

5 SUMMARY

5.1 English summary

Astrocytes constitute the largest glial cell population within the mammalian brain. A major part of astrocytic intra- and intercellular signaling occurs through dynamic changes in the cytosolic Ca^{2+} concentration. For a better insight into astrocytic reactions to changes in their environment, the specifics of this cellular “ Ca^{2+} code” need to be understood.

Here, the action of the recently discovered Ca^{2+} -releasing second messenger NAADP⁺ on astrocytes is reported. Murine cortical astrocytes in culture and in acutely prepared slices respond with transient intracellular Ca^{2+} increases to extracellularly applied NAADP⁺. Evidence for connexin hemichannel-mediated cellular uptake and for intracellular activity of NAADP⁺ was found. Apart from a partial dependence on intact endoplasmatic reticulum Ca^{2+} stores, and on the activity of voltage-gated Ca^{2+} channels, lysosomes were critically involved in the NAADP⁺-mediated signaling. This is the first time lysosomes were shown to play a role in astrocytic Ca^{2+} signaling. Extracellular degradation of NAADP⁺ to adenosine or its direct action on adenosine receptors also provides a large part of its intracellular signal, as revealed by the P1 receptor inhibitor CGS-15943. In addition, astrocytes express the NAADP⁺-synthesizing enzyme CD38 *in situ*. These findings suggest that NAADP⁺ is a functional signalling molecule, adding to the complexity of information encoding by Ca^{2+} in astrocytes.

In a separate series of experiments, it was found that increased Ca^{2+} signaling in astrocytes in perfused acute cortical slices is caused by the decrease in temperature from 30-33°C to room temperature (22-24°C), that accompanies switching off the perfusion. Basal Ca^{2+} signaling in astrocytes was inversely related to temperature. Phototoxicity contributed to the high basal activity at room temperature, but not at higher temperatures (30-38°C). Astrocytic swelling and NO are involved in the Ca^{2+} signaling activity, triggered in astrocytes by a decrease in temperature. In the presence of mannitol, used to reduce swelling, no oscillations were induced by switching off the perfusion. Investigating the contribution of different transmitter systems, only the NOS inhibitor L-NNA decreased the number of reacting cells. Also, the NO donor SNOG mimicked the effect of the stop of perfusion, by inducing oscillatory Ca^{2+} activity in a

similar population of astrocytes, as switching off the perfusion did. These results have methodological implications, since altered Ca^{2+} signaling behavior renders studies on astrocytes at room temperature prone to artifacts. Moreover, these results contribute to the mechanistic knowledge of hypothermia on a cellular level, which could ultimately be of clinical relevance, since the neuroprotective effect of mild hypothermia is still rather empirical, and cryopreservation of nervous tissue needs to be optimized.

5.2 Deutsche Zusammenfassung

Astrozyten stellen die größte Zellpopulation im zentralen Nervensystem der Säugetiere dar. Ein Großteil der intra- und interzellulären Signaltransduktion dieser Zellen wird durch dynamische Änderungen ihrer zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vermittelt. Aufgründessen ist es essentiell, die Spezifität des astrozytären Ca^{2+} -Kodes zu verstehen, um eine bessere Einsicht in astrozytäre Reaktionen auf Änderungen ihrer Umgebung zu gewinnen.

In der vorliegenden Arbeit wird über die Wirkungsweise des vor kurzem entdeckten, Ca^{2+} freisetzenden, intrazellulären Botenstoffes NAADP⁺ im Hinblick auf Astrozyten berichtet. Kortikale Astrozyten der Maus in akut präparierten Gehirnschnitten reagieren mit vorübergehenden Erhöhungen des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels auf extrazellulär appliziertes NAADP⁺. Es wurden Hinweise auf Konnexin-Hemikanal abhängige zelluläre Aufnahme und für intrazelluläre Aktivität von NAADP⁺ gefunden. Neben einer partiellen Abhängigkeit von intakten endoplasmatisch-retikulären Ca^{2+} -Speichern und spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, sind Lysosomen kritisch involviert in NAADP⁺-induzierter Signaltransduktion. Somit wird erstmalig gezeigt, dass Lysosomen eine Rolle in astrozytärer Ca^{2+} -Signaltransduktion spielen. Durch Verwendung des P1 Rezeptor Inhibitors CGS-15943 wurde festgestellt, dass ferner extrazelluläre Degradation von NAADP⁺ zu Adenosin oder die direkte Aktivierung von P1 Rezeptoren durch NAADP⁺ einen Großteil zum NAADP⁺ induzierten Signal beitragen. Weiterhin exprimieren Astrozyten das NAADP⁺ synthetisierende Enzym CD38 *in situ*. Aufgrund dieser Ergebnisse kann NAADP⁺ als Signaltransduktionsmolekül, welches zur Komplexität der astrozytären Informationskodierung durch Ca^{2+} beiträgt, betrachtet werden.

In einer zusätzlichen, unabhängigen Serie von Experimenten wurde nachgewiesen, dass eine erhöhte Ca^{2+} -Signaltransduktionsaktivität in akuten, kortikalen Gehirnschnitten der Maus die

Konsequenz eines Temperaturabfalls von 30-33°C auf Raumtemperatur (22-24°C) ist, welcher durch das Ausschalten der Perfusion bedingt ist. Die basale Ca^{2+} -Signaltransduktionsaktivität zeigte eine inverse Abhängigkeit von der Temperatur. Fototoxizität steuert zu einer hohen Basalaktivität bei Raumtemperatur, jedoch nicht bei höheren Temperaturen (30-38°C) bei. Ein Anschwellen von Astrozyten, sowie NO, tragen zu dieser durch Temperaturabfall bedingten Ca^{2+} -Aktivität bei. Das zur Suppression von Schwellungen verwendete Mannitol konnte die durch Temperaturabfall induzierten Ca^{2+} -Oszillationen verhindern. Von verschiedenen Transmittersystemen, die auf einen Beitrag hin getestet wurden, konnte nur der NOS Inhibitor L-NNA die Anzahl der reagierenden Zellen reduzieren. Desweiteren konnte der NO Donor SNOG den Effekt des Ausschaltens der Perfusion derart nachahmen, dass er oszillatorische Ca^{2+} -Aktivität in einer ähnlichen Zellpopulation auslöste wie das Ausstellen der Perfusion selbst. Diese Ergebnisse sind von methodologischer Bedeutung, da verändertes Ca^{2+} -Signaltransduktionsverhalten Astrozyten betreffende Studien bei Raumtemperatur anfällig für Artefakte macht. Weiterhin tragen diese Ergebnisse zum mechanistischen Verständnis von Hypothermie auf zellulärer Ebene bei. Dieses könnte letztendlich von klinischer Relevanz sein, da der neuroprotektive Effekt leichter Hypothermie noch immer empirisch ist, und ausserdem eine Optimierung der Kryopräservierung von Nervengewebe notwendig ist.