

# Astrozytäre Kommunikation im Cortex

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

von  
Dipl.-Biochem. Brigitte Haas  
geb. am 25.01.1977 in Nürnberg

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin  
im Dezember 2006

Gutachter: 1. Prof. Dr. Fritz G. Rathjen  
Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin  
Entwicklungsbiologie  
Robert-Rössle Str. 10  
13125 Berlin

2. Prof. Dr. Helmut Kettenmann  
Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin  
Zelluläre Neurowissenschaften  
Robert-Rössle Str. 10  
13125 Berlin

Tag der Disputation: 28.2.07

**Inhalt:**

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1       | Einleitung .....  | 7  |
| 1.1     | Der Aufbau des Gehirns .....  | 7  |
| 1.1.1   | Verwendete Hirnareale .....   | 8  |
| 1.2     | Gliazellen .....  | 9  |
| 1.2.1   | Astrozyten sind der häufigste Zelltyp im Zentralen Nervensystem ..... | 10 |
| 1.2.2   | Expression von Neurotransmitterrezeptoren auf Astrozyten .....        | 12 |
| 1.2.2.1 | Glutamatrezeptoren .....  | 13 |
| 1.2.2.2 | Purinerge Rezeptoren .....  | 14 |
| 1.2.3   | Gap Junctions verbinden Astrozyten untereinander .....                | 15 |
| 1.3     | Astrozytäre Kommunikation .....                                       | 16 |
| 1.3.1   | Astrozytäre $Ca^{2+}$ -Signale .....                                  | 16 |
| 1.3.2   | Astrozyten kommunizieren untereinander durch $Ca^{2+}$ -Wellen .....  | 17 |
| 1.3.2.1 | Propagationsmechanismen astrozytärer $Ca^{2+}$ -Wellen .....          | 18 |
| 1.3.3   | $Ca^{2+}$ -Signale unter pathologischen Bedingungen .....             | 22 |
| 1.4     | Interaktionen von Astrozyten mit anderen Zellen .....                 | 23 |
| 1.4.1   | Kommunikation zwischen Neuronen und Astrozyten .....                  | 23 |
| 2       | Zielsetzung .....   | 26 |
| 3       | Material und Methoden .....   | 27 |
| 3.1     | Puffer und Lösungen .....   | 27 |
| 3.1.1   | ACSF .....  | 27 |
| 3.1.2   | HEPES-Puffer .....  | 27 |
| 3.1.3   | Lösungen extrazellulär applizierter Substanzen .....                  | 28 |
| 3.1.4   | Intrazelluläre Lösungen .....   | 28 |
| 3.1.5   | Pufferlösungen für Färbungen .....                                    | 29 |
| 3.2     | Verwendete Tiere .....  | 30 |
| 3.2.1   | NMRI .....  | 30 |
| 3.2.2   | Connexin-defiziente Tiere .....                                       | 30 |
| 3.2.3   | GFAP-EGFP .....   | 30 |
| 3.2.4   | PDAPP/GFAP-EGFP .....   | 31 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.3     | Anfertigen von Hirnschnitten für elektrophysiologische Untersuchungen ...   | 31 |
| 3.4     | Imaging von astrozytären Calciumsignalen .....  | 32 |
| 3.5     | Auslösen von $Ca^{2+}$ -Wellen.....   | 33 |
| 3.6     | Auslösen und Imaging von Cortical Spreading Depression .....  | 34 |
| 3.7     | Nachweis von ATP mittels Sniffer-cell-assay.....  | 34 |
| 3.8     | Patch Clamp-Messungen .....   | 35 |
| 3.9     | Verwendete Stimulations- und Messprotokolle .....   | 36 |
| 3.10    | Anfärben von Zellen für morphologische Analysen.....  | 37 |
| 3.11    | Sulforhodamin-Färbung.....  | 38 |
| 3.12    | Kongorot-Färbung.....   | 38 |
| 4       | Ergebnisse.....   | 39 |
| 4.1     | Kopplung und elektrophysiologische Eigenschaften von Astrozyten .....   | 39 |
| 4.1.1   | Kopplung von Astrozyten in Cortex und Corpus callosum von GFAP-EGFP-Mäusen.....                                       | 39 |
| 4.1.2   | Kopplung von Astrozyten in Connexin-defizienten Mäusen.....   | 41 |
| 4.1.3   | Kopplung und elektrophysiologische Eigenschaften von Astrozyten in einem Tiermodell für die Alzheimer Krankheit ..... | 42 |
| 4.2     | Astrozytäre $Ca^{2+}$ -Wellen .....   | 46 |
| 4.2.1   | Elektrische Stimulation im Cortex aktiviert Neurone und Astrozyten ...  | 46 |
| 4.2.2   | Mechanismus der Ausbreitung von astrozytären $Ca^{2+}$ -Wellen im Cortex .....  | 49 |
| 4.2.3   | Messung von Transmitterfreisetzung aus Astrozyten während astrozytärer $Ca^{2+}$ -Wellen .....                        | 51 |
| 4.2.3.1 | Charakterisierung der Gl261 Zellen.....   | 51 |
| 4.2.3.2 | ATP-Freisetzung während astrozytärer $Ca^{2+}$ -Wellen.....   | 53 |
| 4.2.4   | $Ca^{2+}$ -Wellen unter pathologischen Bedingungen.....   | 57 |
| 4.2.4.1 | Unter nicht gekoppelten Astrozyten treten $Ca^{2+}$ -Wellen spontan auf .....   | 57 |
| 4.2.4.2 | ATP-Freisetzung während CSD .....   | 60 |
| 4.3     | Neuronal induzierte $Ca^{2+}$ -Signale in Astrozyten.....   | 61 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 4.3.1   | Mechanismus der neuronal induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Astrozyten im motorischen Cortex.....  | 61 |
| 4.3.2   | Mechanismus der neuronal induzierten $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Astrozyten im Barrel Cortex.....  | 65 |
| 4.3.2.1 | Die Reaktion im Barrel Cortex unterscheidet sich von der im motorischen.....  | 65 |
| 4.3.2.2 | Im Barrel Cortex zeigen in jungen Tieren sowohl Neurone als auch Astrozyten $\text{Ca}^{2+}$ -Signale.....  | 66 |
| 4.3.2.3 | Astrozyten reagieren nicht auf neuronale Spontanaktivität.....  | 71 |
| 4.3.2.4 | Pharmakologie des astrozytären Signals im Barrel Cortex.....  | 73 |
| 5       | Diskussion .....  | 78 |
| 5.1     | Kopplung von Astrozyten.....  | 78 |
| 5.1.1   | Astrozyten im Cortex bilden große Netzwerke.....  | 78 |
| 5.1.2   | Elektrophysiologische Eigenschaften der Astrozyten und Ausmaß der Kopplung ändern sich in der Nähe von A $\beta$ -Plaques.....                            | 79 |
| 5.2     | Calciumwellen in der grauen Substanz.....   | 81 |
| 5.2.1   | Astrozytäre $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen können sich im Cortex ausbreiten.....  | 81 |
| 5.2.2   | Propagation von astrozytären $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen hängt im Cortex von funktionellen Gap Junctions ab.....   | 82 |
| 5.2.3   | Sniffer Zellen detektieren ATP-Freisetzung.....   | 83 |
| 5.2.4   | ATP- und astrozytäre $\text{Ca}^{2+}$ -Welle sind unabhängig von einander .....   | 85 |
| 5.2.5   | ATP als neuromodulatorische Substanz.....   | 87 |
| 5.2.6   | Unter ungekoppelten Astrozyten kommt es leichter zur Auslösung von Spreading Depression und damit assoziierten astrozytären $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen..... | 88 |
| 5.2.7   | Während CSD wird ATP freigesetzt .....  | 90 |
| 5.3     | Neuronal induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Astrozyten.....  | 91 |
| 5.3.1   | Im motorischen Cortex ist das astrozytäre Signal durch neuronales NO induziert  | 91 |
| 5.3.2   | $\text{Ca}^{2+}$ -Signale im Barrel Cortex .....  | 92 |

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| 5.3.2.1 | In jungen Tieren zeigen Neurone und Astrozyten $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nach elektrischer Stimulation ..... | 92  |
| 5.3.2.2 | Astrozyten reagieren selektiv auf glutamaterge Transmission in einzelnen Barrel Columns .....                | 93  |
| 5.3.2.3 | Purinerge Antagonisten verstärken die Antwort der Astrozyten auf neuronale Aktivität.....                    | 96  |
| 6       | Zusammenfassung .....  | 97  |
|         | Summary .....  | 98  |
| 7       | Literaturverzeichnis.....  | 99  |
| 8       | Anhang .....   | 116 |
|         | Abkürzungsverzeichnis.....   | 116 |
|         | Publikationen und Posterbeiträge.....  | 118 |
|         | Erklärung zur selbständigen Durchführung der Dissertation .....  | 121 |
|         | Danksagung .....   | 122 |