

1 Einleitung

Das Verständnis der Funktionsweise des Gehirns hat sich in den letzten 20 Jahren deutlich gewandelt. Grund dafür ist die eingehende Beschäftigung mit Zellen, die zwar schon lange bekannt sind, denen man aber lediglich untergeordnete Funktionen zusprach: den Astrozyten. Da diese im Gegensatz zu Nervenzellen nicht elektrisch erregbar sind, fehlte lange Zeit die Technik, ihre „Sprache“, nämlich Änderungen der intrazellulären Calcium- (Ca^{2+}) Konzentration, zu verstehen. Erst mit der Entwicklung verbesserter Ca^{2+} -sensitiver Farbstoffe Mitte der 80er Jahre wie Fura-2 (Grynkiewicz et al., 1985), konnte man ihren Geheimnissen auf die Spur kommen. Die vorliegende Doktorarbeit beschreibt die Kommunikationsform der Astrozyten, die Ca^{2+} -Wellen, in akut isoliertem Gewebe und geht auf neuronal induzierte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten ein. Am Anfang soll allerdings eine Einführung in den Aufbau des Gehirns allgemein und in die Eigenschaften der Astrozyten im Speziellen stehen.

1.1 *Der Aufbau des Gehirns*

Das Zentrale Nervensystem (ZNS) umfasst das Rückenmark und das Gehirn. Grundsätzlich unterscheidet man im ZNS zwei Strukturen, die weiße und die graue Substanz. Die graue Substanz, die den Großteil des Hirns ausmacht, enthält die neuronalen Zellkörper, sowie Gliazellen. In der weißen Substanz, die einen Teil des Rückenmarks bildet und im Hirn durch den Corpus callosum, die Brücke zwischen den Hemisphären, repräsentiert wird, finden sich myelinisierte Axone von Neuronen, sowie ebenfalls Gliazellen. Innerhalb der Großhirnhälften (cerebrale Hemisphären), mit denen sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, unterscheidet man Großhirnrinde (Neocortex), weiße Substanz (Corpus callosum) und drei Kerne: die Basalganglien, den Hippokampus und die Amygdala. Der Neocortex zeigt einen typischen sechsschichtigen Aufbau und wird als Sitz der höchsten integralen Funktionen des Gehirns angesehen. Viele Bereiche der Großhirnrinde dienen in erster Linie der Verarbeitung von sensorischen Informationen oder motorischen Befehlen. Je nachdem, auf welcher Ebene sie für die Informationsverarbeitung verantwortlich sind,

werden sie als primäre, sekundäre oder tertiäre (sensorische oder motorische) Areale bezeichnet. Bei Primaten machen die so genannten Assoziationsfelder einen weiteren großen Teil des Neocortex aus. Ihre Aufgabe besteht darin, verschiedenartige Informationen zu einer sinnvollen Handlung zu verknüpfen.

1.1.1 Verwendete Hirnareale

In dieser Arbeit wurden die Hirnareale des Barrel Cortex und des motorischen Cortex der Maus als Präparation zur Erforschung der Mechanismen von Neuron-Glia Interaktionen verwendet. Mechanismen der interastrozytären Kommunikation wurden ebenfalls im motorischen Cortex erforscht und mit dem Hippokampus und dem Corpus callosum verglichen. Im Folgenden wird auf diese Strukturen näher eingegangen.

Der Barrel Cortex, Teil des primären somatosensorischen Cortex, dient bei Nagetieren der Repräsentation einzelner Tasthaare und zeichnet sich durch eine genau beschriebene hoch organisierte Struktur aus (Abb. 1.1). Dadurch lässt sich die Informationsweiterleitung nach Stimulation einzelner Barthaare genau verfolgen. Auch können die zellulären Veränderungen nach gezieltem Entfernen einzelner Tasthaare beobachtet werden.

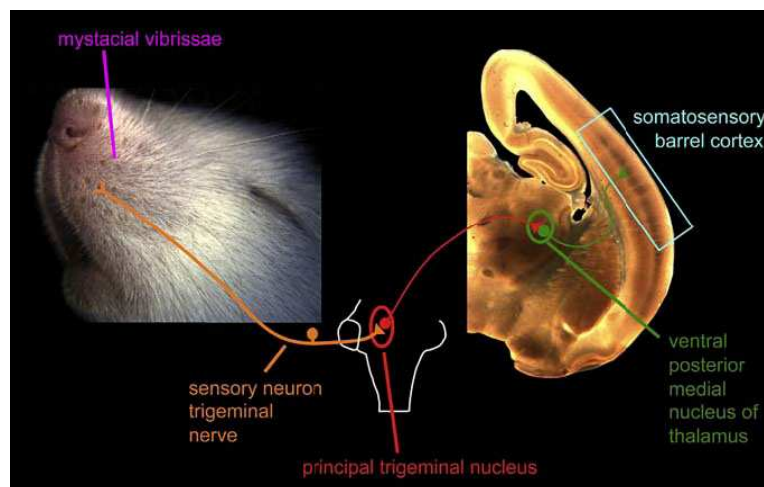


Abbildung 1.1: Das Muster der Barthaare (links) wird im Neocortex durch Gruppen von Neuronen (rechts, dunkle Flecken sind Neurone, die ein Barrel bilden) abgebildet. Dabei bleibt die architektonische Anordnung erhalten und einzelne Schnurrhaare lassen sich exakt dem entsprechenden Barrel zu ordnen (Petersen, 2003).

Deshalb eignet er sich ausgezeichnet als Modellsystem zur Erforschung der Verarbeitung somatosensorischer Informationen und der Anpassungsfähigkeit des Gehirns nach Schädigungen. Als Teil des Neocortex besitzt auch der Barrel Cortex

einen sechsschichtigen Aufbau. Jedes Barthaar wird durch eine Gruppe von Neuronen in Schicht 4, ein so genanntes Barrel (Tonne), vertreten, das sich lichtmikroskopisch anhand der tonnenförmigen Form leicht identifizieren lässt (Abb. 1.1). Barrels erhalten sensorischen Eingang über den Thalamus. Vom Barrel aus wird die eingegangene Information vertikal zur Hirnoberfläche weiter geleitet. Diese Verschaltung definiert die so genannte Barrel Column (Säule), die sich säulenartig in Schicht 2/3 und 5 erstreckt. Funktionelle Verbindungen zwischen einzelnen Barrels sind selten. Der Input innerhalb eines Barrels wird durch autaptische Verschaltung in Schicht 4 verstärkt, die Projektion auf die postsynaptischen Neuronen erfolgt dann innerhalb einer Barrel Column in Schicht 2/3 (Lubke et al., 2003), wo es zur weiteren Verstärkung des Signal kommt (Feldmeyer et al., 2006).

Der motorische Cortex ist im Vergleich zum Barrel Cortex weniger deutlich strukturiert. Ihm fehlt, im Vergleich zu diesem, eine klar zu erkennende granuläre Schicht 4, und er wird deshalb zum agranulären frontalen Cortex gezählt. Der Input kommt vom ventrolateralen Thalamus, der wiederum Informationen aus dem Kleinhirn und den Basalganglien erhält. Die Ausgangsprojektionen führen von Neuronen der Schicht 5 direkt zum Rückenmark (Schwartz A.B. and Wise S.P, 2004).

Der zum limbischen System gehörende Hippokampus ist Teil des mittleren Temporallappens. Der Hippokampus ist das evolutionär älteste Assoziationsgebiet. Er stellt einen kurzfristigen Speicher (Wochen bis Monate) für Inhalte des Langzeitgedächtnisses dar. Für eine permanente Speicherung überträgt er die erworbenen Informationen in andere Hirngebiete, vermutlich in den Cortex (Kandel 1996, Hanser 2000).

1.2 Gliazellen

Im ZNS wird die Aufgabe der Informationsweiterleitung, -kodierung und -speicherung klassischerweise den Neuronen zugeschrieben, da sie elektrisch erregbar sind und damit elektrische Impulse sehr schnell über weite Strecken kommunizieren können.

Obwohl sie dadurch hauptsächlich für die Funktion des Gehirns verantwortlich sind, sind sie zahlenmäßig unterlegen. Mehr als die Hälfte des Nervensystemvolumens machen die nichtneuronalen Gliazellen aus. Sie sind damit im Gehirn von Säugetieren bis zu zehnmal häufiger vertreten als Nervenzellen (Magistretti and Ransom, 2002). Obwohl sie schon im 19. Jahrhundert von Rudolf Virchow beschrieben wurden, wusste man im Vergleich zu den Neuronen lange relativ wenig über ihre Funktionen. Man vermutete, dass sie lediglich als Nähr- und Stützelemente dienen und keinen Einfluss auf neuronale Plastizität haben. Gliazellen unterscheiden sich in vielen Aspekten grundlegend von Neuronen, u. a. da sie nicht elektrische erregbar und damit nicht unmittelbar an der schnellen Informationsübertragung beteiligt sind.

Man teilt die Gliazellen von Vertebraten in Mikro- und Makroglia ein.

Mikroglia sind mesodermalen Ursprungs und leiten sich embryologisch gesehen von Makrophagen ab. Als „Immunzellen des Gehirns“ werden sie bei Verletzungen aktiviert und sind sie für den Abtransport von Zelltrümmern, die bei pathologischen Prozessen entstehen, verantwortlich. Makroglia dagegen sind ektodermalen Ursprungs und werden auch als Neuroglia bezeichnet. Man unterscheidet Schwann-Zellen, Oligodendrozyten und Astrozyten. Schwann-Zellen bilden die Myelinscheide um Axone im peripheren, Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem. Eine schnelle Informationsweiterleitung entlang der Axone wäre ohne sie nicht möglich, da sie die Axone elektrisch isolieren.

1.2.1 Astrozyten sind der häufigste Zelltyp im Zentralen Nervensystem

Astrozyten sind in der grauen Substanz die häufigsten Gliazellen (Kettenmann and Ransom, 2005). Ihr Anteil an der Gesamtzellzahl, der Gliaindex, nimmt mit steigender kognitiver Leistung zu. Im menschlichen Cortex kommen auf jedes Neuron 1,4 Astrozyten, in dem von Mäusen lediglich knapp 0,4 (Nedergaard et al., 2003). Es kann daher vermutet werden, dass Astrozyten eine Rolle bei der Informationsverarbeitung und -speicherung spielen. Darüber hinaus ist bekannt, dass

Astrozyten die korrekte Bildung von Synapsen kontrollieren (Slezak and Pfrieger, 2003).

Man differenziert Astrozyten morphologisch und funktionell in folgende Untergruppen: radiale Astrozyten wie Bergmann Gliazellen und Müller-Zellen der Retina, fibrilläre, die hauptsächlich in der weißen Substanz, und protoplasmatische, die hauptsächlich in der grauen Substanz vorkommen (Kettenmann and Ransom, 2005). Gemeinsame Merkmale fast aller Astrozyten sind die Expression spezifischer Proteine wie des glialen fibrillären sauren Proteins (glial fibrillary acidic protein, GFAP), des intermediären Filaments Vimentin und des Ca^{2+} -bindenden Proteins S-100 β (Verkhratsky 1998). GFAP ist die Hauptkomponente der Intermediärfilamente in adulten Astrozyten und wird zellspezifisch exprimiert. Daher wird GFAP häufig als Marker bei transgenen Tieren oder bei immunhistologischen Färbungen verwendet.

Astrozyten befinden sich im Hirn in einer strategisch günstigen Position. Ihre Fortsätze bilden sowohl auf Neuronen, als auch auf dem Endothel der Blutgefäße so genannte Endfüßchen (Abb. 1.2). Somit weisen sie eine Kontaktseite zur neuronalen Membran und eine weitere zu den Grenzen des ZNS, nämlich den Blutgefäßen und den Ventrikeln auf und sind dadurch prädestiniert, Ernährungsfunktionen für Neurone zu übernehmen. Auf folgende Aufnahmen von Astrozyten aus einer transgenen Maus, in denen die Astrozyten mit dem grün fluoreszierenden Protein EGFP, das unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promotor steht, markiert sind (Nolte et al., 2001), sind diese Eigenschaften gut zu erkennen (Abb. 1.2).

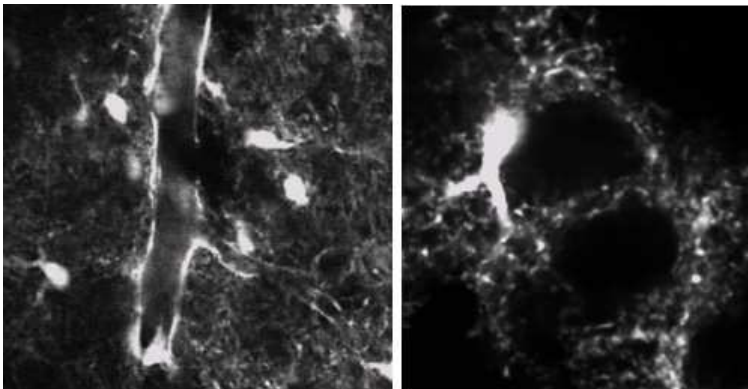


Abbildung 1.2:
Astrozytäre Fortsätze
winden sich um
Blutgefäße (links) und
stehen in engem Kontakt
mit Neuronen und
Synapsen (rechts).

Die astrozytären Ausläufer umhüllen Neurone und Synapsen und schließen diese zum Extrazellulärraum hin ab. In Abb. 1.2 rechts zeichnen sich die umhüllten neuronalen Somata durch schwarze ovale Bereiche in der Bildmitte ab.

Funktional spielt diese enge Assoziierung astrozytärer und neuronaler Strukturen vor allem bei der Signalübertragung an glutamatergen Synapsen eine wichtige Rolle: Durch die in hohem Maße exprimierte Glutamattransporter sorgen Astrozyten für die Wiederaufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt. Dieser Transport ist so schnell und effektiv, dass große Ströme über die astrozytäre Zellmembran, die durch Transporteraktivierung hervorgerufen werden, (Clark and Barbour, 1997) gemessen und zur Detektion von neuronaler Aktivität eingesetzt werden können (Bergles and Jahr, 1997; Diamond et al., 1998). Eine weitere Eigenschaft der Astrozyten, nämlich ihre hohe Kalium-(K⁺) Permeabilität, ermöglicht ihnen die Pufferung von K⁺-Ionen, deren Konzentration bei neuronaler Erregung im Extrazellulärraum ansteigt. Damit wird eine Depolarisation von Nachbarneuronen vermieden.

1.2.2 Expression von Neurotransmitterrezeptoren auf Astrozyten

Astrozyten exprimieren eine Vielzahl von Rezeptoren, unter anderem für Glutamat und GABA, die wichtigsten exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmitter, sowie purinerge Rezeptoren. Des Weiteren wurden Rezeptoren für Glycin, Acetylcholin (nikotinisch und muskarinisch), Adrenalin, Dopamin, Histamin, Serotonin, Angiotensin, das atriale natriuretische Peptid, Bradykinin, Endothelin, Opioide, Oxytozin, Vasopressin, Somatostatin, Tachykinin, das Thyreotropin freisetzende Hormon (TRH) und das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) nachgewiesen (Steinhauser and Kettenmann, 2007). Allerdings zeigt sich immer deutlicher, dass Astrozyten keine einheitliche Population bilden, sondern sich auch innerhalb eines Hirngebietes in vielen Eigenschaften unterscheiden. Auch können Expressionsmuster kultivierter Astrozyten von der Situation *in situ* und *in vivo* abweichen.

1.2.2.1 Glutamatrezeptoren

Glutamatrezeptoren (GluRs) kommt eine besondere Bedeutung zu, da Glutamat als fast ubiquitär vorkommender Neurotransmitter im Gehirn prädestiniert für Neuro-Glia-Kommunikation ist. Im Folgenden wird zusammengefasst, welche Glutamatrezeptoren Astrozyten im intakten Gewebe exprimieren.

Generell unterscheidet man für Glutamat, wie auch für andere Substanzen, ionotrope und metabotrope Rezeptoren. Ionotrope Rezeptoren öffnen nach Ligandenbindung eine Ionenpore. Funktionelle ionotrope Glutamatrezeptoren bestehen aus mehreren Untereinheiten, vermutlich vier oder fünf, die homo- oder heteromere Komplexe in der Zellmembran bilden. Je nach Zusammensetzung können sie eine Ca^{2+} -Permeabilität (bei Vorhandensein der GluR2-Einheit des AMPA-Rezeptors) bewirken. Alle drei Subtypen, NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren, die nach synthetischen selektiven Agonisten benannt sind, wurden auf Astrozyten nachgewiesen (Schipke et al., 2001; Garcia-Barcina and Matute, 1996), wobei für den Kainat-Rezeptor funktionelle Studien fehlen.

Metabotrope GluRs sind an G-Proteine gekoppelt. Bisher wurden acht Subtypen beschrieben (mGluR 1-8), die nach Sequenzhomologien und intrazellulären Signalwegen in drei Gruppen eingeteilt werden. Gruppe-I-Rezeptoren (mGluR 1 und 5) sind an die intrazelluläre IP_3 - Ca^{2+} -Kaskade gekoppelt, wohingegen Gruppe-II-Rezeptoren (mGlu 2 und 3) und Gruppe-III-Rezeptoren (mGluR 4,6 und 7) negativ an die Adenylylcyclase gekoppelt sind. Da es nach Aktivierung metabotroper GluRs Ca^{2+} -abhängig zu Glutamatfreisetzung aus Astrozyten kommen kann, sind diese besonders für Rückkopplungseffekte interessant. Astrozytäres Glutamat könnte in dieser Weise als Feedback-Schleife zur synaptischen Modulation beitragen (Araque et al., 1999). Die Freisetzung von Prostaglandinen nach mGluR-Aktivierung kann dagegen neuronale Aktivität und die Regulation des Blutflusses koppeln (Zonta et al., 2003b). Funktionelle GluR der Gruppe I wurden in Hippokampusschnitten junger Ratten nachgewiesen (Porter and McCarthy, 1995b). Für den mGluR5 wurde weiterhin eine Abnahme der Expression mit steigendem Alter der Ratten gezeigt (Cai

et al., 2000). In akut isolierten GFAP-positiven Zellen ebenfalls aus Rattenhippokampi wurde auch mGluR3-Expression beobachtet (Schools and Kimelberg, 2001).

1.2.2.2 Purinerge Rezeptoren

Ebenso wichtig für die integrierte Funktion der Astrozyten sind purinerge Rezeptoren, da deren Aktivierung unterschiedliche, weit reichende Folgen hat.

Purinerge Rezeptoren für Adenosin, ADP und ATP lassen sich in zwei Familien einteilen, die Adenosin- oder P_1 -Rezeptoren und P_2 -Rezeptoren, an die ATP und ADP binden. Alle vier Subtypen von P_1 -Rezeptoren (A_1 , A_{2B} , A_{2B} , A_3) sind an G-Proteine gekoppelt, während man für den P_2 -Typ ionotrope P_2X - und metabotrope P_2Y -Rezeptoren unterscheidet, jeweils wieder mit mehreren Subtypen.

Astrozyten exprimieren alle vier P_1 -Rezeptoren (Hasko et al., 2005). In cortikalen und hippokampalen Astrozyten löst P_1R -Aktivierung intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung aus cytoplasmatischen Speichern aus (Porter and McCarthy, 1995a). Aktivierung der verschiedenen Subtypen kann zu so unterschiedlichen Ereignissen wie Proliferation (Rathbone et al., 1991) und Apoptosis (Abbracchio et al., 1997), sowie Stimulation oder Inhibierung von Purin-Freisetzung führen (Ciccarelli et al., 2001).

Auf funktioneller Ebene wurden alle P_2X -R-Typen außer Typ 6 und die P_2Y -R-Typen 1,2,4,6,12 und 14 nachgewiesen (Burnstock, 2006). Diese unterscheiden sich genetisch und in ihrer Selektivität für verschiedene Agonisten (Ralevic and Burnstock, 1998) und können entgegen gesetzte Aktionen auslösen. Unter den ionotropen ATP-Rezeptoren ist der P_2X_7 -Rezeptor von besonderem Interesse. Er kann eine große Pore ausbilden, durch die exzitatorische Aminosäuren wie Glutamat freigesetzt werden können (Duan et al., 2003; Fellin et al., 2006).

P_2Y -Rezeptor-Aktivierung führt zu G_q -Protein/Phospholipase C (PLC) vermitteltem Anstieg von Inositol-3-phosphat (IP_3) und damit zu Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Darüber hinaus können P_2YR an G_i/G_o -Proteine gekoppelt sein. Diese wiederum sind an die Synthese von Phospholipase A2, Arachidonsäure und Prostaglandin E2, an die Stimulation der MAP-Kinase und an die Induktion von Immediate Early-Genen gebunden. P_2Y -vermittelte Ca^{2+} -Signale konnten u. a. in

Bergmann Gliazellen des Kleinhirns (Beierlein and Regehr, 2006), in Astrozyten aus Cortex (King et al., 1996), Hippokampus (Zhu and Kimelberg, 2001) und Corpus callosum (Schipke et al., 2002) und in Müller Zellen und Astrozyten aus der Retina beobachtet werden (Newman, 2001). Die Rolle von P₂YR in der Propagation von Ca²⁺-Wellen wird später eingehend behandelt.

1.2.3 Gap Junctions verbinden Astrozyten untereinander

Eine wichtige Eigenschaft der Astrozyten ist, dass sie häufig ein großes Synzytium bilden, da sie untereinander durch interzelluläre Kanäle, die Gap Junctions, elektrisch und chemisch verbunden sind. Abbildung 1.3 zeigt den Aufbau eines Gap Junction-Kanals. Jeweils sechs Connexin-Proteine bilden einen Hemikanal, ein so genanntes Connexon. Erst durch die Verbindung mit einem gegenüberliegenden Connexon über dessen extrazelluläre Schleifen (Loops) entsteht der funktionelle Kanal.

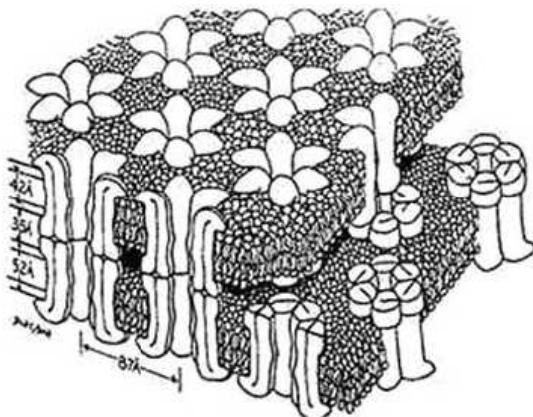


Abbildung 1.3: Hexamere des Connexin-Proteins bilden Gap Junctions, die in einander gegenüber liegenden Membranen einen Kanal formen, der den interzellulären Spalt (Gap) überbrückt (Makowski et al., 1977).

Durch Einsatz von Antikörpern gegen diese Loops konnte in kultivierten Zellen und *in vivo* gezeigt werden, dass Hemikanäle auch unverbunden, also einzeln vorliegen (Hofer et al., 2002; Dermietzel et al., 2003). Damit bilden sie eine Pore, durch die beispielsweise ATP (Stout et al., 2002) oder Glutamat (Ye et al., 2003) freigesetzt werden kann. Gap Junctions erlauben die Diffusion von kleinen Molekülen mit einem Molekulargewicht bis 1 kDa und einem Durchmesser von etwa 1,5 nm. Außerdem kann ein, hauptsächlich von Kaliumionen getragener, Strom fließen.

Man unterscheidet mindestens 20 verschiedene Connexine. Connexin43 (Cx43) ist das in Astrozyten am weitesten verbreitete Connexin und wird schon pränatal exprimiert. Ab einem Alter von etwa zwei Wochen kann auch Connexin30 (Cx30) nachgewiesen werden (Kunzelmann et al., 1999; Theis et al., 2003). Studien an Astrozyten von transgenen Mäusen ohne Cx43-Expression wiesen zusätzlich Cx26, Cx40 und Cx45 nach (Dermietzel 2000; (Theis et al., 2003). Inwieweit diese aber nur den Verlust von Cx43 kompensieren bleibt unklar. In einem Tiermodell mit einem lacZ-Reporter gen für Cx26 konnte keine Expression auf Astrozyten festgestellt werden (Filippov et al., 2003).

Nicht alle Astrozyten sind automatisch durch Gap Junctions gekoppelt. Für den Hippokampus sind zwei Populationen beschrieben, die sich morphologisch und elektrophysiologisch unterscheiden lassen. Während GluT-exprimierende Zellen mit Hunderten anderer Zellen gekoppelt sind, besitzen GluR-exprimierende Zellen kein Cx43 und sind damit auch nicht untereinander verbunden (Wallraff et al., 2004).

Astrozyten sind aber nicht nur untereinander gekoppelt. In Zellkultur und im Hirnschnitt wurden funktionelle Gap Junctions zwischen Astrozyten und Neuronen beschrieben (Fróes 1999, Alvarez-Maubecin 2000). Außerdem können Astrozyten mit Oligodendrozyten, Ependymalzellen und Müller Zellen koppeln (Zahs, 1998).

1.3 Astrozytäre Kommunikation

1.3.1 Astrozytäre Ca^{2+} -Signale

Im Gegensatz zu Nervenzellen sind Astrozyten nicht elektrisch erregbar. Ihre Signale werden in Erhöhungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Ca^{2+} -signalling) kodiert und sind damit um Größenordnungen langsamer als die von Neuronen. Zwischen dem Mechanismus des Ca^{2+} -signallings in elektrisch erregbaren und dem in unerregbaren Zellen gibt es einen grundlegenden Unterschied. Während die Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration in erregbaren Zellen sowohl aus Ca^{2+} -Einstrom durch spannungs- oder ligandengesteuerte Kanäle, als auch aus Freisetzung von Ca^{2+} aus internen Speichern resultiert, dominiert in elektrisch nicht

erregbaren Zellen wie den Gliazellen die Ca^{2+} -Ausschüttung aus intrazellulären Speichern (Verkhratsky 1996). Insgesamt ergibt sich jedoch ein Zusammenspiel aus vier Faktoren: Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran oder aus internen Ca^{2+} -Speichern in das Zytosol und Ca^{2+} -Ausstrom über die Zellmembran nach außen oder zurück in die internen Speicher. Da Gliazellen nur eine geringe Ca^{2+} -Pufferkapazität besitzen, führt schon ein geringer Ca^{2+} -Einstrom zu einem signifikanten Ca^{2+} -Anstieg. Die Form der Ca^{2+} -Signale in Astrozyten kann sehr vielfältig sein. Grob lassen sich einfache Peaks und zweiphasige, an die eine Plateauphase anschließt, sowie Oszillationen unterscheiden. Zudem können sich Ca^{2+} -Signale wellenartig von Zelle zu Zelle ausbreiten (siehe Kapitel 1.3.2).

Wie bereits erwähnt, hat die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern den größten Anteil an astrozytären Ca^{2+} -Signalen. Sie erfolgt hauptsächlich über Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) kontrollierte Ca^{2+} -Kanäle (IP_3 -Rezeptoren, IP_3R) im endoplasmatischen Reticulum (ER). Die IP_3 -Produktion wiederum geschieht über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die über G-Proteine mit zahlreichen Rezeptoren der Plasmamembran gekoppelt ist. Sie spaltet Phosphatidyl-4,5-bisphosphat in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol. Nach dem Eintritt in das Zytoplasma werden die Ca^{2+} -Ionen von mehreren Molekülen gebunden, die wiederum diverse Signaltransduktionswege auslösen. Der bekannteste Ca^{2+} -Sensor ist das Calmodulin (CaM), welches mindestens drei Enzymklassen reguliert, nämlich CaM-abhängige Proteinkinasen, Proteinphosphatasen und Adenylatcyclasen. Letztere können das Signal zum Zellkern weiterleiten, wo es die Genexpression beeinflussen kann. Ein weiterer Weg Ca^{2+} -Signale mit der Genexpression zu verbinden, führt über so genannte Ras-Proteine, die eine Phosphorylierungskaskade auslösen (Verkhratsky and Kettenmann, 1996).

1.3.2 Astrozyten kommunizieren untereinander durch Ca^{2+} -Wellen

Ca^{2+} -Signale können sich zwischen Astrozyten konzentrisch von Zelle zu Zelle ausbreiten. Üblicherweise geschieht dies mit einer Geschwindigkeit von 10 bis 20 $\mu\text{m/s}$ und kann bis zu 500 μm weit reichen. Das Phänomen wurde 1990 das erste

Mal beobachtet, als Glutamatapplikation auf kultivierte Astrozyten zur Ausbreitung einer Ca^{2+} -Welle führte (Cornell-Bell et al., 1990). Andere Substanzen, die lokal appliziert Wellen in kultivierten Astrozyten induzieren können, sind ATP (Guthrie et al., 1999; Newman and Zahs, 1997), Noradrenalin (Yagodin S et al., 1995), Albumin (Nadal et al., 1997), das proapoptotische Protein Bax (Carvalho et al., 2004), Stickstoffmonoxid (Willmott et al., 2000a) und das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin (Venance et al., 1997). Auch das Absenken der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann ausreichend sein (Zanotti and Charles, 1997). Dies ist besonders interessant, da die Ca^{2+} -Konzentration bei starker neuronaler Aktivität um etwa 20 % und während pathologischer Bedingungen sogar um das Zehnfache sinken kann.

Die gebräuchlichsten Arten, Ca^{2+} -Wellen auszulösen sind elektrische (Nedergaard, 1994) oder mechanische (Charles et al., 1991) Stimulation, z.B. mit einer Patchpipette. Während anfangs die meisten Experimente mit kultivierten Zellen durchgeführt wurden, konnten später auch Ca^{2+} -Wellen in intakten Präparationen, wie kultivierten (Harris-White et al., 1998) oder akuten Hirnschnitten (Schipke et al., 2002) und isolierter Retina (Newman and Zahs, 1997) beobachtet werden. In der Mehrzahl der untersuchten Fälle waren die ausgelösten Ca^{2+} -Wellen unabhängig von extrazellulärem Ca^{2+} und ließen sich durch Thapsigargin, welches das Wiederauffüllen der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher verhindert, inhibieren. Der Einsatz von Ca^{2+} -bindenden Chelatoren zeigte, dass der intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg für die Propagation entscheidend ist (Wang et al., 1997).

1.3.2.1 Propagationsmechanismen astrozytärer Ca^{2+} -Wellen

Für die Ausbreitung der Ca^{2+} -Wellen sind hauptsächlich zwei Mechanismen denkbar. Zum einen kann die Diffusion von IP_3 oder Ca^{2+} als Botenstoffe (Second Messengers) durch Gap Junctions zu benachbarten Zellen dort eine Ca^{2+} -Ausschüttung bewirken (Abb. 1.4), zum anderen kann dies durch die Freisetzung von ATP mit nachfolgender Aktivierung purinergeer Rezeptoren erfolgen (Abb. 1.5). Allerdings ist eine rein passive Diffusion von Second Messengers durch Gap Junctions nicht ausreichend für eine Ausbreitung der Ca^{2+} -Aktivität, weshalb eine

Form der Regeneration der IP_3 -Quelle benötigt wird (Sneyd et al., 1994). Dies geschieht wahrscheinlich durch Aktivierung der PLC durch Ca^{2+} (Hofer et al., 2002).

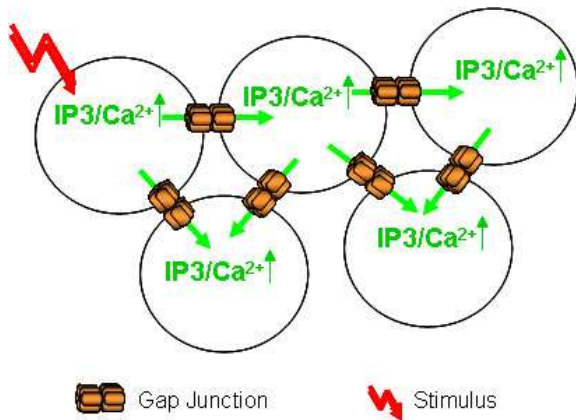


Abbildung 1.4: Schema für Gap Junction-abhängige Ausbreitung von Ca^{2+} -Wellen. Diffusion von Second Messenger-Molekülen durch Gap Junctions führt zu Ca^{2+} -Erhöhungen in gekoppelten Zellen.

Experimente, in denen die Ausbreitung der Welle durch Blocker von Gap Junctions vermindert wurde, unterstützen diesen Mechanismus (Venance et al., 1997; Finkbeiner, 1992). Zudem konnte gezeigt werden, dass in schwach gekoppelten C6-Glioma-Zellen mit der Transfektionsrate für Connexin43 (Cx43) auch die Geschwindigkeit und die Ausbreitung mechanisch ausgelöster Ca^{2+} -Wellen anstieg (Charles et al., 1992). In kultivierten Zellen von Cx43-Knockout-Mäusen wurden unterschiedliche starke Reduktionen der Ca^{2+} -Welle festgestellt (Naus et al., 1999; Scemes et al., 1998). Wahrscheinlich kompensieren in den Knockout-Tieren andere Connexine zum Teil den Mangel an Cx43 (Dermietzel et al., 2000; Theis et al., 2003). Außerdem wurde eine Veränderung im purinergen Rezeptorprofil von Adenine-sensitiven P_2Y_1 -R zu Uridine-sensitiven P_2Y_4 -Rezeptoren in Cx43-knockout-Zellen festgestellt (Scemes et al., 2000; Suadicani et al., 2003). Damit könnten Astrozyten den Verlust der Voraussetzung für den oben beschriebenen Propagationsmechanismus durch Wechsel auf einen anderen ausgleichen.

Dieser Mechanismus involviert die Ausschüttung von ATP in den extrazellulären Raum. Dadurch werden purinerge Rezeptoren auf benachbarten Zellen aktiviert, was über eine Aktivierung der PLC und erneuter Bildung von IP_3 dort zu einer Erhöhung der internen Ca^{2+} -Konzentration führt (Abb. 1.5).

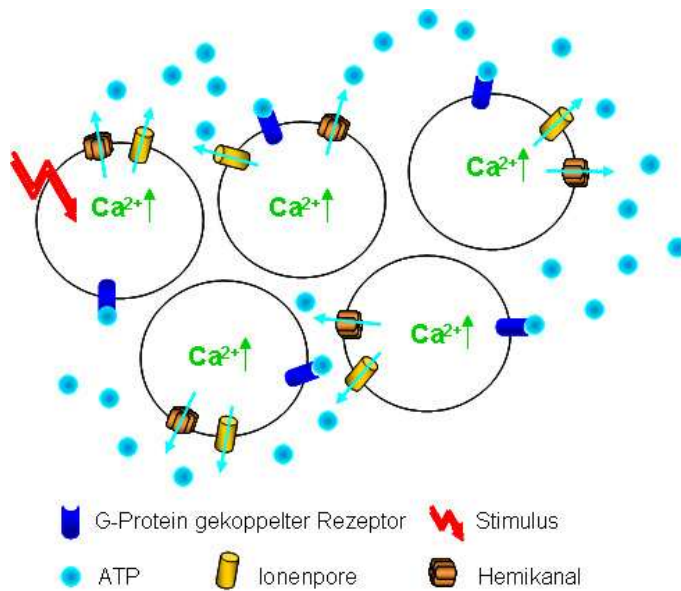


Abbildung 1.5: Schema für die regenerative Ausbreitung von Ca²⁺-Wellen durch ATP-Freisetzung und Aktivierung purinergere Rezeptoren auf benachbarten Zellen. Nach Aktivierung und Ca²⁺-Erhöhung kommt es zur erneuten Ausschüttung von ATP.

Dieser Mechanismus wurde vorgeschlagen, nachdem gezeigt wurde, dass sich Ca²⁺-Wellen in Astrozytenkultur auch über zellfreie Gebiete hinweg ausbreiten können (Hassinger et al., 1996) und durch Suramin, einen Antagonisten purinergere Rezeptoren, reduziert werden konnten (Cotrina et al., 1998b). Außerdem wurde ATP nach der Ausbreitung einer Welle in der Extrazellulärflüssigkeit nachgewiesen (Guthrie 1999, Cotrina 1998b, Scemes 2000). Zudem wurde gezeigt, dass Astrozyten fähig sind, ATP in einer regenerativen Weise freizusetzen, was als ATP induzierte ATP-Freisetzung (ATP induced ATP release) bezeichnet wird (Anderson et al., 2004). Abhängig vom P₂Y-Rezeptor-Subtyp können Ca²⁺-Wellen leicht unterschiedliche Eigenschaften haben (Gallagher and Salter, 2003). ATP-vermittelte Wellen konnten nicht nur in Kultur, sondern auch in intakten Systemen wie Hirnschnitten und Retinapräparationen beobachtet werden. Elektrische Stimulation im Corpus callosum führte zu Ca²⁺-Wellen, die nicht nur durch Reactive Blue2, einem weiteren Antagonisten purinergere Rezeptoren blockiert wurden, sondern auch der Perfusionsrichtung der Badlösung folgten, was auf die Freisetzung einer Substanz hinweist (Schipke et al., 2002). In der Retina ist die Propagation von Ca²⁺-Signalen zwischen Astrozyten und Müller Zellen Suramin-sensitiv und ATP-Wellen konnte mittels eines Biolumineszenzassays sichtbar gemacht werden. Dagegen ist die Ausbreitung unter Astrozyten in der Retina von der interzellulären Diffusion von

Botenstoffe durch Gap Junctions abhängig (Newman, 2001). Dies ist die einzige Studie, die Gap Junction-vermittelte Ausbreitung in einer intakten Präparation zeigt. Die regenerative Art der ATP-Freisetzung wird oft in Frage gestellt, da sich dann Ca^{2+} -Wellen unbegrenzt ausbreiten müssten. Biolumineszenz-Aufnahmen von ATP-Freisetzung in Echtzeit weisen auf eine punktförmigen ATP-Quelle hin, von der aus es zur passiven Diffusion im Extrazellulärraum kommt (siehe Abbildung 1.6; Arcuino et al., 2002).

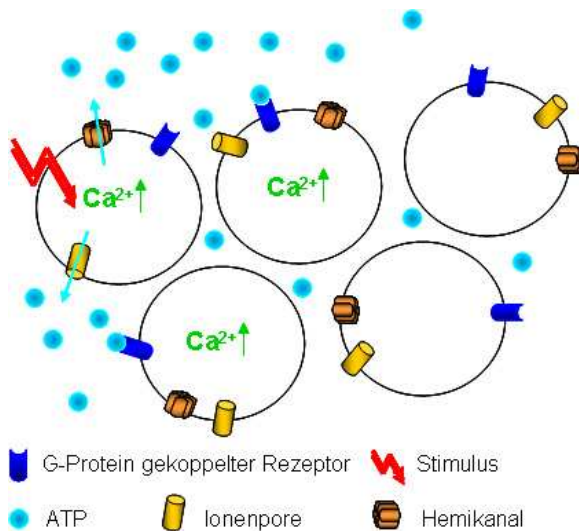


Abbildung 1.6: Schema für die nicht-regenerative Ausbreitung von Ca^{2+} -Wellen durch ATP-Freisetzung aus einer punktförmigen Quelle mit nachfolgender passiver Diffusion

Für den Freisetzungsmechanismus von ATP gibt es mehrere Vorschläge. Obwohl Ca^{2+} -abhängige vesikuläre ATP-Freisetzung gezeigt wurde (Maienschein et al., 1999; Bal-Price et al., 2002), ist ein Anstieg in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nicht unbedingt erforderlich (Wang et al., 2000). ATP kann auch durch verschiedene große Poren die Zelle verlassen, darunter Anionenkanäle (Mongin and Kimelberg, 2002), P_2X_7 -Rezeptoren (Suadicani et al., 2006) und Connexin-Hemikanäle (Cotrina et al., 1998a; Stout et al., 2002). Da Hemikanäle durch physiologische Konzentrationen von zweiwertigen Kationen blockiert werden können, würde dies erklären, wie eine Erniedrigung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration Ca^{2+} -Wellen auslösen kann. Sich einander widersprechende Ergebnisse den Ausbreitungsmechanismus betreffend lassen sich zum Teil dadurch erklären, dass Blocker von Gap Junctions recht unspezifische Wirkungen haben und nicht nur die interzellulären

Kanäle beeinträchtigen, sondern auch Hemikanäle und P2X7-Rezeptoren (Suadicani et al., 2006).

Glutamat scheint im Gegensatz zu ATP für das Propagieren von Ca^{2+} -Wellen nicht erforderlich zu sein. Es wurde zwar eine, der Ca^{2+} -Welle voranschreitende Glutamatwelle beobachtet (Innocenti et al., 2000), die Anwendung von GluR-Antagonisten zeigte allerdings keinen Einfluss auf die Ausbreitung der ausgelösten Ca^{2+} -Wellen (Charles et al., 1991; Venance et al., 1997).

Neben den bisher beschriebenen Mechanismen kann auch Stickstoffmonoxid (NO) die Ausbreitung einer Welle vermitteln. Allerdings sind dabei nicht IP₃-, sondern Ryanodine-sensitive Speicher involviert (Willmott et al., 2000a; Willmott et al., 2000b).

1.3.3 Ca^{2+} -Signale unter pathologischen Bedingungen

Astrozytäre Ca^{2+} -Wellen werden auch in Modellen für pathologischen Situationen wie Spreading Depression und der Alzheimer-Krankheit beschrieben. Spreading Depression ist eine Welle neuronaler Depolarisation, die mit der Aura von Migräne assoziiert wird. Begleitend zu der Depolarisationswelle ließen sich Ca^{2+} -Erhöhungen in Astrozyten beobachten, die sich mit der gleichen Geschwindigkeit von ca. 40 $\mu\text{m/s}$ ausbreiteten. Interessanterweise lief die astrozytäre Ca^{2+} -Welle weiter als die Depolarisation und die Geschwindigkeit sank dann auf Werte einer typische Astrozytenwelle, nämlich ca. 15 $\mu\text{m/s}$ (Peters et al., 2003).

Die Alzheimer-Krankheit ist eine fortschreitende Demenz-Erkrankung, bei der es zur Degeneration bestimmter Neuronen und dadurch zu Störungen der normalen zerebralen Funktionen kommt. Die Krankheit ist u. a. mit intrazellulären Ablagerungen eines Fragments des Amyloid-Vorläufer Proteins APP (Amyloid Precursor Protein) assoziiert, den so genannten Plaques. Nach Inkubation von kultivierten Astrozyten mit diesem Fragment, dem Amyloid- β -(A β)Peptid, konnte eine Zunahme der Geschwindigkeit und Reichweite von Ca^{2+} -Wellen festgestellt werden. Dieser Steigerungseffekt wurde durch Gap Junction-Blocker inhibiert, was darauf

hinweist, dass das Amyloid- β Peptid die Kopplung von Astrozyten moduliert und dadurch Ca^{2+} -Wellen beeinflusst (Haughey and Mattson, 2003).

1.4 Interaktionen von Astrozyten mit anderen Zellen

Ca^{2+} -Wellen breiten sich nicht nur unter Astrozyten aus, sondern rufen durch die damit einhergehende Ausschüttung verschiedener Substanzen wie ATP, Glutamat oder Prostaglandin auch in anderen Zelltypen Antworten hervor. Abbildung 1.7 fasst diese Interaktionen zusammen.

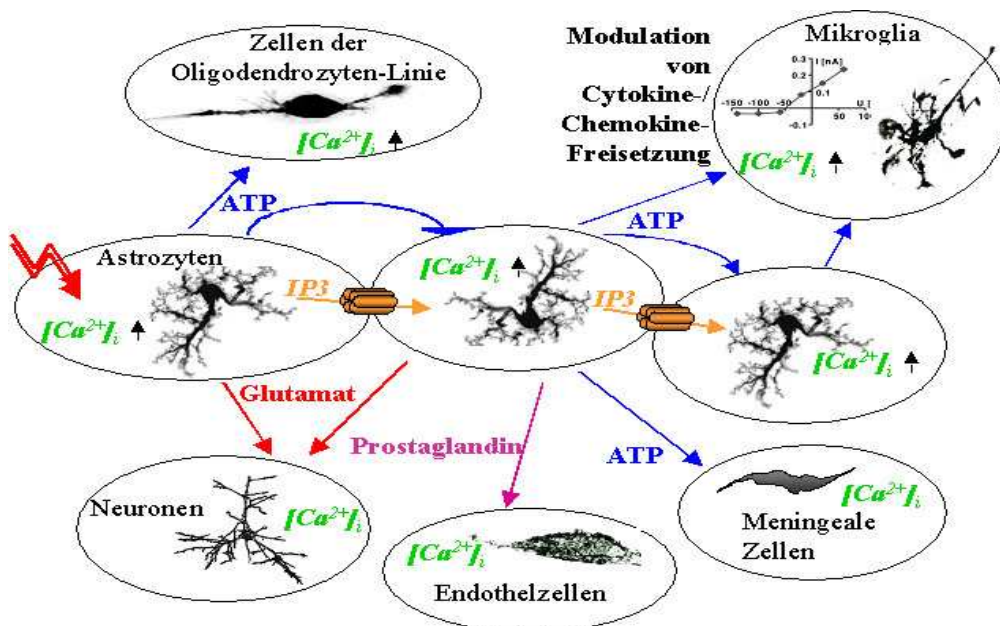


Abbildung 1.7: Einfluss von astrozytären Ca^{2+} -Wellen auf andere Zellen

Zellen der Oligodendrozyten-Linie, meningeale und Endothelzellen antworten mit einem Ca^{2+} -Anstieg auf ATP, bzw. Prostaglandin-Freisetzung. In Mikroglia kann zudem eine purinerge Stromantwort gemessen werden. Die Aktivierung von Mikroglia moduliert generell die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, was wiederum weitere Prozesse beeinflusst. Die Wechselwirkung mit Neuronen ist vielfältig und wird im folgenden näher beschrieben.

1.4.1 Kommunikation zwischen Neuronen und Astrozyten

Astrozyten können neuronale Aktivität wahrnehmen, da sie wie erwähnt über eine umfassende Ausstattung mit Neurotransmitterrezeptoren verfügen, deren Aktivierung

meist zu Ca^{2+} -Signalen führt. Eine wegweisende Arbeit zeigte, dass hochfrequente Stimulation oder NMDA-Applikation im Gyrus dentatus kultivierter Hippokampus-schnitte Ca^{2+} -Oszillationen und Wellen in Astrozyten auslösen, die auf neuronal ausgeschüttetes Glutamat zurückzuführen sind (Dani et al., 1992). Elektrophysiologische und ultrastrukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass Gliazellen nicht nur auf „Überlaufen“ von Glutamat aus dem synaptischen Spalt reagieren, sondern auch direkt, ähnlich wie in einer Synapse aktiviert werden können (Bergles et al., 2000). Auch für andere Neurotransmitter wird eine Rolle im Neuron-Glia-Signalling beschrieben. So induzierte Aktivierung von Interneuronen Ca^{2+} -Signale in Astrozyten über Aktivierung astrozytären GABA_B -Rezeptoren (Kang et al., 1998). Außerdem kann auch die Stimulation von cholinergen Afferenzen in Hippokampus zu Signalen in Astrozyten führen (Araque et al., 2002). Nicht nur im Hippokampus, sondern auch im Cerebellum wurden neuronal aktivierte Ca^{2+} -Signale beobachtet. Diese konnten zum einen durch Glutamat hervorgerufen werden, das Ca^{2+} -permeable AMPA-Rezeptoren auf Astrozyten aktiviert (Muller et al., 1992), zum anderen auch durch NO (Matyash et al., 2001).

Auch *in vivo* konnte die Aktivierung von Astrozyten durch Neuronen demonstriert werden. Eine erste Arbeit zeigte den Zusammenhang zwischen neuronaler Aktivität und Ca^{2+} -Signalen in Astrozyten im Cortex anästhesierter Mäuse. Nach Erhöhung neuronaler Aktivität durch Applikation von GABA_A -R-Antagonisten wurden eine Zunahme spontaner Ca^{2+} -Signale in Astrozyten beobachtet (Hirase et al., 2004). In einer weiteren Studie konnten nach Stimulation einzelner Barthaare von ebenfalls anästhesierten Mäusen Ca^{2+} -Signale in Astrozyten beobachtet werden, die auf die jeweils korrespondierenden Barrels beschränkt waren (Wang et al., 2006).

Astrozyten können also über verschiedenen Mechanismen neuronale Aktivität wahrnehmen, was in der Folge zu Ca^{2+} -Erhöhungen und Freisetzung von Glutamat, GABA und ATP aus Astrozyten führen und dadurch wieder auf Neuronen zurückwirken kann. Mehrere Arbeiten zeigen, dass von Astrozyten freigesetztes Glutamat sowohl exzitatorische als auch inhibitorische neuronale Transmission beeinflusst (Araque et al., 1998; Parpura and Haydon, 2000; Parri et al., 2001b; Kang

et al., 1998). Ein weiterer wichtiger Transmitter, der neuronale Aktivität moduliert, ist ATP. Elektrische Stimulation im Hippokampus führte zu Ca^{2+} -Erhöhungen in Astrozyten und Bahnung von GABAergen IPSCs in Interneuronen. Beide Phänomene ließen sich durch P_2Y_1 -Antagonisten blockieren, was darauf hinweist, dass von Astrozyten freigesetztes ATP zur Steigerung von synaptischer Inhibierung führen kann (Bowser and Khakh, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass zu Adenosin degradiertes astrozytäres ATP sowohl homo- als auch heterosynaptische Depression auslösen kann. ATP kann nach Glutamat- (Zhang et al., 2003) oder GABA_B -Rezeptor-vermitteltem Ca^{2+} -Anstieg (Serrano et al., 2006) von Astrozyten ausgeschüttet werden. Eine ähnliche Funktion von ATP/Adenosin konnte auch in der Retina, in der auch Ca^{2+} -Wellen intensiv charakterisiert wurden, nachgewiesen werden. Hier wurde ebenfalls eine Reduktion der Spontanaktivität von retinalen Ganglionzellen gezeigt. Das ATP stammte allerdings nicht aus den Astrozyten, sondern aus Müller Zellen, einem nur in der Retina vorkommenden Gliazelltyp (Newman, 2003).