

**Funktionelle Analysen von NG2- und komplexen
Gliazellen
im Hippokampus von Maus und Mensch**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Alexandra Wyczynski

aus

Schwetz/Polen

Bonn, November 2009

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Steinhäuser

2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Bleckmann

Tag der Promotion: 26.04.2010

Erscheinungsjahr: 2010

*Diese Arbeit widme ich
meinen geliebten Eltern
Gabriela und Norbert Wyczyński
dla moich Kochanych rodziców*

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian Steinhäuser für die Bereitstellung des herausfordernden Themas und die engagierte und persönliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Horst Bleckmann danke ich sehr für die Übernahme des Koreferates.

P.D. Dr. Ronald Jabs danke ich sehr herzlich für die Betreuung und Hilfestellung, die mit Sicherheit nicht nur selbstverständlich war.

P.D. Dr. Gerald Seifert danke ich für die Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die praktischen Tipps ohne die es manchmal nicht geht.

P.D. Dr. Amin Derouiche danke ich für die freundliche Zusammenarbeit.

Dr. Kerstin Hüttmann danke ich vor allem für die Starthilfe in das „*patch*-Leben“ und nicht nur.

Natürlich danke ich auch Thomas Erdmann und Ina Fiedler für die technische Unterstützung.

Dr. Ines Nauroth danke ich für die Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft, die das Leben doch erleichtern.

Auf keinen Fall möchte ich es versäumen mich bei Katja Jennissen, Susan Strohschein, Christian Haberlandt (Siggi) – ganz besonders!!! und Joana Fischer zu bedanken, ohne die das Leben im Labor und auch sonst hier im Rheinland viel trauriger wäre ;-)

Darüber hinaus und aus tiefstem Herzen danke ich mal wieder meiner Familie, die mir ALLES möglich gemacht hat.

Danke für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht, für die Möglichkeit diese Arbeit schreiben zu dürfen und für das grenzenlose Vertrauen in mich.

Stephan danke ich für das Dasein.

D a n k e

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen.....	4
1. Einleitung.....	9
1.1 Anatomie und Funktion des Hippokampus.....	9
1.2 Gliazellen.....	10
1.2.1 Heterogenität und Funktionen hippocampaler Gliazellen.....	10
1.2.1.1 Mikrogliazellen.....	11
1.2.1.2 Astrozyten.....	11
1.2.1.3 Komplexe Gliazellen und GluR Zellen.....	12
1.2.1.4 NG2 positive Zellen im Hippokampus.....	13
1.2.2 In dieser Arbeit verwendete Nomenklatur der Gliazellen.....	15
1.3 Glutamat und GABA - Rezeptoren.....	16
1.4 Spannungsabhängige Ca ²⁺ Kanäle.....	18
1.5 Neuron Glia Interaktion.....	19
1.6 Epilepsie.....	20
1.7 Zielsetzung.....	22
2. Materialien und Methoden.....	23
2.1 Lösungen.....	23
2.2 Verwendetes Gewebe.....	25
2.2.1 Gewebe von der Maus.....	25
2.2.2 Etablierung eines Epilepsie Pilocarpin Mausmodells.....	26
2.2.3 Präparation von akuten Hirnschnitten der Maus.....	27
2.2.4 Humane Resektate.....	27
2.2.5 Präparation von akuten humanen Hirnschnitten.....	28
2.3 Elektrophysiologische Messungen.....	28
2.3.1 Messaufbau.....	28
2.3.2 Messung der synaptischen Innervation an Gliazellen.....	30
2.3.3 Fokale Applikation.....	30
2.3.4 Analyse der Membraneigenschaften.....	31
2.4. Kopplungsanalyse.....	33
2.4.1 Biozytinvisualisierung.....	33
2.4.2 Farbstoffausbreitung im Gewebe.....	34

2.5 Messung der Ca^{2+} -Erhöhung.....	35
2.5.1 Fura-2 Pentapotassium.....	35
2.5.2 Bestimmung des isosbestischen Punktes	37
2.5.3 Calcium Imaging.....	37
2.5.4 K_d Bestimmung von Fura-2 für die Kalibration von $[\text{Ca}^{2+}]$	39
2.6 Antikörperfärbungen	41
2.7 Molekularbiologische Analyse.....	42
2.8 Statistische Datenanalyse	45
3. Ergebnisse	47
3.1 Synaptische Innervation und Ca^{2+} -Messungen in NG2 Zellen	47
3.1.1 NG2 Zellen sind synaptisch innerviert.....	47
3.1.2 Messungen der Ca^{2+} -Erhöhung in hippocampalen NG2 Zellen	50
3.1.2.1 Der experimentelle isosbestische Punkt für Fura-2 nahe bei theoretischem Wert	50
3.1.2.2 Schnellere Messfrequenz nach Pseudoratiobildung.....	51
3.1.2.3 Reversibilität der Ca^{2+} -Erhöhungen durch Spannungsänderungen.....	52
3.1.2.4 Ni^{2+} blockiert die Ca^{2+} -Erhöhungen.....	54
3.1.2.5 Keine Ca^{2+} -Erhöhung in Ca^{2+} -freier Badlösung	56
3.1.2.6 Kein Ca^{2+} -Anstieg bei fehlender Depolarisation	57
3.1.2.7 Depolarisation von 100 ms reicht aus für eine Ca^{2+} -Erhöhung in NG2 Zellen.....	58
3.1.2.8 Freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration im nanomolaren Bereich	59
3.1.2.9 Ca_v Kanaltypen in NG2 Zellen.....	60
3.2 Gliale Eigenschaften in TLE-Resektaten	62
3.2.1 Farbstoff Injektionen als Kopplungsindikator	64
3.2.2 Verwendung eines TLE Tiermodells zur Untersuchung zeitlicher Aspekte der Epileptogenese	67
3.2.3 Humane komplexe Gliazellen sind synaptisch innerviert	68
4. Diskussion	78
Neuron Glia Synapsen	78
Löst die synaptische Innervation intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhungen in NG2 Zellen aus?.....	78
Spannungsänderungen induzieren reversible Ca^{2+} -Erhöhungen	78
Charakterisierung der Ca^{2+} -Erhöhungen in NG2 Zellen	79
4.1 Physiologische Funktion der NG2 Zellen	82

Eigenschaften von Gliazellen in Hippokampusresektaten von TLE Patienten	84
Komplexe Gliazellen im humanen Hippokampus sind synaptisch innerviert	86
5. Zusammenfassung.....	87
5.1 Summary	89
6. Literaturverzeichnis	91
Internetquellen	102
7 Abbildungsverzeichnis	103
8 Tabellenverzeichnis	105
Curriculum vitae	106
Eidesstattliche Erklärung	108

Verzeichnis der Abkürzungen

α	Irrtumswahrscheinlichkeit
Abb.	Abbildung
ACSF	artefizielle Zerebrospinalflüssigkeit
AK	Antikörper
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionat
AN2	homologes Protein in der Maus zu NG2 in der Ratte
AOI	<i>Area Of Interest</i>
as	<i>antisense</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
bp	Basenpaare
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CA	Cornu Ammonis
Ca _v	Spannungsabhängige Ca ²⁺ Kanäle
cDNA	komplementäre Deoxyribonukleinsäure
CICR	<i>Ca²⁺ induced Ca²⁺ release</i>
C _M	Membrankapazität
CNPase	2', 3'-zyklische Nukleotid 3'-phosphodiesterase
CNQX	7-Nitro-2,3-Dioxo-1,4-Dihydroquinoxalin-6-Carbonitril
CTZ	Cyclothiazid
Cx	Connexin
Cy3	Cyanin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAB	Diaminobenzidin
DAD	<i>Drug Application Device</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNT	Dysembryoplastischer neuro-epithelialer Tumor
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EAAC1	exzitatorischer Aminosäuren-Carrier 1
EAAT	exzitatorischer Aminosäuren-Transporter
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Reticulum
EYFP	verstärktes gelb fluoreszierendes Protein
FAM	6-Carboxyfluorescein
FG	Freiheitsgrade
g	Leitfähigkeit
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFAP	saures Gliafaserprotein
GLAST	Glutamat/Aspartat-Transporter
GLT-1	Glutamat-Transporter-1
GluR	Glutamatrezeptor
GluT	Glutamatttransporter
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRIP	Glutamatrezeptor-Interaktionsprotein
GS	Glutaminsynthetase
GYKI ₅₃₆₅₅	1-(4-Aminophenyl)-3-Methylcarbamyl-4-Methyl-3,4-Dihydroxy-7,8-Methylendioxy-5-H-2,3-Benzodiazepin
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
(h)GFAP	(humanes) saures Gliafaserprotein
Hz	Herz
I	Stromstärke
I _H	Haltestrom
I _{max}	kapazitiver Ladestrom
IL	Innenlösung

IP ₃	Inositoltriphosphat
KA	Kainatrezeptor
KA1-2	Kainatrezeptoren
K _A -Kanäle	transiente K ⁺ -Kanäle
K _{dr} -Kanäle	verzögert gleichrichtende K ⁺ -Kanäle
K _{ir} -Kanäle/-Ströme	einwärts gleichrichtende K ⁺ -Kanäle/-Ströme
Kv-Kanäle	spannungsabhängige K ⁺ -Kanäle
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kHz	Kiloherz
LTP	Langzeitpotenzierung
MCSP	Melanom-Chondroitinsulfat-Proteoglykan
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min.	Minute(n)
mm	Millimeter
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
MΩ	Megaohm
mOsm	Milliosmol
ms	Millisekunde(n)
µs	Mikrosekunde(n)
mV	Millivolt
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl Stichprobenelemente
NBQX	2,3-Dihydroxy-6-Nitro-7-Sulfamoyl-Benzo(f)quinoxalin-2,3-Dion
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ Austausch
NG2	Chondroitinsulfat-Proteoglykan
NGS	normales Ziegenserum
nm	Nanometer

nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NR	NMDA-Rezeptor
OPC	Oligodendrozytenvorläuferzelle
p	postnataler Tag
pA	Pikoampere
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Thrombozyten Wachstumsfaktor
PDZ	Postsynaptic density Protein-95/Discs-large/Zona occludens-1
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkoeffizientenkonzentration
PNS	Peripheres Nervensystem
R_M	Membranwiderstand
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase Inhibitor
ROI	<i>Region Of Interest</i>
R_S	Serienwiderstand
RT	Raumtemperatur
S	transmembrane Segmente in der Ca_v Struktur
s.	Sekunde(n)
s_{abw}	Standardabweichung
s100 β	Ca^{2+} -bindendes Protein
se	<i>sense</i>
SERCA	sarco/endoplasmatische Reticulum Ca^{2+} /ATPase
SGZ	Subgranularzellschicht
sPSC	spontaner postsynaptischer Strom
SVZ	Subventrikularzellschicht
t	Prüfgröße beim t-Test
$t_{FG/\alpha}$	kritischer Wert beim t-Test
Tab.	Tabelle

TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
Tg	transgen
TLE	Temporallappenepilepsie
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TTX	Tetrodotoxin
U	Spannung
U ₀	10 mV Spannungspuls des Artefakt-Protokolls
U _H	Haltepotential
U _R	Ruhemembranpotential
U _{rev}	Umkehrpotential
UE	Untereinheit
UNG	Uracil-DNA-Glycosylase
V	Volt
V _r	Ruhemembranpotential
W	Watt
x	Einzelwert
\bar{x}	Mittelwert
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Das menschliche Gehirn ist ein hochkomplexes und präzises Netzwerk, das aus mehr als 100 Milliarden einzelner Nervenzellen besteht, es ist die Steuerzentrale des gesamten Körpers. Hier laufen die Informationen aus dem Körper und der Umwelt zusammen und werden zu Reaktionen verarbeitet. Im Gehirn finden sich neben den Nervenzellen mehrere Arten von Gliazellen. Lange Zeit konzentrierte sich die neurowissenschaftliche Forschung nahezu ausschließlich auf die Charakterisierung von Eigenschaften und Funktionen von Neuronen, da sie als einzige Zellen im Gehirn in der Lage sind, Aktionspotentiale zu generieren. Dabei wurde die zahlenmäßig größere Population der Gliazellen im Gehirn ignoriert, nicht zuletzt, weil es bisher nur schwer möglich war, diese Zellen im intakten Hirngewebe zu untersuchen. Im menschlichen Gehirn gibt es ca. 10-mal mehr Gliazellen als Neuronen, weswegen es sinnvoll ist, sich eingehender mit den Gliazellen zu beschäftigen.

1.1 Anatomie und Funktion des Hippokampus

Der Hippokampus [von griechisch *hippos* „Pferd“, von griechisch *kampos* „Wurm“] ist eine im Schläfenlappen des Großhirns gelegene Hirnregion mit seepferdchenähnlicher Morphologie. Der Hippokampus ist funktionell ein Teil des limbischen Systems und gehört zum Archikortex oder Allokortex, der im Gegensatz zum phylogenetisch jüngeren Neokortex typischerweise nicht sechs- sondern vierschichtig ist. Zu der Hippokampusformation gehören folgende Strukturen: der *Gyrus dentatus*, das Ammonshorn oder *Cornu ammonis* (CA) und das *Subiculum* (Abbildung 1.1).

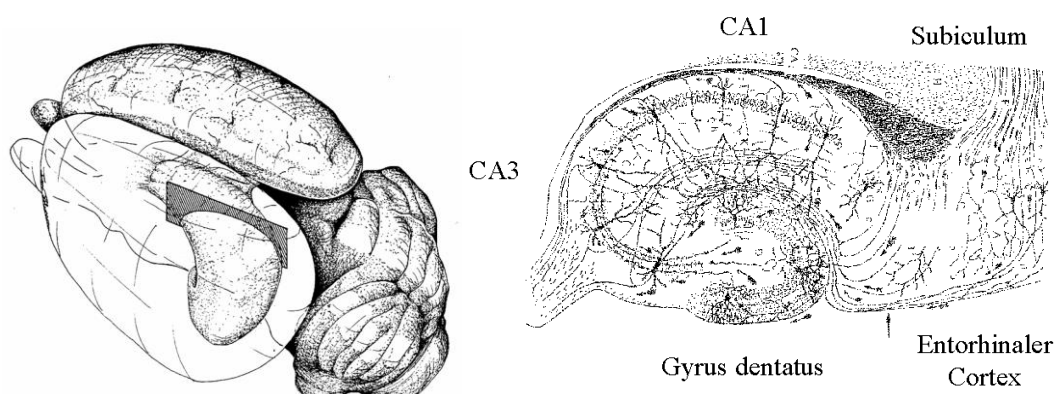


Abb.1.1: Struktur des Hippokampus. Links: Querschnitt durch den Hippokampus der Ratte. Rechts: Transversalschnitt des Hippokampus. Die Formation besteht aus *Gyrus dentatus*, Ammonshorn (CA) mit den Regionen CA1 bis CA3 und *Subiculum*. Pyramidenneuronen sind der Hauptneuronentyp in den Regionen CA1 und CA3 (Internetquelle: <http://www.neuroscience.bham.ac.uk/neurophysiology/research/hippocampus.htm>).

Der *Gyrus dentatus* ist die Eingangsstruktur des Hippokampus und besteht aus drei Schichten, dem *Stratum moleculare*, dem *Stratum granulare* und dem *Hilus*. Das Ammonshorn wird in seiner tangentialen Richtung in die Regionen CA1 bis CA3 unterteilt. Jedes dieser Felder besteht aus vier Schichten, dem *Stratum oriens*, *Stratum pyramidale*, *Stratum radiatum* und dem *Stratum lacunosum-moleculare*. Das *Subiculum* ist der Übergang vom vierschichtigen, archikortikalen Hippokampus zum sechsschichtigen Neokortex und befindet sich zwischen der CA1 Region und dem entorhinalen Kortex. Der Hippokampus erhält hauptsächlich Informationen aus dem entorhinalen Kortex über den *Tractus perforans*, der an den Dendriten der Körnerzellen des *Gyrus dentatus* terminiert. Die Axone der Körnerzellen (die Moosfasern) projizieren zu den großen Pyramidenzellen der CA3 Region. Diese senden die Schaffer'schen Kollateralen zu den apikalen Dendriten der Pyramidenneuronen in der CA1 Region. Die Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis ist eine wichtige Funktion des Hippokampus. Die in den 1950er Jahren von dem Neurochirurg William B. Scoville am Patienten H.M. durchgeführte bilaterale Hippokampektomie, die zu einer vollständigen anterograden Amnesie und partieller retrograder Amnesie (für das Jahr vor der Operation) führte, bewies eindrucksvoll die Rolle des Hippokampus bei der Gedächtnisbildung. Bliss und Lomo fanden im Jahr 1973 das Phänomen der Langzeitpotenzierung (LTP) der synaptischen Transmission, das als zelluläres Modell für Lern- und Gedächtnisvorgänge im Hippokampus gilt (Bliss und Lomo, 1973; Miyamoto, 2006).

1.2 Gliazellen

Im zentralen Nervensystem (ZNS) befinden sich zwei Arten von Gliazellen: Die Makrogliazellen und die Mikrogliazellen. Während Mikrogliazellen mesodermalen Ursprungs sind, stammen Makrogliazellen, die unterteilt werden in Oligodendrozyten und Astrozyten, vom Ektoderm ab (Ramón y Cajal, 1913; Übersicht: Somjen, 1988; Übersicht: Kimelberg, 2004). Ein weiterer Typ der Makrogliazellen sind Gliazellen mit einem komplexen Strommuster, die auch als GluR oder NG2 Zellen bezeichnet werden (Matthias et al., 2003; Übersicht: Peters, 2004).

1.2.1 Heterogenität und Funktionen hippokampaler Gliazellen

Der Entdecker der Gliazellen, Rudolf Virchow, vermutete Mitte des 19. Jahrhunderts Stütz- und Haltefunktion und gab den Zellen deshalb den Namen Gliazellen, abgeleitet aus dem

griechischen Wort für „Leim“. Mittels Silberimprägnation (Golgi-Färbung) durch Santiago Ramón y Cajal, Pío del Río Hortega und Camillo Golgi konnten Gliazellen Ende des 19. Jahrhunderts weiter klassifiziert werden. Nach damaliger Erkenntnis bildeten Gliazellen ein Stützgerüst für Nervenzellen und sorgten für die elektrische Isolation der Nervenzellen. Gliazellen wurden als nicht erregbare Zellen angesehen, deren Aufgaben sich lediglich auf die Ionenhomöostase, die Aufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt, Stützfunktionen sowie die Versorgung von Neuronen mit Nährstoffen beschränken. Dass auch Gliazellen spannungsgesteuerte Ionenkanäle besitzen, konnte durch Anwendungen neuer elektrophysiologischer Messmethoden gezeigt werden (Kettenmann et al., 1982, Bevan et al., 1985). Es konnte gezeigt werden, dass Gliazellen durch den Neurotransmitter Glutamat depolarisiert werden und funktionelle ionotrope Glutamat Rezeptoren exprimieren (Bowman und Kimelberg, 1984; Usowicz et al., 1989). Im Verlauf der Jahre wurde eine Vielzahl von Rezeptoren und Ionenkanälen in Gliazellen nachgewiesen, die auch Nervenzellen besitzen (Übersicht: Verkhratsky und Steinhäuser, 2000). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass synaptische Übertragung durch einen bestimmten Typ von Gliazellen, die Astrozyten, durch Freisetzung von Neurotransmittern moduliert wird. Inzwischen wurden mehrere Beispiele für Neuron-Glia-Wechselwirkungen gefunden, bei denen Gliazellen synaptische Transmission kontrollieren und modulieren (Übersicht: Volterra und Meldolesi, 2005).

1.2.1.1 Mikrogliazellen

Mikrogliazellen stellen die Phagozyten des ZNS dar (Streit et al., 2005), sie ändern ihre Morphologie je nach ihrem Aktivitätszustand. Im Ruhezustand sind sie stark verzweigt. Sie werden durch Verletzungen und Infektionen aktiviert, werden dann hypertroph und entwickeln breite Fortsätze. Sowohl im Ruhe- als auch im aktivierten Zustand sind sie beweglich und scheinen die zelluläre Mikroumgebung zu überwachen (Nimmerjahn et al., 2005).

1.2.1.2 Astrozyten

Die Astrozyten bilden die Mehrheit der Gliazellen im ZNS von Säugetieren und werden auch als Astroglia bezeichnet. Es sind zwei Typen von Astrozyten bekannt. Die protoplasmatischen Astrozyten (*Astrocytus protoplasmaticus* - auch: Kurzstrahler) kommen vor allem in der grauen Substanz vor, während die fibrösen Astrozyten (*Astrocytus fibrosus* - auch: Langstrahler) fibrillenreich sind und sich vor allem in der weißen Substanz befinden. Es sind stern- bzw.

spinnenförmig verzweigte Zellen, deren Endfüße am Endothel der Blutgefäße an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind. Dabei wird die Bildung von *Tight Junctions* an den Blutgefäßen durch Astrozyten induziert. Die Zellkopplung durch *Gap Junctions* ist eine wichtige Eigenschaft von Astrozyten. *Gap Junctions* sind für Ionen und Moleküle, die ca. 1 kDa groß sind, durchlässig. Auf diese Weise wird unter anderem die Verteilung von Energiesubstraten im Gehirn (Giaume et al., 1997) oder die Verteilung von bei neuronaler Aktivität aufgenommenen Ionen und Neurotransmittern (Hansson et al., 2000) ermöglicht. Die hohen K^+ -Leitfähigkeiten der Membranen von Astrozyten, ermöglichen es ihnen, die erhöhten K^+ -Konzentrationen im Extrazellulärraum zu puffern, die lokal durch neuronale Aktivität verursacht werden (Orkand et al., 1966; Newman et al., 1984). In den klassischen Färbungen von Cajal und del Rio-Hortega findet man in Astrozyten intermediäre Filamente, deren Hauptbestandteil später als gliales, fibrilläres, saures Protein (*glial fibrillary acid protein* GFAP) identifiziert wurde und deshalb oft als spezifischer astrozytärer Zell-Marker verwendet wurde (Übersicht: Kimelberg, 2004). GFAP als eindeutiger Marker ist jedoch umstritten, da es in manchen Astrozyten erst nach Gewebeverletzungen repräsentiert wird und durch eine geringe Proteinexpression immunohistochemisch schwer nachweisbar ist. Die Fortsätze von Astrozyten umhüllen neuronale Synapsen und nehmen das bei neuronaler Aktivität freiwerdende Glutamat über ihre Glutamat Transporter auf (Bergles et al., 1999; Übersicht: Oliet et al., 2004). Sie besitzen Transporter für die wichtigsten Neurotransmitter Glutamat, γ -Aminobuttersäure (GABA), Glycin, Adenosin, Noradrenalin, Dopamin und Serotonin (Swanson, 2005), sind somit an der chemischen Signalübertragung beteiligt und in der Lage die Wirkung der Transmitter an den Synapsen zu beenden (Kang et al., 1998; Parri et al., 2001; Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004; Übersicht: Volterra und Steinhäuser, 2004). Das unter Verwendung der *patch clamp* Technik aufgezeichnete Strommuster reifer Astrozyten und Oligodendrozyten wird als passiv bezeichnet, weil in diesen Zellen die spannungs- und zeitunabhängigen Ströme dominieren. Die zu Grunde liegenden Kanäle dieser Leitfähigkeiten sind Gegenstand aktueller Untersuchungen (Seifert et al., 2009).

1.2.1.3 Komplexe Gliazellen und GluR Zellen

1992 konnten Steinhäuser et al. zeigen, dass es im Hippokampus der Maus neben den Astrozyten, die ein passives Strommuster hatten, Gliazellen mit einem komplexen Strommuster gibt. Diese Zellen wurden komplexe Gliazellen genannt. Mit Hilfe einer transgenen (Tg) Maus, die das verstärkte grün fluoreszente Protein (*enhanced green fluorescent protein* EGFP) unter Kontrolle

des humanen GFAP-Promotors exprimiert (Tg hGFAP-EGFP Maus) (Nolte et al., 2001), konnte gezeigt werden, dass die komplexen Gliazellen Glutamat-Rezeptoren (GluR) vom AMPA-Typ exprimierten, weswegen sie GluR Zellen genannt wurden (Matthias et al., 2003). Diese Zellen haben ein kleines rundes Zellsoma mit wenigen dünnen Fortsätzen. GluR Zellen weisen keine Kopplung auf (Wallraff et al., 2004). In GluR Zellen konnten durch Applikation von Glutamat oder AMPA schnell aktivierende und fast vollständig desensitisierende Antworten ausgelöst werden. Diese Desensitisierung wurde durch den AMPA-Rezeptor Modulator Cyclothiazid (CTZ) (Partin et al., 1993) blockiert. Sowohl 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f) quinoxalin-2,3-dion (NBQX) als auch 1-(4-aminophenyl)-3-methylcarbonyl-4-methyl-3,4-dihydroxy-7,8-methylenedioxy-5-H-2,3-benzodiazepin (GYKI₅₃₆₅₅) waren in der Lage, AMPA-Rezeptoren vollständig zu blockieren (Seifert et al., 2004).

1.2.1.4 NG2 positive Zellen im Hippokampus

Antikörperfärbungen juveniler EGFP positiver Zellen im *Stratum Radiatum* der CA1 Region des Hippokampus von Tg hGFAP-EGFP Mäusen zeigten, dass 38 % der grünfluoreszenten Zellen AN2 positiv waren. AN2 ist das Maus Homolog von NG2 (Niehaus et al., 1999; Schneider et al., 2001), das früher als Marker oligodendroglialer Vorläuferzellen (OPC) angesehen wurde (Matthias et al., 2003). Das Chondroitinsulfat Proteoglykan NG2 ist ein integrales Membranprotein, das zuerst als Oberflächenantigen neuraler Zellen in der Ratte identifiziert und charakterisiert wurde (Stallcup, 1981; Nishiyama et al., 1991; Levine und Nishiyama, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass GluR Zellen die NG2 exprimieren, durch GABA- und glutamaterge Neurone innerviert werden (Jabs et al., 2005). Die Expression von NG2 erfolgt im sich entwickelnden und adulten ZNS bei Subpopulationen glialer Zellen. Die intrazelluläre Region von NG2 enthält eine *postsynaptic density protein-95/Discs-large/Zona occludens-1* (PDZ) - Bindedomäne (Stallcup, 2002), über die das NG2 mit dem Glutamatrezeptor-Interaktionsprotein (GRIP) interagiert (Stegmüller et al., 2002, 2003). Somit könnte NG2 über das GRIP Einfluss auf die Positionierung von AMPA-Rezeptoren in der Membran von Gliazellen haben (Karram et al. 2005). Im adulten Gehirn besitzen NG2 Zellen kleine, runde oder längliche Somata und mehrere primäre Fortsätze. Diese Morphologie ist untypisch für unreife Vorläuferzellen. Zudem verfügen nur wenige NG2 Zellen über die Fähigkeit, sich langsam zu teilen (Horner et al., 2000; Dawson et al., 2003).

NG2 positive Zellen entziehen sich bislang einer Zelltypklassifizierung, da sie sowohl gliale als auch neuronale Eigenschaften aufweisen, z. B. die Expression der messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) für den neuronalen Glutamat-Transporter EAAC1 (Matthias et al., 2003). Durch das fehlende Vermögen Aktionspotentiale generieren zu können, sind NG2 positive Zellen klar von den Neuronen abzugrenzen. Zu den Astrozyten können sie ebenfalls nicht gezählt werden, da sie unter anderem kein GFAP exprimieren, keinen funktionellen Glutamat-Transporter besitzen und nicht über *Gap Junctions* gekoppelt sind. Da sie ebenfalls keine für Oligodendrozyten typischen Myelinscheiden bilden und auch nicht das basische Myelinprotein exprimieren, werden sie auch nicht zu den Oligodendrozyten gezählt. Lange Zeit wurden NG2 positive Zellen den OPC zugeordnet (Bergles et al., 2000; Lin und Bergles, 2004). Da jedoch die Spezifität von NG2 als Marker für OPCs immer mehr in Frage gestellt wird und zudem das NG2 eine heterogene Zellpopulation im Gehirn markiert (Nishiyama et al., 2002; Stallcup, 2002; Greenwood und Butt, 2003; Aguirre et al., 2004; Peters, 2004), werden NG2 Zellen inzwischen auch als neuer, eigenständiger Typ von Makrogliazellen beschrieben, die in sich heterogen sind (Übersicht: Polito und Reynolds, 2005; Übersicht: Nishiyama et al., 2009). Das Strommuster von GluR Zellen, bzw. NG2 positiven Zellen wird durch spannungs- und zeitabhängige Ströme geprägt, weswegen diese Zellen als komplexe Gliazellen bezeichnet werden (Steinhäuser et al., 1994). Das Strommuster dieser Zellen wird durch mehrere Kanal-Typen vermittelt, zum einen die einwärtsgerichteten K^+ -Kanäle (K_{ir} -Kanäle), die eine höhere Leitfähigkeit in Einwärts- als in Auswärtsrichtung aufweisen und in die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials der Zelle eingreifen, zum anderen existieren zwei Typen spannungsgesteuerter K^+ -Kanäle, verzögert gleichrichtende K^+ -Kanäle (K_{dr} -Kanäle) und transiente K^+ -Kanäle (K_A -Kanäle), die bei Depolarisation öffnen (Christie, 1995). Desweiteren konnte die Existenz von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen vom L- und N-Typ auf Gliazellen nachgewiesen werden (Akopian et al., 1996). Schließlich spielen verschiedene Typen von Cl^- -Kanälen (Walz, 2002), sowie spannungsabhängige Na^+ -Kanäle (Übersicht: Verkhratsky und Steinhäuser, 2000) ebenfalls eine Rolle bei der Bildung des Strommusters der komplexen Gliazellen, GluR Zellen bzw. NG2 Zellen.

1.2.2 In dieser Arbeit verwendete Nomenklatur der Gliazellen

Steinhäuser et al. (1992), zeigten dass es im Hippokampus der Maus Gliazellen mit unterschiedlichen Strommustern gibt. Diese Zellen wurden komplexe (Abbildung 1.2 rechts) und passive (Abbildung 1.2 links) Gliazellen genannt.

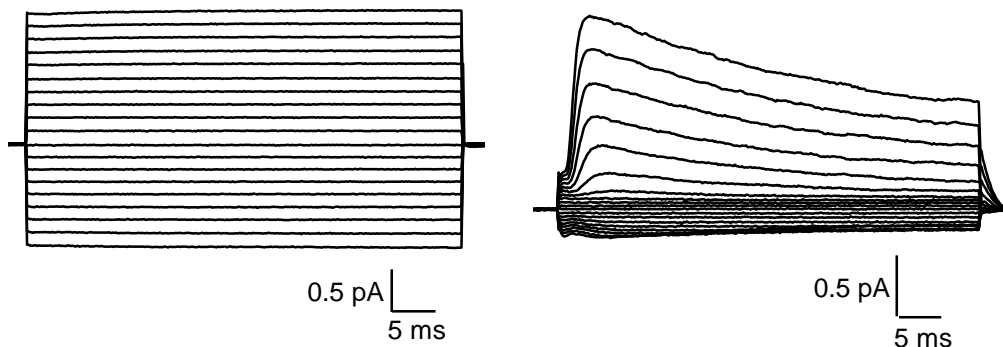


Abb.1.2: Strommuster einer passiven (links) und komplexen (rechts) Gliazelle.

Arbeiten an Tg hGFAP-EGFP Mäusen (Nolte et al., 2001) zeigten, dass komplexe Gliazellen eine schwache grüne Fluoreszenz aufweisen, ein kleines rundes Soma haben und Glutamat-Rezeptor vom AMPA-Typ exprimieren. Gliazellen mit einem passiven Strommuster sind dagegen stark fluoreszent, haben ein großes, unregelmäßiges Soma und exprimieren Glutamat Transporter. Auf Grund der unterschiedlichen Expressionsmuster werden die komplexen Gliazellen GluR Zellen und die passiven Gliazellen GluT Zellen genannt (Matthias et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass GluR Zellen das NG2 Protein exprimieren. Weitere Arbeiten zeigten, dass GluT Zellen Kopplung aufweisen, die durch *Gap Junctions* vermittelt wird. GluR Zellen dagegen sind vollständig ungekoppelt (Wallraff et al., 2004).

Karram et al., (2008) generierten eine NG2-EYFP knockin Maus, die auf einem Allel das gelbfluoreszierende EYFP Protein unter der Kontrolle des NG2 Promotors exprimiert. Diese Maus wurde zur eindeutigen Identifizierung der NG2 Zellen generiert.

Bei elektrophysiologischen Untersuchungen der Gliazellen in humanen Hippokampusresektaten konnten in dieser Arbeit ebenfalls Gliazellen mit passiven und komplexen Strommustern identifiziert werden.

Auf Grund dieser Befunde, wurde die folgende Nomenklatur, der in dieser Arbeit untersuchten Gliazellen festgelegt (Tabelle 1.1):

Tab. 1.1: Nomenklatur der untersuchten Gliazellen

	passives Strommuster	komplexes Strommuster
humane Resektate, C57BL/6J Mäuse	Astrozyten	komplexe Gliazellen
Tg hGFAP-EGFP Mäuse	GluT Zellen	GluR Zellen
NG2-EYFP knockin Mäuse	Astrozyten	NG2 Zellen

1.3 Glutamat und GABA - Rezeptoren

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS der Wirbeltiere. Es wird synaptisch freigesetzt und bindet sowohl post- als auch präsynaptisch an GluRs. Zu der Gruppe der GluRs zählen metabotrope und ionotrope Rezeptoren. Die metabotropen GluR (mGluRs) gehören zu den phylogenetisch ältesten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G protein-coupled receptors* GPCRs). Aufgrund von Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz, pharmakologischen Eigenschaften und intrazellulären Signalwegen, mit denen sie gekoppelt sind, werden sie in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe (mGluR1 und mGluR5) bewirkt eine Ca^{2+} -Ausschüttung aus intrazellulären Speichern (durch die Aktivierung der Phospholipase C und des Inositoltriphosphat (IP_3)/ Diacylglycerol-Systems). Die zweite Gruppe (mGluR2 und mGluR3) und die dritte Gruppe (mGluR4, 6, 7 und 8) modulieren die synaptische Übertragung in Neuronen durch Hemmung der Adenylatzyklase (Knopfel und Grandes, 2002). Die ionotropen GluRs sind ligandengesteuerte und nicht selektive Kationenkanäle. Diese werden in drei Familien unterteilt: AMPA-Rezeptoren (GluR 1-4), Kainat- (GluR5-7, KA-1 und KA-2) und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren (NR1, NR2A-D, NR3A) (Dingledine et al., 1999). Sie unterscheiden sich im Aufbau, der Aminosäuresequenz ihren Untereinheiten (UE) sowie in ihren spezifischen Bindungs-, Aktivierungs- und Leitungseigenschaften. Forschungsergebnisse zeigen, dass funktionelle AMPA-Rezeptoren auch in der Zellmembran von Astrozyten und Oligodendrozyten zu finden sind, während NMDA- und Kainatrezeptoren unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich auf Neuronen vorkommen, (Seifert und Steinhäuser, 1995; Seifert et al., 1997; Zhou und Kimelberg, 2001). AMPA-Rezeptoren sind aus vier UE aufgebaut. GluR1-4 kommen jeweils in zwei Formen vor, der sogenannten „Flip“ und „Flop“ Form, die sich durch die Ab- bzw. Anwesenheit eines alternativ gespleißten Exons unterscheiden (Sommer et al., 1990). Die Ionenspezifität der AMPA-Rezeptoren, d. h. die relativen Leitfähigkeiten für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} -

Ionen, hängt von der Kombination der UE ab, aus denen die Rezeptoren zusammengesetzt sind. In der Regel sind GluR2-enhaltende Rezeptoren wenig permeabel für Ca^{2+} -Ionen (Jonas und Burnashev, 1995). NMDA-Rezeptoren sind tetramere nichtselektive Kationenkanäle, die zusätzlich zur ligandenabhängigen Aktivierung auch noch eine Spannungsabhängigkeit zeigen. Die Öffnung des NMDA-Rezeptorkanals erfordert nicht nur die Bindung von Glutamat, sondern auch die Beseitigung seiner Blockade durch je ein Mg^{2+} -Ion bei Depolarisation. Kainat-Rezeptoren sind tetramere Ionenkanäle, die in erster Linie für Na^+ und K^+ leitfähig sind, ein wenig jedoch auch für Ca^{2+} .

Im ZNS wird L-Glutamat durch das Enzym L-Glutamatdecarboxylase zu GABA decarboxyliert, einem weiteren Neurotransmitter. Glutamat ist die einzige Aminosäure, die im Gehirn oxidiert, transaminiert, aminiert und decarboxyliert wird. GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS der Wirbeltiere und ist eine sogenannte γ -Aminosäure, bei der sich die Aminogruppe am dritten Carboxyl-Kohlenstoffatom befindet, weswegen sie eine nichtproteinogene Aminosäure ist. Bei proteinogenen α -Aminosäuren befindet sich die Aminogruppe am ersten Kohlenstoffatom nach dem Carboxyl-Kohlenstoffatom. GABA bindet an spezifische Rezeptoren. Es gibt ionotrope und metabotrope GABA-Rezeptoren. Der GABA_A -Rezeptor ist ein ligandengesteuerter Cl^- -Kanal (ionotrop), der sich öffnet und ein inhibitorisches Signal auslöst, sobald GABA an ihn bindet. Der GABA_B -Rezeptor gehört zu den GPCRs (metabotrop). Er vermittelt eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit von K^+ -Kanälen. Dies führt zur Hyperpolarisation der Zellmembran. Weiterhin wird die Offenwahrscheinlichkeit für Ca^{2+} -Kanäle vermindert. Dieser Effekt macht sich hauptsächlich präsynaptisch bemerkbar, hier wird die Transmitter-Ausschüttung gehemmt. Der GABA_C -Rezeptor ist ein ionotroper Rezeptor. Er unterscheidet sich vom GABA_A -Rezeptor dadurch, dass pharmakologische Substanzen wie Benzodiazepine und Barbiturate an diesem Rezeptor unwirksam sind. GABA wird mit Hilfe der Glutamat-Decarboxylase aus Glutamat synthetisiert. In einem Schritt wird also aus dem wichtigsten exzitatorischen der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter. GABA wird zum Teil in benachbarte Gliazellen transportiert. Dort wird es durch die GABA-Transaminase zu Glutamin umgewandelt und bei Bedarf so wieder in die präsynaptische Zelle gebracht und in Glutamat umgewandelt (Glutaminzyklus). Danach kann es erneut in GABA umgewandelt werden. GABA-Rezeptoren kommen auch häufig an der präsynaptischen Zelle vor, was zu einer präsynaptischen Hemmung führt.

Bei der Entwicklung des Gehirns spielen GABAerge Signalwege eine wichtige Rolle, unter anderem bei der Neurogenese und der Differenzierung von Zellen. GABAerge Erregung in der subgranulären Zone fördert die Differenzierung von hippokampalen Vorläuferzellen zu Neuronen (Tozuka et al., 2005), in der subventrikulären Zone reguliert GABA die Proliferation von GFAP positiven Zellen (Liu et al., 2005). Im Laufe der Entwicklung ändert sich die Wirkung von GABA auf Neurone von exzitatorisch zu inhibitorisch. Diese anfängliche exzitatorische Wirkung von GABA, die durch eine hohe intrazelluläre Cl^- -Konzentration vermittelt wird, kann bei der Entwicklung neuronaler Netzwerke von Bedeutung sein, da sich GABAerge Neurone vor glutamatergen Neuronen teilen und reife Synapsen entwickeln. Die Depolarisation der Neurone durch GABA kann spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle (Ca_Vs) öffnen sowie die spannungsabhängige Blockierung von NMDA-Rezeptoren durch Mg^{2+} bei negativen Potentialen aufheben (Übersicht: Ben-Ari, 2002, Ben-Ari, 2006).

1.4 Spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle

Ca_Vs vermitteln den Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen als Antwort auf eine Depolarisation der Membran und regulieren so verschiedene Prozesse wie Kontraktion, Sekretion, Genexpression und neuronale Transmission. Sie gehören einer Gen Superfamilie der transmembranalen Ionenkanal-Proteine an, der auch spannungsabhängige K^+ - und Na^+ Kanäle angehören (Yu und Catterall, 2004). Biochemische Analysen der Ca^{2+} -Kanäle ergaben, dass sich das Kanalprotein aus einem Komplex von vier oder fünf UE zusammensetzt (Catterall, 2000). Die $\alpha 1$ - UE ist die größte UE und beinhaltet die Kanalpore und den Spannungssensor. Diese UE ist aus vier homologen Domänen (I – IV) aufgebaut. Jede Domäne beinhaltet 6 transmembrane Segmente (S1 – S6). Das S4 enthält den Spannungssensor, die Kanalpore befindet sich zwischen S5 und S6. Die intrazelluläre β - UE und der transmembranale, disulfidgebundene $\alpha_2\delta$ - UE Komplex sind Komponenten der meisten Ca^{2+} -Kanäle. Eine γ - UE wurde in Ca^{2+} -Kanälen der Skelettmuskelzellen gefunden, darüber hinaus wird diese UE im Herzen und Gehirn exprimiert. Die pharmakologischen und elektrophysiologischen Unterschiede der Ca^{2+} -Kanäle werden wesentlich durch die Ausprägung der $\alpha 1$ - UE bestimmt (Hofmann et al., 1994).

Ca^{2+} -Ströme wurden in verschiedenen Zelltypen gemessen und haben unterschiedliche physiologische und pharmakologische Eigenschaften. Eine alphabetische Nomenklatur wurde für Ca^{2+} -Kanäle aufgestellt (Tsien et al., 1995). In Tabelle 1.2 sind Ca_V -Typen den Ca^{2+} -Strömen zugeordnet (Catterall et al., 2005).

Tab.1.2: Ca_v-Kanaltypen

Kanal-Typ	Strom-Typ	Aktivierungsschwelle	Vorkommen (Gewebe)	Blockierungssubstanzen
Ca _v 1.1	L-Typ	hoch	Skelettmuskelzellen, transversale Tubuli	Ni ²⁺ , Cd ²⁺ , Dihydropyridin, Phenylalkylamin, Benzothiazepin
Ca _v 1.2			Herzmuskelzellen, glatte Muskulatur, proximale Dendriten	
Ca _v 1.3			Endokrine Zellen, neuronale Zellkörper und Dendriten, atriale Herzmuskelzellen	
Ca _v 1.4			Bipolare Zellen in der Retina, Rückenmark, Mastzellen	
Ca _v 2.1	P-/ Q-Typ	mittel	Nerventerminale und Dendriten,	ω-agatoxin IVA, IVB
Ca _v 2.2	N-Typ		neuroendokrine Zellen	ω-Conotoxin GIVA, MVIIA, MVIIC
Ca _v 2.3	R-Typ		neuronale Zellkörper und Dendriten	SNX-482, Ni ²⁺ , Cd ²⁺ , Mibefradil
Ca _v 3.1	T-Typ	niedrig	neuronale Zellkörper und Dendriten,	Ni ²⁺ , Mibefradil,
Ca _v 3.2			Herzmuskelzellen, glatte Muskulatur	
Ca _v 3.3			neuronale Zellkörper und Dendriten	

1.5 Neuron Glia Interaktion

Im ZNS bilden Astrozyten ein enges Netzwerk mit Neuronen, denn ihre Fortsätze umschließen die Synapsen. In hippokampalen Astrozyten löst die synaptische Freisetzung von Glutamat die Aktivierung von GPCRs aus, die eine Signalkaskade über die Aktivierung von Phospholipasen und Erzeugung von IP₃ zur Folge hat. IP₃ löst eine Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern aus (Haydon und Carmignoto, 2006). Es findet eine direkte wechselseitige Kommunikation über die Freisetzung von Transmittern aus Astrozyten und die Bindung an die jeweiligen neuronalen

Rezeptoren statt (Vesce et al., 1999; Übersicht: Volterra und Meldolesi, 2005; Haydon und Carmignoto, 2006; Bennay et al., 2008). Aus Synapsen ausgeschüttetes Glutamat ruft Ca^{2+} -Signale in benachbarten Astrozyten hervor, die verschiedene Signalwege aktivieren und so die Freisetzung von Neurotransmittern regulieren können (Araque et al., 1999; Haydon, 2001). Astrozyten setzen Glutamat und Adenosin Triphosphat (ATP) frei (Nedergaard, 1994; Parpura et al., 1994). ATP wird durch die Ektonukleotidase zu Adenosin metabolisiert, das auf Neurone hemmend wirken kann (Newman, 2004; Pascual et al., 2005). Bei Bergmann- Gliazellen im Cerebellum wurde auch eine andere Art der Kommunikation festgestellt. Diese erfolgte über ektopische neuronale Freisetzung von Transmittern nahe der Gliazellen, welche parallel zu der konventionellen Freisetzung an der Synapse stattfindet. Die Reaktion der Bergmann-Gliazellen äußert sich im Ca^{2+} -Einstrom über ionotrope Glutamat-Rezeptoren vom AMPA-Typ und durch Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Matsui und Jahr, 2004).

NG2 Zellen erhalten synaptischen Input von glutamat- und GABAergen Neuronen (Jabs et al., 2005; Übersicht: Paukert und Bergles, 2006; Übersicht: Gallo et al., 2008). Glutamat und GABA beeinflussen die Entwicklung der NG2 Zellen (Lin und Bergles 2004; Übersicht: Paukert und Bergles 2006). Weiterhin ist es seit mehr als einem Jahrzehnt bekannt, dass Gliazellen, die in ihren Eigenschaften den NG2 Zellen sehr ähnlich sind, sowohl funktionelle Ca^{2+} -durchlässige AMPA Rezeptoren (Seifert und Steinhäuser, 1995), als auch Ca_V -Kanäle (Akopian et al., 1996) exprimieren, die durch GABA aktiviert werden können (Kirchhoff und Kettenmann, 1992). Jedoch ist die physiologische Bedeutung der synaptischen Innervation von NG2 Zellen nach wie vor unbekannt.

1.6 Epilepsie

Epilepsie (altgriechisch *epilepsis* „ergreifen“, „packen“, „anfallen“), im Deutschen die Fallsucht oder auch Krampfleiden genannt, bezeichnet einen Zustand mit mindestens zwei wiederholt spontan auftretenden Krampfanfällen, die nicht durch eine vorausgehende, erkennbare Ursache hervorgerufen wurden. Ein solcher epileptischer Krampfanfall ist Folge paroxysmaler, synchroner Entladungen von Neuronengruppen im Gehirn, die zu plötzlichen, unwillkürlichen und stereotypen Verhaltens- oder Befindungsstörungen führen.

Die verschiedenen Verlaufsformen der epileptischen Anfälle werden nach der Definition der Internationalen Liga gegen Epilepsie (ILAE) wie folgt eingeteilt:

(1) Generalisierter Krampfanfall: Ein Anfall wird als generalisiert bezeichnet, wenn der Verlauf und die Symptome keine Hinweise auf eine anatomisch begrenzte Lokalisation geben und keine Zeichen eines lokalen (herdförmigen) Beginns zu erkennen sind. Die generalisierten Anfälle werden in drei Untertypen unterteilt: 1. Der konvulsive Anfall geht mit Bewusstseinsverlust, Sturz, Verkrampfung und anschließend rhythmischen Zuckungen beider Arme und Beine (tonisch-klonischer oder früher auch französisch *Grand-mal* genannt) einher. Als konvulsiven Anfall bezeichnet man auch den Verlust der Spannung der Muskulatur (atonischer Anfall) oder eine krampfhaft gesteigerte Spannung der Muskulatur (tonischer Anfall). 2. Als den nicht-konvulsiven generalisierten Anfall, bezeichnet man den *Absence*-Anfall, der mit einer kurzen Bewusstseinspause ohne Sturz (früher auch französisch mit *Petit-mal* bezeichnet) einhergeht. 3. Der myoklonische Anfall manifestiert sich durch einzelne oder unregelmäßig wiederholte Zuckungen einzelner Muskelgruppen.

(2) Partieller (fokaler) Krampfanfall: Diese Anfallsform ist dadurch gekennzeichnet, dass es ein Zeichen für einen Beginn des Anfallsgeschehens in einer umschriebenen Region des Gehirns gibt. Dabei ist es egal, ob es zu einer sekundären Ausbreitung auf die restliche Hirnrinde kommt (sekundäre Generalisierung). Insbesondere ein Anfallsbeginn mit einer Aura hat einen hohen Aussagewert darüber, in welcher Hirnregion der Anfall seinen Ursprung hat, denn sie ist das Ergebnis einer umschriebenen Aktivierung von Nervenzellverbänden.

Wenn der Patient bei einem Anfall wach ist und auf seine Umgebung reagiert, wird der Anfall einfach partiell genannt. Ist das Bewusstsein eingeschränkt und tritt eine Erinnerungslücke oder Verwirrheitszustände auf, während des Anfalls oder danach, wird der Anfall als komplex partiell bezeichnet (www.ilae-epilepsy.org).

Bei Temporallappenepilepsie (TLE) haben die Anfälle ihren Ursprung in definierten anatomischen Strukturen des Schläfenlappens, dem Hippokampus, der Windung um den Hippokampus herum und der Amygdala (Volcy Gómez, 2004). Die mesiale temporale Sklerose, auch als Hippokampussklerose oder Ammonshornsklerose (AHS) bezeichnet, ist der häufigste neuropathologische Befund bei therapieresistenter TLE. Histologisch ist die AHS durch Nervenzellverluste im Hippokampus charakterisiert (de Lanerolle et al., 1989), nach deren Verteilungsmuster sich vier verschiedene Typen abgrenzen lassen. Während bei der klassischen Form der AHS (Typ1A nach Blümcke) und der schweren AHS (Typ 1B nach Blümcke), eine günstige Prognose in Bezug auf eine Anfallsfreiheit nach epilepsiechirurgischen Eingriffen zu erwarten ist, kann nach einem chirurgischen Eingriff, bei einem atypischen Verteilungsmuster

mit Nervenzellverlusten im Bereich der CA2, CA3 und CA4-Region (Endblattsklerose, Blümcke Typ 3), seltener Anfallsfreiheit erzielt werden (Blümcke et al., 2007). Patienten, die an AHS leiden, berichten häufig von ersten Anfällen als Fieberkrämpfen im Kleinkindalter, aus denen sich, nach einer unterschiedlich langen anfallsfreien Periode, eine Epilepsie entwickelt. Tumore, Entzündungen des Gehirns, der Gefäße oder andere Missbildungen können weitere Ursachen sein. Die Anfälle sind charakterisiert durch meist viszerale Auren mit Aufsteigen unangenehmer Gefühle aus der Magengegend. Ihnen folgen herdförmige Anfälle mit Bewusstseinsverlust, die sich in schmatzend-kauenden Mundbewegungen äußern, welche die Reaktion der Patienten auf einen oft beschriebenen „seltsamen Geschmack“ im Mund sind, gefolgt von sich wiederholenden Handbewegungen, dann Umhergucken und schließlich Bewegungen des ganzen Körpers. Die medikamentöse Therapie ist bei TLE schwierig, nur etwa ein Viertel der Patienten wird anfallsfrei, bei einem weiteren Drittel wird zumindest eine Abnahme der Anfallshäufigkeit erreicht. In therapieresistenten Fällen ist eine operative Entfernung des Anfallsursprungs der letzte Ausweg, vorausgesetzt der Fokus ist auf eine Hirnhälfte beschränkt und lokal umschrieben (Elger und Schramm 1993).

1.7 Zielsetzung

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war es, synaptische Innervation von Gliazellen mit komplexem Strommuster im Gewebe der Maus und des Menschen zu untersuchen.

Im Hinblick darauf, dass im Hippokampus von AHS Patienten nur komplexe Gliazellen zu finden sind, sollten diese, analog zu den Untersuchungen im Gewebe der Maus, auf synaptische Innervation analysiert werden. Ein weiteres Ziel war es, ein Epilepsie Pilocarpin-Mausmodell zu etablieren, mit der Absicht, zeitliche Aspekte der Epileptogenese im Gewebe des Menschen zu verstehen.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung synaptischer Innervation von NG2 Zellen der Maus und die Analyse möglicher Auswirkungen dieser Innervation auf Anstiege intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen in NG2 Zellen. Dabei sollte untersucht werden, ob Ca_v -Kanäle an Konzentrationserhöhungen des intrazellulären Ca^{2+} beteiligt sind. Um den Mechanismus, der den Ca^{2+} -Anstiegen zu Grunde liegt, möglichst genau charakterisieren zu können, sollte in dieser Arbeit eine schnelle Messmethode des intrazellulären Ca^{2+} etabliert werden. Es sollten die Konzentrationen des freien intrazellulären und des einströmenden Ca^{2+} bestimmt werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Lösungen

Im Folgenden werden alle Lösungen aufgelistet die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von *Sigma* (Taufkirchen, Deutschland), *Invitrogen* (Karlsruhe, Deutschland) und *Tocris* (Bristol, Großbritannien) bezogen.

Präparationslösung:

- 87 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 7 mM MgSO₄
- 0,5 mM CaCl₂
- 25 mM Glucose
- 1,25 mM NaH₂PO₄
- 25 mM NaHCO₃
- 75 mM Sucrose

pH 7.4, eingestellt mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) bei 4 °C

Osmolarität: 330 ± 5 mOsm

Aufbewahrungs- und Badlösung:

- 126 mM NaCl
- 3 mM KCl
- 2 mM MgSO₄
- 2 mM CaCl₂
- 10 mM Glucose
- 1,25 mM NaH₂PO₄
- 26 mM NaHCO₃

pH 7.4, eingestellt mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) bei Raumtemperatur (RT)

Osmolarität: 300 ± 5 mOsm

Pipettenlösung 1:

- 130 mM KCl
- 10 mM HEPES
- 5 mM BAPTA
- 3 mM ATP
- 2 mM MgCl₂
- 0,5 mM CaCl₂

pH 7.25 – 7.28, eingestellt mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) bei RT

Osmolarität: 290 ± 2 mOsm

Pipettenlösung 2:

- 130 mM K-Glukonat
- 20 mM HEPES
- 10 mM EGTA
- 3 mM ATP
- 1 mM MgCl₂

pH 7.25 – 7.28, eingestellt mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) bei RT

Osmolarität: 290 ± 2 mOsm

Pipettenlösung 3:

- 130 mM KCl
- 10 mM HEPES
- 3 mM ATP
- 2 mM MgCl₂
- 0,2 mM Fura-2

pH 7.25 – 7.28, eingestellt mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) bei RT

Osmolarität: 290 ± 2 mOsm

Phosphat gepufferte Saline (PBS):

- 150 mM NaCl
- 8,3 mM Na₂HPO₄
- 1,7 mM NaH₂PO₄

pH 7.38 – 7.4, eingestellt mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) bei RT

Paraformaldehyd (PFA):

- 150 mM NaCl
- 8,3 mM Na₂HPO₄
- 1,7 mM NaH₂PO₄
- 4 % Paraformaldehyd

pH 7.38 – 7.4, eingestellt mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) bei RT

2.2 Verwendetes Gewebe

2.2.1 Gewebe von der Maus

In dieser Arbeit wurden drei Mauslinien verwendet.

1: C57BL/6J Mäuse (Charles River Laboratories International, Inc., Sulzfeld, Deutschland) im Alter von postnataler Tag (p) 60 – 220.

Die Mauslinie C57BL/6J wurde 1922 in dem Tierzuchtzentrum Miss Abby Lathrop in den USA entwickelt. 1948 wurde diese Mauslinie in die Jackson Laboratorien und 1981 in die Charles River Laboratorien aufgenommen. Das Genom dieser Mauslinie trägt Elemente von *Mus musculus* und *Mus spretus* (<http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/C57BL.shtml>).

2: Tg hGFAP-EGFP Mäuse (Nolte et al., 2001) im Alter von p 60 – 220.

Die transgenen Mäuse wurden aus Mäusen des FVB/N Stamms hergestellt. Die Tiere exprimieren das grün-fluoreszierende Protein (*enhanced green fluorescent protein* EGFP) unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promotors. Die Aktivierung des Promotors in Gliazellen führt zur Expression von EGFP und ermöglichte eine schnelle und direkte Detektion von Gliazellen in vitalen hippokampalen Gehirnschnitten (Nolte et al., 2001).

3: NG2-EYFP knockin Mäuse (Karram et al., 2008) im Alter von p7 – 15.

Die Generierung dieser Mäuse erfolgte durch die Integration des Gens für EYFP gefolgt von einer loxP-flankierten Neomycinresistenzkassette in das Startcodon von Exon 1 des NG2-Gens über homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Linie 129 OLA. Durch Injektion in Blastozysten (C57black 6J) wurden chimäre Mäuse erzeugt (Karram et al., 2008).

Für die durchgeführten Experimente zur synaptischen Innervation und der Ca^{2+} -Messungen in NG2 positiven Zellen wurden heterozygote NG2-EYFP Mäuse verwendet, die sowohl das Wildtyp-Allel als auch EYFP exprimierten. Außerdem wurden homozygote NG2-EYFP Mäuse verwendet, die nur das EYFP exprimierten, um eine mögliche Auswirkung des fehlenden NG2 Proteins, auf die Physiologie der Zellen festzustellen. Die Expression von EYFP in den NG2 positiven Zellen ermöglichte eine schnelle und direkte Detektion der Zellen in lebenden Hirnschnittpräparaten.

2.2.2 Etablierung eines Epilepsie Pilokarpin Mausmodells

Für die Etablierung eines Epilepsie Mausmodells wurden Tg hGFAP-EGFP und C57BL6J Mäuse im Alter von p 60 bis p 220 verwendet. Pilokarpin (latein. *pilus* = Haar, griech. *karpos* = Frucht) ist ein Hauptalkaloid der Jaborandiblätter des Rautengewächses *Pilocarpus* mit muscarinartiger Wirkung (Agonist am muscarinischen Acetylcholinrezeptor). Pilokarpin gehört zu den direkten Parasympathomimetika und ruft in der Maus chronische, spontane, wiederholte Anfälle hervor. Zusätzlich bewirkt es einen Verlust von Zellen im *Hilus*, *Gyrus dentatus* sowie in der CA1 und CA3 Region des Hippokampus und ähnelt so der humanen Temporallappenepilepsie. Das Modell wurde von Turski et al. (1983) für Ratten entwickelt und 1984 für Mäuse modifiziert. Vor der Pilokarpininjektion wurde den Mäusen Scopolamin (10 μg /10 g Körpergewicht (KG)) intraperitoneal gespritzt. Scopolamin wirkt beruhigend und verhindert ein starkes Schwitzen. Nach einer 20 minutigen Scopolamineinwirkung wurde den Tieren, ebenfalls intraperitoneal, Pilokarpin (3,4 mg /10 g KG) injiziert. Die Tiere wurden anschließend beobachtet. Die Anfälle setzten frühestens 20 min nach Pilokarpininjektion ein. Es wurde unterschieden zwischen Anfällen mit und ohne Gleichgewichtsverlust der Tiere (Turski et al., 1984). Das Einsetzen des *Status Epilepticus* (SE) manifestierte sich durch ein starkes Zittern der Tiere. Dieser Zustand wurde nach 2 h durch eine Diazepaminjektion (50 μg /10 g KG) beendet. Im Folgenden werden die mit Pilokarpin behandelten Tiere Pilokarpintiere bzw. Pilokarpinmäuse genannt.

Scopolaminlösung:

4 μM Scopolamin (MW= 438,31 g/mol) in 20 ml Ringer gelöst. Ringer setzt sich zusammen aus in Wasser für Injektionszwecke gelösten 147 mM Na^+ , 4 mM K^+ , 2,2 mM Ca^{2+} - und 156 mM Cl^- .

Pilokarpinlösung:

340 mg Pilokarpin (MW = 244,72 g/mol) in 5 ml Ringer gelöst

DiazepamLösung:

0,2 ml der Diazepam-ratiopharm[®] 10 Injektionslösung mit 0,8 ml Ringer gemischt. 2 ml Injektionslösung enthält 10 mg Diazepam, Benzoesäure, Benzylalkohol, Na^+ Benzoat, Propylenglykol, Ethanol (13,12 Vol.-%), Wasser für Injektionszwecke

Die Lösungen wurden stets frisch angesetzt und lichtgeschützt aufbewahrt.

Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit der Direktive des Rats der Europäischen Gemeinschaft vom 24. November 1986 (86/609/EEC) durchgeführt. Tierversuchsgenehmigung: Aktenzeichen 23.203.2-Bn28, 20/00.

2.2.3 Präparation von akuten Hirnschnitten der Maus

Die Mäuse wurden mit einem Gasgemisch aus 50 % CO_2 und 50 % O_2 anästhesiert und decapitiert. Im Anschluss wurde das Gehirn freipräpariert und mit Hilfe eines Vibratoms (VT100S Vibratom, Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden 200 μm dicke Frontalschnitte angefertigt. Während des gesamten Präparationsvorgangs wurde eisgekühlte Präparationslösung verwendet. Die Schnitte wurden anschließend in der gleichen Lösung bei 35°C gelagert. Es folgte eine 20 minutige Abkühlphase bei RT. Im Anschluss wurden die Schnitte bis zur Verwendung in der Aufbewahrungslösung (begast mit Carbogen (5 % CO_2 / 95 % O_2) bei RT gelagert.

2.2.4 Humane Resektate

Humane hippokampale Gewebeproben wurden Patienten entnommen, die auf Grund einer pharmakoresistenten TLE chirurgisch behandelt wurden. Die meisten Patienten zeigten komplex-partielle Anfälle, teilweise mit zusätzlichen einfach partiellen Anfällen. Einige Patienten hatten *Grand-mal* Anfälle von unterschiedlicher Häufigkeit. Bei der histopathologischen Untersuchung des Gewebes wurde eine AHS diagnostiziert, die durch starken Neuronenverlust in der CA1, CA3 und CA4 Region gekennzeichnet war (de Lanerolle et al., 1989). Bei allen AHS Patienten wurde durch nicht invasive und invasive prächirurgische Untersuchungen der Hippokampus als Anfallsursprung identifiziert (Elger und Schramm, 1993; Behrens et al., 1994). Um eine mögliche

Reduktion der Anfallsaktivität zu erlangen, wurde den Patienten die Entfernung des Hippokampus empfohlen. Bei Patienten mit extrahippokampalen Läsionen wurde eine Entfernung des Hippokampus im Rahmen der Entfernung der epileptogenen Läsion durchgeführt. Alle Patienten, deren Gewebe in dieser Arbeit verwendet wurde, haben einer anschließenden elektrophysiologischen Untersuchung des Gewebes zugestimmt. Alle Vorgehensweisen wurden durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn genehmigt und entsprachen den Standards der Deklaration von Helsinki (1989).

2.2.5 Präparation von akuten humanen Hirnschnitten

Mit Hilfe einer speziellen Resektions-Technik wurden *en bloc*-Präparate des Hippokampus entnommen, die sowohl eine anschließende histopathologische als auch eine elektrophysiologische Untersuchung ermöglichten (Dietrich et al., 1999). Sofort nach der Resektion wurde das Gewebe in eisgekühlter Präparationslösung mit einer Rasierklinge transversal in 3-4 mm dicke Blöcke zerteilt. Mit einem Vibratom wurden aus diesen Blöcken 200 µm dicke Hirnschnitte angefertigt. Die humanen Hirnschnitte wurden anschließend wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, gelagert.

2.3 Elektrophysiologische Messungen

2.3.1 Messaufbau

Die *in situ* Messungen der Membranströme der Zellen wurden mit der *patch clamp* Technik in der *whole cell* Konfiguration durchgeführt. Für die Messungen wurden die Hirnschnitte in eine auf dem Mikroskop (Zeiss Axioskop FS2, Oberkochen, Deutschland bzw. Nikon Eclipse 600 FN, Düsseldorf, Deutschland) befestigte Perfusionskammer überführt und mit Hilfe eines U-förmigen, mit Nylonfäden bespannten Platindrahtes fixiert. In der Perfusionskammer fand ein permanenter Zu- und Abfluss der mit Carbogen begasten Badlösung statt. Die Gravitation trieb den Zufluss an. Der Abfluss wurde, je nach Arbeitsplatz, entweder durch die Gravitation oder durch eine Unterdruckpumpe (KNF Neuberger Laborport, Freiburg, Deutschland) sichergestellt. Alle Messungen wurden bei RT durchgeführt. Der Widerstand der mit Pipettenlösung gefüllten *patch*-Pipetten, die aus Borosilikat-Kapillaren (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland; Außendurchmesser 2,0 mm; Innendurchmesser 1,0 mm) bestanden, betrug 5-7 MΩ. Mess- und Referenzelektrode bestanden aus Silber-Silberchlorid-Draht. Die Pipetten wurden mit einem

horizontalen Ziehgerät (Sutter Instrument CO., Model P-87, USA) gezogen. Um die *patch*-Pipette unter optischer Kontrolle mit Hilfe einer CCD-Infrarotkamera (PCO, Kehlheim, Deutschland) präzise auf die Zelle aufzusetzen, wurde je nach verwendetem *patch clamp* Messplatz ein Schrittmotor-getriebener Mikromanipulator 5171 (Eppendorf, Hamburg) oder ein Mikromanipulator SM-1 der Firma Luigs & Neumann (Luigs & Neumann GmbH, Ratingen, Deutschland) verwendet. Die verwendeten Objektive unterschieden sich, je nach benutztem Mikroskop. Für das Zeiss Axioskop FS2 wurden das CD-Achromat 5x/0.12, ∞ - (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und das Wasserimmersionsobjektiv LUMPlanFI/IR 60x/0.90W ∞ /0 (Olympus, Japan) verwendet. Für das Nikon Eclipse 600 FN wurden das Plan Fluor 4x/0.13, ∞ -WD 17.1 (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) und das Wasserimmersionsobjektiv Fluor 60x/1.00W, Dic H, ∞ /0, WD 2.0 (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) verwendet. Der für eine hochohmige Verbindung zwischen *patch*-Pipette und Zellmembran (Gigaseal) benötigte Überdruck wurde über ein mit Wasser gefülltes U-Rohr auf die Pipette übertragen. Dieser Überdruck sorgte für einen kontinuierlichen Ausstrom von Pipettenlösung aus der Pipette und verhinderte das Eindringen von Badlösung sowie Verstopfungen durch Gewebefragmente. Die Pipette wurde so nahe an die Zelloberfläche herangeführt, bis eine halbkreisförmige helle Struktur zu erkennen war. Für die Etablierung des Gigaseals wurde der Überdruck weggenommen und Unterdruck durch Saugen erzeugt. Somit wurde die Zellmembran dicht mit dem Pipettenglas verbunden. Nach Erreichen des Gigaseals wurde die Zelle durch vorsichtiges Saugen geöffnet, wodurch der Wechsel von der *cell attached*- in die *whole cell*-Konfiguration erfolgte, die eine Membranstrommessung der gesamten Membran einer Zelle ermöglichte. Die Membranstrome wurden mit Hilfe des Verstärkers EPC 7 (HEKA, Lambrecht, Deutschland) bei 10 kHz gefiltert und mit Hilfe des ITC 16 (NPI electronic) digitalisiert. Die Aufnahme Frequenz betrug 6 kHz.

Der EPC7 Verstärker besitzt zwei verschiedene Operationsmodi, die Spannungsklemme (engl. *voltage clamp*) und die Stromklemme (engl. *current clamp*). In der Spannungsklemme wird das Membranpotential der Zelle mit dem vorgegebenen Potential des Verstärkers verglichen. Bei einer Differenz wird über die Messelektrode Strom in die Zellen injiziert. Dieser Strom wird als Reaktion der Zelle dargestellt. Wird die Stromklemme verwendet, so wird die Spannung angegeben, bei der kein Strom in die Zelle injiziert wird. Dieser Modus ist für die Analyse physiologischer Erregungsmuster geeignet, da die Zelle nicht durch die Strominjektionen des Verstärkers beeinflusst wird.

Das Haltepotential (U_H) betrug -80 mV (soweit nicht anders angegeben). Als Mess- und Analyseprogramme wurden TIDA Version 5 (HEKA Elektronik für Windows, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) und IGOR Pro 6.0.3 (WaveMetrics, Nimbus, USA) benutzt.

Um zu verhindern, dass Erschütterungen sich negativ auf elektrophysiologische Messungen auswirken, befanden sich die sensitiven Teile des *patch clamp* Messplatzes (Mikroskop, die Messkammer sowie die Aufhängung für den Vorverstärker) auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Newport Spectra-Physics GmbH, Darmstadt, Deutschland). Die elektrische Abschirmung wurde durch einen mechanisch vom Messplatz entkoppelten Faradaykäfig gewährleistet.

2.3.2 Messung der synaptischen Innervation an Gliazellen

Für die Messung der synaptischen Innervation erfolgten die Messungen wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Bei diesen Experimenten wurden die Membranströme zusätzlich mit einem DPA 2F Verstärker (NPI electronic GmbH, Tamm, Germany) bei 1,3 kHz gefiltert. Als Analyseprogramm wurde hier zusätzlich die IGOR Pro 6.0.3 Unterfunktion Neuromatic (NeuroMatik Version 2.0, Data Analysis Software for Electrophysiology) benutzt. Die Messungen wurden im Gewebe von NG2-EYFP Mäusen und von AHS- und Läsionspatienten durchgeführt.

Die glialen spontanen postsynaptischen Ströme (*spontaneous postsynaptic currents* sPSCs) wurden in Anwesenheit von 10 mM KCl (Gewebe der Maus) und entweder in 10 μ M NBQX + 50 μ M DL-APV, oder 10 μ M NBQX + 50 μ M DL-APV + 3 μ M Ionomycin, oder 10 μ M Bicucullin, oder 10 μ M Bicucullin + 3 μ M Ionomycin (humanes Gewebe) in der Badlösung gemessen.

2.3.3 Fokale Applikation

Für extrazelluläre Applikationen wurde das *OctaFlow* System (Perfusions System, ALA Scientific Instruments, Westbury, USA) benutzt. Zu diesem System gehört eine Quarzpipette, deren Durchmesser 100 μ m beträgt. An diese Pipette sind zwölf druckbetriebene Kanäle und ein gravitationsgetriebener Spülkanal angeschlossen. Eine Besonderheit dieses Systems ist das geringe Totvolumen. Die Applikationsdauer (im 100 ms-Bereich) und Applikationsdruck wurden mit Hilfe der *OctaFlow* Software programmiert und ausgeführt. Gestartet wurde das Applikationsprotokoll durch TIDA, in dem Trigger einprogrammiert wurden. Die Quarzpipette wurde gegenüber der *patch*-Pipette in der Perfusionskammer positioniert und an die Oberfläche des Gewebeschnittes herangeführt (Abb.2.1a). Die Positionierung wurde stets mit

Kontrolllösungen getestet, um sicher zu stellen, dass die applizierte Substanz an der untersuchten Zelle ankommt (Abb. 2.1b). Darüberhinaus begann und endete jede Substanzapplikation mit einer Applikation der Badlösung, um mögliche Druck- bzw. pH-Effekte der Badlösung sichtbar zu machen und somit die Spezifität der Substanzapplikation sicher zu stellen.

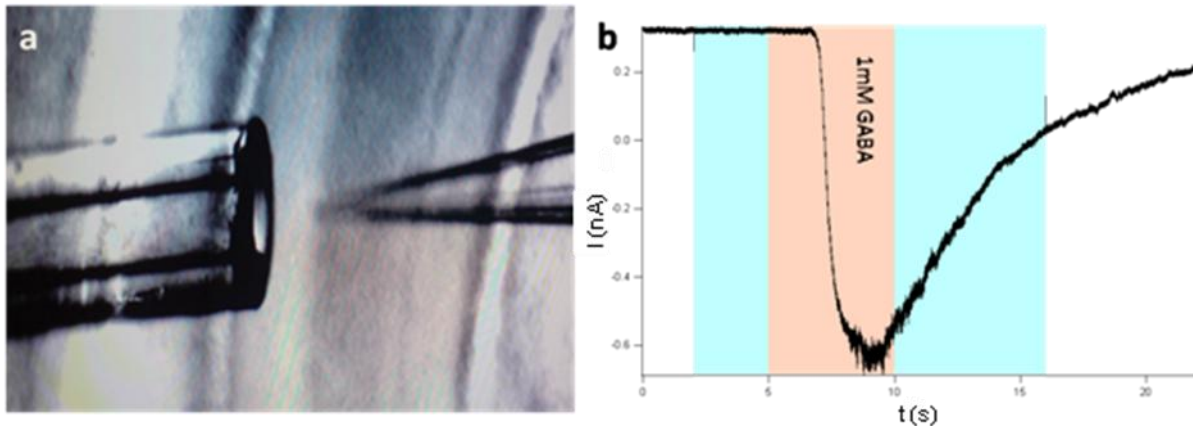


Abb.2.1: Applikationspositionierung a: Positionierung der Quarzpipette (links) relativ zu der *patch*-Pipette (rechts). Im Hintergrund ist der Gewebeschnitt zu sehen. b: Test-Applikation von 1mM GABA (Anstiegszeit: 1s). Blau unterlegt ist die Zeit, in der Badlösung appliziert wurde, beige unterlegt ist die Zeit, in der GABA appliziert wurde.

2.3.4 Analyse der Membraneigenschaften

Die Bestimmung von Membranpotentialen (U_R) wurde jeweils durch einen kurzzeitigen Wechsel vom *voltage clamp* in den *current clamp* Modus des Verstärkers durchgeführt. Membrankapazität (C_M), Membranwiderstand (R_M) und Serienwiderstand (R_S) wurden aus der Differenz der kapazitiven Umladeströme vor und nach dem Durchbrechen der Zellmembran bestimmt. Die korrespondierenden Stromwerte vor dem Durchbrechen wurden von den Stromwerten nach dem Durchbrechen subtrahiert. Die Messungen der kapazitiven Ladeströme bestanden aus zehn nacheinander folgenden 10 mV Spannungssprüngen von U_H -80 mV auf -70 mV. Um die Bestimmung der genannten Größen herzuleiten, ist das Ersatzschaltbild einer Ganzzelleleitung zu betrachten (Abbildung 2.2).

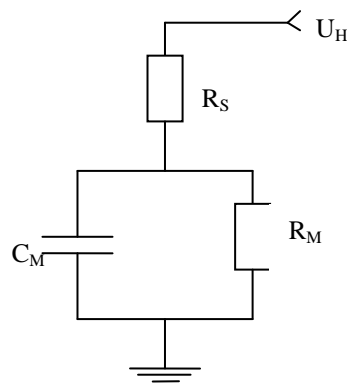


Abb.2.2: Ersatzschaltbild einer Ganzzelleableitung. Der R_S fällt an der Membranöffnung unter der Pipettenmündung ab. Die Zellmembran wird mit ihren kapazitiven Eigenschaften als Kondensator C_M und ihrem Membranwiderstand R_M dargestellt, die parallel geschaltet sind.

Zwischen dem Elektrodendraht und dem Zellsoma liegt der Serienwiderstand R_S an. Die Zellmembran einer einfachen, kugelförmigen Zelle kann man durch die parallel geschalteten Parameter, den Membranwiderstand (R_M) und die Membrankapazität (C_M) beschreiben. In der Ganzzelleableitung ist die Pipette mit dem Zellinneren leitend verbunden, wobei dazwischen R_S anliegt. Legt man, wie bei dem verwendeten Protokoll zur Bestimmung von R_S und C_M , einen rechteckförmigen 10 mV Spannungspuls (U_0) an, ergibt sich nach Differenzbildung die in Abbildung 2.3 gezeigte Stromantwort der Zelle.

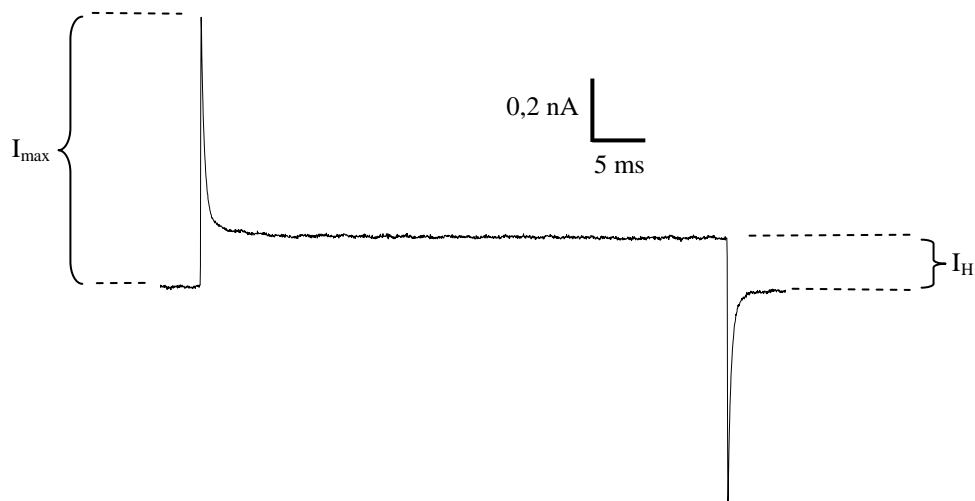


Abb. 2.3: Ladestrom-Differenz aus der Stromantwort einer Zelle vor und nach dem Durchbrechen der Zellmembran (Wechsel in den *whole cell* Modus) auf einen rechteckförmigen 10 mV Spannungspuls von 50 ms Dauer. Beim Anlegen des Spannungssprunges fließt zunächst der fast senkrecht ansteigende kapazitive Ladestrom I_{\max} , der dann exponentiell abfällt, bis nur noch der Haltestrom I_H fließt.

Im Idealfall sollte R_S viel kleiner sein als R_M ($R_S \ll R_M$), denn je größer R_S ist, desto mehr weicht die Spannung (U) über der Membran vom Kommandopotential ab (Spannungsteiler). Wenn diese Bedingung erfüllt ist, kann man aus dem Ersatzschaltbild der Ganzzelleableitung (Abbildung 2.2) die Berechnung verschiedener Größen ableiten.

Am Anfang des Umladeprozesses, ausgelöst durch den 10 mV Puls, hat der Kondensator praktisch einen Widerstand von Null, d. h. R_M wird kurzgeschlossen und somit ist nur R_S wirksam. Nach dem Ohmschen Gesetz lässt sich R_S zu diesem Zeitpunkt mit Hilfe des

kapazitiven Ladestroms I_{\max} wie folgt berechnen: $R_S = \frac{U_0}{I_{\max}}$ mit $U_0 = 10 \text{ mV}$

Nach Laden des Kondensators wird der fließende Strom (Haltestrom I_H) dann durch R_S und R_M

bestimmt. Nach dem Ohmschen Gesetz gilt dann: $R_M + R_S = \frac{U_0}{I_H}$

R_M kann demnach wie folgt berechnet werden: $R_M = \frac{U_0}{I_H} - R_S$

Mit Hilfe der zu dem 10 mV Spannungspuls korrespondierenden Stromantwort konnte dann C_M berechnet werden. Hierfür wurde durch numerische Integration die Fläche unter der Kurve berechnet, abzüglich der Fläche unter einer gedachten Geraden parallel zur x-Achse bei $I = I_H$ (vergleiche Abbildung 2.3).

Für die Berechnungen der Parameter wurde das Programm Igor Pro 6.0.3 verwendet.

2.4. Kopplungsanalyse

2.4.1 Biozytinvisualisierung

Für Kopplungsanalysen wurden die Zellen während elektrophysiologischer Ableitungen 20 min lang mit einer 0,5% Biozytinlösung (Pipettenlösung 2 + 0,5 % Biozytin) gefüllt. Die Hirnschnitte mit den intrazellulär markierten Zellen wurden sofort nach den Ableitungen in PBS mit 4 % PFA bei 4 °C über Nacht fixiert. Anschließend wurde das Biozytin mit dem fluoreszenten Konjugat Streptavidin-Cy3 nach folgendem Protokoll visualisiert. Zunächst wurden die Hirnschnitte dreimal für je 10 Minuten bei RT in PBS gewaschen. Es folgte eine zweistündige Blockierung der unspezifischen Antigen-Bindungsstellen bei RT mit PBS, das 10 % normales Ziegen Serum

(*normal goat serum* NGS) und 0,5 % Triton X-100 enthielt. Anschließend wurden die Hirnschnitte über Nacht und bei 4 °C mit dem Streptavidin-Cy3 Konjugat, 1:300 in PBS verdünnt, inkubiert. Das PBS enthielt bei diesem Schritt zusätzlich 2 % NGS und 0,1% X-100 Triton. Schließlich wurden die Schnitte dreimal für je 10 Minuten bei RT in PBS gewaschen. Die Hirnschnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und mit Eindeckmedium (VECTASHIELD® Mounting Medium, Vectorlabs, Burlingame, USA) versiegelt. Mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop (TCS NT; Leica Lasertechnik, Heidelberg, Deutschland) wurden Aufnahmen von den Biozytin-markierten und mit dem fluoreszenten Streptavidin-Cy3 Konjugat gefärbten Zellen erstellt (PLAN Apochromat 63x1.4, Leica Lasertechnik). Die Analyse der Aufnahmen erfolgte mit der Metaview 4.5r5 Software (Universal Imaging, West Chester, USA).

2.4.2 Farbstoffausbreitung im Gewebe

Als Alternativexperiment zu den Kopplungsanalysen mit Biozytin, sind CellTracker Injektionen im Gewebe durchgeführt worden. Das CellTracker Reagenz ist ein fluoreszentes Chloromethyl-Derivat mit einer Estergruppe, das zellmembranpermeabel ist. In der Zelle spalten die endogenen Esterasen die Estergruppe ab, so dass das Reagenz membranimpermeabel wird. Die Fluoreszenz bleibt für mindestens 24 Stunden nach Abspaltung der Estergruppe sichtbar (Produktinformation: Invitrogen GmbH, Karlsruhe Deutschland).

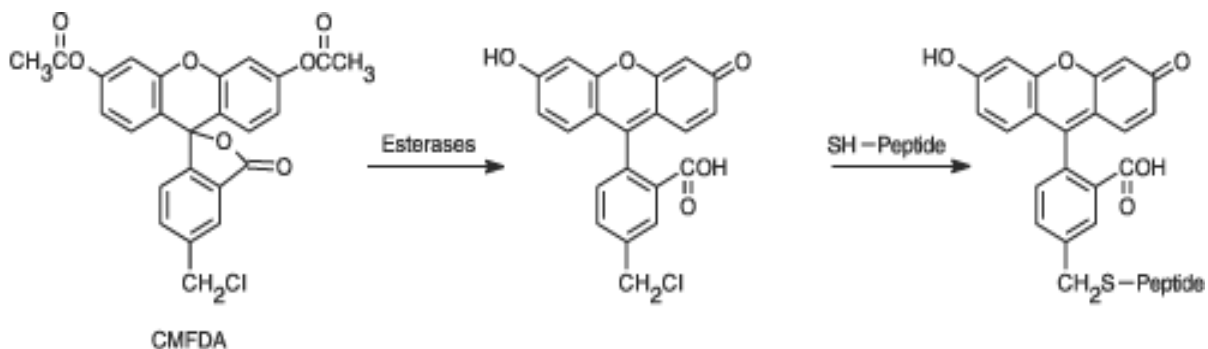


Abb.2.4: Reaktion des CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) von Invitrogen mit den endogenen Esterasen.

Da die Porengröße der *Gap Junctions* ausreichend groß ist für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 1 kDa (Moreno, 2004; Theis et al., 2005), ist das CellTracker Reagenz, das ein Molekulargewicht von 464,86 Da hat, *Gap Junctions*-gängig. Für die Injektionen des Farbstoffes in 200 µm dicken Hirnschnitten wurden niederohmige ($1 \pm 0,2$ MΩ) Pipetten verwendet, die mit 10 µl der CellTracker Lösung gefüllt waren (50 µg CellTracker + 200 µl 20 %

Pluronic Acid in DMSO), beides von Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland). Die Injektionen erfolgten mit Hilfe des hydrostatischen Drucks direkt in die Hirnschnitte (CA1 Region, *Stratum radiatum*). Die Durchflussgeschwindigkeit der Badlösung bei den fünfminütigen Injektionen betrug 15 – 18 ml / min. Danach folgten einstündige Inkubationen in ACSF bei RT, in denen sich der CellTracker in den Schnitten, durch *Gap Junctions* ausbreiten konnte. Nach den Inkubationen wurden die Schnitte in PBS mit 4 % PFA über Nacht bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Längen und die Breiten der Ausbreitungswolken des CellTrackers in den Schnitten gemessen. Dazu wurde das Mikroskop Axiophot (Zeiss, Jena, Deutschland mit dem Objektiv: Zeiss, PLAN Neofluor, 10x/0.30) verwendet. Für die Messungen wurden die Schnitte durch ein quadratisches Gitter betrachtet, bei dem die Seitenlängen 125 µm betragen.

2.5 Messung der Ca²⁺-Erhöhung

Calcium Imaging ist eine bildgebende Technik zur Bestimmung von Ca²⁺-Konzentrationen in Zellen. Hierzu werden Ca²⁺-Indikatoren verwendet, die Eigenschaften von Ca²⁺-Puffern haben. Nach der spezifischen Bindung von Ca²⁺-Ionen an Ca²⁺-Indikatoren ändert sich deren Absorptionsverhalten.

2.5.1 Fura-2 Pentapotassium

Für die Ca²⁺-Messungen wurde der Ca²⁺-Indikator Fura-2 Pentapotassium von Invitrogen verwendet. Das Fura-2 Molekül basiert auf 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA).

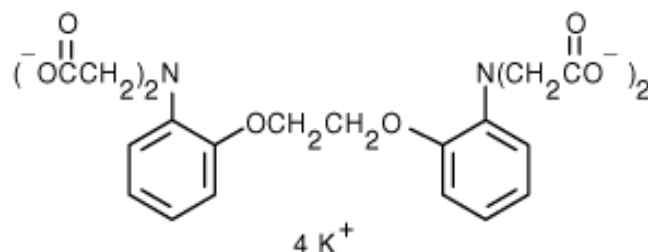


Abb.2.5: Strukturformel von BAPTA Tetrapotassium von Invitrogen (MW: 628,8 Da).

BAPTA ist ein spezifischer Ca²⁺-Chelator und wurde in dieser Arbeit zur Herstellung von Pipettenlösung 1 verwendet, um die Zellen während elektrophysiologischer Ableitungen vor zu

hohen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen zu schützen. Für die Ca^{2+} -Messungen wurde Pipettenlösung 3 verwendet, bei der BAPTA durch Fura-2 ersetzt wurde. So wurde die Pufferung der Ca^{2+} -Ionen beibehalten, gleichzeitig konnten Ca^{2+} -Messungen in den Zellen durchgeführt werden.

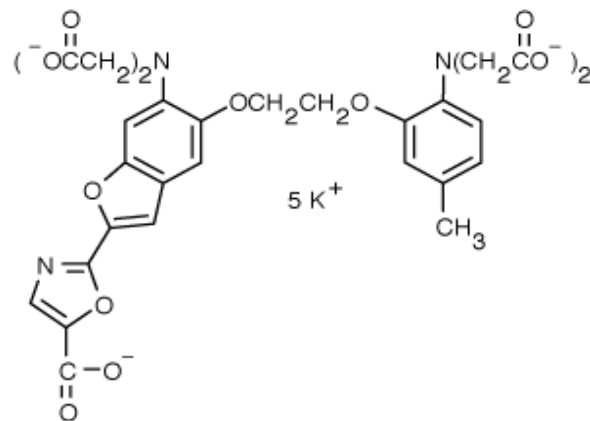


Abb.2.6: Strukturformel des Ca^{2+} -Indikators Fura-2 Pentapotassium von Invitrogen (MW: 832 Da).

An einem der beiden aromatischen Ringe des Moleküls ist eine Elektronendonatorgruppe CH_3 angehängt, um die Affinität für Ca^{2+} zu erhöhen. An dem anderen aromatischen Ring sind ein Benzolring und ein Benzofuran eingefügt, wobei an dem Benzofuran ein Oxazolin gebunden ist. Wird ein Ca^{2+} -Ion gebunden, so lagert es sich in den Hohlraum ein, den die vier Carboxylgruppen bilden. Durch die positive Ladung des Ca^{2+} -Ions werden auch die freien p-Orbitalelektronen der Stickstoffatome vom jeweiligen Benzolring weg, in Richtung auf das gebundene Ion hin gelenkt. Hierdurch kommt es zu einer Veränderung in der Struktur der elektronischen Energieniveaus und damit zu einem geänderten Absorptionsverhalten des Fura-2. Das Absorptionsmaximum wird dabei von der Anregungswellenlänge 380 nm zu 340 nm verschoben. Bei etwa 360nm liegt der so genannte isosbestische Punkt, bei dem das Absorptionmaximum von Ca^{2+} -gebundenem und Ca^{2+} -freiem Indikator in etwa gleich ist. Fura-2 wird für ratiometrische Messungen verwendet. Durch die Verhältnisbildung aus den beiden Fluoreszenzintensitäten, die bei 340 nm und 380 nm angeregt und bei 510 nm detektiert werden, kann der Einfluss sekundärer Effekte, wie z.B. Farbstoffbleichen, Schwankungen der optischen Parameter oder Bewegungsartefakte minimiert werden.

2.5.2 Bestimmung des isosbestischen Punktes

Da der isosbestische Punkt von Faktoren wie Osmolarität und Ionenzusammensetzung der Lösung abhängig ist, in der der Ca^{2+} -Indikator gelöst wurde, konnte der theoretische Wert von 360 nm für die folgenden Ca^{2+} -Messungen nicht übernommen werden. Der Wert musste für die verwendeten Pipetten- und Badlösung bestimmt werden. Über die *patch*-Pipette, die mit Pipettenlösung 3 gefüllt war, wurden die Zellen elektrisch stimuliert. Die Stimulation wurde in 15 Pulsen durchgeführt. Ein einzelner Puls bestand aus einer 100 ms langen Hyperpolarisation auf -100 mV und einer 100 ms langen Depolarisation auf +20 mV. Zur Bestimmung des isosbestischen Punktes wurden nacheinander Messungen bei folgenden Anregungswellenlängen durchgeführt: 350, 355 und 360 – 370 nm. Das TIDA Protokoll für die Stimulation beinhaltete einen Trigger für den Startpunkt der Detektion der Fluoreszenzintensität, so dass die jeweiligen Aufnahmen zeitlich korreliert registriert werden konnten.

2.5.3 Calcium Imaging

Ratiometrische Messungen des Ca^{2+} mit Fura-2 lassen sich beschleunigen, indem man nur bei einer Wellenlänge anregt. Da das Signal-Rausch-Verhältnis bei 380 nm Anregung größer ist als das bei 340 nm, wurden die Messungen bei 380 nm angeregt. Jede Messsequenz begann und endete mit jeweils einer bei 362 nm angeregten Aufnahme. Zwischen den 362 nm Werten wurde eine Bleichgerade gebildet, unter der Annahme, dass das Bleichen des Fura-2 ein linearer Prozess ist. Mit Hilfe linearer Extrapolation der 380 nm Werte zu der Bleichgeraden, wurde jedem 380 nm Wert ein 362 nm Wert zugeordnet.

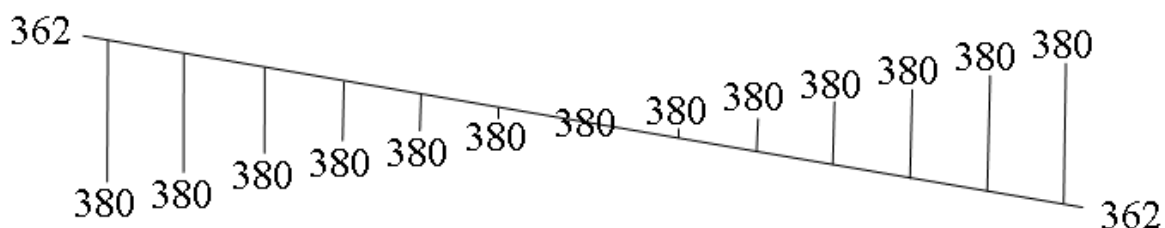


Abb.2.7: Schema der Pseudoratiobildung. Zwischen den 362 nm Werten wurde eine Gerade gebildet. Ein Pseudoratio wurde aus den 362 nm Werten auf der Geraden und den 380 nm Werten gebildet, die zu der Geraden extrapoliert wurden.

Anschließend wurde für den jeden 380 nm-Punkt ein Pseudoratio (380/362) berechnet. Auf diese Weise wurden Bleicheffekte, die bei 380 nm angeregten Aufnahmen auftreten, korrigiert (Neher und Augustine, 1992). Gleichzeitig wurde eine Frequenz der Messungen von 20 Hz erreicht.

Für die Messungen der Fluoreszenzintensität wurde in dieser Arbeit das TILL Photonics Imaging System, Software Version 4.0.1 (TILLvisION, Gräfelfing Deutschland) verwendet. Da der Framegrabber dieses Systems nur eine begrenzte Anzahl von Bildpunkten auslesen konnte und somit durchgehende Ca^{2+} -Messungen unmöglich machte, wurden die Messungen in Blöcken durchgeführt. Je nach Experiment wurden 15 oder 1 Puls Depolarisationen durchgeführt. Die schematische Darstellung in Abbildung 2.8 verdeutlicht den Verlauf der Ca^{2+} -Messungen parallel zu den elektrischen Stimulationen der Zellen.

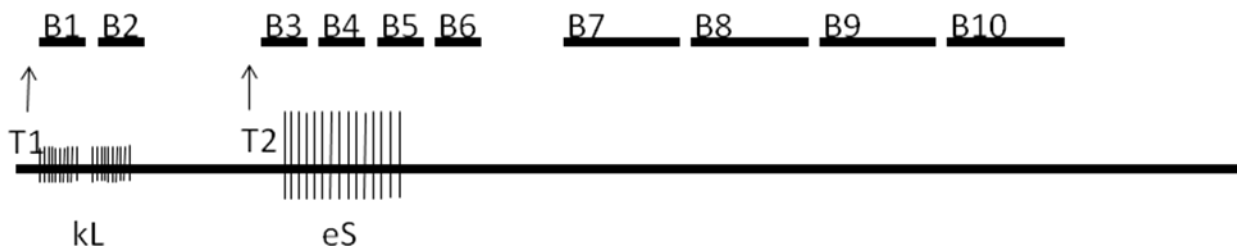


Abb.2.8.: Schema einer Ca^{2+} -Messung. **kL**: kapazitiven Ladeströme. Die hier applizierten Pulse, die aus einer Hyper- und einer Depolarisation um jeweils 10 mV bestanden, sollten der Isolation der Ca^{2+} -Ströme dienen. Die kapazitiven Ladeströme wurden entsprechend multipliziert und von den Ladeströmen, die bei den Depolarisationspulsen aufgenommen wurden, subtrahiert. Weiterhin sollte hiermit gezeigt werden, dass geringe Spannungsänderungen keine Auswirkung auf die Ca^{2+} -Anstiege in den Zellen haben. **eS**: elektrische Stimulationspulse. Ein einzelner Puls bestand aus einer 100 ms langen Hyperpolarisation auf -100 mV und einer 100 ms langen Depolarisation auf +20 mV. **T1** und **T2**: Trigger 1 und 2. Aus technischen Gründen war es nicht möglich, herkömmliche Ca^{2+} -Messungen durchzuführen. Aus diesem Grund wurden mehrere Teilmessungen nacheinander durchgeführt. Dabei wurden die Messsequenzen zweimal, jeweils mit einem Trigger, gestartet. Dies war wichtig, um eine exakte zeitliche Korrelation der beiden Messungen zu gewährleisten. **B1 – B6**: kurze Messblöcke. Die Blöcke B1 bis B6 bestanden jeweils aus 31 Einzelaufnahmen, wobei die erste und die letzte bei 362 nm und alle übrigen bei 380 nm für je 40 ms registriert wurden. Blöcke B1 und B2 wurden während der Aufnahmen der kapazitiven Ladeströme durchgeführt und dienten als Vorkontrolle für die Ca^{2+} -Messungen, die in B3 bis B6 durchgeführt wurden. Die Frequenz von B1 – B6 betrug 20 Hz. **B7 – B10**: lange Messblöcke. Die Blöcke B7 bis B10 bestanden ebenfalls aus jeweils 31 Einzelmessungen. Auch hier wurden die erste und die letzte bei 362 nm und alle übrigen bei 380 nm für je 40 ms registriert. Zwischen den Einzelaufnahmen erfolgte eine 250 ms lange Pause, um die Messdauer zu verlängern, ohne die Anzahl der Einzelaufnahmen zu erhöhen. Diese Blöcke dienten der Beobachtung des Abklingens der Ca^{2+} -Erhöhung und konnten deshalb eine niedrigere Aufnahme Frequenz haben (3,45 Hz).

Als Lichtquelle diente das Polychrome II von Till Photonics, das aus einer 75 Watt Xenonlampe besteht und mit Hilfe eines im ms-Bereich schaltenden Gitters monochromatisches Licht liefert. Die Messungen erfolgten mit einer CCD-Kamera (SensiCam, Till Photonics, Imaging Systems, Gräfelfing Deutschland) und wurden mit der TILL Photonics Imaging System Software, Version 4.0.1, ausgewertet.

Zunächst wurden die Zellen während einer kontinuierlichen Belichtungssequenz (380 nm Belichtungsdauer jeweils 40 ms) fokussiert. Es wurde eine *Area Of Interest* (AOI) als Messbereich gewählt, in dem sich sowohl die zu analysierende Zelle befand, als auch ein Bereich mit nichtfluoreszenten Strukturen zur Aufnahme der Hintergrundfluoreszenz. Nach der Messung

wurden zwei *Regions Of Interest* (ROIs) festgelegt. Ein ROI befand sich außerhalb der zu analysierenden Zellen und diente der Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz von dem ROI in dem sich die Zelle befand. Für das ROI, in dem sich die Zelle befand, wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität bei der Anregungswellenlänge 380 nm als Zahlenkolonne in einer Textdatei dargestellt und gespeichert. Diese Zahlenkolonne wurde zusammen mit den elektrophysiologischen Daten in das Programm Igor Pro 6.0.3 exportiert, dort zusammengefügt und zeitkorreliert dargestellt.

2.5.4 K_d Bestimmung von Fura-2 für die Kalibration von $[Ca^{2+}]$

K_d ist die Gleichgewichtskonstante der Bindung von Ca^{2+} an den Ca^{2+} -Indikator Fura-2. Da der Wert für K_d von Messparametern wie dem pH Wert und der Osmolarität abhängig ist, wurde er für die in dieser Arbeit verwendete Pipettenlösung 3 bestimmt und konnte nicht vom Hersteller übernommen werden (0,150 μ M).

Für die Kalibration der Ca^{2+} -Konzentration in den untersuchten Zellen wurde die in Kapitel 2.5.3 beschriebene Methode um ratiometrische Messungen (R1 – R6) erweitert. In Abbildung 2.9 ist die erweiterte Messmethode schematisch dargestellt.

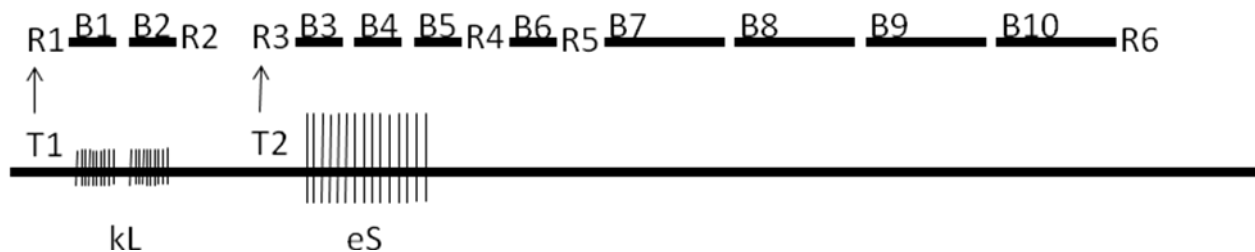


Abb.2.9.: Schema einer Ca^{2+} -Messung für die Ca^{2+} -Kalibration. Die Messung erfolgte wie in Abbildung 2.8 beschrieben. Die Blöcke B1 bis B10 bestanden jeweils aus 31 Einzelaufnahmen, wobei die erste und die letzte bei 362 nm und alle übrigen bei 340 nm bzw. 380 nm für je 40 ms registriert wurden. Für die Ca^{2+} -Kalibration wurden zusätzlich ratiometrische Messungen durchgeführt (R). **R1 – R6**: Ratio 1 bis 6. Ratio ist der Quotient aus der Intensität der Emission für die 340 nm und für 380 nm Wellenlänge.

Die Kalibration erfolgte nach Grynkiewicz et al. (1985).

Seien F_{340} bzw. F_{380} die gemessenen Intensitäten für die Wellenlängen 340 nm und 380 nm. c_f sei die Konzentration des freien und c_b die Konzentration des gebundenen Indikators. Dann gilt:

$$F_{340} = S_{f340}c_f + S_{b340}c_b$$

$$F_{380} = S_{f380}c_f + S_{b380}c_b$$

Die Koeffizienten S müssen bestimmt werden. c_f und c_b hängen wie folgt zusammen

$$c_b = \frac{c_f \times [Ca^{2+}]_i}{K_d}$$

Das Fura Ratio ist

$$R = \frac{F_{340}}{F_{380}} = \frac{S_{f340} + S_{b340} [Ca^{2+}]_i / K_d}{S_{f380} + S_{b380} [Ca^{2+}]_i / K_d}$$

Löst man nach $[Ca^{2+}]_i$ auf, so ergibt sich

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \frac{R - \frac{S_{f340}}{S_{f380}}}{\frac{S_{b340}}{S_{b380}} - R \frac{S_{f380}}{S_{b380}}}$$

Anschließend fasst man zur effektiven Dissoziationskonstanten (K_{eff}) zusammen

$$K_d \frac{S_{f380}}{S_{b380}} = K_{eff}$$

Für die Kalibration wurden feste Belichtungszeiten der Wellenlängen 340 nm und 380 nm gewählt, nämlich 40 ms.

Die Bestimmung des Ratio R_{min} für die minimale Ca^{2+} -Konzentration erfolgte unter Verwendung von Pipettenlösung 3, in die 10 mM BAPTA hinzugegeben wurde. Die hohe BAPTA-Konzentration pufferte das freie Ca^{2+} . Bei dem Ratio R_{max} sollte Fura-2 maximal mit Ca^{2+} gesättigt werden. Deshalb wurde für diese Messung Pipettenlösung 3 verwendet, in die 10 mM $CaCl_2$ hinzugegeben wurde. Um auch die effektive Fura Bindungskonstante K_{eff} zu bestimmen, wurde die Pipettenlösung 1, die 200 μ M Fura-2 beinhaltet, verwendet. Die freie Ca^{2+} -Konzentration in dieser Lösung beträgt 11,03 nM. Das Ratio dieser Lösung betrug $387,44 \pm 31,73$. Für R_{min} wurde der Wert $R_{min} = 366,2 \pm 26,5$ μ M, für $R_{max} = 945,32 \pm 35,48$ μ M und für K_{eff} 0,0139 μ M bestimmt. Hierbei wurde der Zusammenhang benutzt

$$[Ca^{2+}]_i = K_{eff} \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}$$

wobei

$$K_{eff} = K_d \frac{S_{f380}}{S_{b380}}$$

Als nächstes wurden aus der jeweils selben ROI, in der R_{min} und R_{max} bestimmt wurden, die Werte für 380 nm bestimmt.

$$\frac{F_{380}(\text{null Kalzium})}{F_{380}(\text{hohes Kalzium})} = \frac{S_{f380}}{S_{b380}} = \frac{215,77}{73,32} = 2,9$$

So erhielt man für $K_d = 0,048 \mu\text{M}$.

2.6 Antikörperfärbungen

In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen an Gewebe von Pilocarpinmäusen, den dazugehörigen Kontrollmäusen und an Gewebe von AHS- und Läsionspatienten durchgeführt. Für immunhistochemische Analysen von Mäusen wurde das Gewebe wie folgt vorbereitet. Die Mäuse wurden mit einer Lösung betäubt, die sich aus 0,05 ml Rompun® (Xylazin 20 mg / ml), 0,15 ml Ketavet® (Ketamin 100 mg / ml) und 0,3 ml NaCl-Lösung (0,9%) zusammensetzte. Diese Lösung (0,1 ml / 30 g KG) wurde den Tieren intramuskulär injiziert. Es folgte eine transkardiale Perfusion der Tiere mit PBS und PBS mit 4 % PFA. Nach der Freilegung der Gehirne wurden diese zum Nachfixieren für 3 h in PBS mit 4 % PFA gegeben. Anschließend wurde das Gewebe für etwa 48 h in PBS mit 30 % Sucrose gelagert, um das Gewebe vor Beschädigungen bei der Herstellung von Kryoschnitten zu schützen.

Mit Hilfe des Kryostaten (HM 560; Microm, Walldorf, Deutschland) wurden 50 μm dicke Gehirnschnitte senkrecht zur hippocampalen Hauptachse angefertigt. Hierfür wurden die Gehirne mit dem Einbettmedium (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Zoeterwonde, Niederlande) eingebettet und unter Nutzung der Schnellfrierfunktion des Gerätes bei $-22 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Die 50 μm Schnitte wurden in mit PBS gefüllte 24-Well-Platten (Labomedic, Bonn, Deutschland) überführt und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Im Gewebe der Pilocarpin- und Kontrollmäuse wurde eine Zellkernfärbung mit Hoechst 33324 (blau) von Invitrogen nach folgendem Protokoll angefertigt. Zunächst wurden die Hirnschnitte dreimal für je 10 min bei RT in PBS gewaschen. Es folgte eine 10 min lange, lichtgeschützte Reaktion mit einer 1 %-igen Hoechst 33324 Lösung in PBS bei RT. Anschließend wurden die Hirnschnitte dreimal für je 10 min bei RT in PBS gewaschen.

200 μm dicke Hirnschnitte von AHS- und Läsionspatienten wurden wie oben beschrieben für die Anfertigung von 50 μm Kryoschnitten vorbereitet. Es wurden Antikörperfärbungen gegen das endogene GFAP (Antikörper: Kaninchen anti human GFAP monoklonal, Chemicon, International, Inc., Deutschland) nach folgendem Protokoll durchgeführt. Die Schnitte wurden dreimal für je 10 min bei RT in PBS gewaschen. Die unspezifischen Antigen-Bindungsstellen wurden 1 h bei RT blockiert. Die Blockierungslösung enthielt 10 % NGS und 2 % Triton X-100

in PBS. Es folgte die erste Antikörperreaktion bei 4 °C über Nacht. Die erste Antikörperlösung setzte sich aus 2 % NGS, 0,5 % X-100 Triton und dem Kaninchen anti human GFAP Antikörper in PBS zusammen. Die Verdünnung des ersten Antikörpers in der Lösung betrug 1:400. Danach wurden die Schnitte dreimal für je 10 min bei RT in PBS gewaschen. Die zweite Antikörperreaktion, zur Visualisierung des ersten Antikörpers, dauerte 1 h und wurde bei RT durchgeführt. Die zweite Antikörperlösung setzte sich aus 2 % NGS und Ziege anti Kaninchen FITC Antikörper (DAKO, Dänemark) in PBS zusammen. Die Verdünnung des zweiten Antikörpers in der Lösung betrug 1:500. Schließlich folgten drei Waschschrte je 10 min lang in PBS und bei RT.

Alle Schnitte wurden nach erfolgter Antikörperfärbung auf Objektträger aufgebracht und mit Eindeckmedium (Vectashield®) konserviert. Den FITC- und Hoechst- Fluoreszenzsignalen wurden die Falschfarben grün (für FITC) und blau (für Hoechst) zugeordnet. Aufnahmen vom *Stratum radiatum* der CA1-Region wurden mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop (TCS NT) erstellt (Objektiv: PLAN Aplanachromat, 40x/0.75, Leica Lasertechnik) bzw. Axiophot (Zeiss, Jena, Deutschland mit dem Objektiv: Zeiss, PLAN Neofluor, 10x/0.30). Die Quantifizierung der antikörpermarkierten Zellen erfolgte mit der Metaview 4.5r5 Software.

2.7 Molekularbiologische Analyse

Die Untersuchung der Genexpression einzelner Zellen auf Transkriptionsebene erfolgte mit Hilfe der reversen Transkription mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* PCR) optimiert für die Analyse von Einzelzellen (Lambolez et al., 1992, W. Walz, 2007). Die Transkripanalyse wurde gemeinsam mit PD Dr. Gerald Seifert durchgeführt. Es wurde ein Nachweis von mRNA (*messenger ribonucleic acid*), die für Cav1.2, Cav1.3, Cav1.4, Cav2.1, Cav2.2, Cav2.3, Cav3.1, Cav3.2 und Cav3.3 Typen von Ca_v-Kanälen kodiert, durchgeführt. Als Kontrollzellen bei diesem Experiment dienten GluT Zellen aus Tg hGFAP-EGFP Mäusen (p 7 – p 15).

Für die Analyse wurde jeweils die gesamte Zelle nach der elektrophysiologischen Messung in der *whole cell* Konfiguration über den Schnitt gehoben, unter mikroskopischer Kontrolle in die Pipette (mit Pipettenlösung 1 gefüllt) eingesaugt und in ein Eppendorf-Gefäß mit 3 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Für die Reaktion der reversen Transkription wurden jeweils 5,5 µl eines Reaktionsgemisches zugegeben, das sich aus 2 µl reverse Transkriptase-Puffer (50 mM Tris-Cl; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂), 1 µl Dithiothreitol (DTT, 10 mM), 1 µl Deoxynukleotide (dNTPs, 4 x 250 µM), 0,5 µl Hexamer-*primer* zufälliger Sequenz (50 µM), 0,5 µl Ribonuklease (RNase)-Inhibitor (20 Einheiten), 0,5 µl SuperscriptIII-Reverse Transkriptase (100 Einheiten) zusammensetzte. Die Endkonzentrationen sind für ein Volumen von 10 µl angegeben.

Als Positivkontrolle wurden 2 ng der Gesamt-RNA, isoliert aus Mäusegehirn, in 5 µl DEPC-behandeltem Wasser verwendet. Reaktionsgemische, die als Negativkontrolle dienten, enthielten Badlösung statt der reversen Transkriptase. Die Inkubation bei 37°C für eine Stunde führte zur Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäuren (*complementary deoxyribonucleic acid* cDNA).

Anschließend wurden zwei aufeinanderfolgende PCR-Schritte durchgeführt, wobei das Produkt der ersten Reaktion als *template* für die zweite Reaktion diente. Bei der ersten PCR wurden größere cDNA-Abschnitte amplifiziert, während die *primer* der anschließenden PCR die Synthese kleinerer Fragmente ermöglichten (*nested* PCR). Dies führte zu einer Erhöhung der Spezifität und Sensitivität der Gesamtreaktion.

In der ersten PCR wurden in jeweils einem Reaktionsgefäß die cDNAs aller Gene amplifiziert. Hierfür wurden zu den reverse Transkription-Produkten jeweils 38 µl eines Reaktionsgemisches gegeben, sodass ein Endvolumen von ca. 50 µl erreicht wurde. Das Reaktionsgemisch setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen (Endkonzentration für ein Volumen von 10 µl in Klammern angegeben): 20,5 µl H₂O, 5 µl PCR-Puffer (20 mM Tris-Cl; 50 mM KCl), 2,5 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) (5%), 2,5 µl MgCl₂ (2,5 mM), jeweils 1 µl *sense* (se)- und *antisense* (as)-*primer* (200 nM) für die Gene der jeweiligen Ca_v Typen (Tabelle 2.1), jeweils 0,5 µl se- und as-*primer* (100 nM) für das Gen S100β (Tab. 2.1), 0,5 µl Betain (1 mM).

Im Anschluss an den Denaturierungsschritt bei 95°C für 3 min wurde jeweils 1 µl Taq-Polymerase bei einer Temperatur von 85°C zugegeben. In einem PCR-Cycler (PTC-200; Biozym, Oldendorf, Deutschland) wurden 45 Zyklen durchlaufen. Die Denaturierung erfolgte bei 94°C für 25 s. Die *primer*-Bindung erfolgte in den ersten fünf Zyklen bei 51°C für 2 min. Bei den übrigen Zyklen verkürzte sich die Zeit der *primer*-Bindung auf 45 s. Die *primer*-Verlängerung wurde bei 72°C für 25 s durchgeführt.

Anschließend wurde mit jeweils 3 µl Produkt der ersten PCR eine *nested* PCR durchgeführt, bei der jeweils nur das Produkt eines Gens pro Reaktionsgefäß amplifiziert wurde. Hierfür wurden

jeweils 47 μ l eines Reaktionsgemisches der folgenden Zusammensetzung zu den Produkten gegeben (Endkonzentration für ein Volumen von 10 μ l in Klammern angegeben): 23 μ l H₂O, 5 μ l Puffer (20 mM Tris-Cl; 50 mM KCl), 2,5 μ l DMSO (5%), 2,5 μ l MgCl₂ (2,5 mM), 1 μ l dNTPs (4 x 50 μ M), jeweils 1 μ l *se-* und *as-primer* (200 nM) für jeweils ein Gen (Tabelle 2.1), 0,5 μ l Platinum® Taq-Polymerase, 0,5 μ l Betain (1 mM).

Es wurden 35 Zyklen durchlaufen. Die Primerbindung erfolgte bei 54°C. Die übrigen Bedingungen entsprachen denen der ersten PCR.

Jeweils 10 μ l der entstandenen PCR-Produkte wurden, mit 2 μ l Ladepuffer versetzt, auf ein Ethidiumbromid (0,013%) haltiges Agarosegel (1,5%) aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen, bei der die Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt wurden. Als Längenstandard wurde zusätzlich der Marker Φ X-174/Hinc II digest (Eurogentec GmbH, Köln, Deutschland) auf das Gel aufgetragen.

Tab.2.1: Oligonukleotid-*primer* für die reverse Transkription-PCR von Einzelzellen. Das erste Nukleotid des Transkriptionsstartcodons jedes Gens wurde als Position 1 festgelegt. Die Länge der amplifizierten PCR-Produkte, unter Einsatz der *primer*, wurden als Basenpaare (bp) angegeben. 'se' und 'as' bezeichnen jeweils die *sense-* und *antisense-primer*. Die *primer*-Paare für Cav1, Cav2 und Cav3 amplifizieren jeweils alle Cav-Untereinheiten der jeweiligen Genfamilie.

Gen	<i>primer</i> -Sequenz	Position	Produktlänge	Genbank - Nummer
S100 β	se 5'-AGGCCATGGTTGCCCTCATTGAT as 5'-ACTCATGGCAGGCCGTGGTCA	17 242	246 bp	
S100 β (nested)	se 5'-TACTCCGGGCGAGAGGGTGACAA as 5'-GGCGACGAAGGCCATGAACTCC	52 216	186 bp	NM_009 115
Cav1	se 5'-GCATTGGGGTCCAGCTBTTCAA as 5'- AAGAAGGCAATGATGATGATR TAGA	3224,3158, 3056 3533,3467, 3365	334 bp	
Cav1.2 (nested)	se 5'-.ATACCTGTTCGGATAGTTCT as 5'- GATGGGGCCCTTGTCCT	3257 3479	239 bp	NM_009 781
Cav1.3 (nested)	se 5'-TGCAGGGGGCTTTTCATTCTTTAT as 5'- CACGGTAGTTGTAGACAGGACCAA	3229 3419	214 bp	NM_028 981
Cav1.4 (nested)	se 5'-.AGGGCTCCTTCCTCATCTACCC as 5'- GATAGGGCCCTCATCTTCTGC	3131 3307	197 bp	NM_019 582

Cav2	se 5'-CCTGGCCACCATCATTGCYAACTG as 5'- GAGGGGGATGAAGTACARCCAGTT	318,303, 288 1012,994, 982	718 bp, 715 bp (Cav2.2)	
Cav2.1 (nested)	se 5'-.AGCGGCTGGATGACACGGAACC as 5'- AGCTGGCGACTCACCCCTGGATGT	398 794	419 bp	NM_007 578
Cav2.2 (nested)	se 5'-.CGGGGATTCTCGCCACAGC as 5'- TTGCCACAGGGAAAGTCACC	527 790	283 bp	NM_001 042528
Cav2.3 (nested)	se 5'-.CCGTAATGGCTGGAATGTCA as 5'- GATCAAACCCCTCTAGAATACCTG	471 770	323 bp	NM_009 782
Cav3	se 5'-.CTTCGTCTTCTTCATCTTYGGCAT as 5'- ATGAAGTAGATGAAGTTGTAGAA	657,714, 645 1105,1177, 1108	471 bp (Cav3.1) 486 bp	
Cav3.1 (nested)	se 5'-.CTGCAGGAGCGTGCCACAC as 5'- ATGATGTCGACCCAGCCCTCCAG	843 1057	237 bp	NM_001 112813
Cav3.2 (nested)	se 5'-.CCCCAGCCGCCGTGAGCTT as 5'- CACCCAGCCCTCCAGTGTGATGA	915 1121	229 bp	NM_021 415
Cav3.3 (nested)	se 5'-.AGGGCCGAGAGTGCTGCCTGT as 5'- TCTCCACCCAGCCTTCCAGAGTGA	860 1055	219 bp	NM_001 044308

2.8 Statistische Datenanalyse

Um die gewonnenen Daten zusammenzufassen und zu analysieren, wurden statistische Verfahren angewendet. Es wurden Mittelwerte (\bar{x}) verschiedener Größen mit Hilfe der Anzahl der Stichprobenelemente (n) und den Einzelwerten x_i (Index $i = 1$ bis n) nach folgender Gleichung

$$\text{berechnet: } \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Weiterhin wurde zur Quantifizierung der Variabilität die Standardabweichung (s_{abw}) wie folgt

$$\text{bestimmt: } s_{abw} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Die Ergebnisse wurden jeweils in der Form $\bar{x} \pm s_{abw}$ angegeben.

Zur Feststellung von signifikanten Unterschieden wurde der Student-Test (T-Test) angewendet. Als Nullhypothese wurde die Zufälligkeit vorhandener Unterschiede angenommen. Die Alternativhypothese ging von einem signifikanten Unterschied aus. Welche der beiden Hypothesen anzunehmen war, wurde durch Ermittlung der Prüfgröße (t) wie folgt bestimmt:

$$t = \sqrt{n} * \frac{\bar{x}}{S_{abw}}$$

Die Nullhypothese wurde abgelehnt, wenn t bei einer gegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit (α) und den ermittelten Freiheitsgraden (FG) einen kritischen Wert $t_{FG / \alpha}$ erreichte oder überschritt. Für α wurde 5 % festgelegt. Die kritischen Werte wurden Tabellen über die Signifikanzschranken der Student-Verteilung (Lozán & Kausch, 2004) entnommen.

$$FG = n_1 + n_2 - 2$$

Wurde die Nullhypothese abgelehnt, konnte daraus abgeleitet werden, dass die Alternativhypothese anzunehmen war.

3. Ergebnisse

3.1 Synaptische Innervation und Ca^{2+} -Messungen in NG2 Zellen

3.1.1 NG2 Zellen sind synaptisch innerviert

Für Astrozyten ist inzwischen beschrieben, dass sie ein aktiver Partner bei der synaptischen Kommunikation zwischen den Neuronen sind. Die Fortsätze der Astrozyten umhüllen die Synapse und nehmen die ausgeschütteten Neurotransmitter auf. In Verbindung mit dieser Aufnahme der Neurotransmitter wurden Erhöhungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Astrozyten beobachtet (Übersicht: Araque 2009).

Die Funktion der Gliazellen mit einem komplexen Strommuster, die das NG2 Protein exprimieren, ist noch weitgehend unklar. Es ist bekannt, dass diese Gliazellen synaptisch innerviert sind (Bergles et al., 2000; Lin et al., 2002; Lin et al., 2005; Jabs et al., 2005; Ge et al., 2006; Hamilton et al., 2009). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Biozitin-gefüllten Gliazellen mit einem komplexen Strommuster (GluR Zellen aus der Tg hGFAP-EGFP Maus), die in Zusammenarbeit mit P.D. Dr. Amin Derouiche durchgeführt wurden, zeigen deutlich synaptische Kontakte zwischen den Gliazellen und den, mit Vesikeln gefüllten Nervenendigungen (Abb. 3.1).

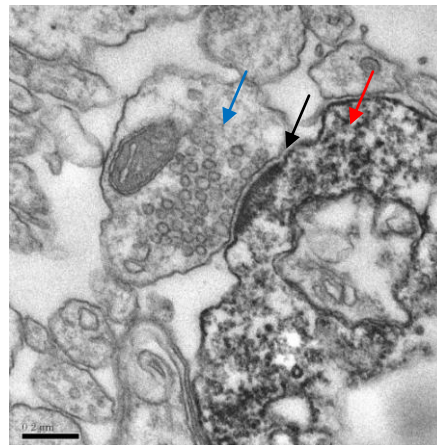


Abb.3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer „Neuron Glia Synapse“. Die Gliazelle wurde mit Biozitin gefüllt und anschließend mit Peroxidase und Diaminobenzidin visualisiert (roter Pfeil). Die präsynaptische Endigung ist mit Vesikeln gefüllt (blauer Pfeil). Zu sehen ist ebenfalls der synaptische Spalt und die, für eine Synapse typische Verdickung der postsynaptischen Membran der Gliazelle (schwarzer Pfeil). Diese Aufnahme wurde in Zusammenarbeit mit P.D. Dr. Amin Derouiche durchgeführt. Skalierungsbalken: 0,2 µm.

In drei analysierten Zellen wurden insgesamt 17 Synapsen identifiziert, wobei sieben davon als unsymmetrische und eine als symmetrische Synapsen klassifiziert werden konnten. Die gefundenen Synapsen weisen typische, von Neuron-Neuron Synapsen bekannte Eigenschaften, wie den synaptischen Spalt, die mit Vesikeln gefüllte Präsynapse und die verdickte postsynaptische Membran auf.

In dieser Arbeit wurde die Signalverarbeitung in den NG2 exprimierenden Zellen analysiert. Die NG2 Zellen wurden auf synaptische Innervation und deren Auswirkung auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration untersucht. Für eine eindeutige Identifizierung der Zellen wurde die von Karram et al., (2008) generierte NG2-EYFP knockin Maus verwendet, bei der auf einem Allel das gelbfluoreszierende EYFP Protein unter der Kontrolle des NG2 Promotors exprimiert wird. Die Verwendung dieser Mauslinie ermöglichte außerdem Untersuchungen sowohl an heterozygoten NG2 +/-, als auch an homozygoten NG2 -/- Mäusen. Karram et al. (2005) vermuten, dass das PDZ-Bindungsmotiv mit den Globulin Domänen am C-Terminus (PSD-95/DiscsLarge/Zona Occludens-1) in der NG2 Proteinstruktur eine Rolle bei der Adhäsion des Proteins spielt. Das NG2 assoziiert mit verschiedenen Proteinen der PDZ Bindungsdomäne, einschließlich dem Glutamat Rezeptor Interaktions Proteins (GRIP). NG2 könnte so an der Positionierung von glialen AMPA Rezeptoren beteiligt sein, die in Richtung der neuronalen Glutamat-Ausschüttung ausgerichtet werden. Analysen an homozygoten NG2 -/- Mäusen machten die Klärung der Frage möglich, ob das Fehlen des NG2 Proteins eine Auswirkung auf physiologische Prozesse der Zellen hat.

Es wurden 12 heterozygote NG2-EYFP +/- Tiere und drei homozygote NG2-EYFP -/- Tiere auf synaptische Innervation der NG2 Zellen untersucht. Zunächst wurden die Membraneigenschaften der Zellen aus hetero- und homozygoten Tieren verglichen. Diese Vergleiche sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tab.3.1: Membraneigenschaften von NG2 Zellen in NG2-EYFP +/- und -/- Tieren

Genotyp	n	R_M (M Ω)	C_M (pF)	U_R (mV)
NG2-EYFP +/-	12	$381,4 \pm 492,5$	$23,1 \pm 8,3$	$-73,3 \pm 4,2$
NG2-EYFP -/-	3	$439,1 \pm 283,3$	$13,9 \pm 7,9$	-72 ± 2
<i>t</i>		$P = 0,851$	$P = 0,104$	$P = 0,606$

Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen gefunden.

Eine hohe K^+ -Konzentration im Extrazellulärraum steigert die neuronale Aktivität und beeinflusst somit auch die synaptische Innervation der Gliazellen. Aus diesem Grund wurde die synaptische Innervation sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von 10 mM KCl in der Badlösung analysiert. Hierfür wurde Pipettenlösung 2 verwendet.

In Abbildung 3.2 sind Messungen in Ab- und Anwesenheit von 10 mM KCl dargestellt. Zu sehen ist die erhöhte Frequenz der spontanen postsynaptischen Ströme (*spontaneous postsynaptic currents* sPSCs) in Anwesenheit von 10 mM KCl.

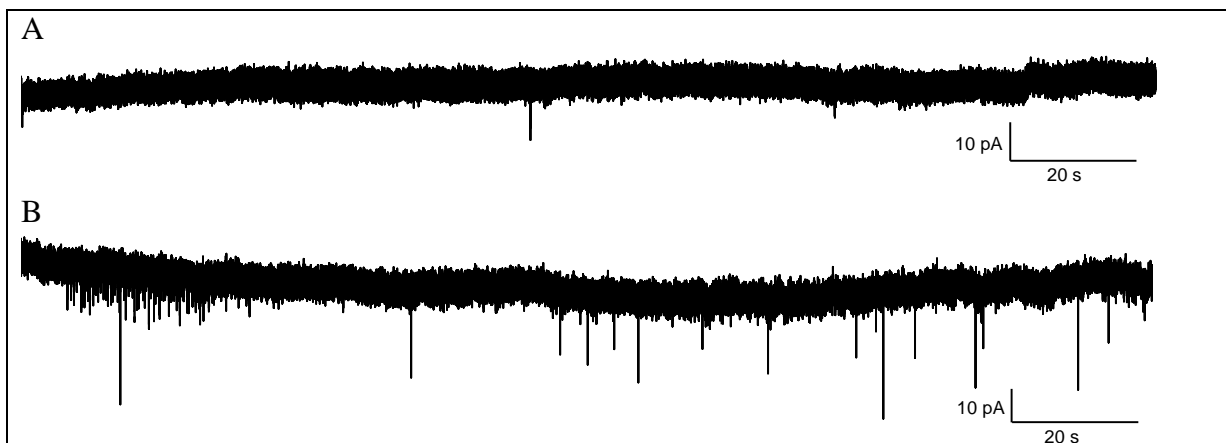


Abb.3.2: Messung der synaptischen Innervation in NG2 +/- Zellen. **A:** Messung der Spontanaktivität in Abwesenheit und **B:** in Anwesenheit von 10 mM KCl in der Badlösung.

Bei der Analyse der sPSCs stellte sich heraus, dass es zwei Typen von sPSCs gab. Sie unterschieden sich in den Zeitkonstanten des exponentiellen Abfalls (*tau*) der sPSCs. Im Folgenden werden die sPSCs mit einem niedrigen *tau* als schnelle sPSCs und die mit einem hohen *tau* als langsame sPSCs bezeichnet. Die Nomenklatur wurde der Arbeit von Jabs et al. (2005) entnommen. Dort wurden sPSCs mit einem *tau* bis 6 ms als schnell und ab 6 ms als langsame sPSCs bezeichnet. Beispiele für ein schnelles und langsames sPSC sind in der Abbildung 3.3 dargestellt.

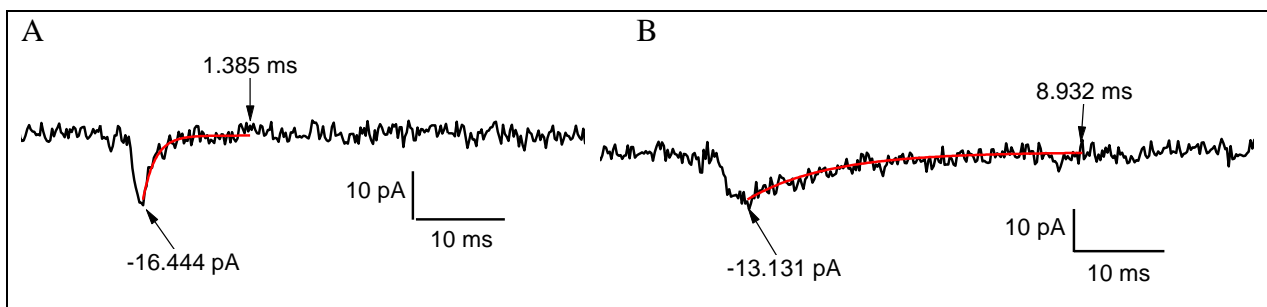


Abb.3.3: Beispiel sPSCs im Gewebe von NG2 +/- Mäusen. **A:** schnelles sPSC, **B:** langsames sPSC. Schwarz ist die Originalaufzeichnung, rot ist die monoexponentielle Fitkurve. Angegeben sind Strom bei Maximum und *tau*-Wert.

In den folgenden zwei Tabellen (Tab. 3.2 und Tab.3.3) sind die Parameter der aufgezeichneten sPSCs nach Genotyp und der verwendeten Badlösung aufgelistet.

Tab. 3.2: Parameter der im entsprechenden Genotyp aufgezeichneten schnellen sPSCs

Genotyp	NG2-EYFP +/-		NG2-EYFP -/-	
	ACSF	ACSF+10mM KCl	ACSF	ACSF+10mM KCl
Zellzahl	12	6	3	2
Zeitkonstante (<i>tau</i>)	2,2 ± 1,0 ms*	2,7 ± 1,1 ms	3,7 ± 1,9 ms*	2,9 ± 0,8 ms
Strom (I)	13,2 ± 7,5 pA	12,3 ± 9,6 pA	6,8 ± 2,2 pA	6,7 ± 0,8 pA
Frequenz (F)	0,03 ± 0,02 Hz	0,1 ± 0,2 Hz	0,12 ± 0,08 Hz	0,09 ± 0,09 Hz
Anzahl der sPSCs	115	218	86	42

Tab. 3.3: Parameter der im entsprechenden Genotyp aufgezeichneten langsamen sPSCs

Genotyp	NG2-EYFP +/-		NG2-EYFP -/-	
	ACSF	ACSF+10mM KCl	ACSF	ACSF+10mM KCl
Zellzahl	n = 9	n = 5	n = 3	n = 2
Zeitkonstante (<i>tau</i>)	15,8 ± 11,3 ms	23,9 ± 17,1 ms	11,9 ± 6,7 ms	11,3 ± 4,9 ms
Strom (I)	15,2 ± 11,9 pA	8,5 ± 3 pA	6,5 ± 1,1 pA	6,8 ± 2,1 pA
Frequenz (F)	0,01 ± 0,005 Hz**	0,09 ± 0,1 Hz**	0,06 ± 0,02 Hz	0,06 ± 0,03 Hz
Anzahl der sPSCs	25	131	47	27

Signifikante Unterschiede wurden bei den *tau* Werten der schnellen sPSCs zwischen den Genotypen festgestellt (**P* = 0,028). Die Frequenzen zwischen den langsamen sPSCs in Ab- und Anwesenheit von 10 mM KCl im Gewebe von heterozygoten Tieren unterschieden sich ebenfalls signifikant (***P* = 0,049).

Die folgenden Ca²⁺-Messungen wurden in heterogenen NG2 +/- Zellen durchgeführt.

3.1.2 Messungen der Ca²⁺-Erhöhung in hippokampalen NG2 Zellen

3.1.2.1 Der experimentelle isosbestische Punkt für Fura-2 nahe bei theoretischem Wert

Die Bestimmung des isosbestischen Punktes, also der Anregungswellenlänge, bei der es keine Änderung der Fluoreszenzintensität nach Änderung der Ca²⁺-Konzentration gibt, war für alle weiteren Experimente notwendig. Hierfür wurden nacheinander Messungen bei folgenden Anregungswellenlängen durchgeführt: 350, 355, 360 – 370 nm, wobei die Zellen gleichzeitig depolarisiert wurden (genaue Durchführung siehe Abschnitt 2.5.2). In Abbildung 3.4 sind die Ergebnisse dargestellt.

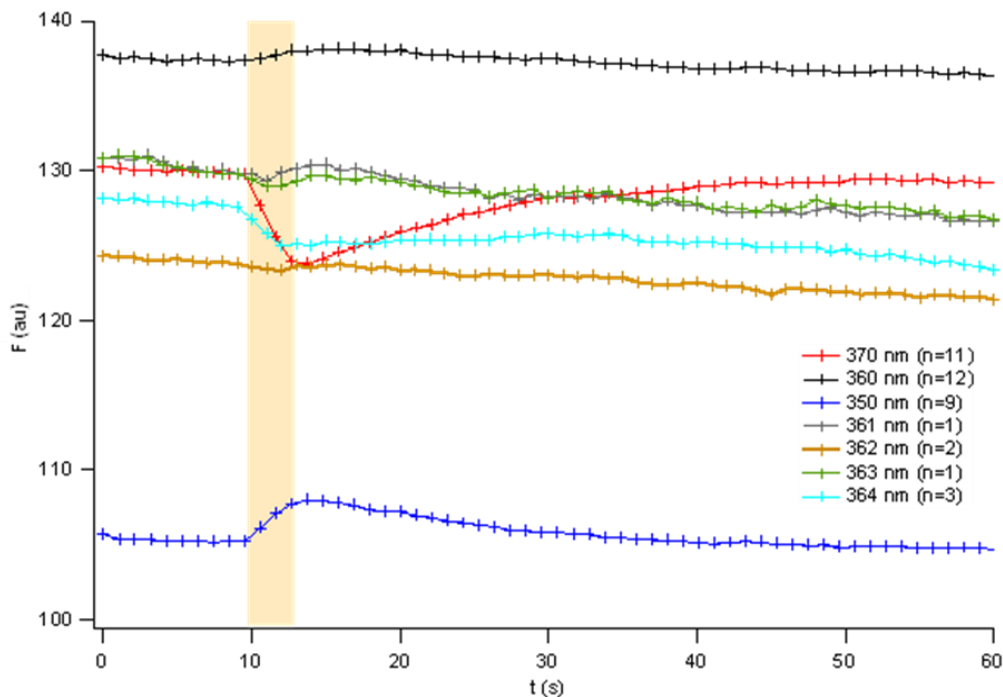


Abb.3.4: Bestimmung des isosbestischen Punktes von Fura-2. Gemittelte Aufnahmen von Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Anregungswellenlängen nach Depolarisation (gelb unterlegt). Die Depolarisation setzte sich aus 15 Pulsen von -80 auf +20 mV für je 100 ms pro Puls zusammen. Jedem Depolarisationspuls ging ein Hyperpolarisationspuls von -80 auf -110 mV für je 100 ms pro Puls voraus.

Der ermittelte isosbestische Punkt für Fura-2 Pentapotassium lag bei 362 nm und war dem isosbestischen Punkt, der vom Hersteller angegeben wird (360 nm) nahe.

3.1.2.2 Schnellere Messfrequenz nach Pseudoratiobildung

Die in Abschnitt 2.5.3 beschriebene Methode erhöhte die zeitliche Auflösung der Messungen von Ca^{2+} -Erhöhungen in NG2 Zellen nach Aktivierung von Ca_V -Kanälen. In Abbildung 3.5 ist die Bildung der Pseudoratiokurve aus den Emissionen bei den Anregungswellenlängen 380 nm und 362 nm dargestellt. Die Emission bei der Anregungswellenlänge von 380 nm wird mit steigender Ca^{2+} -Konzentration kleiner, weil der Anteil der ungebundenen Fura-2 Moleküle abnimmt.

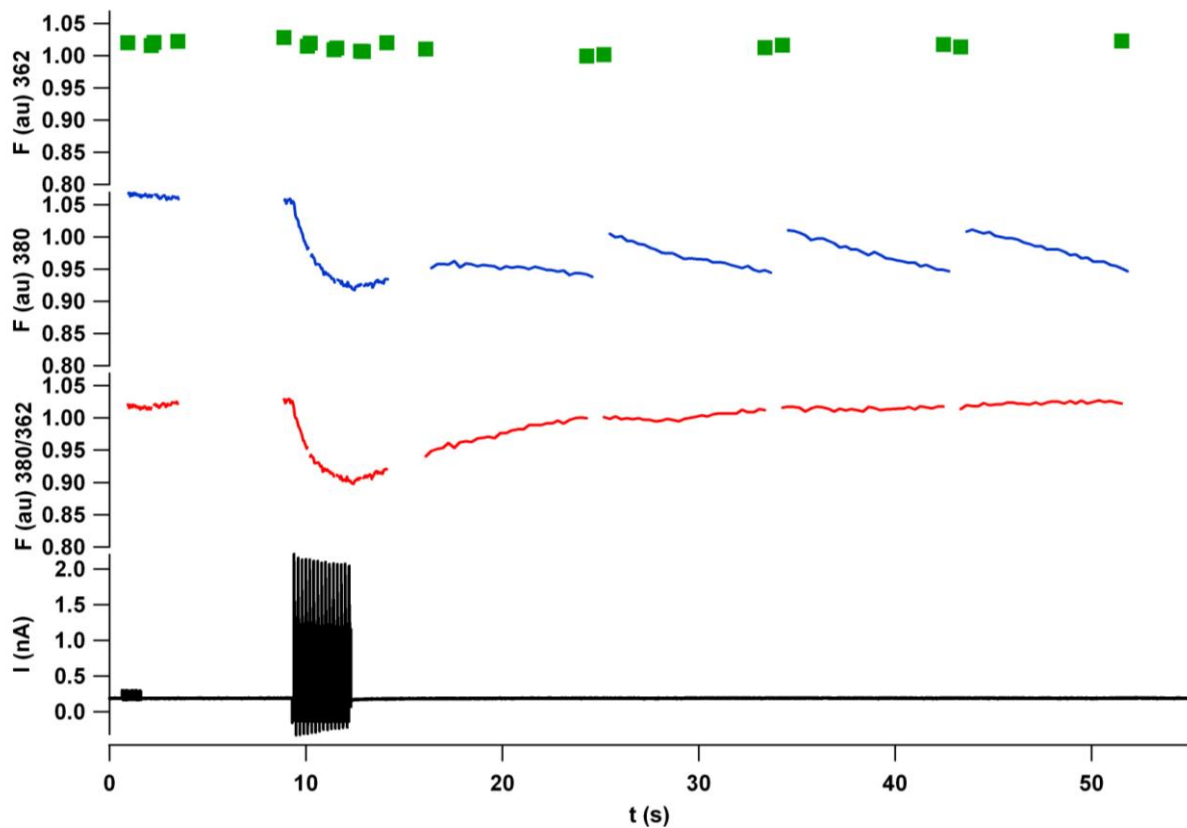


Abb.3.5: Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mittels Pseudoratiobildung. Die Depolarisation (schwarz) ist zeitkorreliert dargestellt mit den Emissionen, die bei 362 nm (grün) und bei 380 nm (blau) angeregt wurden und dem daraus gebildeten Pseudoratio (rot).

3.1.2.3 Reversibilität der Ca^{2+} -Erhöhungen durch Spannungsänderungen

Die Ca^{2+} -Erhöhung in der Zelle nach einer Depolarisation auf +20 mV ist der erste Hinweis dafür, dass Ca_v -Kanäle an der Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beteiligt sind. In Abbildung 3.6 ist zu sehen, dass die Ca^{2+} -Erhöhung exakt nach Beginn der Depolarisation beginnt (grüner Balken).

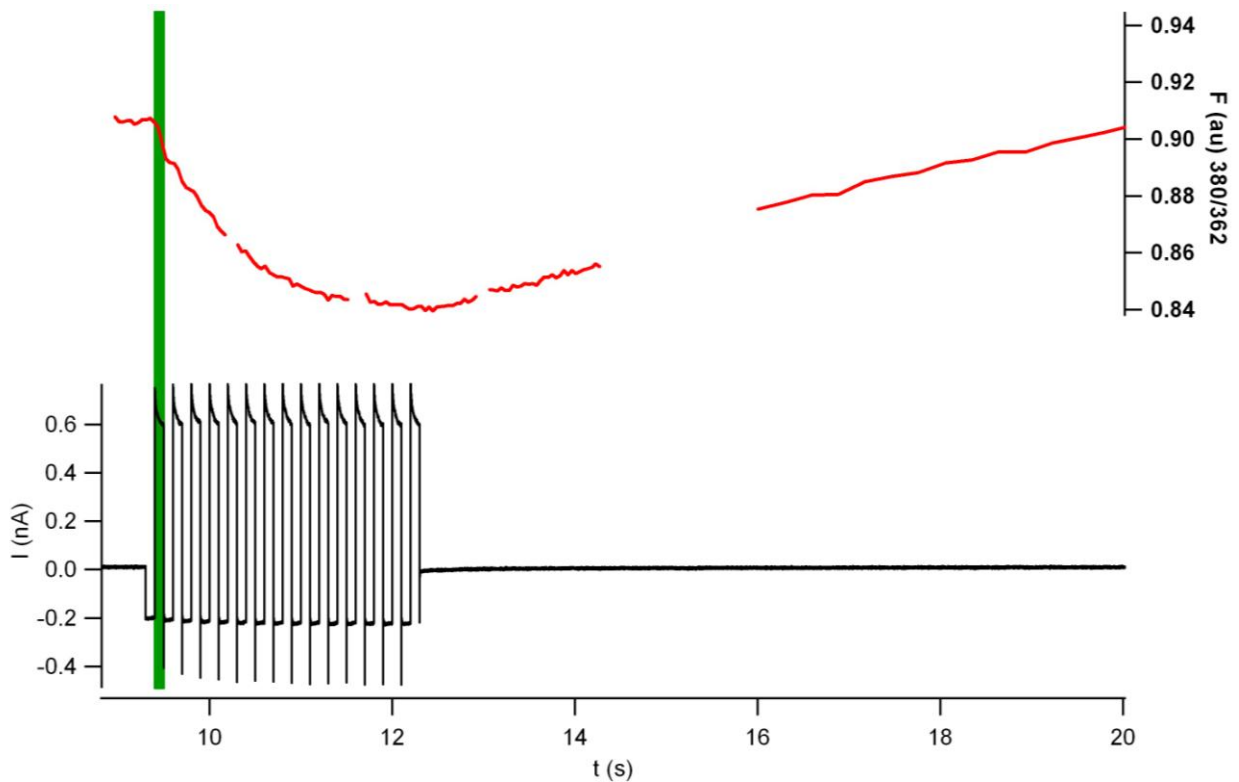


Abb.3.6: Ca^{2+} -Erhöhung nach Depolarisation. Die Ca^{2+} -Erhöhung (rot) ist zeitkorreliert mit der Depolarisation der Zelle (schwarz) dargestellt. Der Beginn der Depolarisation ist mit einem grünen Balken markiert.

Die Kombination von *Calcium Imaging* mit hoher Zeitauflösung und elektrischer Depolarisation ergab eine gute Reversibilität der Ca^{2+} -Erhöhungen. In Abbildung 3.7 sind drei Beispielszellen für die mehrfache Auslösbarkeit der Ca^{2+} -Erhöhungen in NG2 Zellen dargestellt. In den folgenden Kapiteln werden Experimente beschrieben, die auf Grund dieser Reversibilität erst möglich wurden. In den insgesamt 40 NG2 Zellen aus 22 NG2-EYFP +/- Tieren konnten über den Zeitraum von 31 ± 19 min Ca^{2+} -Erhöhungen nach Depolarisation (15 Pulse) ausgelöst werden. Die relativen Änderungen des Fluoreszenzratios betragen zu Beginn der Messungen $\Delta = 0,12 \pm 0,02$. Nach einem Zeitraum von 10 min konnten relative Änderungen des Fluoreszenzratios von $\Delta = 0,07 \pm 0,04$ und nach 20 min von $\Delta = 0,02 \pm 0,01$ gemessen werden. Auf Grund der begrenzten Speicherkapazität des verwendeten TILL Photonics Programmes, mit dem alle Ca^{2+} -Messungen durchgeführt wurden, mussten Pausen zwischen die Messblöcke programmiert werden, die während der Depolarisationen und nach den Depolarisationen durchgeführt wurden.

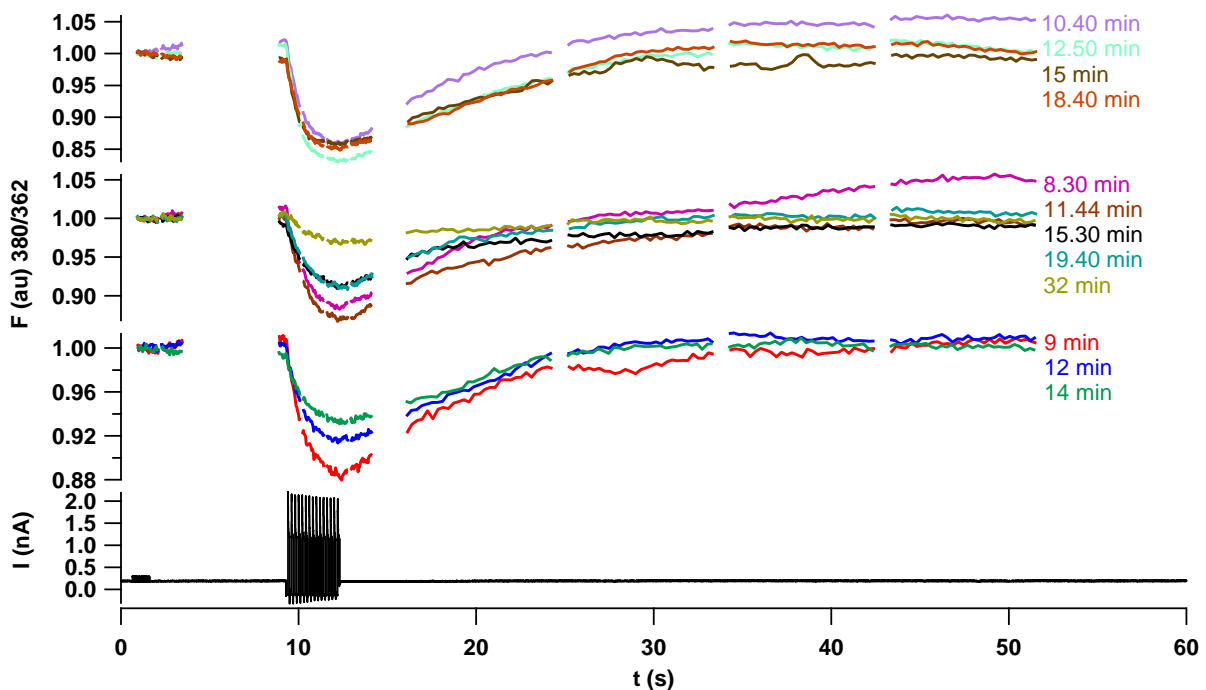


Abb.3.7: Reversibilität der Ca^{2+} -Erhöhungen in NG2 Zellen. Rechts ist angegeben, zu welchem Zeitpunkt nach Erreichen der *whole cell* Konfiguration die Ca^{2+} -Messung durchgeführt wurde (3 Zellen).

3.1.2.4 Ni^{2+} blockiert die Ca^{2+} -Erhöhungen

Ni^{2+} ist ein zweiwertiges Metall, das in höheren Konzentrationen unspezifisch alle Ca_V -Kanäle blockiert (Übersicht: Lacinová, 2005). Ein weiteres Indiz dafür, dass die Ca^{2+} -Erhöhungen durch die Aktivierung von Ca_V -Kanälen in NG2 Zellen vermittelt wurden, ist die vollständige Blockade der Ca^{2+} -Erhöhung in Anwesenheit von $200 \mu\text{M Ni}^{2+}$ in der Badlösung. Die in Abbildung 3.8 dargestellte irreversible Blockade der Ca^{2+} -Erhöhung (rot) wurde in fünf NG2 Zellen gemessen. In den Vorkontrollen (grün) betrug die relative Änderung des Fluoreszenzratios $\Delta = 0,11 \pm 0,03$.

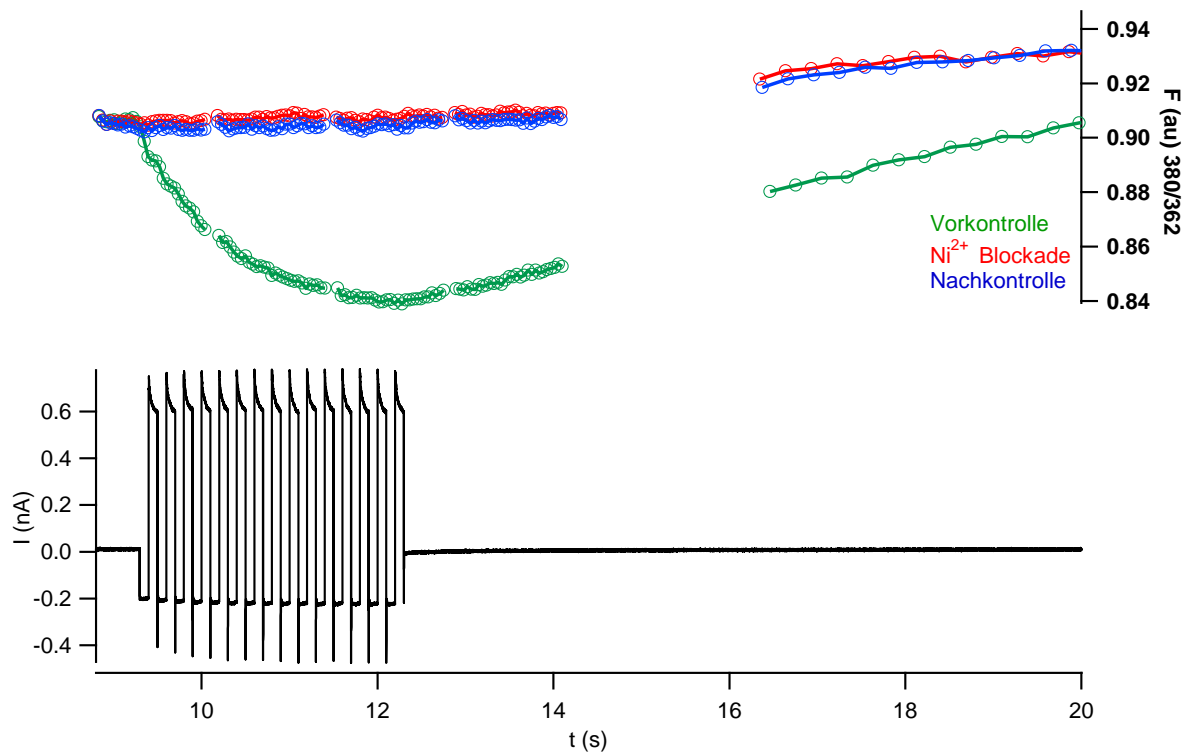


Abb.3.8: Irreversible Ni^{2+} -Blockade des Ca^{2+} -Einstroms. Dargestellt sind gemittelte Ca^{2+} -Messungen aus fünf Zellen, die während der Messungen depolarisiert wurden (15 Pulse je 100 ms, auf +20 mV).

Fokale und zeitlich begrenzte (10 s) Ni^{2+} -Applikationen (1 mM) über das *Octaflow* System während der Einzelpuls-Depolarisation der Zellmembran (100 ms Depolarisation auf +20 mV) bewirkten eine reversible Reduktion der Ca^{2+} -Erhöhungen in fünf NG2 Zellen (Abbildung 3.9). Die relative Änderung des Fluoreszenzratios der Vorkontrollen betrug $\Delta = 0,01$ und somit nur 10 % der oben beschriebenen relativen Änderung ($\Delta = 0,11$). Der niedrigere Wert war jedoch zu erwarten, da bei diesem Experiment nur einzelne Depolarisationspulse durchgeführt wurden. In Anwesenheit von Ni^{2+} betrug die Änderung $\Delta = 0,003$. Die Ca^{2+} -Erhöhungen wurden somit auf 25 % reduziert. Nach Auswaschen von Ni^{2+} wurde eine relative Änderung des Fluoreszenzratios von $\Delta = 0,009$ gemessen. Die Ca^{2+} -Erhöhungen kehrten also auf 75 % der Vorkontrolle zurück.

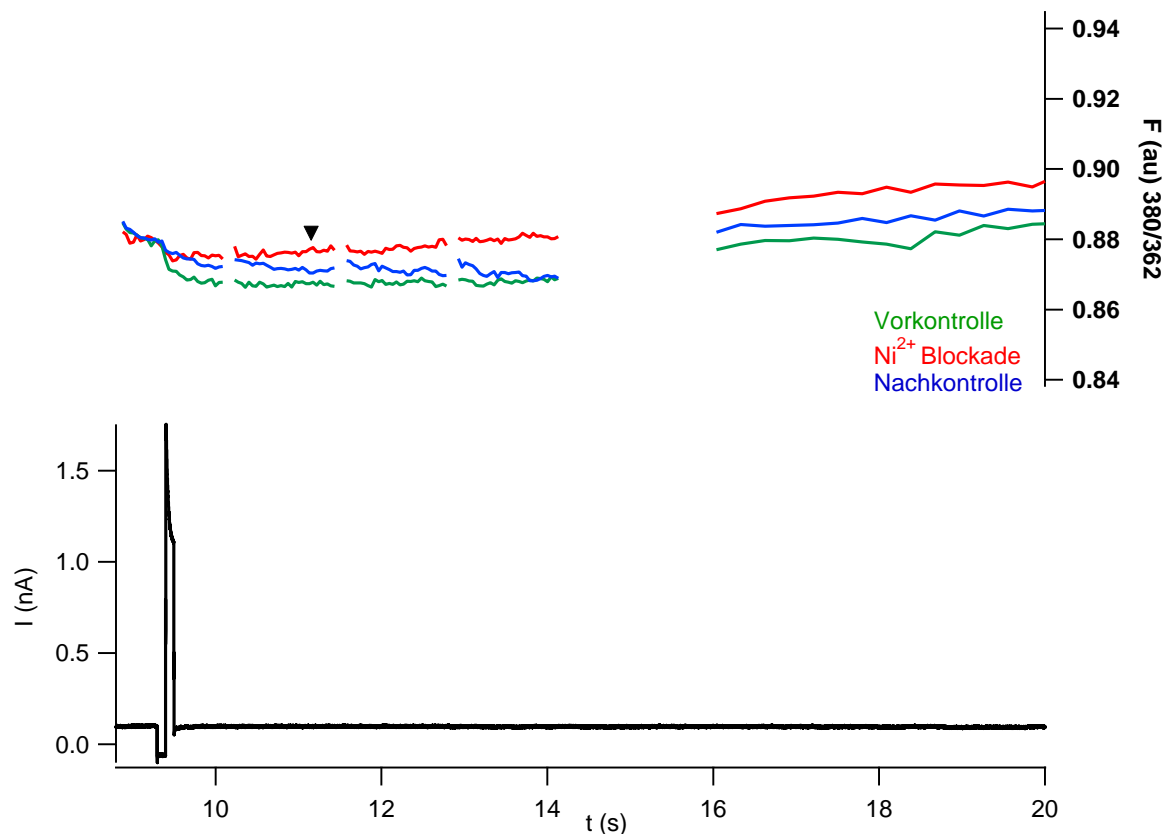


Abb.3.9: Reversible Ni^{2+} -Blockade der Ca^{2+} -Erhöhung. Dargestellt sind gemittelte Ca^{2+} -Messungen in fünf Zellen nach Einzelpuls-Depolarisation (100 ms auf +20 mV). Die Reduktion der Ca^{2+} -Erhöhungen wurde zu dem mit dem Pfeil gekennzeichnetem Zeitpunkt ermittelt.

Die relative Änderung des Fluoreszenzratios bei der Ca^{2+} -Messung nach der Depolarisation während der Ni^{2+} -Blockade stieg über den Ausgangswert des Ratios dieser Messung hinaus, da die Anwesenheit von Ni^{2+} in der Badlösung unphysiologisch war und somit zusätzlichen Stress für die untersuchten Zellen darstellte. Dieser Stress äußerte sich in erhöhten Werten des Fluoreszenzratios.

3.1.2.5 Keine Ca^{2+} -Erhöhung in Ca^{2+} -freier Badlösung

Einen weiteren Hinweis darauf, dass die Ca^{2+} -Anstiege in NG2 Zellen durch die Aktivierung von Ca_V -Kanälen vermittelt wurden, liefern Messungen, die in nominal Ca^{2+} -freier Badlösung und in Anwesenheit von 2 mM EDTA durchgeführt wurden. In Abbildung 3.10 wurden die Daten von vier NG2 Zellen gemittelt. Zu sehen ist die fehlende Ca^{2+} -Erhöhung in Ca^{2+} -freier Badlösung (blau). Die unphysiologische Ca^{2+} -freie und EDTA-haltige Lösung bewirkte, dass die untersuchten Zellen schnell apoptotisch wurden und keine zeitlich stabile *patch clamp* Kontrolle aufrechterhalten werden konnte. Dies manifestierte sich in den hohen Werten des

Fluoreszenzratios. Die relative Änderung des Fluoreszenzratios der Messungen in Badlösung betrug $\Delta = 0,10 \pm 0,02$ (rot).

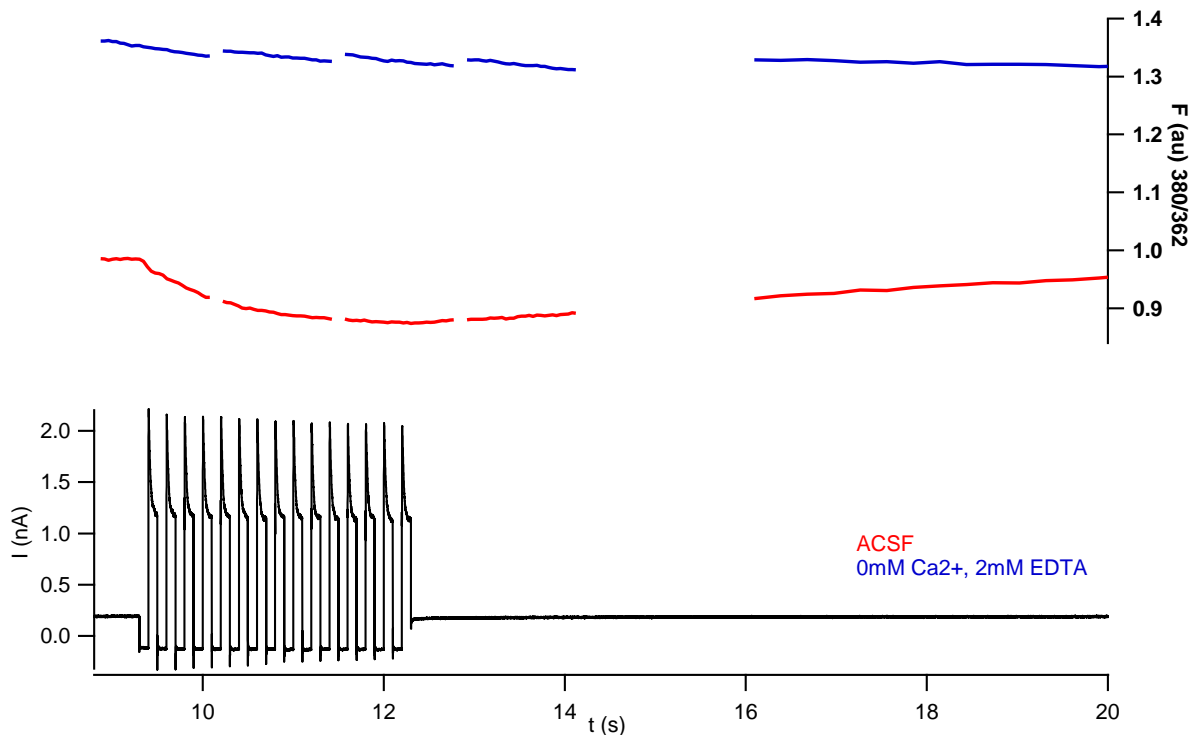


Abb.3.10: Fehlende Ca^{2+} -Erhöhung in Zellen bei nominal Ca^{2+} -freier Badlösung. Dargestellt sind gemittelte Messungen in vier Zellen in Badlösung (rot) und in nominal Ca^{2+} -freier und EDTA-haltiger Lösung (blau). In schwarz sind die Depolarisationspulse (15 Pulse je 100 ms auf +20 mV) dargestellt.

3.1.2.6 Kein Ca^{2+} -Anstieg bei fehlender Depolarisation

Jedem Depolarisationspuls ging ein Hyperpolarisationspuls voraus, um möglichst viele der spannungsgesteuerten Ionenkanäle in einen geschlossenen aktivierbaren Zustand zu bringen. In dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob diese Hyperpolarisationspulse zur Ca^{2+} -Erhöhung in den Zellen führen. Hierfür wurden fünf NG2 Zellen untersucht und die Daten gemittelt. Die Abbildung 3.11 zeigt, dass bei fehlender Depolarisation keine Ca^{2+} -Erhöhung in den Zellen beobachtet wurde (blau). Bei Depolarisation betrug die relative Änderung des Fluoreszenzratios $\Delta = 0,07 \pm 0,02$ (rot).

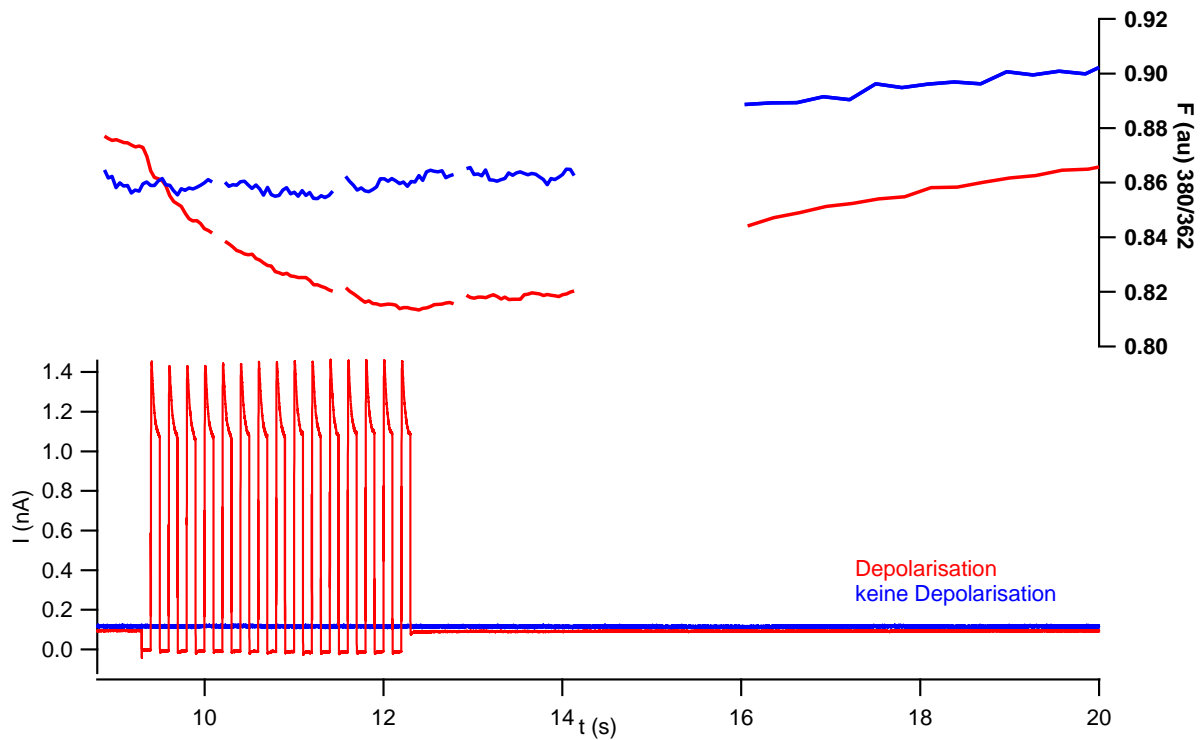


Abb.3.11: Kein Ca^{2+} -Anstieg bei fehlender Depolarisation. Dargestellt sind gemittelte Messungen in fünf Zellen mit (rot) und bei fehlender Depolarisation (blau). Unten sind die dazugehörigen Stimulationsprotokolle in den entsprechenden Farben dargestellt.

3.1.2.7 Depolarisation von 100 ms reicht aus für eine Ca^{2+} -Erhöhung in NG2 Zellen

Im Folgenden sollte geprüft werden, ob ein einzelner 100 ms Depolarisationspuls ausreicht, um eine Ca^{2+} -Erhöhung in den NG2 Zellen zu induzieren. In Abbildung 3.12 sind gemittelte Ca^{2+} -Messungen aus 12 NG2 Zellen dargestellt. Zu sehen ist ein Ca^{2+} -Anstieg direkt nach Beginn der Depolarisation. Auffällig ist die langsame Kinetik des gemittelten Ca^{2+} -Anstiegs in den NG2 Zellen: das Maximum ist erst 1,3 s nach Ende des elektrischen Pulses erreicht (schwarzer Pfeil). Die Ca^{2+} -Amplitude beträgt unmittelbar nach Ende des Depolarisationspulses lediglich 75 % ($\Delta = 0,012 \pm 0,002$) des Maximums ($\Delta = 0,016 \pm 0,002$). Dieser Befund läßt vermuten, dass das nach Depolarisation in die Zelle fließende Ca^{2+} einen intrazellulären Verstärkungsmechanismus aktiviert.

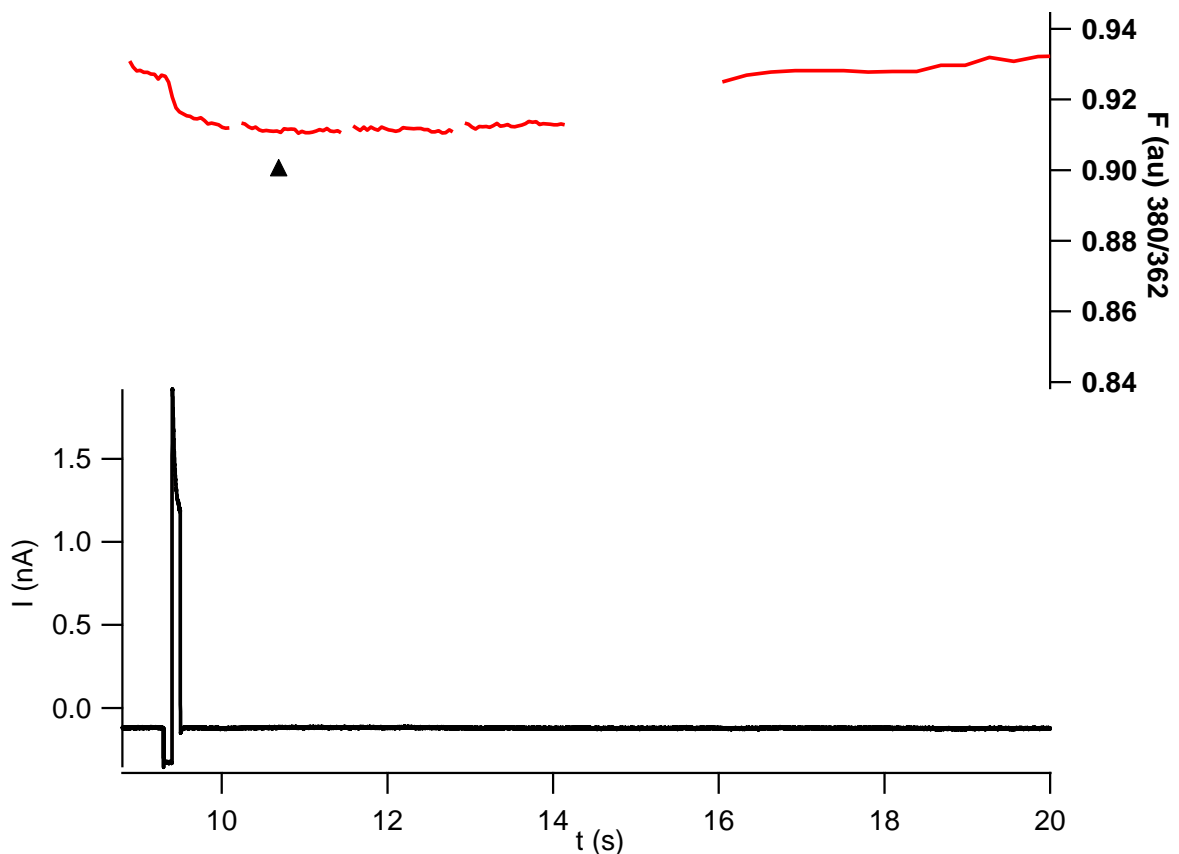


Abb.3.12: Ca^{2+} -Anstieg nach 100 ms langer Depolarisation. Die zeitkorrelierte Darstellung der in 12 Zellen durchgeführten und gemittelten Messungen der Ca^{2+} -Erhöhung (rot) nach einer 100 ms Depolarisation (schwarz) zeigt zum einen, dass diese kurze Depolarisation ausreichend ist, um eine Ca^{2+} -Erhöhung in den Zellen auszulösen, zum anderen wird eine langsame Abfallkinetik der Ca^{2+} -Erhöhung deutlich. Das Maximum ist erst 1,3 s nach Ende der Depolarisation erreicht (schwarzer Pfeil).

3.1.2.8 Freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration im nanomolaren Bereich

Im Folgenden wurden Untersuchungen zur Bestimmung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in NG2 Zellen durchgeführt. Diese Untersuchungen zielten darauf ab, sowohl die basale, als auch die durch Depolarisation erhöhte Ca^{2+} -Konzentration zu ermitteln. Die Bestimmung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde aus 11 Messungen in sechs Zellen durchgeführt. Dazu wurde die Änderung der absoluten Ca^{2+} -Konzentration nach einem Depolarisationspuls (fünf Messungen in fünf von sechs Zellen) und 15 Depolarisationspulsen (sechs Messungen in sechs von sechs Zellen) detektiert, dabei dauerte ein Depolarisationspuls auf +20 mV, 100 ms. Die 11 gemittelten Messungen ergaben den Wert für die basale Ca^{2+} -Konzentration von $60,3 \pm 0,4$ nM. Dieser Wert wurde vor den Pulsapplikationen bestimmt. Der in sechs Zellen gemessene und gemittelte Wert für die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration nach 15 Puls- Depolarisation betrug 47 ± 67 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Für die Erhöhung der

Ca^{2+} -Konzentration nach 1 Puls- Depolarisation wurden auf Grund der langsamen Kinetik zwei Werte bestimmt. Der in fünf Zellen gemessene und gemittelte Wert unmittelbar nach Ende der Depolarisation ($t_1 = 100 \text{ ms}$) betrug $3,6 \pm 1,2 \text{ nM } [\text{Ca}^{2+}]_i$. Die maximale Erhöhung, die nach 1,3 s (t_2) erreicht wurde betrug $6,8 \pm 1,5 \text{ nM } [\text{Ca}^{2+}]_i$. Somit war die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration nach einer 15 Puls- Depolarisation um 691 % größer, als nach 1 Puls- Depolarisation. Der Unterschied zwischen beiden Werten war erwartungsgemäß signifikant ($P = 0,004$). Die Änderung der Ca^{2+} -Konzentration war sowohl nach einem als auch nach 15 Depolarisationspulsen reversibel. In Abbildung 3.13 sind die Messungen der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration dargestellt.

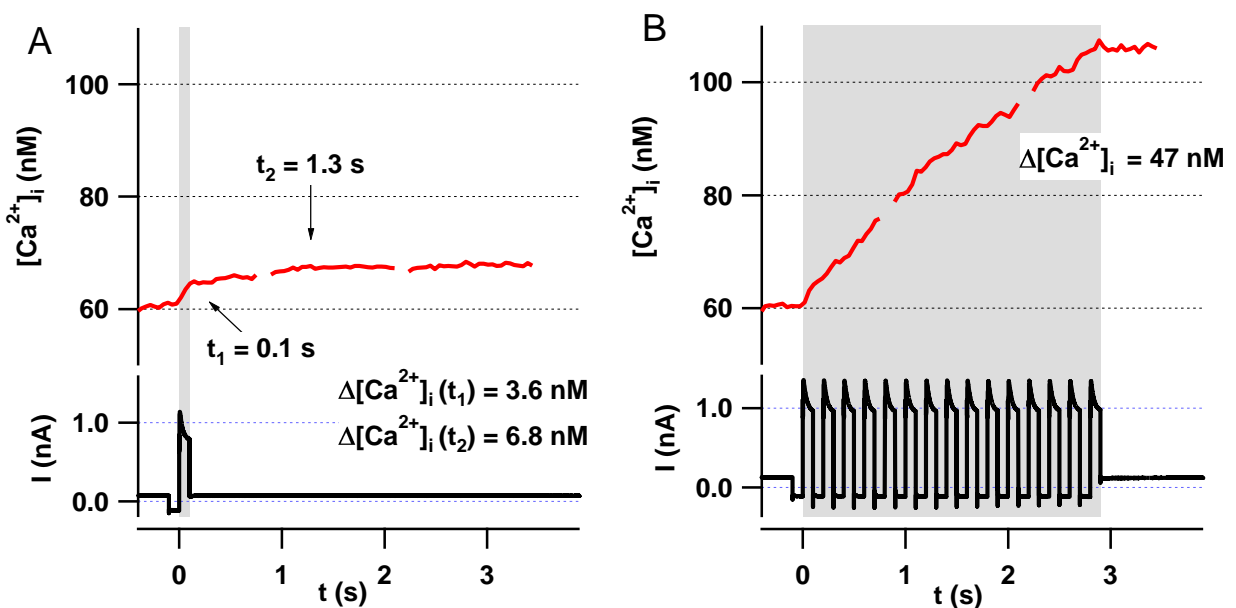


Abb.3.13: Bestimmung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in NG2 Zellen. Zeitkorreliert dargestellt sind die Depolarisationsprotokolle (schwarz) mit der Ca^{2+} -Konzentrationsgeraden (rot). Grau unterlegt ist die Zeit der Depolarisation. **A:** Bestimmung der Ca^{2+} -Erhöhung nach 1 Puls Depolarisation. Auf Grund der langsamen Kinetik der Ca^{2+} -Erhöhung wurden hier zwei Werte bestimmt: die Änderung der Konzentration nach Ende der Depolarisation und die Änderung der Ca^{2+} -Konzentration am Maximum der Ca^{2+} -Erhöhung (1,3 s nach Ende der Depolarisation). **B:** Bestimmung der Ca^{2+} -Erhöhung nach 15 Puls Depolarisation.

3.1.2.9 Ca_V Kanaltypen in NG2 Zellen

Schließlich wurde mit Hilfe der reverse Transkription PCR Analyse von Einzelzellen, das Expressionsmuster verschiedener Ca_V Kanäle in NG2 Zellen auf der Transkriptebene analysiert, um herauszufinden welche Ca_V Kanäle in welcher Häufigkeit in NG2 Zellen vorkommen.

Es wurden 56 NG2 Zellen aus 11 NG2-EYFP +/- auf die Präsenz von mRNA für Ca_V Kanäle untersucht. 19 NG2 Zellen wurden auf die Expression von mRNA der Ca_V1 -Familie, 20 Zellen hinsichtlich der Ca_V2 -Familie und 17 Zellen auf die Expression von Mitgliedern der Ca_V3 -

Familie untersucht. Als Positivkontrolle diente mRNA für s100 β . 84 % der untersuchten Zellen waren s100 β mRNA positiv. Analysen hinsichtlich der Expression von Transkripten für Ca_v Kanäle in Astrozyten (n = 16) waren negativ. Diese exprimierten zu 100 % mRNA für s100 β . In Abbildung 3.14 sind Elektrophoresegele mit Produkten der Ca_v-Analyse mittels reverser Transkription-PCR von Einzelzellen dargestellt.

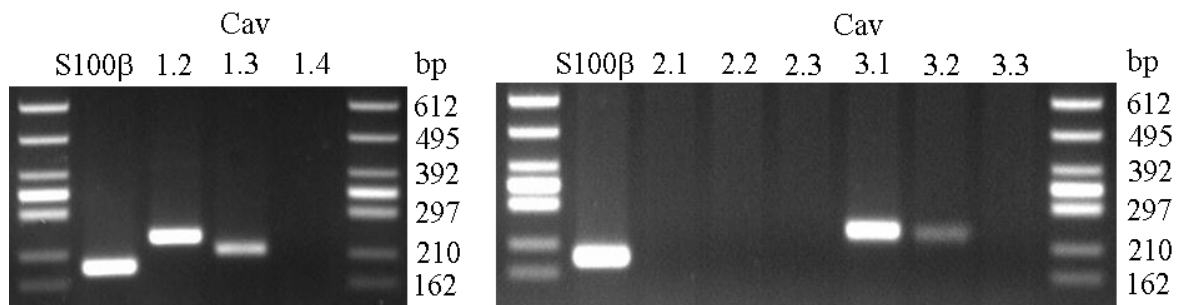


Abb.3.14: Gelelektrophorese zur Analyse der Produkte der reverse Transkription-PCR von Einzelzellen. Links: Elektrophorese der PCR Produkte aus einer NG2 Zelle. Zu sehen ist eine Kolokalisation der mRNAs, die für s100 β , Ca_v1.2 und Ca_v1.3 kodieren. Rechts: Elektrophorese der PCR Produkte aus einer NG2 Zelle mit der Kolokalisation der mRNAs, die für s100 β , Ca_v3.1 und Ca_v3.3 kodieren. Als Längenmarker wurde Φ X174/Hinc II digest verwendet.

In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse der reversen Transkription-PCR von Einzelzellen zusammengefasst. Angegeben sind sowohl die Zellzahlen aller analysierten Zellen, als auch die Anzahl der Zellen in denen die mRNA mehrerer Ca_v-Kanaltypen exprimiert wird (Koexpression). Weiterhin ist die Anzahl der Zellen angegeben, in denen mRNA eines Ca_v-Kanaltyps exprimiert wird (Einzelexpression). Schließlich ist die Anzahl der Zellen angegeben, in denen keine mRNA der Ca_v-Kanaltypen exprimiert wird (keine Expression).

Tab.3.4: Relative Verteilung der Transkripte für Ca_v Kanäle in den untersuchten NG2 Zellen. Angegeben sind die Gesamtzahlen der analysierten Zellen, sowie die Zellzahlen in denen mRNA von zwei und einem der Ca_v-Kanaltypen nachgewiesen wurde. Schließlich sind die Zellzahlen angegeben, in denen keine mRNA für Ca_v-Kanäle nachgewiesen wurde.

Ca _v -Familie	Ca _v 1			Ca _v 2			Ca _v 3		
Gesamtzahl der analysierten Zellen	19			20			17		
Ca _v -Kanaltypen	1.2	1.3	1.4	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3
Anzahl positiver Zellen	14	17	0	2	2	0	9	6	0
Koexpression	12		---	1		---	4		---
Einzelexpression	2	3	0	1	1	0	5	2	0
keine Expression	0			17			6		

3.2 Gliale Eigenschaften in TLE-Resektaten

Die in dieser Arbeit untersuchten Hippokampusresektate wurden Patienten entnommen, die auf Grund einer pharmakoresistenten Temporallappenepilepsie chirurgisch behandelt wurden. Diese vitalen Resektate wurden auf Grund der neuropathologischen Befunde in zwei Gruppen unterteilt: 1. Gewebe von Patienten mit Ammonshornsklerose (AHS) und 2. Gewebe von Patienten mit läsionsassoziierten Loci, bei denen der Hippokampus nur geringe morphologische Veränderungen aufweist (Läsion). Die morphologischen Veränderungen bestanden vor allem in einer Reduktion der CA1 Region und dem damit einhergehenden Verlust der Pyramidenneurone der CA1 Region, einer reaktiven Gliose und einer Dispersion der Körnerzellen des *Gyrus dentatus* (de Lanerolle et al., 1989).

Sowohl im AHS- als auch im Läsionsgewebe wurden komplexe Gliazellen hinsichtlich ihrer Membraneigenschaften untersucht. Astrozyten wurden jedoch nur im Läsionsgewebe hinsichtlich des Kopplungsverhaltens und des Strommusters untersucht. Im AHS Gewebe fehlten diese Zellen. Außerdem wurden Mikrogliazellen anhand der Membraneigenschaften und Immunreaktivität identifiziert (Kettenmann, 1993; Kettenmann, 1994).

Im Gewebe von 31 AHS Patienten im Alter von 10 bis 71 Jahren wurden insgesamt 79 Gliazellen untersucht. Auf Grund des Gesamtstrommusters wurden 59 dieser Gliazellen als komplexe Gliazellen und 20 als Mikrogliazellen klassifiziert. In 22 Resektaten von Läsionspatienten im Alter von 1 bis 37 Jahren wiesen von 92 Gliazellen 55 ein passives und 27 ein komplexes Gesamtstrommuster auf. 10 Zellen wurden als Mikrogliazellen klassifiziert (Abb. 3.16 A). Die Auswahl der elektrophysiologisch untersuchten Zellen erfolgte subjektiv, weswegen diese Zahlen keine Rückschlüsse auf die tatsächliche relative Häufigkeit der Zelltypen erlauben.

Bei den Analysen humaner Gliazellen wiesen nur Astrozyten im Läsionsgewebe eine Kopplung auf (Abb.3.16 B, rechts). Die Quantifizierung der Kopplung, also der Zahl von Zellen, die sich in einer Kopplungswolke befanden, ergab einen Mittelwert von 56 ± 71 Zellen. Insgesamt wurde der Kopplungsstatus von 55 Astrozyten untersucht.

Schließlich wurde das humane Gewebe auf GFAP Immunreaktivität untersucht. Die Antikörperfärbungen konnten jedoch nicht vergleichend qualitativ analysiert werden, da die GFAP Markierung im AHS Gewebe nicht mit zellulären Strukturen assoziiert war (Abb. 3.15 C, links).

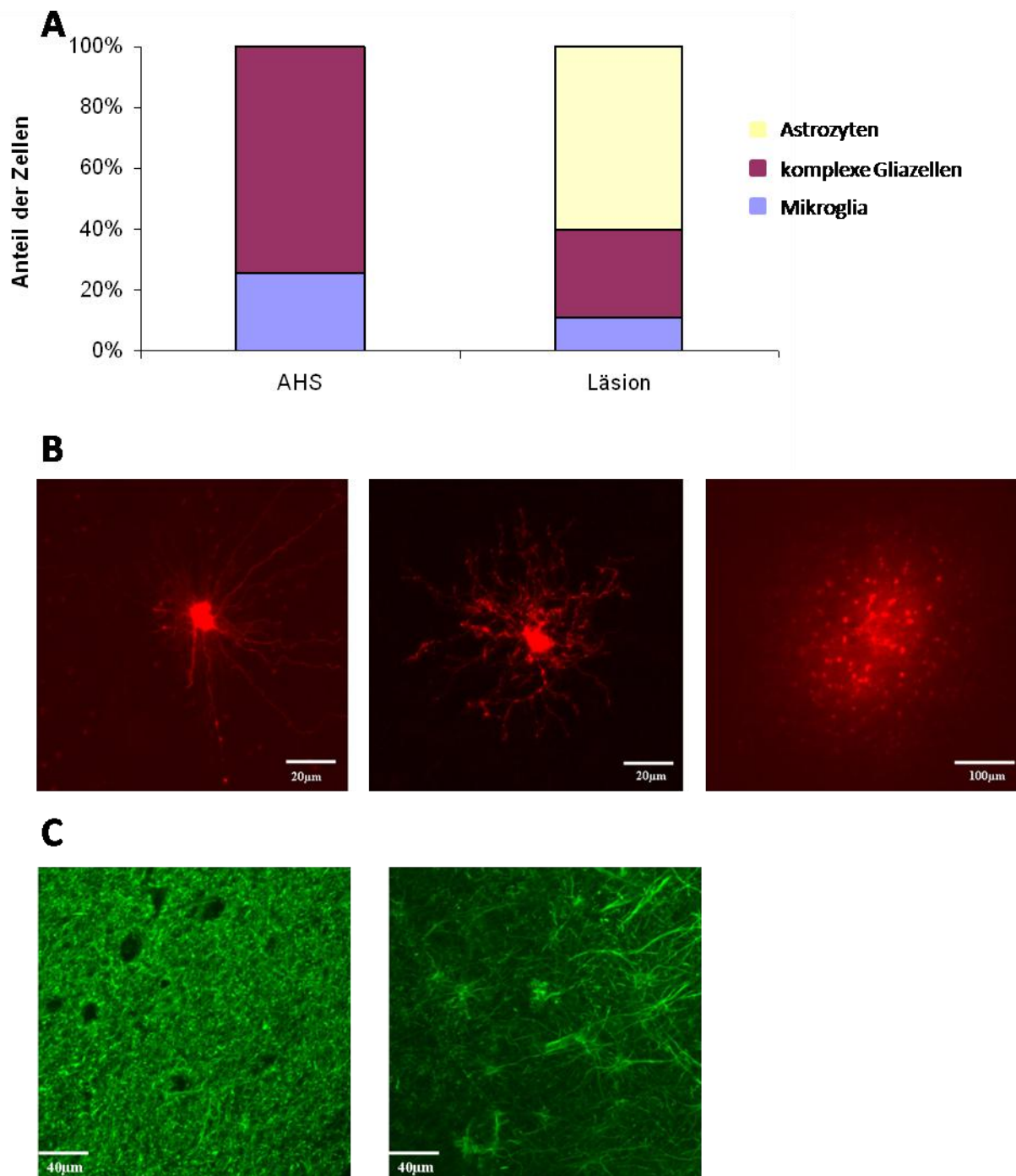


Abb.3.15: Gliazellen im humanen Gewebe. **A:** Anteil der abgeleiteten Zelltypen im Gewebe von AHS- und Läsionspatienten. **B:** Kopplungsverhalten der Gliazellen im humanen Gewebe. Links: komplexe Gliazelle im AHS Gewebe. Mitte: komplexe Gliazelle im Läsionsgewebe. Rechts: Gekoppelter Astrozyt im Läsionsgewebe. **C:** Immunhisto- chemische Färbungen von AHS- (links) und Läsionsgewebe (rechts) gegen GFAP.

Ein Vergleich der Membraneigenschaften C_M , R_M und U_R zwischen den Zelltypen aus AHS- und Läsionsgewebe ergab signifikante Unterschiede von U_R zwischen komplexen Gliazellen (Tabellen 3.5, 3.6, 3.7).

Tab.3.5: Membraneigenschaften von Mikrogliazellen

Gewebetyp	n	R _M (MΩ)	C _M (pF)	U _R (mV)
AHS	20	15036,5 ±	15,1 ±	-20,4 ±
		29887,2	19,3	12,5
Läsion	10	4701,2 ±	12,3 ±	-17,1 ±
		2700,7	3,8	10,9
<i>t</i>		<i>P</i> = 0,291	<i>P</i> = 0,655	<i>P</i> = 0,484

Tab.3.6: Membraneigenschaften komplexer Gliazellen

Gewebetyp	n	R _M (MΩ)	C _M (pF)	U _R (mV)
AHS	59	277,5 ±	22,8 ±	-58,6 ±
		236	14,5	17,4
Läsion	27	209,7 ±	17,5 ±	-68,5 ±
		168,7	12,2	10,8
<i>t</i>		<i>P</i> = 0,183	<i>P</i> = 0,102	<i>P</i> = 0,008*

Tab.3.7: Membraneigenschaften von Astrozyten

Gewebetyp	n	R _M (MΩ)	C _M (pF)	U _R (mV)
Läsion	55	14,9 ±	50,4 ±	-71,8 ±
		13,6	36,6	9,5

3.2.1 Farbstoff Injektionen als Kopplungsindikator

Auf Grund der subjektiven Zellauswahl des Experimentators, die ein Problem bei der Kopplungsanalyse via Biozytininjektion in die untersuchten Zellen darstellt, wurden Farbstoff Injektionen im humanen Gewebe durchgeführt. Hierfür wurde der CellTracker™ Green (5-chloromethylfluorescein diacetate CMFDA) von Invitrogen verwendet. Die Injektionen wurden mit einer Pipette mit einem großen Öffnungsdurchmesser, direkt in das Gewebe durchgeführt. So wurde das Problem der Subjektivität ausgeschlossen, denn bei dieser Form der Kopplungsanalyse mussten nicht einzelne Astrozyten ausgesucht werden. Die Ausbreitung des CellTrackers im Gewebe sollte die Kopplung der Zellen in dem jeweils untersuchten Gewebe zeigen. Da Kopplung bislang nur bei Astrozyten beobachtet werden konnte und diese im AHS Gewebe fehlen (siehe Abschnitt 3.2), würde eine geringere Ausbreitung des injizierten

CellTrackers im AHS Gewebe im Vergleich zum Läsionsgewebe die Ergebnisse hinsichtlich des Fehlens von Astrozyten in den untersuchten AHS Resektaten bestätigen.

Die CellTracker Injektionen wurden in 9 AHS- und 7 Läsions- Gewebeschnitten durchgeführt. Das Alter der AHS Patienten betrug 10 – 71 Jahre, das der Läsionspatienten 3 – 59 Jahre. Die Ausbreitung des injizierten Farbstoffes ist beispielhaft in Abb. 3.16 für das Läsionsgewebe und in Abb. 3.17 für das AHS Gewebe dargestellt.

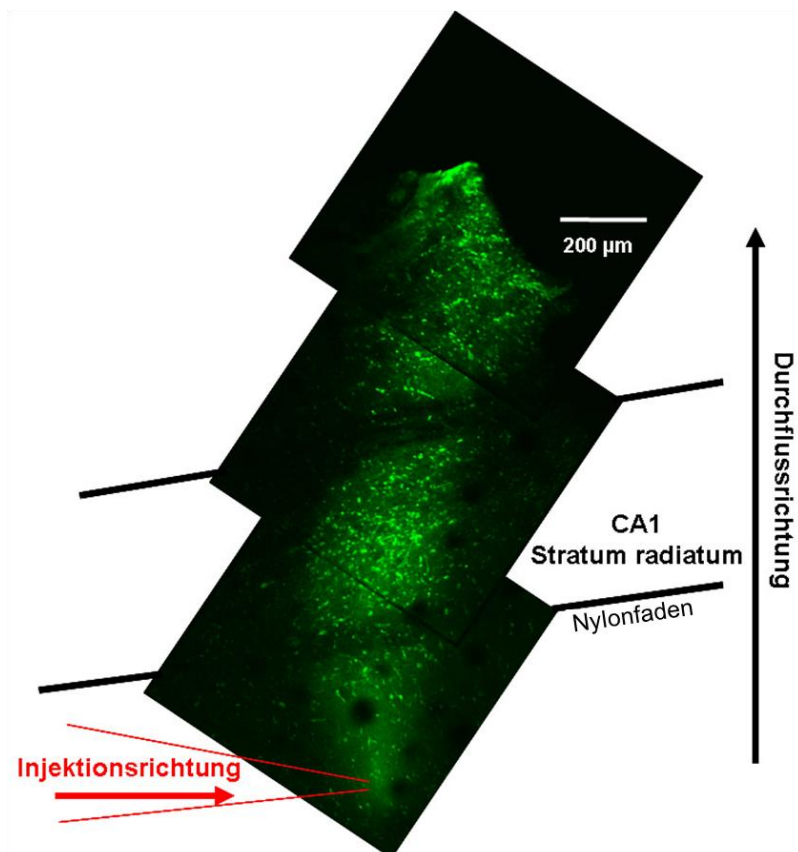


Abb.3.16: CellTracker Injektionsschema im Läsionsgewebe. Gezeigt sind drei zusammengefügte konfokale Aufnahmen. Die Injektion wurde in einem Winkel von 90° zur Durchflussrichtung der Badlösung in der Versuchskammer durchgeführt.

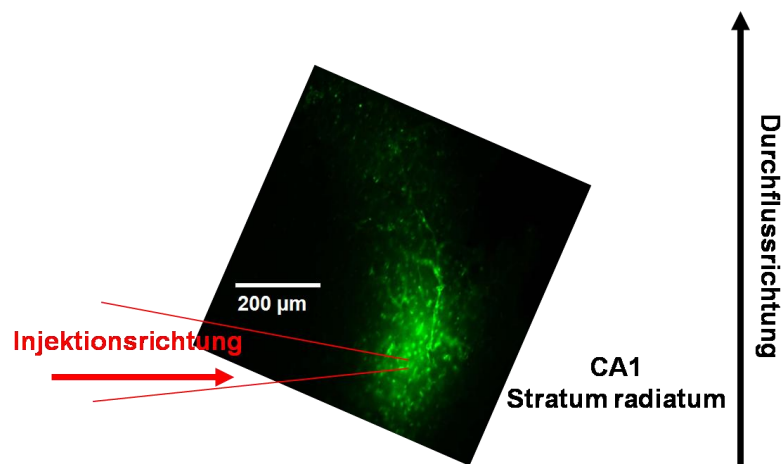


Abb.3.17: CellTracker Injektionschema im AHS Gewebe. Die Injektion wurde in einem Winkel von 90° zur Durchflussrichtung der Badlösung in der Versuchskammer durchgeführt.

Die CellTracker Injektionen zeigten deutlich, dass sich im Läsionsgewebe, im Gegensatz zum AHS-Gewebe, zelluläre Strukturen identifizieren lassen (Abb.3.18).

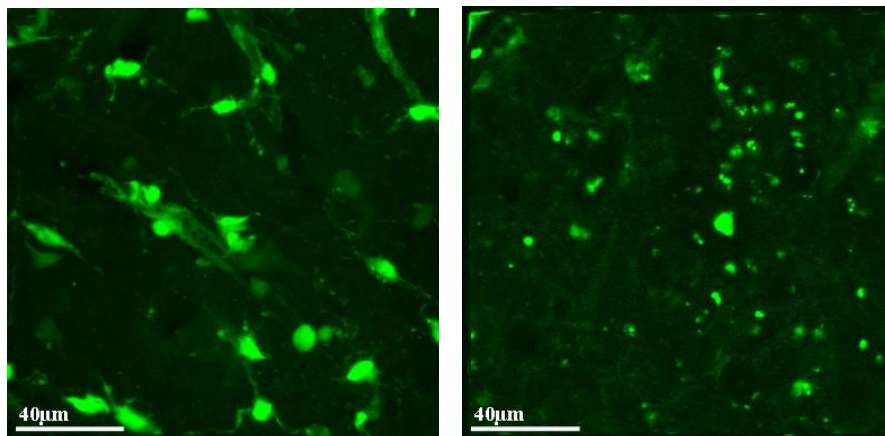


Abb.3.18: Konfokale Aufnahmen von CellTracker markierten Schnitten. Links: Läsionsgewebe und rechts: AHS-Gewebe.

Zum quantitativen Vergleich der Ausbreitung des CellTrackers im Gewebe wurden Seitenlängen der Ausbreitungen unter dem Mikroskop bestimmt und die von diesen Seitenlängen begrenzten Flächen ausgewertet (Abb. 3.19).

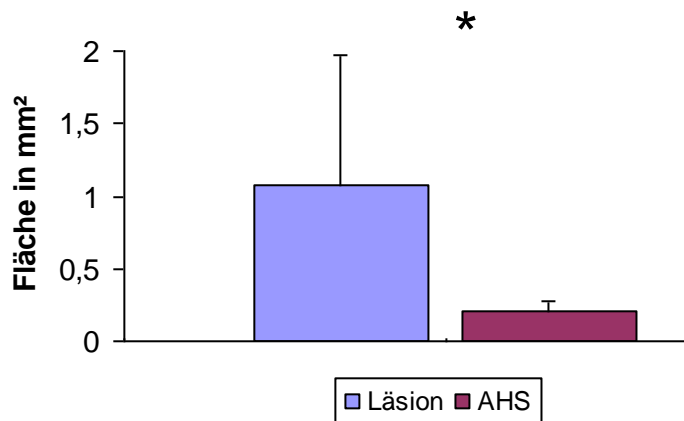


Abb.3.19: Vergleich der Flächen der Ausbreitungswolken des CellTrackers im AHS- und Läsionsgewebe.

Die auf diese Weise bestimmten Flächen der Ausbreitungswolken im AHS- Gewebe betragen $0,21 \pm 0,07 \text{ mm}^2$ und unterschieden sich signifikant ($P = 0,018$) von den Ausbreitungswolken im Läsionsgewebe ($1,07 \pm 0,90 \text{ mm}^2$).

Mit dieser signifikant höheren CellTracker Ausbreitung im Läsionsgewebe, im Vergleich zu der Ausbreitung im AHS Gewebe, wurde die in Abschnitt 3.2 beschriebene Beobachtung bestätigt, dass Astrozyten in dem in dieser Arbeit untersuchten AHS Gewebe fehlten.

3.2.2 Verwendung eines TLE Tiermodells zur Untersuchung zeitlicher Aspekte der Epileptogenese

Das in dieser Arbeit untersuchte Gewebe wurde Epilepsiepatienten entnommen, die sich im Endstadium der Erkrankung befanden. Deshalb waren zeitliche Aspekte der Epileptogenese, wie die Klärung der Frage ob Gliazellen an der Entstehung der AHS beteiligt sind, an humanen Resektaten nicht analysierbar. Die geringe Verfügbarkeit des humanen Gewebes und das oben genannte Problem machten die Verwendung eines Epilepsiemodells notwendig.

Mit dem Modell sollte geklärt werden, ob die Astrozyten während der Epileptogenese morphologische und funktionelle Veränderungen erfahren und zum Zeitpunkt der Klassifizierung des Strommusters einen veränderten funktionellen Phänotyp aufweisen.

Für das Epilepsie - Tiermodell erhielten 46 Tg hGFAP-EGFP und 49 C57BL6J Mäuse im Alter von p 60 bis p 220 intraperitoneale Pilokarpininjektionen (Borges et al., 2003). Die Tiere wurden lichtempfindlich und waren weder in Lage sich ein Nest zu bauen noch Nahrung zu finden. Innerhalb der ersten Woche nach Injektion verstarben 50% der Tg hGFAP- EGFP Mäuse. Die

Sterberate der C57BL6J Mäuse betrug 80%, weswegen sie aus weiteren Versuchen ausgeschlossen wurden.

Um die lange Zeitspanne von Beginn der Epilepsieentwicklung bis zur operativen Entfernung des Hippokampusgewebes, die bei AHS Patienten Jahre beträgt, zu simulieren, wurde die Zeitspanne von Pilocarpininjektion bis zur elektrophysiologischen Untersuchung des Hippokampusgewebes der Maus auf 6 Wochen festgelegt.

Im Gewebe von 14 Pilocarpinmäusen wurden 66 Gliazellen untersucht. Diese wurden nach ihrem Gesamtstrommuster in 50 GluT Zellen und 16 GluR Zellen gruppiert. Im Gewebe von 7 Kontrollmäusen wurden 32 Zellen als GluT- und 8 als GluR Zellen identifiziert. Es muss angemerkt werden, dass diese Zellverteilung nicht repräsentativ ist, da in dieser Studie selektiv nach GluT Zellen gesucht wurde, um eine größtmögliche Anzahl von Zellen hinsichtlich ihrer Kopplungseigenschaften zu analysieren.

Die Quantifizierung der Kopplung, ergab im Gewebe der Pilocarpinmäuse einen Mittelwert von 36 ± 15 Zellen und im Gewebe der Kontrollmäuse von 22 ± 11 Zellen. Das Ausmaß der Kopplung im Pilocarpingewebe unterschied sich signifikant von der im Kontrollgewebe ($P = 0,014$).

Auf Grund dessen, dass im Gewebe von Pilocarpinmäusen, im Gegensatz zum Gewebe von AHS-Patienten, gekoppelte GluT Zellen gefunden werden konnten und keine makroskopischen Veränderungen des Hippokampus der Pilocarpintiere beobachtet wurden, wurde dieses Modell für Analysen der zeitlichen Aspekte der Epileptogenese als ungeeignet befunden.

3.2.3 Humane komplexe Gliazellen sind synaptisch innerviert

Nachdem in vorangegangenen Studien an humanem Gewebe gezeigt werden konnte, dass in Resektaten von AHS Patienten die Astrozyten fehlen, jedoch in beiden Gewebetypen (AHS- und Läsionsgewebe) Gliazellen mit einem komplexen Strommuster gefunden wurden, konzentrierten sich weitere Studien auf die komplexen Gliazellen. Untersucht wurde die synaptische Innervation dieser Zellen, analog zu den Analysen im Gewebe der Maus (siehe Abschnitt 3.1.1). Auf Grund der Reduktion der CA1 Region des Hippokampus in Resektaten von AHS Patienten wurde erwartet, dass die im AHS Gewebe befindenden komplexen Gliazellen keine synaptische Innervation erhalten, während die komplexen Gliazellen im Läsionsgewebe synaptisch innerviert sind.

Synaptische Innervation wurde in 13 von 19 untersuchten komplexen Gliazellen aus sieben von acht AHS Patienten gemessen. Das Gewebe von einem Patienten (sechs Zellen) war in einem schlechten Zustand, weswegen keine Messung der synaptischen Innervation möglich war. Im Gewebe von drei Läsionspatienten wurden fünf komplexe Gliazellen auf synaptische Innervation untersucht.

Ein Vergleich der Membraneigenschaften R_M , C_M und U_R der synaptisch innervierten Zellen von AHS- und Läsionspatienten ergab keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 3.8).

Tab.3.8: Membraneigenschaften synaptisch innervierter komplexer Gliazellen im AHS- und Läsionsgewebe

Gewebetyp	n	R_M (M Ω)	C_M (pF)	U_R (mV)
AHS	13	269,9 \pm 217,8	29,4 \pm 23,1	-60,9 \pm 7,5
Läsion	5	155,8 \pm 83,5	22,3 \pm 21,3	-71,0 \pm 14,3
<i>t</i>		$P = 0,237$	$P = 0,530$	$P = 0,056$

Im Gewebe von AHS Patienten wurden 214 sPSCs und im Gewebe von Läsionspatienten 238 sPSCs aufgezeichnet. Wie im Abschnitt 3.1.1 beschrieben, wurden auch bei der Analyse der sPSCs im humanen Gewebe zwei Typen von sPSCs gab. Sie unterschieden sich in den Zeitkonstanten des exponentiellen Abfalls (*tau*) der sPSCs. Im Folgenden werden die sPSCs mit einem niedrigen *tau* als schnelle sPSCs und die mit einem hohen *tau* als langsame sPSCs bezeichnet (siehe Abschnitt 3.1.1). In Tabelle 3.9 sind die Parameter der schnellen und in Tabelle 3.10 die Parameter der langsamen sPSCs aufgelistet.

Tab. 3.9: Parameter der schnellen sPSCs, gemessen im AHS- und Läsionsgewebe.

Gewebetyp	AHS	Läsion
Zeitkonstante (<i>tau</i>)	0,4 \pm 0,5 ms*	1,1 \pm 0,8 ms*
Strom (I)	8,7 \pm 8,4 pA	8,1 \pm 3,0 pA
Frequenz (F)	0,09 \pm 0,08 Hz**	0,2 \pm 0,2 Hz**
Anzahl der sPSCs	212	231

Tab. 3.10: Parameter der langsamen sPSCs, gemessen im AHS- und Läsionsgewebe.

Gewebetyp	AHS	Läsion
Zeitkonstante (<i>tau</i>)	11,9 \pm 0,2 ms	7,9 \pm 1,2 ms
Strom (I)	9,3 \pm 1,3 pA	12,1 \pm 1,9 pA
Frequenz (F)	0,033 Hz	0,12 Hz
Anzahl der sPSCs	2	7

Signifikante Unterschiede wurden zwischen den Werten für τ ($*P = 0,001$) und Frequenz ($**P = 0,004$) der schnellen sPSCs im AHS Gewebe festgestellt.

In den Abbildungen 3.20 und 3.21 sind Messungen der synaptischen Innervation im AHS- (Abbildung 3.20) und Läsionsgewebe (Abbildung 3.21) dargestellt.

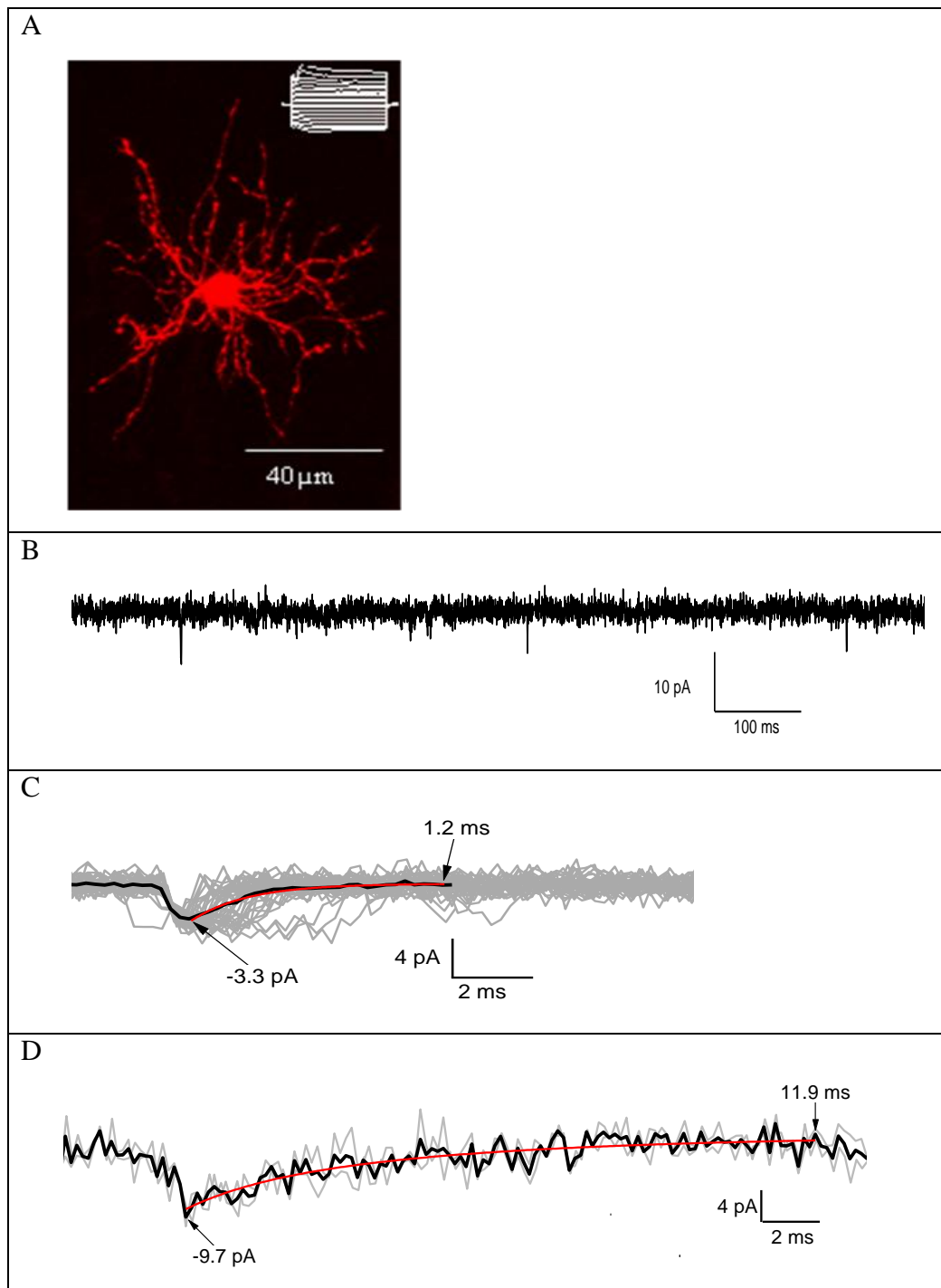


Abb. 3.20: Messung synaptischer Innervation im AHS Gewebe **A**: Mit Biozotin gefüllte komplexe Gliazelle, oben rechts ist das Strommuster der Zelle gezeigt. **B**: Ein beispielhafter Ausschnitt einer Messung synaptischer Innervation. Die Originalkurven der Ströme (grau) mit den Mittelwertkurven (schwarz) schneller (**C**) und langsamer (**D**) sPSCs. Die monoexponentiell gefitteten Kurven sind rot dargestellt.

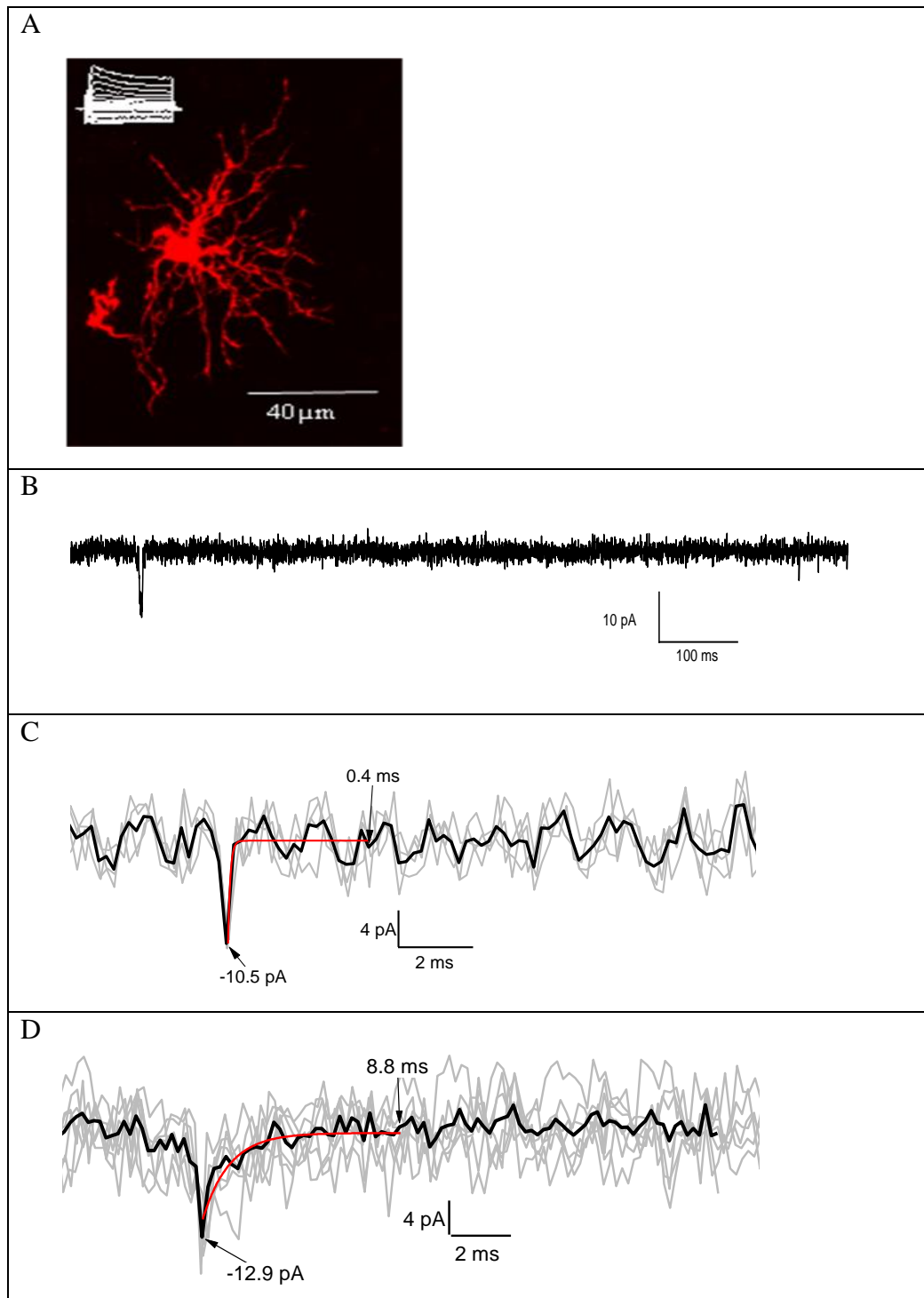


Abb. 3.21: Messung synaptischer Innervation im Läsionsgewebe **A**: Mit Biozytin gefüllte komplexe Gliazelle, oben links ist das Strommuster der Zelle gezeigt. **B**: Ein beispielhafter Ausschnitt einer Messung synaptischer Innervation. Die Originalkurven der Ströme (grau) mit den Mittelwertkurven (schwarz) schneller (**C**) und langsamer (**D**) sPSCs. Die monoexponentiell gefitteten Kurven sind rot dargestellt.

Um zu klären ob humane komplexe Gliazellen durch glutamat- oder GABA-erge Neurone innerviert werden, wurden folgende Antagonisten in die Badlösung gegeben: 10 μM NBQX

(AMPA-Rezeptor Antagonist) + 50 μ M DL-APV (NMDA-Rezeptor Antagonist); 10 μ M Bicucullin (Antagonist des ionotropen GABA_A Rezeptors).

In sieben Zellen aus vier AHS Patienten wurden 52 schnelle sPSCs in Gegenwart von NBQX und DL-APV gemessen. Die Kinetik der sPSCs, die in humanem Gewebe in Anwesenheit von NBQX und DL-APV gemessen wurden, unterscheidet sich von der Kinetik der sPSCs, die im Gewebe von Mäusen in Anwesenheit der gleichen Antagonisten gemessen wurden (Jabs et al., 2005). Jabs et al. konnten keine sPSCs mit einer Zeitkonstante des Abfalls von weniger als 6 ms (schnelle sPSCs) in Anwesenheit in Anwesenheit von NBQX und DL-APV messen, in dieser Arbeit wurden jedoch schnelle sPSCs in Anwesenheit von NBQX und DL-APV gemessen. Eine mögliche Erklärung für das Vorkommen schneller sPSCs in Anwesenheit von NBQX und DL-APV in humanen Gliazellen, könnte die krakhaft veränderte Umgebung der Zellen sein, die sich auf die Kinetik der sPSCs auswirkt. In Tabelle 3.11 sind die Parameter der sPSCs aufgelistet. Im Läsionsgewebe wurden keine Messungen in Anwesenheit von NBQX und DL-APV durchgeführt, da die Verfügbarkeit des Gewebes sehr schlecht war.

Tab. 3.11: Parameter der schnellen sPSCs in Anwesenheit von NBQX und DL-APV, gemessen im AHS Gewebe.

Gewebetyp	AHS
Zeitkonstante (<i>tau</i>)	0,5 ± 0,4 ms
Strom (I)	11,0 ± 8,5 pA
Frequenz (F)	0,04 ± 0,03 Hz

Vergleiche der *tau*-Werte, der Amplitude und der Frequenz der sPSCs unter ungeblockten Bedingungen und in Anwesenheit von NBQX und DL-APV, ergaben keine signifikanten Unterschiede.

In Gegenwart von Bicucullin wurden 59 schnelle sPSCs in vier Zellen aus zwei AHS Patienten gemessen. Im Läsionsgewebe wurden in zwei Zellen aus zwei Patienten 78 schnelle sPSCs gemessen. In Tabelle 3.12 sind Parameter der schnellen sPSCs aufgelistet.

Tab. 3.12: Parameter der schnellen sPSCs in Anwesenheit von Bicucullin, gemessen im AHS- und Läsionsgewebe.

Gewebetyp	AHS	Läsion
Zeitkonstante (<i>tau</i>)	0,6 ± 0,4 ms	0,8 ± 0,7 ms
Strom (I)	8,5 ± 4,6 pA	6,5 ± 2,9 pA
Frequenz (F)	0,08 ± 0,07 Hz	0,2 ± 0,2 Hz

Die Parameter der schnellen sPSCs, gemessen in Anwesenheit von Bicucullin, im Vergleich zu denen, die in Anwesenheit von NBQX und DL-APV gemessen wurden, unterschieden sich nicht signifikant.

Signifikante Unterschiede wurden detektiert zwischen den *tau*-Werten der schnellen sPSCs im AHS Gewebe, die in Anwesenheit von Bicucullin und unter ungeblockten Bedingungen gemessen wurden ($P = 0,011$). Der Vergleich der Parameter der schnellen sPSCs, die im Läsionsgewebe in Anwesenheit von Bicucullin und unter ungeblockten Bedingungen gemessen wurden, ergab ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den *tau*-Werten ($P = 0,004$) und den Amplituden ($P = 0,001$). Signifikante Unterschiede gab es auch zwischen den schnellen sPSCs im AHS- und im Läsionsgewebe, die in Anwesenheit von Bicucullin gemessen wurden. Dort unterschieden sich die *tau* Werte ($P = 0,003$) und die Amplituden ($P = 0,002$).

Um zu bestätigen, dass es sich bei den gemessenen Strömen tatsächlich um postsynaptische Ströme an den Gliazellen handelt, die durch eine synaptische Innervation der Zellen hervorgerufen werden, wurde Ionomycin ($3 \mu\text{M}$) appliziert. Ionomycin ist ein Ca^{2+} - Ionophor und erhöht die neuronale Aktivität, indem es die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht, wodurch die Frequenz der Generation von Aktionspotentialen in Neuronen gesteigert wird. Um eine zeitliche Korrelation der Ionomycin-Applikation mit dem Ionomycin-Effekt auf die Frequenz der sPSCs zu erreichen, wurde die Ionomycinlösung fokal und zeitlich begrenzt über das *Octaflow* System 10 s bzw. 30 s auf die Gewebeschnitte appliziert. In einer von drei Zellen (einer von drei AHS Patienten) wurde nach einer 10 s Applikation von Ionomycin eine Steigerung der Frequenz der schnellen sPSCs von 0,133 Hz auf 0,333 Hz beobachtet. In derselben Zelle wurde nach einer 30 s Ionomycin Applikation eine Frequenzsteigerung der schnellen sPSCs von 0,033 Hz auf 0,3 Hz registriert. Langsame sPSCs wurden weder vor, noch nach der Ionomycin-Applikation aufgezeichnet. Der Ionomycin Effekt scheint teilweise reversibel zu sein, da die Frequenz, die nach der ersten 10 s Applikation erhöht wurde, vor der zweiten Applikation wieder gesunken ist. Die Aufnahmedauer betrug acht min (8×1 min lange Aufnahmeeinheiten). Die Frequenzen wurden jeweils vor und nach der Ionomycinapplikation ermittelt. In Abbildung 3.22 sind die Messungen der sPSCs vor und nach der Ionomycin Applikation dargestellt.

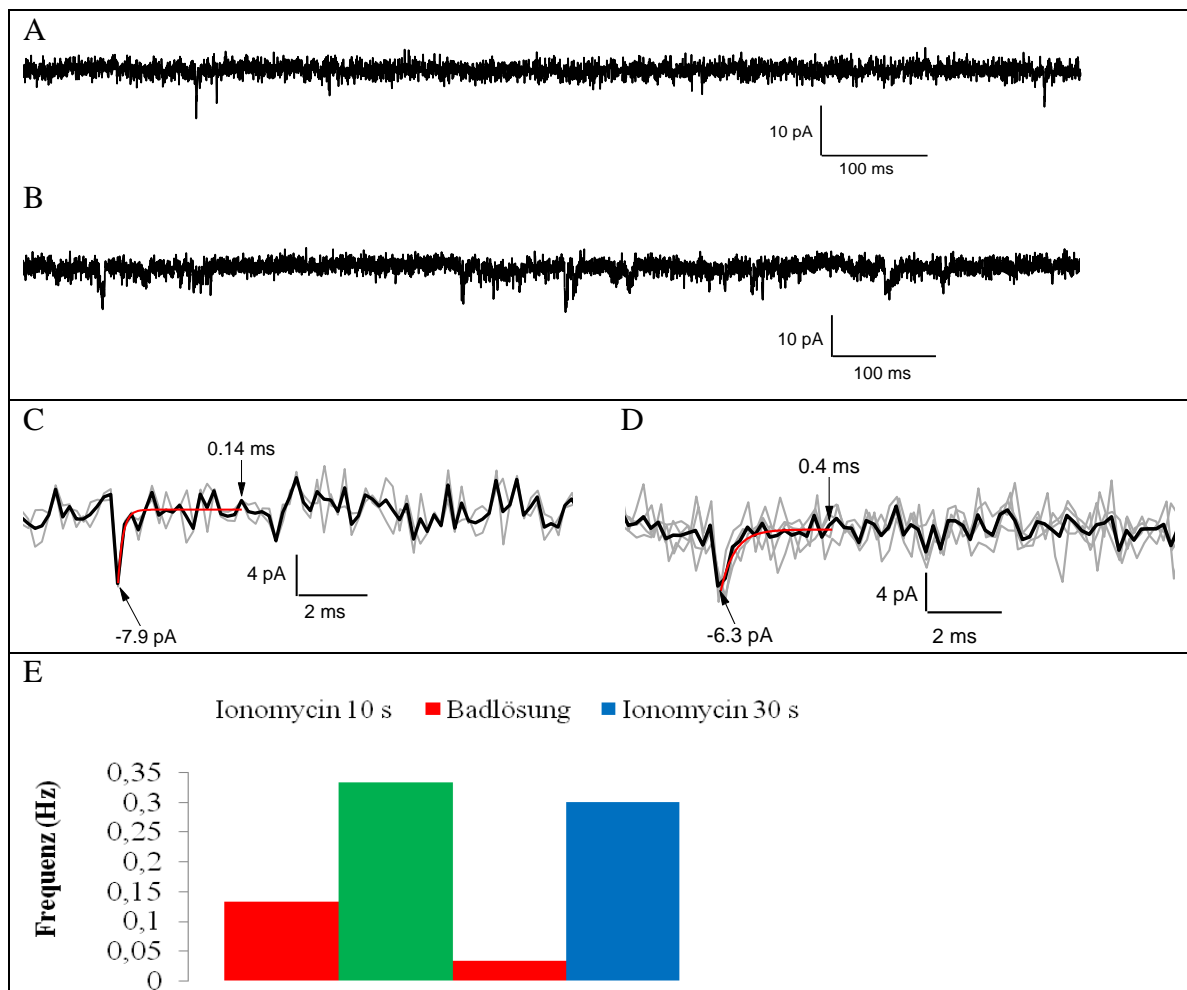


Abb.3.22: Messung synaptischer Innervation im AHS Gewebe vor und nach der Ionomycin Applikation. **A:** Messung der sPSCs vor der Ionomycin Applikation. **B:** Messung der sPSCs nach der Ionomycin Applikation. Die Originalkurven der sPSCs (grau) vor der Ionomycinapplikation (**C**) und in Anwesenheit von Ionomycin (**D**). In schwarz sind die Mittelwertkurven und in rot die gefitteten Kurven dargestellt. **E:** Graphische Darstellung der Steigerung der sPSCs Frequenz.

Im Läsionsgewebe aus einem Patienten wurde in zwei Zellen eine Frequenzsteigerung der schnellen sPSCs beobachtet. In einer der Zellen wurde nach einer 10 s Ionomycin Applikation eine Steigerung der Frequenz von 0,067 Hz auf 0,083 Hz festgestellt. Außerdem wurden nach dieser Applikation 2 langsame sPSCs registriert.

In der zweiten Zelle wurde eine Frequenzsteigerung schon während der 10 s Applikation registriert. Vor der Applikation betrug die Frequenz 0,02 Hz, während der Applikation 0,08 Hz und nach der Applikation 0,38 Hz. Eine zweite Messung der sPSCs nach Ionomycin Applikation (30 s) in dieser Zelle ergab die Werte 0,13 Hz vor, 0,183 Hz während und 0,233 Hz nach der Ionomycin Applikation. Hier wurde ebenfalls ein teilweise reversibler Ionomycin Effekt beobachtet. Die Frequenz vor der zweiten Applikation (0,13 Hz) ist deutlich niedriger als die

nach der ersten Applikation (0,38 Hz). Die Messungen der sPSCs vor und nach Ionomycinapplikation im Läsionsgewebe sind in Abbildung 3.23 dargestellt.

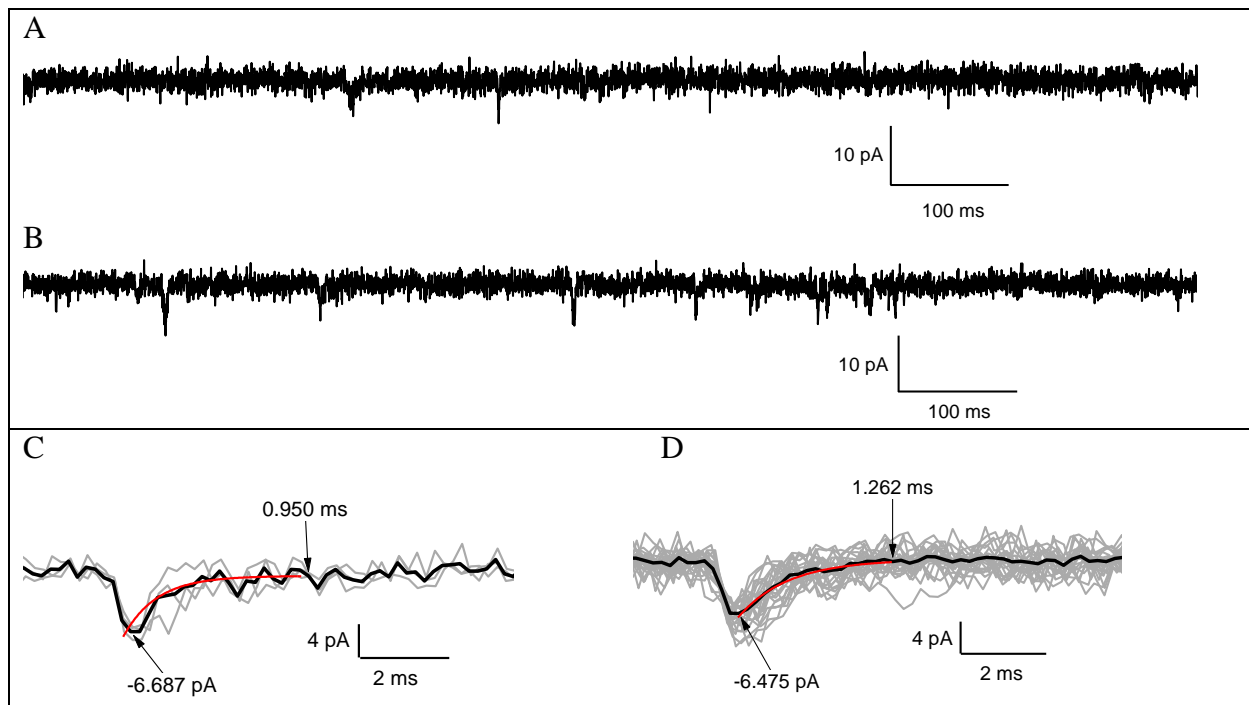


Abb. 3.23: Messung synaptischer Innervation im Läsionsgewebe vor und nach Ionomycin Applikation **A**: Messung der sPSCs vor der Ionomycin Applikation. **B**: Messung der sPSCs nach der Ionomycin Applikation. Die Originalkurven der sPSCs (grau) vor der Ionomycinapplikation (**C**) und in Anwesenheit von Ionomycin (**D**). In schwarz sind die Mittelwertkurven und in rot die gefitteten Kurven dargestellt.

Weiterhin wurde in dieser Zelle eine Messung der sPSCs in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ Bicucullin nach 30 s Ionomycin Applikation gemessen. Die Frequenz vor der Applikation betrug $0,183 \text{ Hz}$, während der Applikation stieg sie auf $0,2 \text{ Hz}$ und nach der Applikation wurde eine Frequenz von $0,383 \text{ Hz}$ festgestellt. Die Messungen der sPSCs vor und nach Applikation von $3 \mu\text{M}$ Ionomycin in Anwesenheit von Bicucullin, sind in Abbildung 3.24 dargestellt.

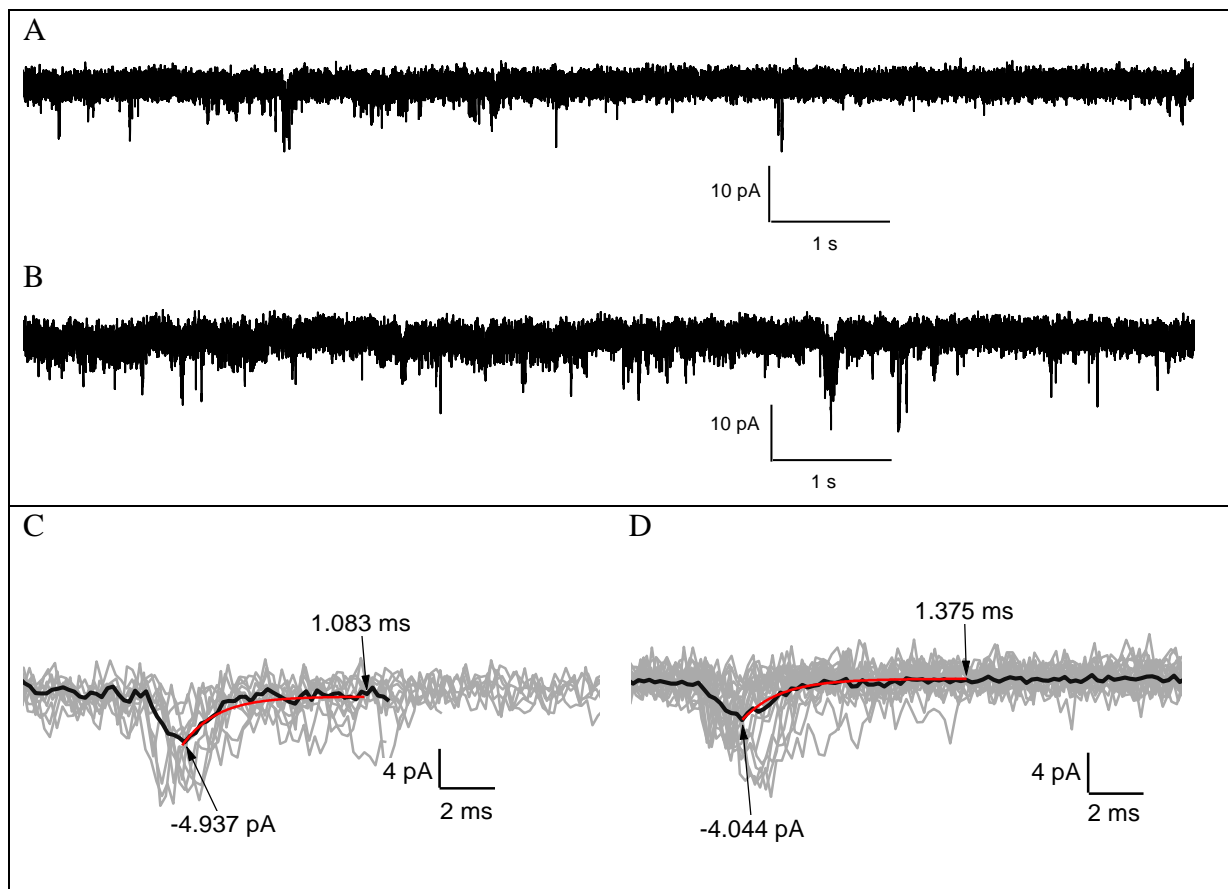


Abb. 3.24 Messung synaptischer Innervation im Läsionsgewebe in Anwesenheit von Bicucullin vor und nach Ionomycin Applikation **A**: Messung der sPSCs vor der Ionomycin Applikation. **B**: Messung der sPSCs nach der Ionomycin Applikation. Die Originalkurven der sPSCs (grau) vor der Ionomycinapplikation (**C**) und in Anwesenheit von Ionomycin (**D**). In schwarz sind die Mittelwertkurven und in rot die gefitteten Kurven dargestellt.

Auf Grund dessen, dass sPSCs sowohl in Anwesenheit von Bicucullin als auch in Anwesenheit von NBQX und DL-APV gemessen werden konnten, ist davon auszugehen, dass die komplexen Gliazellen im humanen Gewebe von sowohl glutamat- als auch GABA-ergen Neuronen innerviert werden. Die Steigerung der Frequenz nach Ionomycin Applikation bestätigt, dass die in komplexen Gliazellen gemessenen sPSCs, durch synaptische Innervation hervorgerufen werden. Es muss darauf hingewiesen werden, dass sich die Kinetik der in Anwesenheit von NBQX und DL-APV gemessenen sPSCs von der Kinetik der sPSCs, die im Gewebe der Maus gemessen wurden (Jabs et al., 2005), unterscheidet. Möglich wäre, dass die krankhaft veränderte Umgebung der humanen Zellen, sich auf die Kinetik der sPSCs auswirkt.

Die Ergebnisse der Messungen synaptischer Innervation an humanen Gliazellen müssen jedoch, auf Grund der niedrigen Anzahl an untersuchten Zellen, als vorläufige Ergebnisse betrachtet werden. Auf Grund der schlechten Verfügbarkeit des humanen Gewebes konnte in dieser Arbeit keine ausführlichere und weiterführende Studie dieser Zellen, hinsichtlich möglicher Ca^{2+} -

Anstiege in den Zellen durchgeführt werden. Die Analyse der synaptischen Innervation humaner komplexer Gliazellen wird jedoch in der Arbeitsgruppe fortgesetzt.

4. Diskussion

Neuron Glia Synapsen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Studien zur Signalübertragung an NG2 Zellen wurde die EYFP-NG2 knockin Maus von Karram et al., (2008) verwendet. In dieser Maus wird auf einem Allel das gelbfluoreszierende EYFP Protein unter Kontrolle des NG2 Promotors exprimiert. So konnte sichergestellt werden, dass ausschließlich NG2 positive Zellen untersucht wurden. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen: (1) NG2 Zellen sind synaptisch innerviert. (2) Sie weisen sPSCs mit zwei verschiedenen Kinetiken auf. (3) NG2 Zellen weisen wiederholt auslösbare Ca^{2+} -Erhöhungen auf, die durch 100 ms kurze Depolarisationen initiiert werden. (4) Diese Ca^{2+} -Erhöhungen lassen sich durch Ni^{2+} reversibel blockieren. (5) Die Änderung der initialen Ca^{2+} -Konzentration in NG2 Zellen bewegt sich im zweistelligen nanomolaren Bereich. (6) Reverse Transkription-PCR Analysen von Einzelzellen identifizieren die Ca_v1 Familie als die am häufigsten in NG2 Zellen vorkommenden Ca_v Kanäle.

Löst die synaptische Innervation intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhungen in NG2 Zellen aus?

NG2 Zellen weisen synaptische Innervation auf. Es wurden sPSCs mit zwei verschiedenen Kinetiken gemessen. Im Hinblick darauf, dass die Kinetiken der in dieser Arbeit gemessenen sPSCs mit den Ergebnissen von Jabs et al., (2005) übereinstimmen, wurde angenommen, dass NG2 Zellen durch GABA- und Glutamat-erge Neurone innerviert werden. Jabs et al. beschreiben, dass sPSCs mit einer schnellen Kinetik ($\tau < 6$ ms) Glutamat-vermittelte und die mit einer langsamen Kinetik ($\tau > 6$ ms) GABA-vermittelte sPSCs sind (Jabs et al., 2005). Der Nachweis der synaptischen Innervation von NG2 Zellen führte zu der wichtigen Frage, ob die geringe Depolarisation der Membran, die für die sPSCs in NG2 Zellen typisch ist, in der Lage ist, Ca_v Kanäle zu aktivieren.

Spannungsänderungen induzieren reversible Ca^{2+} -Erhöhungen

Ca^{2+} -Messungen in Gliazellen sind nicht neu. Bereits 1992 berichteten Kirchhoff und Kettenmann über einen Ca^{2+} -Anstieg nach GABA Applikation in kultivierten Oligodendrozyten Vorläuferzellen (OPCs), die in ihren Membraneigenschaften den NG2 Zellen der Maus ähneln (Kirchhoff und Kettenmann, 1992). In ausgereiften Oligodendrozyten konnte jedoch kein Ca^{2+} -

Anstieg beobachtet werden. Bicucullin, Nifedipin und 0 mM Ca^{2+} im Zellmedium blockierten reversibel die Ca^{2+} -Anstiege. Durch Applikationen von Lösungen mit unterschiedlichen K^{+} -Konzentrationen konnten weiterhin verschiedene Ca^{2+} -Ströme identifiziert werden, was auf die Existenz von verschiedenen Ca^{2+} -Kanaltypen in der Membran der OPCs hindeutete. Diese Studie wurde in Zellkultur durchgeführt und stellte eine Grundlage für weitere Forschungen auf dem Gebiet dar. Akopian et al. (1996) fanden in Gliazellen mit einem komplexem Strommuster zwei unterschiedliche Ca^{2+} -Ströme, die nach ihrer Kinetik und pharmakologischen Eigenschaften unterschieden wurden. Die Verwendung spezifischer Ca^{2+} -Kanal-Blocker wie Amilorid, Cd^{2+} , Nifedipin und ω -Conotoxin GVIA, ermöglichte die Identifizierung von L- und N-Typ Ca^{2+} -Kanälen. In der Arbeit von Akopian et al. wurden die Zellen 10 s lang auf +20 mV depolarisiert, die Aufnahmezeit der Ca^{2+} -Messungen betrug 0,5 Hz. Auf Grund der starken Abnahme der Ströme während elektrophysiologischer Aufnahmen erwies sich eine genaue Charakterisierung der Ca^{2+} -Ströme als problematisch. Dennoch konnten dort zum ersten Mal Ca^{2+} -Ströme in Gliazellen mit einem komplexen Strommuster aus akut isolierten Hirnschnitten gezeigt werden. In Experimenten, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, ist es zum ersten Mal gelungen, Ca^{2+} -Anstiege in NG2 Zellen nach Depolarisation zu detektieren. Unter Durchführung von einem bzw. 15 Puls Depolarisationen der Zelle auf +20 mV, wobei ein einzelner Puls eine Dauer von 100 ms hatte, und der Anwendung von *Calcium Imaging*, das eine hohe Frequenz der Ca^{2+} -Messungen (20 Hz) erlaubte, war es möglich wiederholt auslösbare Ca^{2+} -Erhöhungen zu detektieren, die bis zu 50 min nach Beginn der Messungen beobachtet werden konnten. Die höhere Zeitauflösung der Ca^{2+} -Messungen als bei Akopian et al. (1996) und die längere Auslösbarkeit der Ca^{2+} -Anstiege als bei Akopian (12 min) ermöglichten eine genauere Quantifizierung und Charakterisierung der Ca^{2+} -Erhöhungen in NG2 Zellen.

Charakterisierung der Ca^{2+} -Erhöhungen in NG2 Zellen

Die Existenz von Ca_v Kanälen in den Gliazellen wird in der Literatur bezweifelt (Ge et al., 2006; Carmignoto und Fellin 2006; Tong et al., 2009). Akopian et al. (1996) konnten jedoch Ca^{2+} -Ströme in Gliazellen zeigen. Sie beschreiben Schwellenwerte von -60 mV für die Aktivierung von N-Typ Kanälen und -40 mV für die Aktivierung von L-Typ Kanälen. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Studien weisen ebenfalls eindeutig auf die Beteiligung von Ca_v Kanälen an der Auslösung der Ca^{2+} -Erhöhung in NG2 Zellen hin. Depolarisationen auf +20 mV führten in allen getesteten NG2 Zellen zu intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhungen. Das Maximum der

50 min gemessenen Ca^{2+} -Erhöhungen betrug am Ende der Messungen 54 ± 38 % der Anfangserhöhung. Die basale Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen vor Depolarisation betrug 60 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Diese Konzentrationsangabe ist durchaus mit den in der Literatur für Gliazellen angegebenen Werten vergleichbar. Die Angaben zur Konzentration des Ca^{2+} in den Astrozyten variieren zwischen 30 - 40 nM und 200 - 400 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$, wobei die Schwankungen vermutlich durch die Wahl des verwendeten Ca^{2+} -Indikators und deren Bleicheigenschaften zu erklären sind (Verkhatsky et al. 1998). Die kapazitiven Eigenschaften der Zellen, also die unbekannt löslichen und unlöslichen intrazellulären Ca^{2+} -Puffer, deren Konzentrationen und Ca^{2+} -Affinitäten, sowie die relativ großen Schwankungen bei der Kalibration der Ca^{2+} -Messungen machen eine exakte Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration unmöglich (Verkhatsky et al., 1998). Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen nach Depolarisation lag im zweistelligen nanomolaren Bereich. Nach 15 Puls-Depolarisation betrug der Anstieg 47 ± 67 nM Ca^{2+} . Nach 1 Puls-Depolarisation stieg die Ca^{2+} -Konzentration um $6,8 \pm 1,5$ nM. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine Konzentrationsangabe des einströmenden Ca^{2+} in die NG2 Zellen nach Depolarisation abgeschätzt werden.

Die per Badapplikation von Ni^{2+} (200 μM) erreichte irreversible Blockade der Ca^{2+} -Erhöhung lag vermutlich an der schlechten Auswaschbarkeit des Kations aus dem Hirnschnitt. Eine reversible Blockade der Ca^{2+} -Erhöhung wurde durch eine fokale und zeitlich begrenzte Applikation erreicht (1 mM Ni^{2+}). Die Blockade der Ca^{2+} -Erhöhung durch Ni^{2+} ist ein wichtiger Hinweis auf die Beteiligung von Ca_V Kanälen an den Ca^{2+} -Erhöhungen, denn Ni^{2+} blockiert in höheren Konzentrationen unspezifisch alle Ca_V -Kanäle (Übersicht: Lacinová, 2005). Depolarisationen von NG2 Zellen in nominal Ca^{2+} -freier Badlösung führten zum Ausbleiben intrazellulärer Ca^{2+} -Erhöhungen. Das war ein weiterer Hinweis dafür, dass die Ca^{2+} -Anstiege in den Zellen durch von Außen einfließende Ca^{2+} Ionen hervorgerufen werden.

Einen weiteren Hinweis für die Existenz von Ca_V -Kanälen in NG2 Zellen lieferten die Analysen der reversen Transkription - PCR von Einzelzellen. Die molekularbiologischen Analysen zeigten, dass in 80 % der getesteten Zellen mRNAs für Ca_V1 -Kanäle vorkommen. Ca_V3 -Kanäle sind in 50 % der getesteten NG2 Zellen vertreten. In 10 % der getesteten NG2 Zellen kommen Transkripte für Ca_V2 -Kanäle vor.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ca^{2+} -Anstiege in NG2 Zellen wurden ausgelöst durch eine direkte Depolarisation der Zellmembran. Diese Depolarisation aktivierten Ca_V -Kanäle durch die dann Ca^{2+} in die NG2 Zellen einströmte. Die synaptische Innervation der NG2 Zellen durch GABA-

erge Neurone, bei der die Zellmembran depolarisiert wird, könnte ein möglicher Aktivator der Ca_v Kanäle sein. Es müssten jedoch für diese Art der Depolarisation viele GABA-erge sPSCs in der NG2 Zelle gleichzeitig ausgelöst werden, damit das Membranpotential ausreichend depolarisiert wird, um Ca_v Kanäle zu aktivieren, denn das Ruhemembranpotential der NG2 Zellen ist um 20 - 40 mV negativer, als die Schwellenwerte von -60 mV für die Aktivierung von L-Typ Kanälen und -40 mV für die Aktivierung von N-Typ Kanälen (Akopian et al., 1996).

Zu bedenken ist ebenfalls ein Mechanismus der Ca^{2+} -Erhöhungen in NG2 Zellen, den Tong et al., (2009) vorschlagen. Sie berichten von einem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher (NCX), der durch GABA-induzierte Depolarisation aktiviert wird und durch den Ca^{2+} in die Zellen fließt. Diese Erklärungsvorschläge für Ca^{2+} -Erhöhungen in NG2 Zellen gilt es in weiterführenden Arbeiten der AG zu untersuchen.

Für die Klärung des genauen Mechanismus, der den Ca^{2+} -Erhöhungen in NG2 Zellen zu Grunde liegt, ist es wesentlich zu erwähnen, dass die Anstiege am Ende der 1 Puls Depolarisation (100 ms, + 20 mV) nicht das Maximum erreicht haben, sondern lediglich 75 % des maximalen Anstieges. Das Maximum der Erhöhung wurde erst 1,3 s nach Ende des elektrischen Pulses erreicht. Das deutet auf einen Verstärkungsmechanismus hin, bei dem Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Ausschüttung (*calcium induced calcium release* CICR) (Verhratsky et al., 1998) involviert sein könnte. In Astrozyten ist der Mechanismus der intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhungen bereits gut bekannt. Diese werden dort durch Interaktionen zwischen Ca^{2+} -Transportern, die sich in der Membran der Astrozyten befinden und den zytoplasmatischen Ca^{2+} -Puffern bestimmt (Verhratsky et al., 1998). Zu den Ca^{2+} -Puffern gehören Ca^{2+} -bindende Proteine, die das in die Zelle eintretende Ca^{2+} binden. Das freie zytoplasmatische Ca^{2+} ist dabei lediglich ein kleiner Teil des gesamten intrazellulären Ca^{2+} der Gliazellen. Das meiste Ca^{2+} befindet sich in den Organellen wie dem endoplasmatischen Reticulum (ER), den Mitochondrien und dem Golgi Apparat (Pende et al., 1994). Der wichtigste Mechanismus zur Freisetzung des Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern der Astrozyten beinhaltet die Aktivierung IP_3 gesteuerter Ca^{2+} -Kanäle (Berridge, 1993; Furuichi et al., 1994). In Astrozyten wurde beobachtet, dass der Ca^{2+} -Anstieg eine Folge der Stimulation der afferenten neuronalen Fasern ist. Diese Stimulation führt zur Aktivierung von GPCRs in den Astrozyten und aktiviert eine IP_3 Signalkaskade (Duffy und MacVicar, 1994; Jabs et al., 1994; Porter und McCarthy, 1995; Carmignoto et al., 1998; Nett et al., 2002; Parri und Crunelli, 2003; Beck et al., 2004; Straub et al., 2006). Die Aktivierung IP_3 gesteuerter Kanäle erfordert wiederum die Aktivierung der Phospholipase C, die an einen GPCR

gebunden ist (McCarthy und de Vellis, 1978; van Calcar et al., 1978; Porter and McCarthy, 1997; Verkhratsky et al., 1998). IP₃ vermittelte Ca²⁺-Freisetzung ist eine inzwischen gut untersuchte Form der glialen Antworten auf Ausschüttungen von Neurotransmittern und Neurohormonen (Porter und McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Kang et al., 1998; Araque et al., 2002; Navarrete und Araque, 2008; Perea und Araque, 2005). Hamilton et al., (2008) zeigten, dass ATP induzierte Ca²⁺-Signale in Astrozyten im optischen Nerv durch Thapsigargin blockiert werden können, was auf die Beteiligung der Ca²⁺/ATPase im ER (sarco/endoplasmatische Reticulum Ca²⁺/ATPase, SERCA) hinweist. In Anbetracht dessen, dass spannungsabhängige Ca²⁺- Erhöhungen in NG2 Zellen nach einer Thapsigarginapplikation reduziert werden (Ch. Haberlandt, persönliche Mitteilung), kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die langsame Kinetik der Ca²⁺-Erhöhung in NG2 Zellen durch CICR zu erklären ist. Die reduzierten Ca²⁺-Anstiege nach Thapsigarginapplikation während einer Depolarisation der Zelle lassen die Schlussfolgerung zu, dass die SERCA eine essentielle Rolle bei der Auslösung der Ca²⁺-Erhöhung spielt. Um die in dieser Arbeit gezeigten Effekte der Ca²⁺-Erhöhungen in NG2 Zellen endgültig zu verstehen, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Die Vermutung, dass die Membran von NG2 Zellen durch synaptische Innervation nicht ausreichend depolarisiert wird um die Ca_v Kanäle zu aktivieren (Lin und Bergles, 2004), klingt zunächst plausibel, jedoch wurden bislang keine Experimente durchgeführt, bei denen Ca²⁺-Erhöhungen nach Fasertraktstimulationen gemessen wurden. Messungen der Ca²⁺-Erhöhung nach Fasertraktstimulation in NG2 Zellen müssten mit Hilfe einer hochempfindlichen Technik, wie z.B. Linescan-Messungen mit einem Zwei-Photonen Laser von einem definierten Ausschnitt der Zellfortsätze durchgeführt werden, während gleichzeitiger Fasertraktstimulationen, die zu PSCs der NG2 Zellen führen. So könnte geprüft werden, ob gliale PSCs in der Lage sind, intrazelluläre Ca²⁺-Anstiege auszulösen.

4.1 Physiologische Funktion der NG2 Zellen

NG2 Zellen sind synaptisch innerviert, sie weisen Ca²⁺-Erhöhungen nach Depolarisation auf und haben synapsenähnliche Verbindungen mit Neuronen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Biozytin-gefüllten NG2 positiven GluR Zellen zeigen deutlich synaptische Kontakte zwischen GluR Zellen und Nervenendigungen, die mit Vesikeln gefüllt sind. Diese Tatsachen lassen vermuten, dass an den Neuron - Glia - Synapsen ähnliche Vorgänge statt finden, wie an neuronalen Synapsen. Der Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ in NG2 Zellen könnte zu Änderungen in der Zellphysiologie, der Genexpression oder auch zur Freisetzung neuroaktiver Substanzen

führen (Lin und Bergles, 2002). Weiterhin könnten die Ca^{2+} -Anstiege die Lebensdauer und Differenzierung der NG2 Zellen regulieren (Nishiyama et al., 2008). Die NG2 Zellen sind wegen der großen K^+ -Leitfähigkeit nicht in der Lage Aktionspotentiale zu generieren. Ein Vergleich der komplexen Gliazellen im Läsions- und AHS-Gewebe zeigte, dass die Expression der Flip Isoform von GluR1 in den komplexen Gliazellen aus AHS-Gewebe erhöht war. Diese Erhöhung verlangsamte die Desensitivierung der AMPA Rezeptoren (Seifert et al., 2004). Da diese Desensitivierung die Abklingzeit der PSCs erhöht, können solche Expressionsänderungen der GluR1 Isoform zu einem gesteigerten Ca^{2+} -Einstrom bei jedem Einzel-PSC führen. Es muss nach wie vor geklärt werden, ob die Expressionsänderungen der GluR1 Isoform eine Konsequenz der Sklerose sind oder ob sie an der Entstehung der Krankheit beteiligt sind. Diese Befunde führen aber auch zu der Frage ob NG2 Zellen erst unter pathologischen Bedingungen „aktiviert“ werden und dann die synaptische Innervation ein Signal zur Differenzierung für NG2 Zellen ist. In der weißen Substanz fungieren NG2 positive Zellen als Vorläuferzellen, die während der Entwicklung in Oligodendrozyten differenzieren (Polito et al., 2005, Nishiyama et al., 2008, Dimou et al., 2009). Akopian et al. (1996) stellten außerdem die Frage, ob die Aktivierung von Ca_v Kanälen in Gliazellen mit einem komplexen Strommuster unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen statt findet, denn das Schwellenpotential, bei dem diese Kanäle aktiviert werden, ist 20 mV positiver als das Ruhemembranpotential dieser Zellen.

NG2 positive Zellen kommen sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz lebenslang vor. Studien zeigen, dass NG2 positive Zellen in der weißen Substanz die axonale Aussprossung an den Ranvier'schen Schnürringen begrenzen können durch die Bereitstellung des Oligodendrozyten Myelin Glykoproteins, eines Proteoglykans, das das Neuritenwachstum beeinflusst (Huang et al., 2005). Neue Studien zeigen, dass NG2 positive Zellen auch im Kleinhirn und dem Cortex direkte synaptische Innervation durch Glutamat-erge Neurone erhalten (Paukert et al., 2006). Diese Art der Kommunikation scheint also eine ubiquitäre Eigenschaft der NG2 positiven Zellen in der grauen und weißen Substanz zu sein (Kukley et al. 2008, Ziskin et al., 2007). Weiterführende Experimente von Ca^{2+} -Anstiegen nach Fasertraktstimulationen werden zeigen, ob NG2 Zellen als eine Zellpopulation betrachtet werden sollte, die den Neuronen möglicherweise näher steht, als den Gliazellen. Vorstellbar wäre sogar ein Kommunikationsweg bei dem Gliazellen Signale aussenden, die Ca^{2+} -Erhöhungen in Neuronen auslösen, also eine Glia - Neuron - Interaktion. Sollten tatsächlich Hinweise auf solch eine Kommunikation gefunden werden, was ich nach den Jahren meiner Forschung an NG2 Zellen nicht ausschließen

würde, müsste die Vorstellung von den im Hirngewebe dominierenden Neuronen und den umliegenden NG2 Zellen abgelegt und neu überdacht werden.

Eigenschaften von Gliazellen in Hippokampusresektaten von TLE Patienten

In dieser Arbeit wurden Hippokampusresektate von AHS- und Läsionspatienten hinsichtlich glialer Eigenschaften untersucht. Sowohl im AHS- als auch im Läsionsgewebe wurden komplexe Gliazellen gefunden und hinsichtlich ihrer Membraneigenschaften untersucht. Astrozyten wurden jedoch nur im Läsionsgewebe gefunden und wurden dort auf Kopplung analysiert. Die untersuchten 55 Astrozyten waren durchschnittlich mit 56 ± 71 Zellen gekoppelt. Ein Vergleich der Membraneigenschaften (C_M , R_M und U_R) von komplexen Gliazellen im AHS- und Läsionsgewebe ergab keine signifikanten Unterschiede.

Da die subjektive Auswahl der Zellen durch den Experimentator ein Problem bei der durchgeführten Kopplungsanalyse via Biozytininjektionen in die untersuchten Zellen darstellte, wurden Farbstoffinjektionen in das Hirngewebe durchgeführt. Diese Injektionen stellten eine, von dem Experimentator unabhängige Kopplungsanalyse dar. Die Injektionen wurden im Gewebe von AHS- und Läsionspatienten durchgeführt. Es sollte untersucht werden ob ein Unterschied in der Ausbreitung des Farbstoffes, zwischen dem krankhaft veränderten Gewebe von AHS-Patienten im Vergleich zu dem Gewebe von Läsionspatienten zu finden ist. Die Ausbreitung des Farbstoffes in den AHS- Resektaten war im Vergleich zu den Läsionsresektaten erwartungsgemäß signifikant kleiner und bestätigte die Aussage, dass im AHS Gewebe keine Astrozyten und somit auch keine Kopplung mehr zu finden sind.

Für die Ausbreitung des Farbstoffes wurde eine runde Form erwartet, die bei Kopplungswolken von mit Biozytin gefüllten Zellen üblich ist. Die Ausbreitungswolken der Farbstoffinjektionen hatten jedoch keine runde Form. Trotz der Injektionsrichtung, die im 90° Winkel zur Flussrichtung der Badlösung durch die Messkammer durchgeführt wurde, hatte die Ausbreitungsform eine Vorzugsrichtung, die parallel zu der Flussrichtung der Badlösung war. Diese Vorzugsrichtung lässt vermuten, dass die Form der Ausbreitungswolke des Farbstoffes durch die Flussrichtung und die Flussgeschwindigkeit der Badlösung durch die Perfusionskammer stark beeinflusst wurde. Vermutlich wurde die Aufnahme einer ausreichenden Menge des Farbstoffes in die Zellen, die für eine Weiterleitung innerhalb der Zellen nötig wäre, durch die hohe Flussgeschwindigkeit der Badlösung durch in der Perfusionskammer erschwert.

Deswegen breitete sich der Farbstoff nie in entgegen gesetzter Richtung zur Durchflussrichtung aus, sondern immer nur in die Richtung der Flussrichtung der Badlösung.

Auf Grund dessen, dass das in dieser Arbeit untersuchte Gewebe Epilepsiepatienten entnommen wurde, die sich im Endstadium der Erkrankung befanden, war es unmöglich zeitliche Aspekte der Epileptogenese an humanen Präparaten durchzuführen. Unter Anwendung eines TLE Mausmodells, bei dem intraperitoneale Pilokarpininjektionen durchgeführt wurden, sollte geklärt werden, welche Astrozyten während der Epileptogenese morphologische und funktionelle Veränderungen erfahren und ob sie zum Zeitpunkt der Klassifizierung ihres Strommusters einen veränderten funktionellen Phänotyp aufweisen. Jedoch erwies sich das Mausmodell für die geplanten Studien als ungeeignet. Die Sterberate der injizierten Mäuse war hoch. Sie betrug bei den tg hGFAP-EGFP Mäusen 50 % und bei den C57BL/6 Mäusen 80 %. Die Empfindlichkeit für Pilokarpin variierte zwischen den zwei verwendeten Mauslinien also deutlich. Dies wurde ebenfalls in anderen Arbeiten beobachtet (Shibley und Smith 2002; Borges et al., 2003; Mazarati et al., 2004). Der Verlust von Nervenzellen in der CA1 Region des Hippokampus ist eine Eigenschaft menschlicher Epilepsie, die mit Sklerosen einhergeht. Diesen Nervenzellverlust sollte das Epilepsie - Pilokarpin - Mausmodell ebenfalls aufweisen. Kernfärbungen zur Beantwortung der Frage, ob es im Gewebe von Pilokarpinmäusen zum Nervenzellverlust in der CA1 Region kommt, zeigten jedoch, dass dies nicht der Fall war. Es gibt auch andere Arbeiten, in denen kein Nervenverlust nach Pilokarpininjektion gezeigt werden konnte (Zhang et al., 2002). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in Resektaten von AHS Patienten Astrozyten und somit auch deren Kopplung fehlen. In Hirnschnitten von Pilokarpinmäusen wurden sowohl Astrozyten als auch Kopplung gezeigt. Dies war ein weiterer Hinweis darauf, dass Pilokarpininjektionen keine Sklerose-ähnliche Veränderungen im Hippokampus der Maus bewirken. Diese Ergebnisse machten das Epilepsie - Pilokarpin - Mausmodell für Analysen der Epileptogenese im humanen Gewebe unbrauchbar. Das Modell wurde zugunsten eines anderen TLE Mausmodells beendet, bei dem intrakortikale Kainatinjektionen durchgeführt werden (Theofilas et al., 2009). Zum einen rufen die intrakortikalen Injektionen sichtbare und quantifizierbare Veränderungen im Gewebe der behandelten Mäuse hervor, zum anderen werden Veränderungen nur in der injizierten Hemisphäre hervorgerufen, so dass die veränderte Hemisphäre direkt mit der unveränderten Hemisphäre verglichen werden kann (K. Hüttmann, persönliche Mitteilung).

Komplexe Gliazellen im humanen Hippokampus sind synaptisch innerviert

In akuten Hirnschnittpräparaten der Maus und unter Verwendung des AMPA/Kainat-Rezeptor Antagonisten NBQX, des NMDA-Rezeptor Antagonisten DL-APV und des Antagonisten des ionotropen GABA_A Rezeptors Bicucullin wurde gezeigt, dass GluR Zellen durch glutamat- und GABA-erge Synapsen innerviert werden (Bergles et al., 2000; Lin und Bergles, 2004; Jabs et al., 2005; Overstreet, 2005). In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal sPSCs in humanen komplexen Gliazellen, sowohl im Gewebe von Läsions- als auch von AHS-Patienten detektiert werden. Für sPSCs Messungen wurden die gleichen Antagonisten wie oben beschrieben, verwendet. sPSCs, die in Anwesenheit von NBQX und DL-APV gemessen wurden, wurden vermutlich durch GABA-erge Neurone vermittelt, jedoch unterschieden sich die Kinetiken der in humanem Gewebe gemessenen sPSCs von den Kinetiken der sPSCs, die im Gewebe der Maus gemessen wurden. Die krankhaft veränderte Umgebung der humanen Gliazellen ist vermutlich die Ursache für die veränderten Kinetiken der humanen glialen sPSCs. Die in Anwesenheit von Bicucullin gemessenen sPSCs wurden wahrscheinlich durch glutamaterge Neurone vermittelt. Die geringen Amplituden und Frequenzen dieser sPSCs, die sich zum Teil nur geringfügig von dem Hintergrundrauschen abgehoben haben, hätten Zweifel zulassen können, ob sich bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen tatsächlich um postsynaptische Ströme handelt. Jedoch konnte durch fokale Applikation von Ionomycin die Frequenz der Ereignisse erhöht werden. Ionomycin steigert die neuronale Aktivität, indem es die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht, wodurch die Frequenz der Generation von Aktionspotentialen in Neuronen gesteigert wird. Diese Beobachtung stellte ein deutliches Indiz dafür dar, dass es sich bei den Ereignissen tatsächlich um postsynaptische Ströme handelt. Das in dieser Arbeit verwendete humane AHS- und Läsionsgewebe war krankhaft verändert. Aus diesem Grund und auf Grund der niedrigen Anzahl der Zellen, die untersucht werden konnten, müssen alle Erklärungsversuche bezüglich der physiologischen Funktion der synaptischen Innervation in humanen komplexen Gliazellen mit Vorsicht getätigt werden. Wie schon in Abschnitt 4.1 angesprochen, könnte die synaptische Innervation im pathologischen Gewebe ein Signal zur Differenzierung der Zellen sein. Da in dieser Studie durchweg pathologisches Gewebe verwendet wurde und ein adäquates Tiermodell noch in der Entwicklung ist, werden weitere Studien zur Bedeutung von synaptischer Innervation in humanen komplexen Gliazellen nötig sein. Dennoch handelt es sich hierbei um die ersten Ableitungen dieser Art im humanen Gewebe.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Eigenschaften von Gliazellen im Hippokampus der Maus und des Menschen untersucht.

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich dabei mit der experimentellen Untersuchung der synaptischen Innervation sowie der Ca^{2+} -Erhöhungen nach somatischer Depolarisation in NG2-positiven im Hippocampus der Maus. Die Verwendung einer NG2 EYFP knockin Maus, in der auf einem Allel das gelbfluoreszierende EYFP Protein unter der Kontrolle des NG2 Promotors exprimiert wird, ermöglichte eine eindeutige Identifizierung von NG2 Zellen. Elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass NG2 Zellen sowohl von glutamat- als auch von GABA-ergen Neuronen synaptisch innerviert werden. Eine Kombination dieser Methode mit zeitkorreliertem *Calcium Imaging* (Sampling Rate 20 Hz) zeigte, dass eine somatische Depolarisation der Zellen auf +20 mV (Dauer 100 ms) zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt. Dieser Effekt ließ sich durch fokale Ni^{2+} -Applikation (1 mM) reversibel blockieren und konnte nicht ausgelöst werden, wenn sich im Außenmilieu kein Ca^{2+} befand. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NG2 Zellen über Ca_v Kanäle verfügen. Ein weiterer Hinweis für diese Schlussfolgerung gelang durch den Nachweis von mRNAs, die für die Ca_v1 , Ca_v2 und Ca_v3 Typ Kanäle kodieren, mit Hilfe der reversen Transkription-PCR aus Einzelzellen. Dabei konnte gezeigt werden, dass in 90 % der untersuchten Zellen Transkripte für Ca_v1 Kanäle vorkommen. In 60 % der untersuchten Zellen kommen Transkripte für Ca_v3 Kanäle und in 10 % Transkripte für Ca_v2 Kanäle vor. Die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in den untersuchten NG2 Zellen konnte mit Hilfe der Kalibration der Daten aus dem ratiometrischen *Calcium Imaging* auf 60 nM bestimmt werden. Die reversible Ca^{2+} -Erhöhung in den Zellen betrug 47 ± 67 nM nach einer Serie von 15 Depolarisationspulsen (je Puls 100 ms auf +20 mV). Nach einem Einzelpuls änderte sich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration um $6,8 \pm 1,5$ nM. Hierbei fiel auf, dass das Maximum der Ca^{2+} -Amplitude erst 1,3 s nach Depolarisationsende erreicht war. Es stellt sich die Frage, ob das einströmende Ca^{2+} zu einer verzögerten Amplifikation des Signals durch Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern (CICR) führt. Diese Hypothese gilt es in der Zukunft zu analysieren um eine mögliche Bedeutung der Ca^{2+} -Erhöhung in NG2 Zellen zu klären.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden gliale Eigenschaften in humanen Hippokampusresektaten untersucht. Es wurde beobachtet, dass es im Gewebe von AHS Patienten zu einem Verlust der

Astrozyten und somit zum Verlust der glialen Kopplung kommt. Dieses Ergebnis wurde durch Farbstoffinjektionen in das humane Gewebe bestätigt. Mit Hilfe dieser Methode konnte eine Analyse der astrozytären Kopplung ohne subjektive Auswahl einzelner Zellen durch den Experimentator erfolgen. Die Tatsache, dass für diese Arbeit Gewebe von Epilepsiepatienten untersucht wurde, die sich im Endstadium der Erkrankung befanden, machte es unmöglich, zeitliche Aspekte der Epileptogenese zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollte daher ein TLE Pilokarpin Mausmodell etabliert werden. Die Analyse des Gewebes von Pilokarpinmäusen ergab, dass es dort keinen Verlust von Astrozyten gibt. Die untersuchten Astrozyten wiesen, ebenfalls im Gegensatz zu den Beobachtungen im humanen AHS-Gewebe, Kopplung auf. Zellkernfärbungen im Hippokampus ergaben keine morphologischen Veränderungen des Gewebes. Auf Grund dieser Tatsache wurde dieses Tiermodell für die Untersuchung der Epileptogenese für ungeeignet erklärt und durch ein Modell ersetzt, bei dem intrakortikale Injektion von Kainat zu ähnlichen morphologischen Veränderungen des Hippokampus führen, wie bei humaner TLE.

Schließlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass humane komplexe Gliazellen im Hippokampus synaptisch innerviert sind. Eine pharmakologische Differenzierung zeigte, dass diese Zellen sowohl von glutamat- als auch GABA-ergen Neuronen innerviert werden. Diese Befunde müssen jedoch auf Grund der geringen Verfügbarkeit von humanem Gewebe und der geringen Anzahl der untersuchten Zellen als vorläufige Befunde gelten. Dennoch handelt es sich hierbei um die ersten elektrophysiologischen Ableitungen dieser Art im humanen Gewebe.

5.1 Summary

The aim of this work was to examine the properties of glial cells in the hippocampus of mice and man.

In the first part of this work the experiments focused on the synaptic innervation and the Ca^{2+} -increases upon somatic depolarisation in NG2-positive cells of the mouse hippocampus. Using NG2 EYFP knockin mice, in which one NG2 allele is replaced by the enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) under the control of the NG2 promoter, NG2-positive cells could be identified unambiguously. Electrophysiological measurements have shown that these cells receive synaptic input from glutamate- as well as from GABA-ergic neurons. A combination of this method with time-correlated *calcium imaging* (sampling rate 20 Hz) has also shown that somatic depolarisation of NG2 cells to +20 mV (for 100 ms) leads to an increase in intracellular Ca^{2+} -concentration. This effect could be reversibly blocked by focal nickel applications (1 mM) and could not be evoked when there was no Ca^{2+} in the outside solution. These results suggest that NG2 cells express functionally Ca_V channels. Furthermore, this conclusion was also supported by the detection of mRNA for the Ca_V -channels of type 1,2 and 3 by single-cell reverse transcription - PCR. It has been shown that 90 % of the cells express mRNA for Ca_V1 , 60 % for Ca_V3 and 10 % for Ca_V2 channels. The free intracellular Ca^{2+} -concentration in NG2 cells could be estimated with the calibration of the ratiometric Ca^{2+} -imaging data to 60 nM. The reversible Ca^{2+} -elevation in the cells was 47 ± 67 nM after series of 15 depolarising pulses (100 ms to +20mV per pulse). After a single pulse the intracellular Ca^{2+} -concentration increased to $6,8 \pm 1,5$ nM. Additionally, it was observed that the maximum of the Ca^{2+} -amplitude was achieved 1,3 s after depolarisation. This observation suggests that the Ca^{2+} -influx leads to an amplification of the signal by Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release out of intracellular stores (CICR). This hypothesis has to be examined by future experiments to further clarify to role of Ca^{2+} - increases in NG2-cells.

In the second part of this work properties of glial cells in the tissue of resected human hippocampi were examined. It could be shown that there is a loss of astrocytes in the hippocampus of AHS patients and thus a loss of cell coupling. These results were further verified by injection of dyes into the human tissue. This method enabled us to analyse the astrocytic coupling without subjective selection of individual cells by the experimenter. The fact that only tissue from patients in the latter phase of their disease has been examined excluded the possibility

of the investigation of temporal aspects of epileptogenesis. For this purpose it was intended to establish a TLE pilocarpine mouse model.

Nevertheless, the analysis of tissue from pilocarpine mice has shown no loss of astrocytes. Furthermore, examined astrocytes displayed coupling, which contrasts the observations in the human AHS-tissue. Additional staining of nuclei in the hippocampus of intraperitoneally injected has shown no morphological changes. Based on these observations the TLE pilocarpine model was considered to be inappropriate to study epileptogenesis and was replaced by a model of intracortical kainate injections.

Finally, this work revealed that human complex glial cells in the hippocampus are synaptically innervated. A pharmacological differentiation indicated that complex glial cells receive synaptic input from glutamate- as well as GABA-ergic neurons. Due to the poor availability of human tissue and the low number of investigated cells these findings have to be considered as temporary findings. Nevertheless, these findings represent the first electrophysiologically data for the human tissue.

6. Literaturverzeichnis

Aguirre,A.A.; Chittajallu,R.; Belachew,S.; Gallo,V. "NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus." J.Cell Biol. 165.4 (2004): 575-89.

Akopian,G.; Kressin,K.; Derouiche,A.; Steinhäuser,C. "Identified glial cells in the early postnatal mouse hippocampus display different types of Ca²⁺ currents." Glia. 17.3 (1996): 181-94.

Angulo,M.C.; Kozlov,A.S.; Charpak,S.; Audinat,E. "Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus." Journal of Neuroscience 24.31 (2004): 6920-27.

Araque,A.; Sanzgiri,R.P.; Parpura,V.; Haydon,P.G. "Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission." Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 77.9 (1999): 699-706.

Araque,A. "Astrocytes process synaptic information." Neuron Glia Biol. (2009): 1-8.

Beck,A.; Nieden,R.Z.; Schneider,H.P.; Deitmer,J.W. "Calcium release from intracellular stores in rodent astrocytes and neurons in situ." Cell Calcium 35.1 (2004): 47-58.

Behrens,E.; Zentner,J.; Van Roost,D.; Hufnagel,A.; Elger,C.E.; Schramm,J. "Subdural and depth electrodes in the presurgical evaluation of epilepsy." Acta Neurochirurgica 128 (1994): 84-87.

Ben-Ari,Y. "Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture." Nat.Rev.Neurosci. 3.9 (2002): 728-39.

Ben-Ari,Y. "Basic developmental rules and their implications for epilepsy in the immature brain." Epileptic.Disord. 8.2 (2006): 91-102.

Bennay,M.; Langer,J.; Meier,S.D.; Kafitz,K.W.; Rose,C.R. "Sodium signals in cerebellar Purkinje neurons and Bergmann glial cells evoked by glutamatergic synaptic transmission." Glia. 56.10 (2008): 1138-49.

Bergles,D.E.; Jahr,C.E. "Excitatory synapses on non-neuronal cells: AMPA receptor signaling in hippocampal astrocytes. Soc.Neurosci.Abstr. 25, 1797. 1999. Ref Type: Generic

Bergles,D.E.; Roberts,J.D.; Somogyi,P.; Jahr,C.E. "Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus." Nature. 405.6783 (2000): 187-91.

Berridge,M. J. "Inositol trisphosphate and calcium signalling." Nature 361 (1993): 315-25.

Bevan,S.; Raff,M. "Voltage-dependent potassium currents in cultured astrocytes." Nature 315 (1985): 229-32.

Bliss,T.V.P.; Lomo,T. "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." Journal of Physiology 232 (1973): 331-56.

Blümcke,I.; Beck,H.; Lie,A.A.; Wiestler,O.D. "Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy." Epilepsy Res. 36.2-3 (1999): 205-23.

Blümcke,I.; Thom,M.; Wiestler,O.D. "Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy." Brain Pathol. 12.2 (2002): 199-211.

Blümcke,I.; Pauli,E.; Clusmann,H.; Schramm,J.; Becker,A.; Elger,C.; Merschhemke,M.; Meencke,H.J.; Lehmann,T.; von,Deimling A.; Scheiwe,C.; Zentner,J.; Volk,B.; Romstock,J.; Stefan,H.; Hildebrandt,M. "A new clinico-pathological classification system for mesial temporal sclerosis." Acta Neuropathol.(Berl). 113.3 (2007): 235-44.

Borges,K.; Gearing,M.; McDermott,D.L.; Smith,A.B.; Almonte,A.G.; Wainer,B.H.; Dingledine,R. "Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model." Exp.Neurol. 182.1 (2003): 21-34.

Bouilleret,V.; Ridoux,V.; Depaulis,A.; Marescaux,C.; Nehlig,A.; Le Gal La,Salle G. "Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy." Neuroscience. 89.3 (1999): 717-29.

Bowman,C.L.; Kimelberg,H.K. "Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture." Nature 311 (1984): 656-59.

Butt, A. M. "Neurotransmitter-mediated calcium signalling in oligodendrocyte physiology and pathology." Glia. 54.7 (2006): 666-75.

Carmignoto,G.; Pasti,L.; Pozzan,T. "On the role of voltage-dependent calcium channels in calcium signaling of astrocytes *in situ*." Journal of Neuroscience 18.12 (1998): 4637-45.

Carmignoto, G.; Fellin, T. "Glutamate release from astrocytes as a non-synaptic mechanism for neuronal synchronization in the hippocampus." J.Physiol Paris. 99.2-3 (2006): 98-102.

Catterall, W. A. "From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels." Neuron 26.1 (2000): 13-25.

Catterall,W.A.; Perez-Reyes,E.; Snutch,T.P.; Striessnig,J. "International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels." Pharmacol.Rev. 57.4 (2005): 411-25.

Christie,B.R.; Eliot,L.S.; Ito,K.-I.; Miyakawa,H.; Johnston,D. "Different Ca²⁺ channels in soma and dendrites of hippocampal pyramidal neurons mediate spike-induced Ca²⁺ influx." Journal of Neurophysiology 73 (1995): 2553-57.

- Clements, J. D.; Bekkers, J. M. "Detection of spontaneous synaptic events with an optimally scaled template." Biophys.J. 73.1 (1997): 220-29.
- Dawson,M.R.L.; Polito,A.; Levine,J.M.; Reynolds,R. "NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS." Mol.Cell Neurosci. 24.2 (2003): 476-88.
- Deitmar,J.W. und Schild,D.(eds) "Ca²⁺ und pH Ionenmessungen in Zellen und Geweben" Spektrum, Akad. Verl. GmbH – Heidelberg · Berlin (2000)
- de Lanerolle, N.C.; Kim, J.H.; Robbins, R.J.; Spencer, D.D. "Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy." Brain Res. (1989) 495, 387–395.
- Dietrich,D.; Clusmann,H.; Kral,T., Steinhäuser,C.; Blümcke,I.; Heinemann,U.; Schramm,J. "Two electrophysiologically distinct types of granule cells in epileptic human hippocampus." Neuroscience. 90.4 (1999): 1197-206.
- Dimou,L.; Simon,C.; Kirchhoff,F.; Takebayashi,H.; Gotz,M. "Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex." Journal of Neuroscience 28.41 (2008): 10434-42.
- Dingledine,R.; Borges,K.; Bowie,D.; Traynelis,S.F. "The glutamate receptor ion channels." Pharmacological Reviews 51 (1999): 7-61.
- Duffy,S.; MacVicar,B.A. "Potassium-dependent calcium influx in acutely isolated hippocampal astrocytes." Neuroscience 61 (1994): 51-61.
- Elger,C.E.; Schramm, J." The surgical treatment of epilepsy. Radiologe." 33 (1993) 165–171.
- Fellin,T.; Pascual,O.; Gobbo,S.; Pozzan,T.; Haydon,P.G.; Carmignoto,G. "Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors." Neuron. 43.5 (2004): 729-43.
- Furuichi,T.; Furutama,D.; Hakamata,Y.; Nakai,J.; Takeshima,H.; Mikoshiba,K. "Multiple types of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels are differentially expressed in rabbit brain." Journal of Neuroscience 14 (1994): 4794-805.
- Gallo,V.; Mangin,J.M.; Kukley,M.; Dietrich,D. "Synapses on NG2-expressing progenitors in the brain: multiple functions?" J.Physiol 586.16 (2008): 3767-81.
- Ge,W.P.; Yang,X.J.; Zhang,Z.; Wang,H.K.; Shen,W.; Deng,Q.D.; Duan,S. "Long-term potentiation of neuron-glia synapses mediated by Ca²⁺-permeable AMPA receptors." Science. 312.5779 (2006): 1533-37.
- Giaume,C.; Taberner,A.; Medina,J.M. "Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions." Glia 21.1 (1997): 114-23.

- Greenwood,K.; Butt,A.M. "Evidence that perinatal and adult NG2-glia are not conventional oligodendrocyte progenitors and do not depend on axons for their survival." Mol.Cell Neurosci. 23.4 (2003): 544-58.
- Grynkiewicz,G.; Poenie,M.; Tsien,R.Y. "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J.Biol.Chem. 260.6 (1985): 3440-50.
- Hamill,O.P.; Marty,A.; Neher,E.; Sakman,B.; Sigworth,F.J "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Archiv European Journal of Physiology 391 (1981): 85-100.
- Hamilton,N.; Hubbard,P.S.; Butt,A.M. "Effects of glutamate receptor activation on NG2-glia in the rat optic nerve." J.Anat. 214.2 (2009): 208-18.
- Hamilton,N.; Vayro,S.; Kirchhoff,F.; Verkhratsky,A.; Robbins,J.; Gorecki,D.C.; Butt,A.M. "Mechanisms of ATP- and glutamate-mediated calcium signaling in white matter astrocytes." Glia. 56.7 (2008): 734-49.
- Hansson,E.; Muyderman,H.; Leonova,J.; Allansson,L.; Sinclair,J.; Blomstrand,F.; Thorlin,T.; Nilsson,M.; Ronnback,L. "Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication." Neurochem Int 37.2-3 (2000): 317-29.
- Haydon,P.G. "GLIA: listening and talking to the synapse." Nat.Rev.Neurosci 2.3 (2001): 185-93.
- Haydon,P.G.; Carmignoto,G. "Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling." Physiol Rev. 86.3 (2006): 1009-31.
- Horner,P.J.; Power,A.E.; Kempermann,G.; Kuhn,H.G.; Palmer,T.D.; Winkler,J.; Thal,L.J.; Gage,F.H. "Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord." Journal of Neuroscience 20.6 (2000): 2218-28.
- Huang, Y.; Man,H.Y.; Sekine-Aizawa,Y.; Han,Y.; Juluri,K.; Luo,H.; Cheah,J.; Lowenstein,C.; Haganir,R.L.; Snyder,S.H. "S-nitrosylation of N-ethylmaleimide sensitive factor mediates surface expression of AMPA receptors." Neuron 46.4 (2005): 533-40.
- Jabs,R.; Kirchhoff,F.; Kettenmann,H.; Steinhäuser,C. "Kainate activates Ca(2+)-permeable glutamate receptors and blocks voltage-gated K⁺ currents in glial cells of mouse hippocampal slices." Pflugers Arch. 426.3-4 (1994): 310-19.
- Jabs,R.; Pivneva,T.; Hüttmann,K.; Wyczynski,A.; Nolte,C.; Kettenmann,H.; Steinhäuser,C. "Synaptic transmission onto hippocampal glial cells with hGFAP promoter activity." J.Cell Sci. 118.Pt 16 (2005): 3791-803.
- Joksovic,P.M.; Weiergraber,M.; Lee,W.; Struck,H.; Schneider,T.; Todorovic,S.M. "Isoflurane-sensitive presynaptic R-type calcium channels contribute to inhibitory synaptic transmission in the rat thalamus." J.Neurosci. 29.5 (2009): 1434-45.

- Jonas,P.; Burnashev,N. "Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA- type glutamate receptor channels." Neuron 15 (1995): 987-90.
- Kandel,E.R.; Schwartz,J.H.; Jessell,T.M. (eds) "Neurowissenschaften - Eine Einführung" Spektrum, Akad. Verl. GmbH – Heidelberg · Berlin · Oxford (1996)
- Kang,J., Jiang,L.; Goldman,S.A.; Nedergaard,M. "Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission." Nat.Neurosci. 1.8 (1998): 683-92.
- Karram,K.; Chatterjee,N. ; Trotter,J. "NG2-expressing cells in the nervous system: role of the proteoglycan in migration and glial-neuron interaction." J.Anat. 207.6 (2005): 735-44.
- Karram,K.; Goebels,S.; Schwab,M.; Jennissen,K.; Seifert,G.; Steinhäuser,C.; Nave,K.A.; Trotter,J. "NG2-expressing cells in the nervous system revealed by the NG2-EYFP-knockin mouse." Genesis. 46.12 (2008): 743-57.
- Kettenmann,H.; Hoppe,D.; Gottmann,K.; Banati,R.; Kreutzberg,G. "Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages." _ 1-21.
- Kettenmann,H.; Banati,R.; Walz,W. "Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages." _ 1-21.
- Kettenmann, H. "Electrophysiological behavior of microglia." Neuropathol.Appl.Neurobiol. 20.2 (1994): 177-78.
- Kimelberg,H.K. "The problem of astrocyte identity." Neurochem Int 45.2-3 (2004): 191-202.
- Kirchhoff,F., Kettenmann,H. "GABA Triggers a [Ca²⁺]_i Increase in Murine Precursor Cells of the Oligodendrocyte Lineage." Eur.J.Neurosci. 4.11 (1992): 1049-58.
- Knopfel,T.; Grandes,P. "Metabotropic glutamate receptors in the cerebellum with a focus on their function in Purkinje cells." Cerebellum. 1.1 (2002): 19-26.
- Hofmann,F.; Biel,M.; Flockerzi,V. "Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity." Annual Review of Neuroscience 17 (1994): 399-418.
- Kubova,H.; Druga,R.; Lukasiuk,K.; Suchomelova,L.; Haugvicova,R.; Jirmanova,I.; Pitkanen,A. "Status epilepticus causes necrotic damage in the mediodorsal nucleus of the thalamus in immature rats." J.Neurosci. 21.10 (2001): 3593-99.
- Kukley,M.; Kiladze,M.; Tognatta,R.; Hans,M.; Swandulla,D.; Schramm,J.; Dietrich,D. "Glial cells are born with synapses." FASEB J. 22 (2008): 2957-69.
- Lacinova,L. "Voltage-dependent calcium channels." Gen.Physiol Biophys. 24 Suppl 1:1-78. (2005): 1-78.

- Lambolez,B.; Audinat,E.; Bochet,P.; Crepel,F.; Rossier,J. "AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells." Neuron. 9.2 (1992): 247-58.
- Levine,J.M.; Nishiyama,A. "The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells." Perspect.Dev.Neurobiol. 3.4 (1996): 245-59.
- Lin,S.C.; Bergles,D.E. "Physiological characteristics of NG2-expressing glial cells." J.Neurocytol. 31.6-7 (2002): 537-49.
- Lin,S.C.; Bergles,D.E. "Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus." Nat.Neurosci. 7.1 (2004): 24-32.
- Lin,S.C.; Bergles,D.E. "Synaptic signaling between neurons and glia." Glia. 47.3 (2004): 290-98.
- Lin,S.C.; Huck,J.H.; Roberts,J.D.; Macklin,W.B.; Somogyi,P.; Bergles,D.E. "Climbing fiber innervation of NG2-expressing glia in the mammalian cerebellum." Neuron. 46.5 (2005): 773-85.
- Liu,X.; Wang,Q.; Haydar,T.F.; Bordey,A. "Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors." Nature Neuroscience 8.9 (2005): 1179-87.
- Ma,D.L.; Tang,Y.C.; Chen,P.M.; Chia,S.C.; Jiang,F.L.; Burgunder,J.M.; Lee,W.L.; Tang,F.R. "Reorganization of CA3 area of the mouse hippocampus after pilocarpine induced temporal lobe epilepsy with special reference to the CA3-septum pathway." J.Neurosci.Res. 83.2 (2006): 318-31.
- Matsui,K.; Jahr,C.E. "Differential control of synaptic and ectopic vesicular release of glutamate." Journal of Neuroscience 24.41 (2004): 8932-39.
- Matthias,K.; Kirchhoff,F.; Seifert,G.; Hüttmann,K.; Matyash,M.; Kettenmann,H.; Steinhäuser,C. "Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus." J.Neurosci. 23.5 (2003): 1750-58.
- Mazarati,A.; Lu,X.; Shinmei,S.; Badie-Mahdavi,H.; Bartfai,T. "Patterns of seizures, hippocampal injury and neurogenesis in three models of status epilepticus in galanin receptor type 1 (GalR1) knockout mice." Neuroscience 128.2 (2004): 431-41.
- McCarthy,K.D.; de,Vellis,J. "Alpha-adrenergic receptor modulation of beta-adrenergic, adenosine and prostaglandin E1 increased adenosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in primary cultures of glia." J.Cyclic.Nucleotide.Res. 4.1 (1978): 15-26.
- Miyamoto,E. "Molecular Mechanism of Neuronal Plasticity: Induction and Maintenance of Long-Term Potentiation in the Hippocampus." Journal of Pharmacological Sciences 100.5 (2006): 433-42.
- Moreno,A.P. "Biophysical properties of homomeric and heteromultimeric channels formed by cardiac connexins." Cardiovasc.Res. 62.2 (2004): 276-86.

- Neher,E.; Augustine,G.J. "Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells." J.Physiol. 450:273-301. (1992): 273-301.
- Navarrete,M.; Araque,A "Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication." Neuron 57.6 (2008): 883-93.
- Nedergaard,M. "Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells." Science 263 (1994): 1768-71.
- Nett,W.J.; Oloff,S.H.; McCarthy,K.D. "Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity." Journal of Neurophysiology 87.1 (2002): 528-37.
- Newman,E.A.; Frambach,D.A.; Odette,L.L. "Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning." Science 225.4667 (1984): 1174-75.
- Newman,E.A. "Glial modulation of synaptic transmission in the retina." Glia 47.3 (2004): 268-74.
- Niehaus,A.; Stegmuller,J.; Diers-Fenger,M.; Trotter,J. "Cell-surface glycoprotein of oligodendrocyte progenitors involved in migration." Journal of Neuroscience 19.12 (1999): 4948-61.
- Nimmerjahn,A.; Kirchhoff,F.; Helmchen,F. "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." Science. 308.5726 (2005): 1314-18.
- Nishiyama,A.; Dahlin,K.J.; Stallcup,W.B. "The expression of NG2 proteoglycan in the developing rat limb." Development. 111.4 (1991): 933-44.
- Nishiyama,A.; Watanabe,M.; Yang,Z.; Bu,J. "Identity, distribution, and development of polydendrocytes: NG2-expressing glial cells." J.Neurocytol. 31.6-7 (2002): 437-55.
- Nishiyama,A.; Komitova,M.; Suzuki,R.; Zhu,X. "Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity." Nat.Rev.Neurosci. 10.1 (2009): 9-22.
- Nolte,C.; Matyash,M.; Pivneva,T.; Schipke,C.G.; Ohlemeyer,C.; Hanisch,U.K.; Kirchhoff,F.; Kettenmann,H. "GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue." Glia 33.1 (2001): 72-86.
- Oliet,S.H.; Piet,R.; Poulain,D.A.; Theodosis,D.T. "Glial modulation of synaptic transmission: Insights from the supraoptic nucleus of the hypothalamus." Glia 47.3 (2004): 258-67.
- Orkand,R.K.; Nicholls,J.G.; Kuffler,S.W. "Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia." J Neurophysiol 29.4 (1966): 788-806.
- Overstreet,L.S. "Quantal transmission: not just for neurons." Trends Neurosci. 28.2 (2005): 59-62.

- Parpura,V.; Basarsky,T.A.; Liu,F.; Jeftinija,K.; Jeftinija,S.; Haydon,P.G. "Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling." Nature 369.6483 (1994): 744-47.
- Parri,H.R.; Gould,T.M.; Crunelli,V. "Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation." Nat.Neurosci 4.8 (2001): 803-12.
- Parri,R.; Crunelli,V. "An astrocyte bridge from synapse to blood flow." Nat.Neurosci. 6.1 (2003): 5-6.
- Partin,K.M.; Patneau,D.K.; Winters,C.A.; Mayer,M.L.; Buonanno,A. "Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A." Neuron 11 (1993): 1069-82.
- Pascual,O.; Casper,K.B.; Kubera,C.; Zhang,J.; Revilla-Sanchez,R.; Sul,J.Y.; Takano,H.; Moss,S.J.; McCarthy,K.; Haydon,P.G. "Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks." Science 310.5745 (2005): 113-16.
- Pasti,L.; Volterra,A.; Pozzan,T.; Carmignoto,G. "Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ." Journal of Neuroscience 17.20 (1997): 7817-30.
- Paukert,M.; Bergles,D.E. "Synaptic communication between neurons and NG2+ cells." Curr.Opin.Neurobiol. 16.5 (2006): 515-21.
- Pende,M.; Holtzclaw,L.A.; Curtis,J.L.; Russell,J.T.; Gallo,V. "Glutamate regulates intracellular calcium and gene expression in oligodendrocyte progenitors through the activation of DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: (1994): 3215-3219.
- Peng,Z.; Houser,C.R. "Temporal patterns of fos expression in the dentate gyrus after spontaneous seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy." J.Neurosci. 25.31 (2005): 7210-20.
- Perea,G.; Araque,A. "Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes." J.Neurosci. 25.9 (2005): 2192-203.
- Peters,A. "A fourth type of neuroglial cell in the adult central nervous system." J.Neurocytol. 33.3 (2004): 345-57.
- Polito,A.; Reynolds,R. "NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system." J.Anat. 207.6 (2005): 707-16.
- Porter,J.T.; McCarthy,K.D. "GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligands with increases in (Ca²⁺)_i." Glia 13 (1995): 101-12.
- Porter,J.T.; McCarthy,K.D. "Hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamate released from synaptic terminals." Journal of Neuroscience 16 (1996): 5073-81.

- Porter, J.T.; McCarthy, K.D. "Astrocytic neurotransmitter receptors *in situ* and *in vivo*." Progress in Neurobiology 51 (1997): 439-55.
- Sankar, R.; Shin, D.H.; Liu, H.; Mazarati, A.; Pereira, de, V.; Wasterlain, C.G. "Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences." J.Neurosci. 18.20 (1998): 8382-93.
- Schneider, S.; Bosse, F.; D'Urso, D.; Muller, H.; Sereda, M.W.; Nave, K.; Niehaus, A.; Kempf, T.; Schnolzer, M.; Trotter, J. "The AN2 protein is a novel marker for the Schwann cell lineage expressed by immature and nonmyelinating Schwann cells." J Neurosci 21.3 (2001): 920-33.
- Seifert, G.; Steinhäuser, C. "Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca²⁺ permeability." European Journal of Neuroscience 7 (1995): 1872-81.
- Seifert, G.; Zhou, M.; Steinhäuser, C. "Analysis of AMPA receptor properties during postnatal development of mouse hippocampal astrocytes." Journal of Neurophysiology 78.6 (1997): 2916-23.
- Seifert, G.; Hüttmann, K.; Schramm, J.; Steinhäuser, C. "Enhanced relative expression of glutamate receptor 1 flip AMPA receptor subunits in hippocampal astrocytes of epilepsy patients with Ammon's horn sclerosis." J.Neurosci. 24.8 (2004): 1996-2003.
- Seifert, G.; Hüttmann, K.; Binder, D.K.; Hartmann, C.; Wyczynski, A.; Neusch, C.; Steinhäuser, C. "Analysis of astroglial K⁺ channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4.1 subunit." Journal of Neuroscience 29.23 (2009): 7474-88.
- Shibley, H.; Smith, B.N. "Pilocarpine-induced status epilepticus results in mossy fiber sprouting and spontaneous seizures in C57BL/6 and CD-1 mice." Epilepsy Res. 49.2 (2002): 109-20.
- Somjen, G.G. "Nervenkit: notes on the history of the concept of neuroglia." Glia. 1.1 (1988): 2-9.
- Sommer, B.; Keinänen, K.; Verdoorn, T.A.; Wisden, W.; Burnashev, N.; Herb, A.; Köhler, M.; Takagi, T.; Sakmann, B.; Seeburg, P.H. "Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS." Science 249 (1990): 1580-85.
- Stallcup, W.B. "The NG2 antigen, a putative lineage marker: immunofluorescent localization in primary cultures of rat brain." Developmental Biology 83.1 (1981): 154-65.
- Stallcup, W.B. "The NG2 proteoglycan: Past insights and future prospects." J.Neurocytol. 31.6-7 (2002): 423-35.
- Stegmüller, J.; Schneider, S.; Hellwig, A.; Garwood, J.; Trotter, J. "AN2, the mouse homologue of NG2, is a surface antigen on glial precursor cells implicated in control of cell migration." J.Neurocytol. 31.6-7 (2002): 497-505.

- Stegmüller,J.; Werner,H.; Nave,K.A.; Trotter,J. "The proteoglycan NG2 is complexed with alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by the PDZ glutamate receptor interaction protein (GRIP) in glial progenitor cells. Implications for glial-neuronal signaling." J.Biol.Chem. 278.6 (2003): 3590-98.
- Steinhäuser,C.; Berger,T.; Frotscher,M.; Kettenmann,H. "Heterogeneity in the membrane current pattern of identified glial cells in the hippocampal slice." European Journal of Neuroscience 4 (1992): 472-84.
- Steinhäuser,C.; Kressin,K.; Kuprijanova,E.; Weber,M.; Seifert,G. "Properties of voltage-activated sodium and potassium currents in mouse hippocampal glial cells in situ and after acute isolation from tissue slices." Pflugers Archiv European Journal of Physiology 428 (1994): 610-20.
- Straub,S.V.; Bonev,A.D.; Wilkerson,M.K.; Nelson,M.T. "Dynamic Inositol Trisphosphate-mediated Calcium Signals within Astrocytic Endfeet Underlie Vasodilation of Cerebral Arterioles." The Journal of General Physiology 128.6 (2006): 659-69.
- Streit,W.J.; Conde,J.R.; Fendrick,S.E.; Flanary,B.E.; Mariani,C.L. "Role of microglia in the central nervous system's immune response." Neurological Research 27 (2005): 685-91.
- Suzuki,F.; Junier,M.P.; Guilhem,D.; Sorensen,J.C.; Onteniente,B. "Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor." Neuroscience 64.3 (1995): 665-74.
- Swanson,J.M. "Long-acting stimulants: development and dosing." Can.Child Adolesc.Psychiatr.Rev. 14.Supplement 1 (2005): 4-9.
- Theis,M.; Sohl,G.; Eiberger,J.; Willecke,K. "Emerging complexities in identity and function of glial connexins." Trends Neurosci. 28.4 (2005): 188-95.
- Theofilas,P.; Bedner,P.; Hüttmann,K.; Theis,M.; Steinhäuser,C.; Frank,S. "The proapoptotic BCL-2 homology domain 3-only protein Bim is not critical for acute excitotoxic cell death." J Neuropathol Exp Neurol. 68.1 (2009): 102-10.
- Tong,X.P.; Li,X.Y.; Zhou,B.; Shen,W.; Zhang,Z.J.; Xu,T.L.; Duan,S. "Ca²⁺ signaling evoked by activation of Na⁺ channels and Na⁺/Ca²⁺ exchangers is required for GABA-induced NG2 cell migration." The Journal of Cell Biology 186.1 (2009): 113-28.
- Tozuka,Y.; Fukuda,S.; Namba,T.; Seki,T.; Hisatsune,T. "GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells." Neuron 47.6 (2005): 803-15.
- Tsien,R.W.; Lipscombe,D.; Madison,D.; Bley,K.; Fox,A. "Reflections on Ca²⁺-channel diversity, 1988-1994." Trends in Neurosciences 18 (1995): 52-54.
- Turski,W.A.; Cavalheiro,E.A.; Schwarz,M.; Czuczwar,S.J.; Kleinrok,Z.; Turski,L. "Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study." Behav.Brain Res. 9.3 (1983): 315-35.

- Turski,W.A.; Cavalheiro,E.A.; Bortolotto,Z.A.; Mello,L.M.; Schwarz,M.; Turski,L. "Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis." Brain Res. 321.2 (1984): 237-53.
- Usovich,M.M.; Gallo,V.; Cull-Candy,S.G. "Multiple conductance channels in type-2 cerebellar astrocytes activated by excitatory amino acids." Nature 339 (1989): 380-83.
- van Calker,D.; Müller,M.; Hamprecht,B. "Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells." Nature. 276.5690 (1978): 839-41.
- Verkhratsky,A.; Orkand,R.K.; Kettenmann,H. "Glial calcium: homeostasis and signaling function." Physiol Rev. 78.1 (1998): 99-141.
- Verkhratsky,A.; Steinhäuser,C. "Ion channels in glial cells." Brain Research Reviews 32.2-3 (2000): 380-412.
- Vesce,S.; Bezzi,P.; Volterra,P. "The active role of astrocytes in synaptic transmission." Cell Mol.Life Sci. 56.11-12 (1999): 991-1000.
- Volcy Gomez,M. "Mesial temporal lobe epilepsy: its physiopathology, clinical characteristics, treatment and prognosis." Rev.Neurol. 38.7 (2004): 663-67.
- Volterra,A.; Meldolesi,J. "Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues." Nat.Rev.Neurosci. 6.8 (2005): 626-40.
- Volterra,A.; Steinhäuser,C. "Glial modulation of synaptic transmission in the hippocampus." Glia 47.3 (2004): 249-57.
- Wallraff,A.; Odermatt,B.; Willecke,K.; Steinhäuser,C. "Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling." Glia 48.1 (2004): 36-43.
- Walz, W. "Chloride/anion channels in glial cell membranes." Glia 40.1 (2002): 1-10.
- Walz,W. (edr) „Neuromethods, Vol 38, Patch-Clamp-Analysis: Advanced Techniques” second edition, chapter 13. Human Press Inc., Totowa, NJ (2007)
- Wigley,R.; Hamilton,N.; Nishiyama,A.; Kirchhoff,F.; Butt,A.M. "Morphological and physiological interactions of NG2-glia with astrocytes and neurons." J.Anat. 210.6 (2007): 661-70.
- Yu,F.H.; Catterall,W.A. "The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis." Sci.STKE. 2004.253 (2004): re15.
- Zhang,X.; Cui,S.S.; Wallace,A.E.; Hannesson,D.K.; Schmued,L.C.; Saucier,D.M.; Honer,W.G.; Corcoran,M.E. "Relations between brain pathology and temporal lobe epilepsy." Journal of Neuroscience 22.14 (2002): 6052-61.

Zhang,S.; Khanna,S.; Tang,F.R. "Patterns of hippocampal neuronal loss and axon reorganization of the dentate gyrus in the mouse pilocarpine model of temporal lobe epilepsy." J.Neurosci.Res. 87.5 (2009): 1135-49.

Zhou,M.; Kimelberg,H.K. "Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression." Journal of Neuroscience 21.20 (2001): 7901-08.

Ziskin,J.L.; Nishiyama,A.; Rubio,M.; Fukaya,M.; Bergles,D.E. "Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter." Nat Neurosci. 10.3 (2007): 321-30.

Internetquellen

www.neuroscience.bham.ac.uk/neurophysiology/research/hippocampus.htm

www.ilae-epilepsy.org

www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/C57BL.shtml

7 Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1: Struktur des Hippokampus	9
Abb.1.2: Strommuster einer passiven und komplexen Gliazelle	15
Abb.2.1: Applikationspositionierung	31
Abb.2.2: Ersatzschaltbild einer Ganzzelleableitung	32
Abb.2.3: Ladestrom-Differenz aus der Stromantwort einer Zelle	32
Abb.2.4: Reaktion des CellTracker™ Green CMFDA	34
Abb.2.5: Strukturformel von BAPTA Tetrapotassium	35
Abb.2.6: Strukturformel des Ca ²⁺ - Indikators Fura-2 Pentapotassium	36
Abb.2.7: Schema der Pseudoratiobildung	37
Abb.2.8: Schema einer Ca ²⁺ -Messung	38
Abb.2.9: Schema einer Ca ²⁺ -Messung für die Ca ²⁺ -Kalibration	39
Abb.3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer „Neuron Glia Synapse“	47
Abb.3.2: Messung der synaptischen Innervation in NG2 Zellen	49
Abb.3.3: Beispiel sPSCs im Gewebe von Mäusen	49
Abb.3.4: Bestimmung des isosbestischen Punktes von Fura-2	51
Abb.3.5: Messung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration mittels Pseudorationbildung	52
Abb.3.6: Ca ²⁺ -Erhöhung nach Depolarisation	53
Abb.3.7: Reversibilität der Ca ²⁺ -Erhöhungen in NG2 Zellen	54
Abb.3.8: Irreversible Ni ²⁺ -Blockade des Ca ²⁺ -Einstroms	55
Abb.3.9: Reversible Ni ²⁺ -Blockade der Ca ²⁺ -Erhöhung	56
Abb.3.10: Fehlende Ca ²⁺ -Erhöhung in Zellen bei nominal Ca ²⁺ -freier Badlösung	57
Abb.3.11: Kein Ca ²⁺ -Anstieg bei fehlender Depolarisation	58
Abb.3.12: Ca ²⁺ -Anstieg nach 100 ms langer Depolarisation	59
Abb.3.13: Bestimmung der freien intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration in NG2 Zellen	60
Abb.3.14: Gelelektrophorese zur Analyse der Produkte der reverse Transkription-PCR von Einzelzellen	61
Abb.3.15: Gliazellen im humanen Gewebe	63
Abb.3.16: CellTracker Injektionschema im Läsionsgewebe	65
Abb.3.17: CellTracker Injektionschema im AHS Gewebe	66
Abb.3.18: Konfokale Aufnahmen von CellTracker markierten Schnitten	66

Abb.3.19: Vergleich der Flächen der Ausbreitungswolken des CellTrackers im AHS-und Läsionsgewebe	67
Abb.3.20: Messung synaptischer Innervation im AHS Gewebe	70
Abb.3.21: Messung synaptischer Innervation im Läsionsgewebe	71
Abb.3.22: Messung synaptischer Innervation im AHS Gewebe vor und nach der Ionomycin Applikation	74
Abb.3.23: Messung synaptischer Innervation im Läsionsgewebe vor und nach Ionomycin Applikation	75
Abb.3.24: Messung synaptischer Innervation im Läsionsgewebe in Anwesenheit von Bicucullin vor und nach Ionomycin Applikation	76

8 Tabellenverzeichnis

Tab.1.1: Nomenklatur der untersuchten Gliazellen	16
Tab.1.2: Ca _v -Typen	19
Tab.2.1: Oligonukleotidprimer für die reverse Transkription-PCR von Einzelzellen	44
Tab.3.1: Membraneigenschaften von NG2 Zellen in NG2-EYFP +/- und -/- Tieren	48
Tab.3.2: Parameter der im entsprechenden Genotyp aufgezeichneten schnellen sPSCs	50
Tab.3.3: Parameter der im entsprechenden Genotyp aufgezeichneten langsamen sPSCs	50
Tab.3.4: Relative Verteilung der Transkripte für Ca _v Kanäle in den untersuchten NG2 Zellen	61
Tab.3.5: Membraneigenschaften von Mikrogliazellen	64
Tab.3.6: Membraneigenschaften komplexer Gliazellen	64
Tab.3.7: Membraneigenschaften von Astrozyten	64
Tab.3.8: Membraneigenschaften synaptisch innervierter komplexer Gliazellen im AHS- und Läsionsgewebe	69
Tab.3.9: Parameter der schnellen sPSCs, gemessen im AHS- und Läsionsgewebe	69
Tab.3.10: Parameter der langsamen sPSCs, gemessen im AHS- und Läsionsgewebe	69
Tab.3.11: Parameter der schnellen sPSCs in Anwesenheit von NBQX und DL-APV, gemessen im AHS Gewebe	72
Tab.3.12: Parameter der schnellen sPSCs in Anwesenheit von Bicucullin, gemessen im AHS- und Läsionsgewebe	72

Eidesstattliche Erklärung

Alexandra Wyczynski
Institut für Zelluläre Neurowissenschaften
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
53115 Bonn

An Eides statt versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation persönlich, selbstständig verfasst und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe, dass diese oder eine ähnliche Arbeit noch nicht anderweitig als Dissertation eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift