

**Charakterisierung von Gliazellen im Thalamus der Maus:
Neue Aspekte glialer Heterogenität in Bezug
auf Zell-Zell-Kommunikation**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Simon Peter Höft

aus Schongau

2016

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. C. Steinhäuser

2. Gutachter: Prof. Dr. med. K. Schilling

Tag der Mündlichen Prüfung: 17.05.2016

Aus dem Institut für Zelluläre Neurowissenschaften
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. C. Steinhäuser

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	6
2.	Einleitung	10
2.1	Der Thalamus	10
2.2	Der Hippocampus	12
2.3	Die Gliazellen	13
2.3.1	Die Astrozyten	13
2.3.2	Die Oligodendrozyten	16
2.4	Ionotrope Rezeptoren auf Astrozyten	17
2.4.1	AMPA-Rezeptoren	17
2.4.2	NMDA-Rezeptoren	18
2.4.3	GABA _A -Rezeptoren	19
2.5	Astrozytäre Netzwerke und Neuron-Glia-Interaktion	20
2.5.1	Gliale Netzwerke	20
2.5.2	Neuron-Glia-Interaktion	23
3.	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	26
4.	Eigener Anteil an gemeinsam durchgeführten Experimenten	28
5.	Material und Methoden	29
5.1	Mausmodelle	29
5.2	Präparation der Hirnschnitte	31
5.2.1	Präparation von Hirnschnitten für pharmakologische Untersuchungen und nachfolgende Isolierung thalamischer Astrozyten	31
5.2.2	Präparation von Hirnschnitten für <i>Live-Imaging</i> sowie <i>in-situ</i> Analyse von Astrozyten, Oligodendrozyten und glialen Netzwerken	32
5.3	Elektrophysiologisches Setup	32
5.3.1	Patch-Clamp-Technik und Bestimmung passiver Membraneigenschaften	34
5.3.2	Pharmakologische Analysen	36
5.4	Farbstofffüllung von glialen Netzwerken	38
5.5	<i>Live-Imaging</i> vitaler Schnitte mittels 2-Photonen-Mikroskopie	38
5.6	Immunhistochemische Untersuchungen	39
5.7	Einzelzell-Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) sowie semi-quantitative-RT-PCR (sq-RT-PCR)	40
5.8	Western Blots	43
5.9	Datenanalyse und Statistik	43

6.	Ergebnisse	45
6.1	Zwei distinkte astrozytäre Populationen im Thalamus der Maus können anhand der funktionellen Expression von AMPA-Rezeptoren unterschieden werden	45
6.1.1	AMPA-Rezeptoren werden auf einem Teil der thalamischen Astrozyten exprimiert	45
6.1.2	GluA+ Zellen besitzen AMPA-Rezeptoren mit geringer Ca^{2+} -Leitfähigkeit	48
6.1.3	GluA+ und GluA- Astrozyten stellen kein Artefakt isolierter Astrozyten dar	49
6.1.4	GluA+ und GluA- Zellen sind elektrophysiologisch differente Zellgruppen	50
6.1.5	Einzelzell-RT-PCR bestätigt die Heterogenität thalamischer Astrozyten	51
6.1.6	Funktionelle GABA_A -Rezeptoren werden auf allen thalamischen Astrozyten exprimiert	52
6.2	Thalamische Gliazellen bilden ausgedehnte zelluläre Netzwerke und enthalten Astrozyten, Oligodendrozyten sowie einen intermediären Zelltyp	54
6.2.1	Thalamische Astrozyten formen ausgedehnte Synzytien	54
6.2.2	Regionsspezifische Unterschiede der Expression von Cx43 und Cx30	55
6.2.3	Thalamische Astrozyten zeigen häufig keine Cx43-Expression	58
6.2.4	Thalamische GJN werden vornehmlich durch Cx30 gebildet	61
6.2.5	Astrozyten und Oligodendrozyten des Thalamus formen ausgedehnte pangliale Netzwerke	63
6.2.6	Gliazellen im ventrobasalen Thalamus weisen ein einzigartiges Antigenprofil auf	68
7.	Diskussion	71
7.1	Expression von ionotropen Rezeptoren in zwei verschiedenen Populationen von Astrozyten im Thalamus	71
7.1.1	Die Mehrzahl thalamischer Astrozyten exprimiert ein Mosaik von AMPA-Rezeptoren mit niedriger Ca^{2+} -Permeabilität	71
7.1.2	GluA+ und GluA- Zellen zeigen eine uniforme GABA_A -Rezeptor Expression	72
7.2	Die Analyse thalamischer Gliazellen zeigt spezifische Eigenschaften thalamischer GJN sowie das Antigenexpressionsprofil eines intermediären Zelltypes auf	73
7.2.1	Thalamische Astrozyten exprimieren vorwiegend Cx30 und sind teilweise negativ für Cx43	73
7.2.2	GJN in Thalamus sowie Hippocampus sind panglial organisiert	75
7.2.3	Gliazellen im Thalamus zeigen ein einzigartiges Antigenprofil	76
8.	Zusammenfassung	78
9.	Anhang	80

9.1	Tabellen	80
9.2	Abbildungsverzeichnis	83
9.3	Formelverzeichnis	83
9.4	Tabellenverzeichnis	83
10.	Literaturverzeichnis	84
11.	Danksagung	101

1. Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridin
AC	Astrozyt
ACSF	Artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (<i>Artificial cerebrospinal fluid</i>)
AD/DA	Analog-Digital/Digital-Analog
Aldh1L1	10-formyl-tetrafolat-Dehydrogenase
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure
ANOVA	Varianzanalyse (<i>Analysis of variance</i>)
ARAS	aszendierendes retikuläres Aktivierungssystem
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraessigsäure
BCA	Bicinchoninsäure
β -Gal	β -Galactosidase
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Cornu ammonis
Cbx	Carbenoxolon
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C_m	Membrankapazität
CNP	2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase
CO	Cortex
CTZ	Cyclothiazid
Cy	Cyanin
Cx	Connexin
D-AP5	D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Differential-Interferenz-Kontrast
Dko	Doppel-Knockout
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
Draq5	(1, 5-bis{[2-(di-methylamino)ethyl]amino}s-4, 8-dihydroxyanthracene-9, 10-dione

ECFP	Verstärktes cyan fluoreszierendes Protein (<i>Enhanced cyan fluorescent protein</i>)
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGFP	Verstärktes grün fluoreszierendes Protein (<i>Enhanced green fluorescent protein</i>)
EZR	Extrazellulärraum
FAM	6-carboxyfluorescein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFAP	saures Gliafaserprotein (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GJ	Gap Junction
GJN	Gap Junction-Netzwerk
GS	Glutamin-Synthetase
Glu-R	Glutamat-Rezeptor
Glu-T	Glutamat-Transporter
GYKI 53655	1-(4-Aminophenyl)-3-methylcarbonyl-4-methyl-3,4-dihydro-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepinhydrochlorid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HC	Hippocampus
hGFAP	Humanes saures Gliafaserprotein (<i>Human glial fibrillary acidic protein</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
Iba1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
IEM1460	<i>N,N,N</i> ,-Trimethyl-5-[(tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dec-1-ylmethyl)amino]-1-pentanaminiumbromid
IHC	Immunhistochemie
IL	Innenlösung
I/U	Strom/Spannung
KA	Kainat
ko	Knockout
ki	Knockin

Kir	Einwärtsgerichteter K^+ -Kanal
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MBP	basisches Myelinprotein
MK801	[5R,10S]-[+]-5-methyl-10,11-dihydro-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>a,d</i>]cyclohepten-5,10-imin
Ncl	Nucleus
Ncll	Nuclei
NeuN	<i>Neuron specific nuclear protein</i>
NG2	Neural/Glial-Antigen-2
NGS	normales Ziegenserum
NMDA	N-methyl-D-aspartat
OL	Oligodendrozyt
Olig2	<i>Oligodendrocyte lineage transcription factor 2</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PEPA	4-[2-(phenylsulfonylamino)ethylthio]-2,6-difluorophenoxyacetamid
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid-Protein
PNS	Peripheres Nervensystem
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RI	Gleichrichtungs/Rektifikations-Index
R_i	Eingangswiderstand
R_m	Membranwiderstand
R_s	Serienwiderstand
RT	Reverse-Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RTN	Nucleus reticularis thalami (reticular thalamic nuclei)
S100 β	S100 Calcium bindendes Protein B
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels (<i>Standard error of the mean</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIC	langsamer Einwärtsstrom (<i>Slow inward current</i>)
Sq	semiquantitativ
SR101	Sulforhodamin 101
Std-IL	Standard-Innenlösung
TAMRA	6-carboxytetramethylrhodamin
TC	thalamocortical
TEA	Tetraethylammoniumchlorid
tg	transgen
TH	Thalamus
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamine-5-(und 6)-isothiocyanat
TTX	Tetrodotoxin
UBP141	(2R*,3S*)-1-(Phenanthrenyl-3-carbonyl)piperazine-2,3-dicarbonsäure
V _h	Haltepotential
V _r	Membranpotential
VPL	<i>Nucleus ventralis posterolateralis</i>
VPM	<i>Nucleus ventralis posteromedialis</i>
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

2. Einleitung

2.1 Der Thalamus

Der Thalamus ist ein paarig angelegter Anteil des Diencephalon, welcher eine Relay- und Modulationsstation im zentralen Nervensystem (ZNS) darstellt. Das Diencephalon schließt sich anatomisch direkt dem Mesencephalon an und kann bei höheren Säugern in Epithalamus, Subthalamus, Hypothalamus sowie den *Thalamus dorsalis* eingeteilt werden. Diese Arbeit beschäftigt sich mit Eigenschaften von Gliazellen in Arealen des Thalamus der Maus, welche dem humanen *Thalamus dorsalis* entsprechen. Der *Thalamus dorsalis* ist ein paarig angelegter Kernkomplex zu beiden Seiten des III. Ventrikels. Zu den wichtigsten Einzelkernen gehören die *Nuclei (Ncl.) anteriores, ventrolaterales* sowie *mediales*. Diese können zytologisch weiter in zahlreiche kleinere Einheiten unterteilt werden. Zusätzlich umgibt der *Nucleus (Ncl.) reticularis thalami* (RTN) den *Thalamus dorsalis* als dünne Schicht vorwiegend inhibitorischer Neurone. Alle aus der Körperperipherie in das ZNS ziehenden Afferenzen - ausgenommen die olfaktorischen - werden im Thalamus vor endgültiger Projektion in corticale Areale ein letztes Mal umgeschaltet (Herrero et al., 2002). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Nucll. Ventroposterolateralis et -medialis* (VPL und VPM) sind als Teil des ventrobasalen Thalamus eine wichtige Umschaltstation der somatosensiblen Afferenzen aus der Peripherie, insbesondere des *Lemniscus medialis* (im VPL) sowie des *Nervus trigeminus* (im VPM) (Jones et al., 1986; Lund und Webster, 1967; Ma et al., 1987; Ralston, 1969). Darüber hinaus werden optische sowie akustische Reize über die *Corpora geniculata laterale* bzw. *mediale* sowie motorische Informationen über den ventralen Thalamus verschaltet. Die medialen sowie anterioren Kerngruppen und das dorsal gelegene Pulvinar dienen, zum Teil nach vorangegangener Verschaltung in den oben genannten Kernen, unter anderem als Verbindungen zu Assoziationsfeldern des Cortex und sind beispielsweise in die Steuerung der Motorik und das limbische System eingebunden. Zusätzlich sind thalamische Kerne unter anderem an dem aufsteigenden retikulären Aktivierungssystem (ARAS) beteiligt (Kinomura et al., 1996; Levitt, 1984; O'Donnell et al., 1997; Sommer, 2003; Sommer und Wurtz, 2002; Yeo et al., 2013). Zu den thalamischen Funktionen gehört nicht nur ein Verschalten von Information, sondern über reziproke Verbindungen regulieren thalamische Kerne auch den Erregungsstatus corticaler Areale (Herrero et al., 2002; Yan und

Suga, 1998). Neurophysiologisch wird zwischen *First* und *Higher Order Nuclei* unterschieden. Hierbei werden Kerne, welche primär Afferenzen aus der Peripherie erhalten, als *First Order Nuclei* bezeichnet, wohingegen *Higher Order Nuclei* den überwiegenden Teil ihrer Afferenzen aus corticalen Arealen erhalten (Guillery, 1995; Sherman, 2007). Der ventrobasale Thalamus der Maus erhält als *First Order Nucleus* vor allem somatosensible Afferenzen. Diese stammen insbesondere von den Schnurrhaaren der Tiere, welche in somatotoper Ordnung in distinkten Arealen, den sogenannten *Barreloids*, terminieren. Diese projizieren wiederum in die Kerngebiete des gleichfalls somatotopisch organisierten *Barrelcortex* der Maus (Haidarliu und Ahissar, 2001; Lopez-Bendito und Molnar, 2003; Van Der Loos, 1976). Im Folgenden sei beispielartig eine somatosensible thalamocorticale Schleife skizziert: Aus der Peripherie (erstes und zweites Neuron) ascendierende Axone projizieren auf glutamaterge thalamische Neurone (drittes Neuron), welche ihrerseits auf korrespondierende Nervenzellen in den Schichten 4-6 des somatosensiblen Cortex projizieren (viertes Neuron). Dieser corticopetale Schenkel des thalamocorticalen (TC) Pfades vermittelt somit somatosensible Information in den Cortex. Über Synapsen auf inhibitorische Neurone des RTN, welche auf TC Neurone projizieren, wird eine modulierende inhibitorische Rückkopplungsschleife geschaffen (Grant et al., 2012). Corticofugale, das heißt corticothalamische, Projektionen aus somatosensiblen Arealen bilden ihrerseits Synapsen im RTN sowie auf TC Neurone und modulieren so ventrobasale Kerne des Thalamus auf zwei verschiedene Arten, nämlich direkt exzitatorisch über glutamaterge Synapsen sowie modulierend inhibitorisch über GABAerge Afferenzen aus dem RTN (Grant et al., 2012). Dem Thalamus werden unter anderem Rollen bei der Generation von Schlafrythmen, Schizophrenie oder beispielsweise epileptischen Störungen zugeschrieben (Cope et al., 2009; Crunelli und Hughes, 2010; Ferrarelli und Tononi, 2011; Fisher et al., 2010). Läsionen des Thalamus können schwerwiegende Folgen haben. So kommt es beispielsweise bei Störungen im ventrobasalen Thalamus zu sensiblen Ausfällen wie brachiofaszial betonten Hyp- sowie Dysästhesien (Krause et al., 2012; Paciaroni und Bogousslavsky, 1998) und in Extremfällen zu zentral bedingten, thalamischen Schmerzsyndromen (Bowsher et al., 1998; Krause et al., 2012). Läsionen in anderen Kerngebieten können beispielsweise zu motorischen Störungen, z.B. thalamischer Astasie bei Läsionen des *Ncl. ventralis lateralis* führen (Lee et al., 2005; Masdeu und Gorelick, 1988). Beispiele für den Verlust höherer kognitiver Funktionen sind Störungen von Auf-

merksamkeit, Impulskontrolle und Entscheidungsfähigkeit bei Läsionen der *Ncll. mediana* (Van der Werf et al., 2003).

2.2 Der Hippocampus

Der Hippocampus stellt eine paarig angelegte Struktur des phylogenetisch alten Archicortex oder Allocortex dar, welcher im Gegensatz zum Neocortex nicht aus sechs, sondern nur aus drei Schichten besteht. Er spielt eine wichtige Rolle im limbischen System und ist an Emotions- und Affektverarbeitung beteiligt. Darüber hinaus nimmt er an Lern- und Gedächtnisprozessen sowie an der Orientierung im Raum teil. Morphologisch besteht diese Region aus dem *Hippocampus proper* oder Ammonshorn, welcher sich aus drei Regionen, CA1 – CA3 (CA = *Cornu ammonis*), zusammensetzt, sowie dem *Gyrus dentatus*, welcher dem Ammonshorn aufsitzt. Der *Hippocampus proper* kann in vier, der *Gyrus dentatus* in drei Schichten unterteilt werden. Die einzelnen Regionen des Ammonshorns unterteilen sich weiter in verschiedene Schichten. Im *Stratum pyramidale* befindet sich das Hauptneuron des Hippocampus, die glutamaterge Pyramidenzelle. Diese erstreckt ihr Axon in das *Stratum oriens*, welches die äußerste, corticale Schicht des Ammonshorns darstellt. Die Dendriten dieser Zelle befinden sich im *Stratum radiatum*, welches sich nach subcortical dem *Stratum pyramidale* anschließt. Zuinnerst liegend ist das *Stratum lacunosum moleculare*. Vor allem in den beiden zuletzt genannten Schichten befinden sich GABAerge Interneurone sowie Gliazellen (Jinno und Kosaka, 2006; Lopes da Silva et al., 1990). Der *Gyrus dentatus* sitzt der CA3-Region C-förmig auf und beinhaltet die sogenannten Körnerzellen als Prinzipalneurone. Diese stehen über ihre Axone, die sogenannten Moosfasern, mit den Pyramidenzellen des Ammonshorns in Kontakt. Eine Schicht des *Gyrus dentatus*, die sogenannte Subgranularzone, stellt eine neurogene Nische dar, in welcher auch im adulten Individuum aus Stammzellen neue Neurone gebildet werden können (Altman und Das, 1965; Kuhn et al., 1996). Die neuronalen Verknüpfungen im Hippocampus sind gut charakterisiert, exemplarisch soll hier der sogenannte trisynaptische Erregungsweg vorgestellt werden: Afferenzen aus dem entorhinalen Cortex durchstoßen das dem Hippocampus anliegende Subiculum im *Tractus perforans* und enden auf glutamatergen Körnerzellen des *Gyrus dentatus*. Diese projizieren wiederum über die Moosfasern auf CA3-Pyramidenzellen, welche ihrerseits über ein intrahippocampales Verbindungssystem, die Schaffer-Kollateralen, mit CA1-Pyra-

midenzellen in Kontakt stehen. Von CA1-Pyramidenneuronen projizieren axonale Efferenzen in das Subiculum und von dort aus über den Fornix in weitere Stationen des limbischen Systems (Andersen et al., 1971; Teyler und DiScenna, 1984). Eine GABAerge Modulation über Interneurone findet hierbei an allen drei Stationen statt. Zusätzlich zu Afferenzen des entorhinalen Cortex empfängt der Hippocampus beispielsweise Information aus septalen Kernen, kommissurale Afferenzen sowie diffuse Projektionen katecholaminerger Fasern aus dem Hirnstamm (Amaral und Kurz, 1985; Frotscher et al., 1984; Haring und Davis, 1985). Die Funktionen des Hippocampus sind vielfältig und umfassen unter anderem die bereits genannte Beteiligung an der Regulation des Affekt- sowie Triebverhaltens, sowie bei Lern- und Gedächtnisprozessen und der Orientierung im Raum. Pathophysiologisch spielt die Hippocampusformation eine entscheidende Rolle bei der Temporallappenepilepsie, Störungen der Gedächtnis- und Lernfunktion sowie psychiatrischen Störungen (Bird und Burgess, 2008; Brasted et al., 2003; Chozick, 1983; Fanselow und Dong, 2010; Otten und Meeter, 2015; Papez, 1995; Wieser, 2004).

2.3 Die Gliazellen

Im ZNS sind zwei verschiedene Klassen von Gliazellen anzutreffen, Mikroglia und Makroglia. Letztere teilt sich in Astrozyten (AC), Oligodendrozyten (OL), Neural/Glial-Antigen-2-Zellen (NG2-Zellen) und Ependymalzellen auf.

Die vorliegende Studie befasst sich mit Astrozyten sowie Oligodendrozyten im Hippocampus, Neocortex und Thalamus der Maus.

2.3.1 Die Astrozyten

Astrozyten gehören zu den im ZNS häufig anzutreffenden Zellen. Ihre Funktion umfasst klassischerweise die strukturelle und metabolische Unterstützung der neuronalen Funktion sowie die Regulation der Elektrolyt- und Säure-Base-Homöostase (Newman et al., 1984; Orkand et al., 1966; Pannasch et al., 2011; Rouach et al., 2008; Wallraff et al., 2006). Gliazellen allgemein sowie speziell Astrozyten werden häufig als ein Marker neuronaler Komplexität betrachtet, denn mit steigender phylogenetischer Entwicklungsstufe nimmt die Anzahl von Gliazellen pro Neuron stetig zu (Nedergaard et al., 2003). Hier ist allerdings zu berücksichtigen, dass auch eine abnehmende neuronale Dichte bei konstanter Anzahl von Gliazellen – im Gegensatz zu einem reinen Anstieg der absoluten Glia-

zellzahlen - als Verursacher des Anstieges der Glia/Neuron-Ratio in Frage kommt (Herculano-Houzel, 2014). Morphologisch sind Astrozyten durch ca. 4-10 Hauptfortsätze, welche tausende weiterer kleiner Fortsätze abgeben, gekennzeichnet. Astrozyten besitzen eine komplexe dreidimensionale Struktur, welche vor allem durch diese feine Fortsätze bestimmt wird, die zu 90-95 % das Volumen der Zelle ausmachen (Bushong et al., 2002; Ogata und Kosaka, 2002). Benachbarte Astrozyten besetzen genau abgesteckte Territorien im Gehirn und überlappen kaum mit Nachbarastrozyten (Bushong et al., 2002). Nur ein Teil der Zellen ist durch den klassischen Astrozytenmarker GFAP (Bignami und Dahl, 1973; Bignami et al., 1972; Ghandour et al., 1979) zu identifizieren (Bushong et al., 2002; Reeves et al., 2011). Astrozyten stehen in engem Kontakt mit dem zerebralen Gefäßendothel einerseits (Kacem et al., 1998), sowie Axonen und Synapsen andererseits (Ventura und Harris, 1999; Witcher et al., 2007). In den letzten zwei Jahrzehnten sind weitere Funktionen identifiziert worden. Hierzu zählen unter anderem Interaktionen von Astrozyten mit Neuronen, interastrozytäre Kommunikation sowie Interaktionen zwischen Astrozyten und anderen Gliazelltypen sowie dem zerebralen Gefäßendothel (Gordon et al., 2008; Henneberger et al., 2010; Iadecola und Nedergaard, 2007; Pascual et al., 2005; Santello et al., 2012). So spielen Astrozyten beispielsweise eine Rolle bei der Induktion der Blut-Hirn-Schranke (Abbott et al., 2006; Dehouck et al., 1990; Janzer und Raff, 1987), der Regulation zerebraler Durchblutung (Gordon et al., 2008; Mulligan und MacVicar, 2004; Takano et al., 2006; Zonta et al., 2003) sowie beim Transport von Metaboliten und Wasser aus dem Blut in das Parenchym und umgekehrt (del Zoppo und Hallenbeck, 2000; Nagelhus und Ottersen, 2013; Rouach et al., 2008). Astrozyten können neuronale Erregungs- und Funktionszustände direkt und indirekt beeinflussen, dies wird als Neuron-Glia-Interaktion bezeichnet (Giaume et al., 2010; Verkhratsky, 2010) (siehe auch folgende Absätze). Zusätzlich besitzen Astrozyten eine den Neuronen ähnliche Ausstattung mit Ionenkanälen sowie ionotropen und metabotropen Rezeptoren, welche direkt neuroglialer Kommunikation dienen können (Matyash und Kettenmann, 2010; Verkhratsky und Steinhauser, 2000). Astrozyten können, genauso wie Oligodendrozyten, keine Aktionspotentiale feuern (Adermark und Lovinger, 2008; Fuss et al., 2000; Kirchhoff et al., 1997; Zhou et al., 2006), obschon diese Zellen sehr wohl eine Ausstattung mit spannungsaktivierbaren Ionenkanälen aufweisen. Die Dichte von beispielweise spannungsaktivierbaren schnellen Na^+ -Kanälen ist jedoch - bei zeitgleich bestehender großer Leit-

fähigkeit für K^+ - nicht suffizient um ein Aktionspotential auszulösen (Verkhratsky und Steinhauser, 2000). Eine Erregbarkeit durch Elevationen der intrazellulären Ca^{2+} - oder Na^+ -Konzentrationen und konsekutive Veränderungen des Funktionszustandes der Zellen sind beschrieben (Lalo et al., 2011). Durch eine starke Expression von 2-pore-Domain-Kalium-Kanälen – wie zum Beispiel TREK-Kanälen - und Kir-Kanälen befindet sich das Ruhemembranpotential von Astrozyten nahe dem Kalium-Äquilibriumspotential. Dies begünstigt die Rolle der Astrozyten bei der Pufferung von extrazellulärem Kalium, welches bei neuronaler Aktivität im extrazellulärem Raum (EZR) akkumuliert (Seifert et al., 2009; Wallraff et al., 2006). Interastrozytäre, beziehungsweise intergliale Kopplung und Kommunikation finden zum größten Teil über direkte Zell-Zell-Verbindungen statt, welche über aus Connexinen (Cx) gebildete *Gap Junctions* (GJ) gewährleistet werden (Dermietzel et al., 1989; Nagy und Rash, 2000; Schools et al., 2006). Zu den von Astrozyten exprimierten Connexinen zählen vor allem Cx26, 30 sowie 43 (Nagy und Rash, 2000). In Analogie zu über das Gehirn verteilten, spezialisierten neuronalen Populationen (Cauli et al., 1997; Llinas, 1988; Markram et al., 2004) scheinen ebenfalls regionsspezifisch verschiedene Typen von astrozytären Zellen mit spezifischen Rezeptor- und Ionenkanalausstattungen zu existieren. So exprimieren Astrozyten im Neocortex beispielsweise N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren), wohingegen diese auf hippocampalen Astrozyten nicht nachgewiesen werden konnten (Lalo et al., 2006; Seifert und Steinhauser, 1995). Zerebelläre Astroglia weist Ca^{2+} -permeable α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure-Rezeptoren (AMPA-Rezeptoren) auf, während Astrozyten im *Nucleus supraopticus* des Hypothalamus und im Hippocampus keinerlei ionotrope Glutamaterezeptoren exprimieren (Israel et al., 2003; Matthias et al., 2003; Muller et al., 1992). Auch die Morphologie der Astrozyten ist zwischen einzelnen Hirnregionen verschieden (Emsley und Macklis, 2006). Zusammenfassend sind diese Unterschiede in Morphologie, sowie der Expression von Ionenkanälen und Rezeptoren für Neurotransmitter Grundlage des Konzeptes der astrozytären Heterogenität (Matyash und Kettenmann, 2010; Zhang und Barres, 2010).

2.3.2 Die Oligodendrozyten

Oligodendrozyten gehören ebenso wie Astrozyten, NG2- und Ependymalzellen zur Makroglia. Wie ihr Pendant im peripheren Nervensystem (PNS), die Schwann-Zellen, besteht ihre primäre Aufgabe darin, durch Isolierung von Axonen mittels Myelinscheiden eine störungsfreie und zügige Fortleitung elektrischer Potentiale zu ermöglichen. Hierzu erfolgt eine vollständige Ummantelung der Axone durch Oligodendrozytenfortsätze. Die sogenannte saltatorische Erregungsleitung erfolgt über in regelmässigen Abständen auftretende, myelinfreie Bereiche des Axons, die sogenannten Ranvierschen Schnürringe. Dies ist Grundlage der schnellen Übertragung elektrischer Impulse im Nervensystem (Baumann und Pham-Dinh, 2001; Huxley und Stampfli, 1949; Salzer, 2015). Ein Oligodendrozyt kann mehrere Axone zugleich myelinisieren. Einige Oligodendrozyten nehmen an der Isolierung von Axonen nicht teil, diese Zellen werden als perineuronale Oligodendrozyten bezeichnet. Sie scheinen an der Volumen- und Elektrolytregulation des perineuronalen Raumes teilzunehmen (Baumann und Pham-Dinh, 2001; Ludwin, 1997). Ebenso wie Astrozyten sind Oligodendrozyten in der Lage, ein weites Spektrum an Ionenkanälen sowie ionotropen und metabotropen Rezeptoren zu exprimieren (Verkhratsky und Steinhauser, 2000). Durch Versorgung der Axone mit Nährstoffen stellen Oligodendrozyten die strukturelle Integrität sowie die Funktionstüchtigkeit der Axone sicher (Funfschilling et al., 2012; Lee et al., 2012). Oligodendrozyten können klassischerweise über die Expression von an der Myelinisierung beteiligten Proteinen identifiziert werden, zum Beispiel 2',3'-Cyclic-Nucleotide-3'-phosphohydrolase (CNP), *Myelin Basic Protein* (MBP) oder Proteolipidprotein (PLP) (Baumann und Pham-Dinh, 2001). Ebenso wie bei Astrozyten ist eine Organisation der Zellen in homo- sowie heterotypen Netzwerken, welche durch GJ gebildet werden, beschrieben (Maglione et al., 2010; Magnotti et al., 2011; Orthmann-Murphy et al., 2007; Tress et al., 2012; Wasseff und Scherer, 2011). Hierbei exprimieren Oligodendrozyten ein eigenes Set an Connexinen, vorwiegend Cx29, 32 sowie 47 (Nagy et al., 2003; Nagy und Rash, 2000).

2.4 Ionotrope Rezeptoren auf Astrozyten

2.4.1 AMPA-Rezeptoren

AMPA-Rezeptoren stellen neben NMDA- sowie Kainat-Rezeptoren eine Subgruppe der ionotropen Glutamat-Rezeptoren dar. Hierbei handelt es sich um ligandenaktivierte, kationenselektive Ionenkanäle, welche bei zahlreichen ZNS-Funktionen eine Rolle spielen, wie beispielsweise synaptischer Übertragung und Plastizität (Bowie, 2012; Dingledine et al., 1999; Traynelis et al., 2010). AMPA-Rezeptoren bestehen aus Tetrameren, welche sich aus den Untereinheiten GluA1-4 zusammensetzen (Gan et al., 2015). Hierbei ist die Expression der GluA2-Untereinheit kritisch für die biologische Funktion des Rezeptors, durch GluA2 werden beispielsweise die Ca^{2+} -Permeabilität, die auswärts- oder einwärtsgerichtenden Eigenschaften des Rezeptors oder auch seine Stöchiometrie reguliert (Bowie und Mayer, 1995; Greger et al., 2007; Jonas und Burnashev, 1995). Die Ca^{2+} -Permeabilität von GluA2 wird durch *RNA-Editing* an einer *Q/R-Site* bestimmt. AMPA-Rezeptoren, welche keine GluA2-Untereinheit exprimieren, sind Ca^{2+} -permeabel, während Rezeptoren mit dieser Untereinheit nicht - oder nur wenig - durchgängig für divalente Kationen sind (Cull-Candy et al., 2006; Isaac et al., 2007). Die Untereinheiten des AMPA-Rezeptors treten in zwei Splice-Varianten – Flip und Flop – auf, welche sich hinsichtlich der Rezeptorkinetik unterscheiden (Mosbacher et al., 1994). Astrozytäre AMPA-Rezeptoren konnten in Studien bereits im Zerebellum, Neocortex sowie Hirnstamm nachgewiesen werden (Lalo et al., 2006; McDougal et al., 2011; Piet und Jahr, 2007). Eine mögliche biologische Funktion dieser AMPA-Rezeptoren konnte anhand von Experimenten mit astroglialen Zellen des Zerebellums, der Bergmann-Glia, gezeigt werden. Diese Zellen exprimieren Ca^{2+} -permeable AMPA-Rezeptoren, wie durch elektrophysiologische Messungen sowie Ca^{2+} -Imaging gezeigt werden konnte (Muller et al., 1992). Passend dazu zeigten molekularbiologische Untersuchungen ein Fehlen der GluA2-Untereinheit an. Durch neuronale Stimulation konnten schnelle, AMPA-Rezeptor vermittelte, Ca^{2+} -Ströme in Bergmann-Glia ausgelöst werden (Piet und Jahr, 2007). Durch virale Überexpression der GluA2-Untereinheit konnte die Ca^{2+} -Permeabilität dieser Rezeptoren ausgeschaltet werden. In Folge kam es zu deutlichen Veränderungen der zerebellären Architektur, wie Defiziten bei der Ummantelung neuronaler Synapsen, Verringerung der Glutamat-Clearance im synaptischen Spalt sowie Veränderungen der Inner-

vation von Purkinje-Zellen. Durch vollständiges Ausschalten astroglialer AMPA-Rezeptoren kam es zu Störungen der motorischen Funktion der Versuchstiere inklusive Störungen der Okulomotorik (Iino et al., 2001; Saab et al., 2012). Im Neocortex konnten ebenfalls funktionelle AMPA-Rezeptoren auf Astrozyten nachgewiesen werden, auch hier konnte ein Einfluss auf neuronale Aktivität gezeigt werden (Lalo et al., 2006). Darüber hinaus ist eine Beteiligung von astrozytären AMPA-Rezeptoren an der gliovaskulären Einheit durch Induktion von Subtypen des Enzyms Haem-Oxygenase diskutiert worden (Parfenova et al., 2012). Auch Astrozyten im Hirnstamm exprimieren AMPA-Rezeptoren, welche eine Rolle bei Neuron-Glia Interaktionen in diesem Bereich spielen (Grass et al., 2004; McDougal et al., 2011). Im Gegensatz dazu konnten auf hippocampalen Zellen bisher noch keine funktionellen AMPA-Rezeptoren nachgewiesen werden (Matthias et al., 2003). Für thalamische Astrozyten liegen bislang nur sehr wenig Daten über die Expression von AMPA-Rezeptoren vor, in einer immunhistochemischen Studie konnte lediglich eine spärliche Expression der GluA1-Untereinheit auf Gliazellen im Thalamus nachgewiesen werden (Spreafico et al., 1994), elektrophysiologisch konnten AMPA-Rezeptoren auf thalamischen Astrozyten bisher noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden (Parri et al., 2010).

2.4.2 NMDA-Rezeptoren

NMDA-Rezeptoren gehören ebenfalls zur Familie ionotroper Glutamat-Rezeptoren. Sie bestehen aus heterotetrameren Komplexen, welche aus GluNR1-, -2- oder -3-Untereinheiten gebildet werden können. Es existieren zusätzlich verschiedene Subtypen der einzelnen Unterfamilien (Cull-Candy et al., 2001; Paoletti und Neyton, 2007). Der Rezeptor stellt einen Kationenkanal mit guter Leitfähigkeit für divalente Ionen dar. Obwohl die Stöchiometrie von NMDA-Rezeptoren nicht vollständig erforscht ist, scheint eine Expression der GluNR1-Untereinheit für die Bildung funktionaler NMDA-Rezeptoren kritisch zu sein (Cull-Candy und Leszkiewicz, 2004; Perez-Otano et al., 2001). NMDA-Rezeptoren zeichnen sich durch eine Vielzahl spezifischer Eigenschaften aus, welche ihnen eine besondere Bedeutung bei neuronaler Signalverarbeitung sowie Plastizität verleiht: So bedingt beispielweise ein von der Membranspannung und somit dem Erregungszustand der Zelle abhängiger Block des Rezeptors mit Mg^{2+} -Ionen die auswärtsgerichtenden Eigenschaften des Rezeptors. Weiterhin besitzen NMDA-Rezeptoren eine hohe Ca^{2+} -Per-

meabilität sowie eine im Vergleich zu anderen ionotropen Glutamatrezeptoren langsamere Aktivierungs- sowie Deaktivierungskinetik (Cull-Candy et al., 2001; Verkhratsky und Kirchhoff, 2007). Diese Eigenschaften sind von der Expression der verschiedenen Untereinheiten abhängig. So werden beispielweise der Mg^{2+} -Block sowie die Ca^{2+} -Permeabilität zumindest partiell von der GluNR2- und -3- Untereinheit vermittelt (Cull-Candy und Leszkiewicz, 2004; Perez-Otano et al., 2001). NMDA-Rezeptoren konnten auf Proteinlevel sowie funktionell auf Astrozyten im Neocortex der Maus nachgewiesen werden (Conti et al., 1996; Conti et al., 1997; Lalo et al., 2006; Palygin et al., 2011; Schipke et al., 2001). Durch Applikation des Agonisten NMDA wurde ein Einwärtsstrom sowie Ca^{2+} -Elevationen in neocorticalen Astrozyten der Maus in situ sowie in isolierten Zellen induziert (Lalo et al., 2006). Diese Antworten konnten durch die Antagonisten D-AP5 sowie MK-801 geblockt werden und waren nur teilweise sensitiv für den Antagonisten Ifendopril, welcher vorzugsweise GluNR2B-Untereinheiten hemmt. Astrozytäre NMDA-Rezeptoren des Cortex zeigen ungewöhnliche Eigenschaften, so zum Beispiel einen nur geringgradig ausgeprägten Block durch Mg^{2+} -Ionen sowie eine lineare Strom-Spannungs-Kennlinie (I/U-Kennlinie). Zusätzlich besteht nur eine niedrige Ca^{2+} -Permeabilität. Diese Eigenschaften wiesen auf eine vorwiegende Expression von GluNR2C/D-Untereinheiten hin, eine Beobachtung welche passend zu einem ausgeprägten Block dieser Rezeptoren durch den Antagonisten UBP141 ist (Palygin et al., 2011). Bis dato konnten keine funktionalen NMDA-Rezeptoren auf Astrozyten im Hippocampus nachgewiesen werden (Matthias et al., 2003). Eine Studie konnte zwar die Expression von GluNR2C in Astrozyten des Hippocampus demonstrieren, gleichzeitig konnte die für die Bildung funktioneller Rezeptoren entscheidende Untereinheit GluNR1 nicht nachgewiesen werden (Karavanova et al., 2007). Im ZNS von Primaten konnte immunhistochemisch der Nachweis von einzelnen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors auf Astrozyten im Thalamus geführt werden (Jones et al., 1998), bis zum heutigen Tage gibt es allerdings keinen Hinweis auf eine funktionelle Expression von NMDA-Rezeptoren auf thalamischen Astrozyten.

2.4.3 GABA_A-Rezeptoren

Γ-amino-Buttersäure (GABA)_A-Rezeptoren bestehen aus Heteropentameren, welche sich aus 19 bis heute bekannten Untereinheiten zusammensetzen können (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , Φ , π sowie ρ 1-3) (Olsen und Sieghart, 2008; Rudolph und Knoflach, 2011). Diese

formen eine Anionen-selektive Pore, welche vor allem Cl^- , aber zum Beispiel auch HCO_3^- permeabel ist (Kaila et al., 1997). Während GABA_A -Rezeptor induzierte Ströme durch die niedrige intrazelluläre Cl^- -Konzentration und das dadurch bedingte - häufig im Vergleich zum Ruhepotential negativere - Nernst-Potential von Cl^- in reifen Neuronen in der Regel hyperpolarisierend wirken, kann GABA in jungen Neuronen sowie in Gliazellen, welche sich durch eine höhere Cl^- -Konzentration auszeichnen, depolarisierend wirken (Bekar und Walz, 2002; Ben-Ari, 2002; MacVicar et al., 1989; Meier et al., 2008; Succol et al., 2012). Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Astrozyten durch GABA_A -Rezeptor-Aktivierung wurde berichtet (Meier et al., 2008; Velez-Fort et al., 2012). GABA_A -Rezeptoren werden in zahlreichen Hirnregionen auf Astrozyten exprimiert, jedoch variieren die Zusammensetzung der Rezeptoren und somit auch deren pharmakologische Charakteristika zwischen den einzelnen Arealen. So können beispielweise durch GABA oder Muscimol induzierte Rezeptorströme auf isolierten hippocampalen Astrozyten durch Barbiturate sowie Benzodiazepine potenziert und durch den Antagonisten Bicuculline geblockt werden. Immunhistochemisch zeigen diese Zellen vor allem eine Expression von $\alpha 1$ - und $\beta 1$ -Untereinheiten (Fraser et al., 1995). GABA_A -Rezeptoren auf Bergmann-Glia sind nicht modulierbar durch Benzodiazepine, jedoch durch Barbiturate, es werden vor allem $\alpha 2$ -, $\alpha 4$ -, $\beta 1$ -, $\gamma 1$ - und $\gamma 3$ -Untereinheiten exprimiert (Muller et al., 1994; Riquelme et al., 2002). Astrozytäre GABA_A -Rezeptoren können weiterhin eine Rolle bei der Proliferation sowie der Differenzierung von astroglialen Zellen spielen. Radialgliazellen des Gyrus dentatus exprimieren GABA_A -Rezeptoren, welche bei Vorhandensein von $\alpha 5$ -, $\beta 3$ - und $\gamma 2$ -Untereinheiten die Stammzell-Eigenschaften dieser Zellen beeinflussen können (Song et al., 2012). Auch die Proliferation GFAP-positiver Stammzellen der Subventrikularzone wird durch GABA_A -Rezeptoren beeinflusst (Liu et al., 2005). GABA_A -Rezeptoren konnten bereits auf hippocampalen Astrozyten nachgewiesen werden, eine Untersuchung an thalamischen Zellen steht noch aus (Fraser et al., 1995).

2.5 Astrozytäre Netzwerke und Neuron-Glia-Interaktion

2.5.1 Gliale Netzwerke

Als gliale Netzwerke bezeichnet man über *Gap Junction* (GJ)-Kanäle verbundene Synzytien von neuroglialen Zellen. Bei diesen Kanälen handelt es sich um transmembranär liegende Poren, welche sich aus jeweils sechs einzelnen Proteinen aus der Familie der

Connexine zusammensetzen. Es sind insgesamt 20 murine sowie 21 humane Connexine bekannt, welche nach ihrem Molekulargewicht in kDa benannt werden (Kumar und Gilula, 1996). Durch Zusammenlagern von sechs Connexinproteinen entsteht ein Halbkanal, ein sogenanntes Connexon. Dabei können die Connexone sowohl homomer, das heißt aus einem Connexin, als auch heteromer, also aus mehreren verschiedenen Connexinen zusammengesetzt sein. Die Connexone zweier sich gegenüberliegender Zellmembranen können einen funktionellen GJ-Kanal bilden. GJ-Kanäle liegen vornehmlich gebündelt in Bereichen der Zellmembran, die dann als GJ-Plaques oder *Nexus* bezeichnet werden. Die einzelnen Verbindungen können wiederum sowohl zwischen gleichartigen (homotype GJ), als auch verschiedenartigen Connexonen (heterotype GJ) ausgebildet werden (Evans und Martin, 2002). Ein *Nexus* kann sowohl zwischen zwei Zellen als auch zwischen verschiedenen Kompartimenten einer Zelle ausgebildet werden, wobei die GJ als Pore in der Zellmembran und somit als direkte Verbindung fungieren. GJ sind für eine Vielzahl von Molekülen bis zu 1 kDa durchlässig und können beispielsweise dem Austausch von sekundären Botenstoffen, von Metaboliten oder auch als elektrische Synapse dienen. Die Zusammensetzung der unterschiedlichen Connexone bedingt ein unterschiedliches Gating-Verhalten gegenüber verschiedenen Molekülen. Dieses ist beispielsweise abhängig von der Größe, Form oder Ladung der den Kanal passierenden Moleküle und wird selbst wiederum über das am *Nexus* herrschende Mikromilieu reguliert (Harris, 2001, 2007). So wird beispielsweise der Stromfluss durch Cx38-Kanäle durch Absenkung des pH-Wertes signifikant vermindert (Peracchia et al., 1996). Connexine werden in vielen verschiedenen Organen, zum Beispiel Herz, ZNS, Retina und Linse oder Pankreas exprimiert. Verschiedene Zelltypen bilden hierbei spezifische Subtypen von Connexinen (Evans und Martin, 2002). Im ZNS werden zum Beispiel Cx43, 26 sowie 30 von Astrozyten exprimiert, wohingegen auf Oligodendrozyten vor allem Cx32, 29 und 47 vorkommen (Nagy et al., 2003; Nagy und Rash, 2000). Neuronale Zellen exprimieren beispielsweise im *Ncl. reticularis thalami* Cx36 und bilden untereinander elektrische Synapsen (Landisman et al., 2002). Die Expression verschiedener Subtypen von Connexinen ist dabei nicht nur zelltypspezifisch, sondern wird auch regionspezifisch sowie im Verlauf der Ontogenese verändert (Dermietzel et al., 1989; Evans und Martin, 2002; Willecke et al., 2002). Halbkanäle ohne komplementäres Connexon auf einer appositionierten Zelle können auf vielen Zellen nachgewiesen werden, die Rolle dieser Kanäle unter physio-

logischen Bedingungen ist bisher jedoch noch unklar. Zwischen glialen Zellen bestehen ausgedehnte GJ vermittelte Netzwerke (GJN), welche zell- sowie regionsspezifisch verschiedene Funktionen ausüben können. Astrozytäre GJN werden vorwiegend von den oben genannten Connexinen in homotyper Art und Weise gebildet (Orthmann-Murphy et al., 2007). Sie spielen eine Rolle beim Transport von Nährstoffen aus dem Gefäßendothel in das Parenchym des ZNS, passend hierzu ist die Expression von Cx43 nahe der gliovaskulären Schnittstelle auch besonders erhöht (Pannasch und Rouach, 2013; Rouach et al., 2008). Eine Rolle glialer Netzwerke bei der Pufferung von Metaboliten und der Clearance einiger Moleküle sowie von Elektrolyten, wie beispielsweise exzessiver Konzentrationen von K^+ -Ionen, wurde schon lange vermutet (Newman et al., 1984; Orkand et al., 1966). Studien in hippocampalen Schnitten konnten eine Bedeutung von Cx43- sowie Cx30- vermittelten GJN für die K^+ -Clearance sowie bei der Ausbildung der sogenannten *Cortical spreading depression* zeigen (Theis et al., 2003; Wallraff et al., 2006). Pathophysiologisch konnte ein Verlust astrozytärer Kopplung bei mesialer Temporalappenepilepsie in humanem Gewebe von epilepsiechirurgisch behandelten Patienten sowie im Tiermodell gezeigt werden (Bedner et al., 2015). Ein Fortleiten astrozytärer Ca^{2+} -Oszillationen über GJN wird diskutiert, jedoch sind hier auch andere Mechanismen wie zum Beispiel Ausschüttung von Adenosintriphosphat (ATP) mit nachfolgender Freisetzung von Ca^{2+} über metabotrope P_2Y -Rezeptoren denkbar (Leybaert und Sanderson, 2012). In anderen Regionen des ZNS konnten weitere Eigenschaften astrozytärer GJN beschrieben werden. So konnte im *Bulbus olfactorius* eine Anpassung der GJN an neuronale Aktivität gezeigt werden. Hier kam es zu einer Verkleinerung der Netzwerke bei Suppression neuronaler Aktivität durch Tetrodotoxin (TTX) oder frühe sensorische Deprivation. Astrozytäre Netzwerke im *Barrelcortex* der Maus zeigen eine Orientierung entlang bestehender neuronalen Strukturen (Houades et al., 2008; Roux et al., 2011). Eine weitere physiologische Bedeutung von GJN in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität konnte ebenfalls für hippocampale Netzwerke gezeigt werden. Diese scheinen für die Energieversorgung von Neuronen bedeutsam zu sein. Bei Entfernung von Glucose aus der Messlösung kam es zu einer Abschwächung neuronaler Aktivität. Diese konnte durch selektive Injektion von Glucose oder Lactat in das astrozytäre Synzytium wiederhergestellt werden (Rouach et al., 2008). Es wurden bereits *in vitro* sowie *in situ* intergliale GJN zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten im Neocortex sowie im *Corpus callosum* beobachtet.

Oligodendrozyten weisen ebenfalls GJ-Plaques auf, diese werden allerdings vor allem autolog innerhalb einer Zelle oder zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten gebildet. GJ zwischen zwei Oligodendrozyten scheinen selten aufzutreten (Maglione et al., 2010; Magnotti et al., 2011; Nagy und Rash, 2000; Orthmann-Murphy et al., 2007; Wasseff und Scherer, 2011). Im Gegensatz zu astrozytären GJN konnten in von Oligodendrozyten ausgehenden GJN auch NG2-Zellen nachgewiesen werden (Maglione et al., 2010). Der Verlust oligodendroglialer Connexine führt zur Vakuolisierung der Myelinscheide sowie Verlust der axonalen Integrität (Menichella et al., 2003; Odermatt et al., 2003). Die Existenz glialer Netzwerke in thalamischen Kernen ist bis dato verneint worden, eine Studie unter Verwendung des anionischen Farbstoffes *Lucifer Yellow* konnte keinen Nachweis interastrozytärer oder interglialer Kopplung im ventrobasalen Thalamus erbringen (Parri et al., 2001).

2.5.2 Neuron-Glia-Interaktion

Ursprünglich wurden Astrozyten und andere Gliazellen als elektrisch inerte „Kitt“ mit vorwiegend strukturellen und supportiven Funktionen angesehen. In den letzten Jahrzehnten wandelte sich dieses Bild, als zunehmend reziproke Interaktionen zwischen Astrozyten und Neuronen nachgewiesen werden konnten. Unter dem Schlagwort der Tripartite-Synapse wird eine funktionelle Entität von neuronaler Prä- sowie Postsynapse und umgebender astrozytärer Membran zusammengefasst (Araque et al., 2014; Hamilton und Attwell, 2010; Perea et al., 2009). Hierbei regulieren Astrozyten neuronale Aktivität nicht nur durch Clearance von neuroaktiven Stoffen wie Neurotransmittern oder Aufrechterhaltung der extrazellulären Homöostase sowie durch nachfrageabhängige Lieferung von Metaboliten, sondern auch durch Exozytose von sogenannten Gliotransmittern. Es konnte in mehreren Studien bereits vesikuläre Exozytose sowie nicht vesikuläre Ausschüttung von neuroaktiven Substanzen wie beispielsweise Glutamat, D-Serin oder ATP gezeigt werden (Duan et al., 2003; Jourdain et al., 2007; Mothet et al., 2005; Newman, 2003). Astrozyten können auf Stimulation durch neuronale Aktivität mit einer Erhöhung ihrer zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration reagieren (Leybaert und Sanderson, 2012; Nimmerjahn und Bergles, 2015; Scemes und Giaume, 2006). Erhöhungen des intrazellulären Ca^{2+} können sowohl spontan als auch induziert in einer einzelnen Zelle oder auch in einem Zellverband vorkommen (Nett et al., 2002; Shigetomi et al., 2010; Takata

et al., 2011). Dies wird allgemein als eine Form astrozytärer Erregbarkeit angesehen, da Gliazellen keine Aktionspotentiale zu feuern vermögen (Adermark und Lovinger, 2008; Nimmerjahn und Bergles, 2015; Orkand et al., 1966; Zhou et al., 2006). Spontane oder getriggerte Ca^{2+} -Wellen in einzelnen Astrozyten oder Synzytien von Astrozyten konnten *in vitro*, *in situ* sowie *in vivo* nachgewiesen werden. Im Allgemeinen wird von einer Aktivierung metabotroper Glutamat-Rezeptoren (vor allem von mGluR5) und nachfolgender, G-Protein-gekoppelter Aktivierung der Phospholipase C mit vermehrter Bildung von Inositoltrisphosphat und schließlich Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern ausgegangen (D'Ascenzo et al., 2007; Panatier et al., 2011). Die Expression von mGluR5 in adulten Gliazellen ist jedoch umstritten, da dieser Rezeptor im ZNS adulter Nagetiere nicht nachgewiesen werden konnte (Sun et al., 2013). Da einzelne Astrozyten bis zu 100.000 Synapsen erreichen können (Bushong et al., 2002; Ogata und Kosaka, 2002), könnte bereits die Aktivierung nur einer Gliazelle die Aktivität eines ganzen Netzwerkes von Neuronen beeinflussen. Durch Elevation der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration in Astrozyten kann eine Exozytose von neuroaktiven Molekülen getriggert werden. Diese wiederum können über Rezeptoren auf Neuronen den Erregungszustand prä- sowie postsynaptischer Membranen beeinflussen (Araque et al., 2014; Hamilton und Attwell, 2010). Dies konnte beispielsweise bereits für thalamische Astrozyten und Neurone gezeigt werden. In einer Studie wurde die Existenz NMDA-Rezeptor vermittelter Ströme auf thalamischen Neuronen gezeigt, welchen astrozytäre Ca^{2+} -Elevationen vorangegangen waren (Parri et al., 2001). Weitere Experimente konnten den Nachweis von durch astrozytäre Ca^{2+} -Oszillationen getriggerten *Slow inward currents* (SICs) auf thalamischen Neuronen erbringen. SICs entstehen hierbei durch die Aktivierung von extrasynaptisch gelegenen GluNR2B-Rezeptoren, welche bereits durch geringe Mengen von Glutamat stimuliert werden können (Fellin et al., 2004; Hamilton und Attwell, 2010; Shigetomi et al., 2008). Die Ca^{2+} -Oszillationen in thalamischen Astrozyten sowie die damit verbundenen SICs könnten eine Rolle bei der Synchronisierung sowie Integrierung neuronaler Netzwerke spielen. Kurzfristige elektrische Stimulation zeigte keinen Einfluss auf astrozytäre sowie neuronale Aktivität, langanhaltende Stimulation führte jedoch zu einem Anstieg der durch Astrozyten vermittelten SICs und damit verbunden zu einer Steigerung neuronaler Aktivität (Pirttimaki et al., 2011; Pirttimaki und Parri, 2012). Die neuronale Aktivität sowie synaptische Plastizität können ebenfalls durch den Aktivitätszustand glialer Netzwerke be-

einflusst werden (Giaume et al., 2010; Pannasch und Rouach, 2013). Hierbei besteht eine reziproke Beziehung, das heißt neuronale Netzwerke beeinflussen die Ausprägung und den Funktionszustand glialer Netzwerke und umgekehrt. So kommt es im *Bulbus olfactorius* beispielsweise zu einer von neuronaler Aktivität abhängigen, verschiedenartigen Ausprägung astrozytärer Netzwerke. Im Hippocampus wiederum führt die Ausschaltung der GJN zu einem massiven Anstieg synaptischer Erregbarkeit. Diese Beobachtung wird mit dem Verlust der Homöostase-Funktion von GJN in Verbindung gebracht (Rouach et al., 2008; Roux et al., 2011). Durch die fehlende Clearing-Funktion glialer Netzwerke kommt es nicht nur zu einer Akkumulation von Elektrolyten sowie Neurotransmittern, sondern folgend auch zu einem Verlust der Volumenregulation des Extrazellulärraumes (Pannasch et al., 2011). Der Transport von Metaboliten in das Parenchym - speziell zu Neuronen - kann ebenfalls über GJN vermittelt werden. So kann beispielsweise eine Disruption von GJN die Funktion neuronaler Netzwerke verändern (Gandhi et al., 2009; Pannasch und Rouach, 2013; Rouach et al., 2008). Lactat dient als neuronales Energiesubstrat und wird in Astrozyten aus Glykogen gewonnen. Bei Unterbrechung des Lactatflusses konnte eine Einschränkung von für Lern- und Gedächtnisformation wichtigen neuronalen Prozessen gezeigt werden (Suzuki et al., 2011). Eine weiterreichende Rolle neuro-glialer Interaktionen - sowie von Interaktionen zwischen neuronalen und glialen Netzwerken - für Krankheiten des ZNS ist zu erwarten (Verkhatsky und Parpura, 2015; Verkhatsky et al., 2014).

3. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Gliazellen, gliale Netzwerke und ihre differentielle Ausprägung in unterschiedlichen Hirnregionen sind wichtig für ein normales und störungsfreies Funktionieren des ZNS höherer Säugetiere. In den letzten Dekaden wurden Gliazellen in zahlreichen Hirnregionen untersucht. Eine systematische Analyse der Eigenschaften thalamischer Gliazellen ist bisher, trotz der enormen Bedeutung des Thalamus für zahlreiche zerebrale Funktionen, nicht erfolgt. Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Frage regionsspezifischer Eigenschaften von Gliazellen sowie glialer Netzwerke im ventrobasalen Thalamus der Maus. Vergleichende Untersuchungen wurden im Hippocampus sowie im Neocortex durchgeführt. Der Fokus wurde im Einzelnen auf folgende Fragestellungen gelegt:

1. Welche ionotrope Rezeptoren werden auf thalamischen Astrozyten exprimiert?

Astrozyten im Thalamus sind in der Lage auf neuronale Stimulation mit Erhöhungen des intrazellulären Ca^{2+} zu reagieren und scheinen in Folge eine Rolle bei der Regulation neuronaler Aktivität zu spielen (Parri et al., 2001, 2010; Pirrtimaki et al., 2011; Pirrtimaki und Parri, 2012). Die molekulare Grundlage dieser Interaktion ist unbekannt. Die Expression verschiedener ionotroper sowie metabotroper Rezeptoren und ihre Rolle in Neuron-Glia-Interaktionen konnte bereits in anderen Hirnregionen gezeigt werden (Matyash und Kettenmann, 2010). Ob ionotrope Glutamat- sowie $GABA_A$ -Rezeptoren auf thalamischen Astrozyten exprimiert werden, soll durch pharmakologische Untersuchungen geklärt werden. Dies könnte eine mögliche Grundlage von Neuron-Glia-Interaktion im Thalamus sein.

2. Welche immunhistochemischen Marker können thalamische Gliazellen identifizieren?

Der klassische Astrozytenmarker GFAP wird von zahlreichen Astrozyten des Thalamus nicht exprimiert (Frassoni et al., 2000). Die vorliegende Arbeit möchte die Frage nach immunhistochemischen Markern zur Identifizierung thalamischer Gliazellen beantworten.

3. Existieren gliale Netzwerke im ventrobasalen Thalamus und wenn ja, wie sind diese aufgebaut?

Gliale Netzwerke sind in zahlreichen Regionen des ZNS vorhanden. Sie scheinen vornehmlich zwischen Astrozyten ausgebildet zu werden, obschon einzelne Studien die Existenz funktioneller Netzwerke zwischen verschiedenen Gliazelltypen zeigen konnten (Magnotti et al., 2011; Wasseff und Scherer, 2011). Bisherige Untersuchungen unter Ver-

wendung von *Lucifer Yellow* haben die Existenz glialer Netzwerke im Thalamus verneint (Parri et al., 2001). In dieser Arbeit möchte ich die Existenz glialer Netzwerke im ventrobasalen Thalamus der Maus zeigen, sowie - wenn vorhanden - diese im Detail charakterisieren.

4. Eigener Anteil an gemeinsam durchgeführten Experimenten

Die hier dargestellten Ergebnisse wurden in zwei Zeitschriftenbeiträgen veröffentlicht (Griemsmann et al., 2015; Höft et al., 2014). Bei beiden Publikationen bin ich einer von zwei gleichrangigen Erstautoren.

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Messungen und Versuche wurden von mir durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte ebenfalls durch mich.

Abweichend hiervon wurden Teile der Kopplungsexperimente in *tg(hGFAP-EGFP)*, *tg(PLP-GFP)*, *Cx30LacZ/LacZ* und *Cx30LacZ/LacZ; Cx43fl/fl:hGFAP-Cre* Mäusen gemeinsam mit Dr. Stephanie Griemsmann durchgeführt und ausgewertet.

Immunhistochemische Analysen von GJN sowie glialer Antigenprofile in *tg(hGFAP-EGFP)*, *Cx30LacZ/LacZ*, *Cx43kiECFP* sowie *tg(PLP-GFP)* Mäusen erfolgten ebenfalls gemeinsam mit Dr. Stephanie Griemsmann. Die Farbstofffüllung von Astrozyten zur immunhistochemischen Analyse neocorticaler GJN erfolgte durch Dr. Nadine Richter.

Die Gewinnung von mRNA zur Analyse der AMPA- sowie GABA_A-Rezeptoren Expression in *tg(hGFAP-EGFP)* Mäusen wurde von Dr. Stephanie Griemsmann durchgeführt.

Die Durchführung von Western Blots zur Bestimmung der relativen Expression von Cx30 und Cx43 erfolgte durch Dr. Jiong Zhang.

Die semi-quantitative Echtzeit-PCR zur Bestimmung der mRNA-Level von Cx30 und Cx43 in Thalamus und Hippocampus wurde von Dr. Elena von Staden durchgeführt.

5. Material und Methoden

5.1 Mausmodelle

Tg(hGFAP-EGFP): Diese transgene Mauslinie wurde 2001 erstmalig beschrieben (Nolte et al., 2001). Die Herstellung einer transgenen Linie, welche ein modifiziertes grün fluoreszierendes Protein (*Enhanced green fluorescent protein*; EGFP) unter Kontrolle des humanen GFAP Promotors exprimiert, erfolgte durch Oozyten-Injektion bei *FVB/N* Mäusen. GFAP ist ein Intermediärfilament, welches im ZNS hauptsächlich in Astrozyten exprimiert wird (Bignami und Dahl, 1973; Bignami et al., 1972; Ghandour et al., 1979; Kalman und Hajos, 1989). *Tg(hGFAP-EGFP)* Mäuse exprimieren EGFP in Zellen mit astrozytärer Morphologie, die Validierung der astrozytären Identität dieser Zellen mittels Immunhistochemie erfolgte für zahlreiche Hirnregionen. Im Hippocampus konnte durch elektrophysiologische Messungen sowie Färbungen gegen NG2 die Expression des Transgens auch in NG2-Zellen gezeigt werden (Wallraff et al., 2004). Obwohl Astrozyten im Thalamus mehrheitlich GFAP negativ sind (Frassoni et al., 2000; Kalman und Hajos, 1989; Nolte et al., 2001), zeigt sich eine starke EGFP-Expression in thalamischen Kernen (Griemsmann et al., 2015; Nolte et al., 2001).

Tg(PLP-GFP): Zur Visualisierung von Oligodendrozyten wurde eine erstmalig von Fuss et al. (Fuss et al., 2000) beschriebene Mauslinie verwandt, in welcher Oligodendrozyten unter Kontrolle des Promotors für Proteolipidprotein (PLP) GFP exprimieren. PLP ist ein in reifen Oligodendrozyten exprimiertes Protein, welches Teil der Myelinscheide ist (Trapp et al., 1997; Wight et al., 1993). Durch Oozyten-Injektion wurde eine transgene Linie mit *C57Bl/6*-Hintergrund geschaffen, in welcher reife Oligodendrozyten durch GFP-Fluoreszenz markiert wurden. Die Expression von unmodifiziertem GFP ist vor allem auf das Soma beschränkt und nur wenig in Zellfortsätzen nachzuweisen (Fuss et al., 2000; Moriyoshi et al., 1996).

Cx43kiECFP: Hierbei handelt es sich um eine weitere Mauslinie mit astrozyten-spezifischer Markierung (Degen et al., 2012). Diese Maus exprimiert unter Kontrolle des Cx43-Promotors (*Gja1*-Promotor) - welcher im ZNS vornehmlich in Astrozyten exprimiert wird (Nagy et al., 1997; Pannasch und Rouach, 2013) - anstelle von Cx43 ein modifiziertes cyan fluoreszierendes Protein (*Enhanced cyan fluorescent protein*; ECFP). Cx43 wird ebenfalls von Kardiomyozyten exprimiert und ist für eine normale Herzaktion und Herzent-

wicklung notwendig. Daher ist ein globaler Cx43-Knockout in der Embryogenese durch Veränderungen im rechtsventrikulären Ausflusstrakt nicht mit dem Leben vereinbar (Reaume et al., 1995). Aus diesem Grund wurde unter Zuhilfenahme eines Cre-Rekombinase-Systems (Lallemand et al., 1998) ein konditionaler Knockout geschaffen. Durch Immunhistochemie sowie Live-Imaging konnte eine Astrozytenspezifität des Transgens im ZNS nachgewiesen werden (Degen et al., 2012). Den Hintergrund der Linie bilden überwiegend *C57Bl6* Mäuse.

Cx30LacZ/LacZ: Mäuse dieser Linie exprimieren das *LacZ/β-Galactosidase*-Reportersystem (*LacZ/β-Gal*-Reportersystem) (Le Mouëllic et al., 1990) anstelle der kodierenden Region für Cx30 (*Gjb6*). Das Reportersystem steht weiterhin unter Kontrolle der regulierenden Elemente von Cx30 (Teubner et al., 2003). Diese Mäuse mit *C57Bl6*-Hintergrund wiesen einen schwer hörgeschädigten Phänotyp auf, was auf Interaktion der Cx30 regulierenden Elemente mit Cx26 zurückgeführt wird. Im ZNS wird das Transgen im Innenohr, den Leptomeningen, Ependymalzellen sowie Astrozyten exprimiert (Teubner et al., 2003), letzteres jedoch in einer regionsspezifischen Art und Weise (Gosejacob et al., 2011). Cx30 spielt für interastrozytäre Kopplung in Astrozyten des Hippocampus nur eine untergeordnete Rolle (Gosejacob et al., 2011).

Cx30LacZ/LacZ; Cx43^{fl/fl}:hGFAP-Cre: Mäuse des Doppelknockout Typs (Dko), welche weder Cx30 noch - in Astrozyten - Cx43 exprimieren, wurden durch Kreuzung von bereits beschriebenen *Cx30LacZ/LacZ* (Teubner et al., 2003) Mäusen mit *hGFAP-Cre* (Zhuo et al., 2001) sowie *Cx43^{fl/fl}(LacZ)* (Theis et al., 2001; Theis et al., 2003) Mäusen geschaffen. In diesen Mäusen steht ein gefloxtes Cx43-Allel unter der Kontrolle einer hGFAP-Promotor gesteuerten Cre-Rekombinase, um die bereits angesprochene pränatale Sterblichkeit des Cx43-Knockouts zu umgehen (Theis et al., 2003). Cx30 ist in diesen Tieren global in allen Körperzellen durch LacZ ersetzt. Dko Mäuse zeigen deutlich eingeschränkte GJ-vermittelte Kopplung sowie eingeschränkte K⁺-Pufferung im Hippocampus (Wallraff et al., 2006). Die Mäuse besitzen einen gemischten *FVB/N*- und *C57Bl6*-Hintergrund.

C57Bl6J: Genetisch nicht veränderte Mäuse vom *C57Bl6J*-Stamm dienten als Kontrolltiere (Charles River Laboratories, Erkrath, D).

Alle Tierexperimente wurden in Einklang mit lokalen, nationalen sowie EU-weiten Richtlinien durchgeführt. Die Tiere wurden in artgerechten Käfigen bei konstanter Luft-

feuchtigkeit sowie Temperatur in einem 12/12-Stunden-Tag/Nacht-Rhythmus bei Nahrung und Wasser *ad libitum* gehalten. Es wurde Sorge getragen, die Anzahl der Versuchstiere auf das notwendige Minimum zu beschränken.

5.2 Präparation der Hirnschnitte

5.2.1 Präparation von Hirnschnitten für pharmakologische Untersuchungen und nachfolgende Isolierung thalamischer Astrozyten

Transgene *tg(hGFAP-EGFP)* Mäuse beiderlei Geschlechts wurden im Alter von 9–13 Tagen *post natum* (p 9-13) mittels Isofluran (Abott, Wiesbaden, D) betäubt und nach Verlöschen der Schmerzreflexe dekapitiert. Die Gehirne wurden zügig aus der Kalotte freipräpariert und aus dem Kranium entfernt. Es erfolgte der Transfer der Gehirne in 1-4 °C kalte, artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (ACSF I), welche kontinuierlich mit Sauerstoff begast wurde. Diese enthielt (in mM): 150 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 1 Na-Pyruvat, 10 Glucose und 10 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES). Der pH-Wert wurde mittels NaOH sowie HCl auf 7,4 eingestellt. Bereits während des Präparationsvorganges wurden die Gehirne mit dieser Lösung begossen und gekühlt. Es erfolgte auf einem eisgekühlten Schneideblock zunächst das Zuschneiden der Gehirne durch Resektion des Zerebellums sowie von Teilen des frontalen Cortex. In Folge wurde ein Teil des parietalen Cortex entfernt und das Gehirn mit dieser parietalen Schnittfläche auf die Schneideunterlage eines Vibratoms (VT1200S, Leica, Nussloch, D) geklebt. Zur Präparation kamen handelsübliche Rasierklingen (Wilkinson Sword GmbH, Solingen, D) zum Einsatz, die Fixierung erfolgte mittels Sekundenkleber (Uhu GmbH & Co KG, Bühl, D). Im Folgenden wurden mittels des Vibratoms 300 µm dicke Schnitte, welche den ventrobasalen Thalamus (insbesondere VPL/VPM) enthielten, gewonnen. Diese wurden in horizontaler Orientierung angefertigt. Die Hirnschnitte wurden zunächst für 1 Stunde in 10 °C kalter ACSF II aufbewahrt. Diese enthielt (in mM): 126 NaCl, 3 KCl, 2MgSO₄, 2CaCl₂, 10 Glucose, 1,25 NaH₂PO₄ und 26 NaHCO₃. Die Lösung wurde kontinuierlich mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) begast, um eine Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 sowie die kontinuierliche Sauerstoffversorgung der Schnitte zu gewährleisten. Danach erfolgte der Transfer in eine ACSF II basierte Lösung, welcher die Protease Papain (Sigma, Taufkirchen, D) in einer Konzentration von 24 U/ml sowie L-Cystein (0,24 mg/ml) zugesetzt waren. In dieser Lösung verblieben die Schnitte für 8–12 min. Nach enzymatischem

Verdau erfolgte der Transfer in die mit O₂ begaste Messlösung (ACSF III), welche wie folgt zusammengesetzt war (in mM): 150 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES sowie 10 Glucose, der pH-Wert wurde auf 7,38 adjustiert. Unter einem Stereomikroskop (KL200, Zeiss, Jena, D), wurden Zellen mithilfe von Wolfram-Nadeln sowie selbst gefertigten Pasteur-Pipetten (Spitzendurchmesser 100–200 µm) isoliert. Vor der Messung erfolgte eine Sauerstoffanreicherung der ACSF III-Lösung mittels Sauerstoffbegasung, elektrophysiologische Messungen an isolierten Zellen erfolgten frühestens 20 min nach mechanischer Dissoziation.

5.2.2 Präparation von Hirnschnitten für *Live-Imaging* sowie *in-situ* Analyse von Astrozyten, Oligodendrozyten und glialen Netzwerken

Mäuse verschiedener genveränderter Linien (*tg(hGFAP-EGFP)*, *tg(PLP-GFP)*, *Cx43kiECFP*, *Cx30LacZ/LacZ*, *Cx30LacZ/LacZ*; *Cx43fl/fl:hGFAP-Cre*), sowie *Wild-Type* (*wt*) *Littermates* und genetisch nicht veränderte Mäuse vom Typ *C57Bl6J* wurden im Alter von p 9-120 wie oben angegeben mit Isofluran betäubt und dekapitiert. Im Anschluss wurden die entnommenen Gehirne in kalter (1-4 °C) ACSF IV-Lösung (in mM: 87 NaCl, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 7 MgCl₂, 0,5 CaCl₂, 25 Glucose und 75 Sucrose, Äquibrierung des pH-Wertes auf 7,38 mittels kontinuierlicher Carbogen-Begasung) verbracht und zugeschnitten. Mittels des Vibratoms wurden 200 µm dicke Schnitte, welche den ventrobasalen Thalamus, den Hippocampus oder den Neocortex enthielten, angefertigt. Es folgte die Aufbewahrung der Schnitte in ACSF II für mindestens 1 Stunde vor Beginn der Messungen. Schnitte für Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)- oder Western Blot-Untersuchungen des Thalamus oder Hippocampus wurden auf gleiche Weise gewonnen.

5.3 Elektrophysiologisches Setup

Die Messung von Rezeptorströmen an isolierten Astrozyten wurde an einem selbst gebauten *Concentration-Clamp-Device* (Seifert und Steinhauser, 1995) durchgeführt, das mit einem EPC7-Verstärker (HEKA, Lambrecht, D) verbunden war. An diesem Setup kann - nach erfolgreichem Patch-Vorgang - eine isolierte Zelle durch Umsetzen von Zelle und Pipette vollständig einer anderen Messlösung ausgesetzt werden (Steinhauser et al., 1994). Die Identifikation der Zellen erfolgte an einem invertierten Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss) mittels Epifluoreszenz sowie Differenzialinterferenzkontrast-Optik (DIC-Optik).

Während der Messungen wurden die Zellen in ACSF III-Lösung (siehe oben) aufbewahrt. Patch-Pipetten wurden aus Borosilicat-Glas (Science Products, Hofheim, D) angefertigt. Der Pipettenwiderstand betrug 4–6 M Ω bei einer Füllung der Pipetten mit Standard-Innenlösung (Std-IL), welche wie folgt zusammengesetzt war (in mM): 130 KCl, 0,5 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraessigsäure (BAPTA), 10 HEPES und 3 Na₂-ATP, pH adjustiert auf 7,25. Die Elektrode bestand aus einem mit Teflon überzogenen Silberdraht mit chlorierter Spitze. Die Referenzelektrode bestand aus einem Silber/Silberchlorid-Draht. Für pharmakologische Untersuchungen *in situ* sowie das Ernten von Zytoplasma für RT-PCR-Experimente wurden mit Epifluoreszenz sowie Infrarot-DIC-Optik ausgestattete Mikroskope (Eclipse E600FN, Nikon, Düsseldorf, D sowie Axioskop FS, Zeiss) verwendet. Diese waren mit einer Infrarotkamera (Cohu, Poway, Kalifornien, USA) verbunden, sodass die Visualisierung der Zellen über einen handelsüblichen Bildschirm möglich war. Elektrophysiologische Messungen erfolgten mit EPC7- oder EPC8-Verstärkern (HEKA). Für Experimente *in situ* wurden die Hirnschnitte in der Messkammer mittels Schwerkraftinfusion oder peristaltischer Pumpe kontinuierlich mit carbogenbegastem ACSF II umspült. Die Applikation der verschiedenen pharmakologisch wirksamen Substanzen erfolgte mittels Schwerkraftinfusion, peristaltischer Pumpe, oder im Falle von isolierten Zellen durch Umsetzen der Zellen mittels *Concentration-Clamp-Device*.

Messungen zur Analyse glialer *Gap Junction* vermittelter Netzwerke (GJN) wurden an oben genannten Setups *in situ* vorgenommen. Die verwendeten Pipetten hatten einen Widerstand von 2–6 M Ω bei Befüllung mit folgender Innenlösung (Biocytin-IL, in mM): 130 K-Gluconat, 1 MgCl₂, 20 HEPES, 10 Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), 3 Na₂-ATP sowie 0,5 % N-biotinyl-L-Lysine (Biocytin), pH 7,2. Als Messlösung diente kontinuierlich mit Carbogen begastes und stetig der Messkammer frisch zugeführtes ACSF II.

Elektrophysiologische Analysen wurden unter Zuhilfenahme eines Computers als Stimulusgenerator mittels TIDA Software (Heka) vorgenommen. Über einen Analog-Digital/Digital-Analog-Wandler (AD/DA-Wandler) (npi, Tamm, D) wurden Impulse an den Patch-Clamp-Verstärker (EPC7 oder EPC8) weitergegeben und von dort aus an die Pipette sowie die Zelle vermittelt. Umgekehrt wurden die gemessenen Signale über den Ver-

stärker registriert und amplifiziert, über das *AD/DA-Board* digitalisiert und digital archiviert und analysiert. Die Abtastrate betrug 0,1–30 kHz, die gemessenen Ströme wurden bei 3 sowie 10 kHz gefiltert. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (circa 22 °C) vorgenommen.

5.3.1 Patch-Clamp-Technik und Bestimmung passiver Membraneigenschaften

Elektrophysiologische Messungen wurden mittels der Patch-Clamp-Technik (Hamill et al., 1981; Neher und Sakmann, 1976) im Voltage-Clamp-Modus (Hodgkin et al., 1952; Marmont, 1949) durchgeführt. Kurz zusammengefasst wird eine Quarzglaspipette, welche mit einer Innenlösung gefüllt ist, über eine mit einem Verstärker verbundenen Elektrode geschoben. Die Pipette wird nachfolgend in die mit einer Messlösung gefüllte Badkammer getaucht. Durch die ebenfalls in die Badkammer eintauchende Referenz-elektrode wird der Stromkreis geschlossen (Abb. 1). Zur Vermeidung von Verunreinigungen wird ein leichter Überdruck an die Pipette angelegt. Nachdem die Spitze der Pipette in unmittelbare Nähe der Membran der Zielzelle gebracht wurde, erfolgt die Wegnahme des Überdruckes sowie die Applikation von leichtem Unterdruck. Hierdurch formiert sich zwischen Zellmembran und Pipette eine feste Verbindung, das so genannte *Gigaseal*, welches sich durch Widerstände im Gigaohmbereich auszeichnet. Das Erreichen des *Gigaseals* wurde durch kontinuierliche Applikation eines 10 mV Spannungssprungs und Berechnung des Widerstandes nach dem Ohmschen Gesetz überprüft. Kurzes, weiteres Applizieren von Unterdruck sorgt für ein Einreißen der Zellmembran unterhalb der Pipette. So entsteht ein direkter Zugang zum Zellinneren, der als Whole-Cell-Modus bezeichnet wird.

Bei Messungen im Voltage-Clamp-Modus (Hodgkin et al., 1952; Marmont, 1949) wird der Zelle über den Verstärker eine Haltespannung (Kommandospannung, V_h) vorgegeben. Über einen separaten Eingang des Vorverstärkers (Operationsverstärker) wird das Membranpotential (V_r) der untersuchten Zelle registriert. Bei einer Spannungsdifferenz zwischen V_h und V_r fließt ein kompensatorischer Strom, bis über der Zelle das Haltepotential anliegt (Abb. 1). Dieser ist eine Abbildung des Stroms über die Membran. Auf diese Art und Weise können Veränderungen der Leitfähigkeiten der Zellmembran – beispielsweise durch das Öffnen spannungsgesteuerter Ionenkanäle oder ligandenaktivierter Rezeptoren - dargestellt werden. Abbildung 1 zeigt das Ersatzschaltbild einer Zelle im Whole-Cell-Voltage-Clamp-Modus. Mittels repetitiver 10 mV Spannungspulse können die

passiven Eigenschaften der untersuchten Zelle bestimmt werden, beispielsweise der Serienwiderstand R_s , der Membranwiderstand R_m , und die Membrankapazität C_m . R_s dient hierbei als Marker des Zugangs zur Zelle, R_m zeigt die Leitfähigkeit der Zellmembran - unter anderem bestimmt durch die Anzahl der offenen Ionenkanäle oder Rezeptoren - an. Die Kapazität der Zellmembran C_m korreliert mit der Größe der Zellen. Bei Fluss von Strom durch die Zellmembran kommt es zunächst zu einer Umladung des Membrankondensators und folgend zum Abfluss des Stroms über die Zellmembran (Abb. 1). Der Strom zu Beginn eines 10 mV Spannungspulses kann zur Berechnung von R_s herangezogen und aus dem konstanten Strom nach Umladen des Membrankondensators kann R_m berechnet werden. Die Bestimmung der Zellkapazität C_m erfolgt mit Hilfe der zellspezifischen Zeitkonstante τ . Diese kann aus dem abfallenden Teil des kapazitiven Umladestroms berechnet werden. Die Berechnung von R_s , R_m sowie C_m wurde nach folgenden Gleichungen vorgenommen:

$$\text{Gleichung 1: } R_s = \frac{\Delta U}{I(t_0)}$$

$$\text{Gleichung 2: } R_m = \frac{\Delta U}{I(t_1)} - R_s$$

$$\text{Gleichung 3: } C_m = \frac{I(t_0) \times \tau}{\Delta U},$$

wobei $I(t_0)$ den Strom zu Beginn des Spannungspulses, $I(t_1)$ den Strom nach vollständigem Abfall des kapazitiven Umladestroms und τ die Zeitkonstante dieses Abfalls bezeichnet. R_s , R_m sowie V_r wurden routinemäßig zu Beginn einer Untersuchung sowie während des Experimentes überwacht. Zellen mit einem initialen V_r positiver als -60 mV wurden von der Analyse ausgeschlossen, gleichfalls Zellen mit einem Anstieg des R_s während der Messung um mehr als das Zweifache. Bei Verwendung von Kalium-Gluconat-Innenlösung wurde das entstehende Liquid-Junction-Potential entsprechend korrigiert. Die Identifizierung der Zellen als Astrozyten oder Oligodendrozyten erfolgte über die Expression von zelltypspezifischen Reportern, die Aufnahme von Farbstoffen und darüber hinaus mittels Applikation von de- und hyperpolarisierenden Spannungssprüngen zwischen -180 und +20 mV. Die Abwesenheit spannungsgesteuerter Leitfähigkeiten ist typisch für reife Astrozyten sowie Oligodendrozyten (Adermark und Lovinger, 2008; Fuss et al., 2000; Kirchhoff et al., 1997; Zhou et al., 2006).

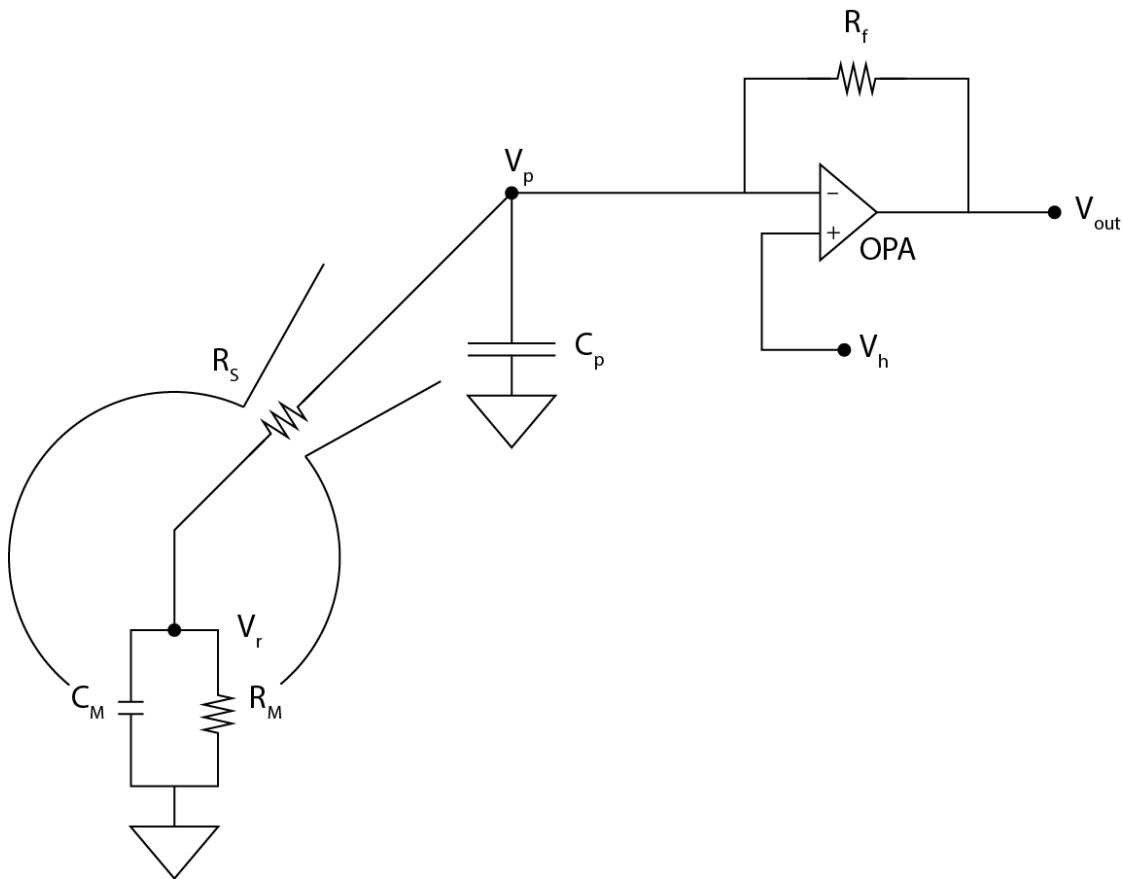


Abb. 1: Vereinfachter Ersatzschaltkreis einer Zelle in der Whole-Cell-Konfiguration. Der Verstärker ist auf Voltage-Clamp-Modus eingestellt. V_h bezeichnet die anliegende Kommandospannung, V_p die Pipettenspannung, welche der transmembranären Spannung (V_r) proportional ist. Über den Operationsverstärker (OPA) werden Differenzen zwischen V_p und V_h verstärkt. Dies resultiert in einem kompensatorischen Stromfluss über den Rückkopplungswiderstand R_f . Die Spannung V_{out} ist proportional zum Stromfluss über R_f und wird als Messsignal ausgelesen. Die abgeleiteten Ströme werden durch die elektrischen Parameter der Zellmembran bestimmt, welche letztlich die biologischen Messgrößen darstellen. C_m bezeichnet den Membrankondensator, welcher abhängig von der Größe der Zellen ist, R_m den Membranwiderstand, welcher beispielsweise durch die Anzahl offener Ionenkanäle bestimmt wird. Der Serienwiderstand R_s und die Pipettenkapazität C_p stellen jeweils Störgrößen dar, welche durch kompensatorische Schaltkreise (hier nicht gezeigt) vermindert werden können.

5.3.2 Pharmakologische Analysen

Pharmakologische Analysen wurden sowohl an isolierten Astrozyten als auch *in situ* durch Applikation verschiedener Agonisten durchgeführt. Zunächst wurden konstitutiv vorhandene Leckleitfähigkeiten der Zellen - vor allem K_{ir-} sowie 2-Pore-Domain-Kanäle (Seifert

et al., 2009) - durch Zusatz verschiedener Antagonisten geblockt. Die Blockerlösungen zur Analyse isolierter Zellen umfassten ACSF III-Lösung als Grundstock, zusätzlich waren enthalten (in mM): entweder 0,1 BaCl₂ und 0,2 Quinine oder 0,1 BaCl₂, 4 4-Aminopyridin (4-AP) und 10 Tetraethylammoniumchlorid (TEA). Experimente *in situ* wurden in ACSF II oder darauf basierenden Blockerlösungen durchgeführt, welche kontinuierlich mittels Schwerkraftinfusion oder peristaltischer Applikation die Schnitte überspülten. Die Lösungen wurden kontinuierlich mit Carbogen begast. Zum Block neuronaler Aktivität wurden bei Experimenten *in situ* zusätzlich zu oben genannten Blockern 0,03 CdCl₂, 0,005 TTX, 0,02 D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure (D-AP5) sowie zum Block glialer GJN 0,1 Carbenoxolone zugesetzt (alle Angaben in mM). Als Innenlösung wurde Std-IL verwendet. Isolierte Zellen wurden mittels *Concentration-Clamp-Device* aus der Messlösung in die mit Agonisten versehenen Blockerlösungen überführt. *In situ* erfolgte die Applikation mittels Schwerkraftinfusion oder peristaltischer Pumpe. Folgende Agonisten, Modulatoren sowie Antagonisten wurden eingesetzt: Cyclothiazid (CTZ), Muscimol, Bicuculline (Abcam, Cambridge, UK), Kainat (Sigma), D-Aspartat, 4-[2-(phenylsulfonylamino)ethylthio]-2,6-difluoro-phenoxyacetamid (PEPA, National Institute of Neuroscience, Tokyo, J), 1-(4-Aminophenyl)-3-methylcarbonyl-4-methyl-3,4-dihydro-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepinehydrochlorid (GYKI 53655), N,N,N-Trimethyl-5-[(tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-ylmethyl)amino]-1-pentanaminiumbromid (IEM 1460, Tocris, Bristol, UK). PEPA und CTZ wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Der Zusatz erfolgte zu den jeweils verwendeten Blockerlösungen. Wo nicht anders angegeben, erfolgte der Kauf der Chemikalien bei Sigma. Das Haltepotential war bei allen Experimenten -70 mV. Während der Applikation wurden in Anwesenheit der Agonisten/Antagonisten repetitive Spannungssprünge von -60 bis +20 mV (Inkrement von 10 mV, siehe Abb. 2) durchgeführt. Für die Erstellung von Strom-Spannungskennlinien (I/U) erfolgte eine Normierung des Stroms auf die Maximalamplitude bei -100 mV. Membranleitfähigkeiten wurden nach folgender Gleichung berechnet:

Gleichung 4:
$$g_{\text{mem}} = \frac{I_{-130\text{mV}}}{(-130\text{mV} - V_r)}$$

Wobei $I_{-130\text{mV}}$ den Strom bei einem Haltepotential von -130 mV und V_r das Ruhepotential der Zelle beschreibt. Ca²⁺-Permeabilitäten wurden anhand einer erweiterten konstanten

Feldgleichung errechnet (Mayer und Westbrook, 1987; Seifert und Steinhauser, 1995). Der Gleichrichtungsindex RI von AMPA-Rezeptoren wurde wie folgt berechnet:

Gleichung 5:
$$RI = \frac{[I_{+70mV}/(+70mV - E_{rev})]}{[I_{-70mV}/(-70mV - E_{rev})]}$$

Wobei I_{+70mV} sowie I_{-70mV} jeweils den Strom beim indizierten Haltepotential beschreiben und E_{rev} das Umkehrpotential des Rezeptorstroms angibt.

5.4 Farbstofffüllung von glialen Netzwerken

Die Füllung einzelner Astrozyten sowie Oligodendrozyten mit Biocytin zur Visualisierung von GJN erfolgte in 200 μ m dicken Schnitten des Thalamus oder Hippocampus. Diese wurden in einer Badkammer, welche kontinuierlich mit durch Carbogen äquilibrierter ACSF II durchflossen war, aufbewahrt. Pipetten wurden mit Biocytin-IL gefüllt, nach Etablierung der Whole-Cell-Konfiguration wurden die Zellen 20 min *per diffusionem* mit dem Tracer gefüllt. Danach erfolgte die Überführung des Schnittes in 4 °C kalte Paraformaldehydlösung zur Fixierung über Nacht (PFA 4%, gelöst in 0,1 M phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), pH 7,4).

5.5 Live-Imaging vitaler Schnitte mittels 2-Photonen-Mikroskopie

Von Gehirnen von *Cx43kiECFP* (*Cx43^{+/ECFP}*) sowie *PLP-GFP* Mäusen wurden 200 μ m dicke Schnitte angefertigt. Diese enthielten den Hippocampus oder den ventrobasalen Thalamus und wurden in ACSF II aufbewahrt. Je nach Experiment wurden die Schnitte zuvor in ACSF II, welches mit 1 μ M Sulforhodamin 101 (SR101, Molecular Probes, Life Technologies, Darmstadt, D) versetzt war, für 20 min bei 35 °C inkubiert. Nach Transfer in eine kontinuierlich mit begastem ACSF II durchströmte Badkammer erfolgte die Anfertigung optischer Schnitte mittels eines SP5 Laserscanning-Mikroskopes (LSM; Leica), welches mit einem Infrarot-Ultrashort-Pulse-Laser (MaiTai; Spectra Physics, Darmstadt, D) ausgestattet war. Zwei-Photonen-Absorption wurde durch Exzitation der Fluorophore mittels weniger Femtosekunden anhaltender Pulse von infrarotem Licht bei Wiederholungsfrequenzen von 80 MHz erreicht. Die Wellenlänge für Doppelanregung bei Verwendung zweier Fluorophore wurde je nach verwendetem Farbstoff an das beste Signal-Rausch-Verhältnis angepasst: ECFP/SR101 870–890 nm (1W); GFP/SR101 950 nm (0,5W). Das

reflektierte und transmittierte Licht wurde über zwei Detektoren im Strahlengang geleitet. Für GFP/SR101 wurde eine Separierung mittels FITC/TRITC-Filterwürfel (Leica), für ECFP/SR101 mittels YFP- sowie FITC/TRITC-Filterwürfel (Leica) vorgenommen. Es wurden Volumina von $455 \times 455 \times 40\text{-}200 \mu\text{m}^3$ mit einer Auflösung von $1024 \times 1024 \times 80\text{-}400$ Pixel gescannt. Die optische Schnittdicke betrug $1\text{-}2 \mu\text{m}$. Die Bildauswertung erfolgte mittels Leica LAS AF Software.

5.6 Immunhistochemische Untersuchungen

Für immunhistochemische Untersuchungen zur Charakterisierung glialer Zellen wurden Mäuse mittels intraperitonealer Injektion von Ketaminhydrochlorid (Medistar, Ascheberg, D; 80 mg/kg Körpergewicht) sowie Medetomidinhydrochlorid (CP Pharma, Burgdorf, D; 1,2 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Nach Erlöschen der Reaktion auf Schmerzreize erfolgte die transcardiale Perfusion der Tiere mit $4 \text{ }^\circ\text{C}$ kaltem PBS und folgend PFA 4%. Die Gehirne wurden entnommen und über Nacht in PFA 4% bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ nachfixiert. Nach mehrfachem Waschen der Gehirne mit PBS am Folgetag erfolgte die Anfertigung von $40 \mu\text{m}$ dicken, horizontalen Hirnschnitten an einem Vibratom (VT1200S, Leica) wie bereits beschrieben. Anschließend wurden die Schnitte in PBS bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Zunächst erfolgte das Blocken der Schnitte bei Raumtemperatur für zwei bis vier Stunden in PBS, der 0,1-2 % Triton X100 sowie 10 prozentiges normales Ziegenserum (NGS; Millipore, Darmstadt, D) zugesetzt wurden. Die Erstantikörper wurden in 0,1% Triton sowie 2% NGS in folgenden Konzentrationen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht inkubiert: Kaninchen- α - β -Gal (Molecular Probes, A11132) 1:400, Maus- α -GFP (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, D; A11120) 1:500, Kaninchen- α -Olig2 (*Oligodendrocyte lineage transcription factor 2*) (Millipore, AB9610) 1:1000, Maus- α -GS (Glutaminsynthetase) (Millipore, MAB302) 1:200, Kaninchen- α -Iba1 (*Ionized calcium binding adapter molecule 1*) (Wako, Neuss, D, 019-19741) 1:400, Maus- α -NeuN (*Neuron specific nuclear protein*) (Millipore, MAB377) 1:200, Kaninchen- α -NG2 (Millipore, MAB5320) 1:100, Ziege- α -GFP [FITC] (Abcam, Cambridge, UK, ab6662-100) 1:500, Huhn- α -GFP (Abcam, ab13970) 1:600. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit passenden Zweitantikörpern für eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur: Ziege- α -Maus-Alexa647 1:500, Ziege- α -Kaninchen-Alexa647 1:500, Esel- α -Kaninchen-Alexa647 1:500, Ziege- α -Kaninchen-Alexa594 1:500–1:800, Ziege- α -Maus-Alexa488 1:600, Ziege- α -Huhn-Alexa488 1:500

(alle Invitrogen). Die Schnitte wurden dann erneut dreimalig mit PBS gewaschen und es wurde eine Kernfärbung mit Hoechst (Molecular Probes, 1:100 in destilliertem H₂O) oder Draq5 (1, 5-bis{[2-(di-methylamino)ethyl]amino}-4, 8-dihydroxyanthracene-9, 10-dione) (Biostatus, Shephed, UK, 1:1000 in PBS) durchgeführt. Nach erneutem Waschen der Schnitte erfolgte das Aufziehen auf handelsübliche Objektträger mittels Aquapolymount (Polyscience Europe, Eppelheim, D) als Eindeckmedium. Die Visualisierung von Biocytin zur Untersuchung glialer Netzwerke erfolgte nach Übernachtsfixierung der zuvor elektrophysiologisch untersuchten Schnitte analog zu den oben angegebenen Protokollen. Es wurden, abhängig vom experimentellen Design, folgende Färbungen verwendet: Streptavidin-Cyanin3 (Streptavidin-Cy3) (Sigma) 1:300, -Cy2 1:100 oder-Cy5 1:200 (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK). Für immunhistochemische Analysen der GJN wurde analog der oben genannten Färbeprotokolle verfahren, zusätzlich wurde 2-5 % bovines Serumalbumin (BSA) zu Blockierungs- und Antikörperlösungen hinzugefügt. Die Inkubationszeit für Zweitantikörper betrug in diesen Fällen zwei Stunden. Digitale Bilder wurden mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops (Axiophot, Zeiss), eines konfokalen Leica TCS NT oder eines Leica SPE Mikroskops aufgenommen. Die Dicke der optischen Schnitte betrug 1–2 µm. Zur Auswertung wurde MetaVue (Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA) oder Fiji Software (fiji.sc) verwendet.

Zur Datenauswertung wurden mittels Leica LAS AF oder Fiji-Software einzel- oder doppelmarkierte Zellen in den optischen Schnitten identifiziert und entsprechend markiert. Für immunhistochemische Auswertungen oder Auswertung der durch *Live-Imaging* gewonnenen Daten erfolgte zunächst die Berechnung des Volumens der jeweils gescannten Region und anschließend die Berechnung der Zelldichten bezogen auf das Volumen des jeweiligen Scans.

5.7 Einzelzell-Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) sowie semi-quantitative-RT-PCR (sq-RT-PCR)

Der Nachweis von mRNA aus einzelnen Zellen wurde durch Gewinnung des Zytoplasmas und anschließende molekularbiologische Analyse geführt. Hierzu wurde zunächst das Zytoplasma einzelner Astrozyten nach Etablierung der Whole-Cell-Konfiguration unter mikroskopischer Kontrolle abgesaugt. Der Inhalt der Pipette wurde sodann in ein mit 3 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte das

Einfrieren der Probe mittels flüssigem Stickstoff und die Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Durchführung der RT-PCR. Zur Synthese von komplementärer Einzelstrang-DNA (cDNA) wurde ein Reaktionsmix (Volumen: $5,5\ \mu\text{l}$) zugefügt, in welchem First-Strand-Puffer (Promega, Mannheim, D), Desoxyribonucleotidtriphosphate (dNTPs, Konzentration $4 \times 250\ \mu\text{M}$, Life Technologies), zufällige Hexanukleotid-Primer ($50\ \mu\text{M}$, Roche, Mannheim, D), MgCl_2 ($25\ \text{mM}$), 20 Einheiten RNasin (Promega) sowie $0,5\ \mu\text{l}$ GoScript™ Reverse Transkriptase (Promega) erhalten waren. Die Synthese der cDNA-Stränge wurde für 1 Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. In Folge wurde eine Multiplex-PCR mit Primern für die AMPA-Rezeptor-Untereinheiten, für die α -, β -, γ - und δ -Untereinheiten des GABA_A -Rezeptors und für das Housekeeping-Gen *S100 β* durchgeführt. Als erstes wurde die zuvor gewonnene cDNA, PCR-Puffer, MgCl_2 ($2,5\ \text{mM}$), Primer (jeweils $200\ \text{nM}$, beziehungsweise $100\ \text{nM}$ für *S100 β*) sowie $3,5\ \text{U}$ Taq-Polymerase (Life Technologies) hinzugegeben. Es wurden zwei Runden PCR durchgeführt. Die PCR wurde in 45 Zyklen durchgeführt (Denaturierung bei $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ für $25\ \text{s}$, Hybridisierung bei $49\text{ }^{\circ}\text{C}$ für fünf min in den ersten fünf Zyklen und für $45\ \text{s}$ in den übrigen Zyklen, Elongation bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ für $25\ \text{s}$, beziehungsweise sieben min im letzten Zyklus). Ein Aliquot der ersten PCR-Runde ($2\ \mu\text{l}$) wurde dann für die zweite Runde der PCR mit spezifischen Primern für die einzelnen Untereinheiten der AMPA- sowie GABA_A -Rezeptoren versetzt (Nested-PCR, 35 Zyklen). Unter Bedingungen wie oben beschrieben erfolgte eine erneute PCR, zusätzlich wurden jedoch dNTPs ($4 \times 40\ \mu\text{M}$) sowie Platinum-Taq-Polymerase ($2,5\ \text{U}$, Invitrogen) hinzugefügt. Die PCR-Produkte wurden mittels Gel-Elektrophorese unter Verwendung eines Längenstandards (*Low molecular weight DNA ladder*, New England Biolabs, Frankfurt, D) identifiziert. Die Primerspezifität wurde anhand eines Kontrollansatzes mit mRNA aus einem kompletten Mausgehirn überprüft. Das Weglassen des RT-Enzymes sowie der Ersatz von cDNA durch Wasser dienten als Negativkontrollen für die reverse Transkriptasereaktion sowie die PCR-Amplifikation. Eine Unterscheidung von Flip- und Flop-Splicevarianten des AMPA-Rezeptors wurde mittels Gel-Elektrophorese vorgenommen. Hierzu wurde zunächst die zweite Runde der PCR für die Untereinheiten *GluA1-4* wiederholt. Nach Aufreinigung des Produktes (MinElute PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, D) und Lösen in $30\ \mu\text{l}$ H_2O wurden jeweils $8\ \mu\text{l}$ des PCR-Produktes mit Restriktionsenzymen inkubiert und anschließend mittels Elektrophorese in einem 3 %igen Agarose-Gel (Agarose 1000, Life Technologies) aufgetrennt. Ein 50 Basenpaare umfassender Längenstandard diente zur Identifikation

der Restriktionsprodukte. Als Restriktionsenzyme dienten die Endonukleasen BsaHI, TspRI, MseI sowie HpaI (New England Biolabs).

Zur semiquantitativen Analyse von Transkripten der Cx43- sowie Cx30-Gene wurden Teile der Thalami und Hippocampi aus 200 µm dicken Schnitten von *C57Bl/6J* Mäusen gewonnen. Aus diesen wurde durch Anwendung von Trizol (Life Technologies) mRNA extrahiert und in mit DEPC vorbehandeltem Wasser gelöst (Volumen 10 µl). Ein Mix aus PCR-Puffer, 2,5 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol (Life Technologies) 20 U DNase-I (Roche, Mannheim, D), sowie 40 U RNase Inhibitor (Promega, Mannheim, D) wurde zur Entfernung genomischer DNA eingesetzt. Das Endvolumen betrug 20 µl, die Reaktion erfolgte für 30 min bei 37 °C. *Oligo-linked-Dynabeads*TM (Life Technologies) wurden zur mRNA-Isolation eingesetzt. Die so gewonnene mRNA wurde in 20 µl Wasser aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Die semiquantitative RT-PCR wurde mittels des TaqManTM Systems (Applied Biosystems, Darmstadt, D) durchgeführt. Hierzu kam ein Single-Enzyme Ansatz (rTth DNA Polymerase; TaqManTM EZ RT-PCR kit, Applied Biosystems) zum Einsatz. Der Reaktionsansatz umfasste 1,25 µl, darin enthalten waren: 1 µl mRNA, TaqManTM-EZ-Puffer, 3 x 300 µM dNTPs (2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat, 2'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat sowie 2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat), 600 µM 2'-Desoxyuridine-5'-Triphosphat, 3 mM Mn(OAc)₂, 1,25 U rTth-DNA-Polymerase, 0,125 U Uracil-N-Glycosylase, 100 nM TaqManTM Probe sowie 600 nM *Gja1* oder *Gjb6* Primer. *B-Actin* Quantifizierung erfolgte mittels TaqmanTM-Probe/Primer Mix (Applied Biosystems). Die RT-PCR für *Gja1* (Cx43), *Gjb6* (Cx30) sowie das Referenzgen *β-Actin* wurden für jede Probe parallel angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 50 °C für zwei min, die Erststrangsynthese bei 60 °C für 20 min. Nach Denaturierung (95 °C, für fünf min) wurden 40 PCR-Zyklen durchgeführt (Denaturierung bei 94 °C für 15 s, Primer-Hybridisierung sowie Elongation bei 59 °C für 60 s). Die Fluoreszenzintensität wurde während jedes Hybridisierungs-/Elongations-Schrittes ausgelesen. Die Datenanalyse erfolgte durch Vergleich der Schwellenwerte (Schwellenzyklus; C_T) des untersuchten Genes (*Gja1*, *Gjb6*) mit denen des Referenzgens (*β-Actin*) bei gleicher Fluoreszenzemission R_n (Seifert et al., 2009).

Die Primer-Tafeln finden sich im Anhang.

5.8 Western Blots

Hippocampus- und Thalamusgewebe von *C57Bl6J* sowie *Cx30LacZ/LacZ*; *Cx43fl/fl:hGFAP-Cre* Mäusen wurde wie oben beschrieben präpariert und in modifiziertem Lyse-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5 % Nonidet P40, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 1 % Triton X100, pH 7,5), welcher mit einem *Single-Use* Protease- sowie Phosphatase-inhibitormix versehen war lysiert (Thermo-Scientific, St. Leon-Rot, D). Die Inkubation sowie Homogenisierung des Gewebes erfolgte auf Eis für insgesamt 30 min. Nach Zentrifugieren der Proben bei 13000 g für 30 min bei 4 °C erfolgte die Übertragung des Überstandes in frische Reaktionsgefäße. Mittels eines Bicinchoninsäure-Assays (BCA-Assay, Pierce, Bonn, D) erfolgte die Abschätzung des Proteingehaltes, im Folgenden wurden 30-50 µg Protein pro Lane für die Blots verwendet. Die Lysate wurden mit Proben-Puffer (62,5 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethanchlorid (TRIS-Cl), 3 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,01 % Bromophenolblau, 5 % β-Mercaptoethanol, 10 % Glycerol, pH 6,8) gemischt und für 10 min bei 65 °C erhitzt. Nach erneutem Zentrifugieren erfolgte eine Standard 10-12 % Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) sowie das Elektroblothen der aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran. Die Membranen wurden in TRIS-Puffer, welcher 5 % Milchpulver sowie 0,05 % Tween-20 enthielt geblockt (pH 7,4) und danach bei 4 °C über Nacht mit folgenden Primärantikörpern inkubiert: Kaninchen-α-Cx43 (Sigma) 1:5000, Kaninchen-α-Cx30 (Zymed-Invitrogen, Life Technologies) 1:250, Maus-anti-α-Tubulin (Sigma) 1:20000. Als Zweitantikörper wurden verwendet: Ziege-α-Maus-Meerrettichperoxidase-Konjugat (HRP-Konjugat) (GE Healthcare, München, D) 1:10000, Ziege-α-Kaninchen-HRP-Konjugat (GE Healthcare) 1:10000. Alle Antikörper wurden in oben aufgeführtem TRIS-Puffer verdünnt. Die Visualisierung der HRP erfolgte mittels West-Dura-Substrat (Pierce), die Messung des Signals mittels GeneGnome-System zur digitalen Erfassung (Synoptics, Cambridge, UK). Die Densitometrie sowie Analyse der Rohdaten erfolgte mit der GeneTools Software (Synoptics). Cx43 sowie Cx30 wurden immer aus derselben Probe bestimmt.

5.9 Datenanalyse und Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte softwaregestützt mittels Fiji, Leica LAS AF, MetaVue, MS Excel (Microsoft, Redmont, Washington, USA) oder Igor Pro (Wavemetrics, Portland, Oregon, USA). Alle Daten werden als Mittelwert ± Standardfehler (*Standard error of the*

mean; SEM) angegeben. Die statistische Analyse erfolgte unter Benutzung des Students t-Tests, des Mann-Whitney U-Tests oder des *Analysis of variance*-Tests (ANOVA-Test). Eine Post-hoc Analyse erfolgte mittels des Tukey-Tests, wo angebracht. Unterschiede wurden bei einem p-Wert von $< 0,05$ (*) oder $< 0,01$ (**) als statistisch signifikant angesehen.

6. Ergebnisse

6.1 Zwei distinkte astrozytäre Populationen im Thalamus der Maus können anhand der funktionellen Expression von AMPA-Rezeptoren unterschieden werden

6.1.1 AMPA-Rezeptoren werden auf einem Teil der thalamischen Astrozyten exprimiert

Neuronale Zellen weisen regionsspezifisch distinkte Expressionsmuster iono- sowie metabotroper Rezeptoren auf. Dies bildet eine der Grundlagen der neuronalen Diversifikation im ZNS (Cauli et al., 1997; Llinas, 1988; Markram et al., 2004). Für Gliazellen konnte ebenfalls die Expression spezifischer Rezeptortypen in bestimmten Hirnregionen nachgewiesen werden. Regionsspezifische Heterogenität konnte für astrozytäre Zellen im Hinblick auf die funktionelle sowie molekulare Expression von AMPA- und NMDA-Rezeptoren gezeigt werden, während GABA-Rezeptoren vermutlich ubiquitär von Astrozyten exprimiert werden (Fraser et al., 1995; Grass et al., 2004; Lalo et al., 2006; Matthias et al., 2003; Muller et al., 1992; Palygin et al., 2011; Piet und Jahr, 2007; Porter und McCarthy, 1995; Saab et al., 2012; Schipke et al., 2001; Velez-Fort et al., 2012; Wang et al., 2005). In der vorliegenden Studie wurden erstmals thalamische Astrozyten hinsichtlich ihrer molekularen und funktionellen Expression ionotroper Glutamat- und GABA-Rezeptoren untersucht. Astrozyten aus dem Thalamus von *tg(hGFAP-EGFP)* Mäusen wurden, wie zuvor beschrieben, mittels eines enzymatischen Verdaus isoliert. Dadurch kann eine Verbesserung der Space-Clamp-Kontrolle sowie eine Minimierung indirekter Effekte - durch Aktivierung benachbarter Zellen und nachfolgender Beeinflussung der untersuchten Zellen - erreicht werden (Kimmelberg et al., 2000; Steinhauser et al., 1994; Zhou und Kimmelberg, 2000). Die Identifikation der Zellen erfolgte durch Visualisierung der endogenen EGFP-Fluoreszenz sowie des weit verzweigten Fortsatzbaumes. Zusätzlich wurde in der Whole-Cell-Konfiguration durch Applikation hyper- sowie depolarisierender Reize eine für Astrozyten typische lineare I/U-Beziehung beobachtet. Das Ruhemembranpotential der untersuchten Zellen betrug $-71,5 \pm 0,5$ mV ($n = 81$) und ihr Eingangswiderstand ($R_i = R_s + R_m$) $23,2 \pm 1,2$ M Ω ($n = 81$). Um auch kleine Ströme durch ionotrope Rezeptoren im Voltage-Clamp Modus sichtbar zu machen, wurden zunächst die für den niedrigen Eingangswiderstand verantwortlichen, großen astrozytären Kir- sowie übrigen Leckleitfähigkeiten durch eine Lösung geblockt, welche BaCl₂ und Quinine oder BaCl₂, TEA und 4-AP enthielt. Dadurch kam es zu einer Depolarisation der Zellen um $16,3 \pm 1,3$ mV sowie einer Erhöhung

des Eingangswiderstandes auf $198 \pm 21 \text{ M}\Omega$ ($n = 81$) (Abb. 2A). In Folge wurden die Zellen dem Agonisten am AMPA/Kainat-Rezeptor Kainat (KA, $500 \mu\text{M}$) sowie zusätzlichen Modulatoren dieses Rezeptors, CTZ ($100 \mu\text{M}$) oder PEPA ($100 \mu\text{M}$) ausgesetzt. Diese positiv allosterischen Modulatoren verstärken jeweils spezifisch die Kainat-induzierten Ströme von Flip- oder Flop-Splice-Varianten des AMPA-Rezeptors (Ahmed et al., 2010; Partin et al., 1994; Sekiguchi et al., 1997). Depolarisierende Ströme wurden ab 20 pA als durch Agonisten verursacht betrachtet, es erfolgte eine Normierung auf die Membrankapazität der Zellen, um Verzerrungen durch Unterschiede in der Größe der gepatchten Zellen zu minimieren. Die Applikation von Kainat induzierte bei einem Haltepotential von -70 mV einen Einwärtsstrom von $4,9 \pm 1,3 \text{ pA pF}^{-1}$ ($n = 17$). Die Koapplikation von CTZ in diesen Zellen potenzierte diese Antworten um $575 \pm 69 \%$ (Abb. 2B). Anhand des Ansprechens auf Applikation von Kainat und CTZ konnten zwei astrozytäre Zelltypen im Thalamus unterschieden werden, welche GluA+ und GluA- genannt wurden. Hierbei bezeichnet GluA+ Zellen, welche einen funktionellen AMPA-Rezeptor exprimieren, wohingegen GluA- Zellen dies nicht tun. Bei 73 untersuchten Astrozyten induzierte die Applikation von Kainat und CTZ in 43 Zellen (59%) einen mit einer Depolarisierung einhergehenden Einwärtsstrom (mittlere Amplitude $26 \pm 4,1 \text{ pA pF}^{-1}$, $n = 43$) (Abb. 2B). Die I/U-Kurve der durch Kainat und CTZ induzierten Antworten war linear (Rektifikationsindex (RI): $0,99 \pm 0,06$; $n = 18$) mit einem Umkehrpotential nahe 0 mV ($-1,45 \pm 1,43 \text{ mV}$) (Abb. 2D). Die deutliche Modulation der Kainat-Antwort durch CTZ zeigte die Expression der Flip-Splice-Variante des Rezeptors an. Um auch das Vorhandensein der Flop-Splice-Variante zu untersuchen, wurden Astrozyten Kainat und PEPA ausgesetzt. Hierunter kam es ebenfalls zu einer Potenzierung der Antworten um $583 \pm 46 \%$ ($n = 4$) (Abb. 2B). Die Ergebnisse weisen auf die Expression beider Splice-Varianten in den untersuchten Zellen hin. Durch Kainat und CTZ induzierte Ströme waren durch den spezifischen Antagonisten GYKI 53655 ($100 \mu\text{M}$) nahezu komplett blockierbar (Inhibition um $96,3 \pm 2 \%$; $n = 13$) (Abb. 2C). Die Applikation von D-Aspartat, einem Agonisten des elektrogenen glialen Glutamat-Transporters (GluT) induzierte sowohl in GluA+ als auch in GluA- Zellen tonische Ströme ($4,6 \pm 0,8 \text{ pA pF}^{-1}$ in 12 von 14 Zellen, $n = 14$), in allen untersuchten GluA+ Zellen konnten transportervermittelte Ströme gemessen werden ($4,5 \pm 0,9 \text{ pA pF}^{-1}$, $n = 9$) (nicht gezeigt).

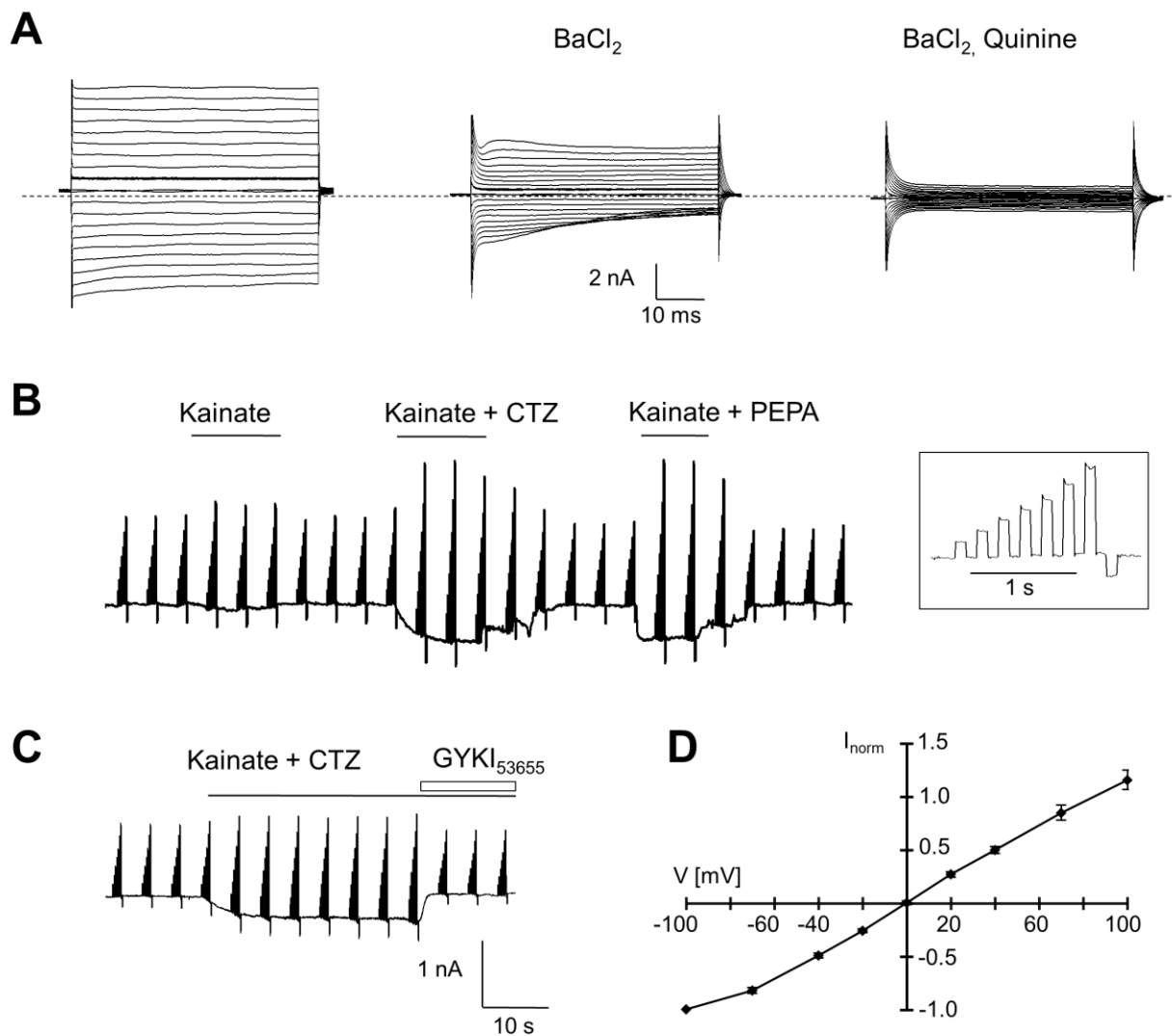


Abb. 2: Pharmakologische Charakterisierung von AMPA-Rezeptoren in isolierten thalamischen Astrozyten. A: Membranströme nach de- und hyperpolarisierenden Spannungssprüngen (10 mV Inkrement, Haltespannung -70 mV). Reduktion von K⁺-Strömen durch BaCl₂ (100 μM) sowie Quinine (200 μM). B: Applikation von Kainat (KA, 500 μM) in Gegenwart von BaCl₂ sowie Quinine induziert einen Einwärtsstrom von 100 pA bei einem Haltepotential von -70 mV. Nach Auswaschen erfolgt die Koapplikation von KA und CTZ (500/100 μM) sowie KA und PEPA (500/100 μM) an derselben Zelle, was den Einwärtsstrom um 551 % sowie 500 % potenziert. Ausschläge von der Grundlinie nach oben und unten repräsentieren Membranströme, welche durch De- sowie Hyperpolarisation der Membran (-40, -20, 0, 20, 40, 70, 100 sowie -100 mV) induziert wurden (siehe Vergrößerung). Die Skalierung gilt ebenfalls für C. C: Antworten auf KA plus CTZ werden durch den Antagonisten am AMPA-Rezeptor GYKI 53655 (100 μM) geblockt. D: Darstellung der gemittelten I/U-Beziehungen nach AMPA-Rezeptor-Aktivierung. Es erfolgte eine Normierung der Ströme auf die Maximalamplitude bei -100 mV. Die Balken geben SEM an. Das Umkehrpotential war $-1,45 \pm 1,43$ mV (n = 18). Modifiziert nach Höft et al., 2014.

6.1.2 GluA+ Zellen besitzen AMPA-Rezeptoren mit geringer Ca^{2+} -Leitfähigkeit

Die relative Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen ist eine Determinante der biologischen Funktion von ionotropen Glutamaterezeptoren. Ein Ca^{2+} -Einstrom durch den AMPA-Rezeptor ist von der Expression der Glu2A-Untereinheit abhängig (Burnashev et al., 1992; Geiger et al., 1995). Rezeptoren, welche diese Untereinheit aufweisen, zeichnen sich durch eine niedrige Ca^{2+} -Permeabilität aus. Durch Anwendung des Blockers IEM 1460, welcher vor allem AMPA-Rezeptoren ohne Glu2A-Untereinheit blockt (Buldakova et al., 1999; Samoilova et al., 1999), können pharmakologisch Ca^{2+} -permeable Rezeptoren - welche folglich keine Glu2A-Untereinheit aufweisen - isoliert werden. In Anwesenheit von IEM 1460 (100 μM) reduzierte sich die Amplitude der durch Kainat plus CTZ induzierten Ströme um $42,3 \pm 7,8 \%$ ($n = 13$) (Abb. 3A). Dies war ein deutlicher Hinweis auf eine Expression von Ca^{2+} -permeablen AMPA-Rezeptoren auf thalamischen Astrozyten. In einem nächsten Schritt wurde die Ca^{2+} -Permeabilität der Rezeptoren weiter durch Vergleich der Antworten nach Applikation von Kainat sowie CTZ in NaCl- (150 mM) sowie CaCl_2 - (50 mM) basierter Lösung untersucht. In 3 von 6 Zellen konnten in CaCl_2 -Lösung bei einem V_h von -70 mV Einwärtsströme abgeleitet werden (Abb. 3B). Die Amplitude belief sich auf knapp 10 % der zuvor in NaCl-Lösung gemessenen Ströme ($10,9 \pm 4,3 \%$) bei einer absoluten Stromdichte von $3,5 \pm 0,7 \text{ pA pF}^{-1}$. Das Umkehrpotential in CaCl_2 -Lösung war im Vergleich zu dem in NaCl-Lösung gemessenen signifikant zu negativeren Potentialen hin verschoben ($-43 \pm 2 \text{ mV}$), die I/U Kurve zeigte auswärtsgerichtete Antworten ($RI = 1,58 \pm 0,24$) (Abb. 3C). Durch Anwendung einer modifizierten Feldgleichung (Mayer und Westbrook, 1987; Seifert und Steinhauser, 1995) wurde eine relative Ca^{2+} -Permeabilität der untersuchten AMPA-Rezeptoren von 0,15 ($P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{K}^+}$) bestimmt. Zusammenfassend konnte so der Nachweis der Expression von AMPA-Rezeptoren mit niedriger Ca^{2+} -Permeabilität auf juvenilen thalamischen Astrozyten geführt werden.

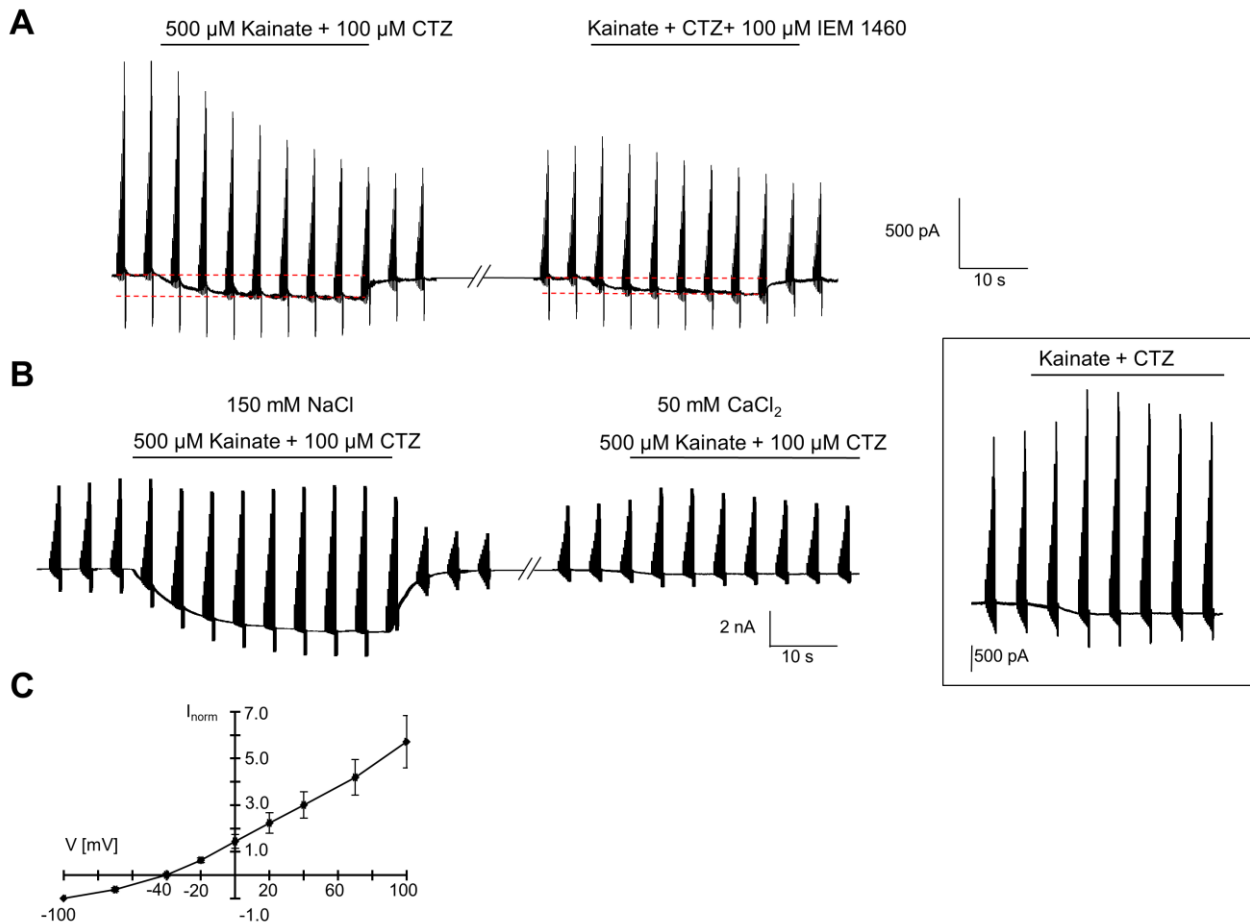


Abb. 3: A: Koapplikation von Kainat, CTZ und IEM 1460 führt zu einer Reduktion des zuvor durch Kainat plus CTZ induzierten Einwärtsstromes. Dies weist auf eine partielle Ca^{2+} -Permeabilität der untersuchten AMPA-Rezeptoren hin, da IEM 1460 vor allem AMPA-Rezeptoren ohne Glu2A-Untereinheit blockt. B: KA/CTZ-induzierte Antworten in NaCl sowie CaCl_2 -Lösung (gleiche Zelle) in Gegenwart von Quinine und BaCl_2 . Die Vergrößerung verdeutlicht die Rezeptorantwort in CaCl_2 -Lösung. C: Gemittelte I/U-Beziehungen der induzierten Antworten in CaCl_2 -Lösung. Zuvor erfolgte eine Normierung der Ströme auf die Maximalamplitude bei -100 mV. Die Balken geben SEM an. Das Umkehrpotential war -43 ± 2 mV ($n = 3$). Siehe auch Abb. 2 D. Modifiziert nach Höft et al., 2014.

6.1.3 GluA+ und GluA- Astrozyten stellen kein Artefakt isolierter Astrozyten dar

Enzymatischer Verdau kann zu Alterationen von Oberflächenproteinen der Zellmembran wie zum Beispiel Rezeptoren oder Absterben von Zellen führen (Akaïke et al., 1988; Kimelberg et al., 1997; Kimelberg et al., 2000). Um auszuschließen, dass die fehlende Antwort von GluA- Astrozyten auf Kainat/CTZ- oder Kainat/PEPA-Applikation durch verminderte Vitalität der Zellen oder enzymatische Destruktion von Rezeptoren bedingt war,

wurden diese Zellen zusätzlich nach Exposition gegenüber Kainat/CTZ oder Kainat/PEPA dem GABA_A-Rezeptoragonisten Muscimol ausgesetzt, da eine astrozytäre Expression von GABA_A-Rezeptoren bereits für zahlreiche Hirnregionen gezeigt werden konnte. In allen untersuchten GluA- Zellen (n = 29) konnten Rezeptor-Antworten nach Muscimol-Applikation aufgezeichnet werden (siehe auch Abschnitt 6.1.6 sowie Abb. 5). Weiterhin konnte der Nachweis von GluA+ sowie GluA- Astrozyten auch in vitalen, nicht enzymatisch verdauten Schnitten geführt werden. Hierzu erfolgten elektrophysiologische Messungen in der Whole-Cell-Konfiguration *in situ*. Um indirekte Effekte zu minimieren sowie die Spannungskontrolle über die untersuchten Zellen zu verbessern, wurden akute Hirnschnitte zunächst in eine Blockerlösung transferiert. Dieser waren zur Unterdrückung neuronaler Aktivität sowie der GJ-vermittelten astrozytären Kopplung CdCl₂, TTX, D-AP5 und Carbenoxolone zugesetzt. Wie zuvor erfolgte die Minimierung der großen Kir- sowie weiteren Leckleitfähigkeiten durch Hinzufügen von BaCl₂ sowie Quinine. Die Unterdrückung der GJ-vermittelten Kopplung wurde durch Injektion eines Tracers (Biocytin 0,5 %; passive Diffusion aus der Pipette in Whole-Cell-Konfiguration über 20 min) mit folgender immunhistochemischer Darstellung bestätigt (siehe auch: Griemsmann et al., 2015) (nicht gezeigt). Unter diesen Bedingungen reagierte ein Teil der untersuchten Astrozyten auf die Applikation von KA plus CTZ mit Einwärtsströmen (19 von 24 Zellen; nicht gezeigt). Somit konnte die Existenz von GluA+ und GluA- Astrozyten ebenfalls *in situ* gezeigt werden.

6.1.4 GluA+ und GluA- Zellen sind elektrophysiologisch differente Zellgruppen

Interessanterweise zeigten sich zwischen AMPA-Rezeptor exprimierenden (GluA+) sowie AMPA-Rezeptor negativen (GluA-) isolierten Astrozyten deutliche Unterschiede der passiven elektrophysiologischen Eigenschaften sowie hinsichtlich der Expression von Ba²⁺-sensitiven Ionenkanälen. So zeigte sich zwischen den beiden Zellgruppen ein signifikant verschiedenes Membranpotential (GluA+: $-70,3 \pm 0,9$ mV, n = 43; GluA-: $-72,9 \pm 0,6$ mV, n = 30, t-Test: p < 0,05), nicht jedoch eine Differenz der Eingangswiderstände der Zellen (R_i; GluA+: $26,5 \pm 2,2$ MΩ, n = 43; GluA-: $24,4 \pm 1,7$ MΩ, n = 30, t-Test: p > 0,05). Wesentliche Unterschiede bestanden zudem in der Komposition der das passive Strommuster der Astrozyten bestimmenden Leitfähigkeiten. In GluA- Zellen kam es nach Applikation der BaCl₂ enthaltenden Lösung, welche vornehmlich Kanäle der Kir-Familie blockt (Seifert et al., 2009), zu einer signifikant größeren Reduktion der Membranleitfähigkeiten als in

GluA+ Zellen (Ba^{2+} -sensitive Stromdichte; GluA+: $187 \pm 38 \text{ pA pF}^{-1}$; GluA-: $395 \pm 82 \text{ pA pF}^{-1}$; korrespondierende residuelle Leitfähigkeit in Anwesenheit von Ba^{2+} ; GluA+: $35,4 \pm 3,5 \%$; GluA-: $20,6 \pm 2,2 \%$, t-Test: $p < 0,05$) (Abb. 4A, B). Dementsprechend zeigen GluA- Zellen signifikant größere Ba^{2+} -sensitive Leitfähigkeiten als GluA+ Zellen.

6.1.5 Einzelzell-RT-PCR bestätigt die Heterogenität thalamischer Astrozyten

Der Nachweis von GluA+ sowie GluA- Zellen konnte durch semi-quantitative Einzelzell-RT-PCR auch auf molekularer Ebene geführt werden. Nach Identifikation von Astrozyten *in situ* und Ernten ihres Zytoplasmas mittels einer Patch-Pipette in Whole-Cell-Konfiguration konnten hinsichtlich der Expression von AMPA-Rezeptoren zwei distinkte Populationen gezeigt werden. Hierzu wurde nach reverser Transkription der extrahierten mRNA eine zwei Runden-Multiplex-PCR für AMPA-Rezeptoren sowie das Housekeeping-Gen *S100 β* durchgeführt. In Einklang mit den funktionellen Ergebnissen der pharmakologischen Charakterisierung der untersuchten AMPA-Rezeptoren konnte die GluA2-Untereinheit in der Mehrzahl (96 %) der Zellen nachgewiesen werden, GluA1, 3 und 4 konnten in jeweils 17,43 sowie 35 % der untersuchten Astrozyten gefunden werden ($n = 23$). In fünf Zellen konnte keine für GluA1-4 kodierende mRNA amplifiziert werden, alle Zellen wiesen jedoch Transkripte des astrozytären Proteins *S100 β* auf ($n = 28$). In einer nachfolgenden Restriktionsanalyse konnte die Expression sowohl von Flip- als auch von Flop-Splice-Varianten der Untereinheiten GluA2 bis GluA4 gezeigt werden. GluA2-Flip (82 %) sowie -Flop (79 %) konnten am häufigsten detektiert werden ($n = 22$). Unter den GluA3-exprimierenden Zellen zeigten sich Flop-Varianten in allen, Flip-Varianten in 50 % der Zellen ($n = 10$). GluA4-Flip- und -Flop-Varianten kamen zu jeweils 75 % in GluA4-positiven Zellen vor ($n = 8$).

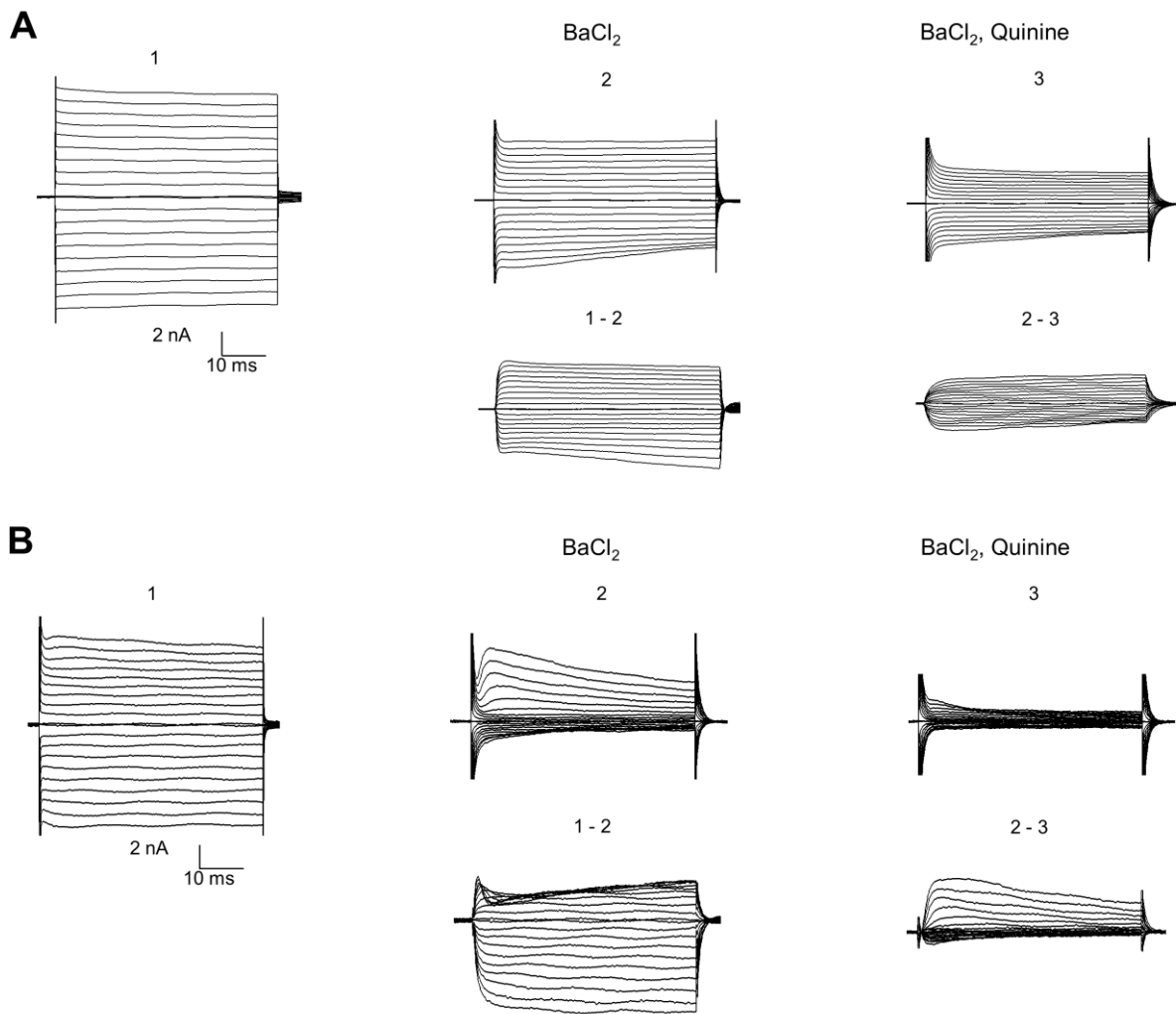


Abb. 4: Astrozyten, die keine AMPA-Rezeptoren exprimieren, zeigen größere Kir-Ströme. Membranströme wurden wie in Abb. 2A beschrieben aktiviert, die Ba^{2+} - sowie Quinineempfindlichen Ströme wurden wie angezeigt durch Subtraktion der Stromfamilien isoliert. Die gezeigte Glu⁺ Zelle (A) zeigt kleinere Ba^{2+} -sensitive Ströme als eine Glu⁻ Zelle, welche nicht auf Applikation von KA, KA/CTZ oder KA/PEPA reagiert (B). Modifiziert nach Höft et al., 2014.

6.1.6 Funktionelle $GABA_A$ -Rezeptoren werden auf allen thalamischen Astrozyten exprimiert

Wie bereits zuvor berichtet, wurde die Expression von funktionellen $GABA_A$ -Rezeptoren nach der pharmakologischen Charakterisierung der AMPA-Rezeptoren untersucht. Isolierte Astrozyten wurden Muscimol ausgesetzt (100 μM , $n = 7$; nicht gezeigt, oder 500 μM Muscimol, $n = 44$) (Abb. 5A, B), wodurch in allen untersuchten Zellen ein rasch desensibilisierender Einwärtsstrom verursacht wurde (Abb. 5A₂, B₂). Dieser entsprach bei einer intra-

zellulären Cl⁻-Konzentration von 135 mmol einem Cl⁻-Ausstrom. Alle untersuchten Astrozyten zeigten - unabhängig davon, ob sie zuvor als GluA⁺ (n = 22) oder GluA⁻ (n = 29) Zellen klassifiziert wurden - eine Rezeptorantwort auf Muscimol. Die Stromdichte der induzierten Ströme war hierbei zwischen den beiden Zelltypen nicht signifikant verschieden (t-Test; gemittelte Stromdichte in GluA⁺ und GluA⁻ Zellen nach Applikation von 500µM Muscimol: 370 ± 48 pA pF⁻¹, n = 44). Dies steht im Einklang mit anderen Studien, welche eine ubiquitäre GABA_A-Rezeptor-Expression auf Astrozyten nahelegen (Velez-Fort et al., 2012). Die durch Muscimol induzierten Ströme konnten in beiden Zellpopulationen durch Koapplikation des Blockers Bicuculline fast vollständig antagonisiert werden (Reduktion auf $9,9 \pm 2,2$ %, n = 12) (Abb. 5A₂, 5B₂). Auf Transkriptionsebene konnten durch Einzelzell-RT-PCR für α-, β- und γ-Untereinheiten bis auf die α3- sowie γ2-Untereinheit alle Untereinheiten des GABA-Rezeptors regelhaft nachgewiesen werden (α1-5: 33, 50, 0, 7 und 56 %, n = 18; β1 und β2/3: 86 und 43 %, n = 7; γ1-3: 100, 11 und 89 %, n = 9)

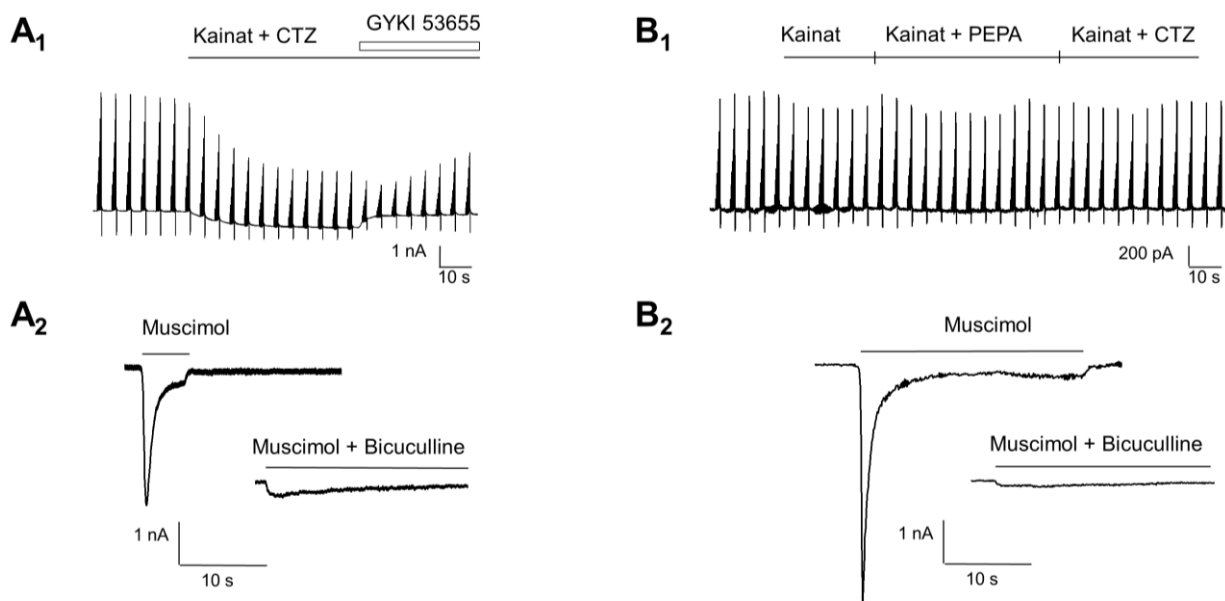


Abb. 5: GluA⁺ und GluA⁻ Zellen exprimieren GABA_A-Rezeptoren. A₁, B₁: Applikation von Kainat sowie spezifischen Modulatoren verursacht einen blockierbaren Einwärtsstrom in GluA⁺, nicht jedoch GluA⁻ Astrozyten. Die Verringerung der Auswärtsströme in Anwesenheit von Kainat ist wahrscheinlich durch einen Block glialer K⁺-Leitfähigkeiten durch AMPA-Rezeptor-induzierten Na⁺-Einstrom bedingt (Schroder et al., 2002). A₂, B₂: Unabhängig von dem Antwortverhalten auf AMPA-Rezeptor-Agonisten/Modulatoren-Applikation reagieren beide Zellen bei einem Haltepotential von -70 mV mit einem rasch desensibilisierenden Einwärtsstrom auf Muscimol-Gabe (500 µM) welcher durch Bicuculline (100 µM) fast vollständig geblockt werden kann. Die Konzentrationen von KA, CTZ, PEPA sowie GYKI 53655 sind Abb. 2 zu entnehmen. Modifiziert nach Höft et al., 2014.

6.2 Thalamische Gliazellen bilden ausgedehnte zelluläre Netzwerke und enthalten Astrozyten, Oligodendrozyten sowie einen intermediären Zelltyp

6.2.1 Thalamische Astrozyten formen ausgedehnte Synzytien

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse GJ-vermittelter-Netzwerke (GJN) zwischen Gliazellen im Thalamus der Maus. Diese wurden in der Vergangenheit mit vielfältigen Funktionen in Verbindung gebracht. Neben metabolischer sowie struktureller Unterstützung für Neurone, deren Axone und Gliazellen (Funfschilling et al., 2012; Lee et al., 2012; Nave, 2010; Nualart-Marti et al., 2013; Pellerin und Magistretti, 2012; Rouach et al., 2008; Suzuki et al., 2011), Rollen bei der Regulation des extrazellulären Milieus – insbesondere der K^+ -Konzentration sowie des pH-Wertes (Deitmer und Rose, 1996; Newman et al., 1984; Orkand et al., 1966; Wallraff et al., 2006) – wurde ebenfalls eine mögliche Teilnahme an der Informationsverarbeitung im ZNS diskutiert (Giaume et al., 2010; Pannasch et al., 2011). Verschiedene Typen von Gliazellen exprimieren spezifische Sets von Connexinen, welche sich zu homo- oder heterotypen GJ-Kanälen zusammensetzen können (Magnotti et al., 2011; Orthmann-Murphy et al., 2007; Theis und Giaume, 2012). Diese unterscheiden sich unter anderem hinsichtlich ihrer Permeabilität für kleine Moleküle sowie ihrem Gatingverhalten (Bedner et al., 2006; Cao et al., 1998; Elfgang et al., 1995; Harris, 2001, 2007; Kanaporis et al., 2008; Weber et al., 2004). Astrozyten exprimieren vorwiegend Cx43 (Genname: *Gja1*), Cx30 (*Gjb6*) und Cx26 (*Gjb2*), während auf Oligodendrozyten vor allem Cx32 (*Gjb1*) und Cx47 (*Gjc2*) vorkommen (Orthmann-Murphy et al., 2007; Theis und Giaume, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass Astrozyten des ventrobasalen Thalamus durch Ca^{2+} -Oszillationen neuronale Netzwerke beeinflussen können (Parri et al., 2001; Pirttimaki et al., 2013; Pirttimaki et al., 2011). Trotz der Relevanz des Thalamus für Signalprozessierung und -verschaltung wurden gliale Netzwerke in dieser Hirnregion bisher noch nicht untersucht. In dieser Studie wurden erstmalig thalamische GJN im Maushirn nachgewiesen und in Bezug auf ihre zelluläre sowie molekulare Komposition analysiert. Vergleichende Untersuchungen wurden unter Zuhilfenahme verschiedener transgener Mausmodelle (*tg(hGFAP-EGFP)*, *Cx43kiEGFP*, *Cx30LacZ/LacZ*, *Cx30LacZ/LacZ; Cx43fl/fl:hGFAP-Cre*, *tg(PLP-GFP)*), den jeweiligen wt-Littermates und genetisch nicht veränderten Mäusen vom Typ *C57Bl6J* im Hippocampus sowie Neocortex durchgeführt. Zuerst wurde die Existenz von GJN im Thalamus von *tg(hGFAP-EGFP)* Mäusen untersucht. Nachdem Astrozyten *in situ* mittels ihrer EGFP-Fluoreszenz sowie ih-

res passiven Strommusters identifiziert wurden, erfolgte die Injektion von Biocytin via Whole-Cell-Konfiguration in eine Zelle. Nachfolgend wurden GJN immunhistochemisch visualisiert (Abb. 6 A₁, A₂, B). Bereits zwei Wochen *post natum* zeigte sich eine maximale Ausdehnung thalamischer GJN, welche bis in das Erwachsenenalter der Mäuse größenkonstant blieben (p9 - p11: 84 ± 13 , n = 24; p13 - p15: 111 ± 8 , n = 20; p30 - p60: 108 ± 11 , n = 14; p90 - 120: 95 ± 8 Zellen, n = 9; Abb. 6C). Im ventrobasalen Thalamus verlaufen zahlreiche Faserbündel, entlang welcher teilweise die Ausdehnung der GJN erfolgte (Abb. 6B). Eine ähnliche Ausrichtung glialer Netzwerke entlang funktioneller Einheiten wurde bereits zuvor in anderen Hirnregionen berichtet (Houades et al., 2008; Roux et al., 2011).

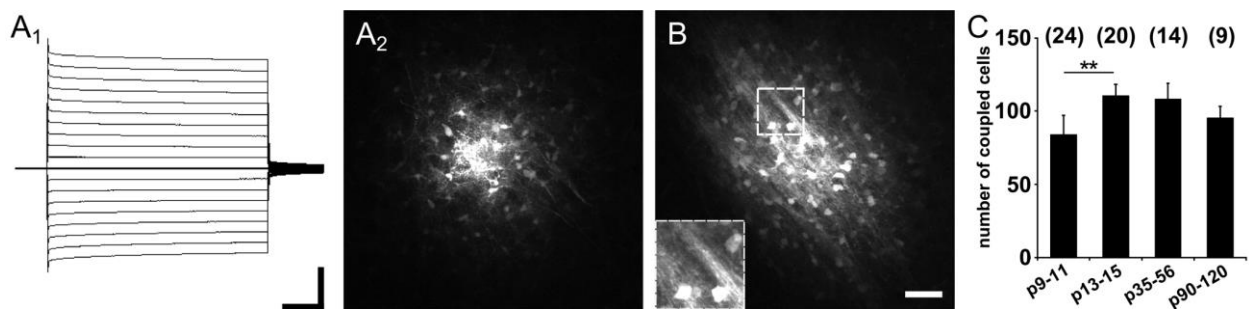


Abb. 6: Visualisierung von GJN im Thalamus. A₁: Repräsentatives Strommuster einer EGFP⁺ Zelle (Astrozyt) einer *tg(hGFAP-EGFP)* Maus nach Applikation de- und hyperpolarisierender Spannungspulse (10 mV Inkrement, Haltespannung -80 mV). Skalierung: 10 ms, 5 nA. A₂: Biocytin markierte GJN im Thalamus, die Diffusion des Tracers erfolgte zum Teil entlang myelinisierter Fasern (B, siehe Vergrößerung). Skalierung: 50 μ m. Quantifizierung der GJN zu verschiedenen Zeitpunkten der Ontogenese. Die durchschnittliche Größe der GJN stieg zwischen p9 - 11 und p13 - 15 an und blieb dann konstant, ANOVA und *post-hoc* Tukey-Test: $p < 0,01$. Anzahl der Experimente in Klammern, Sternchen zeigen statistische Signifikanz an. Übernommen aus Griemsmann et al., 2015.

6.2.2 Regionsspezifische Unterschiede der Expression von Cx43 und Cx30

Cx43 ist maßgeblich für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der astrozytären GJN des Hippocampus verantwortlich (Wallraff et al., 2006). Mithilfe der *Cx43kiECFP* Reportermaus - in welcher das *Gja1/Cx43*-Gen durch den Reporter ECFP ersetzt wurde (Degen et al., 2012) - wurde die Rolle von Cx43 bei der Ausbildung astrozytärer GJN in den verschiedenen Hirnregionen Thalamus (TH), Neocortex (CO) und Hippocampus (HC) unter-

sucht. Die Experimente erfolgten in heterozygoten $Cx43^{+/ECFP}$ Tieren, zum Vergleich dienten wt-Littermates. In diesen verteilte sich, unabhängig von der untersuchten Hirnregion, das injizierte Biozytin in ca. 80 Zellen (Abb 7A - C). Das Alter der Tiere betrug p 30-64. Im Hippocampus war in $Cx43^{kiECFP}$ Mäusen im Vergleich zu wt-Tieren eine signifikant verminderte Ausdehnung der GJN nach Ersatz eines $Gja1/Cx43$ Allels durch ECFP nachweisbar ($Cx43^{+/+}$: 79 ± 9 , $n = 18$; $Cx43^{ECFP/+}$: 51 ± 10 Zellen, $n = 15$, t-Test: $p < 0,05$). Im Thalamus und Neocortex war hingegen keine Veränderung der Größe der GJN festzustellen (TH; $Cx43^{+/+}$: 79 ± 4 , $n = 9$; $Cx43^{ECFP/+}$: 87 ± 10 , $n = 11$; CO; $Cx43^{+/+}$: 75 ± 9 , $n = 7$; $Cx43^{ECFP/+}$: 71 ± 9 Zellen, $n = 11$, t-Test: p jeweils $> 0,05$) (Abb. 7D₁). In Einklang hiermit war der relative Anteil von ECFP-markierten Zellen in den mit Biocytin markierten GJN in den unterschiedlichen Hirnregionen verschieden. So waren im Hippocampus nahezu alle gekoppelten Zellen auch positiv für das Reporterprotein ECFP ($96,6 \pm 0,76$ %, $n = 15$), im Gegensatz hierzu exprimierte eine deutlich kleinere Fraktion der Zellen in GJN des Neocortex und des Thalamus ECFP (TH: $43,8 \pm 4,6$ %, $n = 10$; CO: $72,6 \pm 3,6$ %, $n = 5$) (Abb. 7D₂). Um die Expression von Cx43 sowie Cx30 ($Gjb6$) zusätzlich auf Transkriptionsebene zu untersuchen, wurde aus Gehirnschnitten von hGFAP-EGFP Mäusen, welche den Thalamus oder den Hippocampus enthielten, mRNA gewonnen und mittels sq-RT-PCR auf Transkripte für $Gja1$ sowie $Gjb6$ untersucht. Für eine semiquantitative Auswertung wurde das Verhältnis zu den mRNA-Leveln des Housekeeping-Gens β -Actin bestimmt. Es war ein deutlicher Unterschied bezüglich der Expression von mRNA für Cx43 respektive Cx30 zwischen Hippocampus und Thalamus festzustellen. In den hippocampalen Gewebeproben fand sich eine gegenüber thalamischen Schnitten signifikant erhöhte $Gja1/\beta$ -Actin-Ratio (HC: $0,12 \pm 0,02$, $n = 10$; TH, $0,09 \pm 0,03$, $n = 10$, t-Test: $p < 0,05$). Im Gegensatz dazu war auf Transkriptionsebene im Thalamus mehr Cx30 kodierende mRNA als im Hippocampus vorhanden (HC: $0,06 \pm 0,01$, $n = 10$; TH: $0,09 \pm 0,02$, $n = 10$, t-Test: $p < 0,05$) (Abb. 8).

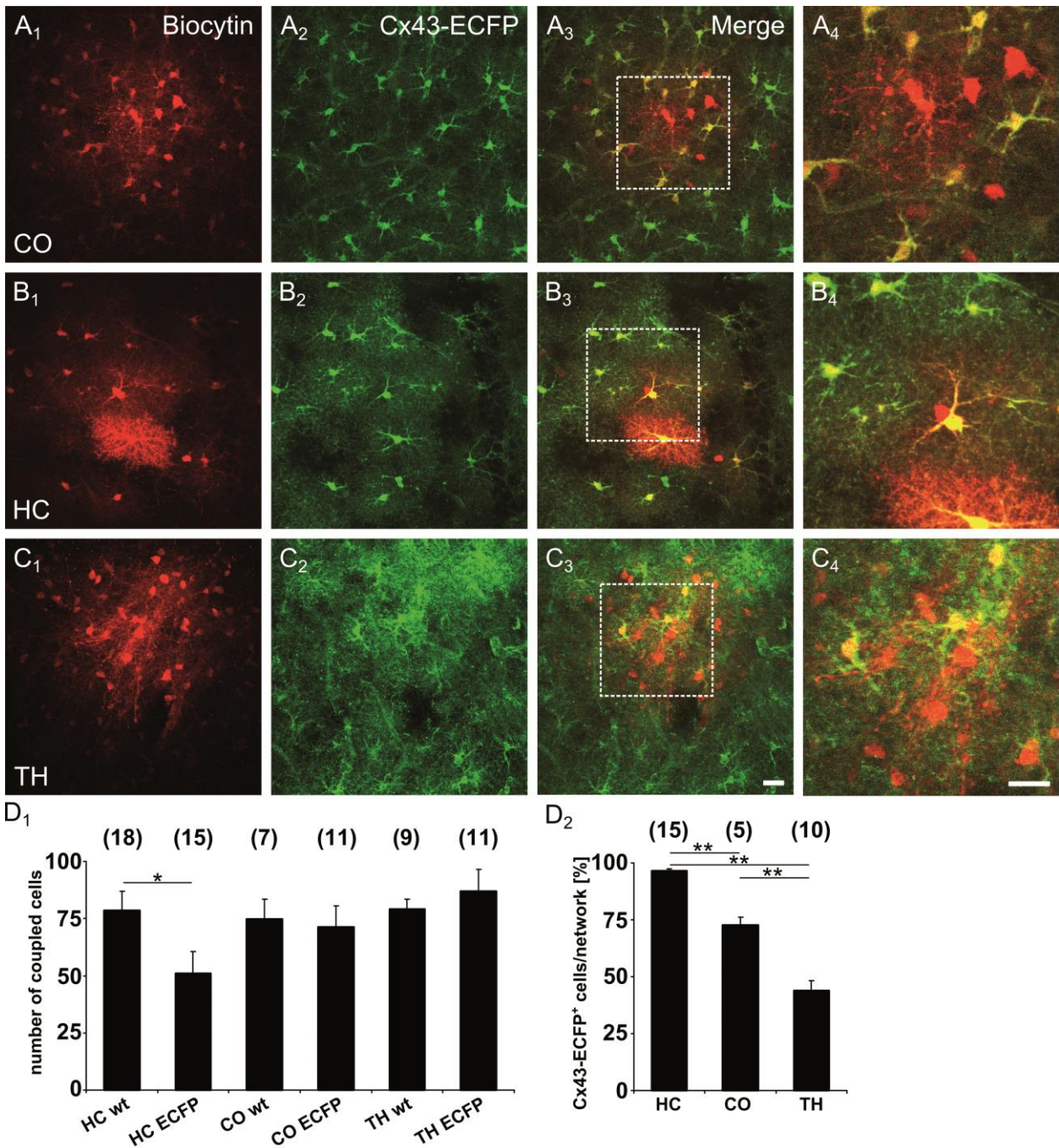


Abb. 7: Die Analyse von GJN in *Cx43kiECFP* Mäusen zeigt astrozytäre Heterogenität auf. ECFP⁺ Zellen in Cortex (CO), Hippocampus (HC) sowie Thalamus (TH) wurden mit Biocytin gefüllt (A - C). In heterozygoten *Cx43^{ECFP/+}* Mäusen war immer Kopplung nachweisbar (A₁ - C₁), die GJN enthielten zahlreiche ECFP⁺ Zellen (A₂ - C₂, A₃ - C₃). Vergrößerungen des markierten Bereiches in A₃ - C₃ zeigt Kolokalisation von Biocytin und ECFP an (A₄ - C₄). Skalierung 20 µm. Die Quantifizierung der GJN in wt sowie *Cx43^{ECFP/+}* Tieren zeigt nur im HC eine Verringerung der Kopplung bei Verlust eines *Gja1* Allels (D₁). In allen drei Hirnregionen besteht ein unterschiedlicher Anteil von ECFP⁺ Zellen an den GJN (D₂, ANOVA und *post-hoc* Tukey-Test: $p < 0,01$), Sternchen zeigen statistische Signifikanz an (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Modifiziert nach Griemsmann et al., 2015.

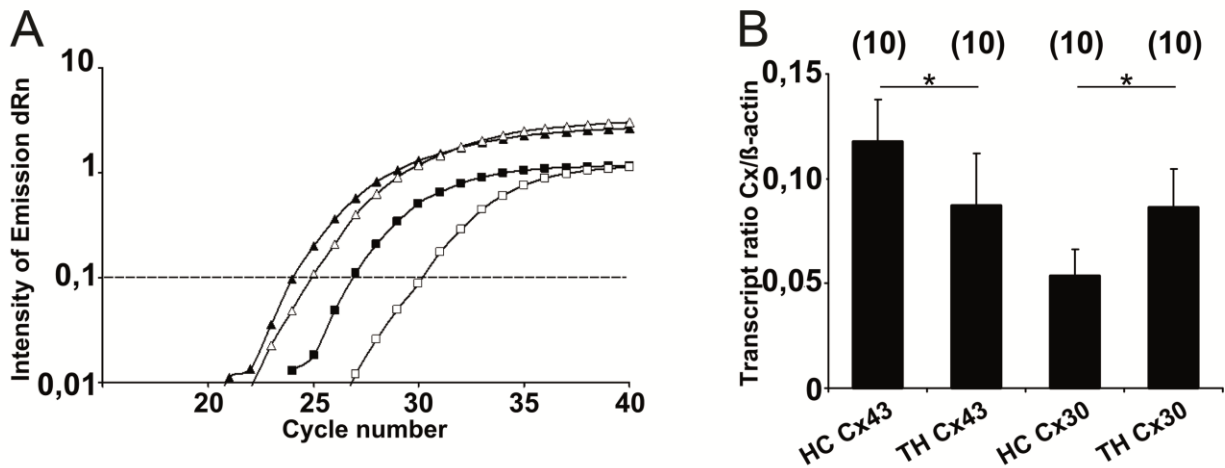


Abb. 8: Differentielle Expression von Cx30 sowie Cx43 in Thalamus und Hippocampus. A: Sq RT-PCR von Cx43 (*Gja1*, Quadrate) und β -Actin (Dreiecke) in Gewebe aus Hippocampus (ausgefüllte Symbole) und Thalamus (leere Symbole) zeigt einen größeren Differenz der notwendigen Schwellen-Zyklen zwischen β -Actin und Cx43 (ΔR_n ; an durchbrochener Linie abgelesen) im Thalamus, konsistent mit geringerer Cx43-Expression im Thalamus im Vergleich zum Hippocampus. Das Verhältnis Cx43(*Gja1*)/ β -Actin sowie Cx30(*Gjb6*)/ β -Actin war signifikant verschieden in den beiden untersuchten Hirnregionen. Im Hippocampus zeigte sich eine höhere Cx43-, im Thalamus eine stärkere Cx30-Expression (B). In Klammern ist die Anzahl der durchgeführten Experimente angegeben, Sternchen zeigen statistische Signifikanz an (* $p < 0,05$). Modifiziert nach Griemsmann et al., 2015.

6.2.3 Thalamische Astrozyten zeigen häufig keine Cx43-Expression

Da generell angenommen wird, dass Cx43 in nahezu allen Astrozyten exprimiert wird (Nagy et al., 1997; Pannasch und Rouach, 2013), stellte sich im Folgenden die Frage der zellulären Identität von Cx43-ECFP-negativen Zellen in thalamischen GJN. Hierzu wurde zunächst durch die Verwendung von SR101, einem als Marker für Astrozyten verwendeten Farbstoff (Nimmerjahn et al., 2004), der Anteil ECFP-positiver Zellen an der astrozytären Population im Thalamus abgeschätzt. Überraschenderweise war die Hälfte der SR101-positiven thalamischen Astrozyten ECFP-negativ. Dies stand in Kontrast zu Ergebnissen in hippocampalen Schnitten wo nahezu alle SR101-positiven Zellen auch ECFP-Expression aufwiesen (SR101⁺/ECFP⁺; TH: $50 \pm 2,1$ %, $n = 9$; HC $91 \pm 1,7$ %: $n = 6$) (Abb. 9A, B). Eine Aufnahme von SR101 in Oligodendrozyten wurde berichtet (Hill und Grutzendler, 2014; Wasseff und Scherer, 2011). Um eine Verzerrung der Ergebnisse durch Markierung von Oligodendrozyten mit SR101 auszuschliessen, wurden zusätzliche

Untersuchungen in *tg(PLP-GFP)*-Mäusen durchgeführt. In diesen transgenen Tieren sind Oligodendrozyten unter Kontrolle des PLP-Promotors durch GFP markiert (Fuss et al., 2000). In beiden untersuchten Hirnregionen waren nur wenige, schwach SR101 markierte Zellen auch positiv für den Marker GFP (TH: $1,9 \pm 0,5$ %, $n = 11$; HC: $1 \pm 0,8$ %, $n = 8$) (Abb. 9C, D). Dass SR101 weder Neurone noch NG2-Zellen markiert, konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden (Hill und Grutzendler, 2014; Kafitz et al., 2008). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass ein Großteil thalamischer Astrozyten im Gegensatz zu hippocampalen Astrozyten kein Cx43 exprimiert.

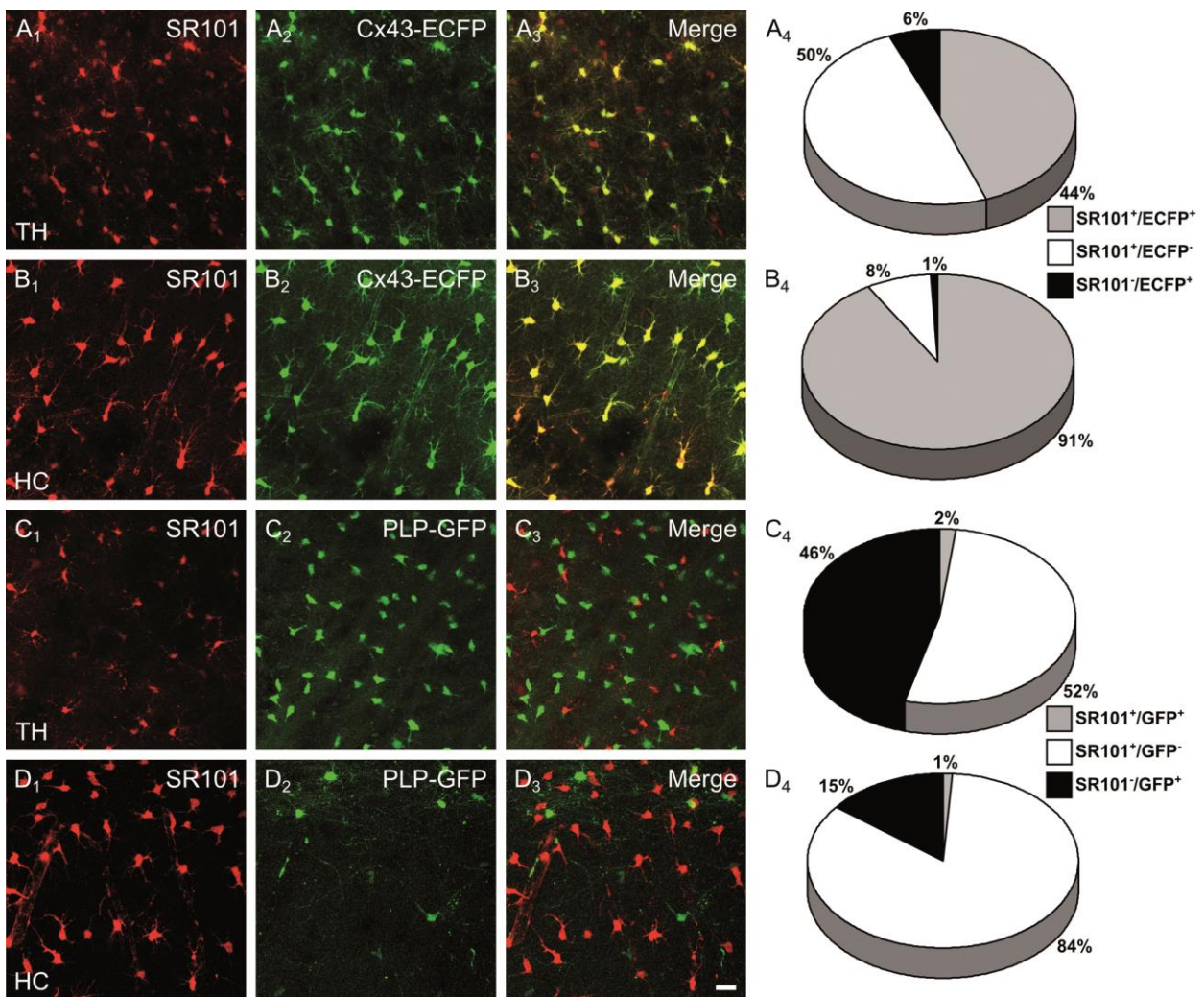


Abb. 9: SR101⁺ Astrozyten weisen unterschiedliche Cx43-ECFP-Expression im Thalamus und Hippocampus auf. Mittels 2-Photonen-Mikroskopie akquirierte Aufnahmen von SR101⁺ Astrozyten in heterozygoten *Cx43^{ECFP/+}* Mäusen zeigen unterschiedliche Überlappung von ECFP und SR101 in Thalamus und Hippocampus (A₁ - B₃). Thalamische Astrozyten sind nur zu 50 % auch positiv für ECFP, während das Reporter gen in 91 % der hippocampalen Astrozyten exprimiert wird (A₄, B₄). Nur ein Bruchteil der Zellen ist ECFP⁺ und SR101⁻, was die Verlässlichkeit von SR101 als astrozytärer Marker demonstriert (A₃, B₃, A₄, B₄) (n = 9 und 6 Experimente in jeweils 3 Mäusen). Eine Spezifität der SR101-Färbung für Astrozyten konnte in ähnlichen Experimenten in *tg(PLP-GFP)* Mäusen demonstriert werden. Sowohl im Thalamus als auch im Hippocampus konnte nur wenig Überlappung von SR101 sowie PLP-GFP nachgewiesen werden (C₁ - D₄) (n = 11 und 8 Experimente in 4 bzw. 3 Mäusen). Skalierung: 20 µm. Übernommen aus Griemsmann et al., 2015.

6.2.4 Thalamische GJN werden vornehmlich durch Cx30 gebildet

Da die Daten der zuvor beschriebenen Experimente sowie der Transkriptionsanalyse auf eine geringere Expression sowie Bedeutung von Cx43 im Thalamus im Vergleich zum Hippocampus hinwiesen, wurden in einem nächsten Schritt mittels verschiedener Knock-out-Mauslinien die GJN-formenden Connexine ermittelt. Da nur wenige Zellen in thalamischen GJN Cx43-ECFP exprimierten, wurde der Einfluss eines Cx30-Knockout (*Cx30^{LacZ/LacZ}*, Teubner et al., 2003) auf thalamische GJN untersucht. In diesen Tieren wurde das für Cx30 kodierende Gen (*Gjb6*) mit dem *LacZ*-Gen ersetzt, nach Hinzugabe entsprechender Substrate kann β -Gal visualisiert werden. Studien zur Rolle von Cx30 im Hippocampus konnten einen nur geringen Einfluss des Cx30-Knockouts auf hippocampale GJN nachweisen (Gosejacob et al., 2011). Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass ein Knockout von Cx30 zur drastischen Reduktion der GJ-vermittelten Kopplung im Thalamus führt (*Cx30^{+/+}*: 81 ± 6 Zellen, $n = 17$; *Cx30^{LacZ/LacZ}*: 22 ± 3 Zellen, $n = 15$, t-Test: $p < 0,01$). In einigen Fällen kam es zur kompletten Unterbrechung der Zell-Zell-Verbindungen (Abb. 10A). Zusätzliche Ausschaltung von Cx43 (*Gja1*) in Doppel-Knockout Tieren (Dko, *Cx30^{LacZ/LacZ}; Cx43^{fl/fl}:hGFAP-Cre*, Wallraff et al., 2006) führte - wie im Hippocampus (Wallraff et al., 2006) - zur kompletten Unterbrechung der GJ-vermittelten Kommunikation. Lediglich in zwei Fällen wurde residuelle Kopplung gefunden (8 ± 6 Zellen, nicht gezeigt). Weiterführende Reporter-Gen-Analysen wurden in Cx30/Cx43 doppelt markierten Mäusen (*Cx30^{LacZ/+}; Cx43^{ECFP/+}*) durchgeführt. Da *LacZ* in dieser Mauslinie nicht im Hippocampus exprimiert wird (Gosejacob et al., 2011), beschränkte sich die Analyse auf den Thalamus. Hierzu erfolgte eine Quantifizierung des ECFP- sowie des β -Gal-Signals nach immunohistochemischer Visualisierung (Abb. 10B). Es zeigte sich, dass nahezu alle thalamischen Astrozyten Cx30 (43051 ± 1627 β -Gal⁺-Zellen/mm³ von 43719 ± 1457 Zellen/mm³) exprimierten, wobei ein Teil der Zellen kein Cx43 aufwies (8904 ± 1117 β -Gal⁺/ECFP⁻-Zellen/mm³, $n = 9$ Mäuse). Lediglich ein Bruchteil der untersuchten Zellen zeigte alleinige Cx43-Expression (Abb. 10B₄). Die Analyse der relativen Proteinexpression in juvenilen und adulten Mäusen der *C57Bl/6J*-Linie im Thalamus und Hippocampus mittels Western Blot zeigte - verglichen mit dem Hippocampus - eine deutlich stärkere Expression von Cx30 im Thalamus, während Cx43-Level in beiden Hirnregionen vergleichbar waren (Abb. 11, $n = 3$).

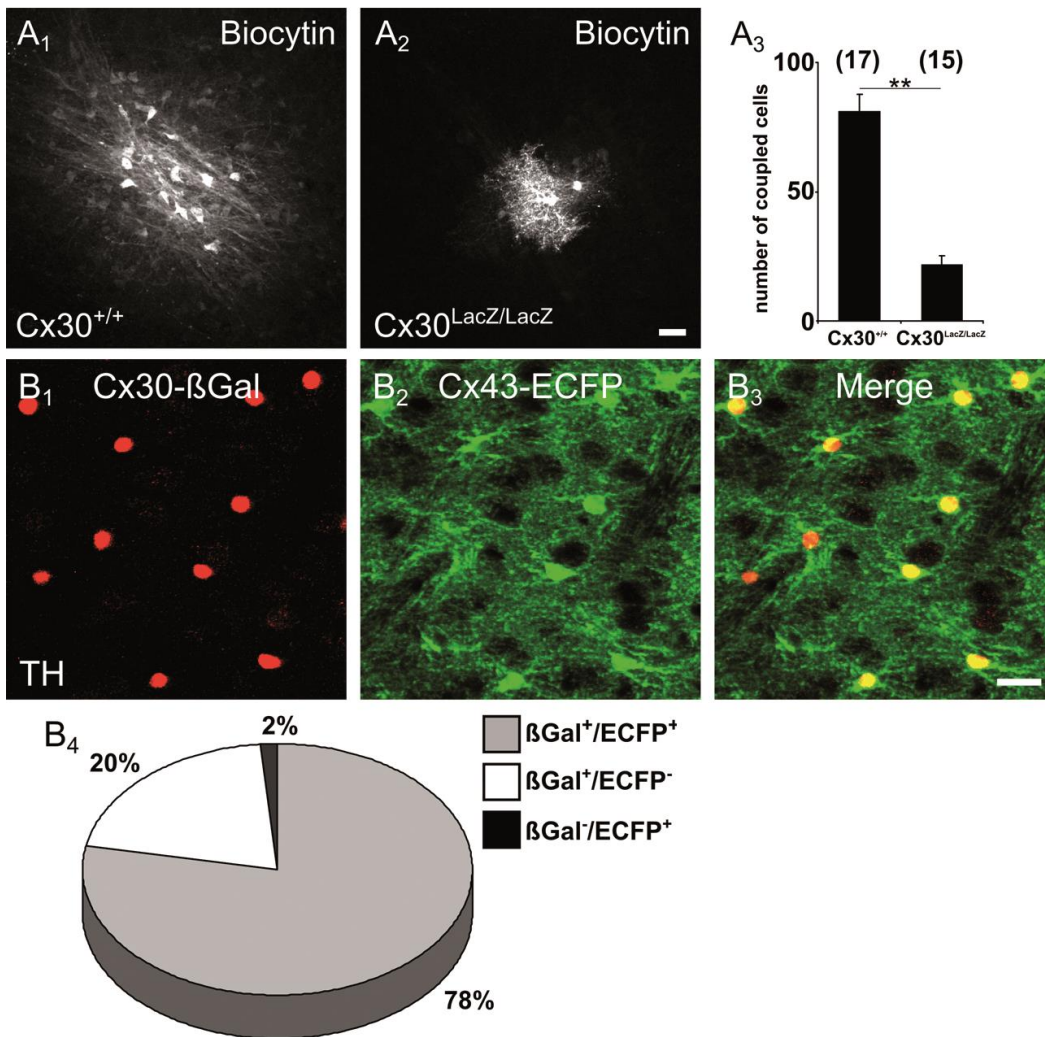


Abb. 10: Connexin 30 ist das dominierende Connexin im Thalamus. GJN im Thalamus von *Cx30^{+/+}* sowie *Cx30^{LacZ/LacZ}* Mäusen wurden mit Biocytin gefüllt (*A₁*, *A₂*). In Mäusen mit Knockout von Cx30 konnten nur kleine oder gar keine GJN dargestellt werden, korrespondierend mit einer stark eingeschränkten Diffusion des Tracers (*A₂*). Die Größe der GJN war in *Cx30^{LacZ/LacZ}* Mäusen um 73 % vermindert (*A₃*). Heterozygote *Cx30^{LacZ/LacZ}; Cx43^{kiECFP}* Mäuse wurden immunhistochemisch auf die jeweiligen Reporter *LacZ* sowie *ECFP* untersucht (*B₁ - 3*). Anhand des Connexin-Expressionsprofils konnten drei verschiedene Populationen identifiziert werden (*Cx30⁺/Cx43⁺*, *Cx30⁺/Cx43⁻*, *Cx30⁻/Cx43⁺*). Nahezu alle Zellen exprimierten Cx30, nur einzelne Zellen waren ausschließlich Cx43 positiv (*B₄*). Skalierung 20 µm. Modifiziert nach Griemsmann et al., 2015.

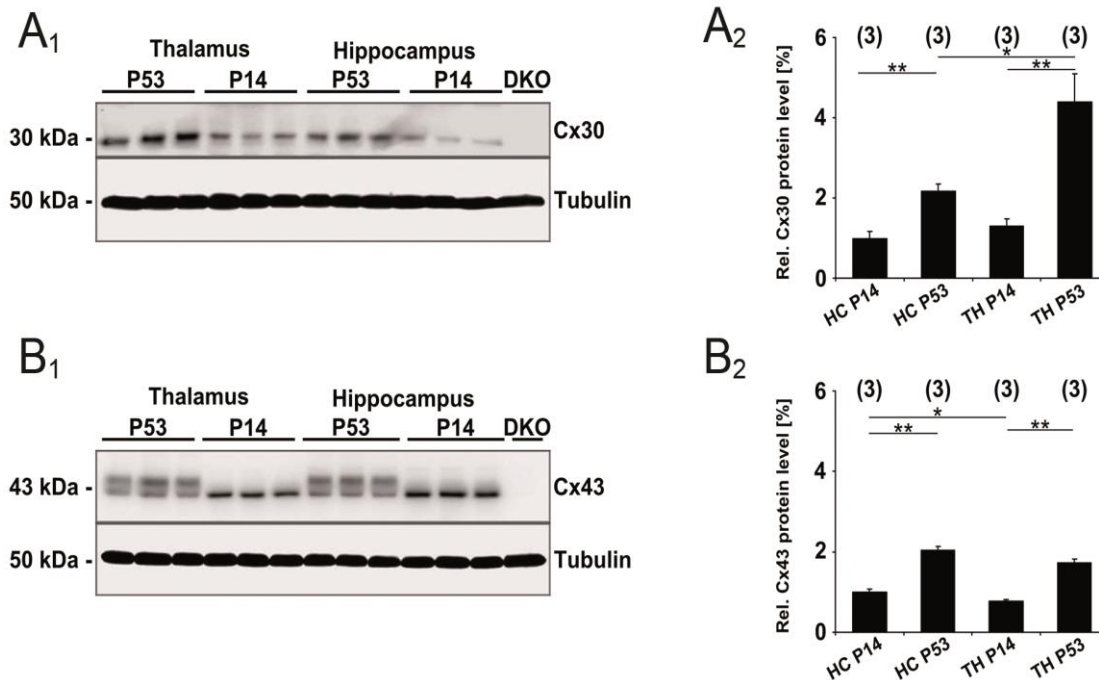


Abb. 11: Western-Blot-Analyse von Cx30 und Cx43 im Thalamus und Hippocampus von *C57Bl/6J* Mäusen zeigte eine im Verlauf der Ontogenese vermehrte Expression der Connexine in beiden Hirnregionen, diese war jedoch für Cx30 stärker im Thalamus und für Cx43 stärker im Hippocampus ausgeprägt. Doppel-Knockout Tiere dienten als Negativkontrolle (Dko), α -Tubulin als Loading-Kontrolle (A₁, B₁). Die zwei sichtbaren Banden im Cx43-Blot korrelieren mit unterschiedlichem Phosphorylierungsstatus des Proteins (B₁). Normierung der Proteinexpression auf α -Tubulin demaskiert eine unterschiedliche Expression der beiden Connexine während der Ontogenese sowie in beiden Hirnregionen (Mann-Whitney *U*-Test: $p < 0,05/0,01$). Anzahl der Experimente in Klammern, Sternchen zeigen statistische Signifikanz an (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) (A₃, C₂, D₂). Modifiziert nach Griemsmann et al., 2015.

6.2.5 Astrozyten und Oligodendrozyten des Thalamus formen ausgedehnte pangliale Netzwerke

Zur Identifizierung der an thalamischen und hippocampalen GJN teilnehmenden Zellen wurden weitere Kopplungsstudien in der *tg(hGFAP-EGFP)* Mauslinie durchgeführt. Zusätzliche Untersuchungen erfolgten im Neocortex. Neben der Visualisierung des als Tracer verwandten Biocytins wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Da der klassische astrozytäre Marker GFAP - trotz ausgeprägter Promotor-Aktivität des hGFAP-Promotors in *tg(hGFAP-EGFP)* Mäusen - nur wenig in thalamischen Kernen exprimiert wird (nicht gezeigt, Frassoni et al., 2000), wurden das astrozytäre Enzym Glutaminsynthetase (GS) (Coulter und Eid, 2012; Norenberg, 1979) sowie der oligodendrozytäre

Transkriptionsfaktor Olig2 (Marshall et al., 2005; Trotter et al., 2010) als Marker verwandt. Während in hippocampalen GJN die Mehrheit der Zellen für GS positiv war (106 ± 10 von 129 ± 11 Zellen, $n = 7$), exprimierte nur gut die Hälfte der an thalamischen GJN teilnehmenden Zellen GS (49 ± 8 von 100 ± 13 Zellen, $n = 10$) (Abb. 12A, B). Dieser Unterschied war signifikant (ANOVA und *post-hoc* Tukey-Test: $p < 0,01$). Überraschenderweise zeigten sich in allen drei untersuchten Hirnregionen (TH/CO/HC) Zellen, welche Olig2 exprimierten und Teil der GJN waren. Der Anteil Olig2-positiver Zellen war in thalamischen und corticalen GJN am höchsten (TH: 49 ± 8 von 75 ± 7 Zellen, $n = 10$; CO: 62 ± 24 von 102 ± 25 Zellen, $n = 8$) (Abb. 12 C-E), während im Hippocampus lediglich ein geringer Anteil der Zellen in den GJN Olig2 exprimierten (HC: 19 ± 4 von 129 ± 18 Zellen, $n = 7$) (Abb. 12C₃₋₄, D₃₋₄, E₃₋₄). Dies war ebenfalls statistisch signifikant (ANOVA und *post-hoc* Tukey-Test: $p < 0,01$). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in den thalamischen Nuclei der astrozytäre Marker GS und der oligodendrozytäre Marker Olig2 in zahlreichen Zellen ko-exprimiert werden, dies konnte im Hippocampus nicht beobachtet werden (Abb. 12A₄, C₄). In keinem Fall konnten Mikroglia- (Iba1, TH $n = 9$, HC $n = 8$), Neuronen- (NeuN, TH $n = 9$, HC $n = 6$) oder NG2-Zell- (NG2, TH $n = 8$, HC $n = 8$, CO $n = 6$) spezifische Marker in GJN des Thalamus, Cortex oder Hippocampus nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Ko-expression von astrozytären und oligodendrozytären Markern in einem GJN weist auf die Möglichkeit panglialer Kopplung hin, diese konnte bereits zuvor *in vitro* und *in situ* gezeigt werden (Maglione et al., 2010; Magnotti et al., 2011; Orthmann-Murphy et al., 2007; Tress et al., 2012; Wasseff und Scherer, 2011). In einem weiteren experimentellen Ansatz konnten pangliale GJN in dieser Studie auch für thalamische Kerne sowie den Hippocampus gezeigt werden. Hierzu wurden in *tg(PLP-GFP)* Mäusen GFP- sowie SR101-positive Zellen mit Biocytin gefüllt. Wie zu erwarten, zeigte die Tracer-Injektion in Astrozyten in beiden Hirnregionen große GJN (TH: 118 ± 15 , $n = 16$; HC: 133 ± 16 Zellen, $n = 16$) (Abb. 13A, C, Abb. 14A). Nach Füllung von Oligodendrozyten zeigten sich jedoch ebenfalls GJN (TH: 87 ± 14 , $n = 6$; HC: 82 ± 15 , $n = 8$) (Abb. 13B, D, Abb. 14A). Diese waren in Bezug auf ihre Größe im Thalamus und Hippocampus nicht verschieden, jedoch waren im Thalamus deutlich mehr PLP-GFP-positive Zellen in den GJN enthalten (Abb. 14A, B). Die Größe der GJN sowie der relative Anteil von PLP-GFP-positiven Zellen (TH: $53,1 \pm 6,4$ % sowie $66,5 \pm 8,4$ %, $n = 16$ sowie 6 ; HC: $12,4 \pm 1$ % sowie $13,4 \pm 1,4$ %, $n = 16$ sowie 8 ; initiale Injektion in Astrozyt beziehungsweise Oligodendrozyt) waren nicht von der Auswahl der

initial mit dem Tracer gefüllten Zelle (SR101- oder GFP-positiv) abhängig (Abb. 14 A, B). Demnach ist anzunehmen, dass unabhängig von der zuerst gepatchten Zelle (Astrozyt oder Oligodendrozyt) das gleiche GJN visualisiert wird. Zu beachten ist, dass in beiden Hirnregionen ein deutlicher Unterschied in der Dichte von Oligodendrozyten besteht. Im Hippocampus sind wesentlich weniger Oligodendrozyten als im Thalamus vorhanden (Abb. 9C, D; Abb. 13), was den signifikant geringeren Anteil von Oligodendrozyten in hippocampalen GJN erklären kann.

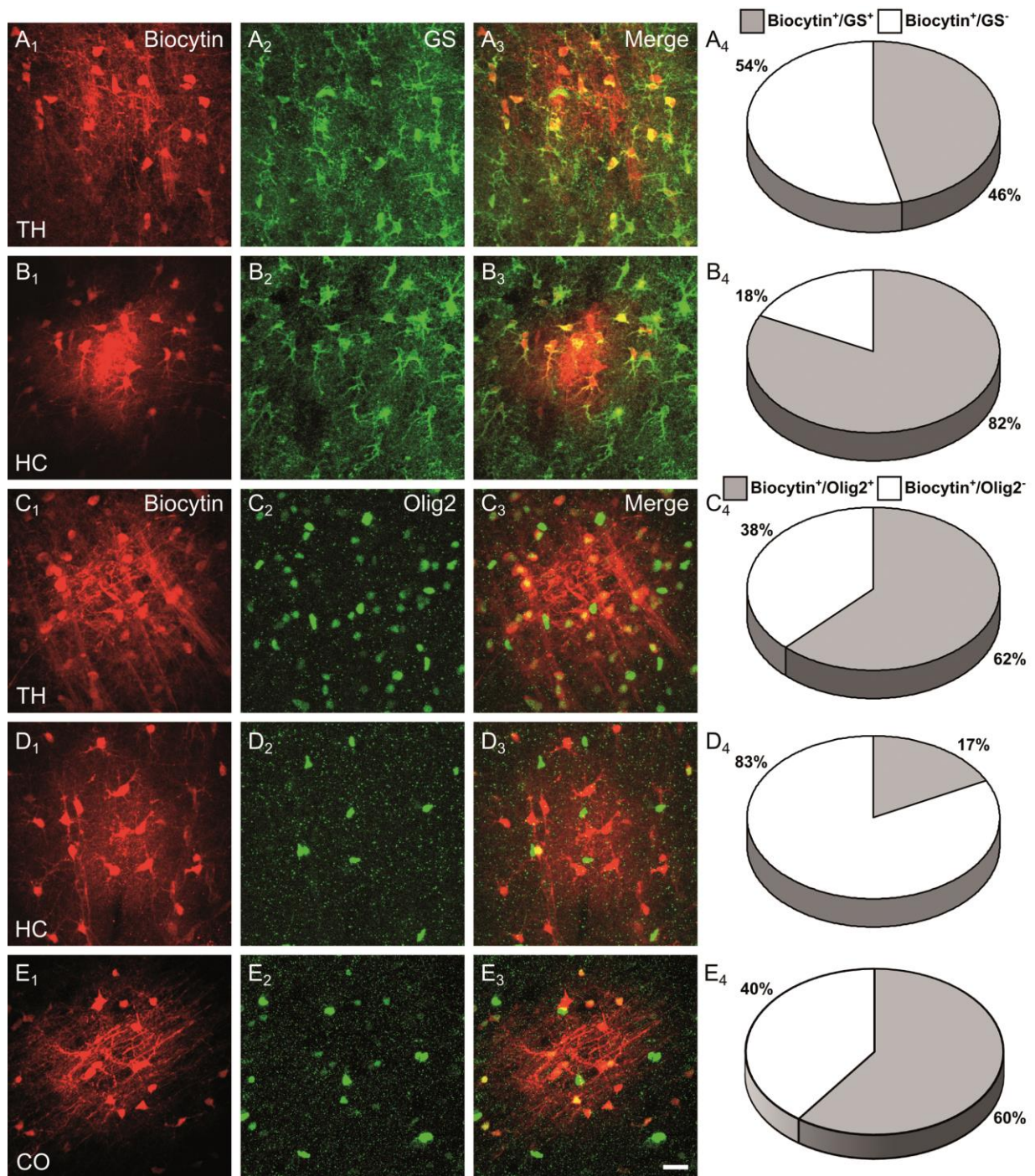


Abb. 12: Immunhistochemische Eigenschaften von Biocytin-markierten GJN in Thalamus (TH), Hippocampus (HC) und Cortex (CO) von *tg(hGFAP-EGFP)* Mäusen. Färbungen gegen GS in TH und HC zeigten weniger als 50 % GS⁺ Zellen in thalamischen GJN, während eine Mehrheit der Zellen in GJN des Hippocampus GS exprimierten (A₁ - B₄). Visualisierung von Olig2 zeigte, dass eine Mehrheit der Zellen in thalamischen und corticalen GJN diesen Marker exprimierten, während im Hippocampus nur wenig Olig2⁺ Zellen in GJN vorhanden waren (C₁ - E₄). Skalierung 20 µm. Übernommen aus Griemsmann et al., 2015.

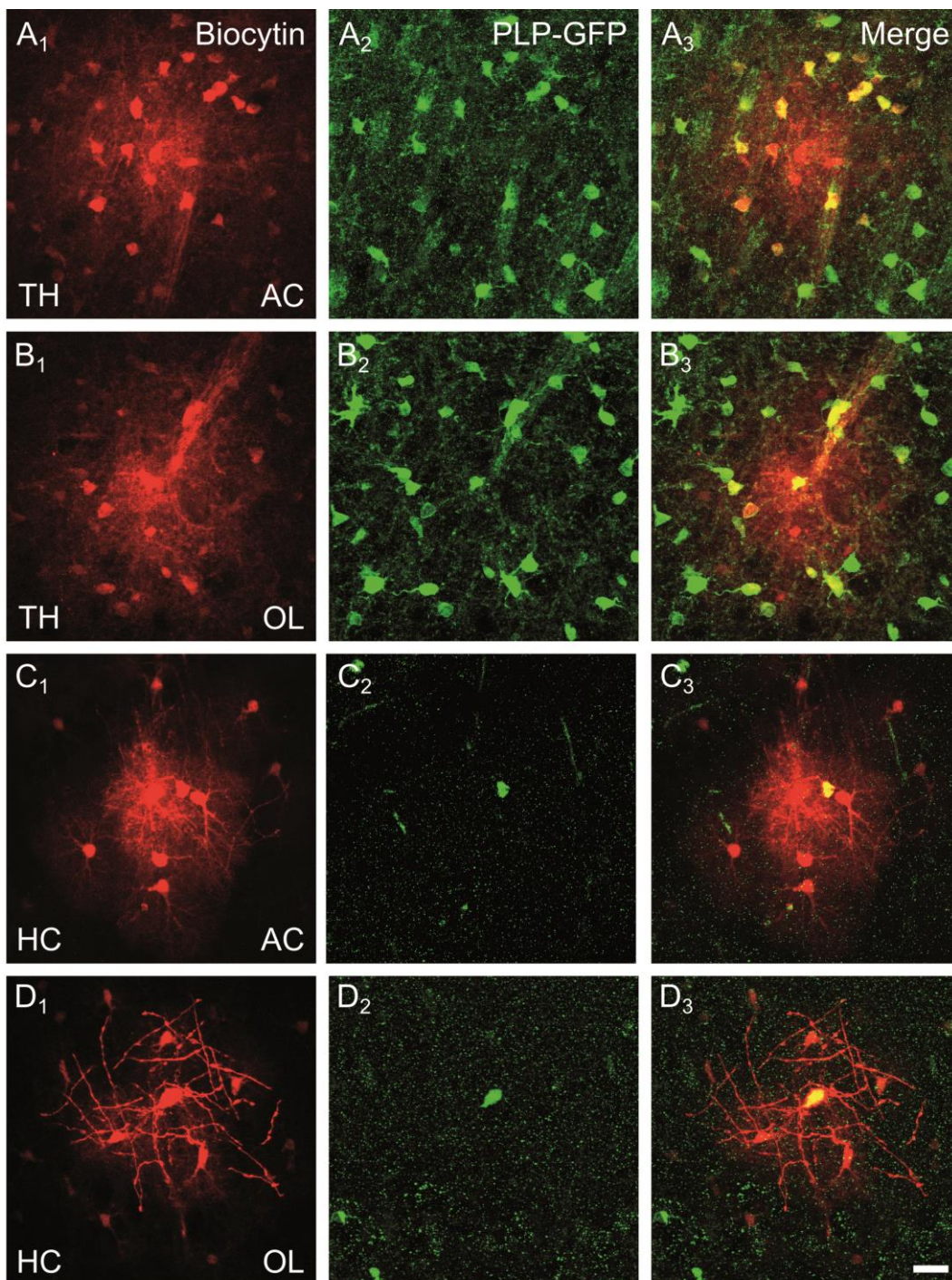


Abb. 13: Nachweis panglialer Kopplung im Thalamus sowie Hippocampus von *tg(PLP-GFP)* Mäusen. Astrozyten (AC) sowie Oligodendrozyten (OL) wurden anhand ihrer SR101-Markierung beziehungsweise ihrer GFP-Fluoreszenz identifiziert. Sowohl AC als auch OL wurden mit Biocytin gefüllt (A₁ - D₁). OL in GJN wurden mittels immunhistochemischer Visualisierung von GFP identifiziert (A₂ - D₂). In allen Fällen konnten GJN, welche immer auch OL enthielten, nachgewiesen werden (A₃ - D₃). In allen Fällen, in denen initial GFP⁺-OL injiziert wurden, konnten GJN visualisiert werden (B, D). Skalierung 20 µm. Modifiziert nach Griemsmann et al., 2015.

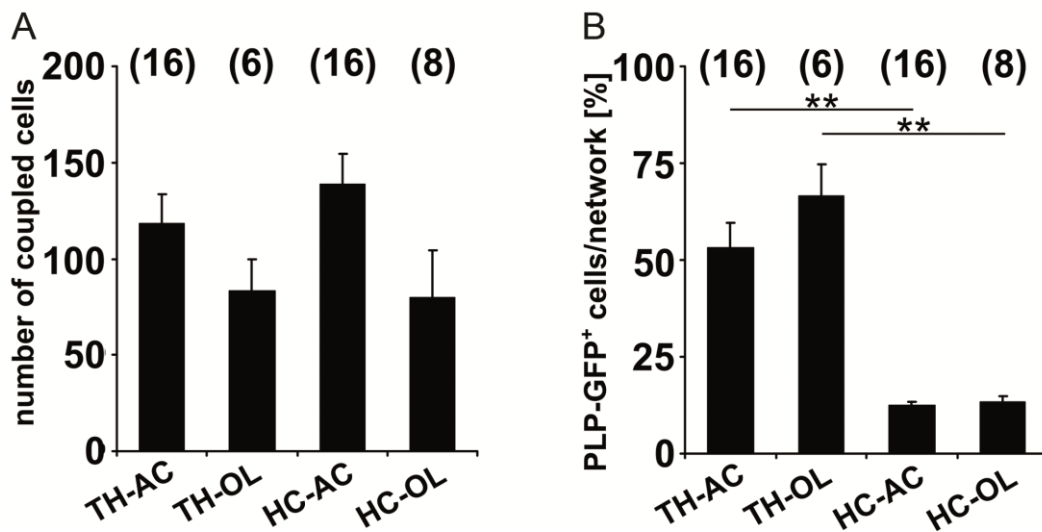


Abb.14: Quantifizierung der panglialen Netzwerke im Hippocampus sowie im Thalamus. A: Die Größe der GJN war unabhängig von der initial gefüllten Zelle (AC oder OL, ANOVA). Der Anteil der GFP⁺ Zellen war unabhängig vom initial gepatchten Zelltyp, jedoch insgesamt geringer im Hippocampus (B, ANOVA und *post-hoc* Tukey-Test: $p < 0,01$). Anzahl der Experimente in Klammern, Sternchen zeigen statistische Signifikanz an. Modifiziert nach Griemsmann et al., 2015.

6.2.6 Gliazellen im ventrobasalen Thalamus weisen ein einzigartiges Antigenprofil auf

Nachdem bereits zuvor die Koexpression eines oligodendrozytären (Olig2) sowie eines astrozytären Markers (GS) in thalamischen Zellen gezeigt werden konnte, wurden in einer weiteren Versuchsreihe die immunhistochemischen Eigenschaften thalamischer, corticaler sowie hippocampaler Gliazellen untersucht. Hierzu wurden in Reporter-mäusen (*Cx43^{kiECFP}* sowie *tg(PLP-GFP)*) Färbungen gegen Olig2, GS sowie NG2 durchgeführt. Hierzu wurde zunächst in *Cx43^{ECFP/+}* Tieren gegen den oligodendrozytären Marker Olig2 gefärbt. Mehr als die Hälfte der *Cx43-ECFP⁺* Zellen im Thalamus koexprimierte Olig2 (20267 ± 2917 ECFP⁺/Olig2⁺ Zellen/mm³ von insgesamt 38563 ± 1723 ECFP⁺ Zellen/mm³, $n = 9$ Mäuse), während ECFP⁺-Zellen des Hippocampus typischerweise kein Olig2 aufwiesen (3155 ± 1107 ECFP⁺/Olig2⁺ Zellen/mm³ von insgesamt 52217 ± 3215 ECFP⁺ Zellen/mm³, $n = 9$ Mäuse). Im Neocortex zeigten sich ca. 20 % ECFP- und Olig2-positive Zellen (3240 ± 879 ECFP⁺/Olig2⁺ Zellen/mm³ von insgesamt 15305 ± 1126 ECFP⁺ Zellen/mm³, $n = 9$ Mäuse) (Abb. 15). Diese Daten weisen auf einen zusätzlichen, intermediären Gliazelltyp im Thalamus sowie Neocortex hin, welcher astrozytäre (Cx43) sowie

oligodendrozytäre (Olig2) Proteine koexprimiert. Diese Zellen waren ebenfalls in thalamischen GJN enthalten; nach Biocytin-Füllung zeigten sich 14 % der Zellen in GJN positiv für ECFP und Olig2 (58 ± 6 gekoppelte Zellen, $n = 10$, nicht gezeigt). In einem weiteren Experiment wurden Färbungen gegen das Proteoglykan NG2 in *tg(PLP-GFP)* Mäusen durchgeführt. Eine Koexpression der beiden Marker konnte in hippocampalen (17,9 % von insgesamt 26447 ± 1434 GFP⁺ Zellen/mm³, $n = 9$), jedoch nur in einem Bruchteil der thalamischen PLP-GFP⁺ Zellen (0,2 % von insgesamt 158844 ± 4092 GFP⁺ Zellen/mm³, $n = 9$) (nicht gezeigt) festgestellt werden. Zusätzlich wurden in *tg(PLP-GFP)* Mäusen weitere Färbungen gegen die astrozytären Proteine GS, S100 β und Aldh1L1 (Cahoy et al., 2008; Ogata und Kosaka, 2002; Parri et al., 2010; Yang et al., 2011) durchgeführt. GS war in nahezu allen (94,5 % von 136911 ± 9363 GFP⁺ Zellen/mm³, $n = 9$) thalamischen Oligodendrozyten enthalten, jedoch nur in einer kleinen Anzahl hippocampaler Oligodendrozyten (17,8 %, von 22644 ± 1573 GFP⁺ Zellen/mm³, $n = 9$, nicht gezeigt). S100 β wird im Hippocampus (Ogata und Kosaka, 2002; Parri et al., 2010) als astrozytenspezifischer Marker angesehen. Tatsächlich zeigten sich nur jeweils eine Minderheit der PLP-GFP⁺ Zellen auch positiv für S100 β (Hippocampus 18,1 %, Thalamus 17,9 %, $n = 9$, nicht gezeigt). Aldh1L1 war in circa 50 % der thalamischen OL festzustellen, fast alle Aldh1L1-positiven Zellen waren Olig2-positiv (nicht gezeigt). Zusammenfassend untermauern diese Daten die Hypothese, dass im Thalamus ein intermediärer glialer Zelltyp existiert, welcher durch klassische Antigenmarker nicht eindeutig zu identifizieren ist.

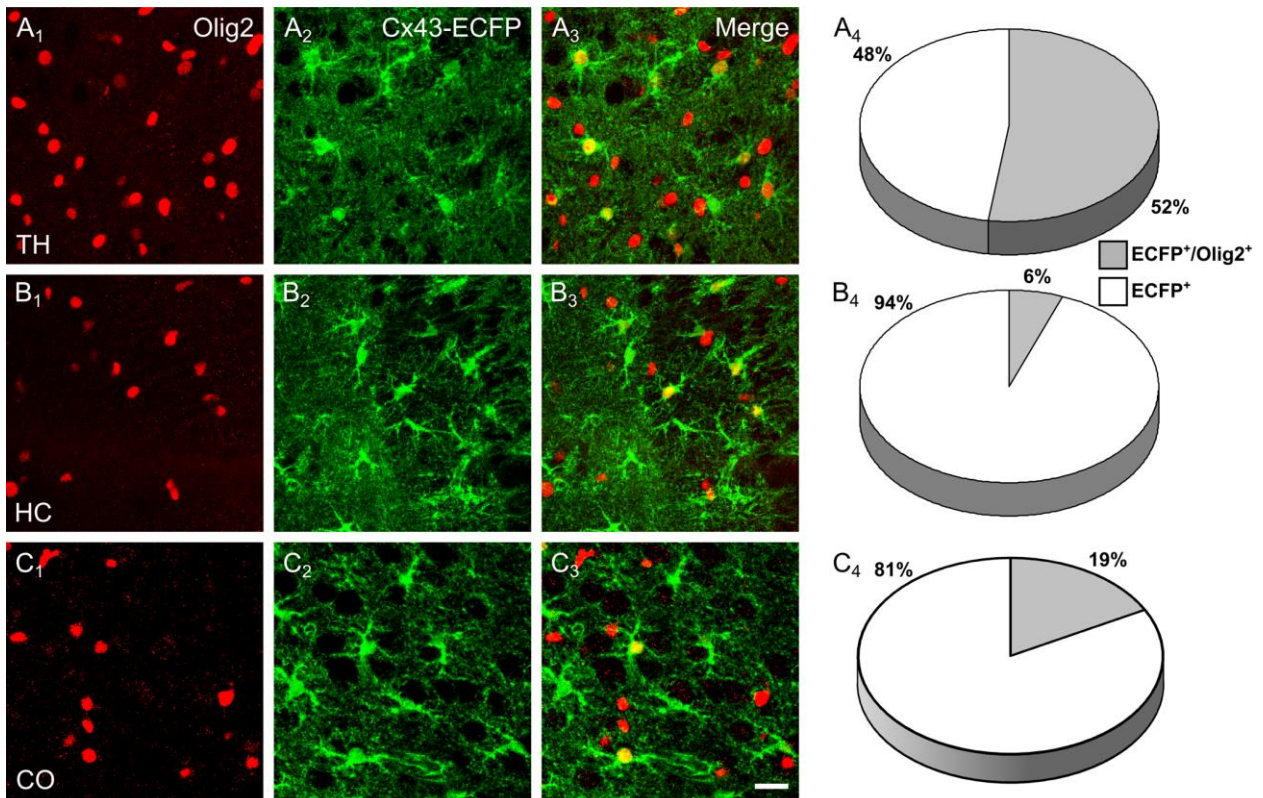


Abb. 15: Antigenprofile thalamischer, hippocampaler und corticaler Cx43-ECFP⁺ Zellen. Färbungen gegen Olig2 in Cx43^{ECFP/+} Mäusen zeigten eine deutliche Überlappung der ECFP- und Olig2-Signale in thalamischen Astrozyten, während in Hippocampus und Cortex nur eine Minderheit der ECFP⁺ Zellen auch Olig2 exprimierte (n = 9 in jeweils 3 Mäusen). Übernommen aus Griemsmann et al., 2015.

7. Diskussion

7.1 Expression von ionotropen Rezeptoren in zwei verschiedenen Populationen von Astrozyten im Thalamus

7.1.1 Die Mehrzahl thalamischer Astrozyten exprimiert ein Mosaik von AMPA-Rezeptoren mit niedriger Ca^{2+} -Permeabilität

Die in isolierten thalamischen Astrozyten mit Hilfe pharmakologischer sowie molekularbiologischer Techniken gewonnenen Daten weisen auf eine heterogene astrogliale Population in Kernen des ventrobasischen Thalamus hin. In ca. 60 % der untersuchten Zellen konnte eine funktionelle Expression von AMPA-Rezeptoren nachgewiesen werden, aber alle untersuchten Zellen - GluA+ und GluA- - wiesen GABA_A -Rezeptoren auf. Zusätzlich bestehen Unterschiede zwischen diesen Zellpopulationen in Hinblick auf die Dichte der einwärtsgerichteten K^+ -Kanäle. Da die unterschiedliche Expression von AMPA-Rezeptoren und die Amplitude der K^+ -Leitfähigkeiten miteinander korreliert ist es wahrscheinlich, dass diese Zellgruppen verschiedene Typen astroglialer Zellen repräsentieren. Eine detaillierte Charakterisierung bleibt jedoch weiteren Untersuchungen vorbehalten. Interessanterweise konnte im Gegensatz zu vorangegangenen Untersuchungen im Hippocampus (Matthias et al., 2003), eine Expression von ionotropen Glutamat-Rezeptoren zusätzlich zur Expression von Glutamat-Transportern auf astroglialen Zellen des Thalamus nachgewiesen werden. Sowohl in GluA+ als auch GluA- Astrozyten konnten GluT-vermittelte Ströme nachgewiesen werden. Durch enzymatischen Zellverdau entstandene Artefakte konnten durch den Nachweis GABA_A -vermittelter Ströme weitgehend ausgeschlossen werden. Zudem konnten die Ergebnisse in akuten Hirnschnitten reproduziert werden und molekularbiologisch zwei Populationen von AMPA-Rezeptor-positiven sowie -negativen Astrozyten nachgewiesen werden. Die zusätzliche Korrelation der Expression von AMPA-Rezeptoren mit einem spezifischen elektrophysiologischen Phänotyp unterstützt die Ergebnisse weiter. Thalamische Astrozyten vom GluA+ Typ zeigten eine niedrige relative Ca^{2+} -Permeabilität, dies weist auf eine vorwiegende GluA2-Expression in diesen Zellen hin. Dies konnte ebenfalls durch Einzelzell-RT-PCR nachgewiesen werden. Die pharmakologische Blockade der durch Kainat und CTZ sowie Kainat und PEPA induzierten Ströme durch IEM1460 legt zusätzlich das Vorliegen eines Mosaiks verschiedener GluA-Untereinheiten in den untersuchten Zellen nahe, auch wenn vorangegangene Untersuchungen mittels immunhistochemischer Methoden lediglich GluA1-Immuno-

reaktivität in thalamischen Astrozyten zeigen konnten (Spreafico et al., 1994). Durch pharmakologische Analyse mittels Applikation der spezifischen Modulatoren CTZ sowie PEPA konnte die Existenz von Flip- sowie Flop-Splice-Varianten in GluA+ Zellen gezeigt werden. Auf molekularer Ebene zeigten die Daten der Einzelzell-RT-PCR gleichfalls das Vorliegen verschiedener GluA-Untereinheiten sowie -Splice-Varianten in den untersuchten Zellen. In vorangegangenen Studien konnten Ca^{2+} -Erhöhungen in thalamischen Astrozyten durch Stimulation afferenter Fasern induziert werden (Pirttimaki et al., 2011). Schwankungen des intrazellulären Ca^{2+} in Astrozyten sind mit Glutamat-Ausschüttung und der Induktion von Slow-Inward-Currents (SIC) in benachbarten Neuronen in Verbindung gebracht worden, die eine Form der Neuron-Glia-Interaktion darstellen (Araque und Navarrete, 2010; Fellin et al., 2004; Navarrete und Araque, 2008; Parri et al., 2001; Pascual et al., 2005; Shigetomi et al., 2008). Diese sind im Thalamus vor allem durch metabotrope Glutamat-Rezeptoren vermittelt, jedoch teilweise auch durch eine ionotrope Komponente gekennzeichnet (Parri et al., 2010; Pirttimaki et al., 2011). Das Überwiegen der metabotropen Komponente ist passend zu der hier berichteten niedrigen Ca^{2+} -Permeabilität der AMPA-Rezeptoren in thalamischen Astrozyten. Glutamat-Ausschüttung aus Astrozyten im Thalamus führte in einer Studie zur Aktivierung von NMDA-Rezeptoren auf thalamischen Neuronen (Parri et al., 2001). Unklar bleibt jedoch, ob die Glutamat-Freisetzung durch Ca^{2+} -vermittelte Exozytose oder andere Mechanismen abläuft. Es ist jedoch möglich, dass - in Einklang mit der niedrigen Ca^{2+} -Permeabilität von GluA Zellen - ein Na^+ -Einstrom durch AMPA-Rezeptoren und folgende Verteilung der Na^+ -Ionen durch gliale GJN sekundär über $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} und so zu einer Exozytose von Gliotransmittern führt (Langer und Rose, 2009; Langer et al., 2012; Verkhratsky et al., 2013).

7.1.2 GluA+ und GluA- Zellen zeigen eine uniforme GABA_A-Rezeptor Expression

Die weitverbreitete Expression von GABA_A-Rezeptoren kann der neuronalen Homöostase dienen sowie Neuron-Glia-Interaktion vermitteln. Durch die im Vergleich zu Neuronen höhere intrazelluläre Cl^- -Konzentration in Gliazellen führt die Aktivierung von astrozytären GABA_A-Rezeptoren zu einer Depolarisierung der Zellen, welche wiederum zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen kann (Meier et al., 2008). Zusätzlich kann über das gliale GJN die extrazelluläre Cl^- -Konzentration reguliert und so die

GABAerge Transmission kontrolliert werden (Egawa et al., 2013; Kroeger et al., 2010). Thalamische Astrozyten wiesen in dieser Studie keine Transkripte der γ 2-Untereinheit auf, welche für synaptische Übertragung auf Neurone und NG2-Zellen unverzichtbar ist (Essrich et al., 1998; Passlick et al., 2013). Dies spricht gegen eine Lokalisation der Rezeptoren direkt an Synapsen und ist gut vereinbar mit einer Detektion synaptischen Spill-Overs durch thalamische Astrozyten. Die Beantwortung der Frage, ob Astrozyten im Thalamus durch GABAerge Interneurone des *Nucl. reticularis* beeinflusst werden und zur Erzeugung oszillatorischer Aktivität thalamischer Kerne beitragen, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

7.2 Die Analyse thalamischer Gliazellen zeigt spezifische Eigenschaften thalamischer GJN sowie das Antigenexpressionsprofil eines intermediären Zelltyps auf

7.2.1 Thalamische Astrozyten exprimieren vorwiegend Cx30 und sind teilweise negativ für Cx43

Astrozytäre GJN dienen neben homöostatischen Funktionen auch der Informationsverarbeitung (Pannasch und Rouach, 2013), jedoch wurden diese Netzwerke bislang nur in wenigen Hirnregionen untersucht. Vor dem Hintergrund astrozytärer Heterogenität (Matyash und Kettenmann, 2010; Zhang und Barres, 2010) drängt sich die Frage auf, ob GJN in verschiedenen Hirnregionen ebenfalls spezifische, möglicherweise auf die jeweiligen lokalen Bedürfnisse ausgerichtete Eigenschaften besitzen. Die vorliegende Studie beweist erstmalig die Existenz glialer Netzwerke im ventrobasalen Thalamus und zeigt deren klar von GJN in Hippocampus und Cortex verschiedene Eigenschaften. Zunächst konnte mittels transgener Tiere, Kopplungsanalysen sowie immunhistochemischer und molekularbiologischer Methoden eine dominierende Rolle von Cx30 für thalamische GJN nachgewiesen werden. So war die Größe von GJN in Thalamus und Cortex nicht nur in *Cx43^{ECFP/+}* Tieren vergleichbar zu wt-Mäusen geblieben, thalamische GJN waren zudem in Cx30-Knockout Tieren deutlich verkleinert. Dies erklärt den scheinbaren Widerspruch mit zuvor veröffentlichten Ergebnissen, welche keine interastrozytäre Kopplung im Thalamus bei Verwendung des Tracers *Lucifer yellow* zeigen konnten (Parri et al., 2001). Verschiedene Subtypen von Connexinen weisen unterschiedliche Permeabilitäten auf, so ist Cx30 nur wenig permeabel für negativ geladene Moleküle wie *Lucifer Yellow*, während das dem Biocytin strukturell verwandte Neurobiotin leicht durch Cx30-Kanäle diffundiert

(Elfgang et al., 1995; Yum et al., 2007). Im Gegensatz dazu wird interzelluläre Kommunikation im Hippocampus mehrheitlich über Cx43 vermittelt (Wallraff et al., 2006; Wallraff et al., 2004), von dem bisher angenommen wurde, dass es in allen Astrozyten exprimiert wird (Nagy et al., 1997; Pannasch und Rouach, 2013). Die hier präsentierten Ergebnisse stehen mit dieser Annahme im Widerspruch, da eine astrozytäre Population ohne Expression von Cx43 im Thalamus identifiziert werden konnte. Dies wurde auf verschiedenen Wegen gezeigt. Zum einen hatte, wie bereits erwähnt, der Knockout eines Cx43-Allels in *Cx43^{ECFP/+}* Mäusen keinen Einfluss auf thalamische GJN, zum anderen waren circa ein Viertel der Astrozyten in Cx30-Knockout Mäusen entkoppelt. Zudem konnte durch *Live-Imaging* in *Cx43kiECFP* Mäusen gezeigt werden, dass circa 50 % der thalamischen SR101⁺ Astrozyten kein Cx43-ECFP exprimierten. Immunhistochemische Studien in Doppelreportermäusen mit Markierung von Cx30- und Cx43-positiven Zellen konnten in ca. 20 % der Astrozyten kein Cx43 nachweisen. Die Diskrepanz zwischen den SR101-Daten sowie den Ergebnissen in Doppelreportermäusen ist durch die verbesserte Visualisierung des Reportergens durch Färben gegen ECFP zu erklären. Neben Cx30 und Cx43 wurde in der Vergangenheit auch Cx26 als möglicher Vermittler astrozytärer Kopplung ins Gespräch gebracht. Obwohl Cx26 mittels immunhistochemischer Färbungen in thalamischen Astrozyten nachgewiesen werden konnte (Nagy et al., 2011), scheinen keine funktionellen Cx26-Kanäle in thalamischen Astrozyten exprimiert zu werden (Griemsmann et al., 2015). In einer unmittelbar an die vorliegende Arbeit anknüpfenden Studie konnte in einem Cx26-Knockout weder eine Veränderung von thalamischen GJN gezeigt werden, noch trat regelmäßig Restkopplung im Cx30/43-Doppelknockout auf. Dies lässt den Schluss zu, dass in thalamischen Kernen astrozytäre GJN vorwiegend über Cx30 vermittelt werden (Griemsmann et al., 2015). Welche physiologische Rolle die überwiegende Expression dieses spezifischen Connexins sowie das weitgehende Fehlen des in anderen Hirnregionen ubiquitär von Astrozyten exprimierten Cx43 spielt bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

7.2.2 GJN in Thalamus sowie Hippocampus sind panglial organisiert

Pangliale Kopplung zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten konnte sowohl im Thalamus als auch im Hippocampus in hohem Maße nachgewiesen werden. Ein Unterschied zwischen den beiden Hirnregionen bestand lediglich in Hinblick auf die kleinere Fraktion von Oligodendrozyten in hippocampalen GJN. Dieser niedrigere Anteil ist hierbei auf die insgesamt niedrigere Anzahl von Oligodendrozyten im Hippocampus zurückzuführen. Die Zusammensetzung sowie Größe dieser panglialen Netzwerke war unabhängig vom initial gefüllten Zelltyp. Interessanterweise war häufig eine Ausbreitung des Tracers entlang myelinisierter Fasern zu beobachten. Enger Kontakt von Axonen, Myelinscheiden und versorgenden Zellen ist unerlässlich für die Integrität der Signalverarbeitung in PNS und ZNS (Nave, 2010). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Oligodendrozyten durch Bereitstellung von Metaboliten axonale Funktionen sicherstellen (Funfschilling et al., 2012; Lee et al., 2012). Da Astrozyten ebenfalls bedarfsabhängig energiereiche Substrate für Neuronen liefern (Pellerin und Magistretti, 2012; Suzuki et al., 2011), stellt sich vor dem Hintergrund panglialer Netzwerke die Frage, ob Oligodendrozyten und Astrozyten parallel oder in einem einzigen panglialen Netzwerk die neuronale Funktion sicherstellen. Es wurde bereits gezeigt, dass die oligodendrozytären Connexine 32 und 47 als Partner für die astrozytären Connexine 30 und 43 fungieren können. Passend zu der genannten zweiten Hypothese führt die Ausschaltung der oligodendroglialen Connexine 32 und 47 zu Vakuolisierung und Zerfall der Myelinscheiden im ZNS (Menichella et al., 2003; Odermatt et al., 2003). Möglicherweise werden energiereiche Metaboliten aus dem Blut über GJN von Astrozyten an Oligodendrozyten weitergegeben, welche die axonale Energieversorgung sicherstellen (Funfschilling et al., 2012; Lee et al., 2012). Es konnte bereits für den Hippocampus eine Abhängigkeit neuronaler Funktion von metabolischem Support über astrozytäre GJN gezeigt werden (Rouach et al., 2008). Vor dem Hintergrund extensiver panglialer Netzwerke im Thalamus und auch im Hippocampus muss die Frage der Funktion panglialer GJN weiter erforscht werden. Im Gegensatz zu einer anderen Studie (Maglione et al., 2010) wurden nie NG2-Zellen in GJN der untersuchten drei Hirnregionen gefunden, sodass GJN in Thalamus und Hippocampus auf Astrozyten sowie Oligodendrozyten beschränkt zu sein scheinen. Die molekulare Basis der panglialen Kopplung im Thalamus wurde in einer Folgestudie weiter untersucht (Griemsmann et al., 2015). GJN zwischen Astrozyten sowie Oligodendrozyten können durch GJ zwischen Cx30 und

Cx32 sowie Cx43 und Cx47 vermittelt werden (Orthmann-Murphy et al., 2007; Theis und Giaume, 2012). Untersuchungen in Mäusen, in welchen Cx30 sowie Cx47 ausgeschaltet wurden, zeigten ebenfalls eine dominierende Rolle von Cx30 (Griemsmann et al., 2015). In *Cx30^{-/-}*; *Cx47^{-/-}* Mäusen konnten GJN entweder nicht oder nur residuell nachgewiesen werden. Das Vorhandensein auch nur eines Allels von Cx30 konnte Existenz und Größe der GJN wiederherstellen, während die Expression eines Allels von Cx47 in *Cx30^{-/-}*; *Cx47^{+/-}* Tieren lediglich kleine GJN hervorbrachte. Pangliale Kopplung konnte in allen untersuchten Genotypen - außer dem Doppelknockout von Cx30 und Cx47 - nachgewiesen werden (Griemsmann et al., 2015). Interessanterweise scheint eine in Thalamus sowie Hippocampus zu erwartende, Cx43-vermittelte residuelle interastrozytäre Kopplung durch den Knockout von Cx30 sowie Cx47 ebenfalls beeinträchtigt zu sein. In Doppelknockout Tieren konnte keine oder nur wenig residuelle Kopplung nachgewiesen werden (Griemsmann et al., 2015). Die Funktion von Cx47 ist von der Cx43-Expression abhängig, da in einem Knockout von Cx43 die Cx47-Level absinken (May et al., 2013). Die Daten der eben genannten Kopplungsanalysen legen im Umkehrschluss ebenfalls eine stabilisierende Rolle von Cx47 für Cx43 nahe (Griemsmann et al., 2015).

7.2.3 Gliazellen im Thalamus zeigen ein einzigartiges Antigenprofil

Trotz ausgeprägter hGFAP-Promotor-Aktivität in thalamischen Kernen konnte nur eine geringgradige Expression des astrozytären Markers GFAP im Thalamus gezeigt werden. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen einer früheren Studie (Frassoni et al., 2000). Um einen Marker zur Identifizierung thalamischer Astrozyten zu finden, wurde die Expression der ebenfalls vornehmlich in Astrozyten exprimierten Enzyme GS und Aldh1L1 im Thalamus untersucht. Immunhistochemische Studien zeigten, dass die Mehrzahl der Zellen in GJN des Hippocampus für GS positiv waren, während lediglich eine Minderheit der Zellen in thalamischen GJN diesen Marker exprimierten und morphologisch Oligodendrozyten ähnelten. Tatsächlich zeigte sich in Versuchen mit *tg(PLP-GFP)* Mäusen, dass nahezu alle Oligodendrozyten im Thalamus GS exprimierten. Zusätzliche Kolokalisation von AldH1L1 und dem oligodendroglialen Transkriptionsfaktor Olig2 in einer Fraktion der Zellen weist auf die Existenz eines intermediären Zelltyps im Thalamus hin. Weiterhin zeigte sich, dass Cx43-ECFP-positive Zellen im Thalamus sowie Neocortex Olig2 exprimierten, dies stützt ebenfalls die Hypothese eines intermediären Zelltypes.

Eine Kolo-kalisation der genannten Marker konnte auch in einem Teil der Zellen in GJN nachgewiesen werden, es muss hier postuliert werden, dass diese aus Astrozyten, Oligodendrozyten sowie einem weiteren, intermediären Zelltyp zusammengesetzt sind. Olig2 wird während der frühen Ontogenese auch in astroglialen Zellen exprimiert und Fate-Mapping-Experimente zeigten, dass sowohl Oligodendrozyten als auch Astrozyten aus Olig2-positiven Zellen hervorgehen können (Ono et al., 2008). Ob dieser intermediäre Zelltyp daher möglicherweise der Ausdruck einer größeren glialen Stammzellpopulation im Thalamus ist oder eine ausdifferenzierte, spezialisierte Unterart thalamischer Gliazellen darstellt, bleibt noch zu klären (Griemsmann et al., 2015).

8. Zusammenfassung

Diese Studie untersuchte erstmalig die Eigenschaften von Astrozyten sowie glialen Netzwerken im ventrobasalen Thalamus. Pharmakologische Analysen von isolierten Astrozyten des *Nucleus ventroposterolateralis* und des *Nucleus ventroposteromedialis* konnten zwei verschiedene Zellpopulationen unterscheiden. GluA⁺ Zellen zeichneten sich durch Expression von AMPA-Rezeptoren aus. Diese wiesen mehrheitlich GluA2-Untereinheiten auf, obschon alle Unterheiten von GluA1–4 in Flip- und Flop-Splice Varianten nachweisbar waren. Die Ca²⁺-Permeabilität der von GluA⁺ Zellen exprimierten AMPA-Rezeptoren war niedrig. GluA⁻ Zellen zeichneten sich dagegen durch Abwesenheit von AMPA-Rezeptoren und stärkere Expression von einwärtsgerichtenden K⁺-Kanälen aus. Alle Zellen wiesen zudem die Expression von GABA_A-Rezeptoren auf, es konnten bis auf die α-3 und γ2-Untereinheit alle Untereinheiten regelhaft nachgewiesen werden. Glutamat-Transporter wurden sowohl in GluA⁺ als auch GluA⁻ Zellen exprimiert. Diese Ergebnisse konnten sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene nachvollzogen werden. Die Existenz verschiedener astrozytärer Populationen, welche anhand ihrer AMPA-Rezeptor-Expression unterschieden werden können, konnte ebenfalls *in situ* geführt werden. Weitere Untersuchungen konnten die Existenz glialer Netzwerke im Thalamus entgegen der bisherigen Studienlage beweisen. Astrozyten in allen untersuchten Altersgruppen waren über GJ miteinander verbunden. Anders als im Hippocampus führte der Knockout eines Cx43-Allels im Thalamus nicht zu einer Reduktion der Kopplung. Experimente unter Verwendung einer transgenen Maus sowie des astrozytenspezifischen Markers SR101 konnten zeigen, dass die Mehrheit der Astrozyten im ventrobasalen Thalamus kein Cx43 exprimiert. Weitere Untersuchungen in verschiedenen Knockout-Mäusen konnten demonstrieren, dass - im Gegensatz zum Hippocampus - Cx30 eine entscheidende Rolle bei der Formation glialer Netzwerke im Thalamus spielt. Immunhistochemische Untersuchungen der GJN legten die Anwesenheit von Oligodendrozyten in den glialen Netzwerken des Thalamus und Hippocampus nahe, dies konnte durch Verwendung transgener Mäuse für beide Hirnregionen bewiesen werden. Immunhistochemische Studien konnten die Koexpression klassischer astrozytärer und oligodendrozytärer Marker in einer Subpopulation von Zellen zeigen, diese scheinen einem intermediären Zelltyp zu entsprechen. Im Hippocampus hingegen ließen sich Astrozyten und Oligodendrozyten anhand etablierter Marker eindeutig unterscheiden. Diese Daten unterstützen nicht nur das Konzept der astro-

zytären Heterogenität in verschiedenen Regionen des ZNS, sie beweisen auch, dass verschiedene Ausprägungen von Gliazellen in einer gegebenen Hirnregion vorkommen.

9. Anhang

9.1 Tabellen

Tabelle 1

<u>Gen</u>	<u>Sequenz</u>	<u>GeneBank Acc.No.</u>
<i>Alpha-se</i>	5'-AACATGACMAYGCCMAAYAAGCT	
<i>Alpha-as</i>	5'-GCATARCAGACAGCWATRAACCA	
<i>α-1-nested-se</i>	5'-CCAGCCCGTTTCAGTGGTTGTA	NM_010250
<i>α-1-nested-as</i>	5'-GCACGGCAGATATGTTTGAAT	
<i>α-2-nested-se</i>	5'-TTACAATGCTTCTGACTCCGTTCA	NM_008066
<i>α-2-nested-as</i>	5'-CGRGCACTGATRCRWARGGT	
<i>α-3-nested-se</i>	5'-CTTGGGAAGAACAAATCTGTGGA	NM_008067
<i>α-3-nested-as</i>	5'-CGRGCACTGATRCRWARGGT	
<i>α-4-nested-se</i>	5'-ACCAAAGGCCCTGAGAAGTCA	NM_010251
<i>α-4-nested-as</i>	5'-CGRGCACTGATRCRWARGGT	
<i>α-5-nested-se</i>	5'-GCTGGAGGATGATGGCACACTTCT	NM_176942
<i>α-5-nested-as</i>	5'-GTTGAGCCTGGAGCCATCTTCTG	
<i>Beta-se</i>	5'-CTGGATGARCAAAACTGYAC	
<i>Beta-as</i>	5'-ACAAAGACAAARCAWCCCAT	
<i>β-1-nested-se</i>	5'-ATGGAGGAGAGGGAGCAGTAACT	NM_008069
<i>β-1-nested-as</i>	5'-CAGCCCATGAGATAGATGTCAATC	
<i>β-2/3-nested-se</i>	5'-GGCGYGGCGRTGACAAKGC	NM_008070
<i>β-2/3-nested-as</i>	5'-TCCCGRAGGTGRGTGTTGAT	NM_008071
<i>Gamma-se</i>	5'-ATTTGGATTCCAGACACYWTCTT	
<i>Gamma-as</i>	5'-AAGTAGCCCATCTTCKRCTCAG	
<i>γ-1-nested-se</i>	5'-CGCCTGCTGCGGATTTG	NM_010252
<i>γ-1-nested-as</i>	5'-CACAGAGGGCTTTTTCCACTTGT	

<i>y-2-nested-se</i>	5'-AAAAMRGCTGAGGCTCACTGGAT	NM_177408
<i>y-2-nested-as</i>	5'-AACTGCGCTTCCATTGATAAACA	
<i>y-3-nested-se</i>	5'-AAAAMRGCTGAGGCTCACTGGAT	NM_008074
<i>y-3-nested-as</i>	5'-CTGAGGCCCATGAAGTCAAAGTGA	
<i>Delta-se</i>	5'-ATGGCGCCAGGGCAATGAATG	NM_008072
<i>Delta-as</i>	5'-GTGGAGGTGATGCGGATGCTGTAT	
<i>δ-nested-se</i>	5'-TATGCCCGAACTTCCGACCAG	
<i>δ-nested-as</i>	5'-AAAATCACCCCATCAGGCTGTAGG	
<i>AMPA-R-se</i>	5'- GGATCMACWAAAGARTTYTTCA	
<i>AMPA-R-as</i>	5'-TCAGGCTSAGRGC ACTSGTCT	
<i>GluA1-se</i>	5'- GTGTTTGTTCGGACCACAGAG	NM_001113325
<i>GluA2-se</i>	5'-GTGAGGACTACGGCAGAAGGAGTA	NM_001083806
<i>GluA2-as</i>	5'-TCGTACCACCATTTGTTTTTCA	
<i>GluA3-se</i>	5'- AGCTGATGGGGTAGCCCGAGTTC	NM_016886
<i>GluA4-se</i>	5'-AGAGCCATCTGTGTTCACTA	NM_019691
<i>GluA1, 3, 4-as</i>	5'- TCMCCTTTATCGTACCACCATTT	
<i>S100β-se</i>	5'-AGGCCATGGTTGCCCTCATTGAT	NM_009115
<i>S100β-as</i>	5'-ACTCATGGCAGGCCGTGGTCA	
<i>S100β-nested-se</i>	5'-TACTCCGGGCGAGAGGGTGACAA	
<i>S100β-nested-as</i>	5'-GGCGACGAAGGCCATGAACTCC	

Tabelle 1: Primer für Einzelzell RT-PCR. 'Se' und 'as' bezeichnen jeweils *Sense-* und *Anti-sense-Primer*.

Tabelle 2

<u>Gen</u>	<u>Sequenz</u>	<u>GeneBank Acc.No.</u>
<i>Cx43-se</i>	5'-TTTGACTTCAGCCTCCAAGGA	NM_010288
<i>Cx43-as</i>	5'-TCTGGGCACCTCTCTTTCACTTA	
<i>Cx43-probe-se</i>	5'-TTCCACCACTTTGGCGTGCCG	
<i>Cx30-se</i>	5'-CGTACACCAGCAGCATTCTT	NM_001010937
<i>Cx30-as</i>	5'-ACCCATTGTAGAGGAAGTAGAACACAT	
<i>Cx30-probe-se</i>	5'-CGCATCATCTTCGAAGCCGCCT	

Tabelle 2: Primer für sq-RT-PCR von Cx43 und Cx30 mRNA: 'Se' and 'as' kennzeichnen *Sense-* und *Antisense-Primer*. Die fluorogenen TaqMan-Sonden für Cx30 und Cx43 wurden am 5'-Ende mit 6-carboxyfluorescein (FAM) und an ihrem 3'-Ende mit 6-carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert.

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Vereinfachter Ersatzschaltkreis einer Zelle	36
Abbildung 2:	Isolierte Astrozyten des Thalamus exprimieren AMPA-Rezeptoren	47
Abbildung 3:	AMPA-Rezeptoren auf GluA+ Zellen zeigen eine niedrige Ca^{2+} -Permeabilität	49
Abbildung 4:	GluA+ und GluA- Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer K_{ir} -Expression	52
Abbildung 5:	GluA+ und GluA- Zellen exprimieren GABA_A -Rezeptoren.	53
Abbildung 6:	Thalamische Astrozyten bilden GJN aus	55
Abbildung 7:	Cx43 spielt eine untergeordnete Rolle in Thalamus und Neocortex	57
Abbildung 8:	Thalamus und Hippocampus unterscheiden sich in Bezug auf Cx43 und Cx30 mRNA-Level	58
Abbildung 9:	Thalamische Astrozyten sind häufig Cx43 negativ	60
Abbildung 10:	Cx30 ist das dominierende astrogliale Connexin im Thalamus	62
Abbildung 11:	Proteinlevel von Cx43 sowie Cx30 in Thalamus und Hippocampus	63
Abbildung 12:	Immunhistochemische Eigenschaften von GJN	66
Abbildung 13:	GJN in Thalamus und Hippocampus sind panglial organisiert	67
Abbildung 14:	Größe und Zusammensetzung panglialer GJN sind unabhängig von der Auswahl der initial gefüllten Zelle	68
Abbildung 15:	Gliazellen im Thalamus weisen ein spezifisches Antigenprofil auf	70

9.3 Formelverzeichnis

Gleichung 1:	Serienwiderstand R_s	35
Gleichung 2:	Membranwiderstand R_m	35
Gleichung 3:	Membrankapazität C_m	35
Gleichung 4:	Membranleitfähigkeit g_{mem}	37
Gleichung 5:	Rektifikationsindex RI	38

9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Primer für Einzelzell-RT-PCR	80
Tabelle 2:	Primer für sq-RT-PCR	82

10. Literaturverzeichnis

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 41-53
- Adermark L, Lovinger DM. Electrophysiological properties and gap junction coupling of striatal astrocytes. *Neurochem Int* 2008; 52: 1365-1372
- Ahmed AH, Ptak CP, Oswald RE. Molecular mechanism of flop selectivity and subsite recognition for an AMPA receptor allosteric modulator: structures of GluA2 and GluA3 in complexes with PEPA. *Biochemistry*. 2010; 49: 2843-2850
- Akaike N, Kaneda M, Hori N, Krishtal OA. Blockade of N-methyl-D-aspartate response in enzyme-treated rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 1988; 87: 75-79
- Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965; 124: 319-335
- Amaral DG, Kurz J. An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol* 1985; 240: 37-59
- Andersen P, Bliss TV, Skrede KK. Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res* 1971; 13: 222-238
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*. 2014; 81: 728-739
- Araque A, Navarrete M. Glial cells in neuronal network function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365: 2375-2381
- Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 2001; 81: 871-927
- Bedner P, Dupper A, Huttmann K, Muller J, Herde MK, Dublin P, Deshpande T, Schramm J, Haussler U, Haas CA, Henneberger C, Theis M, Steinhäuser C. Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. *Brain*. 2015; 138: 1208-1222
- Bedner P, Niessen H, Odermatt B, Kretz M, Willecke K, Harz H. Selective permeability of different connexin channels to the second messenger cyclic AMP. *J Biol Chem* 2006; 281: 6673-6681
- Bekar LK, Walz W. Intracellular chloride modulates A-type potassium currents in astrocytes. *Glia*. 2002; 39: 207-216
- Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 728-739
- Biglami A, Dahl D. Differentiation of astrocytes in the cerebellar cortex and the pyramidal tracts of the newborn rat. An immunofluorescence study with antibodies to a protein specific to astrocytes. *Brain Res* 1973; 49: 393-402
- Biglami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 1972; 43: 429-435

- Bird CM, Burgess N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 182-194
- Bowie D. Redefining the classification of AMPA-selective ionotropic glutamate receptors. *J Physiol* 2012; 590: 49-61
- Bowie D, Mayer ML. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron*. 1995; 15: 453-462
- Bowsher D, Leijon G, Thuomas KA. Central poststroke pain: correlation of MRI with clinical pain characteristics and sensory abnormalities. *Neurology*. 1998; 51: 1352-1358
- Brasted PJ, Bussey TJ, Murray EA, Wise SP. Role of the hippocampal system in associative learning beyond the spatial domain. *Brain*. 2003; 126: 1202-1223
- Buldakova SL, Vorobjev VS, Sharonova IN, Samoilova MV, Magazanik LG. Characterization of AMPA receptor populations in rat brain cells by the use of subunit-specific open channel blocking drug, IEM-1460. *Brain Res* 1999; 846: 52-58
- Burnashev N, Khodorova A, Jonas P, Helm PJ, Wisden W, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B. Calcium-permeable AMPA-kainate receptors in fusiform cerebellar glial cells. *Science*. 1992; 256: 1566-1570
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 2002; 22: 183-192
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 2008; 28: 264-278
- Cao F, Eckert R, Elfgang C, Nitsche JM, Snyder SA, DF Hu, Willecke K, Nicholson BJ. A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 1): 31-43
- Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci* 1997; 17: 3894-3906
- Chozick BS. The behavioral effects of lesions of the hippocampus: a review. *Int J Neurosci* 1983; 22: 63-80
- Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Melone M. Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia*. 1996; 17: 254-258
- Conti F, Minelli A, DeBiasi S, Melone M. Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. *Mol Neurobiol* 1997; 14: 1-18
- Cope DW, Di Giovanni G, Fyson SJ, Orban G, Errington AC, Lorincz ML, Gould TM, Carter DA, Crunelli V. Enhanced tonic GABAA inhibition in typical absence epilepsy. *Nat Med* 2009; 15: 1392-1398
- Coulter DA, Eid T. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia*. 2012; 60: 1215-1226

- Crunelli V, Hughes SW. The slow (<1 Hz) rhythm of non-REM sleep: a dialogue between three cardinal oscillators. *Nat Neurosci* 2010; 13: 9-17
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11: 327-335
- Cull-Candy S, Kelly L, Farrant M. Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16: 288-297
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004; 2004: re16
- D'Ascenzo M, Fellin T, Terunuma M, Revilla-Sanchez R, Meaney DF, Auberson YP, Moss SJ, Haydon PG. mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 1995-2000
- Degen J, Dublin P, Zhang J, Dobrowolski R, Jokwitz M, Karram K, Trotter J, Jabs R, Willecke K, Steinhauser C, Theis M. Dual reporter approaches for identification of Cre efficacy and astrocyte heterogeneity. *FASEB J* 2012; 26: 4576-4583
- Dehouck MP, Meresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* 1990; 54: 1798-1801
- Deitmer JW, Rose CR. pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog Neurobiol* 1996; 48: 73-103
- del Zoppo GJ, Hallenbeck JM. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb Res* 2000; 98: 73-81
- Dermietzel R, Traub O, Hwang TK, Beyer E, Bennett MV, Spray DC, Willecke K. Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 10148-10152
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 7-61
- Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Swanson RA. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci* 2003; 23: 1320-1328
- Egawa K, Yamada J, Furukawa T, Yanagawa Y, Fukuda A. Cl(-) homeodynamics in gap junction-coupled astrocytic networks on activation of GABAergic synapses. *J Physiol* 2013; 591: 3901-3917
- Elfang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hulser DF, Willecke K. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 1995; 129: 805-817
- Emsley JG, Macklis JD. Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol* 2006; 2: 175-186
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B. Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci*. 1998; 1: 563-571
- Evans WH, Martin PE. Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol* 2002; 19: 121-136

- Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*. 2010; 65: 7-19
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron*. 2004; 43: 729-743
- Ferrarelli F, Tononi G. The thalamic reticular nucleus and schizophrenia. *Schizophr Bull* 2011; 37: 306-315
- Fisher R, Salanova V, Witt T, Worth R, Henry T, Gross R, Oommen K, Osorio I, Nazzaro J, Labar D, Kaplitt M, Sperling M, Sandok E, Neal J, Handforth A, Stern J, DeSalles A, Chung S, Shetter A, Bergen D, Bakay R, Henderson J, French J, Baltuch G, Rosenfeld W, Youkilis A, Marks W, Garcia P, Barbaro N, Fountain N, Bazil C, Goodman R, McKhann G, Babu Krishnamurthy K, Papavassiliou S, Epstein C, Pollard J, Tonder L, Grebin J, Coffey R, Graves N. Electrical stimulation of the anterior nucleus of thalamus for treatment of refractory epilepsy. *Epilepsia*. 2010; 51: 899-908
- Fraser DD, Duffy S, Angelides KJ, Perez-Velazquez JL, Kettenmann H, MacVicar BA. GABAA/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 1995; 15: 2720-2732
- Frassoni C, Amadeo A, Ortino B, Jaranowska A, Spreafico R. Organization of radial and non-radial glia in the developing rat thalamus. *J Comp Neurol* 2000; 428: 527-542
- Frotscher M, Leranth C, Lubbers K, Oertel WH. Commissural afferents innervate glutamate decarboxylase immunoreactive non-pyramidal neurons in the guinea pig hippocampus. *Neurosci Lett* 1984; 46: 137-143
- Funfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Mobius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW, Moraes CT, Frahm J, Goebbels S, Nave KA. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*. 2012; 485: 517-521
- Fuss B, Mallon B, Phan T, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Nishiyama A, Macklin WB. Purification and analysis of in vivo-differentiated oligodendrocytes expressing the green fluorescent protein. *Dev Biol* 2000; 218: 259-274
- Gan Q, Salussolia CL, Wollmuth LP. Assembly of AMPA receptors: mechanisms and regulation. *J Physiol* 2015; 593: 39-48
- Gandhi GK, Cruz NF, Ball KK, Theus SA, Dienel GA. Selective astrocytic gap junctional trafficking of molecules involved in the glycolytic pathway: impact on cellular brain imaging. *J Neurochem* 2009; 110: 857-869
- Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron*. 1995; 15: 193-204
- Ghandour MS, Langley OK, Vincendon G, Gombos G. Double labeling immunohistochemical technique provides evidence of the specificity of glial cell markers. *J Histochem Cytochem* 1979; 27: 1634-1637
- Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 87-99

- Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC, MacVicar BA. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature*. 2008; 456: 745-749
- Gosejacob D, Dublin P, Bedner P, Huttmann K, Zhang J, Tress O, Willecke K, Pfrieger F, Steinhauser C, Theis M. Role of astroglial connexin30 in hippocampal gap junction coupling. *Glia*. 2011; 59: 511-519
- Grant E, Hoerder-Suabedissen A, Molnar Z. Development of the corticothalamic projections. *Front Neurosci* 2012; 6: 53
- Grass D, Pawlowski PG, Hirrlinger J, Papadopoulos N, Richter DW, Kirchhoff F, Hulsmann S. Diversity of functional astroglial properties in the respiratory network. *J Neurosci* 2004; 24: 1358-1365
- Greger IH, Ziff EB, Penn AC. Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly. *Trends Neurosci* 2007; 30: 407-416
- Griemsmann S, Höft SP, Bedner P, Zhang J, von Staden E, Beinhauer A, Degen J, Dublin P, Cope DW, Richter N, Crunelli V, Jabs R, Willecke K, Theis M, Seifert G, Kettenmann H, Steinhauser C. Characterization of Panglial Gap Junction Networks in the Thalamus, Neocortex, and Hippocampus Reveals a Unique Population of Glial Cells. *Cereb Cortex* 2015; 25: 3420-3433
- Guillery RW. Anatomical evidence concerning the role of the thalamus in corticocortical communication: a brief review. *J Anat* 1995; 187 (Pt 3): 583-592
- Haidarliu S, Ahissar E. Size gradients of barreloids in the rat thalamus. *J Comp Neurol* 2001; 429: 372-387
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981; 391: 85-100
- Hamilton NB, Attwell D. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 227-238
- Haring JH, Davis JN. Differential distribution of locus coeruleus projections to the hippocampal formation: anatomical and biochemical evidence. *Brain Res* 1985; 325: 366-369
- Harris AL. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys* 2001; 34: 325-472
- Harris AL. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog Biophys Mol Biol* 2007; 94: 120-143
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*. 2010; 463: 232-236
- Herculano-Houzel S. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*. 2014; 62: 1377-1391
- Herrero MT, Barcia C, Navarro JM. Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv Syst* 2002; 18: 386-404

- Hill RA, Grutzendler J. In vivo imaging of oligodendrocytes with sulforhodamine 101. *Nat Methods*. 2014; 11: 1081-1082
- Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 1952; 116: 424-448
- Höft S, Griemsmann S, Seifert G, Steinhauser C. Heterogeneity in expression of functional ionotropic glutamate and GABA receptors in astrocytes across brain regions: insights from the thalamus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369: 20130602
- Houades V, Koulakoff A, Ezan P, Seif I, Giaume C. Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* 2008; 28: 5207-5217
- Huxley AF, Stampfli R. Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibres. *J Physiol* 1949; 108: 315-339
- Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1369-1376
- Iino M, Goto K, Kakegawa W, Okado H, Sudo M, Ishiuchi S, Miwa A, Takayasu Y, Saito I, Tsuzuki K, Ozawa S. Glia-synapse interaction through Ca²⁺-permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science*. 2001; 292: 926-929
- Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*. 2007; 54: 859-871
- Israel JM, Schipke CG, Ohlemeyer C, Theodosis DT, Kettenmann H. GABA_A receptor-expressing astrocytes in the supraoptic nucleus lack glutamate uptake and receptor currents. *Glia*. 2003; 44: 102-110
- Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*. 1987; 325: 253-257
- Jinno S, Kosaka T. Cellular architecture of the mouse hippocampus: a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neurosci Res* 2006; 56: 229-245
- Jonas P, Burnashev N. Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron*. 1995; 15: 987-990
- Jones EG, Schwark HD, Callahan PA. Extent of the ipsilateral representation in the ventral posterior medial nucleus of the monkey thalamus. *Exp Brain Res* 1986; 63: 310-320
- Jones EG, Tighilet B, Tran BV, Huntsman MM. Nucleus- and cell-specific expression of NMDA and non-NMDA receptor subunits in monkey thalamus. *J Comp Neurol* 1998; 397: 371-393
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci* 2007; 10: 331-339
- Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia*. 1998; 23: 1-10

- Kafitz KW, Meier SD, Stephan J, Rose CR. Developmental profile and properties of sulforhodamine 101--Labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus. *J Neurosci Methods*. 2008; 169: 84-92
- Kaila K, Lamsa K, Smirnov S, Taira T, Voipio J. Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K⁺ transient. *J Neurosci* 1997; 17: 7662-7672
- Kalman M, Hajos F. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. I. Forebrain. *Exp Brain Res* 1989; 78: 147-163
- Kanaporis G, Mese G, Valiuniene L, White TW, Brink PR, Valiunas V. Gap junction channels exhibit connexin-specific permeability to cyclic nucleotides. *J Gen Physiol* 2008; 131: 293-305
- Karavanova I, Vasudevan K, Cheng J, Buonanno A. Novel regional and developmental NMDA receptor expression patterns uncovered in NR2C subunit-beta-galactosidase knock-in mice. *Mol Cell Neurosci* 2007; 34: 468-480
- Kimelberg HK, Cai Z, Rastogi P, Charniga CJ, Goderie S, Dave V, Jalonen TO. Transmitter-induced calcium responses differ in astrocytes acutely isolated from rat brain and in culture. *J Neurochem* 1997; 68: 1088-1098
- Kimelberg HK, Cai Z, Schools G, Zhou M. Acutely isolated astrocytes as models to probe astrocyte functions. *Neurochem Int* 2000; 36: 359-367
- Kinomura S, Larsson J, Gulyas B, Roland PE. Activation by attention of the human reticular formation and thalamic intralaminar nuclei. *Science*. 1996; 271: 512-515
- Kirchhoff F, Ohlemeyer C, Kettenmann H. Expression of myelin-associated glycoprotein transcripts in murine oligodendrocytes. *Neuroscience*. 1997; 78: 561-570
- Krause T, Brunecker P, Pittl S, Taskin B, Laubisch D, Winter B, Lentza ME, Malzahn U, Villringer K, Villringer A, Jungehulsing GJ. Thalamic sensory strokes with and without pain: differences in lesion patterns in the ventral posterior thalamus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012; 83: 776-784
- Kroeger D, Tamburri A, Amzica F, Sik A. Activity-dependent layer-specific changes in the extracellular chloride concentration and chloride driving force in the rat hippocampus. *J Neurophysiol* 2010; 103: 1905-1914
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996; 16: 2027-2033
- Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell*. 1996; 84: 381-388
- Lallemand Y, Luria V, Haffner-Krausz R, Lonai P. Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase. *Transgenic Res* 1998; 7: 105-112
- Lalo U, Pankratov Y, Kirchhoff F, North RA, Verkhratsky A. NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 2006; 26: 2673-2683

- Lalo U, Pankratov Y, Parpura V, Verkhratsky A. Ionotropic receptors in neuronal-astroglial signalling: what is the role of "excitable" molecules in non-excitable cells. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813: 992-1002
- Landisman CE, Long MA, Beierlein M, Deans MR, Paul DL, Connors BW. Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. *J Neurosci* 2002; 22: 1002-1009
- Langer J, Rose CR. Synaptically induced sodium signals in hippocampal astrocytes in situ. *J Physiol* 2009; 587: 5859-5877
- Langer J, Stephan J, Theis M, Rose CR. Gap junctions mediate intercellular spread of sodium between hippocampal astrocytes in situ. *Glia*. 2012; 60: 239-252
- Le Mouellic H, Lallemand Y, Brulet P. Targeted replacement of the homeobox gene Hox-3.1 by the *Escherichia coli lacZ* in mouse chimeric embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 4712-4716
- Lee PH, Lee JH, Joo US. Thalamic infarct presenting with thalamic astasia. *Eur J Neurol* 2005; 12: 317-319
- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*. 2012; 487: 443-448
- Levitt P. A monoclonal antibody to limbic system neurons. *Science*. 1984; 223: 299-301
- Leybaert L, Sanderson MJ. Intercellular Ca(2+) waves: mechanisms and function. *Physiol Rev* 2012; 92: 1359-1392
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 2005; 8: 1179-1187
- Llinas RR. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science*. 1988; 242: 1654-1664
- Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH, Lohman AH. Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev* 1990; 70: 453-511
- Lopez-Bendito G, Molnar Z. Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 276-289
- Ludwin SK. The pathobiology of the oligodendrocyte. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 111-124
- Lund RD, Webster KE. Thalamic afferents from the dorsal column nuclei. An experimental anatomical study in the rat. *J Comp Neurol* 1967; 130: 301-312
- Ma W, Peschanski M, Ralston HJ, 3rd. The differential synaptic organization of the spinal and lemniscal projections to the ventrobasal complex of the rat thalamus. Evidence for convergence of the two systems upon single thalamic neurons. *Neuroscience*. 1987; 22: 925-934
- MacVicar BA, Tse FW, Crichton SA, Kettenmann H. GABA-activated Cl⁻ channels in astrocytes of hippocampal slices. *J Neurosci* 1989; 9: 3577-3583

- Maglione M, Tress O, Haas B, Karram K, Trotter J, Willecke K, Kettenmann H. Oligodendrocytes in mouse corpus callosum are coupled via gap junction channels formed by connexin47 and connexin32. *Glia*. 2010; 58: 1104-1117
- Magnotti LM, Goodenough DA, Paul DL. Functional heterotypic interactions between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *Glia*. 2011; 59: 26-34
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 793-807
- Marmont G. Studies on the axon membrane; a new method. *J Cell Physiol* 1949; 34: 351-382
- Marshall CA, Novitsch BG, Goldman JE. Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells. *J Neurosci* 2005; 25: 7289-7298
- Masdeu JC, Gorelick PB. Thalamic astasia: inability to stand after unilateral thalamic lesions. *Ann Neurol* 1988; 23: 596-603
- Matthias K, Kirchhoff F, Seifert G, Huttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhauser C. Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 2003; 23: 1750-1758
- Matyash V, Kettenmann H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev* 2010; 63: 2-10
- May D, Tress O, Seifert G, Willecke K. Connexin47 protein phosphorylation and stability in oligodendrocytes depend on expression of Connexin43 protein in astrocytes. *J Neurosci* 2013; 33: 7985-7996
- Mayer ML, Westbrook GL. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J Physiol* 1987; 394: 501-527
- McDougal DH, Hermann GE, Rogers RC. Vagal afferent stimulation activates astrocytes in the nucleus of the solitary tract via AMPA receptors: evidence of an atypical neural-glia interaction in the brainstem. *J Neurosci* 2011; 31: 14037-14045
- Meier SD, Kafitz KW, Rose CR. Developmental profile and mechanisms of GABA-induced calcium signaling in hippocampal astrocytes. *Glia*. 2008; 56: 1127-1137
- Menichella DM, Goodenough DA, Sirkowski E, Scherer SS, Paul DL. Connexins are critical for normal myelination in the CNS. *J Neurosci* 2003; 23: 5963-5973
- Moriyoshi K, Richards LJ, Akazawa C, O'Leary DD, Nakanishi S. Labeling neural cells using adenoviral gene transfer of membrane-targeted GFP. *Neuron*. 1996; 16: 255-260
- Mosbacher J, Schoepfer R, Monyer H, Burnashev N, Seeburg PH, Ruppersberg JP. A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science*. 1994; 266: 1059-1062
- Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 5606-5611

- Muller T, Fritschy JM, Grosche J, Pratt GD, Mohler H, Kettenmann H. Developmental regulation of voltage-gated K⁺ channel and GABAA receptor expression in Bergmann glial cells. *J Neurosci* 1994; 14: 2503-2514
- Muller T, Moller T, Berger T, Schnitzer J, Kettenmann H. Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science*. 1992; 256: 1563-1566
- Mulligan SJ, MacVicar BA. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature*. 2004; 431: 195-199
- Nagelhus EA, Ottersen OP. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol Rev* 2013; 93: 1543-1562
- Nagy JI, Ionescu AV, Lynn BD, Rash JE. Coupling of astrocyte connexins Cx26, Cx30, Cx43 to oligodendrocyte Cx29, Cx32, Cx47: Implications from normal and connexin32 knockout mice. *Glia*. 2003; 44: 205-218
- Nagy JI, Lynn BD, Tress O, Willecke K, Rash JE. Connexin26 expression in brain parenchymal cells demonstrated by targeted connexin ablation in transgenic mice. *Eur J Neurosci* 2011; 34: 263-271
- Nagy JI, Ochalski PA, Li J, Hertzberg EL. Evidence for the co-localization of another connexin with connexin-43 at astrocytic gap junctions in rat brain. *Neuroscience*. 1997; 78: 533-548
- Nagy JI, Rash JE. Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 32: 29-44
- Navarrete M, Araque A. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*. 2008; 57: 883-893
- Nave KA. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature*. 2010; 468: 244-252
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 2003; 26: 523-530
- Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*. 1976; 260: 799-802
- Nett WJ, Oloff SH, McCarthy KD. Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiol* 2002; 87: 528-537
- Newman EA. Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci* 2003; 23: 1659-1666
- Newman EA, Frambach DA, Odette LL. Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science*. 1984; 225: 1174-1175
- Nimmerjahn A, Bergles DE. Large-scale recording of astrocyte activity. *Curr Opin Neurobiol* 2015; 32: 95-106
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Kerr JN, Helmchen F. Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods*. 2004; 1: 31-37

- Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke CG, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kirchhoff F, Kettenmann H. GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia*. 2001; 33: 72-86
- Norenberg MD. Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J Histochem Cytochem* 1979; 27: 756-762
- Nualart-Marti A, Solsona C, Fields RD. Gap junction communication in myelinating glia. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1828: 69-78
- O'Donnell P, Lavin A, Enquist LW, Grace AA, Card JP. Interconnected parallel circuits between rat nucleus accumbens and thalamus revealed by retrograde transynaptic transport of pseudorabies virus. *J Neurosci* 1997; 17: 2143-2167
- Odermatt B, Wellershaus K, Wallraff A, Seifert G, Degen J, Euwens C, Fuss B, Buschow H, Schilling K, Steinhauser C, Willecke K. Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS. *J Neurosci* 2003; 23: 4549-4559
- Ogata K, Kosaka T. Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience*. 2002; 113: 221-233
- Olsen RW, Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* 2008; 60: 243-260
- Ono K, Takebayashi H, Ikeda K, Furusho M, Nishizawa T, Watanabe K, Ikenaka K. Regional- and temporal-dependent changes in the differentiation of Olig2 progenitors in the forebrain, and the impact on astrocyte development in the dorsal pallium. *Dev Biol* 2008; 320: 456-468
- Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 1966; 29: 788-806
- Orthmann-Murphy JL, Freidin M, Fischer E, Scherer SS, Abrams CK. Two distinct heterotypic channels mediate gap junction coupling between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *J Neurosci* 2007; 27: 13949-13957
- Otten M, Meeter M. Hippocampal structure and function in individuals with bipolar disorder: a systematic review. *J Affect Disord* 2015; 174: 113-125
- Paciaroni M, Bogousslavsky J. Pure sensory syndromes in thalamic stroke. *Eur Neurol* 1998; 39: 211-217
- Palygin O, Lalo U, Pankratov Y. Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes. *Br J Pharmacol* 2011; 163: 1755-1766
- Panatier A, Vallee J, Haber M, Murai KK, Lacaille JC, Robitaille R. Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell*. 2011; 146: 785-798
- Pannasch U, Rouach N. Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends Neurosci* 2013; 36: 405-417

- Pannasch U, Vargova L, Reingruber J, Ezan P, Holcman D, Giaume C, Sykova E, Rouach N. Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 8467-8472
- Paoletti P, Neyton J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7: 39-47
- Papez JW. A proposed mechanism of emotion. 1937. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1995; 7: 103-112
- Parfenova H, Tcheranova D, Basuroy S, Fedinec AL, Liu J, Leffler CW. Functional role of astrocyte glutamate receptors and carbon monoxide in cerebral vasodilation response to glutamate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 302: H2257-2266
- Parri HR, Gould TM, Crunelli V. Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* 2001; 4: 803-812
- Parri HR, Gould TM, Crunelli V. Sensory and cortical activation of distinct glial cell subtypes in the somatosensory thalamus of young rats. *Eur J Neurosci* 2010; 32: 29-40
- Partin KM, Patneau DK, Mayer ML. Cyclothiazide differentially modulates desensitization of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor splice variants. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 129-138
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*. 2005; 310: 113-116
- Passlick S, Grauer M, Schafer C, Jabs R, Seifert G, Steinhauser C. Expression of the gamma2-subunit distinguishes synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors in NG2 cells of the hippocampus. *J Neurosci* 2013; 33: 12030-12040
- Pellerin L, Magistretti PJ. Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32: 1152-1166
- Peracchia C, Wang X, Li L, Peracchia LL. Inhibition of calmodulin expression prevents low-pH-induced gap junction uncoupling in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* 1996; 431: 379-387
- Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 2009; 32: 421-431
- Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF. Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci* 2001; 21: 1228-1237
- Piet R, Jahr CE. Glutamatergic and purinergic receptor-mediated calcium transients in Bergmann glial cells. *J Neurosci* 2007; 27: 4027-4035
- Pirttimaki T, Parri HR, Crunelli V. Astrocytic GABA transporter GAT-1 dysfunction in experimental absence seizures. *J Physiol* 2013; 591: 823-833
- Pirttimaki TM, Hall SD, Parri HR. Sustained neuronal activity generated by glial plasticity. *J Neurosci* 2011; 31: 7637-7647
- Pirttimaki TM, Parri HR. Glutamatergic input-output properties of thalamic astrocytes. *Neuroscience*. 2012; 205: 18-28

- Porter JT, McCarthy KD. GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neurotrophins with increases in $[Ca^{2+}]_i$. *Glia*. 1995; 13: 101-112
- Ralston HJ, 3rd. The synaptic organization of lemniscal projections to the ventrobasal thalamus of the cat. *Brain Res* 1969; 14: 99-115
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science*. 1995; 267: 1831-1834
- Reeves AM, Shigetomi E, Khakh BS. Bulk loading of calcium indicator dyes to study astrocyte physiology: key limitations and improvements using morphological maps. *J Neurosci* 2011; 31: 9353-9358
- Riquelme R, Miralles CP, De Blas AL. Bergmann glia GABA(A) receptors concentrate on the glial processes that wrap inhibitory synapses. *J Neurosci* 2002; 22: 10720-10730
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science*. 2008; 322: 1551-1555
- Roux L, Benchenane K, Rothstein JD, Bonvento G, Giaume C. Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 18442-18446
- Rudolph U, Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 685-697
- Saab AS, Neumeyer A, Jahn HM, Cupido A, Simek AA, Boele HJ, Scheller A, Le Meur K, Gotz M, Monyer H, Sprengel R, Rubio ME, Deitmer JW, De Zeeuw CI, Kirchhoff F. Bergmann glial AMPA receptors are required for fine motor coordination. *Science*. 2012; 337: 749-753
- Salzer JL. Schwann Cell Myelination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7
- Samoilova MV, Buldakova SL, Vorobjev VS, Sharonova IN, Magazanik LG. The open channel blocking drug, IEM-1460, reveals functionally distinct alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors in rat brain neurons. *Neuroscience*. 1999; 94: 261-268
- Santello M, Cali C, Bezzi P. Gliotransmission and the tripartite synapse. *Adv Exp Med Biol* 2012; 970: 307-331
- Scemes E, Giaume C. Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia*. 2006; 54: 716-725
- Schipke CG, Ohlemeyer C, Matyash M, Nolte C, Kettenmann H, Kirchhoff F. Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *FASEB J* 2001; 15: 1270-1272
- Schools GP, Zhou M, Kimelberg HK. Development of gap junctions in hippocampal astrocytes: evidence that whole cell electrophysiological phenotype is an intrinsic property of the individual cell. *J Neurophysiol* 2006; 96: 1383-1392
- Schroder W, Seifert G, Huttmann K, Hinterkeuser S, Steinhauser C. AMPA receptor-mediated modulation of inward rectifier K⁺ channels in astrocytes of mouse hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 2002; 19: 447-458

- Seifert G, Huttmann K, Binder DK, Hartmann C, Wyczynski A, Neusch C, Steinhauser C. Analysis of astroglial K⁺ channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4.1 subunit. *J Neurosci* 2009; 29: 7474-7488
- Seifert G, Steinhauser C. Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca²⁺ permeability. *Eur J Neurosci* 1995; 7: 1872-1881
- Sekiguchi M, Fleck MW, Mayer ML, Takeo J, Chiba Y, Yamashita S, Wada K. A novel allosteric potentiator of AMPA receptors: 4--2-(phenylsulfonylamino)ethylthio--2,6-difluoro-phenoxyaceta mide. *J Neurosci* 1997; 17: 5760-5771
- Sherman SM. The thalamus is more than just a relay. *Curr Opin Neurobiol* 2007; 17: 417-422
- Shigetomi E, Bowser DN, Sofroniew MV, Khakh BS. Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *J Neurosci* 2008; 28: 6659-6663
- Shigetomi E, Kracun S, Sofroniew MV, Khakh BS. A genetically targeted optical sensor to monitor calcium signals in astrocyte processes. *Nat Neurosci* 2010; 13: 759-766
- Sommer MA. The role of the thalamus in motor control. *Curr Opin Neurobiol* 2003; 13: 663-670
- Sommer MA, Wurtz RH. A pathway in primate brain for internal monitoring of movements. *Science*. 2002; 296: 1480-1482
- Song J, Zhong C, Bonaguidi MA, Sun GJ, Hsu D, Gu Y, Meletis K, Huang ZJ, Ge S, Enikolopov G, Deisseroth K, Luscher B, Christian KM, Ming GL, Song H. Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*. 2012; 489: 150-154
- Spreafico R, Frassoni C, Arcelli P, Battaglia G, Wenthold RJ, De Biasi S. Distribution of AMPA selective glutamate receptors in the thalamus of adult rats and during postnatal development. A light and ultrastructural immunocytochemical study. *Brain Res Dev Brain Res* 1994; 82: 231-244
- Steinhauser C, Kressin K, Kuprijanova E, Weber M, Seifert G. Properties of voltage-activated Na⁺ and K⁺ currents in mouse hippocampal glial cells in situ and after acute isolation from tissue slices. *Pflugers Arch* 1994; 428: 610-620
- Succol F, Fiumelli H, Benfenati F, Cancedda L, Barberis A. Intracellular chloride concentration influences the GABAA receptor subunit composition. *Nat Commun* 2012; 3: 738
- Sun W, McConnell E, Pare JF, Xu Q, Chen M, Peng W, Lovatt D, Han X, Smith Y, Nedergaard M. Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. *Science*. 2013; 339: 197-200
- Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, Alberini CM. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*. 2011; 144: 810-823
- Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci* 2006; 9: 260-267

- Takata N, Mishima T, Hisatsune C, Nagai T, Ebisui E, Mikoshiba K, Hirase H. Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *J Neurosci* 2011; 31: 18155-18165
- Teubner B, Michel V, Pesch J, Lautermann J, Cohen-Salmon M, Sohl G, Jahnke K, Winterhager E, Herberhold C, Hardelin JP, Petit C, Willecke K. Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 13-21
- Teyler TJ, DiScenna P. The topological anatomy of the hippocampus: a clue to its function. *Brain Res Bull* 1984; 12: 711-719
- Theis M, de Wit C, Schlaeger TM, Eckardt D, Kruger O, Doring B, Risau W, Deutsch U, Pohl U, Willecke K. Endothelium-specific replacement of the connexin43 coding region by a lacZ reporter gene. *Genesis*. 2001; 29: 1-13
- Theis M, Giaume C. Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res* 2012; 1487: 88-98
- Theis M, Jauch R, Zhuo L, Speidel D, Wallraff A, Doring B, Frisch C, Sohl G, Teubner B, Euwens C, Huston J, Steinhauser C, Messing A, Heinemann U, Willecke K. Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J Neurosci* 2003; 23: 766-776
- Trapp BD, Nishiyama A, Cheng D, Macklin W. Differentiation and death of premyelinating oligodendrocytes in developing rodent brain. *J Cell Biol* 1997; 137: 459-468
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 405-496
- Tress O, Maglione M, May D, Pivneva T, Richter N, Seyfarth J, Binder S, Zlomuzica A, Seifert G, Theis M, Dere E, Kettenmann H, Willecke K. Panglial gap junctional communication is essential for maintenance of myelin in the CNS. *J Neurosci* 2012; 32: 7499-7518
- Trotter J, Karram K, Nishiyama A. NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res Rev* 2010; 63: 72-82
- Van Der Loos H. Barreloids in mouse somatosensory thalamus. *Neurosci Lett* 1976; 2: 1-6
- Van der Werf YD, Scheltens P, Lindeboom J, Witter MP, Uylings HB, Jolles J. Deficits of memory, executive functioning and attention following infarction in the thalamus; a study of 22 cases with localised lesions. *Neuropsychologia*. 2003; 41: 1330-1344
- Velez-Fort M, Audinat E, Angulo MC. Central role of GABA in neuron-glia interactions. *Neuroscientist*. 2012; 18: 237-250
- Ventura R, Harris KM. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 1999; 19: 6897-6906
- Verkhratsky A. Physiology of neuronal-glia networking. *Neurochem Int* 2010; 57: 332-343
- Verkhratsky A, Kirchhoff F. NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist*. 2007; 13: 28-37

- Verkhatsky A, Noda M, Parpura V, Kirischuk S. Sodium fluxes and astroglial function. *Adv Exp Med Biol* 2013; 961: 295-305
- Verkhatsky A, Parpura V. Astroglial pathology in neurological, neurodevelopmental and psychiatric disorders. *Neurobiol Dis* 2015.
- Verkhatsky A, Rodriguez JJ, Steardo L. Astroglial pathology: a central element of neuropsychiatric diseases? *Neuroscientist*. 2014; 20: 576-588
- Verkhatsky A, Steinhauser C. Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 32: 380-412
- Wallraff A, Kohling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhauser C. The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci* 2006; 26: 5438-5447
- Wallraff A, Odermatt B, Willecke K, Steinhauser C. Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia*. 2004; 48: 36-43
- Wang LP, Kempermann G, Kettenmann H. A subpopulation of precursor cells in the mouse dentate gyrus receives synaptic GABAergic input. *Mol Cell Neurosci* 2005; 29: 181-189
- Wasseff SK, Scherer SS. Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling. *Neurobiol Dis* 2011; 42: 506-513
- Weber PA, Chang HC, Spaeth KE, Nitsche JM, Nicholson BJ. The permeability of gap junction channels to probes of different size is dependent on connexin composition and permeant-pore affinities. *Biophys J* 2004; 87: 958-973
- Wieser HG. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*. 2004; 45: 695-714
- Wight PA, Duchala CS, Readhead C, Macklin WB. A myelin proteolipid protein-LacZ fusion protein is developmentally regulated and targeted to the myelin membrane in transgenic mice. *J Cell Biol* 1993; 123: 443-454
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 2002; 383: 725-737
- Witcher MR, Kirov SA, Harris KM. Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. *Glia*. 2007; 55: 13-23
- Yan W, Suga N. Corticofugal modulation of the midbrain frequency map in the bat auditory system. *Nat Neurosci* 1998; 1: 54-58
- Yang Y, Vidensky S, Jin L, Jie C, Lorenzini I, Frankl M, Rothstein JD. Molecular comparison of GLT1+ and ALDH1L1+ astrocytes in vivo in astroglial reporter mice. *Glia*. 2011; 59: 200-207
- Yeo SS, Chang PH, Jang SH. The ascending reticular activating system from pontine reticular formation to the thalamus in the human brain. *Front Hum Neurosci* 2013; 7: 416
- Yum SW, Zhang J, Valiunas V, Kanaporis G, Brink PR, White TW, Scherer SS. Human connexin26 and connexin30 form functional heteromeric and heterotypic channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C1032-1048

Zhang Y, Barres BA. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol* 2010; 20: 588-594

Zhou M, Kimelberg HK. Freshly isolated astrocytes from rat hippocampus show two distinct current patterns and different $[K^{+}]_o$ uptake capabilities. *J Neurophysiol* 2000; 84: 2746-2757

Zhou M, Schools GP, Kimelberg HK. Development of GLAST(+) astrocytes and NG2(+) glia in rat hippocampus CA1: mature astrocytes are electrophysiologically passive. *J Neurophysiol* 2006; 95: 134-143

Zhuo L, Theis M, Alvarez-Maya I, Brenner M, Willecke K, Messing A. hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. *Genesis*. 2001; 31: 85-94

Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 2003; 6: 43-50

11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Steinhäuser für die Bereitstellung des Themas, die immer vorhandene hilfreiche Unterstützung sowie die vielen anregenden Diskussionen bedanken.

Besonderer Dank gebührt PD Dr. Gerald Seifert, der mich in die Geheimnisse des Einzelzell-Setups sowie der Astrozytenphysiologie eingeführt hat, für die hervorragende und enge Betreuung meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei den weiteren Mitarbeitern des Instituts, insbesondere PD Dr. Ronald Jabs, Prof. Dr. Martin Theis und Dr. Peter Bedner für anregende Ideen sowie Anleitung bei speziellen Fragestellungen und Unterstützung. Hervorragende technische Assistenz wurde durch Thomas Erdmann sowie Ina Fiedler geleistet.

Vor allem danke ich Dr. Stephanie Griemsmann für endlose Stunden, Diskussionen und erfolgreiches Patchen am Thalamus, Johannes Weller für gemeinsame Erfahrungen am Setup und Dr. Stefan Passlick sowie Dr. Christian Haberlandt für die gemeinsame Zeit.

Mein ganzer Dank gilt meiner Familie, die mich immer unterstützt hat und dies möglich gemacht hat sowie insbesondere meiner Frau für Geduld und jede Hilfestellung und meiner Tochter für all die Motivation.

VeröffentlichungenZeitschriftenbeiträge

Höft S*, Griemsmann S*, Seifert G, Steinhauser C. Heterogeneity in expression of functional ionotropic glutamate and GABA receptors in astrocytes across brain regions: insights from the thalamus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369: 20130602

* beide Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Publikation beigetragen

Griemsmann S, **Höft S***, Bedner P, Zhang J, von Staden E, Beinhauer A, Degen J, Dublin P, Cope DW, Richter N, Crunelli V, Jabs R, Willecke K, Theis M, Seifert G, Kettenmann H, Steinhauser C. Characterization of Panglial Gap Junction Networks in the Thalamus, Neocortex, and Hippocampus Reveals a Unique Population of Glial Cells. *Cereb Cortex*. 2015; 25: 3420-3433

* beide Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Publikation beigetragen

Kongressbeiträge und Posterpräsentationen als präsentierender Autor

Höft S, Seifert G, von Staden E, Jabs R, Theis M, Cope DW, Crunelli V, Steinhäuser C. Morphological and functional analysis of astrocytes in the thalamus. Joint Meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies, Kopenhagen 2010

Höft S, Seifert G, Von Staden E, Bedner P, Jabs R, Theis M, Cope DW, Crunelli V, Steinhäuser C. Morphological and functional analysis of astrocytes in the thalamus. 7th FENS Forum of European Neuroscience, Amsterdam 2010

Höft S, Griemsmann S, Bedner P, Zhang J, Jabs R, Theis M, Cope D, Crunelli V, Seifert G, Steinhäuser C. Astrocytes are heterogenous with respect to gap junction coupling. 10th European Meeting on glial cells in health and Disease, Prag 2011

Höft S, Griemsmann S, Bedner P, Zhang J, Jabs R, Theis M, Cope D, Crunelli V, Seifert G, Steinhäuser C. Astrocytes are heterogenous with respect to gap junction coupling. 91st Annual Meeting of the German Physiological Society, Dresden 2012

Höft S, Buermann J, Kaminski M. Die Chirurgie der abszedierenden Bronchopneumonie. 24. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Thoraxchirurgie, Berlin 2015