

Aus dem Johannes-Müller-Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Lysophospholipide induzieren Calcium- und pH-Änderungen in muriner Mikroglia

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Berit Rückert
aus Neubrandenburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. U. Heinemann
2. Prof. Dr. J. W. Deitmer
3. Prof. Dr. med. A. Schwab

Datum der Promotion: 25.09.2006

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der Lysophospholipide Lysophosphatidsäure (LPA), Sphingosin-1-phosphat (S1P) und Lysophosphatidylcholin (LPC) auf murine Mikroglia untersucht. S1P und LPA führen in Mikroglia zu einem transienten Calciumanstieg. Auslösbar ist dieser ab einer LPA-Konzentration von 0,1 μM . Es wurde gezeigt, dass dieser LPA-induzierte Ca^{2+} -Anstieg durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern zustande kommt.

Im Gegensatz dazu konnte LPC ab einer Konzentration von 10 μM eine Ca^{2+} -Antwort in Mikroglia auslösen, die zusätzlich zu dem schnellen initialen Ca^{2+} -Anstieg eine verlängerte, plateauförmige Komponente besaß. Diese Form der Ca^{2+} -Antwort entsteht durch den Einstrom von Ca^{2+} über die Zellmembran aus dem Extrazellulärraum über nicht selektive Kationenkanäle. Diese Kanäle konnten durch 100 μM Gadolinium beziehungsweise 100 μM Lanthan blockiert werden und so einen LPC-induzierten Ca^{2+} -Anstieg inhibieren. Zusätzlich führen LPA und LPC zu einem pH_i -Abfall in muriner Mikroglia.

Abstract

In this thesis, I analyzed the action of lysophospholipide, lysophosphatid acid (LPA), sphingosin-1-phosphate (S1P) and lysophosphatidylcholin(LPC) on murine microglia. S1P and LPA induced a transient increase of calcium in the microglia, with a treshhold LPA concentration of 0.1 μM . I could clearly demonstrate, that this LPA-induced Ca^{2+} increase is mediated by the release of Ca^{2+} from intracellular stores. In contrast, LPC could induce a Ca^{2+} response in microglia starting at a concentration of 10 μM , which was characterized in addition to a fast, initial Ca^{2+} increase by a prolonged component with a final plateau phase. This type of Ca^{2+} response was mediated by an influx of Ca^{2+} through the cell membrane from the extracellular space via non-selective cation-channels. These channels could be blocked by 100 μM gadolinium respectively by 100 μM lanthan, which inhibited a LPC-induced Ca^{2+} -influx. LPA and LPC lead to a pH_i -decrease in murine microglia.

Schlagwörter:

Microglia, Lysophospholipide, Calcium

Keywords:

Microglia, lysophospholipids, calcium

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	8
1.1	Mikroglia	8
1.2	Aktivierung von Mikroglia	9
1.3	Mechanismen der Mikrogliaaktivierung/ Rolle der Mikroglia bei Erkrankungen	11
1.4	Lysophospholipide	14
1.4.1	Biochemische Eigenschaften	14
1.4.2	Biologische Eigenschaften	16
2	MATERIAL & METHODEN	18
2.1	Mikrogliazellkultur	18
2.2	Messlösungen	19
2.3	Pharmakologie	19
2.4	Fluoreszenzimaging	21
2.4.1	Physikalische Grundlagen	21
2.4.2	Fluoreszenzfarbstoffe	23
2.4.3	Kalibrierung des Calciumsignals	26
2.4.4	Messplatz	27
2.5	Datenerfassung und -analyse	27
3	ERGEBNISSE	29
3.1	LPA Calciummessungen	29
3.1.1	LPA in physiologischer Ringerlösung	29
3.1.2	LPA in calciumfreier Ringerlösung	31
3.1.3	LPA in calciumfreier Ringerlösung und mit entleerten Calciumspeichern der Mikroglia	33
3.2	S1P in calciumhaltiger und calciumfreier Ringerlösung	34
3.3	LPC Calciummessungen	36
3.3.1	LPC in calciumhaltiger Ringerlösung	36
3.3.2	LPC in calciumfreier Ringerlösung	38
3.3.3	Pharmakologische Eigenschaften der LPC-Antworten	41
3.4	LPC und Morphologieänderungen der Mikroglia	43
3.5	LPA pH _i -Messungen	44
3.5.1	LPA in calciumhaltiger Ringerlösung	44
3.5.2	LPA in calciumfreier Ringerlösung	45
3.5.3	LPA und DPI	46

3.6	LPC und pH_i-Messungen	48
3.6.1	LPC in calciumhaltiger Ringerlösung.....	48
3.6.2	LPC in calciumfreier Ringerlösung.....	50
3.6.3	LPC und DPI.....	50
3.7	ZUSAMMENFASSUNG.....	52
4	DISKUSSION	53
4.1	LPA-induzierte Calciumantworten in Mikroglia.....	53
4.2	S1P-induzierte Calciumantworten in Mikroglia.....	55
4.3	Funktionelle Bedeutung der LPA- und S1P-induzierten Calciumantworten.....	56
4.4	LPC-induzierte Calciumantworten in Mikroglia.....	57
4.5	Funktionelle Bedeutung der LPC-induzierten Calciumantworten	60
4.6	Lysophospholipid-induzierte pH-Änderungen in Mikroglia	61
5	ZUSAMMENFASSUNG	66
6	LITERATURVERZEICHNIS	67
	DANKSAGUNG	75

Abkürzungsverzeichnis

AM	Acetoxymethyl
BCECF	(2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)carboxyfluorescein)
CD	(engl.) cluster of differentiation; Differenzierungsantigene
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNAse	Desoxyribonuklease
DPI	Diphenyleneiodonium
EGTA	Ethyleneglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FCS	fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
HBSS	Hank's balanced salt solution
HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPA	Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPL	Lysophospholipide
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
MHC	(engl.) major histocompatibility complex; Haupthistokompatibilitätskomplex
MS	Multiple Sklerose
PBS	Phosphate Buffered Saline

S1P	Sphingosin-1-phosphat
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Mikroglia

Mikrogliazellen sind die ortsständigen Makrophagen des Gehirns. Makrophagen gehören zu den phagozytierenden Zellen, die neben der Phagozytose auch zur Antigenpräsentation und Zytokinfreisetzung befähigt sind. In der Gruppe der Phagozyten befinden sich neben den im Blut zirkulierenden Makrophagen die ortsständigen Kupffer-Stern-Zellen in der Leber, die Osteoklasten im Knochengewebe und die Alveolarmakrophagen in der Lunge, die allesamt aufgrund ihres gemeinsamen Ursprunges sehr ähnliche immunologische und funktionelle Eigenschaften aufweisen. Die Funktion der Mikroglia besteht in der immunologischen Überwachung des zentralen Nervensystems (ZNS).

Entdeckt wurden die Mikrogliazellen Ende des 19. Jahrhunderts, in ihrem funktionellen und entwicklungsbiologischen Zusammenhang zutreffend beschrieben wurden sie erstmals zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Pio del Rio-Hortega, der Mikroglia als eine eigene Spezies der Gliazellen erkannte (del Rio-Hortega 1932).

Entwicklungsbiologisch entstammt sie dem Mesoderm und gehört dem mononukleären, phagozytierendem System an. Die hämatopoetischen Vorläuferzellen (beziehungsweise Monozyten), zirkulieren im Blut und wandern während der Embryonalentwicklung ins Parenchym des ZNS ein (Eglitis et Mezey 1997; Hickey et Kimura 1988). In dieser Phase besitzt die Mikroglia eine amöboide Zellform, bei der das Zellsoma abgerundet ist und die Zelle keine Rami aufweist. Diese Zellform ist ein Zeichen sowohl für ihre Migrationsfähigkeit als auch für ihre Aktivierung im Rahmen der ZNS-Reifung und -Formung, an der sie dahingehend beteiligt ist, als dass sie überflüssige, apoptotische Neurone phagozytiert. Erst postnatal gehen die Mikrogliazellen im gesunden Gehirn in den ruhenden, ramifizierten Zustand über (Compston et al. 1997).

In diesem ruhenden Zustand unterstützt die Morphologie die Immunkompetenz der Zellen, da sie mit Ausprägung zahlreicher Rami auftreten, wodurch eine einzelne Zelle einen Durchmesser des Gehirnparenchyms von 30-40 µm abdeckt, so dass sie Änderungen nicht nur der unmittelbaren Umgebung wahrnehmen kann.

Mikrogliazellen sind zahlenmäßig mit Neuronen vergleichbar und machen in etwa 15 % aller im ZNS befindlichen Zellen aus. Die im ZNS vorherrschende Zellart bilden die Astrozyten. Durch den engen Zellkontakt wird angenommen, dass die Astroglia-Mikroglia-Interaktion eine wichtige Rolle in der Funktionsweise der Mikrogliazellen spielt, zum Beispiel durch die Freisetzung löslicher Faktoren aus der Astroglia (Schilling et al. 2001). Das gesunde ZNS stellt eine immunprivilegierte Zone dar, da die Blut-Hirn-Schranke, die von hochspezialisierten Endothelzellen und Astrozyten gebildet wird, ein Eindringen von im Blut zirkulierenden Zytokinen und Lymphozyten verhindert. Dieses Immunprivileg schützt einerseits das ZNS vor schädigenden Einflüssen, andererseits kann das Zusammenbrechen der Blut-Hirn-Schranke - zum Beispiel nach Traumata oder Infektionen - einen Angriff von Immunzellen, vor allem Lymphozyten ermöglichen. Dieses kann dann zu starken (Auto-) Immunreaktionen führen, da Strukturen des ZNS, die durch das Immunprivileg vor deren Erkennung und immunologischen Toleranzentwicklung geschützt waren, plötzlich als fremd erkannt werden, was zu einer massiven Entzündung und Zerstörung von Neuronen beziehungsweise Myelin (wie bei Multipler Sklerose) führen kann.

1.2 Aktivierung von Mikroglia

Die im gesunden Gehirn ruhende Mikroglia kann bei Eintreffen schädigender Ereignisse für das Gehirn in kürzester Zeit aktiviert werden. Während des Aktivierungsprozesses gehen Änderungen wie zum Beispiel die Reorganisation des Zytoskeletts und die Expression von membranständigen Molekülen von statten.

Am deutlichsten kann man die Aktivierung anhand der Änderung der Morphologie erkennen, denn die Zellen können innerhalb kürzester Zeit die Rami zurückbilden und das Zellsoma verdicken, bis sie komplett abgerundet sind. In dieser Form sind die Zellen zur Migration befähigt und können sofort zum Ort der Schädigung gelangen.

Im nächsten Schritt der Aktivierung folgen die Expression beziehungsweise Hochregulation einer Reihe von membranständigen Rezeptoren. Zu den bedeutendsten zählen die antigenpräsentierenden MHC Klasse-I- und MHC Klasse-II- sowie verschiedene Adhäsionsmoleküle. Gleichzeitig sezerniert die Mikroglia eine Vielzahl von proinflammatorischen Substanzen, die für die Abwehr zuständig sind. Dabei kommt es nicht nur

zur para- sondern auch zur autokrinen Stimulation. Eine Auswahl der Rezeptoren und Sekretionsprodukten ist in Tabelle 1 dargestellt.

Die nach einem schädigenden Ereignis im ZNS freigesetzten Zytokine und Chemokine tragen unter anderem auch zum Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke bei, was das Einwandern von Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen Granulozyten ermöglicht. Mikrogliazellen zählen zu den antigenpräsentierenden Zellen, die pathogenes Material phagozytieren, prozessieren und als Antigen CD4- oder CD8- positiven T-Zellen mit Hilfe der Histokompatibilitätsmoleküle MHC I und II präsentieren können. Die exprimierten Adhäsionsmoleküle unterstützen den Zellkontakt zu Lymphozyten, Granulozyten oder Mikroglia. Kostimulatorische Moleküle der Mikroglia verstärken weiterhin die T-Zellaktivierung.

Tabelle 1: Zellmembran-Rezeptoren und Sekretionsprodukte der Mikroglia (modifiziert nach Rock et al. 2004)

Zellmembranrezeptoren	Sekretionsprodukte
Adhäsionsmoleküle	Cytokine
Ig Fc Rezeptoren	IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-16, IL-23, TNF- α , TGF- β
MHC I & II	Chemokine
CD4-Rezeptoren	Freie Radikale
ICAM-1	Superoxid, NO
Integrine	Eicosanoide
Komplementrezeptoren	Leukotriene
Cytokin-/ Chemokinrezeptoren	Wachstumsfaktoren
IFN- α , IFN- β , IFN- γ	Nerven-, Fibroblasten-wachstumsfaktor
IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-16	Komplementfaktoren
TNF- α	C1, C3, C4
M-CSF, GM-CSF	
CD14-Rezeptoren	
Mannose-Rezeptoren	
Purinerge Rezeptoren	
Opioid-, Cannabinoid- und Benzodiazepin- Rezeptoren	

In der Abfolge kommt es zur Stimulation der Proliferation, indem z. B. die Expression von M-CSF- und GM-CSF-Rezeptoren erhöht wird. Durch Freisetzung von M-CSF durch die Mikroglia selbst kommt es zur autokrinen Stimulation. Innerhalb kurzer Zeit beginnt die mitotische Aktivität, die zusammen mit der Migration einen Anstieg der Zellzahl bis auf das Fünffache nach sich zieht.

Der bei Schäden des ZNS hervorgerufene neuronale Zelltod birgt die Gefahr der Ausbreitung des geschädigten Areals, da aus absterbenden Neuronen toxische Substanzen in die Umgebung gelangen können. Deshalb ist es wichtig, dass Mikrogliazellen zu phagozytierenden Zellen transformieren und die vorhandenen Zelltrümmer beseitigen. Interessanterweise unterscheidet sich die Beseitigung von Zelltrümmern in grauer und weißer Substanz im Zeitraum, den die phagozytierenden Zellen benötigen: einige Tage in der grauen und bis zu Jahren in der weißen Substanz (Raivich et al. 1999).

1.3 Mechanismen der Mikrogliaaktivierung/ Rolle der Mikroglia bei Erkrankungen

Die Mikrogliaaktivierung bei ZNS-Schäden durchläuft je nach Ursache in spezifischer Form die im vorigen Kapitel beschriebenen Phasen. Als Ursachen kommen Infektionen durch Viren, Bakterien, Parasiten, Pilze oder Prione, autoimmunologische Entzündungen, Traumata, ischämische Insulte oder neurodegenerative Prozesse in Frage. Eine Auswahl neurotroper Infektionserreger ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Erreger neurologischer Infektionen (modifiziert nach Rock et al. 2004)

Viren	Bakterien
Retrovirus: HIV	Mycobacterium tuberculosis
Herpesviren: Herpes Simplex Virus, Cytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus	Treponema pallidum
Enteroviren: Polio-, Coxsackie-, Echovirus	Borrelia burgdorferi
Rabiesvirus	Leptospiren
Mumpsvirus	Brucellen
Masernvirus	Rickettsien
Rötelnvirus	Mycoplasmen

Pilze	Parasiten
Cryptococcus neoformans	Toxoplasma gondii
Candida	Trypanosoma
Aspergillus	Entamoeba histolytica
Prione	Echinococcus
	Schistosoma

Im Folgenden sollen einige der erregerbedingten Erkrankungen näher beleuchtet werden.

Der HIV- assoziierten Enzephalitis geht eine Infektion der Mikrogliazellen mit dem Retrovirus HI voraus. Aufgrund dessen, dass das Virus ausschließlich CD4- positive T-Zellen und mononukleäre Phagozyten befällt, sind die Mikrogliazellen die einzigen Zellen des ZNS, die infiziert werden. Neurone werden nicht befallen. Der Infektionsweg erfolgt über Makrophagen in den Hirngefäßen und perivaskuläre Makrophagen. Die befallenen Mikrogliazellen fusionieren zu mehrkernigen Riesenzellen, die Zellknötchen bilden. Die Sekretion neurotoxischer Substanzen der Mikroglia (siehe Tabelle 1) verursacht den neuronalen Zellverlust, obwohl auch nachgewiesen werden konnte, dass die neuroprotektive Fähigkeit der Mikroglia in frühen Phasen der HIV-Erkrankung die Entwicklung einer Demenz verzögern. Die HIV- Enzephalitis kann in der Spätphase die Ursache für vielfältige neuropsychologische Defizite bis hin zur Ausprägung einer Demenz sein.

Ein Beispiel für die Mikrogliaaktivierung durch eine bakterielle Infektion sei Streptococcus pneumoniae. Pneumokokken führen zwar nicht zu einer Enzephalitis mit Beteiligung des Gehirnparenchyms, aber sie stellen die häufigsten Erreger der Meningitis mit einer hohen Mortalität von 30% dar. Die Erreger sind am häufigsten im Subarachnoidalraum lokalisiert. Die freigesetzten Zyto- und Chemokine können jedoch Mikroglia und Astrozyten, die entlang der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert sind, aktivieren. Pneumokokken sind auch in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und somit direkt mit den Immunzellen in Kontakt zu treten. Diese starten daraufhin die oben beschriebene Aktivierungskaskade mit Freisetzung neurotoxischer Zytokine und die Rekrutierung von Lymphozyten. Die Neurotoxizität lässt sich am ehesten auf die Induktion von NO-Synthase (iNOS) zurückführen, welche für die Produktion von NO-Radikalen verantwortlich ist. Radikale haben einen stark toxischen Effekt, sie sind fähig, Lipide, Proteine und DNA zu zerstören und damit Bakterien zu eliminieren aber auch neuronale Zellen zu zerstören. Die Pneumokokken sind ebenfalls in der Lage, direkt Apoptose in Neuronen durch

Freisetzung apoptoseinduzierender Faktoren zu induzieren. Die schlechte Prognose der infizierten Patienten ist durch den neuronalen Zelltod und die Entstehung eines intrazerebralen Ödems zu erklären.

Auch in der Pathophysiologie von Apoplexien scheinen Mikrogliazellen eine wichtige Rolle zu spielen. Es wird die globale von der fokalen Ischämie unterschieden. Erstere kommt durch ein embolisches Geschehen der hirnversorgenden Gefäße, beispielsweise der A. cerebri media zustande, letztere durch Ischämie in einem lokal begrenzten Areal. Die Mikrogliazellen werden nach einer globalen Ischämie innerhalb von Minuten aktiviert und erreichen das Maximum im geschädigten Hippokampus innerhalb von vier bis sechs Tagen (Stoll et al. 1998). Die Aktivierung läuft mit ähnlichem Muster wie bei anderen entzündlichen Prozessen ab: in Anwesenheit sterbender Neurone beginnen die Mikrogliazellen zu proliferieren, Oberflächenmoleküle hochzuregulieren (Kato 2001), zu phagozytieren und antigenpräsentierende MHC-I- und -II-Moleküle zu exprimieren. In dieser Phase sind die residenten Mikrogliazellen immunphänotypisch nicht mehr von den zirkulierenden Makrophagen zu unterscheiden (Kreutzberg 1996), die durch den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke zeitlich verzögert in das geschädigte Hirnparenchym einwandern. Bei der fokalen Form der Ischämie spielt die Rekrutierung peripherer Makrophagen eine größere Rolle als bei der globalen Ischämie, bei der die aus der Penumbra eingewanderte Mikroglia die dominierende Zellart darstellt (Stoll et al. 1998). Bis heute gibt es unterschiedliche Aussagen zum therapeutischen Nutzen der Inaktivierung von Mikrogliazellen, so dass dies ein Thema weiterer Untersuchungen sein wird (Kumar et Evans 1997; Wang et al. 2002).

Eine weitere Erkrankung, bei der die Aktivierung der Mikroglia eine Rolle spielt, ist die Multiple Sklerose. Die Ätiologie der Multiplen Sklerose (MS) ist nicht vollends aufgeklärt. Einige Wissenschaftler halten eine virale Genese (Gilden 2005), andere einen primären autoimmunologischen Prozess für die Ursache der Erkrankung. Pathophysiologisch kommt es zur Demyelinisierung von Axonen durch ins ZNS eingewanderte T-Lymphozyten, die zur nachfolgenden Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen führen. Dabei kommt es zur Hochregulierung von Molekülen zur Antigenpräsentation, zum Myelinabbau und zur Produktion von Sauerstoffradikalen. Mikroglia synthetisiert außerdem Komponente der Komplementkaskade, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neurotrophine, chemotaktische Moleküle und apoptose-induzierende Substanzen. Diese Substanzen regulieren gegenläufige Prozesse wie die Schädigung des Myelins, der Axone und Oligodendrozyten aber auch die Reparatur der weißen Substanz durch Mikroglia und Makrophagen in Zusammenspiel mit Lymphozyten

(Raivich et Banati 2004). Die Aktivität der Mikroglia/Makrophagen scheint mit dem Voranschreiten der Krankheit und dem Auftreten neurologischer Defizite zu korrelieren (Banati et al. 2000). Klinisch zeichnen sich die Defizite durch spastische Paresen, zerebelläre Ataxien (der so genannte Charcot-Trias: Nystagmus, Intentionstremor, skandierende Sprache), Retrobulbärneuritis, Hirnstamm- und spinale Symptome und im späten Krankheitsverlauf durch psychische Symptome ab.

Aus den vorigen Abschnitten geht hervor, welche große Bedeutung die Herstellung und Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen den neurotoxischen und neuroprotektiven Eigenschaften der Mikrogliazellen zukommt. Bei jeder Abwehrreaktion gegen Fremdstoffe im Gehirn werden neben den pathologischen Materialien auch Neurone geschädigt. Es wird zum Wohle des gesamten ZNS ein Verlust in einem begrenzten Areal in Kauf genommen. Unterstützend für Neurone werden daneben auch neurotrophe und antiinflammatorische Substanzen wie TGF- β und IL-10 von aktivierter Mikroglia freigesetzt (Raivich et al. 1999).

1.4 Lysophospholipide

Lysophospholipide sind bioaktive Lipidmediatoren, die auf unterschiedlichste zelluläre Funktionen wirken können: Proliferation, Differenzierung, Migration, Adhäsion, Invasion und Morphogenese. Diese Funktionen beeinflussen eine Vielzahl biologischer Prozesse wie Neurogenese, Angiogenese, Wundheilung, Immunvorgänge und Karzinogenese.

1.4.1 Biochemische Eigenschaften

Lysophospholipide zählen zur Spezies der Lipide, vergleichbar mit den Phospholipiden (Phosphatidylcholin oder Sphingomyelin), die die Zellmembran der Säugetiere bilden. Beispiele aus der Gruppe der Lysophospholipide seien unter anderem die Lysophosphatidsäure (LPA), Sphingosin-1-phosphat (S1P), Lysophosphatidylcholin (LPC) und Sphingosylphosphorylcholin (SPC). Sie besitzen eine gemeinsame chemische Grundstruktur, die sich aus einem Glycerol- oder Sphingoidgrundgerüst und einer Acylkette variabler Länge und Sättigung zusammensetzt (Abbildung 1).

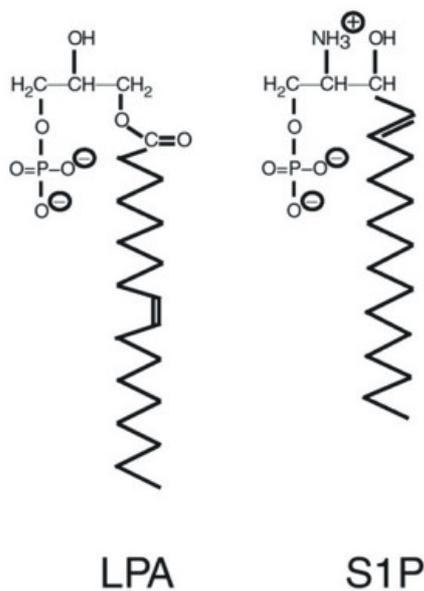


Abbildung 1 Strukturformeln für Lysophosphatidsäure und Sphingosin-1-phosphat (aus Fukushima et al. 2001)

LPA wird in erster Linie von aktivierten Thrombozyten gebildet. An der LPA-Produktion sind verschiedene Enzyme beteiligt, zu ihnen zählen die Phospholipase A, Lysophospholipase D und Autotaxin. Es kann aber auch als Abbauprodukt mittels Lysophospholipase entstehen. Im Serum ist LPA an Albumin, low-density lipoproteins (LPL) oder an andere Proteine gebunden, die es vor dem enzymatischen Abbau schützen (Pages et al. 2001). An der Zelle wirkt das LPA über spezifische Rezeptoren, die so genannten LPA₁-LPA₄ Rezeptoren.

S1P wird ausschließlich aus Sphingosin durch die Sphingosinkinase synthetisiert und durch die S1P-Lyase oder -Phosphatase degradiert (Yatomi et al. 2001; Spiegel et Kolesnick 2002). Auch die Produktion von S1P wird hauptsächlich durch Thrombozyten gewährleistet, in denen die S1P-Kinase, jedoch nicht die S1P-Lyase nachgewiesen werden konnte. S1P-Rezeptoren wurden molekulargenetisch identifiziert und werden als S1P₁-S1P₅ Rezeptoren bezeichnet (Ishii et al. 2004). Des Weiteren wird angenommen, dass es einen Rezeptor geringer Affinität für S1P gibt (GPR12). S1P besitzt neben der extrazellulär vermittelten Wirkung auch die Eigenschaft eines intrazellulären second messengers, der, ähnlich wie Inositol-3-phosphat, Calcium aus intrazellulären Speichern mobilisieren kann (Meyer zu Heringdorf 2004).

Sowohl die LPA- als auch die S1P-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die je

nach G-Protein ($G_{i/o}$, G_q , $G_{12/13}$, G_s) unterschiedliche Signalkaskaden innizieren. Dadurch kommt es zur Regulierung der DNA-Synthese, der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), der Adenylatcyclase (AC), der Phospholipase C (PLC), dem intrazellulären Calcium, Rho, Rac, Ras und der Phosphatidylinositol-3-kinase. Eine genaue Beschreibung der Rezeptoren, seiner Signalkaskaden und deren Vorkommen ist im Review von Ishii et al. (2004) nachzulesen.

LPC wird aus Phosphatidylcholin mit Hilfe der Phospholipase A_2 gebildet. Im Gegensatz zu LPA und S1P, die im Serum in einer Konzentration zwischen 1 und 5 μM vorkommen (Okajima 2002; Baker et al. 2001), tritt LPC in einem Konzentrationsbereich bis zu 180 μM auf (Xu 2002; Kabarowski et al. 2002). LPC wirkt an der Zelle auf zwei verschiedene Arten: zum einen unspezifisch über einen mechanosensitiven Effekt an der Membran, zum anderen über Rezeptoren, an die neben SPC auch LPC binden kann (OGR1, GPR4 und GPR 12). Zusätzlich wurde ein Rezeptor mit hoher Affinität zu LPC entdeckt (G2A) (Xu et al. 2000; Zhu et al. 2001; Ignatov et al. 2003).

1.4.2 Biologische Eigenschaften

Für Lysophospholipide sind eine Reihe von biologischen Effekten auf die unterschiedlichsten Zellarten beschrieben worden. Eine Auswahl der am meisten erforschten Effekte ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Das Nervensystem ist einer der Hauptorte für die Expression von Lysophospholipid-Rezeptoren. Sie besitzen einen Einfluss auf den Entwicklungsprozess des ZNS wie beispielsweise auf die Neurogenese, neuronale Migration, Neuritogenese und Myelinisierung (Contos et al. 2000; Fukushima et al. 2001; Weiner et al. 1998). Lysophospholipide haben einen Effekt nicht nur auf Mikrogliazellen, sondern auch auf Neurone, Oligodendrozyten, Schwann-Zellen und Astrozyten (Ye et al. 2002).

Setzt man neuronale Zellen LPA aus, reagieren diese mit einem schnellen Rückzug von Zellausläufern und mit einer Zellabrundung, welche durch die Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts zustande kommt. Dieser Vorgang wurde als erstes von Tigyi et al. (1992) an einer neuronalen Zelllinie beschrieben. Die funktionelle Bedeutung dieses Vorgangs liegt in der Migration und dem Entstehen axonaler Verbindungen zwischen Neurone während der Differenzierung des ZNS. Im Gegenzug dazu konnte aber auch gezeigt werden, dass das Protein

PRG-1 (plasticity-related-gene-1) LPA abbaut und so in Phasen der Regeneration wie beispielsweise nach Hirntraumata zu einem Wachstum von Zellausläufern in Neurone führt (Bräuer et al. 2003).

Tabelle 3: Biologische Eigenschaften von LPA und S1P (modifiziert nach Moolenaar et al. 2004; Xu 2002)

Effekte von LPA und S1P	Zellarten
Zellproliferation	viele Zelltypen
Schutz vor Apoptose	Schwann Zellen, Makrophagen, T-Lymphoblastom-Zellen
Zellmigration	viele Zelltypen
Thrombozytenaggregation	
Zellkontraktion	glatte Muskelzellen, Myofibroblasten
Chlorid-vermittelte Membrandepolarisation	Fibroblasten, Neuroblasten
Zellabrundung, Einziehen von Neuriten	Neuroblastomzellen, PC 12 Zellen, kortikale Neuroblasten, primäre Neurone, Astrozyten
Invasion von Tumorzellen	Carcinome, Hepatome, T-Lymphomzellen
Wundheilung	Haut, Gastrointestinaltrakt
Wachstum und Faltung des cerebralen Cortex	
Entstehung von Arteriosklerose	Gefäße

2 Material & Methoden

2.1 Mikrogliazellkultur

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden entweder primäre murine Mikroglia oder Zellen der murinen Mikrogliazelllinie BV-2 verwendet. Die BV-2 Zellen zeigten in den Experimenten keine Unterschiede zu kultivierter primärer Mikroglia. Ihr Vorteil besteht in ihrer leichteren Verfügbarkeit, der hohen Zellzahl als auch in einem geringeren Verbrauch an Tieren zu experimentellen Zwecken.

Die murinen Mikrogliazellen wurden aus neonatalen NMRI-Mäusen (P2-P4) (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) gewonnen. Nachdem die Dura mater und der Hippokampus von den Großhirnhemisphären entfernt wurden, erfolgten die Zerkleinerung des Großhirns und eine anschließende Inkubation mit 0,125% Trypsin in Nährmedium (Hank's balanced salt solution, HBSS) für 15 Minuten bei 37°C. Um eine vollständige Zelllyse zu erreichen, wurden die Zellen zusätzlich mechanisch mit einer Pasteurpipette bearbeitet. Dabei enthielt das Nährmedium 200 U Desoxyribonuklease (DNase). Die Einzelzellsuspension wurde in einer Dichte von $2 - 4 \times 10^6$ Zellen pro 10 ml Medium in Kulturflaschen gegeben. Das Medium, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Deutschland), enthielt zusätzlich 30% L929-Fibroblastenkulturüberstand, was als wirksame Substanz Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor (M-CSF) enthält, 10% fetales Kälberserum (FCS, Gibco, Deutschland), Glutamin und Penicillin/Streptomycin. In der ersten Woche wurde das Medium zwei Mal ausgetauscht.

In den folgenden 10-14 Tagen bildete sich eine adhärente Astrozytenzellschicht am Boden der Kulturflaschen. Um die weitaus weniger adhärenen Mikrogliazellen zu gewinnen, wurden die Kulturflaschen auf einem Schüttler für 30 Minuten vorsichtig gerüttelt. Die abgelösten Mikrogliazellen wurden mit dem Nährmedium entnommen, zentrifugiert, in DMEM resuspendiert und als Sekundärkultur angelegt. Etwa 30 000 Mikrogliazellen wurden auf ein sterilisiertes und gereinigtes Glasplättchen in 24-well-Platten pipettiert. Bis zur experimentellen Verwendung wurden die Kulturen im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt.

Zellen der Zelllinie BV-2 wurden ebenfalls im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ in dem Nährmedium DMEM mit 10% FCS 40F kultiviert. Zwei Mal wöchentlich wurden die Zellen geteilt, dabei wurden die Kulturflaschen, die etwa 20×10^6 Zellen der adhärenen Zelllinie

enthielten, zwei Mal mit Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in 5 ml PBS mithilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden in Suspension gebracht und anschließend 3 Minuten bei 600 U/min und 37°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zellpellet mit 1 ml DMEM resuspendiert. Nach dem Auszählen der Zellen mithilfe einer Zählkammer wurden 2×10^6 Zellen in 20 ml neues Nährmedium in 100 ml-Kulturflaschen angesetzt. Die für die Experimente bestimmten Zellen wurden in 24-well-Platten auf gereinigte und sterilisierte Glasplättchen zu 1000-3000 Zellen pro Plättchen mit 500 µl DMEM ausplattiert, die nach zwei bis sechs Tagen für die Experimente benutzt werden konnten.

2.2 Messlösungen

Die auf den Glasplättchen adhärenen Mikrogliazellen wurden während der Experimente mit einer calciumhaltigen Ringerlösung superfundiert (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 8 mM D-Glukose, 2 mM CaCl₂ und 1 mM MgCl₂).

In einigen Experimenten wurde calciumfreie Ringerlösung verwendet, in der die Calciumionen durch Magnesiumionen substituiert und der Calciumpuffer EGTA hinzugefügt wurde (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 8 mM D-Glukose, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂).

Für die Kalibrierung des Calciumsignals war es notwendig, eine maximal calciumhaltige Ringerlösung herzustellen. Diese setzte sich aus 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM CaCl₂ und 5 mM MgCl₂ zusammen.

Der pH-Wert der Lösungen wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Die Osmolarität wurde mit einem kryoskopischen Osmometer überprüft und gegebenenfalls auf 280 mosmol/kg korrigiert.

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3 Pharmakologie

Zur pharmakologischen Charakterisierung der intrazellulären Calcium- und pH-Änderungen in Mikrogliazellen wurde die Wirkung verschiedener Substanzen untersucht. Diese wurden entweder in das Messschälchen, in dem sich das Glasplättchen mit den Mikrogliazellen befand, pipettiert (50-100 µl auf 900-950 µl Messlösung) oder über ein Zuflusssystem eingewaschen, so

dass die komplette Messlösung ausgetauscht wurde. Eine Absaugung sorgte für ein gleich bleibendes Flüssigkeitsniveau. In Tabelle 4 sind alle verwendeten Substanzen aufgelistet.

Tabelle 4 Experimentell eingesetzte Substanzen.

Substanz	Konzentration	Lösungsmittel
<i>Lysophospholipide</i>		
LPA (L-Oleoyl-Lysophosphatidic acid)	0,001 – 10µM	Aqua dest.
S1P (Sphingosin-1-phosphat)	5 µM	Aqua dest.
LPC (Lysophosphatidylcholin bovin)	1-100 µM	Aqua dest.
LPC (Lysophosphatidylcholin palmitoyl)	15 µM	Aqua dest.
<i>Calcium-Imaging-Experimente</i>		
Thapsigargin	1 µM	DMSO
Ionomycin	10 µM	DMSO
Lanthan (LaCl ₃ *7 H ₂ O)	0,1 – 1mM	Aqua dest.
Gadolinium (GdCl ₃ *6 H ₂ O)	0,1 – 1mM	Aqua dest.
Ginkgolide B BN52021	10 µM	DMSO
<i>pH-Imaging-Experimente</i>		
DPI (Diphenyleneiodonium)	1 - 10µM	DMSO

Es wurde die Wirkung von Lysophosphatidsäure (LPA), Sphingosin-1-phosphat (S1P) und Lysophosphatidylcholin (LPC) auf Mikroglia untersucht. Die Stammlösungen dieser Substanzen wurden jeweils mit Aqua dest. und 50 mg/ml Albumin (fettsäurefreies bovines Serumalbumin, BSA) in einer Konzentration von 10 mM angesetzt und bei –20°C gelagert. Für die Messungen wurde die Stammlösung in die jeweils benötigte Endkonzentration in Ringerlösung weiter verdünnt. Da es sich bei diesen Substanzen um stark lipophile Lösungen handelt, wurden sie vor der Verwendung zur besseren Löslichkeit für 10 Minuten in ein Ultraschallbad gegeben.

Alle nicht hier aufgeführten und im Text genannten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland bezogen. Die übrigen Quellen sind in Tabelle 5 genannt.

Tabelle 5 Bezugsnachweis der verwendeten Chemikalien

Bezugsfirma	Substanz
Merck, Darmstadt, Deutschland	D-Glucose
Molecular Probes, Leiden, Niederlande	Fura-2AM
	Pluronsäure
	BCECF
Gibco, Karlsruhe, Deutschland	FCS
	DMEM

2.4 Fluoreszenzimagining

2.4.1 Physikalische Grundlagen

Der Begriff Fluoreszenz ist definiert als Licht, welches von Molekülen absorbiert und zu einem bestimmten Teil mit Verzögerung wieder abgegeben wird.

Abbildung 2 zeigt das Prinzip der Fluoreszenzstrahlung. Das Farbstoffmolekül wird von Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, dabei hebt die Energie des absorbierten Photons ein Elektron von einem bestimmten Energieniveau auf ein höheres: das Molekül geht vom Grund- (E_0) in den angeregten Zustand (E_1) über. Dieser dauert nur wenige Pikosekunden (10^{-12} s), dann fällt das Molekül, noch immer in angeregtem Zustand, auf ein niedrigeres Energieniveau (E_2). Nach weiteren Nanosekunden (10^{-9} s) fällt das Molekül spontan in den Grundzustand zurück. Bei diesem Sprung bilden die emittierten Photonen die Fluoreszenzstrahlung.

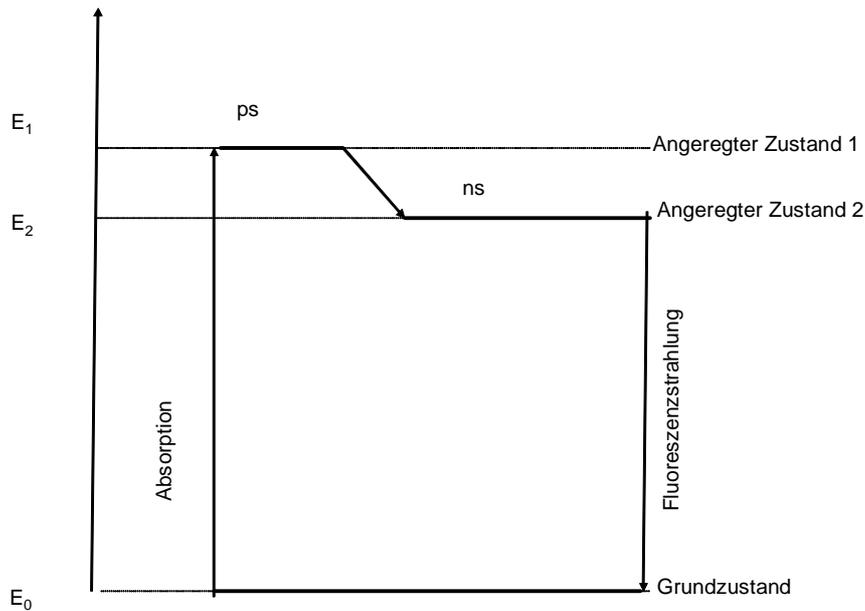


Abbildung 2 Energieniveauschema (modifiziert nach Deitmer)

Die absorbierte Energie (E_{abs}) ergibt sich aus der Differenz von $E_1 - E_0$, die emittierte Energie (E_{em}) aus der Differenz von $E_2 - E_0$. Die Energie des absorbierten Photons ist also größer als die des emittierten. In Gleichungen 1 errechnet sich die Energie eines Photons aus der Frequenz des Lichts und dem Planckschen Wirkungsquantum. Setzt man für die Frequenz das Produkt aus Gleichung 2 ein, ergibt sich Gleichung 3.

$$E = h * f$$

Gleichung 1 E ... Energie des Photons, h ... Plancksches Wirkungsquantum, f ... Frequenz des Lichtes

$$f = c / \lambda$$

Gleichung 2 Betrachtet man das Photon als Welle, dann ist c die Lichtgeschwindigkeit. λ ...Wellenlänge

$$E = h * c / \lambda$$

Gleichung 3

Demzufolge ist bei einer höheren Energie eines Photons die Wellenlänge geringer. Damit ist die Wellenlänge des emittierten Photons größer als die des absorbierten ($\lambda_{em} > \lambda_{abs}$). Diese Verschiebung der Wellenlänge wird Stokes-Shift genannt und bildet die Voraussetzung zur experimentellen Unterscheidung des emittierten Fluoreszenzsignals von der Anregung (Deitmer et al. 2000).

2.4.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind Fura-2AM (Ca^{2+} -sensibel) und BCECF-AM (pH-sensibel).

Das jeweilige Fluoreszenzsignal besitzt ein Intensitätsmaximum bei einer bestimmten Anregungswellenlänge. In Abbildung 3 ist ein solches Spektrum für den Farbstoff Fura-2AM dargestellt, in Abbildung 4 für BCECF.

Bindet das Fura in der Zelle an Calcium, ändert es seine Konformation und damit sein Anregungsmaximum. Calciumgebundenes Fura besitzt das Anregungsmaximum nahe 340 nm, calciumfreies Fura hingegen zwischen 360 und 380 nm (Abbildung 3). Im experimentellen Aufbau wurden zur klaren Unterscheidung beider Maxima die Anregungswellenlängen bei 340 und 380 nm gewählt. Diese Eigenschaft lässt sich für die Kalibrierung und Berechnung absoluter Calciumkonzentrationen zu Nutze machen. Das Maximum des Emissionsspektrums für Fura befindet sich zwischen 505 und 512 nm, für dessen Bereich die spezifischen Filter lichtdurchlässig sind.

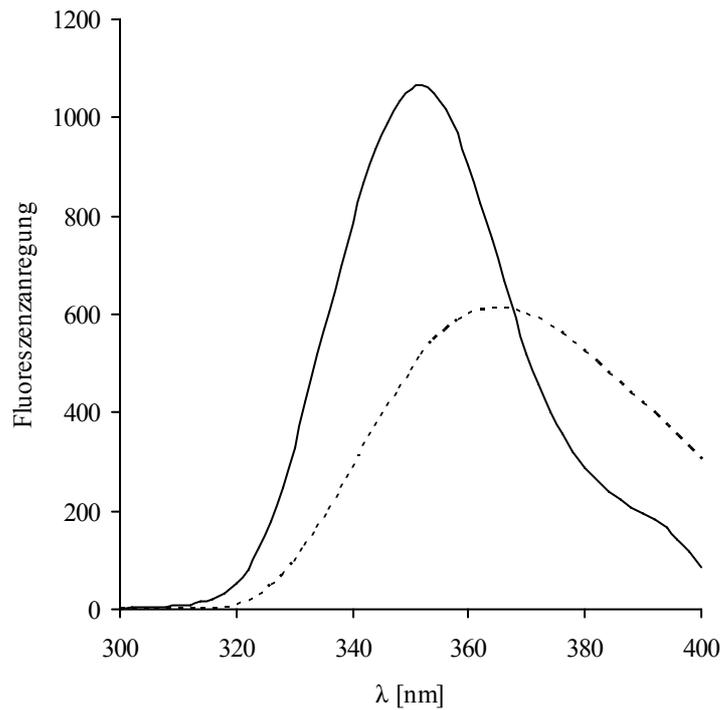


Abbildung 3 Anregungsspektrum der calciumfreien (gestrichelte Linie) und calciumgebundenen (durchgezogene Linie) Form des Fura-2AM

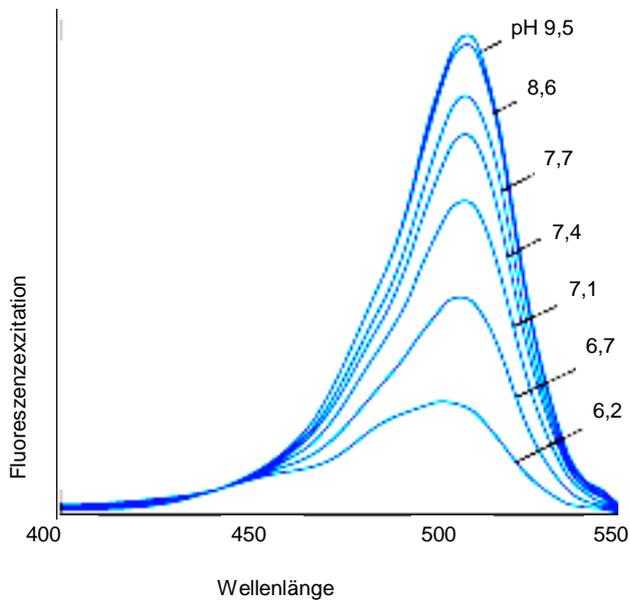


Abbildung 4 Anregungs- oder Exzitationsspektrum von BCECF bei unterschiedlichen pH-Werten (modifiziert aus dem Handbuch von Molecular Probes)

BCECF AM ist ein pH-sensitiver Farbstoff, der seine Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom pH-Wert bei einem Anregungsmaximum von 490 nm ändert. Als zweiten Messpunkt für die ratiometrische Messung wählt man den isobestischen Punkt bei 440 nm. Am isobestischen Punkt zeigt der Farbstoff keine Sensitivität für Protonen, die Fluoreszenzintensität ändert sich nur in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration. Der Vorteil einer ratiometrischen Fluoreszenzmessung besteht darin, dass das gemessene Signal weder von der geladenen Farbstoffkonzentration noch von der Zelldicke abhängig ist. Das Emissionsmaximum von BCECF befindet sich 535 nm.

Fura-2-Acetoxymethylrest (Fura-2-AM) als auch BCECF AM liegen in der unpolaren Form vor. Diese Form ist lipophil und somit membrangängig, so dass der jeweilige Farbstoff während der Inkubation ins Zytosol der Zellen gelangen kann. Dort wird der AM-Rest durch unspezifische Esterasen gespalten, die polare bzw. Säureform des Farbstoffs, welche hydrophil ist, kann nun nicht mehr über die Membran aus der Zelle diffundieren.

Beide Farbstoffe wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in Aliquots von 3 mM bei -20°C aufbewahrt. Vor der Messung wurde die Stammlösung mit Hilfe eines Ultraschallbades für 10 Minuten in bessere Lösung gebracht. Daraufhin wurde Fura-2AM mit Pluronsäure versetzt, die die Löslichkeit und Diffusionsfähigkeit des Farbstoffs erhöht. Bei Raumtemperatur wurden die Mikrogliazellen in Ringerlösung für 20-30 Minuten in 3 μM Fura-2AM beziehungsweise für 10 Minuten in 5 μM BCECF-AM inkubiert. Die optimale Inkubationszeit wurde anhand von Testreihen ausgewählt.

Dabei ist die Kenntnis der optimalen Fura-Farbstoffkonzentration wichtig, da es bei Anwendung in zu hohen Konzentrationen als Puffer des freien Calciums wirken kann. Bei einer zu hoch gewählten Konzentration könnten außerdem die intrazytoplasmatischen Esterasen nicht in ausreichendem Maße die AM-Gruppe abspalten, der Farbstoff könnte in die Kompartimente wie z.B. die Calciumspeicher diffundieren und dort angereichert werden. Dies würde zu falsch hohen Ca^{2+} -Konzentrationen führen. Eine zu geringe Konzentration dagegen führt zu einer zu geringen Intensität der Fluoreszenzstrahlung und somit einer erhöhten Fehlerquelle. Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffkonzentrationen wurden an Arbeiten von Kao (1994) angelehnt.

Im Verlauf der pH-Fluoreszenzmessung kommt es zur Bleichung des im Vergleich zum Fura-Signal ohnehin schwachen BCECF-Signals. Nach Belichtung der Zellen kommt es zur Bildung freier Radikale, die sich schädigend auf die Zellen auswirken. Aus diesem Grund wurde eine relativ geringe Aufnahmezeit von einem Bild pro zwei Minuten gewählt, da (was durch

Kontrollexperimente verifiziert wurde) keine schnelleren pH-Änderungen zu erwarten waren.

2.4.3 Kalibrierung des Calciumsignals

Um die detektierten Fluoreszenzsignale in absolute intrazelluläre Calciumkonzentrationen umzurechnen, bedarf es einer Kalibrierung. Diese wurde nach der etablierten Methode nach Grynkiewicz (Grynkiewicz et al. 1985) durchgeführt.

Zunächst wurde das Fluoreszenzsignal von Fura bei minimaler Calciumkonzentration detektiert. Dazu wurden Mikrogliazellen in calciumfreie, EGTA-gepufferte Ringerlösung gegeben. Um die intrazellulär vorhandenen Calciumspeicher zu entleeren, wurde 1 µM Thapsigargin der Messlösung zugefügt und schließlich 10 µM Ionomycin, ein Calciumionophor, das das intrazelluläre Milieu dem extrazellulären angleicht. Das maximal zu messende Ca²⁺-Signal wurde aufgenommen, indem die intrazelluläre Calciumkonzentration mittels Ionomycin der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration von 10 mM angeglichen wurde.

Die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und 380 nm in beiden Lösungen wurde detektiert, woraus sich der Quotient $R_{\min} = F_{340}/F_{380}$ beziehungsweise $R_{\max} = F_{340}/F_{380}$ und der Quotient $\beta = F_{380\min}/F_{340\max}$ ergaben. Es wurden folgende Werte gemessen: $R_{\min} = 0,3876$; $R_{\max} = 5,062$ und $\beta = 4,9087$. Die Dissoziationskonstante K_d betrug 224 nm (Grynkiewicz et al. 1985). Die so gewonnenen Daten wurden in Gleichung 4 eingesetzt.

$$[Ca^{2+}]_i = K_d * \beta * \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R}$$

Gleichung 4 Gleichung zur Kalibrierung des Calciumsignals (nach Grynkiewicz et al. 1985)

Der anschließend bei Messungen gewonnene Wert R, der sich aus dem Quotient F_{340}/F_{380} ergibt, konnte in die Gleichung eingesetzt und so die absolute intrazelluläre Calciumkonzentration errechnet werden.

2.4.4 Messplatz

Die Experimente dieser Arbeit wurden an einem Imaging-System durchgeführt. Dieses besteht aus einer Xenonbogenlampe, einem Monochromator, dem Mikroskop mit Kamera und dem Computer. Die Xenonbogenlampe dient als Lichtquelle zur Anregung. Der Monochromator reguliert die Anregungswellenlänge und leitet das Licht über ein Glasfaserkabel weiter zu einem inversen Mikroskop (Olympus IX50, Hamburg, Deutschland), das mit einem 40-fachen Wasserimmersions-Objektiv ausgestattet ist. Das Licht trifft auf die mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Zellen, die das Fluoreszenzlicht emittieren. Dieses passiert die für den jeweiligen Farbstoff spezifischen Filter und wird von einer CCD-Kamera (charged coupled devices) detektiert. Die von der Kamera digitalisierten Daten werden offline am IBM-kompatiblen Computer gespeichert und analysiert.

2.5 Datenerfassung und –analyse

Die Ansteuerung der Kamera sowie des Monochromators als auch die Datenaufzeichnung erfolgten mit dem Programm TILL Vision (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland). In der Offline-Analyse wurden die einzelnen Zellen als Regionen (Regions of interest, ROI) markiert und pro Bildaufnahme ein Mittelwert der Fluoreszenzintensität pro Region gebildet. Je nach Versuchsaufbau wurde alle 5 – 20 Sekunden (Calcium-Imaging) beziehungsweise alle 2 Minuten (pH-Imaging) ein Bild aufgenommen. Das Programm führte eine automatische Korrektur des Hintergrundsignals durch. Zur Datenanalyse wurden die Programme IGOR (Wavemetrics, Lake Oswego/USA) und Excel (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland) verwendet. Die errechneten Daten in Abschnitt 3 sind bei den Calcium-Messungen (Fura-2AM) als absolute intrazelluläre Calciumkonzentration dargestellt, bei den pH-Messungen (BCECF) als relative Änderungen des Fluoreszenzsignals $\Delta F/F_0$ (Munsch et Pape 1999).

In der Regel wurde aus den Daten der Einzelzellmessungen das arithmetische Mittel mit Angabe des Standardfehlers ermittelt (Mittelwert \pm Standardfehler). Die statistische Signifikanz zwischen den verschiedenen Daten wurde mittels des Student's t-Tests für unabhängige Stichproben errechnet. Dazu wurde das Programm „SPSS“ (SPSS Inc., Chicago/USA)

verwendet. Die Maximalwerte der Calciumantworten nach Stimulation mit Lysophospholipiden wurden für die Erstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit der in der Biologie weit verbreiteten Hillschen Gleichung (Gleichung 5) angepasst. Dafür wurde das Programm IGOR verwendet.

$$f(x) = y = y_{base} + \frac{y_{max} - y_{base}}{1 + \left(\frac{x_{1/2}}{x}\right)^n}$$

Gleichung 5 Hillsche Gleichung; y_{max} ...maximale Calciumantwort, y_{base} ...minimale Calciumantwort, $x_{1/2}$ der Wert von x, bei dem 50% der maximalen Calciumantwort erreicht wird, n ...Hill-Parameter, der die Sigmoidizität der Kurve angibt

3 Ergebnisse

3.1 LPA Calciummessungen

Die Messungen der intrazellulären Calciumkonzentrationen wurden mit der Methode des Calciumimaging durchgeführt, die in Abschnitt 2.4 beschrieben wurde.

3.1.1 LPA in physiologischer Ringerlösung

In einer ersten Versuchsreihe wurde untersucht, ob und in welcher Höhe die intrazelluläre Calciumkonzentration der Mikroglia durch Lysophosphatidsäure (LPA) verändert wird. Dazu wurde der intrazelluläre Ruhespiegel des Calciums vor der Messung bestimmt, der im Mittelwert $109,67 \pm 0,1 \text{ nM}$ ($n = 1650$) betrug. Anschließend wurde LPA in Konzentrationen von 10 nM bis 10 μM zu den Zellen appliziert. Calciumantworten wurden erst ab einer Konzentration von 100 nM LPA in 90,6% der Zellen beobachtet ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ $341,64 \pm 17,86 \text{ nM}$, $n = 184$). Der ermittelte Calciumwert nach Hinzufügen von 0,5 μM LPA betrug $506,16 \pm 12,16 \text{ nM}$, der in 313 (in 93,1% aller beobachteten) Zellen erfasst wurde. Bei 1 μM LPA wurde ein Calciumwert von $515,57 \pm 14,98 \text{ nM}$ in 278 Zellen gemessen, was einem Anteil an der Gesamtzellzahl von 99,3% entspricht. Auf 5 μM LPA antworteten die Mikrogliazellen mit einem Calciumspiegel von $424,33 \pm 12,77 \text{ nM}$ bei $n = 398$. Auf 10 μM LPA wurde ein Calciumwert von $567,36 \pm 25,42 \text{ nM}$ in 328 Mikrogliazellen gemessen, das sind 91,9% aller beobachteten Zellen. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Wirkung von LPA auf die intrazelluläre Calciumkonzentration ist in Abbildung 5 dargestellt. Die halb-maximale LPA-Konzentration betrug 78,4 nM.

In 96,9% der Zellen stellte sich die Calciumantwort als transiente, schnelle Antwort (Abbildung 6) dar und in 3,1% der Zellen als zweiteilige Antwort mit einer zusätzlichen verlängerten Komponente (Abbildung 7). Die Form der Antwort ist weder abhängig von der Zellform (ramifiziert oder amöboid) noch von der Zellart (murine Mikroglia oder Zelllinie BV-2) oder der applizierten LPA-Konzentration.

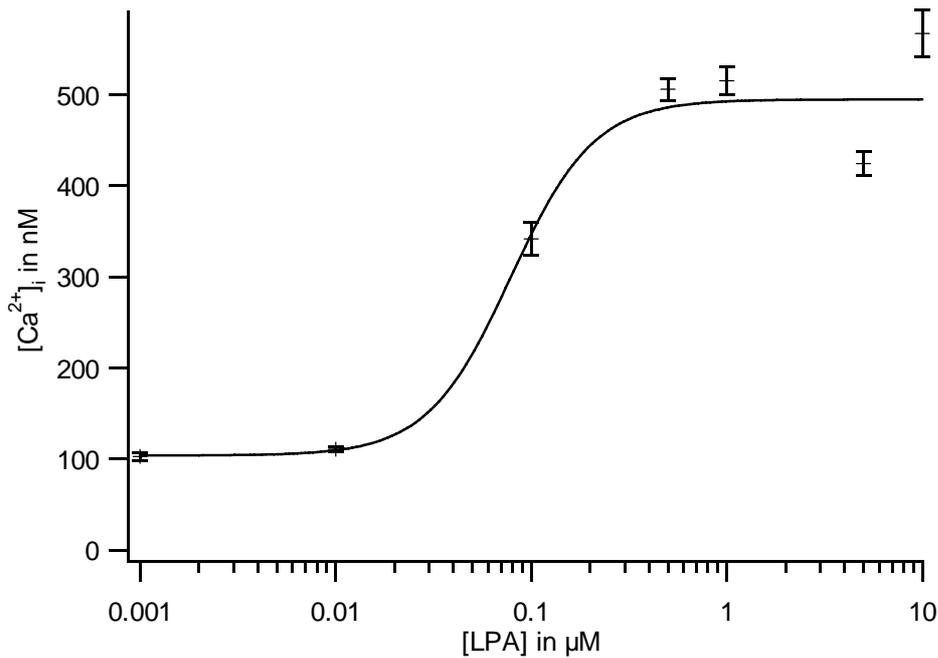


Abbildung 5 Konzentrations-Wirkungs-Kurve: Abhängigkeit der intrazellulären Calciumkonzentration in Mikroglia von der applizierten LPA-Konzentration; Die Kurve wurde mit der Hill-Gleichung gefittet, die folgende Parameter ergab: $y_{\text{max}} = 494,9 \pm 143 \text{ nM}$, $y_{\text{base}} = 103,8 \pm 45,9 \text{ nM}$, $x_{1/2} = 0,078 \pm 0,11 \mu\text{M}$.

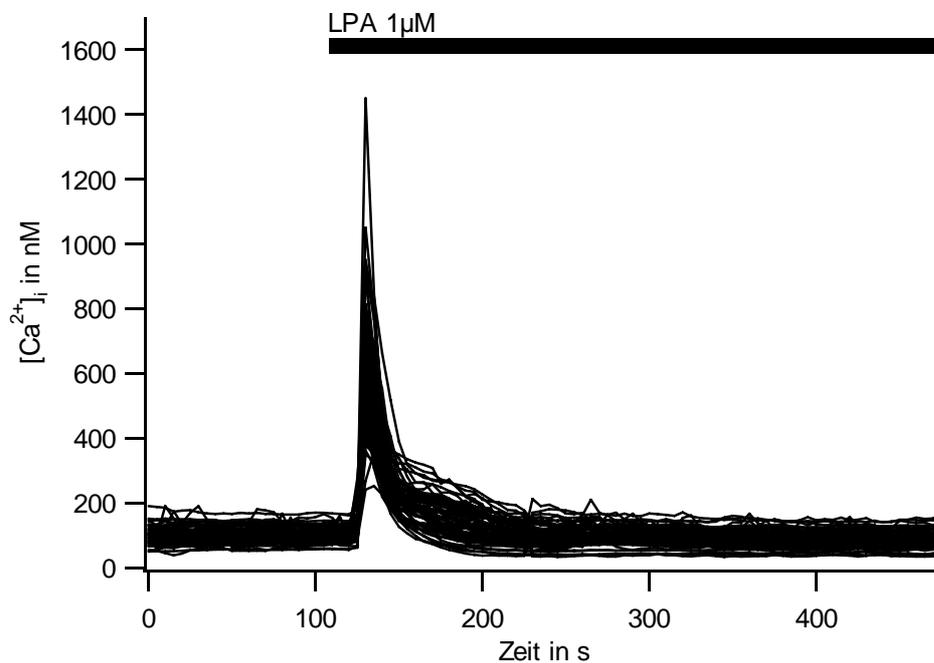


Abbildung 6 Kinetik, bei der die Zeit gegen die intrazelluläre Calciumkonzentration abgetragen ist. Ein Graph bedeutet dabei das Verhalten einer Einzelzelle. Mikrogliazellen in calciumhaltiger Ringerlösung, zu denen $1\mu\text{M}$ LPA appliziert wurde: Calciumantwort mit transientser Komponente

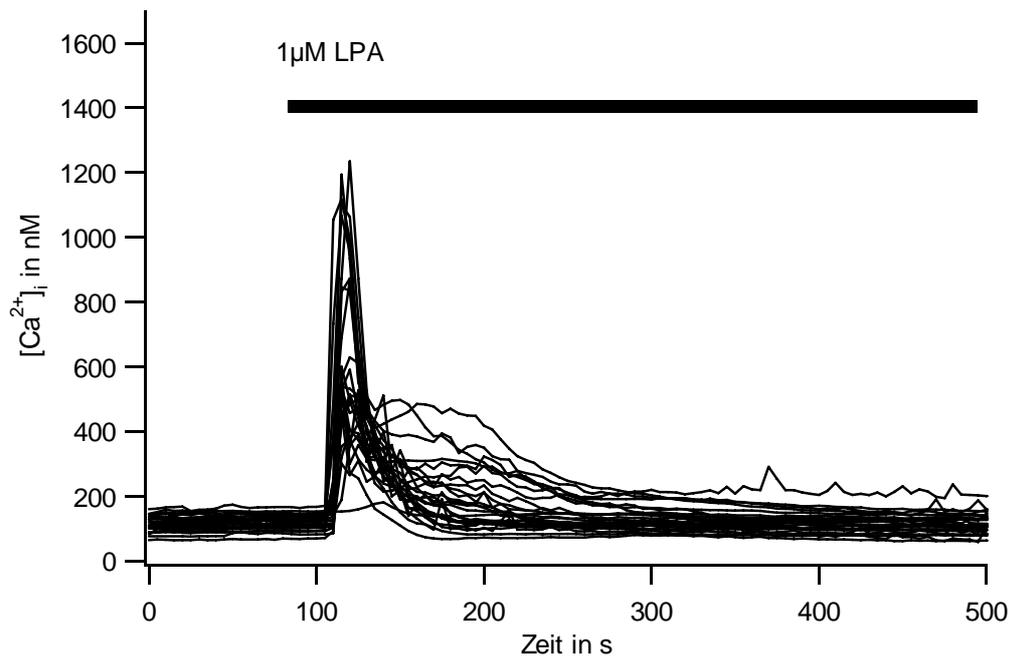


Abbildung 7 Calciumantwort mit zusätzlich verlängertem Calciumeinstrom

3.1.2 LPA in calciumfreier Ringerlösung

In einer nächsten Versuchsreihe wurde der Frage nachgegangen, woher die Ca^{2+} -Ionen stammen, die nach der LPA-Applikation in das Zytoplasma einströmen. Es könnte sich dabei um einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum oder um die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Kompartimenten handeln. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen des LPA in calciumfreie Ringerlösung eingewaschen.

Der Calciumspiegel der Zellen wurde in der calciumfreien Lösung vor Zugabe von LPA bestimmt, der im Mittel $82,17 \pm 0,97$ nM betrug ($n = 995$). Nach dem Pipettieren des LPA wurden ähnlich zu den Antworten in der physiologischen Ringerlösung keine Antworten bei 10 bzw. 50 nM LPA beobachtet. Erst ab einer Konzentration von 100 nM LPA erfolgte ein Anstieg des Calciumspiegels. Die Ca^{2+} -Antworten gleichen denen in der calciumhaltigen Ringerlösung (Abbildung 8).

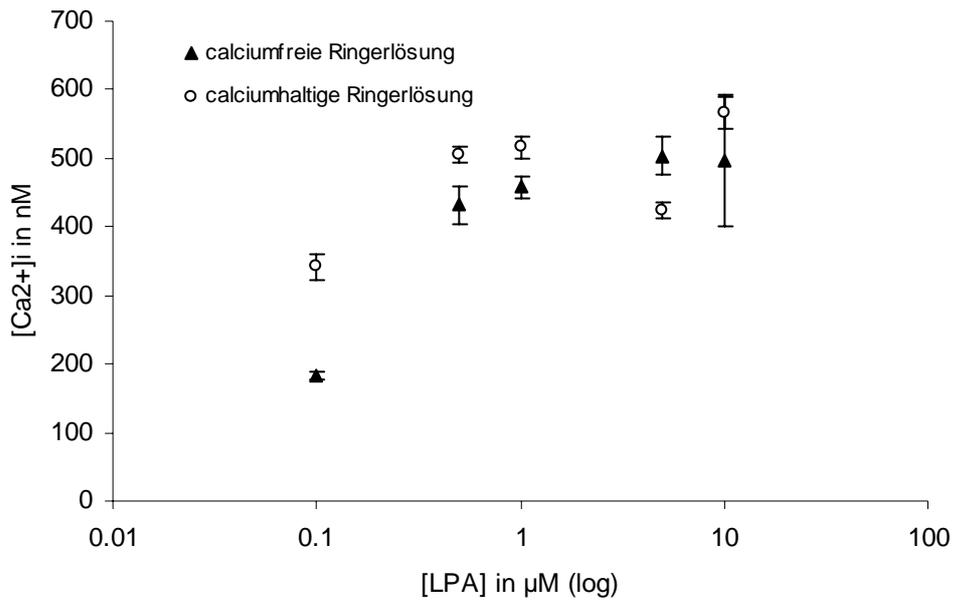


Abbildung 8 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen im Vergleich: Calciumantworten auf LPA in calciumhaltiger und calciumfreier Ringerlösung

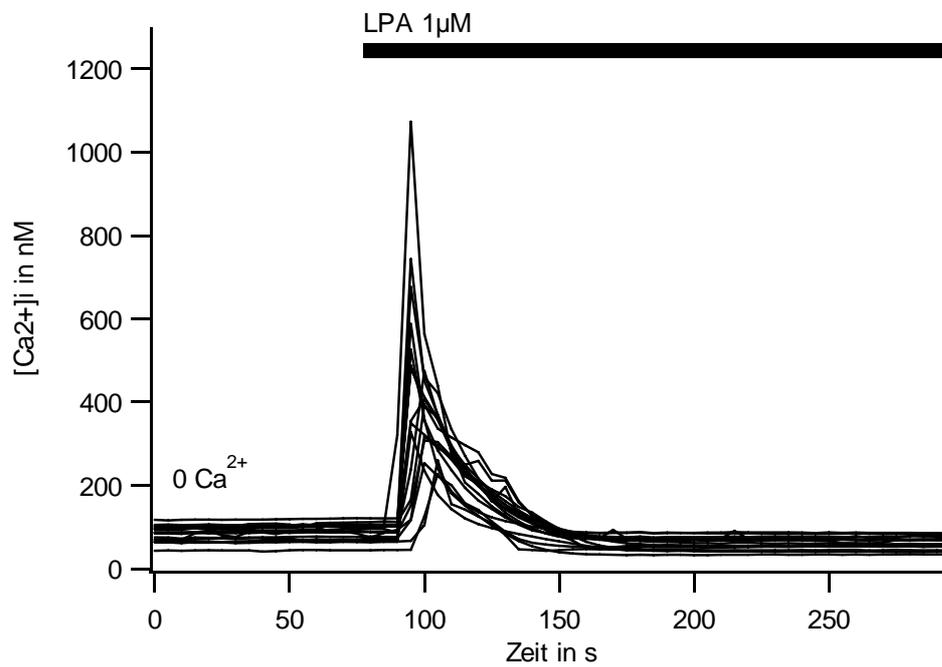


Abbildung 9 Kinetik eines Experiments, bei dem $1 \mu M$ LPA zu den Mikrogliazellen appliziert wurde. Calciumantwort von Mikroglia in calciumfreier Ringerlösung

Bei einer Konzentration von 100 nM LPA erreichte die intrazelluläre Calciumkonzentration $182,99 \pm 6,56$ nM bei $n = 92$. Eine Applikation von 500 nM LPA führte zur Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels auf $431,41 \pm 26,64$ nM bei $n = 132$, von 1 μ M LPA auf $457,74 \pm 16,4$ nM bei $n = 217$. Das durchschnittliche Maximum der Calciumantwort auf 5 μ M LPA betrug in 166 untersuchten Zellen $503,33 \pm 27,1$ nM und auf 10 μ M LPA $495,63 \pm 94,95$ nM in 96 Zellen. Nicht nur die Höhe der Ca^{2+} -Signale in beiden Lösungen glichen sich, sondern auch die Form der Antwort. Abbildung 9 zeigt das typische transiente, schnelle Ca^{2+} -Signal nach LPA-Stimulation.

3.1.3 LPA in calciumfreier Ringerlösung und mit entleerten Calciumspeichern der Mikroglia

Aus dem vorigen Abschnitt geht hervor, dass die intrazellulären Ca^{2+} -Signale nach LPA-Applikation unabhängig vom Vorhandensein extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen sind. Es entsteht die Vermutung, dass es sich bei der LPA-Antwort um eine Freisetzung des Calciums aus intrazellulären Speichern handelt. Um diese Annahme zu verifizieren, wurde der calciumfreien Ringerlösung 1 μ M Thapsigargin hinzugefügt. Thapsigargin ist ein Ca^{2+} -ATPase-Inhibitor, der das Wiederauffüllen der Ca^{2+} -Speicher gegen den Gradienten unterdrückt. In Abbildung 10 ist ein Beispiel für ein Experiment gezeigt, in dem Mikroglia sich in calciumfreier Lösung befindet. Nach dem Einwaschen von 1 μ M Thapsigargin kann ein geringer Calciumanstieg beobachtet werden, der der Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher entspricht. Im Folgenden konnte durch 5 μ M LPA keine Calciumantwort ausgelöst werden, da die intrazellulären Calciumspeicher geleert waren. Dieses Verhalten konnte in 10 Experimenten an 439 Zellen bestätigt werden.

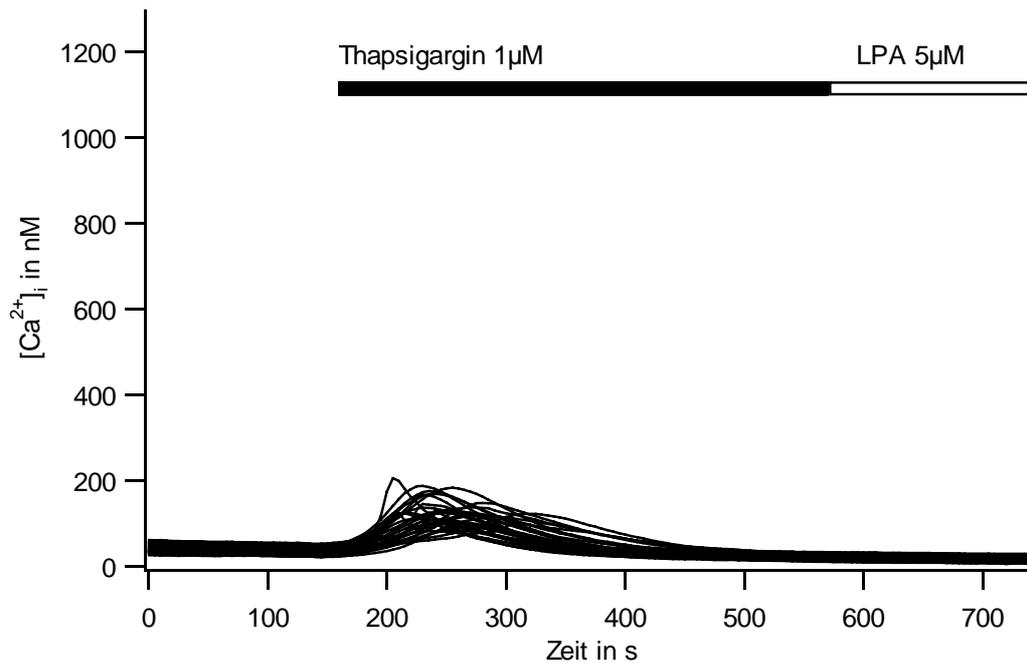


Abbildung 10 Kinetik eines Experiments, bei dem in calciumfreier Ringerlösung mit Hilfe von Thapsigargin die intrazellulären Calciumspeicher entleert wurden und anschließend 5 μ M LPA appliziert wurden

3.2 S1P in calciumhaltiger und calciumfreier Ringerlösung

Anschließend wurde mit Hilfe des Calciumimaging die Wirkung eines zweiten Lysophospholipids, dem Sphingosin-1-phosphat (S1P) auf den Calciumspiegel muriner Mikroglia überprüft. In Abbildung 12 ist ein Versuch dargestellt, bei dem sich die Mikroglia in calciumhaltiger Ringerlösung befand und 5 μ M S1P appliziert wurden. Man erkennt ähnlich zu den Versuchen mit LPA einen schnellen, transienten Calciumanstieg. Auch das Verhalten der Mikroglia in calciumfreier Ringerlösung nach Applikation von 1 μ M S1P, wie man in Abbildung 12 sehen kann, gleicht dem nach Hinzufügen von LPA. Die Zellen zeigen auch in calciumfreier Ringerlösung einen transienten, schnellen Calciumanstieg mit einem ebenso schnellen Abfall.

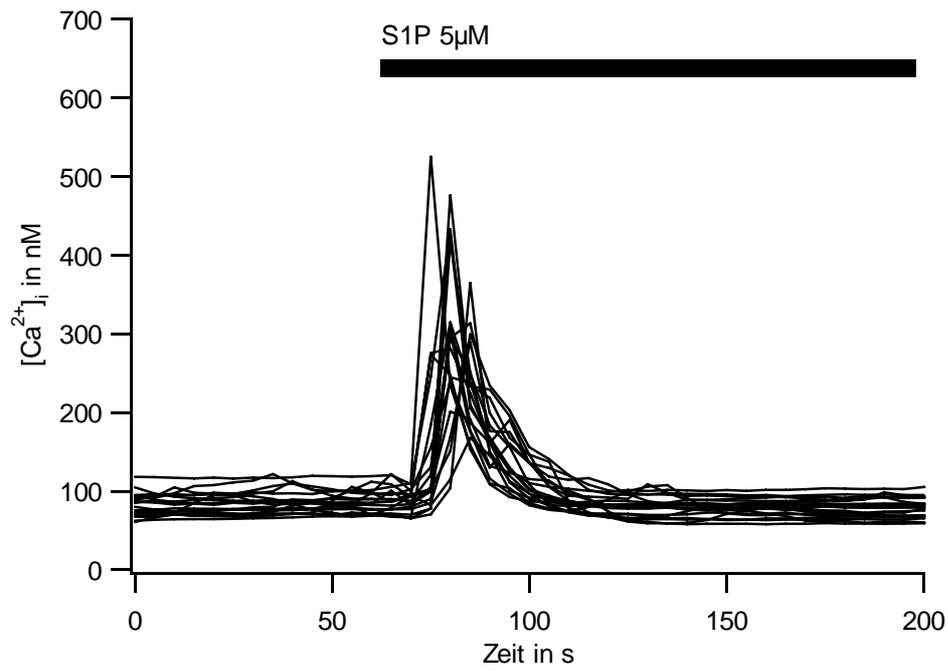


Abbildung 11 Applikation von 5µM S1P in calciumhaltige Ringerlösung

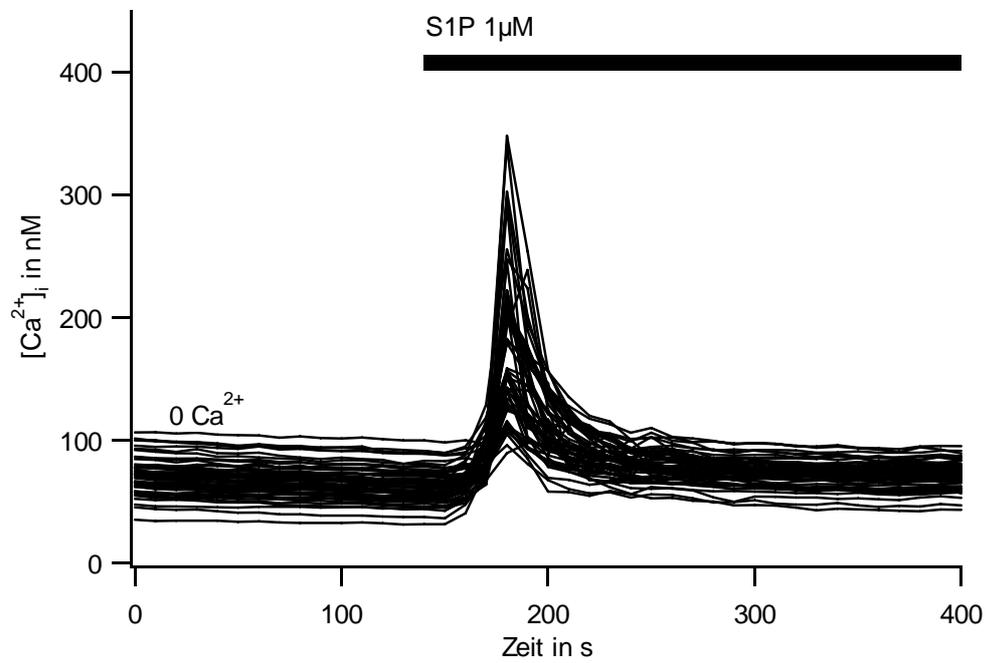


Abbildung 12 Applikation von 1µM S1P in calciumfreie Ringerlösung

3.3 LPC Calciummessungen

3.3.1 LPC in calciumhaltiger Ringerlösung

In einer nächsten Versuchsreihe wurde die Wirkung von Lysophosphatidylcholin (LPC), einem weiteren Vertreter aus der Familie der Lysophospholipide, auf den Calciumspiegel in Mikroglia untersucht.

In den Experimenten zur Bestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2 wurde ein bovines LPC verwendet. Für die Untersuchungen der pharmakologischen Eigenschaften in Abschnitt 3.3.3 wurde synthetisch hergestelltes LPC verwendet (LPC palmitoyl), das chemisch reiner ist und somit zum einen in geringeren Konzentrationen appliziert werden kann und andererseits das Risiko unspezifischer Antworten verringert. Die Form der Antwort unterscheidet sich aber nicht im Gegensatz zum bovinen LPC, wie in Abbildung 13 und Abbildung 15 zu erkennen ist.

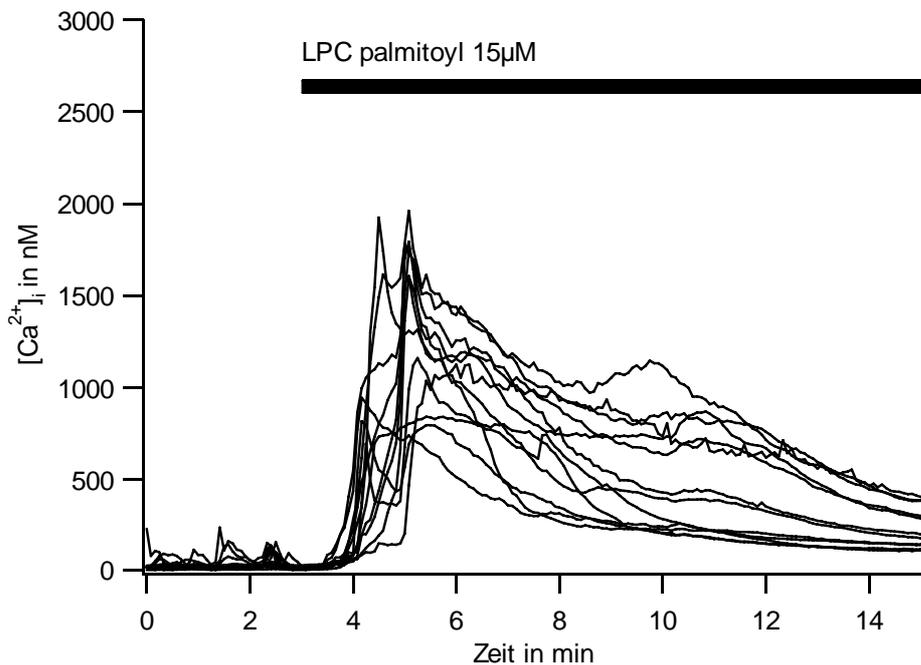


Abbildung 13 Applikation von 15 μ M LPC palmitoyl in calciumhaltiger Ringerlösung

Nach Applikation von 1 μ M LPC wurden keine Ca^{2+} -Antworten beobachtet. Bei einer

Konzentration von 10 μ M LPC wurde ein Calciumanstieg in 56,63% der untersuchten Zellen gesehen, wobei $[Ca^{2+}]_i$ im Mittel von $61,03 \pm 1,0$ nM, n = 520 (Kontrolle) auf $191,94 \pm 16,60$ nM (n = 47) anstieg. Schon bei 25 μ M LPC gab es in 100% der untersuchten Zellen eine Antwort, die im Durchschnitt auf $111,24 \pm 7,29$ nM (n= 37) anstieg. Für die Konzentrations-Wirkungskurve, die in Abbildung 14 gezeigt wird, wurde weiterhin die Wirkung von 40 μ M LPC untersucht, die zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration auf $188,47 \pm 13,01$ nM, n = 39 führte. Bei 50 μ M LPC erfolgte ein Anstieg des Calcium auf $832,26 \pm 42,85$ nM, der in 192 Zellen untersucht wurde. Bei 75 μ M LPC betrug der Calciumspiegel $1283,29 \pm 68,66$ nM, n = 55 und bei 100 μ M LPC $1192,41 \pm 93,90$ nM, n=78. Die halb-maximale LPC-Konzentration wurde bei 48,1 μ M beobachtet. Bei hohen Konzentrationen ab 75 μ M LPC wurde ein Teil der Zellen zerstört. Als Kriterium für den Zelltod wurde ein rascher Verlust des Fluoreszenzsignals herangezogen, welches durch das Ausfließen des Farbstoffs erklärbar wird. Diese Zellen wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen.

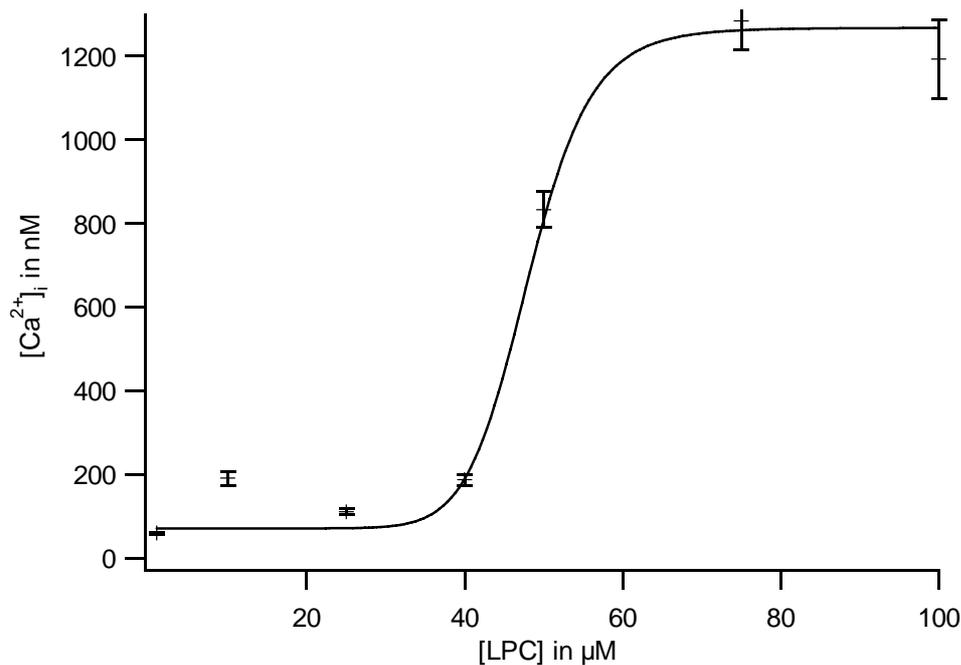


Abbildung 14 Konzentrations-Wirkungs-Kurve, bei der die applizierte LPC-Konzentration gegen die durchschnittliche maximale Calciumkonzentration in Mikrogliazellen aufgetragen ist. Die Experimente wurden in calciumhaltiger Ringerlösung durchgeführt.

Die Daten wurden mit der Hill-Gleichung angepasst, woraus sich folgende Werte ergaben: $y_{\max} = 1266,7 \pm 444$ nM, $y_{\text{base}} = 71,6 \pm 17,4$ nM, $x_{1/2} = 48,1 \pm 7,9$ μ M.

Die Form der Calciumantwort war konzentrationsabhängig. Bei geringeren Konzentrationen bis 25 μ M LPC reagierten die Zellen mit einem transienten Anstieg. Diese transienten Calciumanstiege waren jedoch deutlich langsamer als die in Mikroglia beobachteten Calciumsignale nach LPA-Stimulation. Dies betraf sowohl den Anstieg als auch den Abfall des Calciumsignals (Abbildung 15). Bei höheren Konzentrationen ab 50 μ M reagierten die Zellen mit einer schnellen Komponente, die dann in ein länger anhaltendes Plateau überging (Abbildung 17).

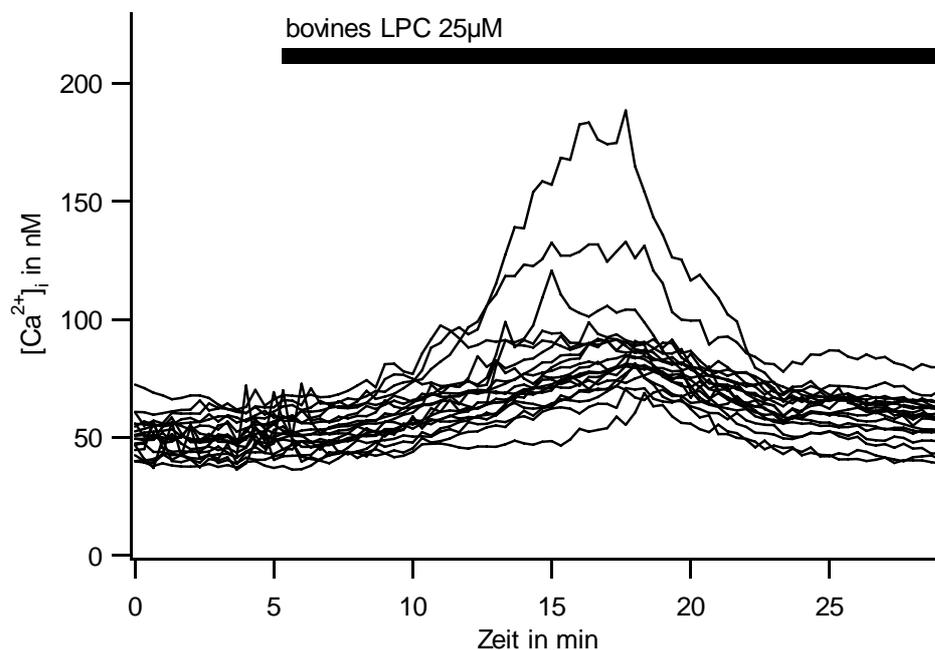


Abbildung 15 LPC in calciumhaltiger Ringerlösung Applikation von 25 μ M LPC mit transienter Antwort

3.3.2 LPC in calciumfreier Ringerlösung

Auch in dieser Versuchsreihe stellte sich die Frage, ob das Calcium aus intrazellulären Kompartimenten oder aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol strömt. Es wurden erneut verschiedene Konzentrationen des LPC appliziert, diesmal jedoch in calciumfreier, EGTA-gepufferter Ringerlösung.

Der Calciumruhespiegel wurde vor dem Einwaschen des LPC bestimmt. Dieser betrug 44,48 nM

$\pm 0,88$ nM (n=243). Im Anschluss wurde LPC in den Konzentrationen von 1, 25, 50 und 75 μ M eingewaschen. Die daraufhin gemessenen intrazellulären Calciumkonzentrationen unterschieden sich nicht von dem vorher bestimmten Calciumruhespiegel (LPC 1 μ M: $45,58 \pm 1,37$ nM, n = 48; LPC 25 μ M: $45,38 \pm 0,96$ nM, n = 44; LPC 50 μ M: $52,80 \pm 1,2$ nM, n = 128; 75 μ M: $41,72 \pm 2,49$ nM, n = 23). Ein Experiment dazu ist in Abbildung 16 gezeigt. In Abbildung 17 ist zu erkennen, dass sich das durch LPC ausgelöste Ca^{2+} -Signal durch Einwaschen Ca^{2+} -freier Ringerlösung abrupt beenden ließ, da notwendiges Calcium aus dem Extrazellulärraum nun nicht mehr zur Verfügung steht.

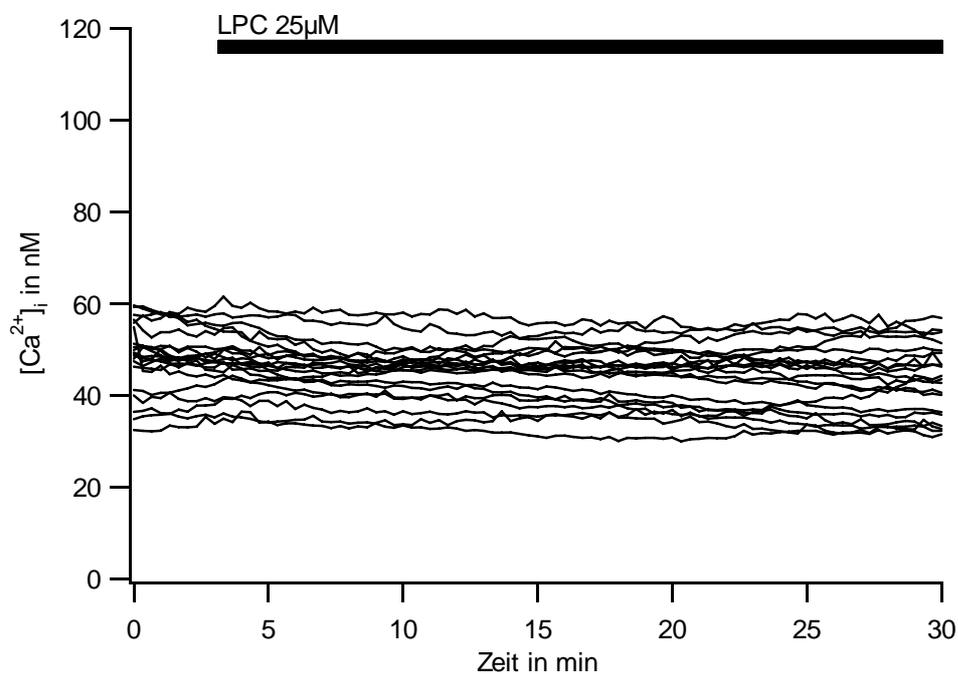


Abbildung 16 Durch Applikation von 25 μ M LPC in calciumfreier Ringerlösung kann kein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg ausgelöst werden

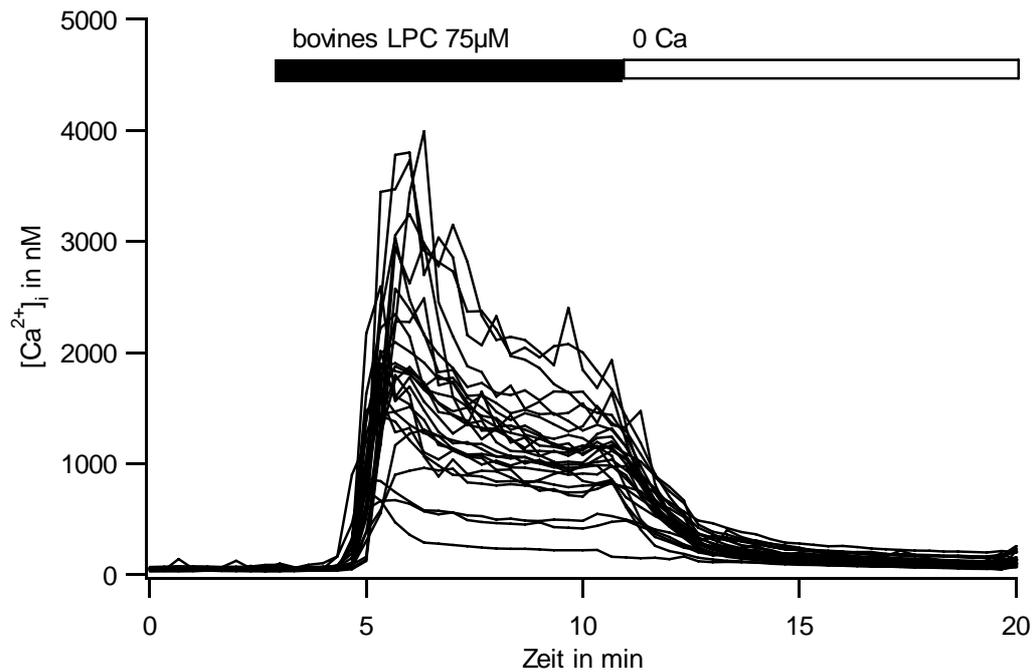


Abbildung 17 Applikation von 75 μ M LPC mit Calciumantwort in Plateauform, die durch Einwaschen calciumfreier Ringerlösung (0Ca²⁺) zu beenden ist

In Abbildung 18 ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von LPC im Vergleich von Ca²⁺-haltiger zu Ca²⁺-freier Ringerlösung gezeigt.

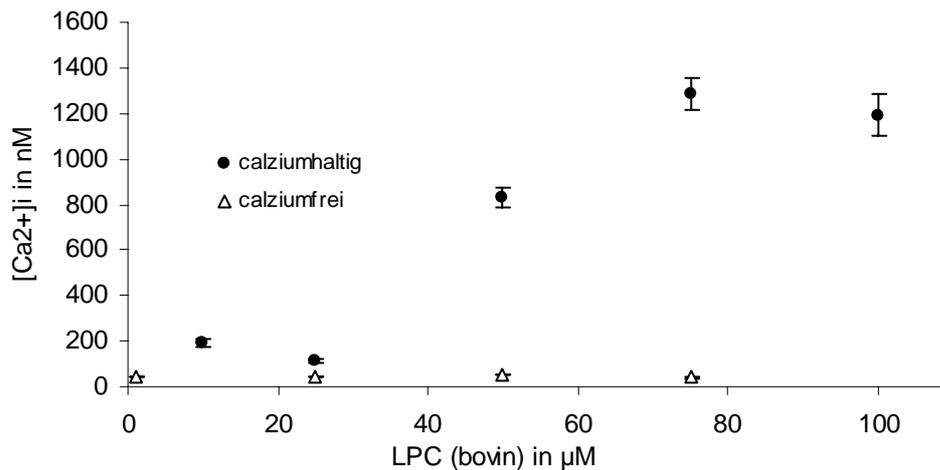


Abbildung 18 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen im Vergleich: Mikrogliazellen reagieren nicht auf LPC-Applikation in Ca²⁺-freier Ringerlösung

Die vorherigen Experimente legen die Vermutung nahe, dass - im Gegensatz zum LPA-induzierten Ca^{2+} -Signal - die Ca^{2+} -Signale nach LPC-Applikation durch einen Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum zustande kommen.

3.3.3 Pharmakologische Eigenschaften der LPC-Antworten

Um die Eigenschaften des Calciumanstiegs nach LPC und mögliche Kanäle, worüber der Ca^{2+} -Einstrom stattfinden könnte, weiter zu charakterisieren, wurden Experimente durchgeführt, bei denen verschiedene pharmakologische Blocker angewendet wurden.

Die Experimente wurden in Ringerlösung durchgeführt, die das jeweilige Pharmakon schon vor dem Einwaschen des LPC enthielt.

Zunächst wurde die Wirkung von Gadolinium auf den Calciumeinstrom untersucht. Gadolinium ist ein polyvalentes Kation, welches die Eigenschaft besitzt, unselektive Kationenkanäle zu inhibieren. Es wurde in einer Konzentration von 1 mM eingewaschen, was die maximale Calciumantwort nach Applikation von 15 μM LPC von $1630,36 \pm 130,8$ nM, $n = 78$ (Positivkontrolle) auf $95,56 \pm 3,94$ nM ($n = 65$) verringert hat. Dieselbe inhibierende Wirkung wurde bei einer geringeren Konzentration von Gadolinium beobachtet. 100 μM Gadolinium verringerten die Calciumantwort nach Applikation von 15 μM LPC auf $102,88 \pm 3,94$ nM ($n = 191$).

Lanthan, welches eine ähnliche Funktionsweise wie Gadolinium aufweist, wurde zunächst in der Konzentration von 1mM appliziert. Auch Lanthan konnte die Calciumantwort fast vollständig, auf $109,6 \pm 5,24$ nM ($n = 35$), reduzieren. Schon 100 μM Lanthan genügte, um einen wesentlichen Block zu erzielen ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ $188,37 \pm 16,25$ nM, $n = 61$). Im Student's t-Test konnte für sämtliche Blocker ein Signifikanzniveau von $p < 0,001$ ermittelt werden. In Abbildung 19 ist die inhibierende Wirkung der Blocker graphisch dargestellt.

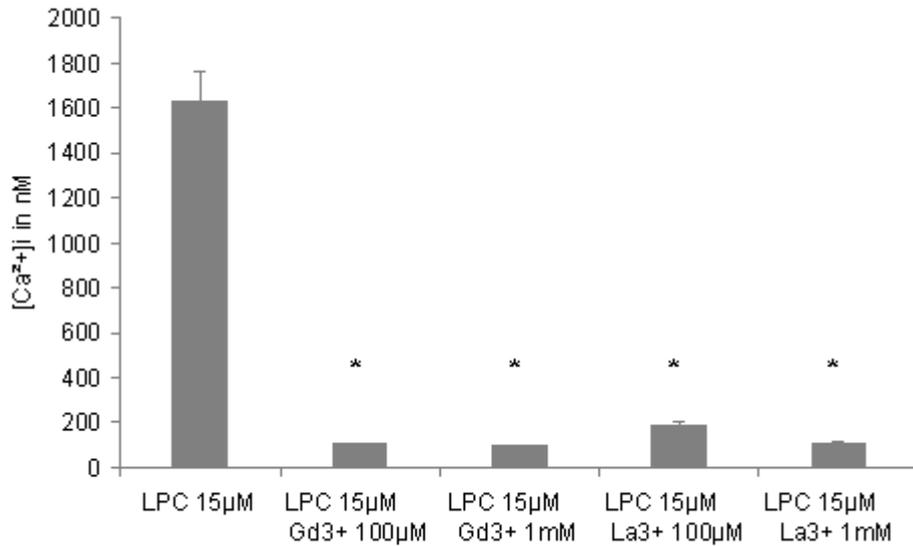


Abbildung 19 Inhibierende Wirkung der Blocker Gadolinium und Lanthan im Vergleich zur Kontrolle mit 15 µM LPC

In der Literatur wurde postuliert, der LPC-induzierte Ca²⁺-Einstrom würde über PAF-Rezeptoren vermittelt werden (Ogita et al. 1997). Ein teilweiser Block konnte mit Hilfe des platelet-activating-factor- (PAF-) Antagonisten, einem Ginkgolid (BN52021), erreicht werden. Im Gegensatz zur Kontrolle, bei der 50 µM des bovinen LPC appliziert und eine durchschnittliche maximale Calciumkonzentration von 1619,66 ± 229,55 nM (n = 63) gemessen wurde, erreichten die Calciumwerte nach Zugabe von 50 µM LPC bei gleichzeitigem Vorhandensein von 10 µM Ginkgoliden im Mittel 623,45 ± 49,82 nM (n = 51). Mit Hilfe des Student's t-Test wurde belegt, dass beide Ca²⁺-Maxima signifikant unterschiedlich sind (p < 0,001). In Abbildung 20 ist der partielle Block graphisch dargestellt.

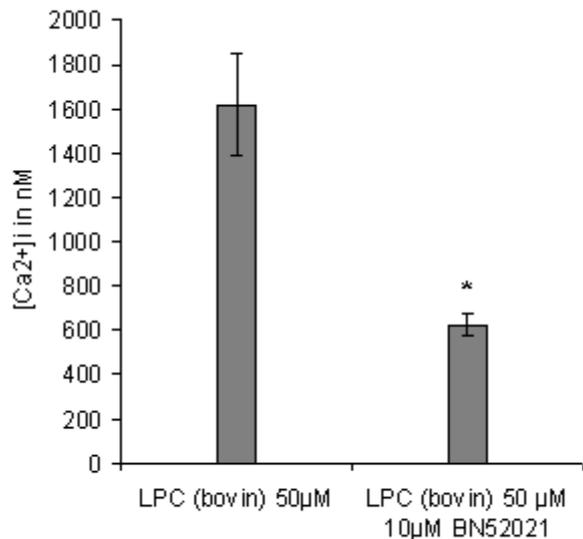


Abbildung 20 maximale intrazelluläre Calciumkonzentrationen in Mikroglia nach Applikation von 50 µM bovinem LPC; inhibierende Wirkung der Ginkgolide im Vergleich zur Positivkontrolle

3.4 LPC und Morphologieänderungen der Mikroglia

Nach Abschluss einer jeden ratiometrischen Fluoreszenzuntersuchung fiel auf, dass sich die Morphologie der Mikroglia massiv verändert hatte. In Abbildung 21A ist eine Aufnahme der Zellen vor einem Experiment gezeigt. Darauf erkennt man die Zellkörper in spindelförmiger Form mit einzelnen Verzweigungen, so genannten Rami. In Abbildung 21B sieht man eine klare Veränderung der mit 15µM LPC behandelten Zellen. Die vorher ramifizierte Zellen haben innerhalb von Sekunden bis Minuten eine amöboide Form angenommen. Sie sind größtenteils kugelförmig, es ist keine Verzweigung mehr zu erkennen. Diese Zellform wird allgemein als die aktivierte Form angesehen, da die Zellen nun die Fähigkeit zur Migration besitzen.

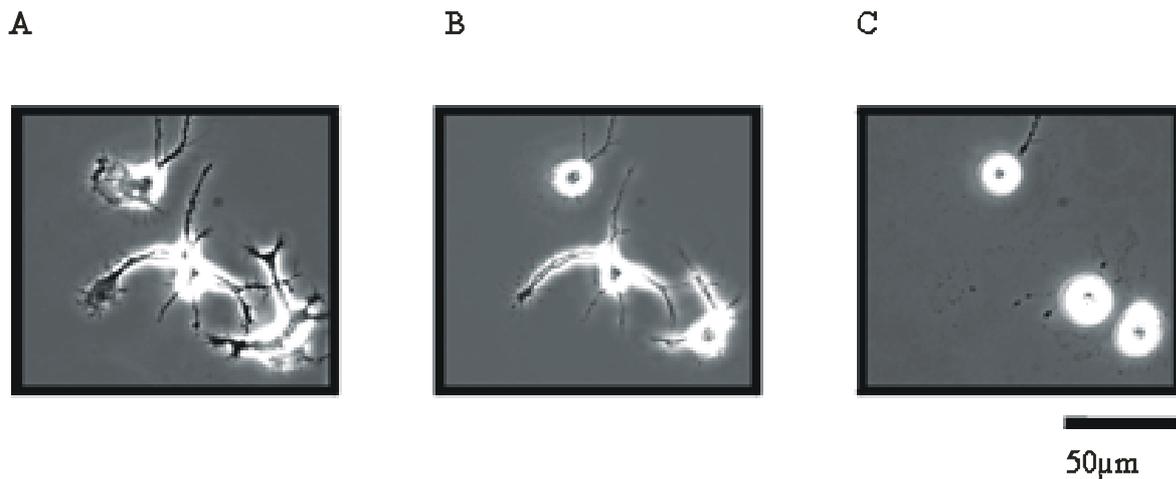


Abbildung 21 Morphologieänderungen primärer Mikroglia durch LPC

- A unbehandelte Mikroglia im Ruhezustand
- B Mikroglia nach der Applikation von 15µM LPC nach 15 min
- C und nach 30 min

3.5 LPA pH_i-Messungen

Im nächsten Abschnitt wurde die Wirkung der Lysophosphatidsäure (LPA) auf den intrazellulären pH-Wert betrachtet. Dafür wurde ebenfalls die Technik des Fluoreszenzimagings herangezogen, wie sie in Abschnitt 2.4 beschrieben wurde. Als pH-sensibler Farbstoff wurde BCECF verwendet.

3.5.1 LPA in calciumhaltiger Ringerlösung

Im ersten Versuchsaufbau wurden die Mikrogliazellen in calciumhaltige Ringerlösung gegeben. Es wurden 500 nM LPA zu den Zellen gegeben, was nach 20 Minuten zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals des BCECF (F_{440}/F_{490}) um $7,8\% \pm 0,6$ in 87 von 117 beobachteten Zellen (das entspricht 74,4%) führte. Der Anstieg des ratiometrischen Fluoreszenzsignals bedeutet eine Ansäuerung des intrazellulären Milieus. 5 µM LPA führten zu einem Anstieg um $11,63\% \pm 0,59$. Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals fand in 202 von 232 Zellen statt, was einem Prozentsatz von 87,07% entspricht.

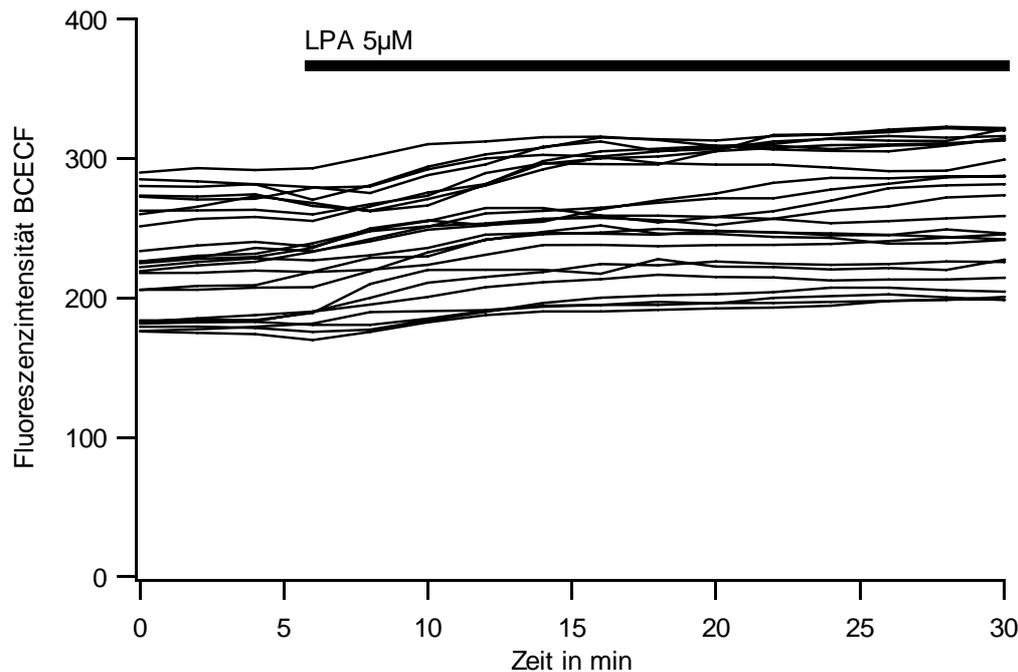


Abbildung 22 Kinetik eines pH-Imagingexperiments; eine Erhöhung des ratiometrischen BCECF-Fluoreszenzsignals bedeutet ein pH-Abfall; Applikation von 5µM LPA in calciumhaltige Ringerlösung

In Abbildung 24 ist dies graphisch dargestellt. In der Kontrolluntersuchung, in der kein Agens hinzugefügt wurde, wurde eine minimale Änderung des Fluoreszenzsignals um $0,1\% \pm 0,41$ ($n = 248$) gemessen, also eine minimalste Änderung ins Basische, was als steady state anzusehen ist.

In Abbildung 22 ist ein Beispiel für eine Messung abgebildet, in der man die Kinetik des langsamen Anstieges des Fluoreszenzsignals erkennt. Eine Erhöhung der Intensität bedeutet dabei eine Verminderung des pH-Wertes.

3.5.2 LPA in calciumfreier Ringerlösung

In den nächsten Experimenten spielte die Überlegung eine Rolle, ob die in Abschnitt 3.1.1 bis 3.1.3 beschriebenen Calciumantworten in Zusammenhang mit den beobachteten pH-Änderungen stünden. Aus diesem Grund wurden Experimente in calciumfreier Ringerlösung durchgeführt, in der zusätzlich 1µM Thapsigargin enthalten war, so dass ein intrazellulärer Calciumanstieg nach Applikation des LPA ausgeschlossen werden konnte. Im Folgenden wurden 0,5 µM LPA appliziert. 0,5 µM LPA erhöhte die Intensität des Fluoreszenzsignals um $11,54\% \pm 0,62$ in 102

von 140 untersuchten Zellen (72,9 %). Eine Konzentration von 5 μM LPA zog einen Anstieg des Fluoreszenzsignals von $7,60 \% \pm 0,54$ in 103 von 146 untersuchten Zellen (70,55 %) nach sich. Die Abbildung 24 zeigen, dass sich diese Antworten nicht wesentlich von denen, die in calciumhaltiger Ringerlösung gemessen wurden, unterschieden. Demnach scheint die Anwesenheit extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen in keinem Zusammenhang mit den LPA-induzierten pH-Änderungen zu stehen.

3.5.3 LPA und DPI

In einer weiteren Versuchsreihe wurde Diphenyleneiodonium (DPI) eingesetzt. DPI ist ein Pharmakon, das die NADPH-Oxidase inhibiert, welche für die gemessene Freisetzung von Protonen ins Cytoplasma verantwortlich sein könnte.

Zunächst wurde die Mikroglia in eine calciumhaltige Ringerlösung mit $10\mu\text{M}$ DPI gebracht. nach Zugabe von 500nM LPA erhöhte sich das Fluoreszenzsignal um $11,53 \% \pm 0,53$. Diese Ansäuerung wurde in 128 Zellen beobachtet, wobei es sich um 96,97% aller untersuchten Zellen handelte.

Gab man in die calciumhaltige Lösung mit $10\mu\text{M}$ DPI das LPA in einer Konzentration von $5\mu\text{M}$ hinzu, belief sich der Anstieg des Fluoreszenzsignals auf $17,27 \% \pm 0,74$ ($n = 127$), wobei sich in 94,07% der beobachteten Zellen eine Ansäuerung feststellen ließ. Die Änderungen des Fluoreszenzsignals sind in Abbildung 24 graphisch dargestellt.

Weiterhin wurde überprüft, wie LPA den intrazellulären pH-Wert beeinflusst, wenn sich die Zellen in einem Medium aus calciumfreier Ringerlösung, $1\mu\text{M}$ Thapsigargin und $10\mu\text{M}$ DPI befinden. Auch in calciumfreier Lösung führten 500 nM LPA zu einer Ansäuerung, bei der das Fluoreszenzsignal um $10,73\% \pm 0,70$ ($n = 98$; 93,3 % der ausgewerteten Zellen) verändert wurde. Eine Konzentration des LPA von $5\mu\text{M}$ führte zu einer Änderung um $14,31\% \pm 0,86$ ($n = 95$) in 96% der Zellen. Dieser Effekt von DPI auf den intrazellulären pH-Wert ist in Abbildung 24 und Abbildung 24 graphisch dargestellt. Die Kinetik des pH-Abfalls blieb unter den verschiedenen Bedingungen unverändert, so dass davon auszugehen ist, dass DPI keinen Einfluss auf die LPA-bedingten pH-Änderungen hat.

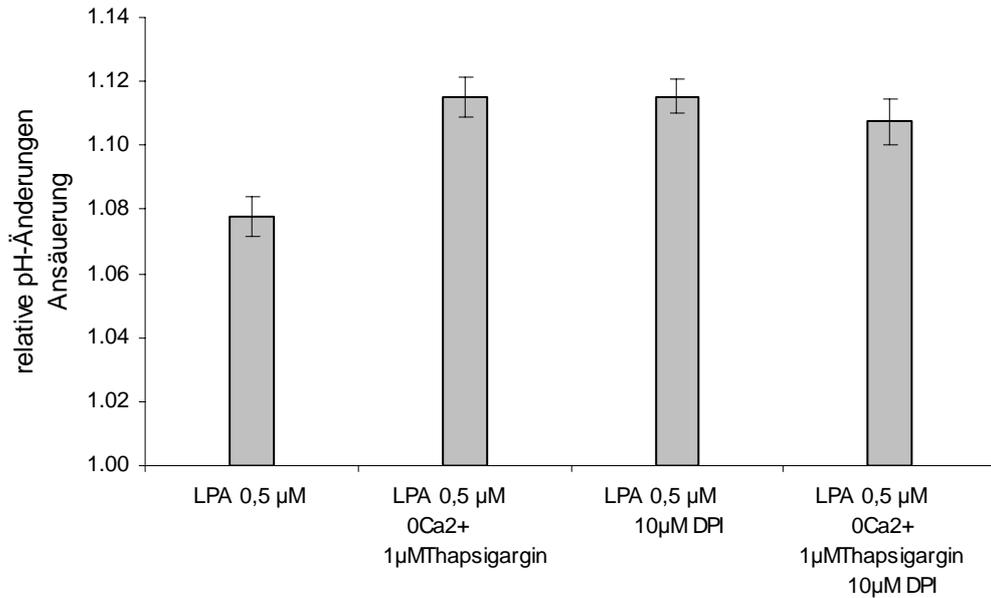


Abbildung 23 relative Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F_0$) des BCECF-Signals nach Applikation von 500 nM LPA in Ca^{2+} -freier, DPI-haltiger und Ca^{2+} -freier DPI-haltiger Messlösung

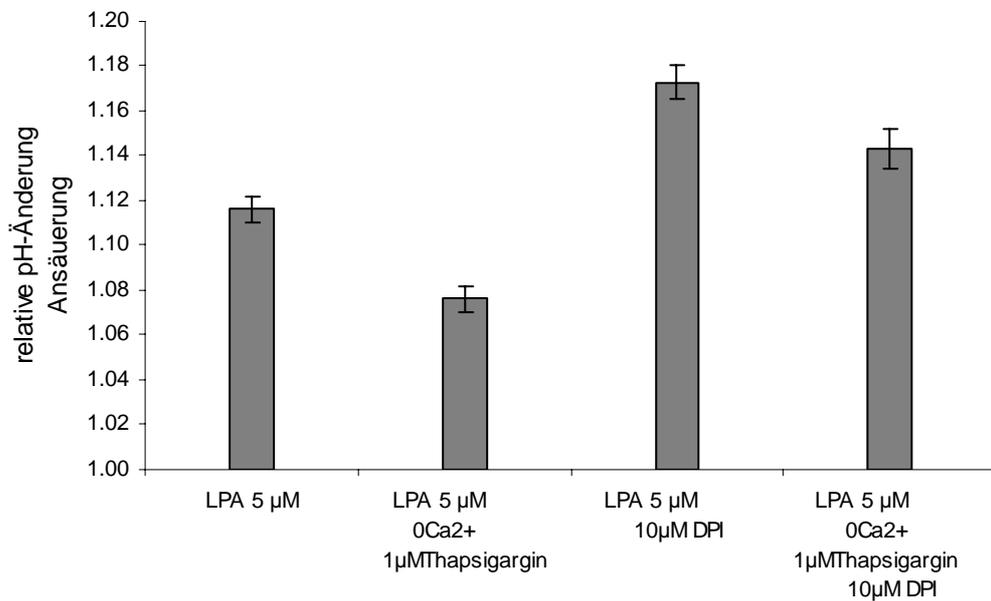


Abbildung 24 relative Änderung der Fluoreszenzintensität ($\Delta F/F_0$) des BCECF-Signals nach Applikation von 5 μM LPA in Ca^{2+} -freier, DPI-haltiger und Ca^{2+} -freier DPI-haltiger Messlösung

3.6 LPC und pH_i-Messungen

3.6.1 LPC in calciumhaltiger Ringerlösung

Da mit LPA ein ansäuernder Effekt auf die Mikroglia gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob die Mikroglia in gleicher Weise auf Lysophosphatidylcholin reagieren würde. Dabei wurde berücksichtigt, in welcher LPC-Konzentration eine Calciumantwort zu eruieren war. Es wurde bovines LPC in einer Konzentration von 10, 25, 50 und 75 μM appliziert. In Abbildung 25 ist die Abhängigkeit der Änderung des Fluoreszenzsignals von der applizierten LPC-Konzentration dargestellt. 10 μM LPC führten zu einer Änderung des Fluoreszenzsignals um $5,67\% \pm 0,41$, was in 70 von 99 Zellen gemessen wurde und einem Prozentsatz von 70,7% entspricht. Wurden 25 μM LPC verwendet, erhöhte sich die Fluoreszenzintensität um $10,15\% \pm 0,98$ (n = 66, das sind 53,2% der gesamt beobachteten Zellen). Eine deutliche Erhöhung der intrazellulären Protonenkonzentration zeigte sich nach Applikation von 50 μM LPC. Die gemessene Fluoreszenzintensität erhöhte sich um $19,12\% \pm 0,73$. Diese Ansäuerung erfolgte in 79,3% der untersuchten Zellen (n = 165). Ein Abfall des pH-Wertes in 100% der Zellen wurde bei einer LPC-Konzentration von 75 μM gemessen (n = 69). Die relative Änderung betrug hierbei $33,49\% \pm 1,25$.

Betrachtet man die Kinetik eines Experiments mit Applikation von 50 μM LPC in calciumhaltige Ringerlösung (Abbildung 26), kann man auch hier wie nach Applikation von LPA einen langsamen Anstieg des Fluoreszenzsignals über 6 Minuten beobachten, das in ein Plateau ohne weitere Niveauänderungen übergeht.

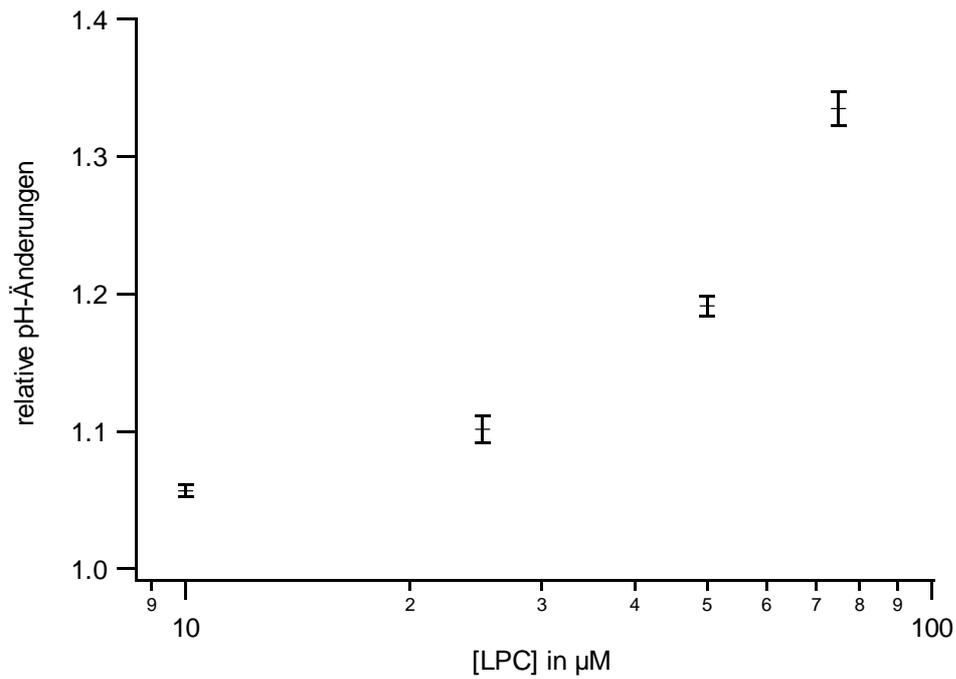


Abbildung 25 Konzentrationsabhängige, relative pH-Änderungen in Mikroglia nach Applikation von LPC in calciumhaltige Ringerlösung

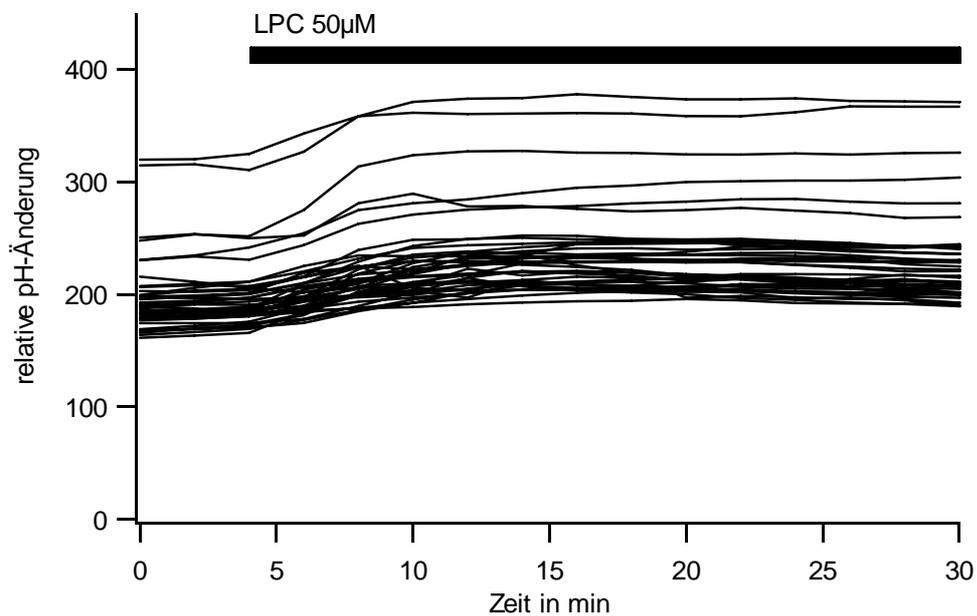


Abbildung 26 Kinetik eines pH-Imaging-Experiments, bei dem die Zeit in Minuten zur Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignals abgetragen wurde; Applikation von $50\mu\text{M}$ LPC in calciumhaltige Ringerlösung

3.6.2 LPC in calciumfreier Ringerlösung

Um den Anstieg der intrazellulären Protonenkonzentration zu charakterisieren, wurden weitere Versuche unter veränderten extrazellulären Bedingungen durchgeführt. In calciumfreier Ringerlösung konnte in Mikrogliazellen keine Ca^{2+} -Antwort durch LPC ausgelöst werden. Es stellte sich nun die Frage, ob dies einen Einfluß auf die gezeigten pH-Änderungen besitzt. Dabei wurde eine Applikation des LPC in Höhe von $50\mu\text{M}$ bevorzugt, da im Abschnitt 3.6.1 gezeigt wurde, dass bei dieser Konzentration eine deutliche pH-Änderung in einem Großteil der Zellen auftritt. Höhere Konzentrationen wie $75\mu\text{M}$ führten zwar zu einer Ansäuerung in 100 % der Zellen, bedeuteten aber gleichzeitig auch einen vermehrten Stress für die Mikroglia.

In Anlehnung an die Fluoreszenzmessungen zum Calciumsignal, in der in calciumfreier Ringerlösung keine Antwort mehr ausgelöst werden konnte, wurden Experimente durchgeführt, bei denen das Verhalten des intrazellulären pH-Wertes in calciumfreier Ringerlösung nach Applikation von $50\mu\text{M}$ LPC beobachtet wurde. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals betrug $20,67\% \pm 1,15$ ($n = 109$) in 83,8% aller untersuchten Zellen (Abbildung 27).

3.6.3 LPC und DPI

Zusätzlich wurde die Wirkung von DPI in pH-Imaging-Experimenten untersucht. Nach Applikation des LPC in calciumhaltige Ringerlösung mit 100 nM DPI betrug der Anstieg des Fluoreszenzsignals $28,90\% \pm 1,55$ ($n = 75$). In 87,2% der Zellen wurde eine Ansäuerung festgestellt. Mit 100 nM DPI konnte die Ansäuerung nicht geblockt werden. Auch eine Erhöhung des DPI auf $10\mu\text{M}$ zeigte kaum einen Effekt auf das gemessene Fluoreszenzsignal im Vergleich zur Positivkontrolle. Der Anstieg des Quotienten aus F_{440}/F_{490} nach Applikation der $50\mu\text{M}$ LPC betrug $16,43\% \pm 0,92$ ($n = 81$). Dieser Abfall des pH-Wertes wurde in 82,65% der Zellen beobachtet. Die graphische Darstellung der Änderung des pH-Wertes ist in Abbildung 27 gezeigt.

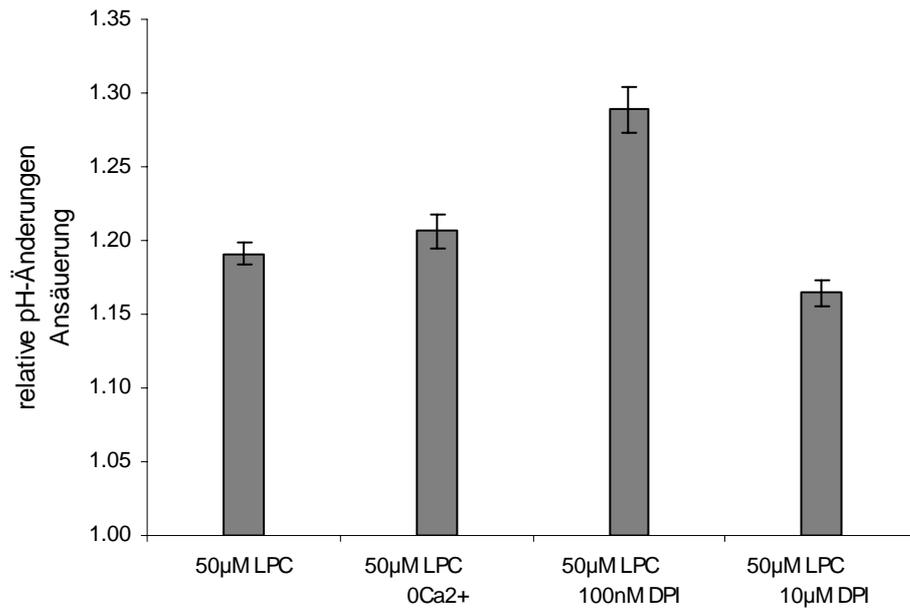


Abbildung 27 Änderung des intrazellulären pH-Wertes der Mikroglia (relative Werte) nach Applikation von 50 µM LPC in unterschiedlichen Messlösungen

3.7 ZUSAMMENFASSUNG

1. CALCIUM-MESSUNGEN

- LPA und S1P triggern einen transienten Calciumanstieg in muriner Mikroglia sowohl in physiologischer, calciumhaltiger, als auch in calciumfreier Ringerlösung. Nach Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher ist in calciumfreier Ringerlösung durch LPA keine Calciumantwort mehr möglich.

LPA und S1P führen also zu einer Calciumfreisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern.

- LPC führt zu einem verlängerten Calciumanstieg mit einem Plateau in calciumhaltiger Ringerlösung, der in calciumfreier Ringerlösung nicht mehr auslösbar ist. Calciumanstiege nach Applikation von LPC sind auf einen Einstrom des Calciums aus dem Extrazellulärraum zurückzuführen.
- Die Calciumantwort in calciumhaltiger Ringerlösung nach Applikation von LPC lässt sich fast vollständig durch Gadolinium und Lanthan inhibieren, durch Ginkgolide nur teilweise.

2. MORPHOLOGIE

- LPC führt zu einer Morphologieänderung der Mikroglia von der ramifizierten in die amöboide Zellform.

3. pH-WERT-MESSUNGEN

- LPA und LPC senken den pH-Wert in Mikrogliazellen.
- Der pH-Abfall ist calciumunabhängig.
- DPI blockt nicht den pH-Abfall nach Applikation von LPA und LPC.

4 Diskussion

4.1 LPA-induzierte Calciumantworten in Mikroglia

In der vorliegenden Arbeit wurden Aktivierungsprozesse von Mikrogliazellen in Zellkultur durch die Stoffgruppe der Lysophospholipide untersucht.

Die mit Lysophosphatidsäure (LPA) stimulierten murinen Mikrogliazellen zeigten einen transienten Calciumanstieg, die sich in calciumhaltiger als auch in calciumfreier und EGTA-gepufferter Ringerlösung auslösen ließen. Durch vorherige Zugabe von Thapsigargin, einem Ca^{2+} -ATPase-Inhibitor, der die intrazellulären Calciumspeicher entleert, konnten die Calciumsignale komplett verhindert werden. Das lässt den Schluss zu, dass die LPA-induzierte Calciumantwort in muriner Mikroglia über den Mechanismus der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern des endoplasmatischen Retikulums zustande kommt. Die intrazelluläre Calciumkonzentrationen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wiesen eine Abhängigkeit von der LPA-Konzentration auf und stiegen maximal bis auf Werte von 500 nM an.

Diese Beobachtungen werden von Schilling et al. (2002) und Möller et al. (2001) in anderen Zelllinien bestätigt. Über den gleichen Mechanismus des Calciumanstiegs verfügen LPA-stimulierte HEK-293-Zellen (humane embryonale Nierenzelllinie) und Astrozyten von Ratten (Eiras et al. 2004; Manning et al. 1997). In Mikrogliazellen von Ratten, humanen Makrophagen (Zelllinie U937) und in humanen Neutrophilen wurde im Unterschied dazu nach LPA-Applikation ein alleiniger Calciumeinstrom über die Membran beobachtet (Möller et al. 2001; Lee et al. 2004; Itagaki et al. 2005). Im Gegensatz zu Manning et al. (1997) berichtet Keller et al. (1997) über einen LPA-induzierten Calciumanstieg in Rattenastrozyten, der sowohl durch Freisetzung aus den Speichern als auch durch Einstrom von extrazellulärem Calcium hervorgerufen wird.

Eine Ursache für diese Unterschiede könnte die je nach Zelltyp verschiedene Expression bestimmter LPA-Rezeptoren darstellen. So wurden bis jetzt die für LPA spezifischen Rezeptoren, die aus der endothelial differentiation gene- (Edg-) Familie stammen, $\text{LPA}_1/\text{Edg-2}$, $\text{LPA}_2/\text{Edg-4}$, $\text{LPA}_3/\text{Edg-7}$ und außerdem der G-Protein-gekoppelte Rezeptor $\text{LPA}_4/\text{GPR23}$ identifiziert. Über diese G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wird auch die Calciumantwort

vermittelt (An et al. 1998; Fukushima et al. 2001; Noguchi et al. 2003).

In muriner Mikroglia konnte mRNA des LPA₁/Edg-2-Rezeptors, in Mikroglia von Ratten dagegen mRNA des LPA₂/Edg-4-Rezeptors nachgewiesen werden. In der auch in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie BV-2 wurde jedoch weder mRNA des LPA₁/Edg-2, noch des LPA₂/Edg-4 oder LPA₃/Edg-7-Rezeptors detektiert (Möller et al. 2001; Schilling et al. 2004). Da aber die BV-2-Zellen auf LPA identisch der murinen Mikroglia reagieren, könnten folgende verschiedene Erklärungen in Frage kommen.

In der Arbeit von Möller et al. (2001) könnten sich die BV-2-Zellen in einem anderen Aktivierungszustand als die Zellen in dieser Arbeit befunden haben. Tham et al. (2003) zeigt, dass sich die Expression verschiedener LPA- und S1P-Rezeptoren durch den Grad der Aktivierung der Mikrogliazellen verändern lässt. Das Niveau von mRNA von LPA₁/Edg-2 wurde durch die Exposition von S1P reduziert, von LPA₃/Edg-7 erhöht. Makrophagen reagierten auf die Behandlung mit S1P-haltigem HDL₃ (high density lipoprotein, Lipoproteine mit hoher Dichte) mit einer Hoch- oder Runterregulation der jeweiligen Rezeptoren.

Auch der Differenzierungsgrad von Zellen scheint einen Einfluss auf die Expression der LPA-Rezeptoren zu haben. So wurden LPA₁/Edg-2-Rezeptoren in differenzierten Makrophagen im Vergleich zu undifferenzierten Monozyten herunterreguliert (Duong et al. 2004).

Eine andere mögliche Erklärung liefert die Veröffentlichung von McIntyre et al. (2003), in der die These aufgestellt wird, dass LPA, welches aufgrund seines hydrophoben Charakters über die Membran in die Zelle aufgenommen werden kann, an intrazellulären Rezeptoren (so genannten peroxisomen proliferationsaktivierten Rezeptoren, PPAR- γ) wirkt. Ob diese Rezeptoren für den Calciumeinstrom nach Applikation von LPA verantwortlich sein könnten, ist allerdings noch nicht geklärt.

Zuletzt könnte das LPA-induzierte Calciumsignal auch über andere Rezeptoren der Edg-Familie, die spezifisch auf S1P reagieren, vermittelt sein.

Der in muriner Mikroglia identifizierte LPA₁/Edg-2-Rezeptor zeigte folgende Charakteristika: Pertussistoxin (PTX) und U73122 (ein Phospholipase C-Inhibitor) besitzen eine inhibierende Wirkung auf das Calciumsignal, welches mit einer gleichzeitigen Produktion von Inositoltriphosphat einhergeht. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass LPA₁/Edg-2-Rezeptoren die Calciummobilisierung größtenteils über PTX-sensitive G_i-Proteine mit nachfolgender Phospholipase C-Aktivierung vermitteln (An et al. 1998).

Die physiologische LPA- beziehungsweise S1P-Konzentration kann bis zu 10 μM erreichen und liegt im normalen Serum bei 0,5 μM (Gerrard et Robinson 1989; Tokumura et al. 1994; Tokumura et al. 1995), wobei sie an Serumalbumin gebunden sind (Thumser et al. 1994; Tigyi et al. 1992). Auch im ZNS konnten LPA und S1P nachgewiesen werden (Das et al. 1989). Durch Ereignisse wie hämorrhagische Insulte (Tigyi et al. 1995) oder zerebrale Ischämien (Kinouchi et al. 1990; Sun et al. 1992) kann die LPA-Konzentration bis in den hohen mikromolaren Bereich steigen.

4.2 S1P-induzierte Calciumantworten in Mikroglia

Ähnlich zum LPA-induzierten Calciumsignal lässt sich die Calciumantwort mit dem Lysophospholipid Sphingosin-1-phosphat (S1P) auslösen.

S1P verursacht in muriner Mikroglia einen transienten Calciumanstieg sowohl in calciumhaltiger als auch calciumfreier Ringerlösung, was den Schluss zulässt, dass es sich dabei um eine Calciumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern handelt. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Beobachtungen an einer Zelllinie eines Primärtumors der Leber (HTC4-) und Ovarialzellen chinesischer Hamster (CHO-Zellen). Kein Calciumsignal konnte S1P in den Zelllinien HEK-293, COS-7 (Nierenzellen von Affen) und RH7777 (Ratten-Hepatomzellen) auslösen.

Rezeptoren, an die S1P spezifisch bindet sind S1P_{1-5} , GPR3, GPR6, GPR12, welche ebenso G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit jeweils unterschiedlichen Eigenschaften darstellen (An et al. 1999; Spiegel et Milstien 2003; Uhlenbrock et al. 2002).

Calciumanstiege können über den S1P_2 - oder S1P_3 -Rezeptor vermittelt werden (An et al. 1999; Kon et al. 1999, Sato et al. 1999). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass der S1P_1 -Rezeptor vielmehr eine inhibitorische Wirkung auf das intrazelluläre Calciumsignal ausübt (Meyer zu Heringdorf et al. 2003; Zondag et al. 1998; Van Brocklyn et al. 1998). Somit mögen die Unterschiede in der Reaktion auf S1P darin begründet liegen, dass die Zellen unterschiedliche beziehungsweise keine Rezeptoren aus der Edg-Familie exprimieren.

Ähnlich dem LPA konnte auch für S1P die Funktionsweise eines intrazellulären second messengers nachgewiesen werden (Meyer zu Heringdorf 2004; Van Brocklyn et al. 1998) und intrazellulär appliziertes S1P konnte unter bestimmten Bedingungen eine Calciumfreisetzung

hervorrufen (Meyer zu Heringdorf et al. 2003).

Eine Untersuchung über die Expression von S1P-Rezeptoren in Mikrogliazellen liegt zur Zeit leider noch nicht vor. Die Ergebnisse unserer Ca^{2+} -Messungen lassen aber die Vermutung zu, dass S1P₂ und/ oder S1P₃-Rezeptoren in Mikroglia exprimiert sind.

4.3 Funktionelle Bedeutung der LPA- und S1P-induzierten Calciumantworten

In etlichen Arbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen LPA-/ S1P-Applikation und Migration beschrieben (Fukushima et al. 2002; Gräler et Goetzl 2002; Manning et al. 2000; Okamoto et al. 2000; Panetti et Mosher 2000; Wang et al. 1999). Das legt die Vermutung nahe, dass der in dieser Arbeit gezeigte LPA-/S1P-induzierte Ca^{2+} -Anstieg an der Migration beteiligt sein könnte. So zeigt Rao et al. (2002), dass eine verminderte intrazelluläre Calciumkonzentration zur Inhibition der Migration in intestinalen Epithelzellen führt und eine erhöhte Calciumkonzentration zu einer Anhebung der Migrationsrate. Wurden die intrazelluläre Transduktionswege der G_i-Protein-gekoppelten LPA/S1P-Rezeptoren mit PTX, C3-Transferase oder Y-27632, einem Inhibitor der Rho-aktivierten ROCK-Kinase, inhibiert, so ließen sich nicht nur die Ca^{2+} -Signale sondern auch die Migration der Zellen verhindern (Manning et al. 2000; Okamoto et al. 2000; Panetti et Mosher 2000). Es scheint aber nicht bedeutend zu sein, über welche Kanäle der Ca^{2+} -Anstieg erfolgt: in Körnerzellen des Cerebellums durch N-Typ Ca^{2+} -Kanäle (Komuro et Rakic 1992) und in epithelialen Keratocyten durch dehnungsaktivierte, Ca^{2+} -permeable nonselektive Kationenkanäle (Lee et al. 1999). Neben der Quantität des Ca^{2+} -Signals spielt auch sein zeitliches Auftreten eine entscheidende Rolle. Es wurde gezeigt, dass Oszillationen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ für die Migration von Neutrophilen wichtig sind (Marks et Maxfield 1990) und dass diese Oszillationen von LPA in Glioblastomzellen hervorgerufen werden können (Manning et al. 2000).

Die Bedeutung des LPA-induzierten Calciumanstiegs für die Mikroglia zeigen Schilling et al. (2002). Die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration führt zur Aktivierung eines Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanals. Charakterisiert wurde dieser Kanal als IKCa1. Nach seiner raschen Aktivierung durch die Applikation von S1P oder LPA öffnet der auswärts gerichtete K^+ -Kanal nur transient, also in gleicher zeitlicher Abfolge wie das Ca^{2+} -Signal. Die Öffnung des Kanals wird von einer Membranhyperpolarisation begleitet, die eine treibende Kraft für den Einstrom

von Kationen darstellen könnte. In einer darauf folgenden Arbeit von Schilling et al. (2004) wird gezeigt, dass der Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanal für die Migration von Mikrogliazellen notwendig ist. Wird der Kanal mit Charybdotoxin oder Clotrimazol inhibiert, so verringert sich gleichsam die Migrationsrate der Mikroglia nach Applikation von LPA. Der Vorgang der Migration setzt sich aus einzelnen Schritten der Form- und Volumenänderung einer Zelle zusammen. So kann der Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanal dazu beitragen, dass durch den Ausstrom von K^+ -Ionen osmotisch bedingt auch Wasser ausströmt, so dass die Zelle am hinteren Ende schrumpft (Lang et al. 1998, Schwab et al. 1999). Klein et al. (2000) konnte an Epithelzellen nachweisen, dass am „vorderen“ Ende der Zelle hingegen Ionentransporter lokalisiert sind, die zu einem osmotischen Wassereinstrom führen, wodurch die Zelle an diesem Ende anschwillt. Zu den dabei beteiligten Ionentransportern zählen der Na^+/H^+ - oder $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher.

Interessanterweise haben LPA und S1P eine migrationsfördernde Wirkung auf unterschiedliche Zelltypen. S1P, jedoch nicht LPA, wirkt auf Endothelzellen, und LPA besitzt eine migrationsfördernde Eigenschaft für Fibroblasten, unterschiedliche Karzinomzellen und humane Glioblastoma multifforme Zelllinien. In glatten Gefäßmyozyten beziehungsweise Melanomzellen wird nach Applikation der beiden Lysophospholipide keine Migration beobachtet (Manning et al. 2000; Okamoto et al. 2000; Panetti et Mosher 2000). Zusätzlich zur chemotaktischen Wirkung des S1P auf Endothelzellen fördert es auch die Proliferation, so dass S1P ein entscheidender Faktor der Angiogenese darstellen könnte (Wang et al. 1999; Meyer zu Heringdorf et al. 2003).

Neben der Morphologie und Migration sind Calciumsignale an einer Reihe von Prozessen beteiligt und kontrollieren die Zellproliferation durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Des weiteren werden komplexe Prozesse wie Mitose, Zelldifferenzierung, Apoptose, Fertilisation und Embryonalentwicklung durch Calciumsignale und den nachfolgenden intrazellulären Signalkaskaden beeinflusst (Berridge et al. 2000).

4.4 LPC-induzierte Calciumantworten in Mikroglia

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen auf Applikation von LPC mit einem lang anhaltenden Calciumanstieg, der sich aus einer initialen Spitze und einem darauf folgenden Plateau zusammensetzt, reagieren. Der LPC-induzierte Calciumanstieg der

Mikrogliazellen ist in calciumfreier Ringerlösung nicht mehr auslösbar, was suggeriert, dass es sich bei der Antwort um einen Calciumeinstrom aus dem extrazellulären Milieu handelt. Die Höhe des gemessenen Calciumanstiegs war von der LPC-Konzentration abhängig.

Der massive, lang anhaltende Calciumanstieg nach LPC-Applikation wird auch an Cardiomyocyten adulter und neonataler Ratten (Ma et al. 1999; Gailis et al. 2001; Yu et al. 1998) und an glatten Muskelzellen der Koronararterien von Kaninchen (Terasawa et al. 2002) beschrieben. Im Gegensatz dazu wurde ein Calciumanstieg nach Applikation von LPC, der sich aus einem Calciumeinstrom über die Zellmembran und zusätzlich aus der Freisetzung von Calcium aus den Calciumspeichern zusammensetzt, in Cardiomyozyten adulter Ratten (Itoh et al. 1998) und humanen Endothelzellen der Aorta (Yokoyama et al. 2002) beobachtet. Mögliche Ursache für die Unterschiede könnte in der Verwendung der verschiedenen Zellarten und Spezies liegen.

Die physiologische Konzentration von LPC liegt je nach Gewebe und Körperflüssigkeiten im Bereich von 5 – 180 μM (Croset et al. 2000; Xu et al. 2002). Unter pathologischen Bedingungen wie Entzündungen (Kabarowski et al. 2002), Epilepsien (Yegin et al. 2002) und Ischämie, z. B. des Myocards, akkumuliert das LPC und steigt extrazellulär auf Konzentrationen bis zu 200 μM an (Akita et al. 1986). Dabei ist zu berücksichtigen, dass etwa 90 % des LPC an Proteine gebunden ist (Yu et al. 1998), so dass eine freie LPC-Konzentration von 20 μM angenommen werden kann.

In den Experimenten zur Charakterisierung des Calciumeinstroms kam das LPC palmitoyl zur Anwendung. Es konnte gezeigt werden, dass Gadolinium die Calciumantwort nach Applikation von LPC nahezu vollständig inhibieren konnte. Lanthan erwies sich ebenfalls als wirksamer Hemmstoff.

Für La^{3+} ist eine inhibierende Wirkung auf den L-Typ Ca^{2+} -Kanal (Wendt-Gallitelli et al. 1985), den Ca^{2+} -freisetzungsaktivierten Kanälen (CRAC), den nicht-selektiven Kationenkanälen, den schwellungsaktivierten Ca^{2+} -Kanälen (SWAC) (Ross et al. 1995) und den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern (Kimura et al. 1986) bekannt. Für diese Arbeit kann ausgeschlossen werden, dass L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle beteiligt sind, da in der Arbeit von Eder 1998 gezeigt wurde, dass diese nicht in Mikroglia vorkommen. Aber auch an Cardiomyocyten, die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle besitzen, wurde widerlegt, dass diese Kanäle an LPC-induzierter Aktivierung beteiligt sind, da Verapamil, ein spezifischer L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Blocker, das Ca^{2+} -Signal nicht inhibieren konnte (Yu et al. 1998).

CRAC-Kanäle sind ebenfalls als unwahrscheinlich für den hier gezeigten Ca^{2+} -Einstrom anzunehmen. Ross beschreibt den IC_{50} von La^{3+} und Gd^{3+} für CRAC-Kanäle bei 58 nM beziehungsweise 28 nM. In diesem Konzentrationsbereich konnte die in dieser Arbeit durch LPC ausgelöste Ca^{2+} -Antwort nicht geblockt werden.

Dahingegen wurde in Mikroglia (Schilling et al. 2004b), Cardiomyozyten von Meerschweinchen (Hashimoto et al. 2000; Magishi et al. 1996) und Kaninchen (Song et al. 2002) glatten Muskelzellen der Renalarterie von Hunden (Jabr et al. 2000), Koronararterien von Kaninchen (Terasawa et al. 2002) sowie Endothelzellen (Yokoyama et al. 2002) die Aktivierung eines nicht-selektiven Kationenkanals durch LPC nachgewiesen. Der nicht-selektive Kationenkanal (I_{NSC}) weist die Charakteristik auf, für Na^+ , K^+ , Ca^{2+} durchlässig zu sein, also für mono- als auch divalente Kationen. Durch Gd^{3+} und La^{3+} lässt er sich vollständig inhibieren (Schilling et al. 2004; Jabr et al. 2000).

Perozo et al. (2002) und Sachs et al. (2002) sehen die Ursachen für die Öffnung des nicht-selektiven Kationenkanals in dem mechanosensitiven Effekt des LPC. Es löst an der Zellmembran einen lokalen Stress aus, der eine Zunahme der Krümmung und nachfolgend eine Druckerhöhung in der Zellmembran nach sich zieht. Dabei vollzieht der nichtselektive Kationenkanal eine Konformationsänderung in den offenen Zustand.

Des Weiteren wurde beschrieben, wie auf die Aktivierung des nicht-selektiven Kationenkanals die Aktivierung eines calciumabhängigen Kaliumkanals folgte, der unter calciumfreien extrazellulären Bedingungen nicht mehr aktiviert werden konnte (Schilling et al. 2004). Der Kaliumausstrom führt zu einer Hyperpolarisation, die eine treibende Kraft für den Einstrom des Calciums und anderer Kationen durch den nicht-selektiven Kationenkanal darstellen könnte.

Eine andere mögliche Theorie für den Calciumeinstrom könnte in der Beteiligung schwellungsaktivierter Calciumkanäle begründet liegen. Die in Abschnitt 3.4 gezeigte Morphologieänderung geht mit einer Anschwellung des Zellsomas einher. Ross et al. (1995) charakterisiert die SWAC-Kanäle an unreifen Thymozyten durch die Fähigkeit, von Gd^{3+} und La^{3+} inhibiert zu werden.

Magishi et al. (1996) stellt in seiner Arbeit an Cardiomyocyten die These auf, dass neben dem LPC-induzierten Calciumeinstrom auch der Na^+ -Einstrom durch den nicht-selektiven Kationenkanal von Bedeutung ist, da sekundär der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aktiviert wird. Dieser könnte zusätzlich zum massiven Einstrom von Ca^{2+} beitragen.

Ogita et al. (1997) hingegen postuliert, dass LPC das Ca^{2+} -Signal über den PAF-Rezeptor (plättchenaktivierender Faktor) vermittelt. Experimente dieser Arbeit haben gezeigt, dass der PAF-Rezeptor-Antagonist BN 52021, ein Ginkgolid, die Ca^{2+} -Antwort auf LPC partiell inhibieren kann. Das führt zu der Annahme, dass die Ca^{2+} -Antwort auf LPC zu einem Teil über den PAF-Rezeptor vermittelt sein könnte. Der durch den PAF-Antagonisten nicht zu inhibierende Anteil des Calciumeinstroms könnte über die oben erwähnten nicht-selektiven Kationenkanäle zustande kommen. Eine Ursache dafür, dass in Ogitas Arbeit die Calciumantwort komplett inhibiert wurde, mag in der Anwendung unterschiedlicher PAF-Rezeptor-Antagonisten (WEB-2086 versus BN 52021) beziehungsweise verschiedener Zellarten (murine peritoneale Makrophagen versus murine Mikroglia) liegen.

Eine Beteiligung intrazellulärer Transduktionswege durch Aktivierung spezifischer LPC-Rezeptoren, wie sie von Xu 2002 beschrieben wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, aber es kann vermutet werden, dass rezeptorvermittelte Calciumsignale von transientser Natur sind, wie sie im vorigen Abschnitt nach Stimulation mit LPA/S1P zu sehen waren.

Vergleicht man diese Arbeiten, wird die Vermutung bestärkt, der durch LPC verursachte Calciumeinstrom könnte über nicht-selektive Kationenkanäle und initial über schwellungsaktivierte Calciumkanäle erfolgen.

4.5 Funktionelle Bedeutung der LPC-induzierten Calciumantworten

Die funktionelle Bedeutung des LPC-induzierten Ca^{2+} -Anstieges gleicht den durch LPA/S1P ausgelösten Signalen. Es konnte gezeigt werden, dass Mikroglia seine Morphologie innerhalb kurzer Zeit nach Applikation von LPC vom ramifizierten in den amöboiden Zustand ändert.

Die Physiologie der Morphologieänderung wurde in der Arbeit von Schilling et al. (2004) geklärt. Die Morphologieänderung der Mikroglia nach Applikation von LPC ist calciumunabhängig. Jedoch lässt sie sich wie die in dieser Arbeit vorgenommenen Experimente zu den Ca^{2+} -Strömen durch Gd^{3+} und La^{3+} teilweise inhibieren. Dieser Fakt führt zu der Annahme, dass der nicht-selektive Kationenkanal (I_{NSC}) auch für die Morphologieänderung eine entscheidende Rolle spielt.

Gänzlich kann die Morphologieänderung durch $\text{Gd}^{3+}/\text{La}^{3+}$ in Kombination mit DIOA (K^+ - Cl^- -Cotransporter-Inhibitor) oder Furosemid (Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Cotransporter-Inhibitor) inhibiert werden.

Demzufolge ist der Prozess der Morphologieänderung durch LPC über nicht-selektive Kationenkanäle (I_{NSC}) und K^+ - Cl^- -Cotransporter vermittelt. Durch den Einstrom der Ionen über den durch LPC aktivierten I_{NSC} in das Zellsoma wird ein osmotisches Gefälle aufgebaut, was zu einem nachfolgenden H_2O -Einstrom führt und eine Zellschwellung im Bereich des Somas verursacht. In den Rami der Zelle kommt es zu einer Zellschrumpfung durch die Aktivierung der an diesem Ort in höherer Anzahl exprimierten K^+ - Cl^- -Cotransportern. Dieser transportiert K^+ und Cl^- aus der Zelle hinaus. Nachfolgend tritt H_2O aufgrund der veränderten osmotischen Verhältnisse hinaus in den Extrazellulärraum. Dies führt zum Einziehen der Zellausläufer und zusammen mit dem Vorgang an den Zellsomata zu einer Abrundung der Zellen.

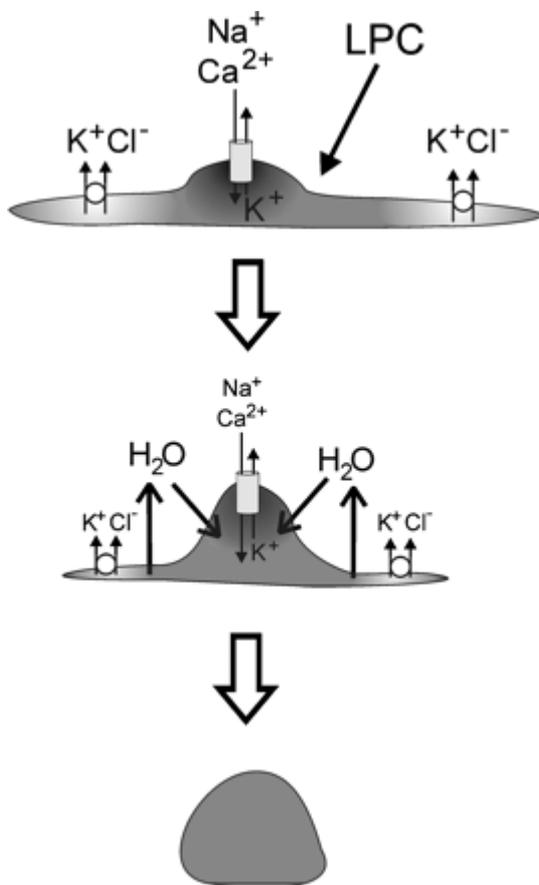


Abbildung 28 Physiologische Mechanismen der Deramifikation von Mikroglia durch LPC (aus Schilling et al. 2004)

4.6 Lysophospholipid-induzierte pH-Änderungen in Mikroglia

In dieser Arbeit wurde neben der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentrationen auch untersucht, welchen Einfluß LPA und LPC auf den intrazellulären pH-Wert (pH_i) von

Mikrogliazellen ausüben. Es konnte gezeigt werden, dass beide Stoffe in gleichartiger Weise zu einem langsamen Abfall des pH_i führen, bei dem sich nach einigen Minuten ein Gleichgewicht einstellt. Eine Abhängigkeit der pH -Änderung vom Lysophospholipid-induzierten Ca^{2+} -Signal konnte nicht gefunden werden, da unter calciumfreien Bedingungen (LPC) und zusätzlich entleerten Ca^{2+} -Speichern (LPA) die pH -Änderung in gleicher Art und Weise wie unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen auftraten. Zur pharmakologischen Charakterisierung des pH -Abfalls wurde Diphenyleneiodonium (DPI) eingesetzt, welches die NADPH-Oxidase inhibiert. Die NADPH-Oxidase produziert Sauerstoffradikale in Phagozyten und führt nebenbei zur Freisetzung von Protonen ins Zytosol.

Der respiratory burst bezeichnet den Vorgang in Phagozyten, bei dem unter hohem Sauerstoffverbrauch Sauerstoffradikale gebildet werden (siehe Abbildung 29).

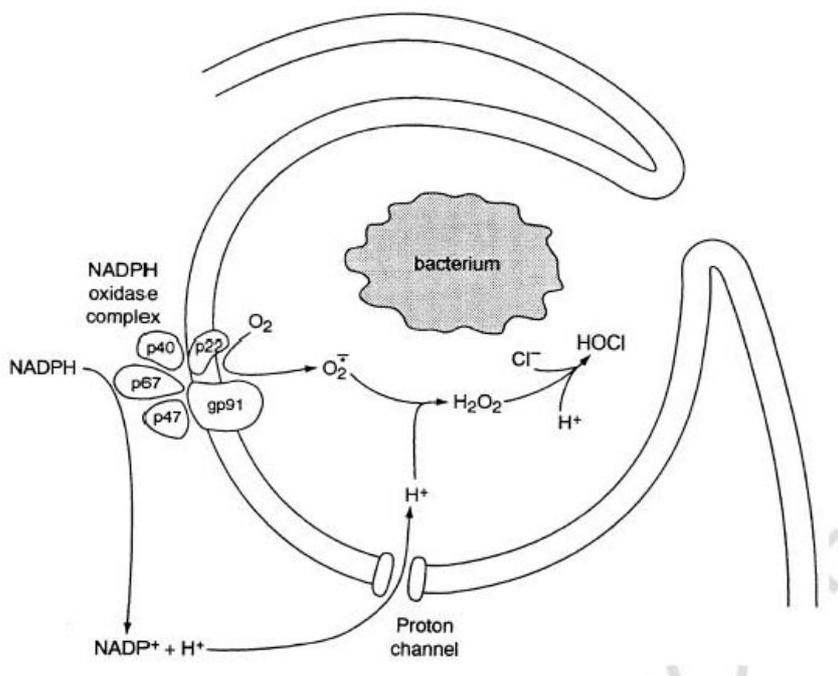


Abbildung 29: Schema über die Funktionsweise des respiratory burst (Quelle: DeCoursey et Grinstein 1999)

Kommt es zur Aktivierung der Mikrogliazelle beispielsweise durch Bakterien, so wird über das Phosphokinase C-System das membranständige Enzym NADPH-Oxidase aktiviert, welche NADPH in NADP⁺ + H⁺ und O₂ in O₂⁻ umwandelt. Damit entstehen im Cytosol Protonen, die zum Abfall des pH_i führen. Um die Homöostase der Zelle zu gewährleisten, wird das H⁺ über einen Protonenkanal aus der Zelle heraustransportiert. Das entstandene Superoxidanion kann

extrazellulär mit Protonen zu Wasserstoffperoxid reduziert werden. Diese zytotoxischen Stoffe dienen dann der Abwehr des Bakteriums (Henderson et al. 1995, 1997; Henderson et Meech 1999).

Da in den Experimenten dieser Arbeit DPI die pH-Veränderungen nicht inhibieren konnte, liegt die Vermutung nahe, dass die LPA/LPC-stimulierte Ansäuerung der Mikroglia nicht auf eine Produktion von H^+ durch die NADPH-Oxidase, also nicht auf den respiratory burst zurückzuführen ist.

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen berichtet Cechin et al. (2002) über eine Ansäuerung von Astrozyten nach Applikation von LPA, die calciumunabhängig ist.

Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen an Mikroglia konnte an Endothelzellen eine LPC-induzierte, NADH-abhängige Sauerstoffradikalproduktion, also ein respiratory burst nachgewiesen werden (Kugiyama et al. 1999). An Eosinophilen wurde durch Applikation von LPA der respiratory burst ausgelöst (Idzko et al. 2004).

Als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich zu den oben zitierten könnten die Verwendung anderer Zellarten und vor allem anderer Methoden liegen. In dieser Arbeit wurde als Maß für den respiratory burst die Produktion von H^+ in Betrachtung gezogen. Die oben zitierten Arbeiten haben die Freisetzung der Sauerstoffradikale gemessen. Die hier gewählte Methode ist bezüglich des respiratory burst weniger spezifisch und kann durch andere pH-verändernde Mechanismen überlagert werden.

Folgende Prozesse können an der Regulierung des intrazellulären pH-Wertes beteiligt sein:

- H^+ -Puffersysteme des Zytoplasmas
- Aufnahme von H^+ in intrazelluläre Organellen wie Mitochondrien und Lysosome
- Freisetzung oder metabolische Produktion von H^+
- Transport von Säuren-/Basen-Äquivalenten über die Zellmembran.

Alle diese Mechanismen können nicht voneinander getrennt betrachtet werden. So führt eine Veränderung der intrazellulären Protonenkonzentration, verursacht durch die Aktivität eines H^+ -Transporters zur nachfolgenden Regulierung der $[H^+]_i$ durch das Puffersystem. Neben den unspezifischen Mechanismen ist vor allem das CO_2/HCO_3^- -abhängige Puffersystem des Cytosols von Bedeutung. Das Enzym Carboanhydrase katalysiert die Hydratation von CO_2 zu HCO_3^- und H^+ . Ob LPA und LPC einen Einfluss auf das intrazelluläre Puffersystem, die Freisetzung von H^+

aus Zellorganellen oder die metabolische Protonenproduktion haben, ist noch nicht untersucht worden.

Die Veränderung des pH_i kommt zu einem großen Teil durch den Transport von Säuren-/Basen-Äquivalenten über die Zellmembran zustande. Die in Mikroglia vorkommenden Transporter beziehungsweise Kanäle sind im Folgenden beschrieben.

Der spannungsabhängige H^+ -Kanal wurde in Mikroglia erstmals von Eder et al. (1995) beschrieben. Zu seiner Charakteristik zählt, dass er ein ausschließlich auswärts gerichteter Kanal ist und zur Erhöhung des pH_i führt. Ob er durch die Lysophospholipide inhibiert wird, ist noch zu untersuchen.

Shirihai et al. (1998) berichtete über das Vorkommen von K^+/H^+ -ATPase in Mikroglia. Sie werden bei hohen extrazellulären K^+ -Konzentrationen aktiviert, wie sie in geschädigtem Gehirnparenchym auftreten. Diese hohe extrazelluläre K^+ -Konzentrationen, wie sie für die Aktivierung der K^+/H^+ -ATPase notwendig wären, wurden in den Experimenten dieser Arbeit nicht erreicht. Daraus lässt sich schließen, dass die K^+/H^+ -ATPase nicht an der LPA/LPC-induzierten pH-Änderung beteiligt ist.

Als Bikarbonat-abhängige Transportmechanismen konnten in Mikroglia zum einen der $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter, zum anderen der Na^+ -abhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher nachgewiesen werden (Faff et al. 1996). Voraussetzung für die Aktivierung sind die Anwesenheit von extrazellulärem HCO_3^- und Na^+ . Es wird Na^+ und HCO_3^- ($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter) oder HCO_3^- im Austausch mit Cl^- ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher) in die Zelle transportiert, die erhöhte $[\text{HCO}_3^-]_i$ führt zu einem pH_i -Anstieg. Eine Beteiligung dieser Transporter in dieser Arbeit kommt nicht in Frage, da die experimentellen Bedingungen so gewählt wurden, dass HEPES-gepufferte Lösung verwendet wurde und extrazellulär somit kein Bikarbonat vorhanden war.

Ein indirekter Beweis für die Existenz der $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -ATPase in Mikroglia wurde von Minelli et al. (2000) geliefert. Dieser transportiert H^+ im Austausch gegen Ca^{2+} aus der Zelle heraus. Dieser Transporter kommt zur Klärung des LPA/LPC-induzierten pH-Abfalls nicht in Frage, da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass LPA/LPC-stimulierte Ansäuerung der Mikroglia unabhängig von Ca^{2+} geschieht.

Auch ein Na^+/H^+ -Austauscher wurde in Mikroglia indirekt nachgewiesen (Faff et al. 1996), indem in HCO_3^- -freier Extrazellulärlösung das Natrium entfernt wurde und die Zellen einen

raschen und starken pH_i -Abfall zeigten. Indem der Na^+/H^+ -Austauscher Protonen im Austausch mit Na^+ aus der Zelle herausschafft, schützt er die Zellen vor Übersäuerung. Eine Inhibierung des Transporters erfolgt mit EIPA- (Ethyl-Isopropylamilorid) und Amilorid, aber auch durch hohe intrazelluläre Natriumkonzentrationen (Grinstein et al. 1991). Eine mögliche Erklärung für den LPC-induzierten pH -Abfall wäre eine Inhibition des Na^+/H^+ -Austauschers, zum einen durch eine direkte Wirkung des LPC an dem Kanal, wie es für Wachstumsfaktoren nachgewiesen wurde (Noel et Pouyssegur 1995; Boron 1992) oder zum anderen durch die Eigenschaft des LPC, nichtselektive Kationenkanäle zu öffnen (siehe Abschnitt 4.4), wodurch es neben einem Einstrom von Ca^{2+} und K^+ auch zu einem intrazellulären Na^+ -Anstieg kommt. Der erhöhte intrazelluläre Natriumspiegel könnte die mögliche Ursache für die Inhibition des Na^+/H^+ -Austauschers darstellen, wodurch es zu der in dieser Arbeit beobachteten LPC-induzierten Ansäuerung des Zytoplasmas gekommen sein könnte. Ob diese Theorie zutreffend ist und ob die LPA-induzierte Ansäuerung einem ähnlichen Prinzip unterliegt, muss in Zukunft noch untersucht werden.

Dass LPC den Na^+/H^+ -Austauscher inhibieren kann, wurde in einer Arbeit von Fuster et al. (2004) an CHO-Zellen gezeigt. Die von ihnen favorisierte Erklärung bezieht sich auf den mechanosensitiven Effekt des LPC (Perozo et al. 2002), wodurch der mechanosensitive Na^+/H^+ -Austauscher inhibiert wird. In einer anderen Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass die Inhibierung des Na^+/H^+ -Austauscher nicht an der LPC-induzierten Ansäuerung beteiligt ist, sondern die Inhibierung des $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporters (Yamaguchi et al. 1998). Im Unterschied zu dieser Arbeit und zu Fuster et al. benutzt Yamaguchi Bikarbonat-gepufferte extrazelluläre Lösung, was eine Beteiligung des $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporters an den pH -regulierenden Prozessen erst möglich macht.

Die Ursache für den LPA/LPC-induzierten pH_i -Abfall ist nicht endgültig geklärt. Es sind weitere Experimente notwendig um zu entschlüsseln, ob und wie LPA und LPC in der Lage sind, in Mikrogliazellen den Na^+/H^+ -Austauscher zu inhibieren oder ob andere pH -regulierende Prozesse an der LPA-/LPC-induzierten pH -Änderung in Mikroglia beteiligt sind.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung unterschiedlicher Lysophospholipide auf Mikrogliazellen untersucht. Obwohl sie einer Stoffgruppe angehören, lösen LPA/S1P einerseits und LPC andererseits in Mikroglia Calciumsignale unterschiedlicher Art aus. LPA/S1P wirken an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die über eine Phospholipase C-Aktivierung Inositoltriphosphat bilden, das Ca^{2+} aus den Thapsigargin-sensitiven Speichern freisetzt. Die Ca^{2+} -Antwort ist transientser Form. LPC dagegen bindet an keine spezifischen Rezeptoren, sondern führt über einen mechanosensitiven Effekt zu einer Zunahme der Krümmung der Zellmembran und nachfolgend zu einer Konformationsänderung des nichtselektiven Kationenkanals in den offenen Zustand. Über diesen kommt es zu einem langanhaltenden und massiven Einstrom von Ca^{2+} und anderen Kationen. Die funktionellen Folgen der Lysophospholipide sind trotz der unterschiedlichen Mechanismen des Ca^{2+} -Anstiegs sehr ähnlich, sie treten aber in unterschiedlicher Intensität auf. Sie fördern die Morphologieänderung, Proliferation und Migration der Zellen.

Erstaunlicherweise zeigen LPA und LPC trotz unterschiedlicher Angriffsmechanismen an der Zellmembran die gleichen langsamen pH-Antworten in Form von Ansäuerung des Cytoplasmas, deren Mechanismus in Zukunft geklärt werden muss.

Betrachtet man die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse, kann man schlussfolgern, dass die Lysophospholipide LPA, S1P und LPC, die unter pathologischen Bedingungen des ZNS erhöht sind, Mikrogliazellen aktivieren. Die aktiven Mikrogliazellen sind notwendig zur Abwehr von Krankheitserregern oder zur Beseitigung abgestorbener Neurone, sie stellen jedoch bei einer überschießenden Reaktion eine Gefahr für das noch nicht geschädigte Gehirnparenchym dar. An diesem Punkt könnte man in Zukunft pharmakologisch eingreifen, indem man die ausgelöste Aktivierung der Mikroglia bremst. Einer der möglichen hier gezeigten Angriffspunkte stellt das intrazelluläre Calciumsignal dar, welches man mit spezifischen Blockern inhibieren könnte. Auf diese Weise ließe sich der Schaden, der durch überschießende Immunreaktionen beispielsweise in der Penumbra eines ischämischen Insults entsteht, reduzieren.

Literaturverzeichnis

Akita H., Creer M.H., Yamada K.A., Sobel B.E., Corr P.B. (1986) Electrophysiologic effects of intracellular lysophosphoglycerides and their accumulation in cardiac lymph with myocardial ischemia in dogs. *J Clin Invest.* 78(1): 271-280.

An S., Bleu T., Zheng Y., Goetzl E.J (1998) Recombinant human G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors mediate intracellular calcium mobilization. *Mol Pharmacol.* 54(5): 881-8.

An S., Bleu T., Zheng Y. (1999) Transduction of intracellular calcium signals through G protein-mediated activation of phospholipase C by recombinant sphingosine 1-phosphate receptors. *Mol Pharmacol.* 55(5): 787-94.

Baker D.L., Desiderio D.M., Miller D.D., Tolley B., Tigyi G.J. (2001) Direct quantitative analysis of lysophosphatidic acid molecular species by stable isotope dilution electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 292: 287–95.

Banati R.B., Newcombe J., Gunn R.N., Cagnin A., Turkheimer F., Heppner F., Wegner P.G., Giovannoni G., Miller D.H., Perkin G.D., Smith T., Hewson A.K., Bydder G., Kreutzberg G.W., Cuzner T., Cuzner M.L., Myers R. (2000) The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. *Brain* 123: 2321– 2337.

Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1(1): 11-21.

Boron W.F., Knakal R.C. (1992) Na⁺-dependent Cl/HCO₃ exchange in the squid axon. Dependence on extracellular pH. *J Gen Physiol.* 99(5): 817-837.

Bräuer A.U., Savaskan N.E., Kühn H., Prehn S., Ninnemann O., Nitsch R. (2003) A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting. *Nature Neurosci.* 6(6): 572-578.

Cechin S.R., Gottfried C., Prestes C.C., Andrighetti L., Wofchuk S.T., Rodnight R. (2002) Astrocyte stellation in saline media lacking bicarbonate: possible relation to intracellular pH and tyrosine phosphorylation. *Brain Research* 946: 12–23.

Compston A., Zajicek J., Sussman J., Webb A., Hall G., Muir D., Shaw C., Wood A., Scolding N. (1997) Glial lineages and myelination in the central nervous system. *J. Anat.* 190: 161–200.

Contos J.J.A., Ishii I., Chun J. (2000) Lysophosphatidic acid receptors. *Mol. Pharmacol.* 58: 1188–96.

Croset M., Brossard N., Polette A., Lagarde M. (2000) Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. *Biochem J.* 345(1): 61-67.

Das A.K., Hajra A.K. (1989) Quantification, characterization and fatty acid composition of lysophosphatidic acid in different rat tissues. *Lipids* 24: 329-333.

DeCoursey T.E., Grinstein S. (1999) Ion channels and carriers in leukocytes. In: *Inflammation: Basic principles and clinical correlates* (Ed. Gallin J.I., Snyderman R.) 3rd. pp. 639-659. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

Deitmer J.W., Schild D. (2000) Ca²⁺ und pH. Ionenmessungen in Zellen und Geweben.

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.

Del Rio-Hortega P. (1932) Microglia. In: Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System, (Ed. E. Penfield) Vol. II, S. 481–534 Paul B. Hoeber, New York.

Duong C.Q., Bared S.M., Abu-Khader A., Buechler C., Schmitz A., Schmitz G. (2004) Expression of the lysophospholipid receptor family and investigation of lysophospholipid-mediated responses in human macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 1682(1-3): 112-9.

Eder C., Fischer H.G., Hadding U., Heinemann U. (1995) Properties of voltage-gated currents of microglia developed with macrophage colony-stimulating factor. *Pflügers Arch*. 430: 526-533.

Eder C. (1998) Ion channels in microglia (brain macrophages). *Am J Physiol*. 275(2): C327-342.

Eglitis M.A., Mezey E. (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 4080–4085.

Eiras S., Camina J.P., Diaz-Rodriguez E., Gualillo O., Casanueva F.F. (2004) Leptin inhibits lysophosphatidic acid-induced intracellular calcium rise by a protein kinase C-dependent mechanism. *J Cell Physiol*. 201(2): 214-26.

Faff L., Ohlemeyer C., Kettenmann H. (1996) Intracellular pH Regulation in Cultured Microglial Cells From Mouse Brain. *J. Neurosci. Res*. 46: 294-304.

Fukushima N., Ishii I., Contos J.J., Weiner J.A., Chun J. (2001) Lysophospholipid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:507-34. Erratum in: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:vii.

Fukushima N., Weiner J.A., Kaushal D., Contos J.J.A., Rehen S.K., Kingsbury M.A., Kim K.Y., Chun J. (2002) Lysophosphatidic Acid Influences the Morphology and Motility of Young, Postmitotic Cortical Neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 20: 271–282.

Fuster D., Moe O.W., Hilgemann D.W. (2004) Lipid- and mechanosensitivities of sodium-hydrogen exchangers analyzed by electrical methods. *PNAS* 101(28): 10482–10487.

Gailis L., Lamarche J., Boudriau S., Chahine M., Daleau P. (2001) Ethanol delays and reverses lysophosphatidylcholine-induced calcium overload in neonatal rat heart cells. *Pflügers Arch*. 443(1): 48-53.

Gerrard J.M., Robinson P. (1989) Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim Biophys Acta*. 1001(3): 282-5.

Gilden D.H. (2005) Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 4(5): 269.

Gräler M.H., Goetzl E.J. (2002) Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1582: 168–174.

Grinstein S., Swallow C.J., Rotstein O.D. (1991) Regulation of cytoplasmic pH in phagocytic cell function and dysfunction. *Clin Biochem*. 24(3): 241-7.

Grynkiewicz G. (1985) New generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-50.

Hashimoto Y., Yabana H., Murata S. (2000) Electrophysiological effect of l-cis-diltiazem, the stereoisomer of d-cis-diltiazem, on isolated guinea-pig left ventricular myocytes. *Eur. J. Pharmacol*. 391(3): 217-223.

- Henderson L.M., Banting G., Chappell J.B. (1995) The arachidonate-activable, NADPH oxidase-associated H⁺ channel. Evidence that gp91-phox functions as an essential part of the channel. *J. Biol. Chem.* 270(11): 5909-16.
- Henderson L.M., Thomas S., Banting G., Chappell J.B. (1997) The arachidonate-activatable, NADPH oxidase-associated H⁺ channel is contained within the multi-membrane-spanning N-terminal region of gp91-phox. *Biochem J.* 325(3): 701-705.
- Henderson LM, Meech RW (1999) Evidence that the product of the human X-linked CGD gene, gp91-phox, is a voltage-gated H⁺ pathway. *J. Gen. Physiol.* 114(6): 771-786.
- Hickey W.F., Kimura H. (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239. 1988 290–292.
- Idzko M., Laut M., Panther E., Sorichter S., Durk T., Fluhr J.W., Herouy Y., Mockenhaupt M., Myrtek D., Elsner P., Norgauer J. (2004) Lysophosphatidic acid induces chemotaxis, oxygen radical production, CD11b up-regulation, Ca²⁺ mobilization, and actin reorganization in human eosinophils via pertussis toxin-sensitive G proteins. *J Immunol.* 172(7) :4480-4485.
- Ignatov A., Lintzel J., Hermans-Borgmeyer I., Kreienkamp H.J., Joost P., Thomsen S., Methner A., Schaller H.C. (2003) Role of the G-protein-coupled receptor GPR12 as high-affinity receptor for sphingosylphosphorylcholine and its expression and function in brain development. *J Neurosci.* 23(3): 907-914.
- Ishii, I., Fukushima N., Ye X., Chun J. (2004) Lysophospholipid receptors: Signaling and Biology. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 321–54.
- Itagaki K., Kannan K.B., Hauser C.J. (2005) Lysophosphatidic acid triggers calcium entry through a non-store-operated pathway in human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 77(2): 181-9.
- Itoh K., Yoshizumi M., Kitagawa T., Fukuta Y., Hori T., Houchi H., Tamaki T., Katoh I. (1998) Extracellular administered lysophosphatidylcholine causes Ca²⁺ efflux from freshly isolated adult rat cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol.* 93(1): 23-29.
- Jabr R.I., Yamazaki J., Hume J.R. (2000) Lysophosphatidylcholine triggers intracellular calcium release and activation of non-selective cation channels in renal arterial smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* 439(4): 495-500.
- Kabarowski J.H., Xu Y., Witte O.N. (2002) Lysophosphatidylcholine as a ligand for immunoregulation. *Biochem. Pharmacol.* 64(2): 161-167.
- Kao J.P.Y. (1994) Practical aspects of measuring [Ca²⁺] with fluorescent indicators. In: *Methods in cell biology.* Academic Press, Oxford
- Kato H. (2001) The role of microglia in ischemic brain injury. in: *Inflammation and stroke.* (Ed. Feuerstein G.Z.) Birkhauser Verlag, Boston.
- Keller J.N., Steiner M.R., Holtsberg F.W., Mattson M.P., Steiner S.M. (1997) Lysophosphatidic acid-induced proliferation-related signals in astrocytes. *J Neurochem.* 69(3): 1073-84.
- Kimura J, Noma A., Irisawa H. (1986) Na-Ca exchange current in mammalian heart cells. *Nature.* 319(6054): 596-597.
- Kinouchi H., Imaizumi S., Yoshimoto T., Yamamoto H., Motomiya M. (1990) Changes of polyphosphoinositides, lysophospholipid, and free fatty acids in transient cerebral ischemia of rat brain. *Mol. Chem. Neuropathol.* 12: 215-228.

- Klein M., Seeger P., Schuricht B., Alper S.L., Schwab A. (2000) Polarization of Na⁺/H⁺ and Cl⁻/HCO₃²⁻ exchangers in Migrating Renal Epithelial Cells. *J. Gen. Physiol.* 115: 599–607.
- Komuro H., Rakic P. (1992) Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science* 257: 806-809.
- Kon J., Sato K., Watanabe T., Tomura H., Kuwabara A., Kimura T., Tamama K., Ishizuka T., Murata N., Kanda T., Kobayashi I., Ohta H., Ui M., Okajima F. (1999) Comparison of intrinsic activities of the putative sphingosine 1-phosphate receptor subtypes to regulate several signaling pathways in their cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 274(34): 23940-23947.
- Kreutzberg G. W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19: 312-18.
- Kugiyama K., Sugiyama S., Ogata N., Oka H., Doi H., Ota Y., Yasue H. (1999) Burst production of superoxide anion in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis.* 143(1): 201-204.
- Kumar K., Evans A.T. (1997) Effect of hypothermia on microglial reaction in ischemic brain. *Neuroreport.* 8: 947-950.
- Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E., Haussinger D. (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 78: 247-306.
- Lee J., Ishihara A., Oxford G., Johnson B., Jacobson K. (1999) Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature* 400(6742): 382-386.
- Lee H.Y., Kang H.K., Yoon H.R., Kwak J.Y., Bae Y.S. (2004) Lysophosphatidic acid is a mediator of Trp-Lys-Tyr-Met-Val-d-Met-induced calcium influx. *Biochem Biophys Res Commun.* 324(1): 458-65.
- Ma H., Hashizume H., Hara A., Yazawa K., Abiko Y. (1999) Protective effect of quinaprilat, an active metabolite of quinapril, on Ca²⁺-overload induced by lysophosphatidylcholine in isolated rat cardiomyocytes. *Jpn J Pharmacol.* 79(1): 17-24.
- Magishi K., Kimura J., Kubo Y., Abiko Y. (1996) Exogenous lysophosphatidylcholine increases non-selective cation current in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* 432(2): 345-350.
- Manning T., Sontheimer H. (1997) Bovine serum albumin and lysophosphatidic acid stimulate calcium mobilization and reversal of cAMP-induced stellation in rat spinal cord astrocytes. *Glia* 20: 163-172.
- Manning T.J., Parker J.C., Sontheimer H. (2000) Role of lysophosphatidic acid and rho in glioma cell motility. *Cell Motil Cytoskeleton.* 45(3): 185-99.
- Marks P.W., Maxfield F.R. (1990) Transient increases in cytosolic free calcium appear to be required for the migration of adherent human neutrophils. *J. Cell. Biol.* 110: 43-52.
- McIntyre T.M., Pontsler A.V., Silva A.R., St Hilaire A., Xu Y., Hinshaw J.C., Zimmerman G.A., Hama K., Aoki J., Arai H., Prestwich G.D. (2003) Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARγ agonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(1): 131-6.
- Meyer zu Heringdorf D., Vincent M.E., Lipinski M., Danneberg K., Stropp U., Wang D.A., Tigyi G., Jakobs K.H. (2003) Inhibition of Ca²⁺ signalling by the sphingosine 1-phosphate

receptor S1P₁. *Cell Signal*. 15(7): 677-87.

Meyer zu Heringdorf D., Liliom K., Schaefer M., Danneberg K., Jaggar J.H., Tigyi G., Jakobs K.H. (2003) Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes Ca²⁺ mobilization independently of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett*. 554(3): 443-9.

Meyer Zu Heringdorf D. (2004) Lysophospholipid receptor-dependent and -independent calcium signaling. *J Cell Biochem*. 92(5): 937-48.

Minelli A., Lyons S., Nolte C., Verkhatsky A., Kettenmann H. (2000) Ammonium triggers calcium elevation in cultured mouse microglial cells by initiating Ca²⁺ release from thapsigargin-sensitive intracellular stores. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol*. 439: 370–377.

Möller T., Contos J.J., Musantei D.B., Chun J., Ransom B.R. (2001) Expression and Function of Lysophosphatidic Acid Receptors in Cultured Rodent Microglial Cells. *J. Biol. Chem*. 276(28): 25946–25952.

Moolenaar W.H., van Meeteren L.A., Giepmans B.N.G. (2004) The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays* 26: 870–881.

Munsch T., Pape H.C. (1999) Modulation of the hyperpolarization-activated cation current of rat thalamic relay neurones by intracellular pH. *J. Physiol*. 519(2): 493-504.

Noguchi K., Ishii S., Shimizu T. (2003) Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J. Biol. Chem*. 278: 25600–25606.

Noel J., Pouyssegur J. (1995) Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. *Am J Physiol*. 268(2): C283-96. Review.

Ogita T., Tanaka Y., Nakaoka T., Matsuoka R., Kira Y., Nakamura M., Shimizu T., Fujita T. (1997) Lysophosphatidylcholine transduces Ca²⁺ signaling via the platelet-activating factor receptor in macrophages. *Am J Physiol* 272 (*Heart Circ Physiol* 41): H17-H24.

Okajima F. (2002) Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? *Biochim. Biophys. Acta* 1582: 132–37.

Okamoto H., Yatomi Y., Ohmori T., Satoh K., Matsumoto Y., Ozaki Y. (2000) Sphingosine 1-phosphate stimulates G_i- and Rho-mediated vascular endothelial cell spreading and migration. *Thromb Res*. 99(3): 259-65.

Pages C., Simon M.F., Valet P., Saulnier-Blache J.S. (2001) Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins OtherLipid Mediat*. 64:1–10.

Panetti T.S., Mosher D.F. (2000) Lysophospholipid-induced cell migration. *Ann N Y Acad Sci*. 905: 326-9.

Perozo E., Kloda A., Cortes D.M., Martinac B. (2002) Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. *Nat Struct Biol*. 9(9): 696-703.

Raivich G., Bohatschek M., Kloss C.U., Werner A., Jones L.L., Kreutzberg G.W. (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev*. 30(1): 77-105.

- Raivich G., Banati R. (2004) Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Research Reviews* 46: 261–281.
- Rao J., Platoshyn O., Li L., Guo X., Golovina V.A., Yuan J.X.J., Wang J.Y. (2002) Activation of K^+ channels and increased migration of differentiated intestinal epithelial cells after wounding. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C885–C898.
- Rock, R. B., Gekker G., Hu S., Sheng W. S., Cheeran M., Lokensgard J. R., Peterson P. K. (2004) Role of microglia in central nervous system infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(4): 942–964.
- Ross P.E., Cahalan M.D. (1995) Ca^{2+} influx pathways mediated by swelling or stores depletion in mouse thymocytes. *J Gen Physiol.* 106(3) :415-444.
- Sachs F. (2002) Retaining your identity under stress. *Nat Struct Biol.* 9(9): 636-637.
- Sato K., Kon J., Tomura H., Osada M., Murata N., Kuwabara A., Watanabe T., Ohta H., Ui M., Okajima F. (1999) Activation of phospholipase C- Ca^{2+} system by sphingosine 1-phosphate in CHO cells transfected with Edg-3, a putative lipid receptor. *FEBS Lett.* 443(1): 25-30.
- Schilling T., Nitsch R., Heinemann U., Haas D., Eder C. (2001) Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K^+ channel expression in microglia via distinct signalling pathways. *Eur J Neurosci.* 14(3): 463-473.
- Schilling T., Repp H., Richter H., Koschinski A., Heinemann U., Dreyer F., Eder C. (2002) Lysophospholipids induce membrane hyperpolarization in microglia by activation of IKCa1 Ca^{2+} -dependent K^+ channels. *Neuroscience* 109(4): 827-35.
- Schilling T, Stock C, Schwab A, Eder C. (2004a) Functional importance of Ca^{2+} -activated K^+ channels for lysophosphatidic acid-induced microglial migration. *Eur J Neurosci.* 19(6): 1469-74.
- Schilling T., Lehmann F., Rückert B., Eder C. (2004b) Physiological mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced de-ramification of murine microglia. *J Physiol* 557(1): 105-120.
- Schwab A., Schuricht B., Seeger P., Reinhardt J., Dartsch P.C. (1999) Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K^+ channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume. *Pflügers Arch.* 438: 330-337.
- Shirihai O., Smith P., Hammar K., Dagan D. (1998) Microglia generate external proton and potassium ion gradients utilizing a member of the H/K ATPase family. *Glia.* 23(4): 339-348.
- Song Y.M., Ochi R. (2002) Hyperpolarization and lysophosphatidylcholine induce inward currents and ethidium fluorescence in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol.* 545(2): 463-473.
- Spiegel S., Kolesnick R. (2002) Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent. *Leukemia* 16: 1596–602.
- Spiegel S., Milstien S. (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(5): 397-407.
- Stoll G., Jander S., Schroeter M. (1998) Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Progress in Neurobiology* 56: 149-171.

- Sun G.Y., Lu F.L., Lin S.E., Ko M.R. (1992) Decapitation ischemia-induced release of free fatty acids in mouse brain. Relationship with diacylglycerols and lysophospholipids. *Mol. Chem. Neuropathol.* 17: 39-50.
- Terasawa K., Nakajima T., Iida H., Iwasawa K., Oonuma H., Jo T., Morita T., Nakamura F., Fujimori Y., Toyo-oka T., Nagai R. (2002) Nonselective cation currents regulate membrane potential of rabbit coronary arterial cell: modulation by lysophosphatidylcholine. *Circulation.* 106(24): 3111-3119.
- Tham C.S., Lin F.F, Rao T.S., Yu N., Webb M. (2003) Microglial activation state and lysophospholipid acid receptor expression. *Int. J. Devl Neuroscience* 21: 431-443.
- Thumser A.E., Voysey J.E., Wilton D.C. (1994) The binding of lysophospholipids to rat liver fatty acid-binding protein and albumin. *Biochem. J.* 301: 801-806.
- Tigyí G., Miledi R. (1992) Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromacytoma cells. *J. Biol. Chem.* 267: 21360-21367.
- Tigyí G., Hong L., Yakubu M., Parfenova H., Shibata M., Leffler C.W. (1995) Lysophosphatidic acid alters cerebrovascular reactivity in piglets. *Am J Physiol.* 268(5): H2048-55.
- Tokumura A., Iimori M., Nishioka Y., Kitahara M., Sakashita M., Tanaka S. (1994) Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Am. J. Physiol.* 267 (*Cel Physiol.* 36): C204-C210.
- Tokumura A. (1995) A family of phospholipid autacoids: occurrence, metabolism and bioactions. *Prog. Lipid Res.* 34(2): 151-184.
- Uhlenbrock K., Gassenhuber H., Kostenis E. (2002) Sphingosine 1-phosphate is a ligand of the human gpr3, gpr6 and gpr12 family of constitutively active G protein-coupled receptors. *Cell Signal.* 14: 941-953.
- Van Brocklyn J.R., Lee M.J., Menzeleev R., Olivera A., Edsall L., Cuvillier O., Thomas D.M., Coopman P.J.P., Thangada S., Liu C.H., Hla T., Spiegel S. (1998) Dual Actions of Sphingosine-1-Phosphate: Extracellular through the Gi-coupled Receptor Edg-1 and Intracellular to Regulate Proliferation and Survival. *J. Cell Biol.* 142(1): 229-240.
- Wendt-Gallitelli M.F., Isenberg G. (1985) Extra- and intracellular lanthanum: modified calcium distribution, inward currents and contractility in guinea pig ventricular preparations. *Pflügers Arch.* 405(4): 310-22.
- Wang C., Yang T., Noor R., Shuaib A. (2002) Delayed minocycline but not delayed mild hypothermia protects against embolic stroke. *BMC Neurol.* 2:2.
- Wang F., Van Brocklyn J.R., Hobson J.P., Movafagh S., Zukowska-Grojec Z., Milstien S., Spiegel S. (1999) Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a Gi-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem.* 274(50): 35343-35350.
- Weiner J.A., Hecht J.H., Chun J. (1998). Lysophosphatidic acid receptor gene vzg-1/lpA1/edg-2 is expressed by mature oligodendrocytes during myelination in the postnatal murine brain. *J. Comp. Neurol.* 398: 587-98.
- Xu Y., Zhu K., Hong G.Y., Wu W.H., Baudhuin L.M., Xiao Y., Damron D.S. (2000) Sphingosylphosphorylcholine is a ligand for ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1. *Nat. Cell Biol.* 2: 261-67.

- Xu Y. (2002) Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine: G protein-coupled receptors and receptor-mediated signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* 1582: 81–88.
- Yamaguchi S., Tamagawa M., Nakajima N., Nakaya H. (1998) Selective impairment of HCO₃⁻-dependent pH regulation by 3 lysophosphatidylcholine in guinea pig ventricular myocardium. *Cardiovasc. Res.* 37: 179–186.
- Yatomi Y., Ozaki Y., Ohmori T., Igarashi Y. (2001) Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 64:107–122.
- Ye X., Fukushima N., Kingsbury M.A., Chun J. (2002) Lysophosphatidic acid in neural signaling. *NeuroReport* 13: 2169–75.
- Yegin A., Akbas S.H., Özben T., Korgun D.K. (2002) Secretory phospholipase A2 and phospholipids in neural membranes in an experimental epilepsy model. *Acta Neurol. Scand.* 106: 258–262.
- Yokoyama K., Ishibashi T., Ohkawara H., Kimura J., Matsuoka I., Sakamoto T., Nagata K., Sugimoto K., Sakurada S., Maruyama Y. (2002) HMG-CoA reductase inhibitors suppress intracellular calcium mobilization and membrane current induced by lysophosphatidylcholine in endothelial cells. *Circulation.* 105(8): 962-967.
- Yu L., Netticadan T., Xu Y.J., Panagia V., Dhalla N.S. (1998) Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced increase in intracellular calcium in rat cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 286(1): 1-8.
- Zhu K., Baudhuin L.M., Hong G., Williams F.S., Cristina K.L., Kabarowski J.H., Witte O.N., Xu Y. (2001) Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G protein-coupled receptor GPR4. *J. Biol. Chem.* 276: 41325–35.
- Zondag G.C.M., Postma F.R., Van Etten I., Verlaan I., Moolenaar W.H. (1998) Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1. *Biochem. J.* 330: 605-609.

Danksagung

An erster Stelle gehört mein Dank Frau PD Claudia Eder für die Überlassung des Themas, der überdurchschnittlichen Betreuung (ihr Büro stand für mich immer und jederzeit offen) und der angenehmen Arbeitsatmosphäre. Die gleiche Unterstützung habe ich von Dr. med. Tom Schilling erfahren, ohne dessen technischen und moralischen Support Vieles nicht in der Art und Weise erforscht worden wäre, wie es nun in dieser Arbeit vorliegt. Frau Sieglinde Latta war unverzichtbar für die Pflege und Präparation der Zellkulturen. Herrn Prof. Uwe Heinemann danke ich für die Möglichkeit, alle Geräte und Materialien im Institut nutzen zu können.

Last but not least muss ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die immerwährende Motivation bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel „Lysophospholipid induzierte Calcium- und pH-Änderungen muriner Mikroglia“ von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde. Die vorliegende Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar, alle benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berit Rückert