

Institut für Neurowissenschaften
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth)

Charakterisierung BDNF-induzierter Calciumtransienten in kultivierten Astrozyten

Bruno Pichler

**Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.**

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth
2. Univ.-Prof. Dr. B. Conrad
3. Univ.-Prof. Dr. J. Dudel, em.,
Ludwig-Maximilians-Universität, München

Die Dissertation wurde am 20.09.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.02.2006 angenommen.

1 Zusammenfassung (deutsch)

Die Familie der Neurotrophine besteht aus strukturell und funktionell verwandten Proteinen, die Überleben, Differenzierung und Funktionserhaltung verschiedener Neuronenpopulationen regulieren.

Um die Wirkung von Neurotrophinen auf Gliazellen zu untersuchen, wurde Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Konzentrationen zwischen 5 und 50 ng/ml für 20 – 150 ms auf primäre hippokampale Astrozytenkulturen appliziert, die zuvor mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM beladen worden waren. Die Effekte wurden mit ratiometrischem Fluoreszenz-Imaging untersucht.

Die Applikation von BDNF rief Calciumtransienten in Astrozyten hervor und generierte eine Calciumwelle, die sich im Astrozytensynzytium ausbreitete. Diese glialen Calciumtransienten ließen sich - im Gegensatz zu BDNF-induzierten Calciumtransienten in Neuronen - nicht durch STX blockieren und zeigten einen anderen Zeitverlauf als in Neuronen. BDNF-induzierte Calciumtransienten in Astrozyten waren in calciumfreier Badlösung auslösbar und ließen sich durch die SERCA-Inhibitoren Thapsigargin und CPA blockieren. Der IP₃-Rezeptor-Blocker 2-APB reduzierte die maximale Amplitude der Calciumtransienten um 75%.

Das Neurotrophin-Antwort-Profil (NT-4/5 erzeugte ähnliche Calciumtransienten wie BDNF; NGF und NT-3 riefen keine Calciumtransienten hervor) deutet auf eine Signaltransduktion über TrkB-Rezeptoren hin. Die Transienten ließen sich nicht durch K-252a blockieren und waren auch in Kulturen von TrkB-Full-Length-Knockout-Mäusen auslösbar.

Demnach werden BDNF-induzierte Calciumtransienten in Astrozyten über IP₃-vermittelte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern nach Aktivierung trunkierter TrkB-Rezeptoren generiert.

2 Zusammenfassung (englisch, Abstract)

The family of neurotrophins comprises of structural and functional related proteins that regulate survival, differentiation and maintenance of function of different neuronal populations.

In order to investigate the effects of neurotrophins on glial cells, Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in concentrations between 5 and 50 ng/ml was locally applied for 20 – 150 ms on primary hippocampal astrocyte cultures stained with the calcium sensitive fluorescent dye Fura-2-AM. The effects were examined using ratiometric fluorescence imaging.

Application of BDNF evoked calcium transients and generated a calcium wave that spread through the astrocyte syncytium. These glial calcium transients – in contrast to BDNF-induced calcium transients in neurons – could not be blocked by STX and showed a different time course as observed in neurons. BDNF-induced calcium transients in astrocytes were elicitable in calcium-free saline and could be blocked by the SERCA inhibitors thapsigargin and CPA. The IP₃ receptor blocker 2-APB reduced the max. amplitude of calcium transients by 75%. The neurotrophin response profile (NT-4/5 evoked similar calcium transients as BDNF; NGF and NT-3 did not evoke calcium transients) suggests a signal transduction via TrkB receptors. The transients could not be blocked by K-252a and were elicitable also in cultures of TrkB-full-length knockout mice.

Thus, BDNF-induced calcium transients in cultured astrocytes are generated by means of IP₃-mediated calcium release from intracellular stores following activation of truncated TrkB-receptors.

3 Schlagwörter (deutsch)

Astrozyten, BDNF, Calcium, Calciumsignale, Calciumspeicher, Calciumwelle, Glia, IP₃, Neurotrophine, TrkB, TrkB-T1.

4 Schlagwörter (englisch, Keywords)

astrocytes, BDNF, calcium, calcium signalling, calcium store, calcium wave, glia, IP₃, neurotrophins, TrkB, TrkB-T1.

5 Abkürzungen

[Ca ²⁺] _e	Calcium-Konzentration im Extrazellularraum
[Ca ²⁺] _i	Calcium-Konzentration im Cytoplasma
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(o-Aminophenoxy)Ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucose
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
CHR	Control Hepes Ringer
CPA	Cyclopiazonic Acid
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ER	endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fetal Bovine Serum
Fura-2-AM	Fura-2 Acetoxymethylester
GABA	Gamma Amino Butyric Acid
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid
HIV	humanes Immundefizienzvirus
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	Jun-N-terminal-Kinase
KCl	Kaliumchlorid
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LF-NT	<i>Lampetra fluviatilis</i> Neurotrophin
ln	natürlicher Logarithmus
M	molar
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MG-NT	<i>Myxine glutinosa</i> Neurotrophin
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
ms	Millisekunde(n)
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NGF	Nerve Growth Factor
nM	nanomolar
NR	Normal-Ringer
NT-3	Neurotrophin 3
NT-4/5	Neurotrophin 4/5
NT-6	Neurotrophin 6
NT-7	Neurotrophin 7

Null-Ca ²⁺	
-CHR	calciumfreier Control Hepes Ringer
p75 ^{NTR}	p75 Neurotrophin-Rezeptor
PDL	Poly-D-Lysin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC _γ	Phospholipase C gamma
PPADS	Pyridoxal-Phosphate-6-Azophenyl-2',4'-Disulfonic Acid
Rho-GDI1	Rho GDP dissociation inhibitor 1
ROCC	rezeptorgesteuerte Ca ²⁺ -Kanäle (receptor operated calcium channels)
ROI	Region Of Interest
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SERCA	Sarcoendoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase
Shc	Src Homology 2/ α -Collagen-related Protein
SOCC	speicherabhängige Ca ²⁺ Kanäle (store operated calcium channels)
STX	Saxitoxin
TG	Thapsigargin
TIPP	Truncated TrkB Interacting Protein
TrkA	Tropomyosin Related Kinase A
TrkB	Tropomyosin Related Kinase B
TrkC	Tropomyosin Related Kinase C
TrkB ^{FL}	Tropomyosin Related Kinase B Full Length
TrkB-T1	Truncated Tropomyosin Related Kinase B 1
TrkB-T2	Truncated Tropomyosin Related Kinase B 2
TRP	Transient Receptor Potential
Tyr	Tyrosin
VGCC	spannungsabhängige Ca ²⁺ Kanäle (voltage gated calcium channels)

6 Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung (deutsch)	2
2	Zusammenfassung (englisch, Abstract)	3
3	Schlagwörter (deutsch)	4
4	Schlagwörter (englisch, Keywords)	4
5	Abkürzungen	4
6	Inhaltsverzeichnis	7
7	Einleitung	9
7.1	Neurotrophine	9
7.1.1	Grundsätzliches	9
7.1.2	Eigenschaften	10
7.1.3	Funktionen.....	10
7.1.4	Rezeptoren.....	11
7.1.5	Signalkaskaden.....	14
7.2	Glia.....	16
7.3	Gliale Calciumsignale	17
7.4	Ausgangspunkt und Fragestellung	20
8	Material und Methoden	21
8.1	Fluoreszenz-Mikroskopie.....	21
8.1.1	Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM.....	21
8.1.2	Fluorescence-Ratio-Imaging	23
8.2	Vorbereitung des zu untersuchenden Gewebes.....	26
8.2.1	Zellkultur	26
8.2.2	Experimente an akuten Gehirnschnitten.....	27
8.3	Versuchsordnung und –durchführung.....	28
8.3.1	Lösungen	28
8.3.2	Datenerfassung und –auswertung.....	30
9	Ergebnisse	32
9.1	BDNF-induzierte Calciumtransienten in kultivierten Astrozyten.....	32

9.2	Vergleich BDNF-induzierter Calciumtransienten in Gliazellen und Neuronen	35
9.3	Der Einfluss intrazellulärer Calciumspeicher	37
9.4	Vergleich BDNF- und ATP-induzierter Calciumtransienten.....	40
9.5	Vergleich von NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5	45
9.6	Experimente zur Rezeptor-Identifikation.....	46
9.7	Ergebnisübersicht	48
10	Diskussion	51
10.1	Signaltransduktion über trunkierte TrkB-Rezeptoren.....	51
10.2	BDNF-vermittelte Neuron-Glia-Kommunikation.....	55
10.3	Mögliche Konsequenzen für die klinische Therapie.....	56
11	Eigene Publikationen	59
11.1	Poster: Göttingen, 2001	60
11.2	Poster: Tübingen, 2002	61
11.3	Publikation: Nature 426, 2003	62
12	Literaturverzeichnis	67
13	Danksagung	79
14	Eidesstattliche Erklärung	80
15	Lebenslauf.....	81

7 Einleitung

Gegenstand vorliegender Dissertation ist die Charakterisierung schneller Wirkungen von Neurotrophinen auf Gliazellen anhand BDNF-induzierter Calciumtransienten in kultivierten Astrozyten. Einleitend soll der Stand der Forschung zusammengefasst sowie Ausgangspunkt und Fragestellung dargestellt werden.

7.1 Neurotrophine

7.1.1 Grundsätzliches

Die Familie der Neurotrophine ist eine Gruppe sezernierter Proteine, die strukturell und funktionell eng verwandt sind und im zentralen und peripheren Nervensystem Überleben, Differenzierung und Wachstum von Neuronenpopulationen regulieren (siehe Kapitel 7.1.3). Sie entfalten ihre Wirkung über ein Zwei-Rezeptoren-System, bestehend einerseits aus $p75^{NTR}$ und andererseits aus der Familie der Trk-Rezeptoren (siehe Kapitel 7.1.4) [Barbacid, 1995; Bibel und Barde, 2000; Siegel und Chauhan, 2000; Kalb, 2005]. Bei Landwirbeltieren wurden vier Neurotrophine beschrieben:

- Nerve Growth Factor (NGF) [Cohen und Levi-Montalcini, 1956; 1957; Cohen, 1960]
- Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) [Barde et al., 1982]
- Neurotrophin-3 (NT-3) [Hohn et al., 1990] und
- Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) [Berkemeier et al., 1991; Ip et al., 1992]

Weitere Neurotrophine (NT-6, NT-7, MG-NT, LF-NT) wurden bei Kieferlosen und Fischen beschrieben. [Hallböök, 1999].

Die Entdeckung des Nerve Growth Factor (NGF) in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts durch Rita Levi-Montalcini und Stanley Cohen gilt als wichtiger Meilenstein der modernen Neurobiologie und wurde 1986 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin gewürdigt [Levi-Montalcini, 1987; Levi-Montalcini et al., 1995; Aloe, 2004].

7.1.2 Eigenschaften

Neurotrophine treten als nicht-kovalent gebundene Dimere auf und zeigen eine große strukturelle Ähnlichkeit u. a. in ihrem Molekulargewicht (13,2 – 15,9 kDa) und ihrem isoelektrischen Punkt (9-10). Ihre Primärstruktur ist zu ca. 50% identisch [Mowla et al., 2001; Tapia-Arancibia et al., 2004]. Bei allen Neurotrophinen finden sich an der jeweils gleichen Position sechs Cystein-Reste, die drei Disulfid-Brücken bilden und damit für das charakteristische Faltungsmuster verantwortlich sind [Maisonpierre et al., 1990; 1991]. Phylogenetisch entstanden NGF und NT-3 einerseits sowie BDNF und NT-4/5 andererseits jeweils durch Gen-Duplikation aus Vorläufer-Neurotrophinen, welche ebenfalls durch Gen-Duplikation eines Ur-Neurotrophins entstanden waren [Hallböök, 1999].

Neurotrophine werden als Prä-Pro-Neurotrophine von ca. 31 - 35 kDa synthetisiert [Mowla et al., 2001], deren Prä- und Pro-Sequenzen u. a. die Zieladressierung auf den intrazellulären Transportwegen regulieren [Lessmann et al., 2003]. Auch diese Proneurotrophine sind biologisch aktiv [Lee, R. et al., 2001; Teng et al., 2005; Blum und Konnerth, 2005].

7.1.3 Funktionen

Die Hauptfunktion der Neurotrophine wurde schon frühzeitig durch die klassische Neurotrophin-Hypothese beschrieben: Zielgewebe regulieren ihre Innervation, indem sie Neurotrophine in begrenzter Menge ausschütten, was zu einer Kompetition innervierender Neurone um die überlebensnotwendigen Faktoren führt. Erfolgreiche Wettbewerber überleben, während Neurone, denen zu wenig Neurotrophin zur Verfügung steht, zugrunde gehen [Levi-Montalcini, 1987]. Durch Applikation von Antikörpern, die Neurotrophin-Wirkungen in bestimmten Entwicklungsphasen unterdrücken, und durch Untersuchungen an transgenen Mäusen, bei denen Neurotrophine oder deren Rezeptoren inaktiviert oder mutiert sind, konnte die Neurotrophin-Hypothese bestätigt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Neurotrophine spezifisch das Überleben bestimmter Neuronenpopulationen kontrollieren [Conover und Yancopoulos, 1997; Barbacid, 1995; Snider, 1994]. So führt beispielsweise NGF-Defizienz zu gestörter Thermo- und Nozizeption [Crowley et al., 1994], NT3-defiziente Tiere dagegen

zeigen eine eingeschränkte Propriozeption [Farinas et al., 1994], jeweils verursacht durch einen massiven Schwund sensorischer Neurone der Hinterwurzelganglien. Neurotrophin- oder Trk-Rezeptor-defiziente Knock-Out-Mäuse sind phenotypisch stark alteriert und können meist nur wenige Stunden bis einige Wochen nach der Geburt überleben [Conover und Yancopoulos, 1997; Barbacid, 1995; Snider, 1994]. Die wesentlichen Gesichtspunkte der Neurotrophin-Hypothese gelten nach wie vor, jedoch sind die in den vergangenen Jahrzehnten beschriebenen Neurotrophin-Wirkungen und -Wirkmechanismen wesentlich komplexer und vielfältiger als ursprünglich angenommen [Yuen et al., 1996]:

Neurotrophine beeinflussen nicht nur Überleben und Untergang von Nervenpopulationen, sondern fast alle Aspekte der neuronalen Entwicklung, so z. B. Proliferation und Migration von Neuronen, Bildung und Auswachsen von Axon und Dendriten, Synapsenbildung und Modulation der synaptischen Transmission, neuronale Plastizität (short- und long-term plasticity), Synthese und Ausschüttung von Neurotransmittern, etc. [Barbacid, 1994; Schuman, 1999; Bibel und Barde, 2000; Tapia-Arancibia et al., 2004].

Die hier genannten Neurotrophin-Wirkungen zeigen sich meist nach Stunden oder Tagen, teilweise auch bereits nach Minuten. Vor wenigen Jahren konnte eine völlig neuartige, schnelle Wirkung beschrieben werden: BDNF und NT-4/5 lösen innerhalb weniger Millisekunden Aktionspotentiale in zentralen Neuronen aus und können somit ähnliche Effekte hervorrufen wie erregende Neurotransmitter [Kafitz et al., 1999; Blum et al., 2002].

7.1.4 Rezeptoren

Neurotrophine wirken über ein Zwei-Rezeptoren-System:

p75^{NTR} ist ein Rezeptor aus der TNF-Familie (TNF: „tumor necrosis factor“) mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa. NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5 können mit ähnlicher Affinität ($K_d \sim 10^{-9}$ M) an p75^{NTR} binden.

Die Familie der Trk-Rezeptoren besteht aus drei Rezeptoren: TrkA, TrkB und TrkC. Die Abkürzung Trk (Aussprache: [træk]) steht für „tropomyosin-related-kinase“ und bezieht sich auf die Zusammensetzung der Rezeptoren aus nicht-muskulärem Tropomyosin und einer intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne. Sie

haben ein Molekulargewicht von ca. 140 kDa und zeigen ein spezifisches Bindungsprofil: NGF bindet bevorzugt an TrkA, BDNF und NT-4/5 an TrkB, NT-3 an TrkC. Die Affinität liegt jeweils bei $K_d \sim 10^{-10}$ M.

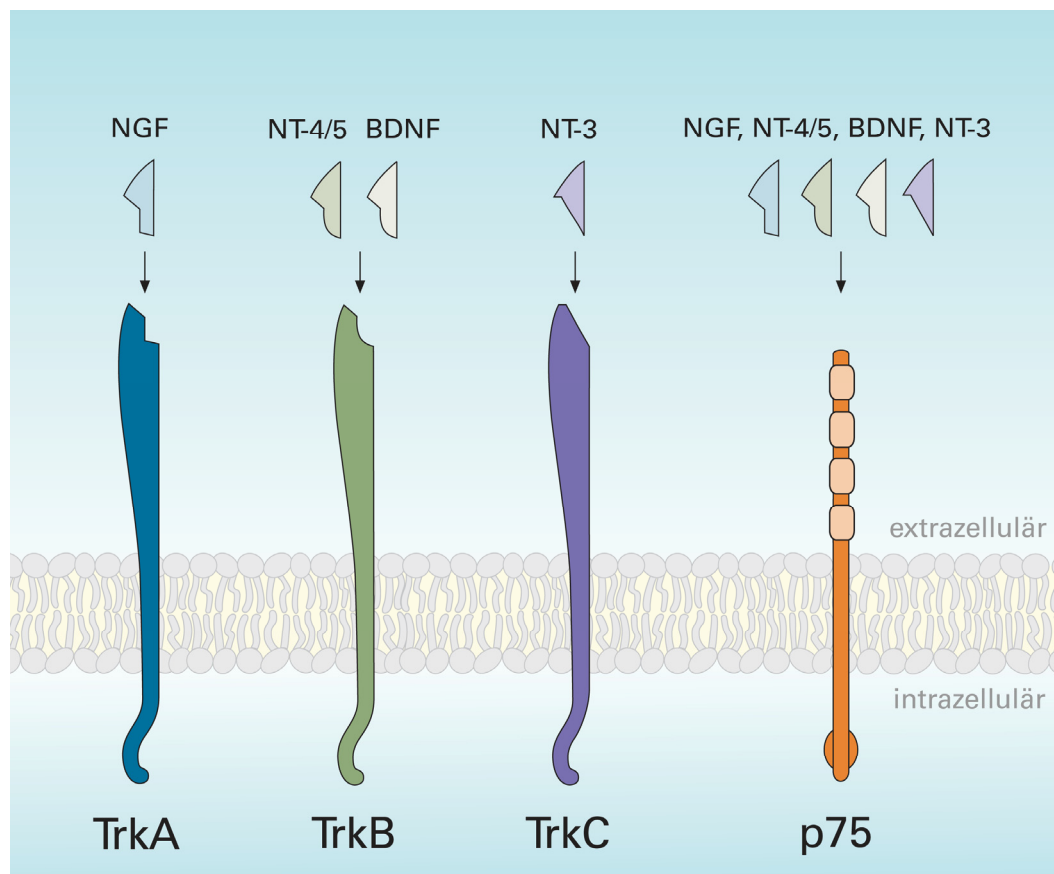


Abb. 1: Spezifität von Neurotrophin-Rezeptoren. (zusammengefasst und modifiziert nach [Barbacid, 1994; Chao, 2003; Purves et al., 2004]). Erläuterung im Text.

Die Bindung eines Neurotrophin-Dimers an ein Trk-Rezeptor-Monomer führt zu einer liganden-induzierten Dimerisierung von Trk-Rezeptoren. Diese löst eine Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten der intrazellulären Kinase-Domäne aus, wodurch diverse Signalkaskaden in Gang gesetzt werden (siehe Kapitel 7.1.5) [Barbacid, 1995; Chao und Hempstead, 1995; Chao, 2003]. Bei der Bindung eines NGF-Dimers an $p75^{NTR}$ findet nach neuesten Erkenntnissen keine Rezeptor-Dimerisierung statt, wie zuvor angenommen worden war. Statt dessen wird ein NGF- $p75^{NTR}$ -Komplex mit ungewöhnlicher, asymmetrischer 2:1-Stoichiometrie gebildet [He und Garcia, 2004].

Bis vor wenigen Jahren herrschte ein einfaches Erklärungsmodell für das

Zwei-Rezeptor-System vor, das entgegengesetzte Funktionen für p75^{NTR} und Trk-Rezeptoren annahm. Man ging davon aus, dass p75^{NTR} Apoptose induziert, während Trk-Rezeptoren das Überleben fördern [Majdan und Miller, 1999; Lewin und Barde, 1996; Barbacid, 1995]. Inzwischen ist klar, dass die Zusammenhänge wesentlich komplexer sind. So kann p75^{NTR} auch das Überleben regulieren, Trk-Rezeptoren können auch Zelltod induzieren [Lee, F. S. et al., 2001]. Des weiteren wurden diverse Interaktionen zwischen p75^{NTR} und Trk-Rezeptoren beschrieben [Dechant, 2001; Hempstead, 2002], z. B. die Entstehung von hochaffinen NGF-Bindungsstellen ($K_d \sim 10^{-11}$ M) durch Bildung heterodimerer Rezeptorkomplexe aus p75^{NTR} und TrkA [Hempstead et al., 1991; Esposito et al., 2001] oder eine Änderung der Spezifität von Trk-Rezeptoren durch Interaktion mit p75^{NTR} [Bibel et al., 1999]. Hinzu kommt, dass p75^{NTR} durch Proneurotrophine aktiviert werden kann, die mit wesentlich höherer Affinität gebunden werden als mature Neurotrophine [Lee, R. et al., 2001; Nykjaer et al., 2004; Teng et al., 2005].

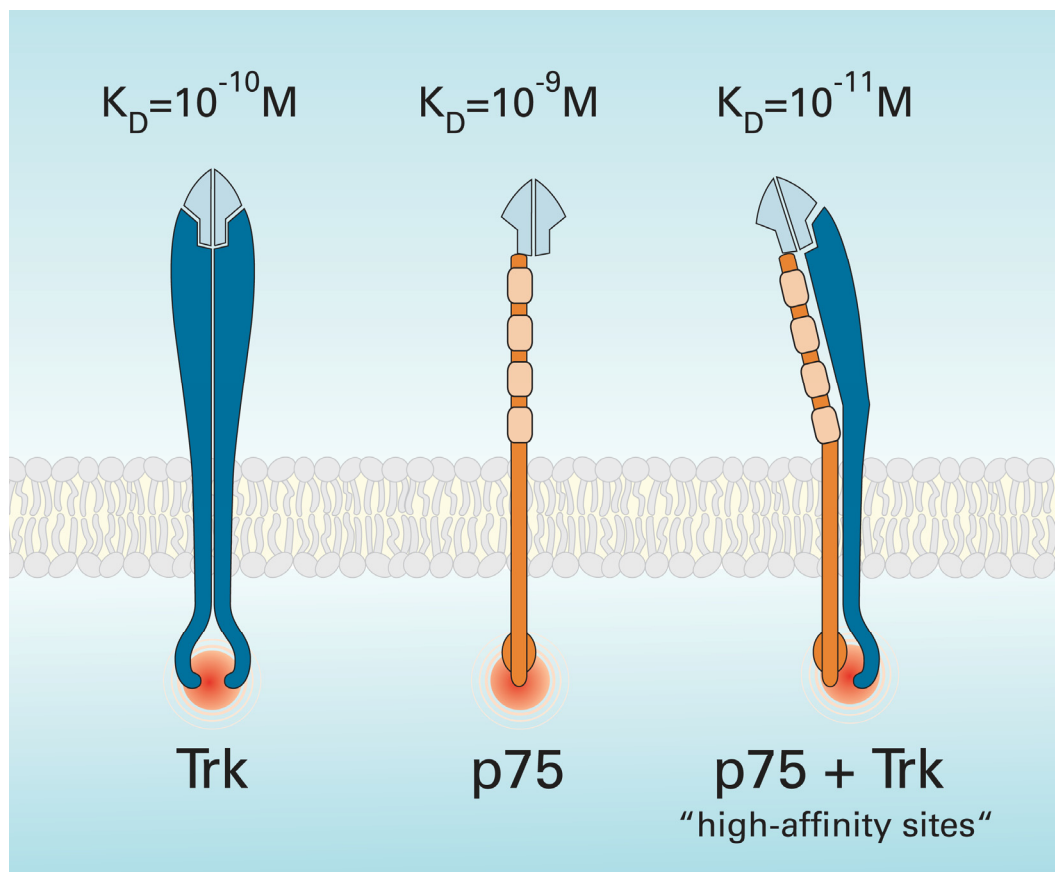


Abb. 2: Affinitätsunterschiede von Neurotrophin-Rezeptoren. Neurotrophin-Dimere binden an Trk-Dimere, p75^{NTR}-Monomere und an Trk-p75^{NTR}-Heterodimere („high-affinity sites“) mit unterschiedlicher Affinität (zusammengefasst und modifiziert nach [Chao, 2003; He und Garcia, 2004; Zampieri und Chao, 2004]).

Neben den „vollständigen“ (engl.: „full-length“) Trk-Rezeptoren existieren auch „unvollständige“ (engl.: „truncated“) Isoformen, deren transmembranäre und extrazelluläre Anteile mit den entsprechenden Bereichen des Full-Length-Rezeptors identisch sind, denen aber die intrazelluläre Kinase-Domäne fehlt [Klein et al., 1990; Middlemas et al., 1991]. Bisher wurden zwei unvollständige TrkB-Rezeptoren (TrkB-T1, TrkB-T2) und vier unvollständige TrkC-Rezeptoren beschrieben [Barbacid, 1994, 1995]. Die Expression trunkierter und nicht-trunkierter TrkB-Rezeptoren ist in der Embryonalentwicklung streng reguliert, das Expressionsmuster verändert sich im Laufe der Gehirnreifung: In der frühen Embryonalentwicklung wird fast ausschließlich TrkB^{FL} exprimiert, perinatal steigt die Expression trunkierter Rezeptoren stark an, im ausgereiften Gehirn überwiegen trunkierte TrkB-Rezeptoren [Allendoerfer et al., 1994; Escandon et al., 1994; Ohira et al., 1999].

7.1.5 Signalkaskaden

Zu den am besten beschriebenen Neurotrophin-induzierten Signalwegen gehören die über Phospholipase C γ 1 (PLC γ), ras/MAP-Kinase (MAPK) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) vermittelten Transduktionskaskaden. Diese werden in Folge der Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten der intrazellulären Kinase-Domäne von Trk-Rezeptoren in Gang gesetzt (Abb. 3) [Chao, 2003].

Phosphorylierung des Tyrosin-Restes 816 bildet eine PLC γ -Bindungsstelle, im Anschluß kommt es zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂). Die nachfolgende Calcium-Ausschüttung aus intrazellulären Speichern und die Bindung der Calciumionen an Calmodulin (CaM) beeinflussen die Genexpression und letztendlich Wachstum und Ausdifferenzierung von Neuronen.

Die Bindung von Shc (Src homology 2/ α -collagen-related protein) an die phosphorylierte Tyr⁵¹⁵-Shc-Bindungsstelle führt zur Aktivierung des PI3K-Transduktionsweges, der über die Akt-Kinase Effekte auf Überleben, Wachstum und Differenzierung entfaltet. Außerdem wird durch Shc die MAPK-Kaskade in Gang gesetzt, die im Endeffekt ebenfalls an der Regulation von Überleben, Wachstum und Differenzierung beteiligt ist und synaptische Transmission sowie neuronale Plastizität beeinflusst.

Diese Signalkaskaden sind in unterschiedlichem Ausmaß von der Präsenz bzw. Abwesenheit von p75^{NTR} abhängig [Nykjaer et al., 2005]. Der p75^{NTR}-Rezeptor kann neben den bereits oben erwähnten Einflüssen auf Spezifität und Affinität von Trk-Rezeptoren auch über eine direkte Interaktion mit Adaptor-Proteinen der Trk-vermittelten Signalkaskaden die Signaltransduktion sowohl unterstützen [Epa et al., 2004] als auch behindern [Hannila et al., 2004]. Die genauen Mechanismen dieser Interaktionen sind bisher weitgehend unbekannt und derzeit Gegenstand intensiver Forschung [Kalb, 2005; Nykjaer et al., 2005]. Daneben sind auch mehrere Signalwege bekannt, die einer alleinigen p75^{NTR}-Aktivierung zugeschrieben werden, so z. B. die Transduktionswege über die Jun-N-terminal-Kinase (JNK) oder den „nuclear factor kappa B“ (NF-κB) [Chao, 2003].

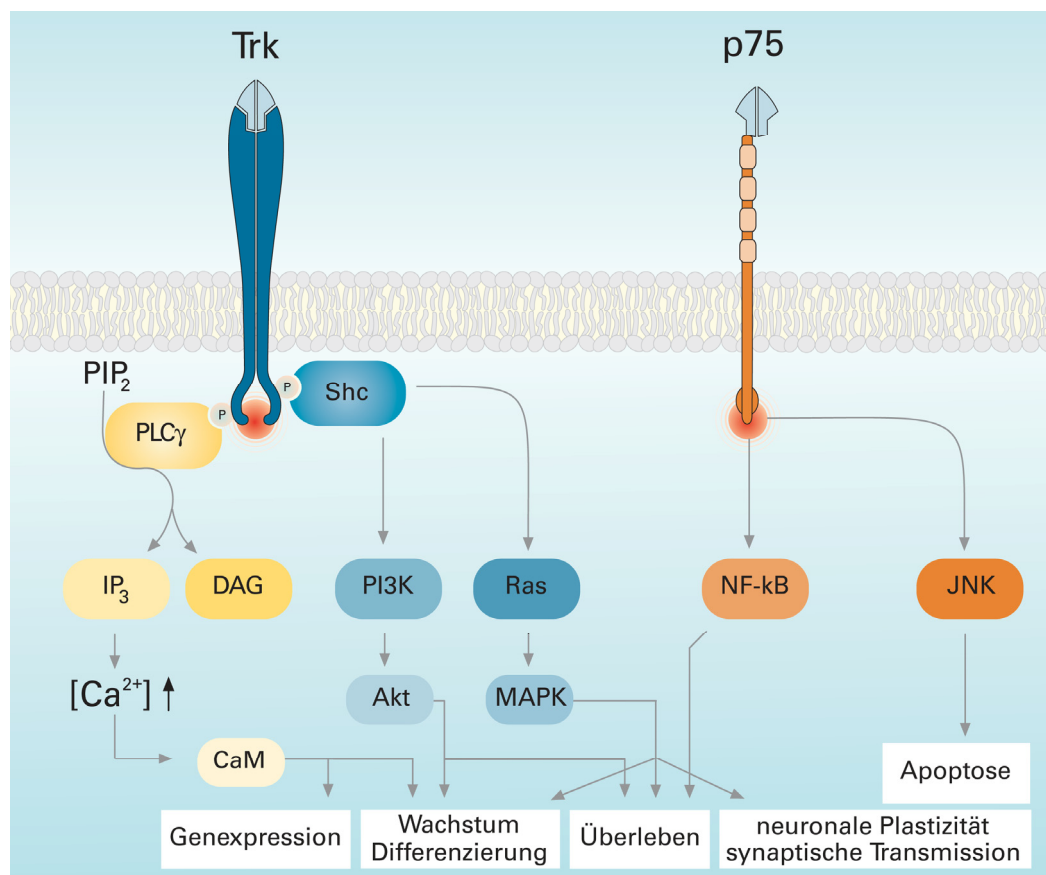


Abb. 3: Signaltransduktionswege nach Aktivierung von Trk und p75^{NTR}. (zusammengefasst und modifiziert nach [Chao, 2003; Purves et al., 2004; Blum und Konnerth, 2005]). Erläuterung im Text.

Neben den genannten intrazellulären Signalkaskaden, kann die Aktivierung von Trk-Rezeptoren auch direkte Wirkungen auf Ionenkanäle entfalten [Rose et al., 2004; Blum und Konnerth, 2005]. So konnten Li et al. eine BDNF-induzierte Aktivierung eines TRP-Kanals zeigen [Li et al., 1999]. Auch die bereits erwähnte schnelle, transmitter-ähnliche Wirkung von Neurotrophinen beruht auf einer direkten Interaktion von Trk-Rezeptoren und Ionenkanälen: durch Aktivierung von TrkB^{FL} wird der Natriumkanal Na_v1.9 geöffnet [Blum et al., 2002].

Die Funktionen und eventuelle Signalkaskaden trunkierter Trk-Rezeptoren sind weitgehend unbekannt. Der intrazelluläre Bereich der trunkierten TrkB-Isoformen TrkB-T1 bzw. -T2 besteht aus einer nur neun (TrkB-T2) bzw. elf (TrkB-T1) Aminosäuren kurzen Sequenz anstelle der Tyrosin-Kinase-Domäne von Full-Length-Rezeptoren [Klein et al., 1990; Middlemas et al., 1991]. Diese kurze, C-terminale Sequenz weist keine bekannte katalytische Aktivität auf [Offenhauser et al., 2002]. Dementsprechend wurden Signaltransduktionsmechanismen trunkierter TrkB-Rezeptoren bisher nicht beschrieben. Bekannt ist jedoch, dass Gliazellen hauptsächlich den trunkierten Rezeptor TrkB-T1 und nur sehr wenige oder gar keine TrkB^{FL}-Rezeptoren exprimieren [Condorelli et al., 1994; Rudge et al., 1994].

7.2 Glia

Das Nervensystem setzt sich im Wesentlichen aus zwei Gruppen von Zellen zusammen, Nervenzellen und Gliazellen. Nervenzellen können durch die Bildung und Fortleitung von Aktionspotentialen elektrische Signale über weite Strecken übertragen, während Gliazellen nicht elektrisch erregbar sind, sondern über andere Mechanismen an der Signalübertragung mitwirken [Purves et al., 2004]. Der Begriff Glia (γλια griech. = Leim, Kitt) geht auf Rudolf Virchow (1821 - 1902) zurück, der 1846 die Bezeichnungen „Nervenkitt“ bzw. „Neuroglia“ für eine im Nervensystem neu entdeckte Substanz wählte, von der er annahm, dass es sich um eine Art Klebstoff handele [Virchow, 1846; Somjen, 1988]. Die Bezeichnung hat sich durchgesetzt, obwohl es bis heute keine Hinweise darauf gibt, dass zu den vielfältigen Aufgaben der Gliazellen auch eine Klebefunktion gehört [Purves et al., 2004].

Im zentralen Nervensystem existieren drei Gruppen von Gliazellen:

Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen. Als Mikroglia werden die aus hämatopoietischen Stammzellen hervorgegangenen, makrophagenartigen Zellen bezeichnet, die bei Zerfall von Nervengewebe die Entfernung der Abbauprodukte übernehmen. Oligodendrozyten bilden die lipidreichen Myelinscheiden, die durch Isolierung der axonalen Nervenzellmembran die Fortleitungsgeschwindigkeit von Aktionspotentialen beeinflussen.

Astrozyten stellen die größte Gruppe von Gliazellen dar. Sie verdanken ihren Namen ihren zahlreichen, sternförmigen Fortsätzen, deren Endfüße den Kapillargefäßen einerseits und den Neuronen andererseits sehr eng anliegen. Nach ihrer Morphologie und Lokalisation werden fibrilläre und protoplasmatische Astrozyten unterschieden: Protoplasmatische Astrozyten finden sich vor allem in der grauen Substanz und besitzen sehr viele kurze und stark verzweigte, radiäre Ausläufer. Fibrilläre Astrozyten kommen hauptsächlich in der weißen Substanz vor, ihre Ausläufer sind dünner, länger und weniger verästelt. Über gap junctions können Astrozyten miteinander in Kontakt treten und Ionen sowie kleinere Moleküle (< 1 - 1,4 kDa) austauschen. Sie bilden dadurch ein funktionelles Synzytium [Giaume und Venance, 1998]. Hauptaufgabe der Astrozyten ist die Aufrechterhaltung eines optimalen Milieus im zentralen Nervensystem. Dazu gehören u. a. die Bildung der Blut-Hirn-Schranke, die Regulation der Ionenkonzentration im Extrazellularraum, die Nährstoffversorgung von Neuronen sowie Aufnahme und Abtransport verschiedener Neurotransmitter an den Synapsen [Simard und Nedergaard, 2004].

Über die Wirkungen von Neurotrophinen auf Astrozyten ist wenig bekannt [Althaus und Richter-Landsberg, 2000]. Es wurde jedoch berichtet, dass Neurotrophinapplikation zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Subpopulationen kultivierter Astrozyten führt. [Roback et al., 1995; Climent et al., 2000].

7.3 Gliale Calciumsignale

Ca^{2+} ist in allen eukaryotischen Zellen ein höchst vielseitiger Botenstoff, der eine ganze Reihe intrazellulärer Ereignisse über verschiedenste Mechanismen regulieren kann, darunter sehr schnelle Ereignisse im Mikrosekundenbereich wie z. B. die Exozytose von Neurotransmittern, und langsamere, wie z. B.

Gentranskription oder Zellproliferation, die sich im Bereich von Minuten und Stunden bis zu mehreren Tagen abspielen [Berridge et al., 2003].

Unter einem „Calcium-Signal“ versteht man eine transiente Erhöhung der Calcium-Konzentration im Cytoplasma ($[Ca^{2+}]_i$). Unter Ruhebedingungen beträgt diese in Astrozyten etwa 30 - 150 nM, während eines Calciumtransienten erreicht die Calciumkonzentration Werte von mehreren hundert nM und sogar einigen μ M. Calcium-Transienten entstehen durch Einstrom aus dem Extrazellularraum sowie durch Ausschüttung von Calcium aus intrazellulären Speichern.

Verschiedene Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle in der Zellmembran können an dem Ca^{2+} -Einstrom mitwirken, so z. B. spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (engl.: voltage-gated calcium channels, VGCC), rezeptorgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (receptor-operated calcium channels, ROCC) und speicherabhängige Ca^{2+} -Kanäle (store-operated calcium channels, SOCC). Die um ca. vier Zehnerpotenzen höhere Calcium-Konzentration im Extrazellularraum ($[Ca^{2+}]_e$) führt zusammen mit dem negativen Ruhemembranpotential zu einem enormen elektrochemischen Gradienten, der auch bei nur geringfügiger Änderung der Ca^{2+} -Permeabilität einen massiven Ca^{2+} -Einstrom bewirkt. Ca^{2+} -Pumpen und Na^+/Ca^{2+} -Austauscher transportieren Ca^{2+} wieder in den Extrazellularraum und halten so den Gradienten aufrecht.

Als intrazelluläre Calcium-Speicher bezeichnet man ein System verschiedener Zellorganellen wie z. B. endoplasmatisches Retikulum (ER), Mitochondrien und Golgi-Apparat. Ca^{2+} -Ionen werden aktiv, ebenfalls durch ATPasen (z. B. sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase, SERCA), in diese Speicher transportiert und können über verschiedene Mechanismen ins Cytosol ausgeschüttet werden. In Astrozyten ist der wesentliche Mechanismus dieser Ca^{2+} -Ausschüttung die Aktivierung von Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren (IP_3 -R) über die Phospholipase-C-Signalkaskade (metabotroper Rezeptor \rightarrow G-Protein \rightarrow PLC \rightarrow IP_3 \rightarrow IP_3 -R) [Verkhratsky et al., 1998; Deitmer et al., 1998]. Ob in Astrozyten auch Ryanodin-Rezeptoren an der Ca^{2+} -Ausschüttung aus intrazellulären Speichern beteiligt sind, ist unklar und wird kontrovers diskutiert [Hua et al., 2004; Beck et al., 2004]. Im Anschluß an die Ca^{2+} -Ausschüttung kommt es zu einem sog. kapazitativen Einstrom von Ca^{2+} , der durch die Entleerung der Speicher initiiert wird [Parekh und Putney, 2005; Golovina, 2005].

Calcium-Transienten können in Astrozyten durch eine Vielzahl

unterschiedlicher Stimuli hervorgerufen werden, beispielsweise durch Glutamat, ATP, Noradrenalin, GABA, Acetylcholin u. a. [Verkhratsky et al., 1998]. Ein besonderer Aspekt astrozytärer Calcium-Signale ist die Fähigkeit, transiente $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen an benachbarte Astrozyten zu übertragen und als Calcium-Welle über weite Strecken zu übermitteln [Cornell-Bell et al., 1990; Porter und McCarthy, 1996]. Diese Fortleitung beruht wahrscheinlich auf zwei Mechanismen: Zum einen diffundiert IP_3 über gap junctions in eine benachbarte Zelle, zum anderen wird durch die $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung ATP ausgeschüttet, das metabotrope Rezeptoren benachbarter Zellen aktiviert. Beides führt letztlich zu einer Ca^{2+} -Ausschüttung aus intrazellulären Speichern der angrenzenden Astrozyten. Es entsteht so eine Calcium-Welle, die sich mit einer Geschwindigkeit von ca. 20 $\mu\text{m/s}$ fortbewegt [Haydon, 2001].

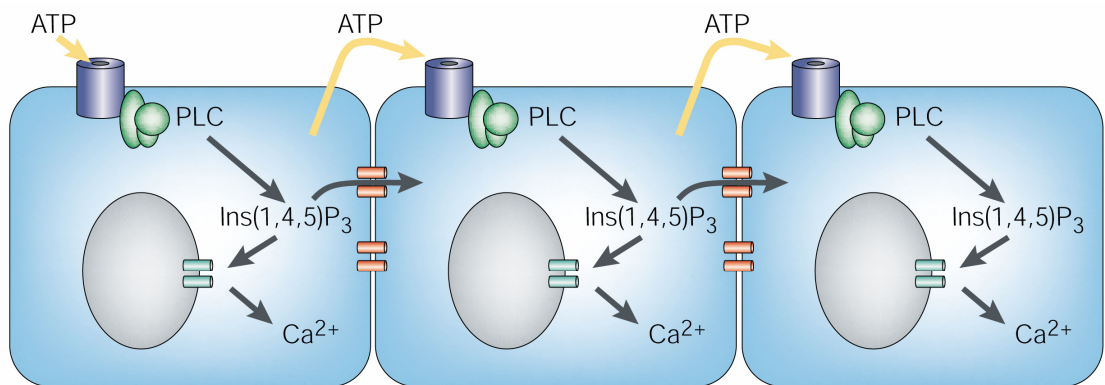


Abb. 4: Mechanismen astrozytärer Calcium-Wellen (aus [Haydon, 2001]). Erläuterung im Text.

Diese Calcium-Signale können nicht nur durch Neurotransmitter hervorgerufen werden, sondern können ihrerseits eine Ausschüttung von Transmittern, z. B. Glutamat, aus Astrozyten hervorrufen und stellen so eine wichtige Komponente der Neuron-Glia-Kommunikation dar [Parpura et al., 1994]. Basierend auf diesen Erkenntnissen interpretieren zahlreiche Autoren astrozytäre Calcium-Wellen als gliale Exzitabilität und postulieren neben den supportiven Funktionen der Astrozyten auch eine direkte Beteiligung an der Informationsverarbeitung [Araque et al., 1999; Bezzi und Volterra, 2001; Haydon, 2001; Fields und Stevens-Graham, 2002; Ransom et al., 2003; Hertz und Zielke, 2004; Zhang und Haydon, 2005].

7.4 Ausgangspunkt und Fragestellung

Wie oben dargestellt, spielen Neurotrophine (NGF, BDNF, NT3, NT-4/5) eine kritische Rolle bei der Entwicklung und Funktionserhaltung des Nervensystems. Neben den vielfältigen klassischen Neurotrophin-Wirkungen (Überleben, Differenzierung, Wachstum, synaptische Plastizität, etc.) konnte kürzlich eine neue, sehr schnelle Wirkung auf zentrale Neurone beschrieben werden, die Neurotrophinen erstmals transmitter-ähnliche funktionelle Eigenschaften zuweist. Dieser neu entdeckte Effekt wird, ebenso wie die klassischen Neurotrophinwirkungen, durch Bindung von Neurotrophinen an vollständige TrkB-Rezeptoren der Nervenzellen vermittelt. Neben den "vollständigen" Trk-Rezeptoren mit zytoplasmatischer Kinasedomäne gibt es "unvollständige", sogenannte trunkierte Trk-Rezeptoren, denen die intrazelluläre Kinasedomäne fehlt. Gliazellen exprimieren interessanterweise fast ausschließlich trunkierte Trk-Rezeptoren, deren Funktion jedoch weitgehend unbekannt ist. Es gibt allerdings Hinweise, dass Astrozyten auf BDNF-Applikation mit einem Anstieg der Calciumkonzentration reagieren.

In Anbetracht der neu entdeckten schnellen Wirkung von Neurotrophinen auf Nervenzellen war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, zu untersuchen, ob ähnliche schnelle Effekte auch an Gliazellen ausgelöst werden. Aufgrund der überragenden Bedeutung von Calciumtransienten für die intra- und interzelluläre Signaltransduktion von Gliazellen ist es von besonderem Interesse, eventuelle schnelle neurotrophin-induzierte Effekte anhand von Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration in Astrozyten detailliert zu untersuchen.

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich demnach folgende Fragestellungen:

- Sind Neurotrophine in der Lage, auf Gliazellen schnelle Effekte in Form von Calciumtransienten hervorzurufen?
- Werden diese Neurotrophin-Wirkungen auf Gliazellen über dieselben Mechanismen vermittelt, die in Neuronen beschrieben wurden?
- Welche Rezeptoren und Signaltransduktionsmechanismen sind an schnellen Neurotrophin-Wirkungen auf Gliazellen beteiligt?

8 Material und Methoden

Die Untersuchungen neurotrophin-induzierter Calciumtransienten wurden mittels konventionellem Fluorescence-Ratio-Imaging mit dem Farbstoff Fura-2-AM an kultivierten Astrozyten durchgeführt.

8.1 Fluoreszenz-Mikroskopie

8.1.1 Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM

Der calciumsensitive Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 wurde 1985 erstmals beschrieben und ist ein Derivat des Calcium-Chelators BAPTA, gekoppelt an eine fluorophore Stilbengruppe [Grynkiewicz et al., 1985]. Fura-2 ist heute ein sehr weit verbreiteter, intrazellulärer Calcium-Indikator, da Fura-2 sehr selektiv für Calcium ist und seine Calcium-Affinität ($K_d \sim 0,25 \times 10^{-6} \text{ M}$) für Messungen im physiologischen Bereich ($\sim 0,1 \times 10^{-6} \text{ M}$) gut geeignet ist.

Für die vorliegende Arbeit wurde der Acetoxymethylester Fura-2-AM verwendet, weil die vorübergehende Maskierung der Carboxylate als AM-Ester eine Diffusion durch die Zellmembran ermöglicht. Intrazellulär werden die AM-Ester durch Esterasen hydrolysiert, wodurch der nicht membranpermeable Polycarboxylat-Indikator entsteht (siehe Abb. 5) [Katerinopoulos und Foukaraki, 2002; Haugland, 2005].

Wird Fura-2 mit UV-Licht angeregt, emittiert es Licht mit einer Wellenlänge von ca. 510 nm, dessen Intensität von der intrazellulären Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ abhängt. Dieser Zusammenhang zwischen Emission und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verändert sich in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Anregungslichtes: Bei einer Wellenlänge von ca. 358 nm liegt der sogenannte isosbestische Punkt, an dem die Emissionsintensität von der Calciumkonzentration unabhängig ist. Ist die Anregungswellenlänge λ_{EX} kürzer als 358 nm, steigt die Emissionsintensität F mit der Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ an. Im Gegensatz dazu verringert sich F mit steigender $[\text{Ca}^{2+}]_i$, wenn $\lambda_{\text{EX}} > 358 \text{ nm}$ (siehe Abb. 6). Durch diese gegenläufige Änderung der Emissionsintensität eignet sich Fura-2 für Messungen mit der Methode des sog. Ratio-Imaging.

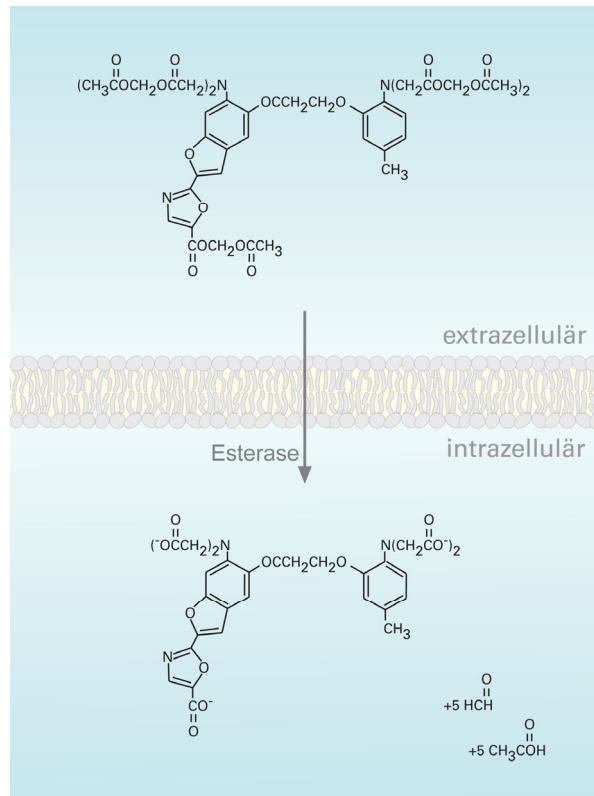


Abb. 5: Prinzip der AM-Ester-Beladung. Fura-2 liegt extrazellulär als unpolarer, membranpermeabler und Ca^{2+} -insensitiver Acetoxymethylester vor. Intrazellulär werden die AM-Ester durch ubiquitär vorhandene Esterasen hydrolysiert, wodurch der polare, nicht membranpermeable und Ca^{2+} -sensitive Polycarboxylat-Indikator entsteht (nach [Katerinopoulos und Foukaraki, 2002; Haugland, 2005]).

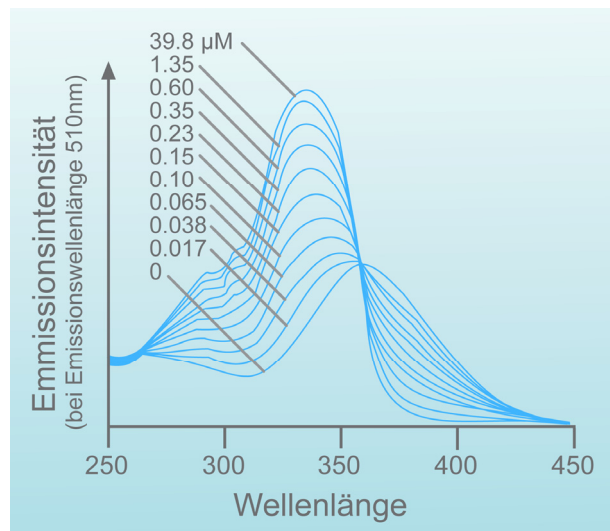


Abb. 6: Fluoreszenz-Exzitations-Spektren von Fura-2. Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenz-Emission von der Calciumkonzentration und der Anregungswellenlänge. Die einzelnen Kurven repräsentieren unterschiedliche Calciumkonzentrationen, auf der x-Achse ist die Anregungswellenlänge aufgetragen, auf der y-Achse die Emissionslichtintensität. Der Schnittpunkt aller Kurven bei ~ 358 nm ist der isosbestische Punkt (nach [Haugland, 2005]).

8.1.2 Fluorescence-Ratio-Imaging

Mit dem Begriff „Fluorescence-Ratio-Imaging“ (engl. *ratio* = Quotient, Verhältnis) wird eine Methode der Fluoreszenzmikroskopie bezeichnet, bei der Farbstoffe zum Einsatz kommen, deren Exzitations- oder Emissionsspektrum sich durch Bindung an Ionen verschiebt, wie es z. B. bei Fura-2 der Fall ist. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, indem unmittelbar hintereinander zwei Fluoreszenzaufnahmen mit unterschiedlicher Exzitations- oder Emissionswellenlänge erstellt werden. Nach Subtraktion der Hintergrundlichtintensitäten wird der Quotient beider Emissionsintensitäten errechnet (Abb. 7). Der Vorteil dieser Methode lässt sich mit folgenden Gleichungen beschreiben:

Die Emissionsintensität F ist das Produkt der Photonenkollektoreffizienz Φ , der Quanten-Effizienz des Detektors Q_D , der Quantenausbeute des Farbstoffs Q_F , der Exzitationsintensität $I_0 \cdot \ln 10$, des Extinktionskoeffizienten ε , des Lichtwegs l und der Farbstoffkonzentration c :

$$(1) \quad F = \Phi \cdot Q_D \cdot Q_F \cdot I_0 \cdot \ln 10 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Alle Faktoren, die auf Eigenschaften des Messstandes oder des Farbstoffs beruhen, können zu einem Proportionalitätskoeffizienten S zusammengefasst werden:

$$(2) \quad F = S \cdot c$$

Da der Farbstoff in freier und gebundener Form vorliegen kann, ergeben sich zwei unterschiedliche Proportionalitätskoeffizienten S_f und S_b . Die Messung wird bei zwei verschiedenen Wellenlängen λ_1 und λ_2 durchgeführt, so dass man die Proportionalitätskoeffizienten noch einmal in S_{f1} und S_{f2} bzw. S_{b1} und S_{b2} unterscheiden muss. Es ergeben sich folgende Gleichungen:

$$(3a) \quad F_1 = S_{f1} \cdot c_f + S_{b1} \cdot c_b$$

$$(3b) \quad F_2 = S_{f2} \cdot c_f + S_{b2} \cdot c_b$$

c_f und c_b sind die Konzentrationen von freiem und gebundenem Farbstoff. Unter der Annahme einer 1:1-Komplexbildung von Calcium und Indikatorfarbstoff lässt sich der Zusammenhang zwischen der Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]$ und den Konzentrationen von freiem (c_f) und gebundenem (c_b) Farbstoff in Abhängigkeit der Dissoziationskonstante K_d darstellen:

$$(4) \quad K_d = \frac{c_f \cdot [Ca^{2+}]}{c_b}$$

Daher ergibt sich für die Ratio $R = F_1/F_2$

$$(5) \quad R = \frac{S_{f1} + \frac{S_{b1} \cdot [Ca^{2+}]}{K_d}}{S_{f2} + \frac{S_{b2} \cdot [Ca^{2+}]}{K_d}}$$

und für die Calciumkonzentration

$$(6) \quad [Ca^{2+}] = K_d \cdot \frac{R - \frac{S_{f1}}{S_{f2}}}{\frac{S_{b1}}{S_{b2}} - R} \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

Da S_{f1}/S_{f2} nichts anderes ist als die minimal mögliche Ratio bei völliger Calciumfreiheit und S_{b1}/S_{b2} der maximalen Ratio bei Calciumsättigung entspricht, ergibt sich

$$(7) \quad [Ca^{2+}] = K_d \cdot \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

Die Gleichung (7) ist die Standard-Gleichung für ratio-metrische Messungen [Grynkiewicz et al., 1985; Helmchen, 2000].

Der Vorteil dieser Methode liegt also darin, dass aus den Fluoreszenzintensitäten F_1 und F_2 die Calciumkonzentration ermittelt werden kann, unabhängig von Parametern wie Farbstoffkonzentration oder optischer Weglänge, die in der Praxis häufig schwer zu ermitteln sind und zwischen zwei Messungen schwanken können. Bei ratiometrischen Messungen spielen solche Änderungen des Farbstoffgehalts, des Lichtwegs oder der instrumentellen Sensitivität keine Rolle, da sie sich rechnerisch eliminieren lassen.

Für die vorliegende Arbeit wurde anhand einer *in-vitro*-Kalibrierung ermittelt, dass die in Kap. 9 dargestellten Ratio-Verläufe einem Anstieg der Calciumkonzentration von Baseline-Werten zwischen 50 und 100 nM auf Maximalwerte zwischen 400 und 800 nM entsprechen.

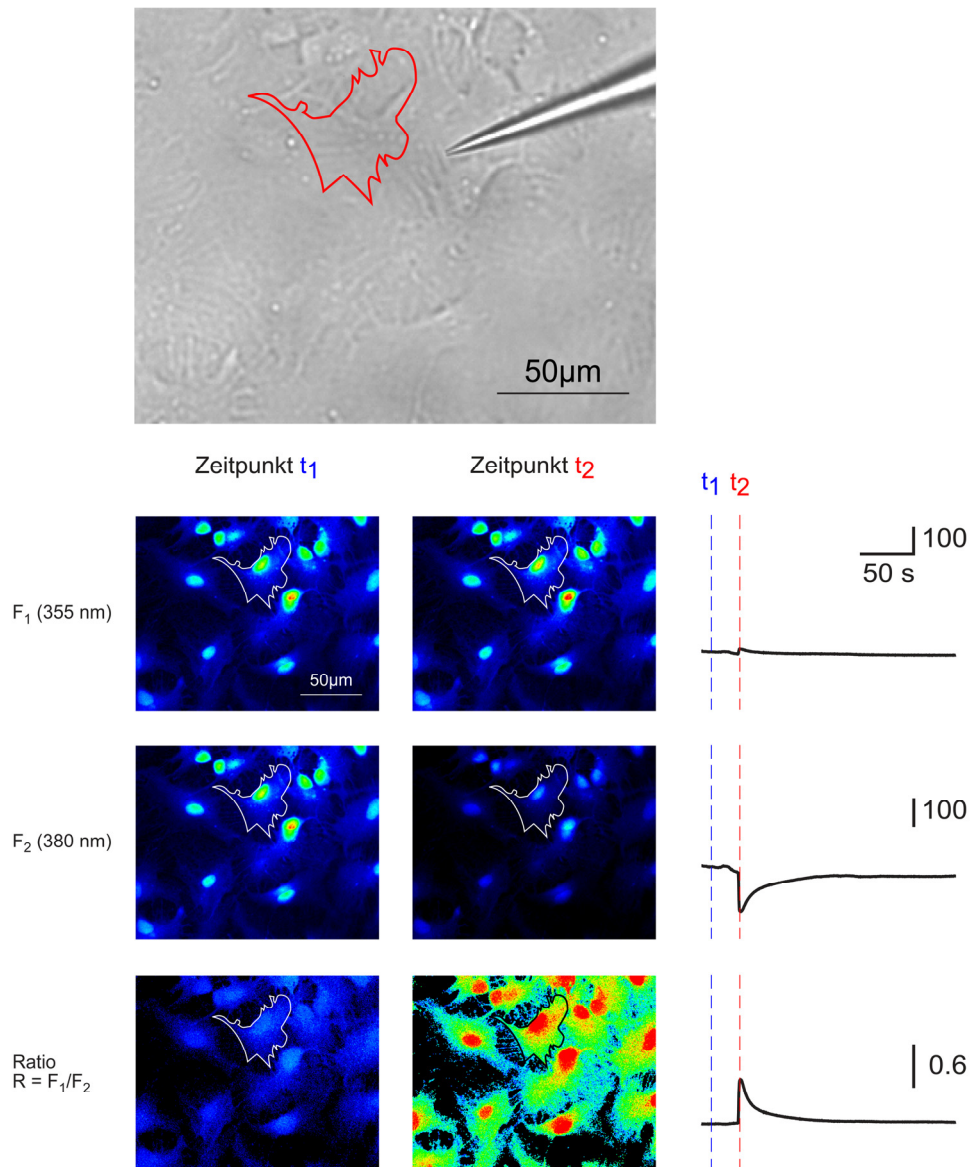


Abb. 7: Prinzip des Fluorescence-Ratio-Imaging. Die Durchlichtaufnahme zeigt die Position der Applikationspipette und der zu messenden Zelle („region of interest“, ROI). Für die vorliegende Arbeit wurden die Fluoreszenzmessungen mit den Anregungswellenlängen 355 nm und 380 nm durchgeführt. Auf den Fluoreszenzaufnahmen der Anregungswellenlänge 355 nm ist deutlich zu erkennen, dass sich die Emissionsintensität zwischen dem Ruhezustand (Zeitpunkt t1) und dem Calciumtransienten (Zeitpunkt t2) kaum verändert, da die Exzitationswellenlänge sehr nahe am isosbestischen Punkt (~358 nm) liegt. Bei Anregung mit 380 nm ist eine deutliche Abnahme der Emission im Zeitpunkt t2 zu erkennen. Das Ratio-Bild wird erstellt, indem der Wert der Lichtintensität jedes einzelnen Pixels der 355 nm-Aufnahme durch den Intensitätswert des entsprechenden Pixels der 380 nm-Aufnahme dividiert wird ($R = F_1/F_2$). Die Werte werden farbcodiert dargestellt. Daneben ist jeweils der Mittelwert der Lichtintensitäten aller Pixel innerhalb des markierten Bereichs (ROI) im Zeitverlauf dargestellt. Für die Ratio ist der rechnerisch ermittelte Quotient ebenfalls als Mittelwert der ROI im Zeitverlauf dargestellt. Dieser Graph entspricht dem Verlauf der Calciumkonzentration in der markierten Zelle.

8.2 Vorbereitung des zu untersuchenden Gewebes

8.2.1 Zellkultur

Primäre Astrozytenkulturen wurden nach vorbeschriebenen [Rose und Ransom, 1996, 1997] Standardprozeduren angefertigt: Der Hippokampus neugeborener (postnataler Tag 0-2) Sprague-Dawley-Ratten (eigene Zucht) wurde in eisgekühlter „Dulbecco's Phosphate Buffered Saline“ (D-PBS; Gibco, Kat.-Nr. 14200-059) präpariert und in Papain-Lösung, bestehend aus Papain 150 U/ml (Roche, 108014), 10 ml D-PBS, 150 µl CaCl₂ (100 mM) und 100 µl EDTA (50 mM), für 60 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 700 rpm) und Absaugen der Papain-Lösung wurde das Gewebe für weitere 15 min im Brutschrank in einer Trypsin-Inhibitor-Lösung inkubiert, die aus 15 mg Trypsin-Inhibitor (Sigma, T9253), 15 mg Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma, A4503) sowie 10 ml Kulturmedium bestand. Dieses Kulturmedium setzte sich zusammen aus 174 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM/F12, Gibco, 21331-020), 20 ml Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, 10106-169), 4 ml Glucose 1 M (Merck, 104074), 1 ml G5-Supplement (Gibco, 17503-012). Nach Auswaschen des Trypsin-Inhibitors wurde das Gewebe mit Pasteur-Pipetten absteigenden Spitzendurchmessers vorsichtig trituiert. Die resultierende Zellsuspension wurde auf 60000 Zellen/ml verdünnt, anschließend wurden jeweils 60 µl auf PDL-beschichtete (s. u.) Deckgläser (Menzel, Ø 12 mm, bezogen über VWR, MenzCB00120RA120) pipettiert. Nach einer Absetzphase von einer Stunde im Brutschrank wurden die Deckgläschen mit Kulturmedium geflutet. Das Kulturmedium wurde nach jeweils vier Tagen erneuert.

Die Beschichtung der Deckgläser wurde wie folgt durchgeführt: Nach mehrstündigem Waschen in Ethanol 70 % und anschließendem Auswaschen wurden die Deckgläser mit 50 µl einer 0,04-prozentigen PDL-Lösung (5 mg Poly-D-Lysin (Sigma, P7280) in 12,495 ml sterilem Wasser) für zwei Stunden beschichtet, anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Deckgläser erneut gewaschen.

Die beschriebene Vorgehensweise führt zu Primärkulturen, die nach ca. sieben bis neun Tagen eine konfluente Zellschicht bilden (Abb. 8), welche zu über 95% aus Astrozyten besteht. Für die Experimente wurden Zellkulturen zwischen

dem neunten und dem fünfzehnten Tag nach Präparation (days *in vitro*, DIV 9-15) eingesetzt.

Für einige Experimente wurden Astrozyten-Kulturen von TrkB^{FL}-Knockout-Mäusen angefertigt. Diese Tiere wurden freundlicherweise von Dr. Michael Meyer, Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried, zur Verfügung gestellt.

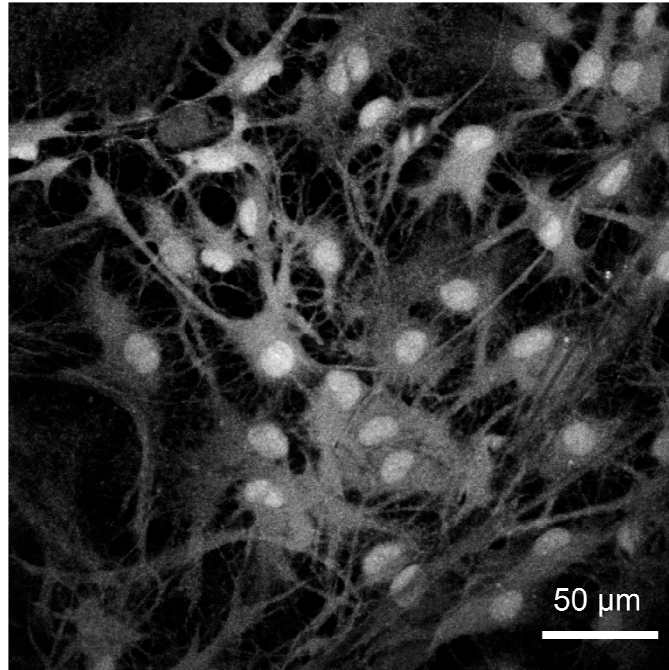


Abb. 8: Astrozytenkultur. Die Abbildung zeigt kultivierte Astrozyten (days *in vitro*: 14), wie sie für die Experimente benutzt wurden. Diese Aufnahme wurde mit einem Zwei-Photonen-Laser-Scanning-System der Firma Biorad und einem Olympus-40x-Objektiv erstellt.

8.2.2 Experimente an akuten Gehirnschnitten

Einige Experimente wurden an akuten Gehirnschnitten durchgeführt (Kapitel 9.2 und 9.6), die nach der Standardmethode [Edwards et al., 1989] präpariert wurden. Sprague-Dawley-Ratten im Alter von acht bis zehn Tagen wurden dekapitiert, das herauspräparierte Gehirngewebe wurde sofort in eisgekühlte Normalringer-Lösung (Zusammensetzung siehe unten) überführt, anschließend wurden mit dem vibrierenden Gewebeschnittgerät „DSK Microslicer DTK-1000“ (Diversified Equipment Company, Inc., Lorton, VA) Hippocampus-Schnitte mit einer Dicke von 300 μm angefertigt. Nach 30 min in 34 °C warmer

NR-Lösung konnten die Schnitte in 25 °C warmer NR-Lösung für bis zu sechs Stunden zur Verwendung bereitgehalten werden. Während der Versuchsdurchführung wurden die Hippokampusschnitte durch ein Gitter aus Platindraht und dünnen Nylonfäden auf dem Boden der Messkammer fixiert.

8.3 Versuchsanordnung und –durchführung

8.3.1 Lösungen

Die eingesetzten Badlösungen, Neurotrophin-Lösungen und die Lösung zur Färbung der Zellen werden im Folgenden erläutert.

8.3.1.1 Badlösungen

Während der Experimente wurden Astrozytenkulturen und Hippokampusschnitte mit Hilfe einer Peristaltik-Pumpe „Ismatec IPC“ (Ismatec SA, Glattbrugg, Schweiz) mit verschiedenen Badlösungen perfundiert.

Die Versuche an kultivierten Astrozyten wurden in zwei verschiedenen, Hepes-gepufferten Badlösungen durchgeführt, von denen im Folgenden die calciumhaltige Lösung als Control-Hepes-Ringer (CHR) und die calciumfreie Lösung als Null-Ca²⁺-CHR bezeichnet wird. Die Versuche an akuten Hirnschnitten wurden in einer Badlösung durchgeführt, die als Normal-Ringer (NR) bezeichnet wird. Die Zusammensetzung dieser Badlösungen geht aus der folgenden Tabelle hervor:

	CHR	Null-Ca ²⁺ -CHR	NR
NaCl (Merck, 106404)	0,125 M	0,125 M	0,125 M
KCl (Merck, 104936)	0,003 M	0,003 M	0,0025 M
MgSO₄ (Merck, 105886)	0,002 M	0,002 M	
CaCl₂ (Merck, 102382)	0,002 M		0,002 M
EGTA (Sigma, E4378)		0,0001 M	
NaH₂PO₄ (Sigma, S9638)	0,00125 M	0,00125 M	0,00125 M
C₆H₁₂O₆ (Merck, 104074)	0,01 M	0,01 M	0,02 M
Hepes (Sigma, H3375)	0,025 M	0,025 M	
NaHCO₃ (Merck, 106329)			0,026 M
MgCl₂ (Merck, 105833)			0,001 M

CHR und Null-Ca²⁺-CHR wurden mit NaOH (Merck, 109136) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, NR wurde durch Begasung mit 95% O₂ und 5% CO₂ ebenfalls auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

8.3.1.2 Ansetzen der Neurotrophin-Lösungen

Um eine Adhäsion der Neurotrophine an die Wand von Eppendorf-Gefäßen, Filtern oder Pipettenspitzen zu verhindern, wurden alle Plastik- und Glas-Materialien, die mit Neurotrophinen in Berührung kamen, vorher mit einer BSA-Lösung geblockt, die aus Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma, A4503) 0,5% in D-PBS (Gibco, 14200-059) bestand. Die Neurotrophine wurden in 0,1% BSA in D-PBS gelöst: NGF (Gibco, 13257-019) mit einer Konzentration von 100 µg/ml, BDNF (Sigma, B3795) mit 10 µg/ml, NT-4/5 (Sigma, N1780) mit 20 µg/ml, NT-3 (Sigma, N1905) mit 10 µg/ml. Diese Stock-Lösungen wurden aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Für die Experimente wurden die Neurotrophine durch Verdünnung mit CHR (bzw. bei Bedarf mit Null-Ca²⁺-CHR oder NR) auf Endkonzentrationen von 20 - 150 ng/ml eingestellt.

8.3.1.3 Färbung der Zellen

Die Astrozyten wurden nach folgendem Protokoll passiv mit Fura-2-AM beladen: Es wurde Pluronic F-127 (Molecular Probes, P6867) 20% in DMSO (Sigma, D8779) gelöst (0,2 g Pluronic F-127 in 1 ml DMSO). Anschließend wurde eine 5 mM Stock-Lösung von Fura-2-AM (Molecular Probes, F1201) in Pluronic/DMSO hergestellt (1 mg Fura-2-AM in 200 µl Plur./DMSO). Diese Stock-Lösung wurde als Aliquots à 20 µl bei -20 °C eingefroren. Zur Färbung der Zellkulturen wurden 2 - 6 µl der 5 mM Stock-Lösung in 1 ml CHR (bzw. bei Bedarf in Null-Ca²⁺-CHR oder NR) gelöst und so eine Endkonzentration von 10 – 30 µM eingestellt. Kultivierte Astrozyten wurden in dieser Färbelösung für eine Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur gefärbt. Gehirnschnitte wurden für 10 min bei 37 °C im begasten Brutschrank gefärbt.

8.3.1.4 Pharmaka

Es kamen verschiedene Pharmaka zum Einsatz, die in den entsprechenden Kapiteln des Ergebnisteils beschrieben werden. Hier werden nur

die Bezugsquellen aufgeführt: Adenosintriphosphat (Sigma, A9187), Cyclopiazonic Acid (Calbiochem, 239805), K-252a (Calbiochem, 420298), PPADS (Calbiochem, 529620), Saxitoxin (Sigma, S1417), Thapsigargin (Sigma, T9033). 2-Aminoethoxydiphenylborat wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Katsuhiko Mikoshiba, University of Tokyo, Japan, zur Verfügung gestellt.

8.3.2 Datenerfassung und –auswertung

Die Versuche wurden bei Raumtemperatur (22 – 24 °C) durchgeführt an einem aufrechten Lichtmikroskop „Zeiss Axioskop“ (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen) mit 40x-Objektiv, das auf einem schwingungsfreien Tisch (Microplan Schwingungstechnik, Saarbrücken) befestigt war. An das Mikroskop war ein digitales Imaging-System (TILL Photonics GmbH, Gräfelfing) gekoppelt, bestehend aus CCD-Kamera, Monochromator, Lichtleiter, Steuereinheiten für Kamera und Monochromator, Personal-Computer (DELL Inc., Round Rock, TX) mit Windows-Betriebssystem (Microsoft Corp., Seattle, WA) sowie der Steuerungssoftware „TILLvision“.

Aus dieser Software heraus konnte auch die Applikation der Neurotrophine gesteuert werden, indem zu einem vordefinierten Zeitpunkt ein analoges Signal an einen „Picospritzer II“ (General Valve Corp., Fairfield, NJ) übertragen wurde. Dadurch wurde für einen definierten Zeitraum (20 - 150 ms) Druck auf die neurotrophin-gefüllten Mikropipetten übertragen, welche mit dem Pipettenziehgerät „Narishige PC-10 Micropipette Puller“ (Narishige Co., Ltd., Tokio) aus Borosilikatglaskapillaren (Hilgenberg, Malsfeld) angefertigt worden waren.

Für die Experimente wurde eine Bildaufnahmefrequenz von 3 Hz gewählt, weil dadurch sowohl eine ausreichend exakte Messung als auch eine für die PC-Hardware ausreichend schnell verarbeitbare Datenmenge (ca. 750 Megabyte Rohdaten pro Versuch) gewährleistet war.

Mit „TILLvision“ wurden einzelne Zellen als „Regions of interest“ (ROI) definiert und nach Subtraktion der Hintergrundlichtintensitäten die durchschnittlichen Emissionsintensitäten und Ratios der ROIs gemessen bzw. berechnet. Diese Werte wurden anschließend als Datentabellen exportiert. Die in

der vorliegenden Arbeit dargestellten Graphen wurden mit der Software „Origin“ (OriginLab Corporation, Northampton, MA) aus diesen Datentabellen erstellt, Histogramme wurden mit „Excel“ (Microsoft Corp., Seattle, WA) erstellt. Die so gewonnenen Roh-Grafiken wurden mit „Freehand“ (Macromedia, San Francisco, CA) in eine präsentabile Form gebracht.

In den jeweiligen Kapiteln wird die Anzahl (n) der Versuche angegeben, wobei pro Versuch zwischen 10 und 30 einzelne Zellen erfasst wurden.

9 Ergebnisse

9.1 BDNF-induzierte Calciumtransienten in kultivierten Astrozyten

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage bearbeitet, ob Neurotrophine in der Lage sind, schnelle Effekte in Gliazellen hervorzurufen. Dazu wurde Mikropipetten mit Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Konzentrationen zwischen 5 und 50 ng/ml ($\sim 0,18 - 1,8$ nM) gefüllt. Mit Hilfe eines Picospritzers wurde für 20 - 150 ms Druck auf die Mikropipette übertragen und BDNF auf primäre Astrozytenkulturen appliziert, die zuvor mit dem calciumsensitiven Farbstoff Fura-2-AM beladen worden waren. Applikation von BDNF ruft Calciumtransienten in kultivierten Astrozyten hervor ($n = 33$). Die Calciumkonzentration steigt nach lokaler Applikation von BDNF innerhalb von ca. drei Sekunden auf ihren Maximalwert an (Abb. 10). Nach dem Erreichen der Maximalkonzentration verläuft der Rückgang der Calciumkonzentration auf das Ausgangsniveau in zwei Phasen. Ausgehend von dem Ort der BDNF-Applikation breitet sich die Erhöhung der Calciumkonzentration als Calciumwelle im Astrozytensynzytium über Distanzen von mehr als 150 μm aus (Abb. 9).

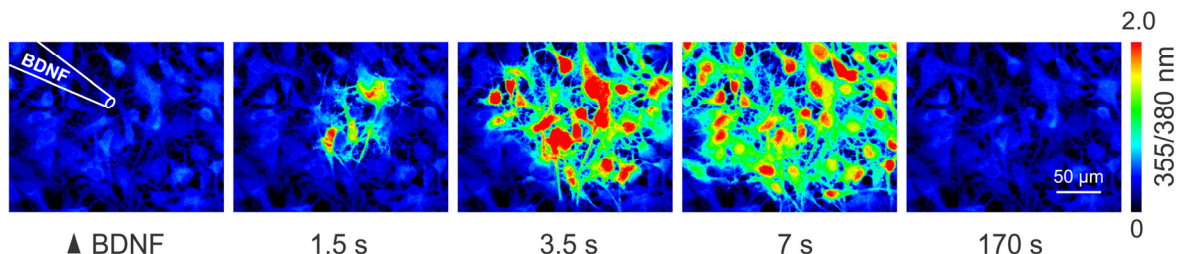


Abb. 9: Ausbreitung einer BDNF-induzierten Calciumwelle in kultivierten Astrozyten. Auf dem linken Bild ist die Position der BDNF-gefüllten Mikropipette schematisch angegeben, auf dem rechten Bild ist die Größenordnung durch den 50 μm -Balken dargestellt. Das Pfeil-Symbol mit der Beschriftung „BDNF“ symbolisiert den Zeitpunkt der BDNF-Applikation, das linke Bild wurde zeitgleich mit der BDNF-Applikation aufgenommen. Die weiteren Bilder wurden jeweils 1,5 Sekunden, 3,5 Sekunden, 7 Sekunden und 170 Sekunden nach der BDNF-Applikation aufgenommen. Der Quotient der Lichtemissionen F_{355} und F_{380} bei den Anregungswellenlängen 355nm und 380nm, die sogenannte Ratio ($R = F_{355}/F_{380}$), ist für jeden Pixel entsprechend dem Skalierungsbalken farbcodiert dargestellt: Die Farbe blau repräsentiert niedrige Calciumkonzentrationen, rot dargestellt sind Bereiche mit hoher Calciumkonzentration.

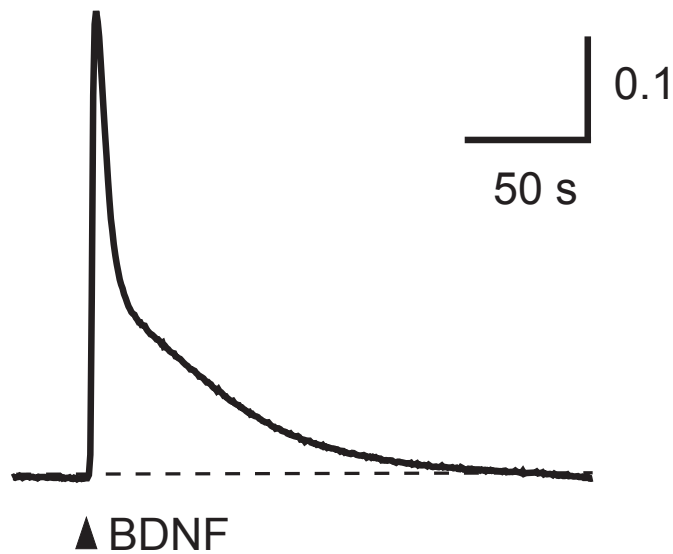


Abb. 10: Calciumtransient in einem einzelnen, kultivierten Astrozyt. Dargestellt ist der Zeitverlauf der intrazellulären Calciumkonzentration eines einzelnen, kultivierten Astrozyten in Folge von BDNF-Applikation (20 ng/ml BDNF, 50 ms). Der Pfeilkopf symbolisiert den Zeitpunkt der BDNF-Applikation. Entsprechend den dargestellten Skalierungsbalken ist auf der x-Achse die Zeit aufgetragen, auf der y-Achse ist der Quotient der Fluoreszenzemissionsintensitäten bei den Anregungswellenlängen 355 nm und 380 nm (Ratio). Der dargestellte Zeitverlauf der Ratio $R = F_{355}/F_{380}$ entspricht dem Verlauf der Calciumkonzentration (siehe Kap. 8.1.2).

Bei repetitiver BDNF-Applikation im Abstand von 10 Minuten lassen sich diese Calciumtransienten über längere Zeiträume wiederholt auslösen ($n = 4$, Abb. 11). Dabei verringert sich die Amplitude der Calciumtransienten zwischen der ersten und der vierten Applikation um ca. 30 % (Abb. 12). Dieses Ergebnis hat besondere Bedeutung für die Beurteilung der in den folgenden Kapiteln dargestellten Abbildungen: Viele Grafiken setzen sich aus drei Kurven zusammen, die jeweils eine BDNF-Applikation als Kontrolle, eine Applikation nach Einspülen eines Pharmakons und eine Applikation nach Auswaschen des Pharmakons repräsentieren. Die Unterschiede in der Maximal-Amplitude zwischen Kontrolle und Wash, die in vielen Abbildungen zu erkennen sind, entsprechen nicht einer unvollständigen Wiederherstellung des Signals. Sie sind vielmehr darauf zurückzuführen, dass die Amplitude bei wiederholter Applikation auch ohne pharmakologischen Einfluß zurückgeht. Dieser Rückgang der Maximal-Amplitude

ist nicht BDNF-spezifisch, sondern tritt auch bei repetitiver Applikation anderer Agonisten glialer Calciumtransienten (z. B. ATP, vgl. Abb. 21) auf.

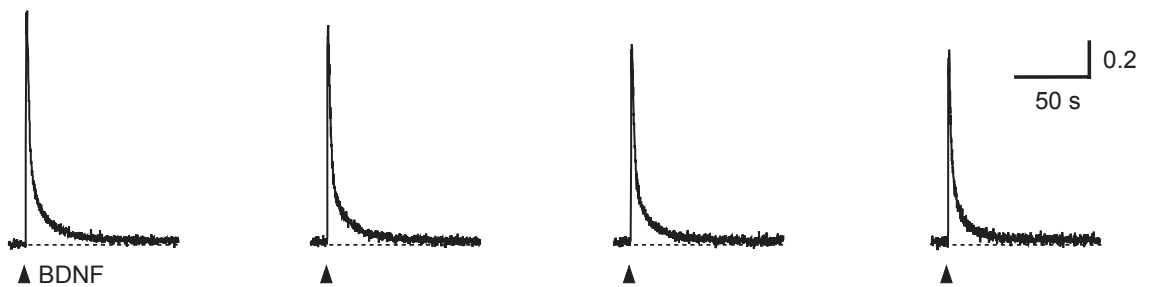


Abb. 11: Repetitive Applikation von BDNF. Dargestellt sind die Zeitverläufe von vier aufeinanderfolgenden Calciumtransienten in einem einzelnen, kultivierten Astrozyt, hervorgerufen durch wiederholte Applikation von BDNF (20 ng/ml, 25 ms) im Abstand von 10 Minuten. Die Pfeilköpfe repräsentieren jeweils den Zeitpunkt der BDNF-Applikationen. x-Achse: Zeit; y-Achse: Ratio.

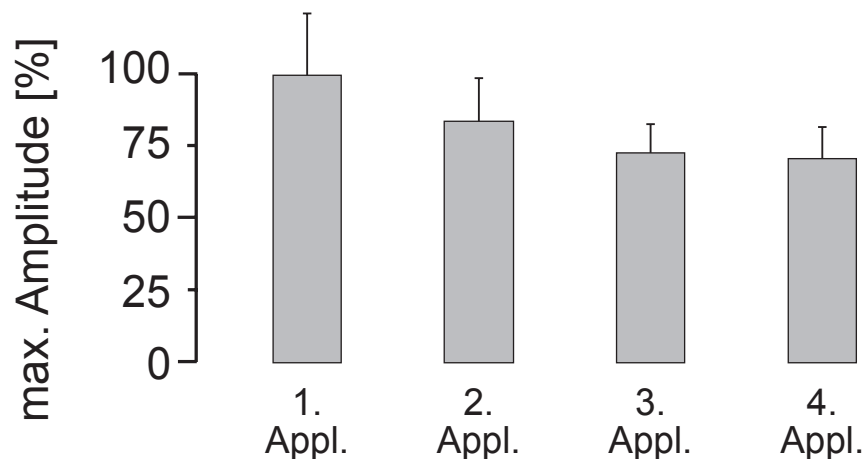


Abb. 12: Abnahme der Maximal-Amplitude bei repetitiver BDNF-Applikation. Zwischen 1. und 4. Applikation verringert sich die Amplitude um ca. 30 %. Dargestellt sind die Mittelwerte der maximalen Amplitude der BDNF-induzierten Calciumtransienten bei wiederholter Applikation im Abstand von 10 min in % des Mittelwertes der Maximal-Amplitude der ersten Applikation. Der Fehlerindikator repräsentiert den Standardfehler des Mittelwerts (engl. „standard error of mean“, s.e.m.).

9.2 Vergleich BDNF-induzierter Calciumtransienten in Gliazellen und Neuronen

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um zu klären, ob die neu gefundenen, schnellen Neurotrophin-Wirkungen auf Gliazellen über dieselben Mechanismen vermittelt werden, die in Neuronen beschrieben wurden. BDNF-induzierte Calciumtransienten in Neuronen kommen durch einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum durch spannungsabhängige Calciumkanäle (voltage-gated calcium channels, VGCC) zustande, die sich als Folge der Depolarisation des Neurons öffnen. Die Depolarisation wird durch einen Natriumeinstrom verursacht, der durch die TrkB-Full-Length-abhängige Öffnung des saxitoxinsensitiven Natriumkanals $Na_v1.9$ bedingt ist [Kafitz et al., 1999; Blum et al., 2002].

Um den Einfluß von Saxitoxin auf Calciumtransienten in Astrozyten zu untersuchen, wurde zunächst der Versuch unternommen, die beschriebenen STX-Wirkungen auf hippocampale Neurone zu reproduzieren: BDNF-induzierte Calciumtransienten in Neuronen lassen sich durch den hochaffinen Natriumkanalblocker Saxitoxin unterdrücken (n = 4, Abb. 13).

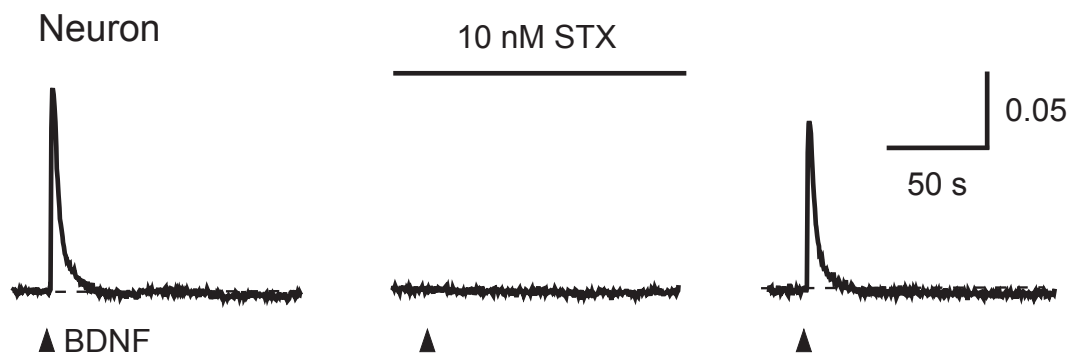


Abb. 13: Hemmende Wirkung von Saxitoxin auf Neuron. Der BDNF-induzierte Calciumtransient wird durch die Zugabe von STX (10 nM) blockiert (Pyramidenzelle der CA1-Region, Hippokampuschnitt, BDNF 50 ng/ml, 100 ms). Die graphische Darstellung entspricht der zeitlichen Abfolge des Experiments: die erste BDNF-Applikation erfolgt in Badlösung als Kontrolle (links), die zweite BDNF-Applikation erfolgt in Badlösung + Saxitoxin 10 nM (mittlerer Graph), die dritte BDNF-Applikation erfolgt wieder in Badlösung nach Auswaschen von Saxitoxin (rechter Graph). Die Pfeilköpfe repräsentieren jeweils den Zeitpunkt der BDNF-Applikationen. x-Achse: Zeit; y-Achse: Ratio.

Anschließend wurde der Einfluß von Saxitoxin-haltiger Badlösung auf kultivierte Astrozyten untersucht. Die durchgeführten Experimente zeigen, dass sich BDNF-induzierte Calciumtransienten in Gliazellen nicht durch das Einspülen von 10 nM Saxitoxin blockieren lassen (n = 4, Abb. 14). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Calciumtransienten in Astrozyten nicht durch Calciumeinstrom via VGCC in Folge einer TrkB-vermittelten Erhöhung der Natriumleitfähigkeit zustande kommen, wie es in Neuronen der Fall ist, sondern über völlig andere Mechanismen vermittelt werden.

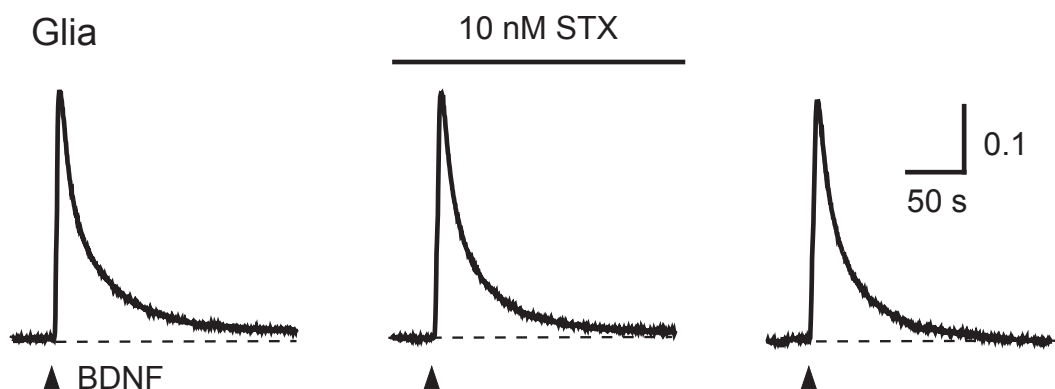


Abb. 14: Saxitoxin-Effekt auf Gliazelle. Der BDNF-induzierte Calciumtransient wird durch die Zugabe von 10 nM STX nicht blockiert (Astrozytenkultur, BDNF 20 ng/ml, 100 ms). Die graphische Darstellung entspricht der Darstellung in Abb. 13.

Bei dem Vergleich der Kinetik der BDNF-Effekte in Neuronen und Astrozyten zeigt sich ebenfalls ein auffälliger Unterschied (Abb. 15). Während Neurone bereits innerhalb von 10 ms auf BDNF reagieren [Kafitz et al., 1999; Blum et al., 2002], tritt der Anstieg der Calciumkonzentration in Astrozyten mit einer Verzögerung von mehr als einer Sekunde auf. Dieser unterschiedliche Zeitverlauf ist ein weiterer Hinweis auf fundamentale Unterschiede in der Generierung der Calciumkonzentrationserhöhung.

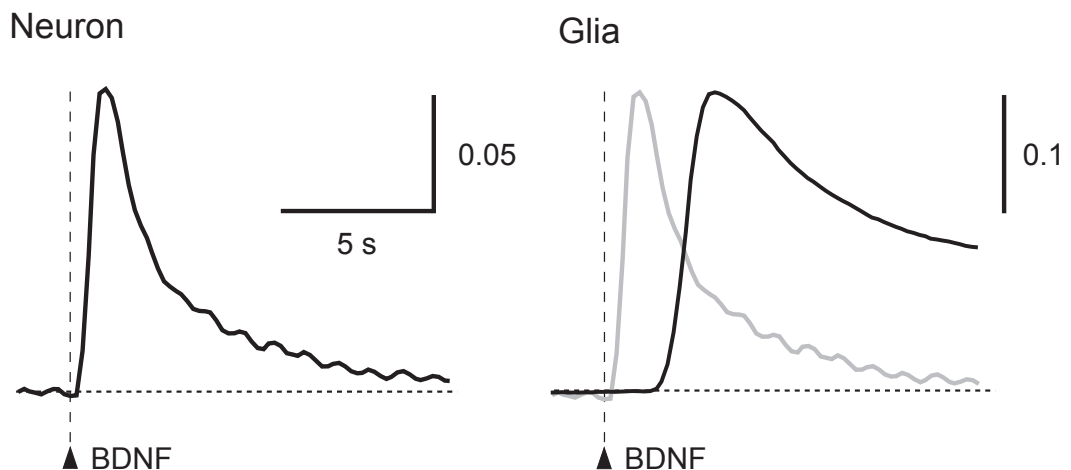


Abb. 15: Unterschiedliche Anstiegskinetik von neuronalen und glialen Calciumtransienten Die Abbildung zeigt links einen neuronalen Calciumtransienten (BDNF 50 ng/ml, 100 ms, Pyramidenzellen der CA1-Region, Hippokampuschnitt), rechts einen glialen Calciumtransienten (BDNF 20 ng/ml, 100 ms, Astrozytenkultur). Zum Vergleich des Zeitverlaufs wurde der neuronale Calciumtransient in grauer Farbe daruntergelegt. Die Pfeilköpfe repräsentieren jeweils den Zeitpunkt der BDNF-Applikationen. x-Achse: Zeit; y-Achse: Ratio.

9.3 Der Einfluss intrazellulärer Calciumspeicher

Neuronale Calciumantworten auf BDNF-Applikation entstehen durch einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum [Kafitz et al., 1999; Blum et al., 2002]. Um herauszufinden, ob auch in Astrozyten ein Calciumeinstrom die Erhöhung der Calciumkonzentration verursacht, wurde eine calciumfreie Badlösung eingesetzt (Zusammensetzung siehe Kap. 8.3.1.1). Auch in calciumfreier Badlösung lassen sich BDNF-induzierte Calciumtransienten in Astrozyten zuverlässig auslösen ($n = 7$, Abb. 16). Die Calciumantwort ist demnach nicht abhängig von extrazellulärem Calcium, sie kommt nicht durch einen Calciumeinstrom zustande. Dieses Ergebnis legt nahe, dass der Anstieg der Calciumkonzentration durch eine Calciumausschüttung aus intrazellulären Speichern zustande kommt.

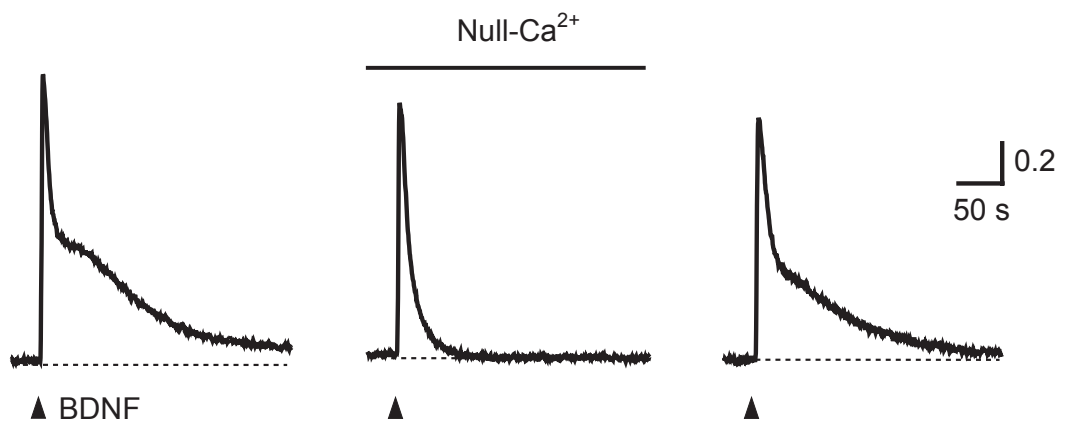


Abb. 16: BDNF-induzierter Calciumtransient in calciumfreier Badlösung. Die Auslösbarkeit von BDNF-induzierten Calciumtransienten ist nicht von extrazellulärem Calcium abhängig (BDNF 5 ng/ml, 50 ms). Man beachte den monophasischen Rückgang auf das Ausgangsniveau in Null-Ca²⁺ im Gegensatz zu dem biphasischen Rückgang in der Kontrolle. Die Abnahme der Amplitude ist nicht auf das Einspülen von calciumfreier Badlösung zurückzuführen, sondern auf die in Abb. 12 dargestellte Abnahme der Amplitude bei repetitiver Applikation. Links: Kontrolle, Mitte: Applikation in Null-Ca²⁺, rechts: nach Auswaschen. Die Pfeilköpfe repräsentieren jeweils den Zeitpunkt der BDNF-Applikationen. x-Achse: Zeit; y-Achse: Ratio.

Der Rückgang der Calciumkonzentration auf das Ausgangsniveau zeigt in calciumfreier Badlösung einen monophasischen Verlauf. In calciumhaltiger Badlösung ist dagegen ein biphasischer Verlauf mit einer zweiten, langsamen Komponente zu beobachten. Diese zweite Komponente ist demnach von extrazellulärem Calcium abhängig, kommt also offenbar durch einen Einstrom von Calcium aus dem Extrazellularraum zustande.

Um die Calciumausschüttung aus intrazellulären Speichern näher zu untersuchen, kamen die Pharmaka Thapsigargin [Thastrup et al., 1990] und Cyclopiazonic Acid (CPA) [Seidler et al., 1989] zum Einsatz. Beide Substanzen hemmen die Calcium-ATPase des endoplasmatischen Retikulums (sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase, SERCA), wobei Thapsigargin eine irreversible, CPA eine reversible Inhibition verursacht. Durch sogenannte Leckströme aus dem endoplasmatischen Retikulum werden bei blockierter SERCA die intrazellulären Calciumspeicher entleert. Das Einspülen von 10 nM Thapsigargin führt zunächst zu einem Anstieg der Calciumkonzentration, die dann

auf erhöhtem Niveau langfristig konstant bleibt. Dieses Phänomen ist auf einen kapazitiven Einstrom als Folge der Entleerung der Calciumspeicher zurückzuführen [Thastrup et al., 1990]. Anschließend lassen sich durch BDNF keine Calciumtransienten mehr erzeugen (n = 5).

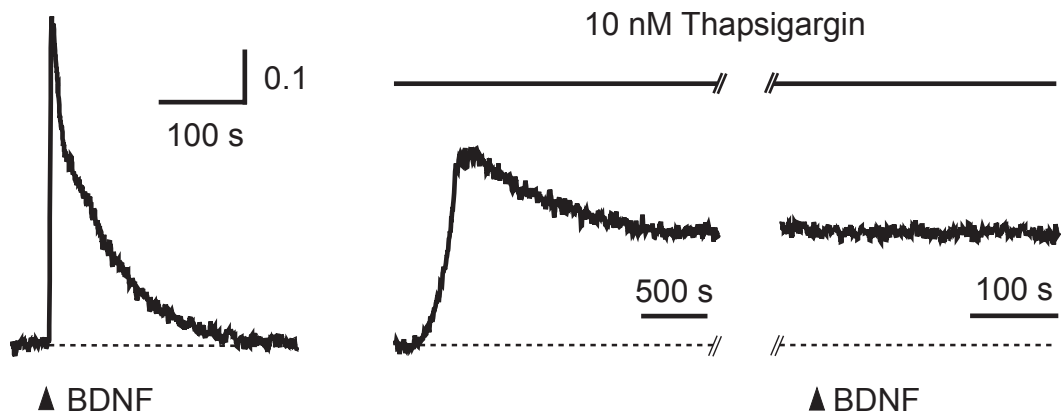


Abb. 17: Hemmende Wirkung von Thapsigargin. Links: Kontrolle. Mitte: Einspülen von Thapsigargin (10 nM) führt zu einem Anstieg der Ruhe-Calciumkonzentration. Rechts: In Thapsigargin (10 nM) lassen sich keine BDNF-induzierten Calciumtransienten auslösen (BDNF 10 ng/ml, 150 ms). Die Pfeilköpfe repräsentieren jeweils den Zeitpunkt der BDNF-Applikationen. x-Achse: Zeit; y-Achse: Ratio.

Auch in 10 μ M CPA lassen sich keine Calciumtransienten durch BDNF auslösen, der Effekt ist jedoch reversibel. Nach einer Phase der Wiederbeladung der Speicher können durch BDNF-Applikation wieder Calciumtransienten hervorgerufen werden (n = 5).

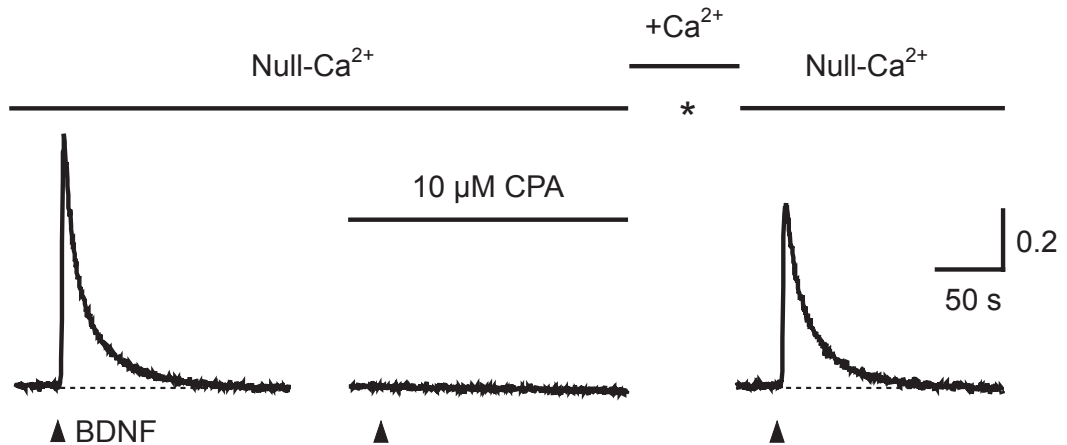


Abb. 18: Hemmende Wirkung von Cyclopiazonic Acid (CPA). BDNF-induzierte Calciumtransienten werden durch CPA (10 μM) reversibel blockiert. Links: BDNF-Applikation in calciumfreier Badlösung (Kontrolle). Mitte: Blockade durch CPA (10 μM). Asterisk-Zeichen (*): Einspülen von calciumhaltiger Badlösung ($+\text{Ca}^{2+}$) für fünf Minuten, um die intrazellulären Speicher wieder aufzuladen. Rechts: Calciumtransienten lassen sich in calciumfreier Badlösung wieder auslösen (BDNF 10 ng/ml, 50 ms). Die Pfeilköpfe repräsentieren jeweils den Zeitpunkt der BDNF-Applikationen. x-Achse: Zeit; y-Achse: Ratio.

Diese Ergebnisse zeigen, dass BDNF-induzierte Calciumtransienten nicht auslösbar sind, wenn die intrazellulären Calcium-Speicher entleert sind. Die Calciumtransienten kommen demnach durch Freisetzung von Calcium aus diesen Speichern zustande.

9.4 Vergleich BDNF- und ATP-induzierter Calciumtransienten

Adenosintriphosphat (ATP) ist ein gut beschriebener Auslöser glialer Calciumsignale, der in Astrozyten bekanntermaßen über die PLC/IP₃-Signalkaskade eine Calciumausschüttung aus intrazellulären Speichern hervorruft. [Salter und Hicks, 1995]. Durch den Vergleich von BDNF- und ATP-induzierten Calciumsignalen sollten weitere Hinweise auf die Mechanismen der intrazellulären Signalübertragung der BDNF-induzierten Calciumtransienten gewonnen werden.

Zunächst wurde bestätigt, dass ATP auch unter unseren

Versuchsbedingungen Calciumtransienten hervorruft: Die Applikation von ATP in einer Konzentration von 1 mM für 150 ms führt zu einer Erhöhung der Calciumkonzentration in Gliazellen, die in ihrer Anstiegskinetik und dem biphasischen Rückgang auf das Ausgangsniveau große Ähnlichkeit zu BDNF-induzierten Calciumtransienten aufweisen. Anschließend sollte verifiziert werden, ob diese Transienten tatsächlich durch ATP ausgelöst werden. Zu diesem Zweck wurde Pyridoxal-Phosphate-6-Azophenyl-2',4'-Disulfonic Acid (PPADS) eingesetzt, das als Purin-Rezeptor-Antagonist ATP-Effekte inhibiert [Lambrecht et al., 1992]. Die Calciumtransienten in Folge von ATP-Applikation werden durch 10 μ M PPADS blockiert (n = 3, Abb. 19). Dadurch konnte bestätigt werden, dass es sich bei den dargestellten Transienten tatsächlich um ATP-induzierte Calciumsignale handelt.

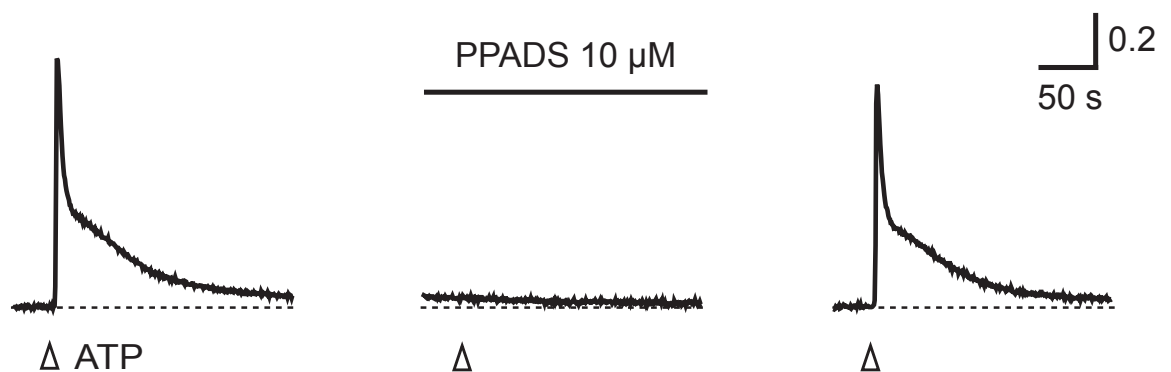


Abb. 19: Blockade durch Pyridoxal-Phosphate-6-Azophenyl-2',4'-Disulfonic Acid (PPADS). ATP-induzierte Calciumtransienten werden durch Zugabe von 10 μ M PPADS blockiert (ATP 1 mM, 150 ms). Links: Kontrolle, Mitte: nach Einspülen von PPADS (10 μ M), rechts: nach Auswaschen von PPADS. Die Pfeilköpfe symbolisieren jeweils den Zeitpunkt der ATP-Applikationen. x-Achse: Zeit, y-Achse: Ratio.

ATP-induzierte Calciumsignale zeigen unter verschiedenen Gesichtspunkten große Ähnlichkeiten zu BDNF-induzierten Calciumtransienten: Ähnlich wie BDNF-induzierte Calciumtransienten lassen sich ATP-induzierte Calciumsignale auch bei wiederholter Applikation zuverlässig auslösen (Abb. 20, vgl. Kap. 9.1, Abb. 11: Repetitive Applikation von BDNF). Die Abnahme der

maximalen Amplitude zwischen erster und vierter Applikation um ca. 30 % zeigt ebenfalls sehr große Ähnlichkeit mit der Abnahme der maximalen Amplitude bei BDNF-Applikation (Abb. 21).

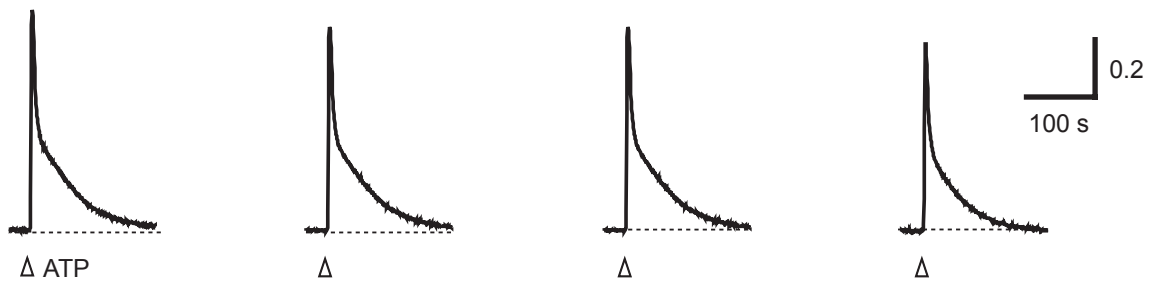


Abb. 20: Repetitive Applikation von ATP. Dargestellt sind die Zeitverläufe von vier aufeinanderfolgenden Calciumtransienten in einem einzelnen, kultivierten Astrozyt, hervorgerufen durch wiederholte Applikation von ATP (1 mM, 150 ms) im Abstand von 10 Minuten. Die Pfeilköpfe symbolisieren jeweils den Zeitpunkt der ATP-Applikation. x-Achse: Zeit, y-Achse: Ratio.

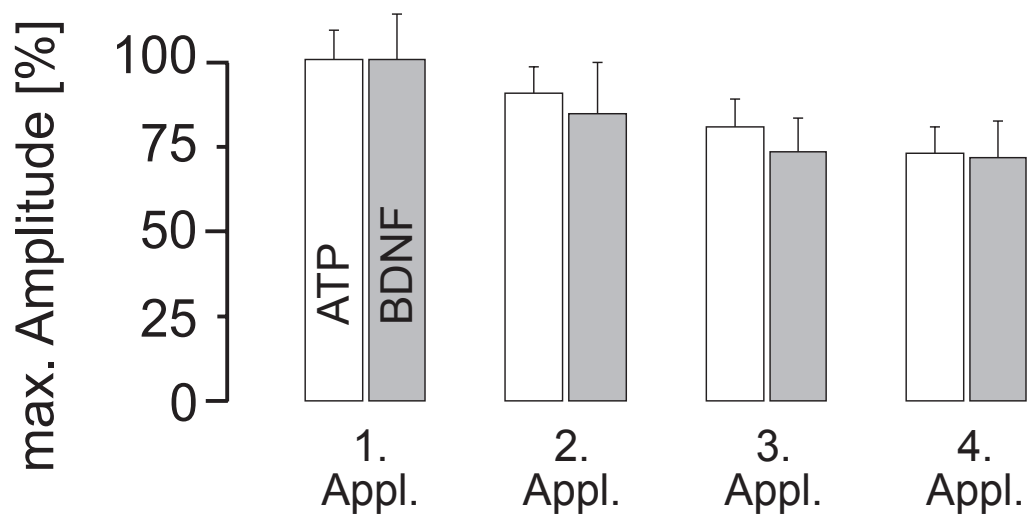


Abb. 21: Abnahme der Maximal-Amplitude bei repetitiver ATP-Applikation. Zwischen 1. und 4. Applikation verringert sich die Amplitude um ca. 30 %. Dargestellt sind die Mittelwerte der maximalen Amplitude von ATP-induzierten Calciumtransienten bei wiederholter Applikation (weiße Balken). Zum Vergleich sind die entsprechenden Werte bei repetitiver BDNF-Applikation dargestellt (graue Balken, vgl. Abb. 12). Der Fehlerindikator repräsentiert den Standardfehler des Mittelwerts (engl. „standard error of mean“, s.e.m.).

ATP-induzierte Calciumtransienten lassen sich auch in calciumfreier Badlösung hervorrufen, sind also ebenso wie BDNF-induzierte Calciumtransienten nicht abhängig von extrazellulärem Calcium (n = 4, Abb. 22, vgl. Abb. 16: BDNF-induzierter Calciumtransient in calciumfreier Badlösung).

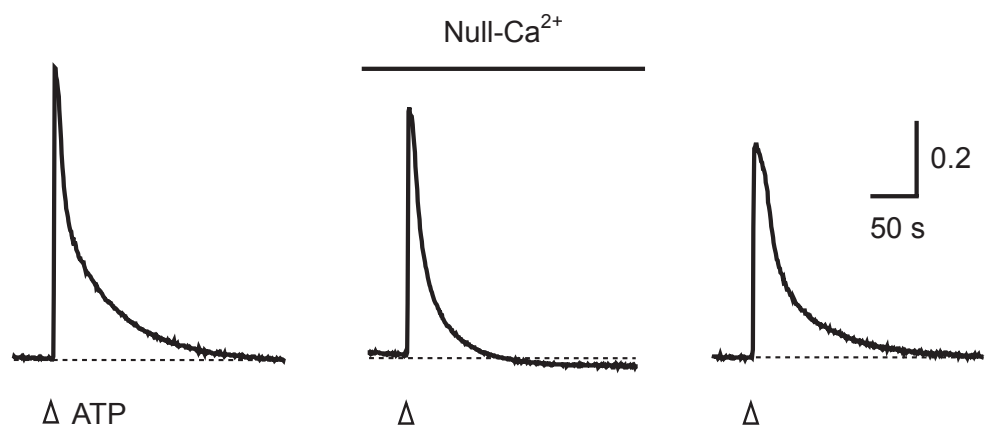


Abb. 22: ATP-induzierter Calciumtransient in calciumfreier Badlösung. Die Auslösbarkeit von ATP-induzierten Calciumtransienten ist nicht von extrazellulärem Calcium abhängig (ATP 1 mM, 150 ms). Die Abnahme der Amplitude ist nicht auf das Einspülen von calciumfreier Badlösung zurückzuführen, sondern auf die in Abb. 21 dargestellte Abnahme der Amplitude bei repetitiver Applikation. Links: Kontrolle, Mitte: Applikation in Null-Ca²⁺, rechts: nach Auswaschen. Die Pfeilköpfe repräsentieren jeweils den Zeitpunkt der ATP-Applikationen. x-Achse: Zeit; y-Achse: Ratio.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ATP und BDNF ihre Effekte auf die intrazelluläre Calciumkonzentration über ähnliche Mechanismen entfalten.

Um diese Hinweise weiter zu untermauern, wurden die Effekte von 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) untersucht. 2-APB inhibiert die IP₃-vermittelte Ausschüttung von Calcium aus intrazellulären Speichern [Maruyama et al., 1997]. Die ATP-induzierte Calciumausschüttung wird durch 2-APB um ca. 78

% gehemmt (n = 5, Abb. 23).

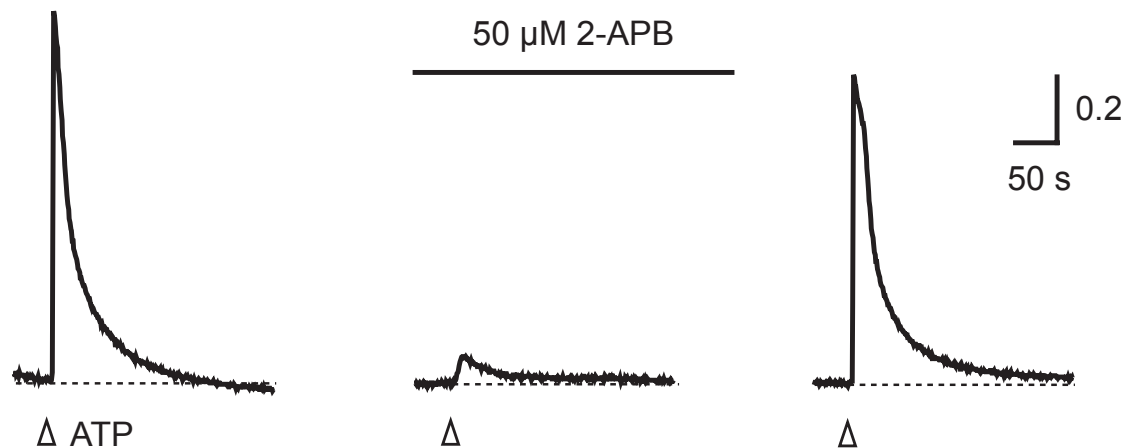


Abb. 23: Hemmende Wirkung von 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) auf ATP-induzierte Calciumtransienten. 2-APB (50 μ M) inhibiert die ATP-induzierte Calciumausschüttung aus intrazellulären Speichern reversibel um 78 % (ATP 1 mM, 150 ms). Links: Kontrolle, Mitte: nach Einspülen von 2-APB, rechts: nach Auswaschen von 2-APB. Die Pfeilköpfe repräsentieren jeweils den Zeitpunkt der ATP-Applikationen. x-Achse: Zeit; y-Achse: Ratio.

Anschließend wurde der Effekt von 2-APB auf BDNF-induzierte Calciumtransienten untersucht. Das Einspülen von 50 μ M APB reduziert den BDNF-induzierten Anstieg der Calciumkonzentration um ca. 75% (n = 8, Abb. 24), was darauf hindeutet, dass IP₃ an der Generierung der Calciumtransienten beteiligt ist.

Die Ähnlichkeiten der grundlegenden Eigenschaften von BDNF- und ATP-induzierten Effekten auf die intrazelluläre Calciumkonzentration kultivierter Astrozyten deuten darauf hin, dass BDNF-induzierte Calciumtransienten über denselben Signaltransduktionsmechanismus vermittelt werden, der für ATP beschrieben wurde, nämlich über die PLC/IP₃-Signalkaskade.

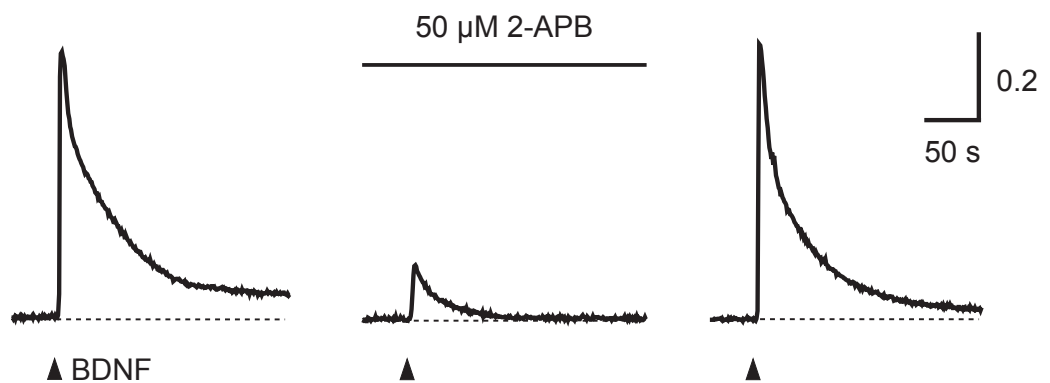


Abb. 24: Hemmende Wirkung von 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) auf BDNF-induzierte Calciumtransienten. 2-APB (50 μM) inhibiert die BDNF-induzierte Calciumausschüttung reversibel um 75 % (BDNF 50 ng/ml, 100 ms). Links: Kontrolle, Mitte: nach Einspülen von 2-APB, rechts: nach Auswaschen von 2-APB. Die Pfeilköpfe repräsentieren jeweils den Zeitpunkt der BDNF-Applikationen. x-Achse: Zeit; y-Achse: Ratio.

9.5 Vergleich von NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5

Um zu untersuchen, über welche Rezeptoren BDNF-induzierte Calciumtransienten vermittelt werden, wurden die vier Neurotrophine NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5 appliziert. Auf Grund der Spezifität der Trk-Rezeptoren (NGF bindet bevorzugt an TrkA, BDNF und NT-4/5 an TrkB, NT-3 an TrkC; siehe Kapitel 7.1.4, Abb. 1) lassen sich durch das unterschiedliche Antwortverhalten auf die verschiedenen Neurotrophine Rückschlüsse auf die beteiligten Rezeptoren ziehen. NT-4/5 erzeugt in kultivierten Astrozyten ähnliche Calciumtransienten wie BDNF, NGF und NT-3 zeigen keine Wirkung ($n = 3$; Abb. 25). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Neurotrophin-Effekte über TrkB-Rezeptoren vermittelt werden.

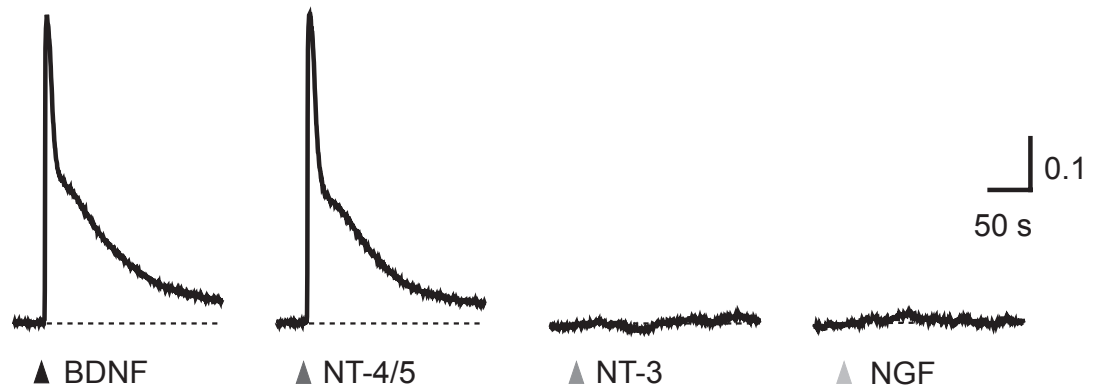


Abb. 25: Neurotrophin-Antwort-Profil. Dargestellt ist der Zeitverlauf der intrazellulären Calciumkonzentration eines einzelnen, kultivierten Astrozyten nach Applikation von BDNF (20 ng/ml, 150 ms), NT-4/5 (30 ng/ml, 150 ms), NT-3 (150 ng/ml, 150 ms) und NGF (150 ng/ml, 150 ms). BDNF und NT-4/5 rufen Calciumtransienten hervor, NT-3 und NGF zeigen keinen Effekt. Die Pfeilköpfe repräsentieren jeweils den Zeitpunkt der Neurotrophin-Applikationen. x-Achse: Zeit; y-Achse: Ratio.

9.6 Experimente zur Rezeptor-Identifikation

Bekanntermaßen werden die schnellen Neurotrophin-Wirkungen auf Nervenzellen durch TrkB^{FL} vermittelt und lassen sich durch K-252a blockieren [Kafitz et al., 1999; Blum et al., 2002]. K-252a ist ein unspezifischer Inhibitor verschiedener Protein-Kinasen [Knusel und Hefti, 1992], in einer Konzentration von 150 nM hemmt K-252a jedoch spezifisch die Tyrosin-Protein-Kinase-Aktivität von Trk-Rezeptoren [Berg et al., 1992; Tapley et al., 1992]. Zunächst wurde versucht, die bereits beschriebenen BDNF-Effekte auf Neurone zu bestätigen: K-252a blockiert neuronale Calciumtransienten ($n = 7$, Abb. 26).

Anschließend wurden die Effekte von K-252a auf kultivierte Gliazellen untersucht. In Astrozyten werden BDNF-induzierte Calciumtransienten nicht durch K-252a blockiert ($n = 7$, Abb. 27). Dieses Ergebnis liegt wahrscheinlich darin begründet, dass in Gliazellen überwiegend der trunkierte TrkB -Rezeptor TrkB-T1 exprimiert wird, dem die intrazelluläre Kinase-Domäne fehlt. TrkB^{FL} -Rezeptoren, deren Tyrosin-Protein-Kinase-Aktivität durch K-252a inhibiert wird, werden in Astrozyten kaum bis gar nicht exprimiert [Condorelli et al., 1994; Rudge et al., 1994].

Neuron

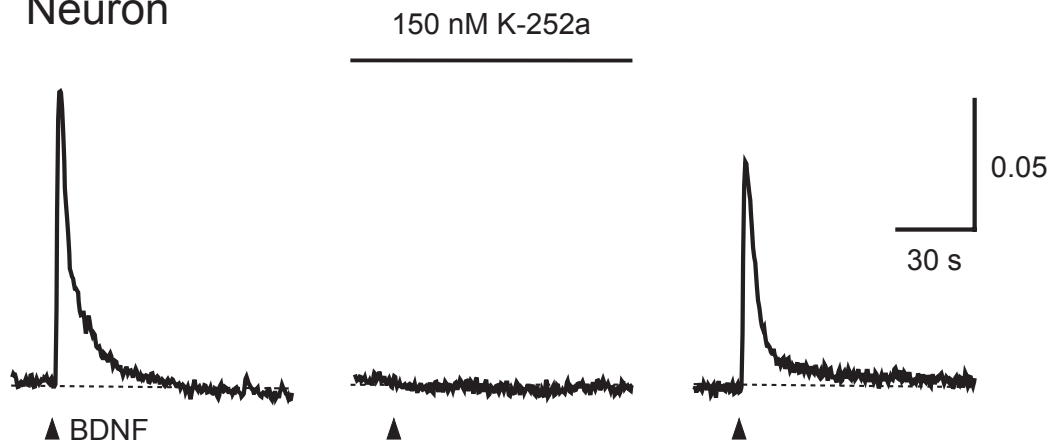


Abb. 26: Hemmender Effekt von K-252a auf Neurone. BDNF-induzierte Calciumtransienten in Neuronen werden durch K-252a (150 nM) blockiert (BDNF 50 ng/ml, 150 ms, Pyramidenzelle der CA1-Region, Hippokampusschnitt). Links: Kontrolle, Mitte: nach Einspülen von K-252a, rechts: nach Auswaschen von K-252a. Die Pfeilköpfe repräsentieren jeweils den Zeitpunkt der BDNF-Applikationen. x-Achse: Zeit; y-Achse: Ratio.

Glia

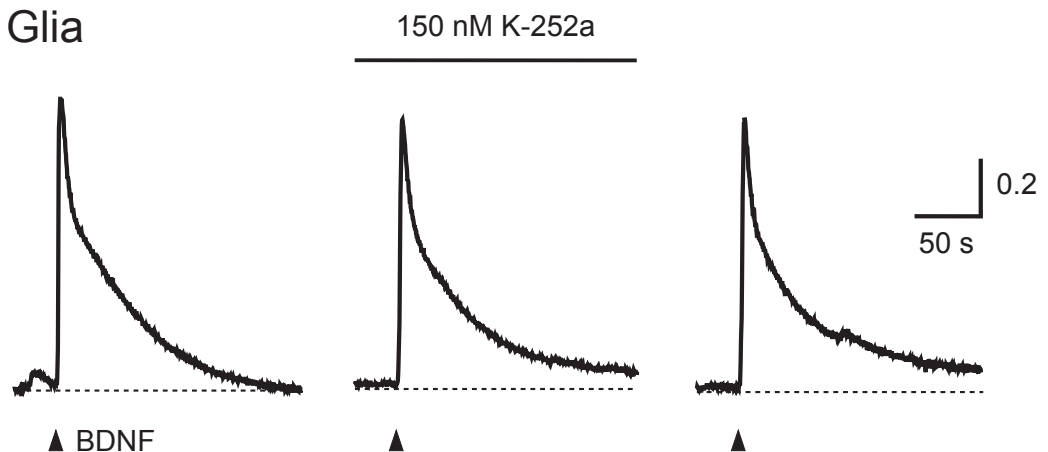


Abb. 27: Keine Blockade durch K-252a in Gliazellen. BDNF-induzierte Calciumtransienten in Astrozyten werden durch K-252a (150 nM) nicht blockiert (BDNF 20 ng/ml, 100 ms, Astrozytenkultur). Die graphische Darstellung entspricht der Darstellung in Abb. 26.

Um diese Hinweise auf eine TrkB^{FL} -unabhängige BDNF-Wirkung auf Astrozyten weiter zu untermauern, kamen Mäuse zum Einsatz, die keine Full-Length-TrkB-Rezeptoren exprimieren [Klein et al., 1993]. In Astrozytenkulturen, die aus solchen Knockout-Mäusen gewonnen wurden, lassen sich durch BDNF-Applikation ebenfalls Calciumtransienten hervorrufen, die sich nicht von den Calciumtransienten in Astrozyten des Wildtyps unterscheiden ($n = 17$; Abb. 28).

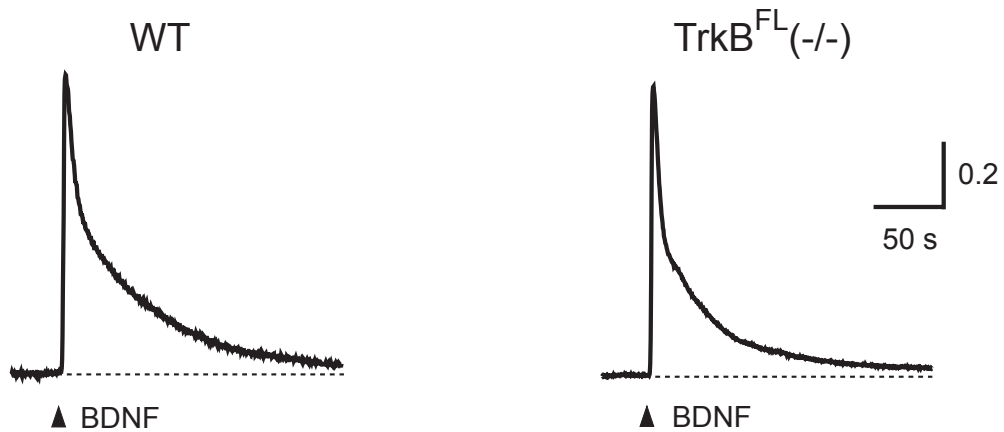


Abb. 28: BDNF-induzierter Calciumtransient in TrkB^{FL} -Knockout. Links: Calciumtransient in Astrozyt aus einer Kultur des Wildtyps (WT). Rechts: Calciumtransient in Astrozyt aus einer Kultur der Knockout-Maus ($\text{TrkB}^{\text{FL}}(-/-)$) (jeweils BDNF 50 ng/ml, 100 ms).

Dieses Ergebnis ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass BDNF-Wirkungen auf Astrozyten nicht über TrkB^{FL} vermittelt werden.

9.7 Ergebnisübersicht

1. Zunächst wurde gezeigt, dass BDNF in subnanomolarer Konzentration zuverlässig Calciumtransienten hervorruft. Diese Signale lassen sich auch bei repetitiver Applikation im Abstand von 10 Minuten zuverlässig auslösen, dabei verringert sich jedoch die maximale Amplitude um ca. 30 % zwischen der ersten und der vierten Applikation (Kap. 9.1).

2. Anschließend wurden gliale und neuronale BDNF-induzierte Calciumtransienten miteinander verglichen, wobei folgende Unterschiede festgestellt werden konnten: Während neuronale Calciumtransienten durch Saxitoxin blockiert werden, zeigt Saxitoxin keinerlei Wirkung auf gliale Calciumtransienten. Des Weiteren erfolgt der Anstieg der Calciumkonzentration in Gliazellen mit einer Verzögerung von mehr als einer Sekunde, die Verzögerung in Neuronen ist wesentlich geringer (Kap. 9.2).
3. Um die Signaltransduktionsmechanismen BDNF-induzierter Calciumsignale in Gliazellen zu untersuchen, wurden Experimente in calciumfreier Badlösung (Null- Ca^{2+} -CHR) durchgeführt: BDNF-induzierte Calciumtransienten sind auch in Null- Ca^{2+} -CHR auslösbar, sind also nicht von extrazellulärem Calcium abhängig. In weiteren Versuchen wurden mit Hilfe der SERCA-Inhibitoren Thapsigargin (TG) und Cyclopiazonic Acid (CPA) die intrazellulären Calciumspeicher entleert und gezeigt, dass sich nach Depletion der Speicher keine BDNF-induzierten Calciumtransienten mehr auslösen lassen (Kap. 9.3).
4. Durch einen Vergleich mit ATP als gut beschriebenem Agonisten glialer Calciumtransienten konnten weitere Erkenntnisse über die Signaltransduktionsmechanismen gewonnen werden. Es wurde gezeigt, dass BDNF-induzierte Calciumtransienten in ihrer Anstiegskinetik, ihrem biphasischen Rückgang auf das Ausgangsniveau, in der Verringerung der Maximal-Amplitude und dem Verhalten in calciumfreier Badlösung den typischen glialen Calciumsignalen entsprechen. Darüber hinaus wird durch 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB), einen Inhibitor der IP_3 -Rezeptoren intrazellulärer Calciumspeicher, die maximale Amplitude sowohl der ATP- als auch der BDNF-induzierten Calciumtransienten deutlich gesenkt (Kap. 9.4).
5. Die Ergebnisse der Versuche mit Null- Ca^{2+} , Thapsigargin, CPA und 2-APB sind in Abb. 29 als Histogramm dargestellt. Sie weisen zusammengenommen eindeutig darauf hin, dass der Anstieg der Calciumkonzentration in Folge von BDNF-Applikation auf einer IP_3 -vermittelten Calciumausschüttung aus intrazellulären Speichern basiert.

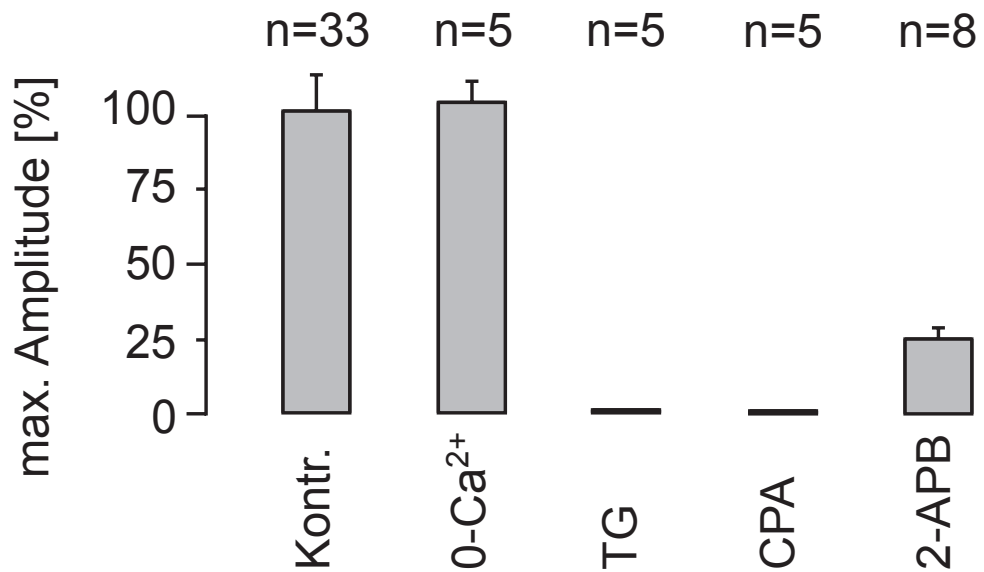


Abb. 29: Ergebnisübersicht der Experimente zur Beteiligung intrazellulärer Speicher. Dargestellt sind die Mittelwerte der maximalen Amplitude der Calciumtransienten in der Kontrolle (Kap. 9.1) sowie in Badlösungen mit Null-Ca²⁺, Thapsigargin, Cyclopiazonic Acid (Kap. 9.3) und 2-Aminoethoxydiphenylborat (Kap. 9.4), angegeben in % des Mittelwertes der Kontrolle. Der Fehlerindikator repräsentiert den Standardfehler des Mittelwerts.

6. Abschließend wurden Experimente zur Identifikation der beteiligten Rezeptoren durchgeführt. Aufgrund der Spezifität von Trk-Rezeptoren konnte anhand der unterschiedlichen Effekte von NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5 gezeigt werden, dass die beschriebenen Transienten über TrkB-Rezeptoren vermittelt werden. Die Versuche mit dem Kinase-Blocker K-252a und mit Kulturen aus TrkB^{FL}(-/-)-Knockout-Mäusen zeigten, dass es sich dabei nicht um Full-Length-TrkB-Rezeptoren handelt.

10 Diskussion

Aus den dargelegten Ergebnissen können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

BDNF induziert Calciumtransienten in kultivierten Gliazellen, die

- sich fundamental von BDNF-induzierten Calciumtransienten in Neuronen unterscheiden,
- durch eine IP_3 -abhängige Ausschüttung von Calcium aus intrazellulären Speichern mit anschließendem Einstrom von extrazellulärem Calcium zustande kommen, und
- nicht über vollständige TrkB-Rezeptoren ($TrkB^{FL}$) vermittelt werden.

Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass BDNF-induzierte Calciumtransienten in Astrozyten über trunkierte TrkB-Rezeptoren vermittelt werden, die eine Signalkaskade aktivieren, welche letztlich zu der IP_3 -induzierten Calciumfreisetzung führt.

10.1 Signaltransduktion über trunkierte TrkB-Rezeptoren

Durch die dargestellten Ergebnisse werden zwei Veröffentlichungen bestätigt, in denen eine Erhöhung der Calciumkonzentration in Astrozyten als Reaktion auf Neurotrophin-Applikation bereits beschrieben worden war: In einer dieser Publikationen wurden Calciumtransienten in Subpopulationen kultivierter Astrozyten nach Badapplikation von BDNF erwähnt [Roback et al., 1995], eine andere Arbeitsgruppe konnte im Rahmen von Experimenten zur Untersuchung der Effekte pränataler Ethanol-Exposition einen BDNF-induzierten Anstieg der Calciumkonzentration in Astrozyten beobachten [Climent et al., 2000]. Jedoch finden sich in keiner dieser Publikationen Hinweise auf die Signaltransduktionsmechanismen.

Zur Aufklärung der Signaltransduktion haben wir zusätzlich zu den oben dargestellten Ergebnissen eine Reihe weiterer ratiometrischer und elektrophysiologischer Untersuchungen durchgeführt [Rose et al., 2003]: Da es sich bei 2-APB (Abb. 24, Kap. 9.4) um einen eher unspezifischen Inhibitor von IP_3 -

Rezeptoren handelt [Soulsby und Wojcikiewicz, 2002], wurde ein weiterer IP_3 -Inhibitor, Heparin, eingesetzt, der in Patch-Clamp-Untersuchungen intrazellulär eingespült wurde. Dadurch wird eine wesentlich spezifischere Inhibition erreicht als durch die extrazelluläre Applikation von 2-APB [Prakriya und Lewis, 2001]. Durch die Ergebnisse der Versuche mit Heparin konnte die Beteiligung von IP_3 verifiziert werden. Die Beteiligung der Phospholipase C (PLC) wurde anhand des PLC-Inhibitors U73122 untersucht [Smith et al., 1990], der das BDNF-induzierte Signal blockierte, während das inaktive Analogon U73343 keinen Effekt zeigte. Des Weiteren wurde der G-Protein-Aktivator Aluminiumfluorid [Sternweis und Gilman, 1982] eingesetzt. Aluminiumfluorid verursachte zunächst einen Anstieg der Calciumkonzentration. Die Calciumantwort auf die erste Applikation von BDNF in Aluminiumfluorid zeigte einen verzögerten Rückgang auf das Ausgangsniveau, durch weitere BDNF-Applikationen in Aluminiumfluorid konnten keine Calciumtransienten mehr hervorgerufen werden, was darauf hindeutet, dass die Signaltransduktion BDNF-induzierter Calciumtransienten in Astrozyten über die Aktivierung eines G-Proteins vermittelt wird.

Mit Hilfe diverser, molekularbiologischer Methoden (Antikörperfärbung, rapid-cycle RT-PCR, Western-Blot, Antisense-Transfektion) und deren Kombination mit Imaging- und Elektrophysiologie-Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass TrkB-T1 die in Gliazellen bei weitem vorherrschende Splice-Variante des TrkB-Rezeptors ist und dass BDNF-induzierte Calciumtransienten über diese TrkB-T1-Rezeptoren vermittelt werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden mit den in Kapitel 9 geschilderten Ergebnissen zu einem Modell der Signaltransduktionsmechanismen BDNF-induzierter Calciumtransienten in Astrozyten zusammengefasst (Abb. 30) [Rose et al., 2003].

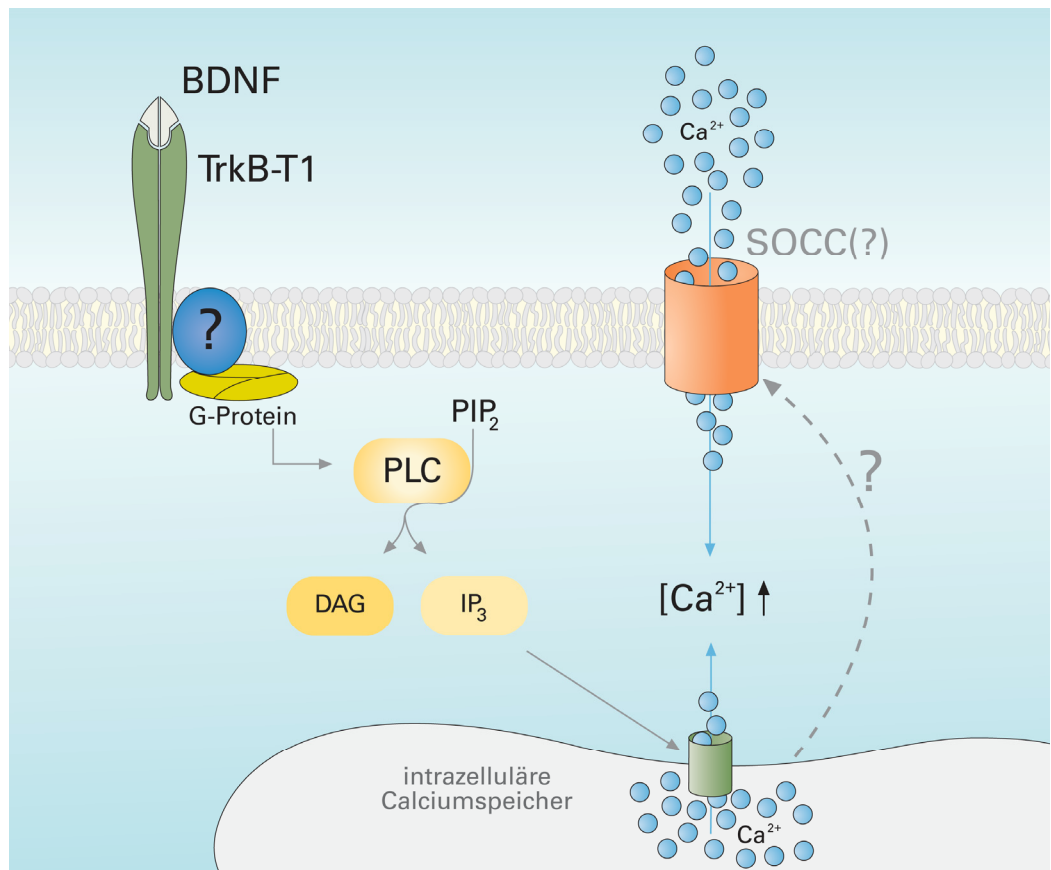


Abb. 30: Modell der Signaltransduktionsmechanismen BDNF-induzierter Calciumsignale in Gliazellen. Nach Aktivierung trunkierter TrkB-T1-Rezeptoren durch BDNF wird über einen noch unbekanntem Mechanismus ein G-Protein aktiviert, das die Phospholipase C stimuliert. Dadurch wird IP₃ gebildet, das die IP₃-Rezeptoren der intrazellulären Calciumspeicher aktiviert und damit zur Freisetzung von Calcium führt. Anschließend kommt es zu einem kapazitiven Einstrom von Calcium aus dem Extrazellularraum. Die Mechanismen dieses Calciumeinstroms sind noch ungeklärt und werden derzeit kontrovers diskutiert. Abkürzungen: BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor; TrkB-T1: trunkierter Tropomyosin-Related-Kinase-Rezeptor B 1; PLC: Phospholipase C; PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, DAG: Diacylglycerol; IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat; SOCC: speicherabhängiger Calciumkanal (engl. store-operated calcium channel).

Die Beteiligung einer trunkierten Isoform von TrkB-Rezeptoren an der Signalübertragung ist äußerst überraschend, weil eine katalytische Funktion von Rezeptoren, die anstelle der intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne eine nur neun (TrkB-T2) bzw. elf (TrkB-T1) Aminosäuren kurze, C-terminale Sequenz aufweisen, bisher kaum vorstellbar schien. Bereits in den ersten Publikationen über trunkierte TrkB-Rezeptoren [Klein et al., 1990; Middlemas et al., 1991] hatten die Autoren eher passive Funktionen postuliert, die später auch experimentell bestätigt wurden: Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von BDNF an trunkierte

TrkB-Rezeptoren zu einer endozytotischen Internalisierung des Neurotrophins und dadurch zum Aufbau eines intrazellulären Reservoirs führt, aus dem BDNF bei Bedarf wieder freigesetzt werden kann [Alderson et al., 2000]. Auch eine Inhibition der TrkB^{FL}-vermittelten Signalübertragung durch Bildung nicht funktionsfähiger Heterodimere aus TrkB^{FL} und TrkB-T1 bzw. -T2 wurde beschrieben [Eide et al., 1996; Saarelainen et al., 2000]. Eine direkte Beteiligung trunkierter Rezeptoren an der Signalübertragung wurde jedoch nicht in Betracht gezogen. Aus diesem Grund wurden die drei TrkB-Isoformen in katalytische TrkB^{FL}-Rezeptoren einerseits und nicht-katalytische TrkB-T1- und -T2-Rezeptoren andererseits unterschieden. 1997 lieferten Baxter et al. erste Hinweise auf eine Signaltransduktion über trunkierte TrkB-Rezeptoren, als sie eine erhöhte Freisetzung saurer Metaboliten nach Aktivierung von TrkB-T1 und -T2 beobachteten [Baxter et al., 1997].

Durch die vorliegende Arbeit wird nun erstmals eine durch BDNF-Bindung an trunkierte Rezeptoren verursachte, schnelle Signaltransduktion detailliert beschrieben. Allerdings ist bisher noch ungeklärt, über welchen Mechanismus TrkB-T1 die nachfolgende Signalkaskade aktiviert. Bereits vor einigen Jahren wurde ein Protein beschrieben, das an TrkB-T1 bindet (TIPP = „Truncated TrkB Interacting Protein“), diese Bindung scheint allerdings liganden-unabhängig zu sein, da die Interaktion zwischen TrkB-T1 und TTIP durch BDNF-Stimulation nicht moduliert wird [Kryl und Barker, 2000]. Kürzlich wurde von Ohira et al. eine Signaltransduktion via TrkB-T1 beschrieben, bei der durch BDNF-abhängige Dissoziation von Rho-GDI1 („Rho GDP dissociation inhibitor 1“) eine Inhibition von Rho-GTPasen verursacht wird, die zu einer Veränderung der Zellmorphologie von Gliazellen führt [Ohira et al., 2005]. Inwieweit ein Zusammenhang zwischen diesen TrkB-T1-bindenden Proteinen und der BDNF-induzierten Calciumfreisetzung in Astrozyten besteht, wird durch zukünftige Untersuchungen zu klären sein.

Auf die BDNF-Bindung an TrkB-T1 und den dadurch veranlassten, bisher unbekanntem Zwischenschritt folgt die Aktivierung eines G-Proteins. Da die Kaskade *Rezeptorbindung* → *G-Protein* → *PLC* → *IP₃* → *Ca²⁺-Ausschüttung* in Astrozyten als wesentlicher Mechanismus für die Generierung glialer Calciumsignale gilt [Salter und Hicks, 1995; Venance et al., 1997; Giaume und Venance, 1998; Hofer et al., 2002], erschien die Annahme einer Beteiligung eines G-Proteins an der Generierung BDNF-induzierter Calciumtransienten nahe liegend. Diese G-Protein-Aktivierung konnte ebenso wie die nachfolgende

Stimulation der Phospholipase C und die anschließende IP₃-vermittelte Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, experimentell bestätigt werden.

Nach der Calciumausschüttung aus intrazellulären Speichern kommt es schließlich zu einem Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum, der einem „speicher-gesteuerten“ (engl. „store-operated“) bzw. „kapazitativen“ (engl. „capacitative“) Einstrom entspricht. Die fundamentale Eigenschaft eines „capacitative Ca²⁺ entry“ ist die Aktivierung des Einstroms in Folge einer Depletion der intrazellulären Calciumspeicher. Es wird angenommen, dass dabei erstens das Absinken der Calciumkonzentration innerhalb der Speicher durch einen Ca²⁺-Sensor detektiert werden und zweitens eine Signaltransduktion von diesem Sensor zu Calciumkanälen der Zellmembran stattfinden muß. Eine vollständige Aufklärung der molekularen Mechanismen dieser Vorgänge ist jedoch derzeit noch nicht in Sicht [Putney et al., 2001; Smani et al., 2004; Parekh und Putney, 2005; Golovina, 2005].

10.2 BDNF-vermittelte Neuron-Glia-Kommunikation

Die IP₃-vermittelte Calciumausschüttung aus intrazellulären Speichern und der darauffolgende kapazitative Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum stellen den typischen Mechanismus der bereits in Kapitel 7.3 angesprochenen glialen Calciumsignale dar, die durch Glutamat [Cornell-Bell et al., 1990], Noradrenalin [Duffy und MacVicar, 1995], Acetylcholin [Shelton und McCarthy, 2000], GABA [Kang et al., 1998], NO [Matyash et al., 2001], sowie eine Reihe weiterer Agonisten [Verkhatsky et al., 1998] hervorgerufen werden können. Astrozyten sind in der Lage, diese transiente Erhöhung der Calciumkonzentration als Calciumwelle innerhalb des Astrozyten-Synzytiums zu übermitteln und daraufhin in einem definierten Zielgebiet [*] eine Transmitterausschüttung (z. B. Glutamat [Parpura et al., 1994]) zu veranlassen. Dadurch kann die synaptische

[*] Hofer et al. postulierten anhand eines Vergleichs von bereits publizierten, experimentellen Daten mit einem mathematischen Modell der Wellenausbreitung, dass Gliazellen in der Lage seien, über eine Regulation der Aktivitäten von PLC und SERCA Entfernung und Geschwindigkeit der Ausbreitung einer Calciumwelle zu modulieren, wodurch eine zielgerichtete Informationsübertragung über die selektiv limitierbare Regenerativität glialer Calciumwellen kontrollierbar wäre [Hofer et al., 2002].

Transmission angrenzender Neurone moduliert werden [Araque und Perea, 2004]. Dieser direkte Einfluß von Astrozyten auf die synaptische Signalübertragung hat zu dem Konzept einer dreiteiligen Synapse („tripartite synapse“), bestehend aus Präsynapse, Postsynapse und Astroglia, geführt [Araque et al., 1999]. Einige Autoren sprechen in diesem Zusammenhang sogar von „Gliotransmittern“ und „Gliotransmission“ (in Anlehnung an die Begriffe „Neurotransmitter“ und „Neurotransmission“), um deutlich zu machen, dass Gliazellen zu Aufnahme, Integration und Weiterleitung chemischer Signale befähigt und somit an der zentralnervösen Informationsverarbeitung aktiv beteiligt sind. Calciumwellen werden dabei als *der* zentrale Informationsträger in Astrozyten betrachtet, als Ausdruck einer glialen Variante von Erregbarkeit, quasi als Analogon zu Aktionspotentialen als Ausdruck neuronaler Exzitabilität [Haydon, 2001; Zhang und Haydon, 2005].

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals die Generierung glialer Calciumwellen durch Neurotrophine beschrieben. Außerdem wird gezeigt, dass BDNF diese Effekte bereits in subnanomolarer Konzentration hervorruft. Die dafür notwendigen Konzentrationen anderer Agonisten glialer Calciumwellen liegen um mehrere Zehnerpotenzen höher. Brain-Derived Neurotrophic Factor ist somit der wirksamste, endogene Agonist für die Generierung von Calciumsignalen in Astrozyten, der bisher beschrieben wurde.

10.3 Mögliche Konsequenzen für die klinische Therapie

Aussagen über die klinischen Konsequenzen von Untersuchungsergebnissen der Grundlagenforschung sind naturgemäß spekulativ und können daher nur sehr zurückhaltend formuliert werden. Es gibt jedoch eine Reihe von Anhaltspunkten, die erwarten lassen, dass die oben dargelegten Erkenntnisse die zukünftigen Therapiestrategien diverser Fachbereiche beeinflussen könnten:

Seit den 1980er Jahren wurden Neurotrophine in Tiermodellen erfolgreich zur Behandlung neuropathischer, traumatischer, ischämischer und neurodegenerativer Störungen des zentralen und peripheren Nervensystems eingesetzt. Daraufhin wurde eine Vielzahl klinischer Versuchsreihen an Menschen durchgeführt, u. a. zur Neurotrophintherapie von Erkrankungen wie Amyotropher Lateralsklerose (ALS), Morbus Alzheimer, diabetischer und HIV-assoziierter

Neuropathie, Apoplexie u. a. . Die Ergebnisse dieser klinisch-therapeutischen Studien waren jedoch sehr ernüchternd: Der erwartete Behandlungserfolg war meist kaum bis gar nicht vorhanden, die Nebenwirkungen (Gewichtsverlust, Fieber, Übelkeit, Diarrhoe, Parästhesien, Schlafstörungen, u. a.) waren dagegen massiv [Apfel, 2002; Thoenen und Sendtner, 2002]. Neue Ergebnisse der Grundlagenforschung offenbarten zudem eine ungeahnte Komplexität der Neurotrophin-Effekte und völlig unerwartete, noch bei weitem nicht vollständig verstandene Wechselwirkungen der Neurotrophin-Rezeptoren, so dass eine wahllose, systemische Überflutung mit Neurotrophinen als therapeutisches Konzept inzwischen als obsolet gilt.

Für einen zukünftigen therapeutischen Einsatz von Neurotrophinen ist es daher unumgänglich, einerseits die molekularen Grundlagen der Neurotrophin-Effekte exakt zu entschlüsseln und andererseits Methoden zu entwickeln, die eine lokal regulierte Neurotrophin-Applikation auf spezifische Neuronenpopulationen ermöglichen. [Thoenen und Sendtner, 2002]. Eine besondere Schwierigkeit stellt dabei die Überwindung der für Neurotrophine impermeablen Blut-Hirn-Schranke dar [Hefti, 1997]. Klinische Versuche, die dieses Problem mit intracerebroventrikulärer [Eriksdotter Jonhagen et al., 1998] oder intrathekaler [Ochs et al., 2000] Applikation von Neurotrophinen zu umgehen versuchten, blieben allerdings ebenfalls erfolglos, wahrscheinlich auf Grund der sehr langsamen Diffusion der Neurotrophine durch das Gehirnparenchym und der relativ schnellen Konvektionsgeschwindigkeit des Liquor cerebrospinalis [Wu, 2005; Pardridge, 2005]. Als vielversprechende Ansätze für die Lösung dieses pharmakokinetischen Problems gelten der Einsatz viraler Vektoren sowie die Transplantation von modifizierten Zellen, die Neurotrophine überexprimieren [Thoenen und Sendtner, 2002].

Nach Überwindung dieser Hürden könnten Neurotrophine in Zukunft bei unterschiedlichsten Krankheiten von therapeutischem Nutzen sein, da sie nicht nur bei den bereits genannten neurodegenerativen, neuropathischen und ischämischen Prozessen von Bedeutung sind, sondern auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese von diversen psychiatrischen Erkrankungen, z. B. schizophrene [Durany und Thome, 2004; Shoval und Weizman, 2005] und affektive Psychosen [Hashimoto et al., 2004], sowie von einigen internistischen Erkrankungen, wie z. B. allergisches Asthma [Nassenstein et al., 2004] und hepatozelluläres Karzinom

[Yang et al., 2005], spielen.

Auf Grund ihrer Effekte auf das Überleben geschädigter Neurone nach Axotomie [Giehl und Tetzlaff, 1996] sowie auf die axonale Regeneration [Xu et al., 1995] könnten Neurotrophine in Zukunft auch nach traumatischen Läsionen des zentralen Nervensystems therapeutisch zum Einsatz kommen und z. B. para- und tetraplegischen Patienten neue Perspektiven eröffnen [Horner und Gage, 2000]. Ein wesentliches Problem in der Behandlung derartiger ZNS-Verletzungen ist die Bildung von Narbengewebe durch Vermehrung und Hypertrophie von Glia. Dieser Prozess, der auch als „reaktive Gliose“ bezeichnet wird, beeinträchtigt die axonale Regeneration [Privat, 2003] und ist nicht nur bei traumatischen Läsionen, sondern bei nahezu allen neuropathologischen Vorgängen zu beobachten, u. a. auch bei infektiösen (z. B. HIV), autoimmunologischen (z. B. Multiple Sklerose), neurodegenerativen (z. B. M. Alzheimer), ischämischen oder tumorbedingten Schädigungen des zentralen Nervensystems [Dietrich et al., 2003; Pekny und Nilsson, 2005].

Im Zusammenhang mit dieser glialen Narbenbildung scheinen auch trunkierte TrkB-Rezeptoren von großer Bedeutung zu sein. So konnten Frisén et al. bereits vor mehr als zehn Jahren eine vermehrte Bildung von mRNA trunkierter TrkB-Rezeptoren in Folge von Rückenmarksläsionen nachweisen, insbesondere in den reaktiven Astrozyten des glialen Narbengewebes [Frisén et al., 1992; 1993; Widenfalk et al., 2001]. Bisher ging man davon aus, dass durch verstärkte TrkB-T1-Expression im Bereich der reaktiven Gliose vermehrt BDNF sequestriert und dadurch die axonale Regeneration inhibiert wird, weil TrkB^{FL}-exprimierenden Neuronen weniger BDNF zur Verfügung steht [Fryer et al., 1997]. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind nun auch andere Schlussfolgerungen denkbar: Die Steigerung der TrkB-T1-Expression könnte darauf hindeuten, dass die in Kapitel 10.1 beschriebene, TrkB-T1-vermittelte Signaltransduktion eine zentrale Rolle für die Proliferation reaktiver Astrozyten und damit für die Pathophysiologie verschiedenster zentralnervöser Krankheitsbilder spielt.

Um die Familie der Neurotrophine für zukünftige therapeutische Ansätze nutzbar zu machen und in der Behandlung derzeit noch unheilbarer Erkrankungen einsetzen zu können, wird es notwendig sein, die Physiologie der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren detailliert zu entschlüsseln und ihre Bedeutung im

pathologisch alterierten Organismus aufzuklären. Vor allem aber sollte im Auge behalten werden, dass eine symptomatische Therapie mit Neurotrophen stets nur zweite Wahl hinter einer kausalen, auf eindeutig identifizierte, pathogenetische Mechanismen gerichteten Therapie sein kann [Thoenen und Sendtner, 2002].

11 Eigene Publikationen

Das Poster „BDNF-induced Calcium Signalling in Glial Cells“ (Kapitel 11.1) wurde auf dem 4th Meeting of the German Neuroscience Society / 28th Göttingen Neurobiology Conference in Göttingen, 2001, vorgestellt. Das Abstract ist erschienen in *Göttingen Neurobiology Report*. 28:804 (2001).

Das Poster „BDNF-evoked Calcium Transients in Cultured Astrocytes“ (Kapitel 11.2) wurde auf der Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft und der Scandinavian Physiological Society (Joint Congress of the German and Scandinavian Physiological Societies) in Tübingen, 2002, vorgestellt. Das Abstract ist erschienen in *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, Volume 443, Supplement 2, 2002.

Der Artikel „Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells“ (Kapitel 11.3) wurde in *Nature* (Band 426), Nr. 6962, veröffentlicht. Er wurde in einem „News and Views“-Artikel diskutiert [Reichardt, 2003] und wurde vorgestellt als „Artikel des Quartals“ in *Neuroforum*, Organ der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft (01/2004).

BDNF-INDUCED CALCIUM SIGNALING IN GLIAL CELLS

Bruno Pichler, Christine R. Rose, Karl Kafitz & Arthur Konnerth

804 Physiologisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, Biedersteiner Str. 29, 80802 München

Introduction

Neurotrophins regulate the survival, differentiation, and maintenance of function of different neuronal populations. They also play an essential role in the modulation of activity-dependent neural plasticity. Furthermore, we could recently show that neurotrophins excite central neurons just as rapidly as the neurotransmitter glutamate. Growing evidence suggests that neurotrophins may exert important effects not only on neurons, but also on glial cells. Since calcium ions represent an important second messenger mediating neuron-glia-interaction, we studied the effect of neurotrophin applications on the intracellular calcium concentration in cultured astrocytes.

Methods

Primary cell cultures of rat astrocytes were prepared from the hippocampus of newborn rats. The cells grew to confluency in about 9 days and cells from 9-15 days *in vitro* were used for the experiments. Cells were loaded with Fura-2/AM and fluorescence images were acquired by a variable scan digital imaging system (TILL Photonics) attached to an upright microscope (40x objective). The fluorescence signals of single cells were obtained at excitation wavelengths of 345 nm and 380 nm and were background corrected. Calcium measurements in acute, Fura-2/AM loaded, hippocampal slices were performed using two-photon laser microscopy. Neurotrophins were applied by a puffsprayer coupled to standard micropipettes.

Results

1) BDNF-evoked calcium transients in cultured astrocytes

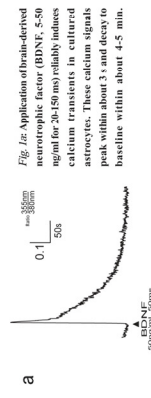


Fig. 1a: Application of brain-derived neurotrophic factor (BDNF; 5-50 ng/ml for 30-150 ms) reliably induces calcium transients in cultured astrocytes. These calcium signals peak within about 3 s and decay to baseline within about 4-5 min.



Fig. 1b: The BDNF-evoked calcium transients can be reliably reproduced. BDNF applications are repeated every 10 min.

2) Spatial distribution of BDNF-evoked calcium transients

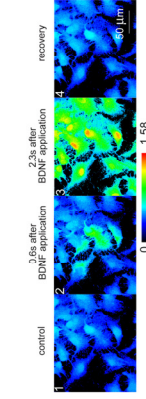


Fig. 2: Fluorescence ratio images of Fura-2/AM loaded astrocytes. Blue colors represent low baseline calcium, red represents an increase in the calcium concentration. Following application of BDNF, calcium signals first occur in a few astrocytes in the center of image 2 and then in all neighboring cells (image 3).

3) BDNF-evoked calcium transients in acute slices

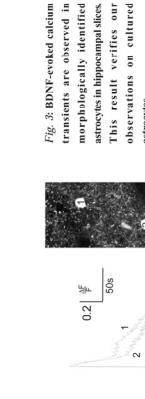


Fig. 3: BDNF-evoked calcium transients are observed in morphologically identified astrocytes in hippocampal slices. This result verifies our observations on cultured astrocytes.

4) Calcium responses induced by other neurotrophins

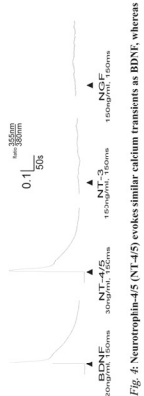


Fig. 4: Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) evokes similar calcium transients as BDNF, whereas both Nerve Growth Factor (NGF) and Neurotrophin-3 (NT-3) are ineffective. This suggests that the BDNF-induced calcium signals are mediated by trkB-receptors.

5) Dependence on extracellular calcium

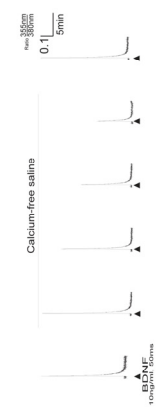


Fig. 5: The BDNF-induced calcium signals persist in calcium-free saline, demonstrating that they are not dependent on extracellular calcium.

6) Influence of CPA

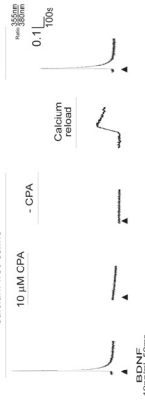


Fig. 6: Application of cyclopiazonic acid (CPA) blocks BDNF-induced calcium transients. CPA inhibits calcium transport into intracellular stores and leads to store depletion. Block persists after removal of CPA. For recovery of BDNF-evoked calcium transients recharging of the stores with calcium, remaining calcium is required. These results suggest that the BDNF-induced calcium signals are mediated by release of calcium from intracellular stores.

Conclusions

Our results show that BDNF reliably evokes Calcium transients in astrocytes.
 Furthermore, our observations suggest that
 - BDNF-evoked Calcium signals are mediated by trkB-receptors.
 - Calcium is released from intracellular stores in response to BDNF application.

BDNF-EVOKED CALCIUM TRANSIENTS IN CULTURED ASTROCYTES

Bruno Pichler, Christine R. Rose, Karl Kaffitz & Arthur Konnerth
 Physiologisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, Biedersteiner Str. 29, 80802 München

Introduction

Neurotrophins play an important role in the regulation of survival, differentiation, and maintenance of function of different neuronal populations and also in the modulation of activity-dependent neural plasticity. Furthermore, neurotrophins excite central neurons just as rapidly as the neurotransmitter glutamate by activation of a N_{tr} conductance (Kaffitz et al. 1999).

Since growing evidence suggests important neurotrophin effects not only on neurons, but also on glial cells, we analysed the effect of neurotrophin application on the intracellular calcium concentration in cultured astrocytes.

Methods

Primary cell cultures of hippocampal astrocytes were prepared from neonatal rats. The cells grew to confluency in about 9 days. Experiments were performed on cells from 9-15 days *in vitro*. To calculate fluorescence ratio from single cells, fluorescence images of astrocytes loaded with Fura-2AM were acquired by a digital imaging system (TILL Photonics) attached to an upright microscope (40x objective at excitation wavelengths of 355 nm and 380 nm). Standard microphotopies were coupled to a Jiscoprinter to apply neurotrophins locally on single cells for 10-150ms.

Results

1) BDNF-evoked calcium transients in cultured astrocytes

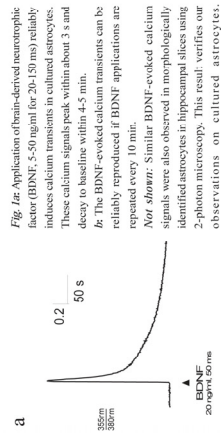


Fig. 1a: Application of brain-derived neurotrophic factor (BDNF; 5-50 ng/ml for 20-150 ms) reliably induces calcium transients in cultured astrocytes. These calcium signals peak within about 3 s and decay to baseline within 4-5 min. **b:** The BDNF-evoked calcium transients can be reliably reproduced if BDNF applications are repeated every 10 min. **Not shown:** Similar BDNF-evoked calcium signals were also observed in morphologically identified astrocytes in hippocampal slices using 2-photon microscopy. This result verifies our observations on cultured astrocytes.

2) Spatial distribution of BDNF-evoked calcium transients

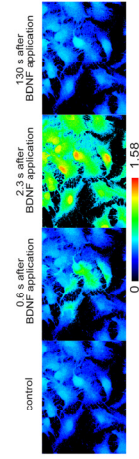


Fig. 2: Fluorescence ratio images of Fura-2AM loaded astrocytes. Blue colors represent low baseline calcium, red represents an increase in the calcium concentration. Following application of BDNF, calcium signals first occur in a few astrocytes in the center of image 2 and then in all neighboring cells (image 3).

3) Dependence on extracellular calcium

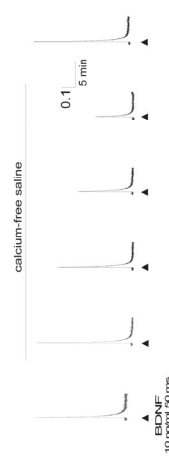


Fig. 3: The BDNF-induced calcium signals persist in calcium-free saline, suggesting a dominating contribution of calcium release from internal stores.

4) Influence of CPA



Fig. 4: Application of cyclopiazonic acid (CPA; 10 μ M) blocks BDNF-induced calcium transients. CPA inhibits calcium transport into intracellular stores and leads to store depletion. The block persists even after removal of CPA and the recovery of BDNF-evoked calcium transients requires recharging of the stores with saline containing calcium (calcium reload). These results strongly suggest that the BDNF-induced calcium signals are mediated by release of calcium from intracellular stores. **Not shown:** Results from experiments with irreversible SERCA-inhibitor thapsigargin are consistent with the data shown in Fig. 4.

5) Calcium responses induced by other neurotrophins



Fig. 5: Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) evokes similar calcium transients as BDNF, whereas both Nerve Growth Factor (NGF) and Neurotrophin-3 (NT-3) are ineffective. This suggests that the BDNF-induced calcium signals are mediated by trkB-receptors.

6) Effects of K252a and STX

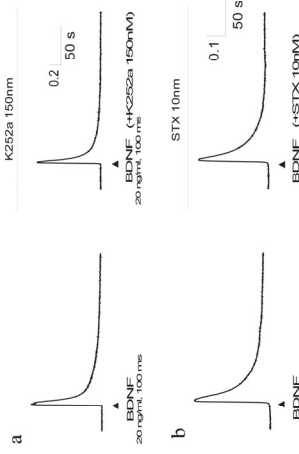


Fig. 6: Neither the trkB-blocker K252a (Fig. 6a) nor the sodium channel blocker STX (b) inhibit BDNF-induced calcium transients in cultured astrocytes. In contrast, both substances are efficient inhibitors of BDNF-induced trkB-mediated rapid excitation of central neurons (Kaffitz et al. 1999).

Conclusions

- Our results demonstrate that BDNF reliably evokes calcium transients in astrocytes.
- Furthermore, our results suggest that these calcium signals are mediated by release of calcium from intracellular stores following activation of trkB-receptors.
- In contrast to trkB-mediated neuronal excitation, BDNF-induced calcium signals in cultured astrocytes persist in K252a and STX.
- Thus, the mechanisms of BDNF-evoked calcium transients in glial cells differ significantly from those observed in neurons (Kaffitz et al. 1999; Rose et al. 2001).

References: Kaffitz et al. 1999; Nature 401; 518-521. Rose et al. 2001; Pflügers Arch 441 (Suppl 6); R176

11.3 Publikation: Nature 426, 2003

letters to nature

Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells

Christine R. Rose, Robert Blum, Bruno Pichler, Alexandra Lepier, Karl W. Kafitz & Arthur Konnerth

Institut für Physiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, 80336 München, Germany

The neurotrophin receptor TrkB is essential for normal function of the mammalian brain¹⁻³. It is expressed in three splice variants. Full-length receptors (TrkB^{FL}) possess an intracellular tyrosine kinase domain and are considered as those TrkB receptors that mediate the crucial effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) or neurotrophin 4/5 (NT-4/5). By contrast, truncated receptors (TrkB-T1 and TrkB-T2) lack tyrosine kinase activity and have not been reported to elicit rapid intracellular signalling⁴. Here we show that astrocytes predominately express TrkB-T1 and respond to brief application of BDNF by releasing calcium from intracellular stores. The calcium transients are insensitive to the tyrosine kinase blocker K-252a and persist in mutant mice lacking TrkB^{FL}. By contrast, neurons produce rapid BDNF-evoked signals through TrkB^{FL} and the Na_v1.9 channel^{5,6}. Expression of antisense TrkB messenger RNA strongly reduces BDNF-evoked calcium signals in glia. Thus, our results show that, unexpectedly, TrkB-T1 has a direct signalling role in mediating inositol-1,4,5-trisphosphate-dependent calcium release; in addition, they identify a previously unknown mechanism of neurotrophin action in the brain.

A short, pulse-like application of the TrkB ligand BDNF (0.73 nM, 50 ms) to cultured astrocytes evoked a Ca²⁺ wave that spread over a distance of more than 150 μm (Fig. 1a). Ca²⁺ transients recorded in single astrocytes consisted of a fast peak, which was often followed by a biphasic recovery phase (Fig. 1b, c). Applying vehicle alone or BDNF together with a BDNF scavenger (polyclonal antibodies to BDNF) was ineffective in eliciting Ca²⁺

signals (Fig. 2h). Similar astrocytic Ca²⁺ waves can be elicited by glutamate or ATP and represent a prominent form of long-range intercellular signalling in the brain⁷⁻¹⁰. Notably, however, the concentrations needed for their induction by other neuroactive substances are several orders of magnitude higher. Thus, BDNF, which is effective at subnanomolar concentrations, is the most potent endogenous agonist for the production of glia Ca²⁺ signals described so far.

With a similarly high efficiency, BDNF depolarizes neurons⁵. In contrast to the propagating Ca²⁺ wave in astrocytes, however, BDNF puffs cause neuronal Ca²⁺ signals that are spatially restricted, for example, to small portions of spiny dendrites¹¹. These neuronal BDNF-induced Ca²⁺ transients are caused by Ca²⁺ influx through voltage-gated Ca²⁺ channels after the TrkB^{FL}-mediated depolarizing action of saxitoxin-sensitive Na⁺ channels^{6,11}. As expected from these previous studies, saxitoxin (STX) blocked BDNF-evoked Ca²⁺ signals in cultured hippocampal neurons (*n* = 41; Fig. 1c). As it has been suggested that BDNF-evoked Ca²⁺ transients in glia are mediated by TrkB^{FL} receptors^{12,13}, we anticipated that STX would be also effective in astrocytes. STX, however, did not affect glia Ca²⁺ transients (*n* = 4; Fig. 1c). But whole-cell recordings obtained from astrocytes showed a BDNF-induced inward current (Fig. 1d; *n* = 7). The nature of

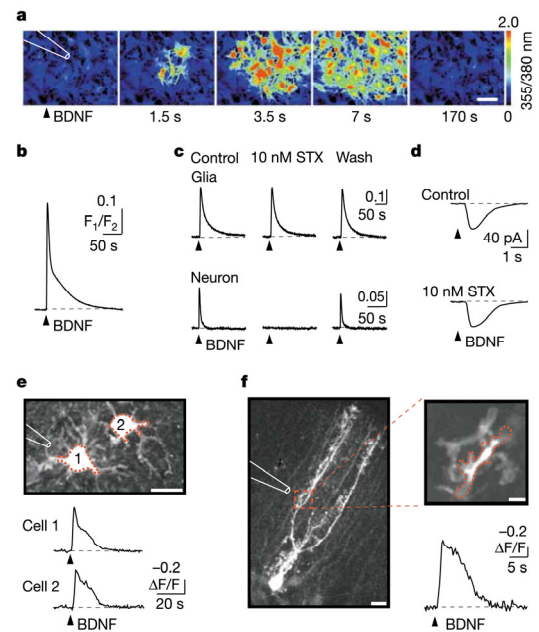


Figure 1 Ca²⁺ signalling in glia cells evoked by focal application of 0.73 nM (20 ng ml⁻¹) BDNF. **a**, BDNF-evoked Ca²⁺ wave in cultured astrocytes. **b**, Glia Ca²⁺ transient in a single astrocyte. F₁, F₂: fluorescence emission at 355 nm and 380 nm excitation, respectively. **c**, **d**, Influence of the Na⁺ channel blocker STX on Ca²⁺ transients in astrocytes and CA1 pyramidal neurons (**c**) and on a BDNF-evoked inward current in astrocytes (**d**). **e**, Image of two putative glial cells in the hippocampal stratum radiatum and BDNF-evoked Ca²⁺ signals in these cells. ΔF/F: change in fluorescence emission divided by the baseline fluorescence. **f**, Images of a Bergmann glia cell and its processes, and BDNF-evoked Ca²⁺ signal in the glia process. In **a**, **e**, **f**, the position of the BDNF ejection pipette is shown schematically; scale bars, 50 μm (**a**), 10 μm (**e**), 2 μm (**f**). Dotted red lines in **e** and **f** indicate the area from which the Ca²⁺ measurement was taken.

this STX-insensitive BDNF-induced current was not investigated further, but it might underlie capacitative Ca^{2+} entry¹⁴. Thus, unexpectedly, the rapid activation of glia cells by BDNF is mediated by mechanisms very different from those that activate neurons.

BDNF-evoked Ca^{2+} signals were also observed in glia cells in acute brain slices. Using two-photon Ca^{2+} imaging we identified, on the basis of morphological criteria (strong dye labelling, cell body diameter 5–10 μ m, stellar morphology), putative glia cells in the stratum radiatum of hippocampal slices loaded with Fura-2-AM (Fig. 1e). Application of BDNF to single glia cells evoked Ca^{2+} signals that were similar to those in culture ($n = 25$; Fig. 1e) and spread to cells 50–100 μ m away (see Supplementary Information).

Whole-cell recordings showed typical electrophysiological characteristics of glia cells (resting potentials around -90 mV; no spontaneous activity, inability to evoke action potentials; $n = 9$). Subsequent labelling for glia fibrillary acidic protein (GFAP) identified three out of four cells as GFAP-positive astrocytes (data not shown). The BDNF-evoked Ca^{2+} signals in glia cells *in situ* were altered neither by tetrodotoxin ($n = 4$), nor by a cocktail of glutamate receptor blockers (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (APV) and α -methyl-(4-carboxyphenyl)glycine (MCPG); $n = 8$; data not shown), showing that they were not due to neuronal activity or to glutamate release, respectively. BDNF-induced Ca^{2+} transients were also elicited in cerebellar Bergmann glia cells ($n = 25$; Fig. 1f).

When combining Ca^{2+} imaging with whole-cell patch-clamp recordings in cultured astrocytes, BDNF-induced Ca^{2+} signals were abolished within 15–20 min of obtaining the whole-cell mode ($n = 13$; data not shown). This run-down suggests that the BDNF-mediated response involves soluble messenger molecules that were washed out through the patch pipette. Therefore, mainly membrane-permeable probes were used with Ca^{2+} imaging to analyse the mechanisms of the BDNF-evoked glia activation.

In contrast to neurons, which respond to BDNF within less than 10 ms (ref. 5), in astrocytes the onset of the BDNF-induced Ca^{2+} signal was delayed by more than 1 s (Fig. 2a). In addition, the primary Ca^{2+} signal was independent on extracellular Ca^{2+} . Notably, however, the recovery phase was mono-exponential, and the second slow component was suppressed in the absence of extracellular Ca^{2+} (Fig. 2b). Inhibitors of endoplasmic Ca^{2+} -ATPase (cyclopiazonic acid (CPA; Fig. 2c, h) or thapsigargin (TG)) completely blocked BDNF-evoked Ca^{2+} signals (Fig. 2h). An inhibitor of inositol-1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5) P_3) receptors (2-aminoethoxydiphenyl borate, 2-APB)¹⁵ reduced the Ca^{2+} transients by 75% (Fig. 2d, h). The Ins(1,4,5) P_3 receptor antagonist heparin, delivered intracellularly during a 2-min period of whole-cell patch-clamp (5 mM heparin in the pipette), also reduced the Ca^{2+} transients by about 90% (Fig. 2e, h). Performing a 2-min patch-clamp recording without heparin had no effect ($n = 5$, not shown). These data suggest that BDNF activates glia cells through the induction of Ins(1,4,5) P_3 production, followed by Ca^{2+} release from intracellular stores and Ca^{2+} entry through store-operated Ca^{2+} channels.

In astrocytes, many agonists of Ins(1,4,5) P_3 -mediated Ca^{2+} signalling, including ATP acting through G-protein-coupled P2Y receptors, require the activation of phospholipase C (PLC)¹⁶. We therefore tested the PLC inhibitor U73122 and its inactive analogue U73343 (ref. 17). U73122 blocked both ATP- and BDNF-evoked Ca^{2+} signalling in astrocytes, whereas U73343 was ineffective (Fig. 2f, h). A general activator of heterotrimeric G proteins, AlF_4^- (ref. 18), induced an increase in baseline Ca^{2+} and prolonged Ca^{2+} transients in response to the first application of BDNF or ATP. During subsequent applications, Ca^{2+} transients were virtually abolished, indicating sustained G-protein activation by AlF_4^- and a lack of further activation by BDNF or ATP (Fig. 2g, h). Pertussis toxin, which inactivates α -subunits of the G_i - and G_o -protein families¹⁸, and PPI, a selective inhibitor of the non-receptor tyrosine kinase Src¹⁹, were ineffective (Fig. 2h). Together, these data suggest that BDNF activates PLC by activation of a G protein that is insensitive to pertussis toxin.

NT-4/5, which, like BDNF, mediates its biological actions through TrkB receptors²⁰, elicited Ca^{2+} transients that were similar to those evoked by BDNF (Fig. 3a). By contrast, NT-3, which preferentially binds to TrkC receptors²⁰, and nerve growth factor (NGF), which almost exclusively binds to TrkA receptors²⁰, did not elicit a response even at much higher concentrations ($n = 4$). This response profile indicates that the neurotrophin-induced Ca^{2+} signals in astrocytes are mediated by TrkB receptors. Unlike in neurons ($n = 9$), however, the tyrosine kinase blocker K-252a

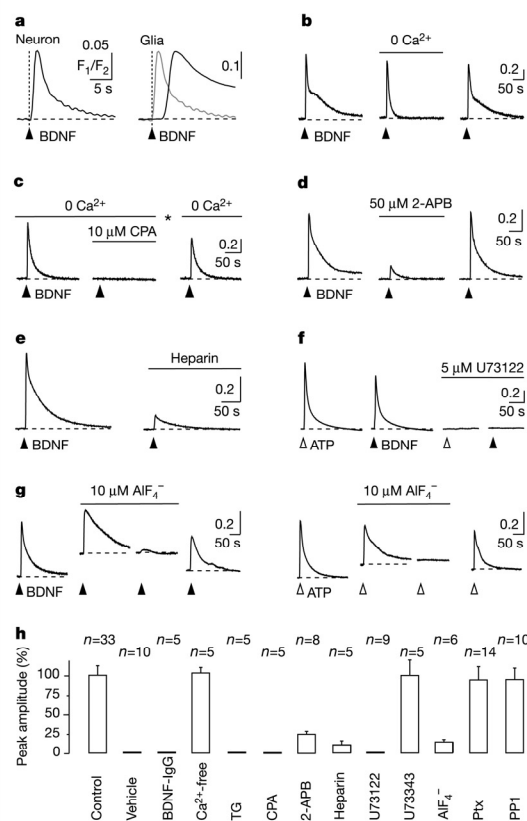


Figure 2 Mechanisms of BDNF-induced glia Ca^{2+} signals. **a**, Neuronal and glia Ca^{2+} signals have different delays. Left: neuronal Ca^{2+} transient induced BDNF (50 ng ml⁻¹, 100 ms). Right: glia Ca^{2+} transient induced by BDNF (25 ng ml⁻¹, 100 ms). The grey trace depicts the neuronal Ca^{2+} transient shown on the left. **b**, Removal of extracellular Ca^{2+} (0 Ca^{2+}) suppresses the slow component of the recovery phase. **c–e**, The endoplasmic Ca^{2+} -ATPase inhibitor CPA (**c**), and the Ins(1,4,5) P_3 receptor antagonists 2-APB (**d**) and heparin (**e**) block Ca^{2+} signals. Asterisk in **c** indicates a 5-min period of perfusion with Ca^{2+} -containing saline to refill intracellular stores. **f**, ATP- and BDNF-evoked Ca^{2+} signals are blocked by the PLC blocker U73122 (ATP application: 1 mM, 50 ms; BDNF: 25 ng ml⁻¹, 100 ms). **g**, Activation of heterotrimeric G proteins by AlF_4^- is sufficient to increase baseline Ca^{2+} and almost abolishes BDNF- and ATP-evoked Ca^{2+} transients. **h**, Histogram summarizing the effect of different manipulations on the peak amplitude of Ca^{2+} signals (values are the mean \pm s.e.m.). TG, 10 nM thapsigargin; Ptx, 100–500 ng ml⁻¹ pertussis toxin; PPI (src-kinase inhibitor), 20 μ M.

letters to nature

(ref. 21), which completely blocks TrkB^{FL}-mediated excitation of neurons⁵, did not block BDNF-induced Ca²⁺ signals in glia ($n = 8$; Fig. 3b). These data indicate that the BDNF-induced Ca²⁺ transients do not require the tyrosine kinase activity of TrkB^{FL}.

We compared the expression pattern of TrkB receptors in glia cells and neurons. In cultured astrocytes at 9 days *in vitro* (DIV), an antibody specific for TrkB-T1 showed substantial staining, whereas an antibody to the C-terminal kinase domain of full-length TrkB receptors showed almost no signal (Fig. 3d). By contrast, the kinase-specific TrkB antibody, but not the TrkB-T1 antibody, strongly stained cultured hippocampal neurons (6 DIV; Fig. 3d). Note that this result does not exclude the expression of TrkB-T2 in neurons, but the lack of an antibody specific for this receptor precluded its detection at the protein level.

We used an approach based on quantitative rapid-cycle real-time polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR) to estimate²² the copy number of TrkB transcripts per amount of glia RNA. We determined very low expression of the TrkB^{FL} and the TrkB-T2 isoforms, with an estimated 1–2 copies of each per glia cell. By contrast, the expression of TrkB-T1 was more than 100-fold higher (Fig. 3c). Western blot analysis confirmed the vast abundance of TrkB-T1 protein in cultured astrocytes (data not shown). Together, these results indicate that TrkB-T1, and not TrkB^{FL}, mediates the BDNF-induced glia Ca²⁺ transients.

To verify this hypothesis, we analysed mouse mutants in which the expression of TrkB^{FL} was eliminated ($trkB^{TK-/-}$)²³. Indeed, BDNF-induced Ca²⁺ signals were indistinguishable between astro-

cyte cultures from wild-type and those from $trkB^{TK-/-}$ mice ($n = 17$, Fig. 4a). In addition, whereas a BDNF-induced inward current was absent in neurons derived from $trkB^{TK-/-}$ mice, glia BDNF-induced currents were the same in wild-type and mutant mice (Fig. 4a, b). These data show that the BDNF-induced Ca²⁺ transients in glia cells do not require TrkB^{FL}.

To investigate further the involvement of TrkB-T1 receptors, we transiently transfected astrocytes with expression vectors encoding antisense TrkB-T1, TrkC or Na_v1.2 mRNA, together with a vector expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP) as a reporter for transfection⁶. Notably, the antisense TrkB-T1 construct contained the complete sequence for TrkB-T1 including the TrkB ligand-binding domain, which is identical in all three TrkB isoforms. In astrocytes transfected with the TrkB antisense vector, the amplitude of BDNF-evoked Ca²⁺ transients was reduced to about 45% of the amplitude of ATP-evoked Ca²⁺ signals in comparison to untransfected cultures (Fig. 4c, e). In astrocytes transfected with either the Na_v1.2 or TrkC antisense vector, the relation between the amplitude of BDNF-evoked Ca²⁺ signals and that of ATP-evoked Ca²⁺ signals was unchanged (Fig. 4e).

To verify the effectiveness of our antisense approach in reducing the protein quantities of the different TrkB isoforms, the TrkB^{FL}, TrkB-T1 or TrkB-T2 receptor was expressed in HEK-293 cells in the presence or absence of the TrkB antisense construct. Comparative immunostaining using a monoclonal antibody against the TrkB receptor domain showed that the expression of TrkB-T1 (Fig. 4d), as well as of TrkB^{FL} and TrkB-T2 (see Supplementary Information),

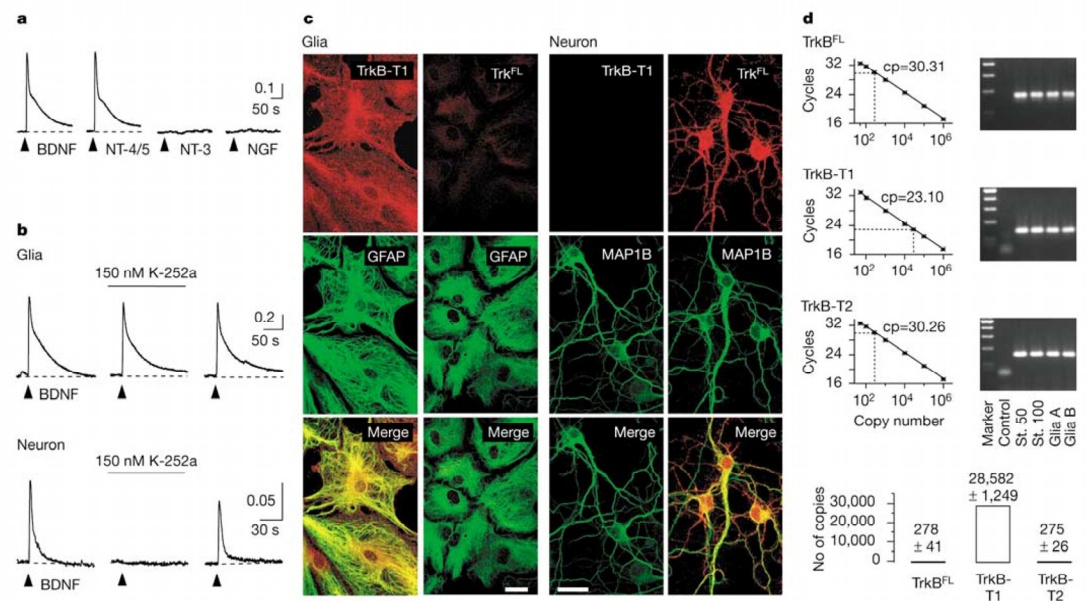


Figure 3 Distinct signalling roles of TrkB^{FL} and truncated TrkB receptors in neurons and glia. **a**, Actions of various neurotrophins in astrocytes. Application was for 150 ms at 20 ng ml⁻¹ (BDNF), 30 ng ml⁻¹ (NT-4/5), 150 ng ml⁻¹ (NT-3, NGF). **b**, Glia Ca²⁺ transients are insensitive to K-252a, whereas Ca²⁺ signals in hippocampal CA1 pyramidal neurons are blocked by K-252a. **c**, Left panels, GFAP-positive astrocytes (green) show substantial staining of TrkB-T1 (red), whereas staining of TrkB^{FL} (red) is barely above background. Right panels, MAP1B-positive cultured hippocampal neurons (green) show no staining for TrkB-T1, but stain strongly for TrkB^{FL} (red). Scale bar, 20 μ m. **d**, Quantitative RT-PCR analysis of TrkB expression in cultured astrocytes. Top left, copy

number of TrkB isoforms was determined by plotting the crossing points (cp; cycles) of the DNA standards (10⁰ to 50 copies) against their log concentration (copy number). For TrkB^{FL}, cp = 30.3 \pm 0.4; y intercept = 39.2. For TrkB-T1, cp = 23.1 \pm 0.2; y intercept = 39.0. For TrkB-T2, cp = 30.3 \pm 0.65; y intercept = 39.1 (mean \pm s.d., $n = 9$ for each isoform). Top right, agarose analysis of PCR products from the TrkB cDNA quantification. Marker, DNA markers; control, reaction without reverse transcriptase; st., standards (50 or 100 cDNA copies). Glia A and glia B are data from two different cultures. Bottom, histogram showing the mean \pm s.e.m. number of transcript copies of TrkB isoforms detected from in 13 ng of glia RNA.

was almost abolished in the presence of the antisense construct.

In conclusion, our study indicates that TrkB-T1 has an independent role in glia Ca^{2+} signalling. In our model (Fig. 4f), activation of TrkB-T1 by BDNF causes activation of a G protein that stimulates PLC, production of $Ins(1,4,5)P_3$, Ca^{2+} release from stores and Ca^{2+} entry from the extracellular space. A role for truncated Trk receptors in slow cellular signalling was indicated by earlier studies, which showed that activation of TrkB-T1 and TrkB-T2 increases the release of acidic metabolites²⁴ and that truncated TrkC receptors promote neuronal differentiation²⁵. Most studies, however, have emphasized the rather passive roles of truncated TrkB receptors as 'BDNF scavengers' or inhibitors of TrkB^{FL} signalling^{2,4,20}. A direct signalling role for TrkB-T1 receptors is unexpected, because they have short intracellular carboxy-terminal tails and no intrinsic catalytic activity^{26,27}. It is therefore possible that, as for the non-catalytic receptor p75^{NTR} (ref. 28), additional interacting factors are required. So far, however, only one cytoplasmatic protein has been identified to bind TrkB-T1 (ref. 29). Alternatively, TrkB-T1

might interact with other membrane-spanning receptors. Regardless of the transduction mechanism, TrkB-T1-mediated Ca^{2+} release represents a previously unknown form of neurotrophin-evoked rapid cellular signalling and may be the dominating mechanism of neurotrophin-dependent glia activation in the brain. Because astrocytic Ca^{2+} signals modulate neuronal activity and activate other types of glia cell¹⁰, BDNF emerges as a conceivable candidate for mediating neuron–glia interactions in the intact brain. □

Methods

Ca²⁺ imaging

Experiments were done at room temperature (22–24 °C). BDNF, NT-4/5, NT-3 and NGF (Sigma) were diluted in 'vehicle' (physiological saline containing 0.002% bovine serum albumin). Neurotrophins and ATP were applied for 20–150 ms to single cells by a Picospritzer (General Valve) coupled to standard micropipettes. *trkB^{TK-/-}* mice²³ were purchased from Jackson Laboratories. For Ca^{2+} imaging experiments in astrocyte cultures, we list the number (*n*) of experiments, which each represent data from 20–30 individual cells. Data are expressed as the mean ± s.e.m. unless otherwise indicated. Cultured glia cells (9–15 DIV) and CA1 pyramidal neurons of hippocampal slices (P8–P10) were loaded with Fura-2-AM. Background-corrected fluorescence images were acquired by a digital imaging system (TILL Photonics) at excitation wavelengths of 355 and 380 nm. On the basis of an *in vitro* calibration, the estimated baseline Ca^{2+} concentration ranged from 50 to 100 nM and the peak amplitude of BDNF-evoked Ca^{2+} increases from 400 to 800 nM. Ca^{2+} imaging in glia cells in slices (P8–P15) was done by two-photon laser-scanning microscopy. Hippocampal glia cells were passively loaded with Fura-2-AM, and Bergmann glia cells were filled with Fura-2 via a patch pipette. Images were acquired at 4–8 Hz, corrected for background and analysed off-line with a custom-written routine in LabView (National Instruments).

Preparation of cell cultures and tissue slices and electrophysiology

Cell cultures were prepared from hippocampi of newborn Sprague-Dawley rats. Neurons were cultured on poly-L-lysine (PLL)-coated glass coverslips in Neurobasal Medium containing B27 supplement (Life Technologies). Glia cultures were seeded on poly-D-lysine (PDL)-coated glass coverslips in DMEM/F12 containing 5% fetal calf serum and G-5 supplement (Life Technologies). During Ca^{2+} -imaging experiments, cultured glia cells (confluent, 9–15 DIV) were perfused with saline containing (in mM): 125 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 2 $CaCl_2$, 2 $MgSO_4$, 10 glucose, 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH). Hippocampal and cerebellar slices (300 μm) from Wistar rats ages 9–15 d and whole-cell patch-clamp recordings were done as described³. Combined imaging and electrophysiological studies of glia cells were done with an intracellular solution containing (in mM): 4 NaCl, 150 KCl, 10 HEPES, 0.4 GTP, 4 Mg-ATP and 0.1 mM Fura-2 (Molecular Probes); pH 7.3. For experiments in hippocampal slices with subsequent immunocytochemical staining, we used 2 mM AlexaFluor-488 (Molecular Probes) instead of Fura-2. Whole-cell recordings of neurons were done as described³.

Immunocytochemistry

Cells were fixed with 2% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde and incubated in blocking buffer. We used the following primary antibodies: rabbit anti-TrkB (raised against the C terminus, gp140; C14/sc-139, Santa Cruz), diluted 1:500; rabbit anti-TrkB[TK-] (C terminus, gp95; C13/sc-119, Santa Cruz), diluted 1:200; mouse anti-GFAP (Sigma) 1:500, and mouse anti-MAP1B (Chemicon), diluted 1:200 in blocking buffer. As secondary antibodies, Cy3-labelled goat anti-rabbit (Dianova) and Alexa488-labelled goat anti-mouse (Molecular Probes) were used. Confocal images were taken with a Fluoview 300 system (Olympus).

Quantitative rapid-cycle real-time RT-PCR

Total RNA was purified from three different glia cultures at 7–9 DIV and reverse-transcribed with Superscript (Invitrogen) and the following primers. TrkB-kinase (EMBL/GenBank m55291): 2026-for, 5'-GTTGGCGAGACATCCAAG-3'; kin-2204-rev, 5'-GGGGTTTCAATGACAGG-3'. TrkB-T1 (EMBL/GenBank m55292): 1720-for, 5'-GGGAGCATCTCTCGGTCT-3'; T1-1862-rev, 5'-AGGGGATCTATGAACAAA-3'. TrkB-T2 (EMBL/GenBank m55293): 1386-for, 5'-CGGGAGCATCTCTCGGTCT-3'; T2-1538-rev, 5'-TCCACTTAAGAGCAAAATAGC-3'. To generate standards, cloned complementary DNAs were quantified by their absorbance at 260 nm and were then adjusted to represent from 10⁶ to 50 single-stranded cDNA copies. Rapid-cycle PCR was done on a LightCycler (Roche) with an equivalent of 13 ng of glia RNA per reaction. To estimate the total amount of the different TrkB transcripts, we analysed the fluorescence of SYBR Green I, which binds to double-stranded PCR products, in the log-linear phase using the 'fit point' method with standards chosen to represent similar cDNA copy numbers³².

Antisense transfection

Rat TrkB-T1 cDNA was cloned in the expression vector pCAGGS (ref. 30). We cloned the corresponding cDNA of the TrkC receptor as a negative control and used a cDNA fragment of the sodium channel Na_v1.2 in the vector³ as a nonsense control. The vectors and a pCAGGS-eGFP vector were cotransfected in a molar ratio of 10:1 into glia cells at 5–6 DIV. Antisense mRNA and enhanced green fluorescent protein (eGFP) were expressed for 72–96 h before the Ca^{2+} imaging experiments were carried out.

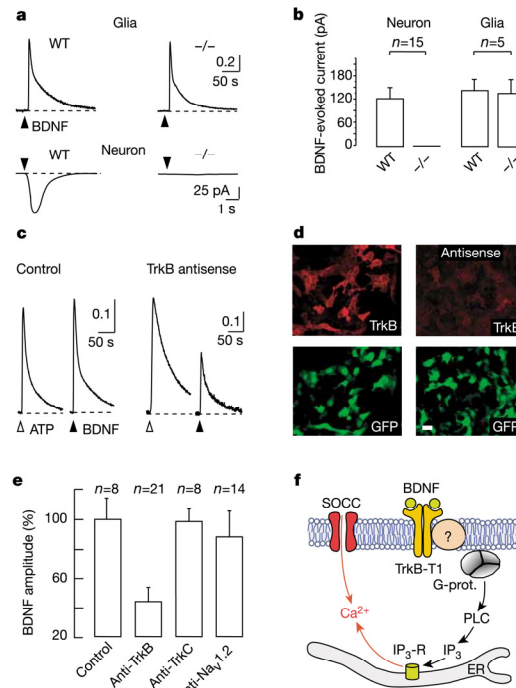


Figure 4 BDNF-evoked glia Ca^{2+} signalling through truncated TrkB-T1 receptors. **a**, Ca^{2+} transients persist in astrocytes derived from mutant mice that lack TrkB^{FL} (–/–), whereas BDNF-evoked current is absent in cultured hippocampal neurons derived from these mice. **b**, Histogram showing the mean ± s.e.m. amplitude of BDNF-evoked currents in neurons and glia cells derived from wild-type and *trkB^{TK-/-}* (–/–) mice. **c**, Antisense TrkB expression causes a strong reduction of Ca^{2+} transients evoked by BDNF (25 ng ml⁻¹, 100 ms) as compared with Ca^{2+} transients induced by ATP (1 mM, 50 ms). **d**, Heterologous expression of TrkB-T1 receptors in HEK-293 cells is strongly reduced by co-transfection with antisense TrkB. Scale bar, 10 μm. **e**, Histogram showing mean ± s.e.m. values of the amplitude of BDNF-induced Ca^{2+} signals as compared with ATP-evoked Ca^{2+} signals in control and antisense-transfected glia cultures. **f**, Model of the mechanism of BDNF-induced Ca^{2+} signalling in glia cells. SOCC, store-operated calcium channel; G-prot., G protein.

letters to nature

The transfection efficiency was around 25%, as judged by the number of cells expressing eGFP. Because astrocytes show extensive intercellular Ca^{2+} signalling³⁹, signals from all cells in the field of view were averaged during imaging experiments.

To verify the efficiency of Trk antisense mRNA expression, we expressed the TrkB^{FL}, TrkB-T1 or TrkB-T2 receptor in HEK-293 cells in the presence or the absence of the TrkB-T1 antisense construct. The reduction of all TrkB protein isoforms by antisense TrkB-T1 mRNA was shown by comparative immunostaining with a monoclonal antibody against the TrkB receptor domain (clone 47; BD Transduction Laboratories).

Received 24 March; accepted 6 August 2003; doi:10.1038/nature01983.

1. Bonhoeffer, T. Neurotrophins and activity-dependent development of the neocortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 119–126 (1996).
2. Thoenen, H. Neurotrophins and activity-dependent plasticity. *Prog. Brain Res.* **128**, 183–191 (2000).
3. Bibel, M. & Barde, Y. A. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* **14**, 2919–2937 (2000).
4. Patapoutian, A. & Reichardt, L. F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 272–280 (2001).
5. Kafitz, K. W., Rose, C. R., Thoenen, H. & Konnerth, A. Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature* **401**, 918–921 (1999).
6. Blum, R., Kafitz, K. W. & Konnerth, A. Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel $Na_v1.9$. *Nature* **419**, 687–693 (2002).
7. Verkhratsky, A., Orkand, R. K. & Kettenmann, H. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol. Rev.* **78**, 99–141 (1998).
8. Bezzi, P. & Volterra, A. A neuron–glia signalling network in the active brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 387–394 (2001).
9. Haydon, P. Glia: listening and talking to the synapse. *Nature Neurosci. Rev.* **2**, 185–193 (2001).
10. Newman, E. A. Calcium signaling in retinal glial cells and its effect on neuronal activity. *Prog. Brain Res.* **132**, 241–254 (2001).
11. Kovalchuk, Y., Hanse, E., Kafitz, K. W. & Konnerth, A. Postsynaptic induction of BDNF-mediated long-term potentiation. *Science* **295**, 1729–1734 (2002).
12. Roback, J. D., Marsh, H. N., Downen, M., Palfrey, H. C. & Wainer, B. H. BDNF-activated signal transduction in rat cortical glial cells. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 849–862 (1995).
13. Climent, E., Sancho-Tello, M., Minana, R., Barattino, D. & Guerri, C. Astrocytes in culture express the full-length TrkB receptor and respond to brain derived neurotrophic factor by changing intracellular calcium levels: effect of ethanol exposure in rats. *Neurosci. Lett.* **288**, 53–56 (2000).
14. Li, H. S., Xu, X. Z. & Montell, C. Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. *Neuron* **24**, 261–273 (1999).
15. Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T. & Mikoshiba, K. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca^{2+} -release. *J. Biochem.* **122**, 498–505 (1997).
16. Idstrup, C. P. & Salter, M. W. P2Y and P2U receptors differentially release intracellular Ca^{2+} via the phospholipase C/inositol 1,4,5-triphosphate pathway in astrocytes from the dorsal spinal cord. *Neuroscience* **86**, 913–923 (1998).
17. Smith, R. et al. Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**, 688–697 (1990).
18. Helms, J. B. Role of heterotrimeric GTP binding proteins in vesicular protein transport: indications for both classical and alternative G protein cycles. *FEBS Lett.* **369**, 84–88 (1995).
19. Hanke, J. H. et al. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J. Biol. Chem.* **271**, 695–701 (1996).
20. Barbacid, M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 148–155 (1995).
21. Knüsel, B. & Heffli, F. K-252 compounds: modulators of neurotrophin signal transduction. *J. Neurochem.* **59**, 1987–1996 (1992).
22. Rasmussen, R. in *Rapid Cycle Real-time PCR* (eds Meuer, S., Wittwer, C. & Nakagawara, K.) 21–34 (Springer, Berlin, 2001).
23. Klein, R. et al. Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* **75**, 113–122 (1993).
24. Baxter, G. T. et al. Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB.T1 and trkB.T2. *J. Neurosci.* **17**, 2683–2690 (1997).
25. Hapner, S. J., Boeshore, K. L., Large, T. H. & Lefcort, F. Neural differentiation promoted by truncated trkB receptors in collaboration with p75^{NTR}. *Dev. Biol.* **201**, 90–100 (1998).
26. Klein, R., Conway, D., Parada, L. F. & Barbacid, M. The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* **61**, 647–656 (1990).
27. Middlemas, D. S., Lindberg, R. A. & Hunter, T. trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol. Cell. Biol.* **1991**, 143–153 (1991).
28. Dechant, G. & Barde, Y. A. The neurotrophin receptor p75^{NTR}: novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nature Neurosci.* **5**, 1131–1136 (2002).
29. Kryl, D. & Barker, P. A. TTIP is a novel protein that interacts with the truncated T1 TrkB neurotrophin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 925–930 (2000).
30. Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193–199 (1991).

Supplementary Information accompanies the paper on www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank H. Thoenen for critically discussing the manuscript; T. Hunter for the TrkB cDNA isoforms; J.-i. Miyazaki for pCAGGS and pCAGGS-eGFP; M. Meyer for help with the knockout mice; and I. Schneider, R. Maul and I. Mühlhahn for technical assistance. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (to C.R.R. and A.K.).

Competing interests statement The authors declare that they have no competing financial interests.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.R.R. (rose@lrz.uni-muenchen.de) or A.K. (konnerth@lrz.uni-muenchen.de).

12 Literaturverzeichnis

- Alderson, R. F., Curtis, R., Alterman, A. L., Lindsay, R. M. und DiStefano, P. S. (2000):** Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro, *Brain Res* (Band 871), Nr. 2, Seite 210-22.
- Allendoerfer, K. L., Cabelli, R. J., Escandon, E., Kaplan, D. R., Nikolics, K. und Shatz, C. J. (1994):** Regulation of neurotrophin receptors during the maturation of the mammalian visual system, *J Neurosci* (Band 14), Nr. 3 Pt 2, Seite 1795-811.
- Aloe, L. (2004):** Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology, *Trends Cell Biol* (Band 14), Nr. 7, Seite 395-9.
- Althaus, H. H. und Richter-Landsberg, C. (2000):** Glial cells as targets and producers of neurotrophins, *Int Rev Cytol* (Band 197), Seite 203-77.
- Apfel, S. C. (2002):** Is the therapeutic application of neurotrophic factors dead?, *Ann Neurol* (Band 51), Nr. 1, Seite 8-11.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P. und Haydon, P. G. (1999):** Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner, *Trends Neurosci* (Band 22), Nr. 5, Seite 208-15.
- Araque, A. und Perea, G. (2004):** Glial modulation of synaptic transmission in culture, *Glia* (Band 47), Nr. 3, Seite 241-8.
- Barbacid, M. (1994):** The Trk family of neurotrophin receptors, *J Neurobiol* (Band 25), Nr. 11, Seite 1386-403.
- Barbacid, M. (1995):** Neurotrophic factors and their receptors, *Curr Opin Cell Biol* (Band 7), Nr. 2, Seite 148-55.
- Barde, Y. A., Edgar, D. und Thoenen, H. (1982):** Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain, *Embo J* (Band 1), Nr. 5, Seite 549-53.
- Baxter, G. T., Radeke, M. J., Kuo, R. C., Makrides, V., Hinkle, B., Hoang, R., Medina-Selby, A., Coit, D., Valenzuela, P. und Feinstein, S. C. (1997):** Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB.T1 and trkB.T2, *J Neurosci* (Band 17), Nr. 8, Seite 2683-90.
- Beck, A., Nieden, R. Z., Schneider, H. P. und Deitmer, J. W. (2004):** Calcium release from intracellular stores in rodent astrocytes and neurons in situ, *Cell Calcium* (Band 35), Nr. 1, Seite 47-58.
- Berg, M. M., Sternberg, D. W., Parada, L. F. und Chao, M. V. (1992):** K-252a inhibits nerve growth factor-induced trk proto-oncogene tyrosine phosphorylation and kinase activity, *J Biol Chem* (Band 267), Nr. 1, Seite 13-6.
- Berkemeier, L. R., Winslow, J. W., Kaplan, D. R., Nikolics, K., Goeddel, D. V. und**

- Rosenthal, A. (1991):** Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB, *Neuron* (Band 7), Nr. 5, Seite 857-66.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. und Roderick, H. L. (2003):** Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 4), Nr. 7, Seite 517-29.
- Bezzi, P. und Volterra, A. (2001):** A neuron-glia signalling network in the active brain, *Curr Opin Neurobiol* (Band 11), Nr. 3, Seite 387-94.
- Bibel, M. und Barde, Y. A. (2000):** Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system, *Genes Dev* (Band 14), Nr. 23, Seite 2919-37.
- Bibel, M., Hoppe, E. und Barde, Y. A. (1999):** Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR, *Embo J* (Band 18), Nr. 3, Seite 616-22.
- Blum, R., Kafitz, K. W. und Konnerth, A. (2002):** Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9, *Nature* (Band 419), Nr. 6908, Seite 687-93.
- Blum, R. und Konnerth, A. (2005):** Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions, *Physiology (Bethesda)* (Band 20), Seite 70-8.
- Chao, M. V. (2003):** Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways, *Nat Rev Neurosci* (Band 4), Nr. 4, Seite 299-309.
- Chao, M. V. und Hempstead, B. L. (1995):** p75 and Trk: a two-receptor system, *Trends Neurosci* (Band 18), Nr. 7, Seite 321-6.
- Climent, E., Sancho-Tello, M., Minana, R., Baretino, D. und Guerri, C. (2000):** Astrocytes in culture express the full-length Trk-B receptor and respond to brain derived neurotrophic factor by changing intracellular calcium levels: effect of ethanol exposure in rats, *Neurosci Lett* (Band 288), Nr. 1, Seite 53-6.
- Cohen, S. (1960):** Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 46), Nr. 3, Seite 302-311.
- Cohen, S. und Levi-Montalcini, R. (1956):** A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Snake Venom, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 42), Nr. 9, Seite 571-574.
- Cohen, S. und Levi-Montalcini, R. (1957):** Purification and properties of a nerve growth-promoting factor isolated from mouse sarcoma 180, *Cancer Res* (Band 17), Nr. 1, Seite 15-20.
- Condorelli, D. F., Dell'Albani, P., Mudo, G., Timmusk, T. und Belluardo, N. (1994):** Expression of neurotrophins and their receptors in primary astroglial cultures: induction by cyclic AMP-elevating agents, *J Neurochem* (Band 63), Nr. 2, Seite

509-16.

- Conover, J. C. und Yancopoulos, G. D. (1997):** Neurotrophin regulation of the developing nervous system: analyses of knockout mice, *Rev Neurosci* (Band 8), Nr. 1, Seite 13-27.
- 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* (Band 247), Nr. 4941, Seite 470-3.
- Crowley, C., Spencer, S. D., Nishimura, M. C., Chen, K. S., Pitts-Meek, S., Armanini, M. P., Ling, L. H., MacMahon, S. B., Shelton, D. L., Levinson, A. D. und et al. (1994):** Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons, *Cell* (Band 76), Nr. 6, Seite 1001-11.
- Dechant, G. (2001):** Molecular interactions between neurotrophin receptors, *Cell Tissue Res* (Band 305), Nr. 2, Seite 229-38.
- Deitmer, J. W., Verkhratsky, A. J. und Lohr, C. (1998):** Calcium signalling in glial cells, *Cell Calcium* (Band 24), Nr. 5-6, Seite 405-16.
- Dietrich, P. Y., Walker, P. R. und Saas, P. (2003):** Death receptors on reactive astrocytes: a key role in the fine tuning of brain inflammation?, *Neurology* (Band 60), Nr. 4, Seite 548-54.
- Duffy, S. und MacVicar, B. A. (1995):** Adrenergic calcium signaling in astrocyte networks within the hippocampal slice, *J Neurosci* (Band 15), Nr. 8, Seite 5535-50.
- Durany, N. und Thome, J. (2004):** Neurotrophic factors and the pathophysiology of schizophrenic psychoses, *Eur Psychiatry* (Band 19), Nr. 6, Seite 326-37.
- Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B. und Takahashi, T. (1989):** A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system, *Pflugers Arch* (Band 414), Nr. 5, Seite 600-12.
- Eide, F. F., Vining, E. R., Eide, B. L., Zang, K., Wang, X. Y. und Reichardt, L. F. (1996):** Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling, *J Neurosci* (Band 16), Nr. 10, Seite 3123-9.
- Epa, W. R., Markovska, K. und Barrett, G. L. (2004):** The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation, *J Neurochem* (Band 89), Nr. 2, Seite 344-53.
- Eriksdotter Jonhagen, M., Nordberg, A., Amberla, K., Backman, L., Ebendal, T., Meyerson, B., Olson, L., Seiger, Shigeta, M., Theodorsson, E., Viitanen, M., Winblad, B. und Wahlund, L. O. (1998):** Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease, *Dement Geriatr Cogn*

Disord (Band 9), Nr. 5, Seite 246-57.

Escandon, E., Soppet, D., Rosenthal, A., Mendoza-Ramirez, J. L., Szonyi, E., Burton, L. E., Henderson, C. E., Parada, L. F. und Nikolics, K. (1994): Regulation of neurotrophin receptor expression during embryonic and postnatal development, *J Neurosci* (Band 14), Nr. 4, Seite 2054-68.

Esposito, D., Patel, P., Stephens, R. M., Perez, P., Chao, M. V., Kaplan, D. R. und Hempstead, B. L. (2001): The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 35, Seite 32687-95.

Farinas, I., Jones, K. R., Backus, C., Wang, X. Y. und Reichardt, L. F. (1994): Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking neurotrophin-3, *Nature* (Band 369), Nr. 6482, Seite 658-61.

Fields, R. D. und Stevens-Graham, B. (2002): New insights into neuron-glia communication, *Science* (Band 298), Nr. 5593, Seite 556-62.

Frisen, J., Verge, V. M., Cullheim, S., Persson, H., Fried, K., Middlemas, D. S., Hunter, T., Hokfelt, T. und Risling, M. (1992): Increased levels of trkB mRNA and trkB protein-like immunoreactivity in the injured rat and cat spinal cord, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 89), Nr. 23, Seite 11282-6.

Frisen, J., Verge, V. M., Fried, K., Risling, M., Persson, H., Trotter, J., Hokfelt, T. und Lindholm, D. (1993): Characterization of glial trkB receptors: differential response to injury in the central and peripheral nervous systems, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 90), Nr. 11, Seite 4971-5.

Fryer, R. H., Kaplan, D. R. und Kromer, L. F. (1997): Truncated trkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in vitro, *Exp Neurol* (Band 148), Nr. 2, Seite 616-27.

Giaume, C. und Venance, L. (1998): Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes, *Glia* (Band 24), Nr. 1, Seite 50-64.

Giehl, K. M. und Tetzlaff, W. (1996): BDNF and NT-3, but not NGF, prevent axotomy-induced death of rat corticospinal neurons in vivo, *Eur J Neurosci* (Band 8), Nr. 6, Seite 1167-75.

Golovina, V. A. (2005): Visualization of localized store-operated calcium entry in mouse astrocytes. Close proximity to the endoplasmic reticulum, *J Physiol* (Band 564), Nr. Pt 3, Seite 737-49.

Grynkiewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R. Y. (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J Biol Chem* (Band 260), Nr. 6, Seite 3440-50.

Hallböök, F. (1999): Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene

- families, *Curr Opin Neurobiol* (Band 9), Nr. 5, Seite 616-21.
- Hannila, S. S., Lawrance, G. M., Ross, G. M. und Kawaja, M. D. (2004):** TrkA and mitogen-activated protein kinase phosphorylation are enhanced in sympathetic neurons lacking functional p75 neurotrophin receptor expression, *Eur J Neurosci* (Band 19), Nr. 10, Seite 2903-8.
- Hashimoto, K., Shimizu, E. und Iyo, M. (2004):** Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders, *Brain Res Brain Res Rev* (Band 45), Nr. 2, Seite 104-14.
- Haugland, R.P. (2005):** *The Handbook. A guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. Tenth Edition, Molecular Probes / Invitrogen Corp., Eugene, Oregon, ISBN: 0-9710636-4-8.*
- Haydon, P. G. (2001):** GLIA: listening and talking to the synapse, *Nat Rev Neurosci* (Band 2), Nr. 3, Seite 185-93.
- He, X. L. und Garcia, K. C. (2004):** Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75, *Science* (Band 304), Nr. 5672, Seite 870-5.
- Hefti, Franz (1997):** PHARMACOLOGY OF NEUROTROPHIC FACTORS, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Band 37), Nr. 1, Seite 239-267.
- Helmchen, F. (2000):** Calibration of Fluorescent Calcium Indicators, in: Yuste, R., Lanni, F. und Konnerth, A., *Imaging Neurons. A Laboratory Manual*, Seite 32.1-32.9, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Hempstead, B. L. (2002):** The many faces of p75NTR, *Curr Opin Neurobiol* (Band 12), Nr. 3, Seite 260-7.
- Hempstead, B. L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D. R., Parada, L. F. und Chao, M. V. (1991):** High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor, *Nature* (Band 350), Nr. 6320, Seite 678-83.
- Hertz, L. und Zielke, H. R. (2004):** Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show, *Trends Neurosci* (Band 27), Nr. 12, Seite 735-43.
- Hofer, T., Venance, L. und Giaume, C. (2002):** Control and plasticity of intercellular calcium waves in astrocytes: a modeling approach, *J Neurosci* (Band 22), Nr. 12, Seite 4850-9.
- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K. und Barde, Y. A. (1990):** Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family, *Nature* (Band 344), Nr. 6264, Seite 339-41.
- Horner, P. J. und Gage, F. H. (2000):** Regenerating the damaged central nervous system, *Nature* (Band 407), Nr. 6807, Seite 963-70.
- Hua, X., Malarkey, E. B., Sunjara, V., Rosenwald, S. E., Li, W. H. und Parpura, V. (2004):** C(a²⁺)-dependent glutamate release involves two classes of endoplasmic reticulum Ca(2⁺) stores in astrocytes, *J Neurosci Res* (Band 76), Nr. 1, Seite 86-

- Ip, N. Y., Ibanez, C. F., Nye, S. H., McClain, J., Jones, P. F., Gies, D. R., Belluscio, L., Le Beau, M. M., Espinosa, R., 3rd, Squinto, S. P. und et al. (1992):** Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 89), Nr. 7, Seite 3060-4.
- Kafitz, K. W., Rose, C. R., Thoenen, H. und Konnerth, A. (1999):** Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors, *Nature* (Band 401), Nr. 6756, Seite 918-21.
- Kalb, R. (2005):** The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons, *Trends Neurosci* (Band 28), Nr. 1, Seite 5-11.
- Kang, J., Jiang, L., Goldman, S. A. und Nedergaard, M. (1998):** Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission, *Nat Neurosci* (Band 1), Nr. 8, Seite 683-92.
- Katerinopoulos, H. E. und Foukaraki, E. (2002):** Polycarboxylate fluorescent indicators as ion concentration probes in biological systems, *Curr Med Chem* (Band 9), Nr. 2, Seite 275-306.
- Klein, R., Conway, D., Parada, L. F. und Barbacid, M. (1990):** The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain, *Cell* (Band 61), Nr. 4, Seite 647-56.
- Klein, R., Smeyne, R. J., Wurst, W., Long, L. K., Auerbach, B. A., Joyner, A. L. und Barbacid, M. (1993):** Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death, *Cell* (Band 75), Nr. 1, Seite 113-22.
- Knusel, B. und Hefti, F. (1992):** K-252 compounds: modulators of neurotrophin signal transduction, *J Neurochem* (Band 59), Nr. 6, Seite 1987-96.
- Kryl, D. und Barker, P. A. (2000):** TTIP is a novel protein that interacts with the truncated T1 TrkB neurotrophin receptor, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 279), Nr. 3, Seite 925-30.
- Lambrecht, G., Friebe, T., Grimm, U., Windscheif, U., Bungardt, E., Hildebrandt, C., Baumert, H. G., Spatz-Kumbel, G. und Mutschler, E. (1992):** PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses, *Eur J Pharmacol* (Band 217), Nr. 2-3, Seite 217-9.
- Lee, F. S., Kim, A. H., Khursigara, G. und Chao, M. V. (2001):** The uniqueness of being a neurotrophin receptor, *Curr Opin Neurobiol* (Band 11), Nr. 3, Seite 281-6.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K. und Hempstead, B. L. (2001):** Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins, *Science* (Band 294), Nr. 5548, Seite 1945-8.

- Lessmann, V., Gottmann, K. und Malsangio, M. (2003):** Neurotrophin secretion: current facts and future prospects, *Prog Neurobiol* (Band 69), Nr. 5, Seite 341-74.
- Levi-Montalcini, R. (1987):** The nerve growth factor 35 years later, *Science* (Band 237), Nr. 4819, Seite 1154-62.
- Levi-Montalcini, R., Dal Toso, R., della Valle, F., Skaper, S. D. und Leon, A. (1995):** Update of the NGF saga, *J Neurol Sci* (Band 130), Nr. 2, Seite 119-27.
- Lewin, G. R. und Barde, Y. A. (1996):** Physiology of the neurotrophins, *Annu Rev Neurosci* (Band 19), Seite 289-317.
- Li, H. S., Xu, X. Z. und Montell, C. (1999):** Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF, *Neuron* (Band 24), Nr. 1, Seite 261-73.
- Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Friedman, B., Alderson, R. F., Wiegand, S. J., Furth, M. E., Lindsay, R. M. und Yancopoulos, G. D. (1990):** NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression, *Neuron* (Band 5), Nr. 4, Seite 501-9.
- Maisonpierre, P. C., Le Beau, M. M., Espinosa, R., 3rd, Ip, N. Y., Belluscio, L., de la Monte, S. M., Squinto, S., Furth, M. E. und Yancopoulos, G. D. (1991):** Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations, *Genomics* (Band 10), Nr. 3, Seite 558-68.
- Majdan, M. und Miller, F. D. (1999):** Neuronal life and death decisions functional antagonism between the Trk and p75 neurotrophin receptors, *Int J Dev Neurosci* (Band 17), Nr. 3, Seite 153-61.
- Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T. und Mikoshiba, K. (1997):** 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release, *J Biochem (Tokyo)* (Band 122), Nr. 3, Seite 498-505.
- Matyash, V., Filippov, V., Mohrhagen, K. und Kettenmann, H. (2001):** Nitric oxide signals parallel fiber activity to Bergmann glial cells in the mouse cerebellar slice, *Mol Cell Neurosci* (Band 18), Nr. 6, Seite 664-70.
- Middlemas, D. S., Lindberg, R. A. und Hunter, T. (1991):** trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors, *Mol Cell Biol* (Band 11), Nr. 1, Seite 143-53.
- Mowla, S. J., Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G. und Murphy, R. A. (2001):** Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 16, Seite 12660-6.
- Nassenstein, C., Kerzel, S. und Braun, A. (2004):** Neurotrophins and neurotrophin receptors in allergic asthma, *Prog Brain Res* (Band 146), Seite 347-67.

- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T. E., Hempstead, B. L. und Petersen, C. M. (2004):** Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death, *Nature* (Band 427), Nr. 6977, Seite 843-8.
- Nykjaer, A., Willnow, T. E. und Petersen, C. M. (2005):** p75NTR--live or let die, *Curr Opin Neurobiol* (Band 15), Nr. 1, Seite 49-57.
- Ochs, G., Penn, R. D., York, M., Giess, R., Beck, M., Tonn, J., Haigh, J., Malta, E., Traub, M., Sendtner, M. und Toyka, K. V. (2000):** A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* (Band 1), Nr. 3, Seite 201-6.
- Offenhauser, N., Muzio, V. und Biffo, S. (2002):** BDNF binding to truncated trkB.T1 does not affect gene expression, *Neuroreport* (Band 13), Nr. 9, Seite 1189-93.
- Ohira, K., Kumanogoh, H., Sahara, Y., Homma, K. J., Hirai, H., Nakamura, S. und Hayashi, M. (2005):** A truncated tropo-myosine-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1, *J Neurosci* (Band 25), Nr. 6, Seite 1343-53.
- Ohira, K., Shimizu, K. und Hayashi, M. (1999):** Change of expression of full-length and truncated TrkB in the developing monkey central nervous system, *Brain Res Dev Brain Res* (Band 112), Nr. 1, Seite 21-9.
- Pardridge, W. M. (2005):** The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development, *NeuroRx* (Band 2), Nr. 1, Seite 3-14.
- Parekh, A. B. und Putney, J. W., Jr. (2005):** Store-operated calcium channels, *Physiol Rev* (Band 85), Nr. 2, Seite 757-810.
- Parpura, V., Basarsky, T. A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S. und Haydon, P. G. (1994):** Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling, *Nature* (Band 369), Nr. 6483, Seite 744-7.
- Pekny, M. und Nilsson, M. (2005):** Astrocyte activation and reactive gliosis, *Glia* (Band 50), Nr. 4, Seite 427-34.
- Porter, J. T. und McCarthy, K. D. (1996):** Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals, *J Neurosci* (Band 16), Nr. 16, Seite 5073-81.
- Prakriya, M. und Lewis, R. S. (2001):** Potentiation and inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP₃ receptors, *J Physiol* (Band 536), Nr. Pt 1, Seite 3-19.
- Privat, A. (2003):** Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals, *Glia* (Band 43), Nr. 1, Seite 91-3.

- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O. und Williams, S. M. (2004):** Neuroscience, Third Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, ISBN: 0-87893-725-0.
- Putney, J. W., Jr., Broad, L. M., Braun, F. J., Lievremont, J. P. und Bird, G. S. (2001):** Mechanisms of capacitative calcium entry, J Cell Sci (Band 114), Nr. Pt 12, Seite 2223-9.
- Ransom, B., Behar, T. und Nedergaard, M. (2003):** New roles for astrocytes (stars at last), Trends Neurosci (Band 26), Nr. 10, Seite 520-2.
- Reichardt, L. F. (2003):** Neurobiology: signals that make waves, Nature (Band 426), Nr. 6962, Seite 25-6.
- Roback, J. D., Marsh, H. N., Downen, M., Palfrey, H. C. und Wainer, B. H. (1995):** BDNF-activated signal transduction in rat cortical glial cells, Eur J Neurosci (Band 7), Nr. 5, Seite 849-62.
- Rose, C. R., Blum, R., Kafitz, K. W., Kovalchuk, Y. und Konnerth, A. (2004):** From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels, Bioessays (Band 26), Nr. 11, Seite 1185-94.
- Rose, C. R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K. W. und Konnerth, A. (2003):** Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells, Nature (Band 426), Nr. 6962, Seite 74-8.
- Rose, C. R. und Ransom, B. R. (1996):** Intracellular sodium homeostasis in rat hippocampal astrocytes, J Physiol (Band 491 (Pt 2)), Seite 291-305.
- Rose, C. R. und Ransom, B. R. (1997):** Gap junctions equalize intracellular Na⁺ concentration in astrocytes, Glia (Band 20), Nr. 4, Seite 299-307.
- Rudge, J. S., Li, Y., Pasnikowski, E. M., Mattsson, K., Pan, L., Yancopoulos, G. D., Wiegand, S. J., Lindsay, R. M. und Ip, N. Y. (1994):** Neurotrophic factor receptors and their signal transduction capabilities in rat astrocytes, Eur J Neurosci (Band 6), Nr. 5, Seite 693-705.
- Saarelainen, T., Lukkarinen, J. A., Koponen, S., Grohn, O. H., Jolkkonen, J., Koponen, E., Haapasalo, A., Alhonen, L., Wong, G., Koistinaho, J., Kauppinen, R. A. und Castren, E. (2000):** Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons show increased susceptibility to cortical injury after focal cerebral ischemia, Mol Cell Neurosci (Band 16), Nr. 2, Seite 87-96.
- Salter, M. W. und Hicks, J. L. (1995):** ATP causes release of intracellular Ca²⁺ via the phospholipase C beta/IP₃ pathway in astrocytes from the dorsal spinal cord, J Neurosci (Band 15), Nr. 4, Seite 2961-71.
- Schuman, E. M. (1999):** Neurotrophin regulation of synaptic transmission, Curr Opin

Neurobiol (Band 9), Nr. 1, Seite 105-9.

Seidler, NW, Jona, I, Vegh, M und Martonosi, A (1989): Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum, J. Biol. Chem. (Band 264), Nr. 30, Seite 17816-17823.

Shelton, M. K. und McCarthy, K. D. (2000): Hippocampal astrocytes exhibit Ca²⁺-elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors in situ, J Neurochem (Band 74), Nr. 2, Seite 555-63.

Shoval, G. und Weizman, A. (2005): The possible role of neurotrophins in the pathogenesis and therapy of schizophrenia, Eur Neuropsychopharmacol (Band 15), Nr. 3, Seite 319-29.

Siegel, G. J. und Chauhan, N. B. (2000): Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain, Brain Res Brain Res Rev (Band 33), Nr. 2-3, Seite 199-227.

Simard, M. und Nedergaard, M. (2004): The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis, Neuroscience (Band 129), Nr. 4, Seite 877-96.

Smani, T., Zakharov, S. I., Csutora, P., Leno, E., Trepakova, E. S. und Bolotina, V. M. (2004): A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway, Nat Cell Biol (Band 6), Nr. 2, Seite 113-20.

Smith, R. J., Sam, L. M., Justen, J. M., Bundy, G. L., Bala, G. A. und Bleasdale, J. E. (1990): Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness, J Pharmacol Exp Ther (Band 253), Nr. 2, Seite 688-97.

Snider, W. D. (1994): Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us, Cell (Band 77), Nr. 5, Seite 627-38.

Somjen, G. G. (1988): Nerven Kitt: notes on the history of the concept of neuroglia, Glia (Band 1), Nr. 1, Seite 2-9.

Soulsby, M. D. und Wojcikiewicz, R. J. (2002): 2-Aminoethoxydiphenyl borate inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate receptor function, ubiquitination and downregulation, but acts with variable characteristics in different cell types, Cell Calcium (Band 32), Nr. 4, Seite 175-81.

Sternweis, P. C. und Gilman, A. G. (1982): Aluminum: a requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 79), Nr. 16, Seite 4888-91.

Tapia-Arancibia, L., Rage, F., Givalois, L. und Arancibia, S. (2004): Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function, Front Neuroendocrinol (Band 25), Nr. 2, Seite 77-107.

- Tapley, P., Lamballe, F. und Barbacid, M. (1992):** K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors, *Oncogene* (Band 7), Nr. 2, Seite 371-81.
- Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z. Y., Lee, F. S., Kraemer, R. T., Nykjaer, A. und Hempstead, B. L. (2005):** ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin, *J Neurosci* (Band 25), Nr. 22, Seite 5455-63.
- Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R. und Dawson, A. P. (1990):** Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 87), Nr. 7, Seite 2466-70.
- Thoenen, H. und Sendtner, M. (2002):** Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches, *Nat Neurosci* (Band 5 Suppl), Seite 1046-50.
- Venance, L., Stella, N., Glowinski, J. und Giaume, C. (1997):** Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes, *J Neurosci* (Band 17), Nr. 6, Seite 1981-92.
- Verkhratsky, A., Orkand, R. K. und Kettenmann, H. (1998):** Glial calcium: homeostasis and signaling function, *Physiol Rev* (Band 78), Nr. 1, Seite 99-141.
- Virchow, R. (1846):** Über das granuliertes Ansehen der Wandungen der Gehirnventrikel, *Allg Z Psychiatrie* (Band 3), Seite 242-250.
- Widenfalk, J., Lundstromer, K., Jubran, M., Brene, S. und Olson, L. (2001):** Neurotrophic factors and receptors in the immature and adult spinal cord after mechanical injury or kainic acid, *J Neurosci* (Band 21), Nr. 10, Seite 3457-75.
- Wu, D. (2005):** Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins, *NeuroRx* (Band 2), Nr. 1, Seite 120-8.
- Xu, X. M., Guenard, V., Kleitman, N., Aebischer, P. und Bunge, M. B. (1995):** A combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into Schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord, *Exp Neurol* (Band 134), Nr. 2, Seite 261-72.
- Yang, Z. F., Ho, D. W., Lam, C. T., Luk, J. M., Lum, C. T., Yu, W. C., Poon, R. T. und Fan, S. T. (2005):** Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel functional protein in hepatocellular carcinoma, *Cancer Res* (Band 65), Nr. 1, Seite 219-25.
- Yuen, E. C., Howe, C. L., Li, Y., Holtzman, D. M. und Mobley, W. C. (1996):** Nerve growth factor and the neurotrophic factor hypothesis, *Brain Dev* (Band 18), Nr. 5, Seite 362-8.

- Zampieri, N. und Chao, M. V. (2004):** Structural biology. The p75 NGF receptor exposed, Science (Band 304), Nr. 5672, Seite 833-4.
- Zhang, Q. und Haydon, P. G. (2005):** Roles for gliotransmission in the nervous system, J Neural Transm (Band 112), Nr. 1, Seite 121-5.

13 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Arthur Konnerth und Frau Prof. Dr. Christine Rose für die Überlassung des Themas, die Einarbeitung in die Methoden, die anregenden, wissenschaftlichen Diskussionen und die umfassende Betreuung der Arbeit.

Ich danke allen Kollegen der Arbeitsgruppe Konnerth für die Unterstützung sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Julia Fröhlich für die Unterstützung bei der graphischen Gestaltung dieser Arbeit.

Ich danke meinen Geschwistern Fabio, Arno und Marion für den Humor, die Solidarität und die Streitkultur.

Ich danke meinen Eltern Ilona und Florian nicht nur dafür, dass sie mich mit den genetischen, emotionalen und materiellen Voraussetzungen ausgestattet haben, die die vorliegende Arbeit ermöglicht haben, sondern vor allem für ihre bedingungslose Zuneigung, die eine der wichtigsten Triebfedern meines Lebens war und ist.

Ich danke meiner Frau Doris dafür, dass sie die beste Frau der Welt ist.

14 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Charakterisierung BDNF-induzierter Cacliumtransienten in kultivierten Astrozyten

im Institut für Neurowissenschaften unter der Anleitung und Betreuung durch

Prof. Dr. Arthur Konnerth und **Dr. Christine Rose**

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den

.....

Bruno Pichler

15 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Bruno Pichler
geboren am	31. März 1976 in Berlin
Eltern	Dr. phil. Dr. med. univ. Ilona Pichler, Ärztin Dr. med. Florian Pichler, Arzt
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Bildungsweg

09/1982 – 07/1986	Grundschule Bayerisch Gmain
09/1986 – 06/1995	Karls gymnasium Bad Reichenhall
05/1997 – 11/2004	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
06. Dezember 2004	Approbation als Arzt

Berufliche Tätigkeit

09/1995 – 10/1996	Zivildienst, Rupertusschule, Piding (Betreuung geistig und mehrfach behinderter Kinder und Jugendlicher)
11/1996 – 04/1997	Tätigkeit als Skilehrer, Skischule Chiemgau Reit im Winkl
09/1999 – 10/2000	Studenten-Tätigkeit, Schlaflabor der Med. Klinik Ziemssenstraße der LMU (Behandlung von Schlafapnoe-Patienten)
10/2000 – 10/2001	Unterbrechung des Studiums: Doktorand im Physiologischen Institut der LMU bei Prof. Konnerth, Lehrstuhl für Zelluläre Physiologie
10/2003 – 02/2004	PJ-Student in der Psychiatrischen Klinik der LMU
02/2004 – 09/2004	PJ-Student im Krankenhaus München-Neuperlach
01/2005 -	Fertigstellung der Promotion