

1 EINLEITUNG

1.1 Gliazellen sind der häufigste Zelltyp im zentralen Nervensystem

Im zentralen Nervensystem wird die Aufgabe der Informationsweiterleitung, -kodierung und -speicherung klassischerweise den Nervenzellen, den Neuronen, zugeschrieben. Neurone sind elektrisch erregbar und können elektrische Impulse sehr schnell über weite Strecken kommunizieren. Gliazellen besitzen diese Eigenschaften nicht (Kandel, 1995). Morphologisch wurden sie bereits im letzten Jahrhundert von Rudolf Virchow als Nerven Kitt beschrieben und bis vor etwa 25 Jahren als rein passive Elemente des Nervensystems angesehen, die nichts mit neuronaler Plastizität zu tun haben. Gliazellen sind jedoch bei vielen neuronalen Mechanismen von großer Bedeutung. So wäre die schnelle Informationsweiterleitung entlang der Axone nicht möglich, wenn nicht die Oligodendrozyten, einer von drei Gliazelltypen, die Myelinscheide bildeten und somit die Axone elektrisch isolierten (Kettenmann and Ransom, 1995). Ein zweiter Typ von Gliazellen sind die Mikrogliazellen. Sie sind die immunkompetenten Zellen des zentralen Nervensystems und eng verwandt mit den Makrophagen. Mikrogliazellen sorgen für die erste Immunantwort nach Verletzung oder Infektion des Gehirns (Kreutzberg, 1996).

Der dritte Gliazelltyp, mit dem sich diese Arbeit beschäftigt, sind die Astrozyten. Sie bilden den von der Anzahl her größten Anteil der Gliazellen. Im menschlichen Gehirn sind sie der häufigste Zelltyp mit 80 % der Gesamtanzahl an Zellen (Kettenmann and Ransom, 1995). Klassischerweise wurde den Astrozyten die Rolle als Nährzellen und als Stützzellen für synaptische Strukturen zugesprochen (Kandel, 1995), da sie mit ihren Endfüßen an den Blutgefäßen sitzen. Interessanterweise ist das Verhältnis

Astrozyten zu Gesamtzahl aller Zellen des Gehirns, der Gliaindex (Kettenmann and Ransom, 1995), umso größer, je höher entwickelt ein Lebewesen ist. Es kann daher vermutet werden, daß Astrozyten eine Rolle bei der Informationsverarbeitung und -speicherung spielen.

Der Marker für Astrozyten im histologischen Präparat ist eine positive Färbung für das gliale, fibrilläre, saure Protein (glial fibrillary acidic protein, GFAP), ein Intermediärfilamentprotein. GFAP ist die Hauptkomponente der Intermediärfilamente in adulten Astrozyten und wird zellspezifisch exprimiert (Brenner et al., 1994).

Die Regulation der GFAP-Genaktivität wurde mit Hilfe transgener Tiere intensiv studiert. Dazu wurden Tiere mit verschiedenen Reporter genen unter Kontrolle des gut beschriebenen, humanen GFAP-Promotors verwendet (Galou et al., 1994, Brenner and Messing, 1996).

1.1.1 GFAP-EGFP-transgene Mäuse erlauben die Identifikation von Astrozyten *in situ*

Um die Identifizierung der Astrozyten im akuten Hirnschnitt eindeutig und schnell möglich zu machen, wurde eine transgene Maus entwickelt, die das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) unter Kontrolle des humanen GFAP-Promotors exprimiert. Die selektive Expression eines Reportergens in GFAP-positiven Zellen verschiedener Spezies ist gut beschrieben (Brenner and Messing, 1996, Zhuo et al., 1997).

Das grüne, fluoreszierende Protein der Qualle *Aequoria Victoria* ist ein vielfach eingesetztes Werkzeug zur Visualisierung transgener Zellen (Tsien, 1998). Die Helligkeit der Fluoreszenz wurde gentechnologisch verstärkt und die hellste,

fluoreszierende Variante, die hier verwendet wurde, ist das EGFP (Patterson et al., 1997).

Die Kombination des GFAP-Promotors und der kodierenden Sequenz für EGFP wurde verwendet, um durch Oozyteninjektion dieses Konstrukts eine transgene Maus zu generieren (Eurogentec, Belgien), die eine Visualisierung von Astrozyten im lebenden Gewebe möglich macht (Abb.1). Folglich ist in dieser Maus die funktionelle Analyse von Astrozyten ohne weitere Anfärbung im akuten Gewebe möglich.

1.1.2 Astrozyten und ihre Interaktionen mit anderen Zelltypen

Die Nähe der Astrozyten zu synaptischen Strukturen und zu Blutgefäßen (Abb.1) prädestiniert sie zu einer Art Vermittlerrolle zwischen metabolisch aktiven Zellen im Gehirn und dem Blutkreislauf.

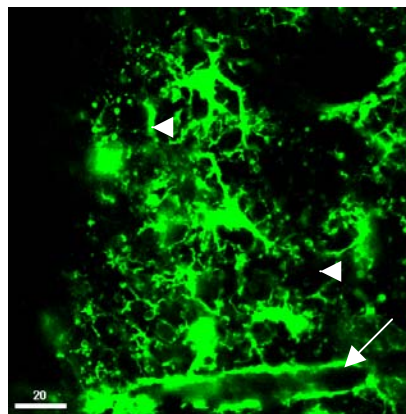


Abbildung 1

Mehrere Astrozyten im Cortex einer GFAP-EGFP-transgenen Maus. Durch die EGFP-Expression sind die Astrozyten bis in die feinsten Ausläufer deutlich grün gefärbt. Im unteren Bereich ist deutlich ein Blutgefäß zu erkennen (Pfeil), das fast gänzlich von astrozytären Ausläufern umhüllt ist. Nahe des Somas der oberen Zelle sind dunkle, runde Bereiche zu erkennen (Pfeilspitzen), wobei es sich um neuronale Somata handelt, die ebenfalls dicht von den Astrozyten umschlossen werden.

In der grauen Substanz umhüllen die astrozytären Ausläufer Synapsen und schließen diese zum Extrazellulärraum hin ab. Dort sorgen Astrozyten für die Wiederaufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt, insbesondere für die Aufnahme von Glutamat. Astrozyten exprimieren in hohem Maße Glutamattransporter. Die Aufnahme von Glutamat über Glutamattransporter ist extrem schnell und effektiv, so daß große Ströme über die astrozytäre Zellmembran, die durch Transporteraktivierung hervorgerufen werden (Clark and Barbour, 1997), gemessen werden können und zur Detektion von neuronaler Aktivität eingesetzt werden können (Bergles and Jahr, 1997, Diamond et al., 1998). Viele Studien belegen, daß es noch weitere Mechanismen gibt, die einen intensiven Informationsaustausch zwischen Glia und Neuronen gewährleisten. Astrozyten haben die Voraussetzungen, in neuronale Kommunikation integriert zu werden, da sie funktionale Rezeptoren für eine große Anzahl von Neurotransmittern und –hormonen exprimieren (Verkhratsky and Kettenmann, 1996), was den Astrozyten die Möglichkeit gibt, neuronale Aktivität zu detektieren und auf diese zu reagieren (Araque et al., 2001).

1.2 Expression von Neurotransmitterrezeptoren auf Astrozyten

1.2.1 Glutamatrezeptoren

Ein fast ubiquitär vorkommender Neurotransmitter im Gehirn ist Glutamat. Eine wichtige Frage ist daher, welche Glutamatrezeptoren Astrozyten im intakten Gewebe exprimieren. Für Glutamat gibt es zwei verschiedene Typen von Rezeptoren, die in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden können: ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren. Als ionotrope Rezeptoren bezeichnet man solche, die nach Ligandenbindung, in diesem Falle Glutamat, eine Ionenpore öffnen. Ionotrope

Glutamatrezeptoren können wiederum in Untergruppen eingeteilt werden: Die Glutamatrezeptoren vom Typ NMDA, AMPA und Kainat. Die Namensgebung erfolgt nach den selektiven (synthetischen, nicht-physiologischen) Liganden, die zur Öffnung der Ionenporen führen. Die Rezeptoren des AMPA-Typs können auch durch Kainat aktiviert werden, jedoch nicht umgekehrt, weshalb die Kainatrezeptoren eine eigene Untergruppe bilden. Die funktionellen, ionotropen Glutamatrezeptoren bestehen aus mehreren Untereinheiten, vermutlich vier oder fünf, die homo- oder heteromere Komplexe in der Zellmembran bilden. NMDA-Rezeptoren werden aus Untereinheiten der NR1-Subfamilie (NR1A-NR1D) und der NR2-Subfamilie (NR2A-NR2D), sowie Untereinheiten der neu beschriebenen NR3-Subfamilie (NR3A und NR3B) gebildet (Chatterton et al., 2002).

Metabotrope Glutamatrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Bis jetzt sind acht Subtypen beschrieben (mGluR 1-8). Nach Sequenzhomologien und dem intrazellulären Signalweg der Rezeptoren werden folgende Untergruppen unterschieden: Gruppe-I-Rezeptoren (mGluR 1 und 5) sind an die intrazelluläre IP3-Calciumkaskade gekoppelt, wohingegen Gruppe-II-Rezeptoren (mGlu 2 und 3) und Gruppe-III-Rezeptoren (mGluR 4,6 und 7) negativ an die Adenylylcyclase gekoppelt sind.

1.2.2 NMDA-Rezeptoren

NMDA-Rezeptoren gelten als Koinzidenzdetektoren auf der postsynaptischen Membran, da sie erst nach vorangegangener Depolarisation der Membran öffnen und zu einem Calciueinstrom in die Zelle führen, wodurch multiple Signalkaskaden ausgelöst werden können. Der spannungsabhängige Block der Pore geschieht durch ein Mg^{2+} -Ion, das erst bei genügender Depolarisation die Pore verläßt. Die bisher

beschriebenen NMDA-Rezeptoren zeigen somit bei einer ausreichend hohen Mg^{2+} -Konzentration (0,5 mM und höher) keine Leitfähigkeit. Der Mg^{2+} -Block wird bei Membranpotentialen positiver als -40 mV gelöst, und Ionen, Na^+ , K^+ und auch Ca^{2+} Ionen können durch die Pore in das Cytosol der Zelle einströmen. Da diese Rezeptoren erst bei einer bereits bestehenden Depolarisation der Membran öffnen, und daraufhin eine weitere, massivere Depolarisation der Zelle, bzw. der postsynaptischen Membran, sowie ein Einstrom von Ca^{2+} , einem der wichtigsten second messenger erfolgt, sind NMDA-Rezeptoren wichtige "Schalter" in den Signalkaskaden, die an der Ausbildung von synaptischer Plastizität beteiligt sind.

NMDA-Rezeptoren sind nicht nur wichtig in der Ausbildung von synaptischer Plastizität, sondern auch ein Schlüsselmolekül in der Induktion von Neurotoxizität (zur Übersicht siehe Ben et al., 1988, und Kutsuwada et al., 1992). Der Einstrom von Ca^{2+} in Neurone durch NMDA-Rezeptoraktivierung ist hier wahrscheinlich der wichtigste schädigende Faktor nach einer Akkumulation von Glutamat im Extrazellulärraum durch Verletzung oder Fehlfunktion des neuronalen Netzwerks.

1.2.3 Hinweise auf die Expression astrozytärer NMDA-Rezeptoren

Funktionale NMDA-Rezeptoren wurden bisher nur auf Neuronen beschrieben. Auf der Ebene der glutamatvermittelten Neuron-Glia-Kommunikation wurde deshalb astrozytären NMDA-Rezeptoren bislang keine Bedeutung zugemessen. So exprimieren Astrozyten zwar sowohl metabotrope Glutamatrezeptoren, als auch AMPA-Rezeptoren (Seifert et al., 1997, Seifert and Steinhauser, 1995). Bis jetzt gab es aber keinen Hinweis auf eine Rolle von NMDA-Rezeptoren auf Astrozyten bei Signalen von Neuronen an Astrozyten.

In kultivierten Astrozyten sind NMDA-Rezeptoren nicht exprimiert, jedoch gibt es einige Hinweise, daß NMDA Signale in Astrozyten im Hirnschnitt auslösen kann. Bergmann-Gliazellen reagieren auf topisch appliziertes NMDA, aber der induzierte Einwärtsstrom zeigt nicht die für NMDA-Rezeptoren typischen Eigenschaften, wie den spannungsabhängigen Mg^{2+} -Block (Müller et al., 1993). Zudem war die in diesen Zellen gemessene Antwort häufig durch Tetrodotoxin blockierbar (Shao and McCarthy, 1997), was darauf hindeutet, daß die NMDA-vermittelte Antwort durch einen indirekten Mechanismus hervorgerufen wird. Jedoch wurden Ströme mit ähnlicher Charakteristik auch in akuten Rückenmarkschnitten nach NMDA-Applikation gemessen (Ziak et al., 1998).

So gibt es keine eindeutigen Daten aus physiologischen Messungen, welche die Expression funktionaler NMDA-Rezeptoren auf Astrozyten zeigen. Es gibt jedoch etliche immunhistochemische Hinweise auf die Anwesenheit von NMDA-Rezeptoruntereinheiten auf glialen Membranen. Immunoreaktivität für die NR1-Untereinheit konnte in astrozytären Ausläufern nahe dendritischer und axonaler Elemente im Nucleus Accumbens nachgewiesen werden (Gracy and Pickel, 1996). So auch in der Amygdala (Farb et al., 1992, Farb et al., 1995) und im visuellen Cortex der Katze (Aoki et al., 1997, Aoki, 1997). Immunhistochemisch konnte die Lokalisation von NR1-, sowie NR2A- und NR2B-Untereinheiten, auf distalen Ausläufern von Astrozyten gezeigt werden (Conti et al., 1996). Auch die Expression von für NMDA-Rezeptoren kodierender mRNA konnte durch *in-situ*-Hybridisierung bewiesen werden. Die Expression scheint dabei jedoch auf eine kleine Subpopulation von Astrozyten begrenzt zu sein (Conti et al., 1994, Conti et al., 1997). Das Hauptproblem bei allen immunhistochemischen Nachweisverfahren ist jedoch die eindeutige Identifizierung des Zelltyps der zugehörigen immunoreaktiven Membran. Das klassische Markerprotein für Astrozyten, GFAP, wird nur in den

großen Ausläufern der Astrozyten exprimiert und nicht in den sehr feinen Ausläufern, welche die Kontaktstellen mit Synapsen bilden. Insgesamt markiert eine GFAP-Färbung nur etwa 15% des gesamten Astrozyten (Bushong et al., 2002). So ist eine eindeutige Identifizierung solcher Membranen, insbesondere in den sehr feinen, an Synapsen gelegenen Strukturen, auf immunhistochemischer Ebene nicht immer möglich. Zudem läßt eine Expression auf mRNA- oder Proteinebene noch nicht auf eine funktionelle Expression von Rezeptoren in der Membran schließen.

Um die Expression von funktionalen NMDA-Rezeptoren auf Astrozyten im Hirngewebe zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die NMDA-induzierten physiologischen Antworten dieser Zellen im akuten Hirnschnitt untersucht. Die Antwort der Astrozyten auf NMDA-Applikation in akuten corticalen Hirnschnitten wurde mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik und mit Calcium-Imaging-Techniken untersucht.

1.3 Astrozytäre Kommunikation

1.3.1 Astrozytäre Calciumsignale

Nicht nur die Kommunikation zwischen Neuronen und Gliazellen, auch die Kommunikation zwischen Gliazellen untereinander ist von Bedeutung. Auch Gliazellen, insbesondere Astrozyten, kommunizieren mit ihresgleichen innerhalb eines Netzwerkes. Die Art der Informationsverarbeitung und -kodierung ist bei Astrozyten anders als bei Neuronen: In Neuronen wird Information in Form von elektrischer Aktivität weitergeleitet, Astrozyten hingegen verarbeiten Signale in Form von intrazellulären Erhöhungen der Calciumkonzentration (Verkhratsky and Kettenmann, 1996, Verkhratsky et al., 1998). Diese Calciumsignale können verschiedenartig sein, von einzelnen, kurzzeitigen Calciumsignalen bis hin zu

Oszillationen der Konzentrationen (Parri et al., 2001). Neuronale und gliale Signale unterscheiden sich jedoch nicht nur durch den Signaltyp an sich. Die zeitliche Skala, in der sie wirken, sind deutlich verschieden. Gliale Signale sind um Größenordnungen langsamer als neuronale Signale. Während die Propagation von Aktionspotentialen entlang von Axonen im Millisekundenbereich passiert, propagieren die Calciumerhöhungen im Sekundenbereich (Cornell-Bell et al., 1990). Die Mechanismen sind also folglich auch auf der zeitlichen Ebene nicht als kompetitiv, sondern eher als sich ergänzend zu sehen.

Calciumkonzentrationserhöhungen in Astrozyten bleiben nicht ohne Folge für die sie umgebenden Zellen:

Die intrazellulären Calciumkonzentrationserhöhungen können neuronale Kommunikation beeinflussen (Kang et al., 1998, Araque et al., 1999, Araque et al., 2001) und zur Ausschüttung von neuroaktiven Substanzen, insbesondere von Glutamat aus Astrozyten führen (Pasti et al., 2001).

Die ersten Arbeiten, die diese Interaktionen zeigen, sind Arbeiten an kultivierten Astrozyten (Parpura et al., 1994), jedoch konnte in letzter Zeit auch gezeigt werden, daß funktionelle Interaktionen zwischen Neuronen und Astrozyten auch im intakten Gewebe existieren.

In der akut isolierten Retina konnte gezeigt werden, daß astrozytäre Calciumsignale zur Modulation von lichtinduzierten Antworten in Ganglienzellen führen (Newman and Zahs, 1998) und im Hippocampus scheinen Glutamatrezeptoren eine Hauptaufgabe bei Neuron-Glia-Interaktionen zu spielen (Bezzi et al., 1998).

1.3.2 Calciumwellen als astrozytäre Kommunikationsform

Wie bereits beschrieben, exprimieren Astrozyten eine große Anzahl verschiedener Neurotransmitterrezeptoren als Sensoren für synaptische Aktivität. Sie können zusätzlich über längere Distanzen kommunizieren. Dies geschieht über sich intrazellulär fortsetzende Calciumsignale, die sogenannten Calciumwellen (Cornell-Bell et al., 1990, Charles et al., 1991). Diese Calciumwellen breiten sich innerhalb des astrozytären Netzwerks aus und wurden bislang in astrozytären Primärkulturen, Schnittkulturen und frisch isolierten Retinapräparationen charakterisiert (Innocenti et al., 2000, Venance et al., 1997, Dani et al., 1992, Newman, 2001). Zwei verschiedene Mechanismen der Kommunikation während der Calciumwelle wurden für Astrozytenkulturen beschrieben (siehe auch Abb.2):

- 1.) die Diffusion von second messengers über gap junctions zwischen den hochgradig gekoppelten Astrozyten mit einer darauf folgenden Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, wie dem endoplasmatischen Retikulum (Giaume and Venance, 1998) und
- 2.) die Freisetzung des Transmitters Adenosintriphosphat (ATP) aus Astrozyten in den Extrazellulärraum, und eine darauf folgende Aktivierung von Purinorezeptoren auf benachbarten Zellen, welche dann wiederum eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels zeigen (Cotrina et al., 2000, Wang et al., 2000) und wiederum ATP freisetzen.

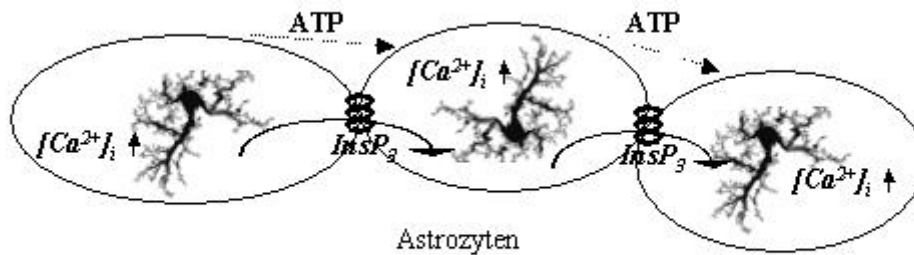


Abbildung 2

Wie im Text beschrieben, können Astrozyten über zwei Hauptwege miteinander kommunizieren. Zum einen über die Diffusion von Botensubstanzen wie Inositoltrisphosphat (InsP_3) durch gap junctions und zum anderen über ATP-Freisetzung und Aktivierung von purinergen Rezeptoren auf Nachbarzellen, was zu einer Calciumerhöhung führt. Bei diesem Signalweg über den Extrazellulärraum sind auch Signale an nicht direkt benachbarte Zellen möglich.

Es wurden bisher keine Versuche zu Calciumwellen im lebenden, akut isolierten Gehirngewebe durchgeführt. Newman und Zahs (Newman and Zahs, 1997) konnten allerdings zeigen, daß eine astrozytäre Calciumwelle sich innerhalb einer intakten Retina ausbreiten kann, und sie konnten weiterhin zeigen, daß diese Welle auch Müller-Zellen mit einschließt, radiale Glia, die einige für Astrozyten typische Eigenschaften haben. In der Retinapräparation konnte gezeigt werden, daß die Calciumwelle sich über ATP-Freisetzung und folgende Purinorezeptoraktivierung fortsetzt (Newman, 2001).

Der Mechanismus, der zur ATP-Freisetzung oder auch zur Freisetzung anderer Neurotransmitter aus Astrozyten führt, ist noch ungeklärt. Die ATP-Freisetzung ist calciumunabhängig, d.h. sie geschieht auch ohne einen Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels in Astrozyten (Wang et al., 2000). Hingegen ist die Freisetzung von Glutamat, eines weiteren Neurotransmitters, den Astrozyten in den Extrazellulärraum abgeben können, abhängig von einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Bezzi et al., 1998, Pasti et al., 2001). Aus einer

calciumabhängigen Glutamatfreisetzung ergibt sich, daß Änderungen in der intrazellulären Calciumkonzentration in Astrozyten neuronale Aktivität beeinflussen können (Hassinger et al., 1995, Parpura and Haydon, 2000, Newman and Zahs, 1998).

Obwohl astrozytäre Calciumwellen hauptsächlich als ein Kommunikationsweg beschrieben werden, über den Astrozyten auch neuronale Signaltransmission beeinflussen können, würden diese Wellen auch allen Ansprüchen genügen, die für eine weitreichende Kommunikation von pathologischen Vorgängen im Gehirn notwendig sind. Es gibt Befunde, daß Gliazellen pathologische Vorgänge, die weiter entfernt stattfinden, detektieren können. Beispielsweise werden nach einer Verletzung des Gehirns Mikrogliazellen mehrere Millimeter weit entfernt von der Verletzungsstelle aktiviert (Lehrmann et al., 1997, Nolte et al., 2001). Mikrogliazellen reagieren mit einer komplexen und abgestuften Reaktion auf jegliche Art von Verletzung im ZNS (Kreutzberg, 1996). Es ist jedoch immer noch unklar, welche Signale die initiale Aktivierung der Mikrogliazellen einleiten. Kultivierte Mikroglia zeigen einen aktivierten Phänotyp nach Behandlung mit verschiedenen, mit pathologischen Vorgängen assoziierten Substanzen, wie zum Beispiel bakteriellen Zellwandkomponenten (Prinz et al., 1999) und Komplementfaktoren (Ilschner et al., 1996), aber auch nach Inkubation mit ATP (Hide et al., 2000). Folglich ist ATP eine mögliche Substanz, die Verletzungen im Gehirn über solche Calciumwellen an die Mikroglia signalisieren könnte, da Mikroglia in Kultur (Walz et al., 1993) und auch im akuten Hirnschnitt (Boucsein et al., 2003) verschiedene Typen von Purinorezeptoren exprimieren. Stimulation von Mikrogliazellen in Kultur mit Agonisten für Purinorezeptoren führt zur Freisetzung von Tumornekrosisfaktor α (TNF- α) aus diesen Zellen (Hide et al., 2000) und zur Modulation der Interleukin (IL)-1 β Freisetzung (Ferrari et al., 1997b), somit also zu ihrer Aktivierung.

Von ATP getragene, intergliale Calciumwellen wären also ein Medium, auch Mikroglia weiter entfernt vom Ort der primären Verletzung zu aktivieren. Auch Astrozyten zeigen eine Art von Aktivierung in den Randzonen um Schädigungen im Gehirn, die sog. Astrogliose. Diese ist insbesondere durch eine verstärkte Expression von GFAP gekennzeichnet (Nolte et al., 2001). Die Astrozyten bilden einen festen Zellverband um die geschädigte Stelle, weshalb häufig auch von einer "Glianarbe" gesprochen wird (Abb.3). Auch für die Aktivierung von Astrozyten in den Randzonen solcher Verletzungen könnten Calciumwellen verantwortlich sein.

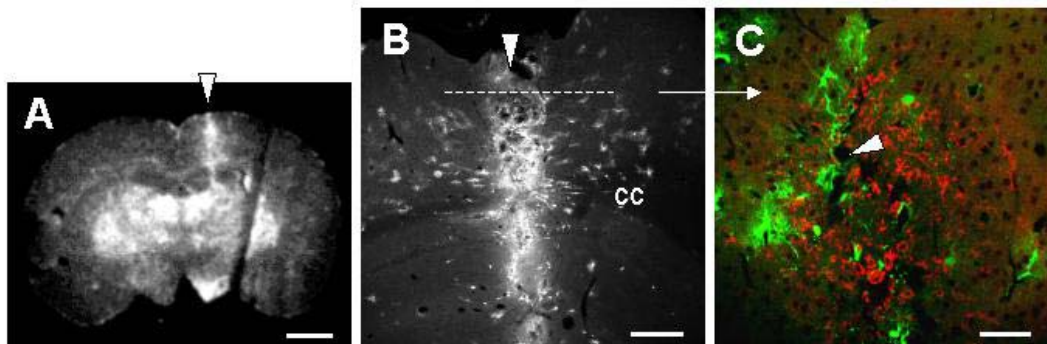


Abbildung 3

Die Aktivierung von Astrozyten in GFAP-EGFP-transgenen Mäusen um eine Verletzung des Hirngewebes herum ist in A deutlich als verstärkte Fluoreszenz und damit verstärkte GFAP-Expression um die Verletzungsstelle herum zu erkennen (Pfeil). B zeigt die Stelle der Verletzung in stärkerer Vergrößerung. C: Aufsicht auf B, wobei in rot Mikroglia angefärbt sind, die Immunzellen des Gehirns.

CC = Corpus Callosum

Die Kommunikation zwischen Gliazellen, insbesondere zwischen Astrozyten im akuten Hirngewebe ist nicht hinreichend untersucht, um eine Aussage über die Rolle von in den Extrazellulärraum abgegebenen Substanzen, also klassischerweise von "Neuro"-transmittern, während dieser Kommunikation zu machen. Es ist jedoch anzunehmen, daß Neurotransmitter auch in dieser Präparation nicht nur für die

Kommunikation zwischen Neuronen, sondern auch für die Kommunikation zwischen Gliazellen eine Rolle spielen.

1.4 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand aus zwei Teilen: Zum einen sollte die Expression von Neurotransmitterrezeptoren auf Astrozyten untersucht werden. Da Glutamat der wichtigste exzitatorische Transmitter im Säugergehirn ist, sollte die Expression eines Subtyps der Glutamatrezeptoren, des NMDA-Rezeptors, auf Astrozyten im akuten Hirnpräparat charakterisiert werden. Dieser Rezeptor ist eine calciumpermeable Ionenpore und seine Expression gibt jeglicher Zelle die Voraussetzung unmittelbar auf einen Anstieg der Glutamatkonzentration im Gewebe zu reagieren, da es nach Rezeptoraktivierung zu einem sofortigen Anstieg der Calciumkonzentration im Cytosol kommt. Um die Expression von funktionalen NMDA-Rezeptoren auf Astrozyten im Hirngewebe zu untersuchen, sollten im Rahmen dieser Arbeit die NMDA-induzierten, physiologischen Antworten der Astrozyten im akuten Hirnschnitt beobachtet werden. Die Antwort der Astrozyten auf NMDA-Applikation in akuten corticalen Hirnschnitten sollte mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik und mit Calcium-Imaging-Techniken untersucht werden.

Im zweiten Bereich der Arbeit sollte die rein interastrozytäre Kommunikation im intakten Gehirngewebe charakterisiert werden. Diese wurde bisher lediglich in Kulturmodellen untersucht, nicht jedoch im intakten Hirngewebe. Um die interastrozytäre Kommunikation im intakten Hirngewebe zu untersuchen, sollte die Propagation von Calciumwellen im akuten Hirnschnitt erforscht werden. Die Art der Kommunikation zwischen den reaktiven Zellen und eine eventuelle Transmitterfreisetzung während der Calciumwelle sollte charakterisiert werden. Dabei sollten nicht nur Signale in Astrozyten betrachtet, sondern die Reaktionen der gesamten Gliazellpopulation beobachtet und charakterisiert werden.