

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen zur Expression von NMDA-Rezeptoren auf Astrozyten

3.1.1 Für NMDA-Rezeptoren kodierende mRNA kann in Astrozyten nachgewiesen werden

In der vorliegenden Arbeit konnten mittels einer transgenen Maus, welche EGFP (enhanced green fluorescent protein) unter Kontrolle des zellspezifischen GFAP-Promotors exprimiert, Astrozyten *in situ* eindeutig identifiziert werden. Um eine reine Präparation dieser Astrozyten zu erhalten, wurden Einzelzellsuspensionen kortikalen Hirngewebes von zwei Wochen alten Tieren angefertigt. Aus diesen Suspensionen wurden Astrozyten mit Hilfe der fluoreszenzunterstützten Zellsortierung isoliert (FACS). Um die Anwesenheit von mRNA, die für die NMDA-Rezeptoruntereinheiten kodiert, nachzuweisen, wurden nur Zellen, die mindestens 50fach stärkere Fluoreszenz als Zellen nicht-transgener Tiere aufweisen, als positiv ausgewählt und sortiert. Sofort nach der Sortierung wurde RNA aus den Zellen isoliert, revers transkribiert und die cDNA mittels PCR auf Genaktivität für die NMDA-Rezeptoruntereinheiten untersucht (Abb. 4). Es wurden Signale aus Amplifikationen für NR1, NR2B und NR2C erhalten. Eine neuronale Kontamination der RNA konnte ausgeschlossen werden, weil eine PCR mit Primern für Tyrosinhydroxylase kein Amplifikationssignal zeigte. In einer Kontrollpräparation der RNA aus dem Gesamthirn der Maus konnte hingegen ein klares Amplifikationssignal für Tyrosinhydroxylase nachgewiesen werden. Eine Proteinpräparation mit dem Ziel, mittels Western-Blot die Expression von Rezeptoruntereinheiten zu zeigen, konnte

nicht durchgeführt werden, weil nicht genügend Astrozyten mittels FACS aufgereinigt werden konnten.

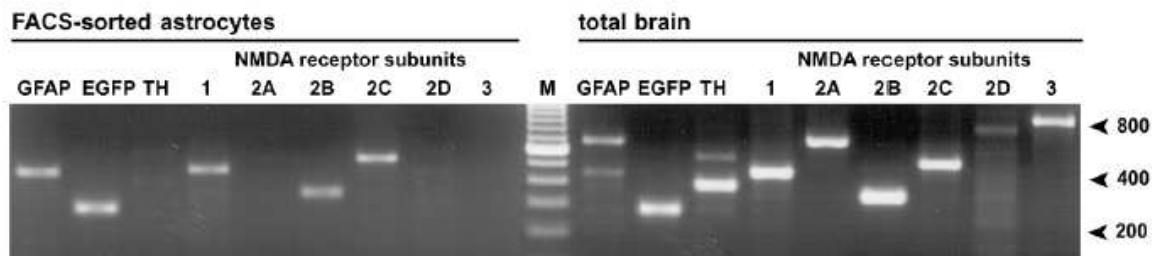


Abbildung 4

RT-PCR Analyse der für NMDA-Rezeptor Untereinheiten kodierenden mRNA. In FACS isolierten Astrozyten der EGFP-transgenen Mäuse konnte mRNA für NMDA-Rezeptoruntereinheiten amplifiziert werden. Für neuronspezifische Tyrosinhydroxylase (TH) konnte keine Amplifikationsprodukte erhalten werden. RNA aus dem Cortex der transgenen Tiere dient als Kontrolle. Hier konnten für alle Untereinheiten, sowie auch für TH Amplifikationsprodukte erhalten werden.

3.1.2 Astrozyten exprimieren physiologisch funktionale NMDA-Rezeptoren

Um die Expression funktionaler NMDA-Rezeptoren auf Astrozyten nachzuweisen, wurden akute Hirnschnitte von GFAP-EGFP-transgenen Maushirnen für elektrophysiologische Messungen angefertigt. EGFP-positive Zellen wurden hauptsächlich im cingulären und parietalen Kortex in koronaren Schnitten des Großhirns von ein bis vier Wochen alten Mäusen untersucht. Typische morphologische Eigenschaften der grün-fluoreszierenden Astrozyten waren kleine Somata mit einem Durchmesser von etwa 10 μm , viele stark aufgefächerte Ausläufer und Endfüße, die Blutgefäße umhüllen. Färbungen für GFAP im Hirngewebe dieser Tiere zeigten eine Überlappung der EGFP-Fluoreszenz und der GFAP-Immunoreaktivität. Es fiel auf, daß lediglich eine Teilpopulation der GFAP-positiven

Zellen sich EGFP-positiv darstellt (Abb. 5). EGFP-positive Zellen, die keine GFAP-Immunoreaktivität aufwiesen, konnten nicht nachgewiesen werden.

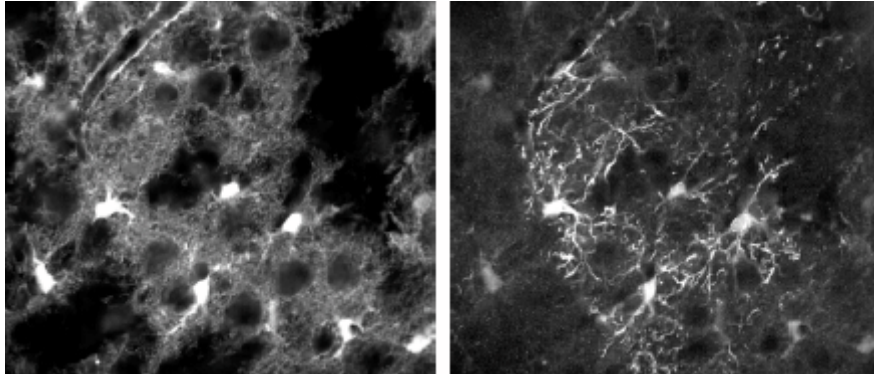


Abbildung 5

EGFP-Expression und positive GFAP-Färbung stimmen nicht 100%ig überein. Im linken Bild ist die EGFP-Fluoreszenz im Bereich des Neocortex gezeigt. Im rechten Bild die GFAP-Färbung des selben Bereiches. Es ist zu erkennen, daß zwar alle GFAP-positiven Zellen auch EGFP exprimieren, nicht jedoch andersherum.

Mittels Vergleich von EGFP-Fluoreszenz- und Phasenkontrastbild wurden individuelle Zellen gepatcht und der Modus der Ganzzelleableitung angewendet. De- und hyperpolarisierende Spannungssprünge, in 10mV-Schritten vom Haltepotential -80 mV (± 90 mV) ausgehend, induzierten in den meisten Fällen Ströme mit einer linearen Strom-Spannungskurve, es wurden jedoch auch Zellen mit komplexem Strommuster gepatcht (Abb. 6).

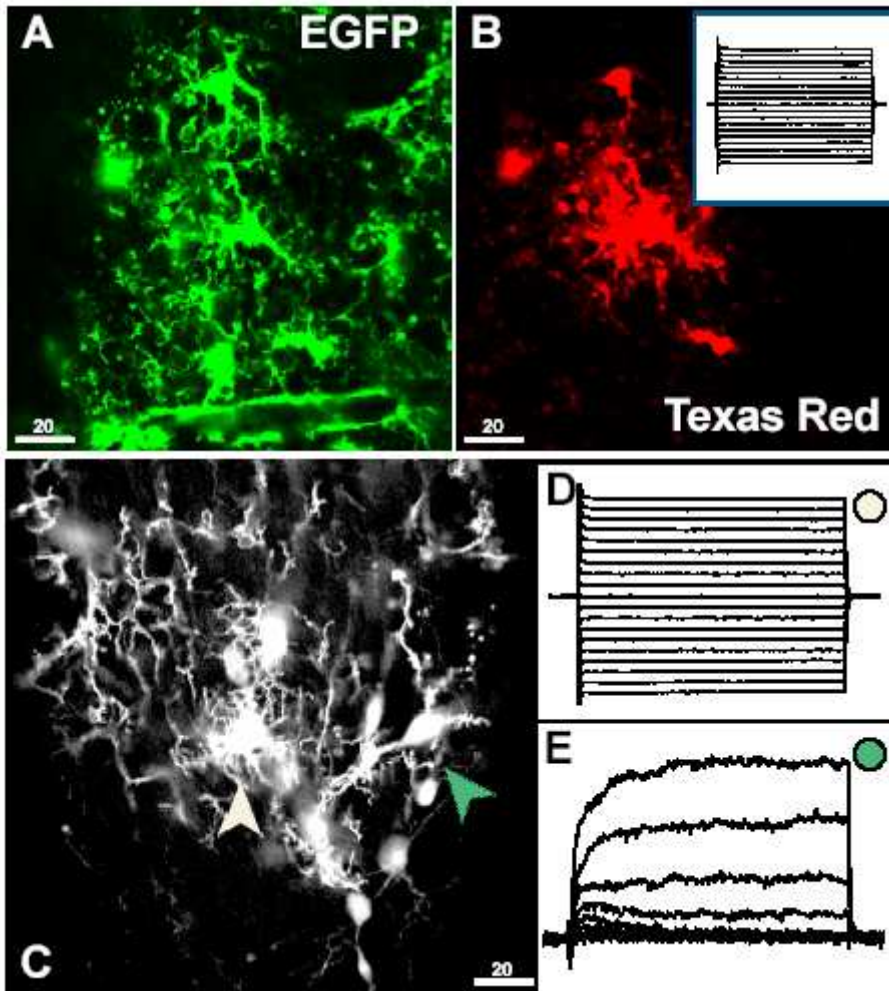


Abbildung 6

Die Hauptzahl der Astrozyten im Neocortex der Maus zeigt passive Membranströme. Eine Zelle in A wurde gepatcht und mit TexasRed über die Pipette gefüllt (B). Das Strommuster ist oben rechts in B gezeigt. C,D,E: In jungen Tieren, in diesem Falle einer 1 Tage alten Maus, finden sich auch Zellen mit komplexem Strommuster (E), die sich auch morphologisch von den protoplasmatischen Astrozyten (D) unterscheiden.

Mit einem durchschnittlichen Membranpotential von $71,8 \text{ mV} \pm 6,4 \text{ mV}$ ($n=133$) zeigten die untersuchten Zellen nicht nur morphologisch, sondern auch elektrophysiologisch, charakteristische, astrozytäre Eigenschaften, da sie bei Depolarisation keine Aktionspotentiale generierten, sondern sich passiv verhielten.

In den identifizierten Astrozyten induzierte die Applikation von 100 μM NMDA in der Badlösung in 96 von 133 Fällen Einwärtsströme (Abb.7). Diese induzierten Ströme hatten eine Größe von 11 bis 814 pA, bzw. 197 ± 190 pA im Mittel.

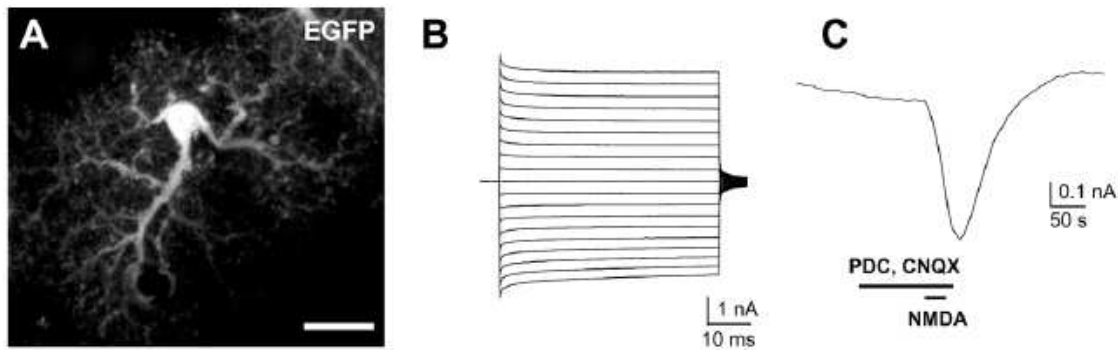


Abbildung 7

Der Strom der Ganzzelleableitung der Zelle in A ist in B gezeigt. Die Zelle ist durch ein symmetrisches Muster von nicht inaktivierenden Einwärts- und Auswärtsströmen gekennzeichnet. Die Zelle wurde auf -80 mV geklemmt und Spannungssprünge in 10 mV Abständen bis $+10$ mV und -170 mV durchgeführt. C: NMDA ($100 \mu\text{M}$) wurde im Verlauf der Messung dieser Zelle appliziert. Um Glutamattransporter, sowie AMPA-Rezeptoren zu blocken, wurden gleichzeitig PDC und CNQX appliziert. Die Zelle zeigt einen deutlichen Einwärtsstrom nach NMDA-Applikation.

Der NMDA-induzierte Strom über die Astrozytenmembran konnte durch MK-801 ($1 \mu\text{M}$), einem spezifischen nicht-kompetitiven Kanalblocker für NMDA-Rezeptoren, welches in etwa 2 min vor der NMDA-Applikation durch wechseln der Badlösung appliziert wurde, fast vollständig geblockt werden (Abb.8). Der in Anwesenheit von MK-801 gemessene Strom belief sich auf etwa 7% des durch NMDA alleine induzierten Stromes ($n=7$ Antworten in 7 verschiedenen Zellen).

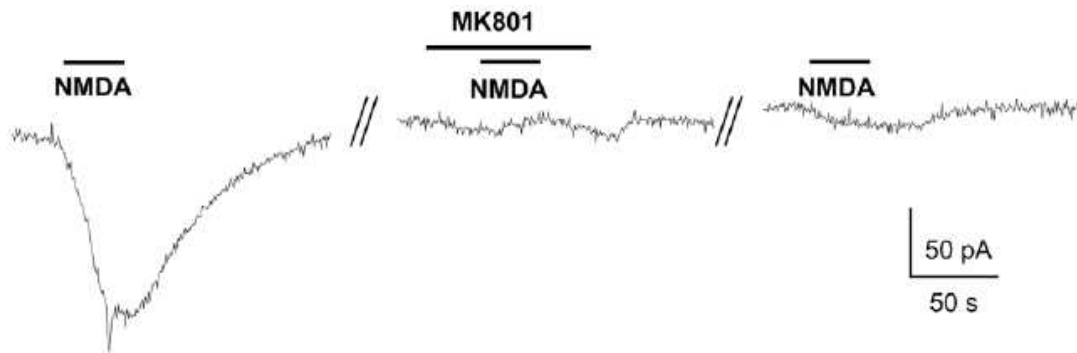


Abbildung 8

Die durch NMDA-induzierte Antwort wird durch MK 801, einen NMDA-Rezeptor spezifischen Kanalblocker, blockiert. In einer Zelle, die nach NMDA-Applikation einen Einwärtsstrom zeigt, kann dieser Strom durch MK 801 geblockt werden. MK 801 kann jedoch nicht wieder ausgewaschen werden, da es sehr fest in der Ionenpore des Rezeptors sitzt. Zwischen den Messungen wurde jeweils 20 min gewaschen.

Die durch MK-801 verursachte Blockade des NMDA-induzierten Stromes war irreversibel. Auch nach einer Auswaschzeit von 15-20 min konnte keine NMDA-Antwort mehr induziert werden. Dies ist auf eine bekannte Eigenschaft des MK-801 zurückzuführen, es verbleibt in der Ionenpore, nachdem es gebunden hat und kann nicht mehr ausgewaschen werden (Wong et al., 1986)

3.1.3 Ein großer Teil des durch NMDA-induzierten Stroms ist durch indirekte Effekte bedingt

Es muss angenommen werden, daß eine NMDA-Applikation in die Badlösung jegliche NMDA-Rezeptoren im Schnittpräparat aktiviert, nicht nur die vermuteten astrozytären Rezeptoren, sondern vor allen Dingen die sehr gut beschriebenen neuronalen NMDA-Rezeptoren. Obwohl kein Zweifel besteht, daß die in dieser Arbeit detektierten Ströme als Ströme über die astrozytäre Zellmembran gemessen wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese Ströme durch indirekte Effekte nach

Aktivierung neuronaler NMDA-Antworten und damit neuronaler Aktivität induziert wurden. Eine Aktivierung neuronaler Aktivität führt zur Freisetzung von Transmittern an Synapsen. Diese Transmitter können Reaktionen auf Astrozyten induzieren.

Um diese sekundären Effekte auszuschließen, bzw. zu minimieren, wurden verschiedene Substanzen eingesetzt, um synaptische Transmission und Aktionspotentiale auf neuronaler Seite, sowie den elektrogenen Glutamattransport auf astrozytärer Seite pharmakologisch zu blockieren. Cd^{2+} (100 μM), welches präsynaptisch lokalisierte, spannungsaktivierte Calciumkanäle blockiert, reduzierte den NMDA-induzierten Strom auf 23 % des Kontrollniveaus ($n=4$). Auch die Blockade von Aktionspotentialen reduzierte die NMDA-induzierte Stromantwort auf etwa 45 %, verglichen mit einer reinen NMDA-Applikation ($n=2$). In Anwesenheit von Cd^{2+} , TTX und auch CNQX, welches eingesetzt wurde um die durch Aktivierung von AMPA-Rezeptoren induzierten Antworten zu blockieren, und PDC, um den elektrogenen Glutamattransport auf astrozytärer Seite zu blockieren, waren die NMDA-induzierten Antworten auf 10 – 25 % der Kontrollantwort reduziert (Abb. 9).

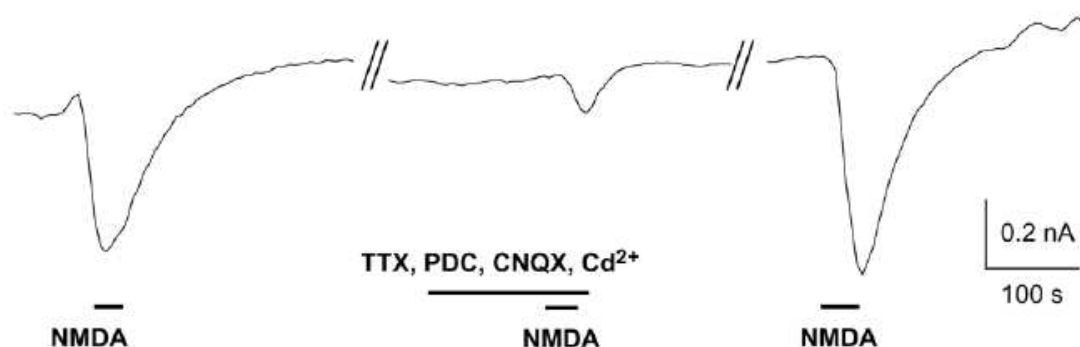


Abbildung 9

In Anwesenheit von Tetrodotoxin (TTX), um die Propagation von Aktionspotentialen zu inhibieren, von PDC, um Glutamattransporter zu inhibieren, von CNQX, um AMPA-Rezeptoren zu inhibieren und von Cd^{2+} , um Vesikelfusion an Synapsen zu inhibieren, ist die Antwort auf NMDA deutlich reduziert. Dies deutet auf einen großen Anteil von Sekundärreaktionen bei der durch reines NMDA-induzierten Antwort hin.

Wie in Abbildung 9 zu erkennen, ist der durch eine topische NMDA-Applikation induzierte Strom über die Astrozytenmembran hauptsächlich durch indirekte Effekte bedingt. Ein durch NMDA-Applikation induzierter signifikanter Strom über die astrozytäre Membran, der nicht durch Blocker bekannter Effekte inhibiert werden konnte, weist eindeutig auf die Expression funktionaler NMDA-Rezeptoren auf Astrozyten hin.

3.1.4 Der isolierte, NMDA-induzierte Strom zeigt für NMDA-Rezeptoren typische, physiologische Eigenschaften

Der Strom durch Ionenporen, zu denen auch der NMDA-Rezeptor gehört, ist durch ein Umkehrpotential charakterisiert, das sich aus den Umkehrpotentialen der Ionen, für welche die Pore Leitfähigkeit zeigt, zusammensetzt. Durch Bestimmung des Umkehrpotentials des Stromes kann auf die Ionen, welche die Leitfähigkeit nach Rezeptoraktivierung verursachen, zurückgeschlossen werden.

Um die durch NMDA-Applikation induzierten Änderungen der Membranleitfähigkeit bei verschiedenen Haltepotentialen und somit das Umkehrpotential des induzierten Stromes bestimmen zu können, wurde die Reaktion der Zellen auf kurze Spannungssprünge in de- und hyperpolarisierende Richtung untersucht. Vom Haltepotential bei -80 mV aus wurden alle $5,5$ s repetitiv Spannungssprünge in 25 mV-Schritten bis -180 mV in hyperpolarisierende, und bis $+70$ mV in depolarisierende Richtung durchgeführt. Während dieses Aufnahmeprotokolls wurde NMDA für 30 s appliziert. In den meisten Versuchen variierte die Ruheleitfähigkeit der Membran sehr stark oder nahm über die Zeit ab. Dadurch war es in den meisten Fällen nicht möglich, eindeutig das Umkehrpotential des induzierten Stromes zu

bestimmen. Umkehrpotentiale des induzierten Stroms wurden nur bei Aufnahmen von Zellen, deren Membranleitfähigkeit 30 min oder länger stabil war, bestimmt.

Strom-Spannungs-Kurven der induzierten Ströme wurden erhalten, indem die durch Spannungssprünge induzierten Ströme vor der NMDA-Applikation von denen bei maximaler Antwort abgezogen wurden (Abb.10). Die Strom-Spannungs-Kurve des durch NMDA-Applikation induzierten Stromes zeigte eine Zunahme an Membranleitfähigkeit von $2,9 \pm 1,8$ nS ($n=9$). Das Umkehrpotential lag bei etwa 25 mV (Abb. 10 unten). In Anwesenheit der Blocker Cd^{2+} , CNQX, PDC und TTX war der Anstieg der Leitfähigkeit während der NMDA-Applikation mit $0,39 \pm 0,34$ nS ($n=6$) deutlich geringer. Das Umkehrpotential lag bei nahe 0 mV ($-1,3$ mV, von $-7,5$ bis $+15,6$ mV, $n=4$) in der erwarteten Größenordnung für Ströme durch die Kationenpore des NMDA-Rezeptors. Die gemessene Stromspannungskurve war linear (Abb. 10 unten).

Der Effekt der Blocker, also die deutlich geringere Erhöhung der Leitfähigkeit bei Anwesenheit und die Veränderung im Umkehrpotential bei Anwesenheit der Blocker, zeigten deutlich, daß die gliale Antwort auf NMDA-Applikation durch zwei Mechanismen, die direkte Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, sowie indirekte Effekte ausgelöst wird.

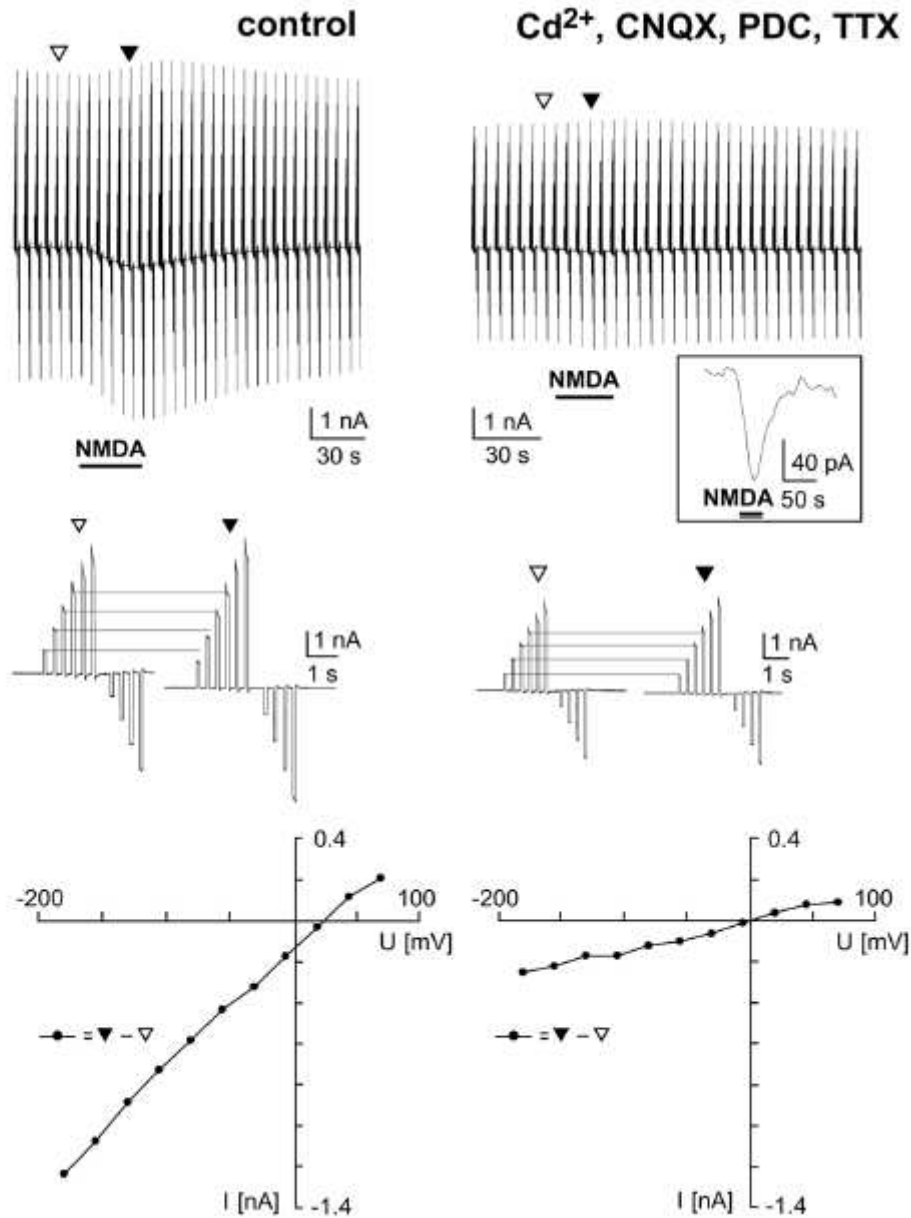


Abbildung 10

Das Umkehrpotential des durch NMDA-induzierten Stroms wurde in An- und Abwesenheit der Blocker untersucht. Eine Serie von de- und hyperpolarisierenden Spannungssprüngen (25 mV Abstände, bis +150 mV bzw. -100 mV vom Haltepotential von -80 mV aus) wurde alle 3 s appliziert und NMDA wurde während dieses Protokolls appliziert (obere Daten). Dies wurde in Abwesenheit (links) und Anwesenheit der Blocker durchgeführt. In der Mitte sind ausgewählte Sprungsequenzen jeweils vor und während der NMDA-Applikation gezeigt. Die Strom-Spannungs-Kurven der NMDA-induzierten Antworten wurde durch Subtraktionen der gemessenen Ströme vor und während der Antwort erhalten. Das Umkehrpotential beträgt 25 mV ohne Blocker und 2 mV in Anwesenheit der Blocker.

3.1.5 Der astrozytäre NMDA-Rezeptor wird durch hohe Mg^{2+} -Konzentrationen blockiert

Neuronale, funktionale NMDA-Rezeptoren zeigen eine spannungsabhängige Blockade des Ionenkanals durch Mg^{2+} -Ionen. Das Mg^{2+} -Ion blockiert den Kanal durch die Bindung in der Ionenpore. Dieses Ion löst sich bei Membranpotentialen positiver als -40mV . Bei Membranpotentialen, die negativer als -40 mV sind, kann trotz Aktivierung des Rezeptors durch einen Liganden, kein Strom durch die Ionenpore gemessen werden. Dies ist eine Schlüsseleigenschaft des NMDA-Rezeptors, da diese Eigenschaft ihm die Rolle des Koinzidenzdetektors verleiht. Erst wenn die Zellmembran bereits depolarisiert ist, öffnet auch der NMDA-Rezeptor und läßt somit Ca^{2+} in das Zytosol einströmen. Der Effekt von extrazellulärem Mg^{2+} auf die astrozytären NMDA-induzierten Ströme wurde daher untersucht. Um nur den Effekt auf die NMDA-Rezeptor vermittelte astrozytäre Antwort zu messen, wurden die Versuche in Anwesenheit der oben erwähnten Blocker durchgeführt. Eine Konzentration von $4\text{ mM } Mg^{2+}$ und höher in der extrazellulären Badlösung blockiert den NMDA-induzierten Strom, verglichen mit einer Messung in Mg^{2+} -freier Lösung. Durch 10minütiges Waschen des Schnittes in Mg^{2+} -freier Lösung konnte der Mg^{2+} -Block nicht wieder rückgängig gemacht werden (Abb. 11A). Nach Depolarisation der Zelle unter Klemmkontrolle in Mg^{2+} -freier Lösung jedoch konnte eine Antwort mit einer mit der Kontrollantwort vergleichbaren Amplitude induziert werden (Abb. 11B). Es konnte somit eine Spannungsabhängigkeit des durch NMDA-induzierten Stromes auf Astrozyten gezeigt werden. Zudem können in diesem Versuch weiterhin Sekundäreffekte durch die sehr hohe Mg^{2+} -Konzentration ausgeschlossen werden, weil alle NMDA-Rezeptoren, die nicht auf der Zelle unter Klemmkontrolle sitzen, durch die hohe Mg^{2+} -Konzentration geblockt sein sollten.

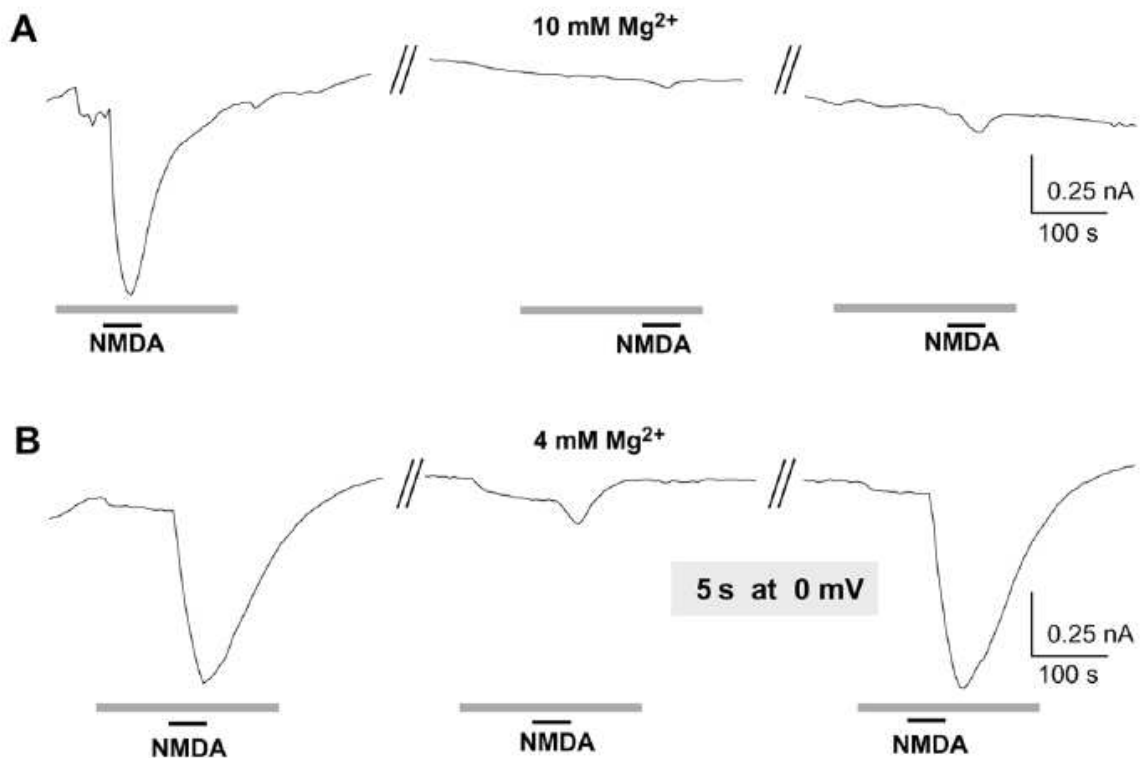


Abbildung 11

Der Mg²⁺-Block des NMDA-Rezeptors ist auch bei Astrozyten spannungsabhängig. A: In Mg²⁺-freier Badlösung induziert NMDA in Anwesenheit der Blocker einen deutlichen Strom. Dieser Strom kann durch Mg²⁺ in der Badlösung geblockt werden. Eine 20minütige Waschphase führt nicht zur Aufhebung dieser Blockade der Leitfähigkeit des NMDA-Rezeptors. B: Wird die gepatchte Zelle nach Applikation von Mg²⁺-haltiger Lösung in Mg²⁺-freier Lösung für 5s auf ein Potential von 0 mV geklemmt, kann durch NMDA sodann wieder eine Reaktion induziert werden. Die Zeit zwischen den Messungen betrug 20 min. Die grauen Balken zeigen die Applikation des Blocker-Cocktails an.

3.1.6 Astrozytäre NMDA-Rezeptoren sind Ca²⁺-permeabel

Im Gegensatz zu den meisten ionotropen Glutamaterezeptoren vom AMPA-Typ, ist der NMDA-Rezeptor für Ca²⁺-Ionen permeabel. Eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren auf Astrozyten sollte somit zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-

Konzentration führen. Es wurde daher der Effekt einer NMDA-Applikation auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in Astrozyten gemessen (Abb. 12).

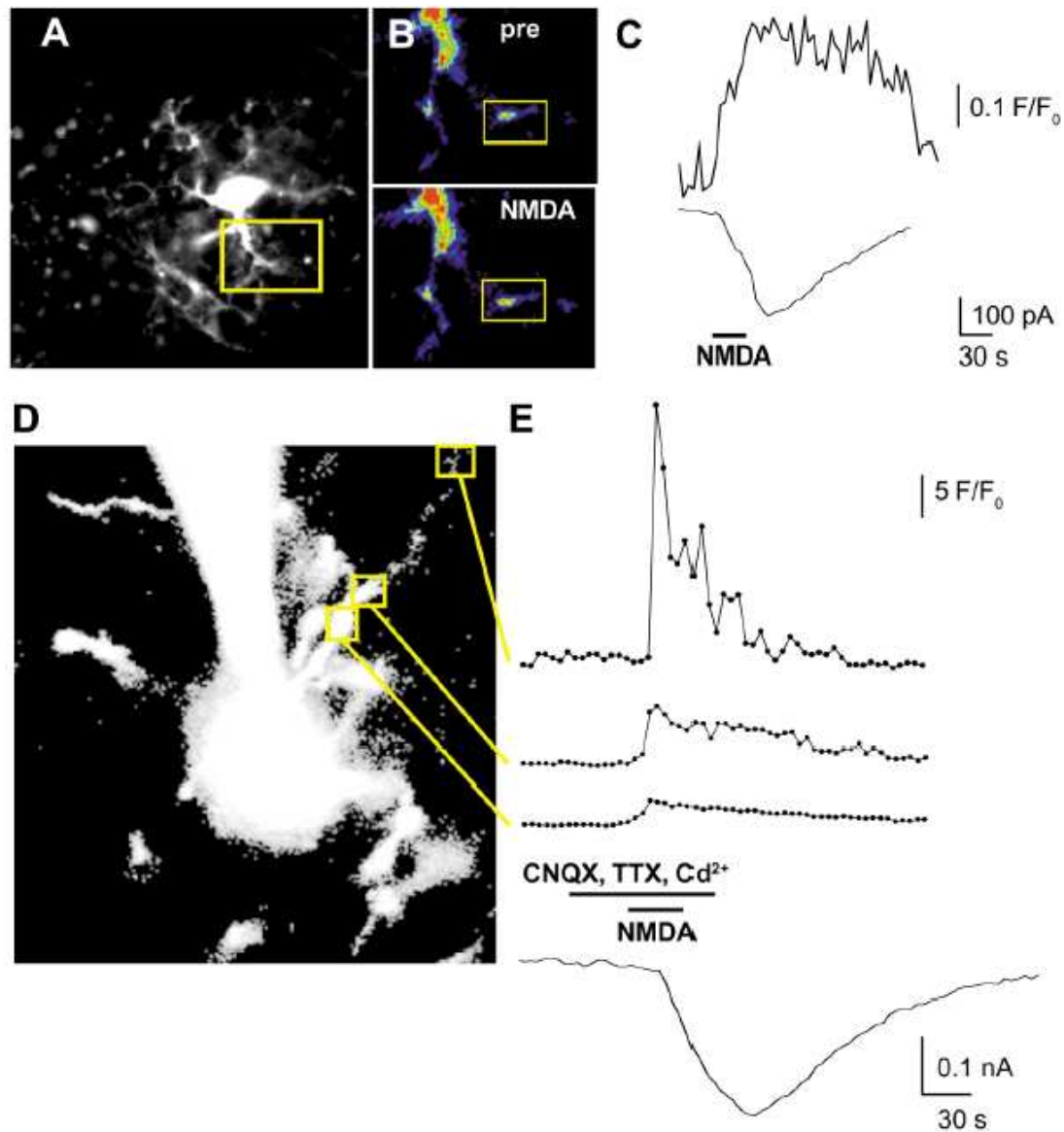


Abbildung 12

NMDA induziert eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels in Astrozyten. A: Das Fluoreszenzbild zeigt die EGFP-Fluoreszenz eines Astrozyten. Das Viereck markiert den Ausschnitt, der in B gezeigt ist. Das Viereck in B markiert den Bereich, in dem die Fluoreszenzänderung bei NMDA-Applikation gemessen wurde. Die Fluoreszenzänderung des Calciumindikators Calcium Orange und der korrespondierende Strom sind in C dargestellt.

D: Eine nicht-EGFP-exprimierende Zelle wurde über die Patchpipette mit dem Calciumindikator Fluo4 gefüllt. Die Fluoreszenzänderungen wurden in den markierten Bereichen bestimmt und sind in E dargestellt. Auch bei dieser Zelle wurde gleichzeitig der Strom über die Zellmembran gemessen (E, unterer Graph).

EGFP-positive Astrozyten wurden in einem ersten Versuch über die Patchpipette mit dem im roten Bereich fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikator Calcium Orange dialysiert. Durch die Wahl dieses Farbstoffes konnte zwischen der intrinsischen EGFP-Fluoreszenz und der Fluoreszenz des Indikators unterschieden werden (Abb. 12 A, B, C). NMDA induzierte einen Anstieg der Fluoreszenzintensität, was einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration anzeigt (n=3). Auch diese Versuche wurden in Anwesenheit aller oben beschriebenen Blocker durchgeführt. Die Eigenschaften von Calcium Orange führten zu Messungen mit sehr kleinen Signalamplituden, weshalb in einem zweiten Versuch der grün fluoreszierende Ca^{2+} -Indikator Fluo-4 verwendet wurde (Abb. 12 D, E). In diesen Versuchen konnten keine EGFP-transgenen Tiere eingesetzt werden, da die Fluoreszenzen von EGFP und Fluo-4 überlappen. Es wurden daher Hirnschnitte von nicht-transgenen Tieren verwendet.

Die wesentlich besseren Fluoreszenzeigenschaften von Fluo-4 erlaubten, die NMDA-induzierte Ca^{2+} -Erhöhung in der Zelle in verschiedenen Kompartimenten zu analysieren. Während nahe des Somas nur kleine Antworten gemessen wurden, konnten in den somafernen Ausläufern sehr hohe lokale Anstiege der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gemessen werden.

Die Applikation von NMDA induziert somit in Astrozyten mehrere für die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren typische Reaktionen im akuten Hirnschnittpräparat.

3.2 Astrozyten propagieren Calciumwellen in akuten Hirnschnitten

Da Calciumsignale nicht nur eine Art der Signalgebung von Neuronen zu Astrozyten sind, sondern auch für die interastrozytäre Kommunikation von Bedeutung sind, wurde im Folgenden die Kommunikation über Calciumsignale zwischen Astrozyten, bzw. Gliazellen im allgemeinen, nach einer fokalen Stimulation untersucht.

3.2.1 Gliale Calciumwellen lassen sich in der weißen Substanz elektrisch auslösen

Um gliale Calciumsignale *in situ* zu messen, wurden akute Hirnschnitte mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4-Acetoxymethylester (Fluo-4-AM) inkubiert. Der Acetoxymethylester des aktiven Farbstoffes Fluo-4 ist membrangängig und kann in die Zellen diffundieren. Im Zytosol wird von unspezifischen Esterasen die Esterbindung gespalten. Der Farbstoff liegt dann als geladenes Molekül vor und kann nicht wieder aus der Zelle herausdiffundieren.

In der weißen Substanz, im Bereich des Corpus Callosum befinden sich ausschließlich gliale Zellsomata. Aus diesem Grund wurde diese Region für die Versuche ausgewählt. Eine Verwendung der GFAP-EGFP-transgenen Tiere war nicht möglich, da die grünen Fluoreszenzen von EGFP und Fluo-4 überlappen, und im roten Bereich fluoreszente Farbstoffe ein für die folgenden Versuche nicht ausreichendes Signal geben.

Um eine Calciumwelle auszulösen, wurde eine mit Badlösung gefüllte Mikropipette mit einer Öffnung von ca. 15 µm vorsichtig auf der Schnittoberfläche im Bereich des Corpus Callosum platziert. Die Stimulation erfolgte elektrisch für 4s mit einer Frequenz von 10 Hz. Bereits während der Stimulation konnte ein Anstieg der

intrazellulären Calciumkonzentration in Astrozyten nahe (10-20 μm) der Stimulationspipette gemessen werden (Abb. 13). Dieser wurde gefolgt von einer sich wellenartig ausbreitenden Reaktion in Form von vorübergehenden Fluoreszenzanstiegen in zahlreichen Zellen, die mit zunehmendem Abstand von der Stimulationspipette zeitlich versetzt zur elektrischen Stimulation reagierten. Die Welle setzte sich mit einer Geschwindigkeit von $13,9 \pm 1,8 \mu\text{m/s}$ ($n=26$) fort. Zur Auswertung wurde der zeitliche Beginn des Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration mit dem Abstand der entsprechenden Zelle von der Stimulationspipette in Beziehung gesetzt.

In manchen Fällen breitete sich die Welle entlang des axonalen Fasertraktes etwas schneller aus, was der Welle eine ellipsoide Ausbreitungsform gab.

Erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel konnten in Zellen bis an den Rand des Beobachtungsbereiches gemessen werden. Dieses lässt schließen, daß die Calciumwelle im Corpus Callosum sich über eine Distanz von mehr als 0,5 mm ausbreitet. Die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels einer gegebenen Zelle hielt für etwa 1 min an, außer bei Zellen in direkter Nähe zur Stimulationspipette, dort persistierte die Reaktion für etwa 2 min.

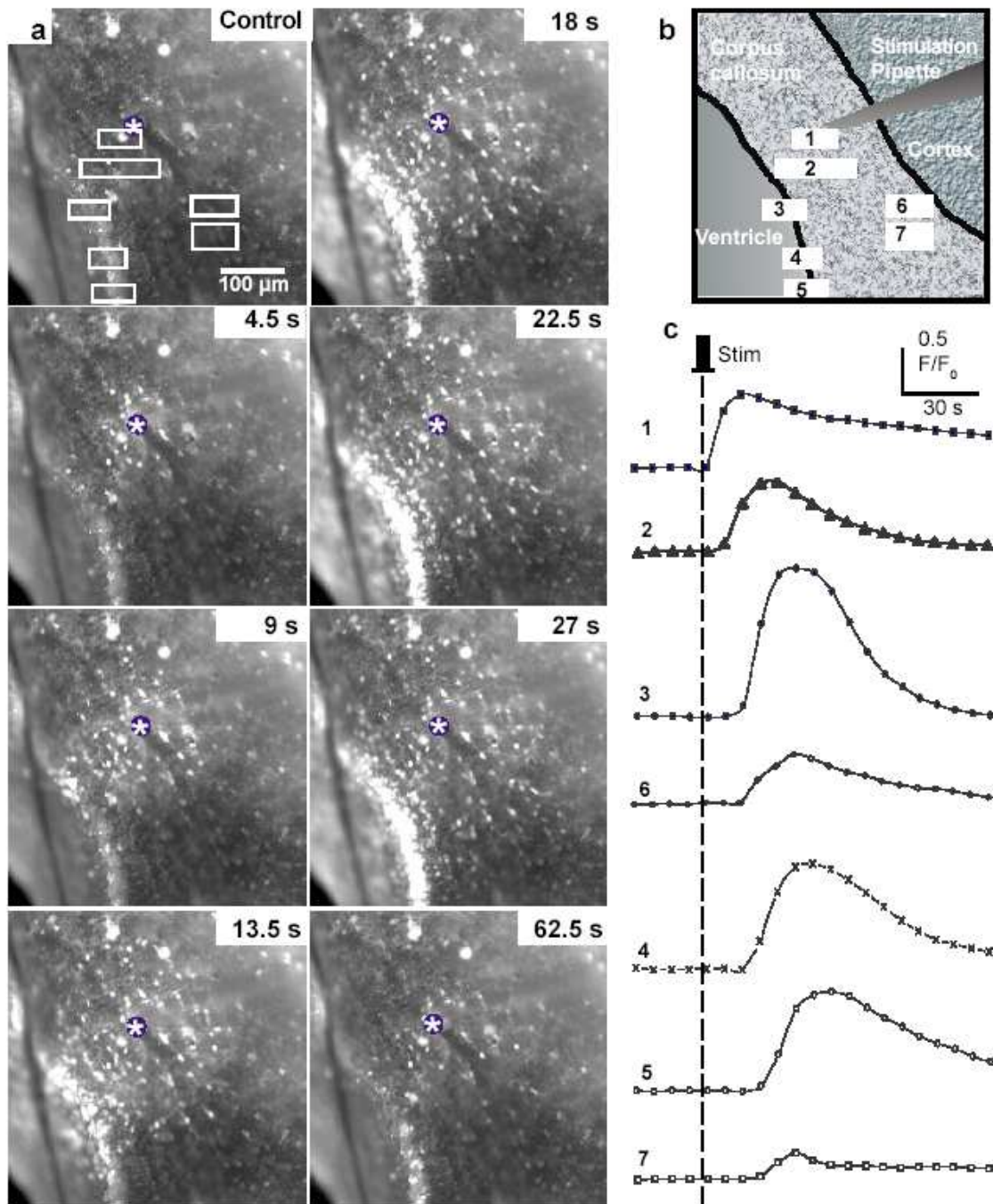


Abbildung 13

Propagation von Calciumwellen im akuten Hirnschnitt. Eine Serie von Fluoreszenzbildern vor (control) und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Stimulation zeigen die Ausbreitung des Calciumsignals innerhalb des Hirnschnittes. Die Position der Stimulationselektrode ist mit einem Sternchen markiert. Das Schema in B skizziert die Struktur des Gewebes in A. In den markierten Bereichen wurde zudem die Änderung der Fluoreszenz gemessen, dies ist in C gezeigt. Nahe der Pipette (Bereich 1) steigt die Fluoreszenz sofort nach der Stimulation an, weiter entfernt erst nach mehreren Sekunden.

Die Welle konnte mindestens vier Mal an derselben Stelle ausgelöst werden, wenn dem Schnitt wenigstens 5 min Erholungszeit zwischen den Stimulationen gegeben wurde.

Das Phänomen der sich ausbreitenden Calciumwelle war nicht auf das Corpus Callosum beschränkt: Zellen in den angrenzenden kortikalen Regionen zeigten ebenfalls einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Entlang der Ependymzellschicht der Ventrikel breitete sich die Calciumwelle schneller aus. Die Ausbreitung der Welle in diesen Hirnregionen wurde nicht weitergehend untersucht.

3.2.2 Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern führt zur Erhöhung der Calciumkonzentration im Zytosol

Um festzustellen, ob es sich bei der gemessenen Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels um einen Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum oder um eine Freisetzung aus den intrazellulären Speichern handelt, wurden Reaktionen in calciumhaltiger und calciumfreier Badlösung miteinander verglichen. Interessanterweise propagierte die Welle in calciumfreier Badlösung und dehnte sich sogar etwas weiter aus, dabei wurden mehr Zellen in das Phänomen miteinbezogen. Dieses läßt darauf schließen, daß der Calciumeinstrom im Wesentlichen nicht aus dem Extrazellulärraum erfolgt. Die meisten Experimente wurden in der Folge in nominal calciumfreier Lösung durchgeführt, auch mit dem Ziel die neuronale Aktivität, bzw. die Freisetzung von Neurotransmittern an Synapsen weitestgehend zu inhibieren. Die Abhängigkeit der Calciumerhöhung von der Calciumfreisetzung aus Speichern innerhalb der Zellen wird auch dadurch bestätigt, daß die Calciumwelle nicht mehr ausgelöst werden konnte, wenn zuvor die intrazellulären Calciumspeicher entleert wurden (Wang et al., 2000). Dieses wurde durch eine wiederholte Applikation

von ATP in Gegenwart von Thapsigargin, einem Blocker der Calcium-ATPase des endoplasmatischen Retikulums, die für die Auffüllung der Speicher sorgt, erreicht (Lytton et al., 1991). Die erste Applikation von ATP führte noch zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Da jedoch die Auffüllung des Speichers inhibiert war, führte bereits eine zweite Applikation von ATP nicht mehr zu einer messbaren Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels (Abb. 14). Nach der Auslösung einer Calciumwelle wurde das beschriebene Protokoll angewendet. Darauf folgend führte eine elektrische Stimulation in Gegenwart von Thapsigargin nicht mehr zur Auslösung einer Calciumwelle. Das Signal war auf die unmittelbare Umgebung der Stimulationspipette begrenzt (Abb. 14).

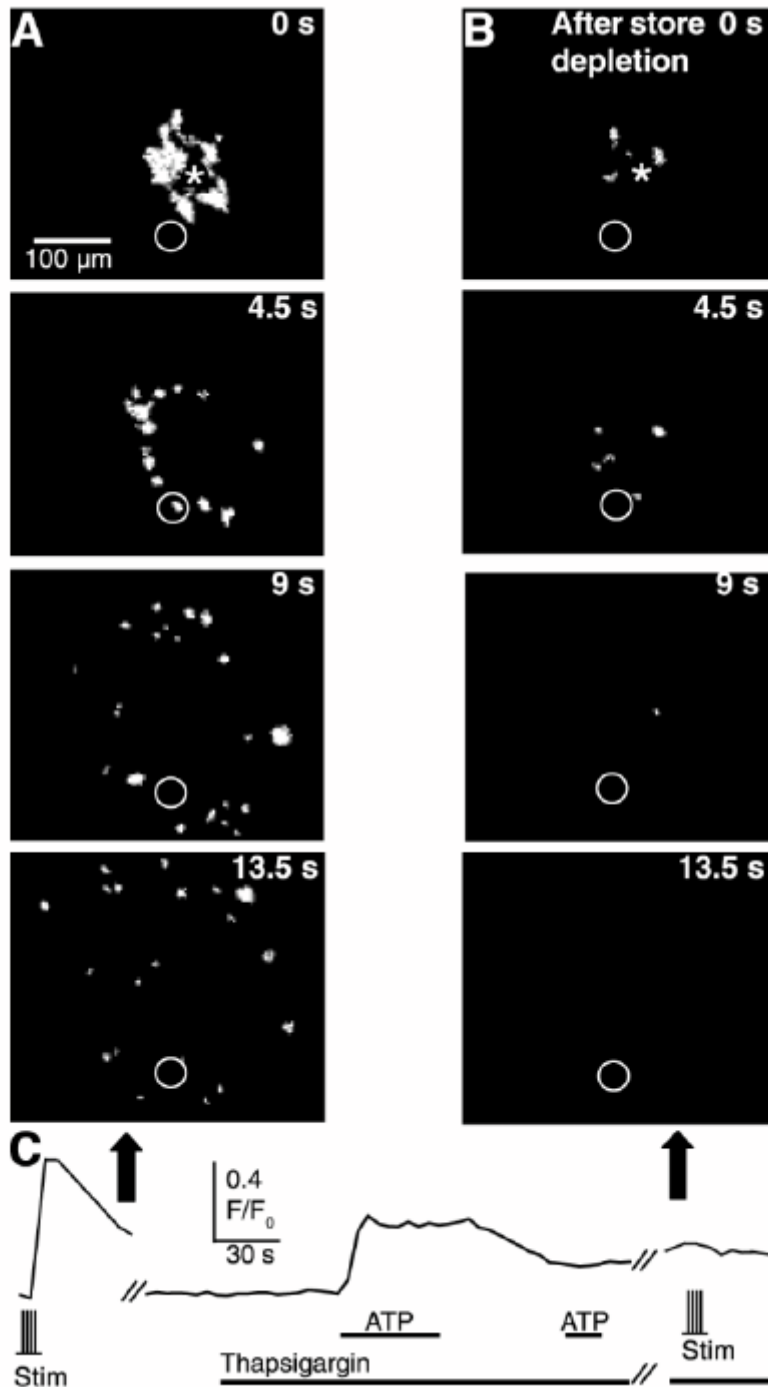


Abbildung 14

Die Ausbreitung der Welle wurde vor (A) und nach (B) der Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher gemessen. Die Speicher wurden durch zwei ATP-Applikationen in Anwesenheit von Thapsigargin, wie in C gezeigt, komplett entleert. Eine Stimulation führt nicht mehr zur Ausbreitung einer Welle, wenn die Speicher zuvor entleert wurden.

3.2.3 Nicht nur Astrozyten nehmen an der glialen Calciumwelle teil

Um den Zelltyp, der an der Reaktion beteiligten Zellen zu bestimmen, wurde das Membranstrommuster der reagierenden Zellen mittels der Patch-Clamp-Technik charakterisiert. Dazu wurden Zellen, die ein Calciumsignal während der Wellenausbreitung zeigten, jedoch nicht in direkter Nähe zur Stimulationspipette lagen, gepatcht und ihre Membranstrommuster in Antwort auf de- und hyperpolarisierende Spannungssprünge von einem Haltepotential von -70 mV aus, charakterisiert (Abb. 15).

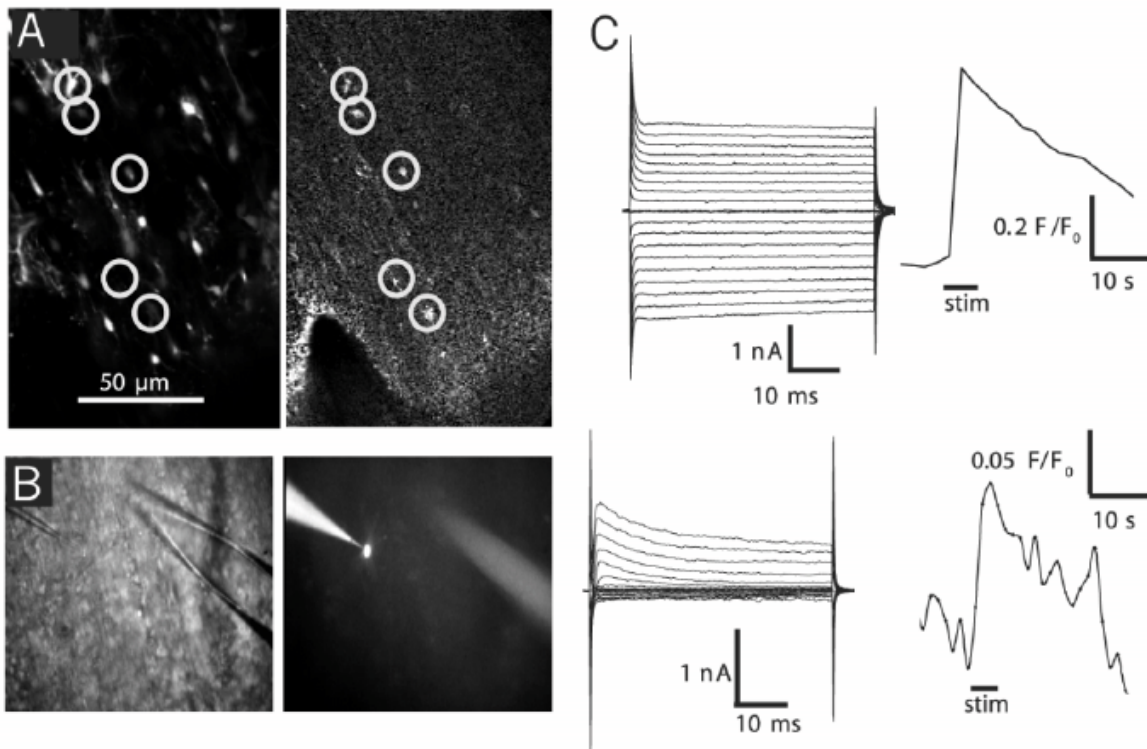


Abbildung 15

Die reagierenden Zellen wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik charakterisiert. Um Astrozyten zu identifizieren, wurden Schnitte der EGFP-transgenen Tiere verwendet, und die Schnitte mit Calcium Orange gefärbt (A). Um evtl. auch andere Zelltypen zu identifizieren, wurden reagierende Zellen in Schnitten nicht transgener Tiere nach der Stimulation mittels Patch-Clamp analysiert (B). In C sind die Ableitungen und Fluoreszenzmessungen zweier Zellen gezeigt. Es wurden verschiedene Strommuster

gemessen, die auf die Integration nicht nur von Astrozyten, sondern auch von Vorläuferzellen hindeuten.

Es konnten zwei verschiedene Arten von Strommustern gemessen werden: Zum einen wurden Zellen mit einer linearen Strom-Spannungs-Kurve, die weder spannungsaktivierte Ströme zeigten, noch die für Oligodendrozyten typischen „tail currents“, identifiziert. Dieses Strommuster ist typisch für Astrozyten (Chvatal et al., 1995). Eine zweite Population von Zellen war durch das Fehlen von Einwärtsströmen, einen prominenten auswärts rektifizierenden Strom und einen sehr kleinen, schnellen Natriumeinwärtsstrom charakterisiert. Dieses Strommuster ist typisch für gliale Vorläuferzellen (Berger et al., 1991). Folglich breitet sich die Calciumwelle innerhalb der Astrozyten aus, bezieht aber auch Vorläuferzellen mit ein. Wie bereits in Abb. 10 zu erkennen, partizipieren darüber hinaus auch Zellen in der Ventrikelwand, höchstwahrscheinlich Ependymzellen, an dem Wellen-Phänomen. Diese Zellen reagierten mit einem sehr deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und die Welle setzt sich in diesen Zellen auch schneller fort. Die Calciumwelle in den Ependymzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

3.2.4 ATP-Freisetzung in den Extrazellulärraum ist der Träger der Calciumwelle

In der Mehrzahl der Versuche wurde die Badperfusion abgestellt, um eventuell freigesetzte Substanzen während der Propagation der Welle nicht auszuspülen. Wenn die Badperfusion während des Versuches nicht ausgeschaltet wurde, wurde die Ausbreitungsrichtung der Calciumwelle deutlich durch die Richtung der Badperfusion beeinflusst (Abb. 16).

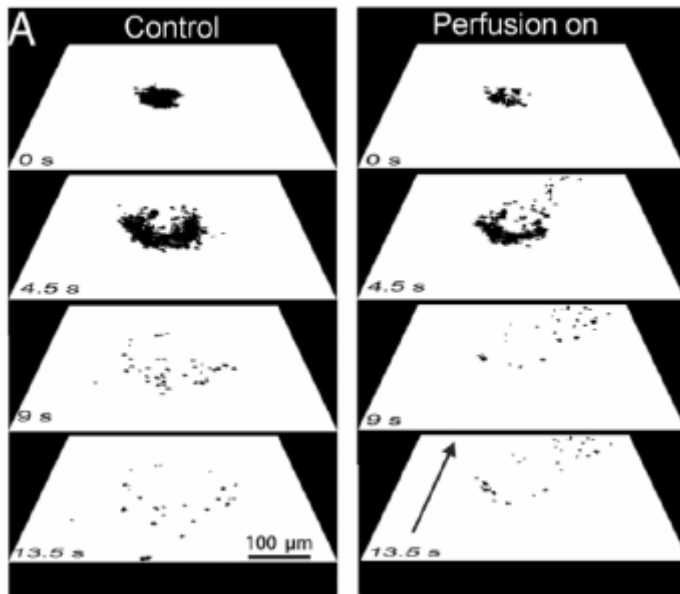


Abbildung 16

Um die Ausbreitung der Welle besser deutlich zu machen, wurden nur die in den jeweiligen Bildern neu reagierenden Zellen zu den einzelnen Zeitpunkten dargestellt. Die Zellen sind hier schwarz dargestellt. In Kontrollbedingungen (links) bildet sich die Welle kreisförmig aus. Wird die Perfusion angestellt und eine Welle ausgelöst, ist das Signal deutlich in Richtung der Perfusion verzerrt. Dies deutet auf die Anwesenheit eines diffusiblen Botenstoffes hin.

Wie in den vorherigen Abbildungen zu erkennen, breitete sich die Calciumwelle, wenn die Badperfusion angehalten war, radial ausgehend vom Stimulationsort aus. Mit einer schnell laufenden Badperfusion, wie sie in den meisten physiologischen Experimenten verwendet wird, war die Reaktion auf die unmittelbare Umgebung der Stimulationspipette beschränkt. Es konnte unter diesen Bedingungen überhaupt keine Welle beobachtet werden. Eine langsamere Perfusion führte zu einer Ausbreitung der Welle bevorzugt in Richtung der Badperfusion.

Aus Arbeiten an kultivierten Astrozyten ist bekannt, daß in kultivierten Astrozyten das Calciumsignal während der Calciumwelle, entweder über die Diffusion eines second messengers durch gap junctions, oder über die Freisetzung von ATP vermittelt wird

(Cornell-Bell et al., 1990, Venance et al., 1998, Guthrie et al., 1999). Um die Beteiligung der ATP-Freisetzung und der Aktivierung von Purinorezeptoren *in situ* festzustellen, wurde die Ausbreitung der Calciumwelle in An- und in Abwesenheit von Reactive Blue 2, einem Antagonisten für Purinorezeptoren, verglichen (Abb. 17). Wurden die Schnitte nach einer Stimulation in Kontrollbedingungen 2 Minuten mit 30 μM Reactive Blue 2 superfundiert, führte die Stimulation nur noch zu einem lokal begrenzten Calciumsignal in der unmittelbaren Nähe der Stimulationspipette (n=5).

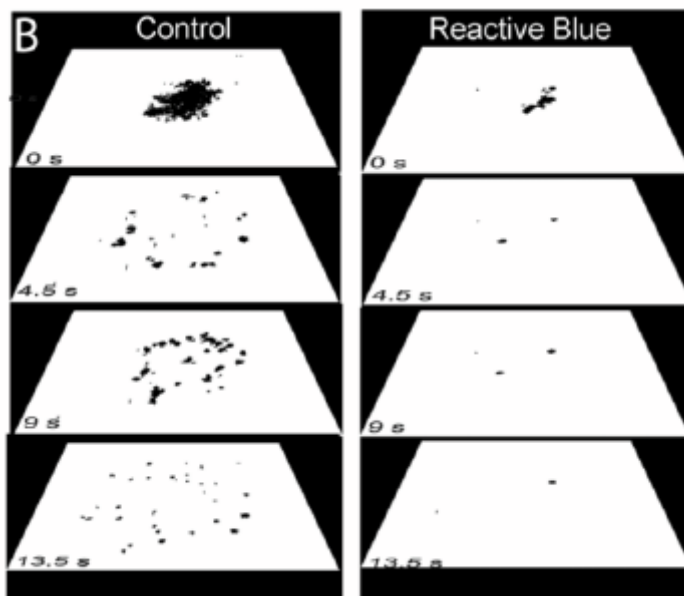


Abbildung 17

Wie in der zuletzt gezeigten Abbildung, sind auch hier nur die reagierenden Zellen dargestellt. In Anwesenheit eines Blockers für purinerge Rezeptoren (Reactive Blue, rechts) konnte keine Propagation der Calciumwelle mehr festgestellt werden.

Das gleiche Ergebnis wurde nach Superfusion mit 100 μM Suramin (n=5), einem weiteren Antagonisten für Purinorezeptoren, erlangt. Um die Beteiligung von Glutamatrezeptoraktivierung an der Wellenausbreitung auszuschließen, wurden unabhängig Experimente in Anwesenheit von MCPG (50 μM), einem Antagonisten für metabotrope Glutamatrezeptoren, und CNQX (50 μM), einem Antagonisten für

ionotrope Glutamatrezeptoren vom AMPA-Typ, durchgeführt. Die Anwesenheit dieser Blocker beeinflusste die Ausbreitung der Welle nicht. Zusätzlich wurden Versuche in Anwesenheit von Glutamat (100 μM) durchgeführt, um alle Glutamatrezeptoren zu desensibilisieren. Auch in Anwesenheit von Glutamat konnte noch eine Welle ausgelöst werden. Um die Beteiligung von Kommunikation durch gap junctions auszuschließen, wurde der Schnitt für 2 min mit Octanol (500 μM) (n=3) inkubiert.

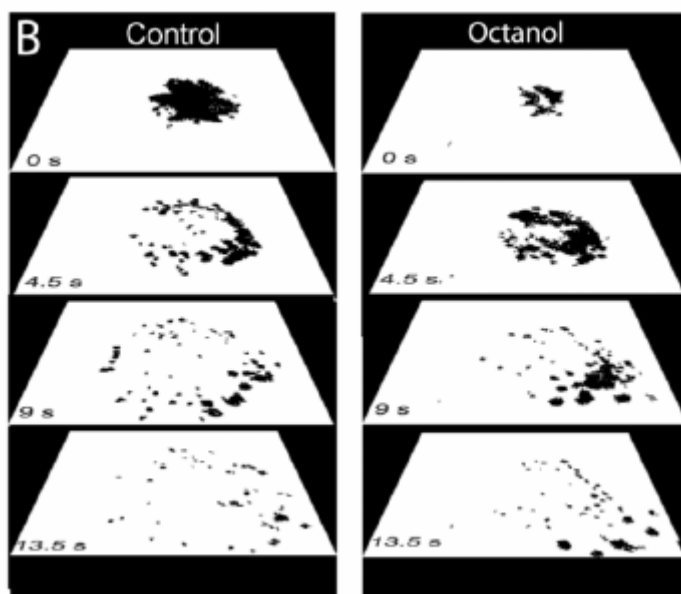


Abbildung 18

Nach Analyse wie in den Abbildungen 16 und 17 zuvor beschrieben, zeigte sich, daß die Anwesenheit des gap-junction-Blockers Octanol die Ausbreitung der Calciumwelle nicht beeinflusst. Das Signal breitet sich nach wie vor gut aus. In diesem Fall ist eine leicht ovale Ausbreitung des Signals zu erkennen, die sich an der Morphologie des Corpus Callosum orientiert. Eine verstärkte Ausbreitung entlang der Fasern wurde häufiger beobachtet.

Für akute Retinapräparationen konnte gezeigt werden, daß Octanol die gliale Kopplung über gap junctions aufhebt (Zahs and Newman, 1997). Eine Beeinflussung der Wellenausbreitung im Corpus Callosum durch Octanol konnte nicht festgestellt

werden (Abb. 18). Eine Ausbreitung der Welle durch Diffusion von Botenstoffen durch gap junctions kann in dieser Hirnregion ausgeschlossen werden.

Um auszuschließen, daß durch elektrische Aktivität aus axonalen Fasern freigesetzte Substanzen an der Ausbreitung der Welle beteiligt sind, wurden die Schnitte mit dem Natriumkanalblocker Tetrodotoxin (TTX, 1 μM) und 100 μM Cd^{2+} inkubiert ($n=4$), wodurch die Generation von Aktionspotentialen und die Vesikelfusion an den Präsynapsen durch Blockade der Calciumkanäle inhibiert wird (Capogna et al., 1996). Die Ausbreitung der Welle war in Anwesenheit dieser Blocker nicht verändert (Abb. 19), was zeigt, daß das Phänomen unabhängig von der Propagation neuronaler Aktivität ist.

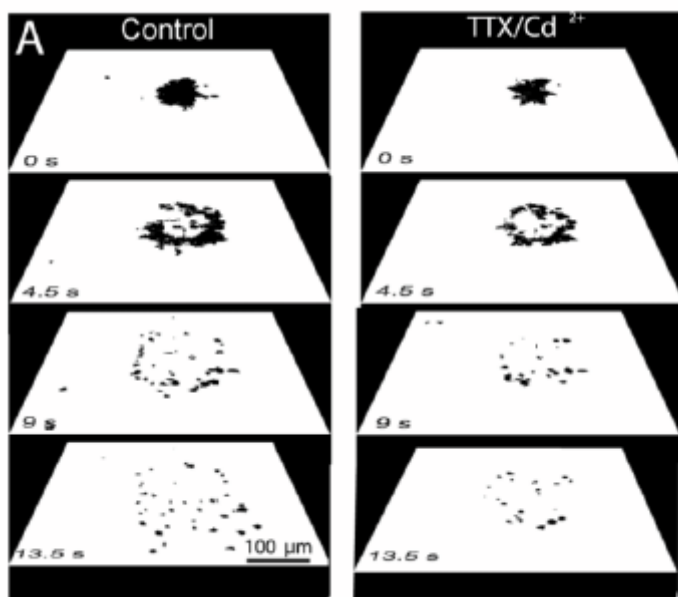


Abbildung 19

Um einen Einfluß der Propagation von Aktionspotentialen und synaptischer Transmission auf die Ausbreitung der Welle auszuschließen, wurden Versuche in Anwesenheit von Tetrodotoxin (TTX) und Cd^{2+} durchgeführt. Diese Substanzen beeinflussen die Ausbreitung des Signals nicht. Es handelt sich somit um eine rein gliale Kommunikationsform.

3.2.5 Die Calciumwelle löst eine Reaktion in Mikrogliazellen aus

Da Mikrogliazellen sich nicht mit Acetoxymethylestern der Calciumfarbstoffe anfärben lassen, wurde die Beteiligung dieser Zellen an der glialen Calciumwelle mit elektrophysiologischen Methoden untersucht. Mikrogliazellen im akuten Hirnschnitt wurden durch eine spezifische Färbung mit an Texas Red gekoppeltem Tomato-Lektin (Lektin aus *Lycopersicon esculentum*) sichtbar gemacht (Acarin et al., 1994). Diese Färbung interferiert nicht mit physiologischen Eigenschaften von Mikrogliazellen im Hirnschnitt (Boucsein et al., 2000). Eine Zweifachfärbung mit dem calciumsensitiven Farbstoff und Tomato-Lektin bestätigte, daß Mikrogliazellen den calciumsensitiven Farbstoff nicht aufnehmen. Mit Tomato-Lektin gefärbte Zellen wurden deshalb gepatcht und es wurden die Membranströme gemessen, während etwa 100 µm entfernt von der Mikrogliazelle eine Calciumwelle durch elektrische Stimulation ausgelöst wurde. Die Mikrogliazellen zeigten eine vorübergehende Induktion eines auswärts rektifizierenden Stromes, in dem Moment, da die Calciumwelle die Zelle erreichte (Abb. 20). Der induzierte Strom zeigte dieselben Eigenschaften wie Ströme, die bei kultivierten Mikrogliazellen in Kultur nach Stimulation mit ATP auftreten (Walz et al., 1993). Es liegt also nahe zu vermuten, daß während der glialen Calciumwelle ATP freigesetzt wird, welches Purinorezeptoren auf den Mikrogliazellen aktiviert. Dieses läßt darauf schließen, daß Mikroglia die Aktivierung und Kommunikation anderer Gliazellen detektieren können und an der globalen glialen Aktivierung der Calciumwelle, teilnehmen.

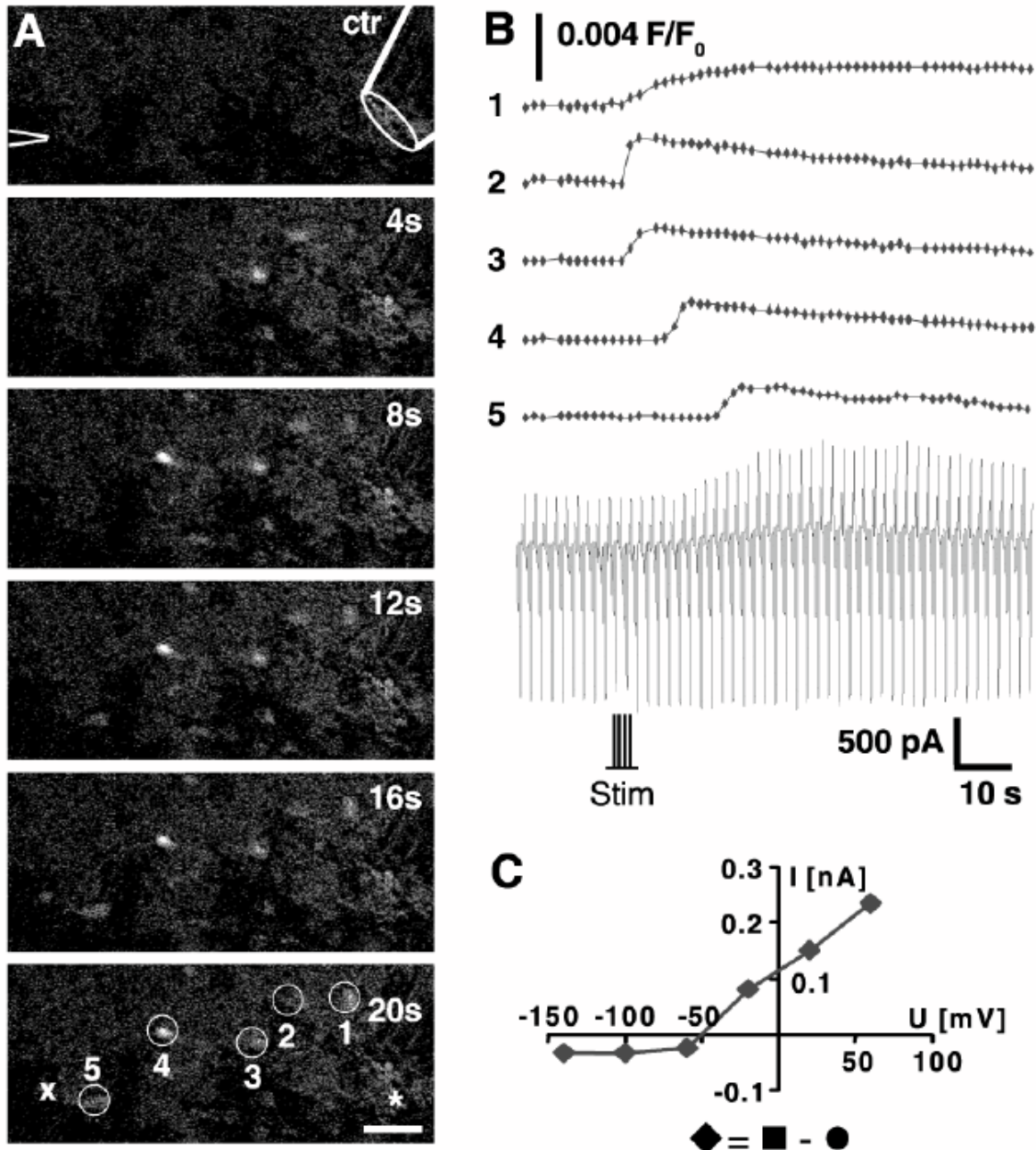


Abbildung 20

Eine Welle wurde unter Standardbedingungen ausgelöst und beobachtet (A). Gleichzeitig wurde von einer Mikrogliazelle mittels Patch-Clamp-Technik der Strom abgeleitet. Die Position der Patchpipette ist im oberen Bild angedeutet. Im letzten Bild sind die Bereiche markiert, für die in B die Änderung der Fluoreszenz dargestellt ist. Das Kreuz markiert die Position der Mikrogliazelle, der Stern die der Stimulationselektrode. Unterhalb der Fluoreszenzgraphen in B ist der von der Mikrogliazelle abgeleitete Strom gezeigt. Die Zelle wurde auf -20 mV geklemmt und wiederholt in Serien von Sprüngen de- und hyperpolarisiert, um eine Stromspannungskurve des induzierten Stromes berechnen zu können. Dieser Strom ist in C dargestellt. Der Graph ist typisch für einen auswärtsrektifizierenden Kaliumkanal.