraneigenschaften von Mitralzellen beeinflusst wie ATP. Die folgenden Versuche wurden unter Verwendung einer Kaliumgluconat-basierten Intrazellulärlösung und durch die bereits zuvor verwendete Kombination aus Antagonisten und TTX weitestgehend in synaptischer Isolation durchgeführt.

Im *voltage clamp*-Modus löste ATP im Mittel einen Einstrom von  $-201 \pm 43$  pA\*s aus (n=5, Abbildung 23A). ADP wurde ebenfalls aus seiner *caged* Form appliziert (NPE-*caged* ADP, 100 µM) und führte ebenso zu einem Einstrom, der sich im Mittel mit  $-398 \pm 83$  pA\*s nicht signifikant von dem ATP-induzierten Einstrom unterschied (n=7, p=0,07, Abbildung 23B und C). In beiden Fällen war der induzierte Einstrom oftmals nicht vollständig reversibel. MRS2179 blockierte weitgehend sowohl den ATP- als auch den ADP-vermittelten Einstrom (auf  $17 \pm 7$  % der Kontrolle für ATP, n=5, p<0,01 und auf  $16 \pm 9$  % der Kontrolle für ADP, n=7, p<0,05, Abbildung 23D). Zusammengefasst lässt sich hieraus ableiten, dass ATP und ADP vermutlich denselben Rezeptor ansprechen und über die gleichen purinergen Signalwege auf M/*t*-Zellen wirken.

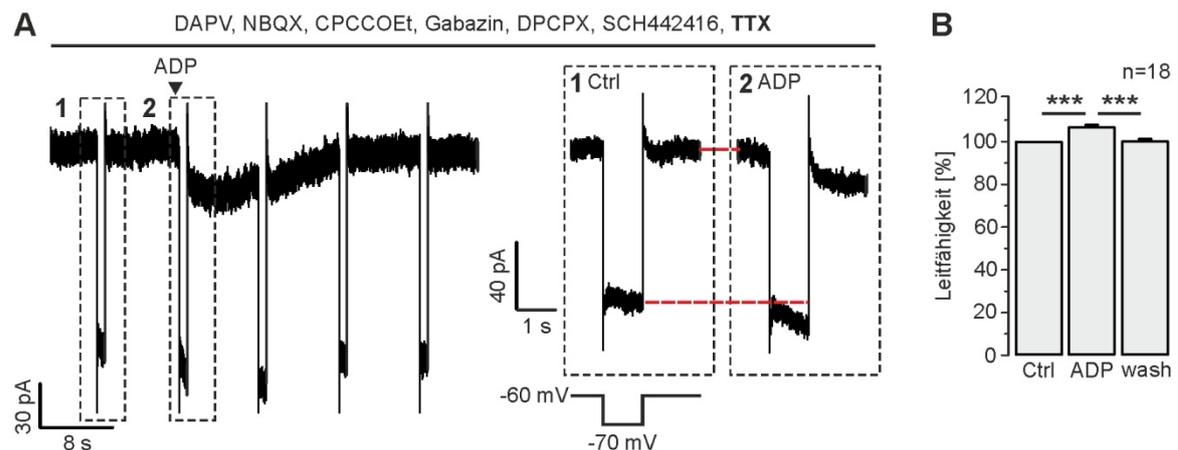


**Abbildung 23: ATP und ADP lösen einen vergleichbaren, P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Einstrom in Mitralzellen aus. A)** ATP-induzierter Einstrom in Mitralzellen unter Kontrollbedingungen (links) und unter Einfluss von MRS2179 (100  $\mu$ M, rechts). **B)** ADP-induzierter Einstrom in Mitralzellen unter Kontrollbedingungen (links) und unter Einfluss von MRS2179 (rechts). **C)** Die Größe des ATP- und des ADP-induzierten Einstroms unterscheidet sich nicht signifikant. **D)** MRS2179 verringert die durch ATP und ADP ausgelösten Einstrome in Mitralzellen in gleichem Maße.

### 3.1.7.2 ADP vermittelt die Öffnung einer Kationenleitfähigkeit in Mitralzellen

Ein Einstrom, wie er durch ADP bzw. ATP direkt in Mitralzellen ausgelöst wird, kann entweder auf dem Öffnen oder dem Schließen von Ionenkanälen beruhen. Öffnen sich Ionenkanäle, so können entweder positive Ionen in die Zelle hinein bzw. negativ geladene Ionen aus der Zelle herausströmen. In beiden Fällen würde das Zellinnere positiver werden, was entsprechend der Vorzeichenkonventionen eine negative Änderung des Haltestroms hervorruft. Der gleiche Effekt würde eintreten, wenn sich eine offene Leitfähigkeit schließt, über die die Zelle ansonsten konstant positive Ladung verliert. Im Folgenden sollte daher eine Untersuchung der Leitfähigkeitseigenschaften der Mitralzellmembran Aufschluss darüber geben, ob durch ADP bzw. ATP Ionenkanäle geöffnet oder geschlossen werden und entsprechend Hinweise auf den an der Depolarisation beteiligten Ionenkanaltyp liefern. Um Leitfähigkeitsänderungen in Mitralzellen zu untersuchen, wurden die Zellen im *voltage clamp*-Modus bei einem Haltepotential von -60 mV abgeleitet und alle 10 s ein Potentialsprung von -10 mV für 1 s appliziert. Die Membranleitfähigkeit wurde aus der Differenz des Haltestroms vor und während des Potentialsprungs errechnet. Die Messungen erfolgten weiterhin in synaptischer Isolation mit TTX. Wie zuvor konnte durch die

Photoapplikation von ADP ein Einstrom ausgelöst werden (Abbildung 24A). Um eine Leitfähigkeitsänderung während des Einstroms festzustellen, wurde die Membranleitfähigkeit vor und während der Wirkung von ADP bestimmt. Es zeigte sich, dass die Membranleitfähigkeit durch ADP reversibel und höchstsignifikant von  $7,45 \pm 0,41$  nS auf  $7,96 \pm 0,39$  nS erhöht wurde ( $n=18$ ,  $p<0,005$ , Abbildung 24B). Dies deutet darauf hin, dass durch ADP Ionenkanäle geöffnet werden.

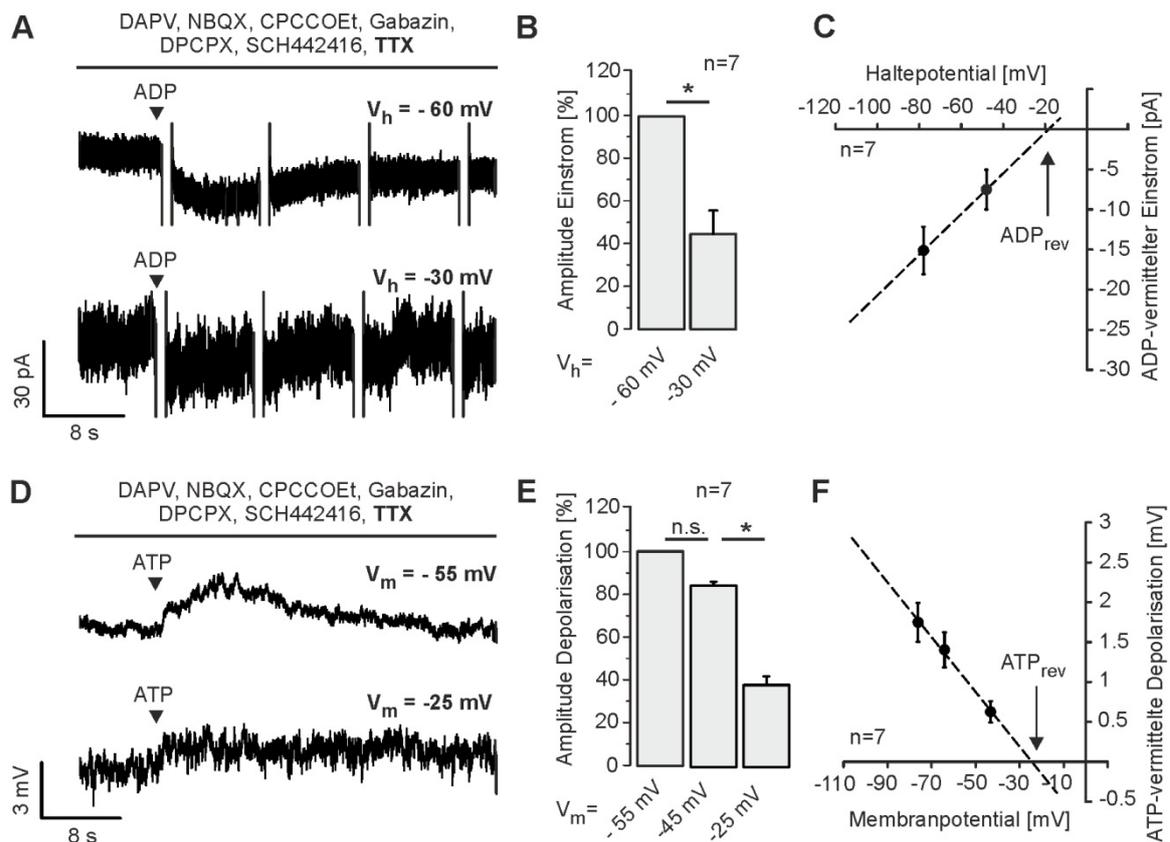


**Abbildung 24: ADP führt zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit von Mitralzellmembranen.**  
**A)** Stromantworten einer Mitralzelle auf die Photoapplikation von ADP und auf repetitive, 1 s andauernde Spannungssprünge um -10 mV alle 10 s. *Inset:* Vergrößerte Ansicht der Stromantworten auf die Potentialsprünge vor (1) und während (2) der Wirkung von ADP.  
**B)** Durch ADP wird die Leitfähigkeit der Mitralzellmembran signifikant und reversibel erhöht.

Die Öffnung von Kalium- sowie Chloridkanälen würde unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu einem Ausstrom führen, die Öffnung von Kationenkanälen, die für Natrium oder Calcium permeabel sind, zu einem Einstrom. Da ATP und ADP einen Einstrom auslösen, ist eine Modulation von Ionenkanälen, die für Natrium oder Calcium permeabel sind, wahrscheinlich. Sollte dies der Fall sein, müsste sich der ADP- bzw. ATP-induzierte Einstrom bzw. die korrespondierende Depolarisation bei Annäherung an das Umkehrpotential des jeweiligen Ions verkleinern (bei den gegebenen extra- und intrazellulären Ionenverhältnissen betrug das Umkehrpotential für Natrium 66 mV, das für Calcium 40 mV). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Mitralzellen zunächst bei -60 mV im *voltage clamp*-Modus abgeleitet und mittels ADP ein Einstrom evoziert. Anschließend wurde das Haltepotential auf -30 mV eingestellt und der abermals ADP-induzierte Einstrom mit dem zuvor ausgelösten verglichen (gemessen als Stromamplitude, Abbildung 25A). Bei -60 mV lag der ADP-induzierte Einstrom im Mittel bei  $-15 \pm 3$  pA und verringerte sich bei -30 mV signifikant um  $55 \pm 11$  % ( $n=7$ ,  $p<0,05$ , Abbildung 25B). Eine lineare Interpolation der

gemittelten Stromamplituden bei -30 und -60 mV ergab nach Korrektur des LJP ein Umkehrpotential des ADP-vermittelten Stroms von ca. -18 mV (Abbildung 25C).

Des Weiteren wurde getestet, ob die durch ATP-induzierte Depolarisation in Ihrer Größe (gemessen als Amplitude) ebenfalls vom Membranpotential abhängig ist. Hierfür wurde die Mitralzelle im *current clamp*-Modus abgeleitet und die Membran durch Strominjektionen auf -55 mV hyper- bzw. auf -25 mV depolarisiert (Abbildung 25D). Als dritter Messpunkt wurden hier zusätzlich die gemittelten Größen der ATP-induzierten Depolarisation beim natürlichen Membranpotential, also ohne Strominjektion, miteinbezogen (-45 mV, n=7). Auch hier zeigte sich, dass die ATP-evozierte Depolarisation bei positiveren Membranpotentialen zunehmend kleiner wurde. So betrug die die ATP-induzierte Depolarisation bei einem Membranpotential von -55 mV im Mittel  $1,6 \pm 0,1$  mV (n=7) und verringerte sich bei einem positiveren Membranpotential von -25 mV signifikant um  $62 \pm 4$  % (n=7,  $p < 0,05$ , Abbildung 25E). Eine lineare Interpolation der gemittelten Größen der ATP-induzierten Depolarisationen pro getestetem Potential ergab nach Korrektur des LJP ein Umkehrpotential des ATP-aktivierten Ionenkanals von ca. -24 mV (Abbildung 25F). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass durch ADP bzw. ATP eine unspezifische Kationenleitfähigkeit in Mitralzellen geöffnet wird.



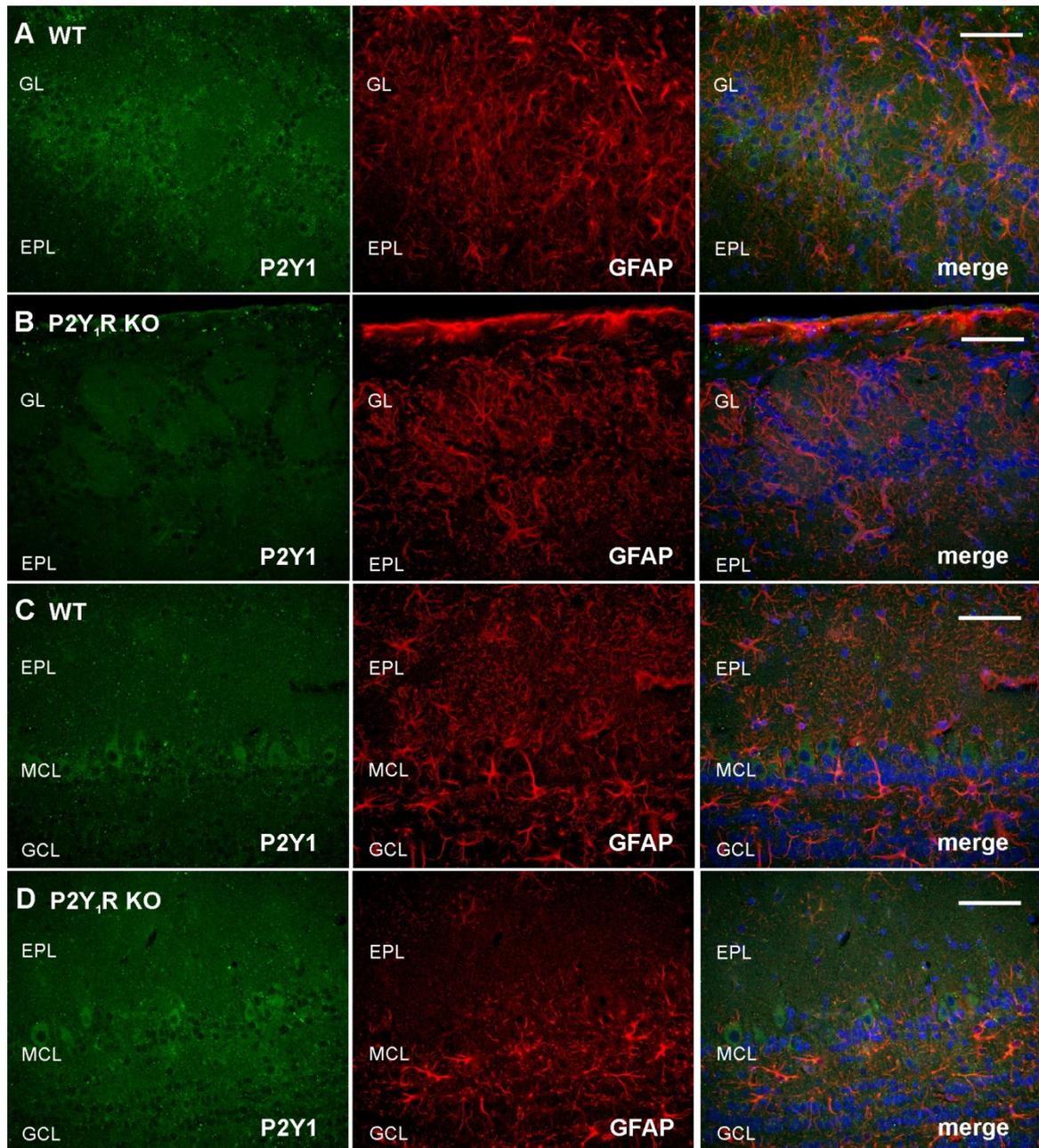
**Abbildung 25: Abhängigkeit ADP- bzw. ATP-induzierter Effekte vom Membranpotential der Mitralzelle.** **A)** ADP-induzierter Einstrom in eine Mitralzelle bei einem Haltepotential ( $V_h$ ) von -60 mV (oben) und -30 mV (unten). **B)** Bei einem Haltepotential von -30 mV kommt es durch ADP zu einem signifikant kleineren Einstrom als bei -60 mV. **C)** Eine lineare Extrapolation der gemittelten Stromamplituden bei Haltepotentialen von -60 mV und -30 mV ergibt ein Umkehrpotential für den ADP-vermittelten Strom ( $ADP_{rev}$ ) von ca. -18 mV (LJP korrigiert). **D)** ATP-induzierte Depolarisation einer Mitralzelle bei einem Membranpotential ( $V_m$ ) von -55 mV (oben) und -25 mV (unten). **E)** Bei einem Membranpotential von -25 mV ist die ATP-induzierte Depolarisation signifikant kleiner als bei einem Membranpotential von -55 mV. **F)** Eine lineare Extrapolation der Amplituden der gemittelten Depolarisationen bei Membranpotentialen von -55 mV, -45 mV und -25 mV ergibt ein Umkehrpotential für den ATP-vermittelten Strom ( $ATP_{rev}$ ) von ca. -24 mV (LJP korrigiert).

### 3.1.8 Immunhistochemischer Nachweis des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors im *Bulbus olfactorius*

Nachdem die funktionelle Expression des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors physiologisch nachgewiesen werden konnte, sollte zusätzlich der histologische Nachweis erfolgen. Eine Untersuchung des P2Y<sub>1</sub>-Expressionsmusters könnte Aufschluss darüber geben, in welchen Zellen dieser Rezeptor tatsächlich lokalisiert ist und damit wichtige Hinweise über die Wirkweise von ATP liefern und bisherige Erkenntnisse ggf. histologisch bestätigen.

Um den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor im Gewebe zu lokalisieren, wurden Antikörperfärbungen in Wildtyp-Mäusen (WT, C57BL/6 Mausstamm) sowie P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-*knock out*-Mäusen (P2Y<sub>1</sub>R KO) derselben Altersklasse als Kontrollen angefertigt. Das Gewebe der P2Y<sub>1</sub>R KO-Mäuse wurde freundlicherweise von Heike Franke (Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt. Für die Färbungen wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Protein verwendet. Da aus physiologischen Studien bekannt ist, dass Gliazellen im *Bulbus olfactorius* P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren exprimieren (Doengi *et al.*, 2008) wurde zusätzlich eine anti-GFAP Färbung durchgeführt. In den übereinander gelagerten Fluoreszenzaufnahmen (*merge*) wurden in blau außerdem die mittels Hoechst33342 gefärbten Zellkerne dargestellt. Abbildung 26A und C zeigen jeweils einen Ausschnitt aus der Glomerular- bzw. Mitralzellschicht in WT-Mäusen. Abbildung 26B und D zeigen die gleichen Färbungen im Gewebe einer P2Y<sub>1</sub>R KO-Maus. Die anti-P2Y<sub>1</sub>-Färbung im grünen Kanal zeigt insgesamt eine schwache Antikörperfärbung des gesamten Gewebes. Im Gewebe der WT-Maus ist eine leicht erhöhte Fluoreszenz in juxttaglomerulären Zellen zu sehen, die im P2Y<sub>1</sub>R KO-Gewebe nicht vorhanden ist. Des Weiteren ist die Fluoreszenz in zellulären Strukturen der Mitralzellschicht erhöht, jedoch sowohl im Gewebe der WT- als auch im Gewebe der P2Y<sub>1</sub>R KO-Maus, in dem der Antikörper gar nicht binden dürfte.

Die anti-GFAP Färbung im roten Kanal zeigt eine deutliche Markierung von astrozytären Strukturen. Entgegen der Erwartungen zeigen die übereinander gelagerten Fluoreszenzaufnahmen (*merge*) jedoch keine eindeutige Ko-Lokalisation von Astrozyten und P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren. Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse dafür, dass der verwendete Antikörper gegen das P2Y<sub>1</sub>-Protein offenbar unspezifische Bindungseigenschaften aufweist (vgl. hierzu auch Anhang VI.4).



**Abbildung 26: Untersuchung des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Expressionsmusters im *Bulbus olfactorius*.** Immunohistochemische Färbungen von Hirnschnitten des *Bulbus olfactorius* aus Gewebe einer Wildtyp-Maus (WT, C57BL/6-Mausstamm) und einer P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-*knock out*-Maus (P2Y<sub>1</sub>R KO). Gezeigt sind von links nach rechts die Färbungen des jeweiligen Ausschnitts mit Antikörpern gegen den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor (grün) sowie die gliale Struktur GFAP (rot). In den übereinander gelagerten Aufnahmen (*merge*) ist in blau zusätzlich eine Zellkernfärbung (Hoechst33342) dargestellt. **A)** Detailaufnahme der Glomerularschicht (GL) aus Gewebe einer adulten WT-Maus (P70). **B)** Detailaufnahme der GL aus Gewebe einer adulten P2Y<sub>1</sub>R KO-Maus (P70). **C)** Detailaufnahme der Mitralzellschicht (MCL) aus Gewebe einer adulten WT-Maus. **D)** Detailaufnahme der Mitralzellschicht aus Gewebe einer adulten P2Y<sub>1</sub>R-KO-Maus. EPL, externe plexiforme Schicht; GCL, Körnerzellschicht. Maßstab in allen Teilabbildungen: 50 µm.

### 3.1.9 Endogener Einfluss von ATP im *Bulbus olfactorius*

Bisher zeigen die Ergebnisse, dass eine artifizielle Applikation von ATP durch photolytische Freisetzung aus *caged* ATP zu einer P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Calciumantwort in juxtaglomerulären Neuronen führte und über einen sekundären Signalweg eine Depolarisation in *M/t*-Zellen auslöste. Des Weiteren ist eine direkte, P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelte Modulation von *M/t*-Zellen wahrscheinlich.

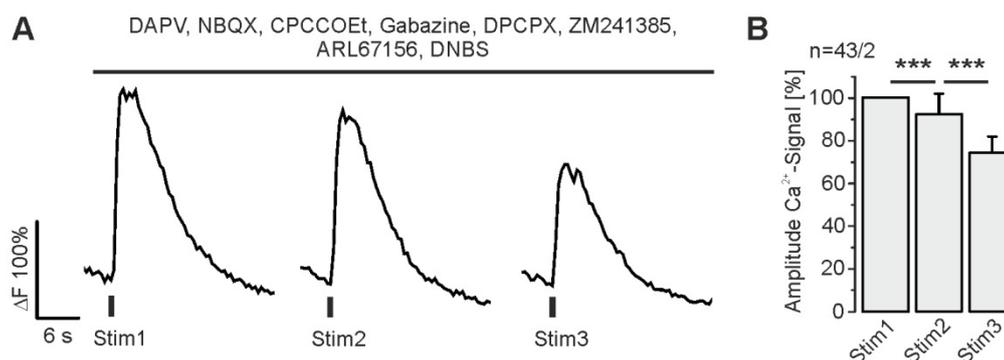
Thyssen *et al.* (2010) zeigten, dass ATP als Ko-Transmitter zusammen mit Glutamat entlang der Axone sowie an den Axonterminalen der ORNs freigesetzt wird und über purinerge Signalwege verschiedene Typen von Gliazellen aktiviert. Daher sollte untersucht werden, ob die endogene Freisetzung von ATP in der Lage ist, purinerge Modulationsmechanismen auch in Neuronen des olfaktorischen *Bulbus* zu aktivieren. Zunächst sollte dabei der Einfluss von endogen freigesetztem ATP auf die Aktivität der identifizierten, juxtaglomerulären P2Y<sub>1</sub>-exprimierenden Neurone visualisiert werden. Um die Wirkung der Bindung eines Geruchsstoffs an ORN möglichst physiologisch nachzuahmen, wurden die ORN-Axonbündel in der Nervenfaserschicht elektrisch stimuliert. Olfaktorische neuronale Aktivität ist eng an respiratorische Aktivität gekoppelt. Rhythmisches Ein- und Ausatmen durch die Nase (*sniffing*) bringt entsprechend nicht nur volatile Substanzen über den Luftstrom an die Duftrezeptoren der ORN, sondern reguliert auch den Informationsfluss des olfaktorischen Systems und führt zu definierten Mustern neuronaler Aktivität (Cang und Isaacson, 2003; Kepecs *et al.*, 2006). Die Stimulationsparameter wurden daher so ausgewählt, dass ein sogenanntes *sniffing*-ähnliches Muster der Exzitation in ORN imitiert werden sollte. Dafür wurden die Axone mittels Stimulationspipette (ca. 2 MΩ, ACSF gefüllt) je Zyklus (sog. *sniff cycle*) für 200 ms mit 100 Hz stimuliert (Simulation der Einatemphase), anschließend erfolgte eine 300 ms lange Pause (Simulation der Ausatemphase). Die Stimulation erfolgte insgesamt über zehn Zyklen (5 Sekunden).

#### 3.1.9.1 Differenzierte purinerge Modulation stimulationsinduzierter Calciumsignale in juxtaglomerulären Neuronen

Die folgenden Calciummessungen wurden in Hirnschnitten von Eno x GCaMP6s Mäusen durchgeführt. Da die endogene Freisetzung von ATP aus den Axonterminalen der ORN auf der Generierung von Aktionspotentialen beruht, wurde TTX in den folgenden Experimenten nicht eingesetzt. Um dennoch die Anzahl an Neuronen zu reduzieren, die indirekt auf den Stimulus reagieren und direkt auf ATP reagierende Neurone möglichst effizient zu isolieren, wurden während des gesamten Versuchs abermals ionotrope sowie metabotrope Glutamatrezeptoren, GABA<sub>A</sub>- sowie Adenosinrezeptoren blockiert. Zur Unterstützung der Detektion von ATP-abhängigen Calciumsignalen wurde zudem der ATP-Abbau durch ARL67156 (100 μM) und den TNAP-Inhibitor 2,5-dimethoxy-N-3-quinolinylnbenzenesulfon-

amid (DNBS, 10  $\mu$ M) in der Extrazellulärlösung inhibiert, wobei die Schnitte vor Beginn der Messung 30 Minuten in ARL67156 (300  $\mu$ M) inkubiert wurden.

Als Vorversuch wurden zunächst Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen die ORN-Axone dreimal im Abstand von 15 Minuten stimuliert wurden (Stim1 bis Stim3, Abbildung 27A). Dies sollte dazu dienen, stimulationsinduzierte Calciumantworten in juxtaglomerulären Neuronen im Verlauf einer Messung beurteilen zu können. Bei Stim1 betrug die gemittelte Amplitude aller untersuchten Zellen  $119 \pm 13$  %  $\Delta F$  (n=43), bei Stim2 betrug die Amplitude der Calciumantwort noch  $92 \pm 9$  % und bei Stim3 noch  $74 \pm 7$  % von Stim1 (Abbildung 27B, p<0,005). Die Calciumantwort wurde also bei der zweiten Stimulation im Vergleich zu Stim1 kleiner und bei der dritten Stimulation im Vergleich zu Stim2 kleiner. Damit unterlag die Calciumantwort einem sog. *run down*, also einer kontinuierlichen Abnahme der Amplitude der Calciumantwort im Verlauf der Messung ohne Veränderung der Versuchsbedingungen.



**Abbildung 27: Kontrollexperiment zur Untersuchung des *run downs* stimulationsinduzierter Calciumsignale in juxtaglomerulären Neuronen. A) Calciumsignal eines juxtaglomerulären Neurons bei repetitiver ORN-Axonstimulation. B) Quantifizierung des *run downs* stimulationsinduzierter Calciumsignale in juxtaglomerulären Neuronen.**

Im Folgenden wurde der Einfluss des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 auf Calciumantworten in juxtaglomerulären Neuronen in Folge einer ORN-Axonstimulation untersucht. Die Kontrolle entspricht dabei dem Zeitpunkt Stim1 des vorangegangenen Kontrollexperimentes, zum Zeitpunkt Stim2 erfolgte die Applikation von MRS2179 und Stim3 entspricht dem *wash*. Die wiederholte ORN-Axonstimulation führte auch hier zu einer Calciumantwort in juxtaglomerulären Neuronen (Abbildung 28A). Die Applikation von MRS2179 hatte allerdings verschiedene Effekte auf diese stimulationsinduzierten Signale: In 21 % der insgesamt 92 Zellen hatte MRS2179 keinen reversiblen Effekt auf die stimulationsinduzierte Calciumantwort. Diese Gruppe schließt damit Zellen ein, deren

Amplitude im Vergleich zur Kontrollstimulation in Anwesenheit von MRS2179 mitunter um mehr als 10 % verändert war, die Antwort im *wash* aber keine Reversibilität aufwies. Aufgrund dessen kann in dieser Gruppe nicht mit Sicherheit beurteilt werden, ob die Zellen von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängiger Neuromodulation beeinflusst werden.

Die Mehrheit der Zellen zeigte dagegen durch den Wegfall der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängigen Modulation bei der zweiten ORN-Axonstimulation in MRS2179 Calciumantworten, die sowohl im Vergleich zur Kontrollstimulation als auch zum *wash* um mehr als 10 % verändert waren. In 27 % der insgesamt 92 untersuchten Zellen bewirkte MRS2179 eine Verringerung der Calciumantwort. Unter Kontrollbedingungen betrug die Amplitude der Calciumantwort in dieser Gruppe im Mittel  $226 \pm 45$  %  $\Delta F$  und wurde durch MRS2179 höchstsignifikant um  $65 \pm 7$  % reversibel reduziert ( $n=25$ ,  $p<0,005$ , Abbildung 28A, B und C). Diese Zellgruppe beinhaltet damit vermutlich Neurone, die direkt über P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren aktiviert werden.

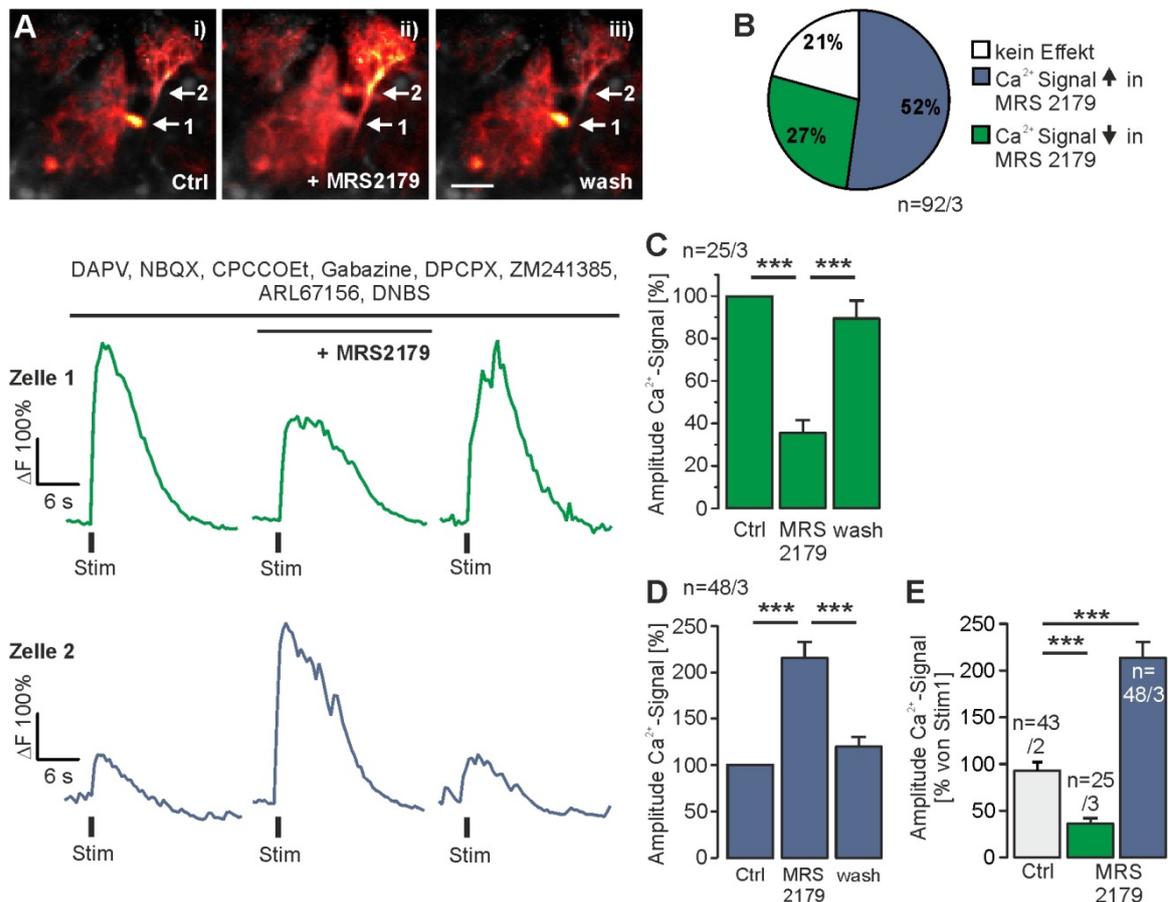
In 52 % der durch die Stimulation aktivierten Zellen hatte MRS2179 eine verstärkende Wirkung auf die stimulationsinduzierte Calciumantwort. In diesen Zellen betrug die Amplitude des Calciumsignals in der Kontrolle  $104 \pm 11$  %  $\Delta F$  und wurde in Anwesenheit des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten MRS2179 um  $114 \pm 17$  % größer ( $n=48$ ,  $p<0,005$ ; Abbildung 28A, B und D). Dies impliziert, dass diesen Neuronen möglicherweise ein P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängiger, inhibitorischer Signalweg vorgeschaltet ist.

Unter Kontrollbedingungen unterschied sich die Amplitude der Calciumantwort zwischen den beiden oben genannten Zellgruppen hochsignifikant ( $p<0,01$ ), sodass davon ausgegangen werden kann, dass es sich um unterschiedliche Zellpopulationen handelt.

Abbildung 28E zeigt außerdem, dass sich die relative Größe der Calciumamplitude bei Stim2 des Kontrollexperiments signifikant von den unter der Wirkung von MRS2179 ausgelösten relativen Amplituden unterscheidet ( $35 \pm 7$  % bzw.  $214 \pm 17$  % der Kontrolle bei der Gruppe mit verminderter bzw. erhöhter Calciumamplitude;  $p<0,005$ ). Dies bestätigt, dass die Modulation der Calciumantworten durch MRS2179 bedingt ist und offenbar auf die Inhibition P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelter Signalwege zurückgeführt werden kann. Allerdings ist zu beachten, dass trotz weitestgehender Isolation von glutamaterger, GABAerger und adenosinerger Neurotransmission dennoch Calciumsignale ausgelöst wurden, die nicht alleine durch P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängige Signalwege bedingt sind. Dies weist darauf hin, dass aus den ORN-Axonterminalen neben Glutamat noch ein weiterer exzitatorisch wirksamer Neurotransmitter freigesetzt wird oder aber weitere Glutamat- oder P2-Rezeptoren stimuliert werden. Eine direkte Stimulation der aktivierten Zellen kann ausgeschlossen werden, da TTX die stimulationsinduzierten Calciumsignale in allen Zellen vollständig blockierte (nicht abgebildet). Dies bestätigt außerdem, dass die Antworten in Folge der Freisetzung von Neurotransmittern aus ORN-Axonterminalen ausgelöst wurden.

Zusammengefasst zeigen diese Versuche damit erstmals einen Einfluss auf die Aktivität der Neurone des *Bulbus olfactorius* durch endogen freigesetztes ATP. Der Nachweis der

endogenen Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren offenbart dabei die komplexe und umfassende Bedeutung der stimulationsinduzierten Freisetzung von ATP auf das prozessierende bulbäre Netzwerk.



**Abbildung 28: Modulation stimulationsinduzierter Calciumsignale in juxtaglomerulären Neuronen durch den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten MRS2179.** **A)** Oben sind Fluoreszenzaufnahmen stimulationsinduzierter Calciumsignale (rot) in juxtaglomerulären Neuronen einer Eno x GCaMP6s-Maus zu sehen. Die Stimulation wurde unter Kontrollbedingungen (i), unter dem Einfluss von MRS2179 (ii, 100  $\mu$ M) sowie nach Auswaschen von MRS2179 (iii) durchgeführt. Die Pfeile markieren die Zellen, deren Messspur unten abgebildet ist. Die Blockade von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren hat unterschiedliche Auswirkungen auf die stimulationsinduzierte Calciumantwort juxtaglomerulärer Neurone. Maßstab: 30  $\mu$ m. **B)** Prozentuale Anteile der unterschiedlich auf MRS2179-Applikation reagierenden Zellen an der Gesamtzahl aller stimulationsaktivierten Zellen. **C)** Änderung der Amplituden der Calciumantwort in Zellen, die in Anwesenheit von MRS2179 mit einem kleineren Calciumsignal reagiert haben. **D)** Änderung der Amplitude der Calciumantwort in Zellen, die in Anwesenheit von MRS2170 mit einem erhöhten Calciumsignal reagiert haben. **E)** Vergleich der Calciumantworten bei der zweiten Stimulation zwischen Kontrollexperiment und bei MRS2179-Applikation.

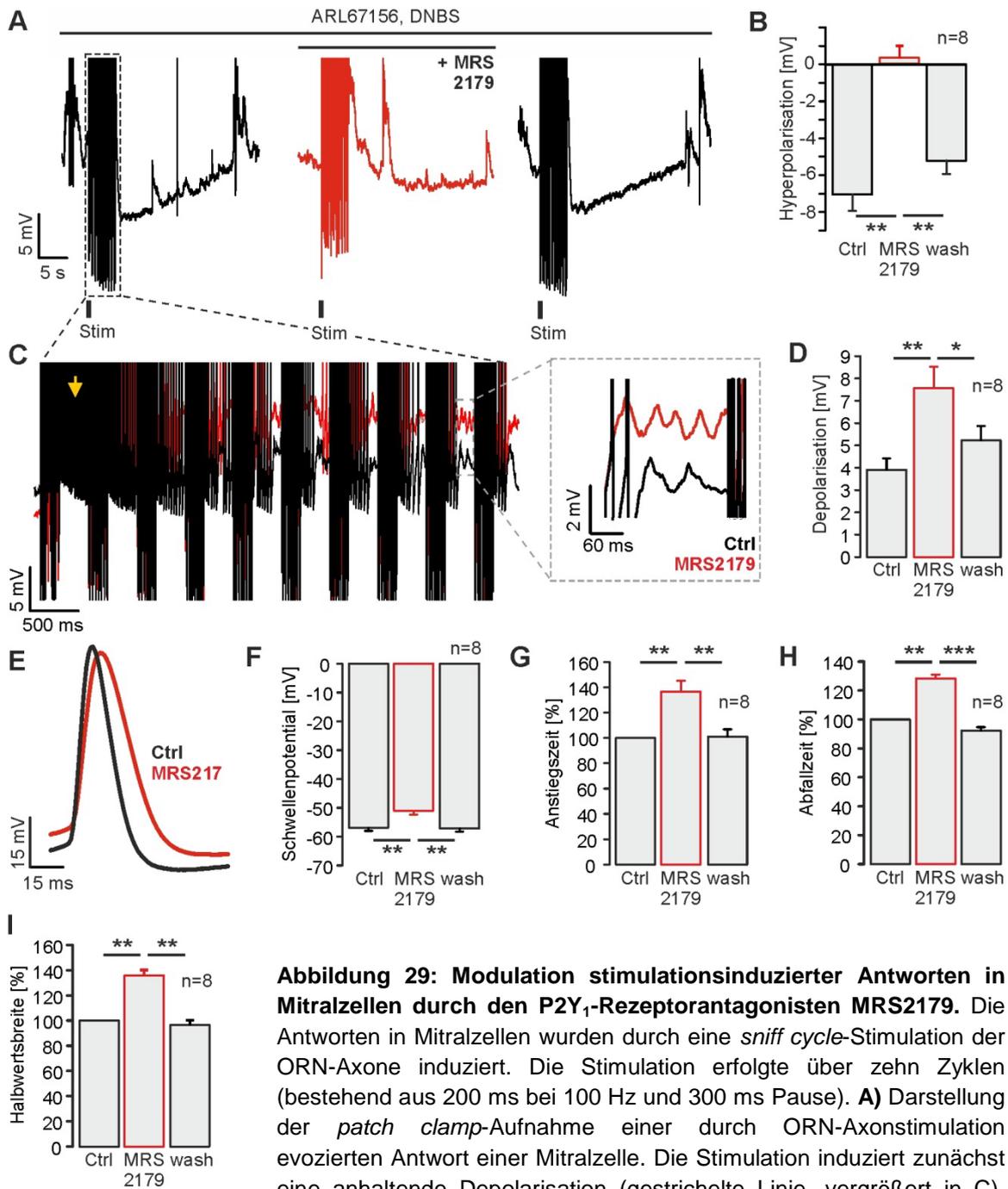
### 3.1.9.2 Untersuchung des endogenen Einflusses von ATP auf den stimulationsinduzierten *output* von Mitralzellen

Mitralzellen erhalten synaptische Eingänge aus dem gesamten olfaktorischen neuronalen Netzwerk und integrieren die eingehenden Geruchssignale zu einer Gesamtinformation. Dieser sogenannte *output* ist letztendlich die entscheidende Information, welche an höhere Hirnzentren weitergeleitet und dort interpretiert wird. Um einen möglichen Einfluss endogener P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängiger Signalwege auf den *output* des olfaktorischen *Bulbus* zu untersuchen, wurden die Axone der ORN abermals mittels *sniff cycle*-Stimulation stimuliert und gleichzeitig die Antwort von Mitralzellen im *current clamp*-Modus in An- und Abwesenheit von MRS2179 aufgezeichnet. Für diese Experimente wurden Mäuse der Linie Pcdh21 x GCaMP6s verwendet, weswegen parallel zur Ableitung von Mitralzellen auch Änderungen der Calciumkonzentration als Antwort auf die *sniff cycle*-Stimulation unter den jeweiligen Versuchsbedingungen untersucht werden konnten (s. Abbildung 30). Wie zuvor wurden die Messungen unter Inhibition ATP-abbauender Enzyme (ARL67156, DNBS) durchgeführt und damit das Gleichgewicht purinerner Signalmoleküle zugunsten von ATP verschoben. Da der Neurotransmitter bzw. der Mechanismus der ATP-induzierten Aktivierung von *M/t*-Zellen bisher unbekannt ist und mögliche Übertragungsmechanismen auch über die Modulation der bulbären prinzipalen Transmittersysteme nicht beeinflusst werden sollte, wurden in diesen Messungen keine weiteren Antagonisten verwendet.

Die elektrische Stimulation der ORN-Axone rief eine zweiphasige Antwort in Mitralzellen hervor. Während der Stimulation wurde im Mittel eine Depolarisation von  $3,9 \pm 0,5$  mV (n=8) mit verstärkter Auslösung von Aktionspotentialen evoziert, der direkt nach der Stimulation eine ausgeprägte, langanhaltende Hyperpolarisation folgte, deren Amplitude im Mittel  $-7,0 \pm 0,9$  mV betrug (n=8, Abbildung 29A). Die Applikation von MRS2179 blockierte diese Hyperpolarisation reversibel, sodass sich die Mitralzelle nach der Stimulation in einem eher depolarisierten Zustand befand ( $0,3 \pm 0,01$  mV, n=8,  $p < 0,01$ ; Abbildung 29B). Die Größe dieser Hyperpolarisation wurde über den Differenzwert zur Basislinie quantifiziert, wobei der tiefste Punkt der Hyperpolarisation ausgemessen und die Basislinie im Bereich der *downstates* definiert wurde. Außerdem wurde der zeitliche Abstand vom letzten Einzelpuls der Stimulation bis zum tiefsten Punkt der Hyperpolarisation ausgemessen. Bei Ausbleiben oder reduzierter Hyperpolarisation in Anwesenheit von MRS2179 wurde entsprechend der Wert des Membranpotentials zu dem Zeitpunkt im Anschluss an die Stimulation ausgelesen, bei dem die Hyperpolarisation in der Kontrolle die stärkste Ausprägung aufwies.

Die stimulationsinduzierte Depolarisation der Mitralzellen betrug in Anwesenheit von MRS2179 im Mittel  $7,6 \pm 0,9$  mV und war damit hochsignifikant größer als in der Kontrolle (n=8,  $p < 0,01$ , Abbildung 29C und D). Auf die Frequenz, Latenz oder Anzahl der stimulationsinduzierten Aktionspotentiale hatte MRS2179 hingegen keine Wirkung,

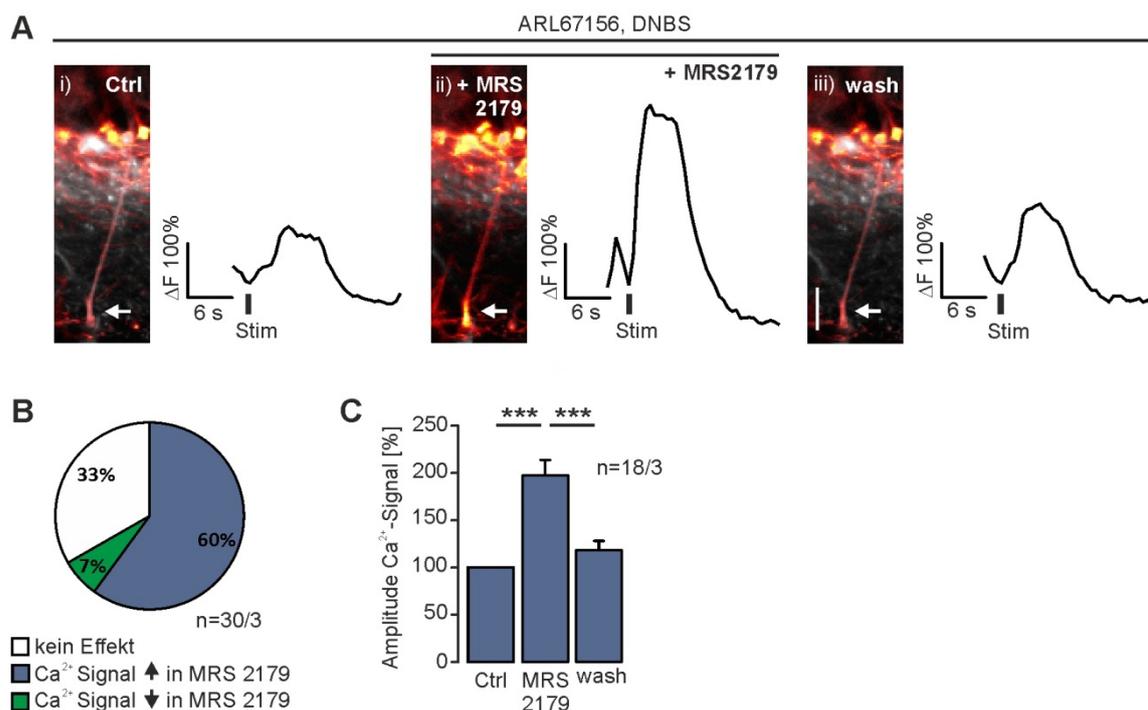
beeinflusste aber deren Kinetik (Abbildung 29E). Um die Kinetik der Aktionspotentiale zu charakterisieren, wurden aus dem ersten *interburst*-Intervall (also während der 300 ms Pause des ersten *sniff cycle*) pro Zelle fünf Aktionspotentiale nach Größe des Schwellenpotentials, Amplitude, Nachhyperpolarisation, Halbwertsbreite sowie Dauer der De- und Repolarisation vermessen und die Werte anschließend gemittelt. MRS2179 hatte keinen Einfluss auf die Nachhyperpolarisation der einzelnen Aktionspotentiale. Die Aktionspotentialamplitude wurde zwar nicht signifikant, aber reversibel von  $61,2 \pm 1,4$  mV in der Kontrolle um  $9,5 \pm 2,8$  % in MRS2179 reduziert ( $n=8$ ,  $p=0,09$ ). Signifikante MRS2179-bedingte Modulationen konnten aber bei den anderen Parametern festgestellt werden. So betrug das Schwellenpotential im Mittel  $-56,9 \pm 1,1$  mV und wurde durch MRS2179 um 5,89 mV ins Positive verschoben (LJP korrigiert;  $n=8$ ,  $p<0,01$ ; Abbildung 29F). Die Depolarisationsphase des Aktionspotentials, gemessen als Anstiegszeit, wurde durch MRS2179 von  $0,57 \pm 0,03$  ms in der Kontrolle um  $36,6 \pm 8,7$  % verlängert ( $n=08$ ,  $p<0,01$ ; Abbildung 29G). Ähnlich wurde die Repolarisationsphase, gemessen als Abfallzeit, beeinflusst und von  $1,18 \pm 0,08$  ms in der Kontrolle um  $28,2 \pm 2,8$  % in Anwesenheit von MRS2179 verlängert ( $n=8$ ,  $p<0,01$ ; Abbildung 29H). Beides führte, gemessen an der Halbwertsbreite, im Mittel zu  $35,8 \pm 4,2$  % länger andauernden Aktionspotentialen ( $1,41 \pm 0,11$  ms in der Kontrolle,  $n=8$ ,  $p<0,01$ ; Abbildung 29I).



**Abbildung 29: Modulation stimulationsinduzierter Antworten in Mitralzellen durch den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten MRS2179.** Die Antworten in Mitralzellen wurden durch eine *sniff cycle*-Stimulation der ORN-Axone induziert. Die Stimulation erfolgte über zehn Zyklen (bestehend aus 200 ms bei 100 Hz und 300 ms Pause). **A)** Darstellung der *patch clamp*-Aufnahme einer durch ORN-Axonstimulation evozierten Antwort einer Mitralzelle. Die Stimulation induziert zunächst eine anhaltende Depolarisation (gestrichelte Linie, vergrößert in C), gefolgt von einer ausgeprägten Hyperpolarisation. Die Antwort ist unter

Kontrollbedingungen (links), in Anwesenheit von MRS2179 (100 μM, Mitte, rot) und nach Auswaschen von MRS2179 (rechts) dargestellt. **B)** Die ausgelöste Hyperpolarisation wird durch MRS2179 inhibiert. **C)** Die evozierte Depolarisation in Mitralzellen unter Kontrollbedingungen (schwarze Kurve) und unter Einfluss von MRS2179 (rote Kurve). *Inset:* Vergrößerung eines Bereichs kurz vor Ende der insgesamt 5 s andauernden *sniff cycle*-Stimulation. **D)** Unter Einfluss von MRS2179 ist die evozierte Depolarisation in Mitralzellen signifikant vergrößert. **E)** Darstellung eines spontanen Aktionspotentials während der Pause im 1. *sniff cycle* (gelber Pfeil aus C) unter Kontrollbedingungen (schwarze Kurve) und unter MRS2179 (rote Kurve). **F)** Das Schwellenpotential ist unter Einfluss von MRS2179 zu positiveren Werten verschoben. **G)** Die Depolarisationsphase (Anstiegszeit), **H)** die Repolarisationsphase (Abfallzeit) sowie **I)** die Halbwertsbreite sind in Anwesenheit von MRS2179 verlängert.

Die vorangegangenen Messungen wurden in Hirnschnitten von Pcdh21 x GCaMP6s-Mäusen durchgeführt. Neben dem Einfluss des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten auf elektrophysiologische Parameter konnte daher zusätzlich dessen Wirkung auf stimulationsinduzierte Calciumsignale in Mitralzellen untersucht werden, wobei die ROIs im Bereich der Somata der Mitralzellen definiert wurden (Abbildung 30A). Von insgesamt 30 untersuchten Zellen führte MRS2179 in 7 % zu einer reversiblen Reduktion der Calciumantwort und in 33 % der Zellen hatte MRS2179 keinen Effekt. Im Großteil der Mitralzellen (60 %) bewirkte MRS2179 eine reversible Verstärkung der stimulationsinduzierten Calciumantwort (Abbildung 30B). In diesen Zellen betrug die Amplitude des Calciumsignals in der Kontrolle im Mittel  $277 \pm 23 \%$   $\Delta F$  (n=18) und wurde in Anwesenheit von MRS2179 um  $97 \pm 14 \%$  vergrößert (n=18, p<0,005; Abbildung 30C). Die Ergebnisse zeigen damit, dass die Inhibition von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren die stimulationsinduzierte Aktivität bzw. Erregbarkeit in den meisten Mitralzellen erhöht.



**Abbildung 30: Modulation stimulationsinduzierter Calciumsignale in Mitralzellen durch den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten MRS2179.** **A)** Fluoreszenzaufnahmen von Calciumsignalen (rot) in M/t-Zellen einer Pcdh21 x GCaMP6s-Maus ausgelöst durch ORN-Axonstimulation. Die Stimulation wurde unter Kontrollbedingungen (i), unter dem Einfluss von MRS2179 (ii, 100  $\mu$ M) sowie nach Auswaschen von MRS2179 (iii) durchgeführt. Der Pfeil markiert die Mitralzelle, deren Messspur jeweils rechts daneben abgebildet ist. Maßstab: 30  $\mu$ m. **B)** In 60 % der Mitralzellen führte die Applikation von MRS2179 zu einer reversiblen Erhöhung des Calciumsignals, in 7 % zu einer Verringerung. Die Signale der restlichen 33 % änderten sich nicht. **C)** Relative Änderung der Amplitude der Calciumantworten von Mitralzellen, die in Anwesenheit von MRS2179 mit einem größeren Calciumsignal reagiert haben.

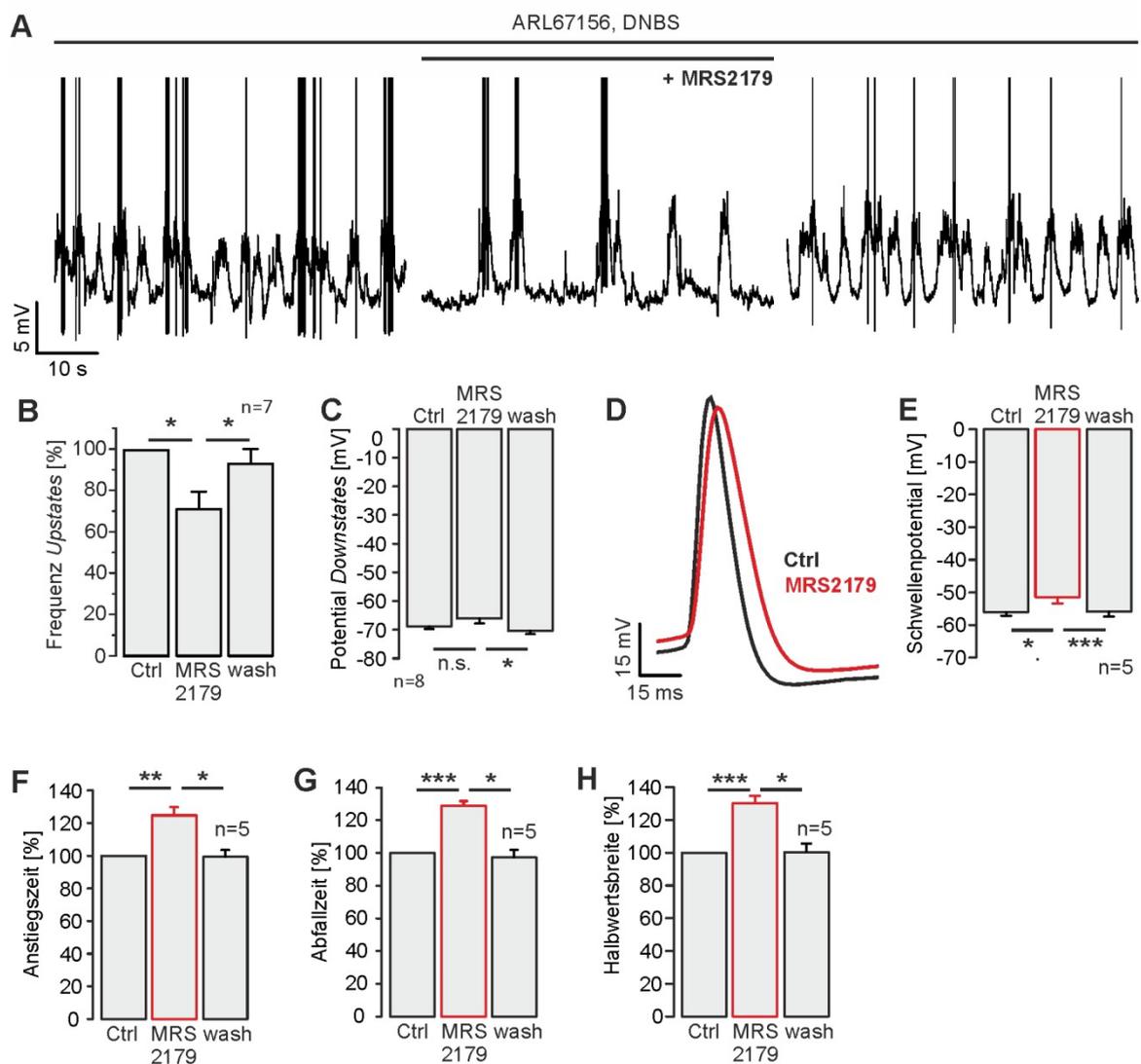
### 3.1.9.3 Untersuchung des endogenen tonischen Einflusses von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren auf Netzwerkdynamiken im Ruhezustand

Zusätzlich zur aktivitätsabhängigen Stimulation von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren ist auch von Interesse, ob tonische Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren, die unabhängig von evozierter neuronaler Erregung auftritt, eine Wirkung auf Mitralzellen und das neuronale Netzwerk im *Bulbus olfactorius* hat. Trotz der Abwesenheit von sensorischem *input* weist das bulbäre Netzwerk aufgrund von externen Faktoren und intrinsischen Zelleigenschaften eine hohe Spontanaktivität auf, die sich unter anderem in der Membranpotentialbistabilität von Mitralzellen widerspiegelt. Diese Bistabilität kennzeichnet sich durch alternierende Phasen von depolarisierten Zuständen (*upstates*), in denen sich das Potential dem Schwellenpotential der Zelle annähert oder dieses sogar überschreitet, und hyperpolarisierten Zuständen geringerer Erregbarkeit (*downstates*). Dabei generieren Mitralzellen i.d.R. ausschließlich während der *upstates* Aktionspotentiale. Die Phasen der *upstates* definieren damit denjenigen Zeitrahmen, in dem die Erregung einer Mitralzelle effektiv in einen *output* umgewandelt werden kann. Bisher zeigt jedoch nur eine Studie eine adenosinerge Regulation von *up-* und *downstates* in Mitralzellen und damit einen purinergen Einfluss auf Netzwerkdynamiken im Ruhezustand (Roux *et al.*, 2015). Daher sollte untersucht werden, ob auch P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren auf verschiedene Parameter der *up-* bzw. *downstates* eine Wirkung haben. Für die Auswertung wurden Abschnitte der vorherigen *patch clamp*-Messungen herangezogen (3.1.9.2), die mindestens zehn Minuten nach der letzten *sniff cycle*-Stimulation in einer zweiminütigen kontinuierlichen Ableitung mit aufgezeichnet wurden und vermutlich nicht durch die Stimulation beeinflusst waren. In Abbildung 31A ist eine solche kontinuierliche Ableitung einer Mitralzelle im *current clamp*-Modus mit typischen *up-* und *downstates* zu sehen. Die Analyse von biphasischen Membranpotentialverläufen erfolgte mit einem *Plugin* für MATLAB, basierend auf der Methode von Seamari *et al.* (2007). Das *Plugin* wurde in Kooperation mit Dr. Rene Werner (Zentrum für Experimentelle Medizin und Institut für *Computational Neuroscience*, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) weiterentwickelt. Mithilfe des Programms können *upstates* nach Amplitude, Größe und Frequenz vermessen werden. Diese Analyse ergab, dass die Frequenz der *upstates* unter Kontrollbedingungen im Mittel  $0,18 \pm 0,01$  Hz, die Amplitude  $4,0 \pm 0,6$  mV und die Dauer  $3,3 \pm 0,3$  s betrug ( $n=7$ ). Der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist MRS2179 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Amplitude ( $4,3 \pm 0,5$  mV in MRS2179) oder die Dauer ( $3,0 \pm 0,5$  s in MRS2179) der *upstates*, reduzierte aber deren Frequenz signifikant und reversibel um  $28,6 \pm 8,5$  % ( $n=7$ ,  $p<0,05$ ; Abbildung 31B). Damit verlängerten sich im Umkehrschluss die Phasen der *downstates*, in denen sich die Zelle in Zuständen schwacher Erregbarkeit befindet.

Das mittlere Potential der *downstates* betrug  $-68,8 \pm 0,9$  mV (LJP korrigiert) und wurde in MRS2179 um  $2,7 \pm 1,6$  mV positiver ( $n=8$ ,  $p=0,15$ ), was allerdings nur im Vergleich zur Phase nach dem Auswaschen von MRS2179 signifikant war ( $-70,4 \pm 1,1$  mV,  $p<0,05$ , Abbildung 31C).

Ähnlich wie zuvor bei stimulationsinduzierten Aktionspotentialen beeinflusste MRS2179 auch die Form spontan generierter Aktionspotentiale (Abbildung 31D). So betrug das Schwellenpotential in der Kontrolle im Mittel  $-56,0 \pm 1,1$  mV ( $n=5$ ) und wurde in Anwesenheit von MRS2179 um  $4,6 \text{ mV} \pm 2,0$  mV in positive Richtung verschoben ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ; Abbildung 31E). Genauso dauerten die De- und Repolarisationsphasen einzelner Aktionspotentiale in Anwesenheit von MRS2179 länger an. Die Depolarisationsdauer, abermals gemessen als Anstiegszeit, betrug unter Kontrollbedingungen  $0,47 \pm 0,01$  ms ( $n=5$ ) und wurde um  $24,7 \pm 5,0$  % verlängert. ( $n=5$ ,  $p<0,01$ ; Abbildung 31F). Die Repolarisationsdauer, gemessen als Abfallzeit, betrug unter Kontrollbedingungen  $1,00 \pm 0,07$  ms ( $n=5$ ) und wurde um  $28,9 \pm 2,8$  % verlängert ( $n=5$ ,  $p<0,005$ ; Abbildung 31G). Dies führte entsprechend auch bei spontan generierten Aktionspotentialen zu einer längeren Dauer des gesamten Aktionspotentials. Gemessen an der Halbwertsbreite betrug diese unter Kontrollbedingungen  $1,19 \pm 0,04$  ms und nahm in MRS2179 um  $30,3 \pm 4,5$  % zu ( $n=5$ ,  $p<0,005$ ; Abbildung 31H). Auf die Amplitude sowie die Nachhyperpolarisation einzelner spontaner Aktionspotentials hatte MRS2179 keine signifikante Wirkung.

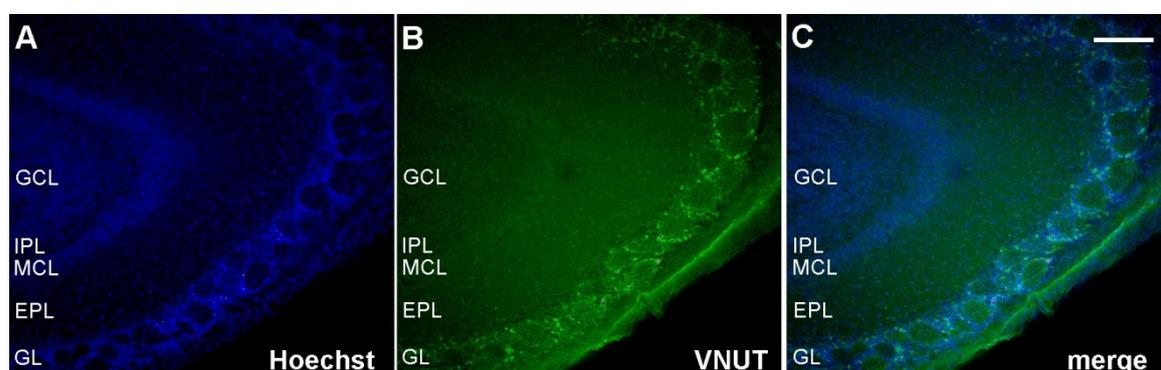
Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse für eine tonische Freisetzung von ATP und einen maßgeblichen Einfluss der endogenen Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren auf die bulbären Netzwerkdynamiken im Ruhezustand.



**Abbildung 31: Tonischer purinerges Einfluss auf die Membraneigenschaften von Mitralzellen.** **A)** Oszillationen von Membranpotential-*upstates* (Depolarisationen) und -*downstates* (Hyperpolarisationen) einer Mitralzelle unter Kontrollbedingungen (links), in Anwesenheit von MRS2179 (100  $\mu$ M, Mitte) und nach Auswaschen von MRS2179 (rechts). **B)** Die Frequenz der *upstates* nimmt unter Einfluss von MRS2179 ab. **C)** Das Potential der *downstates* (Ruhemembranpotential) ändert sich durch MRS2179 nur im Vergleich zur Auswaschphase signifikant. **D)** Darstellung eines spontanen Aktionspotentials unter Kontrollbedingungen (schwarze Kurve) und unter MRS2179 (rote Kurve). **E)** Das Schwellenpotential ist unter Einfluss von MRS2179 zu positiveren Werten verschoben. **F)** Die Depolarisationsphase (Anstiegszeit), **G)** die Repolarisationsphase (Abfallzeit) sowie **H)** die Halbwertsbreite einzelner spontaner Aktionspotentiale sind in Anwesenheit von MRS2179 verlängert.

### 3.1.10 Immunhistochemischer Nachweis des vesikulären Nukleotid-Transporters VNUT im *Bulbus olfactorius*

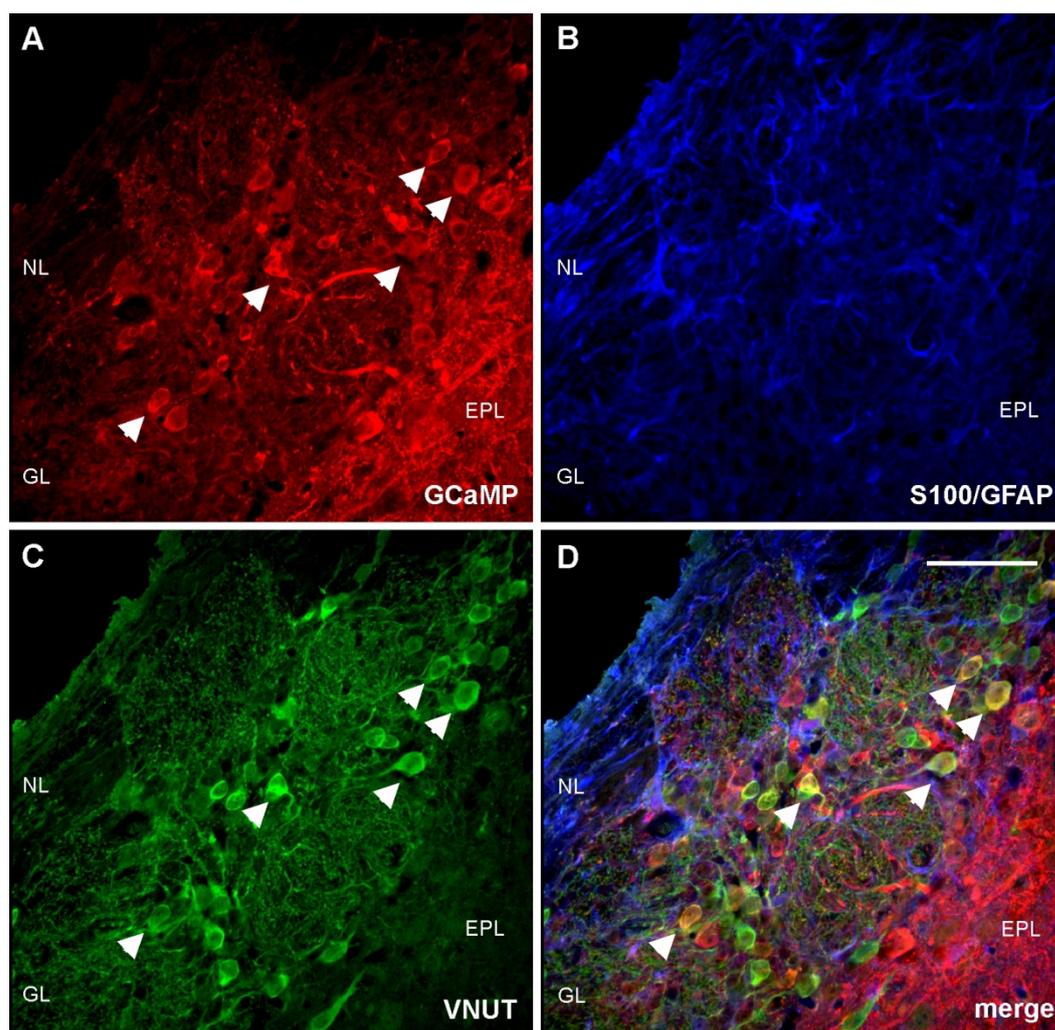
Um die Bedeutung einer neuromodulatorischen Substanz in einem Netzwerk zu charakterisieren, ist es nicht nur von Interesse, welche Zellen die entsprechenden Rezeptoren zur Perzeption besitzen, sondern auch mögliche Quellen dieser Substanz zu lokalisieren. Bevor Nukleotide wie ATP, ADP und UDP ausgeschüttet werden, werden sie in sekretorischen Vesikeln gelagert, deren Beladung vesikuläre Nukleotid-Transporter (VNUT) vermitteln (Sawada *et al.*, 2008). Die Expression und Lokalisation von VNUT kann daher ein zusätzlicher wichtiger Hinweis sein, aus welchen zellulären Komponenten das purinerge System im olfaktorischen *Bulbus* besteht. Zur Lokalisation von VNUT wurde ein polyklonaler Antikörper aus Meerschweinchen verwendet. Abbildung 32A zeigt eine Übersichtsaufnahme des olfaktorischen *Bulbus* mit Zellkernfärbung, in der die Gliederung in Glomerularschicht, externe plexiforme Schicht, Mitralzellschicht, interne plexiforme Schicht und Körnerzellschicht deutlich zu sehen ist. Abbildung 32B zeigt den gleichen Ausschnitt mit der VNUT Immunmarkierung, aber ohne Zellkernfärbung. In Abbildung 32C ist die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen aus A und B zu sehen. Hier wird deutlich, dass vor allem in der Glomerularschicht eine Färbung gegen VNUT zu erkennen ist.



**Abbildung 32: VNUT-immunreaktive Zellen in einer Übersichtsdarstellung des *Bulbus olfactorius*.** Fluoreszenzaufnahmen aus sagittalen Gewebeschnitten einer adulten Maus (P53). **A)** Darstellung einer Zellkernfärbung mittels Hoechst33342. **B)** Immunhistochemische Färbung gegen den vesikulären Nukleotid-Transporter (VNUT). **C)** Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen aus A und B. VNUT-immunreaktive Zellen (grün) sind in der Glomerularschicht (GL) lokalisiert. GCL, Körnerzellschicht; IPL, interne plexiforme Schicht; MCL, Mitralzellschicht; EPL, externe plexiforme Schicht. Maßstab: 160 µm.

In einer weiteren Färbung wurden zusätzlich zu VNUT Immunmarkierungen gegen die glialen Strukturen S100 $\beta$  und GFAP (in Kombination) durchgeführt. Aufgrund der verwendeten Mauslinie (Eno x GCaMP6s) konnte als neuronaler Marker eine Immunmarkierung des GCaMP6s über anti-GFP-Antikörper herangezogen werden.

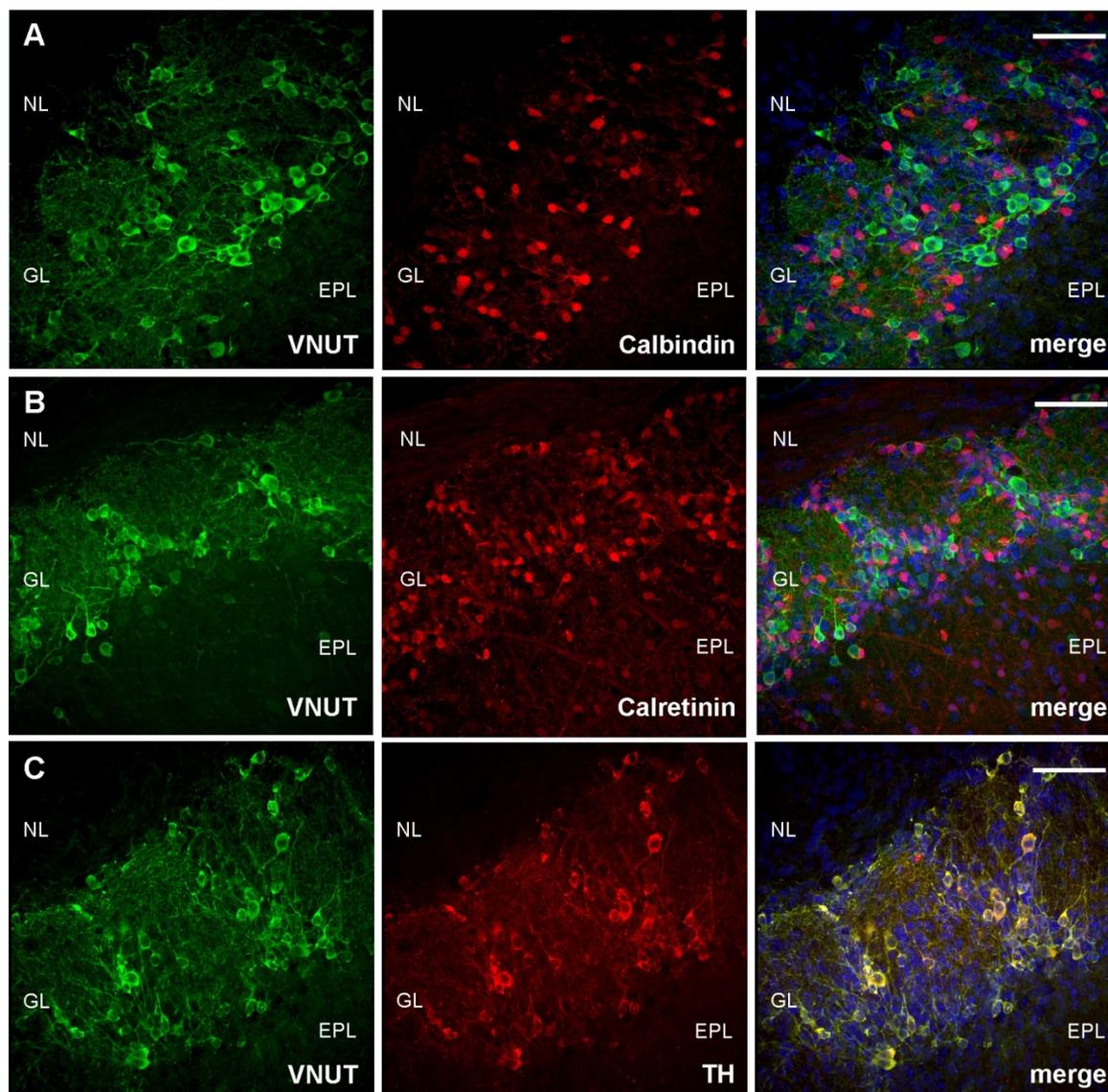
Abbildung 33 zeigt jeweils Fluoreszenzaufnahmen des gleichen Ausschnitts aus der Glomerularschicht des olfaktorischen *Bulbus* mit der anti-GCaMP6s-Färbung (rot, Abbildung 33A), der anti-GFAP/S100 $\beta$ -Färbung (blau, Abbildung 33B) sowie der anti-VNUT-Färbung (grün, Abbildung 33C). In den überlagerten Aufnahmen (*merge*, Abbildung 33D) ist zu sehen, dass VNUT und GCaMP6s zum Teil ko-lokalisiert sind. Eine Ko-Lokalisation von VNUT und GFAP/S100 $\beta$  ist hingegen nicht eindeutig zu erkennen. Es ist daher davon auszugehen, dass VNUT in Neuronen der Glomerularschicht exprimiert wird.



**Abbildung 33: VNUT wird in Neuronen der Glomerularschicht exprimiert.** Detailaufnahme der Glomerularschicht (GL) aus sagittalen Gewebeschnitten einer adulten Eno x GCaMP6s-Maus (P53). **A)** GCaMP6s-Immunmarkierung unter dem neuronenspezifischen Eno-Promotor. **B)** Immunhistochemische Färbung gegen die astrozytären Proteine S100 $\beta$  und GFAP. **C)** Immunhistochemische Färbung gegen VNUT. **D)** Die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen aus A, B und C zeigt in einigen Zellen (gelb, Pfeile) eine Ko-Lokalisation von GCaMP6s-markierten neuronalen Strukturen (rot) und VNUT (grün). Eine Ko-Lokalisation von VNUT und astrozytären Strukturen (blau) ist hingegen nicht erkennbar. NL, Nervenfaserschicht; EPL, externe plexiforme Schicht. Maßstab: 70  $\mu$ m.

### 3.1.10.1 Charakterisierung VNUT-immunreaktiver Zellen

Neurone in der Glomerularschicht sind morphologisch sehr heterogen und werden grundsätzlich in PG-Zellen, sSA-Zellen und eTC eingeteilt (Pinching und Powell, 1971). eTC sind anhand ihrer Morphologie eindeutig von PG- und sSA-Zellen unterscheidbar, doch gerade die Subpopulationen der PG-Zellen sind anhand morphologischer Merkmale nur schwer spezifizierbar. Anhand der molekularen Diversität von PG-Zellen lassen sich jedoch Einordnungen in verschiedene Subpopulationen vornehmen. Zu den am besten charakterisierten Proteinen gehören dabei die Expression der TH als Schlüsselenzym der Dopaminsynthese, sowie der Calcium-bindenden Proteine Calbindin und Calretinin. Jeder dieser molekularen Marker entspricht dabei einem spezifischen Subtyp von PG-Zellen (Nagayama *et al.*, 2014). Um also eine Einordnung VNUT-immunreaktiver Zellen zu den verschiedenen Neuronentypen der Glomerularschicht vornehmen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen gegen die oben genannten Proteine in Kombination mit VNUT durchgeführt. Die Färbungen wurden in Präparaten von C57BL/6-Mäusen angefertigt (P26). Abbildung 34A und B und C zeigen im grünen Kanal jeweils die Immunmarkierungen gegen VNUT und in den übereinander gelagerten Fluoreszenzaufnahmen (*merge*) in blau zusätzlich eine Zellkernfärbung mittels Hoechst33342. Die Immunmarkierungen der molekularen Marker sind jeweils im roten Kanal dargestellt. Abbildung 34A und B zeigen im grünen und im roten Kanal unterschiedliche Detektionsmuster der Antikörper, sodass in den überlagerten Aufnahmen keine Ko-Lokalisation von Calbindin bzw. Calretinin mit VNUT zu sehen ist. Anhand der gelben Strukturen aus den übereinander gelagerten Fluoreszenzaufnahmen aus Abbildung 34C wird deutlich, dass VNUT-immunreaktive Zellen ebenso positiv für die Expression der TH sind. Dies impliziert, dass die VNUT-positiven Neurone zur Subpopulation der TH-positiven und damit zu den dopaminergen PG-Zellen zählen.



**Abbildung 34: Molekulare Eigenschaften VNUT-immunreaktiver juxtaglomerulärer Zellen.** Detailaufnahme der Glomerularschicht (GL) aus sagittalen Gewebeschnitten einer adulten C57BL/6-Maus (P26). **A)** Immunhistochemische Färbung gegen VNUT (links, grün) und Calbindin (Mitte, rot). Die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen (*merge*, rechts) zeigt, dass VNUT und Calbindin nicht ko-lokalisiert sind. Maßstab: 60  $\mu$ m. **B)** Immunhistochemische Färbung gegen VNUT (links, grün) und Calretinin (Mitte, rot). Die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen (*merge*, rechts) zeigt, dass VNUT und Calretinin nicht ko-lokalisiert sind. Maßstab: 60  $\mu$ m. **C)** Immunhistochemische Färbung gegen VNUT (links, grün) und Tyrosin-Hydroxylase (TH, Mitte, rot). Die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen (*merge*, rechts) zeigt eine Ko-Lokalisation von VNUT und TH (gelbe Strukturen). Maßstab: 60  $\mu$ m. In den übereinander gelagerten Aufnahmen aus A, B und C ist in blau zusätzlich eine Zellkernfärbung (Hoechst33342) dargestellt. NL, Nervenfaserschicht; EPL, externe plexiforme Schicht.

Alle immunhistochemischen Färbungen aus Abschnitt 3.1.10 wurden in Zusammenarbeit mit Frau Anne Catrin Rakete angefertigt.

### 3.2 ADENOSIN ALS MODULATOR SYNAPTISCHER TRANSMISSION IM *BULBUS OLFACTORIUS*

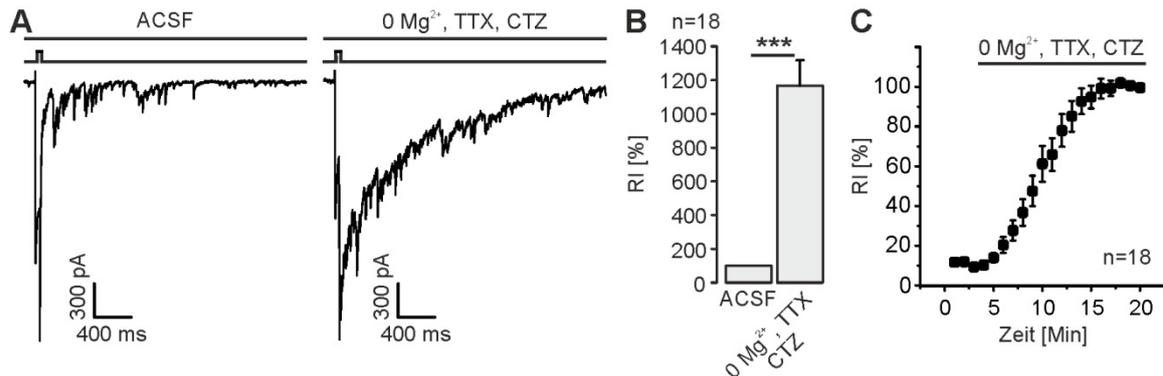
Im olfaktorischen *Bulbus* wird ATP offenbar sowohl bei evozierter Aktivität als auch tonisch freigesetzt. Da die Aktivität ATP-abbauender Enzyme im *Bulbus olfactorius* außergewöhnlich hoch ist (Langer *et al.*, 2008), hat vermutlich auch das ATP-Abbauprodukt Adenosin eine Wirkung auf die neuronale Aktivität. Typisch für den *Bulbus olfactorius* sind sog. dendrodendritische synaptische Strukturen, die eine reziproke synaptische Übertragung vermitteln. Bei reziproken Synapsen handelt es sich um zwei eng benachbarte Synapsen, bei denen jeweils die präsynaptische Seite der einen direkt neben der postsynaptischen Seite der anderen Synapse auf gegenüberliegenden Dendriten lokalisiert ist (s. Abbildung 2C). Im *Bulbus olfactorius* bildet die reziproke Übertragung an dendrodendritischen Synapsen die Basis der sog. rekurrenten Inhibition (RI) von Mitralzellen. Hierbei führt die Exzitation von Interneuronen in Folge der Freisetzung von Glutamat aus der Mitralzelle zur Ausschüttung von GABA, welches die Mitralzelle rückwirkend inhibiert (Nowycky *et al.*, 1981; Jahr und Nicoll, 1982; Isaacson und Strowbridge, 1998; Egger und Urban, 2006). Reziproke Synapsen finden sich auch in anderen Hirngebieten, im *Bulbus olfactorius* ist deren Vorkommen im Vergleich zu konventionellen Synapsen allerdings bemerkenswert hoch (Dowling, 1968; Cheramy *et al.*, 1981; Ludwig und Pittman, 2003; Urban und Castro, 2010; Crespo *et al.*, 2013). Der Einfluss von Adenosin auf synaptische Übertragung wurde bisher überwiegend an herkömmlichen, unidirektionalen Synapsen untersucht (Dittman und Regehr, 1996; Zhang und Linden, 2009; Rombo *et al.*, 2015). Im *Bulbus olfactorius* wird die axo-dendritische Synapse zwischen ORN und Mitralzellen jedoch nicht durch Adenosin beeinflusst (Rotermund *et al.*, 2017). In meiner Masterarbeit (Schulz, 2014) konnte ich allerdings eine Adenosin-vermittelte Inhibition der RI von Mitralzellen zeigen, was auf eine Modulation reziproker Synapsen hindeutet. Ziel des folgenden Teils war die Untersuchung der Mechanismen, die zur adenosinergen Modulation der RI in Mitralzellen führen.

#### 3.2.1 Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptoren vermitteln eine Reduktion der rekurrenten Inhibition in Mitralzellen

Die folgenden Experimente wurden entsprechend der in meiner Masterarbeit (Schulz, 2014) etablierten Messmethode durchgeführt, die zunächst kurz erläutert wird: der Kreislauf der RI kann künstlich durch die Depolarisation des exzitatorischen Neurons evoziert werden (Isaacson und Strowbridge, 1998; Schoppa *et al.*, 1998). Um also eine RI auszulösen, wurden Mitralzellen in der Ganzzellkonfiguration abgeleitet, in der Spannungsklemme bei -70 mV gehalten und im Abstand von einer Minute wiederholt ein kurzer (50 ms), depolarisierender Spannungssprung auf 0 mV appliziert. Als Antwort auf diesen Spannungssprung wurde unter physiologischen Bedingungen (ACSF) ein großer, schneller

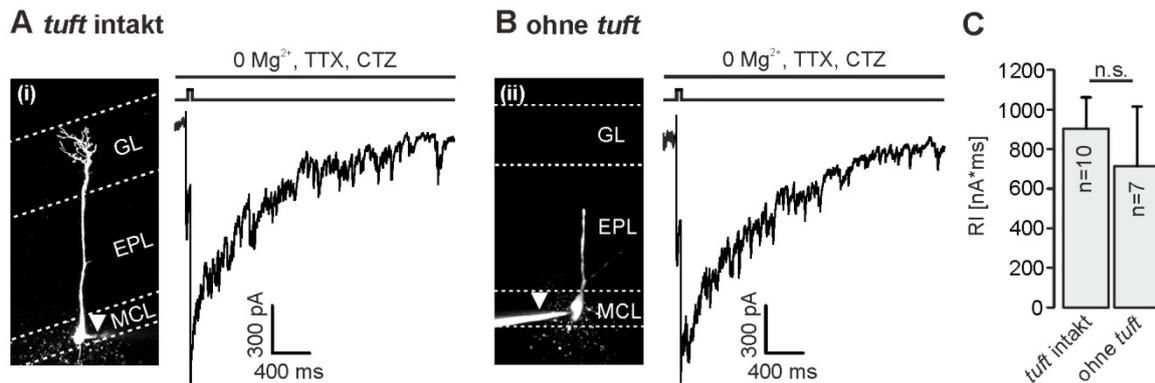
Einstrom ausgelöst, dem eine Reihe vieler einzelner GABAerger, inhibitorischer postsynaptischer Ströme folgten. Aufgrund der hohen Chloridkonzentration (das Chloridumkehrpotential lag bei ca. 3 mV) der verwendeten Cäsium-basierten Intrazellulärlösung wurden GABAerge Einstrome bei einem Haltepotential von -70 mV als Einstrome sichtbar. Diese summierten sich zu einem großen, postsynaptischen Einstrom auf, der die RI der Mitralzelle widerspiegelt (Abbildung 35A).

Um spannungsabhängige Natriumkanäle zu inhibieren und Aktionspotentiale zu unterbinden, die die Aufnahme der RI stören könnten, erfolgten die folgenden Messungen in Anwesenheit von TTX (1  $\mu$ M). Um auch kleine modulatorische Effekte von Adenosin auflösen zu können, wurde außerdem der Kreislauf der synaptischen Übertragung mit dem Ziel der Verstärkung der RI pharmakologisch manipuliert. Hierbei wird eine Extrazellulärlösung ohne Zusatz von Magnesiumionen (0  $Mg^{2+}$ ) verwendet sowie Cyclothiazid (CTZ, 200  $\mu$ M) appliziert. Dadurch wird zum einen die spannungsabhängige Inhibition von NMDA-Rezeptoren durch  $Mg^{2+}$  (Nowak *et al.*, 1984) und zum anderen die schnelle Desensitisierung von AMPA-Rezeptoren (Fucile *et al.*, 2006) verhindert und somit die glutamaterge Komponente der synaptischen Übertragung verstärkt. Wie in Abbildung 35A zu sehen führte dies zu einer Potenzierung der postsynaptischen rekurrenten Ströme. Als Maß für die RI der Mitralzelle diente das Integral des postsynaptischen Stroms. Das RI-Integral vergrößerte sich nach Einwaschen von 0  $Mg^{2+}$ , CTZ und TTX allmählich von  $-204 \pm 40$  nA\*ms bis es nach ca. 15 Minuten ein Plateau erreichte und im Mittel  $-1774 \pm 204$  nA\*ms groß war ( $n=18$ ,  $p<0,005$ ; Abbildung 35B und C). Damit ist von einer erheblichen Aktivität GABAerger Interneurone auszugehen, die über reziproke Synapsen mit der abgeleiteten Mitralzelle verbunden sind.



**Abbildung 35: Rekurrente Inhibition in Mitralzellen.** **A)** Versuchsbedingungen zur Ableitung der RI in Mitralzellen. Links: Eine RI wurde durch einen depolarisierenden Spannungssprung (50 ms) ausgelöst (Kurve über der Messspur). Rechts: In einer Mg<sup>2+</sup>-freien Extrazellulärlösung (0 Mg<sup>2+</sup>) mit Zusatz von TTX (1 μM) und Cyclothiazid (CTZ, 200 μM) waren die rekurrenten postsynaptischen Ströme im Vergleich zur Kontrolle wesentlich größer. **B)** Die RI in normaler Extrazellulärlösung im Vergleich zur 0 Mg<sup>2+</sup>-Lösung, CTZ und TTX, quantifiziert über das Integral der Stromspur nach dem Spannungssprung. **C)** Vergrößerung der RI durch Einwaschen von TTX und CTZ in 0 Mg<sup>2+</sup>-Lösung im Zeitverlauf der Messung.

In meiner Masterarbeit (Schulz, 2014) konnte ich eine adenosinerge Reduzierung der RI von Mitralzellen zeigen. Im Rahmen dieser Dissertation sollte neben den grundlegenden Mechanismen dieser Modulation auch der Einfluss von Adenosin auf synaptische Kreisläufe mit verschiedenen auf die Mitralzelle konvergierenden Typen von Interneuronen untersucht werden. So formen Mitralzellen sowohl mit Interneuronen aus der externen plexiformen Schicht als auch mit PG-Zellen reziproke Synapsen (Toida, 2008). Um den Anteil an RI abschätzen zu können, der über den *tuft* miteingebracht wird, wurde die RI von Mitralzellen mit intakten apikalen Dendriten und solche, deren *tuft* durch die Herstellung der Hirnschnitte abgeschnitten war, verglichen. Die Zellmorphologie wurde abermals mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Alexa 594, 10 μM) in der Intrazellulärlösung sichtbar gemacht (Abbildung 36A und B). Mitralzellen mit intaktem *tuft* hatten tendenziell eine größere RI (904 ± 180 nA\*ms, n=10, Abbildung 36A) als Zellen ohne *tuft* (714 ± 302 nA\*ms, n=7, Abbildung 36B). Da der Unterschied aber nicht signifikant war, ist davon auszugehen, dass die Beteiligung von PG-Zellen an der RI eher gering ist (p=0,57, Abbildung 36C).



**Abbildung 36: Einfluss eines intakten tufts auf die Größe der rekurrenten Inhibition von Mitralzellen.** **A)** RI in einer Mitralzelle mit intaktem tuft (i). **B)** RI einer Mitralzelle ohne tuft (ii). Die Pfeilspitze aus (i) und (ii) verweist auf die mit Alexa 594 (10  $\mu$ M) gefüllte patch-Pipette. MCL, Mitralzellschicht; EPL, externe plexiforme Schicht; GL, Glomerularschicht. **C)** Die RI in Mitralzellen mit intakten tuft unterscheidet sich nicht signifikant von der RI in Zellen ohne tuft.

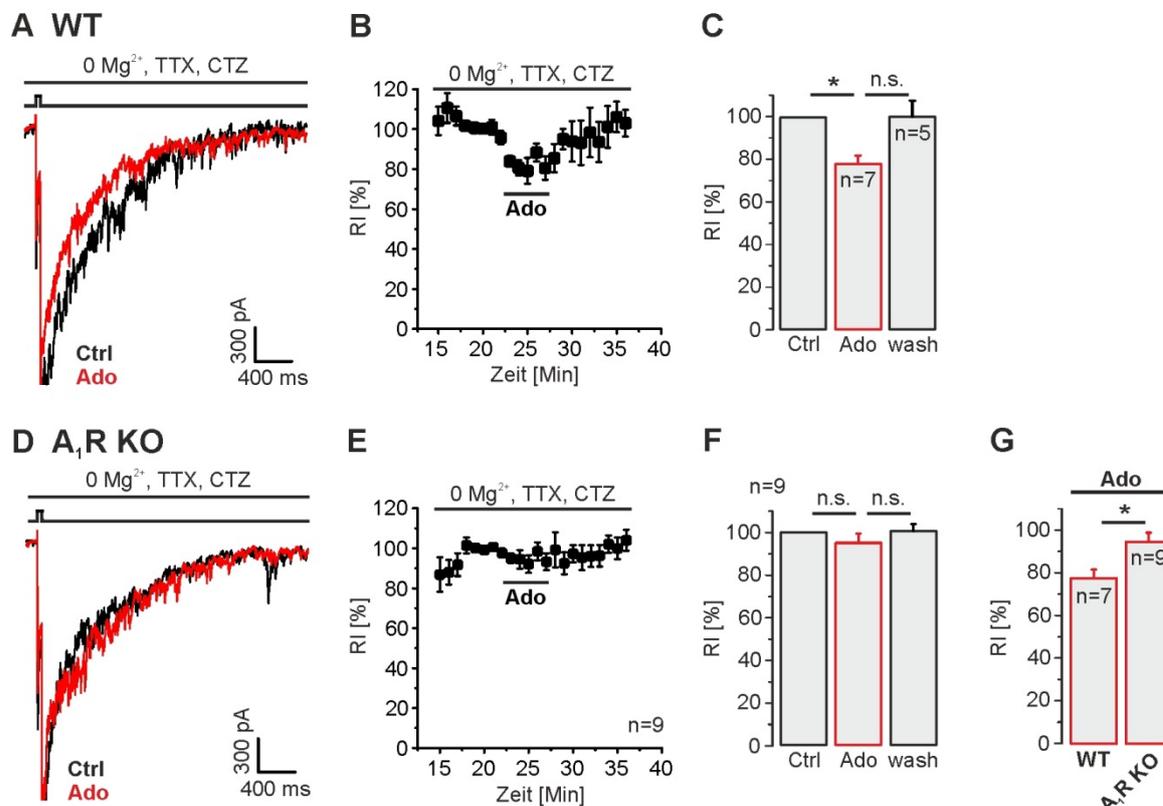
Welcher Adenosinrezeptor an der Modulation der RI durch Adenosin beteiligt ist, wurde bisher noch nicht untersucht. In anderen Hirngebieten ist eine Inhibition synaptischer Aktivität durch Adenosin häufig  $A_1$ -Rezeptor-vermittelt (Mogul *et al.*, 1993; Yawo und Chuhma, 1993). Daher wurde der Effekt von Adenosin auf die RI von Mitralzellen in  $A_1$ -Rezeptor-*knock out*-Mäusen ( $A_1R$  KO) untersucht und die Ergebnisse mit der Wirkung von Adenosin in den entsprechenden Wildtyp-Wurfgeschwistern (WT) verglichen.

In beiden Versuchsgruppen wurde Adenosin (100  $\mu$ M) unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen über das Perfusionssystem appliziert. Als Kontrollwert wurde jeweils der Mittelwert aus drei RI-Integralen nach Eintreten der maximalen Wirkung von 0  $Mg^{2+}$ , CTZ und TTX vor der Applikation von Adenosin gebildet. Das RI-Integral in WT-Mäusen war unter Kontrollbedingungen  $-2411 \pm 772$  nA\*ms groß (n=7, Abbildung 37A) und unterschied sich damit nicht signifikant von der RI unter Kontrollbedingungen in  $A_1R$  KO-Mäusen ( $-1380 \pm 215$  nA\*ms, n=9,  $p > 0,05$ , Abbildung 37D).

In WT-Mäusen bewirkte die Badapplikation von 100  $\mu$ M Adenosin eine signifikante Reduktion des RI-Integrals auf  $-1816 \pm 535$  nA\*ms (n=7,  $p < 0,05$ ). Zehn Minuten nach Applikation von Adenosin vergrößerte sich das RI-Integral nicht signifikant, aber mit einem deutlichen Trend wieder auf  $-2214 \pm 773$  (n=5,  $p = 0,0625$ , Abbildung 37B und C).

In  $A_1R$  KO-Mäusen bewirkte die Badapplikation von 100  $\mu$ M Adenosin jedoch keine signifikante Reduktion des RI-Integrals ( $-1279 \pm 178$  nA\*ms; n=9,  $p > 0,05$ , Abbildung 37D bis F). Auch zehn Minuten nach Applikation von Adenosin blieb das RI-Integral mit einer Größe von  $-1338 \pm 195$  nA\*ms auf einem ähnlichen Niveau. Zusammenfassend bewirkte Adenosin in WT-Mäusen eine Inhibition des RI-Integrals um  $22 \pm 4$  %, was sich signifikant von der Wirkung von Adenosin in  $A_1R$  KO-Mäusen unterschied ( $p < 0,05$ , Abbildung 37G). Damit wird

impliziert, dass die adenosinerge Modulation der RI in Mitralzellen über A<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt wird.



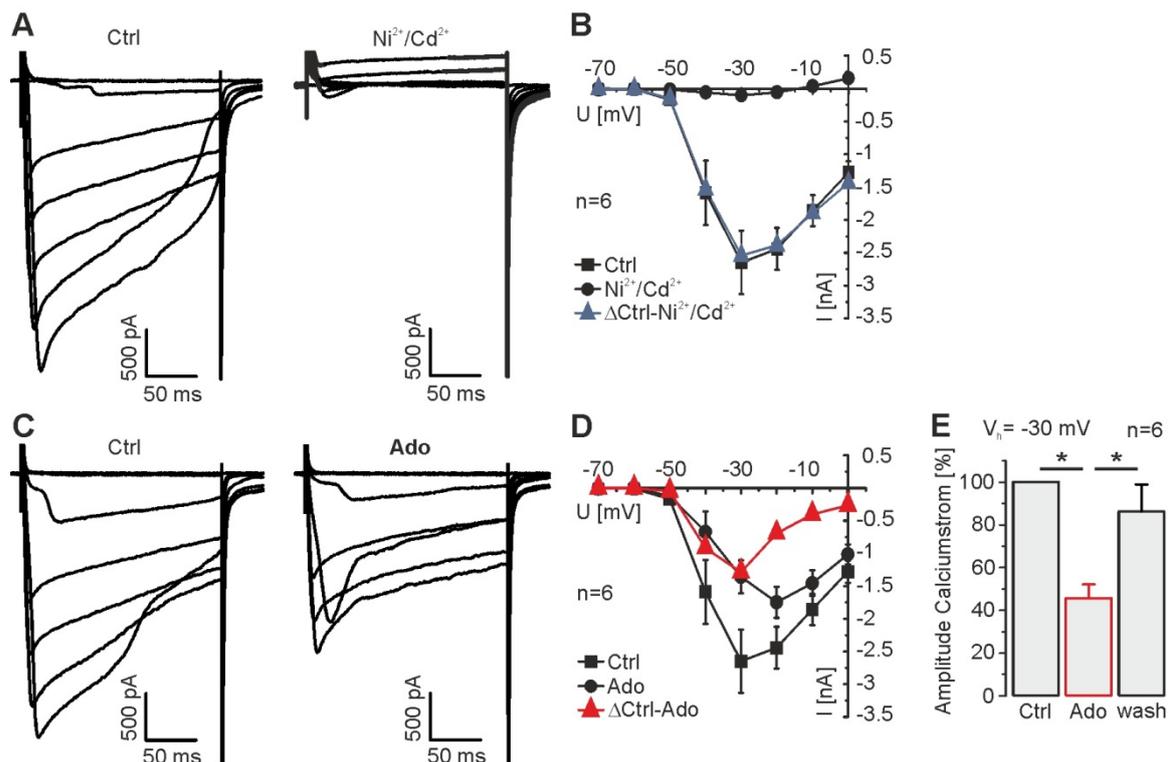
**Abbildung 37: Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptoren verringern die rekurrente Inhibition in Mitralzellen.** **A)** RI in Wildtyp-Mäusen (WT) unter Kontrollbedingungen (schwarze Kurve) und unter Badapplikation von Adenosin (100 μM, rote Kurve). **B)** Darstellung der Adenosin-induzierten Abnahme der RI im zeitlichen Verlauf der Messung in WT-Mäusen. **C)** Adenosin verringerte die RI in WT-Mäusen signifikant. **D)** RI in A<sub>1</sub>-Rezeptor-*knock out*-Mäusen (A<sub>1</sub>R KO) unter Kontrollbedingungen (schwarze Kurve) und unter Badapplikation von Adenosin (100 μM, rote Kurve). **E)** Die RI im zeitlichen Verlauf der Messung in A<sub>1</sub>R KO-Mäusen. **F)** In A<sub>1</sub>R KO-Mäusen hatte Adenosin keinen signifikanten Einfluss auf die Größe der RI. **G)** Die Wirkung von Adenosin unterschied sich in WT-Mäusen und in A<sub>1</sub>R-KO Mäusen signifikant.

### 3.2.2 Adenosin moduliert Calciumströme in Mitralzellen

Die RI von Mitralzellen wird durch die Aktivität GABAerger Interneurone an reziproken Synapsen vermittelt. Eine Verminderung der RI kann also entweder durch eine Modulation der Präsynapse, also der Transmitterfreisetzung aus der Mitralzelle bzw. aus Interneuronen, oder durch veränderte Rezeptoreigenschaften an der jeweiligen Postsynapse bedingt sein. Tatsächlich konnte ich in meiner Masterarbeit (Schulz, 2014) über die Bestimmung der Autoexzitation von Mitralzellen (Isaacson, 1999; Friedman und Strowbridge, 2000; Salin *et al.*, 2001) eine adenosinerge Reduktion der Glutamatfreisetzung aus Mitralzellen

nachweisen, was auf eine maßgebliche Beeinflussung der präsynaptischen Funktion der Mitralzelle hinweist. Da die vesikuläre Freisetzung von Neurotransmittern über den präsynaptischen Calciumeinstrom gesteuert wird, ist eine Interaktion des A<sub>1</sub>-Rezeptors mit spannungsaktivierten Calciumkanälen wahrscheinlich. Um eine mögliche Inhibition spannungsaktivierter Calciumkanäle durch Adenosin zu testen, wurden Spannungssprünge in Schritten von 10 mV von -70 mV auf 0 mV für 200 ms appliziert und so spannungssensitive Calciumströme in Mitralzellen evoziert. Unter Kontrollbedingungen wurden die Messungen in 0 Mg<sup>2+</sup> und synaptischer Isolation durch TTX, Gabazin, DAPV und NBQX durchgeführt. Spannungsabhängige Kaliumströme wurden durch den Austausch von K<sup>+</sup> durch Cs<sup>+</sup> sowie TEA/4-AP in der für diese Versuche verwendeten Intrazellulärlösung weitestgehend blockiert. Es ist also davon auszugehen, dass es sich bei den evozierten Strömen um isolierte Calciumströme handelt. Der Serienwiderstand betrug zwischen 6 bis 18 MΩ, wodurch es vermutlich zu *space clamp*-Problemen kam. Dadurch sind einige der Calciumströme in der späteren Phase deformiert; die Amplitude der Ströme schien hiervon jedoch weniger betroffen zu sein und wurde deshalb zur Analyse herangezogen.

Die evozierten Calciumströme aktivierten bei -50 mV, waren bei -30 mV am größten (-2,65 ± 0,48 nA, n=6) und konnten durch Ni<sup>2+</sup> und Cd<sup>2+</sup> nahezu vollständig blockiert werden (Spannungssprung auf -30 mV: -0,10 ± 0,05 nA; Abbildung 38A und B). Unter Einfluss von Adenosin (100 μM) verringerten sich die Calciumströme (Abbildung 38C). Die Strom-Spannungskennlinie des Adenosin-sensitiven Calciumstroms zeigt eine Aktivierung bei -40 mV und den größten Einfluss von Adenosin bei einem Spannungssprung auf -30 mV (Abbildung 38D), bei dem der Strom reversibel auf 46,1 ± 6,4 % der Kontrolle verringert wurde (n=6, p<0,05, Abbildung 38E). Dies lässt vermuten, dass Adenosin vor allem sog. *high voltage activated calcium channels* (HVACC) moduliert, also Calciumkanäle die erst bei relativ großen depolarisierenden Spannungsänderungen aktivieren.

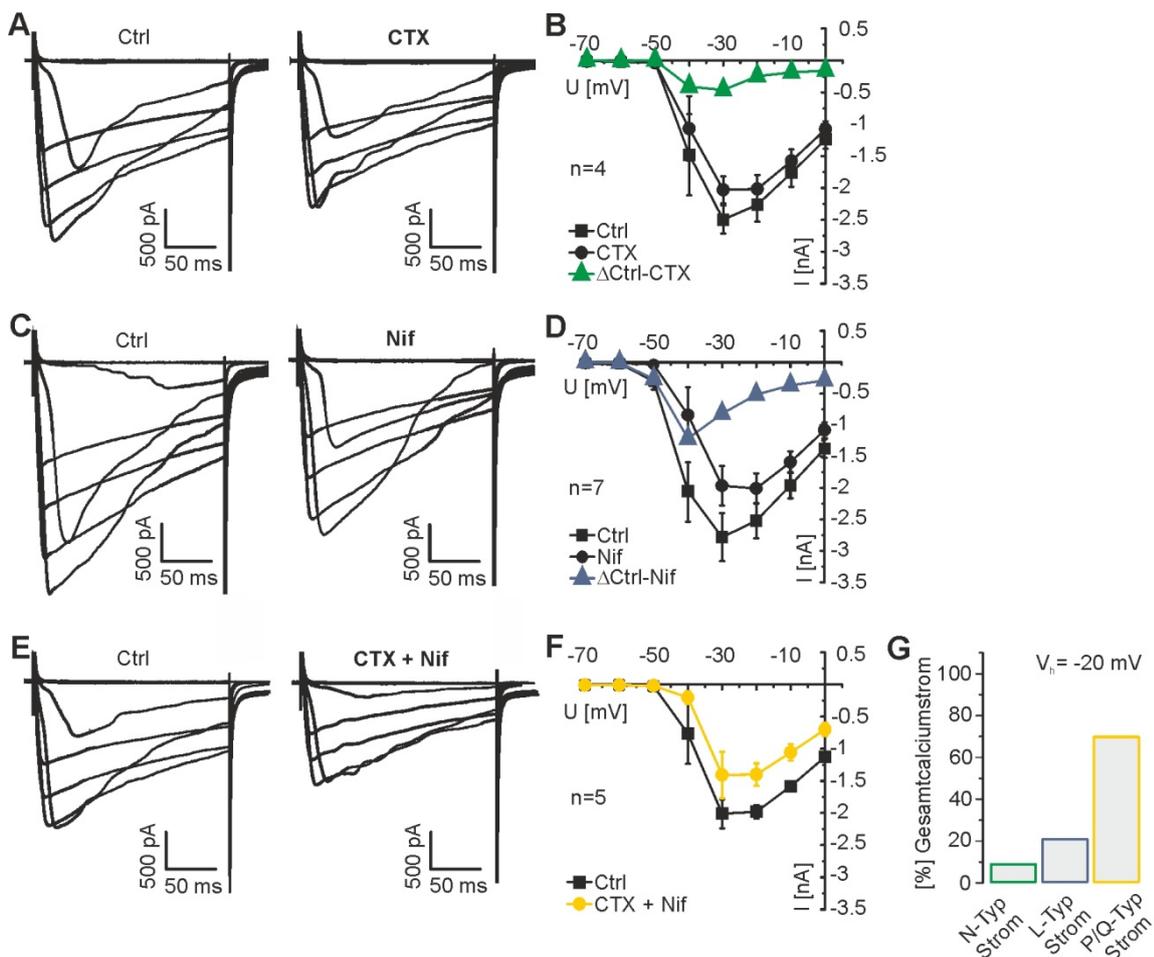


**Abbildung 38: Untersuchung des Einflusses von Adenosin auf Calciumströme in Mitralzellen.** **A)** Calciumströme in Mitralzellen wurden mithilfe eines Spannungssprungprotokolls von -70 mV auf 0 mV in Schritten von 10 mV für 200 ms ausgelöst und sind durch Ni<sup>2+</sup> (200 μM)/Cd<sup>2+</sup> (200 μM) blockierbar. **B)** Strom-Spannungskennlinie der Calciumströme ohne (Quadrate) und mit Ni<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup> (Kreise). ΔCtrl-Ni<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup> (blaue Dreiecke) repräsentiert die Strom-Spannungskennlinie des durch Ni<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup> blockierten Stroms. **C)** Calciumströme in Mitralzellen unter Kontrollbedingungen (links) und unter dem Einfluss von Adenosin (100 μM, rechts). **D)** Strom-Spannungskennlinie der Calciumströme ohne (Quadrate) und mit Adenosin (Kreise). ΔCtrl-Ado (rote Dreiecke) repräsentiert die Strom-Spannungskennlinie des Adenosin-sensitiven Stroms. **E)** Calciumströme ausgelöst durch einen Spannungssprung auf -30 mV werden durch Adenosin signifikant und reversibel reduziert.

Zu den HVACCs zählen die Subtypen L-, N- und P/Q-Typ-Calciumkanäle (Dunlap *et al.*, 1995). Um zu untersuchen, zu welchen Anteilen der Gesamtcalciumstrom einer Mitralzelle aus Strömen dieser drei Subkanaltypen zusammengesetzt ist, wurden verschiedene Antagonisten für die unterschiedlichen Subtypen der Calciumkanalfamilien eingesetzt.

Conotoxin GVIA (CTX, 100 nM) blockiert N-Typ-Calciumkanäle und führte im Vergleich zu Kontrollbedingungen zu einer Reduktion der Calciumstromamplitude (Abbildung 39A). CTX-sensitive Calciumströme aktivierten bei -40 mV und waren zwischen -40 mV und -30 mV am größten (n=4, Abbildung 39B). Auch durch den L-Typ-Calciumkanalblocker Nifedipine (Nif, 10 μM) wurde die Amplitude der Calciumströme kleiner (Abbildung 39C). Nifedipin-sensitive Ströme aktivierten bei -50 mV und waren bei -40 mV am größten (n=7, Abbildung 39D). Durch die Kombination aus CTX und Nifedipin, also durch die Inhibition von N- und L-Typ-

Calciumkanälen, konnten P/Q-Ströme isoliert werden (Abbildung 39E). Die unter der Kombination von CTX und Nifedipin verbliebenen Ströme aktivierten bei -40 mV und waren zwischen -30 mV und -20 mV am größten (n=4, Abbildung 39F). Der relative Anteil der HVACC-Kanalsubtypen am Gesamtcalciumstrom wurde bei einem Spannungssprung auf -20 mV kalkuliert, da der Calciumstrom hier am größten war. Dies ergab einen Anteil von jeweils 9 % N-Typ-Strom, 21 % L-Typ-Strom und 70 % PQ-Typ-Strom am Gesamtcalciumstrom in Mitralzellen (Abbildung 39G).

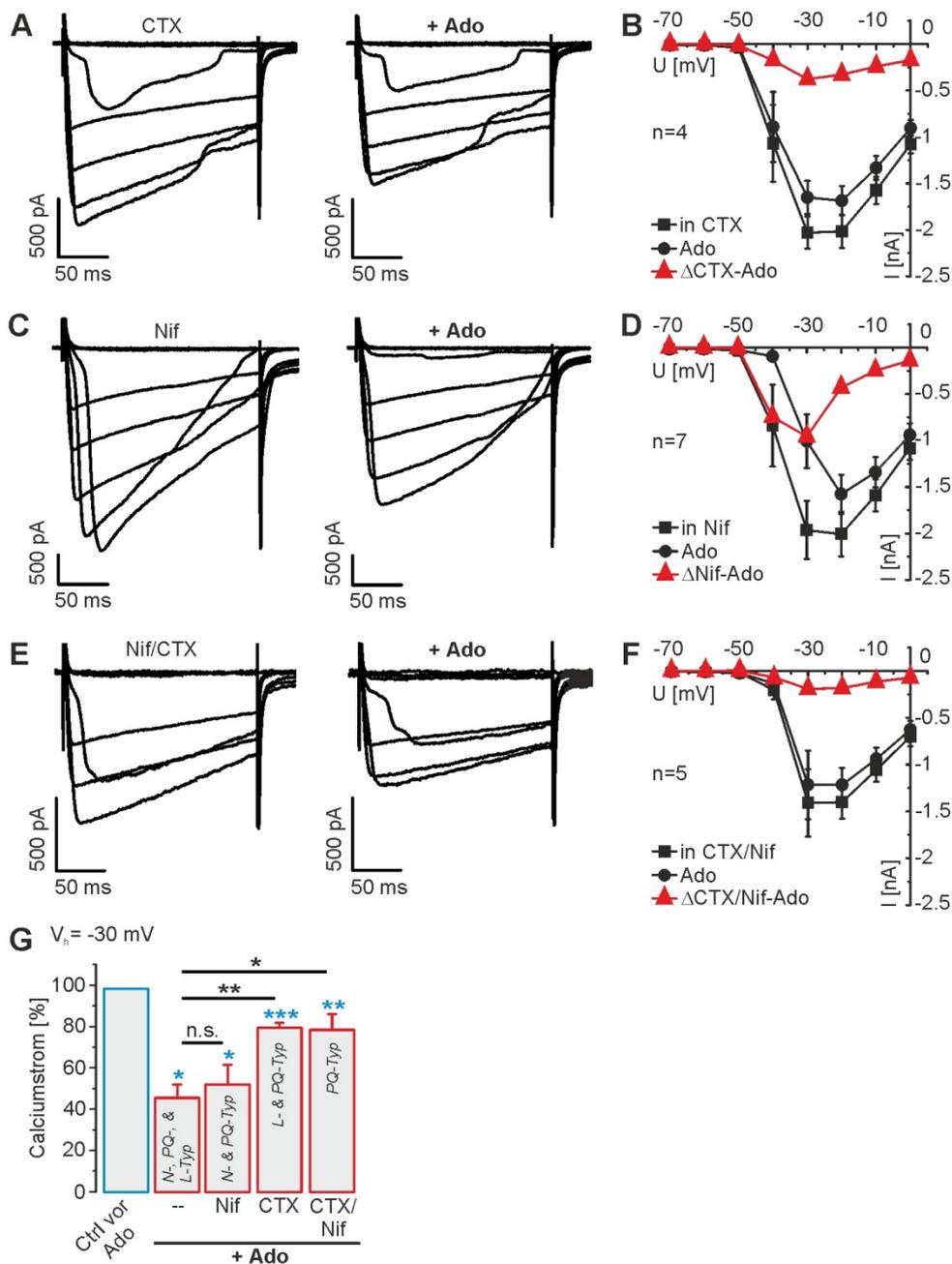


**Abbildung 39: Zusammensetzung der Calciumströme in Mitralzellen.** **A)** Calciumströme in Mitralzellen unter Kontrollbedingungen (links) und dem Einfluss von Conotoxin GVIA (CTX, 100 nM; rechts). **B)** Strom-Spannungskennlinie der Calciumströme ohne (Quadrat) und mit CTX (Kreise).  $\Delta$ Ctrl-CTX (grüne Dreiecke) repräsentiert die Strom-Spannungskennlinie des CTX-sensitiven Stroms (N-Typ Strom). **C)** Calciumströme in Mitralzellen unter Kontrollbedingungen (links) und dem Einfluss von Nifedipin (Nif, 10  $\mu$ M; rechts). **D)** Strom-Spannungskennlinien der Calciumströme ohne (Quadrat), mit Nifedipin (Kreise) und des Nifedipin-sensitiven Stroms (L-Typ Strom) als  $\Delta$ Ctrl-Nif (blaue Dreiecke). **E)** Im Vergleich zu Kontrollbedingungen (links) isoliert die Kombination aus CTX und Nifedipin die Calciumströme vom PQ-Typ (rechts). **F)** Strom-Spannungskennlinie des isolierten P/Q-Typ Stroms (gelbe Kreise). **G)** Prozentuale Anteile der verschiedenen Calciumstromsubtypen am Gesamtcalciumstrom in Mitralzellen bei einem Spannungssprung von -70 auf -20 mV.

Um zu bestimmen, welcher HVACC-Kanalsubtyp bevorzugt von Adenosin moduliert wird, wurde Adenosin in Anwesenheit der jeweils oben beschriebenen Antagonisten appliziert.

In Anwesenheit von CTX, Nifedipin sowie der Kombination aus Nifedipin und CTX reduzierte Adenosin die Amplitude der Calciumströme (Abbildung 40A, C und E). Die rote Linie in Abbildung 40B, D und F repräsentiert die Strom-Spannungskennlinie des Adenosin-sensitiven Stroms unter den jeweiligen Bedingungen.

Wie bei der Quantifizierung des adenosinergen Effekts auf den Gesamtcalciumstrom (vgl. Abbildung 38E) wurden die Calciumstromamplituden zur genaueren Analyse auch hier bei einem Haltepotential von -30 mV ausgewertet und der Effekt von Adenosin quantifiziert (Abbildung 40G). In Anwesenheit von CTX wurde die Amplitude der verbliebenen Calciumströme (L- und PQ-Typ) unter Adenosin auf  $80,7 \pm 2,5$  % der Kontrolle ( $n=4$ ,  $p<0,005$ ) reduziert. Verglichen mit dem Effekt von Adenosin auf den Gesamtcalciumstrom (ca. 47 %, vgl. Abbildung 38E) war der Effekt von Adenosin auf den Calciumstrom in Anwesenheit von CTX signifikant geringer ( $p<0,01$ ). Dies weist darauf hin, dass N-Ströme einen Teil des Adenosin-inhibierten Calciumstroms tragen. Bei Kombination von CTX und Nifedipin bewirkte Adenosin eine ähnliche Reduktion der Amplitude des verbliebenen P/Q-Stroms und verringerte diese auf  $79,7 \pm 7,8$  % der Kontrolle ( $n=5$ ,  $p<0,01$ ). Auch hier war die Reduktion des Calciumstroms signifikant geringer verglichen mit dem Effekt von Adenosin auf den Gesamtcalciumstrom ( $p<0,05$ ). Dies deutet darauf hin, dass auch PQ-Typ-Calciumkanäle von Adenosin moduliert werden. In Anwesenheit von Nifedipine alleine wurde die Amplitude der verbliebenen PQ- und N-Typ-Calciumströme durch Adenosin auf  $52,9 \pm 9,6$  % der Kontrolle reduziert ( $n=7$ ,  $p<0,05$ ). Adenosin hatte damit auf die verbliebenen P/Q- und N-Ströme keinen signifikant unterschiedlichen Effekt verglichen mit dem Effekt auf den Gesamtcalciumstrom ( $p=0,89$ ) und einen deutlich stärkeren Effekt als auf isolierte P/Q-Ströme alleine. Dies weist erneut darauf hin, dass neben PQ-Typ- auch N-Typ-Calciumkanäle moduliert werden.



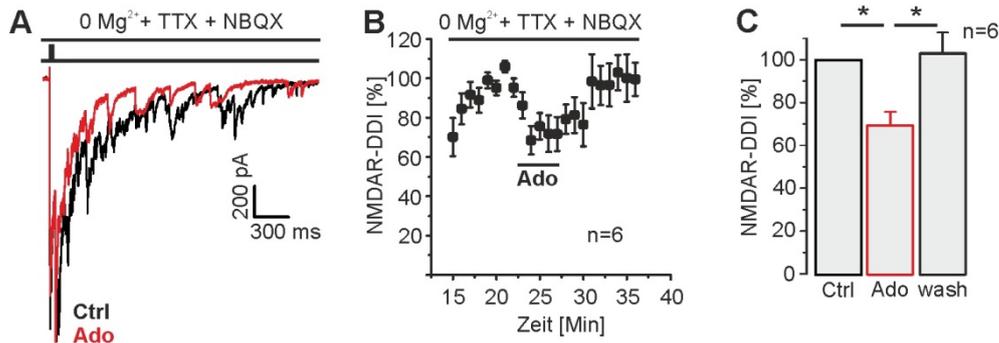
**Abbildung 40: Einfluss von Adenosin auf die verschiedenen Calciumstromsubtypen in Mitralzellen.** **A)** Calciumströme in Anwesenheit von CTX (100 nM, links) und zusätzlicher Applikation von Adenosin (100  $\mu$ M, rechts). **B)** Strom-Spannungskennlinie des Adenosin-sensitiven Stroms in Anwesenheit von CTX (rote Dreiecke). **C)** Calciumströme in Anwesenheit von Nifedipine (Nif, 10  $\mu$ M; links) und zusätzlicher Applikation von Adenosin (rechts). **D)** Strom-Spannungskennlinie des Adenosin-sensitiven Stroms in Anwesenheit von Nifedipine (rote Dreiecke). **E)** Durch CTX und Nifedipine isolierte P/Q-Typ-Calciumströme (links) unter Einfluss von Adenosin (rechts). **F)** Strom-Spannungskennlinie des Adenosin-sensitiven Stroms in Anwesenheit von CTX und Nifedipine (rote Dreiecke). **G)** Inhibition der Calciumströme im Vergleich zur Kontrolle gemessen bei Abwesenheit von Calciumkanalantagonisten (--) oder in Anwesenheit von Nifedipin, CTX oder einer Kombination aus CTX/Nifedipin. Als Bezugswert diente die jeweilige Stromamplitude bei einem Spannungssprung von -70 auf -30 mV. Blaue Asteriske geben das Signifikanzniveau zur jeweiligen Kontrolle vor Adenosin an.

### 3.2.3 Adenosin beeinflusst unterschiedliche Typen von reziproken Synapsen

Reziproke synaptische Verschaltungen im *Bulbus olfactorius* werden üblicherweise zwischen Mitral- und Körnerzellen beschrieben und untersucht. Typisch für die Transmission zwischen diesen beiden Zelltypen ist die NMDA-Rezeptor-vermittelte Exzitation der Körnerzellen (Isaacson und Strowbridge, 1998; Schoppa *et al.*, 1998). Erst seit einigen Jahren ist bekannt, dass ebenfalls reziproke Synapsen zwischen Mitralzellen und in der externen plexiformen Schicht lokalisierten Parvalbumin-Interneuronen maßgeblich zur RI in Mitralzellen und damit zur Verarbeitung der Geruchsinformation beitragen (Kato *et al.*, 2013; Miyamichi *et al.*, 2013). Hierbei wird die Exzitation der Parvalbumin-Interneurone nicht über NMDA-Rezeptoren vermittelt, sondern von calciumpermeablen AMPA-Rezeptoren bestimmt (Kato *et al.*, 2013). Im Folgenden wurde untersucht, ob Adenosin sowohl an der synaptischen Transmission zwischen Mitral- und Körnerzellen als auch zwischen Mitralzellen und Parvalbumin-Interneuronen modulatorisch wirkt. Die Versuchsbedingungen können dabei entsprechend der unterschiedlichen Eigenschaften der synaptischen Übertragung angepasst werden und beide reziproken Verbindungen somit getrennt voneinander analysiert werden.

#### 3.2.3.1 Einfluss von Adenosin auf die synaptische Transmission zwischen Mitral- und Körnerzellen

Um die synaptische Transmission zwischen Mitral- und Körnerzellen gezielt zu untersuchen, wurden die Messungen in  $Mg^{2+}$ -freier Extrazellulärlösung mit dem Zusatz von TTX und NBQX durchgeführt. Hierdurch wird einerseits die Inhibition von NMDA-Rezeptoren durch  $Mg^{2+}$  verhindert und somit die NMDA-Rezeptor-vermittelte RI durch Körnerzellen potenziert, andererseits ist die AMPA-Rezeptor-vermittelte Exzitation der Parvalbumin-Interneurone unterbunden. Eine Depolarisation der Mitralzelle führte zu einer NMDA-Rezeptor-vermittelten RI (NMDAR-RI), die unter Kontrollbedingungen  $-1325 \pm 362 \text{ nA} \cdot \text{ms}$  groß war und sich unter Adenosin reversibel um  $31 \pm 6 \%$  verringerte ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ; Abbildung 41A bis C). Dies deutet darauf hin, dass Adenosin die synaptische Transmission zwischen Mitral- und Körnerzellen moduliert.

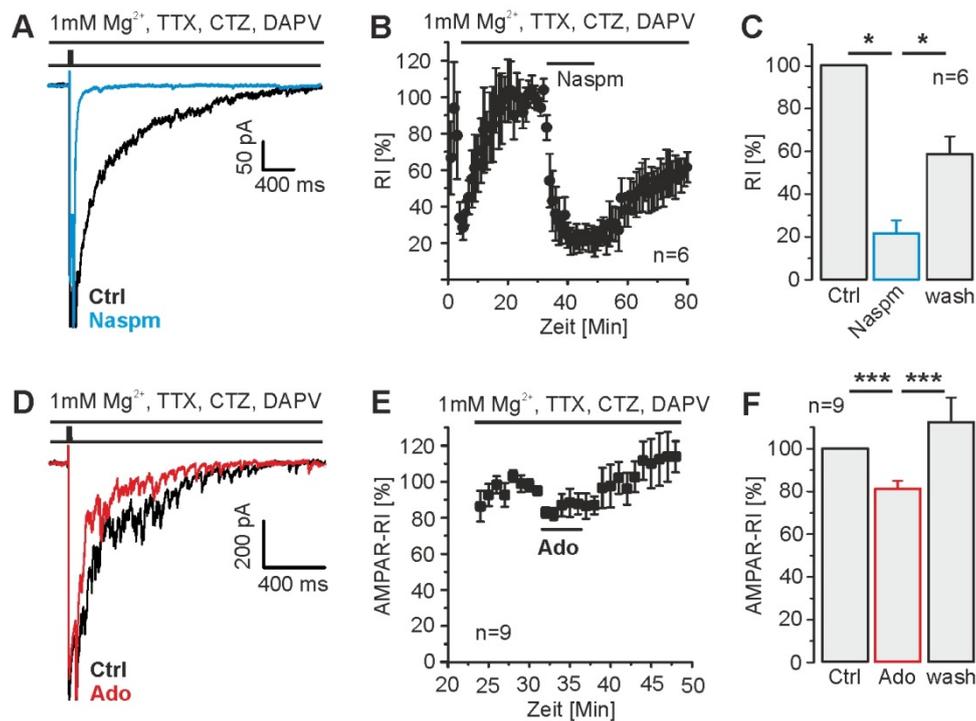


**Abbildung 41: Adenosin moduliert die synaptische Übertragung zwischen Mitral- und Körnerzellen. A)** Um eine für diese synaptische Übertragung von Mitralzelle und Körnerzelle typische, NMDA-Rezeptor-abhängige RI (NMDAR-RI) zu isolieren, wurde die Messung der RI in einer  $Mg^{2+}$ -freien Extrazellulärlösung mit Zusatz von TTX und NBQX durchgeführt (schwarze Kurve). Die rote Kurve zeigt die RI bei zusätzlicher Applikation von Adenosin ( $100 \mu M$ ). **B)** Abnahme der NMDAR-RI durch Adenosin im zeitlichen Verlauf der Messung. **C)** Adenosin verringerte die NMDAR-RI in Mitralzellen signifikant und reversibel.

### 3.2.3.2 Einfluss von Adenosin auf die synaptische Transmission zwischen Mitralzellen und Parvalbumin-Interneuronen

An den synaptischen Verbindungen zwischen Mitralzellen und Parvalbumin-Interneuronen wird der Calciuminflux zur Auslösung der GABA Freisetzung nicht über NMDA-Rezeptoren, sondern über calciumpermeable AMPA-Rezeptoren vermittelt (Kato *et al.*, 2013). Um eine AMPA-Rezeptor-vermittelte RI (AMPA-RI) zu isolieren, wurden die Messungen in einer Extrazellulärlösung mit dem Zusatz von  $1 \text{ mM } Mg^{2+}$ , TTX, CTZ und DAPV durchgeführt. Hierdurch wurden die NDMA-Rezeptoren durch Magnesiumionen sowie DAPV blockiert und damit die durch Körnerzellen vermittelte RI größtenteils unterbunden. AMPA-Rezeptor-vermittelte Ströme und die dadurch vermittelte RI durch Parvalbumin-Interneurone wurden hingegen durch die Unterbindung der schnellen Desensitisierung von AMPA-Rezeptoren mittels CTZ verstärkt (Fucile *et al.*, 2006). Die Depolarisation der Mitralzelle führte zu einer AMPAR-RI, welche durch NASPM ( $50 \mu M$ ) - einem spezifischen Blocker für calciumpermeable AMPA-Rezeptoren - zu  $79 \pm 6 \%$  im Vergleich zur Kontrolle ( $-246 \pm 65 \text{ nA}$ ,  $n=6$ ,  $p<0,05$ ) blockierbar war (Abbildung 42A bis C). Dies zeigt, dass eine unter diesen Bedingungen gemessene RI in Mitralzellen hauptsächlich durch calciumpermeable AMPA-Rezeptoren und damit von Parvalbumin-Interneuronen vermittelt wird.

In Anwesenheit von Adenosin wurde die AMPAR-RI auf  $81 \pm 4 \%$  der Kontrolle verringert ( $-304 \pm 58 \text{ nA} \cdot \text{ms}$ ,  $n=9$ ,  $p<0,005$ , Abbildung 42D bis F). Dies lässt vermuten, dass Adenosin neben der Körnerzellsynapse auch die synaptische Transmission zwischen Mitralzellen und Parvalbumin-Interneuronen beeinflusst.



**Abbildung 42: Adenosin moduliert die synaptische Übertragung zwischen Mitralzellen und Parvalbumin-Interneuronen.** **A)** Zur Messung der RI zwischen Mitralzellen und Parvalbumin-Interneuronen wurde einerseits 1 mM Mg<sup>2+</sup> sowie DAPV appliziert, um NMDA-Rezeptor-vermittelte RI zu unterdrücken, andererseits wurde CTZ (200 μM) hinzugefügt, um AMPA-Rezeptor-vermittelte RI zu potenzieren (AMPA-RI, schwarze Kurve). Die blaue Kurve zeigt eine unter diesen Bedingungen gemessene RI bei zusätzlicher Anwesenheit von NASPM (50 μM), einem Antagonisten für calciumpermeable AMPA-Rezeptoren. **B)** Einfluss von NASPM auf die RI im zeitlichen Verlauf der Messung. **C)** NASPM reduzierte die RI signifikant, was auf eine Vermittlung der RI durch calciumpermeable AMPA-Rezeptoren hinweist. Dies ist typisch für die synaptische Übertragung zwischen Mitralzellen und Parvalbumin-Interneuronen. **D)** Die AMPAR-RI unter Kontrollbedingungen (schwarze Kurve) sowie unter Einfluss von Adenosin (100 μM, rote Kurve). **E)** Abnahme der AMPAR-RI unter Adenosin im zeitlichen Verlauf der Messung. **F)** Adenosin verringerte die AMPAR-RI in Mitralzellen signifikant und reversibel.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 ATP ALS NEUROMODULATOR IM *BULBUS OLFACTORIUS*

#### 4.1.1 Die Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren erhöht die Netzwerkaktivität im *Bulbus olfactorius*

Trotz dem Vorhandensein einer ganzen Reihe von Rezeptoren und Enzymen des purinergen Systems, konnten im *Bulbus olfactorius* bisher überwiegend adenosinerge Effekte auf Neurone des Netzwerks gezeigt werden (Rotermund *et al.*, 2017). Adenosin ist das Endprodukt der enzymatischen ATP-Hydrolyse, die im *Bulbus olfactorius* mit einer äußerst hohen katalytischen Effizienz stattfindet (Dunwiddie *et al.*, 1997). Mithilfe der Photoapplikation aus *caged* ATP wurde in dieser Arbeit zunächst die neuromodulatorischen Wirkung von ATP selbst untersucht. Die Applikation erfolgte in der Glomerularschicht, sodass der Effekt von ATP auf die Netzwerkaktivität innerhalb eines Glomerulus als funktionelle Einheit untersucht werden konnte. In simultan zur Photolyse abgeleiteten Mitralzellen löste die Applikation von ATP eine Zunahme synaptischer Eingänge und daraus folgend eine prominente Depolarisation in Mitralzellen aus (Abbildung 7). Dabei war auffällig, dass die Reaktion der Mitralzelle mehrere Sekunden andauerte, obwohl die Beleuchtung nur einen Zeitraum von 100 ms umfasste. Bei dieser langen zellulären Antwort spielen wahrscheinlich die zugehörigen metabotropen Mechanismen purinergere P2Y-Rezeptoren eine große Rolle (vgl. Abbildung 1). Daneben ist eine ATP-induzierte ATP-Freisetzung aus anderen Neuronen oder Gliazellen denkbar, die die initiale ATP-induzierte Netzwerkantwort über einen längeren Zeitraum multipliziert (Anderson *et al.*, 2004).

Die ATP-induzierte Depolarisation wurde kleiner, je weiter entfernt die Photolyse von demjenigen Glomerulus, in den die abgeleitete Mitralzelle ihren apikalen *tuft* projiziert, durchgeführt wurde, blieb aber erst ab einer Entfernung von drei Glomeruli nahezu aus (Abbildung 8). Bei dem entsprechenden Versuch wurden, außer der adenosinergen Komponente, keine weiteren Neurotransmittersysteme blockiert. Es ist daher möglich, dass bspw. über die interglomerulären Netzwerke von superfiziellen sSA-Zellen exzitatorische Signale auch in distale glomeruläre Netzwerke transferiert werden. Normalerweise resultiert eine starke Erregung von glomerulären Netzwerken aber eher in der Inhibition umgebender Glomeruli. Der Mechanismus dieser sog. lateralen interglomerulären Inhibition dient der Schärfung eines starken Geruchsreizes, da gleichzeitig niederschwellige glomeruläre Aktivierungen unterdrückt werden (Wachowiak und Shipley, 2006). Interglomeruläre laterale Inhibition kann von glutamatergen sSA-Zellen vermittelt werden und eine Aktivierung GABAerger PG-Zellen in distalen Glomeruli hervorrufen (sog. *center surround inhibition*, Aungst *et al.*, 2003). Außerdem sind Mitral- und *tufted*-Zellen jeweils über Synapsen mit GABAergen Körnerzellen und Parvalbumin-Interneuronen an den lateralen Dendriten in

horizontaler Ebene quervernetzt. Über den Mechanismus der RI führt die Erregung von Mitralzellen eines distalen Glomerulus damit ebenfalls eher zu einer Inhibition benachbarter glomerulärer Einheiten. Es scheint daher plausibler, dass die Reaktion benachbarter glomerulärer Netzwerke in den durchgeführten Experimenten auf einer raschen Diffusion des photolytisch freigesetzten ATPs in der Badlösung beruht. ATP wirkt damit in gewisser Weise parakrin, aufgrund der Verdünnung in der Badlösung werden aber zunehmend geringere Antworten ausgelöst.

#### 4.1.2 P2-Rezeptoren

Mithilfe verschiedener Agonisten und Antagonisten von P2-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass die ATP-induzierten Antworten in Mitralzellen maßgeblich über die Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren gesteuert werden (Abbildung 10). Im olfaktorischen *Bulbus* sind P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren weit verbreitet. Unter anderem konnte deren Lokalisation in der Glomerularschicht, in der externen plexiformen Schicht, in der Körnerzellschicht und in der Nervenfaserschicht über die Bindung eines radioaktiv markierten Liganden nachgewiesen werden, wobei die Bindungsintensitäten in der Glomerularschicht und in der externen plexiformen Schicht am stärksten waren (Simon *et al.*, 1997b). Eine funktionelle Expression von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in Neuronen des *Bulbus olfactorius* wurde bisher nur von Fischer *et al.* (2012) gezeigt. Welche Neuronentypen funktionelle P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren exprimieren, konnten in dieser Studie allerdings nicht identifiziert werden.

P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren binden neben ATP auch ADP, wobei ADP, je nach Spezies, als Agonist sogar potenter ist (Palmer *et al.*, 1998; Ralevic und Burnstock, 1998; Waldo *et al.*, 2002). Aufgrund der hohen katalytischen Effizienz ATP-abbauender Enzyme kann ATP im *Bulbus olfactorius* innerhalb kürzester Zeit zu ADP hydrolysiert werden. Möglich ist daher, dass die gemessenen P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Antworten nicht ausschließlich durch das photolytisch freigesetzte ATP hervorgerufen wurden, sondern teilweise auch nach dessen Abbau durch ADP.

Das erstellte pharmakologische Profil der ATP-induzierten Antwort trifft neben P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren zumindest teilweise auch auf P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren zu (Kügelgen und Hoffmann, 2016). So sind an P2Y<sub>13</sub> und P2Y<sub>12</sub>-Rezeptoren 2-MeSADP und ADP sehr potente Agonisten, die Affinitäten für ATP sind im Vergleich eher gering (Hollopeter *et al.*, 2001; Bodor *et al.*, 2003; Marteau *et al.*, 2003). Da durch die Photolyse theoretisch auch ADP-vermittelte Effekte ausgelöst werden können, wäre aber denkbar, dass auch Rezeptoren mit höheren Affinitäten für ADP beteiligt sind. Expressionsanalysen im *Allan Brain Atlas* zeigen eine diffuse Lokalisation des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors in allen Schichten des olfaktorischen *Bulbus* und eine Expression des P2Y<sub>13</sub>-Rezeptor in der Glomerular-, Mitral-

und Körnerzellschicht. Darüber hinaus gibt es in der Literatur bisher allerdings keine weiteren histologischen oder physiologischen Hinweise auf das Vorkommen oder die Funktionalität von P2Y<sub>12</sub>- oder P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren im *Bulbus olfactorius*. Außerdem führte die Applikation von ATP zu Calciumsignalen in verschiedenen Neuronentypen, wohingegen P2Y<sub>12</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren Signalkaskaden auslösen, die in einer Reduzierung der intrazellulären cAMP-Konzentration resultieren (Burnstock, 2007b). Daher kann eine Beteiligung dieser Rezeptoren an den gemessenen Effekten weitestgehend ausgeschlossen werden.

Neben P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren konnte bisher tatsächlich nur die Expression des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors im *Bulbus olfactorius* gezeigt werden. Hegg *et al.* (2003) wiesen diesen mittels RT-PCR in bulbärem Gewebe sowie immunhistologisch in ORNs und damit in der Nervenfasern- und Glomerularschicht nach. In kultivierten ORN löste ATP mutmaßlich einen P2Y-Rezeptor-vermittelten Einstrom sowie Calciumsignale aus, beides wurde allerdings pharmakologisch nicht genauer charakterisiert. P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren binden UTP und ATP, aber nicht ADP (Kügelgen und Hoffmann, 2016). Da ADP aber in der Lage war, ATP-induzierte Effekte zu imitieren (Abbildung 10A), ist eine Aktivierung von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren in den durchgeführten Experimenten ebenfalls unwahrscheinlich.

Zu beachten ist weiterhin, dass sich die Sensitivitäten von Rezeptoren für die gleichen Substanzen zwischen verschiedenen Spezies unterscheiden können. So weist der P2Y<sub>4</sub>-Rezeptor in der Maus beispielsweise die gleiche Affinität für ATP und UTP auf (Bogdanov *et al.*, 1998); die humanen P2Y<sub>4</sub>-Rezeptoren werden hingegen ausschließlich durch UTP bzw. UDP aktiviert (Nicholas *et al.*, 1996). Denkbar sind daher auch unterschiedliche Bindungseigenschaften von Antagonisten. So charakterisieren Baurand *et al.* (2001) sowie Houston *et al.* (2008) MRS2179 auch ausschließlich als selektiven P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-spezifischen Antagonisten. Zusammengefasst wird daher davon ausgegangen, dass MRS2179-sensitive Effekte hauptsächlich auf die Inhibition von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren zurückzuführen sind.

Neben einigen P2Y-Rezeptoren bindet ATP aber vor allem an ionotrope P2X-Rezeptoren, deren Expression auch im *Bulbus olfactorius* gezeigt wurde. P2X<sub>2</sub>-Rezeptoren wurden histologisch in Mitralzellen, eTC und Körnerzellen nachgewiesen (Vulchanova *et al.*, 1996; Kanjhan *et al.*, 1999); außerdem konnte über *in-situ* Hybridisierungen P2X<sub>2</sub>-Rezeptor-RNA in bulbärem Gewebe detektiert werden (Simon *et al.*, 1997a). Mitralzellen weisen außerdem eine hohe Expression von P2X<sub>4</sub>- (Bo *et al.*, 1995; Buell *et al.*, 1996; Soto *et al.*, 1996), P2X<sub>5</sub>- und P2X<sub>6</sub>-Rezeptoren auf (Collo *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 2008). Bisher konnte eine Wirkung von ATP über P2X-Rezeptoren allerdings nur in nicht weiter identifizierten, dissoziierten Zellen aus dem olfaktorischen *Bulbus* von *Xenopus* Kaulquappen gezeigt werden (Hassenklöver *et al.*, 2010).

Die in dieser Arbeit durchgeführte photolytische Applikation von ATP sollte von der Freisetzungskinetik her eine geeignete Methode sein, um theoretisch auch P2X-Rezeptoren aktivieren zu können, ohne dass deren schnelle Desensibilisierung zum Tragen kommt. *Caged* ATP wurde in einer Konzentration von 100  $\mu$ M eingesetzt, die Photolyse erfolgte mit einer Wellenlänge von 375 nm. Jedoch liegt die optimale Wellenlänge zur Abspaltung der Dimethoxynitrophenylethylester-Gruppe (DMNPE) bzw. der Nitrophenylethylester-Gruppe (NPE) bei 355 nm. Eine Konzentration von 100  $\mu$ M freien ATPs würde theoretisch ausreichen, um zumindest einige P2X-Rezeptoren zu aktivieren. Da aber keine Möglichkeit besteht, die Effektivität der Photolyse zu bestimmen und die Konzentration von ATP auch von der Aktivität ATP-abbauender Enzyme abhängt, ist unklar, welche ATP-Konzentration letztendlich am Rezeptor vorlag und ob diese ausreicht, um P2X-Rezeptoren überhaupt zu aktivieren.

Tatsächlich war aber zu beobachten, dass 2-MeSADP eine signifikant kleinere Antwort in Mitralzellen auslöste als ATP (Abbildung 10A). Die *caged* Form von 2-MeSADP (MRS2703) wurde zwar in einer fünffach geringeren Konzentration als *caged* ATP eingesetzt, da P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren aber eine deutlich höhere Affinität für 2-MeSADP als für ATP aufweisen (Waldo und Harden, 2004), ist davon auszugehen, dass die Netzwerkantwort mit zunehmender Spezifität der Agonisten für P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren abnahm. Des Weiteren wurde die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen durch MRS2179 nicht vollständig inhibiert (Abbildung 10B). Beides könnten Hinweise darauf sein, dass neben P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren auch andere P2-Rezeptoren aktiviert wurden. Allerdings hatte der unspezifische P2-Rezeptorantagonist PPADS auf die MRS2179-insensitive Komponente der Mitralzellantwort keinen signifikanten zusätzlichen Effekt (Abbildung 11). PPADS wurde in einer Konzentration von 100  $\mu$ M eingesetzt, was zuverlässig P2Y-Rezeptoren, P2X<sub>1,2,3,5</sub>-Rezeptoren sowie die Heteromere P2X<sub>2/3</sub> und P2X<sub>1/5</sub> blockieren sollte. Die Rezeptorsubtypen P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>6</sub> und P2X<sub>7</sub> werden hingegen erst bei sehr viel höheren Konzentrationen inhibiert (Coddou *et al.*, 2011; Kügelgen und Hoffmann, 2016). Da diese Rezeptoren zum Teil bereits im *Bulbus olfactorius* nachgewiesen wurden, könnte deren Aktivierung womöglich zum MRS2179- und PPADS-insensitiven Teil der ATP-induzierten Antwort in Mitralzellen beigetragen haben.

Die Funktionalität von P2X-Rezeptoren in Gehirnschnitten wurde mittels elektrophysiologischer Methoden bisher allerdings erst äußerst selten nachgewiesen, obwohl der histologische Nachweis vorliegt (Jabs *et al.*, 2007). Dies könnte daran liegen, dass durch die Präparation und das Schneiden des Gewebes so viel freies ATP vorliegt, dass die Rezeptoren in Schnittpräparaten desensibilisieren oder sogar inaktivieren (North, 2002). Zhang *et al.* (2003) zeigten im Gegensatz dazu aber, dass freies ATP in Schnittpräparaten sehr schnell abgebaut wird. Hier konnte ein Effekt von ATP in hippocampalen Gehirnschnitten erst unter der Wirkung von Ektonukleotidaseinhibitoren beobachtet werden, was gegen eine maßgebliche Desensibilisierung durch freigesetztes ATP aufgrund der

Präparation spricht. Auch Mori *et al.* (2001) konnten im Hippocampus eine ATP-induzierte, schnelle synaptische Transmission messen. Es bedarf allerdings weiterer Analysen, ob die Aktivierung von P2X Rezeptoren auch bei den hier durchgeführten Versuchen eine Rolle spielt und möglicherweise dem MRS2179-insensitiven Effekt in Mitralzellen zugrunde liegt.

#### 4.1.3 Eine Subpopulation juxtaglomerulärer Interneurone wird P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelt aktiviert und moduliert die Netzwerkaktivität im *Bulbus olfactorius*

Die Applikation von ATP führte im *voltage clamp*-Modus zu einer Zunahme synaptischer Aktivität in Mitralzellen, was eine Erregung präsynaptischer Zellen des glomerulären Netzwerkes reflektiert. Da ATP im *current clamp*-Modus eine Depolarisation der Mitralzellmembran hervorrief, scheinen die präsynaptisch aktivierten Zellen daher überwiegend einen exzitatorisch wirksamen Neurotransmitter freizusetzen.

Die beiden wichtigsten Neurotransmittersysteme im *Bulbus olfactorius* beruhen auf Exzitation durch Glutamat und Inhibition durch GABA (Halász und Shepherd, 1983). Interessanterweise zeigte sich jedoch, dass die ATP-induzierte Depolarisation unabhängig von glutamaterger oder GABAerger Neurotransmission ist (Abbildung 9), grundsätzlich aber von Zellen initiiert werden müsste, welche die glomeruläre Netzwerkaktivität antreiben können. Diese Eigenschaft wird vor allem eTC zugeschrieben, da sie das gesamte neuronale Netzwerk eines Glomerulus zu synchroner Aktivität anregen können (Hayar *et al.*, 2004a; Saint Jan *et al.*, 2009). Dabei reagieren sie sehr empfindlich auf Signale der ORN und leiten die Erregung über einen sog. *feed forward* Mechanismus mittels Glutamat an andere Neurone des Netzwerkes weiter (Gire *et al.*, 2012; Igarashi *et al.*, 2012). In der Mitralzelle sind diese Erregungen als rhythmisch wiederkehrende, gebündelte Zunahme synaptischer Aktivität zu erkennen, die vergleichbar mit den ATP-induzierten Strommustern sind und als *population bursts* bezeichnet werden. Neurochemische Studien zeigten, dass eTC neben Glutamat eine Reihe weiterer putativer Neurotransmitter enthalten. Unter anderem wurde Immunreaktivität gegen Cholecystokinin (CCK) nachgewiesen (Seroogy *et al.*, 1985; Ma *et al.*, 2013), welches im olfaktorischen *Bulbus* exzitatorisch wirkt (Ma *et al.*, 2013). Da Mitralzellen mutmaßlich die CCK-Rezeptoren des Typ CCK<sub>A</sub> (Honda *et al.*, 1993) und CCK<sub>B</sub> (Ma *et al.*, 2013) exprimieren, erschien es möglich, dass eTC direkt durch ATP aktiviert werden und trotz der Inhibition glutamaterger Transmission die Erregung auf die Mitralzelle übertragen.

Tatsächlich aber zeigten Paarableitungen an Mitralzellen und eTC, die in denselben Glomerulus projizieren, dass beide Zelltypen uniform auf die Photolyse von *caged* ATP reagierten (Abbildung 12). Außerdem waren die ATP-induzierte Exzitation sowie das Calciumsignal sowohl in Mitralzellen als auch in eTC größtenteils durch TTX inhibierbar (Abbildung 13, Abbildung 16). In Mitralzellen konnte zudem trotz Einfluss eines

intrazellulären Antagonisten für spannungsgesteuerte Natriumkanäle (QX-314) eine deutliche Depolarisation durch ATP ausgelöst werden. Die Depolarisation in Anwesenheit von QX-314 war durch die Unterdrückung der Generierung von Aktionspotentialen in der abgeleiteten Zelle zwar signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe ohne QX-314, konnte abermals aber erst durch extrazelluläres TTX fast vollständig inhibiert werden (Abbildung 14). Zusammengenommen sprachen diese Ergebnisse gegen *M/t*-Zellen als direktes Ziel der ATP-induzierten Neuromodulation. Wahrscheinlicher ist, dass die P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelte Exzitation in *M/t*-Zellen zum Großteil durch einen indirekten Mechanismus ausgelöst wird und auf die Summation vieler exzitatorischer postsynaptischer Potentiale zurückgeht. Dies wäre konform mit der typischen Eigenschaft extrazelluläre Nukleotide, häufig die Freisetzung interzellulärer Signalmoleküle zu initiieren, was bisher jedoch überwiegend für nicht-neuronales Gewebe gezeigt wurde. Bei den durch ATP (oder andere Nukleotide) freigesetzten Signalmolekülen kann es sich dabei um klassische Neurotransmitter handeln, aber auch um Wachstumsfaktoren, Hormone oder Cytokine, die dann den purinergen Stimulus auf andere Zellen transferieren (Zimmermann, 2016). Die Stimulation von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren führt beispielsweise zur Freisetzung von Prolaktin aus lactotrophen Zellen der Adenohypophyse (He *et al.*, 2003), Cortisol aus Zellen der Nebennierenrinde (Nishi *et al.*, 2013), Interleukin-10 aus Mikroglia (Seo *et al.*, 2008) sowie reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bzw. Stickoxide aus verschiedensten Zelltypen (Díaz-Vegas *et al.*, 2015).

In Neuronen wurde bisher nur die P2Y<sub>1</sub>-vermittelte Freisetzung von Vasopressin und Oxytocin gezeigt (Song *et al.*, 2009). Besonders häufig scheinen hingegen Astrozyten an P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelter Gliotransmission oder der Freisetzung diverser anderer Signalmoleküle beteiligt zu sein. So konnte bereits die Freisetzung von Glutamat, *tumor necrosis factor* (TNF), Prostaglandin E2 (Domercq *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2008) sowie Interleukin-6 (Fujita *et al.*, 2009) und ATP selbst (Gallagher und Salter, 2003; Anderson *et al.*, 2004) gezeigt werden. Es ist nachgewiesen, dass Astrozyten im olfaktorischen *Bulbus* P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren exprimieren und die neuronale Aktivität sowie die synaptische Transmission modulieren (Kozlov *et al.*, 2006; Doengi *et al.*, 2008). Dennoch ist es unwahrscheinlich, dass Astrozyten bei dem in dieser Arbeit beobachteten exzitatorischen Effekt am Anfang der Reaktionskette stehen. Kozlov *et al.* (2006) zeigten zum einen, dass Astrozyten eher einen GABAergen, inhibitorischen Effekt auf Mitralzellen vermitteln. Des Weiteren inhibierte TTX, welches Astrozyten in ihrer Physiologie nicht beeinflusst, die P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelte Exzitation von *M/t*-Zellen fast vollständig. Fischer *et al.* (2012) zeigten außerdem, dass ATP ein im Vergleich zur neuronalen Antwort zeitlich verzögertes Calciumsignal im Soma von juxtaglomerulären Astrozyten auslöste. Zusammengefasst führte dies zu der Vermutung, dass die Photoapplikation von *caged* ATP im Glomerulus vermutlich die Freisetzung eines sekundären Signalmoleküls aus Neuronen auslöst, welches dann die Exzitation von *M/t*-Zellen und des Netzwerkes herbeiführt.

Neben GABAerger und glutamaterger Transmission sind tatsächlich eine Reihe weiterer Neurotransmitter und –modulatoren beschrieben, die die Aktivität der Neurone im Netzwerk beeinflussen können. Diese werden entweder von lokalen Interneuronen oder von in den olfaktorischen *Bulbus* projizierenden Zentrifugalfasern aus anderen Hirngebieten ausgeschüttet. Zu den zentrifugalen, sog. *top down*-Verbindungen gehören serotonerge, cholinerge und adrenerge Projektionsfasern (Price und Powell, 1970; Olmos *et al.*, 1978; Luskin und Price, 1983). Noradrenalin-assoziierte Fasern stammen aus dem *Locus coeruleus* und projizieren in die Körnerzellschicht, die interne plexiforme Schicht und die Glomerularschicht. Serotonerge Fasern stammen aus den Raphekernen und enden in unterschiedlichen Schichten des *Bulbus olfactorius*. Cholinerge Fasern haben ihren Ursprung im basalen Vorderhirn und verteilen sich ebenfalls über alle bulbären Schichten. Die Funktionen dieser zentrifugalen Projektionen sind bisher aber nur wenig untersucht. Petzold *et al.* (2009) zeigten, dass die Aktivierung von serotonergen 2C-Rezeptoren über eine Exzitation von eTC und damit vermehrtem synaptischen *input* auf GABAerge, PG-Zellen zu einer GABA<sub>B</sub>-vermittelten, präsynaptischen Inhibition von ORNs führte. Werden cholinerge Fasern stimuliert, führt dies zu einer Verminderung spontan generierter Aktionspotentiale in PG-Zellen (Ma und Luo, 2012) und erhöht die Erregbarkeit von Mitralzellen (Rothermel *et al.*, 2014). Des Weiteren dämpft Acetylcholin die Aktionspotentialrate in dopaminergen Zellen des olfaktorischen *Bulbus* (Pignatelli und Belluzzi, 2008) und noradrenerge Fasern vermitteln vermutlich eine verringerte Inhibition von Mitralzellen (Trombley und Shepherd, 1993). Außer dieser zentrifugalen Verbindungen sind vor allem die dopaminergen Verschaltungen äußerst komplex (Liu *et al.*, 2013). Letztendlich können aber Modulationen an allen möglichen synaptischen Systemen im *Bulbus olfactorius*, die in der Summe zu einer erhöhten Erregbarkeit von M/t-Zellen führen, den ATP-abhängigen Effekt auf die Netzwerkaktivität vermitteln.

Um die Identität des beteiligten Signalmoleküls zu identifizieren wurde daher eine Kombination von Antagonisten zur Inhibition diverser Neurotransmitter-Rezeptoren eingesetzt. Der Fokus lag dabei auf neuroaktiven Substanzen, die, wie oben beschrieben, in Verbindung mit der Modulation von Mitralzell- bzw. glomerulärer Aktivität stehen oder in anderen Geweben P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelt freigesetzt werden. Allerdings hatte auch die Kombination der Antagonisten keine blockierende Wirkung auf die ATP-induzierte Antwort des glomerulären Netzwerkes (Abbildung 17A). Denkbar waren daher Übertragungsmechanismen, die unabhängig von neurosekretorischer Transmission über chemische Synapsen stattfinden können. Carbenoxolon, ein *gap junction* Inhibitor, war aber ebenfalls nicht in der Lage die ATP-Antwort des Netzwerkes zu unterdrücken (Abbildung 17B). Der Großteil des Effekts scheint daher tatsächlich über ein sekundäres Signalmolekül vermittelt zu werden und nicht über elektrische Synapsen. Ob dieses putative Signalmolekül

aber tatsächlich Calcium-abhängig aus Vesikeln freigesetzt wird, bedarf weiterer Analysen. Da das olfaktorische System über eine außerordentlich hohe neurochemische Diversität verfügt, wurden aber noch längst nicht alle möglichen neuroaktiven Substanzen getestet (Halász und Shepherd, 1983).

Auch wenn die ATP-Antwort in Mitralzellen durch die Inhibition von *gap junctions* nicht blockiert werden konnte, hatte Carbenoxolon dennoch einen signifikanten Effekt auf die ATP-induzierte Depolarisation. *Gap junctions* sind Kanalproteine die ihrerseits aus sechs einzelnen Connexinen, die zusammen ein Connexon bilden, bestehen. Eine *gap junction* besteht dabei aus zwei Connexonen, von denen bei elektrischen Synapsen jeweils eines von den an der Synapse beteiligten Zellen ausgebildet wird. Juxtaglomeruläre Astrozyten sind nachweislich über *gap junctions* miteinander gekoppelt (Roux *et al.*, 2011). Über astrozytären Netzwerke können Calciumsignale weitergegeben und amplifiziert werden (Haydon, 2001). Neben der Beteiligung eines Connexons an einer *gap junction* spielen diese aber auch als sogenannte Hemikanäle eine Rolle. Insbesondere Gliazellen können über solche Hemikanäle Transmitter - unter anderem ATP - freisetzen (Anselmi *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2008; Roux *et al.*, 2015). Da ATP durchaus auch selbst die Freisetzung von ATP aus Astrozyten initiieren kann (Anderson *et al.*, 2004), ist es möglich, dass ein solcher Mechanismus an der ATP-induzierten Antwort des Netzwerkes beteiligt ist und der ursprüngliche Effekt von ATP verstärkt wird. Da Carbenoxolon sowohl vollständige *gap junctions* als auch Hemikanäle blockiert, ist einerseits der Amplifizierungsmechanismus der astrozytären Netzwerke aber auch die Freisetzung von ATP aus Hemikanälen unterbunden. Dies könnte die Reduktion der ATP-induzierten Antwort im Vergleich zur Kontrolle erklären und eine Einschätzung der Beteiligung von Gliazellen an den gemessenen Effekten erlauben.

Dennoch steht zu Beginn der Reaktionskette vordergründig eine direkte Aktivierung neuronaler, juxtaglomerulärer Zellen durch ATP. Calciummessungen in der Glomerularschicht mit simultaner Beobachtung des Membranpotentials in Mitralzellen mittels *patch clamp*-Ableitung während der Photolyse von *caged* ATP zeigten, dass die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen durch TTX blockiert wird. Im Gegensatz dazu blieb das Calciumsignal in einer Subpopulation juxtaglomerulärer Neurone aber bestehen (Abbildung 20). Offenbar sind diese Zellen die Initiatoren der ATP-induzierten Netzwerkantwort, welche letztendlich zu einer Depolarisation in M/t-Zellen führt. In Anwesenheit von MRS2179 wurde die ATP-abhängige Calciumantwort auch in diesen Zellen unterdrückt. Dies ist damit der erste Nachweis, dass ca. 20 % der juxtaglomerulären Neurone im *Bulbus olfactorius* funktionelle P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren exprimieren und direkt durch extrazelluläres ATP im Glomerulus aktiviert werden.

#### 4.1.4 Physiologische Relevanz der ATP-induzierten Neuromodulation

Roux *et al.* (2015) zeigten, dass ATP im *Bulbus olfactorius* aus Astrozyten über Connexin 43-Hemikanäle (Cx43 HC) freigesetzt wird und diese damit eine Quelle für extrazelluläre Nukleotide darstellen. Die Freisetzung von ATP über Cx43 HC aus Astrozyten wurde schon in mehreren Hirngebieten gezeigt (Kang *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2012; Chever *et al.*, 2014). Zhang *et al.* (2003) sowie Torres *et al.* (2012) wiesen dabei eine direkte Abhängigkeit der ATP Freisetzung aus Astrozyten von der neuronalen Aktivität nach. Der zugrundeliegende Mechanismus durch den Spontanaktivität von Neuronen eine Modulation astroglialer Hemikanäle beeinflusst, beruht dabei vermutlich auf einer lokalen Abnahme der extrazellulären Calciumkonzentration in Folge exzitatorischer neuronaler Funktion (Torres *et al.*, 2012).

Möglich ist, dass auch im olfaktorischen *Bulbus* die ATP-Freisetzung aus Astrozyten zumindest teilweise auf der spontanen Aktivität von Neuronen beruhen könnte. In jedem Fall wird aus Astrozyten freigesetztes ATP zu Adenosin abgebaut, welches dann über einen A<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängigen Signalweg Membranpotential-Oszillationen in Mitralzellen moduliert (Roux *et al.*, 2015). Solche Membranpotential-Oszillationen werden vermutlich durch die Aktivität von Neuronen im Netzwerk der Mitralzelle erzeugt und nicht durch intrinsische Membraneigenschaften der Mitralzelle selbst (Sanchez-Vives und McCormick, 2000; Shu *et al.*, 2003; Roux *et al.*, 2015). Um zu untersuchen, ob auch die Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren einen Effekt auf die Netzwerkdynamiken im Ruhezustand hat, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von MRS2179 auf biphasische Membranpotentialverläufe in Mitralzellen charakterisiert. Unter der Wirkung von MRS2179 war zu beobachten, dass die Frequenz von *upstates* abnahm und die Dauer der *downstates* im Umkehrschluss länger wurde (Abbildung 31). Dies impliziert eine tonische Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren durch endogen freigesetztes ATP, infolge deren die Frequenz spontaner Membranpotential-Oszillationen in Mitralzellen erhöht wird. Damit sind ATP bzw. ADP offenbar in der Lage, den Wechsel der Mitralzelle in einen Status höherer Erregbarkeit zu koordinieren. Ob diese Modulation das neuronale Netzwerk betrifft und auf die Mitralzelle übertragen wird oder die Mitralzelle in ihren Eigenschaften selbst moduliert wird, kann dabei nicht mit Bestimmtheit beurteilt werden. Da sich aber nur die Frequenz der *upstates* ändert, nicht aber die Amplitude und Membranpotential-Oszillationen in Mitralzellen vermutlich extern gesteuert werden (Roux *et al.*, 2015), spricht dies für einen präsynaptischen Effekt.

Roux *et al.* (2015) zeigten außerdem, dass in Anwesenheit des A<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten DPCPX die Amplitude von *upstates* reduziert war. In anderen Hirngebieten wurde der Modulation von *upstates* vor allem eine entscheidende Rolle bei der Verstärkung sensorischen *inputs* zugeschrieben (Castro-Alamancos, 2009). So wird beispielsweise durch die Zunahme der Amplitude von *upstates* die Sensitivität für exzitatorische synaptische

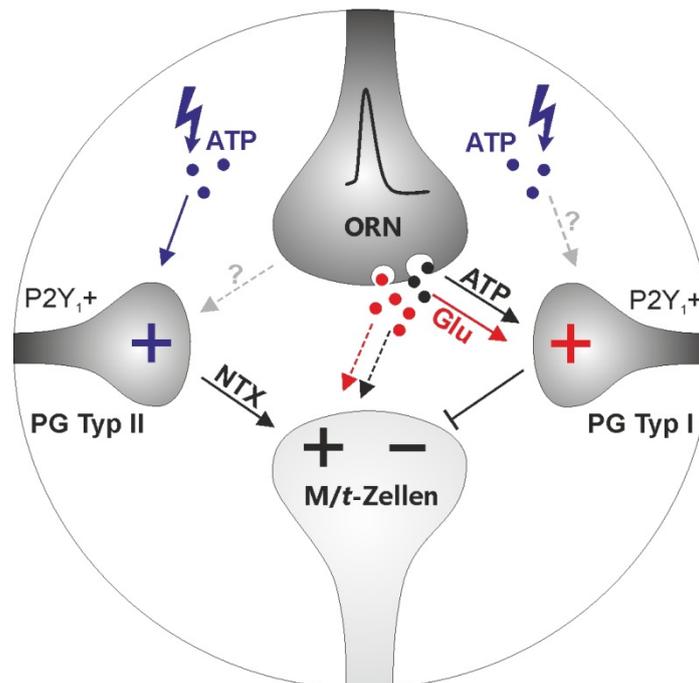
Eingänge erhöht und die Zelle während der *upstates* näher an das Schwellenpotential gebracht, wie es beispielsweise im auditorischen System der Fall ist (Reig *et al.*, 2015). Da P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängige Signalwege im *Bulbus olfactorius* keine Modulation der Amplitude oder Dauer der *upstates* vermitteln (Abbildung 31), scheint ATP die Sensitivität für Eingangssignale durch die ORN während der *upstates* nicht zu modulieren. Trotzdem zeigen die Ergebnisse zusammenfassend, dass basales ATP, welches vermutlich tonisch über die Spontanaktivität des neuronalen Netzwerkes im Glomerulus freigesetzt wird, einen Einfluss auf die neuronale Netzwerkdynamik eines Glomerulus hat und langsame Membranpotential-Oszillationen in Mitralzellen in ihrer Frequenz modifiziert. Durch diese Modulation der Erregbarkeit der Mitralzelle im Ruhezustand wird so wiederum die Sensitivität des gesamten Netzwerkes für exzitatorische Signale erhöht.

Die elektrische Stimulation von ORN-Axonon in der Nervenfaserschicht führt zur Freisetzung von ATP aus den Axonterminalen im Glomerulus. ATP hat damit vermutlich nicht nur einen tonischen Einfluss auf die Netzwerkdynamiken im Ruhezustand, sondern ist wahrscheinlich auch an der Prozessierung sensorischer Signale beteiligt. Tatsächlich wird die Hypothese einer Stimulus-abhängigen Wirkung von ATP durch diese Arbeit in mehrfacher Hinsicht unterstützt. Zunächst wurde gezeigt, dass mindestens eine Subpopulation juxtaglomerulärer Neurone durch die Photoapplikation von ATP direkt aktiviert wird (Abbildung 19). Des Weiteren wurden stimulationsinduzierte Calciumsignale juxtaglomerulärer Neurone durch P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängige Signalwege in unterschiedlicher Weise beeinflusst (Abbildung 28). Dies deutet auf eine komplexe synaptische Verschaltung von purinerg aktivierten sowie inaktivierten Zellen hin, bei der verschiedene lokale Interneurone und sekundäre Signalmoleküle involviert sind. Darüber hinaus wurde ebenfalls ein Einfluss dieses P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-modulierten Netzwerkes auf die Prozessierung von Eingangssignalen durch die Mitralzelle nachgewiesen. So unterlagen stimulationsinduzierte Antworten in Mitralzellen - bestehend aus einer durch den Stimulus ausgelösten Depolarisation mit anschließender, ausgeprägter Hyperpolarisation – durch die Blockade P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängiger Signalwege großen Veränderungen. Neben einer verstärkten Depolarisation während des Stimulus kam es zu einer vollständigen Unterdrückung der nachfolgenden Hyperpolarisation (Abbildung 29). Der Effekt auf die Depolarisation war dabei besonders am Ende der 5 Sekunden andauernden Stimulation sehr ausgeprägt. Es ist daher einerseits davon auszugehen, dass sowohl der Effekt auf die stimulationsinduzierte Depolarisation als auch auf die nachfolgende Hyperpolarisation den gleichen Mechanismen unterliegt. Andererseits wird deutlich, dass Mitralzellen bei wirksamen P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängigen Signalketten in der Summe inhibiert bzw. ihre Erregbarkeit herabgesetzt wird. Diese Ergebnisse lassen zunächst die Folgerung zu, dass ATP nicht nur tonisch freigesetzt wird,

sondern auch bei evozierter Netzwerkaktivität und damit vermutlich bei der Integration von Geruchsinformationen eine Rolle spielt.

Die bei der Stimulation beobachtete Inhibition der Mitralzelle durch purinerge Signalwege steht allerdings im Kontrast zur exzitatorischen Reaktion der Mitralzelle in Folge der Photoapplikation von ATP. Der direkte Vergleich beider Ergebnisse ist allerdings nur eingeschränkt möglich. So ist die Photoapplikation von ATP eine rein artifizielle Methode, während die stimulationsinduzierte Freisetzung von ATP eher den physiologischen Gegebenheiten entspricht. Bei der elektrischen Stimulation von ORN-Axonon wird ATP als Ko-Transmitter zum hauptsächlichen Transmitter Glutamat ausgeschüttet (Thyssen *et al.*, 2010), welches über komplexe synaptische Schaltkreise verschiedene Neuronentypen des glomerulären Netzwerks erregen kann – unter anderem auch solche, die mit inhibitorischen Neurotransmittern ausgestattet sind. Bei der Photoapplikation wird ATP hingegen gleichzeitig und überall im Glomerulus freigesetzt, wobei die Effektivität der Photolyse nicht beurteilt werden kann. Somit könnte bei dieser Form der ATP-Applikation einerseits die Reihenfolge synaptischer Verschaltungen übergangen werden, die für die ATP-vermittelte Inhibition des sensorischen *output* maßgeblich ist. Andererseits könnte die Menge an freigesetztem ATP nicht ausreichen, um P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-exprimierende Neurone zu aktivieren, die in Folge der Stimulation von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren durch endogen freigesetztes ATP einen inhibitorischen Neurotransmitter ausschütten und die Mitralzelle hemmen. Überhaupt wäre möglich, dass es sich bei den zuletzt genannten Zellen um PG-Zellen des Typ I handelt, die direkte, glutamaterge Eingänge von den ORN erhalten, die zur effektiven Aktivierung dieser Neurone notwendig sind. ATP wirkt als Ko-Transmitter dann möglicherweise nur rein modulatorisch auf das durch Glutamat evozierte exzitatorische postsynaptische Potential in diesen Zellen.

Wird ATP photolytisch appliziert, spielen glutamaterge Signalwege aber offenbar höchstens eine untergeordnete Rolle. Anscheinend werden durch photolytisch freigesetztes ATP keine glutamatergen Neurone angesprochen, sodass auch diejenige Zellpopulation, die die Inhibition der Mitralzelle vermittelt, nicht erregt wird. Hauptsächlich scheinen hingegen P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-exprimierende Neurone stimuliert zu werden, die eine Exzitation von Mitralzellen über einen noch unbekanntem Transmitter vermitteln. Für die Aktivierung dieser Neuronenpopulation bedarf es offensichtlich keiner Erregung durch Glutamat. Theoretisch könnte es sich bei diesen Zellen um PG-Zellen des Typ II handeln, die keine direkten Eingänge von ORN erhalten und daher in den Stimulationsexperimenten nicht angesprochen werden, womit auch der exzitatorische Druck, der durch die Photoapplikation auf die Mitralzelle ausgeübt wird, wegfällt. Abbildung 43 verdeutlicht schematisch das oben beschriebene, hypothetische Modell der ATP-induzierten Neuromodulation auf Netzwerkebene im Glomerulus.



**Abbildung 43: Hypothetisches Modell zur neuromodulatorischen Wirkung von ATP auf Netzwerkebene.** Ausschnitt aus dem neuronalen glomerulären Netzwerk. Bei Photoapplikation von ATP reagiert eine Subpopulation periglomerulärer Neurone via  $P2Y_1$ -Rezeptoren direkt auf ATP und vermittelt über ein Signalmolekül (Neurotransmitter X, NTX) die Erregung von M/t-Zellen. Möglich ist, dass die direkt auf ATP reagierenden Interneurone keine synaptischen Eingänge von ORN erhalten (PG Typ II) und daher bei stimulationsinduzierter Freisetzung von ATP nicht angesprochen werden. Wird ATP als Ko-Transmitter zusammen mit Glutamat endogen aus den Axonterminalen der ORN freigesetzt, werden über glutamaterge Eingänge von den ORN möglicherweise inhibitorische periglomeruläre Neurone des Typ I (PG Typ I) aktiviert, in denen ATP via  $P2Y_1$ -Rezeptoren rein modulatorisch auf das evozierte exzitatorische postsynaptische Potential wirkt. Da es für die Aktivierung dieser Zellen entsprechend der Erregung durch Glutamat bzw. den direkten synaptischen *input* durch die ORN bedarf, reagieren diese Zellen vermutlich nicht auf die Photoapplikation von ATP. Glutamat und ATP wirken auch direkt auf M/t-Zellen, bei stimulationsinduzierter Freisetzung von ATP und offenen  $P2Y_1$ -Rezeptor-abhängigen Signalwegen kommt es in der Summe allerdings zu einer Herabsetzung der Erregbarkeit von M/t-Zellen.

Die Inhibition von Mitralzellen in Folge der stimulationsinduzierten, endogenen Freisetzung von ATP bei wirksamen  $P2Y_1$ -Rezeptor-abhängigen Signalwegen muss aber nicht zwangsläufig durch eine Modulation auf Netzwerkebene bedingt sein. Da Mitralzellen offensichtlich auch selbst funktionelle  $P2Y_1$ -Rezeptoren exprimieren, könnten Mitralzellen auch direkt postsynaptisch in ihren Membraneigenschaften moduliert werden.  $P2Y_1$ -Rezeptoren vermitteln klassischerweise über ihre  $G_{\alpha_{q/11}}$ -Kopplung die Aktivierung der PLC mit konsekutiver Erhöhung der Konzentration von  $IP_3$  und DAG und anschließender Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern (Boyer *et al.*, 1994; Ralevic und Burnstock, 1998; Burnstock, 2006). Über diesen  $G_{\alpha_{q/11}}$ -Signalweg, aber auch direkt

membrangebunden über die  $G\beta,\gamma$ -Untereinheit können unterschiedliche Wirkungen in Neuronen hervorgerufen werden. Besonders häufig besteht das Ziel dieser intrazellulären Signalwege aber darin, die Aktivität von Ionenkanälen zu beeinflussen. Auch eine mögliche  $P2Y_1$ -Rezeptor-vermittelte direkte Modulation von Mitralzellen würde vermutlich auf einer G-Protein-abhängigen Modulation von Ionenkanälen beruhen. Eine dämpfende Wirkung bzw. eine Hyperpolarisation und damit einhergehende Herabsetzung der Erregbarkeit von Neuronen wird dabei vor allem durch die Aktivität von Kaliumkanälen bestimmt. Kaliumkanäle bilden die vielfältigste und am häufigsten vorkommende Gruppe aller bekannten Ionenkanäle. Sie werden eingeteilt in 2-P Kaliumkanäle ( $K_2p$ ), einwärts-rectifizierende Kaliumkanäle (Kir), spannungsaktivierte Kaliumkanäle ( $K_v$ ) und calciumaktivierte Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ; Alexander *et al.*, 2013). Grundsätzlich kommen sämtliche Subtypen der einzelnen Gruppen auch in Säugetieren vor.

In Neuronen des ZNS wurde für  $P2Y_1$ -Rezeptoren bisher tatsächlich besonders oft eine Interaktion mit Kaliumkanälen beschrieben (Filippov *et al.*, 2004; Filippov *et al.*, 2006; Schicker *et al.*, 2010; Coppi *et al.*, 2012). Filippov *et al.* (2004) beschreiben eine  $P2Y_1$ -Rezeptor-vermittelte Modulation von KCNQ2/3- ( $K_v7$ ) und GIRK- (Kir3) Kanälen. Beide Kanaltypen zeichnen sich durch langsame Kinetiken aus und sind histologisch in Mitralzellen beschrieben (Karschin *et al.*, 1996; Iizuka *et al.*, 1997; Cooper *et al.*, 2001). Allerdings werden KCNQ2/3-Kanäle im Hippocampus durch die Aktivierung von  $P2Y_1$ -Rezeptoren inhibiert, was entsprechend zu einer erhöhten Membranerregbarkeit der Zelle führt und damit im Gegensatz zu den hier gewonnenen Ergebnissen steht (Filippov *et al.*, 2006).

GIRK-Kanäle werden in Folge der Stimulation von  $P2Y_1$ -Rezeptoren hingegen äußerst komplex moduliert. In einem ersten, schnellen Schritt werden sie durch die  $G\beta,\gamma$ -Untereinheit aktiviert, was zu einer Hyperpolarisation in Neuronen führt. Dieser Hyperpolarisation folgt eine langsame Inhibition der Kanäle, welche durch die  $G\alpha$ -Untereinheit vermittelt wird (Filippov *et al.*, 2004). Die Aktivierung solcher Kanäle führt damit einerseits zu einer Stabilisierung des Ruhemembranpotentials, wohingegen die Inhibition andererseits die Erregbarkeit in Neuronen erhöht und zu einer Depolarisation führt. Je nachdem, welcher Signalweg überwiegt, könnte eine  $P2Y_1$ -vermittelte Modulation von GIRK-Kanälen theoretisch den Effekt von MRS2179 auf die der Stimulation folgenden Hyperpolarisation erklären. Dagegen spricht jedoch, dass durch Photoapplikation von ATP und ADP eine direkte Modulation der Mitralzelle gezeigt wurde, die vermutlich auf der Öffnung einer auf Natrium- oder Calciumionen basierenden Kationenleitfähigkeit beruht (Abbildung 24, Abbildung 25; siehe auch 4.1.5.). Ein Hinweis auf eine Modulation von Kaliumkanälen war in den entsprechenden Versuchen dagegen nicht zu finden. Dies könnte daran liegen, dass die Modulation bei stimulationsinduzierten Antworten von Mitralzellen vor allem Kanäle betrifft, die spannungsaktiviert und daher im Ruhezustand der Mitralzelle inaktiv sind. GIRK-Kanäle werden hingegen durch G-Protein-abhängige Signalkaskaden aktiviert und sollten daher

grundsätzlich auch bei Ruhemembranpotentialen modulierbar sein. Dementsprechend scheinen sie als Interaktionspartner einer direkten P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Neuromodulation in Mitralzellen unwahrscheinlich.

Für eine direkte, P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelte Modulation von mindestens einer Art von Kaliumkanälen in Mitralzellen spricht aber in jedem Fall der Einfluss von MRS2179 auf die Kinetik von sowohl stimulationsinduzierten als auch spontan generierten Aktionspotentialen. So führte die Blockade von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren zu einer Verlängerung der De- und Repolarisationsphasen, was insgesamt eine längere Aktionspotentialdauer bewirkte. Neben KCNQ- und GIRK-Kanälen ist das weitere Expressionsprofil von Mitralzellen bezüglich Kaliumkanälen allerdings wenig bekannt. Anscheinend wird aber 50 % des Auswärtsstroms über SK<sub>Ca</sub>-Kanäle (K<sub>Ca2</sub>) und BK-Kanäle (K<sub>Ca4</sub>, K<sub>Ca5</sub>) vermittelt (Wang *et al.*, 1996; Coppi *et al.*, 2012). SK- und BK-Kaliumkanäle zählen zwar im weitesten Sinne zu den spannungsaktivierten Kaliumkanälen, tatsächlich ist für deren Aktivierung aber die intrazelluläre Calciumkonzentration mitentscheidend. SK-Kanäle sind scheinbar an der Einstellung von Feuerfrequenzen in Neuronen beteiligt (Hopf *et al.*, 2010). BK-Kanäle bestimmen aufgrund ihrer schnellen Aktivierungs- und Inaktivierungskinetiken dagegen maßgeblich die Form der Repolarisation und damit die Ausprägung des gesamten Aktionspotentials. Da die Inhibition von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren zu einer Verlängerung der De- und Repolarisation führte, aber keinen Einfluss auf die Frequenz oder Anzahl der Aktionspotentiale hatte, könnten BK-Kanäle theoretisch Ziel der ATP-induzierten Neuromodulation sein. In striatalen Hirnschnitten konnte bereits eine P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelte Aktivierung von SK- und BK-Kanälen gezeigt werden (Coppi *et al.*, 2012). Dabei bewirkten SK-Kanäle eine verringerte Feuerfrequenz, die Auswirkungen der BK-Aktivierung wurden aber nicht genauer beschrieben. Allerdings ist zu beachten, dass die Blockade P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängiger Signalwege in den hier durchgeführten Versuchen in einem Großteil der Mitralzellen zu einer Verstärkung der stimulationsinduzierten Calciumantwort führte (Abbildung 30), der intrazelluläre Calciumlevel bei offenen P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Signalwegen im Umkehrschluss also reduziert ist und damit begünstigend auf die Inaktivität von BK-Kanälen wirken dürfte.

Ein weiterer Teil des Auswärtsstroms in Mitralzellen wird von K<sub>v</sub>1.3- und Erg-Kanälen (K<sub>v</sub>11) getragen (Fadool und Levitan, 1998; Hirdes *et al.*, 2009), außerdem scheint auch der sogenannte A-Strom (K<sub>v</sub>1.4/3/4) in Mitralzellen von Bedeutung zu sein (Wang *et al.*, 1996). Verbindungen zum purinergen System sind aber bei keinem der drei zuletzt genannten Kanaltypen bekannt.

Neben der Modulation der Aktionspotentialdauer bewirkte die Inhibition von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren vermeintlich auch eine Modifizierung des Schwellenpotentials in Mitralzellen. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass das Membranpotential in MRS2179 sowohl während

der Stimulation als auch im Bereich der *downstates* im Ruhezustand leicht depolarisiert war. Die Verschiebung des Schwellenpotentials in positivere Bereiche ist daher konform mit der Annahme von Hodgkin und Huxley (1952) die besagt, dass die Sensitivität von Natriumleitfähigkeiten abhängig vom *steady state* des Neurons ist und P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren daher vermutlich keine Modulation von Natriumkanälen vermitteln. Allerdings könnte die diesem Effekt zugrundeliegende Depolarisation des Ruhemembranpotentials purinerg vermittelt sein. Rotermund *et al.* (2017) zeigten, dass Adenosin über die Aktivierung von A<sub>1</sub>-Rezeptoren und der Öffnung von Kaliumkanälen, die verantwortlich für das Ruhemembranpotential der Mitralzelle sind, eine Hyperpolarisation hervorruft. Möglicherweise wurde die Depolarisation also durch einen reduzierten adenosinergen Effekt bedingt, da die Generierung von Adenosin in den hier durchgeführten Experimenten aufgrund der Inhibition von Ektonukleotidasen vermindert war.

Insgesamt führen die Ergebnisse dieser Arbeit, basierend auf der jeweiligen experimentellen Vorgehensweise, zu folgenden Hypothesen der ATP-vermittelten Neuromodulation im *Bulbus olfactorius*:

Mithilfe der Photoapplikation aus *caged* ATP wurden folgende Erkenntnisse über die Wirkweise von ATP gewonnen:

- I. ATP aktiviert eine Subpopulation juxtaglomerulärer Neurone direkt über P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren.
- II. Die Aktivierung dieser Neurone führt in der Summe zu einer exzitatorischen Reaktion in Mitralzellen.
- III. Die Kommunikation im Netzwerk und zur Mitralzelle ist unabhängig der Prinzipaltransmitter Glutamat und GABA und wird über einen noch unbekanntem Mechanismus oder Neurotransmitter vermittelt.

Die Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren durch endogen freigesetztes ATP führt zu folgenden Schlussfolgerungen:

- I. ATP wird tonisch freigesetzt und moduliert Netzwerkdynamiken im Ruhezustand.
- II. Bei evozierter Netzwerkaktivität führt ATP in der Summe zu einer Verringerung der Erregbarkeit von Mitralzellen - möglicherweise über die Aktivierung inhibitorischer Interneurone.
- III. ATP vermittelt möglicherweise eine Modulation von Kaliumkanälen in Mitralzellen.

Zusammengefasst ist die Konsequenz der Aktivierung P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängiger Signalwege auf den *output* des olfaktorischen *Bulbus* sicherlich noch nicht abschließend beurteilbar. Offenbar werden durch die Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren im Netzwerk aber

die Phasen hoher Erregbarkeit im Ruhezustand häufiger. Im Gegensatz dazu werden Mitralzellen während und direkt nach der Erregung durch eingehende evozierte sensorische Signale eher inhibiert. Darüber hinaus werden die Aktionspotentiale von Mitralzellen zeitlich geschärft. Diese Befunde könnten darauf hindeuten, dass P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängige Signalwege möglicherweise zu bestimmten zeitlichen Erregungsmustern im glomerulären Netzwerk beitragen.

#### 4.1.5 Die Photoapplikation von ATP öffnet eine unspezifische Kationenleitfähigkeit in Mitralzellen

Wie im vorigen Abschnitt dargelegt, hat ATP auf Netzwerkebene offenbar einen entscheidenden Einfluss auf die synaptische Integration sensorischen *inputs*. Darüber hinaus wird vermutlich auch die Mitralzelle selber durch endogen freigesetztes ATP in ihren Eigenschaften beeinflusst, indem die Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren möglicherweise zu einer Modulation von Kaliumkanälen führt. Die Photoapplikation von ATP bzw. ADP führte aber offenbar ebenso zu einer direkten Modulation, die unter diesen Bedingungen aber vermutlich auf einer P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Aktivierung einer unspezifischen Kationenleitfähigkeit beruht und in einer TTX-resistenten, unterschwelligen Depolarisation sichtbar war (Abbildung 22). Die vermeintliche Diskrepanz der direkten Modulation von Mitralzellen bei Photoapplikation und bei endogener Freisetzung von ATP könnte vom Zustand der Mitralzelle abhängen - also ob die Zelle sich im Moment der ATP-Freisetzung in Ruhe bzw. in einer überschweligen Depolarisation befindet. Wie zuvor dargelegt, könnte es sich bei den durch endogen freigesetztes ATP modulierten Kaliumkanälen möglicherweise um spannungssensitive Kanäle handeln, die erst durch die überschwellige Depolarisation (*upstates*) der Mitralzelle aktiviert werden. Da Mitralzellen aber in Anwesenheit von TTX intrinsisch keine Membranpotential-Oszillationen mit überschweligen *upstates* generieren, würde entsprechend auch keine Modulation solcher Kaliumkanäle sichtbar sein. Andererseits wäre denkbar, dass auch hier die Menge des freigesetzten ATPs entscheidend ist, welche Ionenkanäle sensitiver auf die ATP-abhängige Modulation ansprechen.

Nichtsdestotrotz lassen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf schließen, dass die durch Photoapplikation von ATP-induzierte Kationenleitfähigkeit in Mitralzellen durch das Öffnen von Kanälen mit einem Umkehrpotential zwischen -18 bzw. -25 mV vermittelt wird (Abbildung 24, Abbildung 25). In der Literatur ist eine Interaktion von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren und Kationenströmen zwar selten beschrieben, konnte jedoch einige Male eindeutig nachgewiesen werden. So zeigten O'Grady *et al.* (1996) eine P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelte Aktivierung einwärts-rektifizierender Kationenströme in *Xenopus* Oocyten und in hippocampalen akuten Schnittpräparaten wurde eine nicht näher definierte, exzitatorische

P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-abhängige Kationenleitfähigkeit in inhibitorischen Interneuronen beobachtet (Kawamura *et al.*, 2004). Unspezifische Kationenströme können mitunter von TRP- (*transient receptor potential*) Kanälen vermittelt werden. Eine Interaktion von purinergen Rezeptoren und TRP-Kanälen ist bisher allerdings nur im peripheren Nervensystem beschrieben. So führte die Aktivierung von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren in Neuronen des Dorsalganglions zu einer Verstärkung von TRPV1-abhängigen Strömen (Moriyama *et al.*, 2003) und in Satelittenzellen konnte eine Interaktion von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren mit TRPV4-Kanälen beobachtet werden (Rajasekhar *et al.*, 2015). Im olfaktorischen *Bulbus* konnten molekularbiologisch bisher alle Mitglieder der verschiedenen TRP-Kanalfamilien, bis auf den Subtyp TRPV5, nachgewiesen werden (Dong *et al.*, 2012). Der TRPC4-Kanal ist dabei mutmaßlich der am stärksten exprimierte TRP-Kanal (Zechel *et al.*, 2007). Die physiologische Rolle von TRP-Kanälen bei der Verarbeitung der Geruchsinformationen ist bisher noch weitestgehend ungeklärt. Stroh *et al.* (2012) zeigten jedoch eine Beteiligung von TRPC1 und TRPC4 bei der reziproken synaptischen Übertragung zwischen Mitral- und Körnerzellen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Gruppe 1 metabotropen Glutamaterezeptoren (mGluR1) in eTC zu einer Verstärkung von Calcium-abhängigen unspezifischen Kationenströmen ( $I_{CAN}$ ) führte (Dong *et al.*, 2009) und die serotonerge Modulation von eTC vermutlich ebenfalls über TRP-Kanäle vermittelt wird (Liu *et al.*, 2012). Außerdem führt die Stimulation von muskarinischen Rezeptoren in Körnerzellen zu einer Depolarisation, die Eigenschaften von  $I_{CAN}$ -Strömen aufweist (Pressler *et al.*, 2007). TRP-Kanäle übernehmen also vermutlich eine wichtige Rolle bei der synaptischen Prozessierung im *Bulbus olfactorius*. Allerdings weisen TRP-Kanäle für gewöhnlich ein Umkehrpotential nahe 0 mV auf (Vennekens *et al.*, 2012), was damit um 18 bzw. 25 mV vom errechneten Umkehrpotential der ATP- bzw. ADP-induzierten Leitfähigkeit in Mitralzellen abweicht.

Unspezifische Kationenleitfähigkeiten können neben TRP-Kanälen auch von HCN- (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*) Kanälen vermittelt werden. Diese liegen mit einem Umkehrpotential von -30 bis -40 mV tatsächlich näher am errechneten Potential der ATP/ADP-induzierten Leitfähigkeit als TRP-Kanäle. HCN-Kanäle werden bei hyperpolarisierten Membranpotentialen aktiviert und durch zyklische Nukleotide moduliert. *In situ*-Hybridisierungen und immunhistochemische Färbungen deuten auf eine starke Expression aller vier bekannten Isoformen von HCN-Kanälen (HCN1-4) im olfaktorischen *Bulbus* hin (Holderith *et al.*, 2003; Notomi und Shigemoto, 2004; Fried *et al.*, 2010). In eTC und PG-Zellen ist HCN1 beispielsweise sowohl im Soma als auch in dendritischen Membranen zu finden (Holderith *et al.*, 2003). HCN-Kanäle sind in viele physiologische Prozesse involviert, z.B. in der Förderung rhythmischer Aktivität, der Modulation von Erregungsschwellen, der Einstellung des Ruhemembranpotentials und der Integration von synaptischen Eingängen (Pape, 1996). Der durch HCN-Kanäle-vermittelte, sogenannte  $I_h$ -Strom ist bisher in nahezu allen Prinzipalneuronen nachgewiesen, unter anderem auch in

einer Subpopulation von Mitralzellen (Angelo und Margrie, 2011). Anhand der biophysikalischen Charakterisierung des von Angelo und Margrie (2011) gemessenen  $I_h$ -Stroms wird dieser vermutlich von HCN2-4 vermittelt und ist verantwortlich für das depolarisierende *sag*-Potential in Mitralzellen.

Ebenfalls konnte eine Bedeutung von HCN-Kanälen auch in einigen Interneuronen gezeigt werden. So wurde ein  $I_h$ -Strom außerdem in TH-positiven Interneuronen (Pignatelli *et al.*, 2013), Körnerzellen (Hu *et al.*, 2016) und ORN (Nakashima *et al.*, 2013) nachgewiesen. HCN-Kanäle scheinen also eine wichtige Rolle im *Bulbus olfactorius* zu spielen. Eine Interaktion von purinergen Rezeptoren und HCN-Kanälen wurde hier bisher allerdings noch nicht gezeigt. HCN-Kanäle werden aber unter anderem über die intrazelluläre cAMP-Konzentration moduliert. So wird die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von HCN-Kanälen durch die Bindung von cAMP ins Positive verschoben und die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals erhöht. Eine Wirkung von aktivierten purinergen Rezeptoren auf den intrazellulären cAMP-Spiegel wurde bisher jedoch nur für P2Y<sub>12</sub>- und P2Y<sub>13</sub>-Rezeptoren beschrieben, die allerdings negativ an die cAMP-Signalkaskade gekoppelt sind. Entsprechend würde die Stimulation von P2Y<sub>12/13</sub>-Rezeptoren also zu einer Stabilisierung des geschlossenen Zustands von HCN-Kanälen führen und die Aktivierungsschwelle in negative Richtung verschieben. Die Spannungen der halbmaximalen Aktivierung von HCN-Kanälen liegen zwischen -70 und -100 mV (Altomare *et al.*, 2003). Die Photolyse von *caged* ATP wurde bei einem Membranpotential von  $-75 \pm 5$  mV (LJP korrigiert) durchgeführt und stimuliert mutmaßlich einen P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor in Mitralzellen. Theoretisch wäre also denkbar, dass die Stimulation von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren die Aktivität von HCN-Kanälen moduliert. Zusammengefasst bleibt aber weitestgehend offen, über welchen Ionenkanal die ATP bzw. ADP-induzierte unspezifische Kationenleitfähigkeit tatsächlich vermittelt wird. Aufschluss hierüber könnte eine pharmakologische Charakterisierung der TTX-insensitiven ATP-Antwort mit Antagonisten mutmaßlich beteiligter unspezifischer Kationenkanäle geben.

#### 4.1.6 VNUT wird in einer Subpopulation juxtaglomerulärer Neurone exprimiert

Die Beladung von Vesikeln mit ATP ist einer der Prozesse, der purinerge Signaltransmission überhaupt erst initiiert. Dabei vermitteln vesikuläre Nukleotidtransporter (VNUT) nicht nur die Beladung (Sawada *et al.*, 2008), sondern sind auch essentiell für die vesikuläre ATP-Freisetzung (Larsson *et al.*, 2012). Im olfaktorischen *Bulbus* wird ATP neben der vesikulären Freisetzung aus den ORN (Thyssen *et al.*, 2010) ebenfalls von Astrozyten, in diesem Fall jedoch über Hemikanäle freigesetzt (Roux *et al.*, 2015). Ob es aber noch weitere Quellen für eine vesikuläre Freisetzung von ATP bzw. Nukleotiden gibt, ist nicht bekannt. Die Ergebnisse

dieser Arbeit zeigen eine VNUT-Expression in TH-positiven, dopaminergen Neuronen der Glomerularschicht (Abbildung 33, Abbildung 34) und weisen damit auf eine vesikuläre Lagerung und exozytotische Freisetzung von ATP aus diesen Zellen hin.

Das Netzwerk eines Glomerulus wird schätzungsweise aus 700 Zellen gebildet: 40 % sind PG-Zellen, 1 % sind sSA-Zellen und 5 % sind eTC. Der Rest (54 %) setzt sich aus Astrozyten, Mikroglia und Zellen des Gefäßsystems zusammen. Verschiedene Studien schätzen, dass innerhalb der PG-Zellpopulation ca. 13-20 % TH-positive Neurone sind, was entsprechend eine Abschätzung der Abundanz VNUT-immunreaktiver Zellen erlaubt (Nagayama *et al.*, 2014). Larsson *et al.* (2012) konnten ebenfalls eine intensive VNUT-Immunreaktivität im olfaktorischen *Bulbus* nachweisen, allerdings ist dort nicht genauer beschrieben in welchen Schichten oder Zellpopulationen die Expression lokalisiert wurde. Im restlichen ZNS ist VNUT außerdem in Neuronen des Cerebellum, Hippocampus, cerebralen Cortex (Larsson *et al.*, 2012) sowie in der *Substantia nigra* und der *Area tegmentalis ventralis* (Ho *et al.*, 2015) weit verbreitet.

TH-positive Neurone wurden lange Zeit ausschließlich den PG-Zellen zugeordnet. Mittlerweile gibt es aber Hinweise darauf, dass einige TH-positive Zellen anhand ihrer Morphologie eher den sSA-Zellen zugeordnet werden sollten. Im Gegensatz zu PG-Zellen besitzen diese keinen Dendritenbaum, der in einen Glomerulus projiziert, sondern lange neuronale Fortsätze über die eine Vielzahl von Glomeruli kontaktiert werden (Kiyokage *et al.*, 2010; Kosaka und Kosaka, 2011). Aufgrund der molekularen Identität könnten die VNUT-exprimierende Zellen in der Glomerularschicht also auch der Zellpopulation der sSA-Zellen angehören. Über ihre intraglomerulären Verschaltungen könnte hiermit ein Mechanismus vermittelt werden, bei dem purinerge Signale mittels ATP-Freisetzung in distale glomeruläre Einheiten transferiert werden können.

Eine Expression von VNUT in eTC kann sowohl aufgrund morphologischer als auch anhand molekularer Merkmale weitestgehend ausgeschlossen werden. eTC werden auf Basis der Expression der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\alpha 1$  und  $\alpha 3$  (Panzanelli *et al.*, 2005) sowie anhand der vesikulären Glutamatttransporter VGLUT2 und VGLUT3 (Tatti *et al.*, 2014) in Subpopulationen eingeteilt. Tatti *et al.* (2014) zeigten zwar, dass VGLUT3-positive Zellen zum Teil auch eine Immunreaktivität gegen TH aufwiesen, diese war jedoch nur in einigen wenigen Zellen vorhanden. Die Ko-Expression von VGLUT3 und Calbindin war hingegen deutlich höher. Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch in den hier durchgeführten Antikörperfärbungen ein nicht näher bestimmbarer Teil der Calbindin-positiven Zellen zu den eTC zählt.

Fraglich bleibt, warum keine eindeutige Immunreaktivität gegen VNUT in der Nervenfaserschicht detektiert werden konnte, obwohl die vesikuläre Freisetzung von ATP aus ORN-Axonen physiologisch nachgewiesen ist (Thyssen *et al.*, 2010). Überhaupt ist

überraschend, dass VNUT und damit die vesikuläre Lagerung und Freisetzung von ATP nur in einer Subpopulation von Neuronen gefunden werden konnte. Diese Zellen machen zwar 15–20 % der PG-Zellen aus, dennoch wird in der purinergen Forschung häufig die Meinung vertreten, dass ATP an jeder Synapse als Ko-Transmitter ausgeschüttet wird. Eine mögliche Erklärung wäre, dass andere potentiell ATP-freisetzende Zellen und auch die ORN einen bisher unidentifizierten ATP-Transporter exprimieren. Bisher konnte zwar nur ein Gen identifiziert werden, was für VNUT kodiert (SLC17A9). Allerdings weisen die Mitglieder der SCL17 Genfamilie, zu der auch vesikuläre Glutamattransporter sowie Transporter für exzitatorische Aminosäuren und Phosphattransporter gehören, eine hohe phylogenetische Verwandtschaft und strukturelle Ähnlichkeiten auf (Sreedharan *et al.*, 2010). Da lange noch nicht alle der zur SLC17-Familie gehörenden Transporter auch funktionell charakterisiert sind, ist es daher sehr wahrscheinlich, dass auch noch weitere vesikuläre ATP-Transporter existieren. Des Weiteren gibt es eine Vielzahl von anderen Freisetzungsmechanismen für ATP, beispielsweise über Pannexine, Connexine oder volumenregulierte Cl<sup>-</sup>-Anionenkanäle. Über diese Mechanismen wird ATP zwar überwiegend aus Astrozyten freigesetzt (Lazarowski, 2012), dennoch können diese auch für Neurone im olfaktorischen *Bulbus* nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus könnte VNUT in anderen Zellen in sehr viel geringerem Maß exprimiert sein, sodass die Proteinmenge unter der Nachweisgrenze des Antikörpers liegt.

Welche funktionellen Auswirkungen die VNUT-Expression in juxtaglomerulären Neuronen hat, ob diese tatsächlich ATP oder möglicherweise andere Nukleotide freisetzen und welche Signalwege hierdurch induziert werden, ist bisher noch völlig offen. In jedem Fall deutet die Ko-Lokalisation von TH und VNUT aber darauf hin, dass es sich bei den VNUT-immunreaktiven Zellen um dopaminerge Neurone handelt und ATP (bzw. andere Nukleotide) vermutlich als Ko-Transmitter zusammen mit Dopamin ausgeschüttet wird. Welche Bedeutung dopaminerge Neurone bei der Prozessierung olfaktorischer Information haben, ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Im zentralen Nervensystem wird dopaminergen Neuronen oft die Fähigkeit zugesprochen, auch bei Abwesenheit synaptischer Aktivität rhythmisch Aktionspotentiale zu generieren (Grace und Onn, 1989; Feigenspan *et al.*, 1998). Diese Eigenschaft trifft auch auf dopaminerge Neurone in der Glomerularschicht zu (Pignatelli *et al.*, 2005). Im olfaktorischen *Bulbus* wirkt Dopamin intraglomerulär typischerweise inhibitorisch, in dem es über präsynaptische D2-Rezeptoren die Glutamatfreisetzung aus ORN-Axonterminalen vermindert und damit die Exzitation der Projektionsneurone herabsetzt (Brünic *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu wird interglomerulär bei Ko-Freisetzung von Dopamin und GABA aus sSA-Zellen nach einer initialen GABAergen Inhibition eine D1-Rezeptor-vermittelt Exzitation in eTC hervorgerufen (Liu *et al.*, 2013). Hinweise auf ein Zusammenspiel von dopaminergen und purinergen Signalwege liefern

mehrere Studien. So konnte VNUT auch in der Retina in dopaminergen Neuronen nachgewiesen werden (Ho *et al.*, 2015) und in Teilen des Mittelhirns wurde die Ko-Transmission von ATP und Dopamin ebenfalls beschrieben (Krügel *et al.*, 2003). Außerdem wurde in dopaminergen Neuronen des Mittelhirns neben der präsynaptischen Expression von purinergen Rezeptoren auch eine Ko-Expression von Dopamin-Rezeptoren und purinergen Rezeptoren in Zellen, die dopaminergen *input* erhalten, gezeigt (Amadio *et al.*, 2007a; Morin und Di Paolo, 2014). Des Weiteren sind purinerge Signalwege in neurologischen Störungen, die auf einer Dysregulation dopaminergener Zellen beruhen, involviert (Kulisevsky und Poyurovsky, 2012). Zusammengefasst scheinen dopaminerge und purinerge Systeme im gesamten ZNS eng aneinander gekoppelt zu sein. Analog zu dieser Annahme konnte die VNUT-Expression auch im *Bulbus olfactorius* in TH-positiven Neuronen gefunden werden. Ob und wie ATP oder seine Metabolite das dopaminerge System im olfaktorischen *Bulbus* modulieren, ist jedoch nicht bekannt.

## 4.2 ADENOSIN ALS MODULATOR SYNAPTISCHER TRANSMISSION IM *BULBUS OLFACTORIUS*

### 4.2.1 Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptoren vermitteln eine Modulation der synaptischen Transmission an reziproken Synapsen im *Bulbus olfactorius*

Der Einfluss purinergener Modulationsmechanismen an reziproken Synapsen wurde auf Basis der rekurrenten Inhibition (RI) in Mitralzellen untersucht. In meiner Masterarbeit (Schulz, 2014) konnte ich zeigen, dass Adenosin den synaptischen Kreislauf an reziproken Synapsen durch eine Modulation der Glutamatausschüttung aus Mitralzellen beeinflusste, was letztendlich zu einer Verminderung der RI führte. In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung, über welche Mechanismen diese Modulation vermittelt wird. Dabei konnte zunächst gezeigt werden, dass eine präsynaptische Aktivierung von A<sub>1</sub>-Rezeptoren den synaptischen Kreislauf an rekurrenten Synapsen beeinflusst (Abbildung 37).

A<sub>1</sub>-Rezeptoren können an verschiedene G-Proteine gekoppelt sein (Cunha, 2001). Am weitesten verbreitet ist jedoch die Kopplung mit G<sub>αi</sub>-Proteinen, sodass bei Aktivierung der Rezeptoren die cAMP-Signalkaskade negativ moduliert wird (van Calker *et al.*, 1978; Ebersolt *et al.*, 1983). Es gibt einige Hinweise darauf, dass intrazelluläre cAMP-abhängige Signaltransduktionsmechanismen eine Wirkung auf die Transmitterausschüttung haben können. So wird in CA1-Neuronen des Hippocampus Adenosin-bedingt die Transmitterausschüttung aufgrund einer Interaktion mit der cAMP-abhängigen PKA inhibiert (Jeong *et al.*, 2003). An der Moosfasersynapse im Hippocampus konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen Adenosin und der Aktivität der PKA nachgewiesen werden,

obwohl auch hier eine  $A_1$ -Rezeptor-vermittelte Inhibition der präsynaptischen Transmitterfreisetzung gezeigt wurde (Gundfinger *et al.*, 2007).

Typischerweise wird die Transmitterfreisetzung aus Neuronen maßgeblich über den präsynaptischen Calciuminflux gesteuert, welcher über verschiedenen Klassen spannungsabhängiger Calciumkanäle vermittelt wird (N-, L-, P/Q-, T- sowie R-Typ-Calciumkanäle). An den meisten Synapsen des ZNS werden mehrere Calciumkanaltypen ko-exprimiert, sodass deren Zusammenwirken zur synergistischen Kontrolle der Neurotransmitterausschüttung führt. Für Neuromodulatoren besteht deshalb ein weit verbreiteter und effizienter Weg, die Transmitterfreisetzung zu beeinflussen, in der Modulation solcher Calciumkanäle.

#### 4.2.2 Adenosin inhibiert Calciumströme in Mitralzellen

Tatsächlich zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine prominente Inhibition von HVACCs in Mitralzellen (Abbildung 38, Abbildung 40). Dabei werden die Calciumströme einer Mitralzelle größtenteils durch P/Q-Typ-Calciumkanäle ( $Ca_v2.1$ ), zu einem geringeren Teil durch L-Typ-Calciumkanäle ( $Ca_v1$ ) und nur zu einem kleinen Teil durch N-Typ-Calciumkanäle vermittelt ( $Ca_v2.2$ ; Abbildung 39). Trotz des geringen Anteils des N-Stroms am Gesamtcalciumstrom einer Mitralzelle scheinen diese Kanäle jedoch das primäre Ziel der adenosinergen Modulation zu sein, da sie durch Adenosin fast vollständig blockiert werden. Eine Kopplung von  $A_1$ -Rezeptoren an N-Typ-Calciumkanäle konnte bereits in hippocampalen Neuronen der CA1- und CA3-Region, in Ganglienzellen der Retina und in Neuronen des sympathischen Systems sowie des Hirnstamms gezeigt werden (Umemiya und Berger, 1994; Wu und Saggau, 1994; Sun *et al.*, 2002; Gundfinger *et al.*, 2007).  $A_1$ -Rezeptoren können den Calciuminflux aber auch über eine Inhibition anderer Calciumkanaltypen beeinflussen. Im Hippocampus zeigten Gundfinger *et al.* (2007), dass  $A_1$ -Rezeptoren neben der Inhibition des N-Stroms ebenso Calciumkanäle des P/Q-Typ modulieren und beides zu einer verminderten Neurotransmitterfreisetzung beitrug. Auch in dieser Arbeit konnte eine adenosinerge Inhibition isolierter P/Q-Typ-Ströme nachgewiesen werden. Diese war, verglichen mit dem Effekt von Adenosin auf N-Ströme, jedoch deutlich schwächer. Dies lässt vermuten, dass P/Q-Typ-Calciumkanäle in Mitralzellen weniger sensitiv für eine adenosinerge Modulation sind als N-Typ-Calciumkanäle. In der hippocampalen Moosfasersynapse werden hingegen beide Calciumkanaltypen zu ähnlichen Teilen via  $A_1$ -Rezeptoren inhibiert (Gundfinger *et al.*, 2007).

Eine Modulation von L-Typ-Calciumkanälen scheint in Mitralzellen hingegen nicht vorzuliegen. Im peripheren Nervensystem wurde eine  $A_1$ -Rezeptor-vermittelte Inhibition von L-Typ-Calciumkanälen in Herzmuskelzellen intensiv erforscht und scheint auch in chemosensorischen Zellen des *Glomus caroticum* von Bedeutung zu sein (Qu *et al.*, 1993;

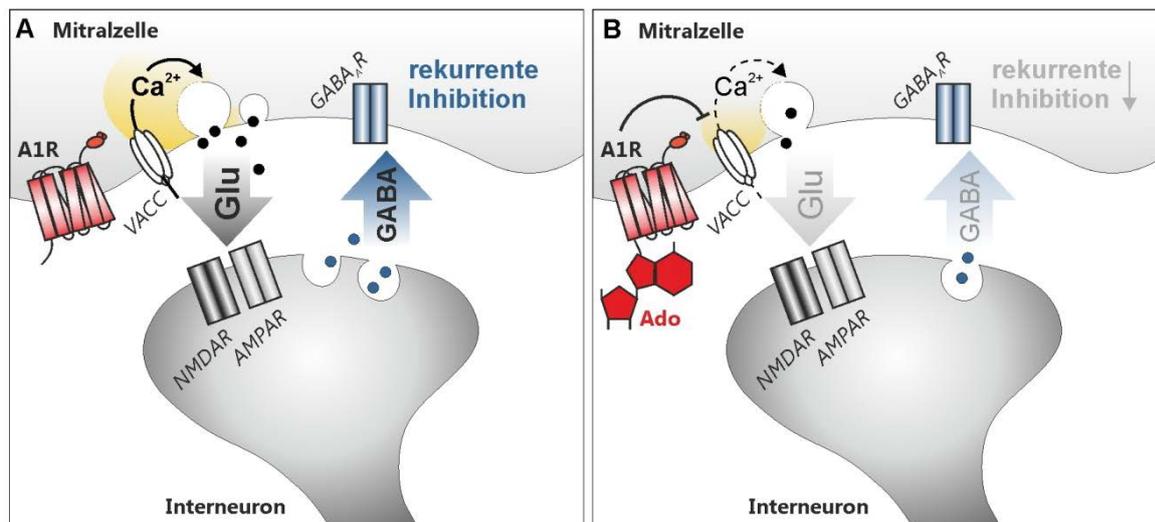
Belardinelli *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1998; Rocher *et al.*, 1999). Im ZNS und vor allem im Gehirn sind L-Typ Calciumkanäle überwiegend an Somata und durchaus auch an Axonen und Dendriten lokalisiert, werden in der Regel aber nicht präsynaptisch exponiert (Catterall, 1998; Furukawa, 2013; Zamponi *et al.*, 2015) und beeinflussen daher auch nur selten die Freisetzung von Neurotransmittern. Dies könnte Grund dafür sein, dass L-Typ-Calciumkanäle im Allgemeinen viel seltener Ziel adenosinerger Modulation sind als andere HVACC. Überhaupt scheinen L-Typ-Calciumkanäle an rekurrenten Synapsen im *Bulbus olfactorius* keine große Rolle zu spielen. Die RI in Mitralzellen kann durch die Blockade von N-Typ- und P/Q-Typ-Calciumkanälen vollständig inhibiert werden. Dies deutet darauf hin, dass präsynaptische L-Typ-Calciumkanäle auch bei dieser Form der synaptischen Übertragung nicht von Bedeutung sind (Isaacson, 2001) und daher auch in den hier durchgeführten Experimenten nicht durch Adenosin beeinflusst wurden.

Neben HVACC sind in Mitralzellen auch Calciumkanaltypen beschrieben, die bereits bei weniger positiven Spannungen aktivieren. So tragen T-Typ-Calciumkanäle ( $Ca_v3$ ) zwar zur Glutamatfreisetzung aus Mitralzellen bei (Fekete *et al.*, 2014), sind jedoch hauptsächlich am apikalen Dendriten lokalisiert (Johnston und Delaney, 2010). Die reziproken Synapsen zwischen Mitralzellen und Parvalbumin-Interneuronen sowie zwischen Mitral- und Körnerzellen sind allerdings an den lateralen Dendriten lokalisiert. Da diese Synapsen mutmaßlich den Großteil der RI in Mitralzellen vermitteln (Schoppa und Urban, 2003; Uchida *et al.*, 2013), dürfte eine potentielle Interaktion des  $A_1$ -Rezeptors mit T-Typ-Calciumkanälen an den hier untersuchten Effekten höchstens eine untergeordnete Rolle spielen.

RI beruht auf der Freisetzung von Neurotransmittern auf beiden Seiten der reziproken Synapse. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse implizieren eine Modulation der präsynaptischen Funktion der Mitralzelle bei der die Adenosin-bedingte Inhibition der Calciumkanäle eine verminderte Freisetzung von Glutamat zu Folge hat (Schulz, 2014). Den folgenden synaptischen Kreislauf betreffend kommt es also zu einer Reduzierung der glutamatergen Eingänge in die beteiligten Interneurone. Dies führt damit indirekt zu einer verringerten GABAergen synaptischen Aktivität, was wiederum in einer Reduzierung der RI resultiert. Eine schematische Darstellung dieses Mechanismus ist in Abbildung 44 gezeigt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Reduktion der RI teilweise auch durch eine adenosinerge Modulation der Körnerzellen hervorgerufen wird. Für lange Zeit wurde angenommen, dass die RI in Mitralzellen fast ausschließlich von Körnerzellen vermittelt wird. Körnerzellen bilden die größte Population lokaler Interneurone und sind mit ihren Somata in der am tiefsten gelegenen Schicht des olfaktorischen *Bulbus* lokalisiert. Dabei sind sie in Paketen von drei bis fünf Zellen angeordnet und synchronisieren ihre Aktivität untereinander über *gap junctions* (Reyher *et al.*, 1991). Körnerzellen senden ihre Dendriten in unterschiedliche Schichten der externen plexiformen Schicht und kontaktieren

dort die lateralen Dendriten von Mitral- und *tufted*-Zellen (Mouradian und Scott, 1988). Dabei bilden Körnerzellen mono-glomerulare Kolumnen unterhalb von Mitralzellen, die in denselben Glomerulus projizieren. Aufgrund der Konvergenz des synaptischen Systems können sie daher als Verlängerung einer glomerularen Einheit betrachtet werden und tragen zu einer geruchsspezifischen Prozessierung der Information bei (Willhite *et al.*, 2006). Die synaptischen Verbindungen zwischen Mitralzellen und Parvalbumin-Interneuronen weisen hingegen räumlich und auch funktionell eine viel breitere Konnektivität auf und werden daher vermutlich nicht in Abhängigkeit spezifischer Düfte aktiviert, tragen nach neueren Erkenntnissen aber genauso zur RI in Mitralzellen bei (Kato *et al.*, 2013; Miyamichi *et al.*, 2013). Durch pharmakologische Manipulation konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl die reziproke Synapse zwischen Mitral- und Körnerzellen als auch zwischen Mitralzellen und Parvalbumin-Interneuronen isoliert werden (Abbildung 41, Abbildung 42). An beiden Synapsen bewirkte Adenosin eine Verringerung der RI bis zu 35 %. A<sub>1</sub>-Rezeptoren scheinen daher nicht zwischen diesen beiden Kreisläufen zu unterscheiden, womit die adenosinerge Modulation der RI vermutlich unabhängig von der geruchsspezifischen Aktivierung synaptischer Netzwerke stattfindet.

Reziproke Synapsen befinden sich allerdings nicht nur an den lateralen Dendriten der Mitralzellen, sondern auch am distalen apikalen *tuft*. Hier erhalten die Mitralzellen reziproke GABAerge Eingänge von PG-Zellen (Toida, 2008). Welchen Anteil die jeweiligen dendritischen Komplexe unter physiologischen Bedingungen zur gesamten RI einer Mitralzelle beitragen, ist bisher noch nicht untersucht. Allerdings gibt es aus eigenen Arbeiten und aus der Literatur Hinweise, die auf die lateralen Dendriten als Ursprung der RI hinweisen. So hatte das Vorhandensein eines Mitralzell*tufts* auf die Größe der RI in Mitralzellen keinen signifikanten Einfluss (Abbildung 36). Ein Großteil der spontanen synaptischen Eingänge einer Mitralzelle ist zudem auf GABAerge Aktivität zurückzuführen. Unter Blockade ionotroper Glutamaterezeptoren verringern sich diese GABAergen Eingänge allerdings deutlich. Dies weist darauf hin, dass zumindest ein Teil dieser Eingänge rekurrenter Natur ist und entsprechend wegfällt, wenn die glutamaterge Erregung unterdrückt wird. Daten aus dem eigenen Labor (unveröffentlicht) zeigen, dass die Anzahl solcher Eingänge ebenfalls nicht in Verbindung mit dem Vorhandensein eines apikalen *tufts* zu stehen scheint. Dies wiederum würde bedeuten, dass GABAerge synaptische Aktivität aus dem Glomerulus nur geringfügig zur Gesamtanzahl synaptischer Eingänge beiträgt. Zwar handelt es sich hierbei um spontane synaptische Signale, dennoch weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass GABAerge Eingänge hauptsächlich über die lateralen dendritischen Komplexe in die Mitralzelle eingehen.



**Abbildung 44: Hypothetisches Modell der adenosinergen Modulation reziproker Synapsen in Mitralzellen. A)** Mechanismus der rekurrenten Inhibition. **B)** Adenosin aktiviert  $A_1$ -Rezeptoren in Mitralzeldendriten, was zu einer Inhibition spannungsgesteuerter Calciumkanäle führt. Dies beeinflusst den folgenden synaptischen Kreislauf dahingehend, dass die Mitralzelle weniger Glutamat freisetzt. Die konsekutive reduzierte Exzitation umliegender Interneurone vermindert die GABA-Freisetzung und damit auch die RI der Mitralzelle.

Adenosin wurde in dieser Arbeit in einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  über die Badperfusion in die Präparate eingewaschen. Unter physiologischen Bedingungen vermutet man eine basale Adenosinkonzentration von  $50 - 200 \text{ nM}$  im Gewebe. Diese kann sich in neuronalem Gewebe bei experimentell evozierter Freisetzung, je nach Stimulus, bis zum 10-fachen erhöhen; bei pathologischen Zuständen sogar bis zum 46-fachen (Latini und Pedata, 2001). Adenosin kann grundsätzlich von jeder Zelle über bidirektionale Nukleosidtransporter in den Extrazellulärraum abgegeben werden und konsekutiv neuromodulatorische Effekte ausüben (Parkinson *et al.*, 2011). Üblicher ist jedoch, dass Nukleotide zellulär freigesetzt werden und Adenosin über den enzymatischen Abbau von ATP generiert wird. Im *Bulbus olfactorius* konnte eine endogene Quelle für extrazelluläres Adenosin bisher aber noch nicht identifiziert werden, wobei es aber grundsätzlich zwei Möglichkeiten gibt. Bei starker Stimulation der ORN wird an den Axonterminalen Glutamat zusammen mit ATP ausgeschüttet (Thyssen *et al.*, 2010). Durch die hohe Aktivität der Ektonukleotidasen in diesem Gewebe wird das ATP innerhalb kürzester Zeit abgebaut und Adenosin bereitgestellt. Dieses führt  $A_{2A}$ -Rezeptorvermittelt in jedem Fall zu Calciumsignalen in periglomerulären Astrozyten (Doengi *et al.*, 2008). Unwahrscheinlich ist jedoch, dass das Adenosin bis in die externe plexiforme Schicht diffundiert. Daher wird über die ATP-Freisetzung aus Axonterminalen im Glomerulus also vermutlich nicht ausreichend Adenosin bereitgestellt, um reziproke Synapsen in der externen plexiformen Schicht zu modulieren. Mittlerweile gibt es aber Daten, die eine mögliche Quelle für das Vorkommen von Adenosin in dieser Schicht aufzeigen. Es konnte gezeigt werden,

dass Astrozyten im *Bulbus olfactorius* nicht nur selbst auf Nukleotide und Nukleoside reagieren, sondern diese auch ausschütten (Lohr *et al.*, 2014). Roux *et al.* (2015) zeigten beispielsweise eine astrozytäre Freisetzung von ATP über Hemikanäle, was durch den enzymatischen Abbau ebenso als Quelle für Adenosin dienen kann. Beispiele aus anderen Hirngebieten zeigen darüber hinaus noch weitere Möglichkeiten der Adenosin-Freisetzung: so konnte im Cortex sogar eine direkte Freisetzung von Adenosin aus Neuronen gezeigt werden (Lohr *et al.*, 2014; Lovatt *et al.*, 2012).

Die purinerge Transmission wird beendet, indem Adenosin entweder über die Aktivität der Adenosindesaminase (ADA) zu Inosin katalysiert oder über die Adenosinkinase zu AMP phosphoryliert wird. Außerdem ist bekannt, dass Astrozyten Adenosintransporter besitzen und extrazelluläres Adenosin innerhalb kurzer Zeit aus dem synaptischen Spalt entfernen (Boison *et al.*, 2010). Interessanterweise ist die Aktivität der ADA im *Bulbus olfactorius* von Ratten besonders hoch (Geiger und Nagy, 1987). Welche Adenosin-Endkonzentration in den dargestellten Experimenten also tatsächlich am A<sub>1</sub>-Rezeptor vorlag bleibt daher offen, da diese letztendlich aus dem Zusammenspiel der Aktivität der ADA bzw. Adenosinkinase, der Expression von Nukleosidtransportern an den synaptischen Verbindungen aber auch durch die Lage der Zellen im Gewebe bestimmt wird.

Die korrekte Prozessierung der eingehenden Geruchsinformation im *Bulbus olfactorius* basiert auf einem außerordentlich fein abgestimmten Gleichgewicht zwischen Exzitation und Inhibition. Besonders tragen aber inhibitorische Netzwerke zur Kontrastverschärfung und Differenzierung von Reizmustern bei (Shepherd *et al.*, 2007). In verschiedenen Verhaltensstudien an Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Störung dieser Netzwerke direkt zu einer Veränderung von Verhaltensmustern führt. Ist beispielsweise die  $\beta$ 3-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors auf Interneuronen funktionsunfähig und die Körnerzell-spezifische GABAerge Inhibition damit gestört, können komplexere Duftgemische weniger gut unterschieden werden (Nusser *et al.*, 2001). Die Deletion der GluA2-Untereinheit in Körnerzellen führte aufgrund des daraus resultierenden vermehrten Calciumeinstroms in die Körnerzelle und konsekutiv erhöhter GABAerger Aktivität hingegen zu einer verstärkten RI in Mitralzellen. In Verhaltensversuchen äußerte sich dies in der Verbesserung der Fähigkeit, Duftgemische voneinander zu unterscheiden (Abraham *et al.*, 2010). Werden Channelrhodopsin-exprimierende Körnerzellen mittels Lichtimpulsen aktiviert und deren Aktivität erhöht, führte auch dies zur Verbesserung der Geruchsdiskriminierung. Die pharmakologische Inhibition von Körnerzellen hatte entsprechend eine Verschlechterung dieser Fähigkeit zur Folge (Gschwend *et al.*, 2015). Inhibitorische Netzwerke nutzen allerdings nicht nur der Unterscheidung von Gerüchen, sondern beeinflussen auch die Detektionsschwellen eines Geruchs. So führte beispielsweise der *knock out* des Glycoproteins 5T4 und der damit einhergehende Funktionsverlust einer Subpopulation von

Körnerzellen zu einer erhöhten Detektionsschwelle für Gerüche (Takahashi *et al.*, 2016). Aus den genannten Beispielen wird die Bedeutung inhibitorischer Netzwerke und damit auch die der RI in Mitralzellen deutlich. Die adenosinerge Modulation reziproker Synapsen als Bestandteile inhibitorischer Netzwerke hat daher mutmaßlich einen großen Einfluss auf die Verarbeitung von Geruchsinformationen.

## 5. REFERENZEN

- Abraham** NM, Egger V, Shimshek DR, Renden R, Fukunaga I, Sprengel R, Seeburg PH, Klugmann M, Margrie TW, Schaefer AT, Kuner T (2010) Synaptic inhibition in the olfactory bulb accelerates odor discrimination in mice. *Neuron* 65:399–411.
- Adipietro** KA, Mainland JD, Matsunami H (2012) Functional evolution of mammalian odorant receptors. *PLoS Genet* 8:e1002821.
- Alexander** SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Catterall WA, Spedding M, Peters JA, Harmar AJ (2013) The concise guide to pharmacology 2013/14. Ion channels. *Br J Pharmacol* 170:1607–1651.
- Altomare** C, Terragni B, Brioschi C, Milanese R, Pagliuca C, Viscomi C, Moroni A, Baruscotti M, DiFrancesco D (2003) Heteromeric HCN1-HCN4 channels. A comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol (Lond)* 549:347–359.
- Amadio** S, Montilli C, Picconi B, Calabresi P, Volonté C (2007a) Mapping P2X and P2Y receptor proteins in striatum and substantia nigra. An immunohistological study. *Purinergic Signal* 3:389–398.
- Amadio** S, Vacca F, Martorana A, Sancesario G, Volonté C (2007b) P2Y1 receptor switches to neurons from glia in juvenile versus neonatal rat cerebellar cortex. *BMC Dev Biol* 7:77.
- Anderson** CM, Bergher JP, Swanson RA (2004) ATP-induced ATP release from astrocytes. *J Neurochem* 88:246–256.
- Angelo** K, Margrie TW (2011) Population diversity and function of hyperpolarization-activated current in olfactory bulb mitral cells. *Sci Rep* 1:50.
- Anselmi** F, Hernandez VH, Crispino G, Seydel A, Ortolano S, Roper SD, Kessarar N, Richardson W, Rickheit G, Filippov MA, Monyer H, Mammano F (2008) ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca<sup>2+</sup> signals across the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18770–18775.
- Aquino-Miranda** G, Osorio-Espinoza A, Escamilla-Sánchez J, González-Pantoja R, Ortiz J, Arias-Montaña J-A (2012) Histamine H<sub>3</sub> receptors modulate depolarization-evoked <sup>3</sup>H-noradrenaline release from rat olfactory bulb slices. *Neuropharmacology* 62:1127–1133.
- Asano** T, Shinohara H, Morishita R, Norota I, Kato K, Endoh M (1995) The G-protein G(o) in mammalian cardiac muscle. Localization and coupling to A1 adenosine receptors. *J Biochem* 117:183–189.
- Aungst** JL, Heyward PM, Puche AC, Karnup SV, Hayar A, Szabo G, Shipley MT (2003) Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature* 426:623–629.
- Axel** R (1995) The molecular logic of smell. *Sci Am* 273:154–159.
- Baurand** A, Raboisson P, Freund M, Léon C, Cazenave JP, Bourguignon JJ, Gachet C (2001) Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 412:213–221.
- Belardinelli** L, Shryock JC, Song Y, Wang D, Srinivas M (1995) Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. *FASEB J* 9:359–365.
- Bo** X, Zhang Y, Nassar M, Burnstock G, Schoepfer R (1995) A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett* 375:129–133.
- Bodin** P, Burnstock G (2001) Purinergic signalling. ATP release. *Neurochem Res* 26:959–969.
- Bodor** ET, Waldo GL, Hooks SB, Corbitt J, Boyer JL, Harden TK (2003) Purification and functional reconstitution of the human P2Y12 receptor. *Mol Pharmacol* 64:1210–1216.
- Bogdanov** YD, Wildman SS, Clements MP, King BF, Burnstock G (1998) Molecular cloning and characterization of rat P2Y4 nucleotide receptor. *Br J Pharmacol* 124:428–430.
- Boison** D, Chen J-F, Fredholm BB (2010) Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death Differ* 17:1071–1082.
- Boyer** JL, Zohn IE, Jacobson KA, Harden TK (1994) Differential effects of P2-purinoceptor antagonists on phospholipase C- and adenylyl cyclase-coupled P2Y-purinoceptors. *Br J Pharmacol* 113:614–620.
- Brill** J, Shao Z, Puche AC, Wachowiak M, Shipley MT (2016) Serotonin increases synaptic activity in olfactory bulb glomeruli. *J Neurophysiol* 115:1208–1219.
- Broussard** GJ, Liang R, Tian L (2014) Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators. *Front Mol Neurosci* 7:97.
- Brüning** I, Sommer M, Hatt H, Bormann J (1999) Dopamine receptor subtypes modulate olfactory bulb gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2456–2460.
- Buck** L, Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors. A molecular basis for odor recognition. *Cell* 65:175–187.
- Buell** G, Lewis C, Collo G, North RA, Surprenant A (1996) An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J* 15:55–62.
- Burnstock** G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24:509–581.
- Burnstock** G (1976) Purinergic receptors. *J Theor Biol* 62:491–503.
- Burnstock** G (1996) Purinoceptors: Ontogeny and phylogeny. *Drug Development Research* 39:204–242.
- Burnstock** G (2006) Historical review. ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27:166–176.
- Burnstock** G (2007a) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87:659–797.
- Burnstock** G (2007b) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64:1471–1483.
- Burnstock** G (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7:575–590.
- Burnstock** G (2013) Introduction to purinergic signalling in the brain. *Adv Exp Med Biol* 986:1–12.
- Burnstock** G, Fredholm BB, Verkhratsky A (2011) Adenosine and ATP receptors in the brain. *Curr Top Med Chem* 11:973–1011.

- Burnstock G, Verkhratsky A** (2009) Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol (Oxf)* 195:415–447.
- Bushdid C, Magnasco MO, Vosshall LB, Keller A** (2014) Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science* 343:1370–1372.
- Calvin M** (1969) Chemical evolution. *Chem Br* 5:22–28.
- Cang J, Isaacson JS** (2003) In vivo whole-cell recording of odor-evoked synaptic transmission in the rat olfactory bulb. *J Neurosci* 23:4108–4116.
- Castro-Alamancos MA** (2009) Cortical up and activated states. Implications for sensory information processing. *Neuroscientist* 15:625–634.
- Catterall WA** (1998) Structure and function of neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* 24:307–323.
- Cavaco S, Gonçalves A, Mendes A, Vila-Chã N, Moreira I, Fernandes J, Damásio J, Teixeira-Pinto A, Bastos Lima A** (2015) Abnormal Olfaction in Parkinson's Disease Is Related to Faster Disease Progression. *Behav Neurol* 2015:976589.
- Chandaka GK, Salzer I, Drobný H, Boehm S, Schicker KW** (2011) Facilitation of transmitter release from rat sympathetic neurons via presynaptic P2Y<sub>1</sub> receptors. *Br J Pharmacol* 164:1522–1533.
- Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS** (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499:295–300.
- Chen WR, Xiong W, Shepherd GM** (2000) Analysis of relations between NMDA receptors and GABA release at olfactory bulb reciprocal synapses. *Neuron* 25:625–633.
- Cheramy A, Leviel V, Glowinski J** (1981) Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* 289:537–542.
- Chever O, Lee C-Y, Rouach N** (2014) Astroglial connexin43 hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission. *J Neurosci* 34:11228–11232.
- Christie JM, Schoppa NE, Westbrook GL** (2001) Tufted cell dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is dependent on NMDA receptor activity. *J Neurophysiol* 85:169–173.
- Christie JM, Westbrook GL** (2003) Regulation of backpropagating action potentials in mitral cell lateral dendrites by A-type potassium currents. *J Neurophysiol* 89:2466–2472.
- Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro JP, Stojilkovic SS** (2011) Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev* 63:641–683.
- Collo G, North RA, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, Surprenant A, Buell G** (1996) Cloning OF P2X<sub>5</sub> and P2X<sub>6</sub> receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci* 16:2495–2507.
- Cooper EC, Harrington E, Jan YN, Jan LY** (2001) M channel KCNQ2 subunits are localized to key sites for control of neuronal network oscillations and synchronization in mouse brain. *J Neurosci* 21:9529–9540.
- Coppi E, Pedata F, Gibb AJ** (2012) P2Y<sub>1</sub> receptor modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in medium-sized neurons from neonatal rat striatal slices. *J Neurophysiol* 107:1009–1021.
- Cox BC, Liu Z, Lagarde MMM, Zuo J** (2012) Conditional gene expression in the mouse inner ear using Cre-loxP. *J Assoc Res Otolaryngol* 13:295–322.
- Crespo C, Liberia T, Blasco-Ibáñez JM, Nácher J, Varea E** (2013) The circuits of the olfactory bulb. The exception as a rule. *Anat Rec (Hoboken)* 296:1401–1412.
- Cunha RA** (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system. Different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 38:107–125.
- Daly JW, Padgett WL** (1992) Agonist activity of 2- and 5'-substituted adenosine analogs and their N6-cycloalkyl derivatives at A<sub>1</sub>- and A<sub>2</sub>-adenosine receptors coupled to adenylate cyclase. *Biochem Pharmacol* 43:1089–1093.
- DeLuca GC, Joseph A, George J, Yates RL, Hamard M, Hofer M, Esiri MM** (2015) Olfactory Pathology in Central Nervous System Demyelinating Diseases. *Brain Pathol* 25:543–551.
- Diaz-Vegas A, Campos CA, Contreras-Ferrat A, Casas M, Buvinic S, Jaimovich E, Espinosa A** (2015) ROS Production via P2Y<sub>1</sub>-PKC-NOX2 Is Triggered by Extracellular ATP after Electrical Stimulation of Skeletal Muscle Cells. *PLoS ONE* 10:e0129882.
- Ding J, Luo AF, Hu L, Wang D, Shao F** (2014) Structural basis of the ultrasensitive calcium indicator GCaMP6. *Sci China Life Sci* 57:269–274.
- Dittman JS, Regehr WG** (1996) Contributions of calcium-dependent and calcium-independent mechanisms to presynaptic inhibition at a cerebellar synapse. *J Neurosci* 16:1623–1633.
- Doengi M, Deitmer JW, Lohr C** (2008) New evidence for purinergic signaling in the olfactory bulb. A<sub>2A</sub> and P2Y<sub>1</sub> receptors mediate intracellular calcium release in astrocytes. *FASEB J* 22:2368–2378.
- Domercq M, Brambilla L, Pilati E, Marchaland J, Volterra A, Bezzi P** (2006) P2Y<sub>1</sub> receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes. Control by tumor necrosis factor- $\alpha$  and prostaglandins. *J Biol Chem* 281:30684–30696.
- Dong HW, Davis JC, Ding S, Nai Q, Zhou F-M, Ennis M** (2012) Expression of transient receptor potential (TRP) channel mRNAs in the mouse olfactory bulb. *Neurosci Lett* 524:49–54.
- Dong HW, Hayar A, Callaway J, Yang X-H, Nai Q, Ennis M** (2009) Group I mGluR activation enhances Ca<sup>2+</sup>-dependent nonselective cation currents and rhythmic bursting in main olfactory bulb external tufted cells. *J Neurosci* 29:11943–11953.
- Dowling JE** (1968) Synaptic organization of the frog retina. An electron microscopic analysis comparing the retinas of frogs and primates. *Proc R Soc Lond , B, Biol Sci* 170:205–228.
- Dunlap K, Luebke JL, Turner TJ** (1995) Exocytotic Ca<sup>2+</sup> channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci* 18:89–98.
- Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR** (1997) Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci* 17:7673–7682.

- Ebersolt C**, Premont J, Prochiantz A, Perez M, Bockaert J (1983) Inhibition of brain adenylate cyclase by A1 adenosine receptors. Pharmacological characteristics and locations. *Brain Res* 267:123–129.
- Edwards FA** (1994) ATP receptors. *Curr Opin Neurobiol* 4:347–352.
- Egger V**, Svoboda K, Mainen ZF (2003) Mechanisms of lateral inhibition in the olfactory bulb. Efficiency and modulation of spike-evoked calcium influx into granule cells. *J Neurosci* 23:7551–7558.
- Egger V**, Urban NN (2006) Dynamic connectivity in the mitral cell-granule cell microcircuit. *Semin Cell Dev Biol* 17:424–432.
- Ellis-Davies GCR** (2007) Caged compounds. Photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat Methods* 4:619–628.
- Ennis M**, Zhou FM, Ciombor KJ, Aroniadou-Anderjaska V, Hayar A, Borrelli E, Zimmer LA, Margolis F, Shipley MT (2001) Dopamine D2 receptor-mediated presynaptic inhibition of olfactory nerve terminals. *J Neurophysiol* 86:2986–2997.
- Eyre MD**, Antal M, Nusser Z (2008) Distinct deep short-axon cell subtypes of the main olfactory bulb provide novel intrabulbar and extrabulbar GABAergic connections. *J Neurosci* 28:8217–8229.
- Fadool DA**, Levitan IB (1998) Modulation of olfactory bulb neuron potassium current by tyrosine phosphorylation. *J Neurosci* 18:6126–6137.
- Färber K**, Kettenmann H (2006) Purinergic signaling and microglia. *Pflugers Arch* 452:615–621.
- Feigenspan A**, Gustinich S, Bean BP, Raviola E (1998) Spontaneous activity of solitary dopaminergic cells of the retina. *J Neurosci* 18:6776–6789.
- Feil R**, Brocard J, Mascres B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10887–10890.
- Fekete A**, Johnston J, Delaney KR (2014) Presynaptic T-type Ca<sup>2+</sup> channels modulate dendrodendritic mitral-mitral and mitral-periglomerular connections in mouse olfactory bulb. *J Neurosci* 34:14032–14045.
- Fields RD**, Burnstock G (2006) Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7:423–436.
- Filippov AK**, Choi RCY, Simon J, Barnard EA, Brown DA (2006) Activation of P2Y1 nucleotide receptors induces inhibition of the M-type K<sup>+</sup> current in rat hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 26:9340–9348.
- Filippov AK**, Fernández-Fernández JM, Marsh SJ, Simon J, Barnard EA, Brown DA (2004) Activation and inhibition of neuronal G protein-gated inwardly rectifying K(+) channels by P2Y nucleotide receptors. *Mol Pharmacol* 66:468–477.
- Fischer T**, Rotermund N, Lohr C, Hirnet D (2012) P2Y1 receptor activation by photolysis of caged ATP enhances neuronal network activity in the developing olfactory bulb. *Purinergic Signal* 8:191–198.
- Freissmuth M**, Selzer E, Schütz W (1991) Interactions of purified bovine brain A1-adenosine receptors with G-proteins. Reciprocal modulation of agonist and antagonist binding. *Biochem J* 275:651–656.
- Fried HU**, Kaupp UB, Müller F (2010) Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels are differentially expressed in juxtglomerular cells in the olfactory bulb of mice. *Cell Tissue Res* 339:463–479.
- Friedman D**, Strowbridge BW (2000) Functional role of NMDA autoreceptors in olfactory mitral cells. *J Neurophysiol* 84:39–50.
- Frugier T**, Tiziano FD, Cifuentes-Diaz C, Miniou P, Roblot N, Dierich A, Le Meur M, Melki J (2000) Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9:849–858.
- Fucile S**, Miledi R, Eusebi F (2006) Effects of cyclothiazide on GluR1/AMPA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2943–2947.
- Fujita T**, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2009) P2Y1 receptor signaling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6 release in hippocampal cultures. *Glia* 57:244–257.
- Fukunaga I**, Herb JT, Kollo M, Boyden ES, Schaefer AT (2014) Independent control of gamma and theta activity by distinct interneuron networks in the olfactory bulb. *Nat Neurosci* 17:1208–1216.
- Furukawa T** (2013) Types of voltage-gated calcium channels. Molecular and electrophysiological views. *Curr Hypertens Rev* 9:170–181.
- Gallagher CJ**, Salter MW (2003) Differential properties of astrocyte calcium waves mediated by P2Y1 and P2Y2 receptors. *J Neurosci* 23:6728–6739.
- Gao J**, Wu X, Zuo J (2004) Targeting hearing genes in mice. *Brain Res Mol Brain Res* 132:192–207.
- Geiger JD**, Nagy JI (1987) Ontogenesis of adenosine deaminase activity in rat brain. *J Neurochem* 48:147–153.
- Gerber U**, Greene RW, Haas HL, Stevens DR (1989) Characterization of inhibition mediated by adenosine in the hippocampus of the rat in vitro. *J Physiol (Lond)* 417:567–578.
- Gerevich Z**, Borvendeg SJ, Schröder W, Franke H, Wirkner K, Nörenberg W, Fürst S, Gillen C, Illes P (2004) Inhibition of N-type voltage-activated calcium channels in rat dorsal root ganglion neurons by P2Y receptors is a possible mechanism of ADP-induced analgesia. *J Neurosci* 24:797–807.
- Gerevich Z**, Müller C, Illes P (2005) Metabotropic P2Y1 receptors inhibit P2X3 receptor-channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Eur J Pharmacol* 521:34–38.
- Gerevich Z**, Zadori Z, Müller C, Wirkner K, Schröder W, Rubini P, Illes P (2007) Metabotropic P2Y receptors inhibit P2X3 receptor-channels via G protein-dependent facilitation of their desensitization. *Br J Pharmacol* 151:226–236.
- Gerwins P**, Fredholm BB (1995) Activation of adenosine A1 and bradykinin receptors increases protein kinase C and phospholipase D activity in smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 351:186–193.
- Giovannardi S**, Landò L, Peres A (1998) Flash Photolysis of Caged Compounds. Casting Light on Physiological Processes. *News Physiol Sci* 13:251–255.
- Gire DH**, Franks KM, Zak JD, Tanaka KF, Whitesell JD, Mulligan AA, Hen R, Schoppa NE (2012) Mitral cells in the olfactory bulb are mainly excited through a multistep signaling path. *J Neurosci* 32:2964–2975.

- Gire DH, Schoppa NE (2009)** Control of on/off glomerular signaling by a local GABAergic microcircuit in the olfactory bulb. *J Neurosci* 29:13454–13464.
- Gonçalves J, Queiroz G (2008)** Presynaptic adenosine and P2Y receptors. *Handb Exp Pharmacol* 184:339–372.
- Goodman RR, Kuhar MJ, Hester L, Snyder SH (1983)** Adenosine receptors. Autoradiographic evidence for their location on axon terminals of excitatory neurons. *Science* 220:967–969.
- Grace AA, Onn SP (1989)** Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci* 9:3463–3481.
- Gschwend O, Abraham NM, Lagier S, Begnaud F, Rodriguez I, Carleton A (2015)** Neuronal pattern separation in the olfactory bulb improves odor discrimination learning. *Nat Neurosci* 18:1474–1482.
- Gundfinger A, Bischofberger J, Johenning FW, Torvinen M, Schmitz D, Breustedt J (2007)** Adenosine modulates transmission at the hippocampal mossy fibre synapse via direct inhibition of presynaptic calcium channels. *J Physiol (Lond)* 582:263–277.
- Guo W, Xu X, Gao X, Burnstock G, He C, Xiang Z (2008)** Expression of P2X5 receptors in the mouse CNS. *Neuroscience* 156:673–692.
- Guzman SJ, Gerevich Z, Hengstler JG, Illes P, Kleemann W (2005)** P2Y1 receptors inhibit both strength and plasticity of glutamatergic synaptic neurotransmission in the rat prefrontal cortex. *Synapse* 57:235–238.
- Haberly LB, Price JL (1977)** The axonal projection patterns of the mitral and tufted cells of the olfactory bulb in the rat. *Brain Res* 129:152–157.
- Halabisky B, Friedman D, Radojicic M, Strowbridge BW (2000)** Calcium influx through NMDA receptors directly evokes GABA release in olfactory bulb granule cells. *J Neurosci* 20:5124–5134.
- Halász N, Shepherd GM (1983)** Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. *Neuroscience* 10:579–619.
- Hassenklöver T, Schulz P, Peters A, Schwartz P, Schild D, Manzini I (2010)** Purinergic receptor-mediated Ca signaling in the olfactory bulb and the neurogenic area of the lateral ventricles. *Purinergic Signal* 6:429–445.
- Hayar A, Karnup S, Ennis M, Shipley MT (2004a)** External tufted cells. A major excitatory element that coordinates glomerular activity. *J Neurosci* 24:6676–6685.
- Hayar A, Karnup S, Shipley MT, Ennis M (2004b)** Olfactory bulb glomeruli. External tufted cells intrinsically burst at theta frequency and are entrained by patterned olfactory input. *J Neurosci* 24:1190–1199.
- Hayashi S, McMahon AP (2002)** Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre. A tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* 244:305–318.
- Haydon PG (2001)** GLIA. Listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2:185–193.
- He M-L, Gonzalez-Iglesias AE, Stojilkovic SS (2003)** Role of nucleotide P2 receptors in calcium signaling and prolactin release in pituitary lactotrophs. *J Biol Chem* 278:46270–46277.
- Hegg CC, Greenwood D, Huang W, Han P, Lucero MT (2003)** Activation of purinergic receptor subtypes modulates odor sensitivity. *J Neurosci* 23:8291–8301.
- Heyward P, Ennis M, Keller A, Shipley MT (2001)** Membrane bistability in olfactory bulb mitral cells. *J Neurosci* 21:5311–5320.
- Hirdes W, Napp N, Wulfsen I, Schweizer M, Schwarz JR, Bauer CK (2009)** Erg K+ currents modulate excitability in mouse mitral/tufted neurons. *Pflugers Arch* 459:55–70.
- Ho T, Jobling AI, Greferath U, Chuang T, Ramesh A, Fletcher EL, Vessey KA (2015)** Vesicular expression and release of ATP from dopaminergic neurons of the mouse retina and midbrain. *Front Cell Neurosci* 9:389.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952)** The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol (Lond)* 116:497–506.
- Hodgkin AL, Katz B (1949)** The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol (Lond)* 108:37–77.
- Holderith NB, Shigemoto R, Nusser Z (2003)** Cell type-dependent expression of HCN1 in the main olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 18:344–354.
- Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB (2001)** Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409:202–207.
- Honda T, Wada E, Battey JF, Wank SA (1993)** Differential Gene Expression of CCK(A) and CCK(B) Receptors in the Rat Brain. *Mol Cell Neurosci* 4:143–154.
- Hopf FW, Seif T, Mohamedi ML, Chen BT, Bonci A (2010)** The small-conductance calcium-activated potassium channel is a key modulator of firing and long-term depression in the dorsal striatum. *Eur J Neurosci* 31:1946–1959.
- Housley GD, Bringmann A, Reichenbach A (2009)** Purinergic signaling in special senses. *Trends Neurosci* 32:128–141.
- Houston D, Costanzi S, Jacobson KA, Harden TK (2008)** Development of selective high affinity antagonists, agonists, and radioligands for the P2Y1 receptor. *Comb Chem High Throughput Screen* 11:410–419.
- Hu R, Ferguson KA, Whiteus CB, Meijer DH, Araneda RC (2016)** Hyperpolarization-Activated Currents and Subthreshold Resonance in Granule Cells of the Olfactory Bulb. *eNeuro* 3.
- Igarashi KM, Ieki N, An M, Yamaguchi Y, Nagayama S, Kobayakawa K, Kobayakawa R, Tanifuji M, Sakano H, Chen WR, Mori K (2012)** Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex. *J Neurosci* 32:7970–7985.
- Iizuka M, Tsunenari I, Momota Y, Akiba I, Kono T (1997)** Localization of a G-protein-coupled inwardly rectifying K+ channel, CIR, in the rat brain. *Neuroscience* 77:1–13.
- Illes P, Ribeiro JA (2004)** Neuronal P2 receptors of the central nervous system. *Curr Top Med Chem* 4:831–838.
- Isaacson JS (1999)** Glutamate spillover mediates excitatory transmission in the rat olfactory bulb. *Neuron* 23:377–384.

- Isaacson JS** (2001) Mechanisms governing dendritic gamma-aminobutyric acid (GABA) release in the rat olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:337–342.
- Isaacson JS, Strowbridge BW** (1998) Olfactory reciprocal synapses. Dendritic signaling in the CNS. *Neuron* 20:749–761.
- Jabs R, Matthias K, Grote A, Grauer M, Seifert G, Steinhäuser C** (2007) Lack of P2X receptor mediated currents in astrocytes and GluR type glial cells of the hippocampal CA1 region. *Glia* 55:1648–1655.
- Jackowski A, Parnavelas JG, Lieberman AR** (1978) The reciprocal synapse in the external plexiform layer of the mammalian olfactory bulb. *Brain Res* 159:17–28.
- Jacobson KA, Balasubramanian R, Deflorian F, Gao Z-G** (2012) G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors. Ligand design and receptor interactions. *Purinergic Signal* 8:419–436.
- Jahr CE, Nicoll RA** (1982) An intracellular analysis of dendrodendritic inhibition in the turtle in vitro olfactory bulb. *J Physiol (Lond)* 326:213–234.
- Jeong HJ, Jang IS, Nabekura J, Akaike N** (2003) Adenosine A1 receptor-mediated presynaptic inhibition of GABAergic transmission in immature rat hippocampal CA1 neurons. *J Neurophysiol* 89:1214–1222.
- Jian K, Cifelli P, Pignatelli A, Frigato E, Belluzzi O** (2010) Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate bulbar dopaminergic cell function. *Brain Res* 1354:47–63.
- Jockers R, Linder ME, Hohenegger M, Nanoff C, Bertin B, Strosberg AD, Marullo S, Freissmuth M** (1994) Species difference in the G protein selectivity of the human and bovine A1-adenosine receptor. *J Biol Chem* 269:32077–32084.
- Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hårdemark A, Betsholtz C, Herlenius E, Fredholm BB** (2001) Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9407–9412.
- Johnston J, Delaney KR** (2010) Synaptic activation of T-type Ca<sup>2+</sup> channels via mGluR activation in the primary dendrite of mitral cells. *J Neurophysiol* 103:2557–2569.
- Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J, Nedergaard M** (2008) Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci* 28:4702–4711.
- Kanjhan R, Housley GD, Burton LD, Christie DL, Kippenberger A, Thorne PR, Luo L, Ryan AF** (1999) Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 407:11–32.
- Kaplan JH, Forbush B, Hoffman JF** (1978) Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue. Utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry* 17:1929–1935.
- Karschin C, Dissmann E, Stühmer W, Karschin A** (1996) IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J Neurosci* 16:3559–3570.
- Kato HK, Gillet SN, Peters AJ, Isaacson JS, Komiyama T** (2013) Parvalbumin-expressing interneurons linearly control olfactory bulb output. *Neuron* 80:1218–1231.
- Kawamura M, Gachet C, Inoue K, Kato F** (2004) Direct excitation of inhibitory interneurons by extracellular ATP mediated by P2Y1 receptors in the hippocampal slice. *J Neurosci* 24:10835–10845.
- Kepecs A, Uchida N, Mainen ZF** (2006) The sniff as a unit of olfactory processing. *Chem Senses* 31:167–179.
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Séguéla P, Voigt M, Humphrey PP** (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 53:107–118.
- Kikuta S, Fletcher ML, Homma R, Yamasoba T, Nagayama S** (2013) Odorant response properties of individual neurons in an olfactory glomerular module. *Neuron* 77:1122–1135.
- Kim M, Yoo OJ, Choe S** (1997) Molecular assembly of the extracellular domain of P2X2, an ATP-gated ion channel. *Biochem Biophys Res Commun* 240:618–622.
- Kiyokage E, Pan Y-Z, Shao Z, Kobayashi K, Szabo G, Yanagawa Y, Obata K, Okano H, Toida K, Puche AC, Shipley MT** (2010) Molecular identity of periglomerular and short axon cells. *J Neurosci* 30:1185–1196.
- Köles L, Kató E, Hanuska A, Zádori ZS, Al-Khrasani M, Zelles T, Rubini P, Illes P** (2016) Modulation of excitatory neurotransmission by neuronal/glial signalling molecules. Interplay between purinergic and glutamatergic systems. *Purinergic Signal* 12:1–24.
- Komoda Y, Isogai Y, Satoh K** (1983) Isolation from humus and identification of two growth promoters, adenosine and 2'-desoxyadenosine, effective in culturing the diatom *phaeodactylum tricornutum*. *Chem Pharm Bull* 10:3771–3774.
- Kosaka K, Toida K, Aika Y, Kosaka T** (1998) How simple is the organization of the olfactory glomerulus? The heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci Res* 30:101–110.
- Kosaka K, Toida K, Margolis FL, Kosaka T** (1996) Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. Prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals. *Neuroscience* 76:775–786.
- Kosaka T, Kosaka K** (2004) Neuronal gap junctions between intraglomerular mitral/tufted cell dendrites in the mouse main olfactory bulb. *Neurosci Res* 49:373–378.
- Kosaka T, Kosaka K** (2011) "Interneurons" in the olfactory bulb revisited. *Neurosci Res* 69:93–99.
- Kozlov AS, Angulo MC, Audinat E, Charpak S** (2006) Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10058–10063.
- Krügel U, Kittner H, Franke H, Illes P** (2003) Purinergic modulation of neuronal activity in the mesolimbic dopaminergic system in vivo. *Synapse* 47:134–142.
- Kügelgen I von, Hoffmann K** (2016) Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology* 104:50–61.

- Kulisevsky J, Poyurovsky M** (2012) Adenosine A2A-receptor antagonism and pathophysiology of Parkinson's disease and drug-induced movement disorders. *Eur Neurol* 67:4–11.
- Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, Zimmermann H** (2008) Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res* 334:199–217.
- Larsson M, Sawada K, Morland C, Hiasa M, Ormel L, Moriyama Y, Gundersen V** (2012) Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cereb Cortex* 22:1203–1214.
- Latini S, Pedata F** (2001) Adenosine in the central nervous system. Release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79:463–484.
- Lawanson AO, Sholeye FO** (1976) Inhibition of prodigiosin formation in *Serratia marcescens* by adenosine triphosphate. *Experientia* 32:439–440.
- Lazarowski ER** (2012) Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal* 8:359–373.
- Lê KT, Villeneuve P, Ramjaun AR, McPherson PS, Beaudet A, Séguéla P** (1998) Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. *Neuroscience* 83:177–190.
- Lechner SG, Dorostkar MM, Mayer M, Edelbauer H, Pankevych H, Boehm S** (2004) Autoinhibition of transmitter release from PC12 cells and sympathetic neurons through a P2Y receptor-mediated inhibition of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Eur J Neurosci* 20:2917–2928.
- Linden J, Thai T, Figler H, Jin X, Robeva AS** (1999) Characterization of human A<sub>2B</sub> adenosine receptors. Radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol Pharmacol* 56:705–713.
- Liu S, Aungst JL, Puche AC, Shipley MT** (2012) Serotonin modulates the population activity profile of olfactory bulb external tufted cells. *J Neurophysiol* 107:473–483.
- Liu S, Plachez C, Shao Z, Puche A, Shipley MT** (2013) Olfactory bulb short axon cell release of GABA and dopamine produces a temporally biphasic inhibition-excitation response in external tufted cells. *J Neurosci* 33:2916–2926.
- Llinás RR** (1988) The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons. Insights into central nervous system function. *Science* 242:1654–1664.
- Lohr C, Grosche A, Reichenbach A, Hirnet D** (2014) Purinergic neuron-glia interactions in sensory systems. *Pflugers Arch* 466:1859–1872.
- Lovatt D, Xu Q, Liu W, Takano T, Smith NA, Schnermann J, Tieu K, Nedergaard M** (2012) Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:6265–6270.
- Ludwig M, Pittman QJ** (2003) Talking back. Dendritic neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 26:255–261.
- Luskin MB, Price JL** (1983) The topographic organization of associational fibers of the olfactory system in the rat, including centrifugal fibers to the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 216:264–291.
- Luthardt J, Borvendeg SJ, Sperlagh B, Poelchen W, Wirkner K, Illes P** (2003) P2Y<sub>1</sub> receptor activation inhibits NMDA receptor-channels in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal and parietal cortex. *Neurochem Int* 42:161–172.
- Ma J, Dankulich-Nagrudny L, Lowe G** (2013) Cholecystokinin. An excitatory modulator of mitral/tufted cells in the mouse olfactory bulb. *PLoS ONE* 8:e64170.
- Ma M, Luo M** (2012) Optogenetic activation of basal forebrain cholinergic neurons modulates neuronal excitability and sensory responses in the main olfactory bulb. *J Neurosci* 32:10105–10116.
- Macrides F, Schneider SP** (1982) Laminar organization of mitral and tufted cells in the main olfactory bulb of the adult hamster. *J Comp Neurol* 208:419–430.
- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H** (2010) A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 13:133–140.
- Major G, Tank D** (2004) Persistent neural activity. Prevalence and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 14:675–684.
- Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB** (1999) Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell* 96:713–723.
- Marala RB, Mustafa SJ** (1993) Direct evidence for the coupling of A<sub>2</sub>-adenosine receptor to stimulatory guanine nucleotide-binding-protein in bovine brain striatum. *J Pharmacol Exp Ther* 266:294–300.
- Marteau F, Le Poul E, Communi D, Communi D, Labouret C, Savi P, Boeynaems J-M, Gonzalez NS** (2003) Pharmacological characterization of the human P2Y<sub>13</sub> receptor. *Mol Pharmacol* 64:104–112.
- Miyamichi K, Shlomai-Fuchs Y, Shu M, Weissbourd BC, Luo L, Mizrahi A** (2013) Dissecting local circuits. Parvalbumin interneurons underlie broad feedback control of olfactory bulb output. *Neuron* 80:1232–1245.
- Mogul DJ, Adams ME, Fox AP** (1993) Differential activation of adenosine receptors decreases N-type but potentiates P-type Ca<sup>2+</sup> current in hippocampal CA3 neurons. *Neuron* 10:327–334.
- Morán-Jiménez MJ, Matute C** (2000) Immunohistochemical localization of the P2Y<sub>1</sub> purinergic receptor in neurons and glial cells of the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 78:50–58.
- Mori K, Kishi K, Ojima H** (1983) Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. *J Comp Neurol* 219:339–355.
- Mori M, Heuss C, Gähwiler BH, Gerber U** (2001) Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J Physiol (Lond)* 535:115–123.
- Morin N, Di Paolo T** (2014) Interaction of adenosine receptors with other receptors from therapeutic perspective in Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol* 119:151–167.

- Moriyama T**, Iida T, Kobayashi K, Higashi T, Fukuoka T, Tsumura H, Leon C, Suzuki N, Inoue K, Gachet C, Noguchi K, Tominaga M (2003) Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. *J Neurosci* 23:6058–6062.
- Mosbacher J**, Maier R, Fakler B, Glatz A, Crespo J, Bilbe G (1998) P2Y receptor subtypes differentially couple to inwardly-rectifying potassium channels. *FEBS Lett* 436:104–110.
- Mouradian LE**, Scott JW (1988) Cytochrome oxidase staining marks dendritic zones of the rat olfactory bulb external plexiform layer. *J Comp Neurol* 271:507–518.
- Murphy GJ**, Glickfeld LL, Balsen Z, Isaacson JS (2004) Sensory neuron signaling to the brain. Properties of transmitter release from olfactory nerve terminals. *J Neurosci* 24:3023–3030.
- Nagai Y**, Sano H, Yokoi M (2005) Transgenic expression of Cre recombinase in mitral/tufted cells of the olfactory bulb. *Genesis* 43:12–16.
- Nagayama S**, Homma R, Imamura F (2014) Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits* 8:98.
- Nagayama S**, Takahashi YK, Yoshihara Y, Mori K (2004) Mitral and tufted cells differ in the decoding manner of odor maps in the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol* 91:2532–2540.
- Nagy A** (2000) Cre recombinase. The universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99–109.
- Nakai J**, Ohkura M, Imoto K (2001) A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19:137–141.
- Nakashima N**, Ishii TM, Bessho Y, Kageyama R, Ohmori H (2013) Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channels regulate the spontaneous firing rate of olfactory receptor neurons and affect glomerular formation in mice. *J Physiol (Lond)* 591:1749–1769.
- Nicholas RA**, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K (1996) Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors. Identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol Pharmacol* 50:224–229.
- Nicke A**, Bäumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers. A novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* 17:3016–3028.
- Nickell WT**, Behbehani MM, Shipley MT (1994) Evidence for GABAB-mediated inhibition of transmission from the olfactory nerve to mitral cells in the rat olfactory bulb. *Brain Research Bulletin* 35:119–123.
- Nicoll RA** (1969) Inhibitory mechanisms in the rabbit olfactory bulb. Dendrodendritic mechanisms. *Brain Res* 14:157–172.
- Nishi H**, Arai H, Momiyama T (2013) NCI-H295R, a human adrenal cortex-derived cell line, expresses purinergic receptors linked to Ca<sup>2+</sup>-mobilization/influx and cortisol secretion. *PLoS ONE* 8:e71022.
- North RA** (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013–1067.
- Notomi T**, Shigemoto R (2004) Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J Comp Neurol* 471:241–276.
- Nowak L**, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462–465.
- Nowycky MC**, Mori K, Shepherd GM (1981) GABAergic mechanisms of dendrodendritic synapses in isolated turtle olfactory bulb. *J Neurophysiol* 46:639–648.
- Numberger M**, Draguhn A, Sakmann B (1996) Patch-Clamp-Technik. Labor im Fokus. Spektrum Akad. Verl. Heidelberg.
- Nusser Z**, Kay LM, Laurent G, Homanics GE, Mody I (2001) Disruption of GABA(A) receptors on GABAergic interneurons leads to increased oscillatory power in the olfactory bulb network. *J Neurophysiol* 86:2823–2833.
- Ogihara S** (1982) Calcium and ATP regulation of the oscillatory torsional movement in a triton model of Physarum plasmodial strands. *Exp Cell Res* 138:377–384.
- O'Grady SM**, Elmquist E, Filtz TM, Nicholas RA, Harden TK (1996) A guanine nucleotide-independent inwardly rectifying cation permeability is associated with P2Y1 receptor expression in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 271:29080–29087.
- Okada Y**, Sakurai T, Mori M (1992) Excitatory effect of adenosine on neurotransmission is due to increase of transmitter release in the hippocampal slices. *Neurosci Lett* 142:233–236.
- Olmos J de**, Hardy H, Heimer L (1978) The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat. An experimental HRP-study. *J Comp Neurol* 181:213–244.
- Orban PC**, Chui D, Marth JD (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6861–6865.
- Orona E**, Rainer EC, Scott JW (1984) Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 226:346–356.
- Palmer RK**, Boyer JL, Schachter JB, Nicholas RA, Harden TK (1998) Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol* 54:1118–1123.
- Palmer TM**, Gettys TW, Stiles GL (1995) Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor. *J Biol Chem* 270:16895–16902.
- Pankratov Y**, Lalo U, Krishtal O, Verkhratsky A (2002) Ionotropic P2X purinoreceptors mediate synaptic transmission in rat pyramidal neurones of layer II/III of somato-sensory cortex. *J Physiol (Lond)* 542:529–536.
- Panzanelli P**, Perazzini AZ, Fritschy JM, Sassoè-Pognetto M (2005) Heterogeneity of gamma-aminobutyric acid type A receptors in mitral and tufted cells of the rat main olfactory bulb. *J Comp Neurol* 484:121–131.
- Pape HC** (1996) Queer current and pacemaker. The hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58:299–327.
- Parkinson FE**, Damaraju VL, Graham K, Yao SYM, Baldwin SA, Cass CE, Young JD (2011) Molecular biology of nucleoside transporters and their

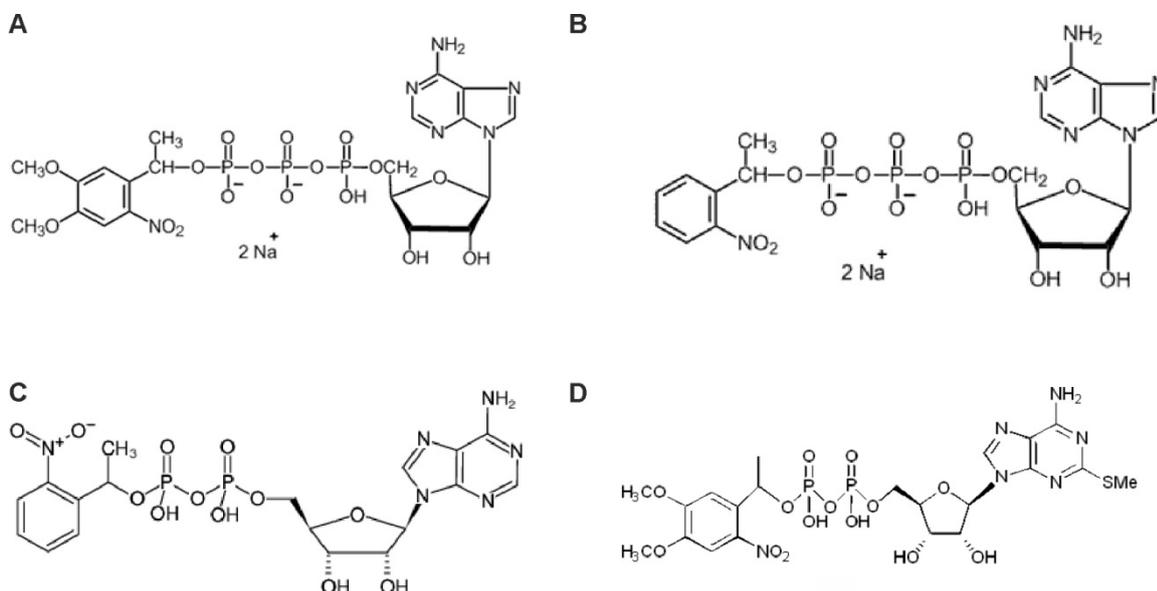
- distributions and functions in the brain. *Curr Top Med Chem* 11:948–972.
- Parrish-Aungst S**, Shipley MT, Erdelyi F, Szabo G, Puche AC (2007) Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 501:825–836.
- Petzold GC**, Hagiwara A, Murthy VN (2009) Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. *Nat Neurosci* 12:784–791.
- Phillips CG**, Powell TP, Shepherd GM (1963) Responses of mitral cells to stimulation of the lateral olfactory tract in the rabbit. *J Physiol (Lond)* 168:65–88.
- Pierce KD**, Furlong TJ, Selbie LA, Shine J (1992) Molecular cloning and expression of an adenosine A2b receptor from human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 187:86–93.
- Pignatelli A**, Belluzzi O (2008) Cholinergic modulation of dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. *Chem Senses* 33:331–338.
- Pignatelli A**, Borin M, Fogli Iseppa A, Gambardella C, Belluzzi O (2013) The h-current in periglomerular dopaminergic neurons of the mouse olfactory bulb. *PLoS ONE* 8:e56571.
- Pignatelli A**, Kobayashi K, Okano H, Belluzzi O (2005) Functional properties of dopaminergic neurones in the mouse olfactory bulb. *J Physiol (Lond)* 564:501–514.
- Pinching AJ**, Powell TP (1971) The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9:305–345.
- Pressler RT**, Inoue T, Strowbridge BW (2007) Muscarinic receptor activation modulates granule cell excitability and potentiates inhibition onto mitral cells in the rat olfactory bulb. *J Neurosci* 27:10969–10981.
- Price JL**, Powell TP (1970) An experimental study of the origin and the course of the centrifugal fibres to the olfactory bulb in the rat. *J Anat* 107:215–237.
- Qu Y**, Campbell DL, Whorton AR, Strauss HC (1993) Modulation of basal L-type Ca<sup>2+</sup> current by adenosine in ferret isolated right ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* 471:269–293.
- Queiroz G**, Talaia C, Gonçalves J (2003) ATP modulates noradrenaline release by activation of inhibitory P2Y receptors and facilitatory P2X receptors in the rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther* 307:809–815.
- Rajasekhar P**, Poole DP, Liedtke W, Bunnett NW, Veldhuis NA (2015) P2Y1 Receptor Activation of the TRPV4 Ion Channel Enhances Purinergic Signaling in Satellite Glial Cells. *J Biol Chem* 290:29051–29062.
- Ralevic V**, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413–492.
- Rall W**, Shepherd GM, Reese TS, Brightman MW (1966) Dendrodendritic synaptic pathway for inhibition in the olfactory bulb. *Exp Neurol* 14:44–56.
- Reig R**, Zerlaut Y, Vergara R, Destexhe A, Sanchez-Vives MV (2015) Gain modulation of synaptic inputs by network state in auditory cortex in vivo. *J Neurosci* 35:2689–2702.
- Reyher CK**, Lübke J, Larsen WJ, Hendrix GM, Shipley MT, Baumgarten HG (1991) Olfactory bulb granule cell aggregates. Morphological evidence for interperikaryal electrotonic coupling via gap junctions. *J Neurosci* 11:1485–1495.
- Ribeiro JA**, Sebastião AM (2010) Modulation and metamodulation of synapses by adenosine. *Acta Physiol (Oxf)* 199:161–169.
- Rieger A**, Deitmer JW, Lohr C (2007) Axon-glia communication evokes calcium signaling in olfactory ensheathing cells of the developing olfactory bulb. *Glia* 55:352–359.
- Robertson SJ**, Ennion SJ, Evans RJ, Edwards FA (2001) Synaptic P2X receptors. *Curr Opin Neurobiol* 11:378–386.
- Rocher A**, Gonzalez C, Almaraz L (1999) Adenosine inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> current and catecholamine release in the rabbit carotid body chemoreceptor cells. *Eur J Neurosci* 11:673–681.
- Rodrigues RJ**, Almeida T, Richardson PJ, Oliveira CR, Cunha RA (2005) Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J Neurosci* 25:6286–6295.
- Rombo DM**, Newton K, Nissen W, Badurek S, Horn JM, Minichiello L, Jefferys JGR, Sebastião AM, Lamsa KP (2015) Synaptic mechanisms of adenosine A2A receptor-mediated hyperexcitability in the hippocampus. *Hippocampus* 25:566–580.
- Rotermund N**, Winandy S, Fischer T, Schulz K, Fregin T, Breikreutz N, Buchta M, Bartels J, Carlström M, Lohr C, Hirnet D (2017) Adenosine A1 receptor activates background potassium channels and modulates information processing in olfactory bulb mitral cells. *J Physiol (Lond)* In press. doi: 10.1113/JP275503
- Rothermel M**, Carey RM, Puche A, Shipley MT, Wachowiak M (2014) Cholinergic inputs from Basal forebrain add an excitatory bias to odor coding in the olfactory bulb. *J Neurosci* 34:4654–4664.
- Roux L**, Benchenane K, Rothstein JD, Bonvento G, Giaume C (2011) Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18442–18446.
- Roux L**, Madar A, Lacroix MM, Yi C, Benchenane K, Giaume C (2015) Astroglial Connexin 43 Hemichannels Modulate Olfactory Bulb Slow Oscillations. *J Neurosci* 35:15339–15352.
- Rudolph R**, Jahn HM, Courjaret R, Messemer N, Kirchhoff F, Deitmer JW (2016) The inhibitory input to mouse cerebellar Purkinje cells is reciprocally modulated by Bergmann glial P2Y1 and AMPA receptor signaling. *Glia* 64:1265–1280.
- Saint Jan D de**, Hirnet D, Westbrook GL, Charpak S (2009) External tufted cells drive the output of olfactory bulb glomeruli. *J Neurosci* 29:2043–2052.
- Saitow F**, Murakoshi T, Suzuki H, Konishi S (2005) Metabotropic P2Y purinoceptor-mediated presynaptic and postsynaptic enhancement of cerebellar GABAergic transmission. *J Neurosci* 25:2108–2116.
- Salin PA**, Lledo PM, Vincent JD, Charpak S (2001) Dendritic glutamate autoreceptors modulate signal processing in rat mitral cells. *J Neurophysiol* 85:1275–1282.
- Samways DSK**, Li Z, Egan TM (2014) Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Front Cell Neurosci* 8:6.

- Sanchez-Vives** MV, McCormick DA (2000) Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* 3:1027–1034.
- Satou** M, Anzai S, Huruno M (2005) Long-term potentiation and olfactory memory formation in the carp (*Cyprinus carpio* L.) olfactory bulb. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 191:421–434.
- Sawada** K, Echigo N, Juge N, Miyaji T, Otsuka M, Omote H, Yamamoto A, Moriyama Y (2008) Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5683–5686.
- Schicker** KW, Chandaka GK, Geier P, Kubista H, Boehm S (2010) P2Y1 receptors mediate an activation of neuronal calcium-dependent K<sup>+</sup> channels. *J Physiol (Lond)* 588:3713–3725.
- Schild** D, Restrepo D (1998) Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol Rev* 78:429–466.
- Schneider** SP, Macrides F (1978) Laminar distributions of interneurons in the main olfactory bulb of the adult hamster. *Brain Research Bulletin* 3:73–82.
- Schoppa** NE, Kinzie JM, Sahara Y, Segerson TP, Westbrook GL (1998) Dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is driven by NMDA receptors. *J Neurosci* 18:6790–6802.
- Schoppa** NE, Urban NN (2003) Dendritic processing within olfactory bulb circuits. *Trends Neurosci* 26:501–506.
- Schulz** K (2014) Einfluss von Adenosin auf die dendrodendritische Synapse zwischen Mitral- und Körnerzellen im Bulbus olfactorius der Maus. Masterarbeit. Universität Hamburg.
- Scott** JW, McBride RL, Schneider SP (1980) The organization of projections from the olfactory bulb to the piriform cortex and olfactory tubercle in the rat. *J Comp Neurol* 194:519–534.
- Seamari** Y, Narváez JA, Vico FJ, Lobo D, Sanchez-Vives MV (2007) Robust off- and online separation of intracellularly recorded up and down cortical states. *PLoS ONE* 2:e888.
- Segal** M (1982) Intracellular analysis of a postsynaptic action of adenosine in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 79:193–199.
- Seo** DR, Kim SY, Kim KY, Lee HG, Moon JH, Lee JS, Lee SH, Kim SU, Lee YB (2008) Cross talk between P2 purinergic receptors modulates extracellular ATP-mediated interleukin-10 production in rat microglial cells. *Exp Mol Med* 40:19–26.
- Seroogy** KB, Brecha N, Gall C (1985) Distribution of cholecystinin-like immunoreactivity in the rat main olfactory bulb. *J Comp Neurol* 239:373–383.
- Shepherd** GM (2004) *The Synaptic Organization of the Brain. Olfactory bulb.* Oxford University Press. New York, USA. 5:165-217.
- Shepherd** GM, Chen WR, Willhite D, Migliore M, Greer CA (2007) The olfactory granule cell. From classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain Res Rev* 55:373–382.
- Shimmen** T, Tazawa M (1977) Control of membrane potential and excitability of Chara cells with ATP and Mg<sup>2+</sup>. *J Membr Biol* 37:167–192.
- Shipley** MT, Ennis M (1996) Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol* 30:123–176.
- Shu** Y, Hasenstaub A, McCormick DA (2003) Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature* 423:288–293.
- Simon** J, Kidd EJ, Smith FM, Chessell IP, Murrell-Lagnado R, Humphrey PP, Barnard EA (1997a) Localization and functional expression of splice variants of the P2X2 receptor. *Mol Pharmacol* 52:237–248.
- Simon** J, Webb TE, Barnard EA (1997b) Distribution of 35SdATP alpha S binding sites in the adult rat neuraxis. *Neuropharmacology* 36:1243–1251.
- Skeen** LC, Hall WC (1977) Efferent projections of the main and the accessory olfactory bulb in the tree shrew (*Tupaia glis*). *J Comp Neurol* 172:1–35.
- Song** Z, Gomes DA, Stevens W (2009) Role of purinergic P2Y1 receptors in regulation of vasopressin and oxytocin secretion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297:R478–84.
- Soto** F, Garcia-Guzman M, Gomez-Hernandez JM, Hollmann M, Karschin C, Stühmer W (1996) P2X4. An ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3684–3688.
- Spehr** M, Munger SD (2009) Olfactory receptors. G protein-coupled receptors and beyond. *J Neurochem* 109:1570–1583.
- Sreedharan** S, Shaik JHA, Olszewski PK, Levine AS, Schiöth HB, Fredriksson R (2010) Glutamate, aspartate and nucleotide transporters in the SLC17 family form four main phylogenetic clusters. Evolution and tissue expression. *BMC Genomics* 11:17.
- Stephenson** R, Houghton D, Sundararajan S, Doty RL, Stern M, Xie SX, Siderowf A (2010) Odor identification deficits are associated with increased risk of neuropsychiatric complications in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 25:2099–2104.
- Stroh** O, Freichel M, Kretz O, Birnbaumer L, Hartmann J, Egger V (2012) NMDA receptor-dependent synaptic activation of TRPC channels in olfactory bulb granule cells. *J Neurosci* 32:5737–5746.
- Sun** X, Barnes S, Baldrige WH (2002) Adenosine inhibits calcium channel currents via A1 receptors on salamander retinal ganglion cells in a mini-slice preparation. *J Neurochem* 81:550–556.
- Takahashi** H, Ogawa Y, Yoshihara S-I, Asahina R, Kinoshita M, Kitano T, Kitsuki M, Tatsumi K, Okuda M, Tatsumi K, Wanaka A, Hirai H, Stern PL, Tsuboi A (2016) A Subtype of Olfactory Bulb Interneurons Is Required for Odor Detection and Discrimination Behaviors. *J Neurosci* 36:8210–8227.
- Taliani** S, Pugliesi I, Bellandi M, La Motta C, Da Settimo F (2010) A3 receptor ligands. Past, present and future trends. *Curr Top Med Chem* 10:942–975.
- Tatti** R, Bhaukaurally K, Gschwend O, Seal RP, Edwards RH, Rodriguez I, Carleton A (2014) A population of glomerular glutamatergic neurons controls sensory information transfer in the mouse olfactory bulb. *Nat Commun* 5:3791.
- Thomas** GP, Sims SM, Cook MA, Karmazyn M (1998) Hydrogen peroxide-induced stimulation of L-type calcium current in guinea pig ventricular myocytes and its inhibition by adenosine A1 receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther* 286:1208–1214.
- Thyssen** A, Hirnet D, Wolburg H, Schmalzing G, Deitmer JW, Lohr C (2010) Ectopic vesicular neurotransmitter release along sensory axons mediates neurovascular

- coupling via glial calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15258–15263.
- Toida K** (2008) Synaptic organization of the olfactory bulb based on chemical coding of neurons. *Anat Sci Int* 83:207–217.
- Torres A, Wang F, Xu Q, Fujita T, Dobrowolski R, Willecke K, Takano T, Nedergaard M** (2012) Extracellular Ca<sup>2+</sup> acts as a mediator of communication from neurons to glia. *Sci Signal* 5:ra8.
- Torres B, Zambon AC, Insel PA** (2002) P2Y<sub>11</sub> receptors activate adenylyl cyclase and contribute to nucleotide-promoted cAMP formation in MDCK-D(1) cells. A mechanism for nucleotide-mediated autocrine-paracrine regulation. *J Biol Chem* 277:7761–7765.
- Trams EG** (1981) On the evolution of neurochemical transmission. *Differentiation* 19:125–133.
- Trombley PQ, Shepherd GM** (1993) Synaptic transmission and modulation in the olfactory bulb. *Curr Opin Neurobiol* 3:540–547.
- Trussell LO, Jackson MB** (1985) Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4857–4861.
- Uchida N, Eshel N, Watabe-Uchida M** (2013) Division of labor for division. Inhibitory interneurons with different spatial landscapes in the olfactory system. *Neuron* 80:1106–1109.
- Umemiya M, Berger AJ** (1994) Activation of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> receptors differentially modulates calcium channels and glycinergic synaptic transmission in rat brainstem. *Neuron* 13:1439–1446.
- Urban NN, Castro JB** (2010) Functional polarity in neurons. What can we learn from studying an exception? *Curr Opin Neurobiol* 20:538–542.
- Vaaga CE, Yorgason JT, Williams JT, Westbrook GL** (2017) Presynaptic gain control by endogenous cotransmission of dopamine and GABA in the olfactory bulb. *J Neurophysiol* 117:1163–1170.
- van Calker D, Müller M, Hamprecht B** (1978) Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature* 276:839–841.
- van Calker D, Müller M, Hamprecht B** (1979) Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 33:999–1005.
- Vennekens R, Menigoz A, Nilius B** (2012) TRPs in the Brain. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 163:27–64.
- Vulchanova L, Arvidsson U, Riedl M, Wang J, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R** (1996) Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8063–8067.
- Wachowiak M, Shipley MT** (2006) Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* 17:411–423.
- Waldo GL, Corbitt J, Boyer JL, Ravi G, Kim HS, Ji X-D, Lacy J, Jacobson KA, Harden TK** (2002) Quantitation of the P2Y<sub>1</sub> receptor with a high affinity radiolabeled antagonist. *Mol Pharmacol* 62:1249–1257.
- Waldo GL, Harden TK** (2004) Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y<sub>1</sub> receptor. *Mol Pharmacol* 65:426–436.
- Wang XY, McKenzie JS, Kemm RE** (1996) Whole-cell K<sup>+</sup> currents in identified olfactory bulb output neurones of rats. *J Physiol (Lond)* 490:63–77.
- Wellis DP, Kauer JS** (1993) GABAA and glutamate receptor involvement in dendrodendritic synaptic interactions from salamander olfactory bulb. *J Physiol (Lond)* 469:315–339.
- Wellis DP, Scott JW** (1990) Intracellular responses of identified rat olfactory bulb interneurons to electrical and odor stimulation. *J Neurophysiol* 64:932–947.
- White TD, MacDonald WF** (1990) Neural release of ATP and adenosine. *Ann N Y Acad Sci* 603:287–298; discussion 298–299.
- Willhite DC, Nguyen KT, Masurkar AV, Greer CA, Shepherd GM, Chen WR** (2006) Viral tracing identifies distributed columnar organization in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12592–12597.
- Williamson RE** (1975) Cytoplasmic streaming in Chara. A cell model activated by ATP and inhibited by cytochalasin B. *J Cell Sci* 17:655–668.
- Wilson RS, Arnold SE, Schneider JA, Boyle PA, Buchman AS, Bennett DA** (2009) Olfactory impairment in presymptomatic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1170:730–735.
- Wu LG, Saggau P** (1994) Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron* 12:1139–1148.
- Xiong W, Chen WR** (2002) Dynamic Gating of Spike Propagation in the Mitral Cell Lateral Dendrites. *Neuron* 34:115–126.
- Yawo H, Chuhma N** (1993) Preferential inhibition of omega-conotoxin-sensitive presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels by adenosine autoreceptors. *Nature* 365:256–258.
- Yokoi M, Mori K, Nakanishi S** (1995) Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3371–3375.
- Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC** (2015) The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* 67:821–870.
- Zechel S, Werner S, Bohlen Und Halbach O von** (2007) Distribution of TRPC4 in developing and adult murine brain. *Cell Tissue Res* 328:651–656.
- Zeng JW, Liu XH, Zhang JH, Wu XG, Ruan HZ** (2008) P2Y<sub>1</sub> receptor-mediated glutamate release from cultured dorsal spinal cord astrocytes. *J Neurochem* 106:2106–2118.
- Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo M-m, Duan S** (2003) ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40:971–982.
- Zhang W, Linden DJ** (2009) Neuromodulation at single presynaptic boutons of cerebellar parallel fibers is determined by bouton size and basal action potential-evoked Ca transient amplitude. *J Neurosci* 29:15586–15594.
- Zhang X, Firestein S** (2002) The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci* 5:124–133.

- Zimmermann H** (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:299–309.
- Zimmermann H** (2016) Extracellular ATP and other nucleotides-ubiquitous triggers of intercellular messenger release. *Purinergic Signal* 12:25–57.
- Zuo J** (2002) Transgenic and gene targeting studies of hair cell function in mouse inner ear. *J Neurobiol* 53:286–305.

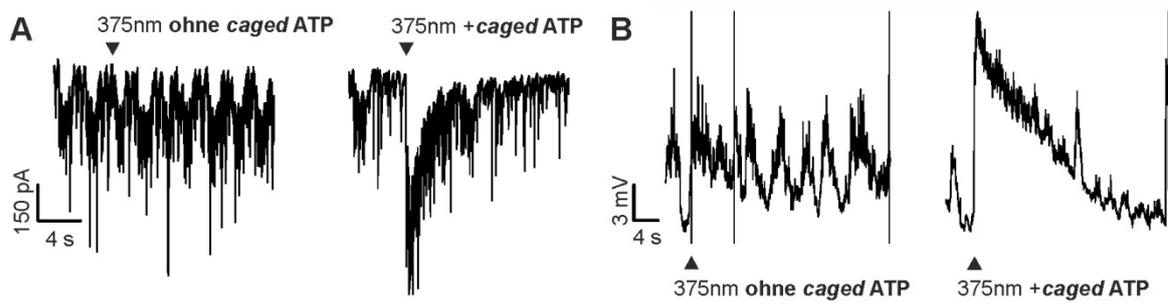
## VI. ANHANG

VI.1 STRUKTURFORMELN DER VERWENDETEN *CAGED* SUBSTANZEN

**Abbildung 45: Strukturformeln verschiedener *caged* Substanzen. A)** DMNPE *caged* ATP (Adenosin-5'-triphosphat P<sup>γ</sup>-(1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)-ethyl)-ester). **B)** Strukturformel von NPE *caged* ATP (Adenosin-5'-triphosphat, P<sup>γ</sup>-(1-(2-nitrophenyl)-ethyl)-ester). **C)** Strukturformel von NPE *caged* ADP (Adenosin-5'-diphosphat, P<sup>γ</sup>-(1-(2-nitrophenyl)-ethyl)-ester). **D)** Strukturformel von MRS2703, die *caged* Form von 2-MeSADP (2-Methylthio-ADP).

## VI.2 EINFLUSS DES LASERLICHTS AUF DIE MEMBRANEIGENSCHAFTEN VON MITRALZELLEN

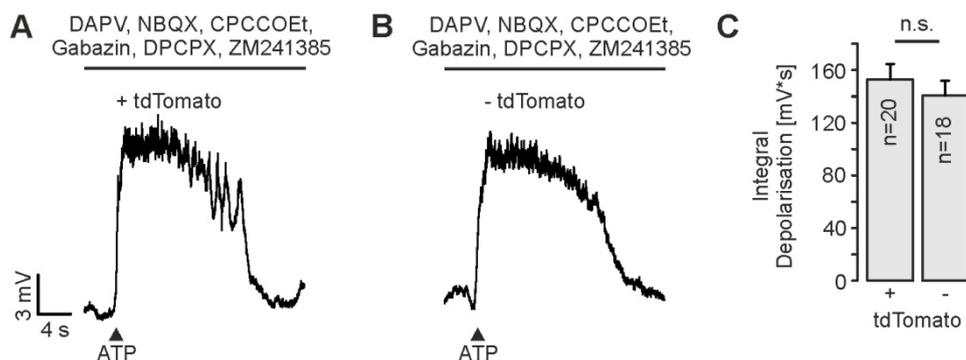
Um sicherzustellen, dass etwaige gemessene Antworten der Zellen tatsächlich auf die Freisetzung von ATP bzw. ADP zurückzuführen sind und kein durch das Laserlicht entstandenes Artefakt darstellen, wurden regelmäßig Tests mit den gewählten Parametern durchgeführt, bei denen der Laser ohne Vorhandensein einer *caged* Substanz angeschaltet wurde. In Abbildung 46 ist beispielhaft zu sehen, dass erst bei Anwesenheit von *caged* ATP eine Antwort in den Zellen gemessen werden konnte, das Laserlicht alleine aber keine Reaktion hervorrief.



**Abbildung 46: Einfluss des Laserlichts auf die Membraneigenschaften von Mitralzellen. A)** *Voltage clamp*-Aufnahmen einer Mitralzelle bei paralleler Illumination mittels 375 nm Laserlicht ohne (links) und mit Anwesenheit (rechts) von *caged* ATP im Versuchsbad. **B)** *Current clamp*-Aufnahmen einer Mitralzelle bei paralleler Illumination mittels 375 nm Laserlicht ohne (links) und mit Anwesenheit (rechts) von *caged* ATP im Versuchsbad. In beiden Fällen wird bei Anschalten des Laserlichts erst durch Anwesenheit von *caged* ATP eine Antwort in der Zelle ausgelöst.

### VI.3 EINFLUSS DER tdTOMATO-EXPRESSION AUF DIE ATP-INDUZIERTE DEPOLARISATION IN MITRALZELLEN

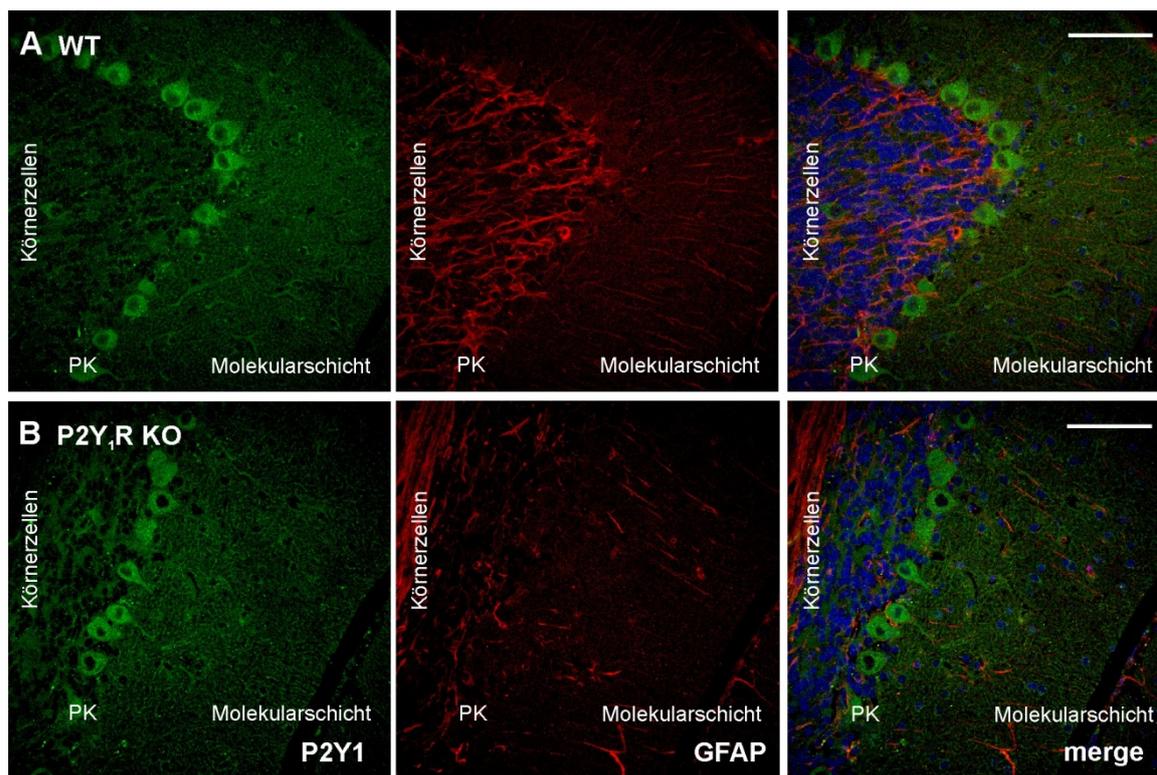
Für einen Großteil der im Rahmen des ATP-Projektes durchgeführten Versuche wurden Tiere der *Pcdh21* x *tdT*-Mauslinie verwendet. Diese stammten aus Verpaarungen der *Pcdh21-Cre*-Mauslinie mit der *loxP*-tragenden Mauslinie *tdTomato<sup>fl/fl</sup>*. Da die Elterntiere der verwendeten F1-Generation jeweils heterozygot waren, wurde das entsprechende *Cre*-Allel nicht an alle Nachkommen weitergegeben. Wie in Abbildung 47 zu sehen, hatte dies bzw. die *tdTomato*-Expression in den Zellen keinen Einfluss auf die Größe der ATP-induzierten Depolarisation in Mitralzellen. In Zellen, in denen *tdTomato* exprimiert wurde, betrug die ATP-induzierte Depolarisation im Mittel  $153 \pm 12$  mV\*s ( $n=20$ , Abbildung 47A). In Zellen aus Tieren ohne das entsprechende *Cre*-Allel und daher ohne *tdTomato*-Expression in *M/t*-Zellen betrug die ATP-induzierte Depolarisation im Mittel  $140 \pm 11$  mV\*s ( $n=18$ , Abbildung 47B) und unterschied sich damit nicht signifikant von der ATP-induzierten Depolarisation in Zellen mit *tdTomato*-Expression ( $p=0,44$ , Abbildung 47C). Für die Versuche an Mitralzellen wurden daher auch die Wurfgeschwister ohne entsprechendes *Cre*-Allel verwendet und die Ergebnisse in den Auswertungen zusammengefasst.



**Abbildung 47: Einfluss der tdTomato-Expression auf die ATP-induzierte Depolarisation in Mitralzellen.** **A)** ATP-induzierte Depolarisation einer Mitralzelle aus einem Schnittpräparat mit tdTomato-exprimierenden Zellen **B)** ATP-induzierte Depolarisation einer Mitralzelle aus Schnittpräparaten ohne tdTomato-Expression (rechts) **C)** Das Vorhandensein des Pcdh21-Cre-Allels bzw. die Expression von tdTomato hatte keinen Einfluss auf die Größe der ATP-induzierten Depolarisationen.

#### VI.4 UNTERSUCHUNG DER SPEZIFITÄT DES VERWENDETEN ANTIKÖRPERS GEGEN DEN P2Y<sub>1</sub>-REZEPTOR

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.1.8. führten zu der Vermutung, dass der verwendete Antikörper gegen das P2Y<sub>1</sub>-Rezeptorprotein möglicherweise unspezifische Bindungseigenschaften aufweist. Um diese Vermutung zu testen, wurde das *Cerebellum* als Vergleichsgewebe herangezogen, da P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren sowohl in Purkinjoneuronen als auch Bergmanngliazellen bereits histologisch und physiologisch nachgewiesen wurden (Morán-Jiménez und Matute, 2000; Amadio *et al.*, 2007b; Rudolph *et al.*, 2016). Die Färbungen wurden wie in Abschnitt 3.1.8. für den *Bulbus olfactorius* beschrieben durchgeführt, wobei auch hier Gewebe einer P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-*knock out*-Maus (P2Y<sub>1</sub>R KO) sowie Gewebe einer Wildtyp- (WT) Maus verwendet wurde. Abbildung 48 zeigt jeweils einen Ausschnitt aus dem *Cerebellum* mit Purkinjoneuronen, sowie der Molekular- und Körnerzellschicht. Im grünen Kanal ist die anti-P2Y<sub>1</sub>-Färbung zu sehen, im roten Kanal die Färbung gegen GFAP und in den übereinander gelagerten Aufnahmen (*merge*) ist in blau zusätzlich eine Zellkernfärbung dargestellt. Abbildung 48A zeigt die Antikörperfärbung im Gewebe der WT-Maus (p70), Abbildung 48B zeigt die gleiche Färbung im Gewebe der P2Y<sub>1</sub>R KO-Maus (p70). Obwohl der P2Y<sub>1</sub>-Antikörper im *knock out*-Mausgewebe nicht binden dürfte, zeigen sich im grünen Kanal die gleichen gefärbten Strukturen wie in der Kontrollfärbung. Eine Ko-Lokalisation von Bergmann-Gliazellen (rot) und dem P2Y<sub>1</sub>-Protein ist hingegen nicht zu erkennen. Es ist daher davon auszugehen, dass der P2Y<sub>1</sub>-Antikörper unspezifisch im Gewebe bindet.



**Abbildung 48: Untersuchung des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Expressionsmusters im *Cerebellum*.** Fluoreszenzaufnahmen sagittaler Gewebeschnitte einer immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor (grün) sowie die gliale Struktur GFAP (rot). In den übereinander gelagerten Aufnahmen (*merge*) ist in blau zusätzlich eine Zellkernfärbung (Hoechst33342) dargestellt. Maßstab: 70  $\mu$ m. **A)** Detailaufnahme der Purkinjeneurone (PKN) sowie der Molekular- und Körnerzellschicht aus Gewebe einer adulten WT-Maus (p70). Maßstab 30  $\mu$ m. **B)** Detailaufnahme der Purkinjeneurone (PKN) mit der Molekular- sowie Körnerzellschicht aus Gewebe einer adulten P2Y<sub>1</sub>R KO-Maus (p70). Maßstab: 70  $\mu$ m.

## VII EIDESTATTLICHE VERSICHERUNG

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

Hamburg, den 04. Januar 2018

KRISTINA SCHULZ

## VIII DANKE

Ohne die Mitarbeit und Unterstützung zahlreicher Personen wäre die Erstellung dieser Dissertation nicht möglich gewesen. Deshalb ist es an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mich in dieser Zeit begleitet haben.

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Christian Lohr und Dr. Daniela Hirnet für die Überlassung des überaus interessanten Themas, die Aufnahme in ihren Arbeitskreis und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Dr. Daniela Hirnet danke ich für alle erdenklich mögliche, hilfreiche Unterstützung. Besonders bedanke ich mich für die intensive, kompetente und warmherzige Begleitung in jeder Phase dieser Arbeit. Die Freiheit, die sie mir während des Forschungsprojektes gewährte trug genauso zum Gelingen dieser Arbeit bei wie ihr Rat, Fachwissen und ihre Hilfe, die ich jederzeit in Anspruch nehmen konnte.

In gleicher Weise danke ich auch Prof. Dr. Christian Lohr für die Betreuung dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt der ständigen Diskussionsbereitschaft, seiner jederzeit offenen Tür und der erfahrenen, sachkundigen und wertvollen Unterstützung. Sehr dankbar bin ich für das Vertrauen in mich und die stetige Bekräftigung auch in schwierigen Zeiten.

Mein herzlicher Dank geht an Prof. Dr. Veronica Egger für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit. Der DFG danke ich für die finanzielle Unterstützung meines Forschungsprojekts.

Danke sagen möchte ich auch den besten Mitdoktoranden, die man sich vorstellen kann. Toni, Timo und Damian, ohne Euch wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen und Ihr tragt entscheidend dazu bei, dass ich die Doktorandenzeit auf keinen Fall hätte missen wollen. Das gleiche gilt für meine Doktorandenvorgängerin Dr. Natalie Rotermund, die mir den Weg in die Welt der Elektrophysiologie geebnet hat. Toni und Natalie, Eure Freundschaft ist mir unbeschreiblich viel wert. Danke, dass Ihr immer da seid.

Bei Anne Catrin Rakete und Anne Theil bedanke ich mich für die allerbeste technische Unterstützung im Labor und die vielen tollen und persönlichen Gespräche, die den Arbeitsalltag unglaublich bereichert haben.

Allen Kollegen und Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich an dieser Stelle gesammelt „Danke“ sagen für die außergewöhnlich hohe Hilfsbereitschaft, den Teamgeist sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ich konnte mich immer auf Euch verlassen, vielen Dank!

Ganz großer Dank geht an meine wunderbaren Eltern, die in jeder Hinsicht eine herausragende Stellung einnehmen und weit über das für diese Arbeit notwendige Verständnis, Hilfe und Engagement immer für mich da sind. Ein herzliches Dankeschön geht

## DANKSAGUNG

auch an den Rest meiner Familie. An meine Schwester und mein Patenkind Niklas, der unser Leben so sehr bereichert und mich immer zum Lachen bringt. Allen meinen Freunden danke ich für die Ausdauer, dass sie mir stets zur Seite standen und immer wieder für Ablenkung gesorgt haben.

Danke!