

Aus dem Institut für Neurophysiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Aktivierung muskarinischer Rezeptoren moduliert die Effekte  
von kapazitativem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom auf Erregbarkeit und  
Energiemetabolismus in zentralen Nervenzellen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nando Taubenberger

aus Stuttgart

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. U. Heinemann  
                      2. Prof. Dr. rer. nat. T. Mittmann  
                      3. Prof. Dr. M. Müller

Datum der Promotion:     01.02.2013

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1 Einleitung .....	4
1.1 Bedeutung von Kalzium in Säugerzellen .....	4
1.2 Kalzium Homöostase während neuronaler Aktivität .....	4
1.2.1 Extrazelluläre Kalzium Homöostase .....	4
1.2.2 Intrazelluläre Kalzium Homöostase .....	5
1.3 Kapazitiver Kalzium-Einstrom.....	6
1.3.1 Regulierung des Ca <sup>2+</sup> -Einstroms durch die intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Konzentration .....	7
1.3.2 Konformationelle Kopplung.....	10
1.3.3 STIM 1 und Orai 1 .....	12
1.3.4 Speichergesteuerte Kanäle .....	13
1.4 Mitochondriale Physiologie .....	14
1.5 Hippokampus Präparat .....	17
2 Herleitung der Aufgabenstellung .....	19
3 Methodik .....	21
3.1 Organotypische hippokampale Hirnschnitt-Kultur .....	21
3.2 Mikrofluorometrische Untersuchungen .....	22
3.2.1 Fluoreszenz-Imaging.....	22
3.2.1 Photon Technology Instruments Mikrofluorimetrisches-System.....	25
3.2.1 Olympus Cell <sup>R</sup> Setup.....	26
3.2.4 Konfokales Spinning-Disc Mikroskop Andor Revolution.....	27
3.3 Experimentell eingesetzte Substanzen und Lösungen.....	28
3.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe bzw. Autofluoreszenz.....	28
3.3.2 Weitere experimentell eingesetzten Substanzen .....	30
3.4 Elektrophysiologische Untersuchungen .....	32
3.5 Datenerfassung und Analyse .....	32
4 Ergebnisse .....	35
4.1 CCE in individuellen Pyramidenzellen .....	35
4.2 CCE und muskarinische Rezeptoraktivierung: Zelluläre Effekte .....	39
4.3 CCE und muskarinische Rezeptor-Aktivierung: Pharmakologie.....	44
4.4 CCE ohne muskarinische Rezeptor-Aktivierung .....	50
5 Diskussion .....	53
5.1 Organotypische hippokampale Hirnschnitt-Kulturen .....	53
5.2 Nachgeschaltete zelluläre Effekte von CCE .....	54
5.3 Funktionale Konsequenzen .....	63
6 Zusammenfassung .....	65
7 Literaturverzeichnis.....	66
Curriculum Vitae.....	75
Publikationsliste .....	76
Selbstständigkeitserklärung.....	77
Danksagung.....	78

# 1 Einleitung

## 1.1 Bedeutung von Kalzium in Säugerzellen

Kalzium ist in der Phylogenese eines der bedeutendsten Elemente zellulärer Signaltransduktion. Kalzium hat eine wichtige Rolle in der Fortpflanzung. Es ist essentiell für die Spermien-Motilität, die Akrosomenreaktion und in Form von periodischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen für die Befruchtung des Ei's. Räumlich und zeitlich unterschiedliche Muster intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$  Anstiege steuern zelluläre Vorgänge der Exocytose, Gen-Transkription und der Zell-Motilität. Weiterhin ist Kalzium wichtig in Prozessen der Apoptose und der Nekrose. Das bedeutet, dass die intrazelluläre Konzentration von Kalzium ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) besonders präziser Kontrolle unterliegen muss (1;2). Die extrazelluläre Kalzium Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ) liegt bei 1-2 mM. In der Zelle jedoch liegt die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  unter Ruhebedingungen um ein 10 000-fach geringeres bei 100-200 nM. Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) ist die  $[\text{Ca}^{2+}]$  ähnlich der extrazellulären Konzentration von  $\sim 1$  mM (3). Das ER fungiert als  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher.

## 1.2 Kalzium Homöostase während neuronaler Aktivität

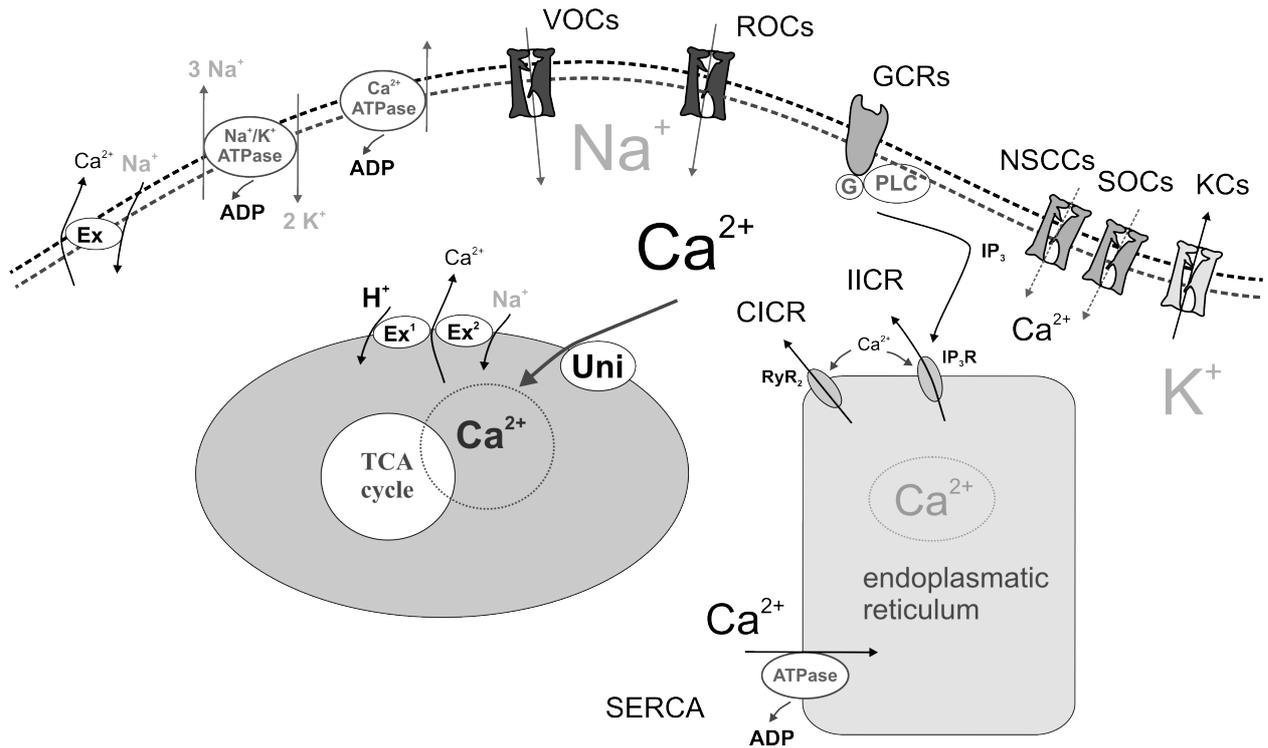
### 1.2.1 Extrazelluläre Kalzium Homöostase

Lange wurde angenommen, dass die  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  während neuronaler Aktivität konstant bleibt und lediglich die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ansteigt. Einige der ersten Arbeiten zur  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  beschrieben Erniedrigungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  bis zu 0,7 mM/l im somatosensorischen Kortex von Katzen (4). Neue Daten weisen ebenfalls daraufhin, dass die  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  unter physiologischer und pathologischer neuronaler Aktivität signifikant absinken kann. Untersucht wurden organotypische Kulturen des Hippokampus von Wistar Ratten. Gezeigt wurde ein Abfall von bis zu 15 % der  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  im synaptischen Spalt (5;6). Es wird weiterhin davon ausgegangen, dass lokal begrenzte Areale bestehen, in denen die  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  noch massiver abnimmt. Diese Regionen werden als „ $\text{Ca}^{2+}$ -sinks“ bezeichnet. Die „ $\text{Ca}^{2+}$ -sinks“ sollen  $\sim 10$ -15 % der extrazellulären Oberfläche ausmachen. Das Absinken der  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  führt zu einem reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, der wiederum eine synaptische Kurzzeit-Depression (short-term depression, STD) mit einer reduzierten Wahrscheinlichkeit konsekutiver synaptischer Ereignisse in CA1 – CA3 bewirkt. Sollte das Phänomen der „ $\text{Ca}^{2+}$ -

sinks“ allgemein verbreitet sein, würde es die Effizienz der Informationsübermittlung in neuronalen Netzwerken beeinflussen, indem es die synaptische Plastizität moduliert (5).

### 1.2.2 Intrazelluläre Kalzium Homöostase

Neuronale Aktivität ist mit transienten Erhöhungen der intrazellulären Kalzium Konzentration aufgrund von  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum sowie mit intrazellulärer Kalzium Freisetzung (Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Mitochondrien) assoziiert. Diese  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhungen werden im Folgenden als  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transienten bezeichnet (siehe *Abb. 1.2.1* (modifiziert nach (7)). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum findet via spannungsgesteuerten Kanälen (VOCs), rezeptorgesteuerten Kanälen (ROCs), speichergesteuerten Kanälen (SOCs) und Nicht-Ionen-selektiven Kationen Kanälen (NSCCs) statt. In vielen nicht-erregbaren Zellen (z.B. Hepatozyten) führt eine Aktivierung von rezeptorgesteuerten Kanälen zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Zellmembran. Erregbare Zellen wie Neuronen verfügen jedoch auch über spannungsgesteuerte Kanäle. Diese werden für Kalzium durchgängig, sobald durch die Membrandepolarisation eine Änderung ihrer Konformation erreicht wird (8). Kalzium kann auch intrazellulär aus dem Endoplasmatischen Retikulum via Rezeptoren für Inositol (1, 4, 5)-Trisphosphat ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) und Ryanodin (RyR) freigesetzt werden (9;10). Kalzium selbst kann eine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung über die Ryanodin Rezeptoren aus dem Endoplasmatischen Retikulum induzieren (CICR = Calcium induced Calcium release). Mitochondrien nehmen  $\text{Ca}^{2+}$  mit dem mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$  Uniporter (Uni) auf. Die Uniporter der Mitochondrien verfügen über eine relativ niedrige Affinität zu Kalzium. Das könnte eine Pufferfunktion bei der Vermeidung pathologischer  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ab  $\sim 0,5 \mu\text{M}$  (11)bedeuten. Neuere Studien zeigen, dass Mitochondrien schon bei niedrigeren  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  Kalzium aufnehmen können (12). Zur Erhaltung der mitochondrialen Ionengradienten wird sehr viel ATP von den  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasen und den  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen verbraucht.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen transportieren bei einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  Kalzium unter ATP Verbrauch aus der Zelle. Dabei werden sie von Na/Ca Austauschern (Na/Ca Exchanger) und  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Puffern (z.B. Calbindin, Calsequestin), die die freie  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  senken, unterstützt. Zytosolisches Kalzium wird aber auch im ER durch eine weitere Art von ATPasen (SERCA = Sarko/Endoplasmatisches Retikulum) akkumuliert. Im ER sind Pufferproteine wie Calsequestin mit sehr hohen Bindungskapazitäten vorhanden. Es gibt Studien, die zeigen, dass die  $[\text{Ca}^{2+}]$  im Endoplasmatischen Retikulum ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ ) in hippokampalen Neuronen niedriger als in anderen Zellen ist (13).



**Abb. 1.2.1 Intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase.** Neuronale Aktivität ist assoziiert mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom via spannungsgesteuerten Kanälen (VOCs), rezeptorgesteuerten Kanälen (ROCs), speichergesteuerten Kanälen (SOCs) und nicht-Ionen-selektiven Kationen Kanälen (NSCCs).  $\text{Ca}^{2+}$  kann auch intrazellulär aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) via Rezeptoren für Inositol (1, 4, 5)-Trisphosphat ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) (IICR =  $\text{IP}_3$  induzierte Kalzium Freisetzung) und Ryanodin Rezeptoren ( $\text{RyR}$ ) freigesetzt werden. Durch Aktivierung von  $\text{RyR}$  können  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen selbst ihre Freisetzung aus dem ER induzieren (CICR = Kalzium induzierte  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung). Mitochondrien nehmen  $\text{Ca}^{2+}$  mit dem mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$  Uniporter (Uni) auf. Zur Erhaltung der Ionengradienten wird sehr viel ATP von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasen und den  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen verbraucht. Weitere Abkürzungen: KCs (Kalium Kanäle), SERCA (Sarkoendoplasmatisches Retikulum ATPasen. Abbildung modifiziert nach (7).

### 1.3 Kapazitiver Kalzium-Einstrom

Kapazitiver  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (CCE = Capacitative Calcium Entry) war die anfängliche Bezeichnung für  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum, der durch Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher getriggert wird (14). Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom wird auch speichergesteuerter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (SOCE = Store Operated Calcium Entry) genannt. Speichergesteuerte Kanäle (SOCs = Store operated channels) werden geöffnet, um die intrazellulären Kalzium Speicher (ER, Mitochondrien) wieder aufzufüllen. SOC's werden per definitionem nur bei Entleerung der Speicher geöffnet. Die Aktivierung metabotroper Rezeptoren der G-Protein oder Tyrosinkinase Familien kann über second messenger wie Diacylglycerol (DAG), Arachidonsäure (AA),

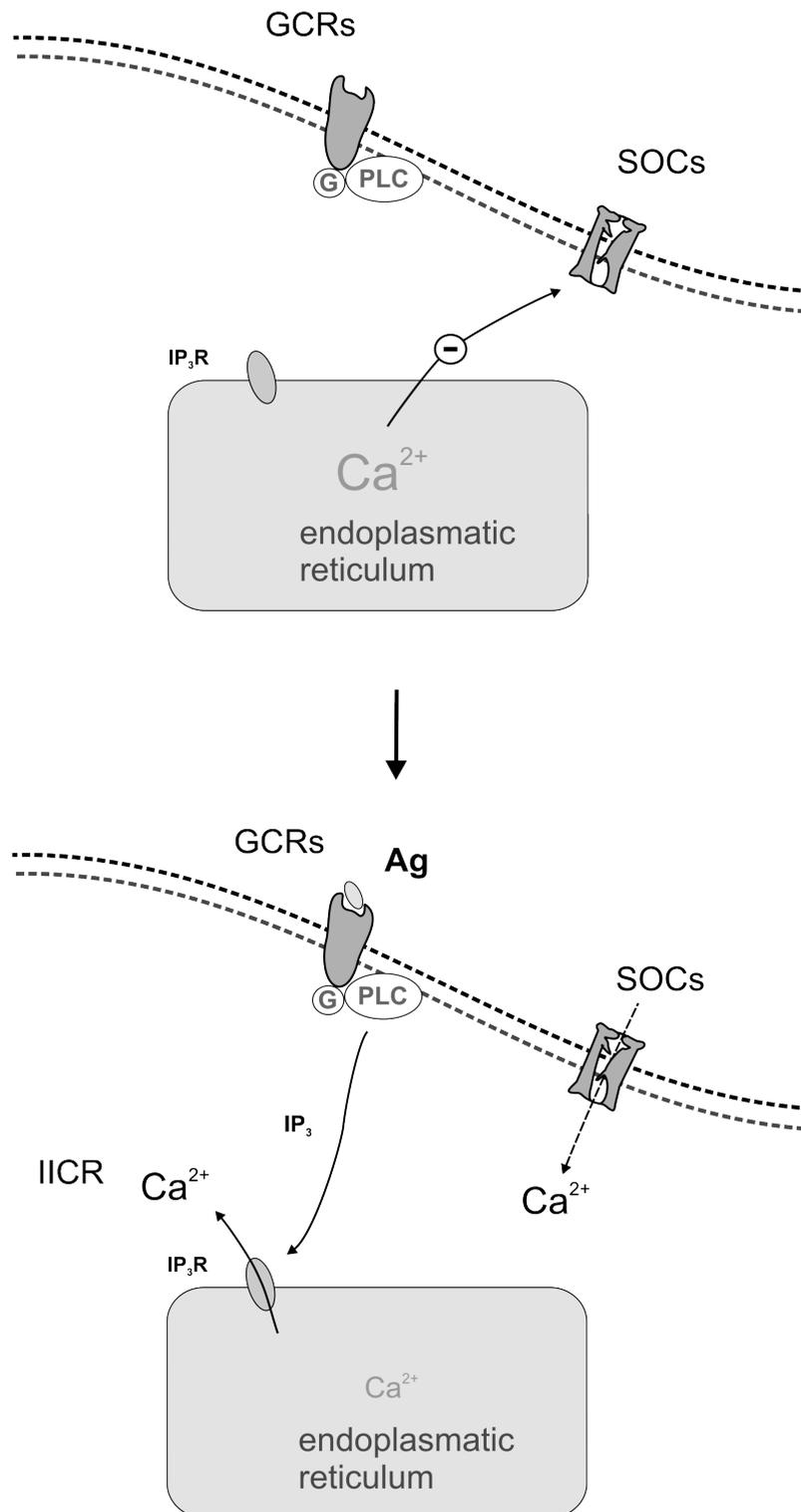
Inositol (1, 4, 5)-Trisphosphat ( $IP_3$ ) und  $Ca^{2+}$  selbst  $Ca^{2+}$ -Kanäle (ROCs = Receptor operated channels) in der Plasmamembran erfolgen. Dieser  $Ca^{2+}$ -Einstrom wird als Receptor Operated Calcium Entry (ROCE) bezeichnet (15). Phospholipase C ist ein mit metabotropen Rezeptoren (G-protein coupled receptors GCRs) assoziiertes Enzym, das second messenger Proteine wie Inositol  $IP_3$  generiert. Dadurch wird eine  $IP_3$  induzierte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung getriggert (IICR) und damit eine Entleerung der  $Ca^{2+}$ -Speicher. Als Aktivator der Phospholipase C kann 2,4,6-Trimethyl-N-(m-3-Trifluoromethylphenyl) Benzensulfonamid (m-3M3FBS) benutzt werden (16;17).

In dieser Arbeit wird CCE als Überbegriff für SOCE und ROCE verwendet. SOCs, ROCs und ihre Aktivierung sind trotz ihrer erstmaligen Erforschung in den frühen 80iger Jahren durch Casteels und Droogmann (18) und J.W. Putney Jr. (15) nicht abschließend beschrieben. Die SOCs und der Mechanismus der Aktivierung durch die Speicher bei Entleerung sind weiterhin Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten (19-21). Der am intensivsten erforschte und charakterisierte SOCE Transient ist der „ $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  current“ ( $I_{CRAC}$ ), der zuerst in Mastzellen (22) und in weiteren Zelltypen von T- und B-Lymphozyten bis zu Hepatozyten nachgewiesen worden ist.  $I_{CRAC}$  ist ein nicht-spannungsgesteuerter Strom, hoch-selektiv für  $Ca^{2+}$ , stark nach intrazellulär gerichtet mit einem positiven Umkehrpotential und geringer Leitfähigkeit (2). Ein als „Fingerabdruck“ für  $I_{CRAC}$  bekanntes Phänomen ist der biphasische Effekt von 2-Aminoethoxydiphenylboran (2-APB). Der  $I_{CRAC}$  Transient wird bei Konzentrationen von 1-5  $\mu M$  potenziert und bei Konzentrationen größer 10  $\mu M$  inhibiert (23). Andere SOCE Transienten zeigen generell eine weniger starke Selektivität für  $Ca^{2+}$  und verschiedene Leitfähigkeiten (7;24).  $La^{3+}$  und SKF 96365 inhibieren SOCE als weiteres Charakteristikum. SOCE lässt sich aber nicht durch  $Ca^{2+}$ -Antagonisten wie Nicardipin oder Verapamil inhibieren.  $I_{CRAC}$  ist per definitionem von der  $[Ca^{2+}]_o$  abhängig (25;26). In Neuronen wurde CCE in verschiedenen Studien gezeigt (25;27). Hinweise, dass Astrocyten über CCE verfügen, existieren ebenfalls (28).

### **1.3.1 Regulierung des $Ca^{2+}$ -Einstroms durch die intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration**

Eine These postuliert, dass die  $[Ca^{2+}]_i$  den  $Ca^{2+}$ -Einstrom reguliert. Beschrieben ist in nicht-erregbaren Zellen, dass die  $[Ca^{2+}]_i$  in der unmittelbaren Nähe der Kanäle in der Plasmamembran diese inhibiert (29;30). Die Entleerung von intrazellulären Speichern könnte restriktiv die  $[Ca^{2+}]_i$  in sehr kleinen Arealen zwischen ER und Plasmamembran senken und die SOC aktivieren (31).

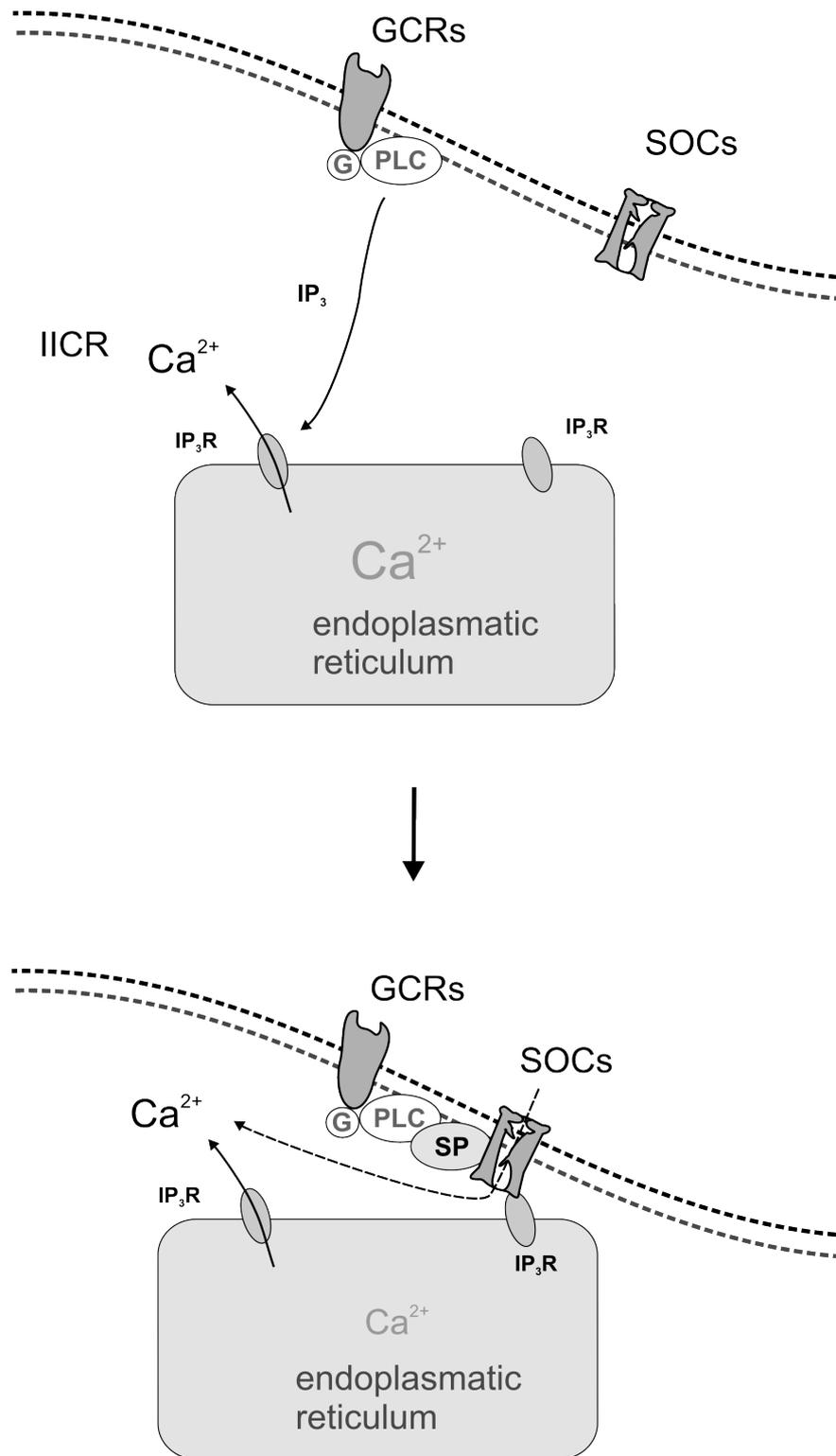
Krause et al. haben gezeigt, dass ein Absenken der  $[Ca^{2+}]_i$  die Aktivierung eines Kalzium Transienten der kapazitiven Kalzium Einstrom repräsentiert, nämlich  $I_{CRAC}$ , bewirkt (22;29).



**Abb. 1.3.1** Regulierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms durch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.  $\text{Ca}^{2+}$  aus vollen intrazellulären Speichern inhibiert speichergesteuerte Kanäle (SOCs) in der Plasmamembran. Durch Aktivierung via Inositol 1,4,5-Trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) wird Kalzium aus Intrazellulären Speichern (endoplasmatisches Retikulum) freigesetzt. Bei Entleerung der Speicher und Absenkung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  fällt diese Hemmung weg. Kalzium strömt in die Zelle ein. Ag = Agonist.

### 1.3.2 Konformationelle Kopplung

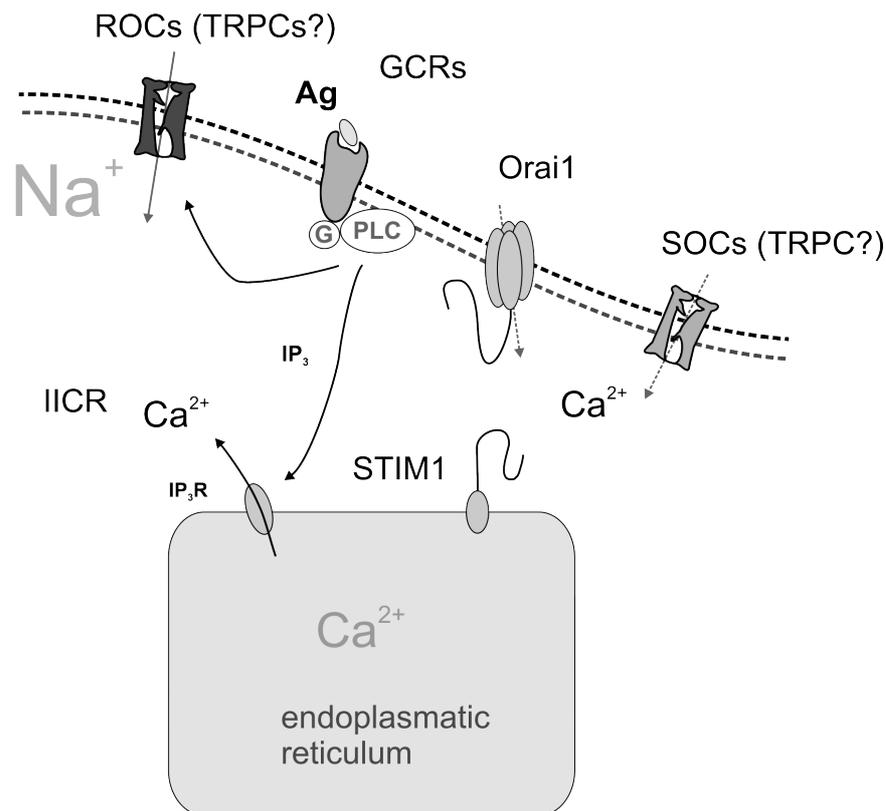
Die Hypothese der konformationellen Kopplung wurde erstmals von Irvine beschrieben (32). Vorgeschlagen wurde ein Modell analog zur Excitations-Kontraktions-Kopplung im Skelettmuskel, in dem Dihydropyridin-Sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle der Plasmamembran direkt mit Typ 1 Ryanodin Rezeptoren des Sarkoplasmatischen Retikulums gekoppelt sind. Im Falle des speichergesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms sollten  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) in der Membran des endoplasmatischen Retikulums direkt mit potentiellen SOCs in der Plasmamembran gekoppelt werden. Eine Entleerung der Speicher bewirkt eine konformationelle Änderung des  $\text{IP}_3\text{R}$ . Diese konformationelle Änderung bewirkt eine Öffnung der SOCs in der Plasmamembran und einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle (32). Ergebnisse, die das Modell der Konformationellen Kopplung stützten, kamen von Studien, die zeigten, dass 2-Aminoethoxydiphenylborane (2-APB, ein potentieller spezifischer  $\text{IP}_3\text{R}$  Inhibitor) und Thapsigargin (Sarkoplasmatisches / Endoplasmatisches Retikulum ATPase (SERCA) Inhibitor) einen induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in HEK293 Zellen blockiert (33). Diese Ergebnisse können jedoch mittlerweile nicht mehr als Beweis für die Bedeutung von  $\text{IP}_3\text{R}$  bei der Konformationellen Kopplung gelten. Es wurde gezeigt, dass 2-APB direkt SOCs inhibiert, unabhängig von einem Antagonismus des  $\text{IP}_3\text{R}$  (34). Ein weiterer starker Hinweis, dass die  $\text{IP}_3\text{R}$  nicht notwendig sind, um einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten zu induzieren, kam von Versuchen mit  $\text{IP}_3\text{R}$ -Knockout B-Lymphozyten, in denen  $I_{\text{CRAC}}$  induziert werden konnte (35). Das bedeutet jedoch nicht, dass andere Proteine in der Membran des ER zur Erklärung einer konformationellen Aktivierung der SOCs ausgeschlossen sind. Kürzlich wurde gezeigt, dass STIM 1, ein Protein in der Membran des ER, eine bedeutende Rolle bei der Messung des Füllungszustandes der Speicher, der konformationellen Kopplung und dem Öffnen der SOCs spielen könnte (36;37).



**Abb. 1.3.2 Konformationelle Kopplung.** Speichertentleerung via Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) induzierter Kalziumfreisetzung (IICR) bewirkt eine konformationelle Änderung des IP<sub>3</sub> Rezeptors (IP<sub>3</sub>R). Der IP<sub>3</sub>-Rezeptor wird zu speichergesteuerten Kanälen (SOCs) in der Plasmamembran transloziert. Durch direkte Protein-Protein Interaktion werden SOCs geöffnet, Kalzium strömt in die Zelle ein. Abkürzungen: PLC (Phospholipase C).

### 1.3.3 STIM 1 und Orai 1

Mit Hilfe der RNAi Technologie wurden zwei Proteine identifiziert, STIM 1 und Orai 1. Beide sind essentiell für SOCE, besonders für  $I_{CRAC}$ . Roos et al. führten ein RNAi Screening von Drosophila S2 Zellen durch. Das Ziel war es, jegliche Proteine mit einer transmembranen Domäne, einschließlich der „Transient Receptor Potential“ Kanal Familie (TRP), sowie jegliches Protein, das vorher im Zusammenhang mit SOCE beschrieben worden war, zu finden. Von 170 Genen war STIM das einzige, das für SOCE und Induzierung von  $I_{CRAC}$  eine Bedeutung hatte (37). In einer parallelen Studie identifizierten Liou et al zwei Homologe von STIM in Säugetieren, STIM 1 und STIM 2 deren Knockout SOCE reduzierte (36). Die Applizierung von siRNA gegen die beiden Homologe von STIM in Jurkat Zellen zeigte, dass nur STIM 1 essentiell für SOCE war, der Verlust von STIM 2 hingegen nicht (37). STIM 1 ist das potentielle Protein, das im  $I_{CRAC}$  Signaltransduktionsweg dafür verantwortlich ist, die  $Ca^{2+}$ -Konzentration in den Speichern ( $[Ca^{2+}]_{ER}$ ) zu messen (36;38). Der physische Beweis der  $Ca^{2+}$ -Bindung steht jedoch noch aus. Fest steht, dass STIM 1 eine signifikante Komponente im  $I_{CRAC}$  Signaltransduktionsweg ist, der exakte Mechanismus ist noch nicht bekannt. In einem Erklärungsmodell wird das ER und STIM 1, das in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist, bei Entleerung der Speicher in die Nähe der Zellmembran transloziert (siehe Abb. 1.3.3). Der zytosolische C-Terminus von STIM 1 würde dann mit weiteren Komponenten des  $I_{CRAC}$  Signaltransduktionsweg kommunizieren, zum Beispiel direkt mit den SOC Kanälen (36). Einer dieser Kanäle könnte das zweite entdeckte Protein sein: Orai 1 (39).



**Abb. 1.3.3 STIM 1 und Orai 1.** Aktivierung eines metabotropen Rezeptors (GCRs) durch einen Agonisten (Ag) induziert Phospholipase C (PLC) Aktivität. Second Messenger können direkt Ca<sup>2+</sup>-Einstrom mittels Rezeptorgesteuerten Kanälen (ROCs) triggern. Potentielle ROCs sind die TRPC Kanäle (Transient Receptor Potential Canonical). Über PLC generiertes IP<sub>3</sub> (Inositol 1,4,5-Trisphosphat) bewirkt Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER via IP<sub>3</sub> Rezeptor (IP<sub>3</sub>R). STIM 1 ist in der Membran des ER lokalisiert. Bei sinkender [Ca<sup>2+</sup>] im ER wird STIM 1 zur Plasma Membran transloziert. Dort interagiert und aktiviert es Orai 1, einen potentiellen Calcium Release Activated Channel (CRAC). Diskutiert wird, ob STIM 1 mit weiteren speichergesteuerten Kanälen (SOCs) wie z.B. TRPCs) interagiert. Abkürzungen: IICR (IP<sub>3</sub> induced Ca<sup>2+</sup>Release).

### 1.3.4 Speichergesteuerte Kanäle

**TRP Protein Gruppe** Potentieller Kandidat für SOCs ist die „Transient Receptor Potential“ (TRP) Protein Gruppe und von diesen die Untergruppe der „Transient Receptor Potential Canonical“ (TRPC). Die TRPC Gruppe enthält die Gene, die die meisten Homologe zu den TRP Genen von *Drosophila* aufweisen. Es gibt zwei Studienrichtungen, die Hinweise dafür liefern, dass TRPC 1 und TRPC 4 SOCs formen oder zu einem Teil konstituieren: Erstens, ektopische Expression von TRPC 1 und 4 in verschiedenen Zellen bewirkte einen Anstieg von SOCE der über IP<sub>3</sub> oder pharmakologische Entleerung von Speichern induziert war (40;41); zweitens, genetische Störung von korrespondierenden Genen von TRPC 1 und 4 sowie die Verwendung

von entgegengerichteten RNA Abschnitten (Antisense Constructs) bewirkte eine effektive Reduktion des SOCE (42;43). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass der archetypische  $I_{CRAC}$  Transient signifikant reduziert worden ist (44;45). Das lässt darauf schließen, dass TRPC 1 und 4 Bestandteile von nativen SOCs sein könnten. Bei TRPC 4 wird jedoch kontrovers diskutiert, ob durch ektopische Expression ein Phospholipase C regulierter Kanal exprimiert wird, dessen Aktivität komplett unabhängig von einer Entleerung der Speicher ist (46). Ein dauerhaftes Problem bei der Identifizierung von TRPC Kanälen als SOCs ist die erfolglose Reproduktion von  $I_{CRAC}$  in ektopisch exprimierten TRP Proteinen. Das lässt darauf schließen, dass SOCs eine heterogene Gruppe von  $Ca^{2+}$  permeablen Kanälen darstellt, und dass es wichtig ist, neben  $I_{CRAC}$  die anderen physiologischen speichergesteuerten Transienten für Kalzium Einstrom zu untersuchen.  $I_{CRAC}$  ist nur einer von vielen SOCE Transienten (2;47).

**Orai 1** In einer weiteren Studie wurde der Name CRACM (für CRAC Membrane) vorgeschlagen. In dieser Arbeit wird die Bezeichnung Orai verwendet (48). Orai 1 wurde zuerst durch eine Analyse der genetischen Ähnlichkeiten bei einer seltenen Form der schweren Immunschwäche (SCID = severe combined immunodeficiency), die durch eine Verringerung von  $I_{CRAC}$  charakterisiert ist, identifiziert (39). Orai 1 sowie die beiden verwandten Proteine Orai 2 und Orai 3 sind im Gegensatz zu STIM 1 überwiegend in der Plasmamembran der Zelle lokalisiert (48). In nachfolgenden Studien wurde eine 50-100 fache Verstärkung des  $I_{CRAC}$  Transienten bei Koexpression von STIM 1 und Orai 1 gezeigt (49;50). Der deutliche Anstieg des  $I_{CRAC}$  lässt darauf schließen, dass Orai 1 ein Bestandteil der  $I_{CRAC}$  konstituierenden Kanäle ist.

## **1.4 Mitochondriale Physiologie**

Mitochondrien bestehen aus zwei Membranen. Die äußere Membran ist permeabel für Ionen und kleine Moleküle. Diese Permeabilität ist möglicherweise präzise reguliert. Die innere mitochondriale Membran ist nahezu impermeabel und bildet daher eine dichte Barriere zwischen der mitochondrialen Matrix und dem neuronalen Zytoplasma. In der inneren mitochondrialen Membran sind zahlreiche Kanäle und mitochondriale Enzymsysteme wie z.B. die Elektronentransportkette (ETC) und ATP-Synth(et)ase vorhanden (siehe Abb. 1.2.1 und 1.4.1).

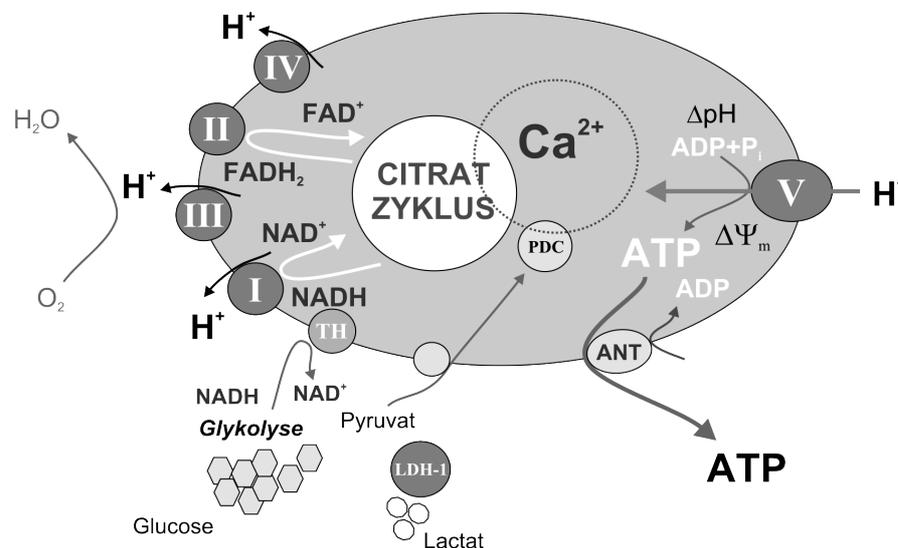
Die äußere und die innere Membran können Kontakt haben (7). Es gibt Studien an kultivierten Säugerzellen die zeigen, dass die Replikation mitochondrialer DNA von perinukleären Strukturen ausgeht (51). Diese mitochondriale DNA verteilt sich dann rasch über das dynamische mitochondriale Netzwerk. In Neuronen von Mäusen wurde gezeigt, dass Mitochondrien kettenartige Strukturen in Dendriten und eher unregelmäßig strukturierte Anhäufungen in Somata bilden (52). Aufgrund eines komplexen cytoskeletalen Transportmechanismus sind individuelle Mitochondrien in Neuronen mobil in antero- und retrograder Richtung. Mitochondrien können in neuronalen Segmenten mit erhöhtem metabolischen Bedarf wie z.B. prä- und postsynaptischen Strukturen positioniert und gehalten werden (53).

Mitochondrien im Gehirn nutzen als primäres Substrat für den oxidativen Metabolismus Glukose. Unter physiologischen Bedingungen ist die Diffusion von Glukose via GLUT-1 Transporter über die Blut-Gehirn Schranke schneller als die anderer Substrate wie Laktat, Keto-Säuren und Aminosäuren. Das durch cytosolische Glykolyse entstandene Pyruvat wird verwendet um NADH und FADH<sub>2</sub> durch Enzyme des Citratzyklus (TCA) zu reduzieren. An der NAD<sup>+</sup>-Isocitrat-Dehydrogenase,  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase und der Malat-dehydrogenase wird NAD<sup>+</sup> zu NADH reduziert. NADH und FADH<sub>2</sub> transportieren die Elektronen zur mitochondrialen Atmungskette. NADH wird an Komplex I, FADH<sub>2</sub> an Komplex II der inneren Mitochondrienmembran oxidiert. Die Oxidation in der Elektronentransportkette erzeugt eine Potentialdifferenz (150-180 mV negativ gegenüber dem Zytosol,  $\Delta\Psi_m$ ) und einen Protonengradienten ( $\Delta\text{pH}$ ) über der inneren Mitochondrienmembran. Dieser Protonengradient ist die treibende Kraft für Komplex V (ATP-Synthase), Ca<sup>2+</sup>-Transporter und Transporter wie die Adenin Nukleotid Translokase (ANT). Über die Laktat Dehydrogenase-I können Neuronen Pyruvat auch aus Laktat, das von astrocytischer anaerober Glykolyse bereitgestellt wird, verwenden (7).

Mithilfe der Autofluoreszenz Messung von NAD(P)H und FADH<sub>2</sub> ergibt sich die Möglichkeit Aussagen über den Energie-Metabolismus der Zelle zu treffen (54). Eine gesteigerte Aktivität des Citratzyklus verursacht eine Verschiebung des NADH/NAD<sup>+</sup> Verhältnisses zugunsten von NADH (55). Dies ist erkennbar an einem Anstieg des Autofluoreszenzsignals von NADH. Bei einem Anstieg von FADH<sub>2</sub> erfolgt aufgrund anderer Fluoreszenzeigenschaften ein Abfall des Autofluoreszenzsignals von FADH<sub>2</sub> (siehe Material und Methoden 3.3.1).

Die Aktivität der Dehydrogenasen des TCA werden unter anderem von der  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  im nano bis micromolaren Bereich reguliert (56-58). Das ist in Abb.1.4.1 angedeutet durch überlappende Kreise (modifiziert nach (7)). Eine weitere Rolle für den Grad der Aktivierung des Citratzyklus

haben die Verhältnisse von ADP/ATP, NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H und CoA/acetylCoA. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass IICR, CICR und CCE in der Lage war, die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>m</sub> zu heben (59). Das impliziert, dass neuronale Mitochondrien die Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> wahrnehmen, sogar im Falle einer durch metabotropische Rezeptoren induzierten Ca<sup>2+</sup>-Signaltransduktion. Neuronale und mitochondriale Aktivität geht einher mit vorübergehenden Erhöhungen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> aufgrund von Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem Extrazellulären Raum und Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Repetitive elektrische Stimulation, metabotropische serotonerge, glutamaterge und muscarinische Rezeptoraktivierung bewirken vorübergehende Erhöhungen der mitochondrialen Kalziumkonzentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>m</sub>). Weitere Transienten sind zu beobachten: Na<sup>+</sup>, und Cl<sup>-</sup> akkumulieren intrazellulär, K<sup>+</sup> strömt in den extrazellulären Raum.



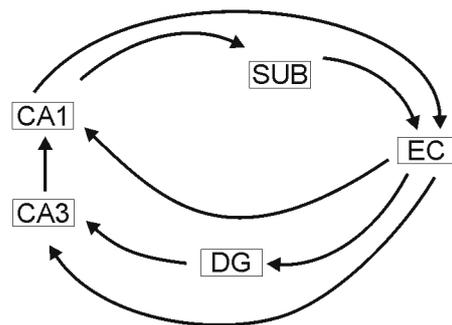
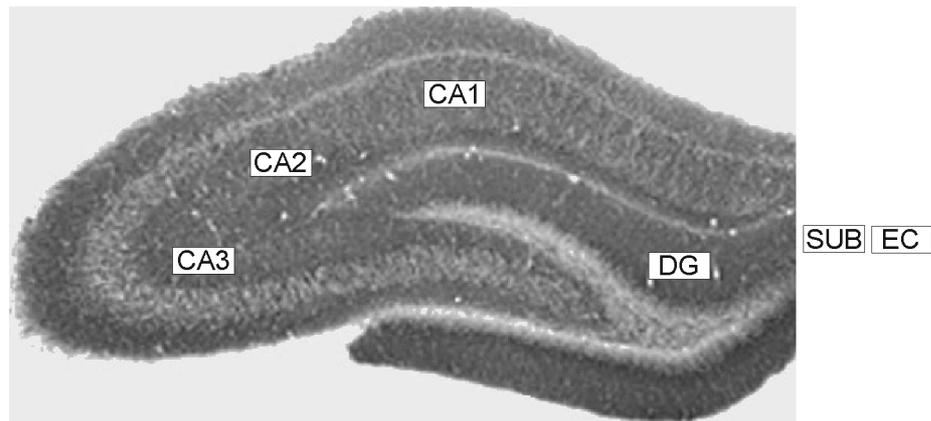
**Abb. 1.4.1 Citratzyklus und Elektronentransportkette.** Glykolyse und Lactat Dehydrogenase-1 (LDH-1) stellen NADH und Pyruvat bereit. Diese werden in die mitochondriale Matrix transferiert und dort über den Pyruvatdehydrogenase Komplex (PDC) in den Citratzyklus eingespeist. NADH und FADH übertragen Energie vom Citratzyklus zu Komplex I und Komplex II der Elektronentransportkette. Die Aktivität der Elektronentransportkette erzeugt eine Potentialdifferenz (150-180 mV negativ gegenüber dem Zytosol,  $\Delta\Psi_m$ ) und einen Protonengradienten ( $\Delta pH$ ) über der inneren Mitochondrienmembran. Dieser Protonengradient ist die treibende Kraft für Komplex V (ATP Synthase), Ca<sup>2+</sup> Transporter und Transporter wie die Adenin Nukleotid Translokase(ANT). Die ATP-Synthase stellt ATP für neuronale Aktivität und Aufrechterhaltung der Ionen Gradienten zur Verfügung. Die Aktivität des Citratzyklus und des Pyruvatdehydrogenase Komplexes werden stimuliert durch Ca<sup>2+</sup> (angedeutet durch überlappende Kreise). Abbildung modifiziert nach (7).

Um die Ionengradienten und damit die Excitationsfähigkeit des nervalen Gewebes aufrecht zu erhalten, steigt die Aktivität der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase und der  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasen. Dieser Prozess macht 60-80 % des ATP Verbrauchs im ZNS aus (60). Zu einer ausführlichen Darstellung der mitochondrialen Physiologie siehe (7).

## **1.5 Hippokampus Präparat**

Eine der evolutionär ältesten Strukturen des Gehirns ist der Hippokampus. Er liegt im Temporallappen und ist eine zum limbischen System gehörende Struktur, die mit Gedächtnisbildung assoziiert ist.

Der Hippokampus im engeren Sinne (Hippocampus proprius) ist das Ammonshorn (Cornu ammonis). Der Hippokampus im weiteren Sinne besteht aus: Ammonshorn, Gyrus dentatus, Subiculum, Fimbria hippocampi und Alveus. Der Begriff der Hippokampusformation bezeichnet den Hippokampus, die Area entorhinalis (entorhinale Kortex =EC) und das Prä-/Parasubiculum. Der Hippokampus gehört zum Allokortex und setzt sich demzufolge aus drei Schichten zusammen. Von außen nach innen in folgender Anordnung: Die Eingangsschicht des Hippokampus besteht aus dem Stratum radiatum und dem Stratum lacunosum-moleculare. Dann folgt die Pyramidenzellschicht (Stratum pyramidale) mit den glutamatergen Hauptzellen. Nach innen folgt die dritte Schicht, das Stratum oriens mit den Zellkörpern der inhibierenden Korbzellen. Im Subiculum ist der Übergang vom dreischichtigen Allokortex zum sechsschichtigen Isokortex. Das Subiculum liegt zwischen CA1 und dem entorhinalen Kortex. Der entorhinale Kortex kann als Schaltstelle zwischen Hippokampus und dem cerebralen Kortex bezeichnet werden (siehe Abb. 1.5.1). Er ist mit vielen anderen Regionen des cerebralen Kortex wechselseitig stark verbunden (61). Dies sind z. B. Teile des Septums, Nuclei anteriores thalami, Teile des Hypothalamus, der serotoninerger Raphekerne und weitere.



**Abb.1.5.1 Histologisches Schnittbild des Hippokampus mit Schema der Leitungsbahnen.**

Die Hauptefferenz des entorhinalen Kortex (EC) ist der Tractus perforans, der das Subiculum (SUB) „perforiert“ und hauptsächlich auf die Körnerzellen im Gyrus dentatus (DG) verschaltet. In geringerem Ausmaß verschaltet der entorhinale Kortex auch auf die apikalen Dendriten der CA3 und CA1. Die Körnerzellen des Gyrus dentatus projizieren über die Moosfasern auf Dendriten der Pyramidenzellen der CA3. Von den Pyramidenzellen der CA3 gehen Axone, Schaffer-Kollaterale genannt, über CA1 zurück bis in die tiefen Schichten des entorhinalen Kortex.

Im Hippokampus ist der Fluss von Informationen aus dem entorhinalen Kortex überwiegend unidirektional. Die Signale breiten sich zuerst zum Gyrus dentatus aus, dann zu CA3, zu CA1, zum Subiculum und wieder zum entorhinalen Kortex. Jede dieser Ebenen hat zusätzlich komplexe intrinsische Verschaltungen und ausgedehnte weitere Verbindungen. Zur detaillierten Schilderung der Gewinnung von organotypischen hippocampalen Hirnschnitt-Kulturen siehe Kapitel 3.1 Methodik.

## 2 Herleitung der Aufgabenstellung

Dargestellt wurden die Grundprinzipien der Kalzium Homöostase, des CCE und der mitochondrialen Physiologie. In vielen nicht-neuronalen Zell-Typen ist eine Entleerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher mit CCE assoziiert. CCE führt zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten über die Zell Membran, der zu einem Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) führt (22;24;62-64). CCE wirkt an der Auffüllung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und der Bildung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen mit. CCE hat eine bedeutende Rolle für Zell-Wachstum, Sekretion, Kontraktion und Chemotaxis (21). Die zugrunde liegenden Ionen-Kanäle und intrazellulären Moleküle, die CCE vermitteln, werden noch erforscht (19-21) und schließen Transient Receptor Potential Kanäle (TRPC), Orai und Stim Proteine ein (65;66). Der Großteil dieser Studien wurde an isolierten Zellen und Zellkulturen durchgeführt.

Mitochondrien sind sowohl für Exzitabilität als auch für synaptische Transmission äußerst wichtig in Neuronen(67). Neuronale Mitochondrien kompensieren lokalen ATP Verbrauch als Reaktion auf Änderungen der Substrat-Verhältnisse und der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (7). In aktuellen Studien wird berichtet, dass einige Mitochondrien mit dem endoplasmatischen Retikulum in Kontakt stehen (68) und an der Regulation von CCE in nicht erregbaren Zellen partizipieren (63;69). Die nachgeschalteten zellulären Effekte von CCE auf Gen-Expression und Mitochondrien-Funktionen in zentralen Neuronen sind jedoch kaum bekannt (70).

Diese Arbeit hat zum Ziel, CCE und seine zellulären Nachfolge Effekte in Bezug auf Erregbarkeit der neuronalen Zellmembran und mitochondriale Funktionen in zentralen Neuronen zu untersuchen. Es wurden die Effekte von muskarinischer Rezeptor Aktivierung und nachfolgendem CCE auf die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ), extrazelluläre Kalium Konzentration ( $[\text{K}^+]_o$ ), mitochondrialem Membranpotential und oxidativem Metabolismus (NAD(P)H und FAD Fluoreszenz) untersucht.

Dazu wurden hippokampale Pyramidenzellen, in denen CCE vorkommt, ausgewählt (25;62;71;72). Es wurden Elektrophysiologische- und Fluoreszenz-Aufnahme Techniken in organotypischen hippokampalen Schnittkulturen kombiniert. Unter Verwendung von Organotypischen hippokampalen Schnittkulturen besteht die Möglichkeit Neuronen in ihrer natürlichen Umgebung zu untersuchen (22;62-64). In organotypischen Kulturen behalten die Neuronen und Gliazellen größtenteils ihre morphologische-, histologische Architektur sowie ihre

physiologischen Interaktionen. Für viele Experimente wurden Parameter gewählt, die nahe an den physiologischen Verhältnissen sind, wie z. B.: normoxische Atmosphäre und volle zelluläre Integrität der Neuronen. Es wurde gezeigt, dass in Organotypischen hippocampalen Hirnschnitt-Kulturen, bei Begasung mit 20 % Sauerstoff, eine Sauerstoffsättigung im Gewebe vorliegt, die Werten, die in vivo unter normoxischen Verhältnissen gemessen wurden, sehr nahe kommen (7). Um eine Situation neuronaler Aktivität zu imitieren, wurde die Kalzium Konzentration im extrazellulären Raum während des Versuches mithilfe einer kalziumfreien Perfusionslösung und einem sehr affinem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator (EGTA) abgesenkt. In dieser kalziumfreien Phase wurde ein muskarinischer Agonist appliziert und sowohl die direkte Antwort bei Applikation des Agonisten als auch die Antwort bei der anschließenden Re-Applikation von Kalzium beobachtet. Die Erfassung potentieller physiologischer Implikationen von CCE unter Anwesenheit von muskarinischen Agonisten ist durch diesen experimentellen Ansatz möglich und in dieser Form in intakten Neuronen in Hirnschnitt-Kulturen bisher nicht untersucht worden (73).

### 3 Methodik

#### 3.1 Organotypische hippokampale Hirnschnitt-Kultur

Organotypische hippokampale Hirnschnitt-Kulturen wurden nach der von Stoppini und Mitarbeitern beschriebenen Methode hergestellt (59;74). Von 7-9 Tage alten Wistar Ratten wurden hippokampale Schnitte (400  $\mu\text{M}$ ) in eisgekühltem Minimal Essential Medium (MEM, Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) unter sterilen Bedingungen hergestellt. Die Schnitte wurden auf einer Biomembran (0.4  $\mu\text{M}$ , Millicell-CM, Millipore, Eschborn, Deutschland) zwischen Kulturmedium (50% MEM, 25% Lösung nach Hank (HBSS, Sigma, Taufkirchen, Deutschland), 25 % Pferde-Serum (Invitrogen GmbH) und 2 mM L-Glutamin bei pH 7.3) und befeuchteter Atmosphäre (5 %  $\text{CO}_2$ , 36,5° C) im Inkubator (Unitherm 150, UniEquip, Martinsried, Deutschland) kultiviert. Jeweils 2-3 Schnitte wurden auf einer Membran platziert. Das Kulturmedium wurde dreimal pro Woche zur Hälfte ausgetauscht. Die Kulturen wurden zwischen Tag 7-10 für die *in vitro* Experimente genutzt (resultierende Dicke 180-210  $\mu\text{M}$ ). Alle Tiere wurden in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der Europäischen Kommission, dem Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin und dem Berliner Tier Ethik Komitee (T0032/08) gehalten, gepflegt und getötet.

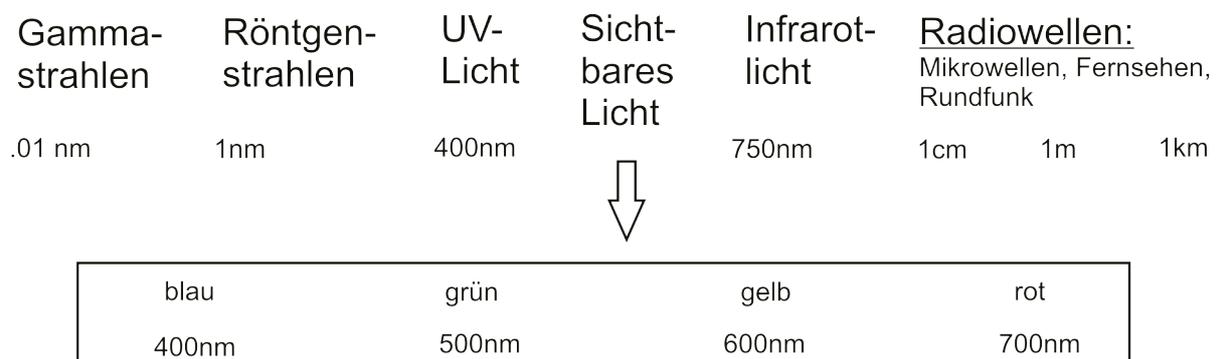


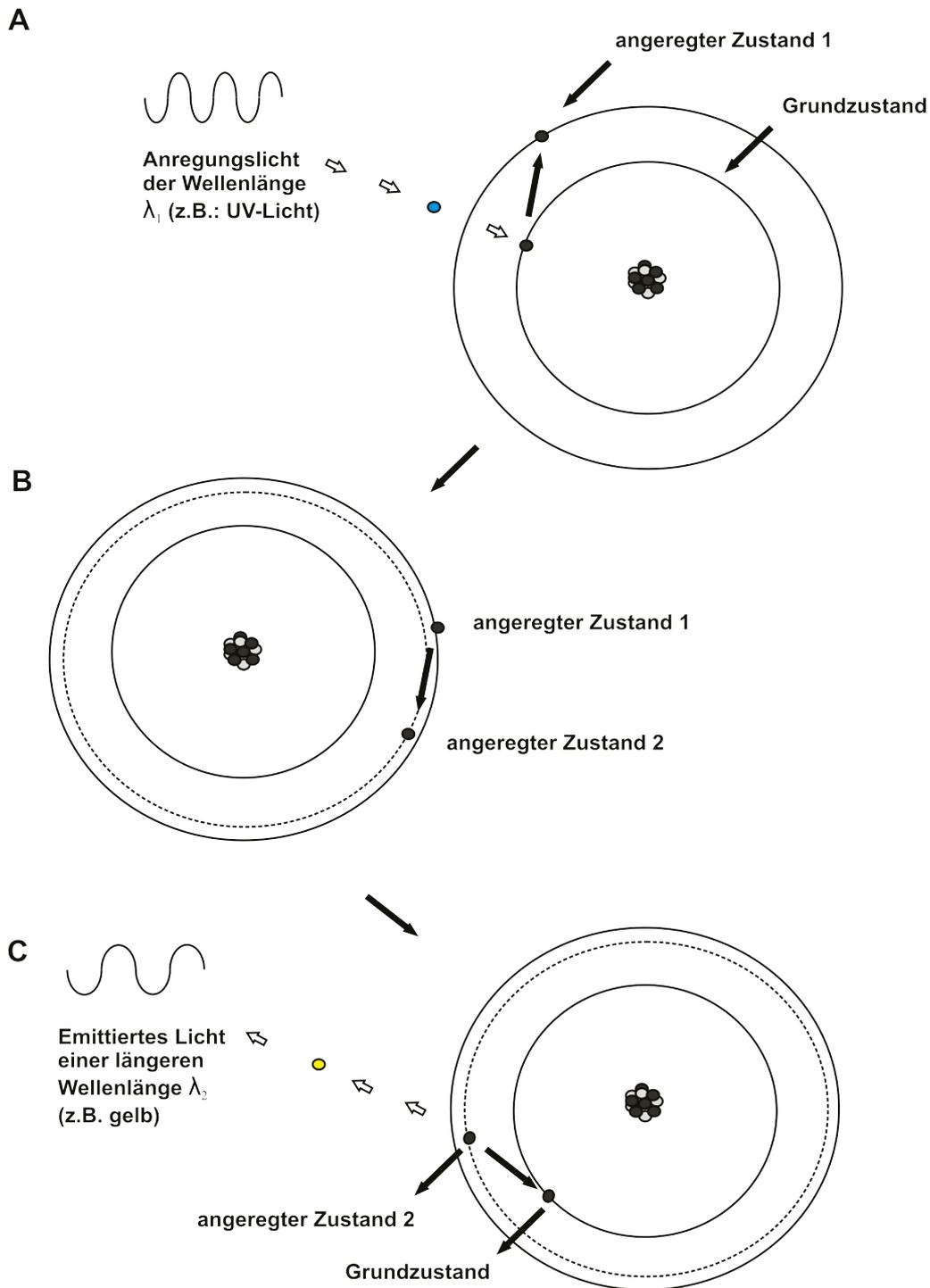
Abb. 3.2.1 Darstellung der verschiedenen Strahlen des sichtbaren Lichts

## **3.2 Mikrofluorometrische Untersuchungen**

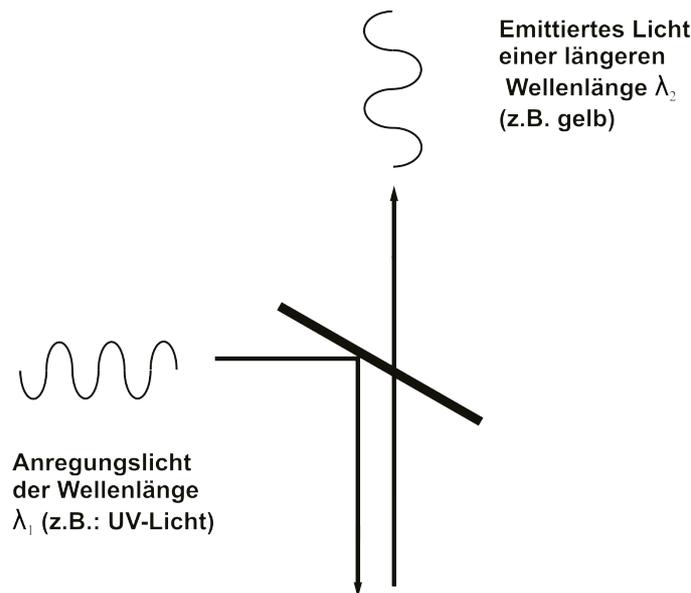
### **3.2.1 Fluoreszenz-Imaging**

Das Prinzip des Fluoreszenz-Imaging wird in den Abbildungen 3.2.1-3.2.3 erklärt. Die Fotolumineszenz beruht auf dem Effekt, dass eingestrahlt Licht von den Molekülen absorbiert wird (Erregungslicht) und Elektronen auf ein energetisch höheres Niveau (angeregter Zustand 1) gehoben werden. Diese Anregungszustände bestehen für ca.  $1-10 \times 10^{-9}$  Sekunden. Zusätzlich besteht das Phänomen der Raman-Streuung (unelastischen Streuung) der absorbierten Photonen. Dabei kommt es zu Schwingungen und Rotationen der angeregten Moleküle, die einen teilweisen Verlust der Photonenenergie bewirken. Die Elektronen besetzen dann einen niedrigeren energetischen Zustand (angeregter Zustand 2). Aufgrund dieses Energieverlustes verschiebt sich die Wellenlänge emittierter Photonen zu längeren Wellenlängen. Dieser so genannte Stokes' Shift ermöglicht es, dass emittierte Licht vom Erregungslicht (absorbierende Photonen) zu trennen. Besteht der angeregte Zustand über mehrere Sekunden, spricht man von Phosphoreszenz.

Das Photon Technology Instruments Imaging-System und das Olympus Cell<sup>R</sup> werden von einer Xenon-Lampe und einem Gitter-Monochromator beleuchtet. Das Olympus Cell<sup>R</sup> ist mit einem System von schnell wechselbaren Anregungsfiltern ausgestattet. Dadurch ist es möglich, zwei verschiedene Wellenlängen Erregungslicht mit kurzer Latenz zu erzeugen. Durch eine geeignete Kombination von Monochromator bzw. Anregungsfiltern, optischem Farbteiler und Emissionsfilter kann die optimale Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes und die alleinige Detektion des emittierten Fluoreszenzsignals erreicht werden.



**Abb. 3.2.2 Stoke's Beobachtung und Stoke's Shift.** **A** Moleküle werden durch die Lichteinstrahlung der Wellenlänge  $\lambda_1$  vom Grundzustand in den angeregten Zustand 1 gehoben. **B** Aufgrund von Molekülschwingungen und -rotationen verlieren die angeregten Elektronen Energie und besetzen den angeregten Zustand 2. **C** Schließlich fallen die Elektronen unter Emission von Photonen der Wellenlänge  $\lambda_2$  in ihren Grundzustand zurück. Der Stokes' Shift entspricht der Differenz zwischen eingestrahelter und emittierter Wellenlänge  $\Delta\lambda = \lambda_2 - \lambda_1$  bzw. der Differenz zwischen angeregten Zustand 2 und 1.



**Abb. 3.2.3 Schematische Darstellung eines Farbteilers bzw. dichroischen Spiegels.** Um die Photonen des anregenden Lichtes von den emittierten Photonen zu trennen, werden Farbteiler eingesetzt. Sie besitzen ein reflektierendes Verhalten für Licht bis zu einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda_r$  und ein transmittierendes Verhalten für Licht mit einer Wellenlänge  $\lambda_t > \lambda_r$ . Die Differenz zwischen  $\lambda_t$  und  $\lambda_r$  beträgt im Allgemeinen 20-30 nm. Diese Eigenschaft von Farbteilern gilt nur in einem engen spektralen Bereich von +/- 50-80 nm um  $\lambda_t$  und  $\lambda_r$  herum.

Das gleiche gilt für die fluorometrischen Bestimmungen bei Verwendung eines konfokalen Spinning Disc Mikroskopes (Andor Revolution). Die verwendeten Fluoreszenzen, sowie die spektralen Eigenschaften und die Filter sind in Tabelle 3.2.1 und 3.3.1 aufgelistet.

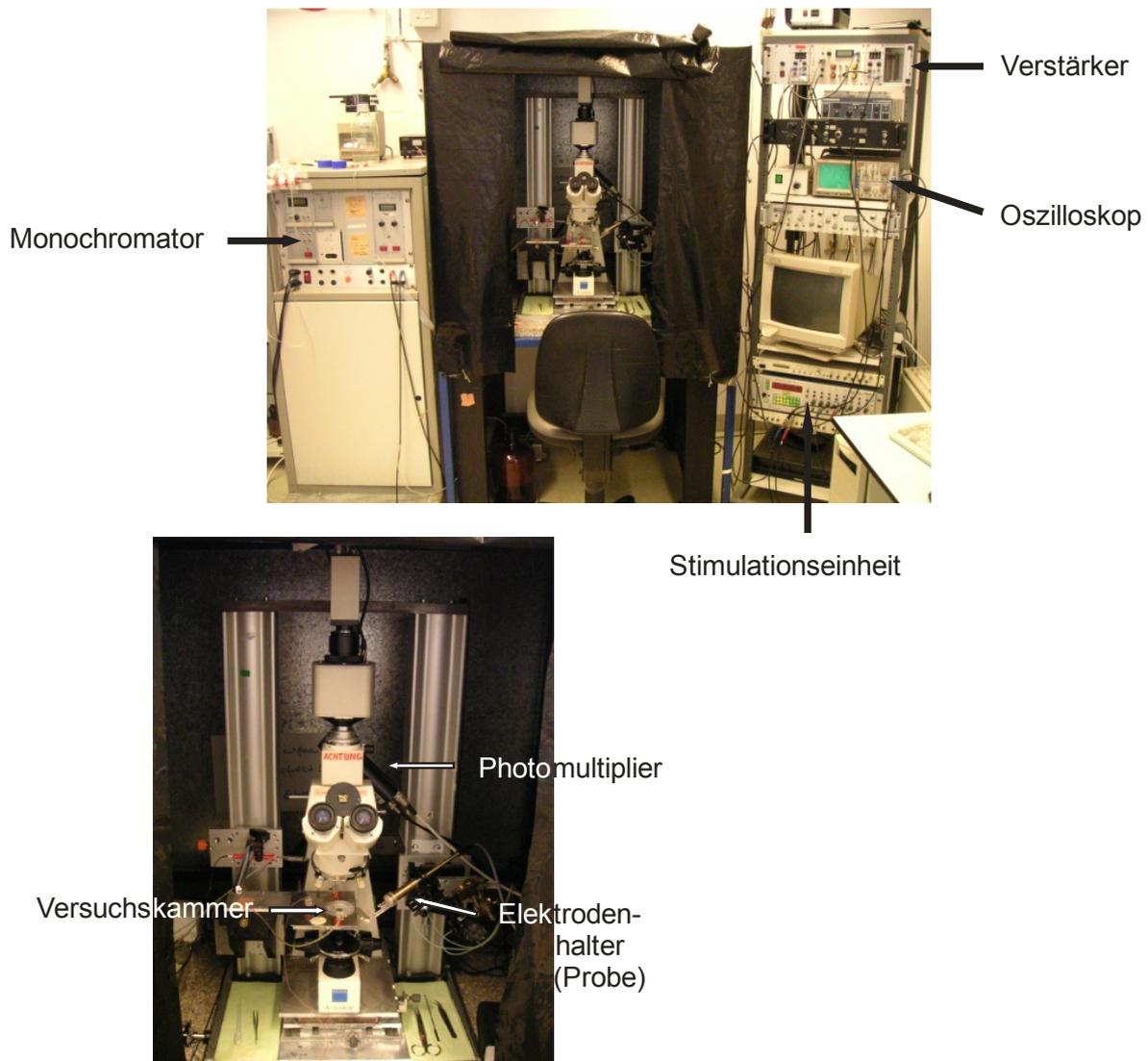
Fluoreszenz	Maximum Spektrum Anregung	Spektrum Emission	Anregungswellenlänge	FT	LP, BP
<b>PTI</b>					
NAD(P)H	340	460	$360 \pm 15$	390	400
Rhod 2	552	581	530	550	590
Rh 123	507	529	$490 \pm 10$	505	515/500-530
<b>Olympus Cell R</b>					
NAD(P)H	340	460	360	440	450-550
FADH	490	540	490	510	520-550
<b>Andor Revolution</b>					
Rhod 2	552	581	561		590

**Tabelle 3.2.1 Spektrale Eigenschaften der gemessene Parameter.** Maximum im Anregungs- und Emissionsspektrum der genutzten fluoreszenten Chemikalien. Darstellung der Anregungswellenlänge und optischen Filterkombination (FT, LP und BP) zur Trennung zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge. Alle Angaben sind in nm.

Zum Detektieren der Signale werden heute unter anderem Photomultiplier und CCD-Kameras (charge-coupled-device) verwendet. Ein Photomultiplier bietet eine sehr gute zeitliche Auflösung bis in den Nano-Sekunden Bereich mit hoher Empfindlichkeit (in unserem Fall in den 10-Hz Bereich), jedoch keine räumliche Auflösung, da es sich um ein Integrationssignal handelt. Eine CCD-Kamera bietet eine gute effektive Pixelgröße (6-20  $\mu\text{m}^2$  pro Pixel), ist jedoch durch die Ausleserate von ungefähr  $1 \times 10^6$ - $10^7$  Pixeln pro Sekunde auf eine zeitliche Auflösung  $\geq 100$  Millisekunden beschränkt.

### **3.2.1 Photon Technology Instruments Mikrofluorimetrisches-System**

Schnelle Fluoreszenzveränderungen wurden an einem Mikrofluorimetrischen-System registriert, das auf einem Zeiss Axioskop mit 20x Wasserimmersionsobjektiven (0,5 Numerische Apertur (NA), Zeiss, Jena) basiert (siehe Abbildung 3.2.4). Die verwendeten Farbteiler (Omega Optical Instruments, München) sind in Tabelle (Spektrale Eigenschaften der gemessenen Parameter) aufgelistet. Zum Detektieren der emittierten Photonen wurde ein Photomultiplier (Seefeld Messtechnik, Seefeld) verwendet. Gemessen wurde in der CA3 des Hippokampus (siehe Kapitel 1.5.). Die Aufnahme Frequenz war 10 Hz. Aufnahme und Steuerung des Systems erfolgte mit Felix-Software (Photon Technology Inc.).



**Abb. 3.2.4 Aufbau des Photon Technology Instruments Imaging-Systems.** Als Lichtquelle wird eine Xenon-Lampe mit einem Gittermonochromator verwendet. Das Licht wird über einen Quarzleiter in das Auflichtmikroskop eingespeist. Am Farbeiler wird es gespiegelt und durch die Objektive auf die Fluoreszenzfarbstoff geladenen Zellen geleitet. Die emittierten Photonen transmittieren aufgrund ihrer höheren Wellenlänge durch den Farbeiler hindurch und werden von einem Photomultiplier registriert. Online werden die Daten digitalisiert, am Computer dargestellt und gespeichert.

### 3.2.1 Olympus Cell<sup>R</sup> Setup

Die Autofluoreszenzen von NAD(P)H (Nicotinamid Adenin Dinucleotid (Phosphat)) und FAD (Flavin Adenosin Dinucleotid) wurden an einem Epifluoreszenz Imaging System Olympus Cell<sup>R</sup> (BX51W1 upright, Olympus, Hamburg) mit 20x Wasserimmersionsobjektiv (60x, 0,9

Numerische Apertur (NA) und 20x, 0,5 NA, mit Wasserkappe, Zeiss, Jena) gemessen. Durch ein schnell rotierendes Filtrerrad konnte das Erregungslicht für NAD(P)H von 360 nm und für FAD von 490 nm mit sehr geringer Verzögerung erzeugt werden (~ 130 ms). Das von NAD(P)H und von FAD bei 460 nm respektive 540 nm emittierte Licht wurde durch einen Triple Band Filter aufgetrennt. Zur Detektion der emittierten Photonen des Stratum radiatum und des Stratum pyramidale der hippocampalen CA3 wurde eine CCD-Kamera von Hamamatsu Photonics (ORCA-ER, Hamamatsu City, Japan) verwendet. Registriert wurden die Daten mit der Cell<sup>R</sup> Software von Olympus bei einer Bildrate von 0,5 Hz.

### 3.2.4 Konfokales Spinning-Disc Mikroskop Andor Revolution

Um  $[Ca^{2+}]_m$  mit Rhodamin 2 AM (Rhod 2) zu untersuchen, wurde ein Andor Revolution Mikroskop System mit Spinning-Disc (BFIOptilas GmbH, Gröbenzell, Deutschland) verwendet. Ausgestattet ist es mit CCD-Kamera (electron multiplying Andor iXonEM+) und einem PFOC fast Piezo Z-Scanner (Physik Instrumente, Berlin, Deutschland). Die Fluoreszenz wurde mit einem 60x Wasserimmersions-Objektiv gemessen (numerische Apertur 0,9). Die maximale Laserstärke, gemessen unter dem Objektiv, war  $< 50\mu W$  (561 nm Laser). Die Expositionszeit wurde kurz gehalten (80-120 ms), und die Aufnahmezeit bei Langzeitaufnahmen war reduziert auf einen Z-Scan alle 10 s. Bei dieser Laserintensität waren bis zu über 20 min lange Versuchsprotokolle möglich, ohne dass es dabei zu phototoxischen Schäden der Hirnschnitt-Kulturen wie z.B. „Photobleaching“ kam. Um  $[Ca^{2+}]_m$  in individuellen Mitochondrien, trotz axonaler und dendritischer Bewegung, über die Gesamte Dauer des Experiments exakt zu evaluieren, wurden 8-12 Bilder in Folge in verschiedenen Tiefen (0,6-1,2  $\mu M$  Schritte in Z-Achse) zum jeweiligen Zeitpunkt aufgenommen. Für 3D Rekonstruktionen wurden hochauflösende Z-Scans (0,3 $\mu M$ ) zu Beginn des Experiments aufgenommen. Hirnschnitt-Kulturen wurden entweder im Ganzen gefärbt (Bulk-Stained) oder lokal über Bolusgaben (Bolos-Stained) per Pipette (siehe unten). Bolus Färbung wurde genutzt um zwischen neuronaler und glialer  $[Ca^{2+}]_m$  unterscheiden zu können. In einem Teil der Experimente wurde Rhod 2 (100-500  $\mu M$ ) mit einer Glas-Pipette als Bolus appliziert (50ms pulse, 8 psi, TooheySpritzer, Toohey Company, Fairfield, NJ, USA). In CA3 des Hippokampus wurden damit Zellen im Umkreis von ungefähr 50  $\mu m$  gefärbt. Nach einer Inkubation zur Hydrolyse der Farbstoff-Ester ( $> 30$  Minuten), intrazelluläre Farbstoff-Diffusion und mitochondrialer Bewegung wurde die Fluoreszenz Bildgebung mit einer Distanz von  $> 100 \mu m$  vom Areal der Bolus Gabe

durchgeführt. In dieser Distanz stammt die Rhod-2 Fluoreszenz nahezu ausschließlich von neuronalen Mitochondrien in peripheren Axonen und Dendriten. Im Gegensatz dazu ist die Fluoreszenz von Glia Zellen überwiegend am Ort der Bolus Applikation zu finden.

### 3.3 Experimentell eingesetzte Substanzen und Lösungen

#### 3.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe bzw. Autofluoreszenz

Die Hirnschnitt-Kulturen wurden mit membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffen bei 36,5°C im Inkubator gefärbt. Die Tabelle 3.3.1 zeigt die verwendeten Autofluoreszenzen bzw. Fluoreszenzfarbstoffe.

	<b>Fluoreszenz</b>	<b>Indikatorfunktion</b>
1	Autofluoreszenz NAD(P)H	Energiemetabolismus / Redox-Status
2	Autofluoreszenz FADH <sub>2</sub>	Energiemetabolismus / Redox-Status
3	Rhodamin 2 AM (Rhod-2)	Mitochondriale Ca <sup>2+</sup> -Konzentration
4	Rhodamin 123 (Rh 123)	Mitochondrienmembranpotential

**Tabelle 3.3.1** Funktion der eingesetzten Autofluoreszenzen bzw. Fluoreszenzfarbstoffe. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden bei Molecular Probes, Leiden, Niederlande gekauft.

**Autofluoreszenz NAD(P)H und FADH<sub>2</sub>** NADH und FADH<sub>2</sub> werden am Citratzyklus reduziert und an der Elektronentransportkette oxidiert (siehe Einleitung Kap. 1.4). Mithilfe der Autofluoreszenz Messung von NAD(P)H und FADH<sub>2</sub> ergibt sich die Möglichkeit Aussagen über den Energiemetabolismus und Redox-Status der Zelle zu treffen (54). Eine gesteigerte Aktivität des Citratzyklus verursacht eine Verschiebung des NADH/NAD<sup>+</sup> Verhältnisses zugunsten von NADH (55) und entsprechend für FADH<sub>2</sub>. Da sich das cytosolische NADPH Spektrum mit dem mitochondrialen NADH Spektrum überlagert, soll NAD(P)H verdeutlichen, dass das Fluoreszenz-Signal entweder von einem oder beiden emittiert worden ist (7). Bei einer

konstanten Gesamtmenge von Nicotinamidadeninnucleotid bedeutet ein Anstieg des Autofluoreszenzsignals von NAD(P)H ein Anstieg der reduzierten Form NAD(P)H, während ein Abfall einen Anstieg der oxidierten Form NAD(P)<sup>+</sup> darstellt. Wegen anderer Fluoreszenzeigenschaften bedeutet bei FADH<sub>2</sub> ein Anstieg des Fluoreszenzsignals einen Abfall der FADH<sub>2</sub>-Konzentration, also genau invers zu NAD(P)H.

**Rhodamin 2 AM (Rhod-2)** Die organotypischen Kulturen wurden mit Zell-permeablen Rhod-2 AM Esther (5µM, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) für 30 min in ACSF (Artificial Cerebrospinal Fluid) bei 36,5°C inkubiert. Die Inkubation dient der Akkumulation dieses positiv geladenen Ca<sup>2+</sup> Indikators in den Mitochondrien (75), da die Mitochondrien die einzigen bekannten Zellorganellen sind, die gegenüber dem Zytoplasma über ein negatives Membranpotential verfügen, das über die Atmungskette aufgebaut wird (76). Rhod 2 AM spiegelt die intramitochondriale Ca<sup>2+</sup> Konzentration wieder (77). Eine Steigerung der Fluoreszenz entspricht einem Anstieg der mitochondrialen [Ca<sup>2+</sup>]. Für die Versuche am Andor Revolution wurden die Zellen mithilfe eines Pico-Spritzers gefärbt. Nach 20 min Inkubation wurde die Messung am konfokalen Spinning-Disc Mikroskop begonnen.

**Rhodamin 123 (Rh 123)** Rh 123 ist ein lipophiles Kation, das in Abhängigkeit des Membranpotentials in den Mitochondrien akkumuliert. In der verwendeten Konzentration verursacht eine Depolarisation der Mitochondrienmembran eine Rückverteilung des Rh123 in das Cytosol, wodurch es zu einem Anstieg des Rh 123 Signals kommt. Bei einer Hyperpolarisation der Mitochondrienmembran kommt es zu einer verstärkten Aufnahme des Farbstoffs aus dem Cytosol in die Mitochondrien. Das bedeutet, dass der Anteil der Farbstoffmoleküle mit unterdrückter Fluoreszenz (weil intramitochondrial = quenching) steigt und es zu einem Abfall des Rh 123 Signals kommt (55).

Die Konzentrationen der verwendeten Farbstoffe sind in Tabelle 3.3.2 dargestellt. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden bei Molecular Probes, Leiden, Niederlande gekauft.

<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Eingesetzte Konzentration (Kultur/Pipette)</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Stammlösung</b>
<b>PTI</b>			
Rhod-2	5 µM (Kultur)	DMSO, Finale [DMSO] < 0,001%	5 mM
Rh 123	5 µM (Kultur)	Ethanol, Finale [Ethanol] < 0,001%	10 mM
<b>Andor Revolution</b>			
Rhod-2	100-500µM (Pipette) 5µM (Kultur)	DMSO/ 20%Pluronic	10mM

**Tabelle 3.3.2** Eingesetzte Konzentrationen

### 3.3.2 Weitere experimentell eingesetzten Substanzen

Die organotypischen hippokampalen Zellkulturen wurden während der Experimente kontinuierlich mit begaster (Fluoreszenz Aufnahmen: 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 75% Stickstoff) Artificial Cerebrospinal Fluid (ACSF) superfundiert. ACSF bestand aus 129 mM NaCl, 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 10mM Glucose, 1,8 mM MgSO<sub>4</sub>, 3 mM KCl, 21 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,6 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O. Für Versuche mit einer nominal Ca<sup>2+</sup>-freien Lösung wurde 1,6mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O mit 1,6 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O ersetzt und zusätzlich mit 0,5 mM eines hoch-affinen Ca<sup>2+</sup>-Chelator (EGTA) versetzt.

In Tabelle 3.3.2 sind alle in dieser Arbeit über das Perfusionsmedium applizierten Substanzen, ihre Lösungsmittel und die jeweilige eingesetzte Konzentration zusammengestellt. Alle Versuche wurden bei Temperaturen von 24-28°C durchgeführt.

Tetrodotoxin (TTX, 1 µM) ist ein selektiver Antagonist spannungsaktivierter Na<sup>+</sup> Kanäle in Neuronen. 6-Cyano-7-Nitroquinoxaline-2,3-Dione (CNQX, 30 µM) ist ein Antagonist von glutamatergen AMPA und Kainat Rezeptoren. 2-Amino-5-Phosphonovalerat (APV, 30 µM) ist ein Antagonist von glutamatergen NMDA Rezeptoren. Weiterhin wurde 1,2-bis-(o-

Aminophenoxy)-Ethane-N,N,N',N'-Tetraacet Säure (BAPTA-AM), ein intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator (78) in Kombination mit einem Sesquiterpen-Lakton Thapsigargin, welches ein irreversibler nicht-kompetitiver SERCA-Inhibitor ist (79), verwendet. Dimethyl-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)pyridin-3,5-dicarboxylat (Nifedipin) ist ein Inhibitor von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen.

Carbachol (CCH) ist ein cholinerges muskarinisches Rezeptoragonist, der zusätzlich zur  $\text{Ca}^{2+}$ -freien ACSF eingesetzt wird, um die Speicherentleerung zu fördern. Ebenfalls wird 1,3,7-Trimethyl-2,6-purindion (Koffein) eingesetzt, um Kalzium aus Ryanodin-sensitiven Speichern freizusetzen. Koffein ist eine „dirty drug“ mit vielen verschiedenen Wirkungen wie z.B.: kompetitiver Antagonismus an Adenosin-Rezeptoren (Subtyp A2a) der Nervenbahnen; die zuständig sind für eine hemmende Rückkopplung (13;80;81). Um Artefakte bei Applikation einer hyperosmolaren, 20 mM Koffein Lösung zu vermeiden, wurden die Schnittkulturen vor und nach Koffein Gabe mit hyperosmolarer  $\text{Ca}^{2+}$ -freier ACSF (mit Zusatz von 20 mM Saccharose) adaptiert (59).

Substanz	Konzentration	Lösungsmittel	Stammlösung
Carbachol	100 $\mu\text{M}$	$\text{H}_2\text{O}$	100 mM
Atropin	1 $\mu\text{M}$	Ethanol	10 mM
TTX °	1 $\mu\text{M}$	$\text{H}_2\text{O}$	1 mM
CNQX	30 $\mu\text{M}$	DMSO	30 mM
APV	30 $\mu\text{M}$	NaOH 30mM	30 mM
Thapsigargin	500 nM	DMSO	1 mM
BAPTA-AM °	50 $\mu\text{M}$	DMSO	50 mM
ACH	50 $\mu\text{M}$	$\text{H}_2\text{O}$	50 mM
Physostigmin °	1 $\mu\text{M}$	$\text{H}_2\text{O}$	100 mM
Mecamylamine	20 $\mu\text{M}$	$\text{H}_2\text{O}$	20 mM
Nifedipin	50 $\mu\text{M}$	$\text{H}_2\text{O}$	keine
Koffein	20mM	$\text{H}_2\text{O}$	keine

**Tabelle 3.3.2 Eingesetzte Reagenzien** Alle nicht gekennzeichneten Reagenzien wurden bei Sigma, Taufkirchen, Deutschland gekauft. Die mit ° markierten wurden bei Biotrend/Tocris, Köln, Deutschland bezogen.

### **3.4 Elektrophysiologische Untersuchungen**

DC-gekoppelte Aufnahmen des Feld-Potentials und der  $[K^+]_o$  wurden nach der Methode von Heinemann und Arens (59) mit doppelläufigen Mikroelektroden gemessen. Die Mikroelektroden wurden von Theta Glas (Science Products, Hofheim, Deutschland) gezogen. Die Referenzseite der Mikroelektrode wurde mit 154 mM NaCl Lösung, die Ionen-Sensitive mit Kalium I Cocktail A (60031, Fluka Chemie, Buchs, Schweiz) und 100mM KCl gefüllt. Nur Mikroelektroden mit einer Ionensensitivität von  $58 \pm 2\text{mV}$  bei einem zehnfachen  $[K^+]_o$  Anstieg wurden für die Experimente genutzt. Der Verstärker verfügte über eine Feedback-Kontrolle der negativen Kapazität, die eine Registrierung der Änderung von  $[K^+]_o$  innerhalb von 50-200 ms ermöglichte. Die Signale der Mikroelektrode wurden gefiltert (3kHz bzw. 300Hz und digitalisiert mit 10 Hz unter Verwendung von FeliX Software (Photon Technology Instrumets, Wedel; Deutschland) bzw. mit 10 KHz unter Verwendung von Spike 2 aufgezeichnet. Um die aufgezeichneten Potentialänderungen (mV) in  $[K^+]_o$  umzurechnen, wurde eine modifizierte Nernst Gleichung verwendet:

$$\text{Log}[\text{Ion}]_1 = E_M * (s * v)^{-1} + \text{log}[\text{Ion}]_o$$

Wobei  $E_M$  = Registriertes Potential,  $s$  = Potential Anstieg der Elektrode bei Kalibrierung,  $v$  = Valenz des spezifischen Ions,  $[\text{Ion}]_o$  Ionen Konzentration in Ruhe,  $[\text{Ion}]_1$  = Ionen Konzentration während Aktivität.

Schnitt-Kulturen wurden für die Experimente akzeptiert, wenn das Postsynaptische Feldpotential, das durch einen elektrischen Einzel-Impuls (0,1 ms) ausgelöst wurde, eine Amplitude von  $> 0,5 \text{ mV}$  zeigte (59).

### **3.5 Datenerfassung und Analyse**

Für die Detektion der Fluoreszenzen von NAD(P)H, Rhod-2, Rh 123 am PTI-Setup wurde der Photomultiplier eingesetzt. Hierzu wurde mit dem 20x Objektiv das Stratum radiatum und das Stratum pyramidale in CA3 eingestellt. Die Aufnahme Frequenz betrug 10 Hz. Die Änderung des gemessenen Fluoreszenzsignals wurde auf die Änderung  $\Delta F/F_o$  des basalen Fluoreszenzsignals normiert.  $F_o$  ist die gemittelte Fluoreszenz der ersten 100 s vor der Bad-Applikation eines Agonisten bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung.

FAD und NAD(P)H wurden am Olympus Cell<sup>R</sup> in derselben Region mit 336 x 256 Pixels registriert. Die Expositionszeit war für NAD(P)H und FAD jeweils 200 ms bei einer Lichtintensität von 6% bzw. 3%. Alle 2 s wurde ein Bild aufgenommen. Dieser Zyklus wurde 600-mal wiederholt. Registriert und analysiert wurden die Daten mit dem Olympus Cell<sup>R</sup> System und Software (Olympus). Die Änderung der Fluoreszenz wurde als Änderung  $\Delta F/F_0 \times 100\%$  dargestellt.

Weitere Versuche mit Rhod-2, um  $[Ca^{2+}]_m$  in individuellen Mitochondrien zu untersuchen, wurden am Andor Revolution Setup durchgeführt. Registriert und für 3D Rekonstruktion bearbeitet wurden die Daten unter Verwendung der Software Andor IQ (BFIOptilas GmbH) und Image J 1.44 (Wayne Rasband, NIH, USA). Um eine reine Darstellung des mitochondrialen Rhod 2 Signals zu erzielen, wurden die Bilder in den entsprechenden Frequenz Bereichen mit einem FFT (fast Fourier transform) Filter in Image J bearbeitet (82). Die Arbeitsweise des FFT Filter ist vereinfacht dargestellt folgendermaßen: es wird ein virtuelles Bild mit den voreingestellten Strukturen entsprechender Größe von dem vorhandenen Bild subtrahiert. Diese Filtertechnik basiert darauf, dass der zytosolische Anteil des Fluoreszenzsignals aus einer glatten und niedrigen Frequenzkomponente des Signals besteht. Die Mitochondrien dagegen sind aufgrund ihrer Größe und Bewegung in den hohen Frequenzen repräsentiert (82-84). Um das Rauschen von einzelnen Pixels (single pixel shot noise) zu vermindern, wurde der Filter „à trous“ verwendet. Dieser Filter reduziert Rauschen abhängig von einer bestimmten Wellenlänge (Threshold). Er eignet sich, um blockartige Artefaktbildung nach der Filterung zu vermeiden. Zur Kontrolle der erfolgreichen Isolierung der mitochondrialen Rhod-2 Signale wurde die Fluoreszenz in ausgewählten Regionen (regions of interest, ROI) innerhalb eines Nukleus gemessen. Nach der „off-line“ Bearbeitung zur Filterung des mitochondrialen Signals war die Änderung der Fluoreszenz Intensität in absoluten Einheiten in diesem ROI gleich null. Das zeigt, dass die Isolierung des mitochondrialen Rhod-2 Signals erfolgreich war, da innerhalb des Nukleus keine Mitochondrien zu erwarten sind (Abb. 4.1.2, Ergebnisse). Änderungen der Fluoreszenz über die Zeit wurden in gefilterten ( $[Ca^{2+}]_m$ ) bzw. ungefilterten ( $Ca^{2+}]_c$ ) Maximum Intensitäts-Projektionen in Z-Achse aus manuell ausgewählten ROIs auf Mitochondrien oder Gruppen von Mitochondrien dargestellt.

Um die  $[Ca^{2+}]_m$  in Axonen und Dendriten von Bolus-Gefärbten Schnittkulturen zu evaluieren, wurde eine Projektion der maximalen Intensität zu allen Zeitpunkten einer Aufnahme berechnet. Das bedeutet, dass jeder helle Punkt der Position eines Mitochondriums zu einem bestimmten Zeitpunkt entspricht. Die mitochondriale Bewegung findet deutlich innerhalb der axonalen und dendritischen Strukturen statt. Das erlaubt die Festlegung von ROIs in Dendriten und Axonen

(Abb. 4.1.1). Die durchschnittliche Fluoreszenz Intensität der ROIs wird nach baseline Korrektur als  $\Delta F/F_0$  in Prozent dargestellt; wobei  $F_0$  die Durchschnitts Fluoreszenz der ersten 2 Minuten einer Aufnahme entspricht. Alle Daten sind als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SE= standard error) angegeben und kommen von mindestens drei verschiedenen Hirnschnitt-Kultur Präparationen pro Versuchsgruppe. Die statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) wurde durch den One-Way ANOVA (analysis of variance) mit Bonferroni's Posthoc-Test für Varianzanalysen ermittelt (73).

## 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wird CCE und seine nachgeschalteten zellulären Wirkungen in Pyramidenzellen der CA3 in hippocampalen Schnittkulturen untersucht. In CA3 sind pyramidale Neurone die Hauptpopulation (> 90%) (85). Um intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher zu entleeren, applizierten wir entweder ausschließlich  $\text{Ca}^{2+}$ -freies ACSF mit 0,5 mM EGTA und/oder Rezeptoragonisten wie Carbachol (cholinerge muskarinerge Rezeptoren) und Koffein, um die Entleerung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern zu forcieren. Zur Aktivierung von CCE wurde  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiges ACSF erneut zugeführt (73).

### 4.1 CCE in individuellen Pyramidenzellen

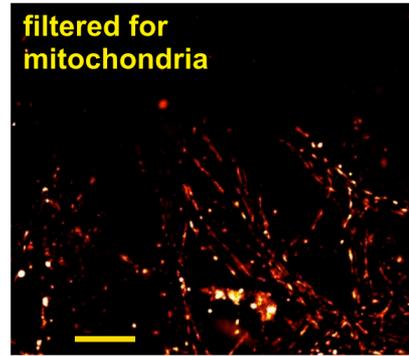
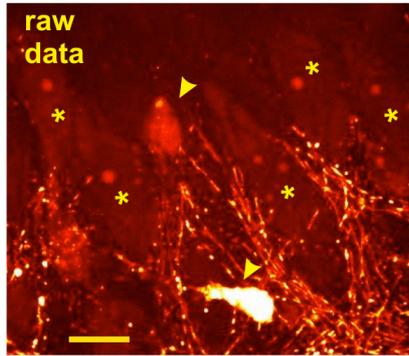
Um den intrazellulären Kalzium Einstrom, sowie Änderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Neuronen und Glia Zellen zu untersuchen und einen potentiellen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  in individuellen Mitochondrien zu detektieren, wurde ein Laser Spinning Disc Mikroskop mit hoher räumlicher Auflösung verwendet. Zur Darstellung der  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  wurde der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 2 AM (Rhod-2) verwendet (59;82). Um ein rein mitochondriales Signal zu isolieren, wurden die Rohdaten offline mit Filtern (FFT, Filter á trous) bearbeitet (siehe Methodik, Abb.4.1.1 A). Das Versuchsprotokoll ist wie in 4.1.1 B dargestellt. Eine initiale Phase von 200s mit Ca-ACSF, in der keine Applikation oder Veränderung erfolgte, diente zur Bestimmung einer Baseline. Darauf erfolgte die Umstellung der Perfusion von  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger ACSF (Ca-ACSF) auf  $\text{Ca}^{2+}$ -freies ACSF (0-Ca ACSF) mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator (0,5 mM EGTA). Nach sechs Minuten in 0-Ca ACSF wurde 100  $\mu\text{M}$  CCh über das Bad appliziert. Nach weiteren fünf Minuten erfolgte die Re-Applikation von Ca-ACSF. Nach insgesamt 20-25 Minuten wurde das Experiment beendet. Die Ergebnisse sind in den Abb. 4.1.1 B-E dargestellt. In Pyramidenzellen nimmt die basale  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  unter der 0-Ca ACSF Applikation ab ( $-17 \pm 1\%$  in 5 min,  $n = 57$  von 8 Kulturen). Diese Abnahme ist durch den Abfall der Rhod-2 Fluoreszenz dargestellt. Dieser Abfall war weniger deutlich in individuellen Mitochondrien (Abb. 4.1.1 B-D). Bei CCh Applikation steigt die Fluoreszenz von Rhod-2 an. Das entspricht neuronalen  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  Transienten durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus Speichern (Anstieg von  $10,3 \pm 2\%$ ,  $n = 36$  Zellen von 7 Kulturen) und  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  Transienten in individuellen Mitochondrien (Anstieg von  $30 \pm 16\%$ ,  $n = 96$  von 7 Kulturen). Die

Re-Applikation von Ca-ACSF hat CCE zur Folge. Dies zeigt sich durch einen deutlichen Anstieg der neuronalen  $[Ca^{2+}]_c$  ( $20 \pm 4\%$ ,  $n = 36$  von 7 Kulturen). CCE resultierte auch in Erhöhungen der  $[Ca^{2+}]_m$  ( $92 \pm 63\%$ ,  $n = 96$  von 7 Kulturen) mit einer Verzögerung von einigen Sekunden (83).  $[Ca^{2+}]_m$  Transienten während CCh Applikation waren weniger synchronisiert als  $[Ca^{2+}]_m$  Erhöhungen während CCE (Abb. 4.1.1.C). Um  $[Ca^{2+}]_m$  ausschließlich in neuronalen Mitochondrien von neuronalen Dendriten und Axonen im Stratum radiatum zu untersuchen, verwendeten wir die Bolus-Gabe eines Indikator-Farbstoff (Bolus stained, siehe Methodik). In dieser Untergruppe von Experimenten zeigten sich Erhöhungen von  $[Ca^{2+}]_m$  mit ähnlicher Amplitude und Kinetik während CCh Applikation ( $12,2 \pm 3,5\%$ ) und Re-Applikation von Ca-ACSF ( $18,9 \pm 4,9\%$ , Abb. 4.1.1 D). Ungefähr 52% der neuronalen Mitochondrien zeigten  $[Ca^{2+}]_m$  Transienten während CCh Applikation und/oder CCE (in  $n = 133$  Dendriten und Axonen von 6 Schnittkulturen). In Glia-Zellen zeigten sich ähnliche Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_c$  während der Gabe von 0-Ca ACSF ( $-23 \pm 4\%$ ), CCh Applikation ( $16 \pm 3\%$ ), und Re-Applikation von Ca-ACSF ( $49 \pm 9\%$ ,  $n = 60$  Zellen von 7 Kulturen).

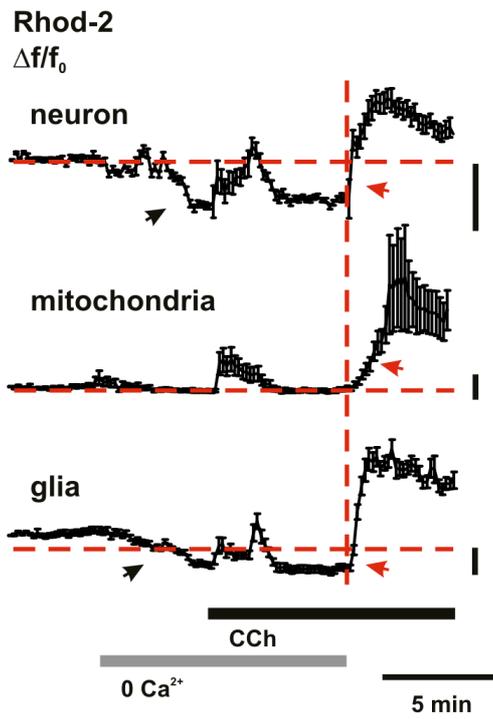
Pyramiden-Zellen wurden im hippocampalen Stratum radiatum mit der Patch-Clamp Technik untersucht (Richard Kovacs, persönliche Mitteilung, siehe (73), Abb. 4.1.2). In Pyramiden-Zellen führte 0-Ca ACSF zu einer transienten Depolarisation der Zell Membran, der eine komplette Repolarisation innerhalb von 5 min folgte. Zusätzliche Gabe von CCh induzierte eine stärkere Depolarisation die nach 32s einen Höhepunkt erreichte. Die Pyramiden Zellen zeigten ein depolarisiertes Plateau-Potential das sich langsam abbaute. Re-Applikation von Ca-ACSF resultierte trotz Anwesenheit von CCh in einer schnellen Repolarisation zurück zur baseline. „Voltage-Clamp“ Aufnahmen zeigten die Aktivierung eines nach innen gerichteten Stroms während CCh Applikation in 0-Ca ACSF. Dieser wurde von einem nach außen gerichteten Strom bei Re-Applikation von Ca-ACSF abgelöst. Zu bemerken ist, dass Re-Applikation von Ca-ACSF ohne vorherige Gabe von CCh nur kleine nach außen gerichtete Ströme und eine leichte Hyperpolarisierung induzierte (Richard Kovacs, persönliche Mitteilung, siehe (73)).

Diese Daten implizieren, dass CCE in hippocampalen Neuronen existiert (25;62;71;72;86). Weiterhin wird gezeigt, dass CCE in individuellen neuronalen Mitochondrien  $[Ca^{2+}]_m$  erhöht und abhängig von begleitender muskarinischer Rezeptor-Aktivierung die Erregbarkeit der neuronalen Zellmembran modulieren kann.

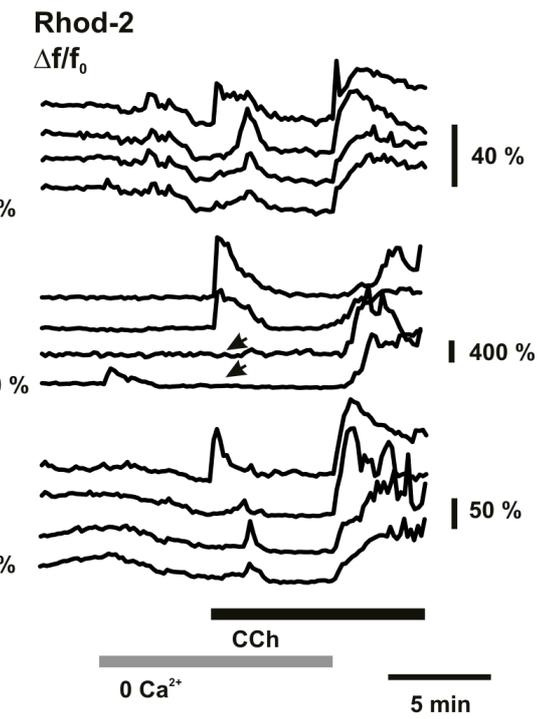
**A** Rhod-2



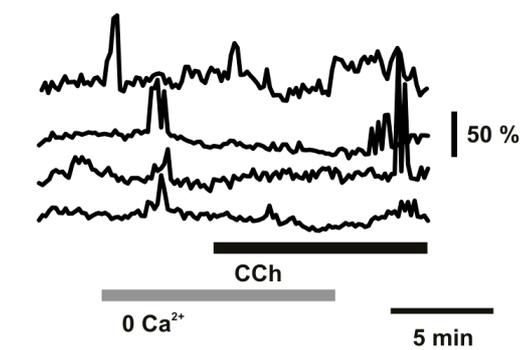
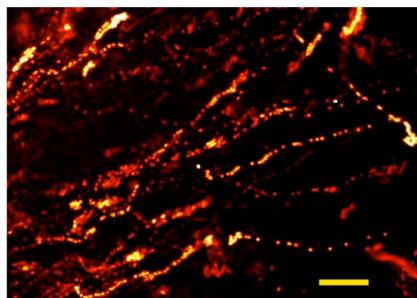
**B**



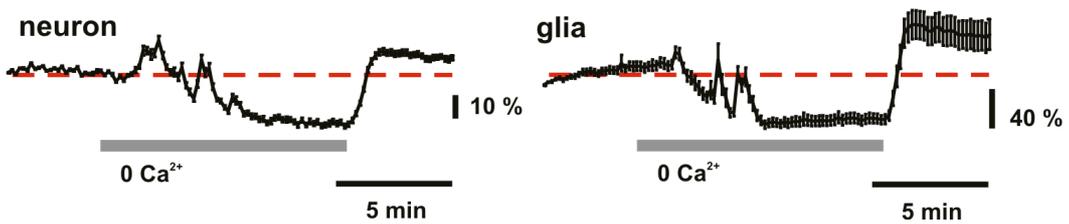
**C**



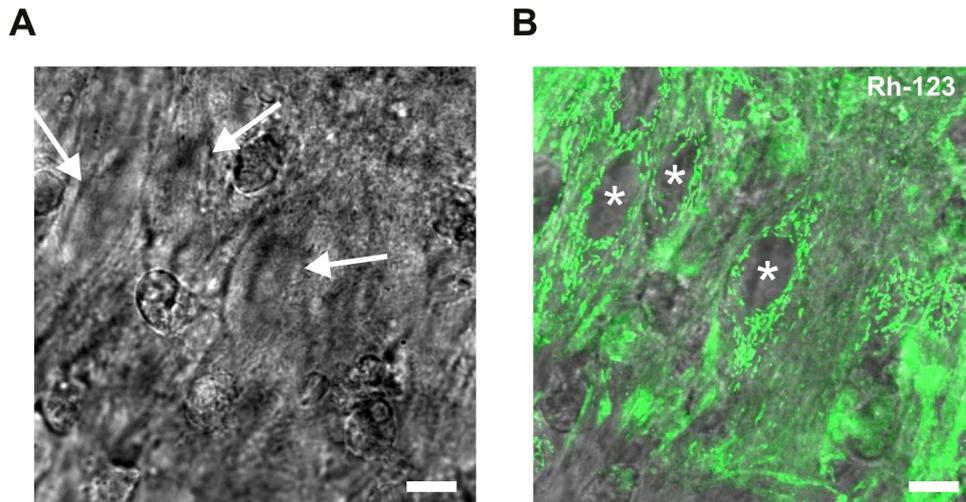
**D**



**E**



**Abb. 4.1.1 CCE und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von individuellen Mitochondrien in Hippokampalen Pyramiden- und Gliazellen.** Konfokale Fluoreszenz Bildgebung an lebendigen Zellen wurde in der hippocampalen CA3 angewendet, um  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  und  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  in Neuronen und Gliazellen zu differenzieren. Hirnschnitt-Kulturen wurden mit dem Farbstoff Rhod-2, der ein Indikator für mitochondriales Kalzium ist, „bulk-stained“. Eine Serie von Bildern (10-12, 0,6 bis 1  $\mu\text{M}$  Schritte) in verschiedener Tiefe wurden alle 10s gemacht und die Maximum Intensitäts-Projektionen wurden analysiert (siehe Methodik). **A** Rohbild (Maximum Intensitäts-Projektion) von Stratum pyramidale in dem dicht gepackte neuronale Zellkörper (Sternchen) und intensiv gefärbte Glia-Zellen (Pfeilspitzen) sowie Mitochondrien in beiden Zelltypen (links) zu sehen sind. Die Maximum Intensitäts-Projektion einer Z-Serie ist nach räumlicher Filterung auf Mitochondrien dargestellt (rechts). Die Maßstabsskala indiziert 10  $\mu\text{M}$ . **B** Rhod-2 Fluoreszenz Traces mit Standard-Fehler gemittelt von verschiedenen neuronalen Somata ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , n = 5, oberer Trace), Mitochondrien ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ , n = 30, mittlerer Trace) und glialen Zellkörpern ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , n = 16, unterer Trace) von einer repräsentativen Hirnschnitt-Kultur. Gabe von 0-Ca ACSF (0  $\text{Ca}^{2+}$ , hellgrauer Balken) resultierte in einem Abfall der neuronalen  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (oberer Trace, schwarzer Pfeil). Die Applikation von CCh (100  $\mu\text{M}$ , schwarzer Balken) induzierte einen Anstieg der neuronalen  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Re-Applikation von Ca-ACSF induzierte einen raschen Anstieg der neuronalen  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (roter Pfeil) der die Basislinie vor 0-Ca ACSF Gabe übersteigt und CCE widerspiegelt. Im Gegensatz dazu war der  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  Abfall in individuellen Mitochondrien bei Applikation von 0-Ca ACSF weniger ausgeprägt (mittlerer Trace). Der CCh induzierte  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  Transient und CCE resultierte jedoch in deutlichen Anstiegen der  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  in individuellen Mitochondrien (roter Pfeil). Zu bemerken ist, dass Erhöhungen in  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  während CCE langsamere Kinetiken hatte. Dies ist Zeichen einer Verzögerung in mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme. **C** Veränderungen der Rhod-2 Fluoreszenz in individuellen neuronalen- und glialen Zell-Körpern sowie Mitochondrien zeigten eine Variabilität in Amplitude und Kinetik. Zu beachten ist, dass Neuronen eher uniform (obere Traces) bei der Re-Applikation von Ca-ACSF reagierten. Die  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  Transienten in glialen Zellen (untere Traces) waren dagegen eher variierend und oszillierend während Re-Applikation von Ca-ACSF. CCh induzierte  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  Transienten (mittlere Traces) waren variabel und gelegentlich abwesend (schwarze Pfeile). **D** Färbung von individuellen Mitochondrien in Dendriten und Axonen abseits des Areal der Rhod-2 Bolus-Gabe (links) und Traces von  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  in axonalen und dendritischen Mitochondrien (rechts). Die Abbildung repräsentierte eine Maximum Intensitäts-Projektion von allen Zeitpunkten einer Aufnahme (20 min). Jeder helle Punkt entspricht der Position eines Mitochondriums zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die Bewegungsrichtung von Mitochondrien entspricht eindeutig dem Verlauf von Axonen und Dendriten. **E** Rhod-2 Fluoreszenz Traces gemittelt von neuronalen Somata (links) und glialen Zell-Körpern (rechts) während Gabe von 0-Ca ACSF (hellgrauer Balken) und Re-Applikation von Ca-ACSF. Zu beachten ist, dass trotz Abwesenheit einer zusätzlichen Entleerung der Speicher durch CCh, sowohl der Abfall der  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  als auch CCE zu detektieren sind

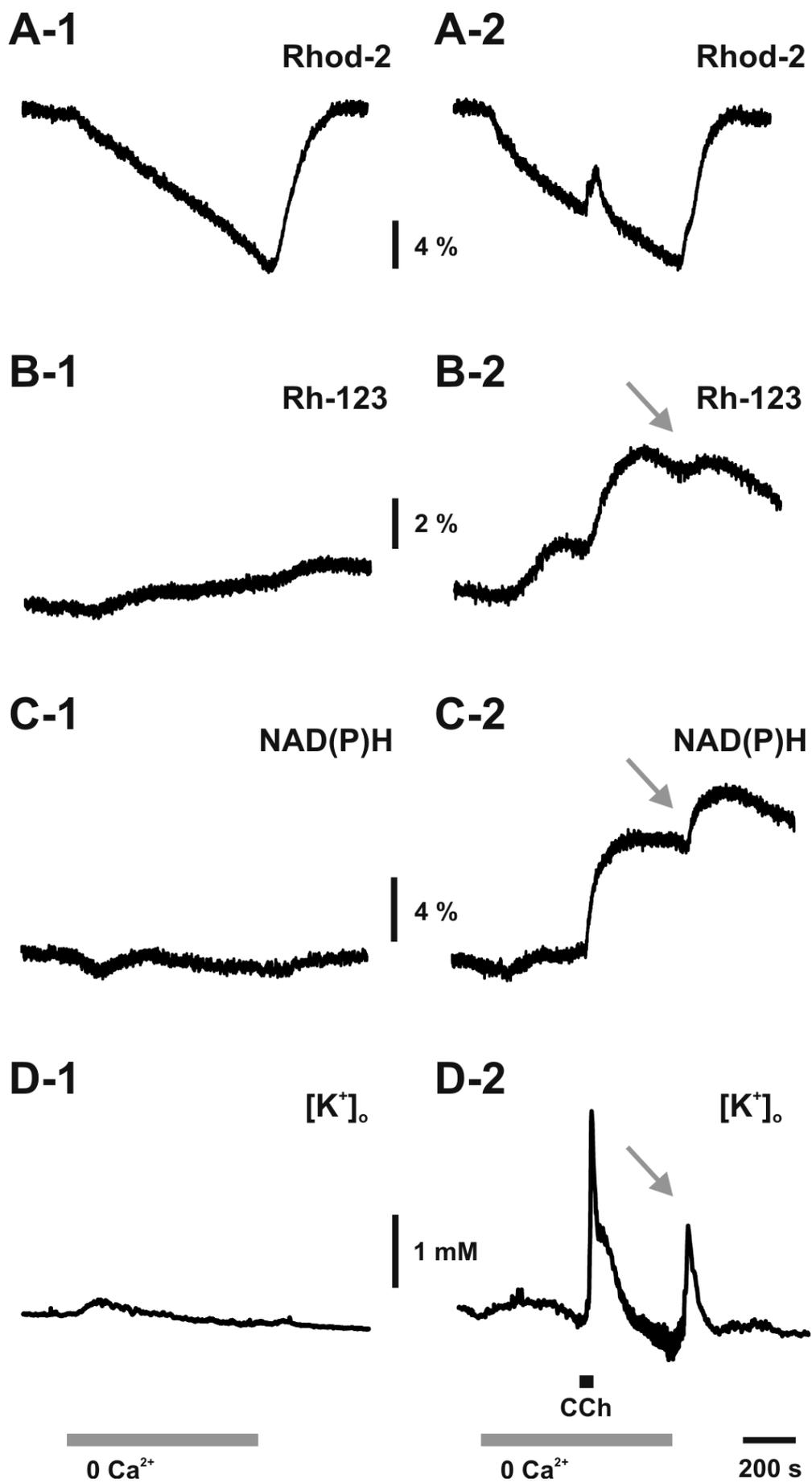


**Abb. 4.1.2 Effekte von CCE und begleitender muskarinischer Rezeptor-Aktivierung auf Erregbarkeit der neuronalen Zellmembran von Pyramidenzellen in CA3 in Hirnschnitt-Kulturen.** **A.** Pyramidenzellen (Pfeile) in Stratum pyramidale (Differential interference contrast microscopy (DIC) Bild), in dem neuronale Zellkörper dicht gepackt sind. Hier wurden die Versuche mit Patch-Clamp Technik durchgeführt (Richard Kovacs, persönliche Mitteilung, siehe (73)). Die Maßstabsskala indiziert  $10\mu\text{M}$ . **B** Bildüberlagerung mit einem konfokalen Fluoreszenzbild derselben Region wie in A gezeigt. Es wird die Vitalität und Intaktheit der oberflächlichen Zellschichten gezeigt wie auch die hervorragende Qualität der Färbungen für Mikrofluorimetrie. Pyramidenzellen wurden mit dem potentiometrischen Indikator Rh 123, der hochspezifisch für Mitochondrien ist, gefärbt. Zu beachten ist, dass sowohl individuelle Mitochondrien, als auch kleine Mitochondrien Anhäufungen zu sehen sind. In Pyramidalen Nuklei ist die Fluoreszenz abwesend (Sterne). Die Maßstabsskala indiziert  $10\mu\text{M}$ .

#### **4.2 CCE und muskarinische Rezeptoraktivierung: Zelluläre Effekte**

Um die Effekte von CCE auf die Erregbarkeit der neuronalen Zellmembran und mitochondriale Funktionen bei voller zellulärer Integrität zu untersuchen, wurden Photomultiplier basierte Mikrofluorimetrie und extrazelluläre Elektrophysiologische Aufnahmetechniken in CA3 kombiniert. Es wurde schon vorher gezeigt, dass dieser experimentelle Ansatz geeignet ist, um Langzeit-Aufnahmen durchzuführen ohne die Vitalität der Hirnschnitt-Kulturen signifikant zu beeinträchtigen (59). Die Signalverläufe der Fluoreszenz Parameter (Rhod-2, Rh 123, NAD(P)H) und  $[\text{K}^+]_o$  stellen integrierte Antworten von vielen Neuronen und Glia-Zellen dar. Rhod-2 Fluoreszenz Transienten stellen die Änderung sowohl der  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  dar, als auch die Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Es wird daher im Folgenden von intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gesprochen ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ).

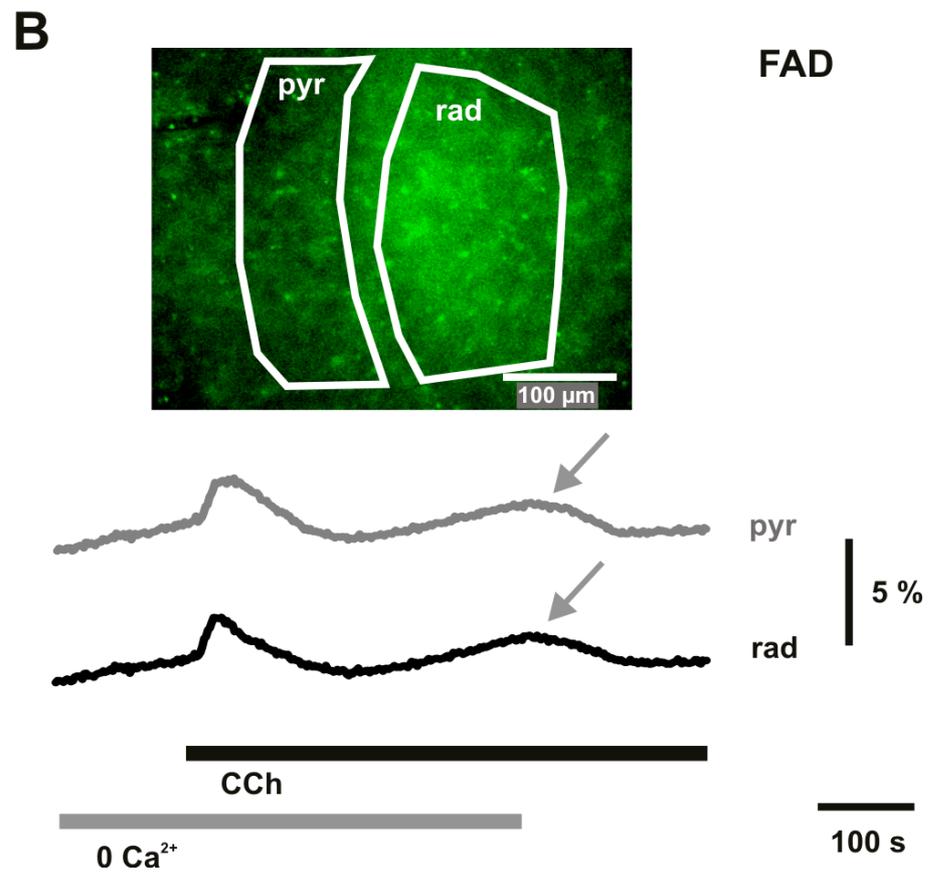
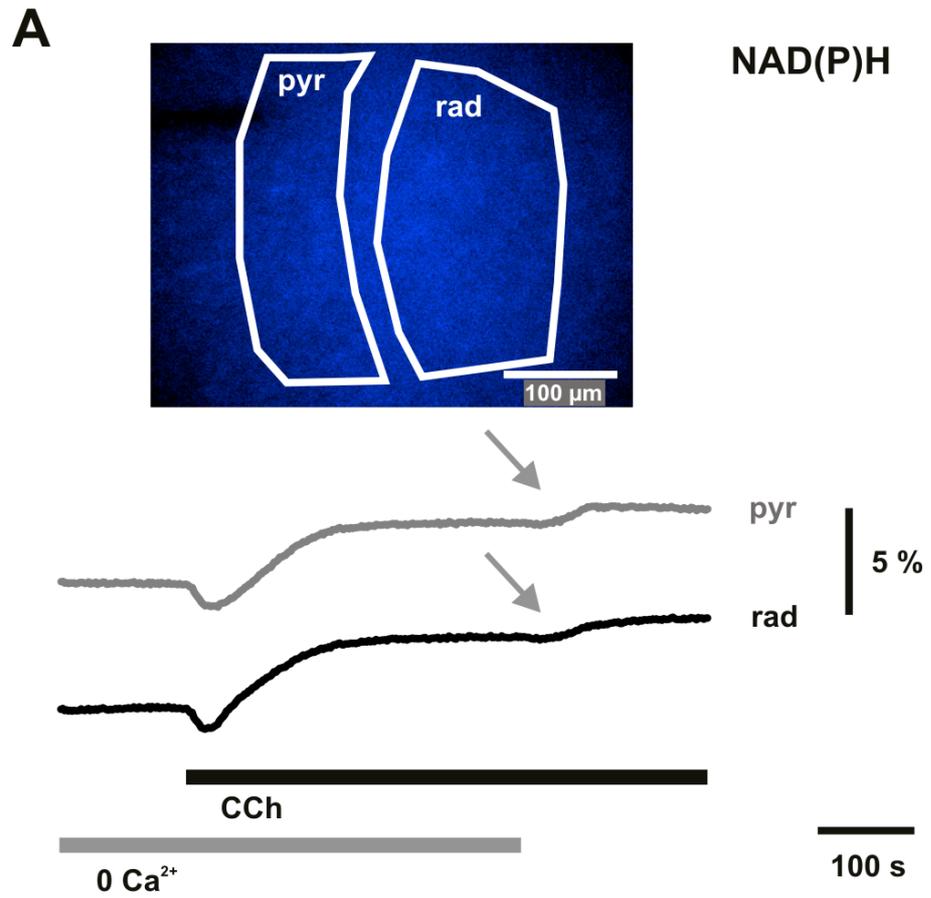
Die Messungen wurden am Photon Technology Instruments Imaging-System durchgeführt und sind in Abb. 4.2.1 dargestellt. Eine initiale Phase von 200s mit Ca-ACSF, in der keine Applikation oder Veränderung erfolgte, diente zur Bestimmung einer baseline. Es erfolgte die Umstellung der Perfusion von Ca-ACSF auf Calcium freies ACSF (0-Ca ACSF) mit einem Calcium Puffer (0,5 mM EGTA). Nach sechs Minuten in 0-Ca ACSF wurde 100  $\mu$ M CCh über das Bad appliziert. CCh ist ein muskarinischer cholinerges Agonist. Nach weiteren fünf Minuten erfolgte die Re-Applikation von Ca-ACSF. Nach 20-25 Minuten wurde die Messung beendet. In der Kontrollgruppe wurde kein CCh appliziert (linke Spalte in der Abb. 4.2.1). Ähnlich zu den Ergebnissen, die bei der konfokalen Laser Mikroskopie erzielt wurden, resultierte 0-Ca ACSF in einem nachhaltigen Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$ . Zusätzliche kurze Gaben von CCh waren assoziiert mit einer Freisetzung von Kalzium aus Speichern, die  $[Ca^{2+}]_i$  Transienten, mitochondriale Membran Depolarisation (Rh 123 Fluoreszenz), Änderungen im intrazellulären Redox-Zustand (FAD und NAD(P)H Fluoreszenz) und einen transienten Anstieg der  $[K^+]_o$  induzierten (Abb 4.2.1 B-D, rechts). Re-Applikation von Ca-ACSF resultierte in einem robusten CCE (Abb. 4.2.1, rechts; Amplitude des CCE:  $6,7 \pm 0,7\%$ , Zeit bis zum Maximum des CCE:  $117 \pm 7$  s, n = 10). Zu bemerken ist, dass CCE auch mitochondriale Membran Depolarisation, Änderungen des Redox-Zustandes und Anstieg des  $[K^+]_o$  auslöste (Abb. 4.2.1, B-D, rechts). Die Effekte werden auch durch den physiologischen Agonisten Acetylcholin (ACh), bei Anwesenheit des cholinergischen, nicotinischen Rezeptor Blocker Mecamylamin hervorgerufen (Abb. 4.3.2 und 4.3.3)(87).



**Abb. 4.2.1 Effekte von CCE auf mitochondriales Membranpotential, intrazellulären Redox-Zustand und  $[K^+]_o$  in CA3.** Die Aufnahmen wurden mit Mikrofluorimetrie durchgeführt. Die Applikation von 0-Ca ACSF ( $0 Ca^{2+}$ , hellgrauer Balken) resultierte in einem Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$  (Rhod-2 Fluoreszenz) (A1) und Re-Applikation von Ca-ACSF rief einen deutlichen CCE hervor. Die Effekte auf das mitochondriale Membranpotential (Rh-123 Fluoreszenz, Abb. B1), intrazellulären Redox-Zustand (NAD(P)H Fluoreszenz) und  $[K^+]_o$  waren nur moderat (B1-D1). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Re-Applikation von Ca-ACSF nach Gabe von CCh (CCh, 100  $\mu$ M, schwarzer Balken) eine deutliche mitochondriale Membran Depolarisation (Anstieg von Rh 123 Fluoreszenz), Änderungen im intrazellulären Redox-Zustand (kleiner Abfall und prominenter Anstieg in NAD(P)H Fluoreszenz) und ein Anstieg von  $[K^+]_o$  (B2-D2, rechte Pfeile). CCE zeigte ähnliche Amplitude und Kinetik wie ohne CCh Applikation (A1 und 2). Man beachte, dass die Gabe von CCh in 0Ca-ACSF (schwarzer Balken) in einer  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern resultiert (A2), die auch mit einer Änderung des mitochondrialen Membranpotentials, Redox-Zustand und  $[K^+]_o$  einhergeht. Für eine detaillierte Evaluation siehe Ergebnisse und Abb. 4.3.1

Um zu untersuchen, ob Unterschiede in der Fluoreszenz Antwort im Stratum pyramidale und im Stratum radiatum der CA3 existieren, verwendeten wir ein CCD Kamera basiertes Imaging System, das Olympus Cell<sup>R</sup> mit einer guten räumlichen Auflösung. Im Stratum radiatum verlaufen die Axonen, Dendriten und Synapsen (Synapsenkompartiment), im Stratum pyramidale liegen die Pyramidenzellen und Interneurone (Zellkörperkompartiment). Untersucht wurde die Auto-Fluoreszenz von NAD(P)H und FAD. Es zeigte sich das CCE ähnliche Änderungen im Redox-Zustand im Stratum pyramidale und Stratum radiatum induziert (Amplitude von NAD(P)H:  $0,48 \pm 0,15\%$  versus  $0,54 \pm 0,19\%$ , Amplitude von FAD:  $0,4 \pm 0,06\%$  versus  $0,25 \pm 0,06\%$ ,  $n = 4$ ,  $p > 0,05$ ). Diese Ergebnisse decken sich mit der weit verbreiteten Expression von muskarinischen Rezeptoren im Hippokampus (88) und können bedeuten, dass CCE in weiteren neuronalen Kompartimenten präsent ist.

Diese Daten zeigen, dass CCE assoziiert sein kann mit nachgeschalteten zellulären Effekten auf die mitochondriale Membran Depolarisation und Änderungen des intrazellulären Redox-Zustandes, die eine Antwort des Energie Metabolismus induzieren. Weiterhin zeigt sich ein Anstieg der  $[K^+]_o$ , der mit den Hyperpolarisierenden nach außen gerichteten Strömen in Neuronen verbunden sein kann.

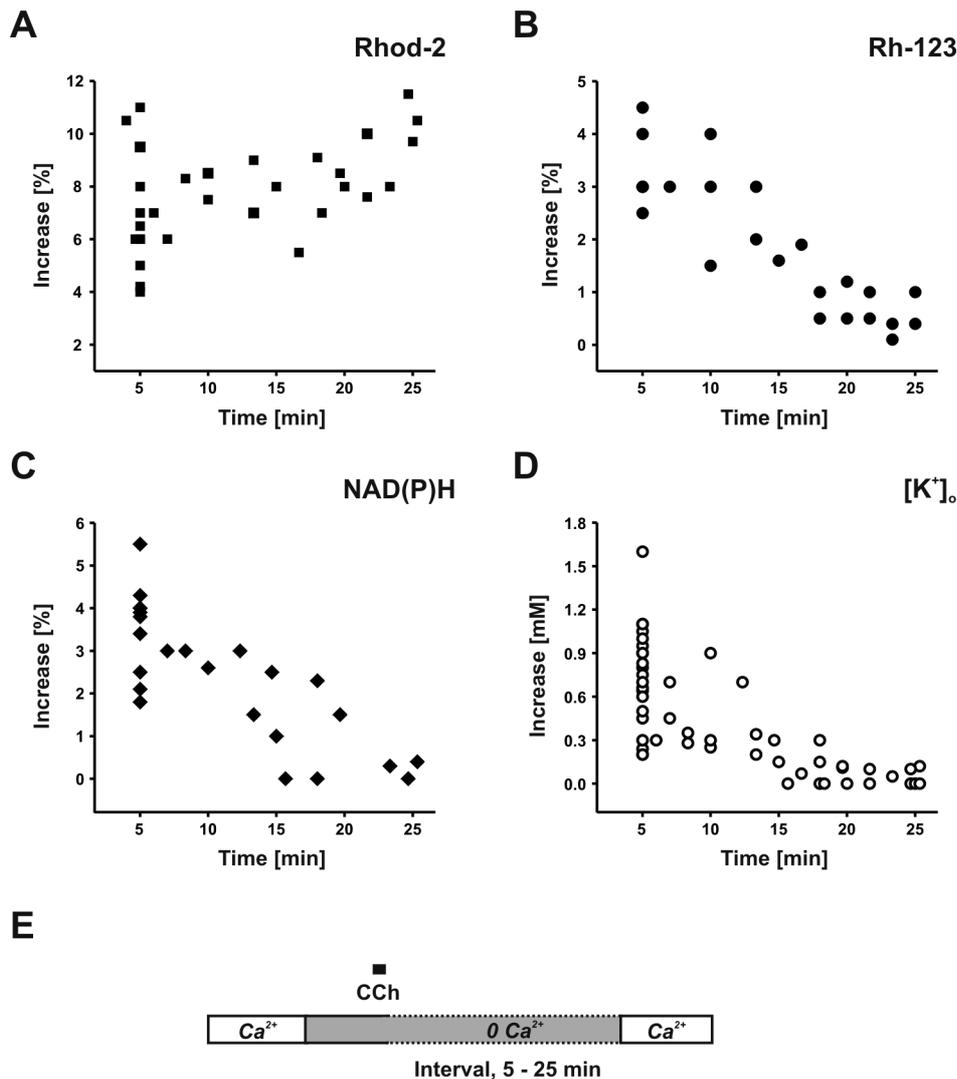


**Abb. 4.2.2 Effekte von CCE auf den intrazellulären Redox-Zustand in Stratum pyramidale und Stratum radiatum.** Paare von NAD(P)H und FAD Fluoreszenz Bildern wurden in der hippocampalen CA3 mit 0,5 Hz unter Verwendung einer CCD Kamera aufgenommen. Die Signalverläufe stellen Änderungen der Fluoreszenz aus zwei Regionen dar, Stratum pyramidale (pyr) und Stratum radiatum (rad). **A** Re-Applikation von Ca-ACSF in Anwesenheit von CCh (100 $\mu$ M, schwarzer Balken) resultierte in NAD(P)H Fluoreszenz Transienten (kleiner Abfall und deutlicher Anstieg, Pfeile) in Stratum pyramidale (grauer Trace) und Stratum radiatum (schwarzer Trace). **B** Re-Applikation von Ca-ACSF bei CCh Gabe (100 $\mu$ M, schwarzer Balken) resultierte in FAD Fluoreszenz Transienten (kleiner Anstieg, deutlicher Abfall, Pfeile) in Stratum pyramidale (grauer Trace) und Stratum radiatum (schwarzer Trace). Man beachte, dass sich die FAD und NAD(P)H Transienten aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften der Di-Nukleotide invers zueinander verhalten. Gabe von CCh in 0-Ca ACSF (schwarzer Balken) war mit deutlichen Änderungen des Redox-Zustandes (NAD(P)H und FAD Transienten) aufgrund von  $\text{Ca}^{2+}$ -Freigabe aus internen Speichern und Anstieg der  $[\text{K}^+]_o$  assoziiert (Abb. 4.2.1. A2 und D2)

### **4.3 CCE und muskarinische Rezeptor-Aktivierung: Pharmakologie**

Um die Rolle von muskarinischer Rezeptor-Aktivierung auf die nachgeschalteten zellulären Effekte von CCE in Pyramidenzellen weiter zu untersuchen, führten wir pharmakologische Manipulationen durch.

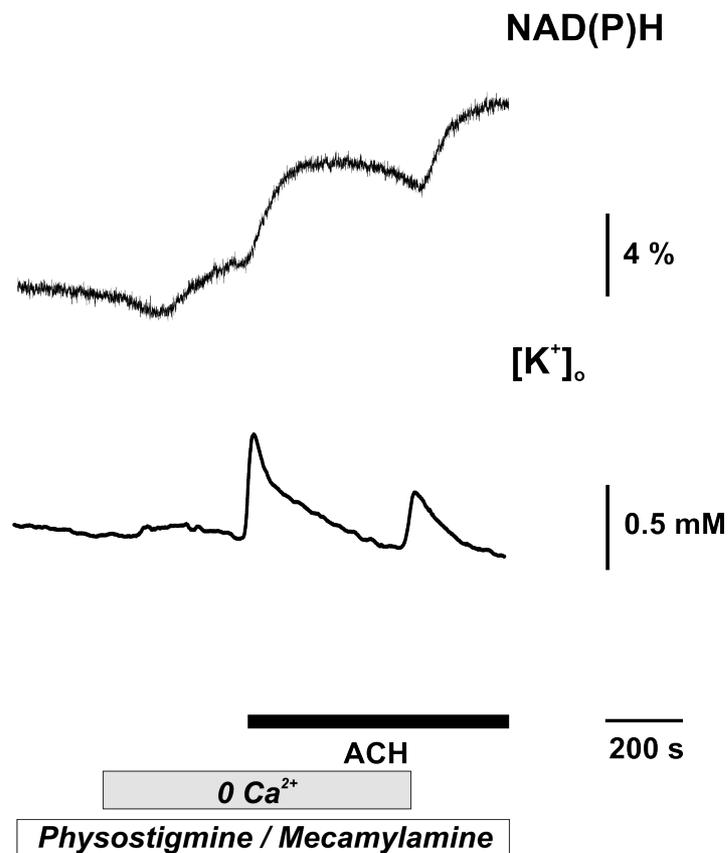
Das Intervall von 0-Ca ACSF Gabe bis zur Re-Applikation von Ca-ACSF wurde verlängert (Abb. 4.3.1 E). Es resultierte eine verstärkte Entleerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, was wiederum eine signifikant erhöhte Amplitude des CCE zur Folge hatte (Abb. 4.3.1 A;  $6,7 \pm 0,7$  % nach 5 min, n = 10 versus  $9,3 \pm 0,6$  % nach 20 min, n = 7, p < 0,05). Eine maximale Verlängerung des Intervalls führte zu komplettem Auswaschen von CCh und eventuell zu einer Aufhebung der nachgeschalteten intrazellulären Effekte (siehe Diskussion). Dies führte zu einer starken Suppression der Antworten aller anderen Parameter wie mitochondriales Membran-Potential, intrazellulärem Redox-Zustand und  $[\text{K}^+]_o$  (Abb. 4.3.1 B-D). Diese Experimente zeigen, dass die nachgeschalteten zellulären Effekte von CCE, die mit Erregbarkeit der neuronalen Zellmembran und mitochondrialen Funktionen assoziiert sind, von gleichzeitiger muskarinischer Rezeptor-Aktivierung abhängig sind. Darüber hinaus zeigen die Experimente, dass eine starke positive Korrelation zwischen mitochondrialer Membran Depolarisation, Änderungen des Redox-Zustandes und Anstieg der  $[\text{K}^+]_o$  besteht.



**Abb. 4.3.1 Effekte von CCE in Anwesenheit und nach auswaschen von CCh.** Die Aufnahmen wurden in der hippocampalen CA3 unter Verwendung von Mikrofluorimetrie gemacht. Die Zeit nach CCh Applikation (100 $\mu$ M, schwarzer Balken) bis zur Re-Applikation von Ca-ACSF wurde schrittweise von 5 bis 25 Minuten verlängert (gepunkteter grauer Balken, **E**). **A** Die Verlängerung des Intervalls verstärkte die Amplitude des CCE (Rhod-2 Fluoreszenz, n = 30). Im Gegensatz dazu wurde die Mitochondriale Membran Depolarisation (Rh 123 Fluoreszenz, n = 22), Änderungen des Redox-Zustandes (NAD(P)H Fluoreszenz, n = 22) und Anstieg der  $[K^+]_o$  (n = 46) nahezu vollständig supprimiert (**B-D**). Man beachte, dass der ähnliche Abfall der Antworten (B-D) impliziert, dass CCE muskarinische Rezeptor-Aktivierung benötigt um nachgeschaltete Veränderungen des mitochondrialen Membran-Potentials, Redox-Zustand und  $[K^+]_o$  zu initiieren.

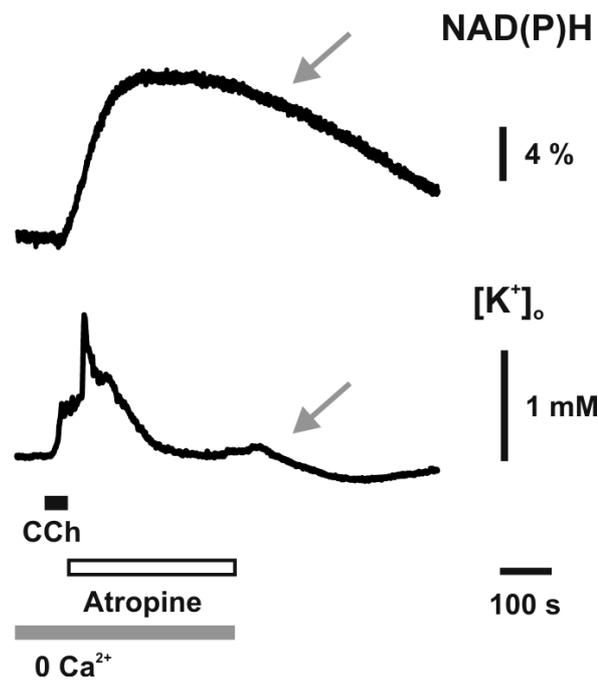
Weiterhin wurde der natürliche Agonist an muskarinischen Rezeptoren Acetylcholin (ACh) verwendet, um zu sehen, ob der beobachtete Effekt reproduzierbar ist (Abb 4.3.2). Während der gesamten Versuche waren Physostigmin (1 $\mu$ M) und Mecamylamin (20 $\mu$ M) anwesend. Physostigmin inhibiert ACh-Esterasen und macht dadurch den Effekt von ACh sichtbar.

Mecamylamin blockt nikotinische ACh-Rezeptoren und bewirkt damit eine Isolierung der muskarinischen Antwort. Nach der initialen 0-Ca ACSF Phase wurde ACh (50  $\mu\text{M}$ ) für eine Minute bzw. prolongiert über das Bad appliziert. Die NAD(P)H Autofluoreszenz und  $[\text{K}^+]_o$  Transienten konnten wie bei CCh reproduziert werden. Die Experimente zeigen, dass die nachgeschalteten zellulären Effekte von CCE, die mit Erregbarkeit der neuronalen Zellmembran und mitochondrialen Funktionen assoziiert sind, auch mit dem natürlichen Transmitter ACh reproduziert werden können.

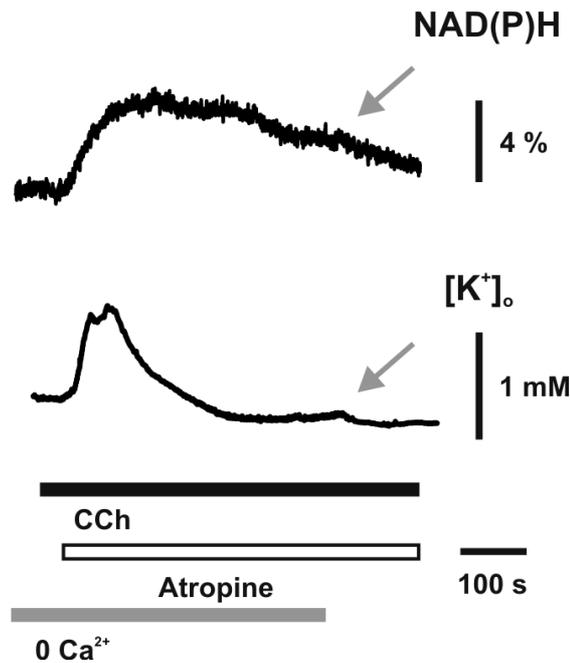


**Abb. 4.3.2 Die Effekte von CCE auf intrazellulären Redox-Zustand (NAD(P)H Fluoreszenz) und  $[\text{K}^+]_o$  persistieren wenn Acetylcholin (ACh, 50 $\mu\text{M}$ ) prolongiert anstatt Carbachol appliziert wird (n = 5).** Die Aufnahmen wurden in der CA3 unter Verwendung von Mikrofluorimetrie gemacht. Während der Experimente sind Physostigmin (1 $\mu\text{M}$ ) und Mecamylamin (20 $\mu\text{M}$ ) anwesend. Physostigmin inhibiert Acetylcholin-Esterasen und unterstützt den Acetylcholin-Effekt. Mecamylamin blockt nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren und bewirkt damit eine Isolierung der muskarinischen Antwort.

Die Abhängigkeit von begleitender muskarinischer Rezeptor-Aktivierung wurde noch weiter untersucht. Um zu prüfen, ob Atropin als cholinerges muskarinischer Antagonist den metabolischen Effekt von CCh oder Acetylcholin bei Re-Applikation von Ca-ACSF blockt, wurde direkt nach der CCh Applikation Atropin appliziert. Die nachgeschalteten zellulären Effekte von CCh auf intrazellulären Redox-Zustand und  $[K^+]_o$  wurden nahezu komplett supprimiert (Abb. 4.3.3 und 4.3.4)



**Abb. 4.3.3 Atropin (1 $\mu$ M) blockt die Carbachol (CCh, 100  $\mu$ M) induzierten nachgeschalteten zellulären Effekte von CCh. Atropin ist ein Antagonist von muskarinischen cholinergen Rezeptoren. Atropin blockt die Antworten signifikant sowohl für NAD(P)H als auch für  $[K^+]_o$  ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).**

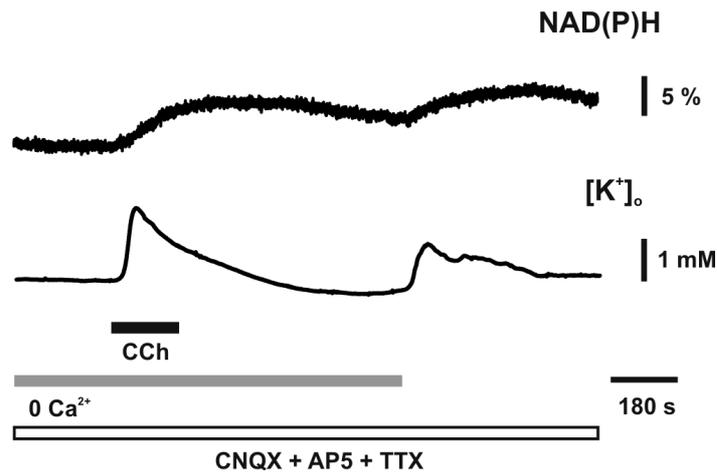


**Abb. 4.3.4 Atropin ( $1\mu\text{M}$ ) blockt auch bei verlängerter Carbachol (CCh,  $100\mu\text{M}$ ) Gabe die nachgeschalteten zellulären Effekte von CCE. Atropin blockt die Antworten signifikant, sowohl für NAD(P)H als auch für  $[K^+]_o$ , ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).**

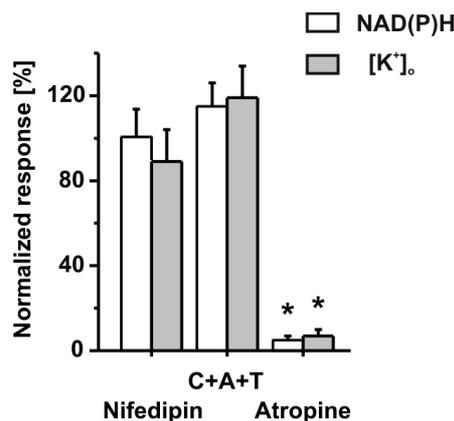
Um auszuschließen, dass neuronaler  $Ca^{2+}$ -Einstrom während Re-Applikation von Ca-ACSF durch spannungsgesteuerte Ionen-Kanäle und/oder ionotropische glutamaterge Rezeptoren vermittelt wurde, führten wir weitere Experimente unter Verwendung von Mikrofluorimetrie durch.

Über die Perfusion wurde während des gesamten Experiments Nifedipin ( $50\mu\text{M}$ ) oder TTX ( $1\mu\text{M}$ ), CNQX, ( $30\mu\text{M}$ ) und AP5 ( $30\mu\text{M}$ ) appliziert. Die Effekte von SOCE auf den intrazellulären Redox-Zustand und  $[K^+]_o$  persistierten bei Anwesenheit von Inhibitoren von L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanälen (Nifedipin), ionotropen glutamatergen Rezeptoren (CNQX, AP5) und spannungsgesteuerten  $Na^+$ -Kanälen (TTX) (siehe Abb. 4.3.5 und 4.3.6) (25;72;89).

Die Resultate implizieren das spannungs- und Rezeptor-gesteuerter  $Ca^{2+}$ -Einstrom nicht zu den nachgeschalteten zellulären Effekte von CCE bei Anwesenheit von Carbachol beitragen.



**Abb. 4.3.5** Die Effekte von CCE auf den intrazellulären Redox-Zustand und  $[K^+]_o$  persistieren trotz Anwesenheit von TTX, CNQX und APV. Die Aufnahmen wurden unter Verwendung von Mikrofluorimetrie in der hippocampalen CA3 durchgeführt. Während des Versuches waren CNQX ( $30\mu\text{M}$ ), AP5 ( $30\mu\text{M}$ ) und TTX ( $1\mu\text{M}$ ) anwesend (weißer Balken, Carbachol  $100\mu\text{M}$ , schwarzer Balken,  $n = 6$ ).



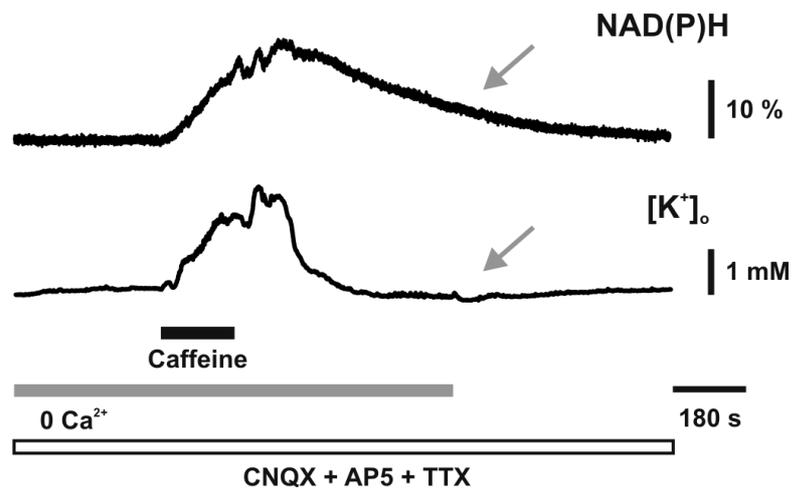
**Abb. 4.3.6** Die Effekte von CCE auf den intrazellulären Redox-Zustand und  $[K^+]_o$  persistieren trotz Anwesenheit von Nifedipin oder TTX, CNQX und AP5. Bei Applikation von Atropin sind sie signifikant unterdrückt (Sternchen). Die Aufnahmen wurden unter Verwendung von Mikrofluorimetrie in der hippocampalen CA3 durchgeführt. Während der Versuche war ein L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal Blocker (Nifedipin,  $50\mu\text{M}$ ,  $n = 6$ ) oder CNQX ( $30\mu\text{M}$ ), AP5 ( $30\mu\text{M}$ ) und TTX ( $1\mu\text{M}$ ) anwesend ( $n = 6$ ).

#### **4.4 CCE ohne muskarinische Rezeptor-Aktivierung**

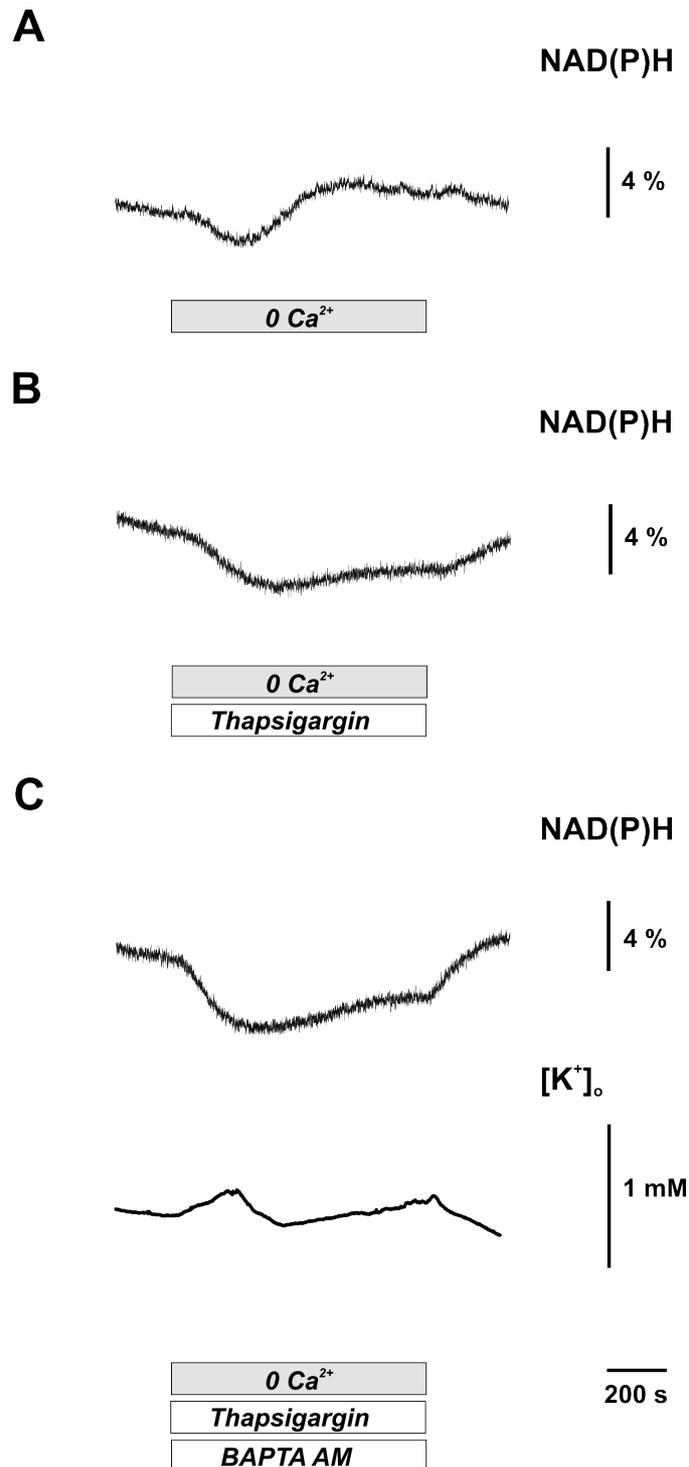
Weiterhin wurde untersucht, inwiefern die oben beschriebenen nachgeschalteten zellulären Effekte von CCE auftreten, wenn CCE durch andere pharmakologische Aktivatoren bei Abwesenheit von Carbachol initiiert wird. Es wurde Koffein, das  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus Ryanodin-Sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern triggert, appliziert. Weiterhin wurde ein intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator (BAPTA-AM) in Kombination mit einem Sesquiterpen-Lakton Thapsigargin, welches ein irreversibler, nicht-kompetitiver SERCA-Inhibitor ist verwendet. Koffein und Thapsigargin wurden als starke Aktivatoren von CCE in hippokampalen Neuronen beschrieben (25;72;90).

Die Re-Applikation von Ca-ACSF resultierte in CCE mit ähnlicher Amplitude und Kinetik. Diese Ergebnisse waren unabhängig von der Art der vorhergehenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher Entleerung z.B. 0-Ca ACSF (Abb. 4.1.2 E, Abb. 4.2.1 A; Amplitude von CCE:  $7,5 \pm 1,2\%$ , Zeit bis zum Maximum CCE:  $113 \pm 5$  s, n = 7), 0-Ca ACSF und Koffein (Abb. 4.4.1; Amplitude von CCE:  $7,4 \pm 0,8\%$ , Zeit bis zum Maximum CCE:  $118 \pm 8$  s, n = 8) oder 0-Ca ACSF mit BAPTA-AM und Thapsigargin (Abb. 4.4.2; Amplitude von CCE:  $6,4 \pm 2,2\%$ , Zeit bis zum Maximum CCE:  $115 \pm 17$  s, n = 5;  $p > 0,05$ , nicht gezeigt).

Zu beachten ist, dass in all diesen Experimenten ausgeprägter CCE nur schwache und langsame Änderungen der nachgeschalteten zellulären Effekte in mitochondrialem Membranpotential, intrazellulärem Redox-Zustand und  $[\text{K}^+]_o$  (Abb.4.4.1 und 2, Abb. 2.1 A1-D1) induzierte. Diese Daten stützen die These, dass nachgeschaltete zellulären Effekte von CCE, insofern sie mit Erregbarkeit der neuronalen Zellmembran und mitochondrialen Funktionen assoziiert sind, begleitende muskarinische Rezeptor-Aktivierung benötigen.



**Abb. 4.4.1 Re-Applikation von Ca-ACSF nach 0-Ca ACSF und Koffein Gabe resultierte in deutlichem CCE (Rhod-2 nicht gezeigt). Die Anstiege von NAD(P)H und [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> waren abwesend (Pfeile).** Die Aufnahmen wurden unter Verwendung von Mikrofluorimetrie in der hippocampalen CA3 durchgeführt. Während des Versuches waren CNQX (30µM), AP5 (30µM) und TTX (1µM) anwesend (weißer Balken) und Koffein (Caffeine, 20mM, schwarzer Balken, n = 8). Die Anstiege von NAD(P)H Fluoreszenz ( $0,6 \pm 0,4 \%$ , n = 8) und [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> ( $0,1 \pm 0,05 \text{ mM}$ , n = 8) waren abwesend (Vergleiche Abb. 4.3.6). Man beachte, dass Koffein massiven Ca<sup>2+</sup>-Ausstrom aus Ryanodin-Sensitiven Speicher induzierte. Das spiegelt sich in den oszillierenden NAD(P)H und [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> Transienten wider.



**Abb. 4.4.2 Abwesenheit der Effekte auf intrazellulären Redox-Zustand und [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>, wenn CCE durch Thapsigargin oder/und BAPTA-AM initiiert wird.** Die Aufnahmen wurden unter Verwendung von Mikrofluorimetrie in der hippocampalen CA3 gemacht. Re-Applikation von Ca-ACSF nach **A** O-Ca ACSF (0 Ca<sup>2+</sup>, grauer Balken), oder **B** in Kombination mit SERCA-Pumpen Inhibitor, Thapsigargin (1 μM, weißer Balken), oder **C** Thapsigargin und zusätzlich ein intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Chelator, BAPTA-AM (50 μM, weißer Balken) resultierte in einem ausgeprägten CCE (Rhod-2, nicht gezeigt) aber nur in kleinen und langsamen Baseline Schwankungen von NAD(P)H Fluoreszenz und [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass CCE in hippokampalen Pyramidenzellen präsent ist und in Änderungen der mitochondrialen Kalzium Konzentration in individuellen Neuronen resultiert. CCE verursacht einen Anstieg der  $[K^+]_o$ . Weiterhin induziert CCE mitochondriale Membran Depolarisation und Änderungen des intrazellulären Redox-Zustandes, die Antworten des Energie Metabolismus widerspiegeln. Bemerkenswert ist, dass diese nachgeschalteten zellulären Effekte von der Anwesenheit muskarinischer Rezeptor Aktivierung abhängig sind.

### 5.1 Organotypische hippokampale Hirnschnitt-Kulturen

Um die nachgeschalteten zellulären Wirkungen von CCE in hippokampalen Pyramidenzellen zu untersuchen, werden in dieser Arbeit organotypische hippokampale Hirnschnitt-Kulturen verwendet. Diese Hirnschnitt-Kulturen reifen in Vitro und behalten synaptische Komponenten wie exprimierte glutamaterge und cholinerge muskarinische Rezeptoren. Diese sind ähnlich zu hippokampalem Gewebe in Vivo (88;91). Bedeutsam ist, dass sich die Neuronen in dieser Präparation in ihrer natürlichen Umgebung in einem drei-dimensionalen Raum, in Anwesenheit von Gliazellen und unter normoxischer Atmosphäre (Methodik) entwickeln. Dies ist von Bedeutung, um mitochondriale Funktionen zu untersuchen. Es wurde gezeigt, dass organotypische Hirnschnitt-Kulturen aufgrund ihrer reduzierten Dicke (10-12 Zellschichten) unter normoxischen Verhältnissen (20 % O<sub>2</sub>) Po<sub>2</sub> Werte von 67 mmHg in der Hirnschnitt-Kultur aufweisen (92). Dies entspricht Werten die in Vivo unter normoxischen Bedingungen in Gehirnen von Ratten gemessen wurden (7). Mitochondrien sind in Vivo in Somata, Dendriten und Axonen von neuronalen Zellen im gesamten Hippokampus und Gyrus Dentatus zu finden (7).

Es wurden extrazelluläre elektrophysiologische und intrazelluläre NAD(P)H und FAD Fluoreszenz Aufnahme-Techniken kombiniert. Das erlaubte, die volle zelluläre Integrität der Neuronen zu erhalten und die Störung des intrazellulären Milieus (künstliche Intrazelluläre Lösungen, Fluoreszenz Indikatoren) in vielen Experimenten zu minimieren. Demzufolge zeigt diese Arbeit Daten zu den nachgeschalteten zellulären Effekten von CCE in zentralen Neuronen auf einem hohen Niveau von struktureller und physiologischer Zell- und Gewebe-Integrität (59;62).

## 5.2 Nachgeschaltete zelluläre Effekte von CCE

Es wurde der  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Rhod-2 und Fluoreszenz Bildgebung mit hoher räumlicher Auflösung verwendet, um Änderungen der neuronalen und glialen  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  und  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  in individuellen Neuronen zu untersuchen (Abb. 4.1.1 und 4.1.2). Mitochondrienspezifische fluoreszenderende  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelat-Bildner (Komplexverbindungen) wie Rhod-2 sind in ihrer membrangängigen Form positiv geladene Acetoxymethyl-Ester. Aus diesem Grund akkumulieren sie in den negativ geladenen Mitochondrien. Nach der enzymatischen Abspaltung der Estherbindung wird der Farbstoff fluoreszierend und kann nicht mehr aus den Organellen heraus perfundieren. Ein Teil des Farbstoffs wird jedoch auch schon im Zytosol von der Esthergruppe abgespalten, weshalb ein Teil der Fluoreszenzantwort die  $[\text{Ca}^{2+}]$  des Zytosols reflektiert. Der Zytosolische Teil der Fluoreszenzantwort kann jedoch durch sorgfältige Ladeprotokolle auf ca. 25% Restsignal minimiert werden (59). Das bedeutet, dass in den Experimenten überwiegend  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  registriert wurde. Eine weitere Option für die Diskrimination zwischen zytosolischem und mitochondrialen Kalzium ist die Anwendung von „spatial frequency filtering“ (Raumfrequenz Filter Techniken) der Fluoreszenzbilder. Diese Technik wurde bei den Konfokalen Laser Spinning Disc Mikroskop Experimenten angewendet. Die meisten Informationen zu CCE und mitochondrialen Eigenschaften sind von dissoziierten Zellkulturen. Es gibt wenig Informationen über CCE und die physiologischen Konsequenzen in intaktem neuronalen Gewebe (7). CCE konnte in diesem Experiment bis auf mitochondriale Ebene in einem komplexen neuronalen Gewebe gezeigt werden. Mit dieser Herangehensweise wird bestätigt, dass CCE in hippokampalen Pyramidenzellen präsent ist (25;62;71;72;86). Darüber hinaus wird gezeigt, dass CCE, zumindest in einer Sub-Population von Mitochondrien in Dendriten und Axonen, in Transienten der  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  resultieren kann. Diese Beobachtung für neuronale Mitochondrien deckt sich mit Berichten über andere Zell-Typen (93;94). Die Tatsache, dass nur eine Unterpopulation von Mitochondrien in den Experimenten reagiert hat, könnte eine Limitierung der Methodischen Ansätze widerspiegeln. Zum Einen bei der Färbung und Aufnahme von sich bewegenden Mitochondrien, zum Anderen die physiologische Variabilität von Mikrodomänen mit hoher  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , denen Mitochondrien ausgesetzt sind. Diese Mikrodomänen mit hoher  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  könnten bei CCE im Vergleich zu zum Beispiel  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom während Aktions-Potentialen zu einem geringeren Grad vorkommen (93). Die Ergebnisse erweitern das Konzept der mitochondrialen Beteiligung bei der Regulierung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase während CCE in Neuronen (95).

Für pharmakologische Experimente wurde Photomultiplier-Basierte Mikrofluorimetrie verwendet (Abb. 4.2.1 A und 4.3.1). Dadurch konnte die Variabilität von neuronalen  $[Ca^{2+}]_m$  Transienten beseitigt werden und das Verhältnis von Signal-Rauschen (signal-to-noise ratio) verbessert werden. Dieser zweite Ansatz zeigte, dass CCE (in diesen Experimenten durch  $[Ca^{2+}]_i$  dargestellt, siehe unten) durch ein verlängertes Intervall von 0-CA ACSF Gabe intensiviert wird (Abb. 4.3.1 A). Es wurden anschauliche Erkenntnisse gewonnen über die zeitlichen Zusammenhänge von CCE und Änderungen des mitochondrialen Membran-Potentials, intrazellulärem Redox-Zustand und  $[K^+]_o$ . Dieser zweite Ansatz erlaubt es jedoch nicht, exakt zwischen zytosolischer, mitochondrialer, neuronaler und glialer Fluoreszenz-Fraktion zu diskriminieren, da Rhod-2 partiell im neuronalen Zytosol zurückbleibt und auch von Glia-Zellen aufgenommen wird (siehe oben, Abb. 4.1.1).

Unter Verwendung unterschiedlicher pharmakologischer Manipulationen (Zeitintervall bis Carbachol Auswaschung, Carbachol in Anwesenheit von Atropin, Thapsigargin und BAPTA-AM, Koffein etc.) wurde gezeigt, dass CCE an sich nur in schwachen Änderungen des mitochondrialen Membran Potentials, des intrazellulären Redox-Zustandes und  $[K^+]_o$  resultiert (Abb. 4.2.1 B1-D1; Abb. 4.3.1, > 20 min; Abb. 4.3.3; Abb. 4.3.4; Abb. 4.3.6; Abb. 4.4.1; Abb.4.4.2). Um Änderungen in der mitochondrialen Membrandepolarisation zu detektieren, werden kationische membranpermeable Fluoreszenzfarbstoffe wie Rh 123 verwendet. Sie zeigen eine Nernstsche Verteilung an der polarisierten inneren Mitochondrienmembran und akkumulieren in der Matrix. Wenn die Farbstoffkonzentrationen im Färbe-Bad im  $\mu$ -Molaren Bereich liegen, akkumulieren die Mitochondrien ein 3 bis 4 Fach höheres der Konzentration das zu einem „self-quenching“ (selbst Unterdrückung) der Fluoreszenz führt (96;97). Eine Depolarisation der Mitochondrien triggert einen Ausstrom des kationischen Farbstoffes und ein „unquenching“ (Aufhebung der Unterdrückung) der Fluoreszenz mit einem folglich resultierenden netto Anstieg der Fluoreszenz als Indikator der Depolarisierung (98). Das Rh 123 „bulk-loading“ (kurze Färbungszeiten (loading) mit hohen Konzentrationen an Farbstoff) Protokoll garantiert eine hohe mitochondriale Konzentration von RH 123 gegenüber dem Zytosol und dem sehr kleinen Extrazellularraum (99). Im konfokalen Laser Spinning Disc Mikroskop zeigt sich nach bulk-loading eine starke Rh 123 Fluoreszenz in den Mitochondrien und ein sehr schwaches Signal im Zytosol (7) (Abb.4.1.2). Das bedeutet, dass der Fluoreszenz Anstieg von Rh 123 eine signifikante Depolarisation der Mitochondrien widerspiegelt und der zytosolische Anteil der Fluoreszenz zu vernachlässigen ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass CCE in Neuronen (und in Abwesenheit von muskarinischer Rezeptor-Aktivierung) mit kleinen Energie-Anforderungen einhergeht, um die intrazellulären

Ca<sup>2+</sup>-Speicher wieder aufzufüllen. Die Daten weisen auch darauf hin, dass mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme während CCE nicht in signifikanter Stimulation der Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Enzyme des TCA resultiert. Besonders erwähnenswert ist, dass sich diese Ergebnisse von Experimentellen Bedingungen, in denen neuronale Aktivierung durch Applikation von hochkonzentrierter K<sup>+</sup>-Lösung oder Transmittern unter Anwesenheit von externem Kalzium induziert wurde, unterscheiden. Insofern erweitern diese Ergebnisse das aktuelle Wissen über die Rolle von Ca<sup>2+</sup>-Ionen bei der Regulation des Energie Metabolismus (7).

Wichtig ist, dass in dieser Arbeit detaillierte Beweise beschrieben sind, die zeigen, dass CCE in Anwesenheit von Carbachol (oder Acetylcholin) in substantieller mitochondrialer Membran Depolarisation, Änderungen des intrazellulären Redox-Zustandes und transienten Anstiegen der [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> resultiert (Abb. 4.2.1 B2-D2; Abb. 4.3.1 B-D, < 20 min; Abb. 4.3.2). Weiterhin wird gezeigt, dass mitochondriale Membran Depolarisation, Änderungen des intrazellulären Redox-Zustandes und Anstieg der [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> eine enge Korrelation besitzen (Abb. 4.3.1 B-D). Neuronale Aktivität verursacht Anstiege der Konzentration von Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> und Cl<sup>-</sup> im neuronalen Cytosol und einen Anstieg der Konzentration von Kalium im extrazellulären Raum (100). Erhöhungen der [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> werden von ATPasen und der Kalium-Puffer Kapazität der Astrozyten ausgeglichen. Während physiologischer neuronaler Aktivität in Vivo können Kalium Erhöhungen von bis zu 2-3 mM über dem basalen Niveau registriert werden (101;102). Die elektrophysiologische Registrierung der [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> kann als akkurater Parameter genutzt werden, um den induzierten Aktivierungsgrad von Neuronen in Hirnschnitt-Kulturen zu beurteilen (67;103). Die aktuelle Interpretation dieser Beobachtungen ist folgende: CCE und begleitende muskarinische Rezeptor-Aktivierung sind mit einer Aktivierung eines nach außen gerichteten Kalium-Stroms, der zu einem Anstieg der [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> (Abb. 4.2.1 D2; Abb. 4.3.1 D) führt, assoziiert. In Patch-Clamp Experimenten in Pyramidenzellen führt CCE und begleitende muskarinische Rezeptor-Aktivierung ebenfalls zu einer Aktivierung von nach außen gerichteten Kalium Strömen (persönliche Mitteilung Dr. Kovacs, (73)). Diese Ionen Ströme aktivieren Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen und gleichzeitigen Abbau von ATP (Änderung der ADP/ATP Quotienten). Sowohl CCE mit nachfolgender mitochondrialer Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme als auch Änderungen des ADP/ATP Quotienten mit nachfolgender Aktivierung der Adenin-Nukleotid Translokase, führen zu einer gesteigerten Aktivität der Elektronentransportkette und des Citratzyklus. Diese Antworten des Energie Metabolismus zeigen sich in der mitochondrialen Membran Depolarisation und Änderungen des intrazellulären Redox-Zustandes (7;104). Die Änderungen des intrazellulären Redox-Zustandes wurden durch Fluoreszenz Aufnahmen von NAD(P)H und FAD ermittelt (Abb. 4.2.1 B2-D2). Der Elektronentransport der Flavoprotein und  $\alpha$ -Lipoamid Dehydrogenasen macht ungefähr

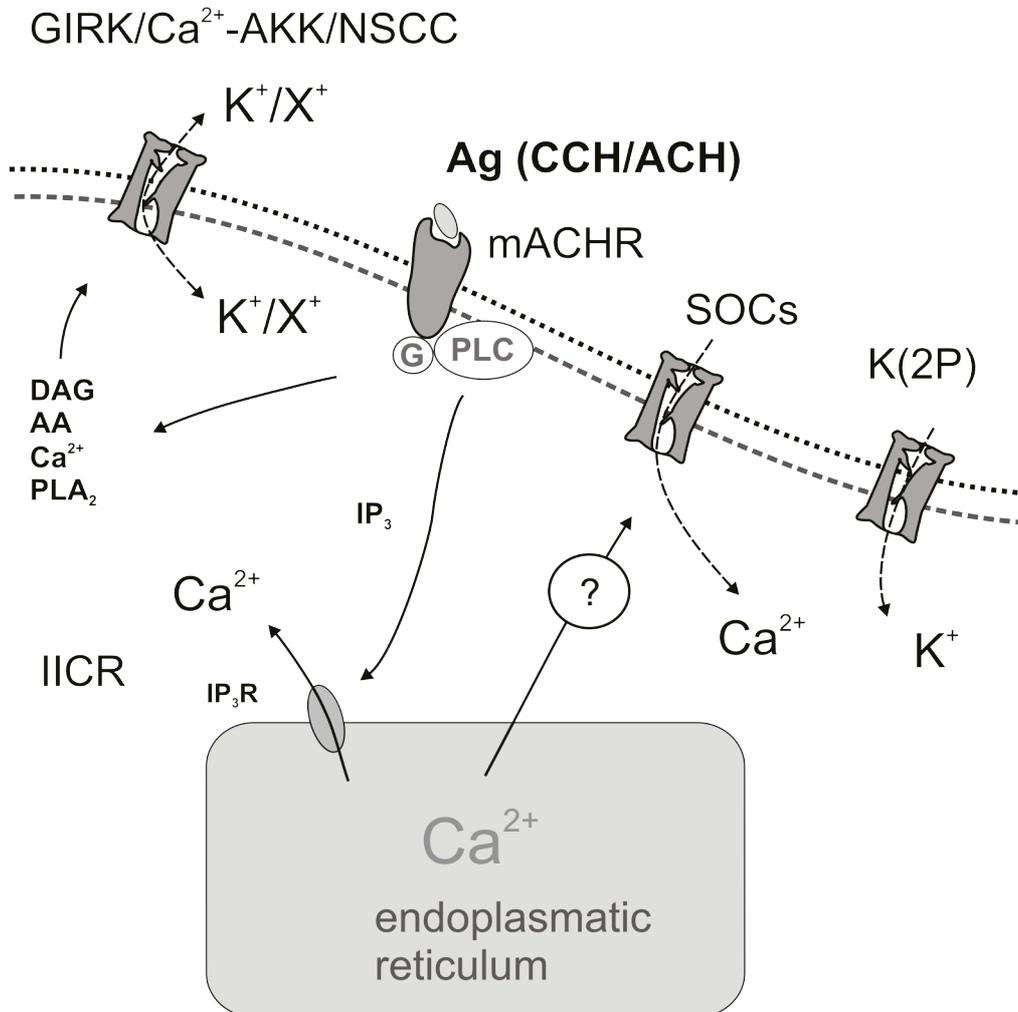
75% der Flavin Fluoreszenz in Neuronen aus (105;106). NAD(P)H, und insbesondere FAD, eignen sich daher sehr gut, um mitochondriale Aktivität zu registrieren. NAD(P)H Fluoreszenz in Organotypischen hippocampalen Hirnschnitt-Kulturen ist von mitochondrialer Aktivität der Elektronentransportkette und des Citratzyklus bestimmt (7). Unter bestimmten Bedingungen kann sie auch durch extra-mitochondriale Signaltransduktion und antioxidative Prozesse, in denen NAD(P)H als Co-Faktor partizipiert beeinflusst werden. In Astrozyten mit hoher glykolytischer Aktivität kann zytosolisches NAD(P)H signifikant zur Gesamt NAD(P)H Fluoreszenz beitragen. Sowohl NAD(P)H als auch FAD Fluoreszenz zeigten kleinere Änderungen in Richtung Oxidation (NAD(P)H Abfall, FAD Anstieg) und ausgeprägtere Änderungen Richtung Reduktion (NAD(P)H Anstieg, FAD Abfall) (Abb. 4.2.1 C; und 4.2.2), die ein Indikator für erhöhte Aktivität des Citratzyklus und Glykolyse sein können (107;108). Diese Arbeit unterstützt eine kürzlich veröffentlichte Studie zum Thema der Regulation intrazellulärer Kalzium Konzentration und der dafür erforderlichen Anpassungen des Energiemetabolismus in Neuronen (109).

Die Daten weisen daraufhin, dass CCE und begleitende muskarinische Rezeptoraktivierung  $K^+$ -Ströme in hippocampalen Pyramidenzellen induziert. Die zugrunde liegenden Mechanismen erscheinen komplex. Sie können folgende Mechanismen involvieren:

- Verschiedene muskarinische Rezeptor-Subtypen wie m1 – m5 (88)
- Intrazelluläre Signalkaskaden die z.B.: an Phospholipase C und Protein Kinase gebunden sind (3;64)
- Ionen-Kanäle wie z.B.:  $Ca^{2+}$ -Aktivierte  $K^+$ -Kanäle ( $Ca^{2+}$ -AKK), die durch muskarinische Rezeptor-Aktivierung moduliert werden (64), G-Protein gekoppelte nach innen gerichtete  $K^+$ -Kanäle (GIRK) (64;110)
- 2 Poren-Domänen  $K^+$ -Kanäle (two-pore domain  $K^+$  channels, K(2P)) (111)
- nicht-selektive Kationen Kanäle (NSCC) (112)
- Plasma Membran Insertion und Aktivierung von TRP-Kanälen (TRPC) (113)

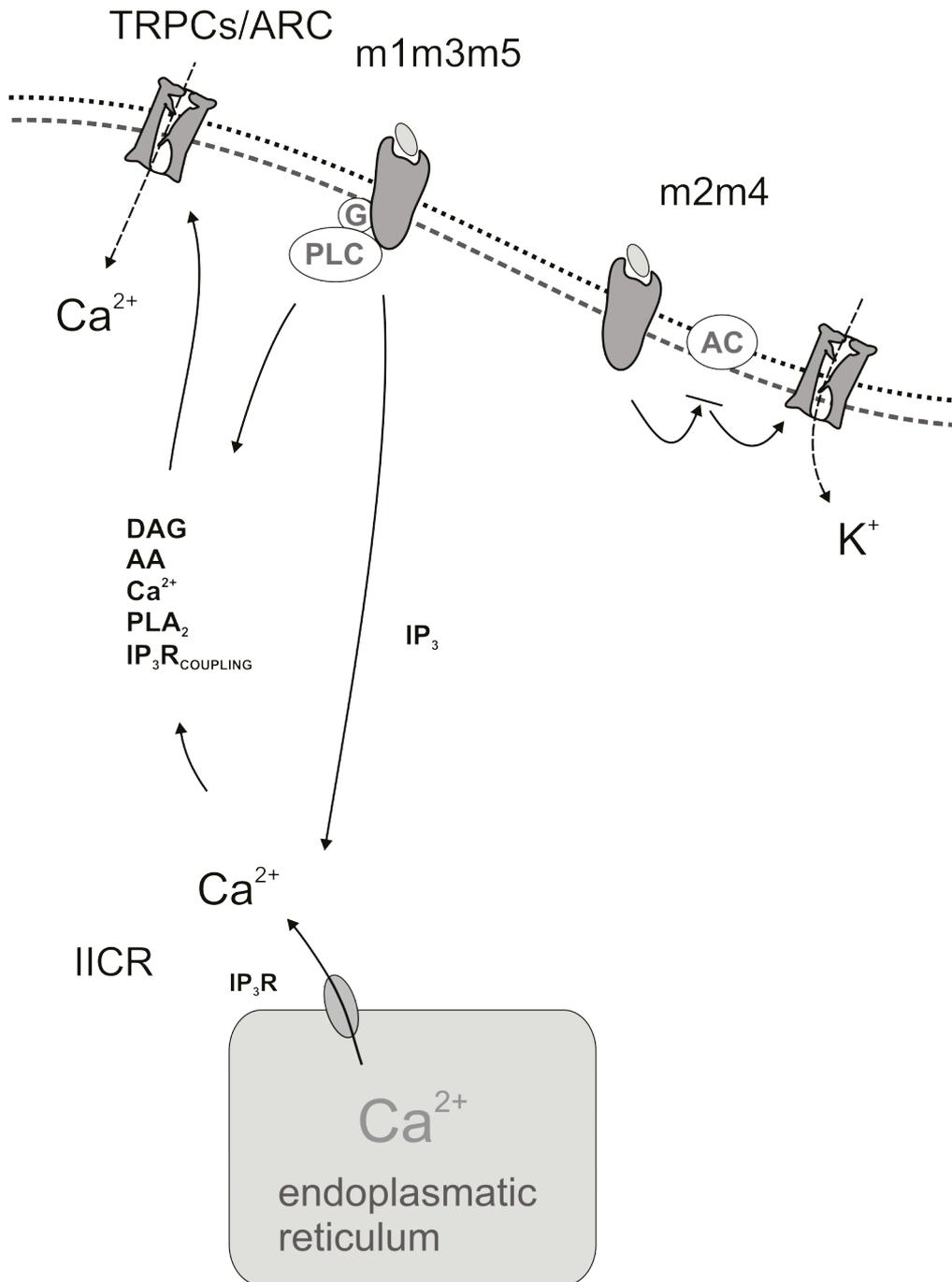
Muskarinische ACh Rezeptoren (**mACHRs**) vermitteln nach Aktivierung (AG = Agonist) via PLC, IP3 über IP3 Rezeptoren (IP3R) eine  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (Abb. 5.2.1). Diese kann wiederum eine Kalzium induzierte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum triggern. Nach Entleerung der Speicher induziert ein unbekanntes Signal die Aktivierung von speichergesteuerten Kanälen (SOCs) in der

Plasmamembran. Die Aktivierung metabotroper Rezeptoren der G-Protein oder Tyrosinkinase Familien kann über second messenger wie Diacylglycerol (DAG), Arachidonsäure (AA), PLA<sub>2</sub> und Kalzium selbst Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (ROCs = Receptor operated channels) und Ca<sup>2+</sup>-abhängige Ionen Kanäle in der Plasmamembran aktivieren (3).



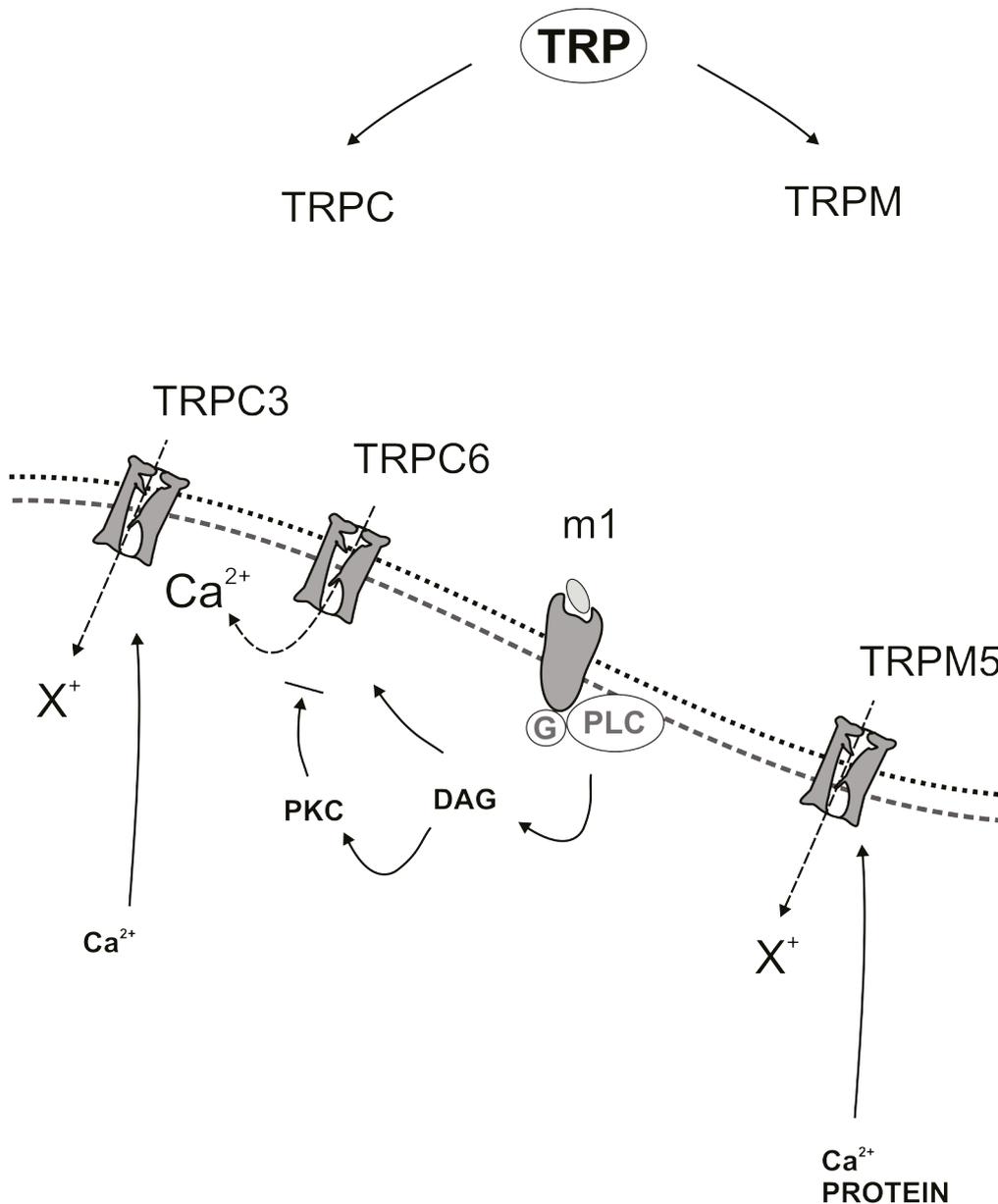
**Abb. 5.2.1 mACHR Aktivierung und CCE induzieren K<sup>+</sup>-Transienten.** Muskarinische ACh Rezeptoren (mACHRs) vermitteln nach Aktivierung (AG = Agonist) via PLC, IP<sub>3</sub> über IP<sub>3</sub> Rezeptoren (IP<sub>3</sub>R) eine Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Nach Entleerung der Speicher induziert ein unbekanntes Signal die Aktivierung von speichergesteuerten Kanälen (SOCs). Die Aktivierung metabotroper Rezeptoren der G-Protein oder Tyrosinkinase Familien kann über second messenger wie Diacylglycerol (DAG), Arachidonsäure (AA), PLA<sub>2</sub> und Kalzium selbst Ca<sup>2+</sup>-aktivierte K<sup>+</sup>-Kanäle (Ca<sup>2+</sup>-AKK) und G-Protein gekoppelte nach innen gerichtete K<sup>+</sup>-Kanäle (GIRK) und nicht selektive Kationen Kanäle (NSCC), die durch muskarinische Rezeptor-Aktivierung moduliert werden, in der Plasmamembran aktivieren und Kationen bzw. K<sup>+</sup>-Transienten induzieren. 2 Poren-Domänen K<sup>+</sup>-Kanäle (K(2P)) induzieren spannungsunabhängig K<sup>+</sup>-Transienten. Abkürzungen: X<sup>+</sup> = Kationen.

Ein weiterer Mechanismus könnte die Beteiligung von Transient Receptor Potential Kanälen (TRPC) bei der Signaltransduktion von m1, m3 und m5 sein (Abb. 5.2.1) (3;113). In Frage kommen IP<sub>3</sub>-induzierte Kopplung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors an einen TRP-Kanal, eine Aktivierung durch DAG oder ein noch unentdecktes Protein (3). Für den m3-Rezeptor wurden PLC unabhängige Signaltransduktionswege postuliert (114;115). Die Signaltransduktion erfolgt dabei über Generation von Arachnidonsäure (AA) via Stimulation von Phospholipase A<sub>2</sub> oder Phospholipase D. Der Kalzium Einstrom erfolgt dann über einen ARC Kanal (Arachnidonate-regulated Ca<sup>2+</sup> channel) dessen molekulare Identität noch nicht geklärt ist (116). Ein kürzlich publizierter Signaltransduktionsweg verläuft ebenfalls PLC-IP<sub>3</sub> unabhängig. ACH aktiviert den muskarinischen Rezeptore m3 (117). Die Rezeptoren m2/m4 inhibieren die Adenylatcyklase (AC) und regulieren Kalium-Kanäle, die Kalium Transienten induzieren.



**Abb. 5.2.2 Durch mAChR und CCE induzierte K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>- Transienten.** Dargestellt sind die muskarinischen Untergruppen. Ein möglicher Mechanismus könnte die Beteiligung von TRP-Kanälen bei der Signaltransduktion von m1, m3 und m5 sein. In Frage kommen IP<sub>3</sub> induzierte Kopplung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors an einen TRP-Kanal, eine Aktivierung durch DAG oder ein noch unentdecktes Protein (3). Für den m3 Rezeptor wurde ein PLC unabhängiger Signaltransduktionsweg postuliert. Die Signaltransduktion erfolgt dabei über Generation von Arachnidonsäure (AA) via Stimulation von Phospholipase A<sub>2</sub> oder Phospholipase D. Der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom erfolgt über einen ARC-Kanal (Arachidonate-regulated Ca<sup>2+</sup> channel). Die Rezeptoren m2/m4 inhibieren die Adenylatcyclase (AC) und regulieren Kalium-Kanäle die Kalium Transienten induzieren.

Die Familie der **TRP-Kanäle** enthält Untergruppen von Kationen Kanälen (Abb. 5.2.3). Dazu gehören die canonical oder klassischen TRPC, die durch metabotrope Rezeptoren aktiviert werden. Eine weitere große Unterfamilie sind die TRPM-Kanäle, die verschiedenste Aktivierungs- und Selektivitätsmodalitäten besitzen. Unter den TRPC-Kanälen werden folgende Kanäle für die Beteiligung bei CCE diskutiert. TRPC3 kodiert einen  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen nichtselektiven Kationenkanal, der Rezeptor induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom vermittelt. TRPC3 Aktivität wird wahrscheinlich direkt durch Kalzium oder durch Kalzium abhängige Prozesse vermittelt (118). Für TRPC6 wurde eine Aktivierung durch m1ACHR in sympathischen Neuronen beschrieben. Ein postulierter Mechanismus verläuft über Aktivierung der PLC, Produktion von DAG und Aktivierung von PKC. DAG könnte die Kanäle direkt innerhalb von Sekunden aktivieren, aber innerhalb von Minuten via Aktivierung der PKC inaktivieren (119). Ein  $\text{IP}_3$  Rezeptor induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom konnte nicht nachgewiesen werden (120). TRPC6 Kanäle werden in embryonalen und adulten Gehirnen exprimiert (121). TRPC6 wurde sowohl im Zerebralen Kortex als auch im Hippokampus exprimiert (122). Die größte Unterfamilie der TRP-Kanäle ist die der TRPM Kanäle. Für diese Arbeit könnte der TRPM5 Kanal von Interesse sein, der in einer Arbeit als Spannungsmodulierter- $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter Monovalenter-Kationen Kanal klassifiziert wurde (123). Der in dieser Arbeit gezeigte Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  könnte den TRPM5 Kanal aktivieren und die  $\text{K}^+$ -Transienten mitgestalten.



**Abb. 5.2.3 Durch CCE und TRPC vermittelte  $K^+/Ca^{2+}$ -Transienten.** Die Familie der TRP-Kanäle enthält verschiedenste Untergruppen von Kationen Kanälen. Zum einen die canonical oder klassischen TRPC, die durch metabotrope Rezeptoren aktiviert werden, zum anderen die TRPM Kanäle. TRPC3 kodiert einen nichtselektiven Kationen Kanal ( $X^+$  = Kationen) der  $K^+$ -Transienten vermitteln kann. TRPC3 Aktivität wird wahrscheinlich direkt durch Kalzium oder durch Kalzium abhängige Prozesse vermittelt. Für TRPC6 wurde eine Aktivierung durch m1ACHR in sympathischen Neuronen beschrieben. Ein postulierter Mechanismus verläuft über Aktivierung der PLC, Produktion von Diacylglycerol (DAG) und Aktivierung von Proteinkinase C (PKC). DAG könnte die Kanäle direkt innerhalb von Sekunden aktivieren, aber innerhalb von Minuten via Aktivierung der PKC inaktivieren. Die größte Unterfamilie der TRP-Kanäle ist die der TRPM Kanäle. Dargestellt ist der TRPM5 ein Spannungsmodulierter- $Ca^{2+}$ -aktivierter Monovalenter Kationen Kanal ( $X^+$  = Kationen). Der in dieser Arbeit gezeigte Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  kann den TRPM5 Kanal aktivieren und die  $K^+$ -Transienten mitgestalten.

Der exakte Mechanismus muss, unter Verwendung weiterer pharmakologischer Techniken und genetisch manipulierter Tiere („knockout animals“), an zukünftige Arbeiten adressiert werden. Die Beteiligung und die genauen Mechanismen von Gliazellen, insbesondere Astrozyten, an den nachgeschalteten zellulären Effekten von CCE muss ebenfalls an weitere Arbeiten adressiert werden (28;124).

### **5.3 Funktionale Konsequenzen**

CCE ist bei einer Reihe von Neuronalen Subtypen etabliert und könnte primär zum Auffüllen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern und zur Dynamik von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen beitragen (70;72;89;125). In dieser Arbeit wird gezeigt, dass neuronale Mitochondrien, ähnlich wie in anderen Zell-Typen, signifikant an der Regulation von diesen Prozessen bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung teilhaben (20). In hippokampalen Pyramidenzellen wurde gezeigt, dass CCE spontane Transmitter Freisetzung in der CA3 und Langzeit Potenzierung (long-term potentiation) in der CA1 beeinflusst (25). In dieser Arbeit werden Hinweise geliefert, dass muskarinische Rezeptor-Aktivierung tatsächlich CCE zur Modulierung der Erregbarkeit der neuronalen Zellmembran in Pyramidenzellen der CA3 verwendet. Es wurde gezeigt, dass muskarinische Rezeptor-Aktivierung lang anhaltende depolarisierende Plateau Potentiale in Neuronen induziert (persönliche Mitteilung Dr. Kovacs) (73;113). Die hyperpolarisierenden nach außen gerichteten  $\text{K}^+$ -Transienten, die durch CCE aktiviert werden, könnten als negative Rückkopplung zur Vermeidung neuronaler (Hyper)Exzitation dienen. Solch eine cholinerge Inhibition wurde für hippokampale Pyramidenzellen in CA1 und in der neokortikalen Schicht 5 (126) postuliert. Zusätzlich wird gezeigt, dass CCE mit begleitender muskarinischer Rezeptor-Aktivierung in mitochondrialer Membran Depolarisierung und Änderungen des intrazellulären Redox-Zustandes resultiert. Dies bildet höchstwahrscheinlich eine Adaption des zellulären Energie Metabolismus ab, um energetische Bedürfnisse bei den komplexen Übertragungsprozessen der Neuronen zu bedienen (7;126).

Der Hippokampus ist Teil des Allokortex und erhält starke cholinerge Innervation über das Septum. Funktionell ist der Hippokampus in Bezug auf Lernen und Gedächtnis bedeutsam involviert und ACh Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in den zugrunde liegenden neuronalen Übertragungsprozessen (127). In dieser Arbeit wird demzufolge ein Mechanismus beschrieben der signifikant zur Informations-Verarbeitung und begleitender neurometabolischen Kopplung im Hippokampus beitragen könnte. Dieser Mechanismus könnte während schneller

neuronaler Netzwerk Oszillation im Gamma Bereich (30-100 Hz), die mit gestiegenen ACh Spiegeln und hohen Energie Bedürfnissen einhergehen, von besonderer Bedeutung sein (126). Da muskarinische Rezeptoren in verschiedenen neuronalen Subtypen exprimiert werden, könnte dieser Mechanismus in weiteren Regionen des ZNS existieren (126;128).

## 6 Zusammenfassung

In den unterschiedlichsten Zell-Typen resultiert die Entleerung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern in kapazitativem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (CCE). Über die Effekte von CCE auf die Erregbarkeit der neuronalen Zellmembran und mitochondriale Funktionen in zentralen Neuronen ist jedoch nicht viel bekannt. In dieser Arbeit werden die nachgeschalteten zellulären Effekte in Pyramidenzellen von organotypischen hippocampalen Hirnschnitt-Kulturen von Ratten unter Verwendung von Elektrophysiologie und Fluoreszenz Bildgebung untersucht. Es wurden die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ), extrazelluläre Kalium-Konzentration ( $[\text{K}^+]_o$ ), mitochondriales Membranpotential und intrazellulärer Redox-Zustand (NAD(P)H und FAD Fluoreszenz) in hippocampalen Hirnschnitt-Kulturen gemessen.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass CCE mit folgenden nachgeschalteten Effekten assoziiert ist:

- Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  in individuellen neuronalen Mitochondrien
- hyperpolarisierende neuronale Ionen Ströme
- Anstieg der  $[\text{K}^+]_o$
- Mitochondriale Membran Depolarisation
- Änderungen des intrazellulären Redox-Zustandes (NAD(P)H und FAD Fluoreszenz) die Änderungen des Energie Metabolismus der Zelle abbilden

Diese zusätzlichen nachgeschalteten zellulären Effekte von CCE erforderten begleitende muskarinische Rezeptor-Aktivierung durch Carbachol oder Acetylcholin. Sie wurden durch Auswaschung des Agonisten oder Applikation des Antagonisten Atropin unterdrückt. Daraus wird geschlossen, dass muskarinische Rezeptoraktivierung die nachgeschalteten zellulären Effekte von CCE auf Erregbarkeit der neuronalen Zellmembran und Energie Metabolismus determiniert. Die Ergebnisse erweitern das aktuelle Konzept von CCE in zentralen Neuronen, insbesondere in Bezug auf Erregbarkeit der neuronale Zellmembran, mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung und Energie Metabolismus. In dieser Arbeit wird ein Mechanismus beschrieben, der signifikant zur Informations-Verarbeitung und begleitender neurometabolischer Kopplung im Hippokampus beitragen könnte. Dieser Mechanismus kann aufgrund der Exprimierung von muskarinischen Rezeptoren in weiteren Regionen des ZNS existieren.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2000;1(1)11-21.
2. Parekh AB, Putney JW, Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 2005;85(2)757-810.
3. Patterson RL, van Rossum DB, Nikolaidis N, et al. Phospholipase C-gamma: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. *Trends Biochem.Sci.* 2005;30(12)688-697.
4. Heinemann U, Lux HD, Gutnick MJ. Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp.Brain Res.* 1977;27(3-4)237-243.
5. Rusakov DA, Fine A. Extracellular Ca<sup>2+</sup> depletion contributes to fast activity-dependent modulation of synaptic transmission in the brain. *Neuron* 2003;37(2)287-297.
6. Zucker RS. Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron* 1996;17(6)1049-1055.
7. Kann O, Kovacs R. Mitochondria and neuronal activity. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2007;292(2)C641-C657.
8. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 1995;80(2)259-268.
9. Meldolesi J. Rapidly exchanging Ca<sup>2+</sup> stores in neurons: molecular, structural and functional properties. *Prog.Neurobiol.* 2001;65(3)309-338.
10. Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev.* 1998;78(1)99-141.
11. Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, et al. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev.* 1994;74(3)595-636.
12. Spat A, Szanda G, Csordas G, et al. High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signalling. *Cell Calcium* 2008;44(1)51-63.
13. Irving AJ, Collingridge GL. A characterization of muscarinic receptor-mediated intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization in cultured rat hippocampal neurones. *J.Physiol* 1998;511 ( Pt 3)747-759.
14. Takemura H, Putney JW, Jr. Capacitative calcium entry in parotid acinar cells. *Biochem.J.* 1989;258(2)409-412.
15. Putney JW, Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 1986;7(1)1-12.

16. Clapp TR, Medler KF, Damak S, et al. Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage-gated calcium channels and SNAP-25. *BMC.Biol.* 2006;47.
17. Horowitz LF, Hirdes W, Suh BC, et al. Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca<sup>2+</sup> requirement, and regulation of M current. *J.Gen.Physiol* 2005;126(3)243-262.
18. Casteels R, Droogmans G. Exchange characteristics of the noradrenaline-sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells or rabbit ear artery. *J.Physiol* 1981;317263-279.
19. Nilius B. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry channels: still elusive! *Sci.STKE.* 2004;2004(243)e36.
20. Parekh AB. Mitochondrial regulation of store-operated CRAC channels. *Cell Calcium* 2008;44(1)6-13.
21. Putney JW. Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol.Rev.* 2009;231(1)10-22.
22. Hoth M, Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 1992;355(6358)353-356.
23. Ma HT, Venkatachalam K, Parys JB, et al. Modification of store-operated channel coupling and inositol trisphosphate receptor function by 2-aminoethoxydiphenyl borate in DT40 lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 2002;277(9)6915-6922.
24. Rohacs T, Bago A, Deak F, et al. Capacitative Ca<sup>2+</sup> influx in adrenal glomerulosa cells: possible role in angiotensin II response. *Am.J.Physiol* 1994;267(5 Pt 1)C1246-C1252.
25. Baba A, Yasui T, Fujisawa S, et al. Activity-evoked capacitative Ca<sup>2+</sup> entry: implications in synaptic plasticity. *J.Neurosci.* 2003;23(21)7737-7741.
26. Leung YM, Kwan CY. Current perspectives in the pharmacological studies of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry blockers. *Jpn.J.Pharmacol.* 1999;81(3)253-258.
27. Grudt TJ, Usowicz MM, Henderson G. Ca<sup>2+</sup> entry following store depletion in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 1996;36(1)93-100.
28. Lo KJ, Luk HN, Chin TY, et al. Store depletion-induced calcium influx in rat cerebellar astrocytes. *Br.J.Pharmacol.* 2002;135(6)1383-1392.
29. Krause E, Schmid A, Gonzalez A, et al. Low cytoplasmic [Ca(2+)] activates I(CRAC) independently of global Ca(2+) store depletion in RBL-1 cells. *J.Biol.Chem.* 1999;274(52)36957-36962.
30. Poggioli J, Mauger JP, Guesdon F, et al. A regulatory calcium-binding site for calcium channel in isolated rat hepatocytes. *J.Biol.Chem.* 1985;260(6)3289-3294.
31. Barritt GJ. Does a decrease in subplasmalemmal Ca<sup>2+</sup> explain how store-operated Ca<sup>2+</sup> channels are opened? *Cell Calcium* 1998;23(1)65-75.

32. Irvine RF. 'Quantal' Ca<sup>2+</sup> release and the control of Ca<sup>2+</sup> entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett.* 1990;263(1)5-9.
33. Ma HT, Patterson RL, van Rossum DB, et al. Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Science* 2000;287(5458)1647-1651.
34. Braun FJ, Broad LM, Armstrong DL, et al. Stable activation of single Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels in divalent cation-free solutions. *J.Biol.Chem.* 2001;276(2)1063-1070.
35. Sugawara H, Kurosaki M, Takata M, et al. Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J.* 1997;16(11)3078-3088.
36. Liou J, Kim ML, Heo WD, et al. STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr.Biol.* 2005;15(13)1235-1241.
37. Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J.Cell Biol.* 2005;169(3)435-445.
38. Zhang SL, Yu Y, Roos J, et al. STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature* 2005;437(7060)902-905.
39. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 2006;441(7090)179-185.
40. Freichel M, Vennekens R, Olausson J, et al. Functional role of TRPC proteins in native systems: implications from knockout and knock-down studies. *J.Physiol* 2005;567(Pt 1)59-66.
41. Philipp S, Cavalie A, Freichel M, et al. A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL. *EMBO J.* 1996;15(22)6166-6171.
42. Brough GH, Wu S, Cioffi D, et al. Contribution of endogenously expressed Trp1 to a Ca<sup>2+</sup>-selective, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry pathway. *FASEB J.* 2001;15(10)1727-1738.
43. Brueggemann LI, Markun DR, Henderson KK, et al. Pharmacological and electrophysiological characterization of store-operated currents and capacitative Ca(2+) entry in vascular smooth muscle cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2006;317(2)488-499.
44. Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, et al. Lack of an endothelial store-operated Ca<sup>2+</sup> current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4<sup>-/-</sup> mice. *Nat.Cell Biol.* 2001;3(2)121-127.
45. Mori Y, Wakamori M, Miyakawa T, et al. Transient receptor potential 1 regulates capacitative Ca(2+) entry and Ca(2+) release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes. *J.Exp.Med.* 2002;195(6)673-681.

46. Obukhov AG, Nowycky MC. TRPC4 can be activated by G-protein-coupled receptors and provides sufficient Ca<sup>2+</sup> to trigger exocytosis in neuroendocrine cells. *J.Biol.Chem.* 2002;277(18)16172-16178.
47. Prakriya M, Lewis RS. CRAC channels: activation, permeation, and the search for a molecular identity. *Cell Calcium* 2003;33(5-6)311-321.
48. Vig M, Peinelt C, Beck A, et al. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science* 2006;312(5777)1220-1223.
49. Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, et al. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat.Cell Biol.* 2006;8(7)771-773.
50. Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, et al. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J.Biol.Chem.* 2006;281(30)20661-20665.
51. Davis AF, Clayton DA. In situ localization of mitochondrial DNA replication in intact mammalian cells. *J.Cell Biol.* 1996;135(4)883-893.
52. Muller M, Mironov SL, Ivannikov MV, et al. Mitochondrial organization and motility probed by two-photon microscopy in cultured mouse brainstem neurons. *Exp.Cell Res.* 2005;303(1)114-127.
53. Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, et al. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 2004;119(6)873-887.
54. Chance B. Pyridine nucleotide as an indicator of the oxygen requirements for energy-linked functions of mitochondria. *Circ.Res.* 1976;38(5 Suppl 1)I31-I38.
55. Duchen MR, Smith PA, Ashcroft FM. Substrate-dependent changes in mitochondrial function, intracellular free calcium concentration and membrane channels in pancreatic beta-cells. *Biochem.J.* 1993;294 ( Pt 1)35-42.
56. Denton RM, Richards DA, Chin JG. Calcium ions and the regulation of NAD<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. *Biochem.J.* 1978;176(3)899-906.
57. Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, et al. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96(24)13807-13812.
58. Rutter GA, Rizzuto R. Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca<sup>2+</sup> release: an intimate connection. *Trends Biochem.Sci.* 2000;25(5)215-221.
59. Kann O, Kovacs R, Heinemann U. Metabotropic receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling elevates mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and stimulates oxidative metabolism in hippocampal slice cultures. *J.Neurophysiol.* 2003;90(2)613-621.
60. Ames A. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 2000;34(1-2)42-68.

61. Zimmer J, Gahwiler BH. Cellular and connective organization of slice cultures of the rat hippocampus and fascia dentata. *J.Comp Neurol.* 1984;228(3)432-446.
62. Emptage NJ, Reid CA, Fine A. Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron* 2001;29(1)197-208.
63. Hartmann J, Verkhratsky A. Relations between intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in primary cultured human glioblastoma cells. *J.Physiol* 1998;513 (Pt 2)411-424.
64. Lujan R, Maylie J, Adelman JP. New sites of action for GIRK and SK channels. *Nat.Rev.Neurosci.* 2009;10(7)475-480.
65. Huang GN, Zeng W, Kim JY, et al. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat.Cell Biol.* 2006;8(9)1003-1010.
66. Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J, et al. Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008;105(8)2895-2900.
67. Kann O, Schuchmann S, Buchheim K, et al. Coupling of neuronal activity and mitochondrial metabolism as revealed by NAD(P)H fluorescence signals in organotypic hippocampal slice cultures of the rat. *Neuroscience* 2003;119(1)87-100.
68. Csordas G, Renken C, Varnai P, et al. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J.Cell Biol.* 2006;174(7)915-921.
69. Kopach O, Kruglikov I, Pivneva T, et al. Mitochondria adjust Ca(2+) signaling regime to a pattern of stimulation in salivary acinar cells. *Biochim.Biophys.Acta* 2011;1813(10)1740-1748.
70. Putney JW, Jr. Capacitative calcium entry in the nervous system. *Cell Calcium* 2003;34(4-5)339-344.
71. Berna-Erro A, Braun A, Kraft R, et al. STIM2 regulates capacitive Ca<sup>2+</sup> entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. *Sci.Signal.* 2009;2(93)ra67.
72. Koss DJ, Riedel G, Platt B. Intracellular Ca<sup>2+</sup> stores modulate SOCCs and NMDA receptors via tyrosine kinases in rat hippocampal neurons. *Cell Calcium* 2009;46(1)39-48.
73. Kann O, Taubenberger N, Huchzermeyer C, et al. Muscarinic receptor activation determines the effects of store-operated Ca(2+)-entry on excitability and energy metabolism in pyramidal neurons. *Cell Calcium* 2012;51(1)40-50.
74. Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J.Neurosci.Methods* 1991;37(2)173-182.
75. Minta A, Kao JP, Tsien RY. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J.Biol.Chem.* 1989;264(14)8171-8178.

76. Chen LB. Fluorescent labeling of mitochondria. *Methods Cell Biol.* 1989;29:103-123.
77. Billups B, Forsythe ID. Presynaptic mitochondrial calcium sequestration influences transmission at mammalian central synapses. *J.Neurosci.* 2002;22(14):5840-5847.
78. Singh BB, Lockwich TP, Bandyopadhyay BC, et al. VAMP2-dependent exocytosis regulates plasma membrane insertion of TRPC3 channels and contributes to agonist-stimulated Ca<sup>2+</sup> influx. *Mol.Cell* 2004;15(4):635-646.
79. Yoshida I, Monji A, Tashiro K, et al. Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> store itself may be a major factor in thapsigargin-induced ER stress and apoptosis in PC12 cells. *Neurochem.Int.* 2006;48(8):696-702.
80. Sharp AH, McPherson PS, Dawson TM, et al. Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> release channels in rat brain. *J.Neurosci.* 1993;13(7):3051-3063.
81. Shmigol A, Kostyuk P, Verkhratsky A. Dual action of thapsigargin on calcium mobilization in sensory neurons: inhibition of Ca<sup>2+</sup> uptake by caffeine-sensitive pools and blockade of plasmalemmal Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuroscience* 1995;65(4):1109-1118.
82. Kovacs R, Kardos J, Heinemann U, et al. Mitochondrial calcium ion and membrane potential transients follow the pattern of epileptiform discharges in hippocampal slice cultures. *J.Neurosci.* 2005;25(17):4260-4269.
83. Gerencser A, Adam-Vizi, . Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> dynamics reveals limited intramitochondrial Ca<sup>2+</sup> diffusion. *Biophys.J.* 2005;88(1):698-714.
84. Gerencser AA AA, Adam-Vizi V. Selective, high-resolution fluorescence imaging of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> concentration. *Cell Calcium* 2001;30(5):311-321.
85. Caeser M, Aertsen A. Morphological organization of rat hippocampal slice cultures. *J.Comp Neurol.* 1991;307(1):87-106.
86. Bouron A. Activation of a capacitative Ca(2+) entry pathway by store depletion in cultured hippocampal neurones. *FEBS Lett.* 2000;470(3):269-272.
87. Beker F, Weber M, Fink RH, et al. Muscarinic and nicotinic ACh receptor activation differentially mobilize Ca<sup>2+</sup> in rat intracardiac ganglion neurons. *J.Neurophysiol.* 2003;90(3):1956-1964.
88. Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, et al. Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J.Neurosci.* 1995;15(5 Pt 2):4077-4092.
89. Bouron A, Altafaj X, Boisseau S, et al. A store-operated Ca<sup>2+</sup> influx activated in response to the depletion of thapsigargin-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores is developmentally regulated in embryonic cortical neurons from mice. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 2005;159(1):64-71.
90. Garaschuk O, Yaari Y, Konnerth A. Release and sequestration of calcium by ryanodine-sensitive stores in rat hippocampal neurones. *J.Physiol* 1997;502 ( Pt 1):13-30.

91. De SA, Griesinger CB, Edwards FA. Development of rat CA1 neurones in acute versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *J.Physiol* 2003;550(Pt 1)135-147.
92. Pomper JK, Haack S, Petzold GC, et al. Repetitive spreading depression-like events result in cell damage in juvenile hippocampal slice cultures maintained in normoxia. *J.Neurophysiol.* 2006;95(1)355-368.
93. Giacomello M, Drago I, Bortolozzi M, et al. Ca<sup>2+</sup> hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca<sup>2+</sup> mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Mol.Cell* 2010;38(2)280-290.
94. Feldman B, Fedida-Metula S, Nita J, et al. Coupling of mitochondria to store-operated Ca(2+)-signaling sustains constitutive activation of protein kinase B/Akt and augments survival of malignant melanoma cells. *Cell Calcium* 2010;47(6)525-537.
95. Walsh C, Barrow S, Voronina S, et al. Modulation of calcium signalling by mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta* 2009;1787(11)1374-1382.
96. Nicholls DG. Simultaneous monitoring of ionophore- and inhibitor-mediated plasma and mitochondrial membrane potential changes in cultured neurons. *J.Biol.Chem.* 2006;281(21)14864-14874.
97. Kovacs R, Schuchmann S, Gabriel S, et al. Ca<sup>2+</sup> signalling and changes of mitochondrial function during low-Mg<sup>2+</sup>-induced epileptiform activity in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur.J.Neurosci.* 2001;13(7)1311-1319.
98. Bindokas VP, Lee CC, Colmers WF, et al. Changes in mitochondrial function resulting from synaptic activity in the rat hippocampal slice. *J.Neurosci.* 1998;18(12)4570-4587.
99. Lux HD, Heinemann U, Dietzel I. Ionic changes and alterations in the size of the extracellular space during epileptic activity. *Adv.Neurol.* 1986;44:619-639.
100. Heinemann U, Lux HD. Undershoots following stimulus-induced rises of extracellular potassium concentration in cerebral cortex of cat. *Brain Res.* 1975;93(1)63-76.
101. Amzica F, Steriade M. Neuronal and glial membrane potentials during sleep and paroxysmal oscillations in the neocortex. *J.Neurosci.* 2000;20(17)6648-6665.
102. Heinemann U, Schaible HG, Schmidt RF. Changes in extracellular potassium concentration in cat spinal cord in response to innocuous and noxious stimulation of legs with healthy and inflamed knee joints. *Exp.Brain Res.* 1990;79(2)283-292.
103. Lewis DV, Schuette WH. NADH fluorescence, [K<sup>+</sup>]<sub>0</sub> and oxygen consumption in cat cerebral cortex during direct cortical stimulation. *Brain Res.* 1976;110(3)523-535.
104. Schuchmann S, Luckermann M, Kulik A, et al. Ca(2+)- and metabolism-related changes of mitochondrial potential in voltage-clamped CA1 pyramidal neurons in situ. *J.Neurophysiol.* 2000;83(3)1710-1721.
105. Huang S, Heikal AA, Webb WW. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. *Biophys.J.* 2002;82(5)2811-2825.

106. Kunz WS, Gellerich FN. Quantification of the content of fluorescent flavoproteins in mitochondria from liver, kidney cortex, skeletal muscle, and brain. *Biochem.Med.Metab Biol.* 1993;50(1)103-110.
107. Brennan AM, Connor JA, Shuttleworth CW. NAD(P)H fluorescence transients after synaptic activity in brain slices: predominant role of mitochondrial function. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 2006;26(11)1389-1406.
108. Kann O, Huchzermeyer C, Kovacs R, et al. Gamma oscillations in the hippocampus require high complex I gene expression and strong functional performance of mitochondria. *Brain* 2011;134(Pt 2)345-358.
109. Ivannikov MV, Sugimori M, Llinas RR. Calcium clearance and its energy requirements in cerebellar neurons. *Cell Calcium* 2010;47(6)507-513.
110. Ngo-Anh TJ, Bloodgood BL, Lin M, et al. SK channels and NMDA receptors form a Ca<sup>2+</sup>-mediated feedback loop in dendritic spines. *Nat.Neurosci.* 2005;8(5)642-649.
111. Enyedi P, Czirjak G. Molecular background of leak K<sup>+</sup> currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev.* 2010;90(2)559-605.
112. Egorov AV, Hamam BN, Fransén E, et al. Graded persistent activity in entorhinal cortex neurons. *Nature* 2002;420(6912)173-178.
113. Tai C, Hines DJ, Choi HB, et al. Plasma membrane insertion of TRPC5 channels contributes to the cholinergic plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus* 2010.
114. Shuttleworth TJ, Thompson JL. Muscarinic receptor activation of arachidonate-mediated Ca<sup>2+</sup> entry in HEK293 cells is independent of phospholipase C. *J.Biol.Chem.* 1998;273(49)32636-32643.
115. Shuttleworth TJ, Thompson JL. Discriminating between capacitative and arachidonate-activated Ca(2+) entry pathways in HEK293 cells. *J.Biol.Chem.* 1999;274(44)31174-31178.
116. Shuttleworth TJ, Thompson JL, Mignen O. ARC channels: a novel pathway for receptor-activated calcium entry. *Physiology.(Bethesda.)* 2004;19355-361.
117. Pemberton KE, Hill-Eubanks LJ, Jones SV. Modulation of low-threshold T-type calcium channels by the five muscarinic receptor subtypes in NIH 3T3 cells. *Pflugers Arch.* 2000;440(3)452-461.
118. Zitt C, Obukhov AG, Strubing C, et al. Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells results in calcium-activated cation currents not related to store depletion. *J.Cell Biol.* 1997;138(6)1333-1341.
119. Zhang L, Guo F, Kim JY, et al. Muscarinic acetylcholine receptors activate TRPC6 channels in PC12D cells via Ca<sup>2+</sup> store-independent mechanisms. *J.Biochem.* 2006;139(3)459-470.

120. Delmas P, Wanaverbecq N, Abogadie FC, et al. Signaling microdomains define the specificity of receptor-mediated InsP(3) pathways in neurons. *Neuron* 2002;34(2)209-220.
121. Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, et al. Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J.Biol.Chem.* 2003;278(40)39014-39019.
122. Volpicelli LA, Levey AI. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog.Brain Res.* 2004;14559-66.
123. Hofmann T, Chubanov V, Gudermann T, et al. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr.Biol.* 2003;13(13)1153-1158.
124. Grimaldi M. Astrocytes refill intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in the absence of cytoplasmic [Ca<sup>2+</sup>] elevation: a functional rather than a structural ability. *J.Neurosci.Res.* 2006;84(8)1738-1749.
125. Singaravelu K, Lohr C, Deitmer JW. Calcium-independent phospholipase A2 mediates store-operated calcium entry in rat cerebellar granule cells. *Cerebellum.* 2008;7(3)467-481.
126. Gullledge AT, Stuart GJ. Cholinergic inhibition of neocortical pyramidal neurons. *J.Neurosci.* 2005;25(44)10308-10320.
127. Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr.Opin.Neurobiol.* 2006;16(6)710-715.
128. Drever BD, Riedel G, Platt B. The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav.Brain Res.* 2011;221(2)505-514.

## **Curriculum Vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationsliste

Kann O<sup>1</sup>, Taubenberger N<sup>1</sup>, Huchzermeyer C, et al. Muscarinic receptor activation determines the effects of store-operated Ca(2+)-entry on excitability and energy metabolism in pyramidal neurons. *Cell Calcium* 2012;51(1)40-50.

<sup>1</sup> geteilte Erstautorenschaft

Huchzermeyer C, Albus K, Gabriel HJ, Otáhal J, Taubenberger N, et al. Gamma oscillations and spontaneous network activity in the hippocampus are highly sensitive to decreases in pO<sub>2</sub> and concomitant changes in mitochondrial redox state. *J.Neurosci.* 2008;28(5)1153-1162.

## Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Nando Taubenberger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Aktivierung muskarinischer Rezeptoren moduliert die Effekte von kapazitativem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom auf Erregbarkeit und Energiemetabolismus in zentralen Nervenzellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## Danksagung

Prof. Uwe Heinemann hat mir eine sehr hervorragende Betreuung zukommen lassen, insbesondere bei der inhaltlichen Entwicklung und Planung dieser Arbeit. Prof. Oliver Kann und Dr. Richard Kovács gaben mir bei der Durchführung und Gestaltung dieser Arbeit sehr wertvolle Ratschläge. Wann immer ich Unterstützung und Rat benötigte, habe ich diese bekommen. Die Sorgfalt und der Erfahrungsreichtum von Kristin Lehmann war Grundlage für die exzellenten Hirnschnitt-Kulturen, die ich in dieser Arbeit verwendet habe.

Die gemeinsame Arbeit mit Ludger Näkel und Prof. Klaus Albus hatte und hat für mich über das Wissenschaftliche hinaus eine sehr große Bedeutung.

Blumen für die sehr gute Zusammenarbeit für Katrin Schulze, Sonja Frosinski und Christine Huchzermeyer.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung mit ganzem Herzen bedanken. Danken möchte ich meinen beiden Schwestern. Sie haben mich von der Hausaufgaben-Betreuung bis zur grammatikalischen Korrektur dieser Dissertation stets unterstützt.