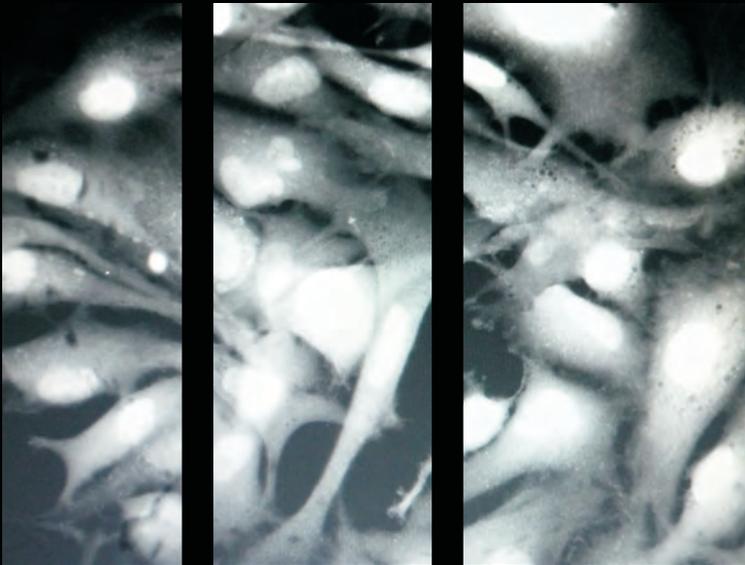


**Mohammed Miqdad**

Der Einfluss von blutigem Liquor auf  
humane Astrozyten in vitro



**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Zahnheilkunde  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

# **Der Einfluss von blutigem Liquor auf humane Astrozyten in vitro**

## **INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Mohammed Miqdad**  
aus Gaza

Gießen 2009

Aus der neurochirurgischen Abteilung  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen  
Direktor: Prof. Dr. med. Dieter-Karsten Böker

Gutachter: PD Dr. med. Matthias F. Oertel

Gutachter: PD Dr. med. Marek Jauß

Tag der Disputation: 22.02.2010

*Meinen Eltern Hikmat und Yousef,  
PD Dr. med. Yaser Abdallah und  
Dr. med. dent. Thomas Mende  
gewidmet*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1	Die intrazerebrale Blutung	6
1.2	Gliazellen	7
1.3	Struktur und Funktion der Astrozyten	8
1.4	Astrozytäre Kommunikation	10
1.4.1	Astrozytäre Calciumsignale	10
1.4.2	Ca <sup>2+</sup> -Wellen als astrozytäre Kommunikationsform	12
1.5	Transmitterabhängige astrozytäre Kommunikation	14
1.6	Nekrose versus Apoptose	15
1.7	Die Rolle der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore	16
1.8	Ziele der Arbeit	17
<b>2.</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>18</b>
2.1	Chemikalien	18
2.2.	Häufig verwendete Medien und Puffer	19
2.2.1	Zellkulturmedien	19
2.2.2	Inkubationsmedium	20
2.3.	Geräte und Laborbedarf	20
2.4	Blutiger Zerebrospinalliquor (bCSF) und nativer Zerebrospinalliquor	21
<b>3.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>22</b>
3.1	Zellkultur	22
3.2	Experimente	22
3.2.1	Apparative Vorraussetzung	22
3.2.2	Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration von Ca <sup>2+</sup>	24
3.2.3	Methode zur Messung von Nekrose und Apoptose in Astrozyten	27
3.3	Blocker des Ca <sup>2+</sup> -Weges	27
3.4	ATP-Messungen im Liquor mittels der ATP-Biolumineszens-Methode	28
3.5	Statistik	28

<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>29</b>
4.1.	Blutiger zerebrospinaler Liquor induziert Nekrose aber nicht Apoptose In humanen Astrozyten	29
4.2.	Die Rolle des zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ bei der Entstehung von bCSF-induzierter Nekrose	30
4.3	Mechanismen des bCSF-induzierten Anstiegs der zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ Konzentration	31
4.4	Die Rolle von extrazellulärem ATP	33
4.5	Die Rolle der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher	34
4.6	Die Rolle des extrazellulären Calciums	36
4.7	Die Rolle der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore für die Entstehung der Nekrose	38
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>48</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>50</b>
<b>9.</b>	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>62</b>
<b>10.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>63</b>
<b>11.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>64</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die intrazerebrale Blutung

Als intrazerebrale Blutung werden Blutungen bezeichnet, die innerhalb des Hirngewebes gelegen sind. Die nicht traumatischen intrazerebralen Blutungen finden im Parenchym statt und können die Hirnventrikel und in einigen Fällen den Subarachnoidalraum erreichen. Intrazerebrale Blutungen treten meist plötzlich auf und machen etwa 15% aller Schlaganfälle aus. Diese Blutungen sind mit hohen Mortalitätsraten verbunden. Nur 38% der Betroffenen überleben das erste Jahr (Dennis et al., 1993). In den Vereinigten Staaten leiden jährlich bis zu 52400 Menschen und weltweit 20 von 100000 an intrazerebralen Blutungen und in den kommenden 50 Jahren ist eine Verdopplung dieser Zahl zu erwarten (Broderick et al., 1992, 1999). Männer sind häufiger betroffen als Frauen, insbesondere wenn sie älter als 55 Jahre sind. Auch ethnische Unterschiede spielen dabei eine bedeutende Rolle, beispielsweise haben Japaner und Schwarzafrikaner ein höheres Risiko an intrazerebralen Blutungen zu leiden als Kaukasier (Broderick et al. 1992).

Abhängig von der zu Grunde liegenden Ursache der Blutung, wird zwischen primären und sekundären Formen unterschieden. Bei der häufigeren primären Form, ca. 88% der Fälle, stammen die Blutungen aus spontanen Rupturen von kleinen Gefäßen, die häufig durch chronischen Bluthochdruck vorbeschädigt sind (Foulkes et al. 1988). Bei der sekundären Form handelt es sich um Blutungen aus Gefäßanomalien (wie arteriovenösen Malformationen und Aneurysmen), Tumoren oder Blutungen in Folge schlecht eingestellter Antikoagulationstherapien (Qureshi Al et al. 2001). Auch wenn es sich bei Blutungen aus rupturierten Gefäßwandaussackungen (sogenannten Aneurysmata) üblicherweise um Subarachnoidalblutungen handelt, können auch intrazerebrale Blutungen durch Aneurysmarupturen verursacht sein.

Intrazerebrale Blutungen treten häufig in Hirnlappen, Basalganglien, Thalamus, Hirnstamm und im Kleinhirn auf. Ein Einbruch dieser Blutungen in die Hirnventrikel findet bei tiefen, großen Hämatomen statt und ist mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert. Werden die Blutungen überlebt, so ist die Größe des Hämatoms für das Ausmaß der neurologischen Ausfälle in den ersten 3 Stunden entscheidend. Eine weitere Verschlechterung der neurologischen Ausfälle in den folgenden 24-48 Stunden weist auf eine Vergrößerung der Blutung oder ein voranschreitendes Ödem im Hirnparenchym hin (Mayer SA et al. 1994). Makroskopisch zeigt sich das Hirnparenchym ödematös und

verfärbt sich durch den Hämoglobinabbau. Neben den ödematösen Veränderungen finden sich histologisch geschädigte Neurone, Makrophagen und neutrophile Granulozyten im Hirnparenchym um das Hämatom.

Im Gegensatz zu früheren Annahmen, dass diese Blutungen durch das umgebende Gewebe zum Stillstand kommen, nimmt man heute an, dass die Blutungen zwischen den Schichten der weißen Substanz über mehrere Stunden expandieren (Brott et al. 1997). Das Ödem des Parenchyms ist bis zu fünf Tage und länger nach dem Ereignis nachweisbar (Yang GY et al. 1994). Für die Schädigung der Neuronen und die Ödementstehung im Parenchym werden sowohl osmotisch wirksame Serumproteine als auch Abbauprodukte der roten Blutkörperchen bzw. des Hämoglobins diskutiert, wobei die Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke, die in der Regel dem Schutz der Neuronen dient, die wichtigste initiale Schädigung darstellt (Lee KR 1996).

Um die Pathomechanismen dieser neuronalen Schädigung zu untersuchen, wurden verschiedene Studien an isolierten Zellen aus zerebralen Gefäßen, an Neuronen und an Astrozyten als wichtiger Bestandteil der Blut-Hirnschranke durchgeführt. In diesem Kontext werden Hämoglobin und insbesondere Oxyhämoglobin aus Erythrozyten als Hauptursache für den zerebralen Gewebsschaden diskutiert. Gehirngewebe einschließlich Neuronen, Astrozyten und Gefäßzellen treten mit Oxyhämoglobin und seinen Abbauprodukten für Tage und Wochen in Kontakt und führen sowohl zu nekrotischem als auch apoptotischem Tod von Endothel- und Glattmuskelzellen, Astrozyten und Neuronen [Xi et al. 1998].

## **1.2 Gliazellen**

Das menschliche Nervensystem besteht im Wesentlichen aus zwei Zelltypen. Zum einen aus Neuronen und zum anderen aus Gliazellen. Gliazellen unterscheiden sich in vielen Aspekten von Neuronen, unter anderem dadurch, dass sie nicht elektrisch erregbar und damit nicht unmittelbar an der schnellen Informationsübertragung beteiligt sind. Gliazellen wurden in der Mitte des 19. Jahrhunderts von dem Berliner Rudolf Virchow entdeckt (Virchow, 1846). Er vermutete, dass diese Zellen ausschließlich für die Stütz- und Haltefunktion der Neuronen verantwortlich sind. Der Name „glia“ leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet „Leim“ oder „Kitt“. Gliazellen werden in Mikroglia- und Makrogliazellen unterteilt. Mikrogliazellen sind mesodermalen Ursprungs und leiten sich embryologisch gesehen von phagozytierenden, immunkompetenten Zellen des Gehirns ab. Zu den Makrogliazellen, die ektodermalen Ursprungs sind, zählt man die

Schwann'schen Zellen, die Oligodendrozyten, die Ependymzellen und die Astrozyten. Die Astrozyten bilden die Mehrheit der Gliazellen und sind mit bis zu 80% der Gesamtzahl an Zellen auch der häufigste Zelltyp im zentralen Nervensystem des Menschen (Kettenmann et al. 2005).

### 1.3 Struktur und Funktion der Astrozyten

Astrozyten weisen einen verhältnismäßig kleinen, im Durchmesser 10-20µm messenden Zellkörper (Soma) und zahlreiche, teilweise verzweigte, Fortsätze auf. Die Fortsätze von Astrozyten bilden dicht aneinander grenzende, füschenartige Ausläufer an der Oberfläche des ZNS, und bilden damit die Membrana limitans gliae superficialis. Diese grenzt über eine Basallamina an die Pia mater.

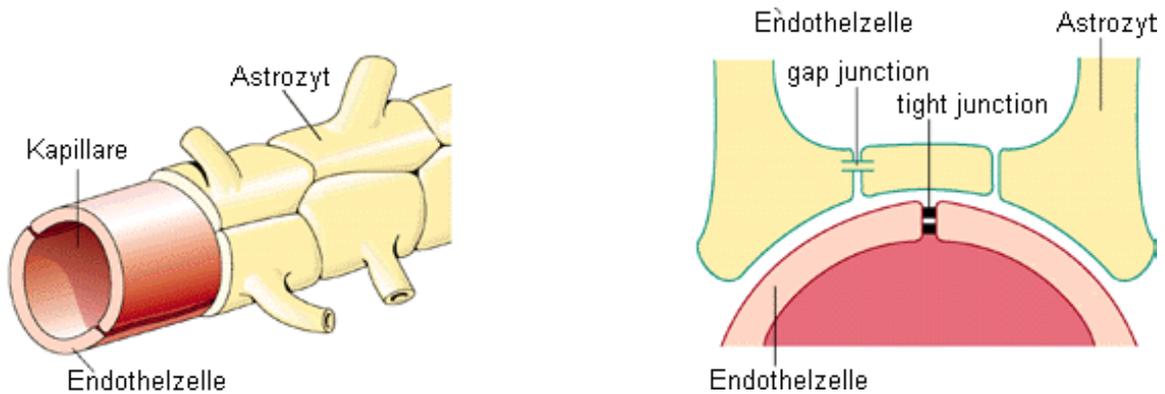
Aufgrund ihrer Morphologie können Astrozyten grob in drei Untergruppen eingeteilt werden:

Die *fibrillären* Astrozyten besitzen zahlreiche, schlanke und wenig verzweigte Fortsätze. Sie kommen vor allem in der weißen Substanz vor.

Die *protoplasmatischen* Astrozyten besitzen dicke und reich verzweigte Fortsätze. Sie sind charakteristisch für die graue Substanz.

Die *radialen* Astrozyten, die sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz vorkommen und zu denen die Bergmann-Glia aus dem Cerebellum (Bergmann, 1875) und die Müller-Zellen aus der Retina zählen (Schultze, 1866).

Astrozyten verfügen über eine Vielzahl von Funktionen, durch die die Integrität des ZNS aufrechterhalten wird. Astrozyten treten über ihre Endfüße in engen Kontakt zu Neuronen und dem Endothel des Gefäßsystems (Abb. 1.1). Diese strukturelle Beziehung kann den Astrozyten die Möglichkeit geben, Neuronen mit Nährstoffen zu versorgen und den Abtransport neuronaler Stoffwechselprodukte zu gewährleisten (Magistretti et al. 1999; Hülsmann et al. 2000).



**Abbildung 1.1:** Astrozytäre Endfüßchen stehen in engem Kontakt mit dem Endothel des Gefäßsystems.

Astrozyten sind an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Sie stehen in Kontakt mit glatten Muskelzellen von arteriolären Gehirngefäßen, die den Gefäßdurchmesser und damit den Blutfluss regulieren. Astrozyten bilden ein reich verzweigtes Netzwerk von Fortsätzen aus, das in engem Kontakt mit den Synapsen steht. Ein einzelner Astrozyt kann im Extremfall über 100.000 Synapsen kontaktieren (Bushong et al. 2002). In einer Vielzahl von Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Astrozyten aktiv an der synaptischen Übertragung beteiligt sind. Dieses erklärt ihre wichtige Rolle in der „Astro-neuronalen-Zellkommunikation“ (Araque et al. 2001; Bezzi et al. 2001; Verkhratsky et al. 2006).

Astrozyten exprimieren eine große Vielfalt von Rezeptoren (Porter et al. 1997), welche nach Aktivierung durch exogen applizierte Neurotransmitter zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums führen können (Porter et al. 1997; Verkhratsky et al. 1998; Kettenmann et al. 2005). In Studien an Hirnschnitten konnte demonstriert werden, dass diese Calcium-Anstiege durch an der Synapse freigesetzte Neurotransmitter, wie z.B. Glutamat (Bezzi et al. 1998; Latour et al. 2001), Gammaaminobuttersäure (GABA) (Kang et al. 1998), Acetylcholin (Araque et al. 2002), Noradrenalin (Kulik et al. 1999) und Stickstoffmonoxid (Matyash et al. 2001) induziert werden können. Andererseits setzen die Astrozyten Gliotransmitter frei und erzeugen mehrere trophische Faktoren, die sowohl die Aktivität der Astrozyten selbst, als auch die Aktivität von benachbarten Neuronen und Endothelzellen beeinflussen können (Verkhratsky et al. 1998). Außerdem werden Astrozyten im Anschluss an akute oder chronische pathologische Prozesse (z.B. Hirntrauma, Ischämie/Hypoxie und Morbus Alzheimer) aktiviert. Dieser Vorgang ist als Astrogliosis bekannt (Franke et al. 2006; Weisman et al. 2005). Astrozyten erfüllen

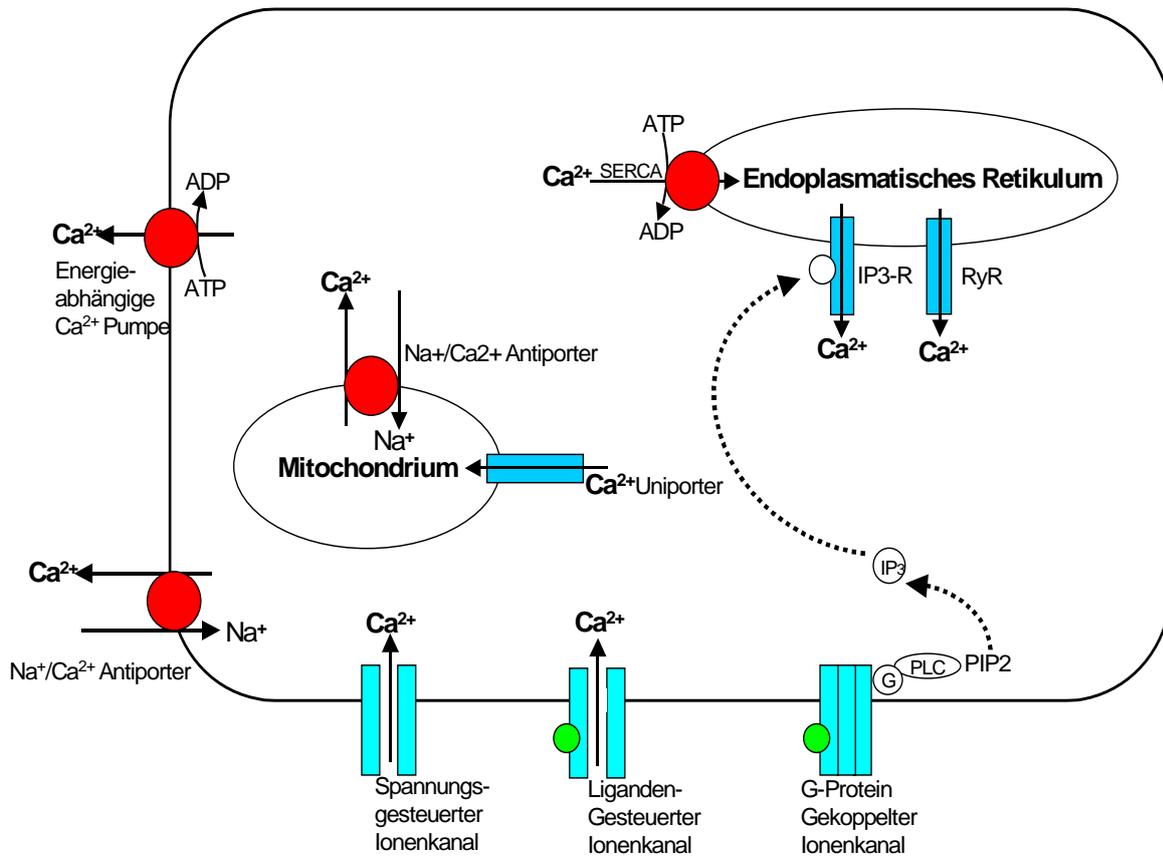
nutritive Funktionen und haben einen großen Anteil an der Homoöstate der Ionen- und Neurotransmitter Konzentrationen im extrazellulären Raum. Große Gruppen von Astrozyten sind über Gap Junctions miteinander verknüpft und bilden so ein Synzytium (Giaume et al. 1996), über das lokale Konzentrationssteigerung von  $K^+$ -Ionen, entstanden z.B. durch synchrone neuronale Aktivität, abgepuffert werden können. Dieser Vorgang nennt sich „Spatial  $K^+$ -Pufferung“ (Kofuji et al. 2004).

Durch die Expression glialer Glutamattransporter GLAST (EAAT1), GLT-1(EAAT2) haben Astrozyten die Möglichkeit, mittels Glutamataufnahme aus dem synaptischen Spalt zu hohe Glutamatkonzentration zu reduzieren und damit die synaptische Aktivität zu stabilisieren (Rusakov et al. 1998; Hulsmann et al. 2000b). Des Weiteren ist bekannt, dass Astrozyten am Wachstum von Neuronen und an der Synaptogenese partizipieren (Slezak et al. 2003).

## **1.4 Astrozytäre Kommunikation**

### **1.4.1 Astrozytäre Calciumsignale**

Neurone sind elektrisch erregbar und können elektrische Impulse sehr schnell über weite Strecken kommunizieren. Astrozyten besitzen diese Eigenschaften nicht, zeigen aber eine andere Form transzellulärer Signalweitergabe, basierend auf intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationserhöhungen (Cornell-Bell et al. 1990; Charles et al. 1991). Die astrozytäre zytoplasmatische  $Ca^{2+}$ -Erhöhung fungiert dabei als intrazelluläres und interzelluläres Signal, welches sowohl innerhalb der Zelle als auch zwischen benachbarten Zellen als  $Ca^{2+}$ -Welle propagieren kann (Aguado et al. 2002; Araque et al. 2002). Mit der Entwicklung verbesserter  $Ca^{2+}$ -sensitiver Farbstoffe Mitte der 80er Jahre wie Fura-2 (Grynkiewicz et al. 1985) konnte man einen Teil ihrer Stoffwechselforgänge und Signaltransduktionswege bestimmen. Ihre Signale stellen eine bislang unbekannt Form der Informationsverarbeitung dar, welche um Größenordnungen langsamer als die der Neuronen ist. Bedingung für das Entstehen der  $Ca^{2+}$ -Signale ist ein  $Ca^{2+}$ -Gradient zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Raum bzw. zwischen intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speichern und Zytoplasma.



**Abbildung 1.2: Calciumhomöostase in Astrozyten.** Das Schema zeigt die vier verschiedenen grundlegenden Faktoren zur Kontrolle des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ . ADP: Adenosin-Diphosphat; ATP: Adenosin-Triphosphat; IP3: Inositol 1,4,5-trisphosphat; IP3R: IP3-Rezeptor; PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat; PLC: Phospholipase C; RyR: Ryanodinrezeptor; SERCA: Sarco-/Endoplasmatisches Retikulum- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

In Astrozyten wird die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase im Wesentlichen über vier Mechanismen kontrolliert, die schematisch in Abb. 1.2 dargestellt sind:

- $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über die Zellmembran in das Zellinnere,
- $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus internen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern in das Zytoplasma,
- $\text{Ca}^{2+}$ -Extrusion über die Zellmembran nach außen,
- oder zurück in intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher.

Jeder der vier genannten Routen kann über verschiedene Mechanismen reguliert werden. So ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über die Zellmembran durch spannungsgesteuerte

(Westenbroek et al. 1998), ligandengesteuerte (Shelton et al. 1999), speichergesteuerte (Lo et al. 2002) und mechanosensitive (Niggel et al. 2000)  $\text{Ca}^{2+}$  permeable Ionenkanäle möglich. In elektrisch nicht erregbaren Zellen wie den Astrozyten dominiert hierbei die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung aus intrazellulären Speichern (Verkhratsky et al. 1996).

Die intrazelluläre Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  kann aus Mitochondrien oder dem endoplasmatischen Retikulum erfolgen. Die Freigabe von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum erfolgt über Ryanodin oder Inositol 1,4,5-triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) kontrollierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ( $\text{IP}_3$ -Rezeptoren,  $\text{IP}_3\text{R}$ ) (Verkhratsky et al. 1998). Während die genannten Prozesse der Richtung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsgradienten folgen und somit passiver Natur sind, ist sowohl die Extrusion von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytoplasma in den Extrazellulärraum als auch das Zurückführen von zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  in die intrazellulären Speicher ein energieabhängiger Prozess, der über  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen oder  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ermöglicht wird.

$\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhungen in Astrozyten bleiben nicht ohne Folge für die sie umgebenden Zellen: Die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhungen können die neuronale Kommunikation beeinflussen (Kang et al. 1998, Araque et al. 2001) und zur Ausschüttung von neuroaktiven Substanzen, insbesondere von Glutamat aus Astrozyten führen (Pasti et al. 2001). In der frisch isolierten Retina konnte gezeigt werden, dass astrozytäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zur Modulation von lichtinduzierten Antworten in Ganglienzellen führen (Newman et al. 1998) und im Hippocampus scheinen Glutamatrezeptoren eine Hauptaufgabe bei Neuron-Glia-Interaktionen zu spielen (Bezzi et al. 1998).

#### **1.4.2 $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen als astrozytäre Kommunikationsform**

$\text{Ca}^{2+}$ -Signale können sich unter Astrozyten konzentrisch von Zelle zu Zelle ausbreiten. Glutamatapplikation auf kultivierte Astrozyten führte zur Ausbreitung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Welle (Cornell-Bell et al. 1990). Aber auch die lokale Applikation von anderen Substanzen wie ATP (Guthrie et al. 1999; Newman et al. 1997), Noradrenalin (Yagodin et al. 1995) und Stickstoffmonoxid (Willmott et al. 2000a) kann solche Wellen induzieren. Lokale mechanische (Charles et al. 1991) oder elektrische Stimuli (Nedergaard 1994) können ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen in Astrozyten auslösen.

Für die Ausbreitung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen zwischen den Zellen wurden hauptsächlich zwei Mechanismen beschrieben:

*Beim ersten Mechanismus* kann die Diffusion von  $IP_3$  oder  $Ca^{2+}$  als Botenstoffe (Second Messengers) durch Gap Junctions zu benachbarten Zellen dort eine  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, wie dem endoplasmatischen Retikulum, auslösen (Giaume et al. 1998). Experimente, in denen die Ausbreitung dieser Calciumwelle durch Blocker von Gap Junctions vermindert werden konnte, bestätigten diesen Mechanismus (Finkbeiner, 1992).

*Der zweite Mechanismus* beruht auf der Ausschüttung von ATP das an purinergen Rezeptoren der benachbarten Zellen bindet, wodurch es zur Bildung von  $IP_3$  in der Zielzelle kommt, und sich die Calciumkonzentration im Zytoplasma durch den Ausstrom aus dem ER durch  $IP_3$ -abhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle erhöht ( Braet et al. 2001).

Dieser zweite Mechanismus wurde vorgeschlagen, nachdem gezeigt worden war, dass sich  $Ca^{2+}$ -Wellen in Astrozytenkultur auch über zellfreie Gebiete hinweg ausbreiten können (Hassingier et al. 1996) und durch Suramin, einem Antagonisten purinerner Rezeptoren, reduziert werden können (Cotrina et al. 1998b). Außerdem konnte ATP nach der Ausbreitung einer Welle in der Extrazellulärflüssigkeit nachgewiesen werden (Guthrie et al. 1999; Cotrina et al. 1998b; Scemes et al. 2000). In nachfolgenden Publikationen wurde bestätigt, dass die Gap Junctions nicht der einzige Weg zur  $Ca^{2+}$ -Wellenausbreitung sind (Abb. 1.4) (Guan et al. 1997; Naus et al. 1997). Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass extrazelluläres ATP der Hauptmessenger für die extrazelluläre Kommunikation ist (Abb. 1.4). Neben den Gap Junctions und ATP kann auch Stickstoffmonoxid (NO) die Ausbreitung einer Welle vermitteln. Allerdings sind dabei nicht  $IP_3$ -, sondern Ryanodin-abhängige  $Ca^{2+}$ -Speicher involviert (Willmott et al. 2000a, 2000b).



(Romanello et al. 2005),  $\beta$ -Zellen des Pancreas und peritonealen Mastzellen (Aspinwall et al. 2005). Die vesikuläre Freisetzung von ATP ist generell in peripheren Nerven nachweisbar (Bodin et al. 2001). Weiterhin wurde dokumentiert, dass ATP zusammen mit Acetylcholin (Reigada et al. 2003) oder Nordadrenalin (Sesti et al. 2002) gespeichert und freigesetzt wird.

Obwohl mehrere erregbare und nichterregbare Zellarten ATP freisetzen können, ist der Mechanismus, der der Freisetzung von ATP zugrunde liegt, besonders in nichterregbaren Zellen wie Astrozyten umstritten. ATP kann durch verschiedene große Poren die Zellen verlassen, darunter Anionenkanäle (Mongin et al. 2002),  $P_2X_7$ -Rezeptoren (Suadicani et al. 2006) und Connexin-Hemikanäle (Cotrina et al. 1998a; Stout et al. 2002). Die Freisetzung von ATP kann durch Inhibitoren für Anionenkanäle (Anderson et al. 2004; Darby et al. 2003) und Gap Junctions (Stout et al. 2002) reduziert werden. Außerdem ist die Freisetzung von ATP zum Teil von Calcium (Bal-Price et al. 2002) und „soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor“ (SNARE) Proteinen abhängig (Abdipranoto et al. 2003).

## 1.6 Nekrose versus Apoptose

Es gibt verschiedene Gründe für den Tod einer Zelle. Die zwei Arten des Zelltodes lassen sich in Nekrose und Apoptose einteilen (Simon, 1997; Cohen, 1993).

*Der pathologische Prozess ist die Nekrose*, die aus dem irreversiblen Schaden einer Zelle resultiert. Sie kann z.B. durch mechanische Beschädigung oder durch toxische Chemikalien ausgelöst werden, unter physiologischen Bedingungen auch nach Beschädigung der Zytoplasmamembran durch das Komplementsystem oder lytische Viren. Die Zelle verliert dabei die Fähigkeit, die zelluläre Homöostase aufrecht zu erhalten, was zu einem Einfließen von extrazellulären Ionen und Wasser in die Zelle führt. In der Folge schwellen die Zellen und die zytoplasmatischen Organellen an, besonders die Mitochondrien, wohingegen das Chromatin unverändert bleibt. Schließlich platzt die Zelle, wodurch der zytoplasmatische Inhalt austritt und entzündliche Reaktionen ausgelöst werden (Wyllie et al. 1980; Cohen, 1993).

*Die Apoptose*, die häufigste Form des Zelltodes im Organismus, läuft programmiert ab (Kerr et al. 1972). Sie kann einerseits durch innere Schädigung der Zelle, wie z.B. durch Inhibierung der Proteinsynthese (Martin et al. 1990) ausgelöst werden, andererseits durch spezifische Signale ihrer Umgebung oder anderer Zellen. Die Zellen zeigen im mikroskopischen Bild nach einem „Kochen“ („boiling“ o. „blebbing“) der Zellen ein

Abschnüren kleiner membranumschlossener Partikel, den "apoptotic bodies", die von Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert werden. Aus diesem Grund kommt es in dieser Phase nicht zur Entzündung im umliegenden Gewebe. Die Apoptose ist ein wichtiger Bestandteil des natürlichen Zellumsatzes in mehrzelligen Organismen, die eine schonende Entfernung funktionsloser oder für den Organismus sogar schädlicher Zellen ermöglicht (Huppertz et al. 1999).

Im Rahmen einer subarachnoidalen Blutung konnte gezeigt werden, dass die lysierten Erythrozyten mit der Aktivierung einer Reihe von Schädigungsmechanismen im Hirngewebe verknüpft sind (Xi et al. 1998). Das Eintreten von Blut in den Subarachnoidalraum wurde für den zerebralen Vasospasmus verantwortlich gemacht (Lennihan et al. 2000; Stoodley et al. 2000). Dieser Vasospasmus tritt Tage nach einer Subarachnoidalblutung auf und kann abhängige Hirnareale in eine Ischämie versetzen. Mechanistisch werden die Abbauprodukte der lysierten Erythrozyten für den Vasospasmus verantwortlich gemacht. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass das Abbauprodukt Oxyhämoglobin in der Lage ist die Endothel- oder Glattmuskelzellen der Gefäße in apoptotischen oder nekrotischen Zelltod zu treiben. Analysen an astrozytären Zelllinien haben gezeigt, dass die Exposition dieser Zellen zu Oxyhämoglobin zum nekrotischen Zelltod führen kann (Rollins et al. 2002).

### **1.7 Die Rolle der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (MPTP)**

Bei MPTP handelt es sich um einen mitochondrialen Proteinkomplex, der unter bestimmten Situationen von zellulärem Stress, z.B. bei zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung oder erhöhten Konzentrationen an reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), sogenannte Mega-Poren zwischen der inneren und äußeren mitochondrialen Membran bildet. Diese Mega-Poren sind für Moleküle bis 1,5 kDa permeabel (Halestrap et al. 2002, 2004, 2007). MPTP-Öffnung führt zum Verlust der mitochondrialen Ionenkompartimentierung sowie zum Zusammenbruch der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung und kann sowohl nekrotischen als auch apoptotischen Zelltod verursachen (Halestrap et al. 2004).

Die genaue Struktur der MPTP ist noch nicht geklärt. Die Mehrzahl der Studien zeigen jedoch, dass die MPTP im intermembranären mitochondrialen Spalt lokalisiert sind. Nach bisherigen Erkenntnissen bestehen sie aus drei Komponenten, einem zur äußeren mitochondrialen Membran gerichteten spannungsgesteuerten Anionenkanal (VDAC), Cyclophilin D (CyP-D) und einer zur inneren mitochondrialen Membran gerichteten Adenin-nukleotid-Translokase (ANT) (Halestrap et al. 2002).

Jacobson und Duchon haben gezeigt, dass Interaktionen in Astrozyten zwischen mitochondrialen ROS und dem freigesetzten Calcium aus dem ER die Frequenz der mitochondrialen Depolarisation erhöhen und zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung in den Mitochondrien führt (Jacobson et al. 1998). Dies leitet die MPTP-Öffnung ein.

### **1.8 Ziele der Arbeit**

Am Model humaner kultivierter Astrozyten wurden folgende Ziele verfolgt:

1. Der Einfluss von blutigem zerebrospinalen Liquor (bCSF) auf humane Astrozyten in vitro.
2. Der Einfluss von bCSF auf die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik von Astrozyten.
3. Die Untersuchung der extrazellulären Signalkaskade (Up-stream) mit Fokus auf ATP- und Glutamatrezeptoren.
4. Die Rolle der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher sowie der plasmalemalen Calciumkanäle vom L-Typ.
5. Die Rolle der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore als down-stream-target für die Entstehung der Nekrose durch bCSF.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Chemikalien

Adenosintriphosphat	Sigma, Taufkirchen
Attachment Factor	ACBRI, USA
CSC Complete Medium	ACBRI, USA
Cyclosporin A	Calbiochem, Bad Soden
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
D(-)-2-Amino-5-Phosphonopentanoic Acid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
FCS	Gibco BRL, Eggenstein
Fura-2 AM	Invitrogen, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hoechst-33342	Hoechst AG, Frankfurt am Main
Medium 199	Biochrom, Berlin
Nimodipine	Merck, Darmstad
Passage reagent Group <sup>TM</sup> (PRG) Reagentien-Kit PRG-1 (EDTA-Lösung) PRG-2 (Trypsin/EDTA-Lösung) PRG-3 (Trypsin Inhibitor-Lösung)	ACBRI, USA
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe

Propidium Iodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Suramin	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-aminoethoxydiphenyl borate	Sigma-Aldrich, Steinheim
8-Phenyltheophyllin	Sigma, Taufkirchen

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Calbiochem, Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

## 2.2 Häufig verwendete Medien und Puffer

### 2.2.1 Zellkulturmedien

#### Medium 199 / HEPES-Stammlösung:

Medium 199	9,8 g / l
HEPES	36 g / l
Aqua Dest	1 l

#### Kultivierungsmedium:

CS-C Medium	
+FCS	10%
+Penicillin / Streptomycin	1%

#### Beladungsmedium:

Medium 199 / HEPES Stammlösung	
+FCS	3 %

Alle Medien wurden sterilisiert und bei 4° C aufbewahrt.

### 2.2.2 Inkubationsmedium

Für unsere Untersuchungen wurde ein Inkubationsmedium mit folgender Zusammensetzung benutzt (in nM):

NaCl (140,0); KCl (2,6),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,2),  $\text{MgSO}_4$  (1,2),  $\text{CaCl}_2$  (1,3),  
HEPES (25,0), Glukose (5,0).

pH-Wert 7,4 bei 30° C nach Titration mit NaOH.

### 2.3 Geräte und Laborbedarf

#### Zellkultur:

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Deckgläser	Menzler Gläser, Braunschweig
Mikroskop	Leica, Wetzlar
Sterilbank	Heraeus, Hanau

#### Fluoreszenzmessungen:

Analysesoftware „Tillvision“	Till Photonics GmbH, Martinsried
CCD Kamera	Till Photonics GmbH, Martinsried
Inkubationskammer	Eigenbau, Werkstatt des Physiologischen Institutes der JLU Gießen
Inkubationskammerheizung	Eigenbau, Werkstatt des Physiologischen Institutes der JLU Gießen
Inverses Mikroskop IX 50	Olympus, Hamburg
Monochromator / Lichtquelle Polychrome IV	Till Photonics GmbH, Martinsried

#### Sonstige Geräte:

Elisa Reader	TECAN, Crailsheim
--------------	-------------------

Heizplatte digital SD 300	Bibby Scientific, UK
Magnet-Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
pH-Meter	WTW, Weinheim
Pipetten	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen	Kendro, Hanau

Verbrauchsmaterialien:

Insulinspritzen (U-40)	Braun, Melsungen
Kulturflaschen (PE Vented Cap) (25cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, USA
Kulturschalen (35x10mm)	Sarstedt, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg

#### **2.4 Blutiger Zerebrospinalliquor (bCSF) und nativer Zerebrospinalliquor**

Proben blutiger zerebrospinaler Liquor (bCSF) wurden von Herrn Dr. Wolfram Scharbrodt zur Verfügung gestellt und stammen von Patienten mit computer-tomographisch gesicherten Subarachnoidalblutungen. Die Kontrollproben stammen von Patienten, die für die Diagnose von degenerativen Rückenmarkerkrankungen, einer Myelographie unterzogen wurden.

### **3    METHODEN**

Für unsere Versuche wurden humane Astrozyten von ACBRI (Applied Cell Biologie Research Institute, Kirkland, WA, 98034 U.S.A.) verwendet.

#### **3.1    Zellkultur**

Folgende Schritte werden in der Zellkultur durchgeführt, um die ausgelieferten humanen Astrozyten auf Schalen zu bringen:

Die Röhrchen mit humanen Astrozyten werden vorsichtig aus dem Trockeneis genommen und in flüssigen Stickstoff gelagert. Die Kulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) wird mit Attachmentfaktor beschichtet. Das CSC-Medium wird aufgetaut, 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin zugesetzt, die benötigte Menge entnommen und ins Eisbad gestellt. Die gefrorenen Zellen werden im Wasserbad aufgetaut und sofort im Verhältnis 1/10 in das eisgekühlte CSC-Medium gegeben. Anschließend werden die Zellen 5-7 Minuten bei 100-200 g zentrifugiert, danach wird der Überstand abgesaugt und das Pellet in 5 ml 37 °C warmen CSC-Medium resuspendiert. Der erste Mediumwechsel erfolgt nach 24 Stunden und danach alle 48 Stunden.

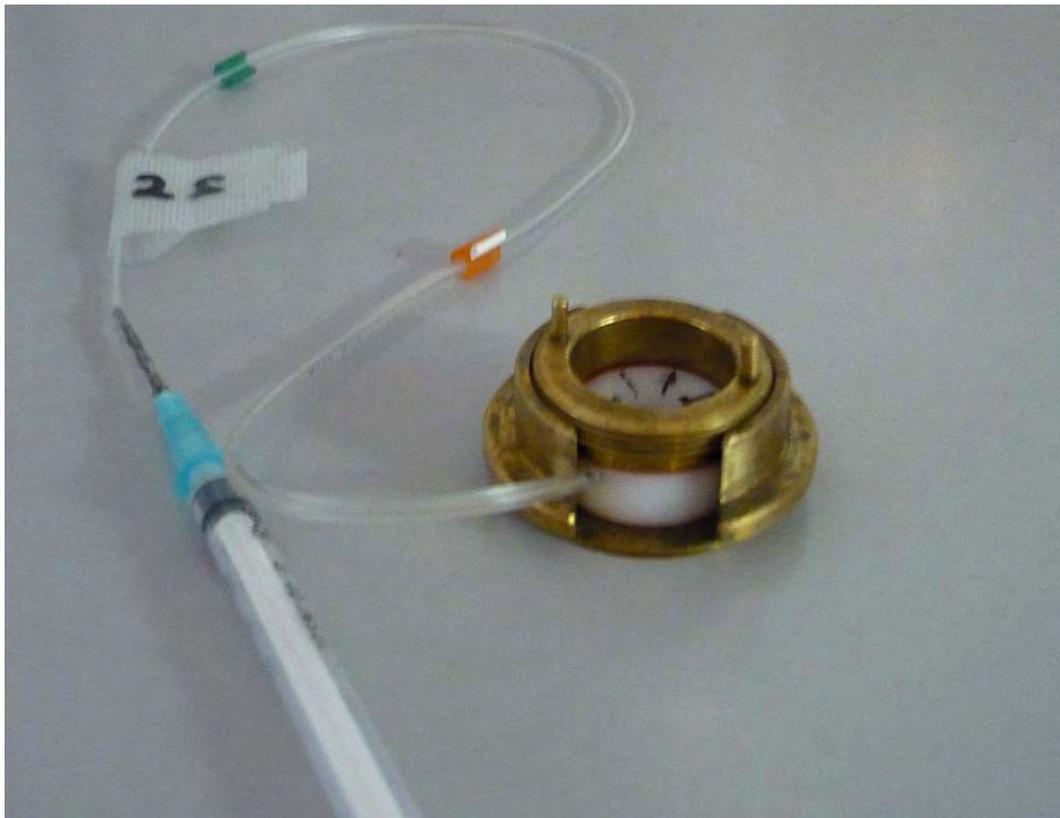
Ausplattierung auf Kulturschalen:

Um die Astrozyten auf Kulturschalen auszuplattieren wird zunächst das Medium aus der Kulturflasche (25 ml) abgesaugt und die 37 °C warme PRG1 Lösung (1 ml) vorsichtig auf die Zellen gegeben. Danach wird die PRG1 abgesaugt und sofort die 37 °C warme PRG2 Lösung (1 ml) dazu gegeben. Anschließend wird die Kulturflasche zurück in den Inkubator gestellt, bis die Zellen sich abgerundet, aber noch nicht von selbst abgelöst haben (ca. 0,5-3 Minuten). Um die Zellen zu lösen wird die Kulturflasche leicht geschüttelt. Die eisgekühlte PRG3 Lösung wird in gleichem Volumen (1 ml), wie die PRG2 Lösung auf die Zellen gegeben. Die abgelösten Zellen werden in ein steriles Röhrchen überführt und in ein Eisbad gestellt, danach wird es zentrifugiert (1-2 Minuten) und der Überstand abgesaugt. Anschließend wird das Röhrchen mit dem Finger leicht angestoßen, um die Zellen abzulösen und in einem definierten Volumen von CSC-Medium aufgenommen und auf Zellkulturschalen mit Deckgläschen ausplattiert.

## 3.2 Experimente

### 3.2.1 Apparative Voraussetzungen

Zur Durchführung unserer Experimente benutzten wir eine Inkubationskammer (300  $\mu$ l Volumen) aus Delrin. Die Inkubationskammer wurde mit einer Edelstahlkanüle (ID=0,5 mm; AD=0,7 mm) verbunden. Durch eine Insulinspritze die durch einen Silikonschlauch mit der Edelstahlkanüle im Kammereinsatz verbunden ist kann das Inkubationsmedium bei Bedarf abgesaugt werden. In diese Inkubationskammer wurden die Deckgläschen mit den darauf angehefteten Zellen eingebaut. Anschließend wurde die Kammer fest verschraubt. Das Inkubationsmedium (300  $\mu$ l) wurde direkt in die Inkubationskammer pipettiert. Zehn Minuten nach Versuchsbeginn wurde das Inkubationsmedium durch eine Spritze abgesaugt und der Patientenliquor (200  $\mu$ l) direkt in die Inkubationskammer gegeben. Die Temperatur in der Inkubationskammer betrug 30 °C.



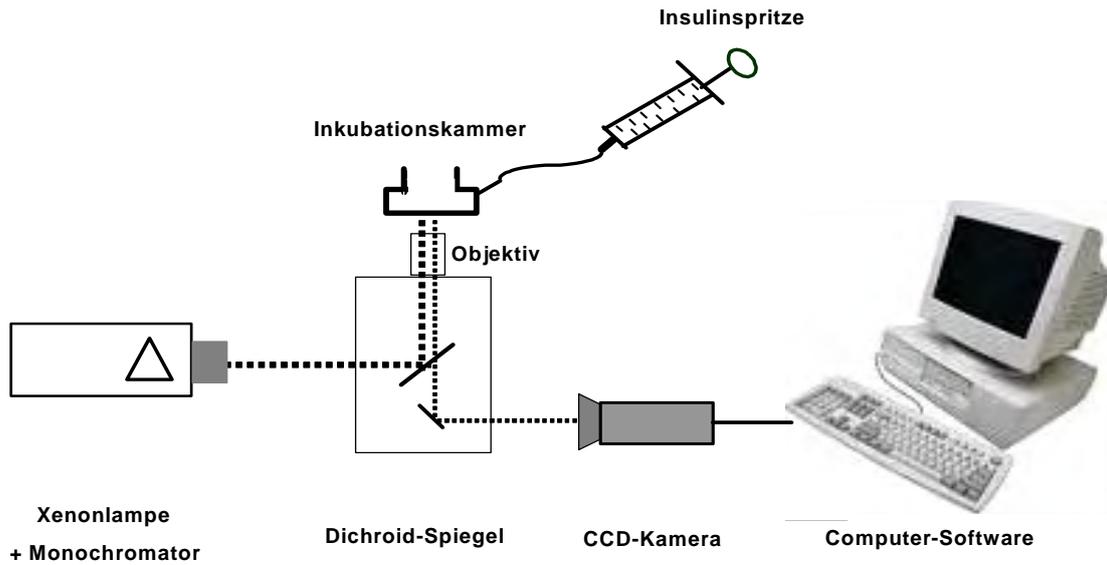
**Abbildung 3.1.1:** Inkubationskammer mit Insulinspritze.



**Abbildung 3.1.2:** Inkubationskammer von oben.

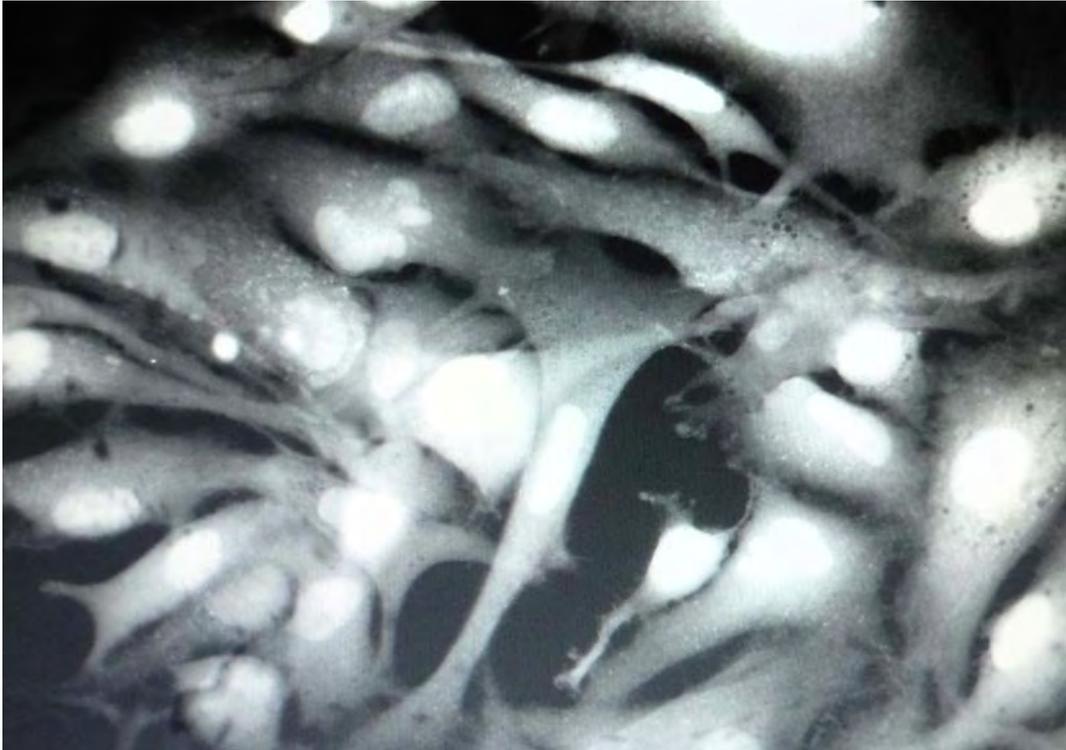
### **3.2.2 Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration von $\text{Ca}^{2+}$**

Die Messungen wurden mit Hilfe eines inversen Mikroskops durchgeführt, welches an das Imaging-System der Firma Till Photonics (Martinsried) gekoppelt war. Mit Hilfe eines Monochromators konnte das Anregungslicht, das von einer Xenonlampe entsendet wurde, entsprechend dem Anregungsspektrum des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes eingestellt werden. Diese selektierten Wellenlängen betragen 340 und 380 nm für Fura-2 AM. Der Lichtstrahl wurde über ein Glasfaserkabel auf einen Dichroidspiegel gelenkt, welcher das Licht weiter auf die Messkammer mit den zu messenden Zellen leitete. Dies führte zur Anregung des Farbstoffes Fura-2 AM. Das emittierte Licht gelangte zurück durch den Dichroiden zu einer CCD-Kamera, die das Lichtsignal registrierte und die Daten zur weiteren Auswertung an einen PC übertrug.



**Abbildung 3.3.1:** Vereinfachte schematische Darstellung der Apparatur. Der Strahlengang des Anregungslichtes ist als durchgezogener Pfeil dargestellt, der Strahlengang des Fluoreszenzlichtes als gestrichelter Pfeil.

Um die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu bestimmen, wurden die Zellen für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit Fura-2 AM ( $2,5 \mu\text{M}$ ) in Beladungsmedien beladen. Fura-2 gelangt als Acetoxymethylester in die Zellen, wird dort von zellulären Esterasen gespalten und kann als geladenes Molekül nicht mehr durch die Membran permeieren. Die Anregung von Fura-2 erfolgte alle 6 Sekunden mit den Wellenlängen 340 nm und 380 nm, das Emissionsmaximum lag bei 510 nm.



**Abbildung 1.1.7:** Abbildung der mit Fura-2 AM beladenen Zellen. Das Bild zeigt eine Originalaufnahme zu Versuchsbeginn.

Aus den gewonnenen Daten wurde der Quotient (engl.:Ratio) R der Emissionsintensitäten bei Anregung mit 340 nm und bei Anregung mit 380 nm (340nm / 380nm) ermittelt. Mit diesem Quotienten konnte die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration berechnet werden (siehe unten). Für die Abbildung wurden die Fura-2-Quotienten auf einen präanoxischen Ausgangswert von 1,2 normiert und als relative Einheiten (r.E.) dargestellt. Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde nach folgender Formel (Grynkiewicz et al. 1985) berechnet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times b \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

Der  $K_d$ -Wert ist ein Maß für die Affinität von Fura-2 zu freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Dieser Wert variiert mit den experimentellen Bedingungen und ist vom pH-Wert abhängig. In vitro beträgt der  $K_d$ -Wert für Fura-2 AM 224 nmol/L (Grynkiewicz et al. 1985). In vivo ermittelten Ladilov et al. (2000) bei einem intrazellulären pH-Wert von 7,2 einen  $K_d$ -Wert von  $309 \pm 8$  nmol/L ( $n = 6$ ), bei einem intrazellulären pH-Wert von 6,5 einen  $K_d$ -Wert von  $347 \pm 7$  nmol/L ( $n = 5$ ). Zur Bestimmung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden die von Ladilov et al. (2000) ermittelten  $K_d$ -Werte verwendet. Der Faktor b ist der Quotient der

Emissionsintensität der 380 nm-Wellenlänge des  $R_{\min}$ -Wertes durch die Emissionsintensität der 380 nm-Wellenlänge des  $R_{\max}$ -Wertes.

### 3.2.3 Methode zur Messung von Nekrose und Apoptose in Astrozyten

Zur Diskriminierung von lebenden und toten Zellen wurden die Zellen mit folgenden Farbstoffen gefärbt:

**Hoechst 33342** ist ein zellmembrangängiger Farbstoff, der das Chromatin im Zellkern anfärbt. Dieser Farbstoff wird häufig in der Kombination mit Propidiumiodid verwendet um kondensierte, pyknotische Kerne in apoptotischen Zellen von nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Seine Anregungswellenlänge liegt bei 360 nm, die Wellenlänge des emittierten Lichtes bei 460 nm.

**Propidiumiodid** ist ein DNS/RNS-Farbstoff, der die perforierte Zellmembran von toten Zellen, doch nicht die intakte Membran von lebenden Zellen durchdringen kann. Das Emissionsmaximum liegt bei 617 nm, die Anregungswellenlänge bei 536 nm. Die Astrozyten in der Inkubationskammer wurden am Versuchsende unter Zugabe von Hoechst 33342 (5  $\mu\text{l/ml}$ ) und Propidiumiodid (5  $\mu\text{l/ml}$ ) inkubiert.

Für unsere Experimente wurden die Astrozyten für 5 Stunden bei 30 °C auf der Heizplatte im Dunkeln inkubiert. Pro Schale wurden die rotgefärbten (Propidiumiodid) und blaugefärbten (HOE) Zellkerne in fünf zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern unter dem Mikroskop gezählt und anschließend die relative Häufigkeit berechnet.

### 3.3 Blocker des $\text{Ca}^{2+}$ -Weges

Die nachfolgende Tabelle zeigt die verwendeten Substanzen mit ihren Eigenschaften und Konzentrationen:

Substanz	Konzentrationen	Eigenschaften
Nimodipine	10 $\mu\text{mol/L}$	Kompetitiver Inhibitor plasmalemaler spannungsabhängiger $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ
Cyclosporin A	1 $\mu\text{mol/L}$	Hemmer der mitochondrialen Permeabilität-Transition-Poren
Suramin	100 $\mu\text{mol/L}$	Inhibitor von purinergen ( $\text{P}_2$ ) ATP-Rezeptoren
2-aminoethoxydiphenyl borate	100 $\mu\text{mol/L}$	Inhibitor der IP3-abhängigen $\text{Ca}^{2+}$ -

		Freisetzungskanäle am endoplasmatischen Retikulum
D(-)-2-Amino-5-Phosphonopentanoic Acid	50 µmol/L	Inhibitor von Glutamat-Rezeptoren

### 3.4 ATP-Messungen im Liquor mittels der ATP-Biolumineszenz-Methode:

Der ATP-Gehalt im Liquor wurde mittels eines kommerziellen ATP-Biolumineszenz-Kits bestimmt. Die Methode der Biolumineszenz beruht auf einer enzymkatalysierten Reaktion, wobei die katalysierenden Enzyme als Luciferasen bezeichnet werden. Luciferasen sind Oxygenasen, welche ihre Luciferine (Leuchtstoffe) mit Hilfe von Sauerstoff oxidieren. Bei Vorhandensein von ATP sowie Luciferin und Luciferase kommt es zur Bildung eines oxyluciferin-AMP-PP<sub>i</sub>-Komplexes und der Freisetzung von Licht als Energie nach folgender Reaktion:



Das emittierte Licht in dieser Reaktion ist mit Hilfe eines Luminometers bei einer Wellenlänge von 560 nm messbar. Das entstehende Licht ist dabei proportional zu der ATP-Konzentration.

Für die Experimente wurden 50 µl nativer oder blutiger Liquor mit 50 µl Luciferase-Reagent vermischt, anschließend sofort in die Detektionskammer des Luminometers eingebracht und wurden innerhalb der ersten 5 Minuten einmal gemessen. Die Ergebnisse sind als „Relative Lichteinheiten“ angegeben.

### 3.5 Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM von n verschiedenen Experimenten wiedergegeben. Statistische Vergleiche wurden durch einfache Varianzanalyse unter Nutzung des Student-Newman-Keuls-Tests für post-hoc Analysen durchgeführt (Ludbrook, 1994). Unterschiede mit  $p \leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Blutiger zerebrospinaler Liquor induziert Nekrose aber nicht Apoptose in humanen Astrozyten

Da bekannt ist, daß der Zelltod von Hirngewebe eine der schwerwiegendsten Folgen einer Ventrikelblutung sein kann, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht, ob blutiger zerebrospinaler Liquor (bloody cerebrospinal fluid=bCSF) den Zelltod von kultivierten Astrozyten induzieren kann. Nach 5-stündiger Inkubation mit nativer CSF (nCSF) oder blutiger CSF (bCSF) wurde sowohl der apoptotische als auch der nekrotische Zelltod mittels Propidiumiodid und Hoechst33342 Doppelfärbung bestimmt.

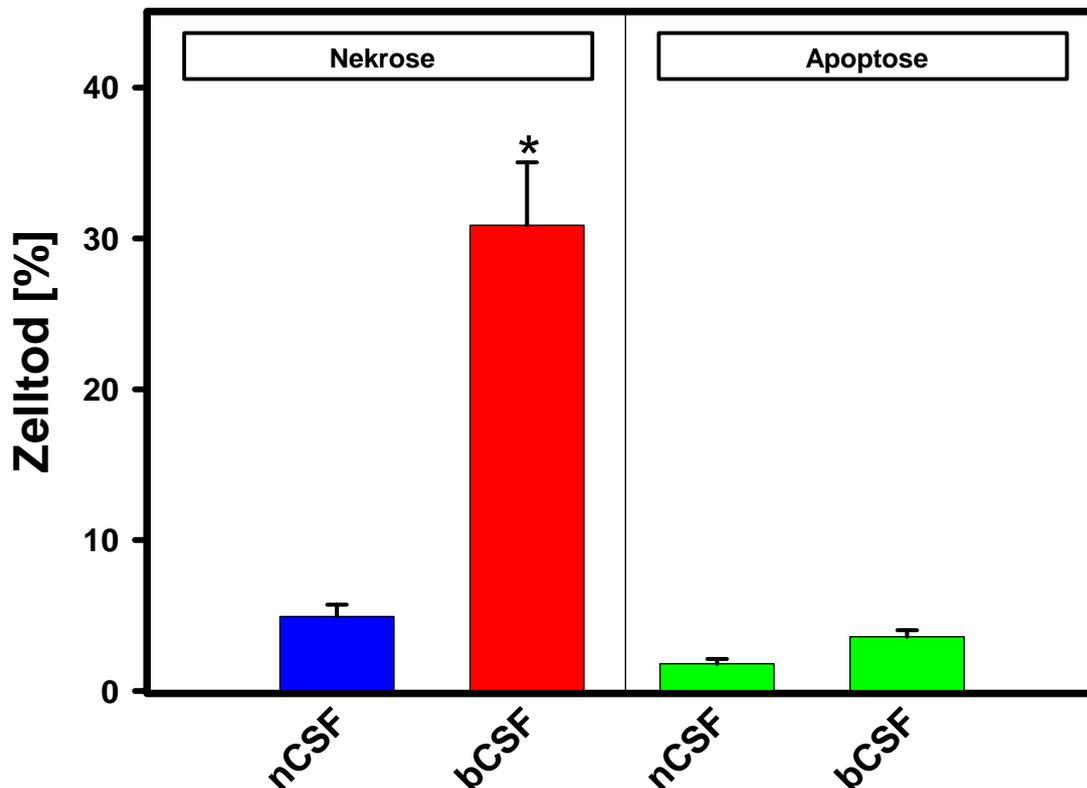


Abbildung 4.1: Nekrose und Apoptose in Astrozyten (%) nach 5-stündiger Inkubation mit nativer CSF (nCSF) oder blutiger CSF (bCSF). Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt; \* $p < 0,05$  vs. nCSF;  $n \geq 4$  pro Bedingung.

Abbildung 1 zeigt einen signifikanten Anstieg der Nekroserate der Astrozyten, die mit bCSF inkubiert wurden im Vergleich zu nCSF inkubierten Astrozyten nach 5 Stunden. Die

Apoptoserate nach bCSF Applikation war nach 5 Stunden im Vergleich zu nativem Liquor nicht signifikant verändert.

#### 4.2 Die Rolle des zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ bei der Entstehung von bCSF-induzierter Nekrose

Da ein unkontrollierter Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu Nekrose führen kann, haben wir die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 in Anwesenheit von bCSF oder nCSF untersucht.

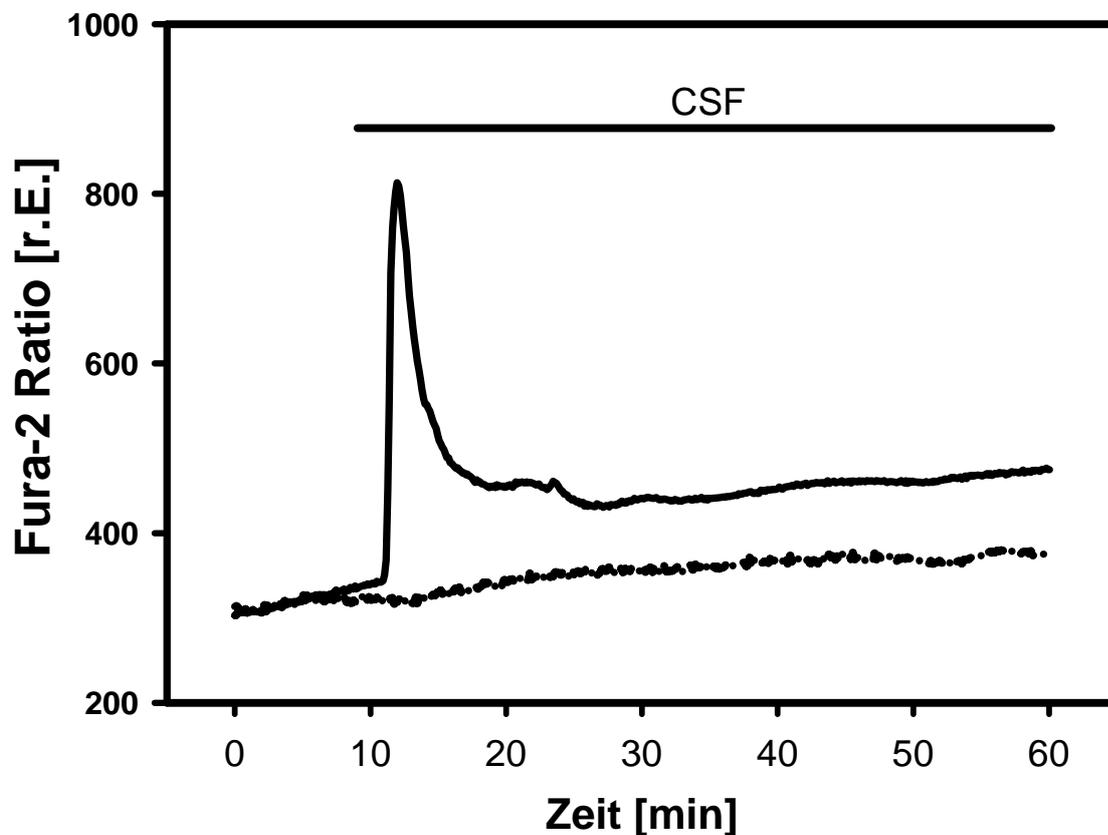


Abbildung 4.2.A: Exemplarischer Verlauf der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Fura-2 ratio) in Astrozyten während Inkubation mit nativer CSF (nCSF, gestrichelte Kurve) oder blutiger CSF (bCSF, durchgezogene Kurve).

Die mit bCSF inkubierten Astrozyten zeigen einen ausgeprägten initialen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg der nicht vollständig reversibel ist und dem eine fortwährende  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung folgt. Die mit nativer CSF inkubierten Astrozyten zeigen keinen Calciumanstieg.

Die folgende Abbildung zeigt die statistische Auswertung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spitzenkonzentration nach Inkubation mit bCSF oder nCSF als Balkendiagramm. Hier und im Folgenden wurde der Maximalwert des Calciumanstiegs nach bCSF Inkubation auf 100% gesetzt und alle restlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte darauf bezogen.

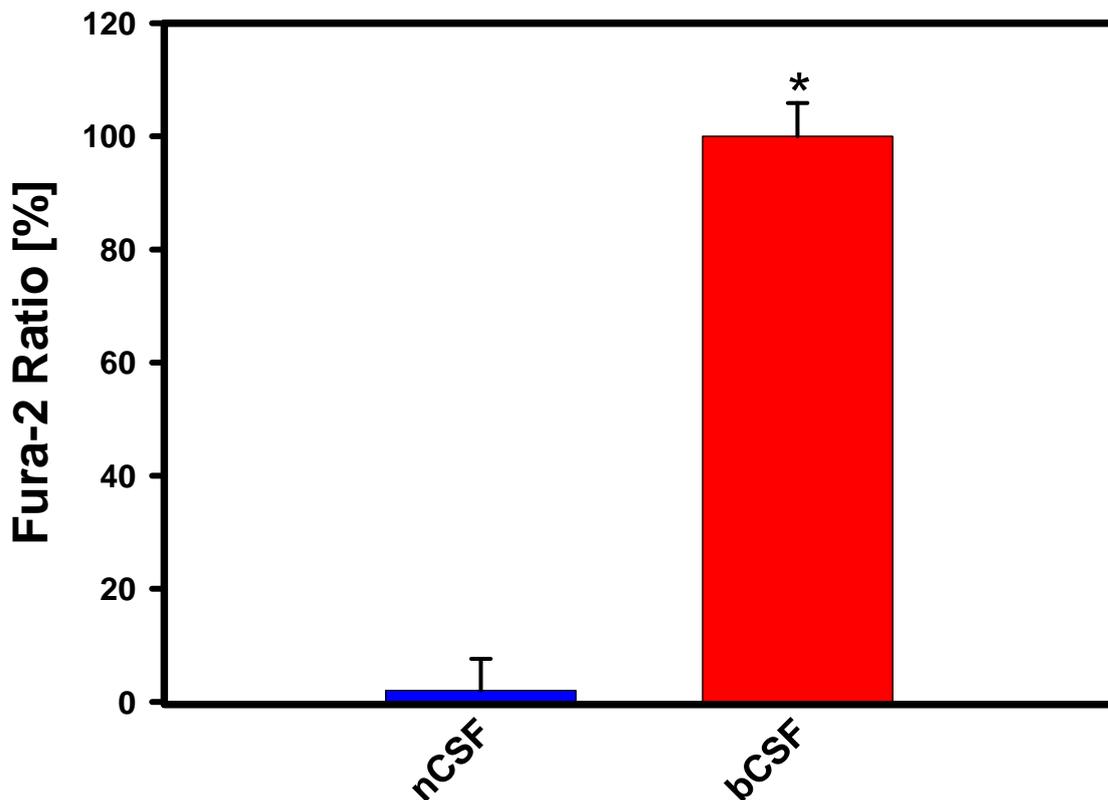


Abbildung 4.2.B: Initialer zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak (Fura-2 ratio) in Astrozyten nach Inkubation mit nativer CSF (nCSF) oder blutiger CSF (bCSF). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in Prozent, bezogen auf die Peakhöhe nach bCSF Applikation. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle;  $n \geq 4$  pro Bedingung.

#### 4.3 Mechanismen des bCSF-induzierten Anstiegs der zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ Konzentration

Als nächstes wurde der Signalweg untersucht, der für die bCSF-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung verantwortlich ist. Astrozyten exprimieren eine große Vielfalt von Rezeptoren (Porter et al. 1997), welche nach Aktivierung durch exogen applizierte Neurotransmitter zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums führen (Porter et al 1997; Verkhratsky et al. 1998; Kettenmann et al. 2005). Unter anderem kann der zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel von extrazellulär über Glutamat- (NMDA-Rezeptoren) oder ATP-Rezeptoren ( $\text{P}_2$ -Rezeptoren)

beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurde die Rolle dieser Rezeptoren bei dem bCSF-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg untersucht. Zu diesem Zweck haben wir spezifische Rezeptorantagonisten gegen  $\text{P}_2$ -Rezeptoren (Suramin) [100 $\mu\text{mol/L}$ ] oder gegen NMDA-Rezeptoren (D(-)-2-Amino-5-Phosphonopentanoic Acid) [50 $\mu\text{mol/L}$ ] während bCSF-Applikation eingesetzt.

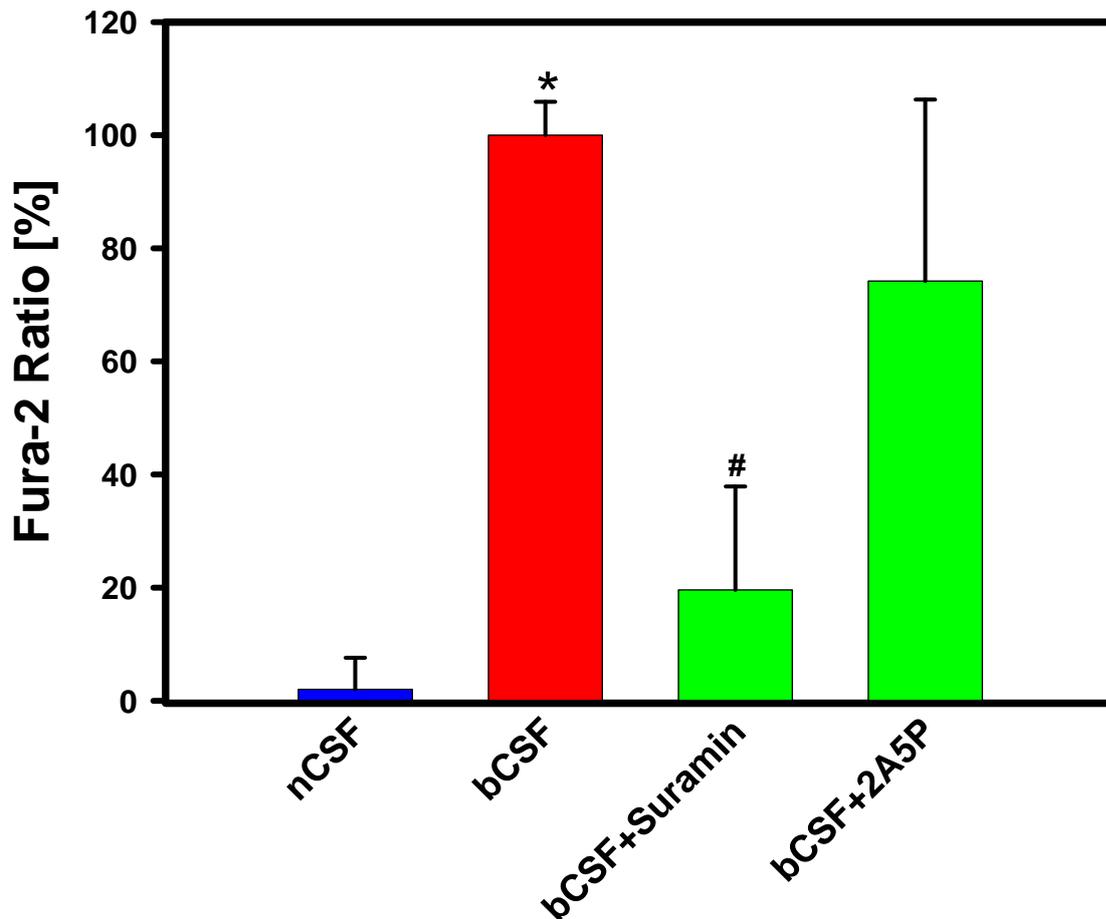


Abbildung 4.3.A: Initialer zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak (Fura-2 ratio) in Astrozyten nach Inkubation mit nativer CSF (nCSF) oder blutiger CSF (bCSF) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Suramin oder D (-)-2-Amino-5-Phosphonopentanoic-Acid (2A5P). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in Prozent, bezogen auf die Peakhöhe nach bCSF-Applikation. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, # $p < 0,05$  vs. bCSF;  $n \geq 4$  pro Bedingung.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Blockade der  $\text{P}_2$ -Rezeptoren durch Suramin den initialen Calciumanstieg reduziert, während eine NMDA-Rezeptor-Blockade keine signifikante Veränderung bewirkt.

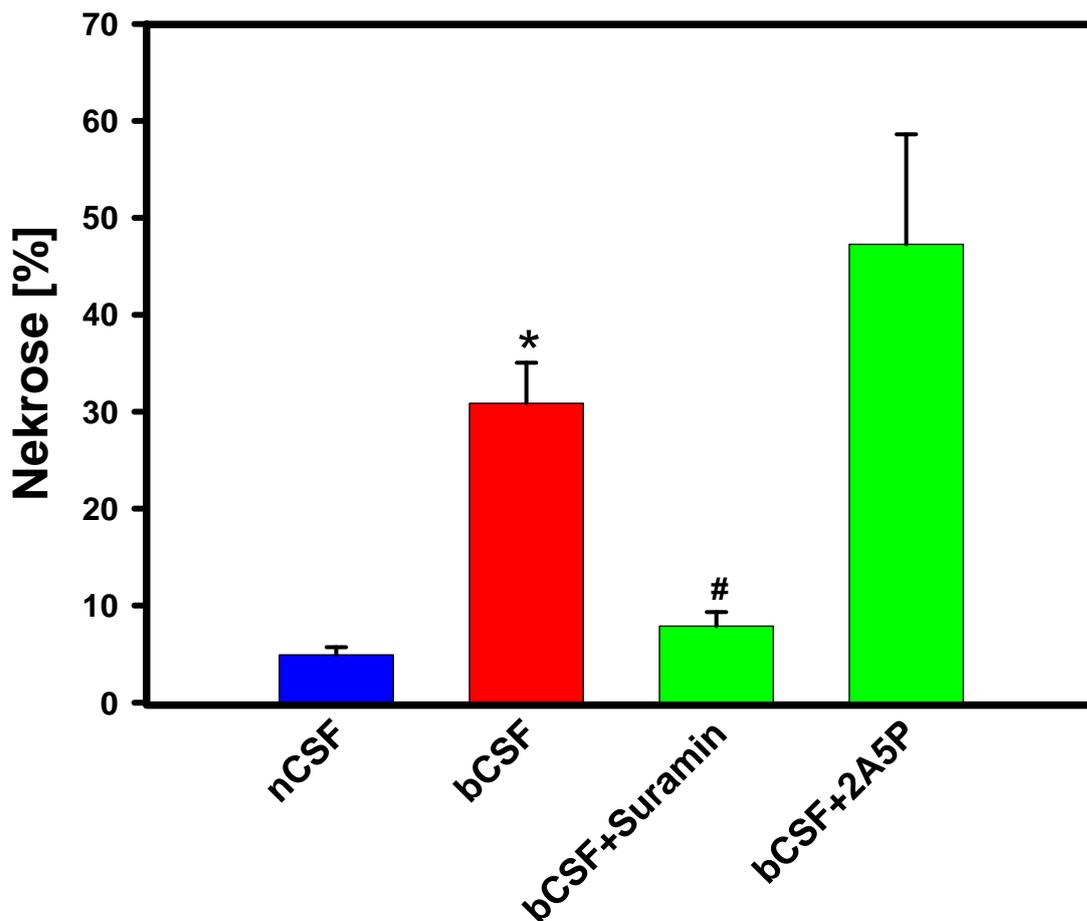


Abbildung 4.3.B: Nekrose in Astrozyten (%) nach 5-stündiger Inkubation mit nativer CSF (nCSF) oder blutiger CSF (bCSF) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Suramin oder D(-)-2-Amino-5-Phosphonopentanoic-Acid (2A5P). Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, # $p < 0,05$  vs. bCSF;  $n \geq 4$  pro Bedingung.

Die Auswertung der Nekrosemessungen unter diesen Versuchsbedingungen (Abbildung 4.3.B) zeigt, dass die durch ATP-Rezeptorblockade erreichte Reduktion des initialen Calciumanstiegs mit einer Nekrosereduktion einhergeht. Eine NMDA-Rezeptorblockade hat hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die bCSF-induzierte Nekrose.

#### 4.4 Die Rolle von extrazellulärem ATP

Die bisherigen Daten deuten auf eine massgebliche Beteiligung der ATP-Rezeptoren an dem zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg und der Nekroseinduktion in Astrozyten nach Inkubation mit bCSF hin. Um zu überprüfen, ob dies auf eine Aktivierung der  $\text{P}_2$ -Rezeptoren durch in bCSF enthaltenem ATP zurückzuführen sein kann, wurde die ATP-Konzentration in den unterschiedlichen Liquorproben bestimmt.

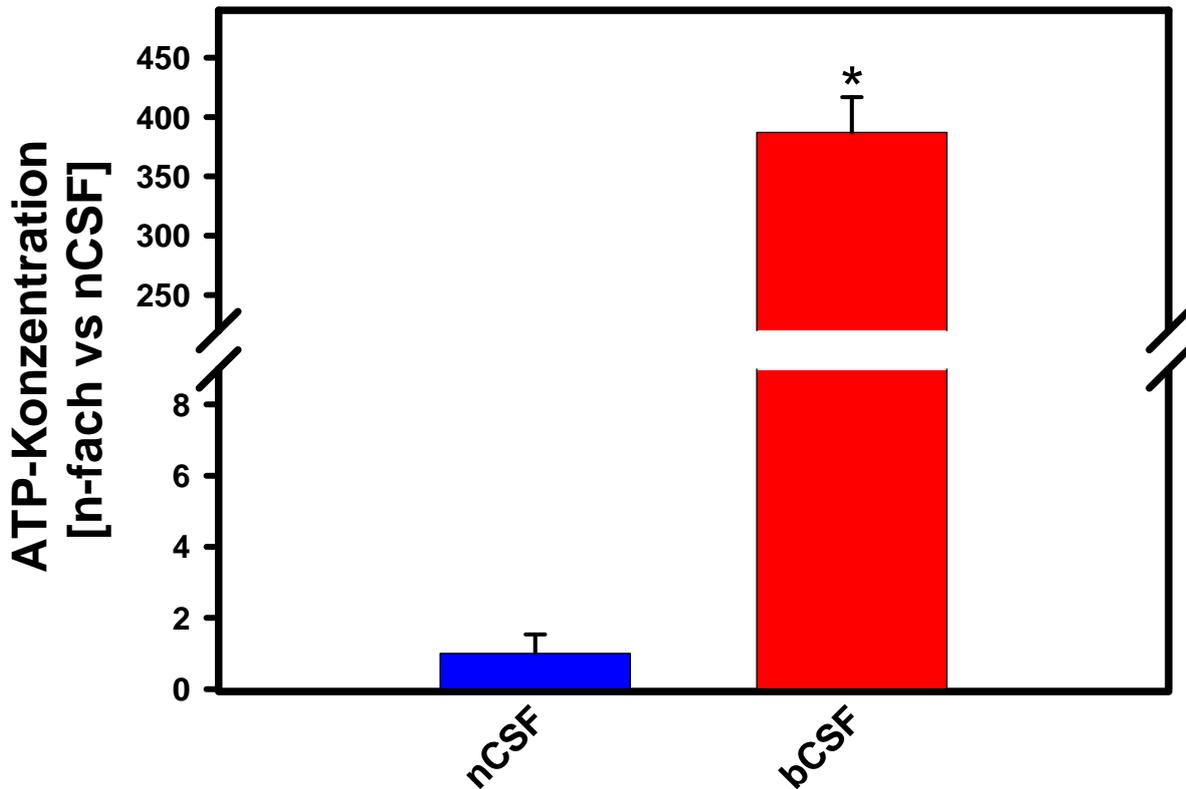


Abbildung 4.4 ATP-Konzentration im liquor. ATP-Konzentration in blutiger CSF (bCSF) und nativer CSF (nCSF). Die durchschnittliche ATP-Konzentration in nativem Liquor wurde auf 1 gesetzt und die Konzentration in bCSF darauf bezogen. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in Prozent. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle;  $n \geq 6$  pro Bedingung.

Die Daten in Abbildung 4.4 zeigen, dass der ATP-Gehalt in bCSF gegenüber nCSF um ungefähr das 400-fache erhöht ist.

#### 4.5 Die Rolle der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher

Durch die Bindung an purinerge Rezeptoren führt ATP zur Öffnung von  $\text{IP}_3$ -abhängigen Calciumfreisetzungskanälen am endoplasmatischen Retikulum, wodurch ein Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytoplasma induziert wird. Deshalb wurde die Rolle der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher als Quelle für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg untersucht, indem die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle des endoplasmatischen Retikulums mit 2APB während bCSF-Applikation blockiert wurden. 2APB wurde in einer Konzentration von  $100\mu\text{mol/l}$  eingesetzt, da es bei dieser Konzentration die  $\text{IP}_3$  abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle am ER blockiert (Putney, 2001).

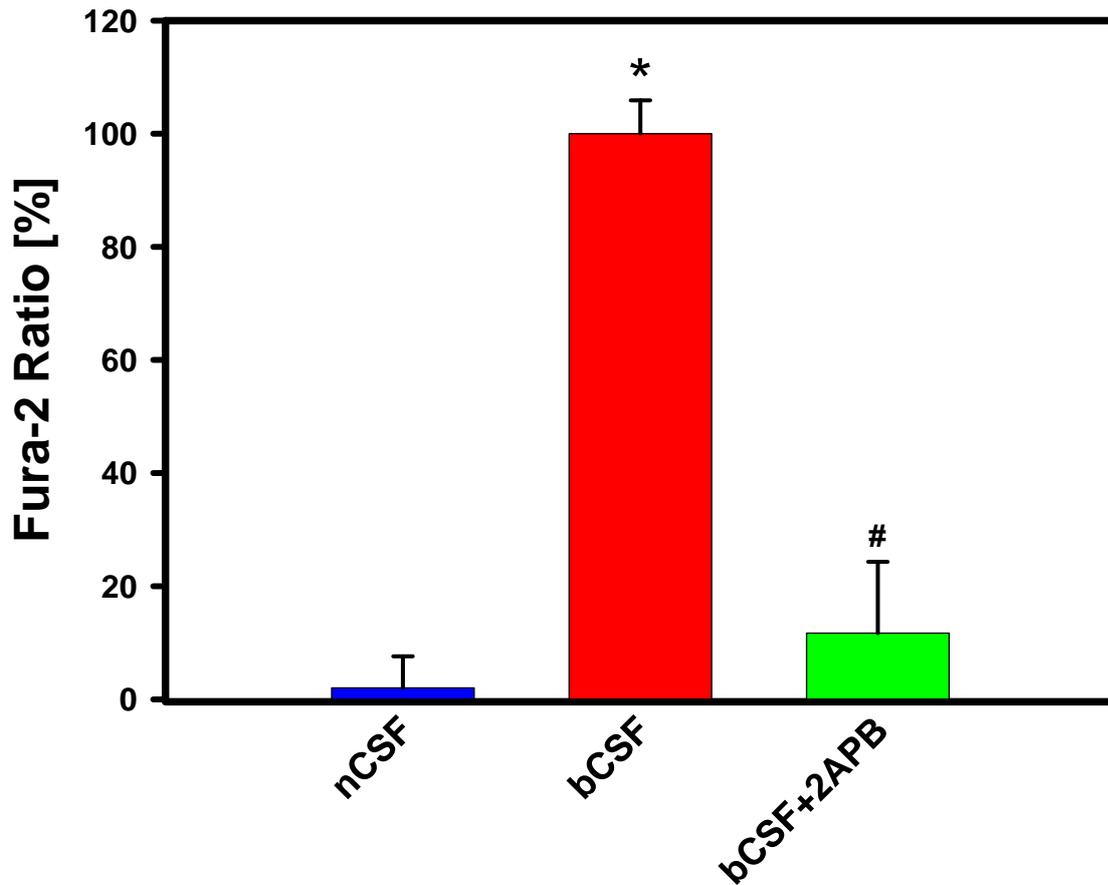


Abbildung 4.5.A: Initialer zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak (Fura-2 ratio) in Astrozyten nach Inkubation mit nativer CSF (nCSF), blutiger CSF (bCSF) in Anwesenheit oder Abwesenheit von 2-aminoethoxydiphenyl borate (2APB). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in Prozent, bezogen auf die Peakhöhe nach bCSF-Applikation. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, # $p < 0,05$  vs. bCSF;  $n \geq 4$  pro Bedingung.

Die statistische Auswertung zeigt, dass durch die Blockade der  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren durch 2APB der initiale  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg aufgehoben wird.

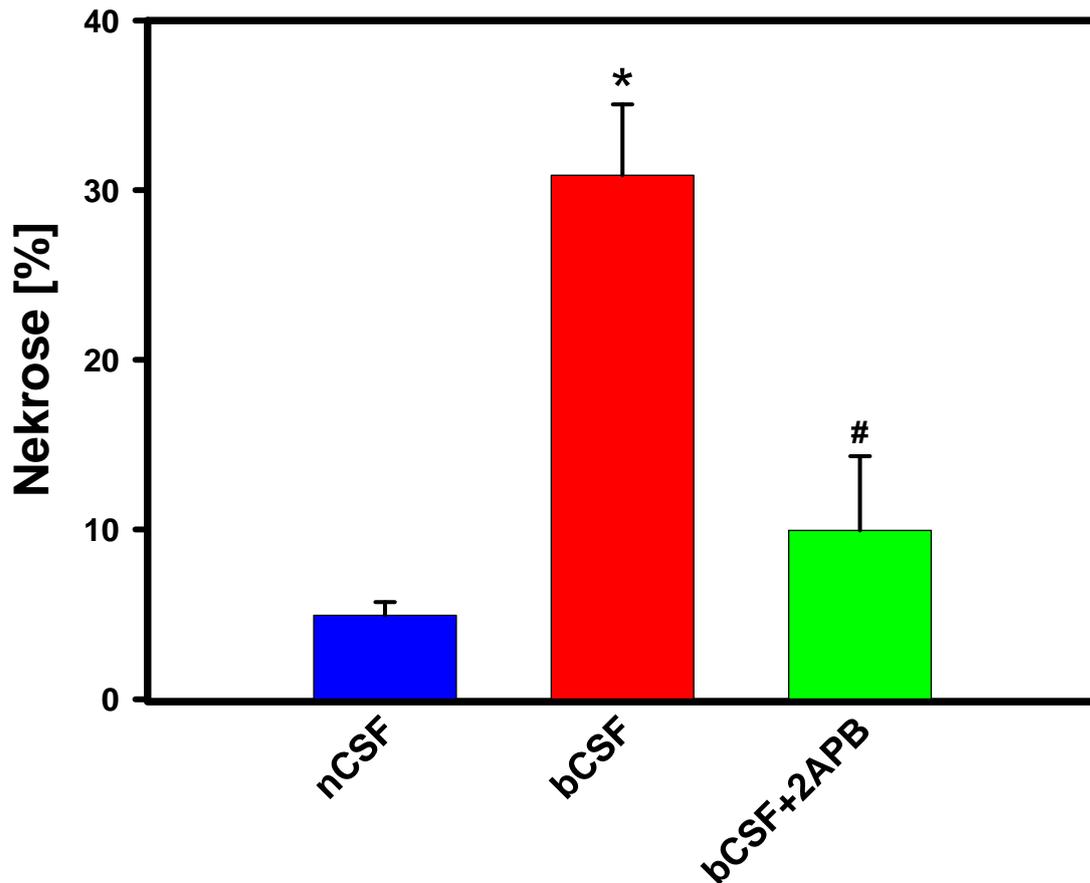


Abbildung 4.5.B: Nekrose in Astrozyten (%) nach 5-stündiger Inkubation mit nativer CSF (nCSF), blutiger CSF (bCSF) in Anwesenheit oder Abwesenheit von 2-aminoethoxydiphenyl borate (2APB). Daten sind als Mittelwerte dargestellt, \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, # $p < 0,05$  vs. bCSF;  $n \geq 4$  pro Bedingung.

Die Quantifizierung der nekrotischen Zellen unter den gleichen Bedingungen zeigt, dass die Blockade der  $IP_3$ -abhängigen Calciumfreisetzung nach bCSF-Applikation zu einer signifikanten Nekrosereduktion führt.

#### 4.6 Die Rolle des extrazellulären Calciums

Um zu untersuchen, ob transplasmalemmale Calciumrouten bei der Entwicklung des initialen, bCSF-induzierten Calciumanstiegs eine Rolle spielen, wurden einerseits Versuche durchgeführt in denen die L-Typ Calciumkanäle mit Nimodipine [10  $\mu\text{mol/l}$ ] gehemmt wurden.

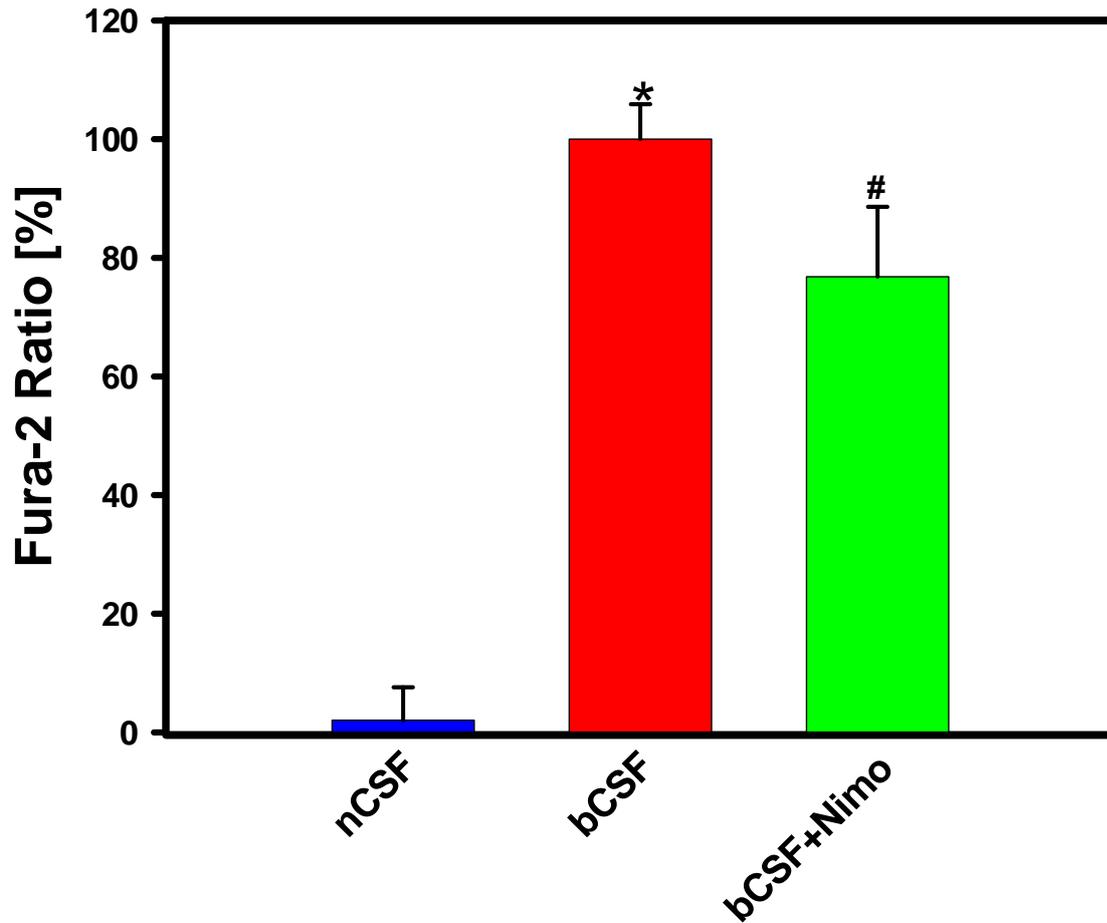


Abbildung 4.6.A: Initialer zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak (Fura-2 ratio) in Astrozyten nach Inkubation mit nativer CSF (nCSF) oder blutiger CSF (bCSF) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Nimodipine (Nimo). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in Prozent, bezogen auf die Peakhöhe nach bCSF Applikation. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, # $p < 0,05$  vs. bCSF;  $n \geq 4$  pro Bedingung.

Die statistische Auswertung der Calciummessungen zeigt, dass eine Hemmung der Calciumkanäle vom L-Typ zu einer gerade signifikanten Verringerung des initialen Calciumanstiegs führt.

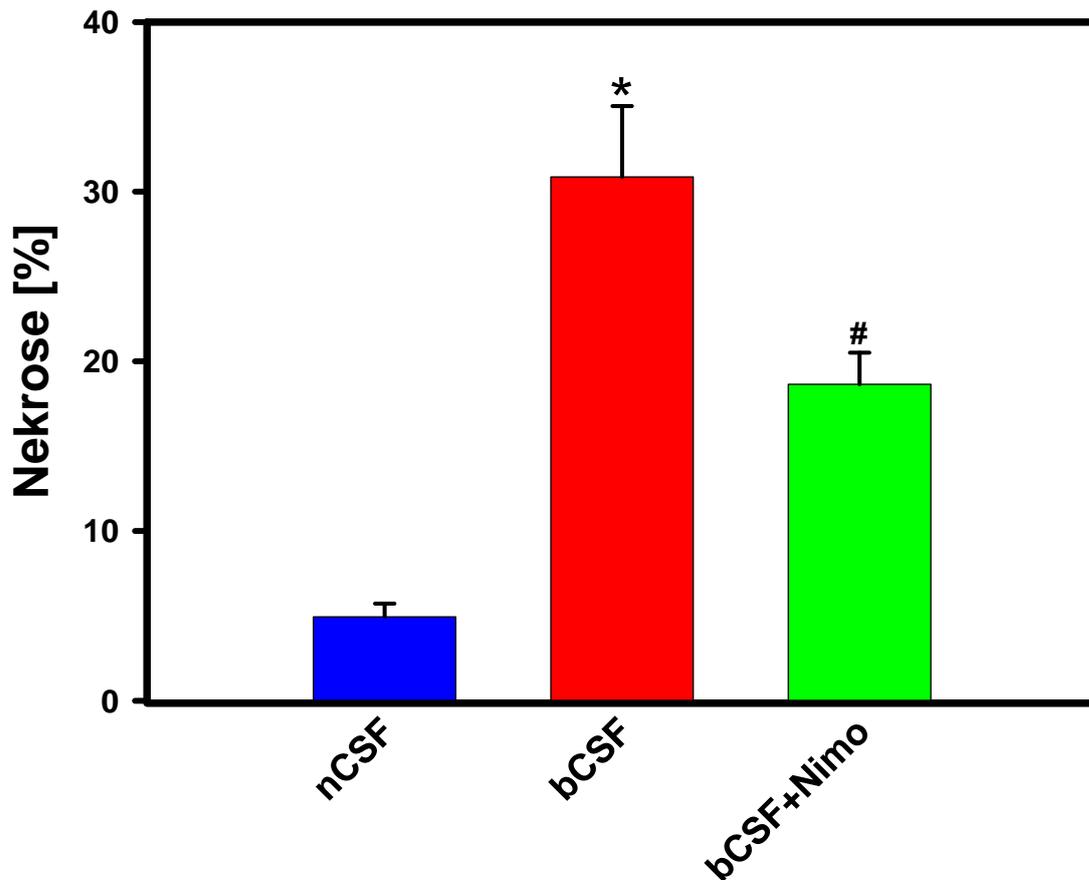


Abbildung 4.6.B: Nekrose in Astrozyten (%) nach 5-stündiger Inkubation mit nativer CSF (nCSF), oder blutiger CSF (bCSF) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Nimodipine (Nimo) Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, # $p < 0,05$  vs. bCSF;  $n \geq 4$  pro Bedingung.

Die Auswertung der Nekroserate unter diesen Versuchsbedingungen zeigte eine Reduktion wenn die L-Typ-Calciumkanäle während bCSF-Applikation gehemmt wurden.

#### **4.7 Die Rolle der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore für die Entstehung der Nekrose**

Der Verlust der mitochondrialen Ionenkompartimentierung sowie der Zusammenbruch der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung durch MPTP-Öffnung kann sowohl nekrotischen als auch apoptotischen Zelltod verursachen (Halestrap et al. 2004). Eine Studie von Jacobson hat gezeigt, dass erhöhte mitochondriale Depolarisation zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung in den Mitochondrien führt (Jacobson et al. 1998). Dies leitet die MPTP-Öffnung ein. Aus diesen Gründen haben wir eine mögliche Beteiligung von MPTP bei der Entstehung der bCSF-induzierten Nekrose untersucht.

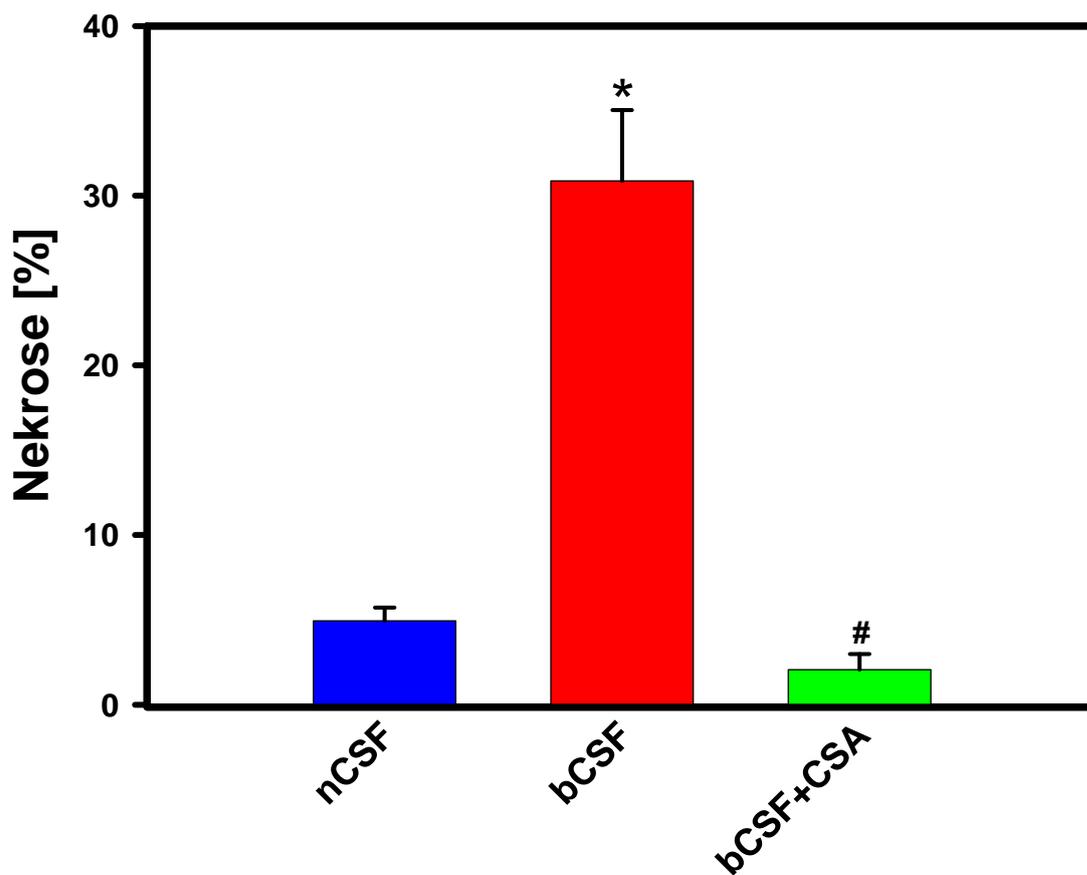


Abbildung 7B: Nekrose in Astrozyten (%) nach 5-stündiger Inkubation mit nativer CSF (nCSF) oder blutiger CSF (bCSF) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Cyclosporin A (CSA). Daten sind als Mittelwerte dargestellt, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, # $p < 0,05$  vs. bCSF;  $n \geq 4$  pro Bedingung.

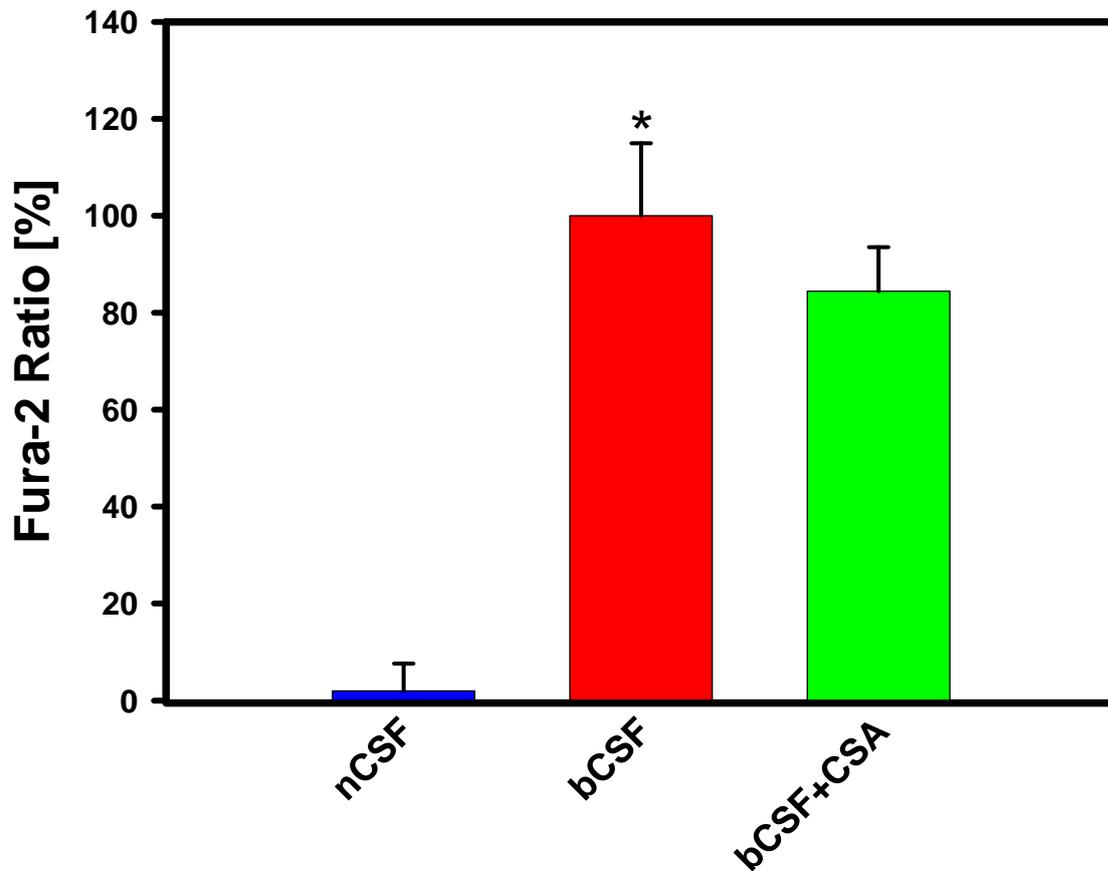


Abbildung 7A: Initialer zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Peak (Fura-2 Ratio) in Astrozyten nach Inkubation mit nativer CSF (nCSF) oder blutiger CSF (bCSF) in Anwesenheit oder Abwesenheit von Cyclosporin A (CSA). Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM in Prozent, bezogen auf die Peakhöhe nach bCSF Applikation. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle;  $n \geq 4$  pro Bedingung.

Die Vorinkubation der Zellen mit dem spezifischen Inhibitor der MPTP Cyclosporin A [1  $\mu\text{mol/l}$ ] führte zur signifikanten Reduktion der Nekroserate ohne signifikanten Einfluss auf die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik. Diese Befunde legen nahe, dass die MPTP ein Downstream-target für den zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg darstellen und für die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Nekroseinduktion nach bCSF-Inkubation verantwortlich sind.

## 5. Diskussion

Am Modell von kultivierten humanen Astrozyten konnte in dieser Studie gezeigt werden,

- 1.) dass blutiger zerebrospinaler Liquor Nekrose und nicht Apoptose in humanen Astrozyten induziert und dass die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung eine wichtige Rolle bei der Entstehung von bCSF-induzierter Nekrose spielt,
- 2.) dass die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung von der Aktivierung astrozytärer  $\text{P}_2$ -Rezeptoren und  $\text{IP}_3$ -abhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle am endoplasmatischen Retikulum abhängig sind, während NMDA-Rezeptoren keine wesentliche Rolle bei diesem Schädigungsmechanismus spielen,
- 3.) dass eine Blockade der  $\text{P}_2$ -Rezeptoren die Nekroserate reduziert, während NMDA-Blockade durch D(-)-2-Amino-5-Phosphonopentanoic Acid keine signifikante Veränderung auf die Nekroserate hat,
- 4.) dass der ATP-Gehalt in bCSF gegenüber nCSF um zwei Zehnerpotenzen erhöht ist,
- 5.) dass die durch bCSF induzierte Nekrose der Astrozyten durch eine Blockade der MPTP mit Cyclosporin A verhindert werden kann ohne die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik zu beeinflussen.

Im Rahmen einer Subarachnoidalblutung konnte gezeigt werden, dass die lysierten Erythrozyten mit einer Reihe von Schädigungsmechanismen im Hirngewebe verknüpft sind (Xi et al. 1998). Einer der schädlichen Effekten von Oxyhämoglobin (OxyHb), einem Abbauprodukt aus lysierten Erythrozyten in der traumatischen Gehirnverletzung oder der Subarachnoidalblutung, ist seine toxische Wirkung auf neuronales Gewebe und Gehirngefäßzellen, was zu zerebralem Vasospasmus, zerebraler Ischämie und zum Infarkt führen kann. Der Eintritt von Blut in den Subarachnoidalraum wurde für den zerebralen Vasospasmus verantwortlich gemacht (Lennihan et al. 2000; Stoodley et al. 2000). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Applikation von OxyHb in kultivierten Endothelzellen Apoptose (Meguro et al. 2001; Ogihara et al. 1999) und in Glattmuskelzellen Nekrose induzieren kann (Ogihara et al. 2000). Analysen an astrozytären Zelllinien haben gezeigt, dass die Exposition dieser Zellen zu Oxyhämoglobin zum nekrotischen Zelltod führt (Rollins et al. 2002). Andere Arbeiten an Ratten-Astrozyten haben gezeigt, dass eine zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung zur Nekrose führen kann (Mehta et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns mit der Frage beschäftigt, ob die Inkubation von kultivierten Astrozyten mit blutigem zerebrospinalen Liquor Nekrose induziert und welcher Mechanismus dieser Schädigung zugrunde liegt.

Dafür verwendeten wir humane Astrozyten, die wir mit bCSF inkubiert haben. In unserem Zellkulturmodell können wir funktionelle Veränderungen (z.B. Ionenhomöostase) und deren morphologische Folgen (z.B. Zelltod) simultan untersuchen.

Die Inkubation mit blutigem Zerebrospinalliquor führte in unserem Modell kultivierter humaner Astrozyten zu einem zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg und zu einer gesteigerten Nekroserate. Mittels Video-Imaging-Floureszenzmikroskopie konnten wir die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der Applikation von bCSF kontinuierlich messen und konnten durch Hemmstoffversuche mit Suramin zeigen, dass bCSF Applikation die Aktivierung von purinergen  $\text{P}_2$ -Rezeptoren nach sich zieht.

Da purinerge  $\text{P}_2\text{Y}$ -Rezeptoren die intrazelluläre Calciumkonzentration  $\text{IP}_3$ -vermittelt erhöhen können, blockierten wir die intrazellulären  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren in einer weiteren Versuchsreihe mit 2-aminoethoxydiphenylborate (2APB). In einer Studie mit pyramidalen Neuronen wurde die Rolle von 2APB beschrieben. Das Ergebnis war, dass 2APB (100  $\mu\text{M}$ )  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren blockieren kann (Hagenston et al. 2009). Eine andere Arbeitsgruppe (Zhao et al. 2008) hat in den glatten Muskelzellen von Hirnarterien gefunden, dass 2APB die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reduziert. Die Experimente im

Rahmen dieser Arbeit auf humanen Astrozyten haben erstmalig gezeigt, dass 2APB den  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg und die Nekroserate nach Applikation von bCSF reduzieren kann.

NMDA-Rezeptoren gehören zu den ionotropen Glutamatrezeptoren. NMDA-Rezeptoren öffnen sich nach vorangegangener Depolarisation der Membran und führen zu einem Calciumeinstrom in die Zelle. Astrozyten exprimieren zwar sowohl metabotrope Glutamatrezeptoren, als auch AMPA-Rezeptoren (Seifert et al. 1997). Untersuchungen auf kultivierte Ratten-Astrozyten von (Zhang et al. 2003) zeigten, dass NMDA-Rezeptoraktivierung zu intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg führt. In der Arbeit von Zhang et al. (2003) wurde D(-)-2-Amino-5-Phosphonopentanoic Acid, ein NMDA-Rezeptorblocker, eingesetzt. Die Deaktivierung von NMDA-Rezeptor zeigte eine Reduktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung. Im Rahmen unserer Arbeit haben wir die Beteiligung von NMDA-Rezeptoren an den bCSF-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg überprüft. Die Daten unserer Arbeit zeigen, dass die NMDA-Blockade mit D(-)-2-Amino-5-Phosphonopentanoic Acid keine signifikante Veränderung auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg oder auf die Nekroserate nach bCSF-Applikation bewirkt.

Eine wichtige Entdeckung war, dass von Astrozyten freigesetztes ATP eine Rolle als extrazelluläre Messenger spielt und dabei Calciumfreisetzung induziert (Guthrie et al. 1999; Cotrina et al. 2000). Freigesetztes ATP aktiviert Astrozyten über einen  $\text{P}_2$ -Rezeptor, der eine lokale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung und anschließende Weiterleitung sogenannter  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen auf benachbarter Astrozyten induziert (Verkhatsky, 2006). Cotrina et al. (1998) zeigte, dass Applikation von Suramin, einem Antagonist purinerge Rezeptoren, auf kultivierte Astrozyten die  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellenausbreitung reduzieren konnte. In der vorliegenden Arbeit gelang es uns, durch eine Blockade der  $\text{P}_2$ -Rezeptoren durch Suramin (100  $\mu\text{M}$ ) den  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg signifikant zu reduzieren. Unter diesen Bedingungen führte Suramin auch zu einer signifikanten Reduktion der Nekrose. Dies weist wiederum auf eine Kausalität zwischen dem zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg und der Entstehung der Nekrose nach Inkubation mit bCSF hin. Untersuchungen von Braet et al. (2003b) haben gezeigt, dass eine endotheliale ATP-Freisetzung durch eine Zunahme von intrazellulärem Calcium ausgelöst werden kann. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass extrazelluläres ATP der Hauptmessenger für die extrazelluläre Kommunikation ist. Zum einen wird ATP von Astrozyten während der Ausbreitung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen freigesetzt (Guthrie et al. 1999; Cotrina et al. 2000). Zum anderen konnte die Ausbreitung durch purinerge Antagonisten reduziert oder aufgehoben werden. (Newman, 2001; Koizumi et al. 2003). Außerdem wurde ATP nach der Ausbreitung einer Welle in

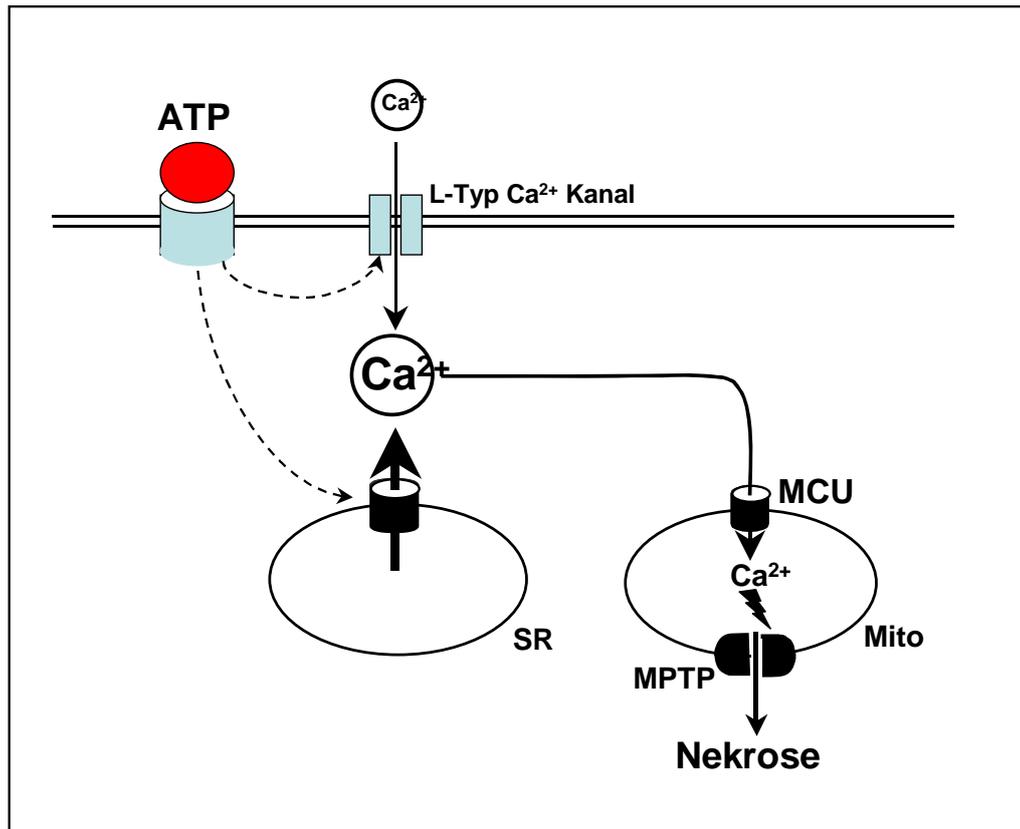
der Extrazellulärflüssigkeit nachgewiesen (Guthrie et al. 1999; Scemes et al. 2000). Am wahrscheinlichsten ist demnach eine propagierende ATP-Freisetzung aus Astrozyten: ATP wird von einer Zelle freigesetzt, bindet an Purinorezeptoren einer Nachbarzelle und löst dort eine intrazelluläre Calciumerhöhung aus, sowie eine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Freisetzung von ATP (Anderson et al. 2004). Diese Kenntnisse haben uns veranlasst, den ATP-Gehalt sowohl in bCSF als auch in nCSF zu messen. Unsere Daten zeigen, dass der ATP-Gehalt in bCSF gegenüber nCSF um zwei Zehnerpotenzen erhöht ist. Dieser ATP-Gehalt scheint der Grund für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg zu sein, da keine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während nCSF-Applikation gefunden wurde.

Nimodipin ist ein L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker. Die Ergebnisse von Haile et al. weisen darauf hin, dass Nimodipin die Schwächung des Arbeitsgedächtnisses nach Hypoxie verhindert (Haile et al. 2009). Andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Nimodipin dopaminerge Neuronen gegen die Inflammation vermittelte Degeneration durch die Hemmung der mikroglialen Aktivierung schützt (Li et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ bei den Astrozyten einen zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg induzieren können und ob dies durch Nimodipin reduziert werden kann. Unsere Daten haben gezeigt, dass eine Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ mit Nimodipin zu einer mässigen Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs und der Nekroserate führt, die jedoch bei weitem nicht so ausgeprägt ist wie bei Blockade der  $\text{IP}_3$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle am endoplasmatischen Retikulum. Somit scheinen die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher die Hauptrolle zu spielen.

Als Mechanismus für die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Nekrose haben wir die Rolle von MPTP untersucht. MPTP stellen eine Megapore zwischen den inneren und äußeren Mitochondrienmembran dar und können sowohl apoptotischen als auch nekrotischen Zelltod induzieren. Einer der möglichen Auslöser einer derartigen MPTP-Öffnung ist ein zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg oder die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies.

Unsere Ergebnisse auf Astrozyten zeigen, dass eine Blockade der MPTP durch Cyclosporin A zu einer signifikanten Reduktion der Nekrose ohne Einfluss auf die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik führt. Dieser Befund weist darauf hin, dass MPTP als ein Downstream-Signal der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung aber als Upstream-Signal der Nekrose fungiert.

Die Befunde und Hypothesen der Arbeit sind im folgenden Schema zusammengefasst:



Das im blutigen Liquor enthaltene ATP führt über Stimulation der purinergen P2 Rezeptoren zu einer IP<sub>3</sub>-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Das freigesetzte Ca<sup>2+</sup> aus dem ER führt in den benachbarten Mitochondrien zur einer Ca<sup>2+</sup> Überladung, die vermutlich durch den sogenannten mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Uniporter (MCU) erfolgt. Diese Ca<sup>2+</sup> Überladung scheint die MPTP-Öffnung zu triggern.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

**Ziele:** Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung ist ein Kofaktor von vielen Zellprozessen einschließlich Apoptose und Nekrose. Die Hypothese von dieser Studie war, dass blutiger zerebrospinaler Liquor (bCSF) von Patienten nach intraventrikulärer Blutung einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg verursachen konnte, der Apoptose oder Nekrose in humanen Astrozyten induziert.

**Methode:** Humane Astrozyten wurden mit bCSF inkubiert. In Kontrollexperimenten wurde nativer zerebrospinaler Liquor (nCSF) verwendet.

Die zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von den einzelnen Zellen wurde mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Farbstoffe (Fura-2) gemessen. Vier Blocker wurden verwendet: Nimodipin (L-Typ-Calciumkanäle Hemmer), 2-aminoethoxydiphenyl-borate (2APB) ( $\text{IP}_3$ -Rezeptorenblocker des endoplasmatischen Retikulums), Suramin ( $\text{P}_2$ -Rezeptorenantagonist), D (-)-2-amino-5-phosphonopentanoic-acid (2A5P) (NMDA-Rezeptorblocker), und Cyclosporin A (MPTP-Inhibitor). Zur Messung von Nekrose und Apoptose wurden Astrozyten mit Hoechst-33342 und Propidium Iodid markiert.

### Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen:

- 1) dass blutiger zerebrospinaler Liquor Nekrose in humanen Astrozyten induziert und dass die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung eine wichtige Rolle bei der Entstehung von bCSF-induzierter Nekrose spielt,
- 2) dass die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung und die Nekrose von der Aktivierung  $\text{P}_2$ -Rezeptoren und  $\text{IP}_3$ -abhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle am endoplasmatischen Retikulum abhängig sind,
- 3) dass eine Blockade der  $\text{P}_2$ -Rezeptoren durch Suramin den  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg und die Nekroserate reduziert, während NMDA-Blockade durch D(-)-2-Amino-5-Phosphonopentanoic Acid keine signifikante Veränderung auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg bzw. die Nekroserate bewirkt,

- 4) dass der ATP-Gehalt in bCSF gegenüber nCSF um ungefähr das 400-fache erhöht ist,
- 5) dass eine Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ durch Nimodipine zu einer geringen aber gerade signifikanten Verringerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs und der Nekroserate führt,
- 6) dass eine Blockade der  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren durch 2APB den  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg und die Nekroserate reduziert, und dass eine Blockade der MPTP durch Cyclosporin A zur signifikanten Nekrose-Reduktion ohne Einfluss auf die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik führt.

### **Schlussfolgerung:**

Blutiger zerebrospinaler Liquor verursacht Nekrose in humanen Astrozyten. Die bCSF-induzierte Nekrose wird durch einen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg verursacht, der durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER zustande kommt. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wird durch die Aktivierung der  $\text{P}_2\text{Y}$ -Rezeptoren durch ATP vermittelt.

## 7. SUMMARY

**Aims:** An increase in cellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is a cofactor of many cellular processes including apoptosis and necrosis. This study's hypothesis was that hemorrhagic cerebrospinal fluid (CSF) from patients after intraventricular hemorrhage may cause an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration which induces apoptosis or necrosis in an in-vitro model of human cerebral astrocytes.

**Method:** Human astrocytes were incubated with CSF from patients with intraventricular hemorrhage. In control experiments native CSF was used.

Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ -concentrations were measured in single cells by fura-2. Four pharmacological blockers were used: Nimodipine, 2-aminoethoxydiphenyl borate (2APB), suramine, D (-)-2-Amino-5-Phosphonopentanoic-Acid (2A5P), and cyclosporin A, that block the L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel, the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  channels, the ATP-sensitive  $\text{PY}_2$ -receptor, the NMDA-receptor, and the mitochondrial permeability transition pore (MPTP), respectively. Apoptosis and necrosis were evaluated by staining the cells with Hoechst-3342 and propidium iodide.

**The major findings of this study are :**

- 1) the fact that bloody cerebrospinal fluid induces necrosis and not apoptosis in human astrocytes. The increase of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ -concentration plays an important role in the bCSF-induced necrosis.
- 2) the fact that the increase of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ -concentration and the necrosis are dependent on the activation  $\text{P}_2$  receptors and IP-3 dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels of the endoplasmic reticulum.
- 3) the fact that blocking the  $\text{P}_2$  receptors by suramin reduces the  $\text{Ca}^{2+}$  increase and the necrosis rate, while blocking of NMDA receptors by D (-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid causes no significant change in the  $\text{Ca}^{2+}$  increase or the necrosis rate.
- 4) the fact that the ATP content is 400-fold higher in bCSF as compared to nCSF.

- 5) the fact that an inhibition of the L- type  $\text{Ca}^{2+}$  channels with Nimodipine leads to a significant reduction of the  $\text{Ca}^{2+}$  increase and the rate of necrosis.
- 6) the fact that a blockade of the IP3 receptors by 2APB reduces the  $\text{Ca}^{2+}$  increase and the necrosis rate, and that a blockade of the MPTP by Cyclosporin A leads to significant reduction of the necrosis without significant influence on cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  kinetics.

**Conclusion:**

Bloody CSF induces necrosis but not apoptosis in human astrocytes. The CSF-induced necrosis is due to increase of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  which is mediated through capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  release by the ER involving the ATP-sensitive PY2-receptor.

## 8. LITERATUR

**Abdipranoto A, Liu GJ, Werry EL et al.**

Mechanisms of secretion of ATP from cortical astrocytes triggered by uridine triphosphate.

NeuroReport 2003 14:2177-81.

**Aguado F, Espinosa-parrilla JF, Carmona MA, Soriano E.**

Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ.

J Neurosci. 2002 22:9430-9444.

**Ahmad S, Ahmed A, McConville G, Schneider BK, Allen CB, Manzer R, Mason RJ, White CW.**

Lung epithelial cells release ATP during ozone exposure: signaling for cell survival.

Free Radic Biol Med 2005 39:213-226.

**Aleu J, Martin-Satue M, Navarro P, Perez de Lara I, Bahima L, Marsal J, Solsona C.**

Release of ATP induced by hypertonic solutions in Xenopus oocytes.

J Physiol 2003 547:209-219.

**Anderson CM, Bergher JP, Swanson RA.**

ATP-induced ATP release from astrocytes.

J Neurochem 2004 88:246-56.

**Araque A, Carmignoto G, Haydon PG.**

Dynamic signaling between astrocytes and neurons.

Annu Rev Physiol. 2001 63 :795-813.

**Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buno W.**

Synaptically-released acetylcholine evokes Ca<sup>2+</sup> elevations in astrocytes in hippocampal slices.

J Neurosci. 2002 22:2443-2450.

**Aspinwall CA, Yeung ES.**

Screening populations of individual cells for secretory heterogeneity.

Anal Bioanal Chem 2005 381:660-666.

**Ballerini P, Di Iorio P, Ciccarelli R et al.**

Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release.

Neuro Report 2002 13:1789-92.

**Bal-Price A, Moneer Z, Brown GC.**

Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes.

Glia 2002 40:312-23.

**Bergmann C (1875).**

Notiz über einige Strukturverhältnisse des Cerebellum und des Rückenmarks.  
Z Rationelle Med 360-336.

**Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini B, Pozzan T, Volterra A.**

Prostaglandins stimulate  $Ca^{2+}$ -dependent glutamate release in astrocytes.  
Nature 1998 391:281-285.

**Bezzi P, Volterra A.**

A neuron-glia signaling network in the active brain.  
Curr Opin Neurobiol. 2001 11:387-394.

**Bleck TP.**

Medical management of subarachnoid hemorrhage.  
New Horiz. 1997 Nov;5(4):387-96.

**Bodin P, Burnstock G.**

Purinergic signalling: ATP release.  
Neurochem Res 2001 26:959-969.

**Braet K, Aspeslagh S, Vandamme W, Willecke K, Martin PE, Evans WH, Leybaert L.**

Pharmacological sensitivity of ATP release triggered by photoliberation of inositol-1,4,5-trisphosphate and zero extracellular calcium in brain endothelial cells.  
J Cell Physiol. 2003 Nov;197(2):205-13.

**Braet K, Paemeleire K, D'herde K, Sanderson MJ, Leybaert L.**

Astrocyte-endothelial cell calcium signals conveyed by two signalling pathways.  
Eur. J. Neurosci. 2001 13:79-91.

**Broderick JP, Adams HP Jr, Barsan W, Feinberg W, Feldmann E, Grotta J, Kase C, Krieger D, Mayberg M, Tilley B, Zabramski JM, Zuccarello M.**

Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: A statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association.  
Stroke. 1999 Apr;30(4):905-15

**Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Huster G, Miller R.**

The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhages in blacks as compared with whites.  
N Engl J Med. 1992 Mar 12;326(11):733-6.

**Brott T, Broderick J, Kothari R, Barsan W, Tomsick T, Sauerbeck L, Spilker J, Duldner J, Khoury J.**

Early hemorrhage growth in patients with intracerebral hemorrhage.  
Stroke. 1997 Jan;28(1):1-5

**Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH.**

Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains.  
J Neurosci. 2002 22(1):183-92.

**Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ.**

Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate.

Neuron 1991 6:983-992.

**Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ.**

Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling.

Science 1990 247:470-473.

**Coco S, Calegari F, Pravettoni E et al.**

Storage and release of ATP from astrocytes in culture.

J Biol Chem 2003 278:1354-62.

**Cohen JJ.**

Apoptosis.

Immunol Today. 1993 Mar; 14(3): 126-30.

**Cotrina ML, Lin JH, Lopez-Garcia JC, Naus CC, Nedergaard M.**

ATP-mediated glia signaling.

J Neurosci 2000 Apr 15;20(8):2835-44.

**Cotrina ML, Lin JH, Nedergaard M.**

Cytoskeletal assembly and ATP release regulate astrocytic calcium signaling.

J Neurosci. 1998 Nov 1;18(21):8794-804.

**Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ.**

Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks.

Neuron 1992 8:429-40.

**Darby M, Kuzmiski JB, Panenka W, et al.**

ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels.

J Neurophysiol. 2003 89:1870-7.

**Dennis MS, Burn JP, Sandercock PA, Bamford JM, Wade DT, Warlow CP.**

Long-term survival after first-ever stroke: the Oxfordshire Community Stroke Project.

Stroke. 1993 Jun;24(6):796-800.

**Dorsch NW.**

Cerebral arterial spasm-a clinical review.

Br J Neurosurg. 1995 9(3):403-12.

**Edlow JA, Caplan LR.**

Avoiding pitfall in the diagnosis of subarachnoid hemorrhage.

N Engl J Med. 2000 Jan 6;342(1):29-36.

**Fabbro A, Skorinkin A, Grandolfo M, Nistri A, Giniatullin R.**

Quantal release of ATP from clusters of PC12 cells.

J Physiol 2004 560:505-517.

**Feigin VL, Rinkel GJ, Algra A, Vermeulen M, van Gijn J.**

Calcium antagonists in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review.

Neurology. 1998 Apr; 50(4):876-83.

**Findlay JM.**

Current management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage guidelines from the Canadian Neurosurgical Society.

Can J Neurol Sci. 1997 May;24(2):161-70.

**Finkbeiner S.**

Calcium waves in astrocytes-filling in the gaps.

Neuron. 1992 Jun;8(6):1101-8.

**Foulkes MA, Wolf PA, Price TR, Mohr JP, Hier DB.**

The Stroke Data Bank: design, methods, and baseline characteristics.

Stroke. 1988 May;19(5):547-54.

**Franke H, Illes P.**

Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS.

Pharmacol Ther 2006 109:297-324.

**Fumagalli M, Brambilla R, D'Ambrosi N et al.**

Nucleotidemediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors.

Glia 2003 43:203-18.

**Giaume C, McCarthy KD.**

Control of gap-junctional communication in astrocytic networks.

Trends Neurosci. 1996 Aug;19(8):319-25.

**Giaume C, Venance L.**

Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes.

Glia. 1998 Sep;24(1):50-64.

**Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY.**

A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties.

J Biol Chem. 1985 Mar 25;260(6):3440-50.

**Guan X, Cravatt BF, Ehring GR et al.**

The sleep-inducing lipid oleamide deconvolutes gap junction communication and calcium wave transmission in glial cells.

J Cell Biol. 1997 139:1785-92.

**Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB.**

ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves.

J Neurosci. 1999 Jan 15;19(2):520-8.

**Hagenston AM, Rudnick ND, Boone CE, Yeckel MF.**

2-Aminoethoxydiphenyl-borate (2-APB) increases excitability in pyramidal neurons.

Cell Calcium. 2009 Mar;45(3):310-7. Epub 2008 Dec 18.

**Haile M, Limson F, Gingrich K, Li YS, Quartermain D, Blanck T, Bekker A.**  
Nimodipine prevents transient cognitive dysfunction after moderate hypoxia in adult mice.  
J Neurosurg Anesthesiol. 2009 Apr;21(2):140-4.

**Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I.**  
The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning.  
Biochim Biophys Acta. (2007) 1767(8):1007-31.

**Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA.**  
Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection.  
Cardiovasc Res. (2004) 61:372-85.

**Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ.**  
The permeability transition pore complex: another view.  
Biochimie. (2002) 84(2-3):153-66.

**Haley EC Jr, Kassell NF, Apperson-Hansen C, Maile MH, Alves WM.**  
A randomized, double-blind, vehicle-controlled trial of tirilazad mesylate in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a cooperative study in North America.  
J Neurosurg. 1997 Mar;86(3)467-74.

**Harrigan MR.**  
Cerebral salt wasting syndrome: a review.  
Neurosurgery. 1996 Jan;38(1): 152-60.

**Hasan D, Schonck RS, Avezaat CJ, Tanghe HL, van Gijn J, van der Lugt PJ.**  
Epileptic seizures after subarachnoid hemorrhage.  
Ann Neurol. 1993 Mar;33(3)286-91.

**Hassinger TD, Guthrie PB, Atkinson PB, Bennett MV, Kater SB.**  
An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Nov 12;93(23):13268-73.

**Hirase H, Qian L, Barthó P, Buzsáki G.**  
Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo.  
PLoS Biol. 2004 Apr;2(4):E96. Epub 2004 Apr 13

**Hülsmann S, Oku Y, Zhang W, Richter DW.**  
Metabolic coupling between glia and neurons is necessary for maintaining respiratory activity in transverse medullary slices of neonatal mouse.  
Eur J Neurosci. 2000 12:856-862.

**Hulsmann S, Oku Y, Zhang W, Richter DW.**  
Metabolic coupling between glia and neurons is necessary for maintaining respiratory activity in transverse medullary slices of neonatal mouse.  
Eur J Neurosci. 2000b 12, 856-62.

**Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P.**

The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization.

Anat Embryol (Berl). 1999 Jul;200(1):1-18.

**Jacobson D, MR Duchon.**

Fluorescence imaging of the mitochondrial permeability transition in rat cortical astrocytes in culture.

J. Physiol. 1998 506.P, 75P.

**Kang J, Jiang L, Goldma SA, Nedergaard M.**

Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission.

Nat Neurosci. 1998 1:683-692.

**Kassell NF, Torner JC, Haley EC Jr, Jane JA, Adams HP, Kongable GL.**

The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: Overall management results.

J Neurosurg. 1990 Jul;73(1):18-36.

**Kassell NF, Torner JC, Jane JA, Haley EC Jr, Adams HP.**

The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 2: Surgical results.

J Neurosurg. 1990 Jul;73(1): 37-47.

**Kazui S, Naritomi H, Yamamoto H, Sawada T, Yamaguchi T.**

Enlargement of spontaneous intracerebral hemorrhage. Incidence and time course.

Stroke. 1996 Oct;27(10):1783-7.

**Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.**

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Br J Cancer. 1972 Aug;26(4):239-57.

**Kettenmann H, Ransom BR.**

Neuroglia. 2005 Oxford University

**Khan ZU, Koulen P, Rubinstein M et al.**

An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex.

Proc Natl Acad Sci USA 2001 98:1964-9.

**Kistler JP, Crowell RM, Davis KR, Heros R, Ojemann RG, Zervas T, Fisher CM.**

The relation of cerebral vasospasm to the extent and location of subarachnoid blood visualized by CT scan: a prospective study.

Neurology. 1983 Apr;33(4):424-36.

**Kofuji P, Newman EA.**

Potassium buffering in the central nervous system.

Neuroscienc 2004 129:1045-56.

**Koizumi S, Fujishita K, Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Inoue K.**

Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures.

Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Sep 16;100(19):11023-8. Epub 2003 Sep.

**Koizumi S, Saito Y, Nakazawa K et al.**

Spatial and temporal aspects of  $Ca^{2+}$  signaling mediated by P2Y receptors in cultured rat hippocampal astrocytes.

Life Sci. 2002 72:431-42.

**Kulik A, Haentzsch A, Luckermann M, Reichelt W, Ballanyi K.**

Neuron-glia signaling via  $\alpha 1$ -adrenoceptor-mediated  $Ca^{2+}$  release in Bergmann glial cells in situ.

J Neurosci. 1999 19:8401-8408.

**Ladilov Y, Schäfer C, Held A, Schäfer M, Noll T, Piper HM.**

Mechanism of  $Ca^{2+}$  overload in endothelial cells exposed to simulated ischemia.

Cardiovasc Res. 2000 Aug;47(2):394-403.

**Latour I, Gee CE, Robitaille R, Lacaille JC.**

Differential mechanisms of  $Ca^{2+}$  responses in glial cells evoked by exogenous and endogenous glutamate in rat hippocampus.

Hippocampus 2001 11:132-145.

**Lee KR, Betz AL, Kim S, Keep RF, Hoff JT.**

The role of the coagulation cascade in brain edema formation after intracerebral hemorrhage.

Acta Neurochir (Wien). 1996;138(4):396-400

**Lennihan L, Mayer SA, Fink ME, Beckford A, Paik MC, Zahng H, Wu YC, Klebanoff LM, Raps EC, Solomon RA.**

Effect of hypervolemic therapy on cerebral blood flow after subarachnoid hemorrhage: a randomized controlled trial.

Stroke. 2000 Feb;31(2):383-91.

**Lo KJ, Luk HN, Chin TY, Chueh SH.**

Store depletion-induced calcium influx in rat cerebellar astrocytes.

Br J Pharmacol. 2002 Mar;135(6):1383-92.

**Li Y, Hu X, Liu Y, Bao Y, An L.**

Nimodipine protects dopaminergic neurons against inflammation-mediated degeneration through inhibition of microglial activation.

Neuropharmacology. 2009 Mar;56(3):580-9. Epub 2008 Nov 21.

**Ludbrook J.**

Advantages of permutation (randomization) tests in clinical and experimental pharmacology and physiology.

Clin Exp Pharmacol Physiol. 1994 Sep;21(9):673-86.

**Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG.**

Energie on demand.  
Science 1999 283:496-497.

**Martin SJ, Lennon SV, Bonham AM, Cotter TG.**

Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis.  
J Immunol. 1990 Sep 15;145(6):1859-67.

**Matyash V, Filippov V, Mohrhagen K, Kettenmann H.**

Nitric oxide signals parallel fiber activity to Bergmann glial cells in the mouse cerebellar slice.  
Mol Cell Neurosci 2001 18:664-670.

**Mayer SA, Sacco RL, Shi T, Mohr JP.**

Neurologic deterioration in noncomatose patients with supratentorial intracerebral hemorrhage.  
Neurology. 1994 Aug;44(8):1379-84

**Meguro T, Chen B, Lancon J, Zhang JH.**

Oxyhemoglobin induces caspase-mediated cell death in cerebral endothelial cells.  
J Neurochem. 2001 May;77(4):1128-35.

**Mehta SL, Manhas N, Raghubir R.**

Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics.  
Brain Res Rev. 2007 Apr;54(1):34-66. Epub 2007 Jan 12.

**Mongin AA, Kimelberg HK.**

ATP potently modulates anion channel-mediated excitatory amino acid release from cultured astrocytes.  
Am J Physiol Cell Physiol. 2002 Aug;283(2):C569-78.

**Mulligan SJ, MacVicar BA.**

Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions.  
Nature 2004 431:195-9.

**Naus CC, Bechberger JF, Zhang Y et al.**

Altered gap junctional communication, intercellular signaling, and growth in cultured astrocytes deficient in connexin 43.  
J Neurosci Res 1997 49:528-40.

**Nedergaard M.**

Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells.  
Science 1994 263:1768-71.

**Newman EA.**

Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells.  
J Neurosci. 2001 Apr 1;21(7):2215-23

**Newman EA, Zahs KR.**

Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina.  
J Neurosci. 1998 Jan 1;18(11):4022-8.

**Newman EA, Zahs KR.**

Calcium waves in retinal glial cells.  
Science. 1997 Feb 7;275(5301):844-7.

**Niggel J, Sigurdson W, Sachs F.**

Mechanically induced calcium movements in astrocytes, bovine aortic endothelial cells and C6 glioma cells.  
J Membr Biol. 2000 15;174(2):121-34.

**Noguchi K, Ogawa T, Seto H, Inugami A, Hadeishi H, Fujita H, Hatazawa J, Shimosegawa E, Okudere T, Uemura K.**

Subacute and chronic subarachnoid hemorrhage: diagnosis with fluid-attenuated inversion-recovery MR imaging.  
Radiology. 1997 Apr;203(1):257-62.

**Ogihara K, Zubkov AY, Bernanke DH, Lewis AI, Parent AD, Zhang JH.**

Oxyhemoglobin-induced apoptosis in cultured endothelial cells.  
J Neurosurg. 1999 Sep;91(3):459-65.

**Ogihara K, Zubkov AY, Parent AD, Zhang JH.**

Oxyhemoglobin produces necrosis in cultured smooth muscle cells.  
Acta Neurochir Suppl. 2000;76:507-10.

**Page KB, Howell SJ, Smith CM, Dabbs DJ, Malia RG, Porter NR, Thickett KJ, Wilkinson GM.**

Bilirubin, ferritin, D-dimers and erythrophages in the cerebrospinal fluid patients with suspected subarachnoid haemorrhage but negative computed tomography scans.  
J Clin Pathol. 1994 Nov;47(11):986-9.

**Parpura V, Haydon PG.**

Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons.  
Proc Natl Acad Sci USA 2000 97:8629-34.

**Pasti L, Zonta M, Pozzan T, Vicini S, Carmignoto G.**

Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate.  
J Neurosci. 2001 Jan 15;21(2):477-84.

**Porter JT, McCarty KD.**

Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo.  
Prog Neurobiol 1997 51:439-455.

**Putney JW Jr.**

Pharmacology of capacitative Calcium entry.  
Mol Inter. 2001 Juni; 1(2):84-94.

**Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF.**

Spontaneous intracerebral hemorrhage.  
N Engl J Med. 2001 May 10;344(19):1450-60.

**Reigada D, Diez-Perez I, Gorostiza P, Verdaguer A, Gomez de Aranda I, Pineda O, Vilarrasa J, Marsal J, Blasi J, Aleu J, Salsona C.**

Control of neurotransmitter release by an internal gel matrix in synaptic vesicles.  
Proc Natl Acad Sci USA 2003 100:3485-3490.

**Rinkel GJ, Feigin VL, Algra A, Vermeulen M, van Gijn J.**

Calcium antagonists for aneurysmal subarachnoid haemorrhage.  
Cochrane Database Syst Rev. 2002 (4):CD000277.

**Rollins S, Perkins E, Mandybur G, Zhang JH.**

Oxyhemoglobin produces necrosis, not apoptosis, in astrocytes.  
Brain Res. 2002 Jul 26;945(1):41-9.

**Romanello M, Codognotto A, Bicego M, Pines A, Tell G, D'Andrea P.**

Autocrine/paracrine stimulation of purinergic receptors in osteoblasts: contribution of vesicular ATP release.  
Biochem Biophys Res Commun 2005 331:1429-1438.

**Roos YB, Beenen LF, Groen RJ, Albrecht KW, Vermeulen M.**

Timing of surgery in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: rebleeding is still the major cause of poor outcome in neurosurgical units that aim at early surgery.  
J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1997 Oct;63(4):490-3.

**Rusakov DA, Kullmann DM.**

A tortuous and viscous route to understanding diffusion in the brain.  
Trends Neurosci. 1998 21, 469-70.

**Sanden N, Thorlin T, Blomstrand F et al.**

5-Hydroxytryptamine<sub>2B</sub> receptors stimulate Ca<sup>2+</sup> increases in cultured astrocytes from three different brain regions.  
Neurochem Int 2000 36:427-34.

**Scemes E, Suadicani SO, Spray DC.**

Intercellular communication in spinal cord astrocytes: fine tuning between gap junctions and P2 nucleotide receptors in calcium wave propagation.  
J Neurosci. 2000 Feb 15;20(4):1435-45.

**Schultze M (1866).**

zur Anatomie und Physiologie der Retina (Cohen & Sohn, Bonn, Germany).

**Seifert G, Rehn L, Weber M, Steinhäuser C.**

AMPA receptor subunits expressed by single astrocytes in the juvenile mouse hippocampus.  
Brain Res Mol Brain Res. 1997 Jul;47(1-2):286-94.

**Sesti C, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Marcus AJ, Levi R.**

EctoNucleotidase in cardiac sympathetic nerve endings modulates ATP-mediated feedback of norepinephrine release.

J Pharmacol Exp Ther 2002 300:605-611.

**Shelton MK, McCarthy KD.**

Hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ.

Glia 1999 26(1):1-11.

**Slezak M, Frieger FW.**

New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis.

Trends Neurosci. 2003 26:531-535.

**Simon HU.**

Programmed cell death

Dtsch Med Wochenschr. 1997 Feb 7;122(6):167-8.

**Solenski NJ, Haley EC Jr, Kassell NF, Kongable G, Germanson T, Truskowski L, Torner JC.**

Medical complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a report of the multicenter, cooperative aneurysm study. Participants of the Multicenter Cooperative Aneurysm Study.

Crit Care Med. 1995 Jan;23(6):1007-17.

**Stoodley M, Macdonald RL, Weir B, Marton LS, Johns L, Du ZZ, Kowalczyk A.**

Subarachnoid hemorrhage as a cause of an adaptive response in cerebral arteries.

J Neurosurg. 2000 Sep;93(3):463-70.

**Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC.**

Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels.

J Biol Chem. 2002 Mar 22;277(12):10482-8. Epub 2002 Jan 14.

**Suadicani SO, Brosnan CF, Scemes E.**

P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling.

J Neurosci. 2006 Feb 1;26(5):1378-85.

**Ullman JS, Bederson JB.**

Hypertensive, hypervolemic, hemodilutional therapy for aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Is it efficacious? Yes.

Crit Care Clin. 1996 Jul;12(3):697-707.

**Verkhratsky A, Kettenmann H.**

Calcium signalling in glial cells.

Trends. Neurosci. 1996 19, 346-352.

**Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H.**

Glial calcium: homeostasis and signaling function.

Physio Rev 1998 78:99-141.

**Verkhatsky A, Toescu EC.**

Neuronal-glia networks as substrate for CNS integration.  
J Cell Mol Med 2006 10:826-836.

**Virchow R. (1846)**

über das granulierte Aussehen der Wandungen der Gehirnvventrikel. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medicin 3: 242-250.

**Weisman GA, Wang M, Kong Q, Chorna NE, Neary JT, Sun GY, González FA, Seye CI, Erb L.**

Molecular determinants of P2Y2 nucleotide receptor function: implication for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes.  
Mol Neurobiol. 2005 31:169-183.

**Westenbroek RE, Bausch SB, Lin RC, Noebels JL, Catterall WA.**

Upregulation of L-Type  $Ca^{2+}$  Channels in Reactive Astrocytes after Brain Injury, Hypomyelination, and Ischemia.  
J. Neurosci. 1998 18:2321-2334.

**Willmott NJ, Wong K, Strong AJ.**

Intercellular  $Ca^{2+}$  waves in rat hippocampal slice and dissociated glial-neuron cultures mediated by nitric oxide.  
J Neuro 2000 Dec 29;487(2):239-47.

**Willmott NJ, Wong K, Strong AJ.**

A fundamental role for the nitric oxide-G-kinase signaling pathway in mediating intercellular  $Ca^{2+}$  waves in glia.  
J Neurosci. 2000 Mar 1;20(5):1767-79.

**Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR.**

Cell death: the significance of apoptosis.  
Int Rev Cytol. 1980 68:251-306.

**Xi G, Wagner KR, Keep RF, Hua Y, de Courten-Myers GM, Broderick JP, Brott TG, Hoff JT.**

Role of blood clot formation on early edema development after experimental intracerebral hemorrhage.  
Stroke. 1998 Dec;29(12):2580-6.

**Yagodin S, Holtzclaw LA, Russell JT.**

Subcellular calcium oscillators and calcium influx support agonist-induced calcium waves in cultured astrocytes.  
Mol Cell Biochem. 1995 Aug-Sep;149-150:137-44.

**Yang GY, Betz AL, Chenevert TL, Brunberg JA, Hoff JT.**

Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats.  
J Neurosurg. 1994 Jul;81(1):93-102.

**Zhang Q, Hu B, Sun S, Tong E.**

Induction of increased intracellular calcium in astrocytes by glutamate through activating NMDA and AMPA receptors.

J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2003;23(3):254-7.

**Zhao G, Adebisi A, Blaskova E, Xi Q, Jaggar JH.**

Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors mediate UTP-induced cation currents, Ca<sup>2+</sup> signals, and vasoconstriction in cerebral arteries.

Am J Physiol Cell Physiol. 2008 Nov;295(5):C1376-84. Epub 2008 Sep.

## 9. ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

(Mohammed Miqdad)

## **10. DANKSAGUNG**

Herrn PD. Dr. med. Matthias F. Oertel danke ich für die Bereitstellung des Themas und die gute Betreuung und die hilfreiche Kritik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Sascha A. Kasseckert danke ich für die engagierte Betreuung dieser Arbeit und für seine wertvollen Anregungen.

Herrn Dr. Wolfram Scharbrodt danke ich für die intensive Unterstützung und für die zahlreichen guten Ratschläge.

Für die hervorragende technische Unterstützung möchte ich mich bei Frau Hilda Kierok und Frau Myrna Hof bedanken.

Den Mitarbeitern der physiologischen institutseigenen Werkstatt, insbesondere Herrn Otto Becker, danke ich für die tatkräftige Unterstützung.

Für das nette Arbeitsklima danke ich allen anderen Mitgliedern des physiologischen Institutes und besonders des Calciumlabors.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**



### Diese Studie untersuchte:

- 1. Der Einfluss von blutigem zerebrospinalen Liquor (bCSF) auf humane Astrozyten in vitro.
- 2. Der Einfluss von bCSF auf die Ca<sup>2+</sup>-Kinetik von Astrozyten.
- 3. Die Untersuchung der extrazellulären Signalkaskade (Up-stream) mit Fokus auf ATP- und Glutamatrezeptoren.
- 4. Die Rolle der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher sowie der plasmalemmalen Calciumkanäle vom L-Typ.
- 5. Die Rolle der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (MPTP) als down-stream-target für die Entstehung der Nekrose durch bCSF.

*edition scientifique*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5578-3



9 783835 119557831