

Expression und Funktion
von Neurotransmitterrezeptoren auf Astrozyten im intakten
Hirngewebe der Maus

Dissertation

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

von
Dipl.-Biochem. Carola Schipke
geb. am 30.04.1974 in Berlin

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin
im Mai 2005

Gutachter: 1. Prof. Dr. Ferdinand Hucho
Freie Universität Berlin
Institut für Chemie - Biochemie
Thielallee 63
14195 Berlin

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

Tag der Disputation: 17. August 2005

nec possunt oculi naturam noscere rerum:
proinde animi vitium hoc oculis adfingere noli

Lucretius, *de rerum natura IV*, 385-6

Die Augen können nicht die Natur der Dinge erkennen:
daher dichte nicht im Geiste diesen Mangel den Augen an

INHALT	Seite
1 EINLEITUNG	7
1.1 Gliazellen sind der häufigste Zelltyp im zentralen Nervensystem.....	7
1.1.1 GFAP-EGFP-transgene Mäuse erlauben die Identifikation von Astrozyten <i>in situ</i>	8
1.1.2 Astrozyten und ihre Interaktionen mit anderen Zelltypen.....	9
1.2 Expression von Neurotransmitterrezeptoren auf Astrozyten.....	10
1.2.1 Glutamatrezeptoren	10
1.2.2 NMDA-Rezeptoren.....	11
1.2.3 Hinweise auf die Expression astrozytärer NMDA-Rezeptoren.....	12
1.3 Astrozytäre Kommunikation	14
1.3.1 Astrozytäre Calciumsignale	14
1.3.2 Calciumwellen als astrozytäre Kommunikationsform.....	16
1.4 Zielsetzung	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Puffer und Lösungen	22
2.1.1 Bikarbonatlösung	22
2.1.2 Lösungen extrazellulär applizierte Substanzen.....	23
2.1.3 Intrazelluläre Perfusionslösung, Pipettenlösung	23
2.1.5 Pufferlösungen für Färbungen (PBS).....	24
2.2 Verwendete Tiere	24
2.3 Anfertigen von Hirnschnitten für elektrophysiologische Untersuchungen	25
2.4 Verwendete Stimulations- und Messprotokolle für elektrophysiologische Messungen	27
2.5 Anfärben der Zellen für morphologische Analysen	28
2.6 Immunhistochemie.....	29
2.7 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)	30
2.8 RT-PCR für NMDA-Rezeptoruntereinheiten aus FACS-isolierten Astrozyten..	30
2.9 Auslösung und Imaging von astrozytären Calciumsignalen.....	31
2.9.1 Elektrische Stimulation zum Auslösen der Calciumwelle.....	31
2.9.2 Imaging der Calciumsignale in Astrozyten	32

3 ERGEBNISSE	34
3.1 Untersuchungen zur Expression von NMDA-Rezeptoren auf Astrozyten	34
3.1.1 Für NMDA-Rezeptoren kodierende mRNA kann in Astrozyten nachgewiesen werden	34
3.1.2 Astrozyten exprimieren physiologisch funktionale NMDA-Rezeptoren	35
3.1.3 Ein großer Teil des durch NMDA-induzierten Stroms ist durch indirekte Effekte bedingt.....	39
3.1.4 Der isolierte, NMDA-induzierte Strom zeigt für NMDA-Rezeptoren typische physiologische Eigenschaften.....	41
3.1.5 Der astrozytäre NMDA-Rezeptor wird durch hohe Mg ²⁺ -Konzentrationen blockiert	44
3.1.6 Astrozytäre NMDA-Rezeptoren sind Ca ²⁺ -permeabel.....	45
3.2 Astrozyten propagieren Calciumwellen in akuten Hirnschnitten	48
3.2.1 Gliale Calciumwellen lassen sich in der weißen Substanz elektrisch auslösen	48
3.2.2 Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern führt zur Erhöhung der Calciumkonzentration im Zytosol	51
3.2.3 Nicht nur Astrozyten nehmen an der glialen Calciumwelle teil.....	54
3.2.4 ATP-Freisetzung in den Extrazellulärraum ist der Träger der Calciumwelle	55
3.2.5 Die Calciumwelle löst eine Reaktion in Mikrogliazellen aus.....	59
4 Diskussion.....	62
4.1 Identifizierung und Untersuchung von Astrozyten im akuten Hirnschnitt	62
4.1.1 GFAP-EGFP-transgene Mäuse erlauben <i>in-situ</i> -Untersuchungen an identifizierten Astrozyten.....	62
4.1.2 Die EGFP-Expression der Astrozytenpopulation ist nicht gleichmäßig	63
4.2 Astrozyten haben die zelluläre Voraussetzung, auf neuronale Aktivität zu reagieren.....	64
4.2.1 Astrozyten exprimieren funktionale NMDA-Rezeptoren.....	64
4.2.2 Der NMDA-induzierte Strom in Astrozyten setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen	65
4.2.3 Die astrozytäre NMDA-induzierte Antwort zeigt typische Eigenschaften ...	67
4.2.4 Astrozyten können durch neuronale Aktivität aktiviert werden.....	68
4.3 Astrozyten können untereinander über Calciumsignale kommunizieren	70

4.3.1 Calciumsignale sind eine Form astrozytärer Kommunikation	70
4.3.2 Calciumwellen können im akuten Hirngewebe propagieren	71
4.3.3 Die Calciumwelle im Corpus Callosum propagiert über die Freisetzung von ATP.....	72
4.4.4 Astrozytäre Calciumwellen und neuronale Aktivität	73
4.4.5 Calciumwellen als Signale in pathologischen Situationen?.....	74
4.4.6 Ausblick: Die Rolle von Gliazellen bei synaptischer Transmission.....	75
5 Zusammenfassung	77
Summary	78
6 Literatur	80
7 Anhang	89
Abkürzungsverzeichnis.....	89
Lebenslauf	91
Publikationen und Posterbeiträge.....	93
Erklärung zur selbständigen Durchführung der Dissertation.....	96
Danksagung.....	97