



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf



Fachbereich Biologie

Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG



Calcium Signaling in Astrozyten der Maus (*Mus musculus*): Bedeutung des Typ 3 Ryanodin- Rezeptors Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften des
Fachbereichs Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Frederik Terzenbach, geb. Czarniak

Hamburg, 2019

Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:

Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas H. Guse

Prof. Dr. rer. nat. Christian Lohr

Datum der Disputation: 04.07.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	VI
Abstract	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Signaltransduktion in Astrozyten	1
1.2 Ca ²⁺ als sekundärer Botenstoff	4
1.3 Rolle der RYR bei der Ca ²⁺ -Signaltransduktion	8
1.4 Die Rolle der Astrozyten bei Multiple Sklerose	10
1.5 Zielsetzung der Arbeit	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Zell- und Gewebekultur	14
2.1.1 Präparation primärer muriner Astrozyten	14
2.1.2 Kultivierung und Passage primärer Astrozyten	15
2.1.3 Kryokonservierung primärer Astrozyten	15
2.1.4 Präparation akuter muriner Hirnschnitte	15
2.1.5 Verwendete Medien und Lösungen	16
2.2 Digitale Ca ²⁺ -Bildgebung	17
2.2.1 Ca ²⁺ -Indikatoren	17
2.2.2 Beladung primärer Astrozyten mit Ca ²⁺ -Indikatoren	19
2.2.3 Ca ²⁺ -Messungen an primären Astrozyten	20
2.2.4 Ca ²⁺ -Messungen an akuten Hirnschnitten der Maus	25
2.2.5 Verwendete Puffer und Lösungen	27
2.3 Molekularbiologische Methoden	27
2.3.1 Pharmakologische Charakterisierung	27
2.3.2 Präparation der Gesamt-RNA aus primären Astrozyten	28
2.3.3 Synthese von cDNA	29
2.3.4 Quantitative Echtzeit-PCR	29
2.4 Statistik	30
3 Ergebnisse	31
3.1 ATP führt zum Anstieg der [Ca ²⁺] _i in murinen Astrozyten	31
3.2 Charakterisierung des Anstiegs der [Ca ²⁺] _i in murinen Astrozyten	33
3.2.1 Die Rolle von cADPR beim Anstieg der [Ca ²⁺] _i	35
3.2.2 Einfluss von NAADP auf den Anstieg der [Ca ²⁺] _i	37
3.2.3 Bedeutung des SOCE beim Anstieg der [Ca ²⁺] _i	39
3.2.4 Pharmakologische Inhibition der PLC reduziert den Anstieg der [Ca ²⁺] _i	43
3.3 ATP führt zu einem verringerten Anstieg der [Ca ²⁺] _i in RYR3 ^{-/-} -Astrozyten	45

3.4	Die Analyse subzellulärer Ca^{2+} -Signale in murinen Astrozyten.....	51
3.5	Der Effekt von $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten	53
3.5.1	Beteiligung von IP_3 am Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter pro-inflammatorischen Bedingungen. ...	55
3.5.2	$\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ verändern die ATP-Sensitivität in murinen WT-Astrozyten.....	57
3.5.3	Die Wirkung pro-inflammatorischer Zytokine auf die Genexpression.....	58
3.6	Die Bedeutung von ATP für die <i>in situ</i> Ca^{2+} -Signaltransduktion.....	60
3.6.1	Der Knock-Out des RYR3 führt zu einem reduzierten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Cerebellum und im Bulbus olfactorius.....	61
4	Diskussion.....	63
4.1	ATP als Stimulus für den Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten	64
4.2	Die Charakterisierung des Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in murinen WT-Astrozyten.....	65
4.3	Die Rolle des RYR3 am durch ATP induzierten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$	69
4.4	Die Analyse subzellulärer Ca^{2+} -Signale in murinen Astrozyten.....	71
4.5	$\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ verstärken den Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in WT-, aber nicht in RYR3 ^{-/-} -Astrozyten.....	73
4.6	Verschiebung der ATP-Sensitivität durch $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ in WT-Astrozyten	74
4.7	Genexpressionsanalysen als Erklärungsansatz für die erhöhte ATP Sensitivität	76
4.8	Übertragbarkeit des charakterisierten In-vitro-Modells auf akute Hirnschnitte des Cerebellums und des Bulbus olfactorius.....	78
4.9	Ausblick und offene Fragen.....	79
	Literaturverzeichnis	81
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	95
	Eigene Publikationen.....	97
	Eidesstattliche Erklärung	98
	Danksagung.....	99

Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺] _i	freie zytosolische Ca ²⁺ -Konzentration
Ach-R	Acetylcholin-Rezeptor
ACSF	künstliche Cerebrospinalflüssigkeit
AM	Acetoxymethyl Ester
AMP	Adenosinmonophosphat
AoD	Assay on Demand
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Bk-R	Bradykinin-Rezeptor
Ca ²⁺	Calcium Ion
cADPR	cyclische ADP-Ribose
CaM	Calmodulin
cDNA	komplementäre DNA
CICR	Calcium-induced Calcium-release
CN	Calcineurin
CRAC	Calcium-release acitvated Calcium
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EH	Eagle's-HEPES
EMCCD	Electron multiplying charge-coupled device
ER	endoplasmatisches Retikulum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gfap	Glial fibrillary acidic protein
GPCR	G _q -Protein gekoppelte Rezeptoren
H-R	Histamin-Rezeptor
IFN _γ	Interferon γ
IP ₃	D- <i>myo</i> -Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ R	IP ₃ -Rezeptor

K _a	Assoziationskonstante
K _d	Dissoziationskonstante
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
MeSADP	2-(Methylthio)adenosine-5'-diphosphat
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
Na ⁺	Natrium Ion
NAADP	Nikotinsäureadenin dinukleotidphosphat
NAD	Nikotinamidadenin dinukleotid
NADP	Nikotinamidadenin dinukleotidphosphat
NF-κB	'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B Cells
NFAT	Nuclear Factor of Activated T Cells
P2Y	purinergere Rezeptor
P2X	purinergere Ionenkanal
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PLC _α	Phospholipase C Subtyp Alpha
PLC _β	Phospholipase C Subtyp Beta
PMCA	Plasmamembran Ca ²⁺ -ATPase
ROI	Region of Interest
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodin-Rezeptor
RyR1	Typ1 Ryanodin-Rezeptor
RyR2	Typ2 Ryanodin-Rezeptor
RyR3	- Typ3 Ryanodin-Rezeptor
SEM	Standardfehler (engl. Standard Error of the Mean)
SERCA	Sarko / Endoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
SOCE	Store-operated Calcium-entry
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STIM1	Stromal interaction molecule 1
Tbp	TATA-binding protein
TNF _α	Tumor Necrosis Factor α

TRPM2	Transient receptor potential channel subtype melastatin 2
TRPML-1	Transient receptor potential channel subtype mucolipin 1
TPC	Two Pore Channel
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Die Calcium (Ca^{2+})-Signaltransduktion ist einer der wichtigsten intrazellulären Prozesse in Astrozyten, die zu den am häufigsten vorkommenden Gliazellen im zentralen Nervensystem (ZNS) zählen. Eine Vielzahl an Botenstoffen und Neurotransmittern haben in Astrozyten einen Anstieg der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zur Folge, an den sich weitere biochemische Prozesse anschließen. Untersuchungen am Tiermodell der Multiple Sklerose, der experimentellen, autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) zeigten, dass das Fehlen eines Ca^{2+} -permeablen Ionenkanals, dem Typ3 Ryanodin-Rezeptor (RYR3), zu einer verminderten Sekretion von Chemokinen und Zytokinen in murinen Astrozyten führt, was eine verringerte Rekrutierung autoreaktiver T-Lymphozyten und Monozyten zur Folge hat (von Osten, 2015). Die Verminderung dieser Zellen im Bereich des ZNS führte so zu einem mildereren Verlauf der EAE, charakterisiert durch einen verringerten Clinical Score.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde untersucht, aus welchen Botenstoffen und Signalwegen sich die Ca^{2+} -Signaltransduktion in primären, murinen Astrozyten zusammensetzt und in welchem Ausmaß der RYR3 an diesem Prozess beteiligt ist. Mithilfe von Lebend-Zell-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass in Wildtyp (WT)-Astrozyten durch Verwendung des Neurotransmitters Adenosintriphosphat (ATP) ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ausgelöst wird, der sich durch die sekundären Botenstoffe D-myoinositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) sowie Nikotinsäureadenindinukleotidphosphat (NAADP) und dem über Calcium-release activated Calcium (CRAC)-Kanäle vermittelten Store-operated Calcium-entry (SOCE) charakterisieren lässt.

Vergleichende mikroskopische Lebend-Zell-Experimente an $\text{RYR3}^{-/-}$ -Astrozyten zeigen, dass durch die Stimulation mit ATP ein verringerter Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ausgelöst wird, der durch die Wirkung des sekundären Botenstoffs IP_3 charakterisiert ist. Es scheint in $\text{RYR3}^{-/-}$ -Astrozyten keinen über CRAC-Kanäle vermittelten SOCE zu geben. Der RYR3 ist somit nur auf indirekte Weise, durch den Calcium-induced Calcium-release (CICR) am ATP-vermittelten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beteiligt.

Darüber hinaus wurde die Wirkung eines pro-inflammatorischen Milieus auf die ATP-vermittelte Ca^{2+} -Signaltransduktion untersucht. Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass es durch die Behandlung von WT-Astrozyten mit pro-inflammatorischen Zytokinen zu einer 30-fachen Verringerung der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) von ATP kommt und bereits nanomolare Mengen ATP zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$

führen. Mithilfe von Lebend-Zell-Mikroskopie wurde der sekundäre Botenstoff IP₃ als Auslöser für den verstärkten Anstieg der [Ca²⁺]_i identifiziert. Genexpressionsanalysen der purinergen Rezeptoren zeigten eine Veränderung der Expression des Gens *P2yr2* in WT- und RYR3^{-/-}-Astrozyten – ein Effekt der sich durch die Verwendung pro-inflammatorischer Zytokine nicht veränderte.

Im letzten Teil der Arbeit wurden *in situ* akute Hirnschnitte von WT- und RYR3^{-/-}-Mäusen mit ATP stimuliert. In den Bergmann-Glia des Cerebellums und in den glomerulären Astrozyten des Bulbus olfactorius kam es dabei zu einem Anstieg der [Ca²⁺]_i, der in akuten Hirnschnitten der RYR3^{-/-}-Mäuse signifikant verringert war.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführte Charakterisierung beteiligter Botenstoffe und Signalwege liefert den ersten Ansatz zur Aufklärung der Rolle der Ca²⁺-Signaltransduktion und des RYR3 im Rahmen der EAE. Die Beobachtung, dass pro-inflammatorische Zytokine die ATP-Sensitivität von Astrozyten erhöhen, zeigt zum ersten Mal, dass dieser Zelltyp unter bestimmten Bedingungen auf nanomolare Konzentrationen von Neurotransmittern mit einem rapiden Anstieg der [Ca²⁺]_i reagiert, der eng mit dem RYR3 verknüpft ist. Der Vergleich von In-vitro- und In-Situ-Experimenten konnte zeigen, dass die mithilfe von Lebend-Zell-Mikroskopie gemachten In-vitro-Beobachtungen auch *in situ* nachweisbar sind. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Beobachtungen in WT- und RYR3^{-/-}-Astrozyten in Kombination mit Untersuchungen der EAE in WT- und RYR3^{-/-}-Mäusen (von Osten, 2015) neue Erklärungen liefern, anhand derer sich neue Therapieansätze oder Medikamente zur Behandlung von Multiple Sklerose entwickeln lassen.

Abstract

Calcium (Ca^{2+}) mediated signal transduction is one of the most important intracellular processes in astrocytes, the most abundant glia cell type in the central nervous system (ZNS). A variety of messenger molecules and neurotransmitters can lead to an increase of the free cytosolic Ca^{2+} -concentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in astrocytes followed by different processes leading to alterations in gene expression. Previous studies on the animal model of multiple sclerosis (MS) the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) showed that the knock-out of ryanodine receptor type 3 (RYR3), a Ca^{2+} -permeable ion channel, led to an attenuated secretion of chemo- and cytokines in murine astrocytes, thus leading to a reduced recruitment of autoreactive t-lymphocytes and monocytes (von Osten, 2015).

In this thesis, the Ca^{2+} mediated signal transduction in murine astrocytes was analyzed to identify underlying mechanisms and to clarify the role of the RYR3. It could be shown that stimulation by the neurotransmitter adenosine triphosphate (ATP) led to an increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in wild-type (WT) astrocytes characterized by D-*myo*-Inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3), Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) and Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channel mediated store operated Ca^{2+} entry (SOCE).

Experiments using RYR3^{-/-} astrocytes showed an attenuated increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ upon ATP stimulation also characterized by IP_3 . Interestingly, no CRAC channel mediated SOCE could be observed in RYR3^{-/-} cells, indicating the indirect role of RYR3 by a Ca^{2+} induced Ca^{2+} release (CICR) mechanism.

Moreover, the effect of a pro-inflammatory environment on the ATP induced Ca^{2+} signaling was investigated. For the first time, it was shown that the pre-treatment of WT astrocytes using pro-inflammatory cytokines led to a 30-fold decreased EC_{50} value for ATP stimulation, thus allowing an increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by stimulation using nanomolar ATP concentrations. First experiments to characterize the described effect identified IP_3 as a triggering secondary messenger. Gene expression analysis of purinergic receptors in murine astrocytes revealed a change in the expression level of *P2yr2* in WT- and RYR3^{-/-}-cells – an effect that was also visible under pro-inflammatory conditions.

In the last part of this thesis, *in situ* Ca^{2+} signaling experiments were performed to examine if the *in vitro* effect of ATP mediated stimulation can also be observed *in situ*. Therefore, experiments on acute brain slices of wild-type and RYR3^{-/-} mice were performed concerning ATP induced Ca^{2+} signaling in cerebellar Bergmann-glia cells

(Cerebellum) and glomerular astrocytes of the olfactory bulb (Bulbus olfactorius). ATP stimulation of both cell populations showed that the ATP induced increase of the $[Ca^{2+}]_i$ is attenuated in RYR3^{-/-} mice compared to wild-type mice which was also observed *in vitro*.

The characterization of secondary messenger molecules and signaling pathways was used to solve the role of Ca²⁺ mediated signal transduction and RYR3 within the EAE.

For the first time, it was shown that pro-inflammatory cytokines enhance the ATP sensitivity of astrocytes thus leading to a Ca²⁺ mediated response to nanomolar ATP concentrations directly coupled to the RYR3. Comparative *in vitro* and *in situ* life-cell imaging experiments showed similar results under both conditions. These observations combined with previous results concerning the EAE in wild-type and RYR3^{-/-} mice allows a better understanding of underlying mechanisms and thus potentially enables the development of new therapeutical or medical treatments for MS patients.

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion in Astrozyten

Astrozyten zählen zu den bedeutendsten Zellen im zentralen Nervensystem (ZNS) und sind Bestandteil des durch Rudolf Virchow im Jahr 1856 bezeichneten „Nervenkitts“, einer zusammengefassten Zellpopulation, bestehend aus Mikroglia, Oligodendrozyten sowie faserigen und protoplasmatischen Astrozyten (Somjen, 1988).

Die Bedeutung der Astrozyten im ZNS hat sich über die vergangenen Jahre gewandelt, und es ist heutzutage klar, dass Astrozyten eine unterstützende Rolle im ZNS einnehmen (Kimelberg und Nedergaard, 2010; Sofroniew und Vinters, 2010). Das Interesse an der Funktion und Rolle der Astrozyten ist über die Jahre gewachsen, und es konnte gezeigt werden, dass Astrozyten sowohl an der Bildung der neuronalen Synapse, der Neurogenese, der Angiogenese und der Bildung von extrazellulären Matrixproteinen, als auch an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind (Sofroniew und Vinters, 2010). Die Fehlsteuerung dieser Zellen, einhergehend mit einer Hyperreaktivität, ist häufig Auslöser für schwere neurologische Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Chorea Huntington, Epilepsie oder Multiple Sklerose (Pekny et al., 2016) – Krankheiten, die bislang nicht vollständig heilbar sind.

Im ZNS spielt die Signalweiterleitung sowie die Signalverarbeitung eine essenzielle Rolle, die es Zellen erlaubt auf extrazelluläre Reize in Form von Signalmolekülen oder elektrischen Stimuli zu reagieren. Die Wahrnehmung und Verarbeitung der extrazellulären Reize wird über in die Plasmamembran eingelagerte Rezeptoren realisiert, deren Aktivierung zur Signalvermittlung durch die enzymatische Bildung sekundärer Botenstoffe führt. Sekundäre Botenstoffe diffundieren meist frei durch die Zellen und beeinflussen weitere biochemische Prozesse, was zu einer Anpassung der Zelle hinsichtlich der Veränderung der Genexpression, der Proliferation, der Zell-Migration oder Sekretion bestimmter Signalmoleküle führt.

Einer der wichtigsten sekundären Botenstoffe in der Informationsverarbeitung extrazellulärer Reize in Astrozyten ist Ca^{2+} , dessen strikte Regulation notwendig ist, um eine Vielzahl an biochemischen und physiologischen Prozessen zu steuern (Cornell-Bell et al., 1990; Hirase et al., 2004; Wang et al., 2006).

Signalkaskaden, die zu einem Anstieg der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) führen, werden im Allgemeinen durch verschiedene extrazelluläre Botenstoffe und deren Bindung an ihre Zielrezeptoren ausgelöst. Astrozyten sind mit einer Vielzahl an Rezeptoren ausgestattet, die einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zur Folge haben können: muskarinerge Acetylcholinrezeptoren (ACh-R), Bradykinin-Rezeptoren (Bk-R), purinerge Rezeptoren (P2Y) oder Ionenkanäle (P2X), metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) sowie Histamin-Rezeptoren (H-R), die einen Teil der extrazellulären Botenstoffe des ZNS verarbeiten können (s. Abbildung 1) (Bazargani und Attwell, 2016; Cornell-Bell et al., 1990; Giaume und Venance, 1998; Glaum et al., 1990; Guthrie et al., 1999; Inagaki et al., 1991; Jeremic et al., 2001; Parpura et al., 1994).

Bei allen aufgeführten Rezeptoren handelt es sich um G_q -Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), die nach ihrer Aktivierung zur G_q -vermittelten Aktivierung der Phospholipase $C\beta$ (PLC β) führen (s. Abbildung 1). Die aktivierte PLC β hydrolysiert im nächsten Schritt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zu Diacylglycerin (DAG) und *D-myoinositol*-1,4,5-triphosphat (IP $_3$). Das enzymatisch gebildete IP $_3$ diffundiert durch das Zytosol und bindet an die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) eingebetteten IP $_3$ -Rezeptoren (IP $_3$ R). Bei den IP $_3$ R handelt es sich um ligandenaktivierte Ca^{2+} -Kanäle, deren Aktivierung zur Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER und zum Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt (Salter und Hicks, 1995).

Dieser Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vermittelt über verschiedene Signalwege die Bildung sowie die Sekretion verschiedener Gliotransmitter, die auf umliegende Blutgefäße, Neurone oder Gliazellen wirken können (Bazargani und Attwell, 2016).

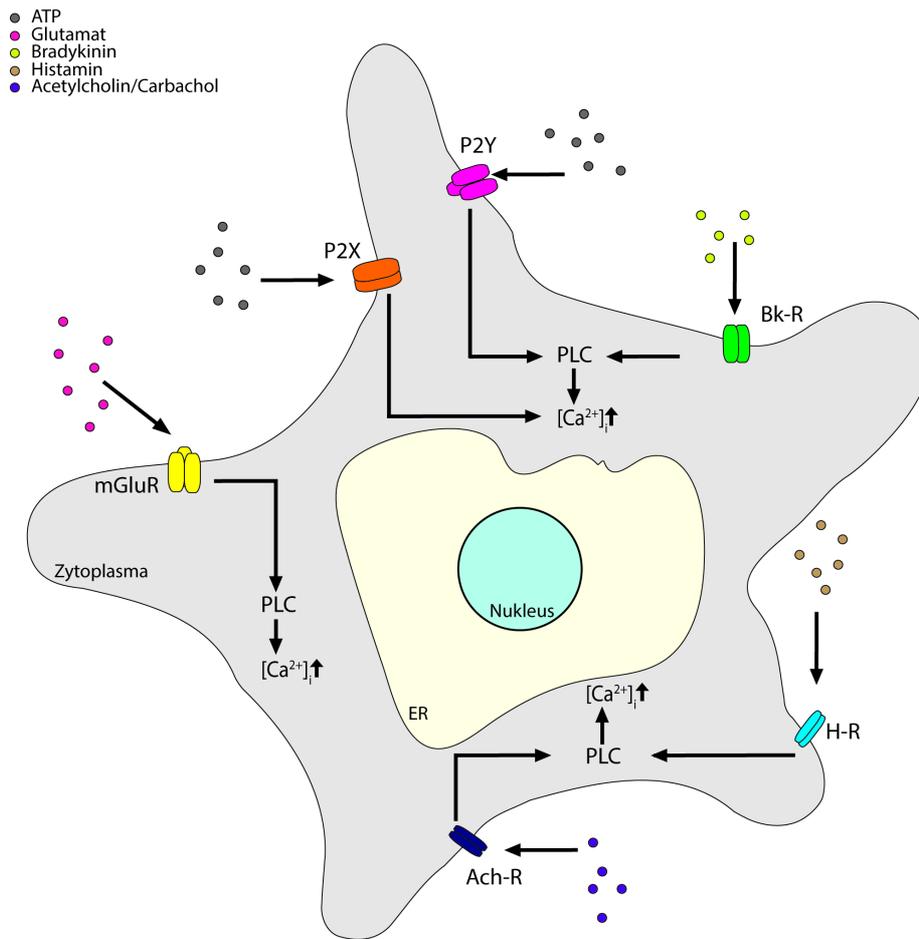


Abbildung 1: Schematischer Überblick über ligandenaktivierte Rezeptoren und Ionenkanäle, deren Aktivierung zum Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in Astrozyten führen.

Vereinfachte Darstellung eines Astrozyten und der an der Calcium-Signaltransduktion beteiligten Organellen und Rezeptoren. Die Botenstoffe ATP, Glutamat, Bradykinin, Histamin sowie Acetylcholin respektive Carbachol können mithilfe ihrer spezifischen Rezeptoren detektiert werden und führen zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. ATP kann entweder an den GPCR P2Y oder an den ligandenaktivierten Ionenkanal P2X binden. Die Aktivierung von P2Y führt zum PLCβ vermittelten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ über Bildung von IP_3 , wohingegen die Aktivierung des P2X zum Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum führt. Glutamat kann mGluR aktivieren, einem GPCR der zur PLCβ vermittelten Bildung von IP_3 führt, was den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zur Folge hat. Die Botenstoffe Bradykinin, Histamin sowie Acetylcholin / Carbachol können spezifisch die Rezeptoren Bk-R, H-R sowie Ach-R aktivieren. Bei allen Rezeptoren handelt es sich ebenfalls um GPCR, deren Aktivierung PLCβ vermittelt zur Bildung von IP_3 und dem sich anschließenden Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führt.

1.2 Ca^{2+} als sekundärer Botenstoff

Ca^{2+} gilt als einer der wichtigsten intrazellulären sekundären Botenstoffe und spielt in vielen Zellen eine Rolle bei der biochemischen Signaltransduktion. Die Beteiligung an essenziellen Prozessen wie der Fertilisation, der embryonalen Entwicklung, dem Membrantransport und dem Lernen legt dar, wie wichtig die Steuerung der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ ist (Berridge et al., 2000).

Der durch zelluläre Stimulation verursachte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ausgelöst durch die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern sowie dem Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum, kann nur aufgrund eines Konzentrationsgefälles realisiert werden, das zwischen dem Extrazellulärraum ($\sim 1 \text{ mM}$), dem Zytosol ($\sim 100 \text{ nM}$) und den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern ($\sim 400 \mu\text{M}$) vorliegt (Berridge et al., 2000; Clapham, 2007; Feske, 2007). Mithilfe eines komplexen Systems bestehend aus verschiedenen Ca^{2+} -Kanälen, ATP-abhängigen Ca^{2+} -Pumpen und Ca^{2+} -bindenden Proteinen, wird dieses Konzentrationsgefälle aufrechterhalten.

Die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern ist abhängig von der Bildung bestimmter sekundärer Botenstoffe. Dies umfasst die sekundären Botenstoffe IP_3 , cyclische ADP-Ribose (cADPR) sowie Nikotinsäureadeninucleotidphosphat (NAADP).

Der am besten charakterisierte sekundäre Botenstoff, dessen Bildung zur Ca^{2+} -Freisetzung führt, ist IP_3 , der erstmals 1983 von Streb et al. an Azinuszellen des Pankreas beschrieben wurde (Streb et al., 1983). Die enzymatische Bildung von IP_3 ist abhängig von der Stimulation der in der Plasmamembran eingebetteten GPCR, die zur G_q -Protein-abhängigen Aktivierung der $\text{PLC}\beta$ führen. Das membranständige Phospholipid PIP_2 wird durch die aktivierte $\text{PLC}\beta$ enzymatisch in IP_3 und DAG gespalten. IP_3 diffundiert durch das Zytosol und bindet an die im ER befindlichen IP_3R , was die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER zur Folge hat (s. Abbildung 2).

Ein weiterer Ca^{2+} -freisetzender sekundärer Botenstoff ist cADPR, das von Lee et al. im Jahr 1989 nach Untersuchungen an Homogenaten aus Seeigelleiern beschrieben wurde (Lee et al., 1989). Bislang konnte gezeigt werden, dass cADPR in vielen Zellsystemen einen Effekt auf die Ca^{2+} -Freisetzung aus internen Speichern hat (Bruzzone et al., 2003; Guse et al., 1995; Lee, 1993). Gebildet wird cADPR aus dem Coenzym Nikotinamidadeninucleotid (NAD) mithilfe einer ADP-Ribosylcyclase, die NAD unter Abspaltung des Nikotinamids zyklisiert (Guse, 2005; Lee, 2001). Die Bildung von

cADPR führt in T-Lymphozyten zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Guse et al., 1997; Lee et al., 1989), der auf die Interaktion zwischen cADPR und den im ER befindlichen Ryanodin-Rezeptoren (RyR) zurückzuführen ist. Die Aktivierung der RyR hat die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER zur Folge (s. Abbildung 2) (Guse, 2005; Lee, 1993).

Das Pyridinnukleotid NAADP zählt zu den potentesten endogenen sekundären Botenstoffen, dessen Bildung die Ca^{2+} -Freisetzung aus internen Speichern zur Folge hat. Entdeckt wurde es 1987 bei Untersuchungen an Seeigeleiern als Verunreinigung von Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP) (Clapper et al., 1987). Die Aufklärung der molekularen Struktur folgte im Jahr 1995 durch Lee und Aarhus (Lee und Aarhus, 1995) und bewies, dass der Austausch einer $-NH_2$ Gruppe des NADP zu einer $-OH$ Gruppe (NAADP) eine strukturelle Veränderung zur Folge hat, die einer zuvor inaktiven Substanz (NADP) die Ca^{2+} -Freisetzung unter Verwendung nanomolarer Mengen ermöglicht (Guse et al., 2013; Lee und Aarhus, 1995).

Die endogene Synthese von NAADP konnte bislang in verschiedenen Zellsystemen, wie in β -Zellen des Pankreas, Adipozyten, T-Lymphozyten und anderen Zellen, nachgewiesen werden (Churamani et al., 2004; Guse et al., 2013). Ein NAADP-synthetisierendes Enzym wurde jedoch *in vivo* bisher nicht nachgewiesen. In-Vitro-Untersuchungen hinsichtlich der Synthese von NAADP konnten zeigen, dass CD38, ein multifunktionales Ektoenzym, einen Basenaustausch katalysiert, der durch Verwendung von NADP als Substrat und einem Überschuss an Nikotinsäure NAADP unter nicht-physiologischen Bedingungen (pH 5) generieren kann (Cosker et al., 2010; Guse et al., 2013; Schmid et al., 2011). Die Rolle von CD38 beim Metabolismus von NAADP konnte in den vergangenen Jahren weiter aufgeklärt werden, und es gibt Indizien, dass CD38 eher einer Rolle beim Abbau von NAADP spielt, da in $CD38^{-/-}$ -Mäusen eine erhöhte Konzentration von NAADP bestimmt werden konnte (Schmid et al., 2011; Soares et al., 2007).

Der Zielrezeptor von NAADP ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es wurden sowohl Two-Pore-Channels (TPCs) auf sauren Lysosomen (Brailoiu et al., 2010; Calcraft et al., 2009; Zong et al., 2009) als auch RyR, Transient receptor potential channel subtype mucolipin 1 (TRPML-1) oder subtype melastatin 2 (TRPM2) als Rezeptoren beschrieben (Ernst et al., 2013; Gerasimenko et al., 2015; Guse und Lee, 2008; Hohenegger et al., 2002; Langhorst et al., 2004) (s. Abbildung 2). In primären T-Lymphozyten ist die Bildung initialer Ca^{2+} -Signale abhängig vom Vorhandensein des RyR1, und es gibt keine Beteiligung von RyR3 sowie TRPM2 an diesem Prozess (Diercks, 2016; Wolf et al.,

2015). Ob es eine Beteiligung von TPCs sowie TRPML-1 bei initialen NAADP-vermittelten Ca^{2+} -Signalen gibt, konnte bisher nicht gezeigt werden. An keinem der genannten Kanäle konnte eine Bindetasche für NAADP nachgewiesen werden, weshalb davon auszugehen ist, dass NAADP mithilfe eines Bindeproteins an seinen Zielkanal bindet (Guse, 2012).

Die durch die Bildung sekundärer Botenstoffe ausgelöste Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern führt zum Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, was wiederum zum CICR führt, einem Prozess der den initialen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über die im ER befindlichen Ca^{2+} -Kanäle, die RYR und IP_3R , verstärkt (Barbara, 2002; Endo, 2009).

Die verstärkte Ca^{2+} -Freisetzung und der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führen zum Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$, was die Aktivierung des Stromal interaction molecule 1 (STIM1) und dessen Translokation zur Plasmamembran zur Folge hat. Es kommt zur STIM1-abhängigen Aktivierung von CRAC-Kanälen, deren Öffnung zum Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum führt: dem Store-operated Ca^{2+} Entry (SOCE) (s. Abbildung 2) (Feske, 2007; Hogan und Rao, 2015). Die Kombination aus Ca^{2+} -Freisetzung über sekundäre Botenstoffe, CICR sowie SOCE hat einen globalen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zur Folge.

Das im Zytosol befindliche Ca^{2+} kann an Ca^{2+} -bindende Proteine binden. Hierbei wird zwischen direkt regulierten Proteinen, deren Aktivität durch die Bindung von Ca^{2+} verändert wird, und zwischen indirekt regulierenden Proteinen, die durch die Bindung von Ca^{2+} weitere Zielmoleküle modifizieren oder aktivieren können (Clapham, 2007), unterschieden.

Die Aufrechterhaltung des Konzentrationsgefälles zwischen Zytoplasma, intrazellulären Speichern sowie dem Extrazellulärraum ist für die Ca^{2+} -Signaltransduktion von essenzieller Bedeutung. Im Grundzustand der Zelle kommt es zu einer dauerhaften, leichten Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Ca^{2+} -Leak), die so kontrolliert werden muss, dass es zu keiner ungewollten Aktivierung sich anschließender Signalwege kommt (Camello et al., 2002; Szlufcik et al., 2006). In der Membran des ER ist das Transportprotein Sarko-/ Endoplasmatische- Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und in der Plasmamembran die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA) zu finden. Beide Transportproteine können Ca^{2+} unter ATP-Hydrolyse über die Membran pumpen und zählen zu wichtigen Regulatoren der Ca^{2+} -Signaltransduktion (s. Abbildung 2) (Berridge et al., 2003; Berridge et al., 2000; Schatzmann, 1966; Wuytack et al., 2002). In der Plasmamembran befindet sich ebenfalls ein Na^+ - Ca^{2+} -Antiporter, sowie in der äußeren Mitochondrienmembran der Mitochondrien- Ca^{2+} -Uniporter und Proteine, die Ca^{2+} in den

Extrazellularräum oder in die Mitochondrien transportieren (Berridge et al., 2003; Brini und Carafoli, 2011).

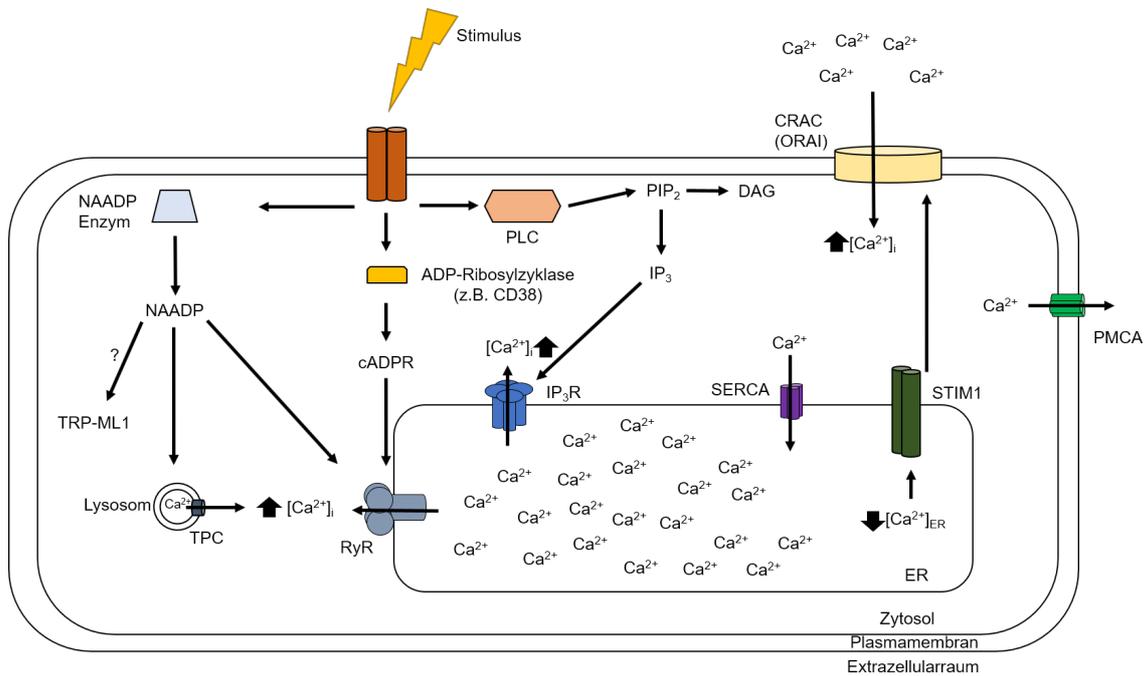


Abbildung 2: Allgemeines Schema der zellulären Ca²⁺-Signaltransduktion.

Nach receptorspezifischer Stimulation der Zelle, kommt es zur enzymatischen Bildung der sekundären Botenstoffe NAADP, cADPR sowie IP₃. NAADP wird mithilfe eines bislang unbekanntes NAADP-synthetisierenden Enzyms hergestellt. Die Bildung von cADPR wird über eine ADP-Ribosylzyklase durch die Zyklisierung von NAD umgesetzt. IP₃ wird mithilfe der PLC durch die enzymatische Spaltung von PIP₂ zu DAG und IP₃ hergestellt. Die synthetisierten Botenstoffe binden anschließend an ihre Zielrezeptoren, den RYR, den IP₃R sowie TPC, was zum Anstieg der [Ca²⁺]_i führt. Die Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER hat den Abfall der [Ca²⁺]_{ER} zur Folge, was zur Aktivierung und Translokation von STIM1 führt. Durch die STIM1-Translokation zur Plasmamembran kommt es zur Aktivierung von CRAC-Kanälen und zum CRAC-vermittelten Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellularräum. Der aktive Rücktransport von Ca²⁺ in das ER respektive in den Extrazellularräum wird über die Ca²⁺-ATPasen SERCA bzw. PMCA realisiert.

1.3 Rolle der RYR bei der Ca^{2+} -Signaltransduktion

Bei RYR handelt es sich um homotetramere, Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle, die sowohl in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) als auch des ER eingebettet vorliegen. Sie sind mit einem Molekulargewicht von über 2 MDa die bislang größten bekannten Ionenkanäle und werden in die drei Subtypen RYR1, RYR2 und RYR3 unterteilt (Inui et al., 1987; Lai et al., 1988; Lanner et al., 2010). RYR1 ist hauptsächlich in Skelettmuskelzellen, RYR2 in ventrikulären Muskelzellen und RYR3 in Zellen des ZNS zu finden (Hosoi et al., 2001; Ledbetter et al., 1994). Neben der klassischen Expression der RYR sind die Ionenkanäle je nach Subtyp auch in weiteren Zelltypen, wie T-Lymphozyten oder dendritischen Zellen zu finden (Giannini et al., 1995).

Die Struktur der RYR wurde bereits 2005 aufgeklärt (Ludtke et al., 2005), jedoch konnte erst im Jahr 2014 eine hochaufgelöste Struktur veröffentlicht werden (s. Abbildung 3) (Zalk et al., 2014). Die Strukturaufklärung ermöglichte die Identifizierung verschiedener zytoplasmatischer Domänen, von denen vermutet wird, dass sie an der Bindung bestimmter Proteine sowie an der Ca^{2+} -Freisetzung beteiligt sind (Liu et al., 2015; Van Petegem, 2015; Zalk et al., 2014). In der molekularen Struktur der RYR existiert ebenfalls ein zytoplasmatischer Ca^{2+} -Sensor, ein EF-Hand-Motiv, dass durch seine Abfolge an geladenen Aminosäuren Ca^{2+} bindet. Die Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung des EF-Hand-Motivs führt zum Öffnen des RYR, was den Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zur Folge hat (Zalk et al., 2014).

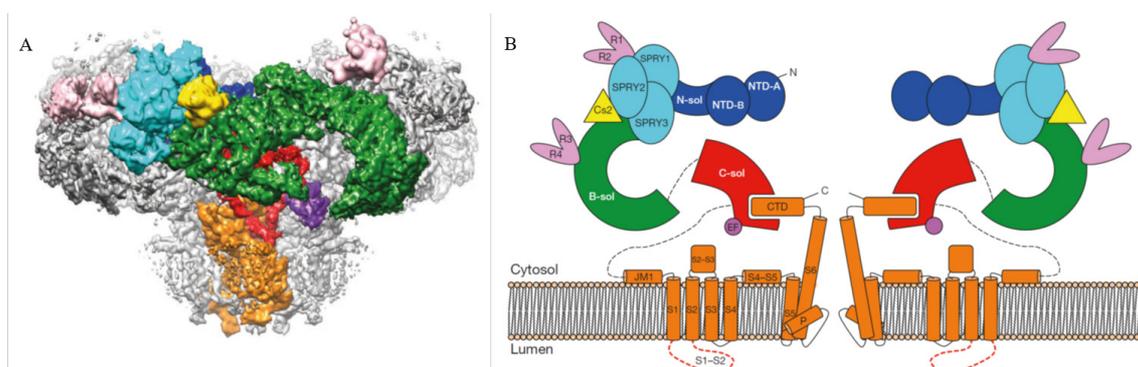


Abbildung 3: Strukturmodell und Domänenarchitektur des RYR1 (modifiziert nach (Zalk et al., 2014)).

A: Frontalansicht des Kalottenmodells des in die Membran eingebetteten RYR1 mit Farbkodierung (Türkis – SPRY Domänen; Rosa – Phosphorylierungsdomänen; Gelb – Calstabin; Blau – N-terminale Domänen; Grün – Brücken-Helix; Rot – Kern-Helix; Lila – EF-Hand-Motiv; Orange – Transmembrandomänen und C-terminale Domänen).

B: Schematischer, 2-dimensionaler Überblick über die Domänenstruktur des RYR mit identischer Farbkodierung.

Die Bildung des sekundären Botenstoffs cADPR hat die Aktivierung der RYR zur Folge. Dieser Effekt wurde in den 1990er Jahren erstmals beschrieben (Lee, 1993; Venturi et al., 2012) und führte zur Frage, ob cADPR direkt oder indirekt über ein Bindeprotein an die RYR bindet. Rekonstitutionsexperimente zeigten, dass cADPR *in vitro* keinen Effekt auf die Öffnungswahrscheinlichkeit von RYR1, RYR2 oder RYR3 hat (Copello et al., 2001; Fruen et al., 1994). Andere Forschungsgruppen konnten zwar einen Anstieg der Öffnungswahrscheinlichkeit beobachten, jedoch nur unter Verwendung nicht-physiologischer cADPR-Konzentrationen (Sitsapesan et al., 1994; Sitsapesan und Williams, 1995). Die Hypothese, dass cADPR über ein Bindeprotein indirekt an die RYR bindet, wurde zuerst 1993 aufgestellt (Walseth et al., 1993). Die damaligen Experimente unter Verwendung einer Photoaffinitätsmarkierung zeigten eine Bindung von cADPR an Proteine der Größe 100 kDa sowie 140 kDa, deren Molekulargewicht damit deutlich geringer ist, als das der RYR. Kürzlich durchgeführte Arbeiten in T-Lymphozyten zeigten, dass das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) das bisher unbekannte Bindeprotein von cADPR ist, das in T-Lymphozyten den cADPR-vermittelten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ beeinflusst (Zhang et al., 2017). GAPDH hat jedoch keinen metabolischen Effekt auf cADPR, sondern ermöglicht nur die Bindung an die RYR.

Ein weiterer sekundärer Botenstoff, dessen Bildung zur Aktivierung der RYR führen kann, ist NAADP. In-Vitro-Untersuchungen konnten zeigen, dass mikromolare NAADP-Konzentrationen RYR2-Kanäle aktivieren und dies eine Ca^{2+} -Freisetzung zur Folge hat (Mojzisoava et al., 2001). Die verwendeten Konzentrationen liegen jedoch deutlich über den intrazellulär vorliegenden Konzentrationen von NAADP (ca. 10 – 100 nM) (Churamani et al., 2004; Gasser et al., 2006). Im Jahr 2002 konnte mithilfe von Einzelkanalmessungen nachgewiesen werden, dass NAADP mit einem EC_{50} von ca. 30 nM die Öffnungswahrscheinlichkeit des RYR1 erhöht (Hohenegger et al., 2002). Dieser Effekt wurde durch Rutheniumrot und Ryanodin blockiert (Hohenegger et al., 2002). Ähnliche Ergebnisse wurden 2004 durch die Mikroinjektion von NAADP in T-Lymphozyten beobachtet, die einen globalen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zur Folge hatten und die durch die Verwendung von Rutheniumrot inhibiert werden konnten (Langhorst et al., 2004). Untersuchungen hinsichtlich des NAADP-vermittelten Ca^{2+} -Signals in primären T-Lymphozyten der Maus konnten schließlich nachweisen, dass das Fehlen des RYR1 zu einem verringerten Ca^{2+} -Signal führt (Wolf et al., 2015). Dementsprechend ist davon auszugehen, dass RYR Zielrezeptoren für NAADP darstellen. Bisher wurde jedoch keine

Bindetasche für NAADP in den RYR nachgewiesen. Daher ist es weiterhin fraglich, ob NAADP direkt an RYR binden kann oder ob für diese Reaktion ein Bindeprotein notwendig ist, welches bisher nicht identifiziert werden konnte (Guse, 2012).

1.4 Die Rolle der Astrozyten bei Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) zählt zu den häufigsten neurologischen Störungen und ist eine chronische inflammatorische Erkrankung des ZNS. Erstmals beschrieben wurde die Krankheit im 18. Jahrhundert und ist charakterisiert durch Läsionen im Gehirn, die durch die Rekrutierung von Immunzellen hervorgerufen werden (Compston et al., 2006a). Sie gilt als Autoimmunerkrankung, die ausgelöst wird, wenn sich T-Lymphozyten gegen körpereigene Proteine der Myelinscheide, z. B. das Myelin-basische Protein, richten. Einhergehend mit dem Durchbrechen der Blut-Hirn-Schranke kommt es zur Infiltration autoreaktiver T-Lymphozyten, die zur Zerstörung der axonalen Myelinscheide führt (Compston et al., 2006b; Wekerle und Lassmann, 2006). Es existieren verschiedene Formen der Krankheit, die entweder schubförmig oder progressiv verlaufen kann (Lassmann et al., 2001).

Bislang wurde davon ausgegangen, dass die Rekrutierung autoreaktiver T-Lymphozyten, im speziellen Th1-Zellen, allein für die Entzündungsreaktionen im Gehirn verantwortlich sei und zur Demyelinierung der Axone führt (Cordiglieri et al., 2010; Lassmann et al., 2001). Jedoch konnte gezeigt werden, dass andere Typen von T-Lymphozyten, sowohl Th2-Zellen als auch Tc1-Zellen, in MS-spezifischen Läsionen ebenfalls zu finden sind (Babbe et al., 2000; Lafaille et al., 1997).

Die Entzündungsreaktion der MS setzt sich aus einer Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen zusammen und macht die Komplexität dieser bislang unheilbaren Erkrankung deutlich. Astrozyten scheinen an der Pathogenese der MS ebenfalls beteiligt zu sein, obwohl lange Zeit nicht in Betracht gezogen wurde, dass diese an Entzündungsreaktionen im ZNS beteiligt sind. Der Nachweis, dass Astrozyten als Primärziel anderer Autoimmunkrankheiten gelten, bei denen es ebenfalls zur Demyelinierung von Axonen kommt, änderte diese Sichtweise jedoch sofort (Brosnan und Raine, 2013; Chung et al., 2015; Wingerchuk, 2007).

Die Forschung zur Beteiligung von Astrozyten an verschiedenen Autoimmunkrankheiten offenbarte eine Vielzahl an Proteinen, die zur Präsentation von Antigenen notwendig sind (Hoftberger et al., 2004). Potenziell besteht daher die Möglichkeit, dass Astrozyten

autoreaktive T-Lymphozyten aktivieren (Hofberger et al., 2004; Nikceвич et al., 1997; Traugott et al., 1986; Zeinstra et al., 2003). Zusätzlich kommt es durch die Sekretion von Chemo- und Zytokinen zur Rekrutierung von Makrophagen und Lymphozyten (Calderon et al., 2006; Miljkovic et al., 2007; Simpson et al., 2000; Sørensen et al., 1999).

Wie in Abschnitt 1.1 bereits beschrieben, ist der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in Astrozyten ein Prozess, der eine Vielzahl an weiteren biochemischen Reaktionen zur Folge hat. Hierzu zählt die regulierte Exozytose von Gliotransmittern, einem Ca^{2+} -abhängigen Vorgang, der durch die Vesikelfusion mit der Plasmamembran charakterisiert ist (Parpura et al., 2010; Parpura et al., 1994). Neben diesem Prozess führt der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in Astrozyten zur Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Phosphatase Calcineurin (CN). Dieses dephosphoryliert nach Ca^{2+} -Bindung den hyperphosphorylierten Transkriptionsfaktor Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT), welcher anschließend in den Zellkern transloziert und dort die Expression einer Vielzahl an Genen reguliert (s. Abbildung 4) (Furman und Norris, 2014). Ein weiterer Transkriptionsfaktor der mithilfe von CN aktiviert wird und anschließend in den Zellkern transloziert, ist der Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B Cells (NF- κ B) (s. Abbildung 4) (Furman und Norris, 2014; Kaltschmidt et al., 2005; Li et al., 2006), dessen Translokation sowohl die Expression von Genen des Major histocompatibility complex (MHC) Klasse I und II zur Folge hat, als auch die Expression der Gene von Chemo- und Zytokinen reguliert (Li et al., 2001; Quinones et al., 2008).

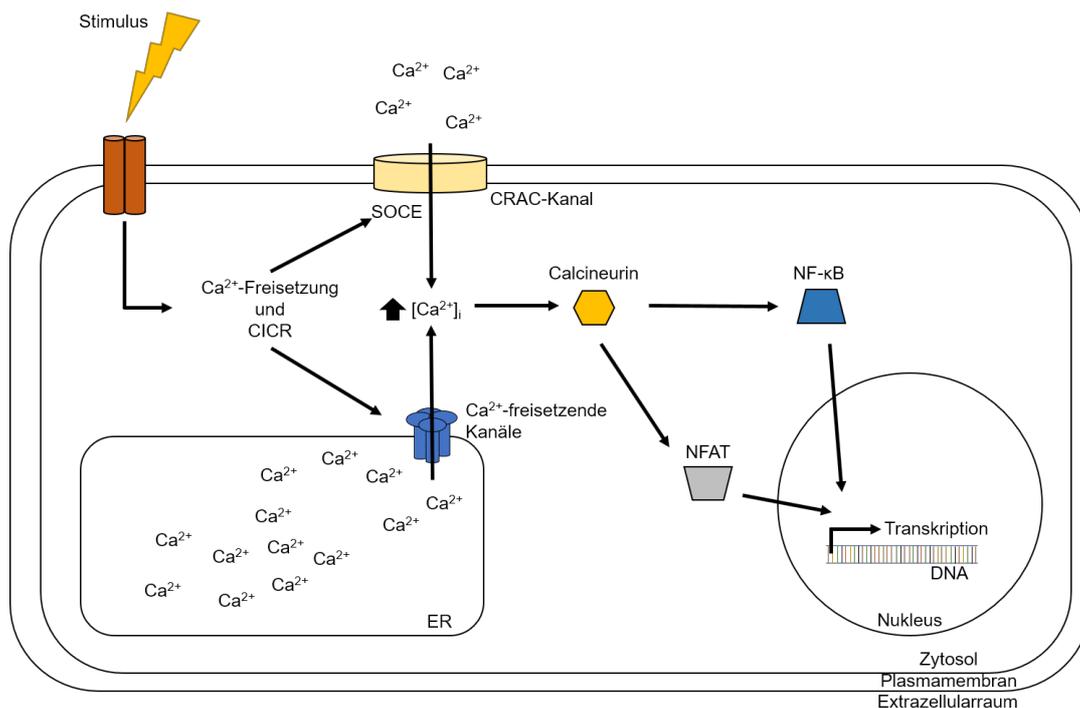


Abbildung 4: Schematischer Überblick der Ca²⁺-vermittelten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT sowie NF-κB in Astrozyten.

Die receptorspezifische Stimulation der Astrozyten führt zur Bildung sekundärer Botenstoffe, die die Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem ER, als auch den CICR zur Folge hat. Dies führt zum ersten Anstieg der [Ca²⁺]_i. Der Abfall der [Ca²⁺]_{ER} führt zum SOCE über in die Plasmamembran eingebettete CRAC-Kanäle, die so den Anstieg der [Ca²⁺]_i verstärkt. Freies im Zytosol befindliches Ca²⁺ kann an verschiedene Proteine binden, wie die Ca²⁺-abhängige Phosphatase Calcineurin (CN). CN kann zum einen den hyperphosphorylierten Transkriptionsfaktor NFAT dephosphorylieren und ermöglicht so, dass dieser in den Nucleus transloziert und dort die Genexpression regulieren kann. CN kann ebenfalls den Transkriptionsfaktor NF-κB aktivieren, der nach seiner Aktivierung auch in den Nucleus transloziert und die Genexpression reguliert.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die RYR sind im ER eingebettete ligandenaktivierte Ca²⁺-Kanäle, von denen bisher nur bekannt ist, dass sie nach ihrer Aktivierung durch die sekundären Botenstoffe cADPR bzw. NAADP oder durch CICR zur Ca²⁺-Freisetzung führen.

Der Knock-out des RYR3 führte in vorherigen Arbeiten zu einem verminderten Clinical Score im Tiermodell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) (von Osten, 2015), erklärbar durch eine verminderte Sekretion von Chemo- und Zytokinen über Astrozyten. Wegen der zunehmend erkennbaren Rolle der Astrozyten im Krankheitsbild der MS, stellte sich die Frage, welche Folgen eine Deletion von RYR3 auf die Signaltransduktion in Astrozyten haben würde. Um dies aufzuklären, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Ca²⁺-Signaltransduktion in Astrozyten untersucht. Es sollte

zunächst geklärt werden, welcher rezeptorspezifische Stimulus zum Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führt, z. B. mithilfe verschiedener pharmakologischer Inhibitoren.

Vergleichende Lebend-Zell-Experimente zwischen Wildtyp (WT)- und RYR3^{-/-}-Astrozyten sollten durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob der Knock-out des RYR3 zu einer Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ führt und wie dieser charakterisiert ist. Um eine Verknüpfung zum Krankheitsbild der MS bzw. der EAE herzustellen, sollte untersucht werden, ob ein pro-inflammatorisches Milieu zu einer Veränderung im ATP-induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führt.

Der abschließende Vergleich zwischen In-vitro- und In-situ-Experimenten in Hirschnitten wurde durchgeführt, um die gemachten Beobachtungen hinsichtlich etwaiger Artefakte durch die Zellkultivierung abzusichern.

2 *Material und Methoden*

2.1 **Zell- und Gewebekultur**

2.1.1 Präparation primärer muriner Astrozyten

Murine Astrozyten wurden wie bereits beschrieben (Tan et al., 1998) aus den Gehirnen neonataler Mäuse (p0 – p2) isoliert. Hierzu wurden die Mäuse dekaptiert und das Gehirn mithilfe einer Pinzette freipräpariert. Das Gehirn wurde in ein Schälchen mit vorgekühltem Eagle's-HEPES-Medium (EH-Medium) (s. Tabelle 1) transferiert. Anschließend wurden die Meningen unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Carl Zeiss Jena, Deutschland) entfernt und das Gehirn in ein sauberes Schälchen mit vorgekühltem EH-Medium transferiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Gehirne zerkleinert und in ein 50 ml-Röhrchen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Es folgte eine Zentrifugation (4 °C, 1200 rpm, 5 min) und die Resuspension in 15 ml 1x Trypsin (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA). Anschließend wurde die Zellsuspension in einem CO₂-Brutschrank bei 37 °C für 20–30 min inkubiert, wobei diese alle 5 min kurz durchmischt wurde. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mittels Astrozyten-Medium (s. Tabelle 1). Die Röhrchen wurden erneut zentrifugiert (4 °C, 1200 rpm, 5 min) und der entstandene Überstand abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde in Astrozyten-Medium resuspendiert und die Zellsuspension mithilfe eines 40 µm-Filters (Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich) filtriert. Das gewonnene Filtrat wurde in eine T75-Polystyrol-Flasche (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) überführt und ab dann fortlaufend in einem CO₂-Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am zweiten Inkubationstag erfolgte ein Wechsel des Mediums. Am vierten Inkubationstag wurde erneut das Medium gewechselt, wobei ein 1:1-Gemisch aus altem und frischem Astrozyten-Medium zu den Zellen gegeben wurde. Nach einer Woche wurden die Zellen abschließend 2 h auf einem Horizontalschüttler bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt und der Überstand verworfen, um die Mikroglia von den Astrozyten zu trennen. Die zurückbleibenden adhären Astrozyten wurden in frischem Astrozyten-Medium weiter kultiviert und für Experimente verwendet.

Die beschriebene Präparation primärer muriner Astrozyten wurde von Mitarbeitern der AG Flügel (Institut für Multiple-Sklerose-Forschung, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt.

2.1.2 Kultivierung und Passage primärer Astrozyten

Die primären Astrozyten wurden bis zu ihrer Verwendung in einer oberflächenbehandelten T75-Polystyrol-Flasche für adhärente Zellen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) in einem CO₂-Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Dies geschah unter Verwendung von Astrozyten-Medium, das alle 2–3 Tage durch frisches Medium ersetzt wurde. Sobald die Astrozyten eine Konfluenz von 85–90 % erreicht hatten, wurden diese passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit 1x DPBS (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) gewaschen, anschließend mit 1x Trypsin bedeckt und für 5 min im CO₂-Brutschrank inkubiert. Die trypsinierte Zellsuspension wurde zentrifugiert (Raumtemperatur (RT), 1200 rpm, 5 min) und erneut in frischem Astrozyten-Medium aufgenommen. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit einer Zelldichte von $0,5 * 10^5$ Zellen/ml in einer neuen T75-Polystyrol-Flasche ausgesät.

2.1.3 Kryokonservierung primärer Astrozyten

Zur dauerhaften Lagerung der primären Astrozyten wurden diese mit 1x DPBS gewaschen, trypsiniert und in frischem Astrozyten-Medium aufgenommen. Es folgte eine weitere Zentrifugation (RT, 1200 rpm, 5 min) mit anschließender Aufnahme der Zellen in ein Einfriermedium (s. Tabelle 1). Die Zellsuspension wurde mit einer Zelldichte von $1 * 10^6$ Zellen/ml in Kryoröhrchen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) aliquotiert, über Nacht bei -80 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.1.4 Präparation akuter muriner Hirnschnitte

Die Präparation akuter Hirnschnitte erfolgte an neonatalen Mäusen (p14 – p18). Hierzu wurden die Mäuse zunächst dekaptiert und das Gehirn in vorgekühlter, CO₂-begaster Präparationslösung (s. Tabelle 1) freipräpariert. Für die Isolation des Cerebellums wurde ein Schnitt sagittal und frontal am Cerebellum durchgeführt und das gelöste Gewebe mittels Spatel entnommen. Die sagittale Schnittfläche wurde dazu verwendet, das Cerebellum auf dem Probenteller des vibrierenden Mikrotoms (VT1000, Leica Biosysteme, Wetzlar, Deutschland) zu fixieren. Es wurden sagittale Schnitte mit einer

Dicke von 250 μm angefertigt, die bis zur weiteren Verwendung in CO_2 -begaster künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) (s. Tabelle 1) gelagert wurden.

Für die Präparation des Bulbus olfactorius wurde dieser frontal vom Hirn getrennt und die Hemisphären durch einen sagittalen Schnitt voneinander gelöst. Die sagittale Schnittfläche wurde dazu genutzt, die einzelnen Hemisphären auf dem Probenteller des vibrierenden Mikrotoms zu befestigen. Es wurden sagittale Schnitte mit einer Schichtdicke von 250 μm angefertigt, die bis zur weiteren Verwendung in CO_2 -begaster ACSF gelagert wurden.

2.1.5 Verwendete Medien und Lösungen

Tabelle 1: Zusammensetzung verwendeter Medien und Pufferlösungen.

Medium / Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Astrozyten-Medium	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (high Glucose 4,5 g/l, Glutamax) 15 % fetales Kälberserum 1 mM Natriumpyruvat 1 mM nicht-essenzielle Aminosäuren 1 mM L-Asparagin 50 μM 2-Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin	Gibco Gibco Gibco Gibco Sigma Aldrich Gibco Gibco Gibco
EH-Medium	13,38 g/l DMEM Pulver 3,7 g/l CH_3COOH 25 mM HEPES	Gibco Sigma Aldrich Carl Roth
Einfriermedium	50 % fetales Kälberserum 30 % Astrozyten Medium 20 % DMSO	Gibco Gibco Sigma Aldrich

ACSF (pH 7,4)	125 mM NaCl 2,5 mM KCl 1,25 mM NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O 26 mM NaHCO ₃ 25 mM D-(+)-Glucose 1 mM MgCl ₂ 2 mM CaCl ₂	Carl Roth Carl Roth Sigma Aldrich Sigma Aldrich Fluka Sigma Aldrich Sigma Aldrich
Präparationslösung (pH 7,4)	83 mM NaCl 2,5 mM KCl 1 mM NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O 26,2 mM NaHCO ₃ 70 mM Sucrose 20 mM D-(+)-Glucose 2,5 mM MgSO ₄ * 7 H ₂ O	Carl Roth Carl Roth Sigma Aldrich Sigma Aldrich Carl Roth Fluka Sigma Aldrich

2.2 Digitale Ca²⁺-Bildgebung

2.2.1 Ca²⁺-Indikatoren

Das grundlegende Prinzip von Ca²⁺-Indikatoren zur Messung der [Ca²⁺]_i beruht auf der Bindung freier Ca²⁺-Ionen, was zur Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften der Ca²⁺-bindenden Moleküle führt. Chemisch synthetisierte Ca²⁺-Indikatoren basieren auf Veränderungen der chemischen Grundstruktur des Ca²⁺-Chelators Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA). Durch Austausch zweier Methylengruppen gegen Benzen bekommt EGTA eine chromophore Eigenschaft und wird zu 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraessigsäure (BAPTA), dem Prototyp der chemisch synthetisierten Ca²⁺-Farbstoffe (Rudolf et al., 2003; Tsien, 1980). Der Vorteil der chemischen Ca²⁺-Indikatoren ist die große Varianz der Dissoziationskonstante K_d bzw. der Assoziationskonstante K_a des Farbstoffs zu Ca²⁺. Durch die Vielzahl an Ca²⁺-sensitiven Farbstoffen, die nur über leichte Strukturänderungen verfügen, ergibt sich ein großes Repertoire an möglichen Substanzen, die die Messung der [Ca²⁺] sowohl im Zytosol, als auch in unterschiedlichen Organellen ermöglichen (Paredes et al., 2008).

Im Allgemeinen wird zwischen ratiometrischen Ca^{2+} -Indikatoren wie Fura-2 und nicht-ratiometrischen Ca^{2+} -Indikatoren wie Fluo-4 unterschieden. Die Bindung von Ca^{2+} bei nicht-ratiometrischen Ca^{2+} -Indikatoren führt zu einem Anstieg der emittierten Fluoreszenz. Die K_d von Fluo-4 beträgt 408 nM und erlaubt theoretisch die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Bereich von 40,8 – 4080 nM (Paredes et al., 2008). Fura-2 zählt zu den ratiometrischen Ca^{2+} -Indikatoren, die nicht direkt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ messen, sondern das Verhältnis von freiem Ca^{2+} zu gebundenem Ca^{2+} darstellen (Grynkiewicz et al., 1985). Fura-2 wird hierzu bei 340 nm und 380 nm angeregt und emittiert Fluoreszenz im Bereich von 510 nm. Mithilfe der 340 nm-Anregung werden alle Farbstoffmoleküle angeregt, die Ca^{2+} gebunden haben (F340). Mithilfe der 380 nm-Anregung erfolgt die Anregung der Ca^{2+} -freien Farbstoffmoleküle (F380) (s. Abbildung 5)

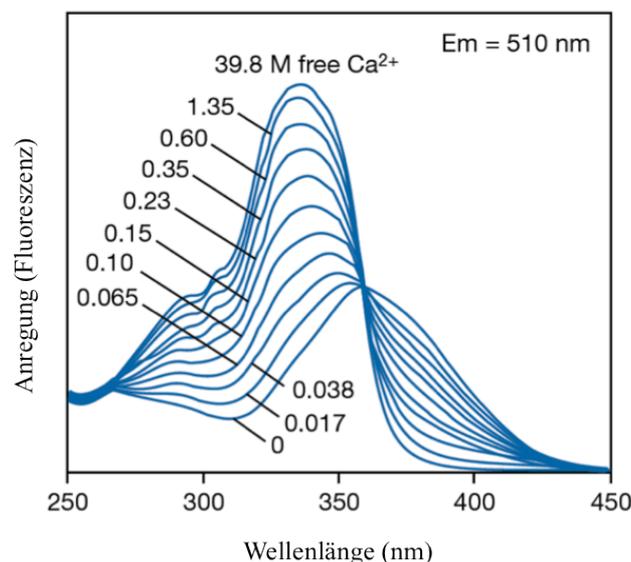


Abbildung 5: Fluoreszenzspektrum des Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffs Fura-2 (modifiziert nach (Johnson, 2010)).

Verlauf der Fura-2-Fluoreszenz unter Verwendung verschiedener Ca^{2+} -Konzentrationen. Anregung der Ca^{2+} -gebundenen Farbstoffmoleküle bei 340 nm Wellenlänge und Anregung der Ca^{2+} -freien Farbstoffmoleküle bei 380 nm Wellenlänge. Die Emission wird bei 510 nm gemessen.

Die Berechnung des Verhältnisses von F340/F380 ermöglicht so unter Verwendung bereits kalibrierter Werte den Rückschluss auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die K_d von Fura-2 beträgt 224 nM (Grynkiewicz et al., 1985) und erlaubt theoretisch die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Bereich von 22,4 – 2240 nM (Paredes et al., 2008).

Die Veresterung der Indikatoren mit AcetoxyMethyl-Gruppen (AM-Gruppen) führt zu einer Neutralisierung der Ladung (Tsien, 1981). Diese Neutralisierung ermöglicht die freie Diffusion des Ca^{2+} -Indikators über die Plasmamembran. Intrazellulär werden die AM-Gruppen der Moleküle mithilfe unspezifischer Esterasen abgespalten, was dazu

führt, dass das Fluorophor wieder geladen vorliegt und nicht über die Plasmamembran aus der Zelle diffundieren kann.

2.2.2 Beladung primärer Astrozyten mit Ca²⁺-Indikatoren

Zur Beladung mit Ca²⁺-Indikatoren wurden die kultivierten primären Astrozyten, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, zunächst gewaschen und trypsinisiert. Anschließend erfolgte die Zellzählung mittels einer Neubauer-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland). Die Astrozyten wurden mit einer Zelldichte von 0,7 - 1,0 * 10⁴ Zellen/Kavität auf Zellkultur-Objektträger (8-Well- μ -slides, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) in Astrozyten-Medium ausgesät. Die Platten wurden bis zum Experiment im CO₂-Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert, sodass die Zellen adhären konnten. Für die Messungen des globalen Ca²⁺-Signals wurden die Astrozyten mit dem membrangängigen Farbstoff Fura-2-AM (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) beladen. Für die Beladung wurden die Astrozyten mit 10 μ M Fura-2-AM im Beladungsmedium (s. Kapitel 2.2.5, Tabelle 2) für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Extrazellulärpuffer (s. Kapitel 2.2.5, Tabelle 2) gewaschen und 150 μ l frischer Puffer zur Messung hinzugegeben.

Zur Betrachtung lokaler Ca²⁺-Signale wurde eine Farbstoffkombination aus Fluo-4-AM (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und Fura-Red-AM (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet, die eine zeitlich hochaufgelöste Messung von Ca²⁺-Signalen ermöglicht (Wolf et al., 2015). Hierfür wurden die Astrozyten wie beschrieben ausgesät und mit 10 μ M Fluo4-AM und 20 μ M Fura-Red-AM im Beladungsmedium für 30 min bei RT inkubiert. Nach 30 min wurde die Farbstoffkonzentration durch Zugabe von Beladungsmedium auf 5 μ M Fluo4-AM und 10 μ M Fura-Red-AM verdünnt und die Zellen für weitere 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Extrazellulärpuffer gewaschen und 150 μ l frischer Puffer zur Messung hinzugegeben.

2.2.3 Ca²⁺-Messungen an primären Astrozyten

Die beladenen primären Astrozyten wurden mithilfe von Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie gemessen. Die 8-Well- μ -slides wurden mit Klebeband auf einem inversen Mikroskop (DM IRE2, Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) befestigt.

Mithilfe eines Wellenlängen-Wechslers (Lambda DG-4, Sutter Instruments, Novato, USA) wurde durch eine Xenon-Bogenlampe und einen Anregungsfilter, monochromatisches Licht erzeugt, das entlang des Lichtleiters durch den Kondensator in den Strahlengang des Mikroskops geführt wurde. Der Lichtstrahl wurde mit einem dichroischen Spiegel geteilt und durch das Objektiv auf die Probe gelenkt. Das emittierte Licht passierte anschließend das Objektiv, den dichroischen Filter und wurde durch einen Emissionsfilter am optischen Ausgang des Mikroskops auf eine EMCCD-Kamera (engl. Electron multiplying charge-coupled device, Modell C9100-02, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching, Deutschland) oder auf das Okular des Mikroskops gelenkt (s. Abbildung 6).

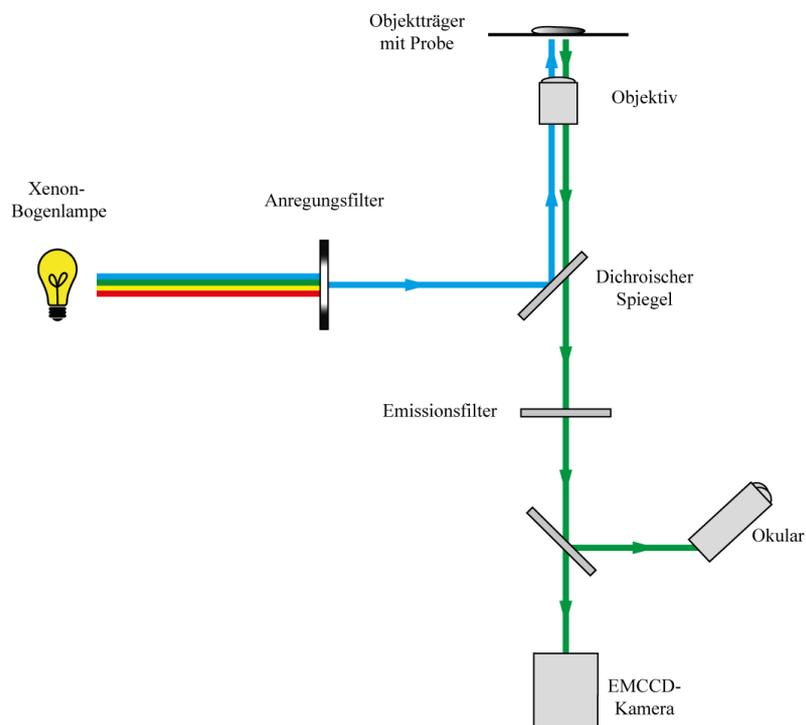


Abbildung 6: Schema des Lichtwegs bei der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie.

Das erzeugte Licht einer Xenon-Bogenlampe wird entlang eines Anregungsfilters sowie eines dichroischen Spiegels auf den Objektträger gelenkt (blaue Linie). Die in der Probe befindlichen angeregten Farbstoffmoleküle emittieren Fluoreszenz, die durch den dichroischen Spiegel über einen Emissionsfilter entweder auf eine EMCCD-Kamera oder auf das Okular gelenkt wird (grüne Linie).

Die Messungen wurden computergestützt mit einem Mac G5 (Apple, Cupertino, USA) und der Software Volocity 6.2.2 (PerkinElmer, Waltham, USA) aufgezeichnet. Die Software erlaubte hierbei die Steuerung aller an der Messung beteiligten Komponenten.

Messung globaler Ca^{2+} -Signale mit dem Ca^{2+} -Indikator Fura-2-AM

Zur Messung globaler Ca^{2+} -Signale der mit Fura-2-AM beladenen Astrozyten, wurden diese mithilfe der in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Für die Messung wurde das Licht des Wellenlängen-Wechslers abwechselnd durch die Anregungsfilter BrightLine HC340/26 (AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) und BrightLine HC387/11 (AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) gelenkt. Im Mikroskop wurde der dichroische Filter bs400DCLP (AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) und der Emissionsfilter em510/84 (AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) verwendet. Mithilfe der Software Volocity wurden die Messungen mit einem 40x-Objektiv durchgeführt. Die Messdauer betrug 12 min, und es wurde alle 2 s ein Bild bei 340 nm-Anregung sowie bei 380 nm-Anregung aufgenommen. Die Messung erfolgte unter weiteren Messparametern wie einer Belichtungszeit von 50 ms, 2x-Binning, 100 % Output und einer Sensitivität von 101. Aufgrund des 2x-Binnings betrug die Größe des Sichtfelds 500x500 Bildpunkte. Durch die Verwendung des 40x-Objektivs ergab sich eine Kantenlänge von 0,38298 μm /Bildpunkt. Eine Minute nach Beginn der Messung erfolgte der Stimulus, und nach 10 min wurde 1,6 μM Thapsigargin (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) als Kontrollsubstanz zugegeben. Bei Thapsigargin handelt es sich um einen nicht-kompetitiven Inhibitor der SERCA (Lytton et al., 1991). Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass die Verwendung von Thapsigargin als nicht-kompetitiver Inhibitor der SERCA zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führt und sich als Kontrollsubstanz eignet (Ali et al., 1985; Treiman et al., 1998).

Auswertung globaler Ca^{2+} -Messdaten

Die erzeugten Messdaten wurden mittels Openlab 5.5.2 (Improvision, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet. Das in Volocity erzeugte Bilderverhältnis der Fluoreszenz bei 340 nm Anregung und der Fluoreszenz bei 380 nm Anregung wird als Ratio-Bild bezeichnet, das jedoch nur der Orientierung während der Messung diene. Die Software Openlab ermöglichte die Berechnung von Ratio-Bildern mit gleichzeitiger

Hintergrundkorrektur. Hierbei wurde jedoch kein gemittelter Grauwert vom Gesamtbild abgezogen, sondern es wurde zu Beginn und am Ende der Messung ein Schwellenwert der Lichtintensität beider Wellenlängen definiert, der sich am Durchlichtbild der Zelle orientierte. Dies war wichtig, da der Ca^{2+} -Indikator Fura-2 während der Messung leicht bleicht. Die erzeugten Ratio-Bilder wurden anschließend mit einem Medianfilter (3x3 Bildpunkte) angepasst. Dieser nicht-lineare Rangordnungsfilter erlaubt die Minimierung des Rauschens in einem Bild, durch die Sortierung der Werte der umliegenden Bildpunkte eines einzelnen Bildpunkts (Oberholzer et al., 1996). Hierbei wird der Ratio-Wert des zentralen Bildpunkts durch den Median aller umliegenden Ratio-Werte ersetzt (Kunerth et al., 2003).

Die Quantifizierung der Ratio-Werte wurde ebenfalls mittels Openlab durchgeführt. Hierzu wurde um die gesamte Zelle ein sogenannter Interessensbereich (engl. Region of Interest, ROI) gelegt. Die Software konnte das mittlere Verhältnis der gesetzten ROI bestimmen, das anschließend gegen die Zeit aufgetragen wurde und so einen Überblick über den Verlauf des Verhältnisses ermöglicht. Die Umrechnung der Ratio-Werte in die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erfolgte anhand der Formel (1) (Grynkiewicz et al., 1985).

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d * \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) * \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad (1)$$

Für die Bestimmung des maximalen (R_{\max}) und des minimalen Verhältnisses (R_{\min}) musste eine Kalibrierung durchgeführt werden. Zur Bestimmung von R_{\max} wurden die Astrozyten mit 4 μM Ionomycin für 5 min bei RT inkubiert. Dieses Ca^{2+} -Ionophor macht die Plasmamembran durchlässig für Ca^{2+} -Ionen, was zur vollständigen Sättigung des intrazellulären Fura-2 führt. Für die Bestimmung des R_{\min} musste das gesamte Ca^{2+} durch Verwendung des Chelators EGTA komplexiert werden. Nach Zugabe von 4 mM EGTA wurden die Zellen für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 4 μM Ionomycin zugegeben und die Zellen für weitere 5 min bei RT inkubiert. Dies führte dazu, dass ebenfalls das in den Zellen vorhandene Ca^{2+} durch EGTA komplexiert wurde (Guse et al., 1993). Die Messung sowohl unter Ca^{2+} -gesättigten Bedingungen als auch unter Abwesenheit von Ca^{2+} wurde mit den gleichen Messparametern wie oben beschrieben durchgeführt.

Berechnung verschiedener Parameter

Anhand der kalibrierten globalen Ca^{2+} -Messdaten wurden mithilfe der Software Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) folgende Parameter berechnet: die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die Amplitude, Time to Peak sowie das Δ -Plateau (s. Abbildung 7).

Die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde dabei als Mittelwert der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vor Applikation des Stimulus (60 s) definiert. Die Amplitude beschrieb den maximalen Ausschlag der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ abzüglich der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$, der während der Messung nach Applikation des Stimulus erreicht wurde. Als Time to Peak wurde die Zeitspanne bezeichnet, die nach Stimulation (60 s) verging, bis die Amplitude erreicht wurde. Das Δ -Plateau wurde als die gemittelte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ definiert, die sich 200 – 400 s nach Erreichen der Amplitude einstellte.

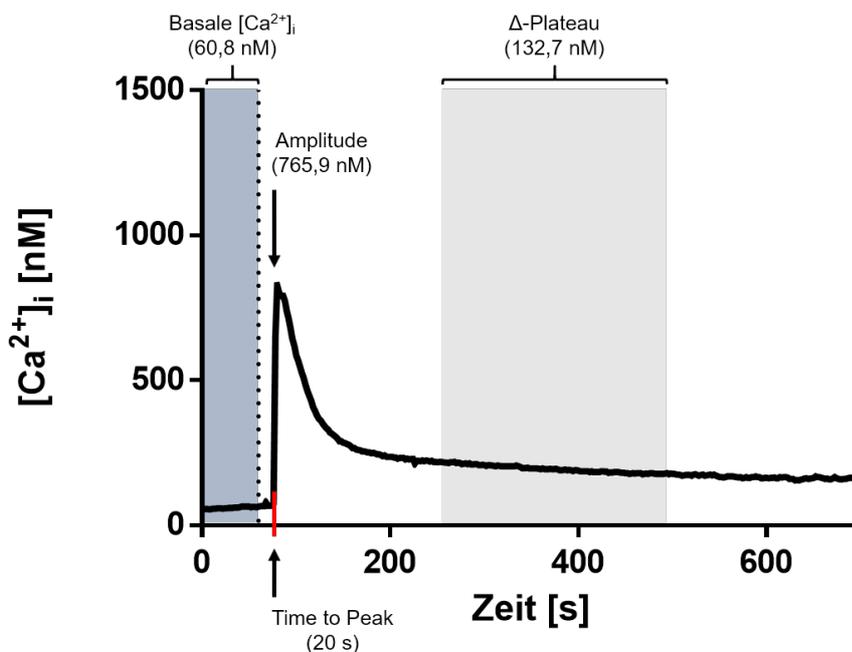


Abbildung 7: Parameterberechnung globaler Ca^{2+} -Messdaten.

Beispielhafter Verlauf einer globalen Ca^{2+} -Messung. Aufgetragen sind die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gegen die Zeit. Mithilfe der Software Excel konnten die Parameter basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$, Amplitude, Time to Peak und das Δ -Plateau berechnet werden. Die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (blaugrauer Bereich) stellt den Mittelwert der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vor Applikation des Stimulus nach 60 s (gestrichelte Linie) dar. Die Amplitude beschreibt den höchsten Wert der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation des Stimulus, abzüglich der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die Time to Peak ist die Zeitspanne, die nach Stimulation (60 s) verging, bevor die Amplitude erreicht wurde. Das Δ -Plateau (hellgrauer Bereich) bezeichnet den Mittelwert der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ abzüglich der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$, der sich 200 – 400 s nach Erreichen der Amplitude einstellte.

Messung lokaler Ca^{2+} -Signale

Zur Messung der mit Fluo-4-AM und Fura-Red-AM beladenen Astrozyten wurden diese mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Das Licht des Wellenlängen-Wechslers wurde durch einen Anregungsfilter BrightLine HC472/30 (AHF Analystechnik, Tübingen, Deutschland) gelenkt. Im Mikroskop wurde der dichroische Filter bs495 (AHF Analystechnik, Tübingen, Deutschland) verwendet. Das von der Probe emittierte Licht wurde kurz vor der EMCCD-Kamera durch einen Emissionstrahlteiler (sog. DualView, PerkinElmer, Waltham, USA) gelenkt. Im DualView befindet sich ein Strahlenteiler, der durch entsprechende Emissionsfilter das emittierte Licht der Probe entsprechend der Filtereigenschaften aufteilt. Bei den Messungen der lokalen Ca^{2+} -Signale wurden Emissionsfilter für 542/50 nm (Fluo-4) und für 650/57 nm (Fura Red) verwendet. Durch den verwendeten Strahlenteiler, wird der Kamerachip jeweils zur Hälfte mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge beleuchtet. Eine Hälfte detektierte das emittierte Licht von Fluo-4 und die andere das emittierte Licht von Fura Red. Dementsprechend verringerte sich die Größe des Sichtfelds auf 250x500 Bildpunkte. Mit Volocity wurden die Messungen mit einem 40x-Objektiv aufgezeichnet. Die Messdauer betrug 5 min. Zur Bestimmung der basalen $[Ca^{2+}]_i$ wurde in der ersten Minute alle 5 s ein Bild aufgezeichnet. Nach einer Minute erfolgte die Zugabe des Stimulus, und es wurde auf die maximale Aufnahmegeschwindigkeit der Kamera gewechselt. Die weiteren Parameter der Messung beinhalteten eine Belichtungszeit von 25 ms, 2x-Binning, 100 % Output und eine Sensitivität von 101. Aufgrund der Belichtungszeit ergab sich eine Aufnahmegeschwindigkeit von 38,5 Zeitpunkten pro Sekunde.

Auswertung lokaler Ca^{2+} -Messdaten

Die erzeugten Messdaten wurden mit Fiji 1.51p (Schindelin et al., 2012) sowie Openlab 5.5.2 ausgewertet. Das aufgenommene Sichtfeld von 500x500 Bildpunkten wurde mithilfe von Fiji in zwei Teilbereiche mit einer Größe von je 250x500 Bildpunkten geteilt. Ein Teilbereich entsprach der aufgenommenen Fluoreszenz von Fluo-4 und der andere Teilbereich der aufgenommenen Fluoreszenz von Fura Red. Anschließend wurde eine Hintergrundkorrektur vorgenommen. Als Hintergrund wurde ein Bereich außerhalb der Zelle definiert, dessen gemittelte Graustufenwerte dem gemittelten Hintergrundrauschen

entsprachen. Der gemittelte Wert wurde von allen aufgenommenen Bildpunkten abgezogen.

Im Allgemeinen unterliegt der Ca^{2+} -Indikator Fura Red einem starken Bleicheffekt während Fluoreszenzmessungen. Dieser Bleicheffekt verläuft wie eine exponentielle Funktion und kann mithilfe einer exponentiellen Korrektur ausgeglichen werden (Vicente et al., 2007). Die so korrigierten Daten wurden mit Openlab 5.5.2 zusammengeführt und die Einzelbilder dekonvolviert. Als Algorithmus wurde die in Openlab implementierte *No Neighbor*-Dekonvolution verwendet. Dieser Algorithmus dient dazu, einen Teil des Streulichts aus dem Originalbild herauszurechnen. Im Rahmen der Korrekturen wurden so 20 % des Streulichts aus dem Bild herausgerechnet (*removal* 0,2) und die detektierten Signale mit dem Faktor 45 verstärkt (*gain* 45). Im nächsten Schritt wurden die Aufnahmen desselben Sichtbereiches von Fluo-4 und Fura Red durch Korrektur der X- und Y-Lokalisation bestmöglich in Übereinstimmung zueinander gebracht (Registrierung). Anhand der dekonvolvierten und registrierten Bilder wurde in Openlab das Verhältnis von Fluo-4 zu Fura Red berechnet. Die Ratio-Bilder wurden anschließend mit einem Medianfilter (3x3) angepasst.

Zur Quantifizierung wurden gewünschte ROIs gesetzt und das mittlere Verhältnis von Fluo-4 zu Fura Red bestimmt. Die ermittelten Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen und ermöglichten den Überblick über den zeitlichen Verlauf des Verhältnisses. Die Umrechnung der Ratio-Werte in die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt.

2.2.4 Ca^{2+} -Messungen an akuten Hirnschnitten der Maus

Beladung akuter Hirnschnitte mit Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen

Die in CO_2 -begaster ACSF gelagerten Hirnschnitte des Cerebellums bzw. des Bulbus olfactorius wurden für die Betrachtung der Ca^{2+} -Homöostase mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fluo-4-AM beladen. Hierzu wurden die angefertigten Schnitte in ein Schälchen mit 2 μM Fluo-4-AM in ACSF transferiert und für 45 min unter CO_2 -Begasung bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die beladenen Hirnschnitte kurz in ACSF gewaschen und bis zur Verwendung im Dunkeln gelagert.

Mikroskopische Ca^{2+} Messung an akuten Hirnschnitten

Die akuten Hirnschnitte wurden in einer Messkammer platziert und mit einem Nylonnetz fixiert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Mikroskop (C1 Eclipse, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) angefertigt. Zur Anregung des Ca^{2+} -Indikators Fluo-4 wurde ein Laser mit 488 nm Wellenlänge mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 0,3 – 0,5 Bildern/s verwendet. Der komplette Aufbau wurde mit der Software EZ-C1 (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) gesteuert. Die Messdauer betrug 10 min, und es wurde alle 3 s mit einer Bildrate von 0,5 Bildern/s ein Bild aufgenommen. Während der Messungen wurden die Hirnschnitte mit frischer CO_2 -begaster ACSF perfundiert. Nach 2 min erfolgte der Stimulus mit 30 μ M ATP in ACSF für 1 min. Anschließend wurden die Zellen bis zum Ende der Aufnahme wieder mit ACSF perfundiert.

Auswertung der Ca^{2+} -Messungen an akuten Hirnschnitten

Um die Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ zu messen, wurden die angefertigten Aufnahmen mit der Software EZ-C1 Viewer (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) analysiert.

Bei den Hirnschnitten des Cerebellums wurden die Bergmann-Glia betrachtet, ein spezieller Typ von Astrozyten, der nur im Kleinhirn zwischen den Purkinjezellen zu finden ist. In den Hirnschnitten des Bulbus olfactorius wurden die glomerulären Astrozyten betrachtet, welche die Glomeruli umlagern. Das Soma der Zellen wurde mit einer ROI umkreist und die Änderung der Fluo-4-Fluoreszenz über die Zeit gemessen. Die gemessene Fluoreszenz (F) wurde gegen den gemittelten Nullwert der Fluoreszenz (F_0) normalisiert. F_0 wurde hierbei aus den ersten 10 aufgenommenen Bildern vor Zugabe gemittelt. Die berechnete Änderung der Fluoreszenz F/F_0 wurde anschließend gegen die Zeit aufgetragen. Dies erlaubt die Betrachtung der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ im Soma der Bergmann-Glia und der glomerulären Astrozyten.

2.2.5 Verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

Medium/Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Extrazellulärpuffer	140 mM NaCl	Fluka
	5 mM KCl	Merck
	1 mM MgSO ₄	Merck
	1 mM CaCl ₂	Merck
	1 mM NaH ₂ PO ₄	Merck
	5,5 mM D-Glukose	Merck
	20 mM HEPES	Carl Roth
Beladungsmedium	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (high Glucose 4,5g/l, Glutamax)	Gibco
	7,5 % Neugeborenes Kälberserum	Gibco

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Pharmakologische Charakterisierung

Mit Fura-2-AM beladene Astrozyten wurden, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, hinsichtlich der globalen Ca²⁺-Signale untersucht. Zur Aufklärung der beteiligten sekundären Botenstoffe und sich anschließender Signalwege wurden die murinen Astrozyten vor Beginn der Messung für die in Tabelle 3 angegebene Zeit mit den dort gelisteten pharmakologischen Antagonisten behandelt.

Tabelle 3: Verwendete pharmakologische Antagonisten zur Charakterisierung der Ca²⁺-Signaltransduktion.

Antagonist	Zeit (min)	[c]	Ziel	Hersteller	Referenz
8-Br-cADPR	15	200 µM	cADPR-Signalweg	Biolog	(Walseth und Lee, 1993)
BZ194	60	1 mM	RYR	B. Zhang	(Dammermann et al., 2009)

Synta66	15	5 μ M	SOCE (CRAC)	Sigma- Aldrich	(Ng et al., 2008)
U-73122	15	4 μ M	PLC	Calbiochem	(Bleasdale et al., 1990)
U-73343	15	4 μ M	PLC (inaktive Substanz)	Calbiochem	(Bleasdale et al., 1990)

2.3.2 Präparation der Gesamt-RNA aus primären Astrozyten

Primäre Astrozyten wurden auf 24-Well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit einer Zelldichte von 10^5 Zellen/Kavität in Astrozyten-Medium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt. Bei Experimenten unter pro-inflammatorischen Bedingungen wurde das Medium am Vortag auf ein Medium mit 1 ng/ml Interferon γ (IFN γ) (Peprotech, Hamburg, Deutschland) und 1 ng/ml Tumor Necrosis Factor α (TNF α) (Peprotech, Hamburg, Deutschland) gewechselt. Am Tag des Versuchs wurde das Medium abgenommen und die Zellen mehrfach mit 1x DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 μ l TriFast™ (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland).

Durch Auf- und Abpipettieren und mechanisch mithilfe einer Pipettenspitze wurden die Zellen vom Boden der Kavität gelöst. Das Gesamtvolumen wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß übertragen und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 μ l Chloroform und ein Durchmischen der Proben für 15 s. Nach einer Inkubation bei RT für 10 min wurden die Proben zur Phasentrennung für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthielt die Ribonukleinsäuren (RNA) und wurde vollständig in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der RNA mittels NucleoSpin®-Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) wie im Protokoll des Herstellers (Stand 2016) beschrieben. Die Qualität der RNA und die gewonnene RNA-Menge wurden mithilfe eines NanoDrop1000 (Thermo Scientific, Waltham, USA) bestimmt.

2.3.3 Synthese von cDNA

Um eine Aussage über die Expression bestimmter Gene treffen zu können muss die aufgereinigte RNA zunächst in die komplementären Desoxyribonukleinsäuren (DNA) (engl. complementary DNA, cDNA) umgeschrieben werden. Die präparierte RNA aus primären Astrozyten wurde mithilfe des sogenannten High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, USA) gemäß den Herstellervorgaben umgeschrieben. Es wurde 1 µg der RNA als Ausgangsmaterial eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem sogenannten Thermocycler (Analytik Jena, Jena, Deutschland) mit dem Standardprotokoll (s. Tabelle 4) durchgeführt.

Tabelle 4: Programmablauf zur Synthese von cDNA.

	Temperatur	Zeit
Schritt 1	25 °C	10 min
Schritt 2	37 °C	120 min
Schritt 3	85 °C	5 min
Schritt 4	4 °C	∞

2.3.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Die synthetisierte cDNA wurde als Ausgangsmaterial für die quantitative Echtzeit-PCR (engl. quantitative Real-Time PCR, qRT-PCR) eingesetzt, eine Methode die zur Vervielfältigung von DNA und zur gleichzeitigen Expressionsanalyse bestimmter Genabschnitte zum Einsatz kommt. Hierbei wurden sogenannte Assay-on-Demand-Primer (AoD-Primer) (s. Tabelle 5) (Applied Biosystems, Foster City, USA) genutzt. Die qRT-PCR wurden mithilfe des TaqMan Gen Expression Analyse Systems (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Ein wichtiger Wert, der bei der qRT-PCR bestimmt wird ist der Ct-Wert (engl. cycle threshold, Ct), als Maß für den Beginn des exponentiellen Wachstums. Die Ct-Werte der einzelnen Gene wurden auf das Haushaltsgen ‚TATA-binding protein‘ (*Tbp*) normalisiert. Mithilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode wurden die Veränderungen der Genexpression berechnet (Livak und Schmittgen, 2001).

Tabelle 5: Verwendete AoD-Primer für die qRT-PCR.

Gen / Primername	Spezies	AoD ID	Hersteller
<i>Tbp</i>	<i>Mus musculus</i>	Mm00446973_m1	Applied Biosystems
<i>Ryr1</i>	<i>Mus musculus</i>	Mm01175211_m1	Applied Biosystems
<i>Ryr3</i>	<i>Mus musculus</i>	Mm01328421_m1	Applied Biosystems
<i>Gfap</i>	<i>Mus musculus</i>	Mm01253033_m1	Applied Biosystems
<i>P2Ry1</i>	<i>Mus musculus</i>	Mm00435471_m1	Applied Biosystems
<i>P2Ry2</i>	<i>Mus musculus</i>	Mm00435472_m1	Applied Biosystems
<i>P2Ry4</i>	<i>Mus musculus</i>	Mm00445136_s1	Applied Biosystems

2.4 Statistik

Für die statistische Analyse wurde das Programm GraphPad Prism Version 6.0f (GraphPad Software, La Jolla, USA) verwendet. Alle ermittelten Daten wurden zunächst hinsichtlich ihrer Normalverteilung überprüft.

Zur Berechnung des Signifikanzniveaus zweier Datenwerte wurde bei der Normalverteilung ein ungepaarter *t-Test* mit *Welch*-Korrektur durchgeführt. Lag keine Normalverteilung der Datenpunkte vor, wurde ein nicht-parametrischer *Mann-Whitney-U-Test* durchgeführt.

Bei Mehrfachtestungen von mehr als zwei Datenwerten, wurde bei Normalverteilung eine *One-Way-Anova* mit *Bonferroni-Holm*-Korrektur zur Bestimmung der Signifikanz verwendet. Lag keine Normalverteilung vor, wurde ein nicht-parametrischer *Kruskal-Wallis-Test* mit *Dunn-Sidak*-Korrektur genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 ATP führt zum Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten

Astrozyten verfügen über eine Vielzahl an Kanälen, deren Stimulation einen transienten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zur Folge haben kann. Zunächst wurden zur Untersuchung der Ca^{2+} -Signaltransduktion in murinen Astrozyten verschiedene Stimuli einzelner Rezeptoren eingesetzt.

Die Stimulation muskarinergere Rezeptoren nach Applikation von 5 μ M Carbachol (Beier und Barish, 2000) sowie die Stimulation der Bk-R nach Verwendung von 10 μ M Bradykinin (Stephens et al., 1993) führte zu keinem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (s. Abbildung 8). Die Applikation von 10 μ M Histamin zur Aktivierung der H-R (Lucherini und Gruenstein, 1992) sowie die Stimulation der mGluR1 und mGluR5 durch Applikation von 10 μ M DHPG (Muyderman et al., 2001) hatte ebenfalls keinen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zur Folge.

Bei der Anwendung von 10 μ M 2-MeSADP (Domercq et al., 2006) als Agonist für die P2Y₁-, P2Y₁₂- und P2Y₁₃-Rezeptoren sowie 1 μ M MRS2365 als selektiver P2Y₁-Agonist (Ravi et al., 2002) konnte ebenfalls kein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet werden.

Im Vergleich hierzu führte die Applikation von 30 μ M ATP zu einem transienten Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$. Vor Applikation von ATP betrug die $[Ca^{2+}]_i$ der Astrozyten 123 ± 8 nM (n=17, Mittelwert \pm SEM). Bereits 24 s nach Zugabe von ATP kam es zu einem steilen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, der nach 40 ± 28 s einen Maximalwert von 495 ± 117 nM erreichte. Anschließend verringerte sich die $[Ca^{2+}]_i$ stetig und betrug 200 – 400 s nach Erreichen der Amplitude einen Wert von 147 ± 21 nM.

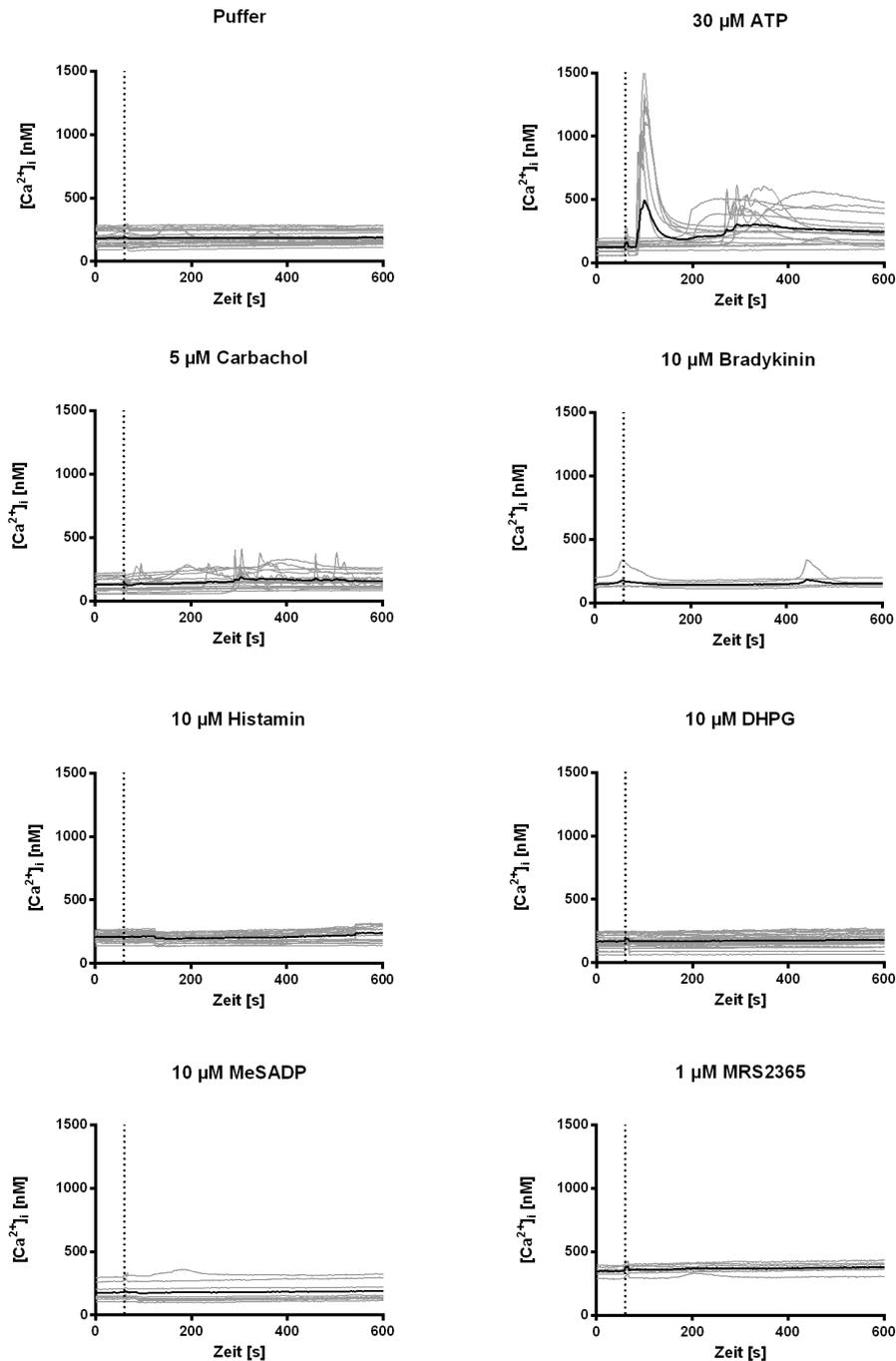


Abbildung 8: Ca^{2+} -Messungen an murinen Astrozyten unter Verwendung rezeptorspezifischer Agonisten.

Die mit Fura-2-AM beladenen Astrozyten wurden mithilfe von Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich eines durch die Zugabe verschiedener Agonisten ausgelösten Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ untersucht. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ einzelner Zellen (graue Linien) und der aus den Einzelmessungen gemittelte Verlauf (schwarze Linie). Die Zugabe erfolgte nach 60 s (gepunktete Linie). Es wurde die folgende Anzahl an Zellen untersucht: Puffer ($n = 26$), $30 \mu\text{M}$ ATP ($n = 17$), $5 \mu\text{M}$ Carbachol ($n = 16$), $10 \mu\text{M}$ Bradykinin ($n = 11$), $10 \mu\text{M}$ Histamin ($n = 15$), $10 \mu\text{M}$ DHPG ($n = 23$), $10 \mu\text{M}$ MeSADP ($n = 9$), $1 \mu\text{M}$ MRS2365 ($n = 8$).

3.2 Charakterisierung des Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten

Die basale $[Ca^{2+}]_i$ der murinen Astrozyten vor der Applikation von ATP betrug 129 ± 7 nM ($n = 16$, Mittelwert \pm SEM). Nach Stimulation betrug die Amplitude 685 ± 146 nM. Im Durchschnitt benötigten die Zellen 74 ± 24 s um nach der Zugabe von ATP diesen Wert zu erreichen. Nach dem Abfall des Maximalwerts der $[Ca^{2+}]_i$ betrug das Δ -Plateau 112 ± 16 nM. Im Vergleich kam es durch die Applikation von Puffer zu keinem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (s. Abbildung 9A).

Im sogenannten Framescan eines repräsentativen Astrozyten (s. Abbildung 9B) war vor der Zugabe von ATP (-10 s) gut zu erkennen, dass sich der Ca^{2+} -Indikator homogen um den Bereich des Zellkerns verteilt hatte. Nach Applikation von ATP (Zeitpunkt 0 s) dauerte es bei der dargestellten Zelle ca. 110 s bis die Amplitude erreicht wurde. Hier ist zu erkennen, dass vor allem im perinukleären Bereich (weiße Pfeile) eine höhere $[Ca^{2+}]_i$ erreicht wurde als im peripheren Zellbereich. Im späteren Verlauf der Messung (280 s) fallen diese perinukleären Anstiege wieder ab und die $[Ca^{2+}]_i$ ist in der kompletten Zelle konstant. Kurz vor Abschluss der Messung (420 s) ist zu erkennen, dass die $[Ca^{2+}]_i$ im Bereich des Zellkerns wieder stärker reguliert wird (weißer Pfeil), da sie hier niedriger ist, als in umliegenden Bereichen der Zelle.

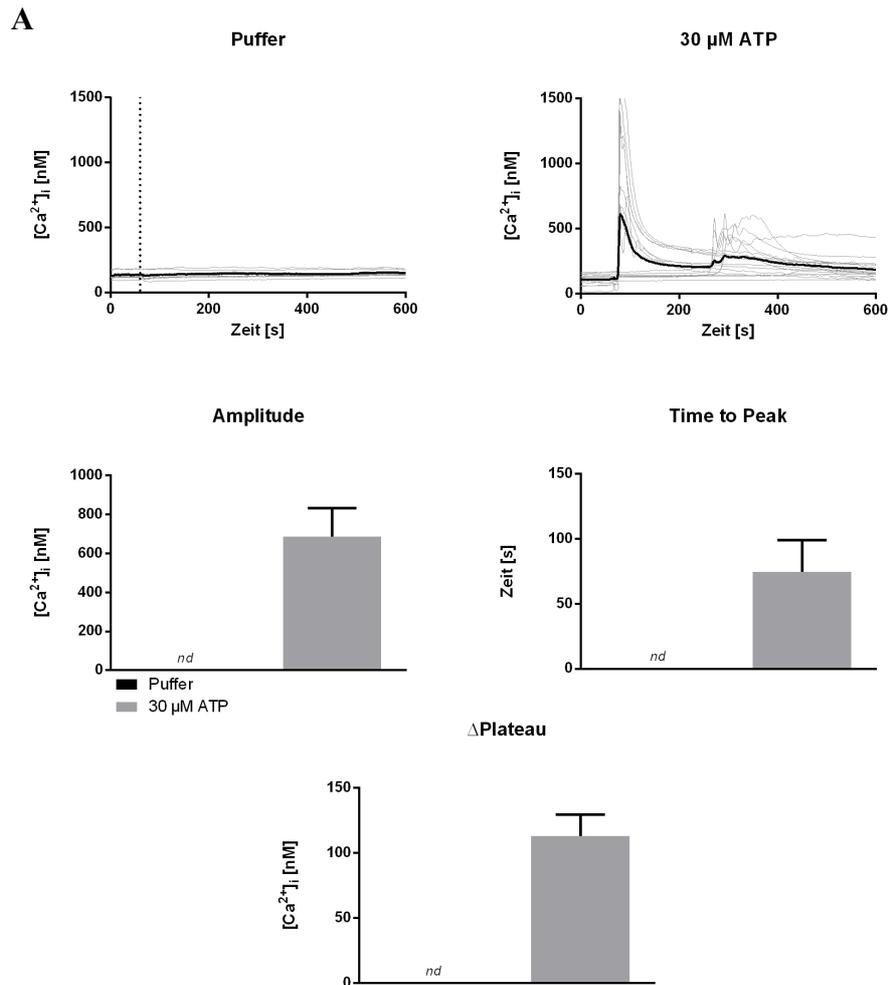
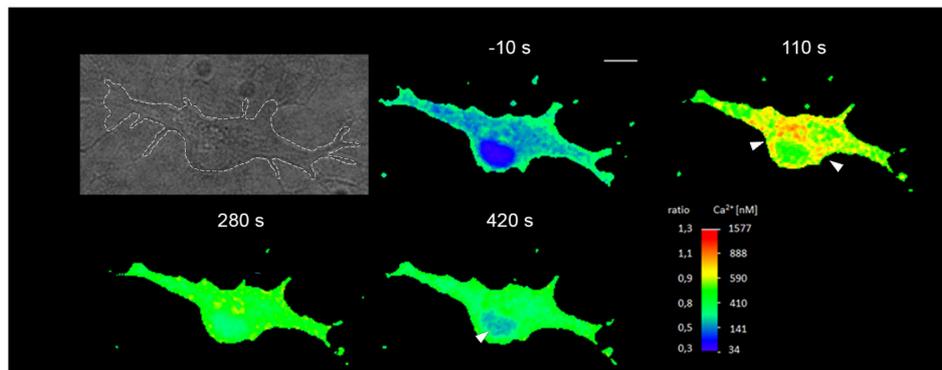
**B**

Abbildung 9: Charakterisierung des durch ATP ausgelöstes Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$.

A Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ der Fura-2-AM beladenen Astrozyten nach Zugabe von Puffer oder 30 μM ATP (gepunktete Linie). Dargestellt ist der Verlauf einzelner Messungen (graue Linie) sowie der gemittelte Verlauf aller Messungen (schwarze Linie). Es wurden die Parameter Amplitude, Time to Peak sowie Δ -Plateau berechnet und als Balkendiagramm dargestellt (Mittelwert \pm SEM). Puffer ($n = 18$), ATP stimulierte Zellen ($n = 16$). Für die Pufferkontrolle konnten die Werte der Amplitude, Time to Peak und Δ -Plateau aufgrund fehlender Reaktion nicht bestimmt werden (*nd*). **B** *Framescan* einer Beispielzelle vor und nach Stimulation mit ATP. Dargestellt sind ein Durchlichtbild mit Markierung der Zelle (gestrichelte Linie) sowie Ratio-Bilder vor der Stimulation (-10 s) und nach Zugabe von ATP. Nach der Zugabe kommt es zum starken Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ im perinukleären Bereich (110 s, weiße Pfeile) sowie gegen Ende der Messung zur stärkeren Regulierung im nukleären Bereich (420 s, weißer Pfeil). Maßstab = 10 μM

3.2.1 Die Rolle von cADPR beim Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$

Um herauszufinden, ob cADPR an dem durch ATP induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ beteiligt ist, wurde der pharmakologische Antagonist 8-Br-cADPR verwendet. 8-Br-cADPR ist ein membranpermeabler, kompetitiver Inhibitor des cADPR und verhindert die cADPR vermittelte Aktivierung der RYR (Walseth and Lee, 1993).

Bereits der gemittelte Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ deutete darauf hin, dass 8-Br-cADPR den durch ATP ausgelösten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ nicht beeinflusste (s. Abbildung 10).

Ebenso waren weder die basale $[Ca^{2+}]_i$ (Kontrolle (n = 52): 124 ± 17 nM (Mittelwert \pm SEM) vs 8-Br-cADPR (n = 25): 92 ± 7 nM), die Ca^{2+} -Amplitude (Kontrolle: 682 ± 50 nM vs 8-Br-cADPR 809 ± 99 nM), die Time to Peak (Kontrolle: 50 ± 11 s vs 8-Br-cADPR: 32 ± 4 s) noch das Δ -Plateau (Kontrolle: 86 ± 8 nM vs 8-Br-cADPR: 76 ± 11 nM) signifikant unterschiedlich.

Zusammenfassend konnte keine Beteiligung von cADPR am durch ATP vermittelten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nachgewiesen werden.

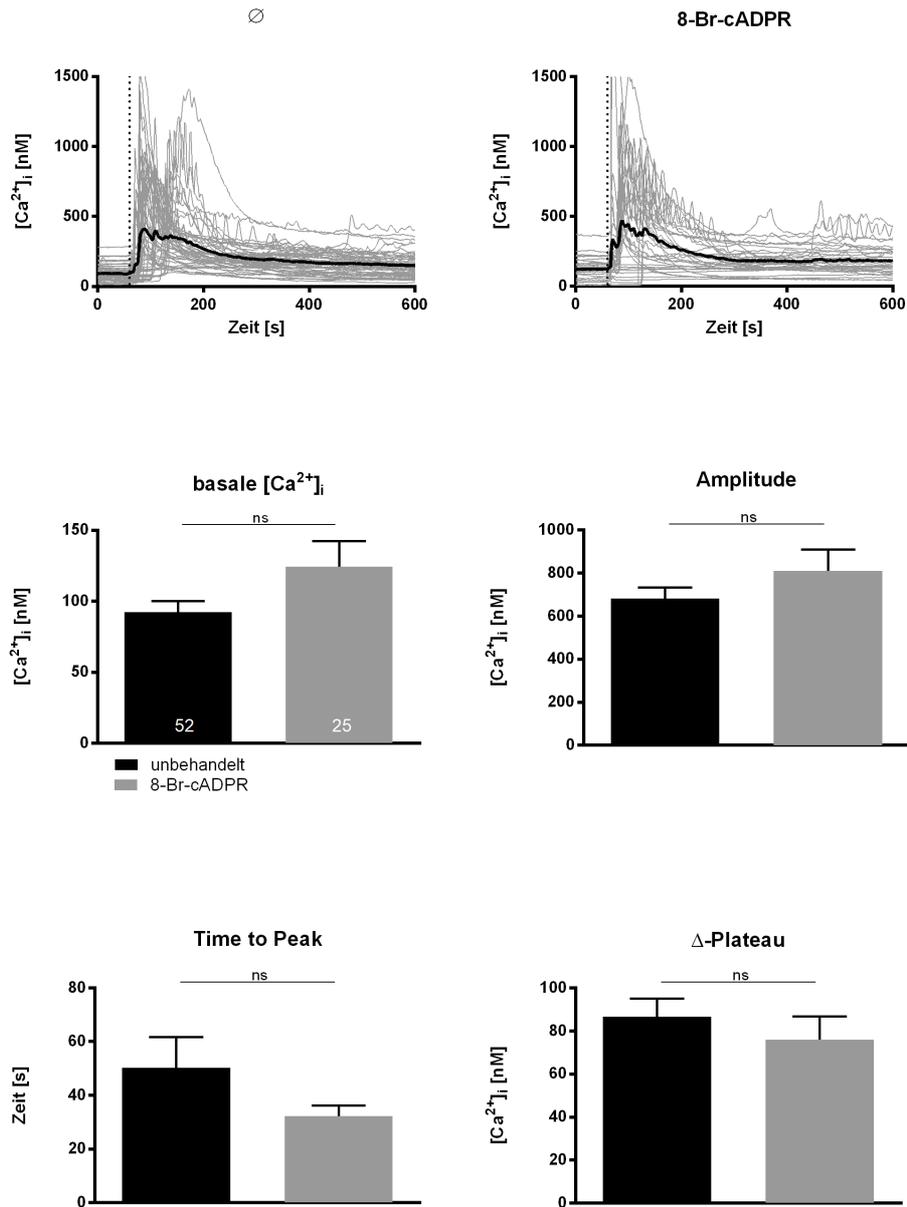


Abbildung 10: Einfluss des cADPR Antagonisten 8-Br-cADPR auf den durch ATP induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten.

Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ der Fura-2-AM beladenen Astrozyten nach Stimulation mit ATP ohne Vorinkubation (\emptyset) und nach Vorinkubation mit 200 μ M 8-Br-cADPR. Dargestellt ist der Verlauf einzelner Messungen (graue Linien) und der gemittelte Verlauf aller Messungen (schwarze Linie). Nach 60 s erfolgte die Zugabe von 30 μ M ATP (gestrichelte Linie). Die Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$, Amplitude, Time to Peak sowie Δ -Plateau wurden berechnet und sind als Balkendiagramm dargestellt (Mittelwert \pm SEM). Unbehandelten Zellen (n = 52); 200 μ M 8-Br-cADPR (n = 25). Die statistische Analyse der basalen $[Ca^{2+}]_i$, der Amplitude und der Time to Peak wurde mittels *Mann-Whitney-U-Test* durchgeführt. Zur Analyse des Δ -Plateaus wurde der ungepaarte *t-Test* verwendet (ns = p > 0,05).

3.2.2 Einfluss von NAADP auf den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$

Zur Analyse, ob NAADP am durch ATP induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten beteiligt ist, wurde der NAADP-Antagonist BZ194 verwendet (Dammermann et al., 2009).

Der gemittelte Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ (s. Abbildung 11) zeigt, dass die Behandlung mit BZ194 zu einer Verminderung der durch ATP ausgelösten Ca^{2+} -Transiente führte, was sich auch in der Berechnung der Parameter widerspiegelt.

Die basale $[Ca^{2+}]_i$ betrug unter Kontrollbedingungen ($n = 22$) 76 ± 5 nM (Mittelwert \pm SEM) und nach Vorinkubation mit BZ194 ($n = 25$) 109 ± 14 nM ($p > 0,05$). Die Bestimmung der Amplitude ergab, dass diese unter Kontrollbedingungen bei 807 ± 96 nM lag und sich nach Vorinkubation mit BZ194 signifikant auf 527 ± 88 nM verringerte ($p < 0,01$). Dieser Unterschied war ebenfalls bei der Time to Peak sichtbar. Die benötigte Zeit erhöhte sich signifikant auf 69 ± 11 s nach Vorinkubation mit BZ194, im Vergleich zu 17 ± 1 s unter Kontrollbedingungen ($p < 0,001$). Das Δ -Plateau verringerte sich signifikant von 133 ± 9 nM unter Kontrollbedingungen auf 76 ± 11 nM nach Behandlung mit BZ194 ($p < 0,001$).

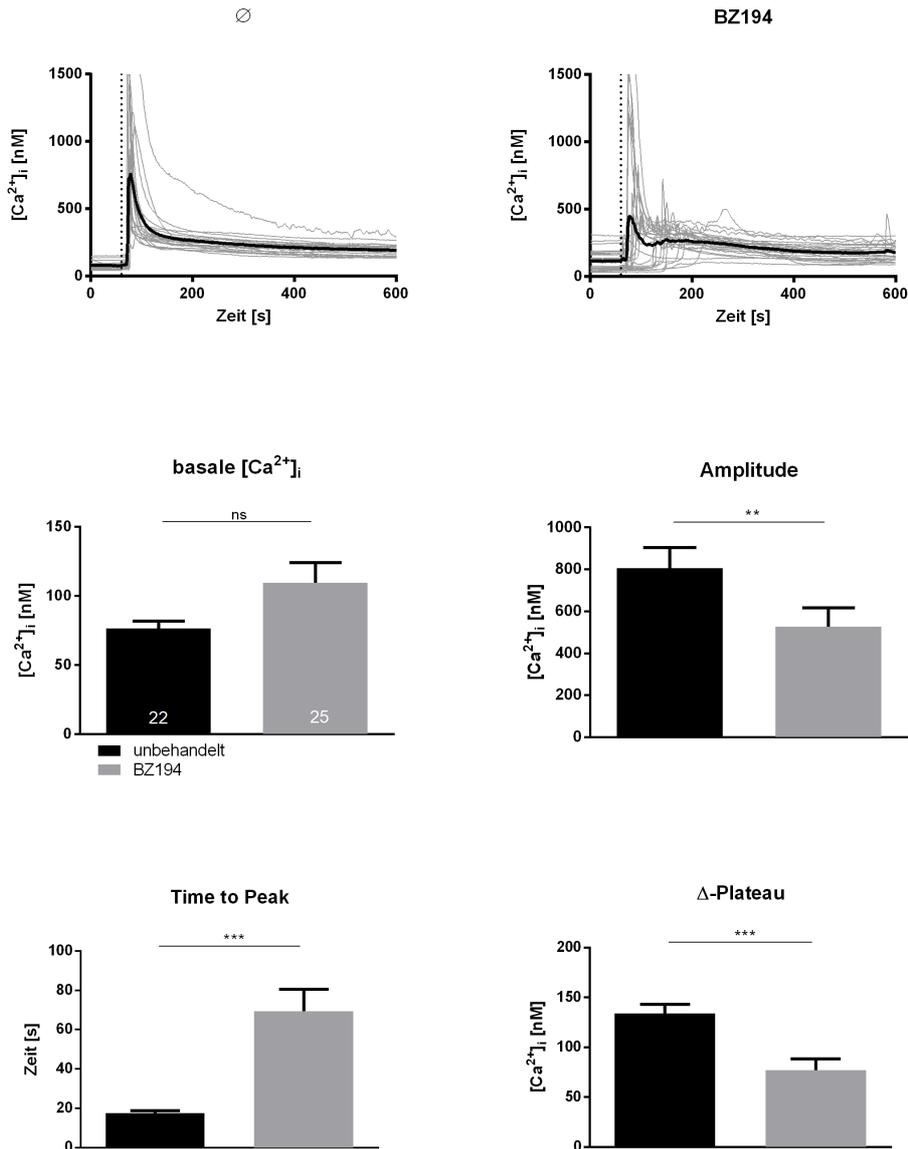


Abbildung 11: Inhibition des NAADP-vermittelten Anteils des durch ATP induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten unter Verwendung des Antagonisten BZ194.

Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ der Fura-2 AM beladenen Astrozyten nach Stimulation mit ATP ohne Vorinkubation (\emptyset) sowie nach Vorinkubation mit 1 mM BZ194. Dargestellt ist der Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ einzelner Zellen (graue Linien) sowie der gemittelte Verlauf aller Einzelmessungen (schwarze Linie). Die ATP Applikation erfolgte nach 60 s (gestrichelte Linie). Aus den Messungen konnten die Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$, Amplitude, Time to Peak sowie das Δ -Plateau berechnet und als Balkendiagramm dargestellt werden (Mittelwert \pm SEM). Unbehandelten Zellen (n = 22), 1 mM BZ194 (n = 25). Die statistische Analyse der Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$, Amplitude und Time to Peak wurde mithilfe des *Mann-Whitney-U-Test* durchgeführt und die Analyse des Δ -Plateau mithilfe des ungepaarten *t-Test* (ns = p > 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

3.2.3 Bedeutung des SOCE beim Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$

Die Ca^{2+} -Signaltransduktion besteht, wie in Abschnitt 1.2 bereits beschrieben, nicht nur aus der Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, sondern auch aus dem Einstrom von extrazellulär verfügbaren Ca^{2+} -Ionen in die Zelle, z. B. über CRAC-Kanäle, die in der Plasmamembran eingebettet vorliegen.

Um zu untersuchen, inwieweit CRAC-Kanäle eine Rolle beim ATP induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ spielen, wurde der pharmakologische Inhibitor Synta66 verwendet, eine Substanz, die die CRAC-Kanäle blockiert und so den SOCE-Mechanismus der Zelle verhindert (Ng et al., 2008).

Die Verwendung von Synta66 führte zu einer Verringerung der durch ATP induzierten Ca^{2+} -Transiente, was bei Betrachtung der gemittelten zeitlichen Verläufe der $[Ca^{2+}]_i$ auffällt (s. Abbildung 12).

Die basale $[Ca^{2+}]_i$ unterschied sich nicht signifikant zwischen Kontrollbedingungen ($n = 24$) mit 124 ± 6 nM (Mittelwert \pm SEM) und nach Behandlung mit Synta66 ($n = 25$) mit 145 ± 11 nM ($p > 0,05$).

Die Ca^{2+} -Amplitude verringerte sich signifikant von 541 ± 51 nM unter Kontrollbedingungen auf 355 ± 36 nM nach Behandlung mit Synta66 ($p < 0,01$).

Die Time to Peak betrug bei der Kontrolle 53 ± 8 s und war nach der Behandlung mit Synta66 signifikant auf 231 ± 34 s erhöht ($p < 0,001$). Das Δ -Plateau unterschied sich zwischen Kontrollbedingungen mit 121 ± 9 nM und nach Vorinkubation mit Synta66 93 ± 10 nM nicht signifikant ($p > 0,05$). Dementsprechend scheint der CRAC-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom zu Beginn der durch ATP ausgelösten Ca^{2+} -Transiente eine Rolle zu spielen.

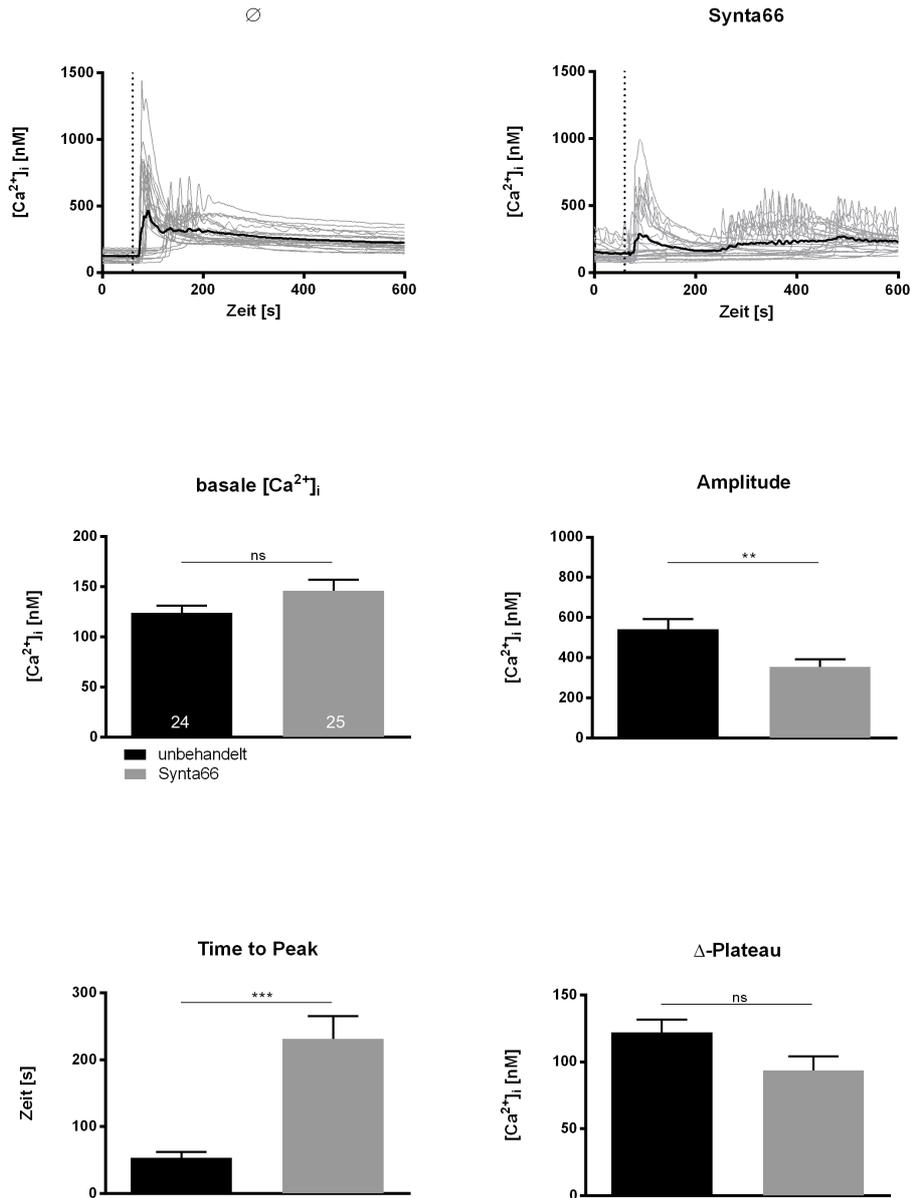


Abbildung 12: Inhibition des Ca^{2+} Einstroms des durch ATP induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten unter Verwendung von Synta66.

Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ der Fura-2-AM-beladenen Astrozyten nach Stimulation mit ATP ohne Vorinkubation (\emptyset) sowie nach Vorinkubation mit 5 μ M Synta66. Dargestellt ist der Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ einzelner Zellen (graue Linien) und der gemittelte Verlauf aller Einzelmessungen (schwarze Linie). Die Applikation von ATP erfolgte nach 60 s (gestrichelte Linie). Aus den Messungen konnten die Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$, Amplitude, Time to Peak und Δ -Plateau berechnet und als Balkendiagramm dargestellt werden (Mittelwert \pm SEM). Unbehandelten Zellen (n = 24), 5 μ M Synta66 (n = 25). Die statistische Analyse der Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$, Amplitude und des Δ -Plateau wurde mithilfe des ungepaarten *t-Test* durchgeführt. Für die Analyse der Time to Peak wurde der *Mann-Whitney-U-Test* verwendet (ns = $p > 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Um die Rolle des extrazellulär verfügbaren Ca^{2+} weiter zu untersuchen, wurden Experimente unter Verwendung eines Ca^{2+} -freien Extrazellulärpuffers durchgeführt. Die Ionenstärke des Puffers wurde durch die Substitution des CaCl_2 durch MgCl_2 konstant gehalten. Die Verwendung des Ca^{2+} -freien Puffers sollte einen Einblick in den durch ATP induzierten Reaktionsmechanismus und die Abhängigkeit von SOCE-Mechanismen geben.

Bei Betrachtung der gemittelten Verläufe der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fällt auf, dass das Fehlen des extrazellulären Ca^{2+} ebenfalls zu einer Verringerung des durch ATP induzierten Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt (s. Abbildung 13). Die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ betrug bei Messungen mit extrazellulärem Ca^{2+} ($n = 21$) 119 ± 9 nM (Mittelwert \pm SEM) und war bei Messungen unter Ca^{2+} -freien Bedingungen ($n = 26$) signifikant auf 67 ± 9 nM verringert ($p < 0,001$). Für die Ca^{2+} -Amplitude ergab sich ebenfalls eine signifikante Verringerung von 739 ± 96 nM unter Kontrollbedingungen auf 339 ± 35 nM unter Ca^{2+} -freien Bedingungen ($p < 0,001$). Die Time to Peak stieg signifikant von 41 ± 11 s unter Kontrollbedingungen auf 68 ± 10 s unter Ca^{2+} -freien Bedingungen ($p < 0,001$). Das Δ -Plateau lag bei normalen Messbedingungen bei 59 ± 12 nM und unter Ca^{2+} -freien Bedingungen bei 62 ± 8 nM. ($p > 0,05$).

Der zuvor beobachtete Effekt nach Verwendung des CRAC-Inhibitors Synta66 konnte ebenfalls unter Ca^{2+} -freien Messbedingungen beobachtet werden und unterstützt die These der Beteiligung des CRAC-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms bereits zu Beginn der durch ATP ausgelösten Ca^{2+} -Transiente.

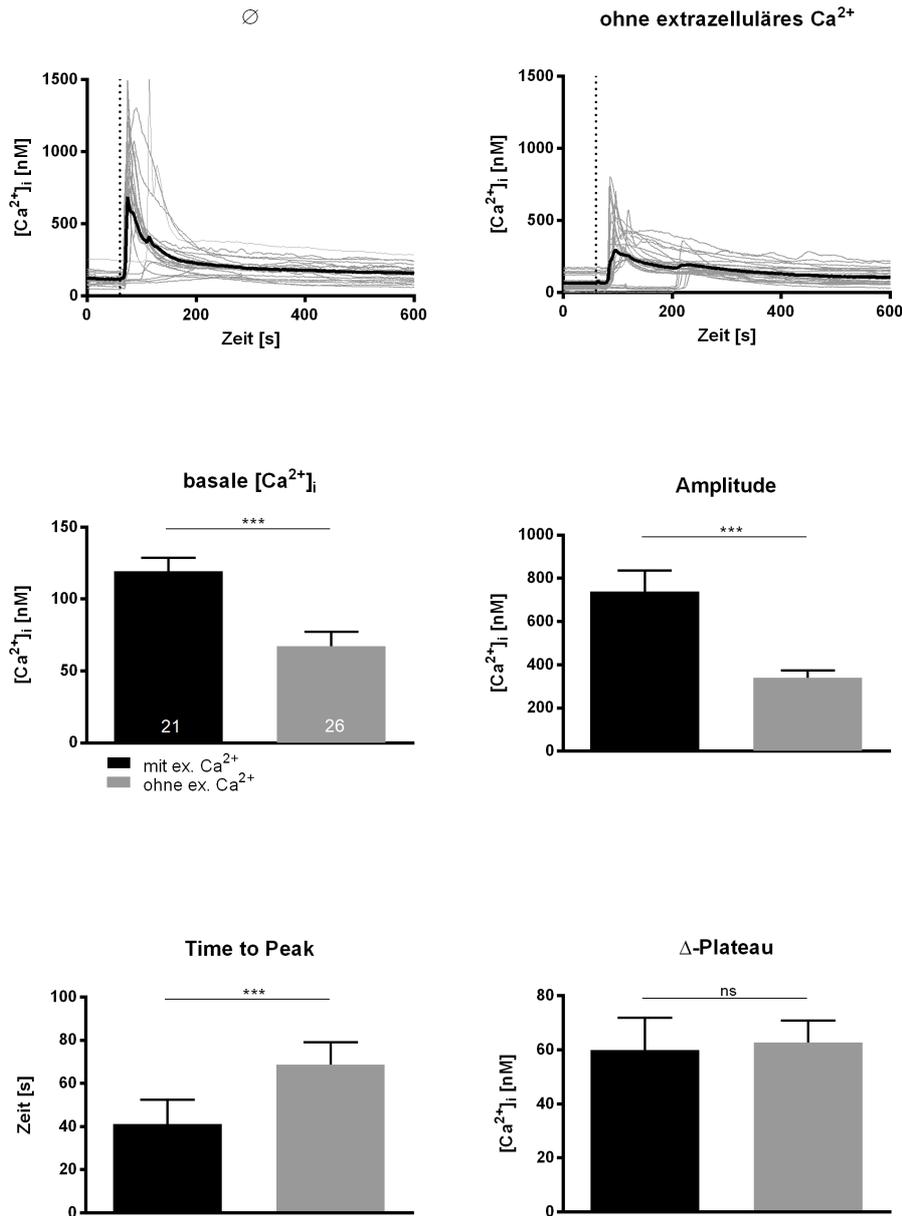


Abbildung 13: Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms durch ATP induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten unter Verwendung eines Ca^{2+} -freien Extrazellulärpuffers.

Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ der Fura-2-AM-beladenen Astrozyten nach Stimulation mit ATP unter Verwendung des normalen Extrazellulärpuffers (\emptyset) sowie unter Verwendung eines Ca^{2+} -freien Extrazellulärpuffers. Dargestellt ist der Messverlauf einzelner Zellen (graue Linien) und der gemittelte Verlauf aller Einzelmessungen (schwarze Linie). Die Applikation von ATP erfolgte nach 60 s (gestrichelte Linie). Aus den Messungen konnten die Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$, Amplitude, Time to Peak und Δ -Plateau berechnet und als Balkendiagramm dargestellt werden (Mittelwert \pm SEM). Extrazellulärpuffer (n = 21), Ca^{2+} -freier Extrazellulärpuffer (n = 26). Die statistische Analyse der Amplitude wurde mithilfe des ungepaarten *t*-Test durchgeführt. Für die Analyse der Parameter Basale $[Ca^{2+}]_i$, Time to Peak und Δ -Plateau wurde der *Mann-Whitney-U-Test* verwendet (ns = $p > 0,05$; *** = $p < 0,001$).

3.2.4 Pharmakologische Inhibition der PLC reduziert den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$.

Zur Untersuchung der Bedeutung von IP_3 beim durch ATP induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ wurden die pharmakologischen Inhibitoren U-73122 und U-73343 verwendet (Bleasdale et al., 1990). U-73122 ist ein Inhibitor der PLC, die nach ihrer Aktivierung cADPR zu IP_3 und DAG hydrolysiert. Wie bereits in Kapitel 1.2 ausführlich beschrieben, führt die Bildung von IP_3 zur Aktivierung der im ER eingebetteten IP_3 -R, die nach ihrer Aktivierung zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER führen. Die strukturell ähnliche aber inaktive Substanz U-73343 führt zu keiner Inhibition der PLC und wurde als Kontrollsubstanz verwendet.

Bei Betrachtung der gemittelten Verläufe der $[Ca^{2+}]_i$ (s. Abbildung 14) fällt bereits auf, dass die Vorinkubation mit U-73122 zu einem nahezu kompletten Verlust des Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit ATP führt. Dieser Effekt wurde jedoch nicht durch die Vorinkubation mit U-73343 ausgelöst.

Die basale $[Ca^{2+}]_i$ betrug unter Kontrollbedingungen ($n = 20$) 89 ± 6 nM (Mittelwert \pm SEM), nach Vorinkubation mit U-73122 ($n = 38$) 94 ± 5 nM und nach Behandlung mit U-73343 ($n = 21$) 103 ± 6 nM ($p > 0,05$). Nach Behandlung mit U-73122 verringerte sich die Ca^{2+} -Amplitude signifikant von 618 ± 95 nM auf 90 ± 16 nM ($p < 0,001$). Die Verwendung von U-73343 ergab einen Wert von 494 ± 108 nM ($p > 0,05$).

Die Time to Peak betrug unter Kontrollbedingungen 54 ± 15 s. Nach Vorinkubation mit U-73122 stieg diese signifikant auf 398 ± 43 s ($p < 0,001$). Eine Behandlung mit U-73343 führte zu einem Wert von 28 ± 1 s, der sich nicht signifikant von den Kontrollbedingungen unterscheidet ($p > 0,05$).

Das Δ -Plateau der $[Ca^{2+}]_i$ betrug unter Kontrollbedingungen 97 ± 13 nM und verringerte sich nach Vorinkubation mit U-73122 signifikant auf 33 ± 13 nM ($p < 0,01$). Die Verwendung von U-73343 führte zu einem Δ -Plateau von 104 ± 8 nM ($p > 0,05$).

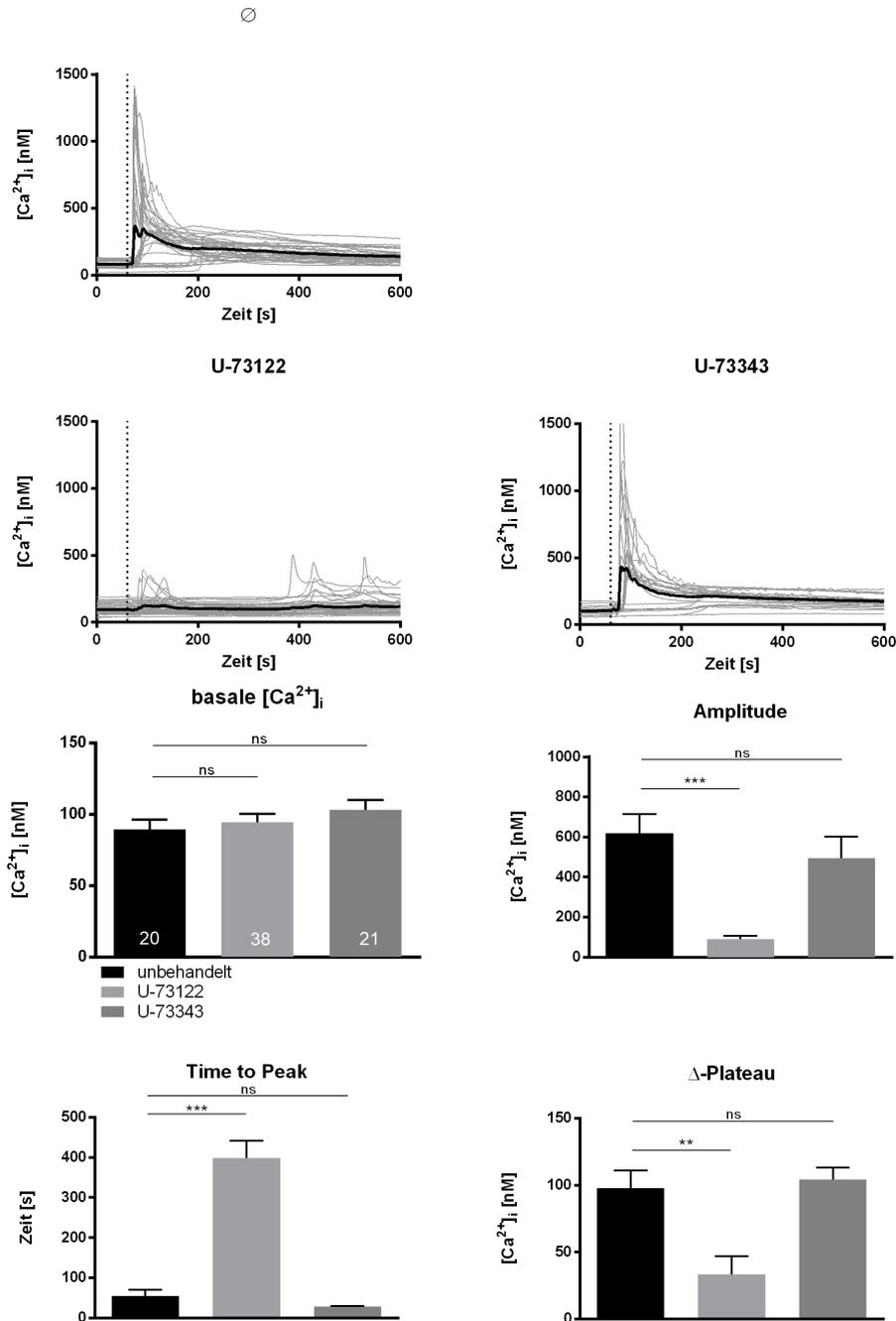


Abbildung 14: Inhibition des IP_3 -vermittelten Anteils des durch ATP induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten unter Verwendung des PLC Inhibitors U-73122.

Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ der Fura-2-AM-beladenen Astrozyten nach Stimulation mit ATP ohne Vorinkubation (\emptyset), nach Vorinkubation mit $4 \mu M$ U-73122 sowie nach Vorinkubation mit $4 \mu M$ U-73343. Dargestellt ist der Messverlauf einzelner Zellen (graue Linien) und der gemittelte Verlauf aller Einzelmessungen (schwarze Linie). Die Applikation von ATP erfolgte nach 60 s (gestrichelte Linie). Aus den Messungen konnten die Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$, Amplitude, Time to Peak und Δ -Plateau berechnet und als Balkendiagramm dargestellt werden (Mittelwert \pm SEM). Unbehandelte Zellen ($n = 20$), $4 \mu M$ U-73122 ($n = 38$), $4 \mu M$ U-73343 ($n = 21$). Die statistische Analyse der Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$ und Δ -Plateau wurde mithilfe einer *One-Way-Anova* durchgeführt. Für die Analyse der Amplitude und der Time to Peak wurde der *Kruskal-Wallis-Test* verwendet (ns = $p > 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

3.3 ATP führt zu einem verringerten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in RYR3^{-/-}-Astrozyten

Wie in Kapitel 3.2 gezeigt werden konnte, kommt es unter Beteiligung der sekundären Botenstoffe IP₃ und NAADP nach Stimulation mit ATP in murinen Astrozyten zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Der durch die Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER ausgelöste SOCE spielt ebenfalls eine Rolle. Um zu untersuchen, ob der RYR3 an diesem Antwortmechanismus beteiligt ist, wurden vergleichende Experimente zwischen Wildtyp- und RYR3^{-/-}-Astrozyten durchgeführt.

Die gemittelten Verläufe der $[Ca^{2+}]_i$ (s. Abbildung 15) machen deutlich, dass die Ca²⁺-Signale in den RYR3^{-/-}-Astrozyten deutlich geringer ausgeprägt sind, als in den Wildtyp-Astrozyten. Die basale $[Ca^{2+}]_i$ betrug in den Kontrollzellen (n = 24) 109 ± 3 nM (Mittelwert \pm SEM) und in den RYR3^{-/-}-Astrozyten (n = 31) 105 ± 4 nM ($p > 0,05$).

Die Ca²⁺-Amplitude lag in den Wildtyp-Astrozyten bei 667 ± 85 nM und verringerte sich in den RYR3^{-/-}-Zellen signifikant auf 151 ± 29 nM ($p < 0,001$). Die Berechnung der Time to Peak ergab für die Kontrollzellen einen Wert von 117 ± 22 s und stieg in den RYR3^{-/-}-Zellen signifikant auf 505 ± 55 s ($p < 0,001$).

Das Δ -Plateau verringerte sich ebenfalls signifikant von 143 ± 12 nM in den Kontrollzellen auf einen Wert der $[Ca^{2+}]_i$ von 80 ± 6 nM in den RYR3^{-/-}-Astrozyten ($p < 0,001$).

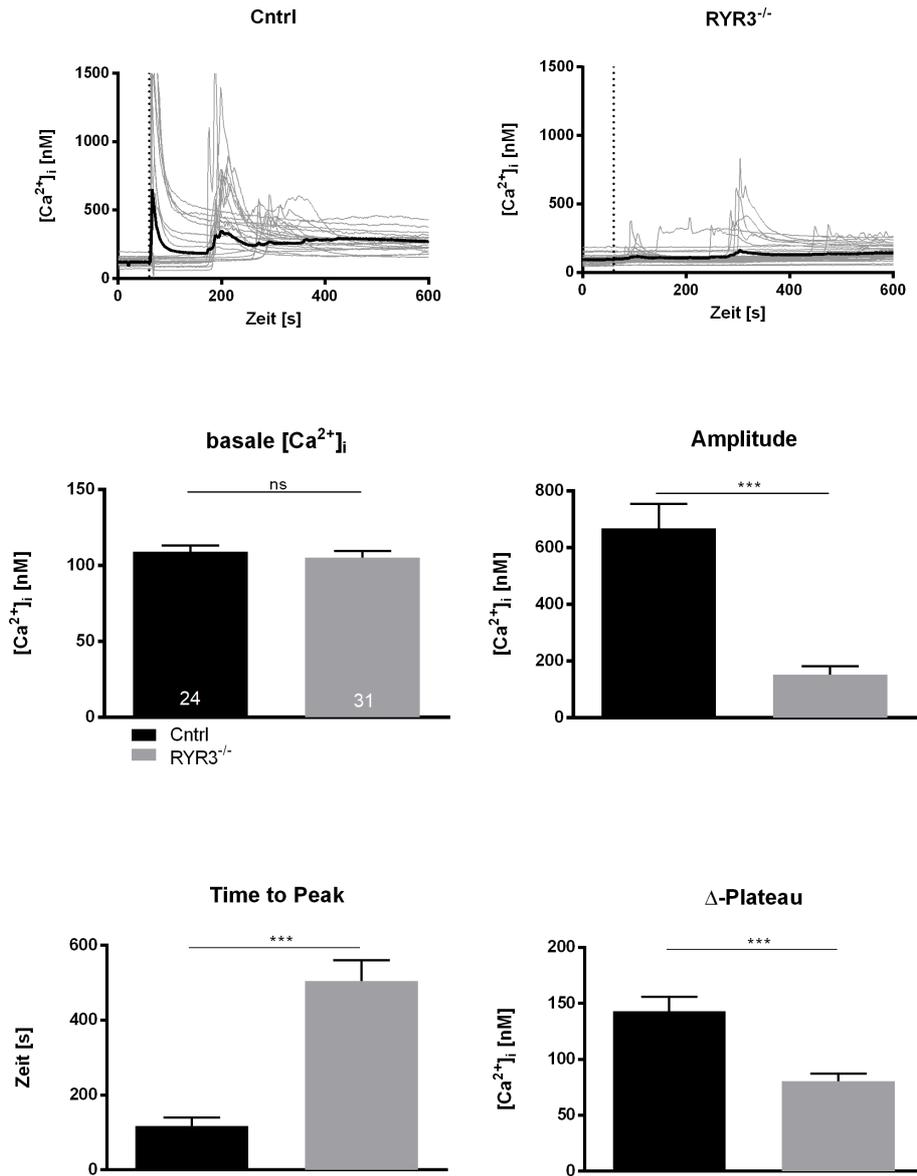


Abbildung 15: Der Einfluss des RYR3 bei dem durch ATP vermittelten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten.

Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ der Fura-2-AM-beladenen Wildtyp- (Cntrl) und RYR3^{-/-}-Astrozyten nach Stimulation mit ATP. Dargestellt ist der Messverlauf einzelner Zellen (graue Linien) und der gemittelte Verlauf aller Einzelmessungen (schwarze Linie). Die Applikation von ATP erfolgte nach 60 s (gestrichelte Linie). Aus den Messungen konnten die Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$, Amplitude, Time to Peak und Δ -Plateau berechnet und als Balkendiagramm dargestellt werden (Mittelwert \pm SEM). Cntrl-Astrozyten (n = 24), RYR3^{-/-}-Astrozyten (n = 31). Die statistische Analyse der Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$, Amplitude und Time to Peak wurde mithilfe des *Mann-Whitney-U-Test* durchgeführt. Für die Analyse des Δ -Plateaus wurde der ungepaarte *t-test* verwendet (ns = p > 0,05; *** = p < 0,001).

Zur Untersuchung, ob der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ im Knock-Out des RYR3 auf der Bildung anderer Botenstoffe oder der Aktivierung anderer Kanäle beruht, wurden Experimente zur Charakterisierung des durch ATP induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ mithilfe der pharmakologischen Inhibitoren Synta66 sowie U-73122 durchgeführt.

Die Verwendung des CRAC-Inhibitors Synta66 führt erneut zu einer Verringerung der Ca^{2+} -Transiente in WT-Astrozyten (s. Abbildung 16). Dieser Effekt war jedoch nicht bei Experimenten an RYR3^{-/-}-Astrozyten sichtbar.

Die basale $[Ca^{2+}]_i$ unterschied sich weder in WT-Astrozyten (Kontrolle (n = 37): 128 ± 8 nM (Mittelwert \pm SEM) vs Synta66 (n = 34): 115 ± 5 nM), noch in RYR3^{-/-}-Astrozyten (Kontrolle (n = 26): 131 ± 7 nM vs Synta66 (n = 30): 115 ± 8 nM) signifikant ($p > 0,05$). Bei Betrachtung der Amplitude fällt auf, dass sich diese durch die Verwendung von Synta66 in WT-Astrozyten signifikant von 644 ± 45 nM auf 429 ± 29 nM verringert ($p < 0,01$). Im Vergleich zeigt die Verwendung von Synta66 bei RYR3^{-/-}-Astrozyten keine signifikante Veränderung (Kontrolle: 430 ± 57 nM vs Synta66: 400 ± 44 nM) ($p > 0,05$). Die Time to Peak in WT-Astrozyten erhöhte sich durch die Inhibition der CRAC-Kanäle signifikant von 21 ± 1 s auf 140 ± 29 s ($p < 0,001$). Im Vergleich hierzu kam es durch die Inhibition der CRAC-Kanäle in RYR3^{-/-}-Astrozyten zu keiner signifikanten Veränderung (Kontrolle: 158 ± 15 s vs Synta66: 149 ± 19 s) ($p > 0,05$). Das Δ -Plateau der $[Ca^{2+}]_i$ zeigte sowohl bei WT-Astrozyten (Kontrolle: 117 ± 7 nM vs Synta66: 108 ± 9 nM), als auch bei RYR3^{-/-}-Astrozyten (Kontrolle: 129 ± 8 nM vs Synta66: 99 ± 7 nM) keine signifikante Veränderung ($p > 0,05$).

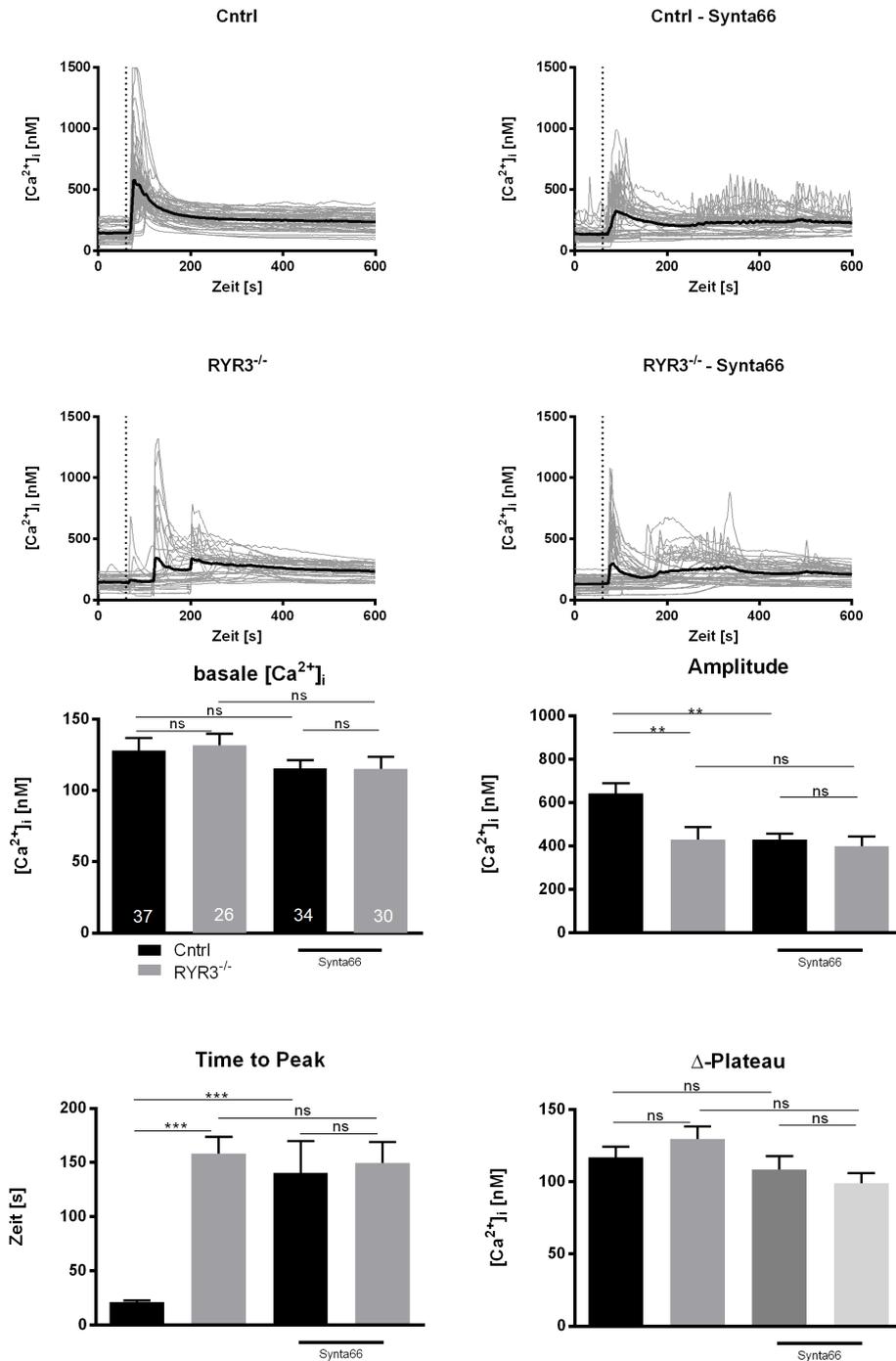


Abbildung 16: Vergleichende Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms des durch ATP vermittelten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Wildtyp- (Cntrl) und RYR3^{-/-}-Astrozyten.

Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ der Fura-2-AM-beladenen Cntrl- und RYR3^{-/-}-Astrozyten ohne Vorinkubation und nach Vorinkubation mit 5 μ M Synta66. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch die Applikation von ATP (gestrichelte Linie). Dargestellt ist der Messverlauf einzelner Zellen (graue Linien) und der gemittelte Verlauf aller Einzelmessungen (schwarze Linie). Aus den Messungen konnten die Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$, Amplitude, Time to Peak und Δ -Plateau berechnet und als Balkendiagramm dargestellt werden (Mittelwert \pm SEM). Cntrl- (n = 37) und RYR3^{-/-}-Astrozyten (n = 26) unter normalen Bedingungen, Cntrl- (n = 34) und RYR3^{-/-}-Astrozyten (n = 30) nach Vorinkubation mit 5 μ M Synta66. Die statistische Analyse der Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$ und Δ -Plateau wurde mithilfe einer *One-Way-Anova* durchgeführt. Für die Analyse der Amplitude und der Time to Peak wurde der *Kruskal-Wallis-Test* verwendet (ns = p > 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

Im nächsten Schritt wurde der PLC Inhibitor U-73122 verwendet, um herauszufinden, ob es eine Beteiligung des sekundären Botenstoffs IP_3 bei dem durch ATP induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in $RYR3^{-/-}$ -Astrozyten gibt. Die Betrachtung der gemittelten Verläufe der $[Ca^{2+}]_i$ (s. Abbildung 17) zeigt, dass die Vorinkubation mit U-73122 in WT-Astrozyten zu einem kompletten Verlust des durch ATP induzierten Signals führt. Dieser Verlust des durch ATP ausgelösten Ca^{2+} -Signals war auch in den $RYR3^{-/-}$ -Astrozyten zu sehen.

Die basale $[Ca^{2+}]_i$ war weder in den WT-Astrozyten (Kontrolle (n = 43): 121 ± 3 nM (Mittelwert \pm SEM) vs U-73122 (n = 41): 102 ± 5 nM), noch in den $RYR3^{-/-}$ -Astrozyten (Kontrolle (n = 30): 114 ± 8 nM vs U-73122 (n = 38): 104 ± 9 nM) signifikant verändert ($p > 0,05$). Die Bestimmung der Ca^{2+} -Amplitude führte bei den Kontrollzellen zu einem Wert von 780 ± 71 nM, der sich nach Vorinkubation mit U-73122 signifikant auf 19 ± 7 nM verringerte ($p < 0,001$). Die Amplitude in den $RYR3^{-/-}$ -Astrozyten betrug ohne Vorinkubation 362 ± 24 nM. Nach Verwendung von U-73122 verringerte sich diese signifikant auf 21 ± 4 nM ($p < 0,001$). Die Berechnung der Time to Peak, sowie des Δ -Plateaus war nach Vorinkubation mit U-73122 nicht mehr möglich.

Dies kann damit erklärt werden, dass in vielen Zellen keine Ca^{2+} -Transiente nach Verwendung von U-73122 ausgelöst wurde und somit die genutzten Gleichungen zur Berechnung der Time to Peak, sowie des Δ -Plateaus einen nicht verwendbaren Wert ergaben. Ohne Vorinkubation ergab sich für die Time to Peak der WT-Astrozyten (n = 27) ein Wert von 19 ± 2 s und für die $RYR3^{-/-}$ -Zellen ein signifikant erhöhter Wert von 80 ± 18 s (n = 30) ($p < 0,01$). Die Bestimmung des Δ -Plateaus in den WT-Astrozyten führte zu einem Wert von 136 ± 8 nM und in den $RYR3^{-/-}$ -Zellen zu einem signifikant verringerten Wert von 65 ± 4 nM ($p < 0,001$).

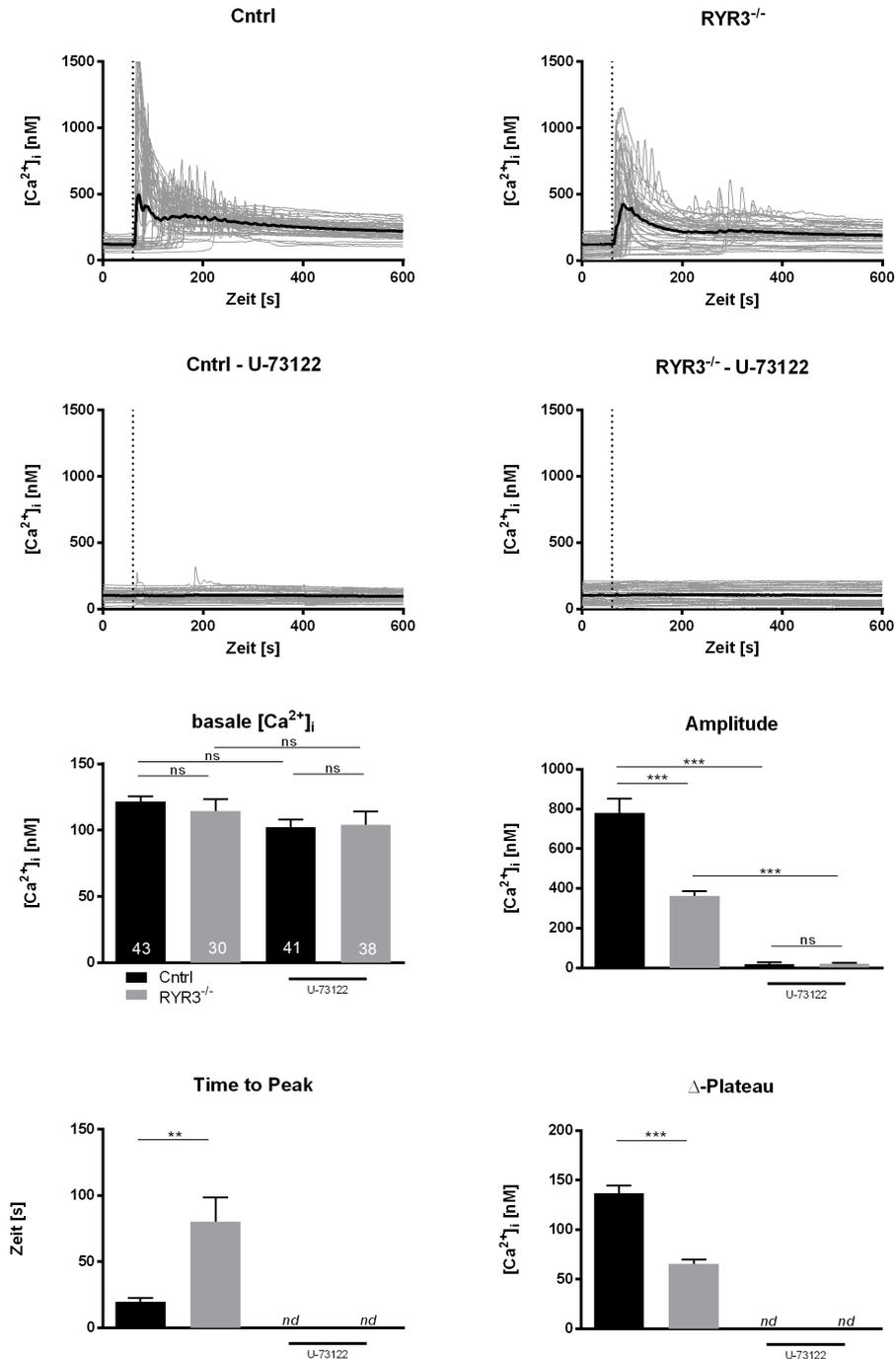


Abbildung 17: Vergleichende Inhibition des IP₃-vermittelten Anteils des durch ATP induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Wildtyp- (Cntrl) und RYR3^{-/-}-Astrozyten.

Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ der mit Fura-2-AM-beladenen Cntrl- und RYR3^{-/-}-Astrozyten ohne Vorinkubation und nach Vorinkubation mit 4 μ M U-73122. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch die Applikation von ATP (gestrichelte Linie). Dargestellt ist der Messverlauf einzelner Zellen (graue Linie) und der gemittelte Verlauf aller Einzelmessungen (schwarze Linie). Aus den Messungen konnten die Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$, Amplitude, Time to Peak und Δ -Plateau berechnet und als Balkendiagramm dargestellt werden (Mittelwert \pm SEM). Nach Inhibition mit U-73122 konnte ein Teil der Parameter nicht mehr bestimmt werden (nd).

Cntrl- (n = 43) und RYR3^{-/-}-Astrozyten (n = 30) unter normalen Bedingungen, Cntrl- (n = 41) und RYR3^{-/-}-Astrozyten (n = 38) nach Vorinkubation mit 4 μ M U-73122. Die statistische Analyse der Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$ und Amplitude wurde mithilfe einer *One-Way-Anova* durchgeführt. Die Parameter Time to Peak und Δ -Plateau konnten nur für Cntrl- (n = 27) und RYR3^{-/-}-Astrozyten (n = 30) ohne Vorinkubation bestimmt werden. Für die statistische Analyse der Time to Peak wurde der *Mann-Whitney-U-Test* und für die Analyse des Δ Plateau der ungepaarte *t-Test* verwendet (ns = p > 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

3.4 Die Analyse subzellulärer Ca^{2+} -Signale in murinen Astrozyten

Zur Aufklärung initialer subzellulärer Ca^{2+} -Signale bei dem durch ATP-Stimulation ausgelösten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten, wurde die Farbstoffkombination aus Fluo-4 und Fura Red verwendet, die zeitlich hochaufgelöste Messungen erlaubt.

Der Framescan eines repräsentativen WT-Astrozyten (s. Abbildung 18) zeigt, dass sich der durch ATP induzierte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bereits 10 s nach Zugabe über die gesamte Zelle ausgebreitet hatte. Der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verlief wellenähnlich, wobei die Ausgangspunkte der Wellenbewegung bereits nach 8,54 s bzw. 8,75 s im peripheren Zellbereich identifiziert werden konnten (weiße Pfeile).

Im Vergleich zeigt der Framescan eines repräsentativen $\text{RYR3}^{-/-}$ -Astrozyten, dass der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erst 73 s nach Zugabe begann. Die Ausbreitung verlief ebenfalls wellenähnlich, wobei die Ausbreitung nicht wie in der Kontrollzelle von der Zellperipherie ins Zellinnere stattfand. Der initiale Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war in den $\text{RYR3}^{-/-}$ -Zellen 73 s nach Stimulation im perinukleären Bereich des Zellkörpers sichtbar (weiße Pfeile) und breitete sich in Richtung der peripheren Zellausläufer aus. Der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ startete später und benötigte über 12 s.

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit in den WT-Astrozyten ($n = 11$) betrug $84 \pm 8 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ und war in den $\text{RYR3}^{-/-}$ -Astrozyten ($n = 11$) signifikant verringert auf $37 \pm 10 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ($p < 0,01$).

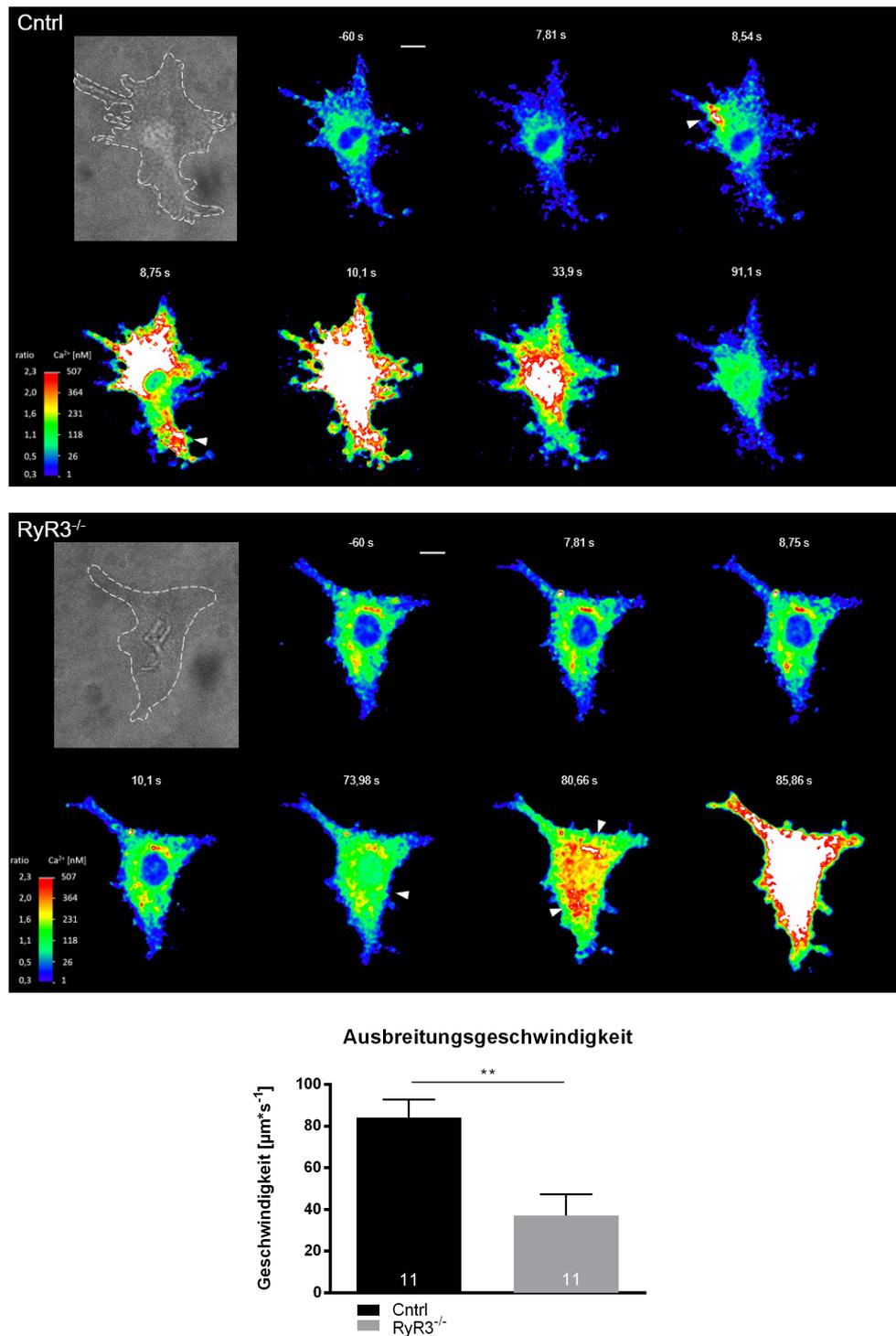


Abbildung 18: Framescan eines repräsentativen Wildtyp- (Cntrl) und RYR3^{-/-}-Astrozyten und die Ausbreitungsgeschwindigkeit des durch ATP induzierten Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Framescan eines Cntrl-Astrozyten (oben) und eines RYR3^{-/-}-Astrozyten (unten), zeitlich hochaufgelöster Ca^{2+} -Messungen unter Verwendung der Farbstoffkombination aus Fluo-4-AM und Fura-Red-AM (Wolf et al., 2015). Dargestellt sind jeweils ein Durchlichtbild sowie farbkodierte Ratio-Bilder vor Applikation von ATP (-10 s) sowie nach Zugabe von ATP. Im Cntrl-Astrozyten sind im peripheren Zellbereich einzelne Bereiche zu erkennen (weiße Pfeile), die als Ausgang für den globalen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ identifiziert werden konnten. Im RYR3^{-/-}-Astrozyten findet der initiale Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im perinukleären Bereich statt (weiße Pfeile) und breitet sich anschließend in Richtung Peripherie aus. Die berechnete Ausbreitungsgeschwindigkeit der Cntrl-Zellen (n = 11) und der RYR3^{-/-}-Zellen (n = 11) ist im unteren Balkendiagramm dargestellt (Mittelwert \pm SEM). Die statistische Analyse wurde mithilfe eines *Mann-Whitney-U-Test* durchgeführt (** = p < 0,01).

3.5 Der Effekt von IFN γ und TNF α auf die [Ca $^{2+}$] $_i$ in murinen Astrozyten

Die bisherigen Experimente dienten der Aufklärung des durch ATP induzierten Anstiegs der [Ca $^{2+}$] $_i$. Grundlegend für dieses Projekt war jedoch ebenfalls die Beobachtung, dass der Knock-Out des RYR3 in Mäusen dazu führt, dass diese einen verringerten Clinical Score nach Induktion der EAE aufweisen (von Osten, 2015). Da diese induzierte Erkrankung ebenfalls mit einem Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine im Bereich des Gehirns einhergeht (Rudick and Ransohoff, 1992), war es von Interesse zu untersuchen, inwieweit die Behandlung der Astrozyten mit pro-inflammatorischen Zytokinen, einen Effekt auf den durch ATP induzierten Anstieg der [Ca $^{2+}$] $_i$ hat. Die murinen Astrozyten wurden dazu einen Tag vor Durchführung der Experimente mit TNF α und IFN γ behandelt. Die anschließende Stimulation mit ATP zeigte, dass diese Behandlung der Zellen zu einer Veränderung im ATP induzierten Anstieg der [Ca $^{2+}$] $_i$ führte (s. Abbildung 19).

In den WT-Astrozyten veränderte sich die basale [Ca $^{2+}$] $_i$ (normal (n = 32): 123 \pm 5 nM (Mittelwert \pm SEM) vs pro-inflammatorisch (n = 39): 139 \pm 5 nM) nicht signifikant (p > 0,05). Allerdings kam es zu einem signifikanten Anstieg der Ca $^{2+}$ -Amplitude von 562 \pm 66 nM unter normalen Bedingungen auf 926 \pm 54 nM unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Die Time to Peak (normal: 219 \pm 28 s vs pro-inflammatorisch: 107 \pm 13 s) und das Δ -Plateau (normal: 150 \pm 12 nM vs pro-inflammatorisch: 138 \pm 10 nM) unterschieden sich nach der Behandlung mit IFN γ und TNF α ebenfalls nicht signifikant (p > 0,05).

Es scheint, dass die Vorinkubation mit IFN γ und TNF α keinen Effekt auf den ATP induzierten Anstieg der [Ca $^{2+}$] $_i$ in RYR3 $^{-/-}$ -Astrozyten hatte. Es waren weder die basale [Ca $^{2+}$] $_i$ (normal (n = 44): 101 \pm 4 nM vs pro-inflammatorisch (n = 29): 125 \pm 6 nM), die Amplitude (normal: 147 \pm 32 nM vs pro-inflammatorisch: 239 \pm 55 nM), die Time to Peak (normal: 321 \pm 41 s vs pro-inflammatorisch: 268 \pm 35 s) noch das Δ -Plateau (normal: 56 \pm 11 nM vs pro-inflammatorisch: 72 \pm 12 nM) signifikant unterschiedlich (p > 0,05).

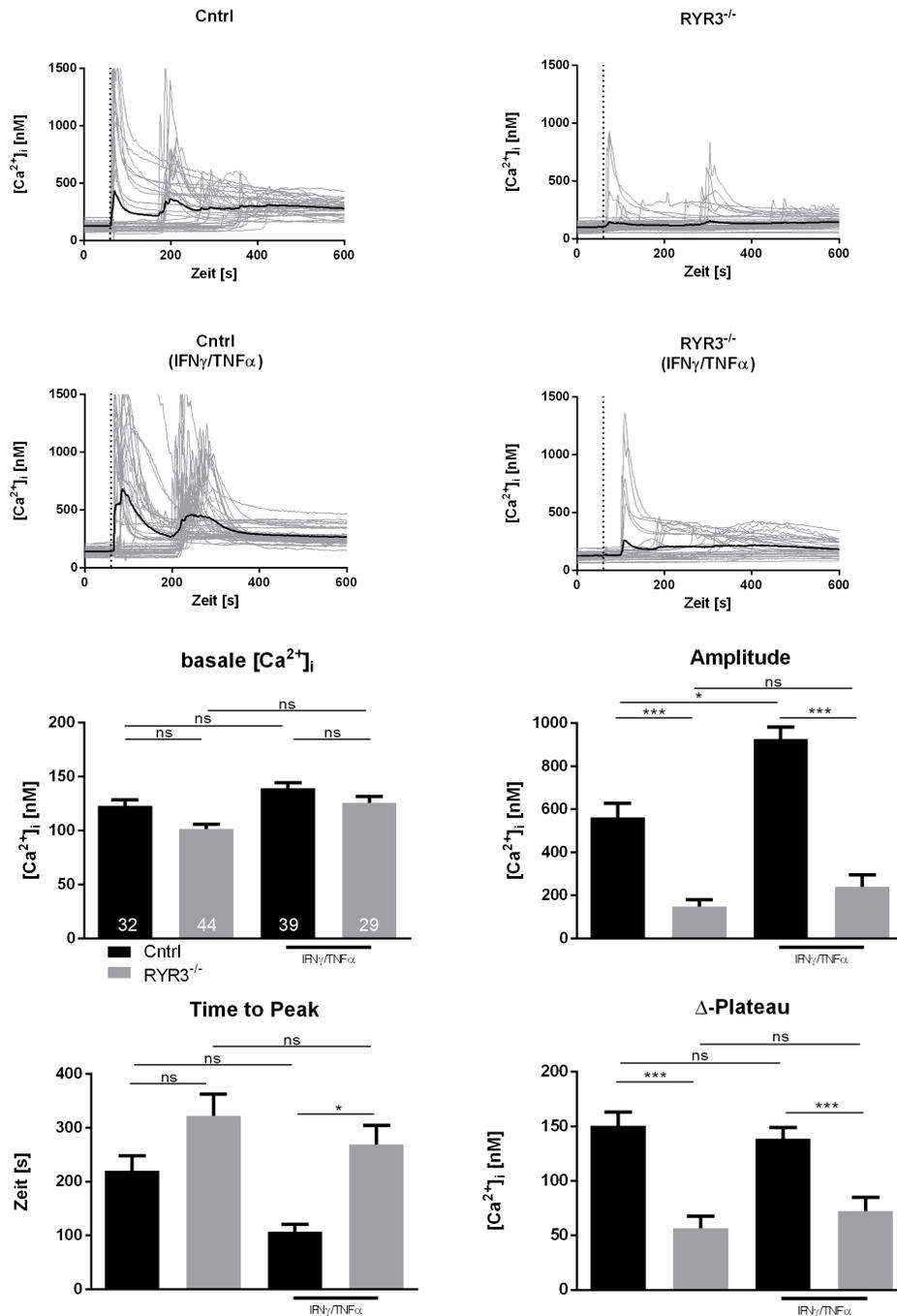


Abbildung 19: Der Effekt der pro-inflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF α auf den durch ATP induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Wildtyp- (Cntrl) und RYR3^{-/-}-Astrozyten.

Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ der Fura-2-AM-beladenen Cntrl- und RYR3^{-/-}-Astrozyten ohne Vorinkubation und nach 24 h Vorinkubation mit 1 ng/ml IFN γ /TNF α . Die Stimulation der Zellen erfolgte durch die Applikation von ATP (gestrichelte Linie). Dargestellt ist der Messverlauf einzelner Zellen (graue Linien) und der gemittelte Verlauf aller Einzelmessungen (schwarze Linie). Aus den Messungen konnten die Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$, Amplitude, Time to Peak und Δ -Plateau berechnet und als Balkendiagramm dargestellt werden (Mittelwert \pm SEM). Cntrl- (n = 32) und RYR3^{-/-}-Astrozyten (n = 44) unter normalen Bedingungen, Cntrl- (n = 39) und RYR3^{-/-}-Astrozyten (n = 29) nach Vorinkubation mit IFN γ und TNF α . Die statistische Analyse der Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$ und Δ -Plateau wurde mithilfe der *One-Way-Anova* durchgeführt. Für die Analyse der Amplitude und der Time to Peak wurde der *Kruskal-Wallis-Test* verwendet (ns = p > 0,05; * = p < 0,05; *** = p < 0,001).

3.5.1 Beteiligung von IP₃ am Anstieg der [Ca²⁺]_i unter pro-inflammatorischen Bedingungen.

Da der PLC-Inhibitor U-73122 bereits effektiv eingesetzt wurde und der ATP induzierte Anstieg der [Ca²⁺]_i in murinen Astrozyten komplett inhibiert werden konnte, wurde dieser verwendet, um die Rolle von IP₃ bei Astrozyten unter pro-inflammatorischen Bedingungen zu klären.

Wie im gemittelten Verlauf der [Ca²⁺]_i zu sehen ist (s. Abbildung 20), kam es durch die Verwendung des PLC-Inhibitors zu einem kompletten Signalverlust in den WT-Astrozyten.

Die basale [Ca²⁺]_i (Kontrolle (n = 25): 105 ± 6 nM (Mittelwert ± SEM) vs U-73122 (n = 42): 84 ± 5 nM) zeigte keinen signifikanten Unterschied (p > 0,05). Die Bestimmung der Ca²⁺-Amplitude zeigte, dass der durch IFN γ und TNF α verstärkte Anstieg der [Ca²⁺]_i durch Vorinkubation mit U-73122 vollständig inhibiert wurde. Die Amplitude verringerte sich in WT-Astrozyten signifikant von 794 ± 100 nM auf 23 ± 8 nM (p < 0,001). Die Berechnung der Time to Peak, sowie des Δ -Plateaus war an dieser Stelle aufgrund der fehlenden Reaktion auf die ATP-Stimulation nicht möglich.

Die Verwendung pro-inflammatorischer Zytokine hatte auf die RYR3^{-/-}-Astrozyten keinen verstärkenden Effekt. Der durch ATP induzierte Anstieg der [Ca²⁺]_i nach Verwendung von IFN γ und TNF α konnte auch hier durch Verwendung von U-73122 komplett inhibiert werden.

Die basale [Ca²⁺]_i (Kontrolle (n = 33): 105 ± 9 nM vs U-73122 (n = 37): 101 ± 10 nM) zeigte keinen signifikanten Unterschied (p > 0,05). Die Ca²⁺-Amplitude verringerte sich signifikant von 429 ± 32 nM auf 40 ± 5 nM (p < 0,001). Die Berechnung der Time to Peak sowie des Δ -Plateaus war nicht möglich.

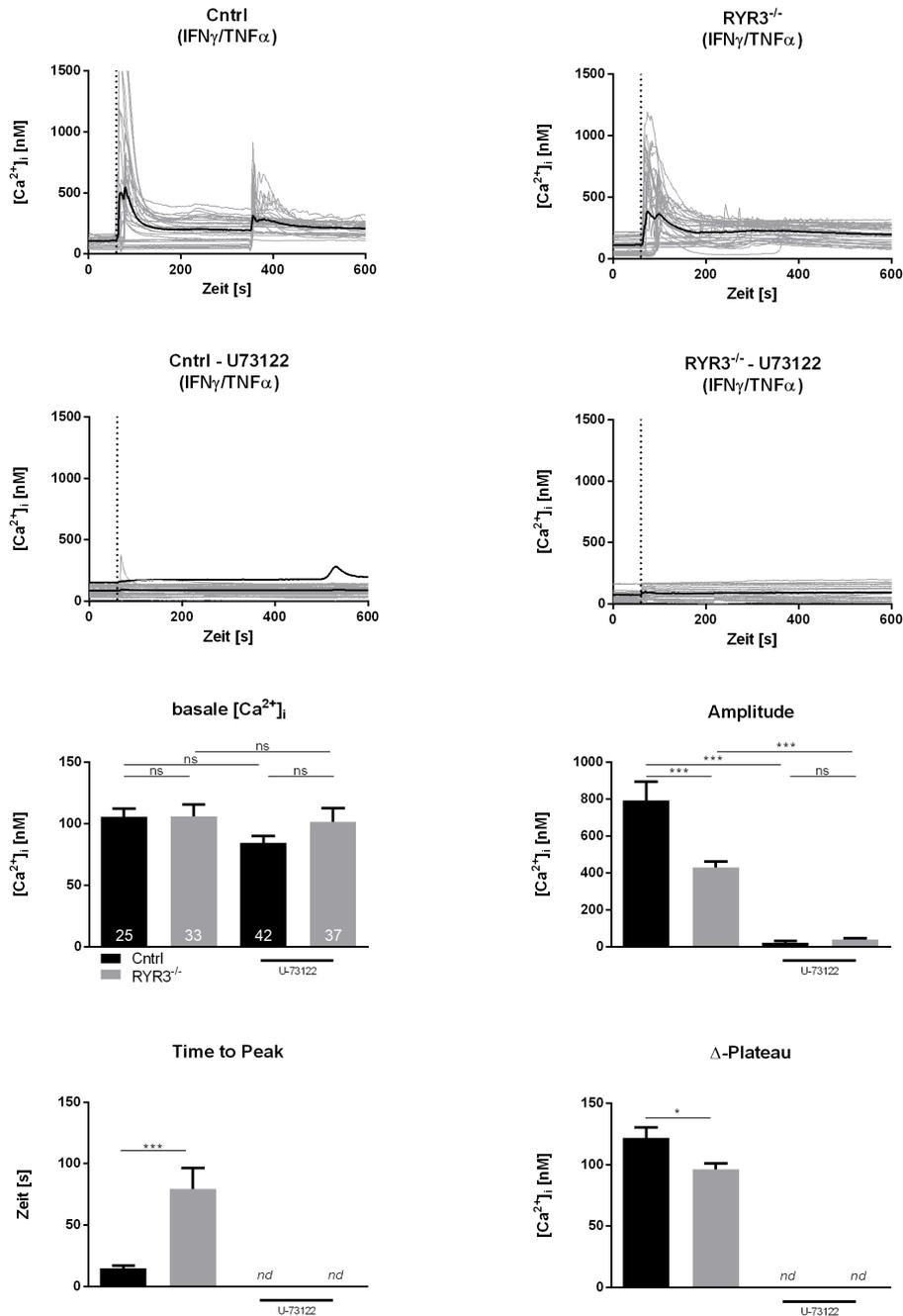


Abbildung 20: Vergleichende Inhibition des IP₃ vermittelten Anteils des durch ATP induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Wildtyp- (Cntrl) und RYR3^{-/-}-Astrozyten unter pro-inflammatorischen Bedingungen.

Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ der Fura-2-AM-beladenen Cntrl- und RYR3^{-/-}-Astrozyten ohne Vorinkubation und nach Vorinkubation mit 4 μ M U-73122. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch die Applikation von ATP (gestrichelte Linie). Dargestellt ist der Messverlauf einzelner Zellen (graue Linien) und der gemittelte Verlauf aller Einzelmessungen (schwarze Linie). Aus den Messungen konnten die Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$, Amplitude, Time to Peak und Δ -Plateau berechnet und als Balkendiagramm dargestellt werden (Mittelwert \pm SEM). Cntrl- (n = 25) und RYR3^{-/-}-Astrozyten (n = 33) unter pro-inflammatorischen Bedingungen, Cntrl- (n = 42) und RYR3^{-/-}-Astrozyten (n = 37) unter pro-inflammatorischen Bedingungen nach Vorinkubation mit 4 μ M U-73122. Nach Verwendung des Inhibitors U-73122 konnte ein Teil der Parameter aufgrund der ausbleibenden Reaktion der Astrozyten nicht bestimmt werden (nd). Die statistische Analyse der Parameter basale $[Ca^{2+}]_i$ und Amplitude wurde mit dem *Kruskal-Wallis-Test* durchgeführt. Für die Analyse der Time to Peak wurde der *Mann-Whitney-U-Test*, und zur Analyse des Δ -Plateaus ein ungepaarter *t-Test* verwendet (ns = p > 0,05; * = p < 0,05; *** = p < 0,001).

3.5.2 IFN γ und TNF α verändern die ATP-Sensitivität in murinen WT-Astrozyten

Die in Kapitel 3.5, Abbildung 19 gezeigte Verstärkung der ATP-induzierten Antwort in WT-Astrozyten wurde im weiteren Verlauf genauer untersucht. Bisher ist bekannt, dass unter normalen Bedingungen nur ATP-Konzentrationen im mikromolaren Bereich zu einem purinerg vermittelten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führen können (Abbracchio et al., 2009; Franke and Illes, 2014). Daher wurde versucht, durch die Applikation nanomolarer Konzentrationen an ATP einen entsprechenden Anstieg auszulösen.

Unter normalen Bedingungen führte die Applikation einer nanomolaren ATP-Konzentration zu keinem transienten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (s. Abbildung 21). Interessanterweise veränderte sich dies nach Vorinkubation mit IFN γ und TNF α , sodass es durch die Applikation von ATP zu einem transienten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ kam.

Aufgrund dieser Beobachtung wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) von ATP unter Verwendung von WT-Astrozyten unter normalen Bedingungen und unter proinflammatorischen Bedingungen erstellt (s. Abbildung 21). Bei Betrachtung der KWK fällt es zum einen auf, dass sich die bereits beschriebene, verstärkte Antwort unter proinflammatorischen Bedingungen in dieser Kurve widerspiegelt und zum anderen, dass es zu einer Linksverschiebung des EC_{50} kommt. Dieser betrug unter normalen Bedingungen $10,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ und verringerte sich nach Behandlung mit IFN γ und TNF α um das 30-fache auf $0,35 \pm 0,03 \mu\text{M}$.

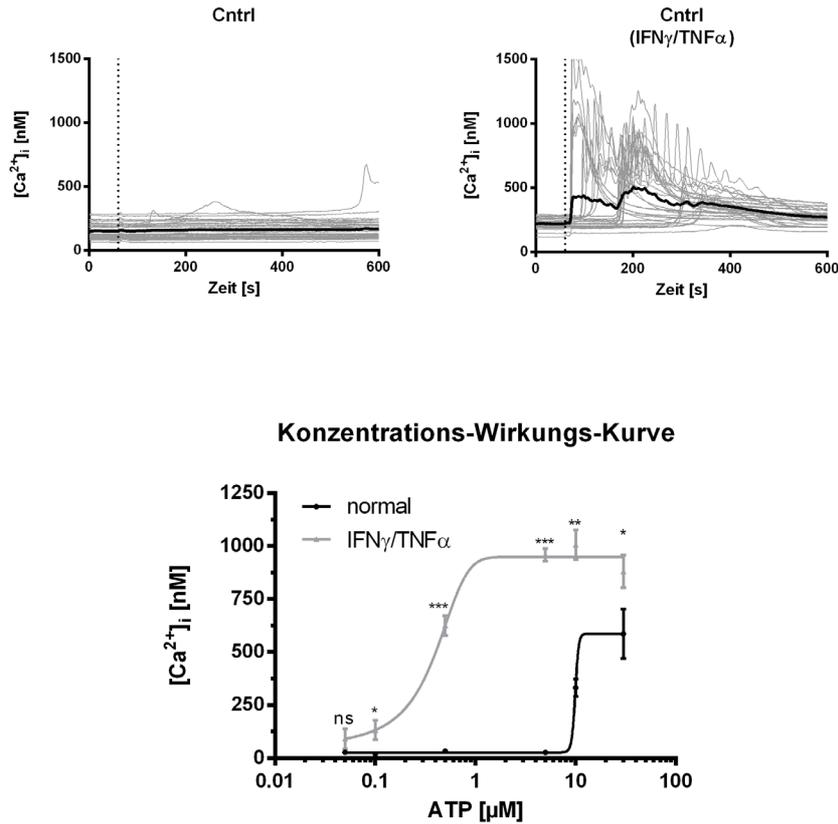


Abbildung 21: Vergleichende Stimulation muriner Wildtyp-(Cntrl) Astrozyten unter Verwendung nanomolarer ATP Konzentrationen.

Oben Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$ der Fura-2-AM-beladenen Cntrl-Astrozyten ohne Vorinkubation und nach 24 h Vorinkubation mit 1 ng/ml $IFN\gamma/TNF\alpha$. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch die Applikation von 500 nM ATP nach 60 s (gestrichelte Linie). Dargestellt ist der Messverlauf einzelner Zellen (graue Linien) und der gemittelte Verlauf aller Einzelmessungen (schwarze Linie). **Unten** Konzentrations-Wirkungs-Kurve unter normalen (schwarze Linie) und unter pro-inflammatorischen Bedingungen (graue Linie). Diese zeigt eine deutliche Linksverschiebung der ATP-Sensitivität nach 24 h Vorinkubation mit 1 ng/ml $IFN\gamma/TNF\alpha$. Aufgetragen wurden die Mittelwerte \pm SEM der Amplitude aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Messpunkte wurden anschließend mit einer nicht-linearen Regressionsanalyse untersucht. Die statistische Analyse wurde wie folgt durchgeführt: 50 nM – *Mann-Whitney-U-Test*; 100 nM – *Mann-Whitney-U-Test*; 500 nM – *Mann-Whitney-U-Test*; 5 μ M – ungepaarter *t-Test*; 10 μ M – ungepaarter *t-Test*; 30 μ M – *Mann-Whitney-U-Test* (ns = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$).

3.5.3 Die Wirkung pro-inflammatorischer Zytokine auf die Genexpression

Um die in Kapitel 3.5.2 beschriebene, durch pro-inflammatorische Moleküle induzierte Linksverschiebung der KWK erklären zu können, wurden vergleichende Genexpressionsanalysen an WT- und an $RYR3^{-/-}$ -Astrozyten durchgeführt (s. Abbildung 22).

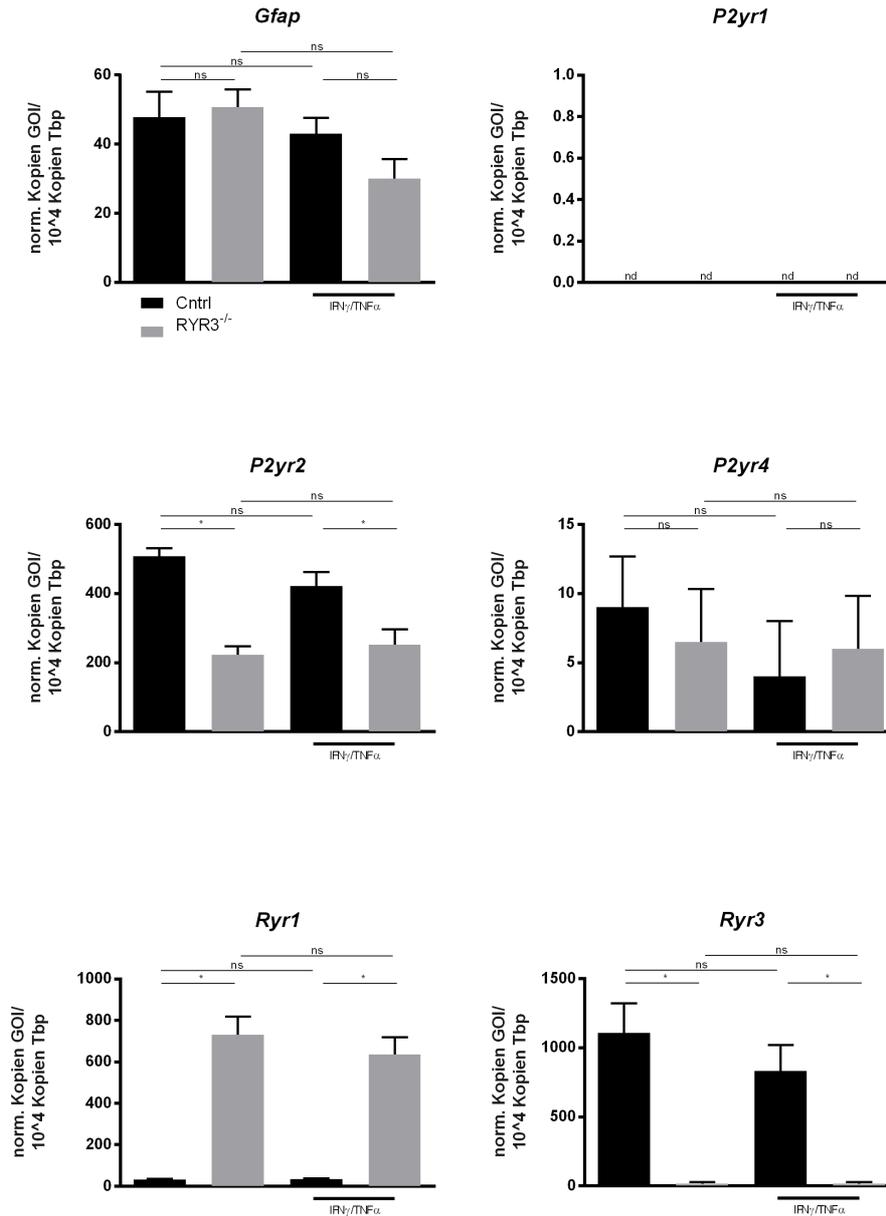


Abbildung 22: Analyse der Genexpression von Wildtyp- (Cntrl) und RYR3^{-/-}-Astrozyten unter normalen und pro-inflammatorischen Bedingungen.

Analyse der Genexpression purinerner Rezeptoren (*P2yr1*, *P2yr2*, *P2yr4*), der Ryanodin-Rezeptoren (*Ryr1*, *Ryr3*) und des Astrozytenmarkers (*Gfap*) an murinen Astrozyten unter normalen Bedingungen und nach 24 h Vorinkubation mit 1 ng/ml IFN γ /TNF α . Die Werte wurden mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode berechnet und auf das Haushaltsgen *Tbp* normalisiert (Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Messungen). Die statistische Analyse wurde unter Verwendung des *Kruskal-Wallis-Test* durchgeführt (ns = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$).

Zur Bestätigung, dass es sich bei den untersuchten Zellen um Astrozyten handelte, wurde die gewonnene RNA auf die Expression des Gens *Glial fibrillary acidic protein* (*Gfap*), welches das für Astrozyten typische saure Gliafaserprotein kodiert, hin untersucht. Bei allen verwendeten Proben konnte die Expression dieses Gens nachgewiesen werden,

wobei sich die errechneten Expressionslevel nicht signifikant voneinander unterscheiden ($p > 0,05$).

Die Rolle des RYR3 bei der Ca^{2+} -Signalweiterleitung in Astrozyten wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, weshalb überprüft wurde, ob es zu einer Veränderung der Genexpression der Gene *Ryr1* und *Ryr3* kommt. Die Expressionsdaten zeigten, dass die Behandlung der Zellen mit pro-inflammatorischen Zytokinen zu keiner signifikanten Veränderung der Expression hinsichtlich beider Gene führt ($p > 0,05$). Interessanterweise führte jedoch der Knock-Out des RYR3 zu einer signifikanten Erhöhung der Genexpression des RYR1 in den RYR3^{-/-}-Astrozyten ($p \leq 0,05$).

Bei genauerer Betrachtung unterschieden sich die Gene *P2yr1*, *P2yr2* sowie *P2yr4* ebenfalls nicht signifikant verglichen zur Vorinkubation mit den pro-inflammatorischen Zytokinen $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ ($p > 0,05$). Es konnte jedoch eine signifikante Verringerung der P2YR2-Expression in RYR3^{-/-}-Astrozyten im Vergleich zu WT-Astrozyten festgestellt werden ($p \leq 0,05$). Dieser Unterschied war ebenfalls nach Verwendung pro-inflammatorischer Zytokine vorhanden.

3.6 Die Bedeutung von ATP für die *in situ* Ca^{2+} -Signaltransduktion

Die vorherigen Ergebnisse dienen der Aufklärung und der Analyse des ATP induzierten Anstiegs der Ca^{2+} -Signalgebung in murinen Astrozyten. Um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt nur ein Artefakt der Zellpräparation ist, wurden vergleichende Experimente hinsichtlich der Rolle des RYR3 bei der Ca^{2+} -Signalgebung an akuten Hirnschnitten von WT- und RYR3^{-/-}-Mäusen durchgeführt.

Das Cerebellum ist eine der Hirnstrukturen, die besonders stark vom Krankheitsbild der MS betroffen ist (Tonra, 2002). Daher wurden die Bergmann-Glia des Cerebellums in akuten Hirnschnitten betrachtet. Dieser Zelltyp zählt zur Klasse der Astro-Glia und befindet sich zwischen der Körnerzellschicht und der Purkinje-Zellschicht.

Vergleichende Experimente wurden ebenfalls am Bulbus olfactorius durchgeführt, einem vorgestülpten Teil des Gehirns, welcher der Geruchswahrnehmung dient. Da die Geruchswahrnehmung in Patienten mit MS ebenfalls gestört sein kann (Zorzon et al., 2000), wurden die glomerulären Astrozyten des Bulbus olfactorius in akuten Hirnschnitten hinsichtlich des ATP-induzierten Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ untersucht.

3.6.1 Der Knock-Out des RYR3 führt zu einem reduzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ im Cerebellum und im Bulbus olfactorius

Die durchgeführten Experimente an akuten Hirnschnitten des Cerebellums in WT- sowie in RYR3^{-/-}-Mäusen zeigte, dass der unter *in vitro* beobachtete Effekt ebenfalls unter In-situ-Bedingungen sichtbar war (s. Abbildung 23).

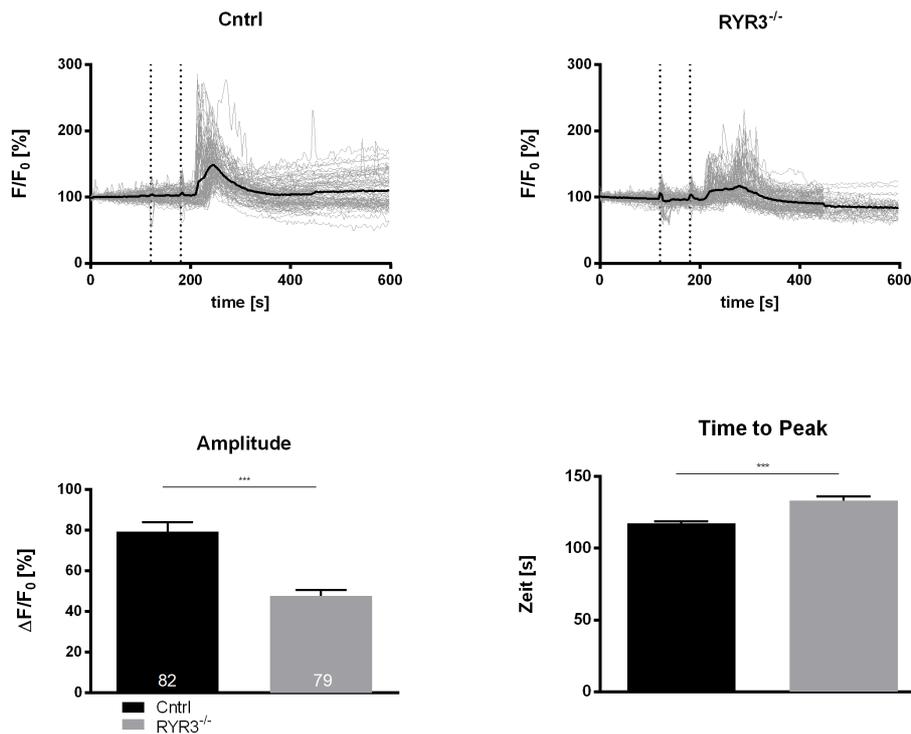


Abbildung 23: Analyse der Ca^{2+} -Signale an akuten Hirnschnitten des Cerebellums von Wildtyp- (Cntrl) und RYR3^{-/-}-Mäusen.

Messverläufe der mit Fluo-4-AM-beladenen akuten Hirnschnitte des Cerebellums. Die Hirnschnitte wurden während des Experiments fortlaufend mit ACSF perfundiert. Nach 120 s (erste gestrichelte Linie) wurden die Schnitte für 60 s mit 30 μ M ATP und anschließend (zweite gestrichelte Linie) erneut mit ACSF perfundiert. Dargestellt ist der Messverlauf einzelner Zellen (graue Linien) und der gemittelte Verlauf aller Einzelmessungen (schwarze Linie). Mithilfe der Messverläufe wurde die Amplitude und die Time to Peak berechnet und als Balkendiagramm dargestellt (Mittelwert \pm SEM). Cntrl-Zellen (n = 82), RYR3^{-/-}-Zellen (n = 79) von mindestens drei verschiedenen Tieren. Die statistische Analyse der Amplitude und der Time to Peak erfolgte unter Verwendung des *Mann-Whitney-U-Test* (***) = $p \leq 0,001$).

Anhand des gemittelten Verlaufs der $[Ca^{2+}]_i$ konnte gezeigt werden, dass der durch ATP ausgelöste Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ geringer ausfiel. Die Berechnung der Amplitude ergab in den Bergmann-Glia der WT-Mäuse (n = 82) eine Änderung der F/F₀ von 79 ± 4 % (Mittelwert \pm SEM). Im Vergleich war die Amplitude in den Bergmann-Glia der RYR3^{-/-}-Mäuse (n = 79) signifikant auf 47 ± 2 % verringert ($p < 0,001$). Die Time to

Peak in WT-Mäusen zeigte, dass die Amplitude hier bereits nach $117 \text{ s} \pm 1 \text{ s}$ erreicht wurde. In den $\text{RYR3}^{-/-}$ -Mäusen war diese signifikant erhöht und die Amplitude wurde erst nach $133 \text{ s} \pm 3 \text{ s}$ erreicht ($p < 0,001$).

Die Untersuchung der glomerulären Astrozyten des Bulbus olfactorius führte zu einem vergleichbaren Bild (s. Abbildung 24).

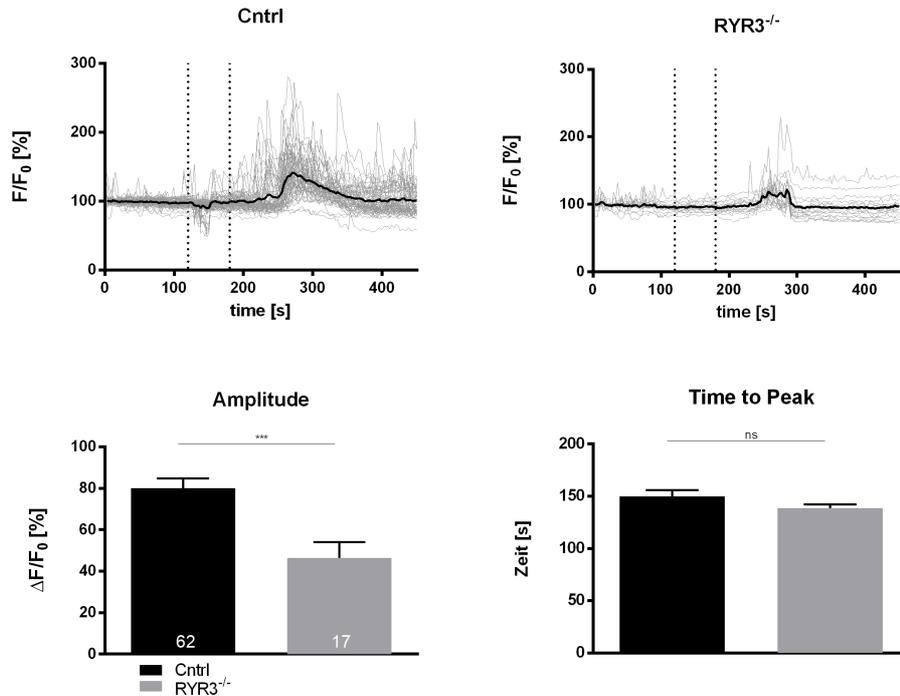


Abbildung 24: Analyse der Ca^{2+} -Signale an akuten Hirnschnitten des Bulbus olfactorius von Wildtyp- (Cntrl) und $\text{RYR3}^{-/-}$ -Mäusen.

Messverläufe der mit Fluo-4-AM-beladenen akuten Hirnschnitte des Bulbus olfactorius. Die Hirnschnitte wurden während des Experiments fortlaufend mit ACSF perfundiert. Nach 120 s (erste gestrichelte Linie) wurden die Schnitte für 60 s mit $30 \mu\text{M}$ ATP und anschließend (zweite gestrichelte Linie) erneut mit ACSF perfundiert. Dargestellt ist der Messverlauf einzelner Zellen (graue Linien) und der gemittelte Verlauf aller Einzelmessungen (schwarze Linie). Mithilfe der Messverläufe wurde die Amplitude und die Time to Peak berechnet und als Balkendiagramm dargestellt (Mittelwert \pm SEM). Cntrl-Zellen ($n = 62$), $\text{RYR3}^{-/-}$ -Zellen ($n = 17$). Die statistische Analyse der Amplitude erfolgte unter Verwendung des ungepaarten *t-Test*. Zur Analyse der Time to Peak wurde der *Mann-Whitney-U-Test* verwendet ($\text{ns} = p > 0,05$; $*** = p < 0,001$).

Es fiel auf, dass der ATP-induzierte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den akuten Hirnschnitten der Knock-Out Tiere geringer ausfiel. Die Änderung F/F_0 der Amplitude betrug in WT-Mäusen ($n = 62$) 80 ± 4 %. Im Vergleich war die Änderung von F/F_0 in den $\text{RYR3}^{-/-}$ -Mäusen ($n = 17$) signifikant auf einen Wert von 46 ± 7 % verringert ($p < 0,001$). Anders als in den Bergmann-Glia des Cerebellums änderte sich die Time to Peak in den glomerulären Astrozyten (Cntrl: $149 \text{ s} \pm 5 \text{ s}$ vs $\text{RYR3}^{-/-}$: $138 \text{ s} \pm 3 \text{ s}$) nicht signifikant ($p > 0,05$).

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des RYR3 in der Ca^{2+} -Signaltransduktion in murinen Astrozyten aufzuklären und zu bestimmen, welche Kanäle, welche sekundären Botenstoffe sowie biochemischen Signalwege involviert sind. Zunächst wurde ATP als ein physiologischer Agonist der Ca^{2+} -Signaltransduktion in murinen Astrozyten identifiziert. Die anschließende Charakterisierung zeigte, dass die sekundären Botenstoffe NAADP und IP_3 , sowie der SOCE maßgeblich am ATP-induzierten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beteiligt sind.

In $\text{RYR3}^{-/-}$ -Astrozyten kommt es unter Beteiligung des sekundären Botenstoffs IP_3 im Vergleich zu WT-Astrozyten zu einem geringeren Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Stimulation mit ATP. Interessanterweise führt die Inhibition des über CRAC-Kanäle vermittelten SOCE jedoch zu keiner Verringerung des ATP-induzierten Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Die Ausbreitung des Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unterscheidet sich in den WT- und in den $\text{RYR3}^{-/-}$ -Astrozyten sowohl in Bezug auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit als auch hinsichtlich der Ausbreitungsrichtung.

Vorherige Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass Astrozyten eine wichtige Rolle im Krankheitsverlauf der MS spielen, und dass der Knock-Out des RYR3 zu einem verringerten Clinical Score im Tiermodell führt (von Osten, 2015). Die Pathogenese der MS geht mit einem Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine im Bereich des ZNS einher (Rudick und Ransohoff, 1992), weshalb in weiteren Experimenten untersucht wurde, ob die Verwendung der Zytokine $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ zu einer Veränderung der Ca^{2+} -Signaltransduktion in murinen Astrozyten führt. Ein pro-inflammatorisches Milieu hatte eine verstärkte Antwort von WT-Astrozyten auf die Stimulation mit ATP zur Folge, wobei dieser Effekt nicht in $\text{RYR3}^{-/-}$ -Astrozyten beobachtet wurde. Die pro-inflammatorische Behandlung der WT-Astrozyten führte zu einer Linksverschiebung der ATP-Sensitivität und einer Verringerung des EC_{50} um den Faktor 30.

Im letzten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit ATP *in situ* ebenfalls zu einem vergleichbaren Effekt führte. An akuten Hirnschnitten des Cerebellums und des Bulbus olfactorius löste die Stimulation mit ATP einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aus. Auch hier konnte eine Verringerung der ATP-vermittelten Ca^{2+} -Transiente in akuten Hirnschnitten von $\text{RYR3}^{-/-}$ -Mäusen beobachtet werden.

4.1 ATP als Stimulus für den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten

Astrozyten verfügen über eine Vielzahl von GPCR, die in Kapitel 1.1 bereits ausführlich beschrieben wurden. Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass nur das Signalmolekül ATP als Stimulus zu einem transienten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ im verwendeten Zellmodell führte. Die Modulation der $[Ca^{2+}]_i$ ist für Astrozyten von essenzieller Bedeutung, da sie an zellulären Prozessen, wie der Modifikation des umgebenden neuronalen Netzes sowie der Kontraktion und Dilatation angrenzender Blutgefäße, beteiligt ist (Henneberger und Rusakov, 2010; Scemes, 2000; Scemes und Giaume, 2006). Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führt in Astrozyten zu einer Veränderung der Genexpression, die die Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat zur Folge hat (Parpura et al., 1994; Parpura et al., 2011), der an angrenzenden neuronalen Synapsen stimulierend wirkt. Die Kontraktion und Dilatation von Blutgefäßen, die in Kontakt mit Astrozyten stehen, wird über die Bildung von Arachidonsäure eingeleitet, die durch den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ und die Aktivierung der Phospholipase A gebildet wird und frei in die glatten Muskelzellen diffundieren kann (Mulligan und MacVicar, 2004).

Die durchgeführten In-vitro-Untersuchungen und die kontrollierten Umgebungsbedingungen der murinen Astrozyten können eine Erklärung dafür sein, dass nur ATP zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ geführt hat. Der Prozess der Isolation und der Kultivierung führte dazu, dass sich die Astrozyten in einer definierten Umgebung befanden, die sich von der regulierten Umgebung im Organismus unterschied. Eine Anpassung der Zellen an konstante Umgebungsbedingungen kann eine verminderte oder ausbleibende Expression der Gene für Rezeptoren wie mGlu1, mGlu5, H-R, Bk-R sowie des Ach-R zur Folge haben, was eine fehlende Reaktion der Astrozyten erklären würde. Dieser Effekt konnte bereits in humanen Stammzellen und murinen Hepatozyten beobachtet werden (Januszyk et al., 2015; Neumann et al., 2010; Pan et al., 2009). Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass nur bestimmte Substanzen, wie in diesem Fall der Neurotransmitter ATP, zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führen.

Zwar konnte bereits gezeigt werden, dass die Verwendung von Molekülen wie Bradykinin, Carbachol sowie Histamin an kultivierten Astrozyten der Ratte oder an akuten Hirnschnitten der Maus zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führt (Barceló-Torns et al., 2011; Doengi et al., 2008; Gimpl et al., 1992; Inagaki et al., 1991), jedoch gibt es bisher keine Studien, die die Unterschiede zwischen Astrozyten der Maus und Astrozyten der Ratte untersucht haben.

Bei Betrachtung der notwendigen Konzentration von 30 μM ATP zur Auslösung einer Ca^{2+} -Transiente in Astrozyten bleibt unklar, welche Zielrezeptoren aktiviert werden. Purinerge Rezeptoren gelten als Zielrezeptoren für ATP, deren EC_{50} im mikromolaren Bereich zu finden ist. Die spezifischen Agonisten der Rezeptoren P2Y1, P2Y12 und P2Y13 führten jedoch zu keinem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Denkbar wäre, dass ein anderer P2Y Rezeptor für den Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verantwortlich ist, der nicht über die verwendeten spezifischen Agonisten aktiviert wurde.

Die Bedeutung des Neurotransmitters ATP für Astrozyten *in vivo* ist ebenfalls nicht gänzlich geklärt. Zwar ist ATP im neuronalen Netzwerk häufig an der Signalweiterleitung zwischen Neuronen beteiligt (Henneberger und Rusakov, 2010; Scemes, 2000), jedoch ist fraglich, ob die freigesetzte Menge an ATP ausreicht, um einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in benachbarten Astrozyten hervorzurufen. Intrazellulär sind ATP-Konzentrationen im nanomolaren Bereich nachgewiesen worden (Marcaida et al., 1997), wobei die Freisetzung dieser Mengen zu gering ist, um an kultivierten Astrozyten einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auszulösen. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Präsenz von Zytokinen den EC_{50} für ATP an Astrozyten um das 30-fache reduziert, was einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter Verwendung nanomolarer Mengen an ATP zur Folge hat.

Die Kombination aus Zytokinen und nanomolarer Mengen an ATP, die durch Astrozyten freigesetzt werden können (Coco et al., 2003), unterstützen die zentrale Rolle der Astrozyten im ZNS unter inflammatorischen Bedingungen.

4.2 Die Charakterisierung des Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in murinen WT-Astrozyten

Die Analyse des durch ATP ausgelösten Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde mithilfe von pharmakologischen Antagonisten und dem Knock-Out eines Gens durchgeführt, sodass die Inhibition bestimmter Teilabschnitte der Ca^{2+} -Signaltransduktion ermöglicht wurde. Zu den bekanntesten Botenstoffen zählt cADPR, der durch die Bindung an RYR zu einem Ca^{2+} -Anstieg im Zytosol führt. Die Charakterisierung des cADPR-vermittelten Mechanismus wurde in vielen Zellsystemen wie T-Lymphozyten, Seeigelleiern oder Fibroblasten untersucht (Bruzzone et al., 2003; Guse et al., 1995; Lee, 1993), meist unter Verwendung des cADPR Antagonisten 8-Br-cADPR (Walseth et al., 1993). Die Überlegung, dass die extrazelluläre Stimulation unter Verwendung von ATP zur

intrazellulären Bildung von cADPR führen kann, wurde bis zum Jahre 2003 nicht in Betracht gezogen. Erste Untersuchungen von Bruzzone et al. in Fibroblasten konnten keine Bildung von cADPR nach ATP-Stimulation nachweisen (Bruzzone et al., 2003). Im Jahre 2006 zeigten Moreschi et al. erstmals, dass NAD^+ ein Agonist des P2Y_{11} -Rezeptors ist, dessen Stimulation zum Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt (Moreschi et al., 2006). Nachfolgend konnten sie im Jahr 2008 zeigen, dass NAADP^+ ebenfalls ein Agonist des P2Y_{11} Rezeptors ist und dass der sich anschließende Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch die Bildung von IP_3 sowie durch die Bildung von cADPR charakterisiert ist (Moreschi et al., 2008). Da bisher nicht klar war, welcher Rezeptor für den ATP-abhängigen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten verantwortlich ist, war zunächst denkbar, dass der P2Y_{11} -Rezeptor, der selektiv durch ATP aktiviert werden kann (Ralevic und Burnstock, 1998), eine essenzielle Rolle in Astrozyten einnimmt und zur Bildung von cADPR führt. Die Verwendung des Inhibitors 8-Br-cADPR im Abschnitt 3.2.1 macht jedoch deutlich, dass es keine Beteiligung von cADPR am ATP ausgelösten Ca^{2+} -Signal gibt (s. Abbildung 10).

Der Botenstoff NAADP gilt seit seiner Entdeckung im Jahre 1987 und seiner Charakterisierung im Jahr 1995 als eine der effektivsten Substanzen, die bereits unter Verwendung nanomolarer Mengen einen Effekt auf die Ca^{2+} -Signaltransduktion haben (Clapper et al., 1987; Lee und Aarhus, 1995). Ein Schwerpunkt der Charakterisierung des NAADP-vermittelten Ca^{2+} -Signals wurde damals in Seeigeleiern (Perez-Terzic et al., 1995) sowie in anderen Säugetierzellsystemen durchgeführt (Kinnear et al., 2008; Yamasaki et al., 2004; Zhang, 2006). Im Jahr 2011 konnte durch Barceló-Torns et al. gezeigt werden, dass es eine Beteiligung von NAADP am ATP-vermittelten Anstieg in kultivierten Astrozyten der Ratte gibt (Barceló-Torns et al., 2011). Diese Untersuchungen wurden mithilfe eines membrangängigen NAADP-Derivats durchgeführt und unter Verwendung von $100 \mu\text{M}$ ATP, einer ATP-Konzentration von der bekannt ist, dass sie ebenfalls zur Aktivierung des P2X_7 -Rezeptors führt (Ralevic und Burnstock, 1998). Dennoch konnte die Gruppe um Barceló-Torns zeigen, dass das durch ATP ausgelöste Ca^{2+} -Signal im gewählten Zellmodell durch Verwendung des NAADP-Inhibitors Ned-19 zu einem verringerten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt (Barceló-Torns et al., 2011). Diese Beobachtung passt zu den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, in denen ebenfalls gezeigt werden konnte, dass der durch ATP ausgelöste Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in murinen WT-Astrozyten durch Verwendung des NAADP-Inhibitors BZ194 signifikant verringert ist (s. Abbildung 11). Die Verwendung des NAADP-Antagonisten führte zur

signifikanten Verringerung der Amplitude und des Plateaus des Ca^{2+} -Signals. Die benötigte Zeit bis zur höchsten Amplitude erhöhte sich signifikant. Die signifikanten Veränderungen der Parameter spricht dafür, dass NAADP während der gesamten durch ATP ausgelösten Stimulation eine Rolle spielt. Wie die Bildung von NAADP realisiert wird und an welchen Rezeptor NAADP bindet und das Ca^{2+} -Signal verstärkt, bleibt jedoch unklar (s. Abbildung 25). Zwar konnte 2015 gezeigt werden, dass in T-Lymphozyten der RYR1 für NAADP vermittelte Ca^{2+} -Signale verantwortlich ist (Wolf et al., 2015), jedoch bleibt zu klären, ob dieser Mechanismus auf Astrozyten übertragbar ist. 2016 konnte von Diercks gezeigt werden, dass in primären T-Lymphozyten der RYR3 kein Zielrezeptor des Botenstoffs NAADP darstellt (Diercks, 2016).

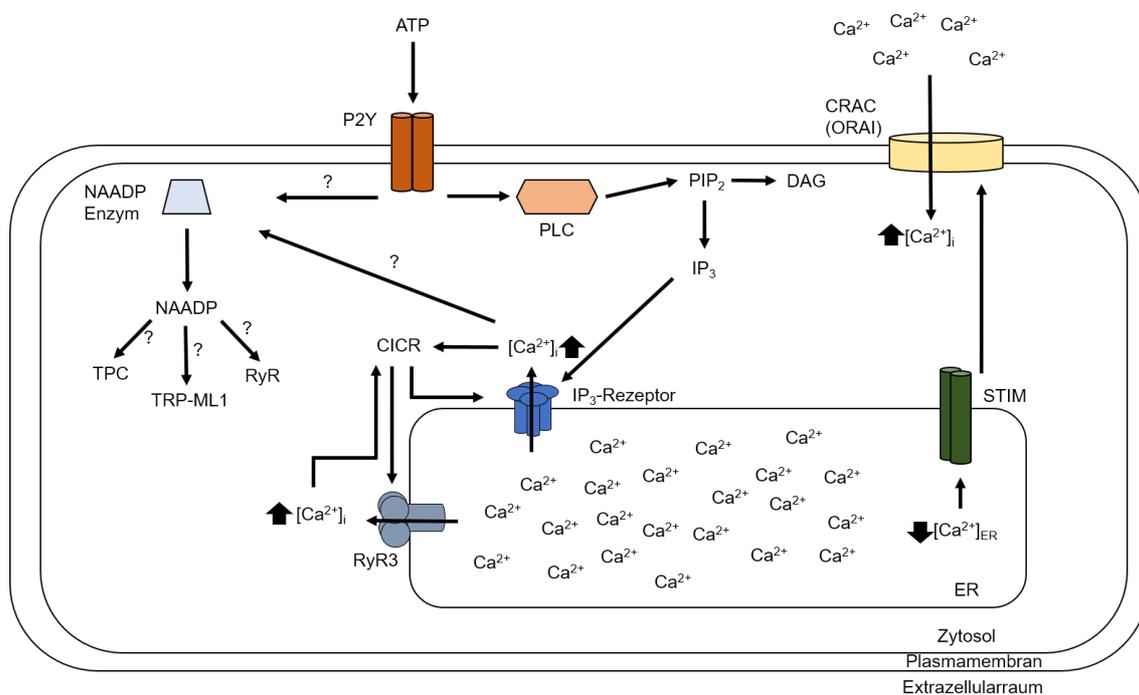


Abbildung 25: Schema des ATP-induzierten Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in murinen Wildtyp-Astrozyten.

Nach ATP-Stimulation kommt es über purinerge P2Y-Rezeptoren zur PLC β -abhängigen Bildung des sekundären Botenstoffs IP $_3$. Dieser führt über die IP $_3$ R zur Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER. Der initiale Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wird über CICR der auf IP $_3$ R und RYR wirkt verstärkt. Der Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_{ER}$ führt zur Translokation von STIM zu CRAC-Kanälen der Plasmamembran, welche sich öffnen und den Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ weiter verstärken. Unklar bleibt bisher die Bildung und die Rolle des sekundären Botenstoffs NAADP, der einen Anteil zum ATP-vermittelten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beiträgt. Potenzielle Zielrezeptoren für NAADP sind die RYR, wobei in T-Lymphozyten gezeigt wurde, dass RYR1 jedoch nicht der RYR3 ein Zielrezeptor für NAADP ist (Diercks, 2016; Wolf et al., 2015). Weiterhin könnten auch TPC oder TRP-ML1 am NAADP Anteil des Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beteiligt sein.

Die beschriebene Problematik der möglichen Stimulation des P2X $_7$ -Rezeptors wurde in dieser Arbeit durch den Einsatz von 30 μM ATP vermieden, einer Konzentration von der bekannt ist, dass sie keine Aktivierung dieses Rezeptors auslöst (Coddou et al., 2011). Aufgrund des genetischen Hintergrunds der Versuchstiere (C57BL/6) kann ebenfalls

davon ausgegangen werden, dass keine Stimulation des Rezeptors möglich war, da bereits 2002 von Adriouch et al. gezeigt wurde, dass in C57BL/6-Mäusen eine natürliche Mutation in der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors die ATP-Sensitivität des P2X₇-Rezeptors reduziert (Adriouch et al., 2002).

Die weitere Charakterisierung des durch ATP ausgelösten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ erfolgte im Hinblick auf die Rolle des Ca^{2+} -Einstroms. Bereits im Jahr 1989 wurde gezeigt, dass durch die Leerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher ein Mechanismus in Gang gesetzt wird, der dazu führt, dass extrazellulär vorhandene Ca^{2+} -Ionen über verschiedene CRAC-Kanäle ins Zytosol gelangen (Berridge und Irvine, 1989; Hoth und Penner, 1992) und so den über die Ca^{2+} -Freisetzung vermittelten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ verstärken. Eine deskriptive Zusammenfassung der beteiligten Komponenten wurde 2015 von Patrick Hogan und Anjana Rao veröffentlicht (Hogan und Rao, 2015).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es eine SOCE-Beteiligung unter Einfluss der CRAC-Kanäle an der durch ATP ausgelösten Ca^{2+} -Transiente in Astrozyten gibt. Die Verwendung der Substanz Synta66 sowie die Verwendung eines Ca^{2+} -freien Extrazellulärpuffers zeigte, dass die unter normalen Bedingungen beobachtete Ca^{2+} -Transiente sowohl nach Inhibition der CRAC-Kanäle, als auch unter Ca^{2+} -freien Bedingungen geringer ausfiel. Es wurden nur die signifikante Verringerung der Amplitude sowie ein Anstieg der Time to Peak beobachtet (s. Abbildung 12 und Abbildung 13). Dies zeigt, dass der Einstrom freier Ca^{2+} -Ionen bereits zu Beginn der durch ATP ausgelösten Ca^{2+} -Transienten eine Rolle spielt, aber wohl zum Ende des Ca^{2+} -Signals unwichtiger wird. Vorherige Arbeiten beschreiben häufig den Nachteil der Verwendung von Synta66, da der genaue Mechanismus der Inhibition noch nicht aufgeklärt wurde (Jairaman und Prakriya, 2013). Trotz des ungeklärten Mechanismus konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von 5 μ M Synta66 spezifisch die CRAC-Kanäle inhibiert (Di Sabatino et al., 2009; Ng et al., 2008).

Die im Rahmen der Arbeit gemachten Beobachtungen unter Verwendung von Synta66 konnten durch die Durchführung der Experimente unter Ca^{2+} -freien Bedingungen bestätigt werden und erlauben den entsprechenden Rückschluss auf die Beteiligung des SOCE-Mechanismus am ATP-induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten.

IP₃ ist ein weiterer sekundärer Botenstoff, von dem seit längerer Zeit bekannt ist, dass seine Bildung zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führt. Dieser Anstieg ist charakterisiert durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER, was bereits 1983 von Streb et al. an Azinus-Zellen des Pankreas gezeigt werden konnte (Streb et al., 1983). Die frühen deskriptiven

Untersuchungen von Berridge und Irvine in den Jahren 1984 sowie 1989 zeigten die wichtige Funktion von IP_3 als Botenstoff der Ca^{2+} -Signaltransduktion (Berridge und Irvine, 1984; Berridge und Irvine, 1989). Studien an T-Lymphozyten sowie gemischten Gliazell-Kulturen konnten 1993 nachweisen, dass eine Beteiligung des IP_3 -gesteuerten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ auch in anderen Zellsystem zu beobachten ist (Charles et al., 1993; Guse et al., 1993). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Rolle des Botenstoffs IP_3 durch Verwendung des PLC-Inhibitors U-73122 erfolgreich aufgeklärt (s. Abbildung 14). Demnach scheint IP_3 im durch ATP-vermittelten Signalweg die wichtigste Rolle zuzukommen, da die Antagonisten für cADPR und NAADP zu keinem oder nur einem teilweisen Signalverlust führten.

Zusammenfassend lässt sich über die durch ATP induzierte Ca^{2+} -Transiente in murinen WT-Astrozyten festhalten, dass das Signal auf Mechanismen zurückzuführen ist, die durch die Bildung der sekundären Botenstoffe NAADP und IP_3 sowie durch SOCE charakterisiert sind (s. Abbildung 25).

4.3 Die Rolle des RYR3 am durch ATP induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$

Die Verwendung muriner Astrozyten, die über einen Knock-Out des RYR3 verfügen, zeigten im Vergleich zu WT-Astrozyten eine verringerte, durch ATP ausgelöste Ca^{2+} -Transiente (s. Abbildung 15). Die Verringerung war in der Amplitude, der Time to Peak und dem Δ -Plateau des Ca^{2+} -Signals sichtbar und impliziert eine wichtige Rolle des RYR3 während des ATP-vermittelten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$. Die Aufklärung hinsichtlich beteiligter Botenstoffe sowie eventueller Unterschiede in der Signalweiterleitung konnten belegen, dass die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER wie in den WT-Astrozyten auf den sekundären Botenstoff IP_3 zurückzuführen ist (s. Abbildung 17). Dementsprechend ist davon auszugehen, dass sowohl in WT-Astrozyten als auch in $RYR3^{-/-}$ -Astrozyten ATP durch direkte Bindung an einen P2Y-Rezeptor zur PLC β -vermittelten Bildung von IP_3 führt.

Die Inhibition des SOCE schien keinen Effekt auf das Ca^{2+} -Signal in $RYR3^{-/-}$ -Astrozyten zu haben (s. Abbildung 16). Dies kann damit erklärt werden, dass eine strikte Abfolge der Ca^{2+} -freisetzenden Mechanismen, nämlich die Leerung der intrazellulären Speicher, CICR und SOCE, notwendig ist, um einen globalen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ auszulösen.

In WT-Astrozyten geschieht dies zunächst über die Bildung der sekundären Botenstoffe IP_3 und NAADP, die zu einer initialen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER führen. Die Beteiligung der Lysosomen über die NAADP vermittelte Aktivierung der TPCs scheint an diesem Prozess ebenfalls beteiligt zu sein, was von Barceló-Torns et al. im Jahr 2011 gezeigt werden konnte (Barceló-Torns et al., 2011). Der initiale Ca^{2+} -Ausstrom wird anschließend über CICR mithilfe der RYR und IP_3R verstärkt, was bereits von Verkhratsky et al. sowie Makoto Endo in den Jahren 1996 und 2009 zusammenfassend für verschiedene Zellsysteme beschrieben wurde (Endo, 2009; Verkhratsky und Shmigol, 1996). Der CICR führt zu einer verstärkten Ca^{2+} -Freisetzung, was den weiteren Abfall der $[Ca^{2+}]_{ER}$ zur Folge hat. Während der Leerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher kommt es zum SOCE, einem Mechanismus der zur STIM-vermittelten Aktivierung der CRAC-Kanäle führt und den Ca^{2+} -Einstrom ins Zytosol zur Folge hat. In den $RYR3^{-/-}$ -Astrozyten fehlt ein Teil des CICR über den RYR3, der zu einem starken Abfall der $[Ca^{2+}]_{ER}$ führen würde. Der sich normalerweise anschließende SOCE bleibt aus. Das Fehlen beider Ca^{2+} -Mechanismen erklärt den verminderten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach ATP Stimulation (s. Abbildung 26).

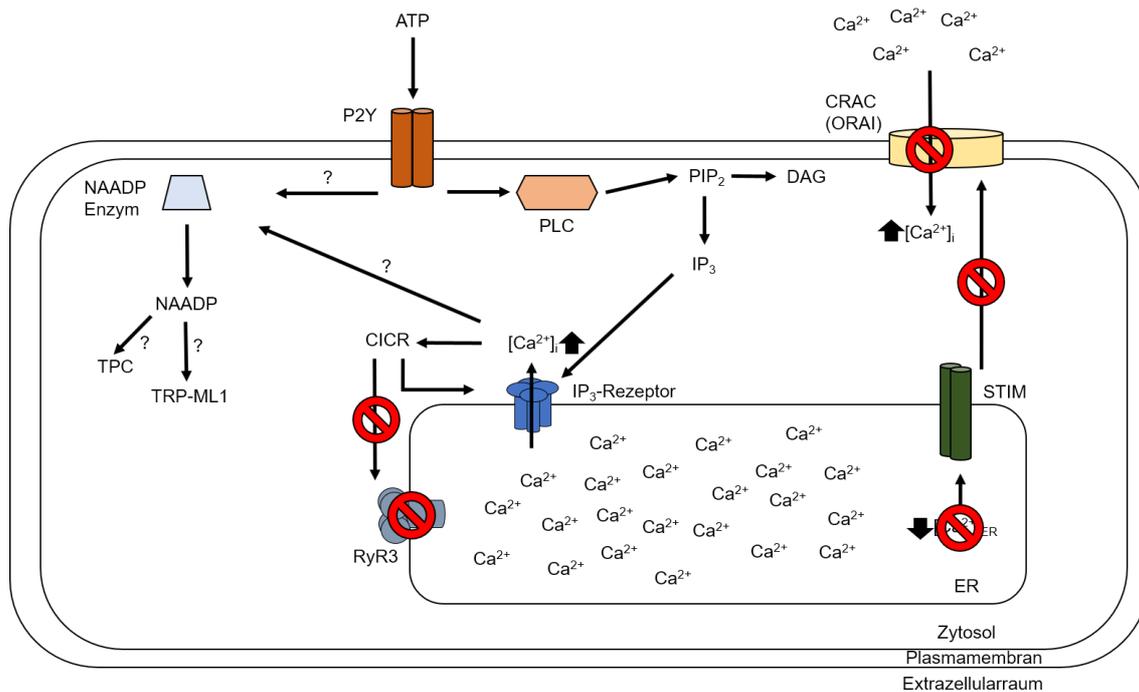


Abbildung 26: Schema des ATP-induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen $RYR3^{-/-}$ -Astrozyten.

Nach ATP-Stimulation kommt es über purinerge P2Y-Rezeptoren zur PLC β -abhängigen Bildung des sekundären Botenstoffs IP $_3$. Dieser führt über die IP $_3$ R zur Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. Der initiale Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ wird über CICR der auf IP $_3$ R wirkt verstärkt. Das Fehlen der RYR3 führt dazu, dass der normalerweise durch CICR verursachte verstärkte Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nicht stattfinden kann. Der Abfall der $[Ca^{2+}]_{ER}$ ist nicht so stark, sodass der über STIM-aktivierte und über CRAC-Kanäle vermittelte SOCE ausbleibt. Ob und wie eine Beteiligung des Botenstoffs NAADP auf potenzielle Zielrezeptoren (TPC, TRP-ML1) eine Rolle spielt, bleibt zu klären.

4.4 Die Analyse subzellulärer Ca $^{2+}$ -Signale in murinen Astrozyten

Die in Kapitel 3.4 durchgeführten Experimente wurden mithilfe der Farbstoffkombination aus Fluo-4-AM und Fura-Red-AM durchgeführt. Beide Farbstoffe lassen sich bei 488 nm Wellenlänge anregen und verfügen über Emissionsmaxima bei 525 nm (Fluo-4) sowie 660 nm (Fura Red) (Johnson, 2010). Es ist somit kein Wechsel der Anregungswellenlänge wie bei anderen üblichen Ca $^{2+}$ -Indikatoren notwendig, und durch die Verwendung eines DualView kann zeitgleich das Sichtfeld für Fluo-4 und Fura Red aufgenommen werden. Die maximal mögliche Aufnahmegeschwindigkeit erhöht sich und erlaubt Aufnahmezeiten von 38,5 Zeitpunkten*s $^{-1}$ und schneller (Diercks, 2016).

Die gleichzeitige Verwendung verschiedener Ca $^{2+}$ -Indikatoren wurde bereits in verschiedenen Zellsystemen erfolgreich eingesetzt. So konnte in Kardiomyozyten sowie HeLa-Zellen gezeigt werden, dass sich die Kombination von Fluo-3 und Fura Red für ratiometrische Ca $^{2+}$ -Messungen eignet (Lipp und Niggli, 1993; Thomas et al., 2000).

Ebenfalls wurde die Kombination der Farbstoffe Fluo-4-AM und Fura-Red-AM erfolgreich in T-Lymphozyten getestet und konnte schließlich 2015 dazu verwendet werden, initiale Ca^{2+} -Signale in murinen T-Lymphozyten nachzuweisen (Wang et al., 2014; Wolf et al., 2015).

Die 2015 von Wolf et al. beschriebene Methode wurde in dieser Arbeit auf murine Astrozyten übertragen, um initiale subzelluläre Ca^{2+} -Signale nachzuweisen. In WT-Astrozyten kommt es nach Stimulation mit ATP schnell zum lokalen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Bereich der Zellperipherie (s. Abbildung 18). Diese lokal begrenzten Ca^{2+} -Signale breiten sich anschließend wellenähnlich über die gesamte Zelle aus und haben den globalen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zur Folge. Bei Betrachtung der $\text{RyR3}^{-/-}$ -Astrozyten fiel auf, dass der durch ATP ausgelöste initiale Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Vergleich zu WT-Astrozyten später auftrat. Die ersten Ca^{2+} -Signale waren nicht im Bereich der Zellperipherie sichtbar, sondern traten im perinukleären Bereich der Zelle auf (s. Abbildung 18). Anhand der aufgenommenen Einzelbilder der WT- und $\text{RyR3}^{-/-}$ -Astrozyten konnte die Ausbreitungsgeschwindigkeit berechnet werden. Die Werte ergaben, dass die Geschwindigkeit in WT-Astrozyten mit $84 \pm 8 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ signifikant höher war als in $\text{RyR3}^{-/-}$ -Astrozyten mit $37 \pm 10 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. Die verminderte Ausbreitungsgeschwindigkeit ist auf die Verringerung des CICR zurückzuführen. Durch das Fehlen des RyR3 wird weniger Ca^{2+} aus dem ER ins Zytosol abgegeben und kann sich so langsamer über die gesamte Zelle ausbreiten.

Bereits 2009 wurden erste Berechnungen hinsichtlich der Ca^{2+} -Dynamik in Astrozyten durchgeführt, die mithilfe vorliegender primärer Datensätze zu einer Ausbreitungsgeschwindigkeit von $15 - 27 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ führten (Kang und Othmer, 2009). Die von Kang und Othmer durchgeführten Berechnungen beschränkten sich jedoch auf die Analyse verschiedener In-situ-Studien, und die Gleichungen wurden unter Einbezug der Diffusionskoeffizienten von IP_3 sowie ATP aufgestellt. Kang und Othmer gehen davon aus, dass die Ausbreitung von Ca^{2+} wesentlich von der Bildung und Ausbreitung von IP_3 sowie der parakrinen Weiterleitung mithilfe von ATP abhängig ist (Kang und Othmer, 2009).

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte wurden nicht automatisiert und ohne Beachtung anderer Diffusionskoeffizienten berechnet. Ebenfalls zu beachten ist, dass es erst durch die Anwendung der 2015 beschriebenen Methode möglich war, die Dynamik initialer Ca^{2+} -Signale aufzuklären (Wolf et al., 2015).

Das im Jahre 2009 von Kang und Othmer beschriebene Verfahren zur Berechnung von Ausbreitungsgeschwindigkeiten berücksichtigt neben der bereits genannten Diffusionskoeffizienten für IP_3 und ATP ebenfalls die Konzentrationen von Proteinen, die eine Rolle in der Ca^{2+} -Signaltransduktion einnehmen (Kang und Othmer, 2009). Daher können die in dieser Arbeit ermittelten Werte für WT- und $\text{RYR3}^{-/-}$ -Astrozyten nur als erster Anhaltspunkt betrachtet werden.

4.5 $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ verstärken den Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in WT-, aber nicht in $\text{RYR3}^{-/-}$ -Astrozyten

Das Krankheitsbild der MS ist durch einen Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine im ZNS charakterisiert. Bereits 1992 wurde von Rudick und Ranshoff beschrieben, dass die Infiltration autoreaktiver T-Lymphozyten zur Ausschüttung verschiedener Interleukine sowie von $\text{INF}\gamma$ führt (Rudick und Ranshoff, 1992). Die sich anschließende Aktivierung der Monozyten hat die Produktion weiterer Interleukine sowie von $\text{TNF}\alpha$ zur Folge. Die Wirkung dieser Entzündungsmediatoren auf Astrozyten und die sich ergebenden Veränderungen hinsichtlich des durch ATP ausgelösten Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden bisher auf molekularer Ebene nicht untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass 1 ng/ml der Zytokine $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ in murinen Astrozyten einen gravierenden Effekt auf den durch ATP ausgelösten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hat. Der unter Standardbedingungen beobachtete Effekt von ATP, der zur IP_3 und NAADP-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER sowie zum über CRAC-Kanäle vermittelten SOCE führte, wurde in WT-Astrozyten verstärkt. Es kam zu einem signifikanten Anstieg der Amplitude in diesen Zellen (s. Abbildung 19). Interessanterweise führte ein pro-inflammatorisches Milieu in murinen $\text{RYR3}^{-/-}$ -Astrozyten zu keiner signifikanten Veränderung des ATP-induzierten Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Die ausgelöste Ca^{2+} -Transiente konnte wie unter normalen Bedingungen komplett durch den PLC-Inhibitor U-73122 gehemmt werden (s. Abbildung 20). Der globale Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist also vollständig auf die Bildung des Botenstoffs IP_3 zurückzuführen.

In glatten Muskelzellen konnte bereits gezeigt werden, dass $\text{TNF}\alpha$ ein durch Bradykinin und Carbachol ausgelöstes Ca^{2+} -Signal verstärken kann (Amrani et al., 1995). Eine Erklärung für den von Amrani et al. beschriebenen Effekt war, dass die Bindung von $\text{TNF}\alpha$ an seinen Rezeptor dazu führt, dass sich die Signaltransduktion zwischen GPCR

und PLC β verändert und so den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ verstärkt. Es wurde jedoch auch in Betracht gezogen, dass es zu einer erhöhten Expression muskarinerner Rezeptoren und des Bk-R kommen kann, die an der intrazellulären Ca^{2+} -Signaltransduktion beteiligt sind. Schnurr et al. zeigten im Jahr 2000, dass es einen synergistischen Effekt von ATP und TNF α in dendritischen Zellen gibt (Schnurr et al., 2000). Zwar wurde die verstärkte Sekretion von Interleukin-12 untersucht, dennoch ist denkbar, dass sich der Synergismus auch auf andere Mechanismen, wie die Ca^{2+} -Signaltransduktion auswirken könnte.

TNF α führt ebenfalls zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, dessen Translokation in den Nukleus eine Veränderung der Genexpression von Zytokinen, Enzymen und Rezeptoren zur Folge hat (Schütze et al., 1995). Ob und inwieweit es jedoch in murinen Astrozyten zu einer NF- κ B-vermittelten Veränderung der Genexpression von Ca^{2+} -Kanälen, Enzymen oder Rezeptoren kommt, konnte bislang nicht gezeigt werden. Die Rolle von IFN γ bleibt in der Verstärkung des Mechanismus unklar. Es ist bekannt, dass IFN γ im ZNS die Expression von MHC-Molekülen (Hirsch et al., 1983) sowie die Produktion von NO durch die Aktivierung der Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) hochreguliert (Lee et al., 1993) – eine Verknüpfung zur Ca^{2+} -Signaltransduktion wurde bisher nicht beschrieben. Experimente zur Untersuchung der alleinigen Wirkung von IFN γ und TNF α wären notwendig, um den Signalweg zur Verstärkung des ATP-vermittelten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ aufzuklären.

4.6 Verschiebung der ATP-Sensitivität durch IFN γ und TNF α in WT-Astrozyten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einer Verschiebung der ATP-Sensitivität durch die Verwendung von IFN γ und TNF α kommt (s. Abbildung 21). Unter Standardbedingungen konnte bisher durch die Applikation nanomolarer ATP-Konzentrationen kein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet werden, was sich durch Verwendung der Zytokine IFN γ und TNF α änderte. Es konnte gezeigt werden, dass ein pro-inflammatorisches Milieu zu einer 30-fachen Verringerung des EC₅₀ von ATP (normal: $10,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ vs pro-inflammatorisch: $0,35 \pm 0,03 \mu\text{M}$) führt.

Die Literatur beschreibt nur wenige Untersuchungen hinsichtlich der Verwendung nanomolarer Konzentrationen von ATP. Zwar konnte 1999 gezeigt werden, dass ATP als Botenstoff bereits in geringen Mengen zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in Gliazellen führen kann (Guthrie et al., 1999), jedoch konnte bisher nicht nachgewiesen werden, dass sich

der Antwortmechanismus unter pro-inflammatorischen Bedingungen verstärkt und der Anstieg unter Verwendung nanomolarer Mengen ATP vergleichbar ist mit dem Anstieg unter Verwendung mikromolarer Mengen ATP. Ein solcher Effekt ist von großem Interesse, da davon ausgegangen wird, dass im Extrazellulärraum nur nanomolare Mengen an ATP vorhanden sind (Melani et al., 2005). Die extrazelluläre ATP-Konzentration bei verschiedenen Krankheiten und damit einhergehenden Entzündungen ist häufig erhöht, wird aber meist schnell durch Endonukleotidasen reguliert (Trautmann, 2009). Die Beobachtung, dass Astrozyten unter pro-inflammatorischen Bedingungen dazu in der Lage sind, auf geringe Konzentrationen des Neurotransmitters ATP mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zu reagieren, bietet einen Anhaltspunkt für die genaue Aufklärung der am Krankheitsbild der MS beteiligten Mechanismen.

Es ergibt sich zum ersten Mal ein Erklärungsansatz, wie Entzündungsreaktionen im Bereich des ZNS zur verstärkten Reaktivität von Astrozyten führen können. Der in WT-Astrozyten auftretende Effekt, der nicht in RYR3^{-/-}-Astrozyten sichtbar war, unterstützt diese Hypothese, da Experimente hinsichtlich der EAE im Tiermodell zu einem verringerten Clinical Score in RYR3^{-/-}-Mäusen führten (von Osten, 2015). Es bleibt die Frage nach der Verbindung zwischen den Botenstoffen IFN γ und TNF α und dem Einfluss auf die Ca²⁺-Signaltransduktion. Von Osten konnte 2015 zeigen, dass der Knock-Out des RYR3 in Astrozyten zu einer verringerten Sekretion von Chemo- und Zytokinen führt (von Osten, 2015). In Zusammenhang mit der Änderung der Ca²⁺-Signaltransduktion spricht diese Beobachtung für eine Ca²⁺-abhängige Regulation der Genexpression über NF- κ B.

TNF α führt ebenfalls zur Aktivierung von NF- κ B, was die Regulation einer Vielzahl an Genen zur Folge hat (Kim et al., 2003; Schütze et al., 1995). Es bleibt zu klären, ob es durch die Behandlung der WT-Astrozyten mit den Zytokinen IFN γ und TNF α zu NF- κ B-vermittelten Veränderungen der Genexpression kommt, die die Verschiebung der ATP-Sensitivität in WT-Astrozyten erklären können.

4.7 Genexpressionsanalysen als Erklärungsansatz für die erhöhte ATP Sensitivität

Die molekularen Mechanismen, welche zur Veränderung der ATP-Sensitivität nach Verwendung unter pro-inflammatorischen Zytokinen führen, wurden in dieser Arbeit mithilfe von Genexpressionsanalysen untersucht. Da bereits geklärt wurde, dass der ATP-vermittelte Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zum großen Teil auf den Botenstoff IP_3 zurückzuführen war, wurde das Expressionslevel purinerner Rezeptoren untersucht. Astrozyten exprimieren hauptsächlich die purinergen Rezeptoren $P2Y_{1,2,4}$ sowie den $P2X_7$ -Rezeptor (Abbracchio and Ceruti, 2006; Hamilton et al., 2008). Daher wurden zunächst Expressionsanalysen der Gene *P2ry1*, *P2ry2* sowie *P2ry4* durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass das Gen *P2ry1* unter allen Bedingungen nicht exprimiert wird und dass sich die Expression des Gens *P2ry4* unter allen Bedingungen nicht signifikant unterscheidet (s. Abbildung 22). Die Expression des Gens *P2ry2* in $RYR3^{-/-}$ -Astrozyten ist signifikant geringer als in WT-Astrozyten.

Astrozyten verfügen über entsprechende Anpassungsmechanismen, um auf Zytokine wie $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ zu reagieren. Es ist bekannt, dass die dadurch ausgelöste Signalkaskade zur Translokation bestimmter Transkriptionsfaktoren und zur Veränderung der Genexpression führen kann (Buffo et al., 2010; Williams et al., 2009). Bisher konnte aber nicht gezeigt werden, dass dies ebenfalls zu einer Veränderung der Genexpression purinerner Rezeptoren führt.

Es ist zu beachten, dass eine Veränderung der mRNA-Masse nicht unbedingt mit einer vergleichbaren Veränderung der Proteinmasse einhergeht (Silva und Vogel, 2016; Vogel und Marcotte, 2012). In der von Silva und Vogel im Jahr 2016 veröffentlichten Arbeit wurde dennoch beschrieben, dass die Korrelation zwischen mRNA-Transkripten und Proteinexpression konstant zwischen verschiedenen Zelltypen und Geweben ist, sich diese aber bezüglich untersuchter Gene stark unterscheidet. Daher ist zu beachten, dass die verringerte Expression des Gens *P2ry2* in $RYR3^{-/-}$ -Astrozyten sich durchaus in einer verringerten Anzahl an $P2Y_2$ -Rezeptoren widerspiegeln könnte. Ob dies eine Erklärung für das verringerte durch ATP ausgelöste Ca^{2+} -Signal in diesen Zellen ist, bleibt unklar, da dafür weitere Analysen wie beispielsweise Immunfärbungen potenziell beteiligter Rezeptoren notwendig wären.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die durchgeführten Genexpressionsanalysen ein Indiz für die zugrunde liegenden Mechanismen sein können. Es ist bekannt, dass die

Verwendung pro-inflammatorischer Zytokine keinen Effekt auf die Genexpression purinergere Rezeptoren hat. Es konnte bereits 2008 gezeigt werden, dass TNF α einen Effekt auf die neuronale Genexpression der IP₃R hat, was einen verstärkten über muskarinerge Rezeptoren vermittelten Anstieg der [Ca²⁺]_i zur Folge hat (Park et al., 2008). Genexpressionsanalysen der IP₃R in murinen Astrozyten wären notwendig, um einen solchen Effekt als Erklärungsansatz zu bestätigen.

Im Rahmen der Genexpressionsanalysen wurden die Gene *Ryr1* sowie *Ryr3* untersucht, die für die Proteine RYR1 und RYR3 kodieren. Erwähnenswert ist, dass in den RYR3^{-/-}-Astrozyten ein kompensatorischer Effekt beobachtet werden konnte, der durch das Vorhandensein von RYR1 mRNA nachgewiesen wurde. Dieser Effekt spiegelte sich jedoch nicht im durch ATP ausgelösten Anstieg der [Ca²⁺]_i wieder, da dieser in RYR3^{-/-}-Astrozyten deutlich verringert war (s. Abbildung 15). Es ist daher weiterhin fraglich, ob mithilfe der Kompensation durch Expression des RYR1 in RYR3^{-/-}-Astrozyten ein Ausgleich des Verlustes erreicht werden soll. Falls dem so ist, stellt sich ebenfalls die Frage, ob die Kompensation nur auf genetischer Ebene stattfindet oder ob es ebenfalls ein funktionelles Protein gibt. Für die Aufklärung der Funktion des RYR1 in murinen Astrozyten wären an dieser Stelle weitere Arbeiten notwendig.

4.8 Übertragbarkeit des charakterisierten In-vitro-Modells auf akute Hirnschnitte des Cerebellums und des Bulbus olfactorius

Im letzten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob der zuvor beschriebene und charakterisierte Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, der durch die Applikation von ATP an *in vitro* kultivierten murinen Astrozyten ausgelöst wird, *in situ* nachgewiesen werden kann. Mithilfe von akuten Hirnschnitten des Cerebellums sowie des Bulbus olfactorius konnte gezeigt werden, dass der durch ATP ausgelöste Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in den Bergmann-Glia und den glomerulären Astrozyten in RYR3^{-/-}-Mäusen geringer ausfällt als in WT-Mäusen (s. Abbildung 23 und Abbildung 24). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in den Bergmann-Glia des Cerebellums in RYR3^{-/-}-Mäusen später auftritt als in WT-Mäusen. Dieser Effekt war jedoch nicht in den Hirnschnitten des Bulbus olfactorius nachweisbar.

Bereits 1995 konnten Kirischuk et al. zeigen, dass durch die Applikation von ATP ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in Bergmann-Glia ausgelöst werden kann (Kirischuk et al., 1995). Die Charakterisierung der ausgelösten Ca^{2+} -Transiente zeigte, dass dieser Anstieg durch die Bildung von IP_3 zu erklären und auf die Stimulation metabotrope P2-Rezeptoren zurückzuführen sei, da durch die Applikation von AMP und Adenosin nur ein geringer Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ausgelöst werden konnte. Die Rolle des RYR3 wurde bisher nicht *in situ* untersucht, es ist jedoch davon auszugehen, dass der RYR3 auch in akuten Hirnschnitten eine verstärkende Funktion hinsichtlich des durch ATP ausgelösten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ einnimmt. Dies kann damit erklärt werden, dass in Hirnschnitten der RYR3^{-/-}-Mäuse ebenfalls eine Ca^{2+} -Transiente ausgelöst werden kann, die jedoch nicht so stark ausfällt wie in WT-Mäusen.

Interessanterweise scheint der durch ATP ausgelöste Mechanismus im Bulbus olfactorius ein wenig anders zu funktionieren. Hier konnte von Doengi et al. im Jahr 2008 gezeigt werden, dass eine durch ATP ausgelöste Ca^{2+} -Transiente an glomerulären Astrozyten durch die Aktivierung der P2Y₁-Rezeptoren erklärt werden kann (Doengi et al., 2008). Die pharmakologische Inhibition des Rezeptors führte jedoch zu keinem kompletten Signalverlust. Im weiteren Verlauf konnte die Gruppe um Doengi zeigen, dass ein Teil des Signals über den Adenosin-Rezeptor A_{2A} vermittelt wird, was dafürspricht, dass die Umgebung der glomerulären Astrozyten dazu führt, dass das applizierte ATP zu AMP und Adenosin abgebaut wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte dennoch ein verminderter Effekt in RYR3^{-/-}-Mäusen gezeigt werden, was die verstärkende Rolle des RYR3 an IP₃-vermittelten Ca²⁺-Transienten erklärt

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *in vitro* gemachten Beobachtungen ebenfalls *in situ* zutreffen. Es scheint, dass die Rolle des RYR3 im CICR ebenfalls in akuten Hirnschnitten zutreffend ist und dass durch ATP *in vitro* und *in situ* eine IP₃-vermittelte Ca²⁺-Transiente ausgelöst wird. Dennoch bleibt die Frage, welche weiteren Effekte die in RYR3^{-/-}-Mäusen verminderte Ca²⁺-Signaltransduktion hat. An dieser Stelle sind weitere Experimente hinsichtlich der Expression verschiedener Gene und Proteine notwendig.

4.9 Ausblick und offene Fragen

Die Stimulation muriner WT-Astrozyten mit dem Neurotransmitter ATP führt zu einem Anstieg der [Ca²⁺]_i. Mithilfe pharmakologischer Antagonisten Ca²⁺-spezifischer Signalwege konnte gezeigt werden, dass der ATP-vermittelte Anstieg der [Ca²⁺]_i primär auf die intrazellulären Botenstoffe NAADP sowie IP₃ zurückgeht. Es konnte ebenfalls eine Beteiligung des SOCE über Aktivierung der CRAC-Kanäle nachgewiesen werden (s. Abbildung 25).

Zudem wurde nachgewiesen, dass der RYR3 eine essenzielle Rolle in der Ca²⁺-Signaltransduktion in Astrozyten einnimmt, da der Knock-Out des RYR3 zu einem verminderten, durch ATP induzierten Anstieg der [Ca²⁺]_i führte. Diese Verringerung kann durch das Fehlen des CICR über die RYR erklärt werden (Endo, 2009; Verkhratsky und Shmigol, 1996). Es ist auch denkbar, dass der RYR3 ein Zielrezeptor von NAADP in Astrozyten darstellt. In murinen und in humanen T-Lymphozyten gibt es zwar keine Beteiligung des RYR3 an NAADP-vermittelten Ca²⁺-Signalen (Diercks, 2016), jedoch wäre denkbar, dass der RYR3 in Astrozyten und in anderen Zelltypen durch NAADP aktiviert werden kann. Der Mechanismus der enzymatischen Bildung von NAADP konnte intrazellulär bislang nicht geklärt werden, und es stellt sich die Frage, inwieweit es eine Verknüpfung zwischen der Aktivierung purinerger Rezeptoren und einem unbekanntem NAADP-synthetisierendem Enzym gibt. Experimente zur Charakterisierung von NAADP am ATP-vermittelten Anstieg der [Ca²⁺]_i wären notwendig, um die Beteiligung von NAADP genau aufzuklären.

Anschließende Experimente konnten zeigen, dass es in WT-Astrozyten unter Verwendung pro-inflammatorischer Zytokine zu einer 30-fachen Verringerung des EC_{50} für ATP kommt, ein Effekt der jedoch nicht in RYR3^{-/-}-Astrozyten auftrat. Die Charakterisierung des Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ zeigte, dass es sich um ein IP₃-vermitteltes Ca²⁺-Signal handelt. Erste Experimente hinsichtlich einer veränderten Genexpression purinerner Rezeptoren lieferten jedoch keine Erklärung für diesen Effekt. Es bleibt daher die Frage, auf welchen Mechanismus die Erhöhung der ATP-Sensitivität in den WT-Astrozyten beruht und ob dies auf eine erhöhte Expression von IP₃R zurückgeht (Park et al., 2008). Fraglich wäre dann nur, warum dieser Effekt nicht in RYR3^{-/-}-Astrozyten beobachtet werden konnte.

Die Betrachtung der Ca²⁺-Signaltransduktion in akuten Hirnschnitten des Cerebellums und des Bulbus olfactorius zeigten, dass der RYR3 auch *in situ* eine wichtige Rolle bei dem durch ATP vermittelten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ einnimmt. Die Stimulation von Bergmann-Glia und glomerulären Astrozyten führte in Hirnschnitten von RYR3^{-/-}-Mäusen zu einem verringerten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ im Vergleich zu WT-Mäusen. Die Veränderung der Ca²⁺-Signaltransduktion in RYR3^{-/-}-Mäusen liefert eine erste Erklärung für die bereits beobachtete Verminderung des Clinical Score und die verminderte Sekretion von Chemo- und Zytokinen während der EAE (von Osten, 2015), da davon auszugehen ist, dass aufgrund der In-vitro- und In-situ-Ergebnisse in diesen Tieren die Ca²⁺-Signaltransduktion ebenfalls vermindert ist.

Die durchgeführten Experimente wurden an Hirnschnitten von gesunden Tieren durchgeführt, wobei es für das vollständige Verständnis notwendig wäre zu untersuchen, ob es während der EAE an Hirnschnitten von WT-Mäusen ein verstärktes, durch ATP ausgelöstes Ca²⁺-Signal gibt, dass in RYR3^{-/-}-Mäusen nicht auftritt.

Literaturverzeichnis

- Adriouch, S., Dox, C., Welge, V., Seman, M., Koch-Nolte, F. und Haag, F. (2002). **Cutting Edge: A Natural P451L Mutation in the Cytoplasmic Domain Impairs the Function of the Mouse P2X7 Receptor.** *J Immunol* 169, 4108-4112.
- Ali, H., Christensen, S. B., Foreman, J. c., Pearce, F. l., Piotrowski, W. und Thastrup, O. (1985). **The ability of thapsigargin and thapsigargin to activate cells involved in the inflammatory response.** *Br J Pharmacol* 85, 705-712.
- Amrani, Y., Martinet, N. und Bronner, C. (1995). **Potentialiation by tumour necrosis factor-alpha of calcium signals induced by bradykinin and carbachol in human tracheal smooth muscle cells.** *Br J Pharmacol* 114, 4.
- Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schroder, R., Deckert, M., Schmidt, S., Ravid, R. und Rajewsky, K. (2000). **Clonal Expansions of CD8⁺ T cells Dominate the T Cell Infiltrate in Active Multiple Sclerosis Lesions as Shown by Micromanipulation and Single Cell Polymerase Chain Reaction.** *J Exp Med* 192, 393-404.
- Barbara, J. G. (2002). **IP₃-dependent calcium-induced calcium release mediates bidirectional calcium waves in neurones: functional implications for synaptic plasticity.** *Biochim Biophys Acta* 1600, 12-8.
- Barceló-Torns, M., Lewis, A. M., Gubern, A., Barneda, D., Bloor-Young, D., Picatoste, F., Churchill, G. C., Claro, E. und Masgrau, R. (2011). **NAADP mediates ATP-induced Ca²⁺ signals in astrocytes.** *FEBS Lett* 585, 2300-2306.
- Bazargani, N. und Attwell, D. (2016). **Astrocyte calcium signaling: the third wave.** *Nat Neurosci* 19, 182-189.
- Beier, S. M. und Barish, M. E. (2000). **Cholinergic stimulation enhances cytosolic calcium ion accumulation in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurones during short action potential trains.** *J Physiol* 526 Pt 1, 129-42.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. und Roderick, H. L. (2003). **Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 517-29.
- Berridge, M. J. und Irvine, R. F. (1984). **Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction.** *Nature* 312, 315.
- Berridge, M. J. und Irvine, R. F. (1989). **Inositol phosphates and cell signalling.** *Nature* 341, 197.
- Berridge, M. J., Lipp, P. und Bootman, M. D. (2000). **The versatility and universality of calcium signalling.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21.

- Bleasdale, J. E., Thakur, N. R., Gremban, R. S., Bundy, G. L., Fitzpatrick, F. A., Smith, R. J. und Bunting, S. (1990). **Selective Inhibition of Receptor-Coupled Phospholipase C-Dependent Processes in Human Platelets and Polymorphonuclear Neutrophils.** *J Pharmacol Exp Ther* 255, 756-768.
- Brailoiu, E., Hooper, R., Cai, X., Brailoiu, G. C., Keebler, M. V., Dun, N. J., Marchant, J. S. und Patel, S. (2010). **An Ancestral Deuterostome Family of Two-pore Channels Mediates Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate-dependent Calcium release from Acidic Organelles.** *J Biol Chem* 285, 2897-901.
- Brini, M. und Carafoli, E. (2011). **The Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Brosnan, C. F. und Raine, C. S. (2013). **The astrocyte in multiple sclerosis revisited.** *Glia* 61, 453-465.
- Bruzzone, S., Kunerth, S., Zocchi, E., De Flora, A. und Guse, A. H. (2003). **Spatio-temporal propagation of Ca²⁺ signals by cyclic ADP-ribose in 3T3 cells stimulated via purinergic P2Y receptors.** *J Cell Biol* 163, 837.
- Buffo, A., Rolando, C. und Ceruti, S. (2010). **Astrocytes in the damaged brain: Molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential.** *Biochem Pharmacol* 79, 77-89.
- Calcraft, P. J., Ruas, M., Pan, Z., Cheng, X., Arredouani, A., Hao, X., Tang, J., Rietdorf, K., Teboul, L., Chuang, K. T., Lin, P., Xiao, R., Wang, C., Zhu, Y., Lin, Y., Wyatt, C. N., Parrington, J., Ma, J., Evans, A. M., Galione, A. und Zhu, M. X. (2009). **NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels.** *Nature* 459, 596-600.
- Calderon, T. M., Eugenin, E. A., Lopez, L., Kumar, S. S., Hesselgesser, J., Raine, C. S. und Berman, J. W. (2006). **A role for CXCL12 (SDF-1 α) in the pathogenesis of multiple sclerosis: regulation of CXCL12 expression in astrocytes by soluble myelin basic protein.** *J Neuroimmunol* 177, 27-39.
- Camello, C., Lomax, R., Petersen, O. H. und Tepikin, A. V. (2002). **Calcium leak from intracellular stores - the enigma of calcium signalling.** *Cell Calcium* 32, 355-61.
- Charles, A. C., Dirksen, E. R., Merrill, J. E. und Sanderson, M. J. (1993). **Mechanisms of Intercellular Calcium Signaling in Glial Cells Studied with Dantrolene and Thapsigargin.** *Glia* 7, 134-145.
- Chung, W. S., Welsh, C. A., Barres, B. A. und Stevens, B. (2015). **Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease?** *Nat Neurosci* 18, 1539-1545.
- Churamani, D., Carrey, E. A., Dickinson, G. D. und Patel, S. (2004). **Determination of cellular nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate (NAADP) levels.** *Biochem J* 380, 449-54.
- Clapham, D. E. (2007). **Calcium Signaling.** *Cell* 131, 1047-58.

- Clapper, D. L., Walseth, T. F., Dargie, P. J. und Lee, H. C. (1987). **Pyridine Nucleotide Metabolites Stimulate Calcium Release from Sea Urchin Egg Microsomes Desensitized to Inositol Trisphosphate.** *J Biol Chem* 262, 9561-9568.
- Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., Matteoli, M. und Verderio, C. (2003). **Storage and release of ATP from astrocytes in culture.** *J Biol Chem* 278, 1354-62.
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P. und Stojilkovic, S. S. (2011). **Activation and Regulation of Purinergic P2X Receptor Channels.** *Pharmacological Reviews* 63, 641-683.
- Compston, A., Lassmann, H. und McDonald, I. (2006a). **Chapter 1 - The Story of Multiple Sclerosis.** In: McAlpine's Multiple Sclerosis (Fourth Edition), Churchill Livingstone, Edinburgh, S. 3-68.
- Compston, A., Lassmann, H. und Smith, K. (2006b). **Chapter 10 - The Neurobiology of Multiple Sclerosis.** In: McAlpine's Multiple Sclerosis (Fourth Edition), Churchill Livingstone, Edinburgh, S. 449-490.
- Copello, J. A., Qi, Y., Jeyakumar, L. H., Ogunbunmi, E. und Fleischer, S. (2001). **Lack of effect of cADP-ribose and NAADP on the activity of skeletal muscle and heart ryanodine receptors.** *Cell Calcium* 30, 269-84.
- Cordiglieri, C., Odoardi, F., Zhang, B., Nebel, M., Kawakami, N., Klinkert, W. E. F., Lodygin, D., Lühder, F., Breunig, E., Schild, D., Ulaganathan, V. K., Dornmair, K., Dammermann, W., Potter, B. V. L., Guse, A. H. und Flügel, A. (2010). **Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-mediated calcium signalling in effector T cells regulates autoimmunity of the central nervous system.** *Brain* 133, 1930-1943.
- Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S. und Smith, S. J. (1990). **Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling.** *Science* 247, 470-3.
- Cosker, F., Cheviron, N., Yamasaki, M., Menteyne, A., Lund, F. E., Moutin, M. J., Galione, A. und Cancela, J. M. (2010). **The Ecto-enzyme CD38 is a Nicotinic Acid adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Synthase That Couples Receptor Activation to Ca²⁺ Mobilization from Lysosomes in Pancreatic Acinar Cells.** *J Biol Chem* 285, 38251-9.
- Dammermann, W., Zhang, B., Nebel, M., Cordiglieri, C., Odoardi, F., Kirchberger, T., Kawakami, N., Dowden, J., Schmid, F., Dornmair, K., Hohenegger, M., Flügel, A., Guse, A. H. und Potter, B. V. L. (2009). **NAADP-mediated Ca²⁺ signaling via type 1 ryanodine receptor in T cells revealed by a synthetic NAADP antagonist.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 10678-10683.

- Di Sabatino, A., Rovedatti, L., Kaur, R., Spencer, J. P., Brown, J. T., Morisset, V. D., Biancheri, P., Leakey, N. A., Wilde, J. I., Scott, L., Corazza, G. R., Lee, K., Sengupta, N., Knowles, C. H., Gunthorpe, M. J., McLean, P. G., MacDonald, T. T. und Kruidenier, L. (2009). **Targeting gut T cell Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels inhibits T cell cytokine production and T-box transcription factor T-bet in inflammatory bowel disease.** *J Immunol* 183, 3454-62.
- Diercks, B.-P. (2016) **Calcium microdomains during T lymphocyte activation – role of second messengers and calcium channels.** Biol. Dissertation, Universität Hamburg.
- Doengi, M., Deitmer, J. W. und Lohr, C. (2008). **New evidence for purinergic signaling in the olfactory bulb: A_{2A} and P2Y₁ receptors mediate intracellular calcium release in astrocytes.** *FASEB J* 22, 2368-2378.
- Domercq, M., Brambilla, L., Pilati, E., Marchaland, J., Volterra, A. und Bezzi, P. (2006). **P2Y₁ receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor-alpha and prostaglandins.** *J Biol Chem* 281, 30684-96.
- Endo, M. (2009). **Calcium-Induced Calcium Release in Skeletal Muscle.** *Physiol Rev* 89, 1153-1176.
- Ernst, I. M., Fliegert, R. und Guse, A. H. (2013). **Adenine dinucleotide second messengers and T-lymphocyte calcium signaling.** *Front Immunol* 4, 259.
- Feske, S. (2007). **Calcium signalling in lymphocyte activation and disease.** *Nat Rev Immunol* 7, 690-702.
- Fruen, B. R., Mickelson, J. R., Shomer, N. H., Velez, P. und Louis, C. F. (1994). **Cyclic ADP-ribose does not affect cardiac or skeletal muscle ryanodine receptors.** *FEBS Lett* 352, 123-6.
- Furman, J. L. und Norris, C. M. (2014). **Calcineurin and glial signaling: neuroinflammation and beyond.** *J Neuroinflammation* 11, 158.
- Gasser, A., Bruhn, S. und Guse, A. H. (2006). **Second Messenger Function of Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate Revealed by an Improved Enzymatic Cycling Assay.** *J Biol Chem* 281, 16906-16913.
- Gerasimenko, J. V., Charlesworth, R. M., Sherwood, M. W., Ferdek, P. E., Mikoshiba, K., Parrington, J., Petersen, O. H. und Gerasimenko, O. V. (2015). **Both RyRs and TPCs are required for NAADP-induced intracellular Ca²⁺ release.** *Cell Calcium* 58, 237-245.
- Giannini, G., Conti, A., Mammarella, S., Scrobogna, M. und Sorrentino, V. (1995). **The Ryanodine Receptor/Calcium Channel Genes Are Widely and Differentially Expressed in Murine Brain and Peripheral Tissues.** *J Cell Biol* 128, 893-904.
- Giaume, C. und Venance, L. (1998). **Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes.** *Glia* 24, 50-64.

- Gimpl, G., Walz, W., Ohlemeyer, C. und Kettenmann, H. (1992). **Bradykinin receptors in cultured astrocytes from neonatal rat brain are linked to physiological responses.** *Neurosci Lett* 144, 139-142.
- Glaum, S. R., Holzwarth, J. A. und Miller, R. J. (1990). **Glutamate receptors activate Ca^{2+} mobilization and Ca^{2+} influx into astrocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3454-3458.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R. Y. (1985). **A New Generation of Ca^{2+} Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties.** *J Biol Chem* 260, 3440-3450.
- Guse, A. H. (2005). **Second messenger function and the structure-activity relationship of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR).** *FEBS J* 272, 4590-7.
- Guse, A. H. (2012). **Linking NAADP to Ion Channel Activity: A Unifying Hypothesis.** *Sci Signal* 5, pe18-pe18.
- Guse, A. H., da Silva, C. P., Emmrich, F., Ashamu, G. A., Potter, B. V. und Mayr, G. W. (1995). **Characterization of cyclic adenosine diphosphate-ribose-induced Ca^{2+} release in T lymphocyte cell lines.** *J Immunol* 155, 3353-3359.
- Guse, A. H., Ernst, I. M. A. und Fliegert, R. (2013). **NAADP Signaling Revisited.** *Curr Top Med Chem* 13, 2978-2990.
- Guse, A. H. und Lee, H. C. (2008). **NAADP: A Universal Ca^{2+} Trigger.** *Sci Signal* 1, re10-re10.
- Guse, A. H., Roth, E. und Emmrich, F. (1993). **Intracellular Ca^{2+} pools in Jurkat T-lymphocytes.** *Biochem J* 291 (Pt 2), 447-51.
- Guthrie, P. B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M. V. L., Charles, A. C. und Kater, S. B. (1999). **ATP Released from Astrocytes Mediates Glial Calcium Waves.** *J Neurosci* 19, 520-528.
- Henneberger, C. und Rusakov, D. A. (2010). **Synaptic plasticity and Ca^{2+} signalling in astrocytes.** *Neuron Glia Biol* 6, 141-146.
- Hirase, H., Qian, L., Bartho, P. und Buzsaki, G. (2004). **Calcium Dynamics of Cortical Astrocytic Networks In Vivo.** *PLoS Biol* 2, E96.
- Hirsch, M.-R., Wietzerbin, J., Pierres, M. und Golidis, C. (1983). **Expression of Ia Antigens by Cultured Astrocytes Treated With Gamma-interferon.** *Neurosci Lett* 41, 199-204.
- Hoftberger, R., Aboul-Enein, F., Brueck, W., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Schmidbauer, M., Jellinger, K. und Lassmann, H. (2004). **Expression of Major Histocompatibility Complex class I Molecules on the Different Cell Types in Multiple Sclerosis Lesions.** *Brain Pathol* 14, 43-50.

- Hogan, P. G. und Rao, A. (2015). **Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation.** *Biochem Biophys Res Commun* 460, 40-49.
- Hohenegger, M., Suko, J., Gscheidlinger, R., Drobny, H. und Zidar, A. (2002). **Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate activates the skeletal muscle ryanodine receptor.** *Biochem J* 367, 423-31.
- Hosoi, E., Nishizaki, C., Gallagher, K. L., Wyre, H. W., Matsuo, Y. und Sei, Y. (2001). **Expression of the Ryanodine Receptor Isoforms in Immune Cells.** *J Immunol* 167, 4887-4894.
- Hoth, M. und Penner, R. (1992). **Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells.** *Nature* 355, 353-6.
- Inagaki, N., Fukui, H., Ito, S. und Wada, H. (1991). **Type-2 astrocytes show intracellular Ca²⁺ elevation in response to various neuroactive substances.** *Neurosci Lett* 128, 257-260.
- Inui, M., Saito, A. und Fleischer, S. (1987). **Purification of the Ryanodine Receptor and Identity with Feet Structures of Junctional Terminal Cisternae of Sarcoplasmic Reticulum from Fast Skeletal Muscle.** *J Biol Chem* 262, 1740-7.
- Jairaman, A. und Prakriya, M. (2013). **Molecular pharmacology of store-operated CRAC channels.** *Channels* 7, 402-414.
- Januszyk, M., Rennert, R. C., Sorkin, M., Maan, Z. N., Wong, L. K., Whittam, A. J., Whitmore, A., Duscher, D. und Gurtner, G. C. (2015). **Evaluating the Effect of Cell Culture on Gene Expression in Primary Tissue Samples Using Microfluidic-Based Single Cell Transcriptional Analysis.** *Microarrays (Basel)* 4, 540-550.
- Jeremic, A., Jeftinija, K., Stevanovic, J., Glavaski, A. und Jeftinija, S. (2001). **ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes.** *J Neurochem* 77, 664-675.
- Johnson, I. D. (2010). **The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th Edition,** Life Technologies Corporation.
- Kaltschmidt, B., Widera, D. und Kaltschmidt, C. (2005). **Signaling via NF-κB in the nervous system.** *Biochim Biophys Acta* 1745, 287-99.
- Kang, M. und Othmer, H. G. (2009). **Spatiotemporal characteristics of calcium dynamics in astrocytes.** *Chaos* 19.
- Kim, J. Y., Kim, H., Lee, S. G., Choi, B. H., Kim, Y. H., Huh, P.-W., Lee, K.-H., Han, H. und Rha, H. K. (2003). **Amyloid β peptide (Aβ₄₂) activates PLC-δ1 promoter through the NF-κB binding site.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310, 904-909.
- Kimelberg, H. K. und Nedergaard, M. (2010). **Functions of Astrocytes and their Potential as Therapeutic Targets.** *Neurotherapeutics* 7, 338-353.

- Kinney, N. P., Wyatt, C. N., Clark, J. H., Calcraft, P. J., Fleischer, S., Jeyakumar, L. H., Nixon, G. F. und Evans, A. M. (2008). **Lysosomes co-localize with ryanodine receptor subtype 3 to form a trigger zone for calcium signalling by NAADP in rat pulmonary arterial smooth muscle.** *Cell Calcium* 44, 190-201.
- Kirischuk, S., Moller, T., Voitenko, N., Kettenmann, H. und Verkhratsky, A. (1995). **ATP-induced cytoplasmic calcium mobilization in Bergmann glial cells.** *J Neurosci* 15, 7861-7871.
- Kunerth, S., Mayr, G. W., Koch-Nolte, F. und Guse, A. H. (2003). **Analysis of subcellular calcium signals in T-lymphocytes.** *Cell Signal* 15, 783-92.
- Lafaille, J. J., Keere, F. V., Hsu, A. L., Baron, J. L., Haas, W., Raine, C. S. und Tonegawa, S. (1997). **Myelin Basic Protein-specific T helper 2 (Th2) Cells Cause Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Immunodeficient Hosts Rather than Protect Them from the Disease.** *J Exp Med* 186, 307-12.
- Lai, F. A., Erickson, H. P., Rousseau, E., Liu, Q. Y. und Meissner, G. (1988). **Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle.** *Nature* 331, 315-9.
- Langhorst, M. F., Schwarzmann, N. und Guse, A. H. (2004). **Ca²⁺ release via ryanodine receptors and Ca²⁺ entry: major mechanisms in NAADP-mediated Ca²⁺ signaling in T-lymphocytes.** *Cell Signal* 16, 1283-1289.
- Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D. und Hamilton, S. L. (2010). **Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003996.
- Lassmann, H., Bruck, W. und Lucchinetti, C. (2001). **Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy.** *Trends Mol Med* 7, 115-21.
- Ledbetter, M. W., Preiner, J. K., Louis, C. F. und Mickelson, J. R. (1994). **Tissue Distribution of Ryanodine Receptor Isoforms and Alleles Determined by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction.** *J Biol Chem* 269, 31544-31551.
- Lee, H. C. (1993). **Potentiation of Calcium- and Caffeine-induced Calcium Release by Cyclic ADP-ribose.** *J Biol Chem* 268, 293-299.
- Lee, H. C. (2001). **Physiological Functions of Cyclic ADP-ribose and NAADP as Calcium Messengers.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 317-45.
- Lee, H. C. und Aarhus, R. (1995). **A Derivative of NADP Mobilizes Calcium Stores Insensitive to Inositol Trisphosphate and Cyclic ADP-ribose.** *J Biol Chem* 270, 2152-2157.
- Lee, H. C., Walseth, T. F., Bratt, G. T., Hayes, R. N. und Clapper, D. L. (1989). **Structural Determination of a Cyclic Metabolite of NAD⁺ with Intracellular Ca²⁺-mobilizing Activity.** *J Biol Chem* 264, 1608-1615.

- Lee, S. C., Dickson, D. W., Liu, W. und Brosnan, C. F. (1993). **Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 β and interferon- γ .** *J Neuroimmunol* *46*, 19-24.
- Li, Q. Q., Bever, C. T., Burt, D. R., Judge, S. I. und Trisler, G. D. (2001). **Induction of RANTES chemokine expression in human astrocytic cells is dependent upon activation of NF- κ B transcription factor.** *Int J Mol Med* *7*, 527-33.
- Li, S., Wang, L., Berman, M. A., Zhang, Y. und Dorf, M. E. (2006). **RNAi Screen in Mouse Astrocytes Identifies Phosphatases that Regulate NF- κ B Signaling.** *Mol Cell* *24*, 497-509.
- Lipp, P. und Niggli, E. (1993). **Ratiometric confocal Ca²⁺-measurements with visible wavelength indicators in isolated cardiac myocytes.** *Cell Calcium* *14*, 359-372.
- Liu, Y., Sun, B., Xiao, Z., Wang, R., Guo, W., Zhang, J. Z., Mi, T., Wang, Y., Jones, P. P., Petegem, F. V. und Chen, S. R. W. (2015). **Roles of the NH₂-terminal Domains of Cardiac Ryanodine Receptor in Ca²⁺ Release Activation and Termination.** *J Biol Chem*, jbc.M114.618827.
- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001). **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} Method.** *Methods* *25*, 402-408.
- Lucherini, M. J. und Gruenstein, E. (1992). **Histamine H1 receptors in UC-11MG astrocytes and their regulation of cytoplasmic Ca²⁺.** *Brain Res* *592*, 193-201.
- Ludtke, S. J., Serysheva, II, Hamilton, S. L. und Chiu, W. (2005). **The Pore Structure of the Closed RyR1 Channel.** *Structure* *13*, 1203-11.
- Lytton, J., Westlin, M. und Hanley, M. R. (1991). **Thapsigargin Inhibits the Sarcoplasmic or Endoplasmic Reticulum Ca-ATPase Family of Calcium Pumps.** *J Biol Chem* *266*, 17067-17071.
- Marcaida, G., Minana, M. D., Grisolia, S. und Felipo, V. (1997). **Determination of intracellular ATP in primary cultures of neurons.** *Brain Res Brain Res Protoc* *1*, 75-8.
- Melani, A., Turchi, D., Vannucchi, M. G., Cipriani, S., Gianfriddo, M. und Pedata, F. (2005). **ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia.** *Neurochem Int* *47*, 442-448.
- Miljkovic, D., Momcilovic, M., Stojanovic, I., Stosic-Grujicic, S., Ramic, Z. und Mostarica-Stojkovic, M. (2007). **Astrocytes Stimulate Interleukin-17 and Interferon- γ Production In Vitro.** *J Neurosci Res* *85*, 3598-606.
- Mojzisova, A., Krizanova, O., Zacikova, L., Kominkova, V. und Ondrias, K. (2001). **Effect of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate on ryanodine calcium release channel in heart.** *Pflügers Arch* *441*, 674-7.

- Moreschi, I., Bruzzone, S., Bodrato, N., Usai, C., Guida, L., Nicholas, R. A., Kassack, M. U., Zocchi, E. und De Flora, A. (2008). **NAADP⁺ is an agonist of the human P2Y₁₁ purinergic receptor**. *Cell Calcium* 43, 344-355.
- Moreschi, I., Bruzzone, S., Nicholas, R. A., Fruscione, F., Sturla, L., Benvenuto, F., Usai, C., Meis, S., Kassack, M. U., Zocchi, E. und Flora, A. D. (2006). **Extracellular NAD⁺ Is an Agonist of the Human P2Y₁₁ Purinergic Receptor in Human Granulocytes**. *J Biol Chem* 281, 31419-31429.
- Mulligan, S. J. und MacVicar, B. A. (2004). **Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions**. *Nature* 431, 195-9.
- Muyderman, H., Angehagen, M., Sandberg, M., Bjorklund, U., Olsson, T., Hansson, E. und Nilsson, M. (2001). **Alpha 1-adrenergic modulation of metabotropic glutamate receptor-induced calcium oscillations and glutamate release in astrocytes**. *J Biol Chem* 276, 46504-14.
- Neumann, E., Riepl, B., Knedla, A., Lefèvre, S., Tarner, I. H., Grifka, J., Steinmeyer, J., Schölmerich, J., Gay, S. und Müller-Ladner, U. (2010). **Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts**. *Arthritis Res Ther* 12, R83.
- Ng, S. W., Capite, J. d., Singaravelu, K. und Parekh, A. B. (2008). **Sustained Activation of the Tyrosine Kinase Syk by Antigen in Mast Cells Requires Local Ca²⁺ Influx through Ca²⁺ Release-activated Ca²⁺ Channels**. *J Biol Chem* 283, 31348-31355.
- Nikceovich, K. M., Gordon, K. B., Tan, L., Hurst, S. D., Kroepfl, J. F., Gardinier, M., Barrett, T. A. und Miller, S. D. (1997). **IFN- γ -activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells**. *J Immunol* 158, 614-21.
- Pan, C., Kumar, C., Bohl, S., Klingmueller, U. und Mann, M. (2009). **Comparative Proteomic Phenotyping of Cell Lines and Primary Cells to Assess Preservation of Cell Type-specific Functions**. *Mol Cell Proteomics* 8, 443-450.
- Paredes, R. M., Etzler, J. C., Watts, L. T., Zheng, W. und Lechleiter, J. D. (2008). **Chemical calcium indicators**. *Methods* 46, 143-151.
- Park, K. M., Yule, D. I. und Bowers, W. J. (2008). **Tumor Necrosis Factor- α Potentiates Intra-neuronal Ca²⁺ Signaling via Regulation of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor**. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 33069-33079.
- Parpura, V., Baker, B. J., Jeras, M. und Zorec, R. (2010). **Regulated exocytosis in astrocytic signal integration**. *Neurochem Int* 57, 451-9.
- Parpura, V., Basarsky, T. A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S. und Haydon, P. G. (1994). **Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling**. *Nature* 369, 744-7.
- Parpura, V., Grubišić, V. und Verkhratsky, A. (2011). **Ca²⁺ sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813, 984-991.

- Pekny, M., Pekna, M., Messing, A., Steinhauser, C., Lee, J. M., Parpura, V., Hol, E. M., Sofroniew, M. V. und Verkhratsky, A. (2016). **Astrocytes: a central element in neurological diseases**. *Acta Neuropathol* 131, 323-45.
- Perez-Terzic, C. M., Chini, E. N., Shen, S. S., Dousa, T. P. und Clapham, D. E. (1995). **Ca²⁺ release triggered by nicotinate adenine dinucleotide phosphate in intact sea urchin eggs**. *Biochem J* 312, 955-959.
- Quinones, M. P., Kalkonde, Y., Estrada, C. A., Jimenez, F., Ramirez, R., Mahimainathan, L., Mummidi, S., Choudhury, G. G., Martinez, H., Adams, L., Mack, M., Reddick, R. L., Maffi, S., Haralambous, S., Probert, L., Ahuja, S. K. und Ahuja, S. S. (2008). **Role of astrocytes and chemokine systems in acute TNF α induced demyelinating syndrome: CCR2-dependent signals promote astrocyte activation and survival via NF- κ B and Akt**. *Mol Cell Neurosci* 37, 96-109.
- Ralevic, V. und Burnstock, G. (1998). **Receptors for Purines and Pyrimidines**. *Pharmacol Rev* 50, 413-492.
- Ravi, R. G., Kim, H. S., Servos, J., Zimmermann, H., Lee, K., Maddileti, S., Boyer, J. L., Harden, T. K. und Jacobson, K. A. (2002). **Adenine nucleotide analogues locked in a Northern methanocarba conformation: enhanced stability and potency as P2Y(1) receptor agonists**. *J Med Chem* 45, 2090-100.
- Rudick, R. A. und Ransohoff, R. M. (1992). **Cytokine Secretion by Multiple Sclerosis Monocytes: Relationship to Disease Activity**. *Arch Neurol* 49, 265-270.
- Rudolf, R., Mongillo, M., Rizzuto, R. und Pozzan, T. (2003). **Looking forward to seeing calcium**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 579-586.
- Salter, M. W. und Hicks, J. L. (1995). **ATP Causes Release of Intracellular Ca²⁺ via the Phospholipase C β /IP₃ Pathway in Astrocytes from the Dorsal Spinal Cord**. *J Neurosci* 15, 2961-2971.
- Scemes, E. (2000). **Components of Astrocytic Intercellular Calcium Signaling**. *Mol Neurobiol* 22, 167-179.
- Scemes, E. und Giaume, C. (2006). **Astrocyte calcium waves: what they are and what they do**. *Glia* 54, 716-25.
- Schatzmann, H. J. (1966). **ATP-Dependent Ca⁺⁺-Extrusion from Human Red Cells**. *Experientia* 22, 364-5.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. und Cardona, A. (2012). **Fiji: an open-source platform for biological-image analysis**. *Nat Methods* 9, 676-682.
- Schmid, F., Bruhn, S., Weber, K., Mittrucker, H. W. und Guse, A. H. (2011). **CD38: A NAADP degrading enzyme**. *FEBS Lett* 585, 3544-8.

- Schnurr, M., Then, F., Galambos, P., Scholz, C., Siegmund, B., Endres, S. und Eigler, A. (2000). **Extracellular ATP and TNF- α Synergize in the Activation and Maturation of Human Dendritic Cells.** *J Immunol* 165, 4704-4709.
- Schütze, S., Wiegmann, K., Machleidt, T. und Kronke, M. (1995). **TNF-induced Activation of NF- κ B.** *Immunobiology* 193, 193-203.
- Silva, G. M. und Vogel, C. (2016). **Quantifying gene expression: the importance of being subtle.** *Mol Syst Biol* 12, 885.
- Simpson, J. E., Newcombe, J., Cuzner, M. L. und Woodroffe, M. N. (2000). **Expression of the interferon- γ -inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions.** *Neuropathol Appl Neurobiol* 26, 133-42.
- Sitsapesan, R., McGarry, S. J. und Williams, A. J. (1994). **Cyclic ADP-Ribose Competes With ATP for the Adenine Nucleotide Binding Site on the Cardiac Ryanodine Receptor Ca²⁺-Release Channel.** *Circ Res* 75, 596-600.
- Sitsapesan, R. und Williams, A. J. (1995). **Cyclic ADP-ribose and Related Compounds Activate Sheep Skeletal Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Release Channel.** *Am J Physiol* 268, C1235-40.
- Soares, S., Thompson, M., White, T., Isbell, A., Yamasaki, M., Prakash, Y., Lund, F. E., Galione, A. und Chini, E. N. (2007). **NAADP as a Second Messenger: Neither CD38 nor Base-exchange Reaction are Necessary for In Vivo Generation of NAADP in Myometrial Cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C227-39.
- Sofroniew, M. V. und Vinters, H. V. (2010). **Astrocytes: biology and pathology.** *Acta Neuropathol* 119, 7-35.
- Somjen, G. G. (1988). **Nervenkitt: Notes on the History of the Concept of Neuroglia.** *Glia* 1, 2-9.
- Sørensen, T. L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V. A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R. M., Frederiksen, J. L. und Ransohoff, R. M. (1999). **Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients.** *J Clin Invest* 103, 807-15.
- Stephens, G. J., Cholewinski, A. J., Wilkin, G. P. und Djamgoz, M. B. (1993). **Calcium-mobilizing and electrophysiological effects of bradykinin on cortical astrocyte subtypes in culture.** *Glia* 9, 269-79.
- Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J. und Schulz, I. (1983). **Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate.** *Nature* 306, 67.
- Szłufcik, K., Missiaen, L., Parys, J. B., Callewaert, G. und De Smedt, H. (2006). **Uncoupled IP₃ receptor can function as a Ca²⁺-leak channel: cell biological and pathological consequences.** *Biol Cell* 98, 1-14.

- Tan, L., Gordon, K. B., Mueller, J. P., Matis, L. A. und Miller, S. D. (1998). **Presentation of Proteolipid Protein Epitopes and B7-1-Dependent Activation of Encephalitogenic T Cells by IFN- γ -Activated SJL/J Astrocytes.** *J Immunol* *160*, 4271-4279.
- Thomas, D., Tovey, S. C., Collins, T. J., Bootman, M. D., Berridge, M. J. und Lipp, P. (2000). **A comparison of fluorescent Ca²⁺indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺signals.** *Cell Calcium* *28*, 213-223.
- Tonra, J. R. (2002). **Cerebellar susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice: Potential interaction of immunology with vascular anatomy.** *The Cerebellum* *1*, 57-68.
- Traugott, U., McFarlin, D. E. und Raine, C. S. (1986). **Immunopathology of the Lesion in Chronic Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse.** *Cell Immunol* *99*, 395-410.
- Trautmann, A. (2009). **Extracellular ATP in the Immune System: More Than Just a "Danger Signal".** *Sci Signal* *2*, pe6-pe6.
- Treiman, M., Caspersen, C. und Christensen, S. B. (1998). **A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases.** *Trends Pharmacol Sci* *19*, 131-5.
- Tsien, R. Y. (1980). **New Calcium Indicators and Buffers with High Selectivity against Magnesium and Protons: Design, Synthesis, and Properties of Prototype Structures.** *Biochemistry* *19*, 2396-2404.
- Tsien, R. Y. (1981). **A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells.** *Nature* *290*, 527-528.
- Van Petegem, F. (2015). **Ryanodine Receptors: Allosteric Ion Channel Giants.** *J Mol Biol* *427*, 31-53.
- Venturi, E., Pitt, S., Galfre, E. und Sitsapesan, R. (2012). **From Eggs to Hearts: What Is the Link between Cyclic ADP-Ribose And Ryanodine Receptors?** *Cardiovasc Ther* *30*, 109-16.
- Verkhatsky, A. und Shmigol, A. (1996). **Calcium-induced calcium release in neurones.** *Cell Calcium* *19*, 1-14.
- Vicente, N. B., Zamboni, J. E. D., Adur, J. F., Paravani, E. V. und Casco, V. H. (2007). **Photobleaching correction in fluorescence microscopy images.** *J Phys Conf Ser* *90*, 012068.
- Vogel, C. und Marcotte, E. M. (2012). **Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses.** *Nat Rev Genet* *13*, 227-232.

- von Osten, M. (2015) **Ryanodine receptors in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis.** Biol. Dissertation, Universität Göttingen.
- Walseth, T. F., Aarhus, R., Kerr, J. A. und Lee, H. C. (1993). **Identification of Cyclic ADP-ribose-binding Proteins by Photoaffinity Labeling.** J Biol Chem 268, 26686-91.
- Walseth, T. F. und Lee, H. C. (1993). **Synthesis and characterization of antagonists of cyclic-ADP-ribose-induced Ca²⁺ release.** Biochim Biophys Acta 1178, 235-242.
- Wang, C. M., Ploia, C., Anselmi, F., Sarukhan, A. und Viola, A. (2014). **Adenosine triphosphate acts as a paracrine signaling molecule to reduce the motility of T cells.** EMBO J 33, 1354-1364.
- Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G. F., Peng, W. G., Han, X., Kang, J., Takano, T. und Nedergaard, M. (2006). **Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo.** Nat Neurosci 9, 816-23.
- Wekerle, H. und Lassmann, H. (2006). **Chapter 11 - The Immunology of Inflammatory Demyelinating Disease.** In: McAlpine's Multiple Sclerosis (Fourth Edition), Churchill Livingstone, Edinburgh, S. 491-555.
- Williams, R., Yao, H., Dhillon, N. K. und Buch, S. J. (2009). **HIV-1 Tat Co-Operates with IFN- γ and TNF- α to Increase CXCL10 in Human Astrocytes.** PLoS ONE 4.
- Wingerchuk, D. M. (2007). **Neuromyelitis Optica: New Findings on Pathogenesis.** Int Rev Neurobiol 79, 665-88.
- Wolf, I. M. A., Diercks, B.-P., Gattkowsky, E., Czarniak, F., Kempinski, J., Werner, R., Schetelig, D., Mittrücker, H.-W., Schumacher, V., Osten, M. v., Lodygin, D., Flügel, A., Fliegert, R. und Guse, A. H. (2015). **Frontrunners of T cell activation: Initial, localized Ca²⁺ signals mediated by NAADP and the type 1 ryanodine receptor.** Sci Signal 8, ra102-ra102.
- Wuytack, F., Raeymaekers, L. und Missiaen, L. (2002). **Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps.** Cell Calcium 32, 279-305.
- Yamasaki, M., Masgrau, R., Morgan, A. J., Churchill, G. C., Patel, S., Ashcroft, S. J. H. und Galione, A. (2004). **Organelle Selection Determines Agonist-specific Ca²⁺ Signals in Pancreatic Acinar and β Cells.** J Biol Chem 279, 7234-7240.
- Zalk, R., Clarke, O. B., Georges, A. d., Grassucci, R. A., Reiken, S., Mancina, F., Hendrickson, W. A., Frank, J. und Marks, A. R. (2014). **Structure of a mammalian ryanodine receptor.** Nature *advance online publication*.
- Zeinstra, E., Wilczak, N. und De Keyser, J. (2003). **Reactive astrocytes in chronic active lesions of multiple sclerosis express co-stimulatory molecules B7-1 and B7-2.** J Neuroimmunol 135, 166-71.

- Zhang, F. (2006). **Production of NAADP and its role in Ca²⁺ mobilization associated with lysosomes in coronary arterial myocytes.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H274-H282.
- Zhang, K., Sun, W., Huang, L., Zhu, K., Pei, F., Zhu, L., Wang, Q., Lu, Y., Zhang, H., Jin, H., Zhang, L. H., Zhang, L. und Yue, J. (2017). **Identifying GAPDH as a Cyclic Adenosine Diphosphoribose (cADPR) Binding Protein by Photoaffinity Protein-Ligand Labeling Approach.** *J Am Chem Soc* 139, 156-170.
- Zong, X., Schieder, M., Cuny, H., Fenske, S., Gruner, C., Rotzer, K., Griesbeck, O., Harz, H., Biel, M. und Wahl-Schott, C. (2009). **The two-pore channel TPCN2 mediates NAADP-dependent Ca²⁺-release from lysosomal stores.** *Pflügers Arch* 458, 891-9.
- Zorzon, M., Ukmar, M., Bragadin, L. M., Zanier, F., Antonello, R. M., Cazzato, G. und Zivadinov, R. (2000). **Olfactory dysfunction and extent of white matter abnormalities in multiple sclerosis: a clinical and MR study.** *Multiple Sclerosis Journal* 6, 386-390.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Überblick über ligandenaktivierte Rezeptoren und Ionenkanäle, deren Aktivierung zum Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in Astrozyten führen.	3
Abbildung 2: Allgemeines Schema der zellulären Ca^{2+} -Signaltransduktion.....	7
Abbildung 3: Strukturmodell und Domänenarchitektur des RYR1 (modifiziert nach (Zalk et al., 2014)).	8
Abbildung 4: Schematischer Überblick der Ca^{2+} -vermittelten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT sowie NF- κ B in Astrozyten.....	12
Abbildung 5: Fluoreszenzspektrum des Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffs Fura-2.	18
Abbildung 6: Schema des Lichtwegs bei der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie.	20
Abbildung 7: Parameterberechnung globaler Ca^{2+} -Messdaten.....	23
Abbildung 8: Ca^{2+} -Messungen an murinen Astrozyten unter Verwendung rezeptorspezifischer Agonisten.....	32
Abbildung 9: Charakterisierung des durch ATP ausgelösten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$	34
Abbildung 10: Einfluss des cADPR Antagonisten 8-Br-cADPR auf den durch ATP induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten.....	36
Abbildung 11: Inhibition des NAADP-vermittelten Anteils des durch ATP induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten unter Verwendung des Antagonisten BZ194.	38
Abbildung 12: Inhibition des Ca^{2+} Einstroms des durch ATP induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten unter Verwendung von Synta66.	40
Abbildung 13: Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms des durch ATP induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten unter Verwendung eines Ca^{2+} -freien Extrazellulärpuffers.	42
Abbildung 14: Inhibition des IP_3 -vermittelten Anteils des durch ATP induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten unter Verwendung des PLC Inhibitors U-73122.....	44
Abbildung 15: Der Einfluss des RYR3 bei dem durch ATP vermittelten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Astrozyten.....	46
Abbildung 16: Vergleichende Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms des durch ATP vermittelten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Wildtyp- (Cntrl) und RYR3 ^{-/-} -Astrozyten.....	48
Abbildung 17: Vergleichende Inhibition des IP_3 -vermittelten Anteils des durch ATP induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Wildtyp- (Cntrl) und RYR3 ^{-/-} -Astrozyten.....	50
Abbildung 18: Framescan eines repräsentativen Wildtyp- (Cntrl) und RYR3 ^{-/-} -Astrozyten und die Ausbreitungsgeschwindigkeit des durch ATP induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$	52
Abbildung 19: Der Effekt der pro-inflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF α auf den durch ATP induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Wildtyp- (Cntrl) und RYR3 ^{-/-} -Astrozyten.	54
Abbildung 20: Vergleichende Inhibition des IP_3 vermittelten Anteils des durch ATP induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in murinen Wildtyp- (Cntrl) und RYR3 ^{-/-} -Astrozyten unter pro-inflammatorischen Bedingungen.....	56
Abbildung 21: Vergleichende Stimulation muriner Wildtyp-(Cntrl) Astrozyten unter Verwendung nanomolarer ATP Konzentrationen.	58

<i>Abbildung 22: Analyse der Genexpression von Wildtyp- (Cntrl) und RYR3^{-/-}-Astrozyten unter normalen und pro-inflammatorischen Bedingungen.....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 23: Analyse der Ca²⁺-Signale an akuten Hirnschnitten des Cerebellums von Wildtyp- (Cntrl) und RYR3^{-/-}-Mäusen.....</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 24: Analyse der Ca²⁺-Signale an akuten Hirnschnitten des Bulbus olfactorius von Wildtyp- (Cntrl) und RYR3^{-/-}-Mäusen.....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 25: Schema des ATP-induzierten Anstiegs der [Ca²⁺]; in murinen Wildtyp-Astrozyten.....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 26: Schema des ATP-induzierten Anstiegs der [Ca²⁺]; in murinen RYR3^{-/-}-Astrozyten.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabelle 1: Zusammensetzung verwendeter Medien und Pufferlösungen.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabelle 2: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 3: Verwendete pharmakologische Antagonisten zur Charakterisierung der Ca²⁺- Signaltransduktion.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 4: Programmablauf zur Synthese von cDNA.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 5: Verwendete AoD-Primer für die qRT -PCR.....</i>	<i>30</i>

Eigene Publikationen

Barlag, B., Beutel, O., Janning, D., Czarniak, F., Richter, C. P., Kommnick, C., Göser, V., Kurre, R., Fabiani, F., Erhardt, M., Piehler, J. und Hensel, M. (2016). **Single molecule super-resolution imaging of proteins in living *Salmonella enterica* using self-labelling enzymes.** *Scientific Reports* 6, 31601.

Czarniak, F. und Hensel, M. (2015). **Red-mediated recombineering of *Salmonella enterica* genomes.** *Methods Mol Biol* 1225, 63-79.

Wolf, I. M. A., Diercks, B.-P., Gattkowski, E., Czarniak, F., Kempinski, J., Werner, R., Schetelig, D., Mittrücker, H.-W., Schumacher, V., Osten, M. v., Lodygin, D., Flügel, A., Fliegert, R. und Guse, A. H. (2015). **Frontrunners of T cell activation: Initial, localized Ca^{2+} signals mediated by NAADP and the type 1 ryanodine receptor.** *Sci Signal* 8, ra102-ra102.

Nach Revision eingereicht:

Diercks, B.-P., Werner, R., Weidemüller, P., Czarniak, F., Hernandez, L., Lehmann, C., Rosche, A., Krüger, A., Kaufmann, U., Vaeth, M., Fialla, A.V., Zobiak, B., Kandil, F. I., Schetelig, D., Ruthenbeck, A., Meier, C., Lodygin, D., Flügel, A., Ren, D., Wolf, I. M. A., Feske, S. und Guse, A. H. (2018). **ORAI1, stromal interaction molecules 1/2, and ryanodine receptor type1 shape sub-second Ca^{2+} microdomains upon T cell activation.** *Sci Signal* (under evaluation)

Eidesstattliche Erklärung

Name: Czarniak

Vorname: Frederik

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei Prof. Dr. Andreas Guse bedanken, der mir dieses interessante Forschungsthema zur Bearbeitung überlassen hat und stets bereits war über die vielen Facetten des Projektes zu diskutieren.

Mein weiterer Dank gilt Dr. Insa Wolf, für die Betreuung und Unterstützung während der Projektphase sowie für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian Lohr bedanken, zum einen für die Begutachtung der vorliegenden Arbeit und zum anderen für die Diskussion und Planung der Experimente rund um das Thema Ca^{2+} -Signaling in Hirnschnitten der Maus.

Ein besonderer Dank gilt meinen ehemaligen Kollegen der Calcium Signaling Group des Instituts für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, mit denen es nie langweilig wurde. Speziell möchte ich mich bei Kerstin und Monika für die schöne Zeit in unserem Büro in N30 bedanken.

Zuletzt möchte ich noch einen Dank an meine Mutter richten, die mich während meines ganzen Werdeganges stets tatkräftig unterstützt hat. Ein besonderer Dank gilt Janine, die mich in den letzten Jahren in jeglicher Stimmung ertragen und stets ermutigt und unterstützt hat.