

4 Ergebnisse

4.1 Kopplung und elektrophysiologische Eigenschaften von Astrozyten

Interastrozytäre Ca^{2+} -Wellen können sich über ATP-Freisetzung in den extrazellulären Raum oder über Diffusion von Second Messengers durch Gap Junctions innerhalb des Astrozytennetzwerks ausbreiten. Als Grundlage für die später folgenden Experimente zur Aufklärung des Propagationsmechanismus im Cortex wurde deshalb zunächst untersucht, in welchem Ausmaß Astrozyten im Cortex und im Corpus Callosum gekoppelt sind. Dazu wurde Gap Junction-permeabler Farbstoff in eine einzelne Zelle eingebracht und dann die Kopplung anhand der Verteilung des Farbstoffs im Schnitt dargestellt. Außerdem wurde überprüft, ob in Connexin-defizienten Mäusen (Cx30(-/-)Cx43(fl/fl):GFAP-cre-positiv) die Kopplung reduziert ist. In einem Tiermodell für die Alzheimer-Krankheit wurde der Zusammenhang zwischen Kopplungsausmaß und Nähe zu A β -Plaques untersucht.

4.1.1 Kopplung von Astrozyten in Cortex und Corpus callosum von GFAP-EGFP-Mäusen

Untersucht wurden Astrozyten in cortikalen Hirnschnitten von GFAP-EGFP-Mäusen im Alter von 8 bis 14 Tagen. Der Vorteil dieser Tiere ist, dass die Astrozyten aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz leicht zu identifizieren sind. Über die Patchpipette wurde durch 20minütige passive Diffusion Biocytin in die Astrozyten eingebracht, der Schnitt fixiert, in 50 μm dicke Schnitte geschnitten und die Färbung entwickelt.

Nach Füllung eines cortikalen Astrozyten mit Biocytin konnte immer ein Netzwerk angefarbter Zellen beobachtet werden (n=14, Abb. 4.1). Besonders in stärkerer Vergrößerung (Abb. 4.1 rechts) ist gut zu erkennen, dass nicht nur die unregelmäßig geformten Zellsomata, sondern auch Ausläufer gefärbt sind. In einigen Schnitten ist außerdem deutlich zu sehen, dass Astrozytenausläufer Blutgefäße umgeben, die dadurch auch sichtbar werden (Abb. 4.1 links).

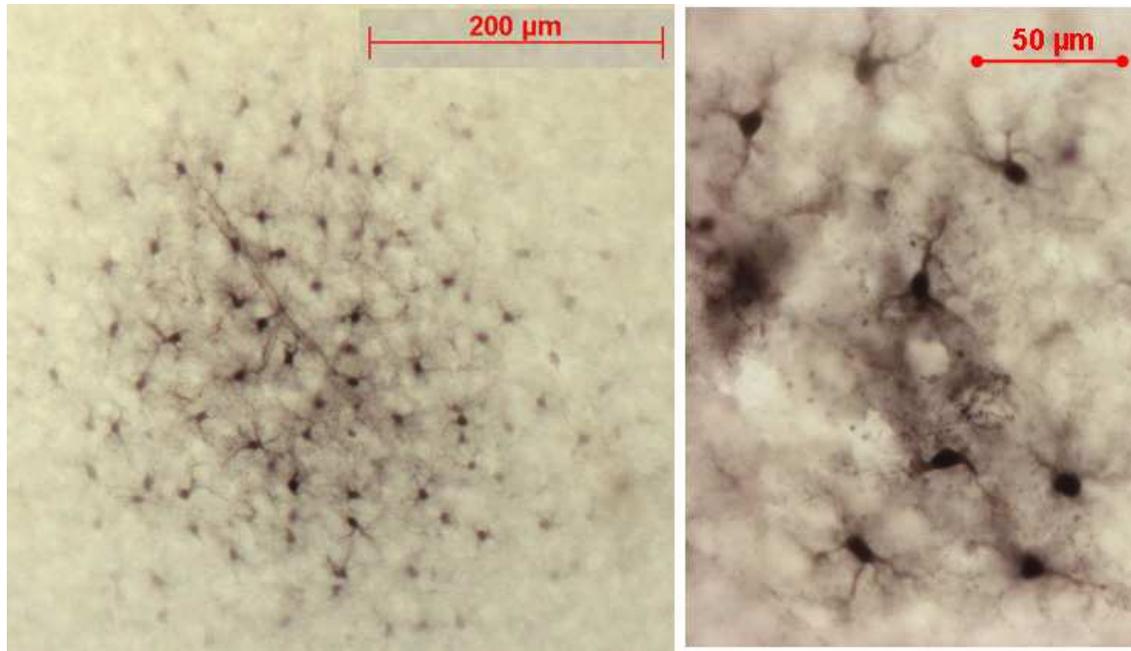


Abbildung 4.1: Astrozytennetzwerke im Cortex. Dargestellt sind 50 µm dicke Kryoschnitte nach DAB-Färbung. Biocytin wurde jeweils in eine einzelne Zelle über die Patchpipette eingebracht.

In den 50 µm dicken Kryoschnitten wurde der Farbstoff in bis zu 180 Zellen beobachtet, was einem Gebiet mit einem Durchmesser von etwa 600 µm entspricht. Die durchschnittliche Zahl gefärbter Zellen in allen Versuchen war 94, der Durchmesser des Areals mit gefärbten Astrozyten durchschnittlich 390 µm. Das dreidimensionale Ausmaß der Kopplung kann im Schnittpräparat nicht dargestellt werden.

Für Biocytinfärbungen im Corpus callosum wurden 150 µm dicke Schnitte als ganzes prozessiert, um Materialverluste bei der Anfertigung von Kryoschnitten zu vermeiden. Entweder konnte die gepatchte Zelle nicht wieder gefunden werden ($n=10$), da vermutlich das Soma mit der Patchpipette aus dem Schnitt herausgezogen wurde, oder nur eine oder maximal zwei Zellen waren gefärbt ($n=4$, Abb. 4.2 rechts). Netzwerke wie im Cortex wurden nie beobachtet. Um auszuschließen, dass dies methodische Gründe hatte, wurde als Kontrolle im selben Schnitt ein Astrozyt im Cortex gepatcht und gefüllt. Hier waren wieder Netzwerke zu sehen, wenn auch die Auflösung schlechter ist als in den Dünnschnitten (Abb. 4.2 links).

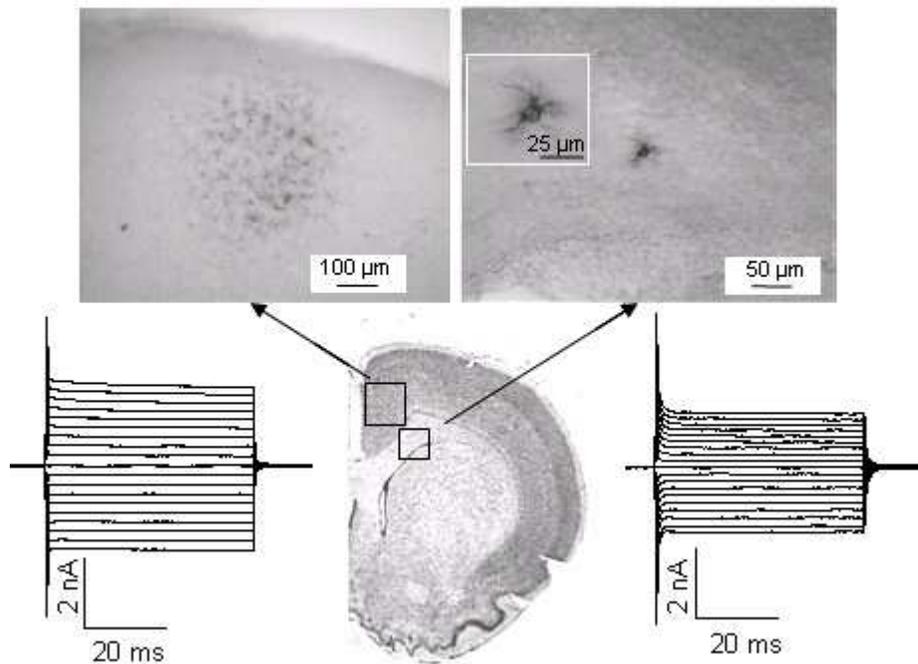


Abbildung 4.2: Biocytinjektionen im Cortex (oben links) und im Corpus callosum (oben rechts) des selben Schnittes mit den Stromprofilen der jeweiligen gepatchten Zellen. Im Gegensatz zum Cortex sind Astrozyten im Corpus callosum nicht gekoppelt.

Die gepatchten Zellen hatten das für Astrozyten typische passive Stromprofil ohne spannungsabhängige Inaktivierung (Abb. 4.2, (Nolte et al., 2001)).

4.1.2 Kopplung von Astrozyten in Connexin-defizienten Mäusen

In den Cx30(-/-)Cx43(fl/fl):GFAP-cre-positiven Mäusen wird in allen Zelltypen kein Cx30 und speziell in Astrozyten kein Cx43 exprimiert. Ein genereller Knockout von Cx43 in allen Zellen führt wegen Herzinsuffizienz sofort nach der Geburt zum Tod. Durch Biocytinfüllung einzelner Astrozyten sollte die Funktionalität der Cx-Inaktivierung überprüft werden. Die Astrozyten wurden hier nicht durch grüne Fluoreszenz, sondern aufgrund ihrer Morphologie und ihres passiven Stromprofils identifiziert (n=6). Eine Kopplung wie im Cortex der GFAP-EGFP-Tieren konnte hier nicht gefunden werden, allerdings auch keine einzelnen gefärbten Zellen. Wahrscheinlich wurden die Zellkörper nach dem Füllvorgang mit der Patchpipette aus dem Schnitt herausgezogen. In Abbildung 4.3 sind einige gefärbte Astrozytenfortsätze einer Zelle zu sehen.

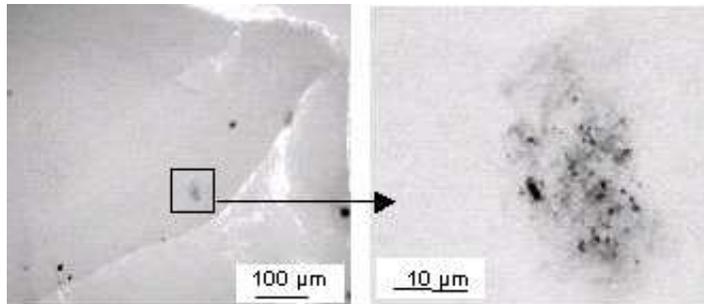


Abbildung 4.3: Übersicht und Ausschnittvergrößerung eines Cx-defizienten Hirnschnitts nach Biocytininjektion in einen corticalen Astrozyten. Es sind keine Astrozytennetzwerke zu erkennen.

4.1.3 Kopplung und elektrophysiologische Eigenschaften von Astrozyten in einem Tiermodell für die Alzheimer Krankheit

Um zu untersuchen, inwiefern sich elektrophysiologische Eigenschaften und Kopplung von Astrozyten während der Alzheimer-Krankheit verändern, wurde ein Alzheimer-Tiermodell eingesetzt. In den so genannten PDAPP-Mäusen erfolgt Überexpression des humanen mutierten V717F β -Amyloid-Vorläufer-Proteins (β -amyloid precursor protein, β -APP) unter dem PDGF-(platelet-derived growth factor) Promotor (PD). Die Tiere entwickeln viele Zeichen der Alzheimer-Erkrankung, darunter extrazelluläre Ablagerung und Aggregation von Amyloid- β ($A\beta$), Bruchstücken des β -APP. Diese so genannten Plaques lassen sich z.B. mit dem Farbstoff Kongorot darstellen. PDAPP-Mäuse wurden hier mit GFAP-EGFP-Mäusen gekreuzt, um die Astrozyten in akuten Hirnschnitten von 15 bis 25 Monate alten Tieren identifizieren und mit Biocytin fällen zu können. Nach der Anfärbung des Biocytins wurden die Plaques durch Inkubation der Schnitte mit Kongorot sichtbar gemacht. Abbildung 4.4 zeigt einen grün fluoreszierenden Astrozyten neben einem mit Kongorot gefärbten Plaque aus einem PDAPP+/GFAP-EGFP-Tier.

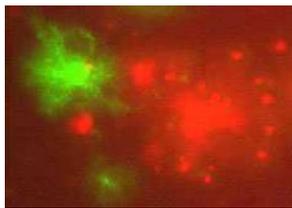


Abbildung 4.4: EGFP-positiver Astrozyt mit kongorot-gefärbtem Plaque in einem PDAPP+/GFAP-EGFP-Tier.

Parallel zur 20minütigen Biocytininjektion wurden das Stromprofil und Antworten auf Kainat- bzw. Aspartat-Applikation gemessen, um Glutamatrezeptoren, bzw. -transporter nachzuweisen. Da die Plaquedichte im Cortex und im Hippokampus am höchsten ist (Games et al., 1995), wurden Astrozyten in diesen Gebieten auf ihre

Eigenschaften in Bezug zur Nähe eines Plaque analysiert. Als Kontrolltiere dienten PDAPP-negative GFAP-EGFP- Mäuse im gleichen Alter.

Die Biocytinfärbungen unterschieden sich dadurch generell von den Ergebnissen in den maximal zwei Wochen alten GFAP-EGFP-Tieren, dass in PDAPP-positiven und -negativen Mäusen die Morphologie der Zellen schlechter zu erkennen und die Form der Astrozytennetzwerke eher unregelmäßig war (Abb. 4.5).

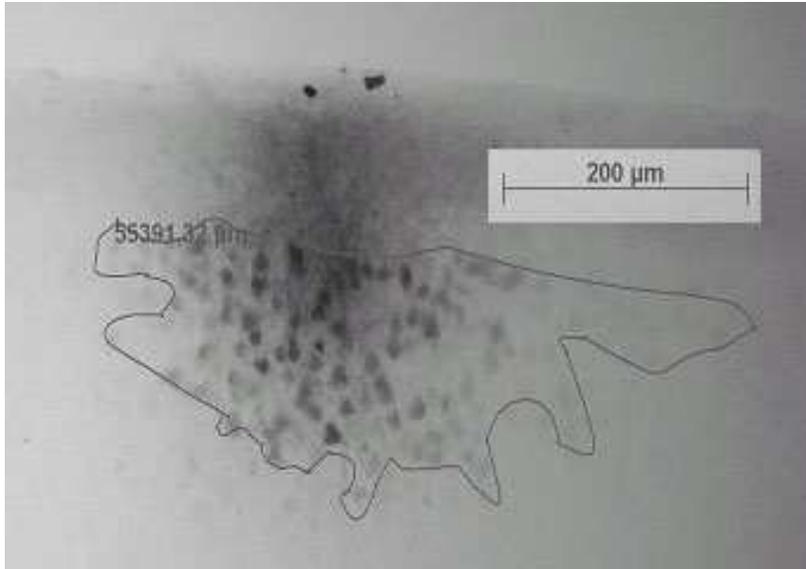


Abbildung 4.5:
Astrozytennetzwerk im Neocortex einer PDAPP-positiven GFAP-EGFP-Maus ohne Nachweis von Plaques.

Um die Netzwerkgröße in PDAPP-negativen und -positiven Tieren vergleichen zu können, wurde als Parameter die Anzahl der gefärbten Zellen verwendet. Die Netzwerke in Gehirnen von PDAPP-positiven Tieren in der Nähe (bis 250 µm) von Plaques waren kleiner als in denen PDAPP-negativer, was besonders im Cortex auffiel. Im Gegensatz zu durchschnittlich 68 Zellen im Cortex der Kontrolltiere bestanden die Netzwerke in den PDAPP-positiven Tieren in der Nähe eines Plaque aus durchschnittlich 33 Zellen. Eine direkte Korrelation zwischen Netzwerkgröße und Abstand zum Plaque konnte allerdings nicht festgestellt werden. Dies liegt auch an der Limitierung durch das zweidimensionale Schnittmodell, in dem Plaques über und unter einem Netzwerk abgeschnitten sein können, wodurch es zu Verfälschung der Ergebnisse kommen kann. Im Hippokampus war dieser Unterschied nicht so deutlich ausgeprägt.

Tabelle 4.1 fasst die Ergebnisse der Netzwerkanalyse zusammen.

Region	PDAPP-negativ	PDAPP-positiv	
		unabhängig vom Plaqueabstand	Plaqueabstand < 250 μm
NC	68 Zellen (n=8)	47 Zellen (n=14)	33 Zellen (n=5)
HK	40 Zellen (n=16)	34 Zellen (n=18)	30 Zellen (n=12)

Tabelle 4.1: Netzwerkgrößen im Neocortex (NC) und Hippokampus (HK) von PDAPP-positiven und -negativen GFAP-EFEGP-Tieren. Netzwerke in PDAPP-positive Tiere wurden unabhängig und in der Nähe von Plaques analysiert.

Weiterhin wurde die Reaktionsfähigkeit der Astrozyten auf die Applikation von Kainat, einem Agonisten für Glutamatrezeptoren (GluR), und D-Aspartat, einem Agonisten für Glutamattransporter (GluT), bestimmt. Aus dem Hippokampus ist bekannt, dass gekoppelte Astrozyten GluT und nicht gekoppelte Astrozyten GluR exprimieren, jedoch nicht beide in einer Zelle (Wallraff et al., 2004). Abbildung 4.6 zeigt exemplarische Antworten auf die Applikation beider Substanzen.

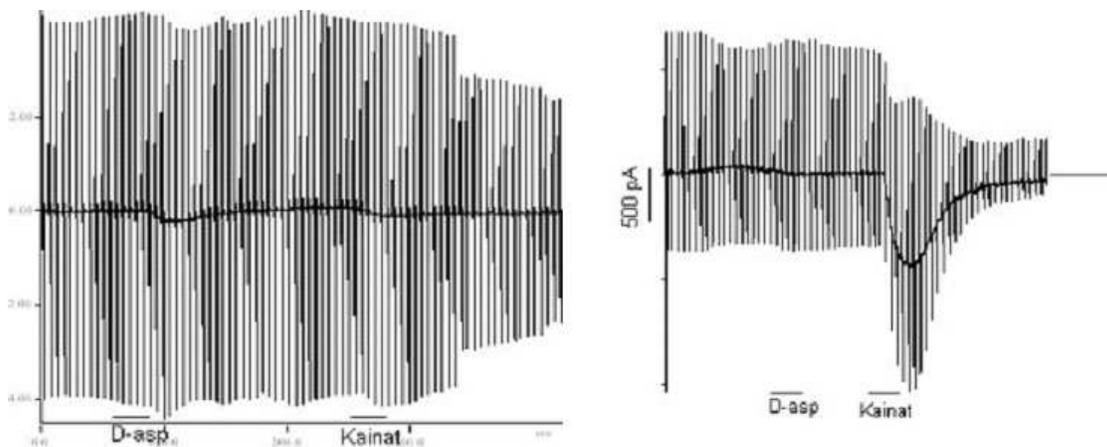


Abbildung 4.6: Elektrophysiologische Antworten auf Aspartat- (links) und Kainat-Applikation (rechts).

In den PDAPP-positiven Tieren reagierte fast die Hälfte der gekoppelten Astrozyten in Cortex und Hippokampus sowohl auf Aspartat als auch auf Kainat, was bedeutet, dass sie sowohl Rezeptoren als auch Transporter für Glutamat exprimieren. Diese Zellen waren häufig in der Nähe eines Plaques (< 250 μm) zu finden. Bei Astrozyten im Gehirn von Kontrolltieren im selben Alter wurden nie Reaktionen einer Zelle auf beide Agonisten beobachtet (siehe Tabelle 4.2).

Da GluT-Zellen üblicherweise ein passives Stromprofil („passive“ Zellen), GluR-Zellen dagegen ein komplexes („komplexe“ Zellen) zeigen, wurde als zusätzliches elektrophysiologisches Merkmal der untersuchten Astrozyten das Stromprofil der gepatchten Zellen gemessen. Abbildung 4.7 zeigt links ein typisches passives, rechts ein komplexes Stromprofil, bei dem spannungsabhängige Inaktivierung der Ströme zu sehen ist.

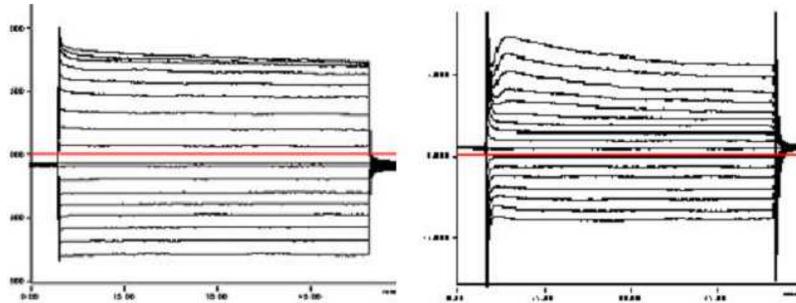


Abbildung 4.7: Passives (links) und komplexes (rechts) Stromprofil von Astrozyten.

Im Cortex konnte kein deutlicher Unterschied zwischen dem Prozentsatz komplexer Zellen in PDAPP-negativen gegenüber PDAPP-positiven Tieren festgestellt werden. Dagegen war die Anzahl komplexer Zellen im Hippokampus PDAPP-positiver Tiere mit 74 % gegenüber 53 % in Kontrolltieren deutlich erhöht. Tabelle 4.2 fasst die elektrophysiologischen Eigenschaften der untersuchten Zellen zusammen.

Region	Stromprofil		Antworten auf Kainat und Aspartat	
	PDAPP-negativ	PDAPP-positiv	PDAPP-negativ	PDAPP-positiv
NC	20 % komplex	12% komplex	0	6 von 14
HK	53 % komplex	74 % komplex	0	6 von 12

Tabelle 4.2: Elektrophysiologische Eigenschaften von Astrozyten in Cortex und Hippokampus (HC) von PDAPP-negativen und positiven GFAP-EGFP-Tieren. Das Stromprofil wurde für alle gepatchten Zellen bestimmt, die Antworten auf Kainat oder Aspartat nur für gekoppelte.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass sich sowohl die Netzwerkgröße, als auch die elektrophysiologischen Eigenschaften in der Nähe von A β -Plaques verändern können. Tendenziell waren die Netzwerke hier kleiner und die Astrozyten exprimierten häufiger sowohl Transporter als auch Rezeptoren für Glutamat, was in gesunden Tieren nicht beobachtet wird.

4.2 Astrozytäre Ca^{2+} -Wellen

4.2.1 Elektrische Stimulation im Cortex aktiviert Neurone und Astrozyten

Fokale elektrische Stimulation ist ein bewährter Weg um astrozytäre Ca^{2+} -Wellen in Kultur und im akuten Hirnschnitt auszulösen. In der grauen Substanz werden dadurch allerdings auch Neurone aktiviert, welche die Astrozytenwelle beeinflussen können. Eine Inhibition neuronaler Transmission lässt sich durch Applikation von TTX, das Natriumkanäle und damit die Propagation von Aktionspotentialen blockiert, erreichen. Eine weitere Möglichkeit ist Verwendung von Ca^{2+} -freiem Puffer, was die Fusion synaptischer Vesikel an der Präsynapse verhindert. Um die Wirksamkeit beider Paradigmen zu überprüfen, wurden einzelne Neurone gepatcht und der Hirnschnitt anschließend elektrisch stimuliert. Die Neurone konnten im Durchlicht leicht anhand ihrer klar umrissenen Somata identifiziert werden. Mit 10 Hz wurde eine für die Auslösung astrozytärer Ca^{2+} -Wellen bewährte Stimulation gewählt (Schipke et al., 2002), die 4 s andauerte und unter Kontrollbedingungen zu einer deutlichen Membrandepolarisation und zur Induktion von Natriumströmen in Neuronen führte. Beides war nach TTX-Applikation stark vermindert (Abb. 4.8).

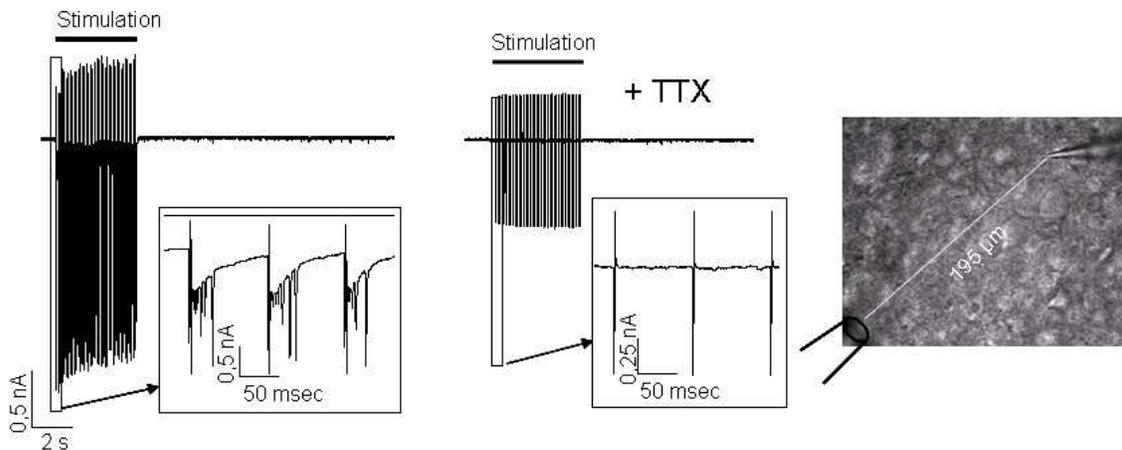


Abbildung 4.8: Voltage Clamp Messungen einer Reaktion unter Kontrollbedingungen (links) und nach Applikation von TTX (Mitte). Man erkennt einzelne Pulse (Ausschnittvergrößerung), die unter Kontrollbedingungen zu einer deutlichen Membrandepolarisation und Natriumströmen führen. Depolarisation und Natriumströme werden durch TTX blockiert. Rechts: Durchlichtbild der gepatchten Zelle. Der Abstand zwischen Patch- und Stimulationspipette (eingezeichnet) beträgt 195 μm .

Auch fünfminütige Perfusion mit Ca^{2+} -freiem Puffer war ausreichend, um neuronale Aktivität zu unterdrücken. Allerdings kam es im Radius bis zu 100 μm um die Stimulationspipette noch zu Membrandepolarisationen (Abb. 4.9).

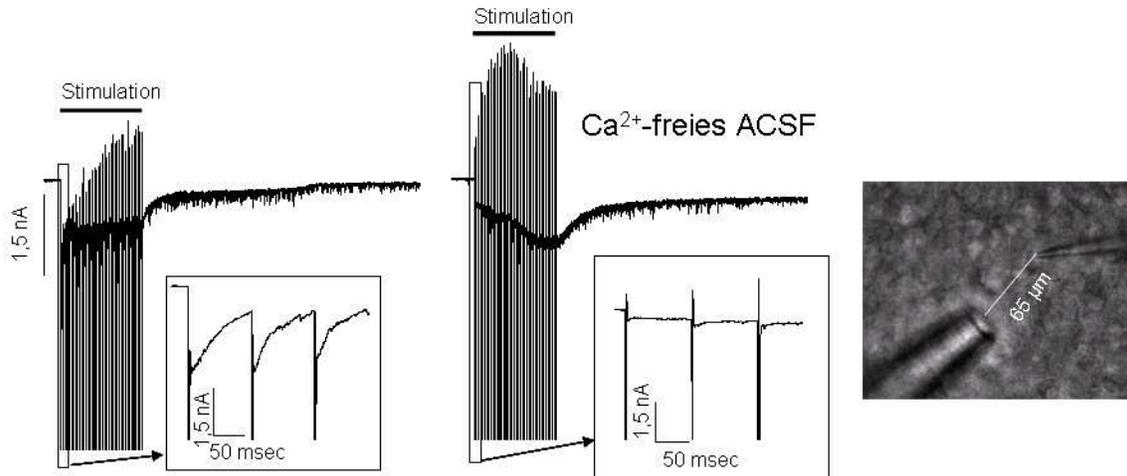


Abbildung 4.9: Voltage Clamp Messungen einer Reaktion unter Kontrollbedingungen (links) und in Ca^{2+} -freiem Puffer (Mitte). In Ca^{2+} -freiem ACSF ist die Membrandepolarisation stark vermindert. Der Abstand zwischen Stimulations- und Patchpipette betrug hier 65 μm .

Abbildung 4.10 zeigt den Unterschied der Astrozytenreaktion in normalem und Ca^{2+} -freiem ACSF nach fokaler elektrischer Stimulation. Unter beiden Bedingungen reagierten die selben Zellen, allerdings waren die Zeitpunkte der Reaktionen verschoben.

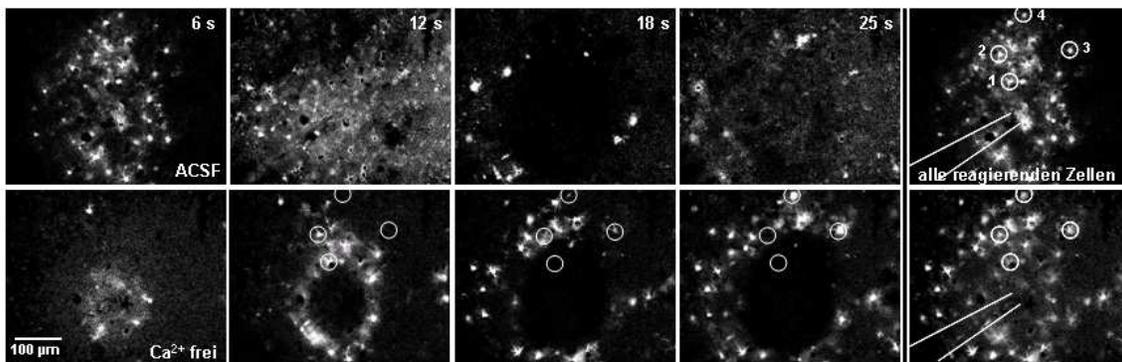


Abbildung 4.10: Fortlaufende Aufnahmen einer astrozytären Reaktion auf elektrische Stimulation im motorischen Cortex unter Kontrollbedingungen und in Ca^{2+} -freiem Puffer. Um nur neu reagierende Zellen zu zeigen wurden die Bilder jeweils voneinander abgezogen. Zeitpunkte der Aufnahme sind jeweils angegeben. Das letzte Bild jeder Reihe zeigt die Summe aller reagierenden Zellen. Dazu wurde der Durchschnitt der Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten gebildet. Die Lage der Stimulationspipette ist markiert, ebenso die Regionen für die die Änderung der Fluoreszenz bestimmt wurde.

Nur in Ca^{2+} -freiem ACSF war eine konzentrische Ausbreitung der Ca^{2+} -Erhöhungen in den Astrozyten vom Punkt der Stimulation aus zu beobachten. Die Betrachtung der Fluoreszenzänderung in einzelnen Zellen erlaubt eine genauere Analyse des zeitlichen Verlaufs (Abb. 4.11).

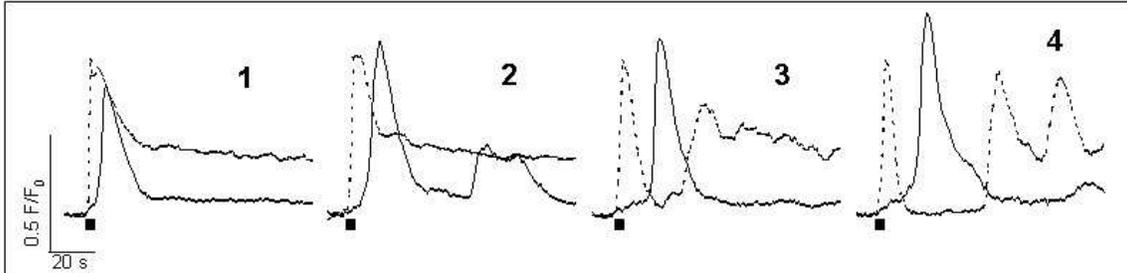


Abbildung 4.11: Fluoreszenzänderungen in den Zellen, die in Abbildung 4.10 markiert sind. Gestrichelte Linien zeigen die Kontrollreaktionen, durchgezogene die Reaktion in Ca^{2+} -freiem Puffer. Schwarze Quadrate markieren die Dauer der Stimulation.

Man erkennt, dass unter Kontrollbedingungen alle Zellen sofort unabhängig vom Abstand zur Stimulationspipette reagierten (Abb. 4.11, gestrichelte Kurven). Der Mechanismus dieser schnellen Reaktion wird in Kapitel 4.3.1 erläutert. In Ca^{2+} -freiem ACSF dagegen trat die Reaktion mit zunehmendem Abstand zum Punkt der Stimulation verzögert auf, wie es für eine wellenförmige Ausbreitung zu erwarten ist (Abb. 4.11, durchgezogene Kurven). Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Welle ließ sich aus den Peakmaxima zu $14 \mu\text{m/s}$ (± 5) bestimmen. Dazu wurden 68 Zellen ausgewertet. Nach Perfusion mit TTX ist das Muster der Propagation ähnlich (Abb. 4.12) wie unter Ca^{2+} -freien Bedingungen. Die Welle breitet sich konzentrisch mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit von $12 \mu\text{m/s}$ (± 5 , 276 Zellen analysiert) aus.

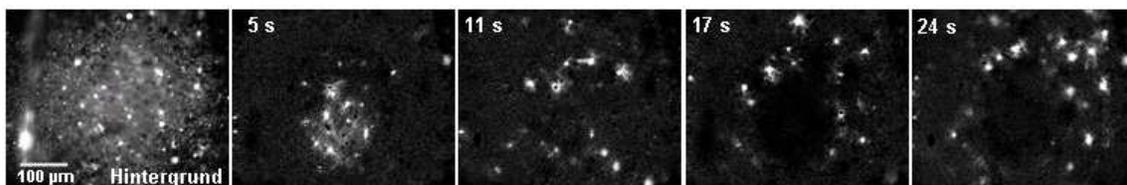


Abbildung 4.12: Fortlaufende Fluoreszenzaufnahmen einer astrozytären Reaktion auf elektrische Stimulation im motorischen Cortex nach fünfminütiger Applikation von TTX. Zeitpunkte nach Beginn der Stimulation sind jeweils angegeben.

4.2.2 Mechanismus der Ausbreitung von astrozytären Ca^{2+} -Wellen im Cortex

In allen folgenden Experimenten wurden astrozytäre Ca^{2+} -Wellen entweder in Ca^{2+} -freiem Puffer oder in Gegenwart von TTX ausgelöst, um eine Beeinflussung durch neuronale Prozesse zu verhindern. Aus dieser Arbeit vorangegangenen Experimenten war bekannt, dass sich die Ausbreitung der astrozytären Ca^{2+} -welle im Cortex durch Carbenoxolon, das Gap Junctions blockiert, vermindern lässt. Suramin, ein purinerges Antagonist und MCPG, ein Inhibitor metabotroper Glutamatrezeptoren, hatten dagegen kaum Einfluss (Haas, 2003). Abbildung 4.13 fasst diese Ergebnisse zusammen. Nach Applikation von Suramin und MCPG reagieren noch ein Großteil der Astrozyten wie in der Kontrollreaktion, während die Ausbreitung nach Inkubation mit Carbenoxolon kaum über 100 μm hinausgeht.

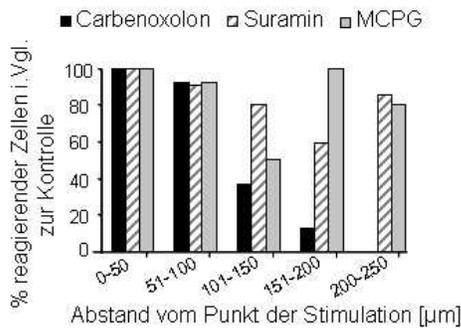


Abbildung 4.13: Balkendiagramm, das die Ausbreitung der Ca^{2+} -Welle in Ca^{2+} -freiem Puffer nach Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren zeigt. Aufgetragen ist die Prozentzahl der reagierenden Zellen im Vergleich zur Kontrollreaktion (in Ca^{2+} -freiem Puffer) in verschiedenen Abständen zur Stimulationspipette. Ab einem Radius von 100 μm um den Punkt der Stimulation verringert Carbenoxolon (schwarze Balken) die Anzahl der reagierenden Zellen auf 30 bis 0 %. MCPG (grau) und Suramin (gestreift) beeinflussen die Anzahl der reagierenden Zellen kaum.

Im Hippokampus dagegen stellte sich die Situation umgekehrt dar, hier hatte nur Suramin einen inhibierenden Einfluss, was darauf hinweist, dass Kopplung keine Rolle für den Ausbreitungsmechanismus spielt.

Um diese Ergebnisse zu erhärten, wurden Experimente mit einem transgenen Tiermodell durchgeführt, in dem Astrozyten untereinander nicht gekoppelt sind. Dazu war im ganzen Tier das Gap Junction-formende Protein Connexin30 (Cx30) und astrozytenspezifisch das Connexin43 (Cx43) deletiert worden. Die astrozytenspezifische Deletion wurde durch Einsatz des cre/lox-Rekombinationssystems erreicht. Das für Connexin43 codierende Gen wird durch zwei lox-sites flankiert und durch die cre-Rekombinase aus dem Genom herausgeschnitten. Als Kontrolltiere dienten cre-negative Tiere. Als Kontrollreaktion wurde in normalem Ca^{2+} -haltigen ACSF stimuliert, um die Reaktionsfähigkeit der Astrozyten zu testen. Das eigentliche Experiment fand in Ca^{2+} -freiem Puffer statt (Abb. 4.14, oben links, Mitte).

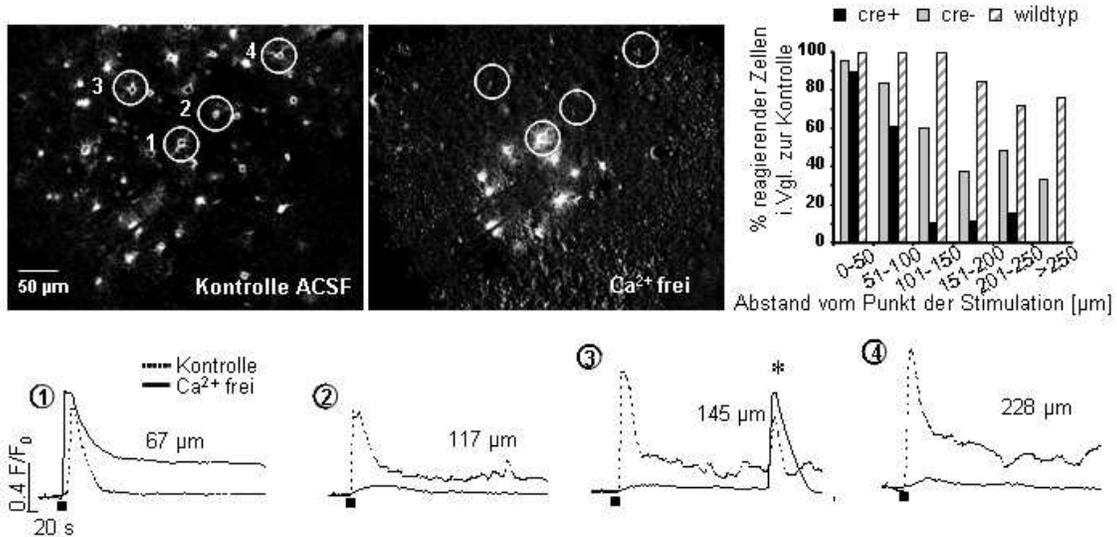


Abbildung 4.14: Vergleich zwischen elektrischer Stimulation in normalem (links) und in Ca²⁺-freiem ACSF (Mitte) in Cx-defizienten Mäusen. Gezeigt sind alle reagierenden Zellen. Fluoreszenzänderungen in den markierten Zellen sind unten dargestellt. Gestrichelte Linien zeigen die Kontrollreaktion, durchgezogene die Reaktion in Ca²⁺-freiem ACSF. Das Histogramm stellt die Versuche in den cre-positiven Tieren denen in cre-negativen und nicht transgenen Tieren gegenüber.

Wie sowohl in den Bildern als auch in den Graphen deutlich zu erkennen ist (Abb. 4.14, gestrichelte Kurven), reagierten die Zellen im Gehirn von Cx-defizienten Tieren in normalen ACSF unverändert, d.h. wie in nicht transgenen Tieren. Im Ca²⁺-freiem Puffer fand dagegen keine Ausbreitung einer Ca²⁺-Welle statt. Dies lag nicht an einer generellen Hemmung von Ca²⁺-Signalen, da spontane Oszillationen beobachtet werden konnten (markiert durch einen Stern in Abb. 4.14). Im Balkendiagramm wurden die Ausbreitung der Ca²⁺-Welle in cre-positiven mit cre-negativen sowie nicht transgenen Tieren verglichen. Ähnlich wie nach Verwendung von Carbenoxolon breitete sich in cre-positiven Tieren, d.h. in Tieren, die keine Kopplung zwischen Astrozyten aufweisen, die Welle kaum über 100 µm vom Punkt der Stimulation aus. Auch in cre-negativen Mäusen war die Propagation im Vergleich zu nicht transgenen Tieren vermindert, allerdings nicht so deutlich wie in den cre-positiven.

Um eine generelle Unfähigkeit der Cx-defizienten Tiere Ca²⁺-Wellen zu propagieren auszuschließen, wurden Stimulationen im Hippokampus und im Corpus Callosum durchgeführt. Für beide Areale ist bekannt, dass die Ausbreitung nicht von Gap Junctions abhängt (Haas, 2003; Schipke et al., 2002).

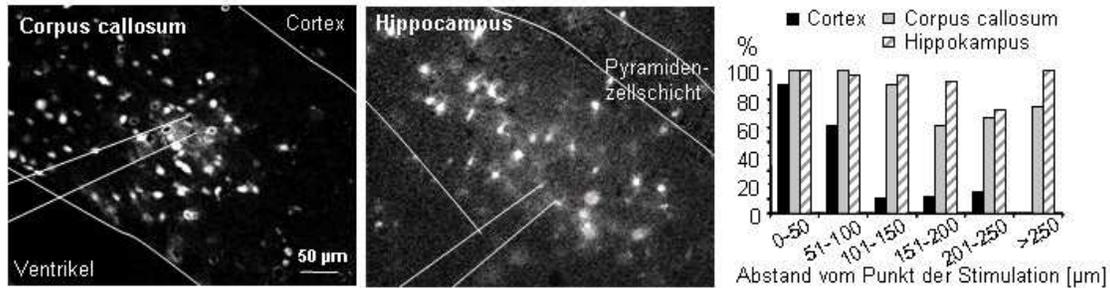


Abbildung 4.15: Ca²⁺-Wellen im Corpus callosum (links) und Hippokampus (Mitte) Cx-defizienter Mäuse. Gezeigt sind alle reagierenden Zellen. Das Balkendiagramm fasst die Ergebnisse aus allen drei untersuchten Hirnregionen zusammen.

Sowohl im Corpus callosum als auch im Hippokampus Cx-defizienter Mäuse waren die Ca²⁺-Wellen in Ca²⁺ freiem ACSF nicht beeinträchtigt (Abb. 4.15). Wie im Balkendiagramm zu erkennen, breiteten sie sich weiter als 250 µm aus. Nur im Cortex stoppte die Propagation nach 100 µm (Abb. 4.15 rechts).

4.2.3 Messung von Transmitterfreisetzung aus Astrozyten während astrozytärer Ca²⁺-Wellen

4.2.3.1 Charakterisierung der GL261 Zellen

Ein weiteres Ziel war, die Freisetzung von ATP aus Astrozyten während der Ausbreitung von Ca²⁺-Wellen direkt zu messen. Da herkömmliche Luciferin-Luciferase-Assays im Schnitt wegen zu hoher Hintergrundaktivität ungeeignet waren, wurde der so genannte Sniffer-Zell-Assay entwickelt. Dazu wurden GL261 Zellen, eine Glioma-Zelllinie, suspendiert und der Fluo4-Färbelösung zugegeben. Während der Färbung hafteten sich die Zellen an der Oberfläche des Schnitts an und wurden wie dieser mit Ca²⁺-Farbstoff beladen. Die Zellen dienten dann während der Messung als „Schnüffel“-Zellen (Sniffer cells), die auf aus dem Schnitt freigesetzte Botenstoffe mit Ca²⁺-Signalen reagieren können. Die GL261 Zellen ließen sich durch ihre runde Form leicht von den Astrozyten im Schnitt unterscheiden. Zudem konnten 60 bis 70 % der GL261 Zellen aufgrund der roten Fluoreszenz nach dsRedII-Transfektion identifiziert werden. Zunächst wurden die Zellen jedoch isoliert auf Deckgläschen auf ihre Reaktionsfähigkeit gegenüber verschiedenen Transmittern getestet, die von Astrozyten freigesetzt werden können. Die GL261-Zellen reagierten

auf Deckgläschen sehr sensitiv auf nanomolare Konzentrationen von ATP, wie der Graph in Abbildung 4.16 zeigt. Auch wenn sie auf dem Schnitt ausgesät waren, konnte eine Reaktion auf 100 nM ATP festgestellt werden. Diese Konzentration führte in den Astrozyten im Hirnschnitt zu keinem Ca^{2+} -Anstieg (Abb. 4.16 links). Daraus lässt sich schließen, dass die GL261 Zellen über sensitivere purinerge Rezeptoren verfügen als Astrozyten.

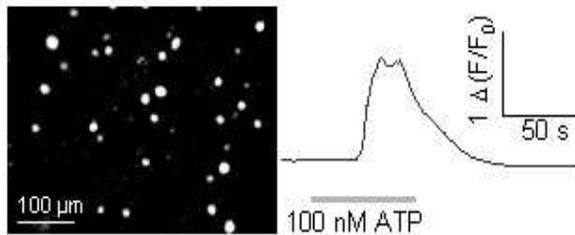


Abbildung 4.16: Links: Fluoreszenzaufnahme (Hintergrund abgezogen) von GL261 Zellen auf einem nicht transgenen cortikalen Hirnschnitt. Nach Applikation von 100 nM ATP zeigen nur die runden GL261 Zellen ein Ca^{2+} -Signal, nicht die Astrozyten im darunter liegenden Gewebe. Rechts: Durchschnittliche Fluoreszenzänderung von 50 Zellen auf Deckgläschen nach ATP-Applikation.

Die ATP-Reaktion ließ sich repetitiv auslösen (Abb. 4.19) und konnte in kultivierten GL261 Zellen durch zehnmütige Inkubation mit dem purinergen Antagonisten Reactive Blue 2 (RB2) reversibel blockiert werden (Abb. 4.17).

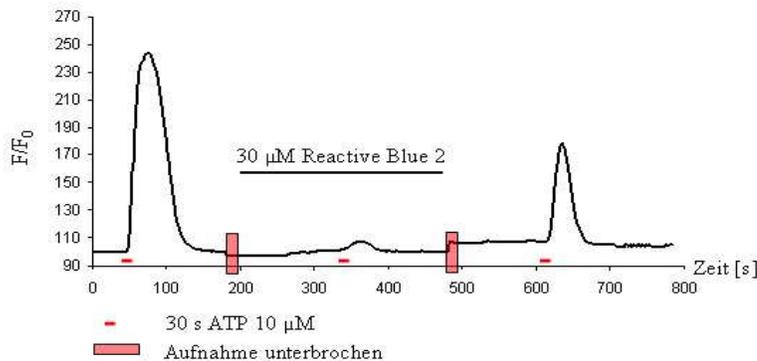


Abbildung 4.17: Fluoreszenzänderung nach Applikation (30 s) von 10 μM ATP. Die Reaktion wird durch RB2 blockiert. Diese Inhibierung ist reversibel.

Weitere Botenstoffe, auf deren Applikation hin die Reaktionsfähigkeit von GL261 Zellen untersucht wurde, waren Glutamat und Adenosin. Glutamat kann Ca^{2+} -abhängig von Astrozyten ausgeschüttet werden. Adenosin wird durch den Abbau von ATP gebildet. Die Applikation dieser beiden Transmitter führte zu keinem Ca^{2+} -Signal in den Sniffer Zellen (Abb. 4.18).

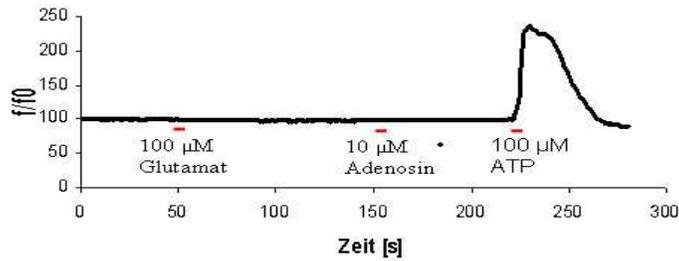


Abbildung 4.18: Fluoreszenzänderung nach Applikation (30 s) von Glutamat, Adenosin und ATP. Nur ATP ruft ein Ca^{2+} -Signal hervor.

Eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration, die durch Depolarisation von Gewebe entstehen kann, führte ebenfalls zu keinem Ca^{2+} -Signal (Abb. 4.19).

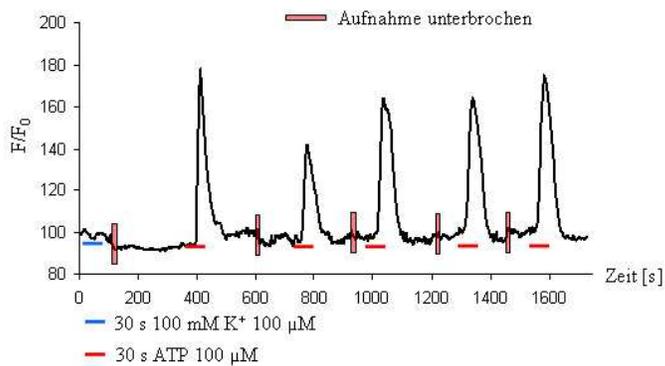


Abbildung 4.19: Erhöhung der extrazellulären K^+ Konzentration führt zu keinem Ca^{2+} -Signal in GI261 Zellen. Die Reaktion auf ATP kann mehrfach ausgelöst werden.

Aufgrund dieser Experimente lässt sich schließen, dass die GI261 Zellen selektiv und sehr sensitiv auf ATP reagieren, nicht aber auf Glutamat, Adenosin oder hohe K^+ -Konzentrationen, und daher als Sniffer Zellen für den Nachweis von ATP-Freisetzung aus Gewebe geeignet sind.

4.2.3.2 ATP-Freisetzung während astrozytärer Ca^{2+} -Wellen

Um zu untersuchen, ob Unterschiede im Propagationsmechanismus auch Unterschiede in der Freisetzung von Botenstoffen bedingen, wurden simultan mit der Ausbreitung der Ca^{2+} -Welle in den Astrozyten im Hirnschnitt auch Ca^{2+} -Änderungen in GI261-Zellen gemessen, die auf den Schnitt ausgesät worden waren. Obwohl die astrozytäre Ca^{2+} -Welle im Cortex von der Diffusion von Second Messengers durch Gap Junctions abhängt und nicht von Freisetzung von ATP und Aktivierung purinerner Rezeptoren wie im Corpus callosum, konnten Signale in den GI261-Zellen detektiert werden. Abbildung 4.20 zeigt die Ausbreitung der Ca^{2+} -Welle in einem nicht transgenen corticalen Hirnschnitt, auf dem Sniffer Zellen haften. Die Reaktion

wurde in Ca^{2+} -freiem Puffer nach Inkubation mit MCPG ausgelöst, einem Antagonisten metabotroper Glutamatrezeptoren, der weder auf die astrozytäre Welle, noch auf die Antwort in den GI261 Zellen einen Einfluss haben sollte.

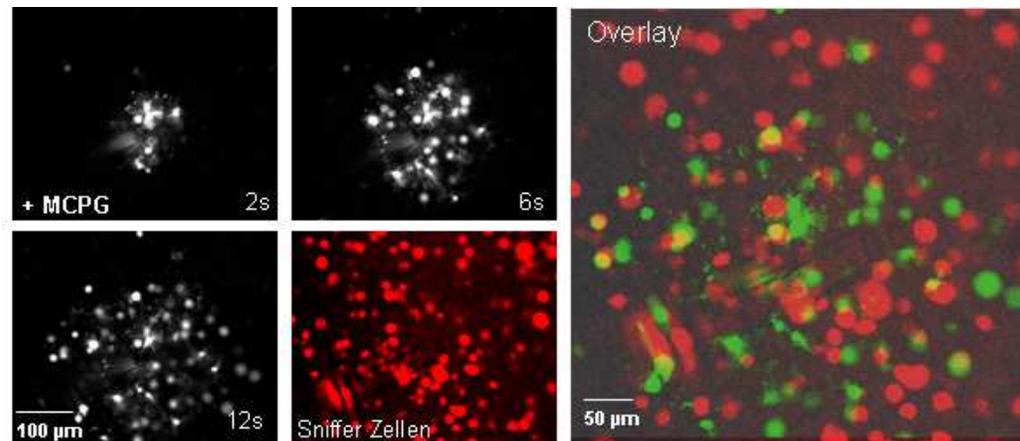


Abbildung 4.20: Ca^{2+} -Welle im nicht transgenen cortikalen Hirnschnitt mit GI261 Zellen nach Applikation von MCPG. Links sind die reagierenden Zellen bei unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulation dargestellt und die rote Fluoreszenz der GI261 Zellen. Rechts: Überlagerung der roten Fluoreszenz der Sniffer Zellen mit der Ca^{2+} -Reaktion in Astrozyten und GI261 Zellen (grün).

Links ist der Fluoreszenzanstieg bei verschiedenen Zeitpunkten in allen mit dem Ca^{2+} -Farbstoff beladenen Zellen zu sehen, also in Astrozyten und GI261 Zellen. Die Ausbreitung der Ca^{2+} -Welle wurde durch MCPG nicht verändert. Außerdem ist die rote Fluoreszenz der dsRedII-transfizierten Sniffer Zellen gezeigt. In der Überlagerung des Bildes mit allen reagierenden Zellen mit dem roten Signal (Abb. 4.20 rechts) lässt sich erkennen, dass manche reagierende, also grüne Zellen keine Überlagerung mit dem roten Signal zeigten. Dabei handelt es sich um Astrozyten oder um nicht transfizierte GI261 Zellen. Einige runde Sniffer Zellen, aber nicht alle, erscheinen durch die Überlagerung des roten mit dem grünen Signal gelb, reagierten also mit einem Ca^{2+} -Anstieg. Um den Unterschied zwischen Astrozyten und Sniffer Zellen deutlicher zu machen, wurden die runden Sniffer Zellen in Abbildung 4.21 durch dunkelgraue Kreise überlagert. In der Ausschnittsvergrößerung sieht man, wie sich die Astrozyten schon allein durch ihre unregelmäßige Form von den GI261 Zellen unterscheiden und dadurch klar identifiziert werden können.

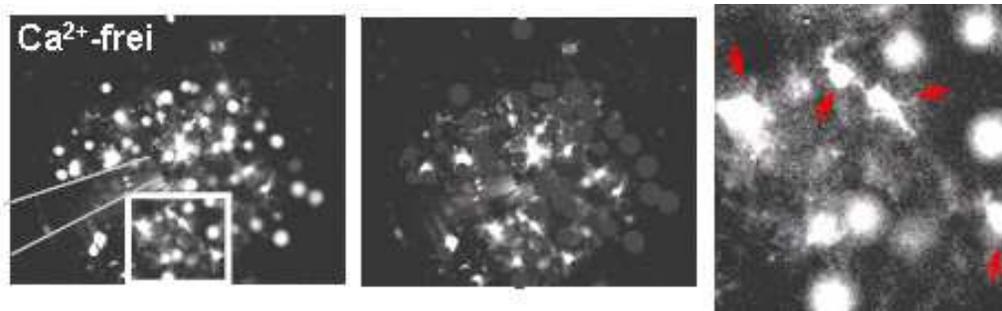


Abbildung 4.21: Ca^{2+} -Welle im cortikalen Hirnschnitt mit Gl261 Zellen. Die runden Gl261 Zellen wurden im mittleren Bild durch dunkelgraue Kreise überdeckt um die Reaktion der Astrozyten im darunter liegenden Schnitt deutlicher zu machen. Die Ausschnittvergrößerung verdeutlicht den Unterschied zwischen runden Sniffer Zellen und unregelmäßig geformten Astrozyten (rote Pfeile).

Während der Ca^{2+} -Welle im Cortex kommt es also zu den Ca^{2+} -Änderungen in den Astrozyten auch zu Ca^{2+} -Änderungen in den Sniffer Zellen. Diese konnten durch fünfminütige Inkubation mit dem purinergeren Antagonist Reactive Blue2 (RB2) blockiert werden. Die Astrozytenreaktion im Schnitt war dadurch nicht beeinträchtigt, wie Abbildung 4.22 zeigt. Bei dem freigesetzten Botenstoff, der die Reaktion in den Sniffer Zellen hervorruft, handelt es sich also um ATP.

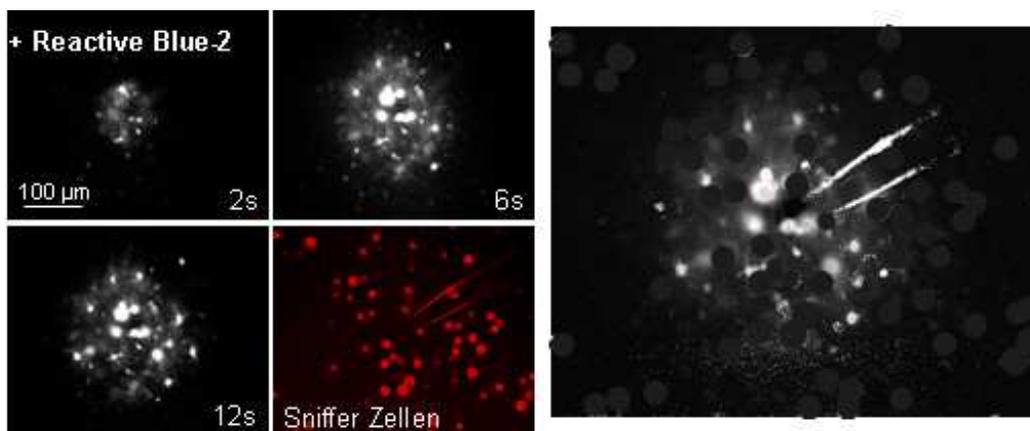


Abbildung 4.22: Ca^{2+} -Welle im cortikalen Hirnschnitt mit Gl261 Zellen nach Applikation von RB2. Links sind die reagierenden Zellen bei unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Stimulation dargestellt und unten rechts die rote Fluoreszenz der Gl261 Zellen. Rechts wurden die Sniffer Zellen überdeckt um die unbeeinflusste astrozytäre Ca^{2+} -Welle im Schnitt zu verdeutlichen.

Weiterhin wurde untersucht, ob es auch in den Hirnschnitten Cx-defizienter Mäuse zu ATP-Freisetzung kommt. Wieder wurden Gl261 Zellen auf den Schnitt ausgesät, im Cortex fokale elektrisch stimuliert und die Fluoreszenzänderungen in Astrozyten und Sniffer Zellen gemessen. Wie erwartet kam es unter den nicht gekoppelte Astrozyten im Schnitt zu keiner Ausbreitung von Ca^{2+} -Signalen. Nach Überlagerung

der runden Sniffer Zellen mit dunklen Kreisen ist keine Aktivität im Schnitt zu sehen (Abb. 4.23 Mitte). Dagegen reagierten die GI261 Zellen wie im nicht transgenen Tier mit Ca^{2+} -Signalen, was auf die wellenartige Ausbreitung der ATP-Freisetzung hinweist.

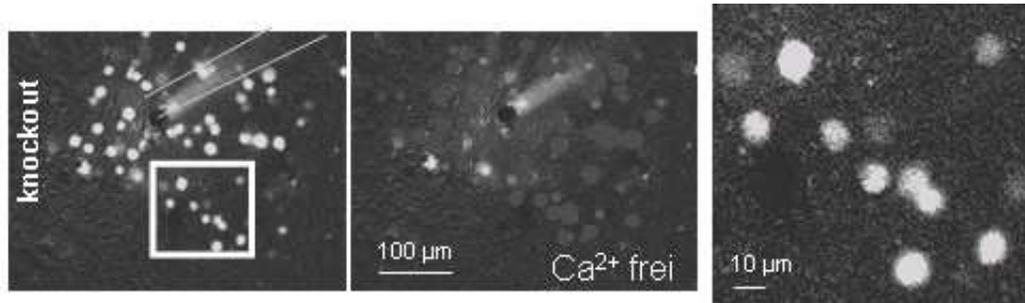


Abbildung 4.23: Stimulation im cortikalen Hirnschnitt Cx-defizienter Mäuse (Astrozyten nicht gekoppelt) mit GI261 Zellen in Ca^{2+} -freiem ACSF. Links: Alle reagierenden Zellen. Mitte: Runde GI261 Zellen wurden durch dunkle Kreise verdeckt. Rechts: Ausschnittvergrößerung: Unter Astrozyten findet keine Ausbreitung von Ca^{2+} -Erhöhungen statt, nur Sniffer Zellen zeigen Ca^{2+} -Signalw.

Besonders in der Ausschnittvergrößerung ist zu sehen, dass fast ausschließlich die runden Sniffer Zellen ein Ca^{2+} -Signal zeigten. Nach Inkubation mit TTX zeigte sich das gleiche Ergebnis wie unter Ca^{2+} -freien Bedingungen (Abb. 4.24).

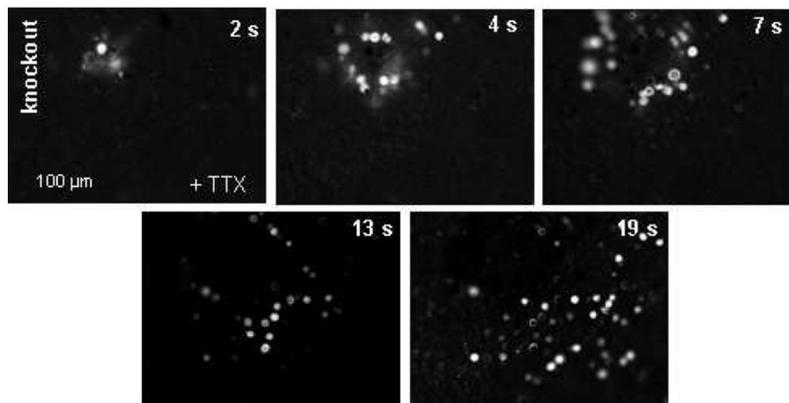


Abbildung 4.24: Stimulation im cortikalen Hirnschnitt Cx-defizienter Mäuse (Astrozyten nicht gekoppelt) mit GI261 Zellen nach Inkubation mit TTX. Nur in den runden GI261 Zellen breitet sich eine Ca^{2+} -Welle aus. Gezeigt ist die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation.

Im Schnitt war keine Propagation einer Ca^{2+} -Welle zu erkennen, während sich in den GI261 Zellen eine ATP-induzierte Ca^{2+} -Welle ausbreitete. Die Geschwindigkeit dieser Welle war ähnlich der einer astrozytären Ca^{2+} -Welle, nämlich ca. $15 \mu\text{m/s}$.

4.2.4 Ca^{2+} -Wellen unter pathologischen Bedingungen

4.2.4.1 *Unter nicht gekoppelten Astrozyten treten Ca^{2+} -Wellen spontan auf*

Cortical Spreading Depression (CSD) ist klassischerweise als eine sich langsam ausbreitende Welle neuronaler Depolarisation definiert (Basarsky et al., 1998). Sie tritt in verschiedenen pathologischen Situationen wie der Aura von Migräne oder bei der Ausbreitung von Hirninfarkten auf. CSD lässt sich in Hirnschnitten durch fokale Druckapplikation von 3 M KCl auslösen. Die Ausbreitung lässt sich durch das so genannte intrinsische optische Signal (IOS) im Durchlicht messen. Die Grundlage des IOS sind Unterschiede in der Lichtbrechung im Hirnschnitt, die durch Verschiebungen der Ionenkonzentrationen zwischen Intra- und Extrazellulärraum während der CSD verursacht werden. Parallel zu dieser neuronalen Welle lassen sich Ca^{2+} -Erhöhungen in Astrozyten beobachten, die mit der gleichen Geschwindigkeit von ca. 40 $\mu\text{m/s}$ propagieren. Die astrozytäre Ca^{2+} -Welle breitet sich weiter als das IOS aus, dann allerdings langsamer, mit der typischen Geschwindigkeit astrozytärer Ca^{2+} -Wellen von 15-20 $\mu\text{m/s}$ (Peters et al., 2003). Sowohl die eigentliche CSD, als auch die pathologisch induzierte astrozytäre Ca^{2+} -Welle sollten hinsichtlich des Einflusses der Kopplung von Astrozyten durch Gap Junctions untersucht werden. Dazu wurden CSDs in Hirnschnitten von Cx-defizienten Mäusen ausgelöst und das IOS sowie die astrozytären Signale mit und ohne begleitendes IOS analysiert. IOS und Fluoreszenz wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz abwechselnd im Abstand von 0,5 s aufgenommen. Abbildung 4.25 zeigt ein Beispiel einer CSD in einem Cx-defizienten Tier. Dargestellt sind Fluoreszenz und IOS zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulation, wobei konsekutive Bilder jeweils von einander abgezogen wurden, um nur neu reagierende Regionen zu zeigen. Die ausgelöste CSD einschließlich der assoziierten astrozytären Ca^{2+} -Signale unterschied sich weder in Ausdehnung noch in der Anzahl reagierender Astrozyten von CSDs in nicht transgenen Tieren.

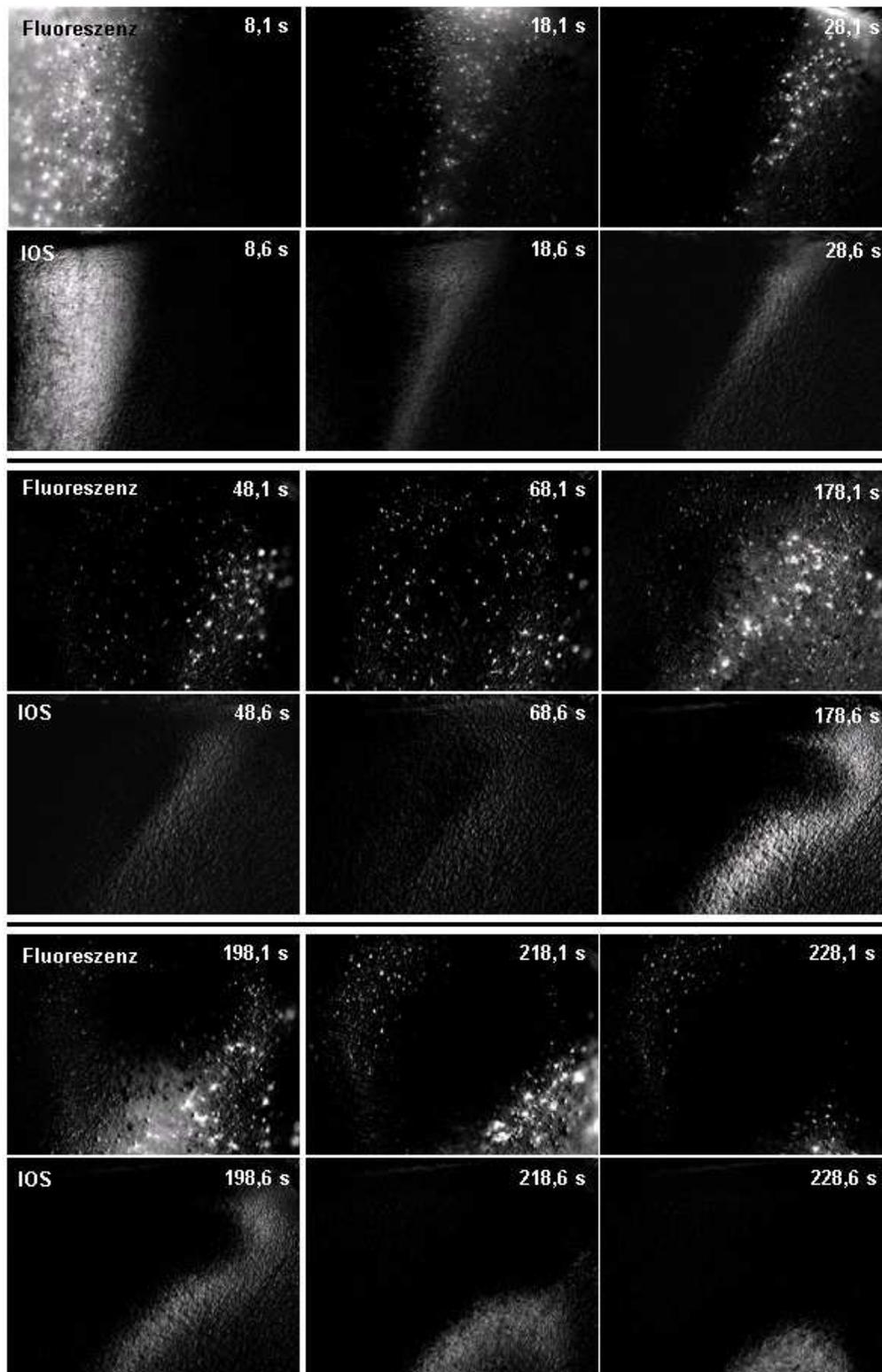


Abbildung 4.25: Beispiel einer induzierten CSD (8 bis 28 s), der nach 48 s eine spontane astrozytäre Ca^{2+} -Welle ohne begleitendes IOS folgt. 178 s nach Stimulation entwickelt sich spontan eine CSD. Gezeigt sind jeweils Fluoreszenz und IOS zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation (Cx-defiziente Maus). Konsekutive Aufnahmen wurden von einander abgezogen, um nur neu reagierende Areale zu zeigen.

Vielmehr traten in über 50 % der Versuche mit Schnitten von Cx-defizienten Mäusen spontane CSDs (178 s nach Stimulation in Abb. 4.25) und damit einhergehende oder auch unabhängige Ca^{2+} -Wellen in Astrozyten auf (48 s nach Simulation in Abb. 4.25, bzw. nach 178 s in Abb. 4.26), teilweise sogar vor dem auslösenden Stimulus, der Applikation von KCl (18 Versuche von 3 Tieren). Spontane Änderungen im IOS waren stets von einer Ca^{2+} -Welle begleitet, während Ca^{2+} -Wellen auch ohne detektierbare IOS-Änderung auftraten (Abb. 4.26). Da bekannt ist, dass Spreading Depression in Hippokampi von Cx-defizienten Tieren beschleunigt abläuft (Theis et al., 2003), wurden die Ausbreitungsgeschwindigkeiten der induzierten und der spontanen CSDs ausgewertet. Das IOS breitete sich durchschnittlich mit ca. 40 $\mu\text{m/s}$ aus, wobei oft festgestellt werden konnte, dass die Geschwindigkeit in den äußeren Schichten des Cortex etwas größer war. In beiden gezeigten Beispielen ist dies deutlich zu sehen, da die Front des IOS schräg verläuft, bzw. sich in Abbildung 4.25 sogar krümmt. Die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Welle in der Peripherie ohne IOS war in den von Cx-defizienten Tieren ca. 15 $\mu\text{m/s}$. Spontane Ca^{2+} -Wellen in Astrozyten ohne IOS hatten vergleichbare Geschwindigkeiten.

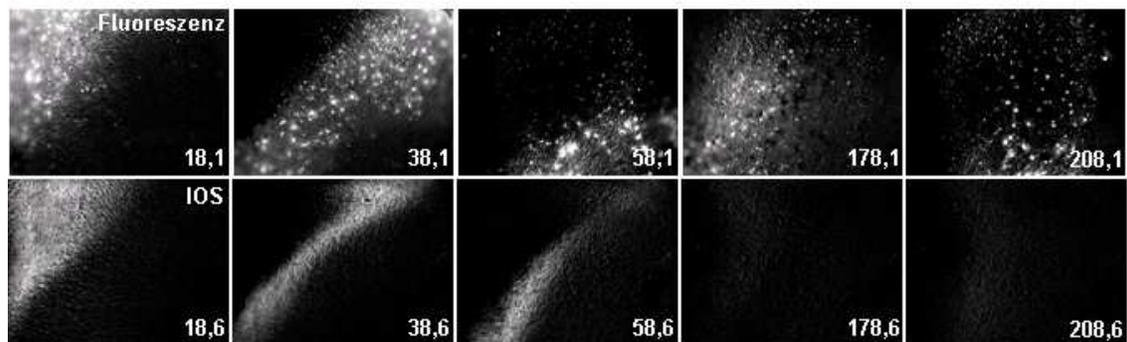


Abbildung 4.26: Beispiel einer induzierten CSD mit Ca^{2+} -Welle ohne begleitendes IOS, der eine spontane Ca^{2+} -Welle ohne IOS folgt (Cx-defiziente Maus).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Abwesenheit von Kopplung zwischen Astrozyten die Entstehung von CSD und damit assoziierten, also pathologisch induzierten, astrozytären Ca^{2+} -Wellen im Cortex erleichtert ist.

4.2.4.2 ATP-Freisetzung während CSD

Es ist bekannt, dass Glutamatkonzentrationen im Extrazellulärraum während CSD ansteigen (Basarsky et al., 1999). Mittels des beschriebenen Sniffer-Zell-Assays sollte nun die Freisetzung von ATP während CSD untersucht werden. Verwendet wurden sowohl Hirnschnitte von nicht transgenen als auch von Cx-defizienten Mäusen, auf die Gl261 Zellen ausgesät worden waren. Abbildung 4.27 zeigt ein Experiment mit einem Cx-defizienten Tier. Die Gl261 Zellen wurden durch ihre charakteristische runde Form identifiziert und so von den Astrozyten im Schnitt unterschieden. Sowohl im Bereich mit IOS (Regionen 1 und 2 in Abb. 4.27) als auch ohne (Regionen 3 bis 6) zeigten die Sniffer Zellen ein Ca^{2+} -Signal. Da eingangs gezeigt wurde, dass die Gl261 Zellen selektiv auf ATP und nicht auf eine bloße Erhöhung der Kaliumkonzentration reagieren, lässt sich daraus schließen, dass während Spreading Depression und der nachfolgenden astrozytären Ca^{2+} -Welle ATP freigesetzt wird. Die ATP-Welle in den Sniffer Zellen breitete sich parallel zu der Reaktion im Schnitt aus. Im gezeigten Beispiel waren dies Geschwindigkeiten von 37 $\mu\text{m/s}$ in Bereichen mit IOS und 18 $\mu\text{m/s}$ ohne. Die ATP-Freisetzung konnte auch in cre-negativen und in nicht transgenen Tieren beobachtet werden.

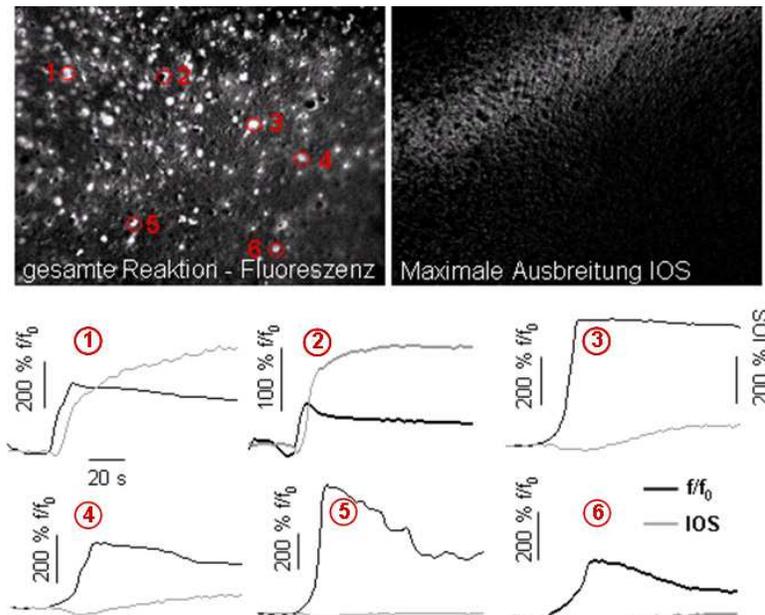


Abbildung 4.27: Sniffer Zellen auf einem Cx-defizienten Hirnschnitt. Oben: Fluoreszenz (links) und IOS (rechts) nach Stimulation einer CSD. Gezeigt ist jeweils die gesamte Reaktion. Unten: Relative Fluoreszenz- (schwarz) und IOS-Änderungen (grau) in den oben markierten Regionen. Sowohl in Bereichen mit als auch ohne IOS reagieren Sniffer Zellen mit einem Ca^{2+} -Anstieg.

Nachgeahmt konnte das Phänomen der Spreading Depression, bzw. der damit einher gehenden Depolarisation, in dem für 30 s ACSF mit 50 mM K^+ appliziert wurde. Auch hier kam es zu Ca^{2+} -Erhöhungen in der Mehrzahl der Sniffer Zellen (Abb. 4.28).

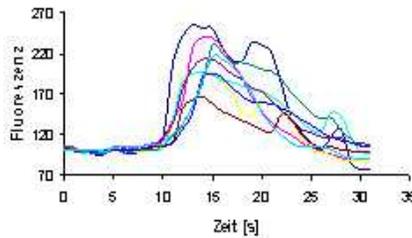
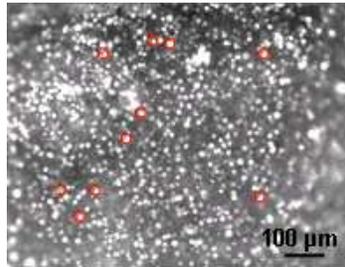


Abbildung 4.28: Links: Sniffer Zellen auf einem nicht transgenen Hirnschnitt. Links: Fluoreszenzaufnahme nach Applikation von 50 mM K^+ -haltigem ACSF. Rechts: Fluoreszenzänderungen in den links markierten Zellen.

Dies zeigt, dass es wie bei den elektrisch induzierten astrozytären Ca^{2+} -Wellen auch bei sozusagen pathologisch induzierten Ca^{2+} -Wellen zu ATP-Freisetzung kommt, die durch Sniffer Zellen detektiert wird. Weiterhin zeigen die Versuche, dass auch Depolarisation von Gewebe, was z.B. durch CSD hervorgerufen wird, zu ATP-Freisetzung führt.

4.3 Neuronal induzierte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten

4.3.1 Mechanismus der neuronal induzierte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten im motorischen Cortex

Wie bereits in Abschnitt 4.2.1 erwähnt, führt elektrische Stimulation im Cortex zur Aktivierung von Neuronen. Um neuronale Transmission zu unterdrücken und so reine astrozytäre Ca^{2+} -Wellen auszulösen, wurde in den bisher beschriebenen Experimenten mit Ca^{2+} -freiem oder TTX-haltigem Puffer gearbeitet. Der folgende Abschnitt beschreibt nun die Untersuchung von neuronal induzierten, in normalem ACSF ausgelösten astrozytären Ca^{2+} -Signalen im motorischen Cortex (Abb. 4.29).

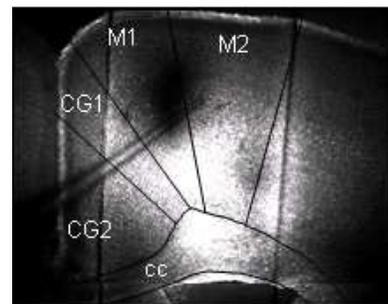


Abbildung 4.29: Lage der Stimulation: Schicht 2/3 im primären (M1) und sekundären (M2) motorischen Cortex; CG1, CG2: cingulärer Cortex, cc: Corpus callosum)

Es wurde der gleiche Stimulus wie für die Auslösung der Ca^{2+} -Wellen verwendet, nämlich 4 s, 10 Hz, 4 V. Abbildung 4.30 zeigt die Reaktion auf diese Stimulation. Im Vergleich zu den bisher beschriebenen langsamen Ca^{2+} -Wellen reagierten die Astrozyten hier deutlich schneller und auch weiter entfernt vom Punkt der Stimulation. Bereits etwa 1,5 s nach Einsetzen der Stimulation war die Reaktion im Großteil der Astrozyten erfolgt.

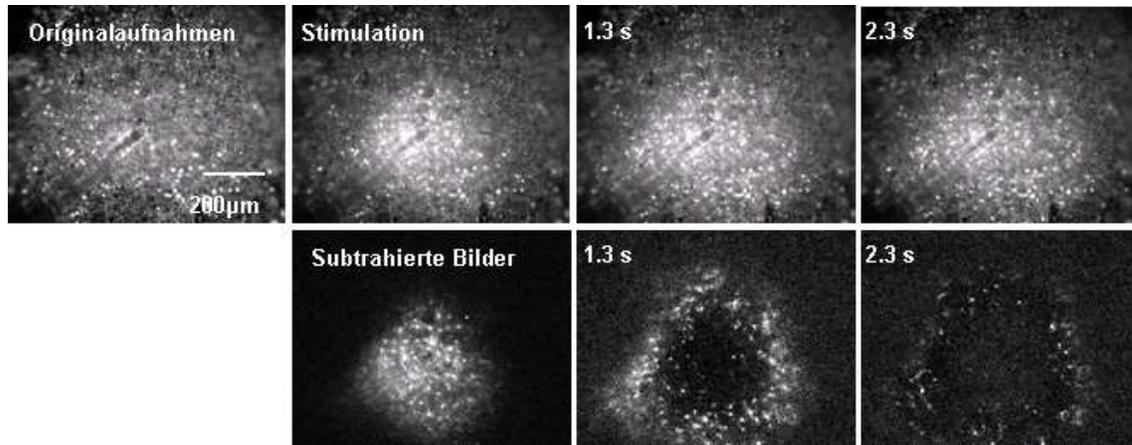


Abbildung 4.30: Stimulation im motorischen Cortex mit 4 V, 10 Hz, 4 s. Oben: Originalaufnahmen, unten: Subtraktion der jeweiligen Originalbilder, auf denen nur neu reagierende Zellen zu erkennen sind. Zeitpunkte nach der Stimulation sind angegeben.

Trägt man das Maximum der Fluoreszenzänderung gegen den Abstand vom Punkt der Stimulation auf (Abb. 4.31), erhält man für die Geschwindigkeit der Ausbreitung einen Wert von ca. 200 $\mu\text{m/s}$, was eine Größenordnung schneller ist, als die der Ca^{2+} -Welle, die in Gegenwart von TTX oder Ca^{2+} -freiem ACSF ausgelöst wurde. Durch die Aufnahme­frequenz von 1 Hz ist eine genauere Bestimmung der Geschwindigkeit nicht möglich, allerdings ist deutlich, dass die Reaktion deutlich schneller abläuft.

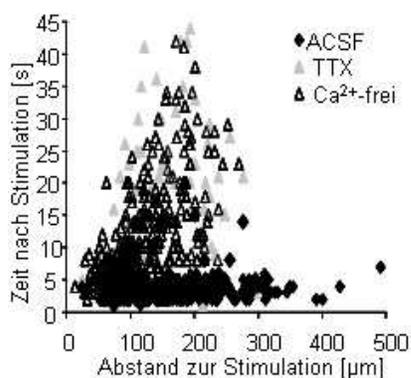


Abbildung 4.31: Zeitpunkte der Astrozytenreaktion in Abhängigkeit der Entfernung der Zelle von der Stimulationspipette unter verschiedenen Bedingungen. In normalem ACSF (schwarze Rauten) reagieren die Astrozyten nahezu unabhängig von der Entfernung sofort nach Einsetzen der Stimulation (ca. 200 $\mu\text{m/s}$). Mit TTX (grau) oder in Ca^{2+} -freiem ACSF (offene Rauten) ist die Ausbreitung deutlich langsamer (ca. 15 $\mu\text{m/s}$).

Verschiedene Antagonisten wurden getestet, um die verantwortlichen Signalmoleküle für die Ca^{2+} -Erhöhungen in den Astrozyten zu charakterisieren. Weder CGP46381 (GABA_B -R-Blocker), Suramin (Antagonist purinerner Rezeptoren), DPCPX (Adenosin-R Blocker) noch eine Mischung metabotroper, AMPA/Kainat- und NMDA-R-Antagonisten (MCPG, CNQX und MK801) zeigten einen Effekt. GABA, ATP, Adenosin und Glutamat können also als Botenstoffe für die Aktivierung der Astrozyten ausgeschlossen werden.

Daraufhin wurde die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) untersucht. Zunächst wurde gezeigt, dass Astrozyten auf Applikation eines NO-Donors (*S*-Nitrosoglutathione, SNOG) unabhängig von extrazellulärem Ca^{2+} mit Ca^{2+} -Oszillationen reagieren (Abb. 4.32). In normalem ACSF hervorgerufene Oszillationen waren regelmäßiger und häufiger als in Ca^{2+} -freiem ACSF.

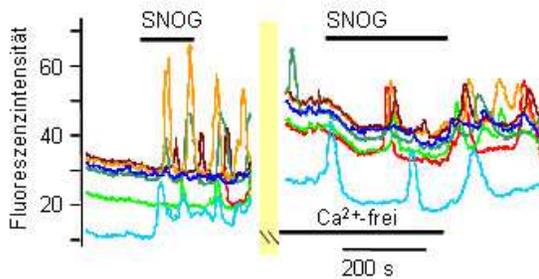


Abbildung 4.32: Absolute Fluoreszenzänderungen in einzelnen Astrozyten nach Applikation des NO-Donors SNOG in normalen und Ca^{2+} -freiem ACSF. Der gelbe Streifen markiert eine Pause zwischen beiden Experimenten.

Daraufhin wurde überprüft, ob N-Nitro-L-Arginin (L-NNA), ein Blocker der NO-Synthase, die Anzahl der auf elektrische Stimulation reagierenden Astrozyten beeinflussen kann. Abbildung 4.33 zeigt eine Folge von elektrischen Stimulationen unter Kontrollbedingungen und mit L-NNA. In Gegenwart von L-NNA wurde ATP appliziert um die generelle Fähigkeit der Astrozyten, Ca^{2+} -Signale unter diesen Bedingungen zu generieren, zu prüfen. Nach 20minütigem Auswaschen von L-NNA erfolgte eine weitere Kontrollstimulation. In Gegenwart von L-NNA ist die Ausbreitung deutlich reduziert, obwohl alle Zellen noch auf ATP reagieren können. L-NNA wirkt also spezifisch auf den Mechanismus der elektrischen Stimulation.

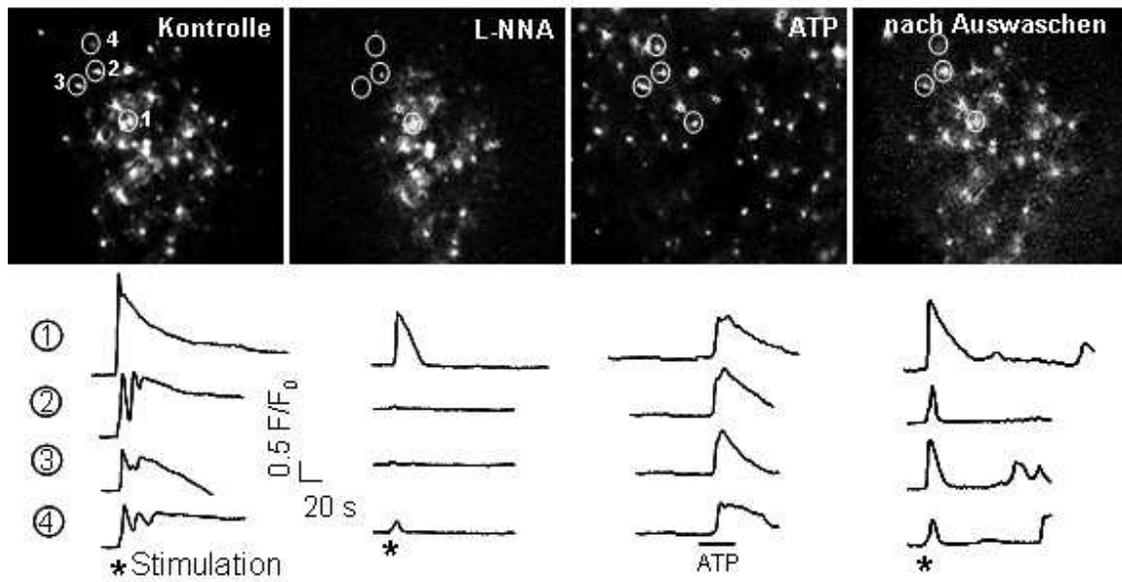


Abbildung 4.33: Oben: Reagierende Zellen nach elektrischer Stimulation unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit L-NNA.. Eine Vitalitätsprüfung erfolgte durch ATP-Applikation während L-NNA-Inkubation. Nach Auswaschen von L-NNA ist die Reaktionsfähigkeit der Astrozyten wieder hergestellt. Unten: Relative Fluoreszenzänderungen in den markierten Zellen. Elektrische Stimulation ist durch einen Stern gekennzeichnet.

Eine Zusammenfassung aller durchgeführten Versuche ist in Abbildung 4.34 dargestellt. Aufgetragen wurde der Prozentsatz der im Vergleich zur Kontrolle reagierenden Zellen in verschiedenen Abständen von der Stimulationspipette. Von insgesamt 365 Zellen in 15 Schnitten reagierten noch 193 nach Applikation von L-NNA. Hauptsächlich die Zellen, die weiter weg als 120 μm von der Stimulationspipette liegen, waren in ihrer Reaktion beeinträchtigt.

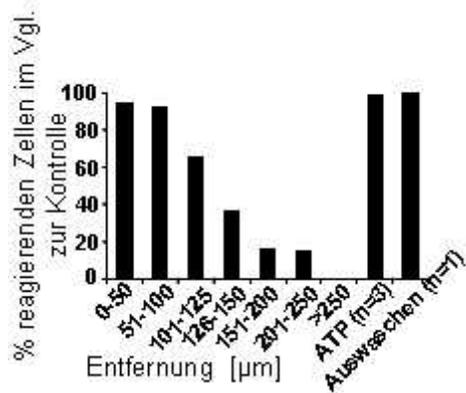


Abbildung 4.34: Zusammenfassung aller Versuche mit L-NNA (n=15). Mit zunehmender Entfernung von der Stimulation ist die Reaktionsfähigkeit auf elektrische Stimulation, aber nicht die allgemeine Fähigkeit, Ca^{2+} -Signale zu generieren beeinträchtigt. Nach Auswaschen von L.NNA ist die Reaktionsfähigkeit wieder hergestellt.

Eine genauere Analyse der Lage der auch mit L-NNA reagierenden Astrozyten zeigt, dass diese meist senkrecht zur Hirnoberfläche lagen. Dazu wurden die reagierenden Astrozyten bezüglich ihrer Lage zur Stimulationspipette und zur Hirnoberfläche in ein

Raster eingeteilt (Abb. 4.35 links) und anschließend ein Intensitätsdiagramm in Abhängigkeit der Anzahl der Zellen pro Rastereinheit erstellt.

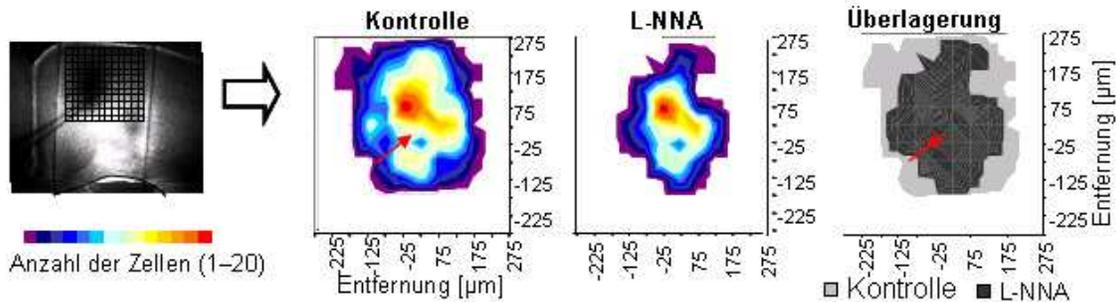


Abbildung 4.35: Rasterauswertung zur 2-dimensionalen Analyse der Verteilung der reagierenden Zellen. Die Anzahl der Zellen ist farbcodiert dargestellt. Der rote Pfeil markiert die Lage der Stimulationspipette.

Schon unter Kontrollbedingungen verläuft die Reaktion leicht elliptisch in Richtung Hirnoberfläche. In der Überlagerung der Reaktionsflächen wird deutlich, dass mit L-NNA hauptsächlich die senkrecht zur Hirnoberfläche liegende Komponente bestehen bleibt (Abb. 4.35). NO ist also zumindest zum Teil für die Kommunikation zwischen Neuronen und Astrozyten im motorischen Cortex verantwortlich.

4.3.2 Mechanismus der neuronal induzierten Ca^{2+} -Signale in Astrozyten im Barrel Cortex

4.3.2.1 Die Reaktion im Barrel Cortex unterscheidet sich von der im motorischen

Für die folgenden Experimente wurde ein anderes Stimulationsparadigma verwendet, nämlich 100 Hz, 0,3 s, 4 V. Damit werden verstärkt neuronale Verschaltungen aktiviert. Der Unterschied zur 10 Hz, 4 s Stimulation bestand in einer erneuten Beschleunigung und weiteren Ausbreitung der Reaktion. Es wurden zwei Areale des Cortex verglichen, der schon beschriebene motorische und der Barrel Cortex, der zu den sensorischen Gebieten zählt und die Barthaare von Nagetieren repräsentiert. Er weist eine charakteristische Verschaltung der Informationsweiterleitung auf, in der jeweils ein Tasthaar mit einem spezifischen Barrel korrespondiert. Der Input in Schicht 4 wird innerhalb einer Barrel Column

hauptsächlich nach Schicht 2/3 projiziert und verstärkt. Während im motorischen Cortex eher unspezifisch in Schicht 2/3 stimuliert wurde, fand die Stimulation im Barrel Cortex stets in der Mitte eines Barrel in Schicht 4 statt (Abb. 4.36 links) und ahmte damit den neuronalen Input bei Bewegung eines einzelnen Barthaars nach. Wie bereits gezeigt, breitete sich die Reaktion im motorischen Cortex eher kreisförmig bis elliptisch um die Pipette mit einer leichten Präferenz zur Hirnoberfläche hin aus (Abb. 4.30, 4.35). Im Gegensatz dazu war die Reaktion im Barrel Cortex deutlich entlang der neuronalen Verschaltungsweise ausgerichtet (siehe Abb. 4.36). Legt man nachträglich die Fluoreszenzaufnahme der reagierenden Zellen über das Durchlichtbild, in dem die Barrel-Struktur zu sehen ist, erkennt man, dass die Reaktion stets auf eine Barrel Column beschränkt ist und sich eindeutig in Richtung Schicht 2/3 ausbreitet.

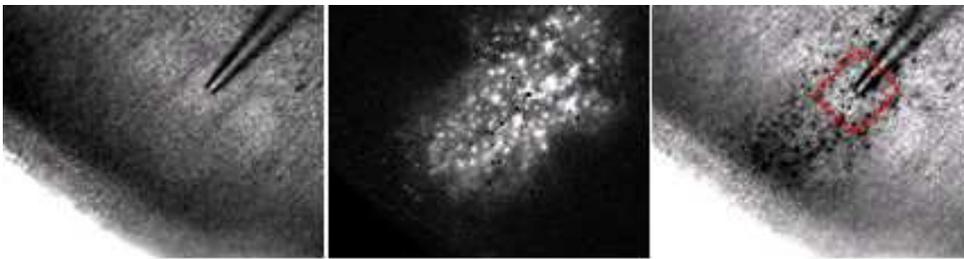


Abbildung 4.36: Reaktion auf elektrische Stimulation in Schicht 4 des Barrel Cortex. Links: Lage der Stimulationspipette (Durchlicht). Mitte: Fluoreszenzbild (Hintergrund subtrahiert) der Reaktion 1 s nach Stimulation. Rechts: Überlagerung der Reaktion (Farbe invertiert) mit dem Durchlichtbild. Grenzen des Barrels sind rot markiert.

4.3.2.2 *Im Barrel Cortex zeigen in jungen Tieren sowohl Neurone als auch Astrozyten Ca^{2+} -Signale*

Um das im Gegensatz zur astrozytären Ca^{2+} -Welle recht schnelle neuronal induzierte Signal zeitlich besser aufzulösen, wurde die Aufnahme­frequenz von 1 Hz auf 4 Hz erhöht. Abbildung 4.37 zeigt ein Beispiel einer Reaktion. Deutlich ließen sich zwei verschiedenen Muster von Ca^{2+} -Signalen unterscheiden. Gleichzeitig mit der Stimulation zeigte eine Zellpopulation mit einem vergleichsweise kleinen Soma im gesamten Schnitt ein schwaches Signal, das sofort wieder abklang. In der Abbildung 4.37 ist die Reaktion solcher Zellen (1 bis 3) exemplarisch mit Fluoreszenzgraphen dargestellt.

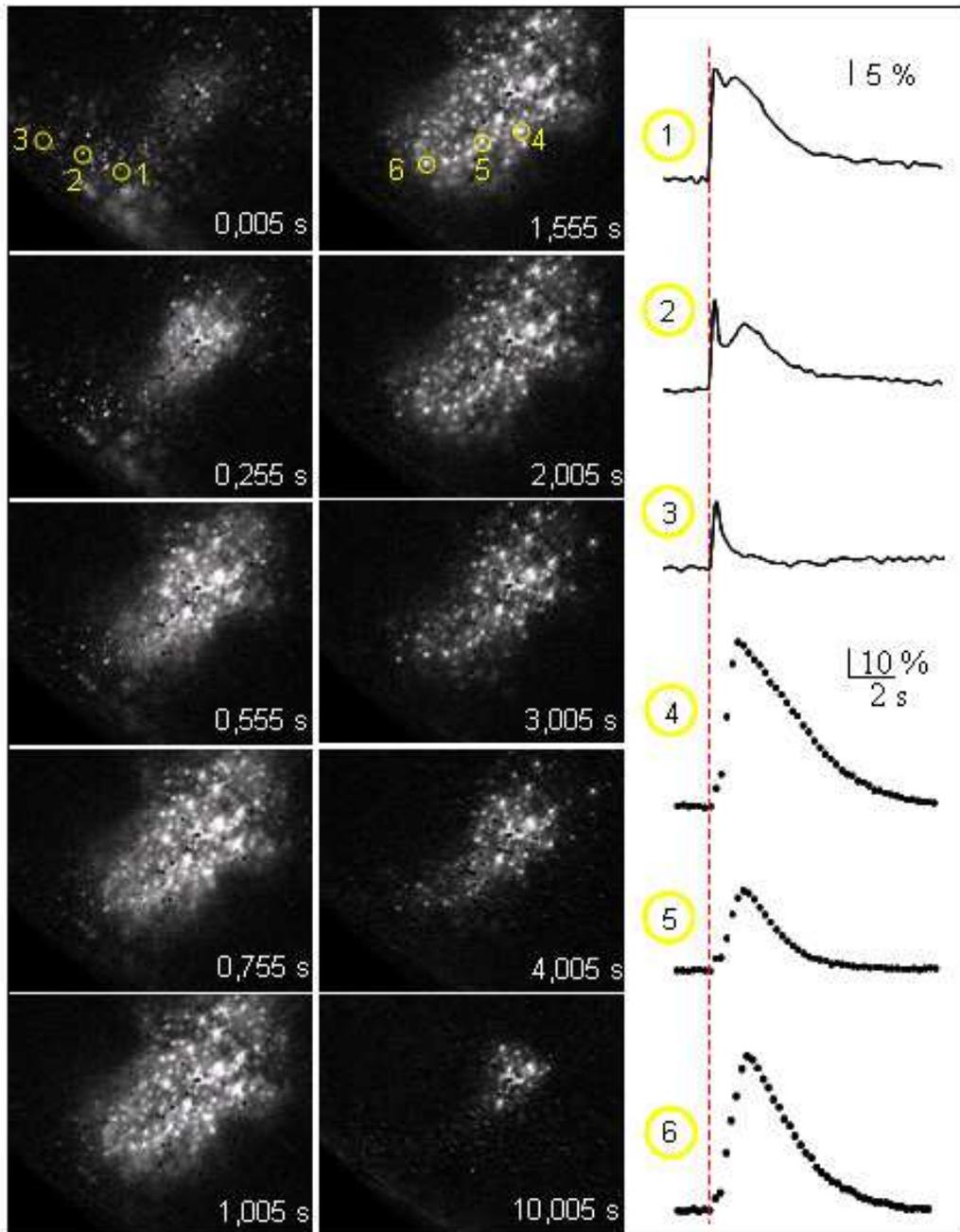


Abbildung 4.37: Stimulation im Barrel Cortex. Von den Fluoreszenzaufnahmen wurde jeweils der Hintergrund (das Bild vor der Stimulation) abgezogen, um die reagierenden Zellen deutlicher darzustellen. Zeitpunkte der Reaktion nach Beginn der Stimulation sind angegeben. Von den markierten Regionen sind jeweils relative Änderungen der Fluoreszenz als Graphen gezeigt. Die rote Linie markiert den Beginn der Stimulation. Deutlich lassen sich zwei verschiedenen Muster von Ca^{2+} -Signalen unterscheiden: kleine, schnelle (1-3) und große, langsame (4-6).

Im Anschluss an diese Reaktion fanden in einer weiteren Gruppe von Zellen langsamere Ca^{2+} -Erhöhungen statt, die deutlich größer waren und ihr Maximum erst 1 s nach der Stimulation erreichten. In der Abbildung 4.37 korrespondiert dies mit

den Regionen 4 bis 6. Diese zweite Reaktion war auf eine Barrel Column beschränkt. Anhand der roten Linie, die den Beginn der Stimulation markiert, lässt sich deutlich der zeitliche Unterschied im Anstieg der Ca^{2+} -Signale erkennen. Auch in der Abklingdauer des Ca^{2+} -Signals unterschieden sich beide Populationen. Um dies genauer zu charakterisieren wurden Ca^{2+} -Signale von vier Experimenten mit 103 Zellen bezüglich Amplitude und Zeitverlauf analysiert. Als Abklingdauer τ wurde jeweils der Zeitpunkt bestimmt, an dem die Fluoreszenzänderung auf die Hälfte des

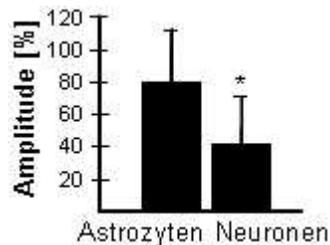


Abbildung 4.38: Analyse der Amplitudengröße der zwei Zellpopulationen. ($p < 0,005$, t-Test)

maximalen Werts gesunken war. Die maximale Amplitude des Signals in Zellen der ersten Gruppe, die später als Neurone identifiziert wurde, war mit durchschnittlich 40 % signifikant kleiner als die der zweiten, die sich als Astrozyten herausstellten

(durchschnittliche Amplitude 80 %, Abb. 4.38). Die Abklingzeit der neuronalen Population war im Mittel

3,3 s, die der Astrozyten 8,8 s. Bei Betrachtung des Zusammenhangs zwischen Amplitude und Abklingzeit (Abb. 4.39, links) erkennt man, dass der Großteil der Zellen mit kleiner Amplitude ein τ unter 2 s hatte, wie es für Neurone typisch ist (schwarze Rauten). Eine Analyse der Lage der Zellen mit kleinem, aber langsam abklingendem Signal (graue Rauten) ergab, dass diese stets innerhalb des stimulierten Barrels lagen (Abb. 4.39, rechts). Dort wird das neuronale Signal vom astrozytären überlagert, so dass der Eindruck einer langsamen Abklingzeit entsteht. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Neurone typischerweise ein kleines, innerhalb von 2 s auf die Hälfte abklingendes Ca^{2+} -Signal zeigten. Innerhalb des Barrels wurde dies durch die nachfolgende Astrozytenreaktion verdeckt. Astrozyten dagegen zeigten Signale mit deutlich größerer Amplitude, die länger andauerten. Aufgrund dieser Eigenschaften ließen sich in den folgenden Experimenten beide Gruppen zuverlässig unterscheiden.

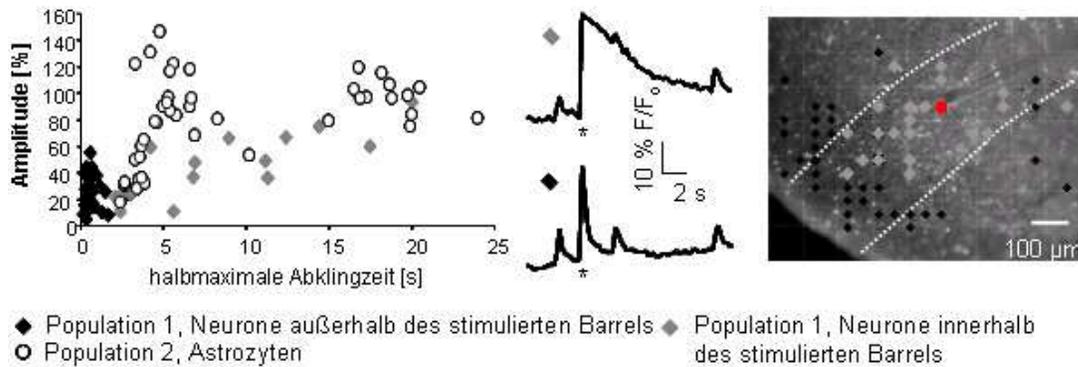


Abbildung 4.39: Links: Zusammenhang zwischen Amplitudengröße der Ca^{2+} -Signale und Abklingzeit τ . Astrozyten (offene Kreise) zeichnen sich durch große Amplituden aus, die langsam abklingen. Neuronale Signale haben eine kleine Amplitude und in der Mehrzahl ein schnelles τ (schwarze Rauten). Mitte: Repräsentative Graphen für neuronale Signale mit schnellem und langsamem τ . Der Zeitpunkt der Stimulation ist mit einem Stern gekennzeichnet. Die übrigen Signale sind spontan. Rechts: Neuronen mit schnell ($t < 2$ s, schwarze Rauten) und langsam ($t > 2$ s, graue Rauten) abklingenden Signalen wurden auf ihre Lage bezüglich der Stimulationspipette (rotes Quadrat) analysiert und in einem Durchlichtbild der Versuchsanordnung dargestellt. Weiße Linien markieren die Barrelgrenzen. Neuronen mit langsamem τ liegen innerhalb des stimulierten Barrels.

Die Identifizierung der Astrozyten erfolgte aufgrund schon publizierter Daten, die zeigten, dass Fluo4-gefärbte Zellen im Cortex von 10 bis 14 Tage alten Mäusen ein für Astrozyten typisches elektrophysiologisches Profil ausweisen (Peters et al., 2003)). Zusätzlich wurde eine Doppelfärbung mit Fluo4-AM und Sulforhodamine 101 (SR101) durchgeführt (Abb. 4.40). SR101 wird selektiv von Astrozyten aufgenommen (Nimmerjahn et al., 2004).

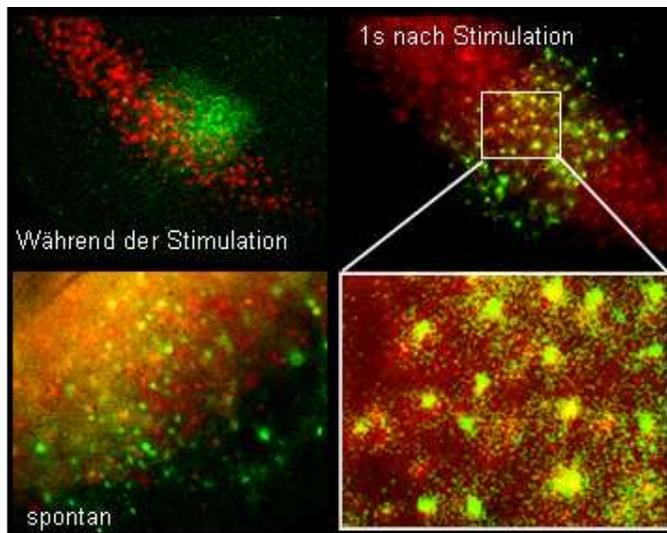


Abbildung 4.40: Identifizierung der Astrozyten durch Doppelfärbung mit dem astrozytenspezifischen Farbstoff SR101. Im Gegensatz zu schnell und spontan reagierenden Zellen (links) sind das grüne Ca^{2+} - und das rote SR101-Signal in den Zellen die 1 s nach der Stimulation auf den Barrel begrenzt reagieren (rechts) stets co-lokalisiert.

Zellen, die während der Stimulation oder spontan Ca^{2+} -Signale (Abb. 4.40, grün) zeigten, wiesen niemals eine Überlappung mit der roten Fluoreszenz des SR 101 auf

(Abb. 4.40, links). Dagegen waren in den Zellen die 1 s nach der Stimulation reagierten stets beide Fluoreszenzsignale lokalisiert (Abb. 4.40, rechts). Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei der langsamer und stärker reagierenden Zellpopulation um Astrozyten handelt.

Neurone wurden aufgrund ihrer Fähigkeit Aktionspotentiale zu generieren elektrophysiologisch identifiziert. Dazu wurden Zellen mit den oben beschriebenen charakteristischen schnellen, kleinen Ca^{2+} -Signalen gepatcht und im Current Clamp Modus durch Injektion von Strompulsen Aktionspotentiale (APs) ausgelöst (Abb. 4.41). Begleitend zur Messung wurden die Zellen über die Patchpipette mit Biocytin gefüllt. Wegen der schwachen Fluoreszenz konnten nur oberflächliche Zellen ausgewählt werden, weshalb der Großteil der gepatchten Neurone kein Membranpotential aufwies, d.h. es handelte es sich um tote Zellen. In fünf Zellen mit einem Membranpotential zwischen -7 mV und -26 mV (Durchschnitt $-14,6$ mV) konnten zumindest schwach ausgeprägte Aktionspotentiale gemessen werden. In vier Neurone mit einem Membranpotential zwischen -48 mV und -77 mV (Durchschnitt -67 mV) waren diese deutlich ausgeprägt. Sowohl die Frequenz (60 Hz), als auch das adaptive Verhalten der einzelnen APs waren typisch für exzitatorische Pyramidenzellen. Für Neurone dieses Subtyps spricht auch, dass das zweite AP stets das kleinste war. Abbildung 4.41 zeigt einige Beispiele.

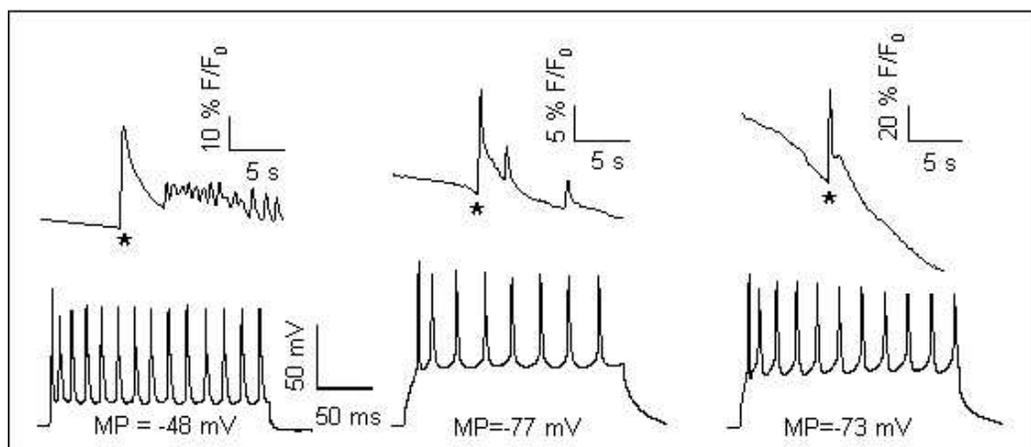


Abbildung 4.41: Beispiele der Charakterisierung dreier Neuronen. Oben ist jeweils das Ca^{2+} -Signal, unten die Aktionspotentiale im Current Clamp dargestellt. Die Zeitpunkte der elektrischen Stimulation sind durch Sterne markiert, andere Ca^{2+} -Peaks sind spontan. Dargestellt sind Spannungsänderungen nach Injektion von 40 pA.

Die Biocytin-Färbungen waren häufiger erfolgreich als die Messung der Aktionspotentiale, da auch tote Zellen den Farbstoff aufnahmen. In 18 von 28 Schnitten konnten gefärbte Zellen nachgewiesen werden. In 50 % waren nicht nur einzelne Zellen, sondern Netzwerke mit zwei bis 15 Zellen zu sehen. Abbildung 4.41 zeigt je ein Beispiel für eine einzelne Zelle und für ein Netzwerk. Von links nach rechts wurde tiefer in den Schnitt hinein fokussiert, so dass eine Staffelung in z-Richtung entsteht.

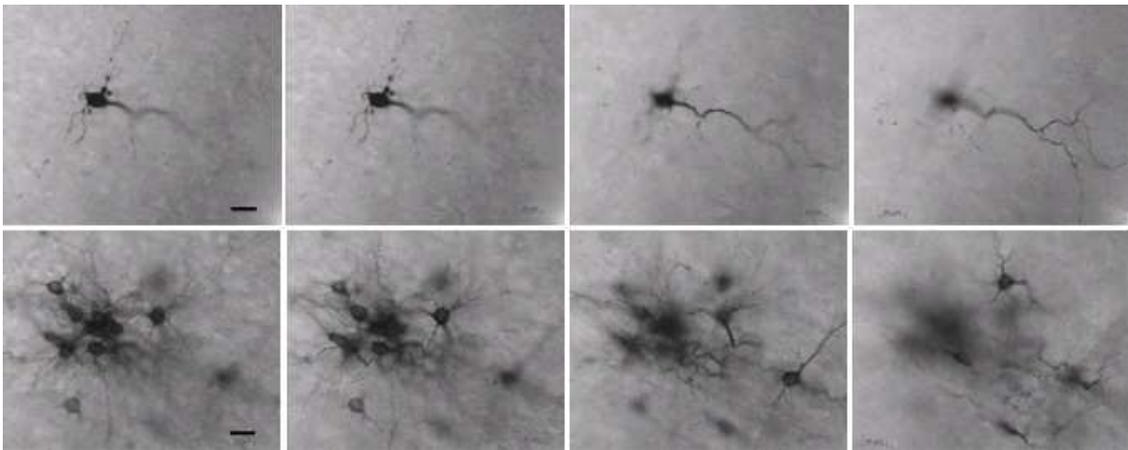
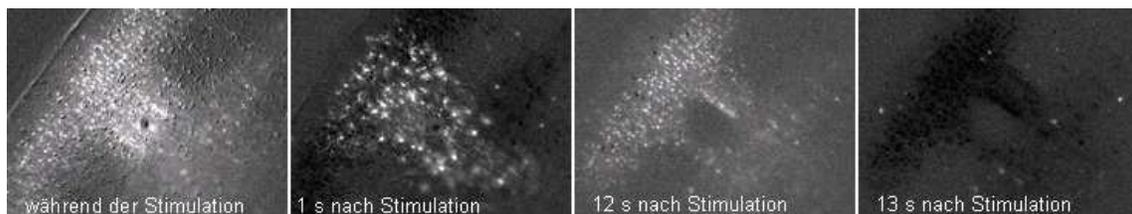


Abbildung 4.42: Beispiele für Biocytin-Injektionen in neuronale Zellen. Gepatcht wurde jeweils eine Zelle im Schnitt. Für die Aufnahmen wurde in z-Richtung in den Schnitt hineinfokussiert. Oben ist eine einzelne Zelle angefärbt, unten ein Netzwerk. Maßstab 20 μm .

Im Gegensatz zu Astrozyten sind die Somata der Neurone klarer abgegrenzt und die Dendriten dünner als astrozytären Fortsätze. Axone sind nicht zu erkennen.

4.3.2.3 Astrozyten reagieren nicht auf neuronale Spontanaktivität

Neuronale Zellen zeigten nicht nur nach elektrischer Stimulation, sondern auch spontan Ca^{2+} -Signale. Dies war vor allem in jüngeren, 8 bis 10 Tage alten Tieren zu beobachten. Die spontanen Ca^{2+} -Signale traten synchronisiert in Zellen der Schicht 2/3 auf. Im Gegensatz zum elektrisch hervorgerufenen Signal reagierten die Astrozyten auf diese spontanen neuronalen Netzwerkoszillationen nicht (Abb. 4.43).



Ergebnisse

Abbildung 4.43: Konsekutive Fluoreszenzbilder nach Stimulation im Barrel Cortex. Neurone zeigen auch spontane Signale (hier 12 s nach Stimulation), woraufhin Astrozyten jedoch kein Ca^{2+} -Signal generieren.

In Gegenwart der GABA_A -Rezeptor-Antagonisten Bicucullin oder SR53371 konnten die spontanen neuronalen Signale häufiger beobachtet werden (Abb. 4.44).

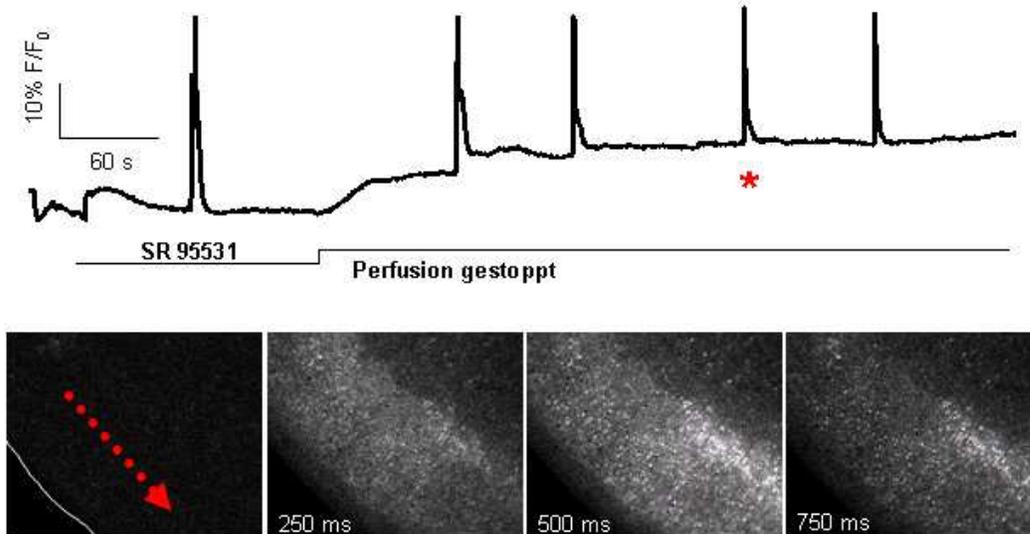


Abbildung 4.44: Spontane Ca^{2+} -Signale nach SR95331-Applikation. Oben: Durchschnittliche Fluoreszenzänderung in zehn willkürlich ausgewählten Zellen. Für 2 min wurde SR95331 eingewaschen, dann die Perfusion angehalten. Währenddessen steigt die Hintergrundfluoreszenz an. Unten: Fluoreszenzaufnahme der mit einem Stern markierten Oszillation. Im ersten Bild sind Hirnoberfläche und Ausbreitungsrichtung eingezeichnet.

Unter diesen Bedingungen waren auch Zellen aus Schicht 4 und tiefer beteiligt. In Aufnahmen mit einer Bildfrequenz von 4 Hz war zu sehen, dass sich die neuronale Aktivität wellenförmig entlang der Oberfläche ausbreitet (Abb. 4.44). Um die Ausbreitungsgeschwindigkeit zu bestimmen, wären allerdings noch höherfrequente Aufnahmen nötig.

Um zu prüfen, ob die Oszillationen von neuronaler elektrischer Aktivität abhängen, oder allein durch elektrische Kopplung entstehen, wurde mit SR95331 die neuronale Aktivität gesteigert und dann versucht, diese mit TTX zu blockieren.

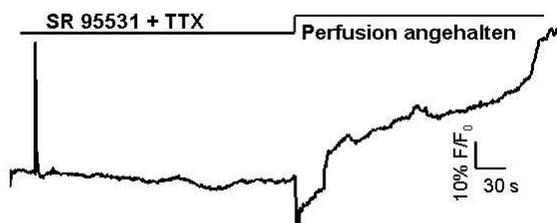


Abbildung 4.45: Durchschnittliche Fluoreszenzänderung in 10 Zellen während gleichzeitiger Applikation von SR 95331 und TTX.

Dabei kam es in Gegenwart von TTX nie zu Netzwerkoszillationen (n=13; Abb. 4.45). Der Peak in der Abbildung wurde 25 s nach TTX-Applikation gemessen, als dessen Wirkung noch nicht eingesetzt hatte (siehe auch Abb. 4.46). In manchen Fällen konnte das TTX ausgewaschen werden, so dass dann nach SR53371-Applikation wieder Oszillationen entstanden. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei den synchronen Oszillationen um sehr schnelle Ausbreitung synaptischer neuronaler Aktivität handelt.

4.3.2.4 Pharmakologie des astrozytären Signals im Barrel Cortex

Um nachzuweisen, dass das astrozytäre Signal als Folge neuronaler Aktivität zu beobachten ist, wurden zwei Paradigmen verwendet, um neuronale Transmission zu inhibieren, nämlich TTX und Ca^{2+} -freies ACSF. Nach Inkubation mit 1 μM TTX waren weder neuronale noch astrozytäre Ca^{2+} -Signale zu beobachten (Abb. 4.46 unten). Die Wirkung von TTX wurde mittels Patch Clamp überprüft. Es wurde nachgewiesen, dass die zweiminütiger Inkubation mit TTX zur Inhibition neuronaler Natriumkanäle und damit Aktionspotentialen führt (Abb. 4.46 oben).

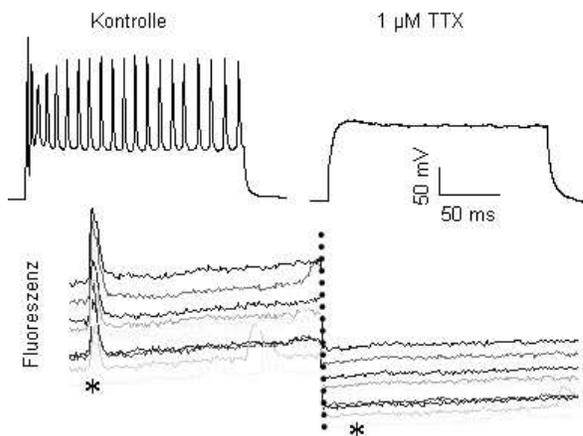


Abbildung 4.46: Oben: Current Clamp Messung eines Neurons unter Kontrollbedingungen und nach 2 min. Inkubation mit TTX. Spannungsänderung nach Injektion von 30 pA. Unten: Absolute Fluoreszenzänderungen in Astrozyten nach elektrischer Stimulation (Stern) unter Kontrollbedingungen und mit TTX.

Auch bei Anwendung des zweiten Paradigmas, die Verwendung von Ca^{2+} -freiem Puffer, was Ca^{2+} -abhängige Vesikelfreisetzung und damit synaptische Transmission unterbindet, war das neuronale und das astrozytäre Signal blockiert (n=8, Abb. 4.47).

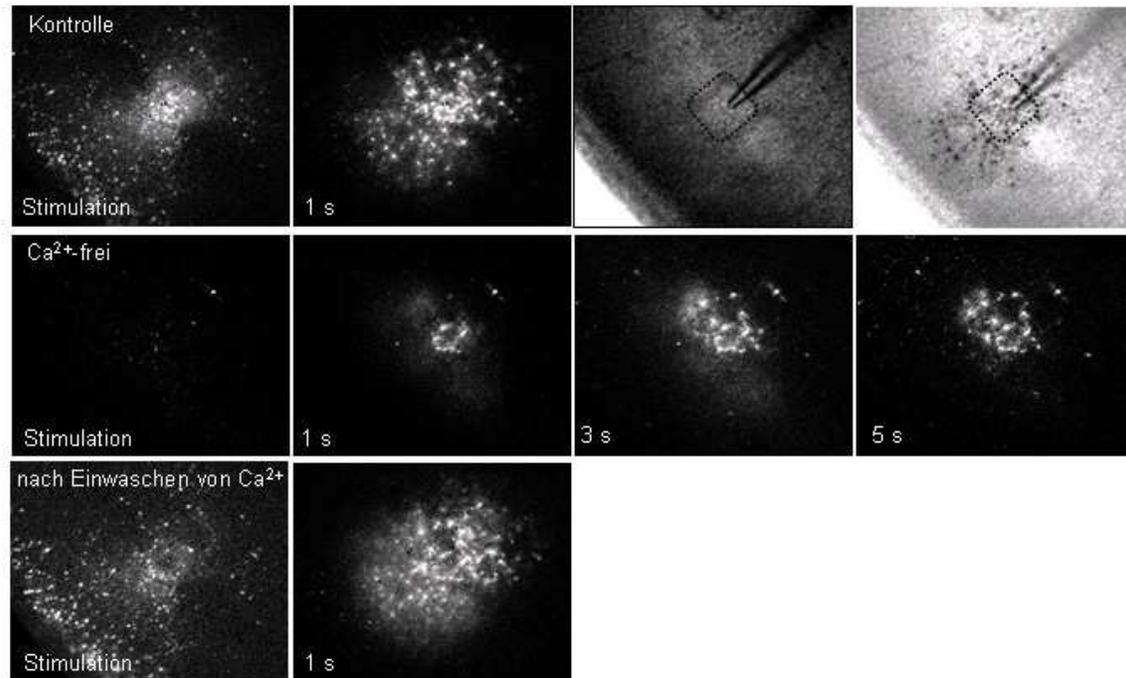


Abbildung 4.47: Oben: Reaktion unter Kontrollbedingungen mit Durchlichtbildern, die die Anordnung und die Überlappung der reagierenden Zellen mit der Barrel Column zeigen. In Ca^{2+} -freiem ACSF (mittlere Reihe) ist das schnelle, neuronal induzierten Ca^{2+} -Signal in den Astrozyten blockiert und es entsteht eine langsame Ca^{2+} -Welle. Unten: in normalen ACSF ist die Reaktion wieder hergestellt. Von allen Fluoreszenzaufnahmen wurde der Hintergrund abgezogen.

In einem Fall konnte eine langsame Ca^{2+} -Welle in den Astrozyten beobachtet werden (Abb. 4.47 Mitte), wie sie im vorangegangenen Kapitel ausführlich beschrieben ist. Da ein deutlich kürzerer Stimulus als für die Auslösung von astrozytären Ca^{2+} -Wellen verwendet wurde, war dies nicht unbedingt zu erwarten. Abbildung 4.47 zeigt eine Reaktion unter Kontrollbedingungen, mit Ca^{2+} -freiem ACSF und nach erneutem Einwaschen von normalem ACSF. Außerdem ist dargestellt, dass sich die reagierenden Astrozyten größtenteils in der stimulierten Barrel Column befinden. Diese Experimente zeigen, dass durch die elektrische Stimulation Neuronen erregt werden, die darauf hin einen Botenstoff ausschütten, der in den Astrozyten zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt. Weitere Versuche mit Blockern von Neurotransmitterrezeptoren auf Astrozyten sollten diesen Transmitter identifizieren.

Inkubation für fünf Minuten mit einer Mischung von Glutamat-Rezeptor-Antagonisten gegen metabotrope (S-MCPG 500 μM), ionotrope AMPA/Kainat- (CNQX 50 μM) und NMDA-Rezeptoren (MK801 40 μM) reduzierte das astrozytäre Signal deutlich (n=5).

Abbildung 4.48 zeigt eine Reaktion jeweils 1 s nach der Stimulation, da hier das astrozytäre Signal maximal ausgeprägt war.

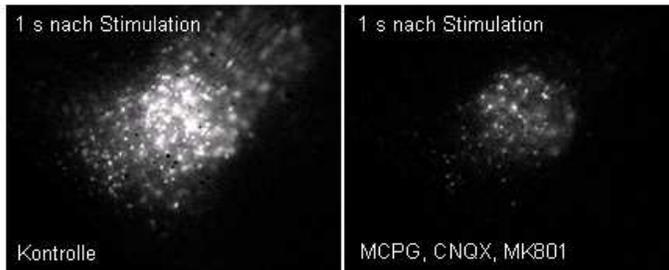


Abbildung 4.48: Astrozytäre Reaktion 1 s nach Stimulation unter Kontrollbedingungen (links) und nach 5 min Inkubation mit MCPG, CNQX und MK801 (rechts). Der Hintergrund wurde jeweils abgezogen.

Auch mit den spezifischeren Antagonisten LY367385 und MPEP gegen metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe I konnte eine Reduktion beobachtet werden (n=8). Auffällig war hier, dass nicht nur die Zahl der reagierenden Astrozyten verringert war, sondern sich die Reaktion verlangsamt entwickelte. Abbildung 4.49 zeigt, dass 2 s nach Stimulation noch deutlich mehr Astrozyten als in der Kontrollstimulation reagierten. Die Gesamtzahl der reagierenden Zellen (in der Abbildung rechts) war trotzdem verringert, wenn auch nicht ganz so deutlich wie durch die oben beschriebene Mischung der verschiedenen Glutamatrezeptor-Blocker.

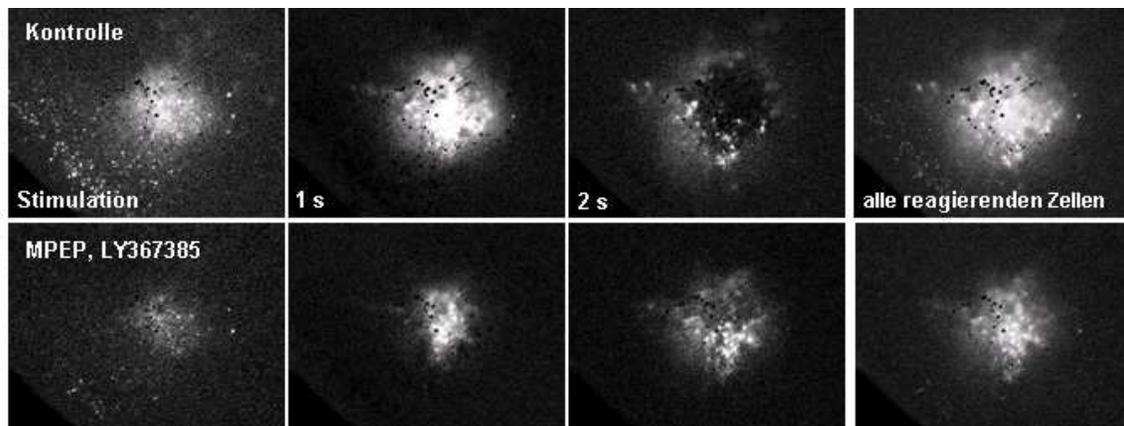


Abbildung 4.49: Astrozytäre Reaktion nach Stimulation unter Kontrollbedingungen (oben) und nach 5 min Inkubation mit MPEP und LY367385 (unten). Die Zeitpunkte der Reaktion sind angegeben. Die Bilder ganz rechts zeigen die gesamte Reaktion. Der Hintergrund wurde jeweils abgezogen.

Auch die Beteiligung des inhibitorischen Transmitters GABA an der Signalentstehung wurde untersucht. Dazu wurden die Schnitte vor der Stimulation entweder mit Bicucullin oder SR95531 inkubiert, beides GABA_A-R-Antagonisten, wobei letzteres spezifischer ist und weniger Nebenwirkungen hat.

Schon die neuronale Reaktion während der Stimulation war deutlich stärker als unter Kontrollbedingungen (Abb. 4.50 links unten). Die anschließende Reaktion der Astrozyten war nicht mehr auf eine Barrel Column beschränkt, sondern breitete sich über den gesamten Beobachtungsbereich aus (Abb. 4.50 rechts unten).

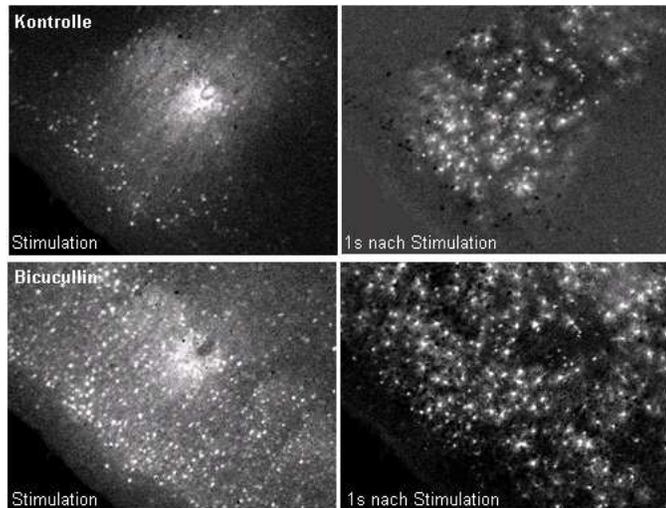


Abbildung 4.50: Neuronale und astrozytäre Reaktion nach Stimulation unter Kontrollbedingungen (oben) und nach 3 min Inkubation mit Bicucullin (unten). Der Hintergrund wurde jeweils abgezogen.

Da bekannt ist, dass Astrozyten Ca^{2+} -abhängig ATP freisetzen können, das zu Adenosin degradiert werden kann, wurden auch Blocker gegen A_1 - (8-Cyclopentyltheophylline, CPT) und P_2 - (Suramin) Rezeptoren eingesetzt. In Anwesenheit von Suramin zeigte sich ein ähnliches Bild wie mit Bicucullin, nämlich dass die Reaktion der Astrozyten nicht mehr auf ein Barrel beschränkt war, sondern sich darüber hinaus ausbreitete (Abb. 4.51). In

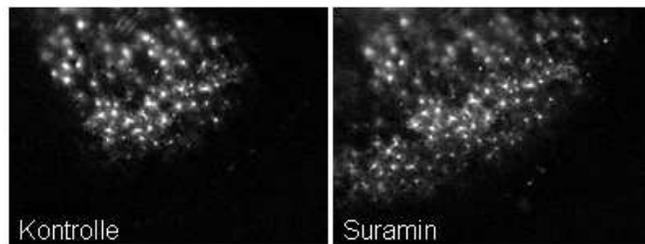


Abbildung 4.51: Astrozytäre Reaktion 1 s nach Stimulation unter Kontrollbedingungen (links) und nach 5 min Inkubation mit Suramin (rechts). Der Hintergrund wurde jeweils abgezogen.

Anwesenheit von CPT war dieser Effekt nicht ganz so ausgeprägt, allerdings war auch hier die Fläche mit reagierenden Astrozyten größer als bei der Kontrollstimulation. Eine Quantifizierung von sechs Versuchen ergab eine signifikante Vergrößerung der Fläche um 42 % im Vergleich zur Kontrollstimulation (Abb. 4.52, $p=0,022$ t-test).

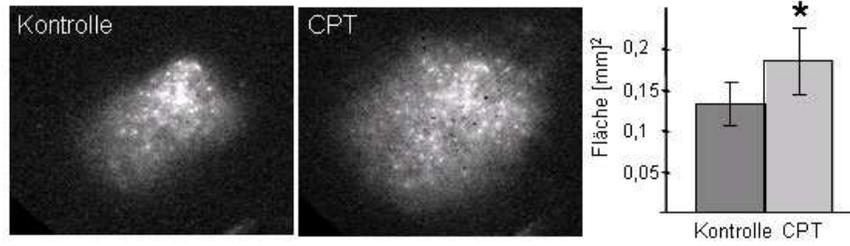


Abbildung 4.52: Astrozytäre Reaktion 1s nach Stim. Kontrolle (links) und nach 10 min Inkubation mit CPT (rechts). Der Hintergrund wurde jeweils abgezogen. Rechts: Quantifizierung der Reaktionsfläche, n=6