

5 Diskussion

5.1 Kopplung von Astrozyten

5.1.1 Astrozyten im Cortex bilden große Netzwerke

Ca²⁺-Signale können sich unter Astrozyten wellenförmig ausbreiten und ermöglichen so die Kommunikation dieser Zellen. Die Ausbreitung kann sowohl extrazellulär über Freisetzung von ATP und Aktivierung purinerger Rezeptoren auf benachbarten Zellen vermittelt werden, als auch durch Diffusion von Second Messenger-Molekülen durch Gap Junctions. Um die Mechanismen der Ausbreitung von Ca²⁺-Wellen im Cortex zu studieren, sollten zunächst die Eigenschaften der Astrozyten in Bezug auf ihre Kopplung untereinander untersucht werden, da dies die Voraussetzung für eine Signalweitergabe über Gap Junctions darstellt. Dies erfolgte durch Injektion von Biocytin in eine einzelne Zelle. Biocytin kann aufgrund seines geringen Molekulargewichts leicht durch Cx-Kanäle diffundieren. Je nach Expression der astrozytären Gap Junction-bildenden Proteine Cx30 und Cx43 und Bildung von funktionellen Kanäle zwischen den Zellen lässt sich das Biocytin dann in gekoppelten Zellen nachweisen. Im Cortex konnten astrozytäre Netzwerke mit bis zu 600 µm Durchmesser beobachtet werden. Die Zahl von mit dieser Methode nachweisbaren maximal 180 gekoppelten Zellen in einem Schnitt liegt im Bereich bereits publizierter astrozytärer Netzwerke im Hippokampus (Wallraff et al., 2004). Man erkennt generell, dass am Rand der Netzwerke die Färbung schwächer wird, da hier nicht mehr genug Substrat zur Anfärbung in die Zellen gelangt ist. Das tatsächliche Ausmaß der Kopplung ist daher wahrscheinlich größer als optisch darzustellen. Im Corpus callosum, einer Struktur der weißen Substanz, waren Astrozyten dagegen maximal mit einer anderen Zelle gekoppelt. Dabei kann es sich auch um Oligodendrozyten gehandelt haben, da bekannt ist, dass astrozytäres Cx43 mit dem in Oligodendrozyten exprimierten Cx47 heterotypische Gap Junctions bildet (Altevogt and Paul, 2004). Untersuchungen mit Antikörpern gegen die Proteine und Versuche mit Reporter genen für Cx43 und Cx30 zeigen, dass Cx43 ubiquitär im Hirn exprimiert

wird, auch im Corpus callosum. Dagegen ist die Expression von Cx30 zum einen auf den Cortex und thalamische Strukturen begrenzt und zum anderen bei der Maus erst ab einem Alter von 15 Tagen nachzuweisen (Nagy et al., 1999; Theis et al., 2003) persönl. Mitteilung Goran Söhl). Im Alter der hier untersuchten Tiere spielt die Cx30-Expression für die Kopplung somit keine Rolle, da die verwendeten Tiere alle jünger als 14 Tage waren. Die Expression von Cx43 im Corpus callosum muss also nicht unbedingt eine Kopplung von Astrozyten wie im Cortex bedingen. In so genannten komplexen Astrozyten (GluR-Zellen) des Hippokampus, welche ebenfalls keine Kopplung aufweisen, konnte keine Expression von Cx43 nachgewiesen werden (Wallraff et al., 2004). Diese Ergebnisse unterstreichen die Heterogenität verschiedener Populationen von Astrozyten im Hinblick auf ihre Kopplung untereinander und damit auch in ihrer Voraussetzung, Ca^{2+} -Signale zu propagieren. Das Fehlen von Farbstofftransfer in den Cx43fl/fl:GFAP-cre/Cx30ko-Mäusen zeigt, dass die cre-Rekombinase das gefloxtete Cx43-Gen in den Astrozyten erfolgreich deletiert hat, der Knockout in den Astrozyten also funktionell ist. Eine Studie in adulten Cx43fl/fl:GFAP-cre-Tieren, die jedoch Cx30 exprimierten, zeigte lediglich eine Reduktion der Kopplung um etwa 50 %, was aber bei Mäusen diesen Alters auf die Expression von Cx30 zurückzuführen ist (Theis et al., 2003).

5.1.2 Elektrophysiologische Eigenschaften der Astrozyten und Ausmaß der Kopplung ändern sich in der Nähe von A β -Plaques

Um zu untersuchen, ob sich typische Eigenschaften von Astrozyten wie das Ausmaß der Kopplung, das Stromprofil und die Expression von Glutamatrezeptoren (GluR), bzw. -transportern (GluT) in pathologischen Situationen ändern, wurden GFAP-EGFP-Tiere mit PDAPP-Mäusen, einem Tiermodell für die Alzheimer-Krankheit verkreuzt. Der Vorteil der erhaltenen Tiere war, dass man die Astrozyten in Hirnschnitten adulter Tiere aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz leicht erkennen und über die Patchpipette mit Biocytin füllen konnte. Anschließend erfolgte eine Anfärbung der A β -Plaques, so dass eine Analyse der erhaltenen Kopplungs- und elektrophysiologischen Daten in Relation zur Nähe eines Plaques möglich war.

Bezüglich der Veränderung des Kopplungsausmaßes in den PDAPP/GFAP-EGFP-Mäusen lässt sich feststellen, dass die astrozytären Netzwerke im Cortex 15 bis 25 Monate alter Mäuse in der Nähe eines Plaques kleiner waren als in Kontrolltieren des gleichen Alters. Im Hippokampus war dies weniger stark ausgeprägt als im Cortex. Hirnschnitte, wie sie in diesen Versuchen verwendet wurden, sind allerdings aufgrund ihrer Zweidimensionalität nur begrenzt zur Quantifizierung von dreidimensionalen Anordnungen wie den astrozytären Netzwerken geeignet.

Eindeutiger waren die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen von Stromprofil und GluR-, bzw. GluT-Expression. So zeigten fast 50 % der gekoppelten Astrozyten in den PDAPP-positiven Tieren sowohl eine Reaktion auf Applikation von GluR als auch GluT Agonisten. In PDAPP-negativen Kontrolltiere wurde dies nie beobachtet. Dies steht im Gegensatz zu einer Studie im Hippokampus von maximal 33 Wochen alten GFAP-EGFP-Mäusen, in der gekoppelte Astrozyten mit einem komplexen Stromprofil lediglich GluT exprimieren, jedoch keine GluR. Umgekehrt exprimieren nicht gekoppelte Astrozyten mit einem passiven Stromprofil im Hippokampus nur GluR, was auf einen funktionellen Unterschied zwischen diesen beiden Populationen hinweist (Wallraff et al., 2004). Ebenfalls erhöht war die Anzahl der komplexen Astrozyten im Hippokampus PDAPP-positiver Mäuse gegenüber den PDAPP-negativen Tieren. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die chronische Exposition gegenüber einer Alzheimer-ähnlichen Pathologie zu Veränderungen in Kopplung und Membraneigenschaften bei Astrozyten führt. Etwas ähnliches ist für den Hippokampus von PDAPP-Tieren gezeigt, in dem TNF α -evozierte Glutamatfreisetzung aus Astrozyten reduziert ist (Rossi 2005). Auch in anderen Modellen für pathologische Ereignisse wurden Veränderungen der Eigenschaften von Astrozyten gefunden. Nach Verschluss der mittleren cerebralen Arterie (MCAO), einem Modell für ischämische Schädigungen, wie sie bei einem Schlaganfall auftreten, war der Anteil komplexer Zellen im Striatum im Vergleich zur Kontrolle erhöht und die Zellen zeigten eine zuvor nicht detektierte Kopplung (Liping Wang, Giselle Cheung, unpubliziert). Der Einfluss der Kopplung von Astrozyten auf die Ausbreitung pathologischer Schädigungen ist nicht abschließend geklärt.

Generell wird kontrovers diskutiert, ob Kopplung durch Abpufferung hoher K^+ -Konzentrationen neuroprotektiv wirkt oder durch Verbreitung schädlicher Substanzen im Netzwerk zum Tod von neuronalen Zellen beiträgt. So ist bei Cx43-defizienten Tieren das Infarktvolume und auch die Entzündungsreaktion nach MCAO größer als in Kontrolltieren (Siushansian et al., 2001; Nakase et al., 2003). Hingegen führte die Anwendung von Gap Junction-Blockern nach einer Ischämie zu einem reduzierten Zelltod (Perez Velazquez et al., 2006).

5.2 Calciumwellen in der grauen Substanz

5.2.1 Astrozytäre Ca^{2+} -Wellen können sich im Cortex ausbreiten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass astrozytäre Ca^{2+} -Wellen in der grauen Substanz, genauer im motorischen Cortex, in Ca^{2+} -freiem oder TTX-haltigem ACSF auslösbar sind. Durch Patch Clamp-Messungen an Neuronen konnte demonstriert werden, dass diese beide Paradigmen erfolgreich neuronale Aktivität unterdrücken. Blockiert man neuronale Erregung nicht, zeigt sich ein anderes Phänomen, das auf Kommunikation zwischen Neuronen und Astrozyten zurückzuführen ist und in einem späteren Kapitel genauer diskutiert wird. Die Geschwindigkeit der ausgelösten astrozytären Ca^{2+} -Welle wurde zu 12 bis 14 $\mu\text{m/s}$ bestimmt und lag damit im Bereich bereits publizierter Werte für den Corpus callosum (Schipke et al., 2002) oder für kultivierte Astrozyten (Giaume and Venance, 1998). Eine pathophysiologische Bedeutung gewinnt die hier beobachtete Welle durch eine Studie, in der Ca^{2+} -Wellen im Zusammenhang mit kortikaler Spreading Depression beobachtet wurden. Im Gegensatz zu anderen Publikationen (Kunkler and Kraig, 1998; Basarsky et al., 1998) wurde dort gezeigt, dass sich synchron mit der Front der neuronalen Depolarisationswelle eine astrozytäre Ca^{2+} -Welle mit einer Geschwindigkeit von etwa 40 $\mu\text{m/s}$ ausbreitet. Hinter der Zone der eigentlichen Depolarisation verlangsamte sich die astrozytäre Ca^{2+} -Welle dann auf 15 $\mu\text{m/s}$ (Peters et al., 2003). Dies scheint somit ein allgemein gültiger Wert für die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Ca^{2+} -Wellen unter Astrozyten zu sein.

5.2.2 Propagation von astrozytären Ca^{2+} -Wellen hängt im Cortex von funktionellen Gap Junctions ab

Für die Ausbreitung von Ca^{2+} -Wellen sind, wie bereits erwähnt, zwei Mechanismen beschrieben: zum einen die Freisetzung von ATP in Kombination mit purinerger Signalling (Guthrie et al., 1999), zum anderen die Diffusion von Second Messenger-Molekülen, wahrscheinlich IP_3 , durch Gap Junctions (Giaume and Venance, 1998). Im Corpus callosum akuter Schnitte beruht die Ausbreitung auf ATP-Freisetzung (Schipke et al., 2002). Für den Cortex wurde dagegen in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Ausbreitung durch Suramin, einem Antagonisten purinerner Rezeptoren, nicht beeinträchtigt wird. Dagegen konnte in Gegenwart von Carbenoxolon, einem Blocker von Gap Junctions oder in transgenen Mäusen ohne Cx43-Expression in Astrozyten keine Welle im Cortex ausgelöst werden. In jungen Mäusen ist Cx43 das dominierende Gap Junction Protein, erst später, ab postnatalem Tag 15 (p15) wird auch Cx30 exprimiert (Nagy et al., 1999; Kunzelmann et al., 1999). Da hier 10 bis 14 Tage alte Tiere verwendet wurden, konnte deshalb zwischen einfach transgenen Tieren mit Cx43-Deletion und doppelt-transgenen Tieren mit zusätzlichem Cx30-Knockout kein Unterschied festgestellt werden. Eine generelle Unfähigkeit der Cx-defizienten Mäuse, Ca^{2+} -Wellen zu propagieren, kann ausgeschlossen werden, da im Corpus callosum normale Wellen ausgelöst werden konnten.

In kultivierten Astrozyten wurde gezeigt, dass die Deletion von astrozytären Connexinen zu einer Änderung des Propagationsmechanismus führt. Ca^{2+} -Wellen propagierten in Cx-Knockout Astrozyten im Vergleich zu wildtyp Astrozyten anstelle durch Gap Junctions über ATP-Freisetzung (Scemes et al., 2000). Ein derartiger Wechsel auf einen anderen Ausbreitungsmechanismus konnte hier nicht beobachtet werden. Anscheinend ist eine Kompensation für den Verlust der Kommunikation zwischen den Astrozyten in den CX-defizienten Tieren nicht erfolgt. Nicht auszuschließen ist allerdings eine Veränderung in Subtypen von purinergen Rezeptoren. Auch wenn es dadurch zu einer erhöhten Sensitivität der Astrozyten

gegenüber purinergen Agonisten in Cx43-defizienten Mäusen käme, scheint dies nicht ausreichend zu sein, um Ca^{2+} -Wellenpropagation über ATP-Freisetzung im akuten Schnitt zu ermöglichen.

Der Mechanismus der Gap Junction-Kommunikation bei der Propagation astrozytärer Ca^{2+} -Wellen ist in der grauen Substanz kein generell gültiger Mechanismus. Für hippocampale Astrozyten ist ein ähnliches Ausmaß der Kopplung beschrieben wie für den Cortex (Theis et al., 2003; Wallraff et al., 2004) jedoch wurde schon in Vorarbeiten festgestellt, dass die Propagation im Hippokampus eher durch Suramin, als durch Carbenoxolon beeinträchtigt ist. Zusätzlich wurde in der vorliegender Arbeit gezeigt, dass sich auch in Hippokampi Cx43-defizienter Tiere die Welle ähnlich wie in Kontrolltieren ausbreitete, was somit eher auf den Mechanismus der ATP-Freisetzung schließen lässt. Das Ausmaß der Kopplung bedingt also nicht notwendigerweise den Mechanismus der Propagation. Allerdings sind im Hippokampus zwei Populationen von Astrozyten beschrieben, gekoppelte und ungekoppelte (Wallraff et al., 2004). Denkbar ist deshalb, dass mit einer Ausbreitung über Gap Junctions ein großer Teil der Astrozyten im Hippokampus nicht an der Welle teilnehmen könnten. ATP-Freisetzung dagegen involviert alle Astrozyten mit purinergen Rezeptoren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich der Mechanismus der Kommunikation von Astrozyten in verschiedenen Hirnregionen unterscheidet. Dies ist ein weiterer Beitrag zum neu entstehenden Bild von Astrozyten als funktionell heterogene Zellpopulation, das bereits durch die Beschreibung der Heterogenität der Expression von Rezeptoren und Transportern begonnen hat sich abzuzeichnen (Israel et al., 2003; Matthias et al., 2003).

5.2.3 Sniffer Zellen detektieren ATP-Freisetzung

In kultivierten Astrozyten wurde mittels des Luciferin-Luciferase Biolumineszenz-Assays simultane ATP-Freisetzung während einer Ca^{2+} -Welle gemessen (Wang et al., 2000). Mit der gleichen Methode wurde auch in isolierter Retina ATP-Ausschüttung gemessen, die der Ausbreitungsfront der Ca^{2+} -Welle voran schritt und

die Ca^{2+} -Signale in den Müller Zellen vermittelte (Newman, 2001). In frisch isolierten Hirnschnitten konnte diese Technik nicht angewendet werden, da es durch konstante ATP-Freisetzung aus beschädigten Zellen zu hoher Hintergrundaktivität kommt. Deshalb wurde mit dem Einsatz von GI261 Zellen eine neue Methode zum Nachweis von ATP-Freisetzung in Schnitten entwickelt. Die Glioma-Zelllinie GI261 exprimiert hochsensitive purinerge Rezeptoren, die schon auf nanomolare Konzentrationen von ATP reagierten und die damit als „Sniffer“ Zellen für die Detektion geringer Mengen an ATP prädestiniert sind. Diese Zellen wurden während der Färbung mit dem Ca^{2+} -Farbstoff auf den Schnitt aufgebracht, wo sie sich anhafteten. Nach Auslösen von astrozytären Ca^{2+} -Wellen konnten parallel zur Ausbreitung im Schnitt auch Ca^{2+} -Signale in den GI261 Zellen beobachtet werden. Da dieses Signal mit dem purinergen Rezeptorantagonisten Reactive Blue2 blockiert und durch ATP-Applikation nachgeahmt werden konnte, ist es auf ATP, das aus dem Schnitt freigesetzt wurde, zurückzuführen.

Die Sniffer Zellen selbst können als Quelle für das ATP ausgeschlossen werden, da das Signal nicht von der Zelldichte auf der Schnittoberfläche abhing. Auch wenn nur sehr wenige GI261-Zellen auf dem Schnitt hafteten, konnten nach Auslösen von astrozytären Ca^{2+} -Wellen Antworten in den Sniffer Zellen beobachtet werden. Zwar kann Connexin43 in Kardiomyozyten innerhalb von 30 Minuten funktionelle Gap Junctions bilden (Haraguchi et al., 2006), aber eine Entstehung von Gap Junctions zwischen Sniffer Zellen und den Astrozyten im Schnitt ist sehr unwahrscheinlich, da sich die Sniffer Zellen während des Experiments bis zu 10 μm bewegen konnten.

Eine punktförmige ATP-Quelle, wie sie z.B. durch Verletzung des Gewebes durch die Stimulation entstehen kann, wäre nicht ausreichend für eine Aktivierung von Zellen über eine Entfernung von bis zu 300 μm . Basierend auf Diffusionsmodellen lässt sich eine derart begründete Ausbreitung auf etwa 110 \pm 30 μm kalkulieren (Crank, 1975). Tatsächlich wurde häufig ein Stimulusartefakt beobachtet, der zur Aktivierung von Zellen im Radius von etwa 100 μm , aber nicht zur Ausbreitung einer darüber hinaus gehenden Ca^{2+} -Welle in Astrozyten und Sniffer Zellen führt. Dies wird auch in den Diagrammen deutlich, in denen die Anzahl reagierender Zellen abhängig vom

Abstand zur Stimulationspipette dargestellt ist. Sowohl nach pharmakologischer Manipulation als auch in Cx-defizienten Tieren blieb die Zahl der reagierenden Zellen im Umkreis bis 100 μm nahezu unverändert im Vergleich zur Kontrolle.

5.2.4 ATP- und astrozytäre Ca^{2+} -Welle sind unabhängig von einander

Sowohl die ATP-Welle in den Sniffer Zellen als auch die astrozytäre Ca^{2+} -Welle konnten durch elektrische Stimulation ausgelöst und parallel beobachtet werden. Abbildung 5.1 beschreibt den vorliegenden Mechanismus der Ausbreitung. Im Neocortex der Cx-defizienten Mäuse, in denen keine Ca^{2+} -Welle zwischen den Astrozyten propagierte, konnte trotzdem eine wellenartige Ausbreitung von Ca^{2+} -Signalen in den GI261-Zellen beobachtet werden. Die ATP-Freisetzung ist also zum einen unabhängig von Ca^{2+} -Erhöhungen in Astrozyten, zum anderen werden dadurch auch keine Ca^{2+} -Signale in den Astrozyten ausgelöst.

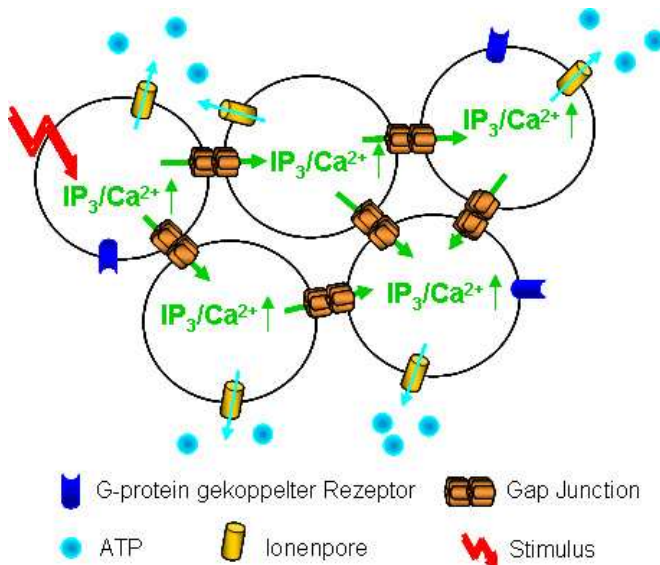


Abbildung 5.1: Mechanismus der Ausbreitung von Ca^{2+} -Wellen im Cortex. Die Voraussetzung für die Propagation zwischen den Astrozyten sind Cx-Kanäle. Parallel dazu, aber unabhängig von Ca^{2+} -Erhöhungen wird ATP freigesetzt, das nicht zu weiteren Ca^{2+} -Signalen in Astrozyten führt. Hemikanäle können für die Freisetzung ausgeschlossen werden.

Freisetzung von ATP unabhängig von Ca^{2+} -Erhöhungen und damit auch unabhängig von der Ausbreitung von Ca^{2+} -Wellen wurde auch in kultivierten Astrozyten beobachtet (Wang et al., 2000). ATP-Ausschüttung kann auch durch ATP selbst vermittelt werden (Anderson et al., 2004). Wahrscheinlich sind die mit den hochsensitiven Sniffer Zellen detektierten Mengen zu gering um ein Ca^{2+} -Signale in den Astrozyten auszulösen. Während Ca^{2+} -Wellenpropagation in der Retina werden

Konzentrationen zwischen 3 und 78 μM gemessen (Newman, 2001), während die Sniffer Zellen schon auf nanomolare Konzentrationen reagierten.

Über die Mechanismen der Freisetzung von ATP konkurrieren mehrere Theorien. Freisetzung über den P2X7-Rezeptor, der eine ausreichend große Pore bildet (Suadicani et al., 2006), über Anionenkanäle (Mongin and Kimelberg, 2002) oder über Vesikelfusion (Maienschein et al., 1999; Bal-Price et al., 2002) sind mögliche Wege. Die Freisetzung von ATP durch Diffusion durch Hemikanäle (Stout et al., 2002) kann in dieser Arbeit aus zwei Gründen ausgeschlossen werden, zum einen, da Cx-defiziente Mäuse keine Hemikanäle in Astrozyten ausbilden können. Zum anderen werden Hemikanäle zwar durch Verwendung von Puffer ohne divalente Kationen geöffnet, so dass es zur Freisetzung von Botenstoffen kommen kann (Ye et al., 2003). Da hier ATP-Freisetzung in Ca^{2+} -freier Lösung beobachtet wurde, könnte es zumindest in den nicht transgenen Tieren zu ATP-Freisetzung durch Hemikanäle kommen. Allerdings würde dieser Mechanismus nicht die ATP-Freisetzung in Gegenwart von TTX anstelle von Ca^{2+} -freiem ACSF erklären. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Neocortex ATP-Wellen unabhängig von astrozytären Ca^{2+} -Wellen auftreten können und dass die ATP-Freisetzung nicht durch Hemikanäle erfolgt.

Auch Glutamat-Konzentrationen können im Extrazellulärraum während astrozytärer Ca^{2+} -Wellen ansteigen (Innocenti et al., 2000). Glutamat kann aber als Substanz, die in den Sniffer Zellen zu Ca^{2+} -Signalen führt, aus mehreren Gründen ausgeschlossen werden. Zum einen ist der Mechanismus der Glutamat-Freisetzung im Gegensatz zur Freisetzung von ATP abhängig von intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhungen (Wang et al., 2000), hier dagegen wurden Signale in den Sniffer Zellen beobachtet, ohne dass es zuvor in den Astrozyten zu Ca^{2+} -Erhöhungen kam. Außerdem war das Signal in den Sniffer Zellen nicht durch MCPG, einen mGluR-Antagonisten beeinträchtigt und kultivierte GI261-Zellen reagierten zudem nicht auf Applikation von Glutamat. Da sie auch nicht auf Applikation von Adenosin, das durch Degradation von ATP entstehen kann, reagierten, kann auch dieses ausgeschlossen werden.

Die Fähigkeit von Astrozyten in der grauen Substanz Informationen über zwei verschiedene Wege, nämlich über die astrozytäre Ca^{2+} -Welle und davon unabhängig über ATP-Freisetzung zu verbreiten, unterstützt ihre Rolle als Elemente der zellulären Kommunikation und als Quelle für neuromodulatorische Substanzen. Dies ist nicht nur entscheidend für die Informationsweiterleitung unter Astrozyten, sondern auch andere Prozesse können dadurch beeinflusst werden. Beispielsweise vermitteln Astrozyten auch die Kommunikation von neuronaler Aktivität zu Blutgefäßen. So kann erhöhte neuronale Aktivität über Aktivierung von Astrozyten eine erhöhte Aufnahme von Metaboliten aus dem Blut bedingen (Zonta et al., 2003a; Simard et al., 2003; Kasischke et al., 2004). Die besondere Bedeutung von astrozytärem ATP wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

5.2.5 ATP als neuromodulatorische Substanz

Neben Glutamat und D-Serin ist, wie erwähnt, ATP ein wichtiger Transmitter, der von Astrozyten freigesetzt wird und neuronale Aktivität moduliert, wie in verschiedenen Studien gezeigt worden ist. So führt elektrische Stimulation im Hippokampus zu Ca^{2+} -Erhöhungen in Astrozyten und Bahnung von GABAergen IPSCs auf Interneuronen. Beide Phänomene lassen sich durch P_2Y_1 -Antagonisten blockieren, was darauf hinweist, dass von Astrozyten freigesetztes ATP zur Steigerung von synaptischer Inhibierung führen kann (Bowser and Khakh, 2004). Weiterhin konnte in einer Arbeit gezeigt werden, dass zu Adenosin degradiertes astrozytäres ATP sowohl homo- als auch heterosynaptische Depression auslösen kann. ATP kann nach Glutamat- (Zhang et al., 2003) oder GABA_B -Rezeptor-vermitteltem Ca^{2+} -Anstieg in den Astrozyten (Serrano et al., 2006) von diesen ausgeschüttet werden. Dieser Freisetzungsmechanismus wird durch eine Studie mit einem Mausmodell unterstützt, in dem durch Expression einer dominant-negativen SNARE-Domäne Transmitterfreisetzung selektiv in Astrozyten blockiert werden kann. Auch hier ruft das zu Adenosin degradierte ATP eine tonische Unterdrückung synaptischer Übertragung hervor. Damit wird der dynamische Bereich für LTP und heterosynaptische Depression vergrößert (Pascual et al., 2005). Eine ähnliche

Funktion von ATP/Adenosin konnte auch in der Retina, in der auch Ca^{2+} -Wellen intensiv charakterisiert wurden, nachgewiesen werden. Hier wird ebenfalls eine Reduktion der Spontanaktivität von retinalen Ganglionzellen beobachtet. Das ATP stammt allerdings nicht aus Astrozyten, sondern aus Müller Zellen (Newman, 2003). All dies weist daraufhin, dass ATP-Freisetzung aus Astrozyten auch im Cortex immens wichtig für die Modulation synaptischer Transmission ist.

5.2.6 Unter ungekoppelten Astrozyten kommt es leichter zur Auslösung von Spreading Depression und damit assoziierten astrozytären Ca^{2+} -Wellen

Unter kortikaler Spreading Depression (CSD) versteht man langsame, weit reichende Wellen neuronaler Depolarisation, die von Ca^{2+} -Signalen in Astrozyten begleitet werden (Basarsky et al., 1998). Eine Studie beschreibt, dass sich die Ca^{2+} -Aktivität in den Astrozyten weiter ausbreitet als die neuronale Depression. Hinter der Zone der eigentlichen Depression verlangsamt sich die astrozytäre Ca^{2+} -Welle von ca. 40 $\mu\text{m/s}$, der Ausbreitungsgeschwindigkeit der CSD, auf 15 $\mu\text{m/s}$ (Peters et al., 2003), was die Geschwindigkeit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen kortikalen astrozytäre Ca^{2+} -Wellen ist. Mehrere Studien zeigen einen Einfluss von Gap Junctions auf Spreading Depression. Applikation von unspezifischen Gap Junction-Blockern in der Retina hemmt die Ausbreitung von SD (Nedergaard et al., 1995). Dagegen kann im Cortex mit dem spezifischeren Blocker Carbenoxolon lediglich eine Verlangsamung der peripheren Ca^{2+} -Welle in den Astrozyten beobachtet werden, jedoch kein Einfluss auf die eigentliche SD (Peters et al., 2003). Im Kontrast dazu steht eine Studie im Hippokampus von Cx43-defizienten Tieren, die eine Beschleunigung der SD zeigt. Ca^{2+} -Signale in Astrozyten wurden in jener Arbeit allerdings nicht gemessen, deshalb lässt sich keine Aussage über eine Beeinflussung der Ca^{2+} -Aktivität während SD in ungekoppelten Astrozyten treffen (Theis et al., 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nun im gleichen Tiermodell mit Cx-defizienten Tieren im Cortex festgestellt werden, dass die Schwelle zur Auslösung der CSD erniedrigt war, so dass sogar häufig unabhängig vom Stimulus spontane CSDs auftraten. Eine Beschleunigung der Ausbreitung, wie für den

Hippokampus beschrieben (Theis et al., 2003), konnte allerdings nicht beobachtet werden. Auch traten Ca^{2+} -Wellen in den Astrozyten häufig spontan und unabhängig von detektierbaren Änderungen der neuronalen Depolarisation auf, was im Gegensatz zu Experimenten mit Carbenoxolon in nicht transgenen Tieren steht, wo eine starke Reduktion der Ca^{2+} -Wellen gefunden wurde (Peters et al., 2003). In den letzten Jahren wurde allerdings deutlich, dass Gap Junction-blockierende Substanzen Nebeneffekte wie die Inhibierung von P_2X_7 -Rezeptoren haben (Suadicani et al., 2006), was der Grund für unterschiedliche Ergebnisse von Experimenten mit pharmakologischen Substanzen und transgenen Tiermodellen sein könnte.

Eine mögliche Erklärung für die leichtere Auslösbarkeit von CSD im Cortex von Cx43-defizienten Tieren wäre die fehlende K^+ -Pufferkapazität der hier ungekoppelten Astrozyten. Während CSD können extrazelluläre K^+ -Konzentrationen vom Ruhewert (3 bis 6 mM) auf bis zu 60 mM ansteigen (Nedergaard and Hansen, 1993). Die so genannte räumlichen Pufferung (spatial buffering) von K^+ -Ionen im weit reichenden Netzwerk der Astrozyten ist eine Theorie, wie Astrozyten das Absenken von erhöhten K^+ -Konzentrationen erreichen (Orkand et al., 1966). Weitere Theorien beschreiben die Aufnahme von K^+ -Ionen durch Transporter oder Kanäle. Vermutlich existiert ein Zusammenspiel aller drei Mechanismen (Walz, 2000). Dies wird durch eine Studie unterstützt, in der der Einfluss von Kopplung auf K^+ -Pufferung nach erhöhter neuronaler Aktivität untersucht wurde. In den dazu verwendeten Cx43/30-defizienten Mäusen war die Wiederherstellung der K^+ -Konzentration verlangsamt, aber noch überraschend effizient. Anscheinend trugen die anderen erwähnten Mechanismen hierzu bei. Aufgrund der Verlangsamung der K^+ -Aufnahme konnten allerdings häufig Epilepsie-artige Phänomene beobachtet werden (Wallraff et al., 2006). Eine andere Studie beschreibt ebenfalls eine langsamere Wiederherstellung der K^+ -Konzentration nach SD, wenn Gliazellen mit spezifischen Toxinen gehemmt wurden (Lian and Stringer, 2004). Dies alles unterstreicht die Bedeutung der Astrozyten in der Regulation der Ionenkonzentrationen im Extrazellulärraum, wodurch Neurotoxizität vermieden werden kann.

5.2.7 Während CSD wird ATP freigesetzt

Da HPLC-Messungen zeigen, dass Glutamat während SD im Hippokampus durch volumensensitive Anionen-Kanäle freigesetzt wird (Basarsky et al., 1999), sollte in der vorliegenden Arbeit auch die Freisetzung von ATP während CSD untersucht werden. Der Nachweis von ATP wurde mittels der oben diskutierten Sniffer Zellen geführt. Da die verwendeten GI261-Zellen lediglich auf ATP-Applikation reagierten, wurde auf eine pharmakologische Charakterisierung mit purinergen Rezeptor-antagonisten verzichtet. Ca^{2+} -Signale in den Sniffer Zellen während CSD konnten sowohl in nicht transgenen, als auch in Cx-defizienten Mäusen beobachtet werden. Nachgeahmt werden konnte diese Reaktion nach Applikation von ACSF mit 50 mM K^+ , eine Konzentration wie sie während SD erreicht werden kann. Die Freisetzung könnte, ähnlich wie für Glutamat beschrieben, durch Anionen-Kanäle erfolgen, Hemikanäle können aufgrund der Experimente mit Cx-defizienten Tieren ausgeschlossen werden.

Pathologische Veränderungen wie Spreading Depression oder fokale Ischämien führen zu einer Aktivierung von Mikroglia (Gehrmann et al., 1993; Lehrmann et al., 1997). Die hier beobachtete ATP-Freisetzung während SD könnte diese Aktivierung vermitteln, da Purinorezeptoren von Mikroglia stark exprimiert werden. Deren Stimulation kann zur Freisetzung von Zytokinen wie $\text{TNF-}\alpha$ oder $\text{IL-1}\beta$ führen (Hide et al., 2000; Ferrari et al., 1997). Da diese wiederum ATP-Freisetzung aus Astrozyten modulieren, ist eine Art Rückkopplungsmechanismus denkbar (Verderio and Matteoli, 2001; John et al., 1999). Da auch Oligodendrozyten und ihre Vorläuferzellen purinerge Rezeptoren exprimieren (Kirischuk et al., 1995) ist wahrscheinlich, dass ATP als universelles Kommunikationsmittel unter Gliazellen dient.

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

5.3.1 Im motorischen Cortex ist das astrozytäre Signal durch neuronales NO induziert

Fokale elektrische Stimulation im Cortex ohne Unterdrückung von neuronaler Aktivität führt zu Ca^{2+} -Signalen in Astrozyten, die sich von den beschriebenen astrozytären Ca^{2+} -Wellen schon in der deutlich höheren Ausbreitungsgeschwindigkeit unterscheiden. Da Applikation von TTX zur Verlangsamung der Reaktion führt, kann von neuronalem Ursprung der schnellen Reaktion ausgegangen werden. Die Aktivierung von Neuronen durch fokale elektrische Stimulation wurde durch Patch Clamp-Messungen bestätigt. Während der Stimulationsdauer wurden Membrandepolarisation und Natriumströme in Neuronen gemessen, was beides durch Ca^{2+} -freien Puffer oder TTX inhibiert werden konnte. Das astrozytäre Signal auf die neuronale Aktivität wurde durch Blockierung der NO-Synthase reduziert. Unter physiologischen Bedingungen sind Neurone die Hauptquelle für NO, unter pathophysiologischen besonders Mikoglia (Garthwaite and Boulton, 1995). Zählt man akute Schnitte zu physiologischen Modellen, aktiviert also wahrscheinlich von Neuronen freigesetztes NO die lösliche Guanylylcyclase (soluble guanylyl cyclase) der Astrozyten. Dies führt nach cGMP-Produktion zu einem Ca^{2+} -Anstieg, entweder durch Ca^{2+} -Einstrom von außen oder durch Aktivierung von Ryanodin-Rezeptoren auf dem ER und erklärt somit das beobachtete Ca^{2+} -Signal in den Astrozyten. Eine ähnliche Wechselwirkung ist für das Kleinhirn beschrieben. Hier setzen Parallelfasern bei neuronaler Aktivität NO frei, was in den benachbarten Bergmann Gliazellen einen Ca^{2+} -Einstrom bewirkt (Matyash et al., 2001). Während Neuron-Glia-Wechselwirkungen über Glutamatfreisetzung in vielen Hirnregionen beschrieben sind (Schipke and Kettenmann, 2004), konnte in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss von GluR-Antagonisten auf das neuronale induzierte Ca^{2+} -Signal in den Astrozyten festgestellt werden. Im Hinblick auf Transmitterfreisetzung durch Astrozyten, wie es bei astrozytären Ca^{2+} -Wellen gezeigt wurde, ist interessant, dass NO in kultivierten Astrozyten vesikuläre Glutamat- und ATP-Ausschüttung induzieren kann (Bal-Price

et al., 2002). Mehrere Arbeiten zeigen, dass dieses von Astrozyten freigesetzte Glutamat sowohl exzitatorische als auch inhibitorische neuronale Transmission beeinflusst (Araque et al., 1998; Parpura and Haydon, 2000; Parri et al., 2001a). Aktivierung von Astrozyten durch neuronal freigesetztes NO kann also weitere (neuro)-modulatorische Auswirkungen haben, die hier allerdings nicht untersucht wurden.

5.3.2 Ca^{2+} -Signale im Barrel Cortex

5.3.2.1 *In jungen Tieren zeigen Neurone und Astrozyten Ca^{2+} -Signale nach elektrischer Stimulation*

Um astrozytäre Reaktionen auf neuronale Aktivität im hoch organisierten Gebiet des Barrel Cortex zu untersuchen, wurde durch fokale elektrische Stimulation in Schicht 4 der neuronale Input des Thalamus nachgeahmt. Nach elektrischer Stimulation mit 100 Hz, was bevorzugt neuronale Verschaltungen aktiviert, konnten in Hirnschnitten von Mäusen, die jünger als 10 Tage waren, anhand der unterschiedlichen Amplituden und Kinetiken der hervorgerufenen Ca^{2+} -Signale zwei Populationen von reagierenden Zellen bestimmt werden, nämlich Neuronen und Astrozyten. Die Unterschiede in den beiden Parametern waren deutlich genug, um die reagierenden Zellen in allen Experimenten eindeutig jeweils einer Gruppe zuzuordnen. Die Identifikation der Neuronen erfolgte aufgrund der Kinetik der Ca^{2+} -Signale, außerdem morphologisch und elektrophysiologisch. Besonders bei reagierende Zellen außerhalb der stimulierten Barrel Column waren die Abklingzeiten des Ca^{2+} -Signal typisch für neuronale Somata (Smetters et al., 1999). Die elektrophysiologischen Messungen nach Spannungssprüngen in dieser Zellpopulation waren typisch für glutamaterge, regulär-spikende Pyramidalneurone (Chagnac-Amitai and Connors, 1989b; Cho et al., 2004). Insbesondere schnell spikende Interneurone können eindeutig ausgeschlossen werden, das diese keine Frequenzadaption zeigen, was bei den hier gepatchten Neuronen stets beobachtet wurde (Chagnac-Amitai and Connors, 1989b; Thomson et al., 1996). Die in den Biocytinfärbungen der

gepatchten Zellen erkennbare Morphologie wies ebenfalls auf Pyramidalneurone hin (D. Feldmeyer, J. Lübke, persönliche Mitteilung). Die auf die elektrische Stimulation mit einem Ca^{2+} -Signal reagierenden Astrozyten wurden mittels Doppelfärbungen mit SR101 identifiziert. Dies wurde *in vivo* erfolgreich zur Markierung von Astrozyten im Cortex verwendet (Nimmerjahn et al., 2004). Die komplette Überlappung der SR101 und der Fluo4-Färbung zeigt, dass Fluo4 auch im Barrel Cortex präferenziell durch Astrozyten aufgenommen wird. Diese spezifische Aufnahme des Ca^{2+} -Farbstoff durch Astrozyten wird auch durch elektrophysiologische Messungen an Fluo4-gefärbten Zellen in 10 bis 14 Tage alten Mäusen bestätigt (Peters et al., 2003). In Tieren, die jünger als 10 Tage sind, wird der Farbstoff zwar auch in gewissem Maße von Neuronen aufgenommen, die entstehenden Ca^{2+} -Signale lassen sich aber deutlich von den astrozytären unterscheiden.

5.3.2.2 Astrozyten reagieren selektiv auf glutamaterge Transmission in einzelnen Barrel Columns

Nach Stimulation in Schicht 4 des Barrel Cortex reagierten größtenteils Astrozyten, die innerhalb der stimulierten Barrel Column lagen und nur wenige Zellen außerhalb, wie ein Vergleich der Reaktion mit der lichtmikroskopisch erkennbaren Morphologie deutlich machte. Dies steht im Gegensatz zu der im motorischen Cortex beobachteten Reaktion, die eher ungerichtet konzentrisch um die Stimulationspipette verteilt war. Der Aufbau der neuronalen Verschaltung im Barrel Cortex ist in der Literatur genau beschrieben (Abb. 5.2). Innerhalb einer Barrel Column erfolgt in Schicht 4 eine Amplifizierung des neuronalen Inputs durch autaptische Verschaltung, die synaptische Projektion erfolgt dann senkrecht zur Hirnoberfläche nach Schicht 2/3 (Abb. 5.2 links). Auch dort findet eine Verstärkung des Signals statt, so dass eine so genannte Innervationsdomäne gebildet wird, die auf eine Barrel Column beschränkt ist (Abb. 5.2 rechts, Lübke et al., 2003; Feldmeyer et al., 2006).

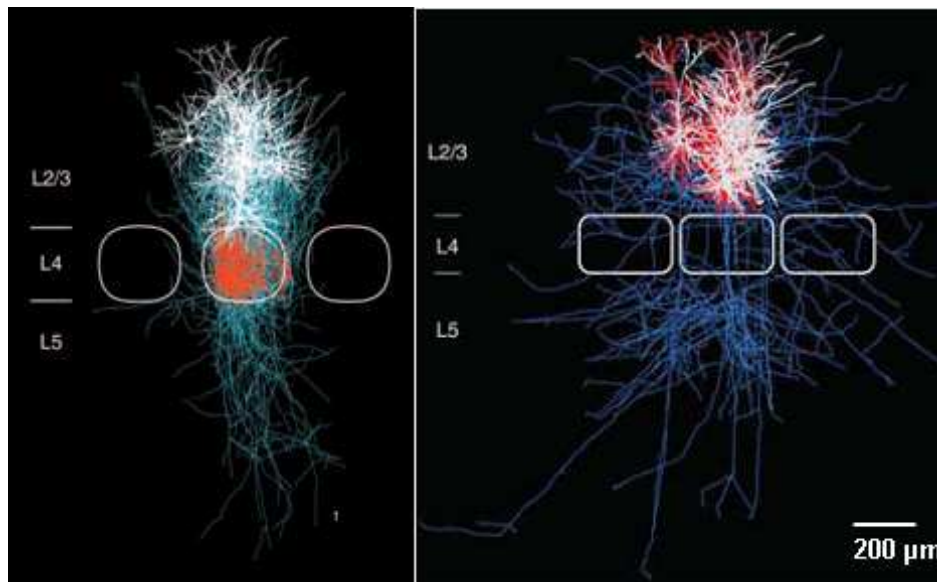


Abbildung 5.2: Rekonstruktion der synaptischen Verschaltung zwischen Schicht 4 und 2/3 (links) und innerhalb Schicht 2/3 (rechts). Barrels sind jeweils weiß markiert. Rot: dendritische Domäne des präsynaptischen Neurons, blau: Projektionsfeld (Axon) des präsynaptischen Neurons, weiß: dendritische Domäne des postsynaptischen Neurons. Schicht 4-2/3 und Schicht 2/3-2/3-Verschaltungen bilden eine Innervationsdomäne, die auf eine Barrel Column beschränkt ist, aus (Lubke et al., 2003; Feldmeyer et al., 2006).

In den hier beschriebenen Experimenten folgen die Astrozyten mit ihrem Ca^{2+} -Signal also eindeutig der glutamatergen exzitatorischen Erregung innerhalb der Innervationsdomäne. Die Inhibierung des Signals durch TTX, Ca^{2+} -freien Puffer und Glutamat-Antagonisten bestätigt dies. Die Relevanz dieses Mechanismus wird durch eine *in vivo*-Studie gestützt, in der nach Barthaar-Stimulation ebenfalls ein glutamaterges Signal in Astrozyten eines Barrels beobachtet wurde (Wang et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings eine bessere zeitliche Korrelation der astrozytären Antwort mit dem neuronalen Input gezeigt werden. Alle Astrozyten reagierten innerhalb von höchstens zwei Sekunden nach dem Stimulus mit einem Ca^{2+} -Signal, während dies in der *in vivo*-Studie teilweise deutlich länger dauerte. Die direkte Stimulation in Schicht 4 scheint somit besser geeignet zu sein als die Barthaar-Stimulation, um direkte Mechanismen der astrozytären Reaktion zu untersuchen.

Ebenfalls im Barrel Cortex konnte eine andere Form von neuronaler Aktivität beobachtet werden, nämlich synchrone Ca^{2+} -Oszillationen in den beschriebenen Pyramidalneuronen in Schicht 2/3. Dabei handelt es sich um schnelle Wellen

neuronaler Aktivität, die mit der Aufnahmefrequenz von 4 Hz nur andeutungsweise zeitlich aufgelöst werden konnten. Neurone bilden senkrecht zu den Barrel Columns weit reichende Netzwerke (Tucker and Katz, 2003), deren Aktivität von synchronisierter Erregung und Inhibition gesteuert wird (Chagnac-Amitai and Connors, 1989b). Dass die Oszillationen niemals in Gegenwart von TTX beobachtet werden konnten, weist auf ihre synaptische Natur hin. Eine Entstehung lediglich durch Kopplung der Neurone ist unwahrscheinlich. Im Gegensatz zur Reaktion nach Barrelstimulation wurden nach den spontanen neuronalen Oszillationen keine Signale in den Astrozyten beobachtet. Auch wenn die Frequenz der inhibitorisch kontrollierten Oszillationen durch Verwendung von GABA_A-Antagonisten gesteigert wurde (Chagnac-Amitai and Connors, 1989a), reagierten die Astrozyten nicht. Dies ist umso bedeutsamer, als auch die gerichtete glutamaterge Erregung entlang einer Barrel Column durch inhibitorische Mechanismen kontrolliert wird, ähnlich wie die spontane Netzwerkaktivität. Dabei handelt es sich um Feedforward-Inhibierung, die verhindert, dass schwache thalamocortikale Erregung weitergeleitet wird (Swadlow et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass nach Blockade dieser Inhibierung durch GABA_A-Rezeptorantagonisten, die Astrozyten nach Barrelstimulation unabhängig von der beschriebenen Verschaltung im gesamten Beobachtungsfeld reagierten.

Astrozyten können also im gleichen Hirngebiet zwischen verschiedenen exzitatorischen Mechanismen unterscheiden, auch wenn die physiologische Grundlage identisch ist, und entsprechend reagieren. Für den Hippokampus wurde bereits gezeigt, dass Astrozyten zwischen verschiedenen axonalen Nervenbahnen unterscheiden können. Hier reagieren Astrozyten auf Glutamatfreisetzung nur nach Stimulation der Schaffer-Kollaterale, nicht nach Alveus-Stimulation (Perea and Araque, 2005).

5.3.2.3 Purinerge Antagonisten verstärken die Antwort der Astrozyten auf neuronale Aktivität

Da auch ATP- und Adenosin-Rezeptor-Antagonisten einen ähnliche Effekt auf die Ausbreitung der astrozytären Ca^{2+} -Signale wie GABA_A -R-Blocker hatten, liegt nahe, dass auch das ATP/Adenosin-System eine Rolle bei der Begrenzung des exzitatorischen Signals nach Stimulation spielt. In thalamocortikalen Schnitten wurde bereits gezeigt, dass A_1 -Rezeptoren eine Rolle bei der Regulation kortikaler Erregung spielen (Fontanez and Porter, 2006), während Blockade von A_2 -Rezeptoren zu einer Verringerung der Spontanaktivität in sensomotorischen kortikalen Neuronen führt (Phillis, 1990). Weiterhin weisen, wie schon erwähnt, mehrere Studien darauf hin, dass Astrozyten tonisch ATP freisetzen, das zu Adenosin degradiert werden und glutamaterge Synapsen inhibieren kann (Pascual et al., 2005; Serrano et al., 2006).

Astrozyten spielen also nicht nur eine Rolle als Integratoren verschiedener Inputs, sondern könnten auch direkt an der Modellierung exzitatorischer Transmission beteiligt sein. ATP scheint dabei eine herausragende Rolle zu spielen, was auch durch die vorliegende Arbeit unterstützt wird. Hier konnte unter anderem gezeigt werden, dass neben der postulierten tonischen ATP-Freisetzung auch aktivitätsabhängig ATP freigesetzt wird, nämlich während kortikalen Ca^{2+} -Wellen unter Astrozyten. Weiterhin wurde demonstriert, dass auch die Reaktion auf exzitatorische Transmission durch ATP/Adenosin beeinflusst wird. Für die Zukunft ist sicher wichtig, dass all die bisher beschriebenen Mechanismen der Modulation neuronaler Aktivität durch Astrozyten auf ihre Gültigkeit in intakten Systemen und mit weniger artifiziellen Stimulationen überprüft werden. Mit der Entwicklung neuer Techniken wie *in vivo*-Imaging und dem Design von genetisch manipulierten Tieren, was die Verwendung von pharmakologischen Substanzen ergänzt, ist man auf dem besten Weg dahin.