

Untersuchungen zur Aktivitäts-Abhängigkeit panglialer Kopplung im Thalamus

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Paula Maria Carlotta Baum

aus Köln

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Steinhäuser
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Benjamin Odermatt

Tag der mündlichen Prüfung: 25.08.2025

Aus dem Institut für Zelluläre Neurowissenschaften

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Deutsche Zusammenfassung	8
1.1 Einleitung	8
1.2 Fragestellung und Innovation	10
1.3 Material und Methoden	10
1.4 Ergebnisse	16
1.5 Diskussion	23
1.6 Zusammenfassung	27
1.7 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	29
2. Veröffentlichung	37
3. Erklärung zum Eigenanteil	38
4. Danksagung	39
5. Publikation (PDF-Version)	41

Abkürzungsverzeichnis

aCSF	Künstlicher Liquor cerebrospinalis (artificial cerebrospinal fluid)
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
APC	Adenomatöse Polyposis coli (adenomatous polyposis coli)
Biozytin	N-biotinyl-L-lysine
CC1	Anti-adenomatöse Polyposis coli (anti-adenomatous polyposis coli)
contra	Contralateral
CTX	ω -Conotoxin GVIA
Cx	Connexin
Dpt	Tag nach Trimmen (day-post-trimming)
EGFP	Verstärkt grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
GFAP	Saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
GSTpi	Glutathion S-Transferase Pi
ipsi	Ipsilateral
ki	Knockin
KO	Knockout
LJP	Flüssigkeitsübergangspotential (liquid junction potential)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)

NG2	Neurales/gliales Antigen 2
NGS	Normales Ziegenserum (normal goat serum)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Myelin Proteolipidprotein
RT-qPCR	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkriptase (reverse transcription-semiquantitative polymerase chain reaction)
SR101	Sulforhodamin 101
TRD	Texas Red Dextran
TTX	Tetrodotoxin
VPM	Nucleus ventralis posteromedialis (ventral posteromedial nucleus)
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Der Thalamus ist ein Teil des zentralen Nervensystems, welcher den Informationstransfer an den Cortex cerebri kontrolliert (Crick und Koch, 2003). Der nucleus ventralis postero-medialis (VPM) des ventrobasalen Thalamus hat eine zentrale Rolle bei der sensomotorischen Wahrnehmung (Landers und Zeigler, 2006; Sugitani et al., 1990). Hierbei sind neuronale Schaltkreise bei der Verarbeitung und Weiterleitung der sensorischen Informationen in den Cortex wichtig (Glazewski et al., 1998; Oberlaender et al., 2012; Parri et al., 2010). An diesem neuronalen Austausch sind funktionale Netzwerke aus metabolisch und elektrisch gekoppelten Gliazellen aktiv beteiligt. Sie tragen durch die metabolische Versorgung von Neuronen zur Aufrechterhaltung der neuronalen Aktivität bei (Meyer et al., 2018; Philippot et al., 2021; Rouach et al., 2008). Durch Transmitter-Rezeptoren sind Gliazellen in diese neuronale Interaktion, die Energieversorgung und Myelinisierung eingebunden (Butt et al., 2014; Philippot et al., 2021; Rouach et al., 2008; Verkhratsky und Nedergaard, 2018). Durch diese neuen Aspekte im Kontext neuronaler Kommunikation wandelt sich das frühere Verständnis von Gliazellen als passives Zwischengewebe und Nervenkitz hin zu einer aktiven Zellgruppe, welche neuronale Funktion und Kommunikation unterstützt und moduliert (Virchow, 1856; Volterra und Meldolesi, 2005). Hierbei ist die Gruppe der Gliazellen in ihren Eigenschaften und Aufgaben heterogen.

Astrozyten sind für die Energiezufuhr sowie bei der Verteilung von Ionen und Neurotransmittern wichtig (Pannasch et al., 2011; Rouach et al., 2008; Steinhäuser et al., 2012). Oligodendrozyten sind für die Myelinisierung und den Metabolitentransport zuständig (Menichella et al., 2003; Meyer et al., 2018; Philippot et al. 2021). Miteinander gekoppelte funktionelle Einheiten aus Astrozyten und Oligodendrozyten bilden sogenannte pangliale Netzwerke (Griemsmann et al., 2015). Im Thalamus ist die Rolle dieser Netzwerke sowie ihre Interaktion und Beeinflussung im Kontext neuronaler Aktivität immer noch unklar. Die panglialen Netzwerke entstehen durch die Ausbildung von interzellulären Kanälen, sogenannten gap junctions. Diese ermöglichen den Ionen- und Metabolitenaustausch (Giaume et al., 2010; Goldberg et al., 2004). Die Kanäle werden durch Connexine (Cx)

ausgebildet, welche zellspezifisch und regional unterschiedlich exprimiert werden (Bedner et al., 2012). Astrozytäre Connexin Isoformen sind Cx30, Cx43 und Cx26. Oligodendrozyten exprimieren Cx32 und Cx47. Für die Konstitution von funktionalen Kanälen können nur bestimmte Connexine zusammen eine übergeordnete Einheit, einen Hemi-Kanal, auch Connexon genannt, bilden (Willecke et al., 2002). Zwei dieser Connexone, je eines in der Plasmamembran einer Zelle, können einen funktionalen gap junction Kanal bilden. Astrozyten bilden homotype gap junction Kanäle untereinander durch Cx30:Cx30, Cx43:Cx43 aus. Heterotype gap junction Kanäle zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten werden durch Cx30:Cx32, Cx47:Cx43 und Cx47:Cx30 ausgebildet (Magnotti et al., 2011a, 2011b; Orthmann-Murphy et al., 2007). Cx30 spielt als dominante Connexin Isoform in thalamischen Astrozyten eine größere Rolle als das in anderen Regionen, wie dem Hippocampus, häufiger exprimierte Cx43 (Griemsmann et al., 2015). Der Thalamus unterscheidet sich nicht nur in seinen zellspezifischen Eigenschaften von anderen Hirnregionen, sondern hat auch als sensorische Eingangsstruktur zum Cortex eine hervorzuhebende Bedeutung.

Bei Mäusen wird im VPM in sogenannten Barreloiden somatotopisch die Anordnung der Tasthaare wiedergegeben (Sugitani et al., 1990; Van der Loos, 1976). Die Tasthaare sind beidseitig im Bereich der Schnauze in Tasthaarkissen organisiert. In den Reihen A – E sind Makrovibrissen angeordnet, welche für eine räumliche Orientierung und zur Distanzmessung zu Objekten wichtig sind (Brecht et al., 1997). Mikrovibrissen, welche für die Objekterkennung relevant sind, sind feiner und nicht immer vom Fellhaar zu unterscheiden (Brecht et al., 1997). Das System der Makrovibrissen ist in der Anordnung der Barreloide repräsentiert (Van der Loos, 1976). Gering gekoppelte Oligodendrozyten begrenzen und verhindern eine Ausbreitung der panglialen Kopplungsnetzwerke über die einzelnen Barreloide hinweg (Claus et al., 2018). Der Einfluss von neuronaler Aktivität auf die Kopplungseffizienz des Netzwerkes in situ und die Reduktion der Ausbreitung von Energiemetaboliten unter neuronaler Deprivation, konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden (Claus et al., 2018).

1.2 Fragestellung und Innovation

Generelles Ziel meiner Arbeit war es, die zellulären Eigenschaften der panglialen Netzwerke im Thalamus und deren Bedeutung im Kontext neuronaler Aktivität zu untersuchen.

Die erste Fragestellung lautete: Welche Connexine vermitteln die aktivitätsabhängige Modulation der panglialen Kopplung im Thalamus in situ? Daraus ergab sich für den zweiten Teil meiner Arbeit folgende Fragestellung: Wird die Kopplungseffizienz der panglialen Netzwerke auch in vivo durch neuronale Aktivität beeinflusst? Dazu habe ich den sensorischen Input in die thalamischen Barreloide durch Kürzung der Tasthaare (whisker trimming) der Maus reduziert und die Kopplungseffizienz ipsi- und contralateral verglichen.

1.3 Material und Methoden

Die aufgeführten Experimente mit Datenerhebung und -auswertung wurden von mir persönlich vorgenommen. PD Dr. Seifert führte für mich die semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkriptase (RT-qPCR) durch.

Für die Durchführung dieser Experimente wurde ein Tierversuchsantrag (81-02.04.2020.A226) genehmigt, welcher mir die Durchführung der Tierversuchsvorhaben erlaubte. Das verwendete Material, Protokolle, Konzentrationen und Herstellerangaben sind in meiner Publikation Baum et al. (2024) detailliert aufgeführt und können dort nachgelesen werden.

Mausmodelle

Für die Experimente wurden unterschiedliche Mauslinien beider Geschlechter im Alter von 14 bis 17 Tagen (p14 – p17) verwendet. Als Kontrollgruppe wurde Gewebe von Wildtyp C57BL6/J Mäusen gewählt. Zur genaueren Untersuchung der unterschiedlichen Connexin Isoformen wurden Mäuse mit genetischen Veränderungen in den entsprechenden codierenden Genregionen herangezogen, sodass das jeweilige Connexin nicht mehr funktional exprimiert wurde. Bei Cx30^{kiLacZ} Mäusen ist die codierende Region des Cx30

Gens durch das LacZ Reportergen ersetzt (Knockin, ki) (Teubner et al., 2003). LacZ ist das Strukturgen für beta-Galactosidase, welches mithilfe von Immunhistochemie nachgewiesen werden kann (Teubner et al., 2003). In Cx32 Knockout (Cx32 KO) Mäusen ist durch eine Insertion das Cx32 Gen inaktiviert (Nelles et al., 1996). In hGFAPcre x Cx43 fl/fl Mäusen ist Cx43 in allen Zellen, die das saure Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) exprimieren, deletiert (Tress et al., 2012). Cx47kiEGFP Mäuse exprimieren das verstärkt grün fluoreszierende Protein (enhanced green fluorescent protein, EGFP) anstelle von Cx47 (Tress et al., 2012). Des Weiteren wurden noch Myelin Proteolipidprotein-GFP (PLP-GFP) Mäuse, welche GFP unter dem Promotor von PLP exprimieren, verwendet (Fuss et al., 2000). PLP ist ein Protein, das in Oligodendrozyten exprimiert wird und für die Myelinscheidenbildung eine wichtige Rolle spielt (Trapp et al., 1997; Wight et al., 1993). In NG2kiYFP Mäusen wird das gelb fluoreszierende Protein (YFP) unter dem Promotor des neuronalen/glialen Antigens 2 (NG2) exprimiert (Karram et al., 2008). Dies lässt eine Identifikation von NG2-positiven Zellen, eine abzugrenzende Klasse von Gliazellen, zu (Steinhäuser et al., 1994; Steinhäuser und Dietrich, 2015).

Präparation akuter Hirnschnitte

Cx30kiLacZ, C57BL6/J, Cx32 KO, Cx47kiEGFP sowie hGFAPcre x Cx43 fl/fl Mäuse wurden anästhesiert und dekapitiert. Zur Visualisierung von Barreloiden in akuten Hirnschnitten wurde das Gehirn aus dem Schädel gelöst und in eiskalte saccharosehaltige Präparationslösung (87 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 7 mM MgCl₂, 0,5 CaCl₂, 25 mM Glucose, 61 mM Saccharose) transferiert. Durch eine angepasste Schnitttechnik wurden horizontale Schnitte mit einer Dicke von 200 µm angefertigt (Baum et al., 2024; Claus et al., 2018). Zur Identifizierung von Astrozyten wurden die Schnitte in künstlichem Liquor cerebrospinalis (artificial cerebro spinal fluid, aCSF: 1,25 mM NaH₂PO₄, 126 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgSO₄·7H₂O, 2 mM CaCl₂·6H₂O, 10 mM Glucose, 26 mM NaHCO₃, Carbogen-begast) versetzt mit 1 µM Sulforhodamin 101 (SR101) gefärbt. Für die Dauer der Experimente wurden die Schnitte in aCSF gelagert. Alternativ wurden einige Schnitte in aCSF mit 0,5 µM Tetrodotoxin (TTX) und 0,5 µM ω-Conotoxin GVIA (CTX) für 3 – 4 h inkubiert, um eine neuronale Deprivation zu erreichen. Alle Lösungen wurden kontinuierlich mit Carbogen (95 % O₂ / 5 % CO₂) begast.

Trimmen von Tasthaaren (Vibrissen) bei Mäusen

Für die sensorische Deprivation in vivo wurden bei C57BL6/J Mäusen die Makrovibrissen einseitig abgeschnitten. Diese Technik des Trimmens war in der Arbeitsgruppe zuvor noch nicht angewendet worden und ich erlernte sie durch einen methodischen Austausch mit einem Mitarbeiter (Dr. Rajeevan T. Narayanan) aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marcel Oberlaender (Max-Planck-Institut für Neurobiologie des Verhaltens – caesar, Bonn). Nachdem ich die Technik erlernt hatte und auf einem reproduzierbaren Niveau durchführen konnte, habe ich C57BL6/J Mäuse im Alter von 12 bis 16 Tagen einseitig getrimmt. Durch die neuronale Verschaltung wird das Tasthaarkissen im contralateralen Thalamus repräsentiert (Killackey und Fleming, 1985). Hierdurch war es möglich, nur auf einer Seite die Tasthaare zu kürzen und die andere Seite der Schnauze als Kontrolle festzulegen.

Nachdem die jungen Mäuse sich an meine Hand, das Mikroskop und die Trimm-Utensilien gewöhnt hatten, ließen sie sich problemlos per Hand fixieren und verhielten sich während des Trimmens ruhig. Hierbei wurde überprüft, ob die Augen des Tieres offen und die Tasthaare regelrecht ausgebildet waren. Es wurde darauf geachtet, dass die Tasthaare nicht durch natürliches Tasthaar-Kürzen der Mäuse untereinander beschädigt waren (Long, 1972; Strozik und Festing, 1981). Unter mikroskopischer Kontrolle habe ich mit einer Schere vorsichtig die Makrovibrissen einzeln der Reihe nach bis auf den Follikel abgeschnitten (< 1 mm). Es wurde darauf geachtet, dass dabei so wenig Manipulation wie möglich am Tasthaarkissen verursacht wurde und dass keine weiteren Haare oder Mikrovibrissen mitgetrimmt wurden. Bei scheingetrimmten Kontrolltieren wurde mit einer flachen Schere oder einer Pinzette ein Abschneiden der einzelnen Tasthaare sowie der Druck durch die Manipulation simuliert. Die Tiere wurden auf der entsprechenden Seite mit einem Farbstift am Ohr und der Pfote markiert. Zeitlicher Aufwand und Ablauf waren für alle Tiere standardisiert. Die getrimmte beziehungsweise scheingetrimmte Seite der Schnauze wurde zwischen den Würfen alterniert. Im Anschluss wurde das Tier zurück zu dem Wurf und der Mutter in den Käfig gesetzt. Um das Explorieren der Umgebung zu fördern, wurden Objekte aus Wolle oder Pappe wie Röhren, Ringe oder Quadrate in den Käfig gelegt (Wimmer et al., 2010). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Trimmen wurden die Tiere geopfert und die Kopplungsanalyse durchgeführt.

Elektrophysiologie

Die Experimente wurden mit der Patch-Clamp Technik durchgeführt. Hierbei wird unter mikroskopischer Kontrolle mittels einer Glaspipette (Öffnungsdurchmesser ca. 1 μm) die Membran einer Zelle zunächst angesaugt. Anschließend wird die Membran im Bereich des Patches, durch kurzzeitigen Unterdruck, geöffnet. Hierdurch wird die sogenannte Whole-Cell-Konfiguration (Ganzzellkonfiguration) erreicht. In dieser Konfiguration können die transmembranären Ionenströme der Zelle erfasst werden und über die Pipette kann die Zelle mit Intrazellulärlösung und Farbstoffen gefüllt werden. In der Spannungsklemme (Voltage-Clamp-Modus) wird die Spannung, beziehungsweise das Membranpotential, konstant gehalten. Durch Messungen der Membranströme und entsprechender Applikation eines Kompensationsstroms wird Änderungen des Potentials entgegengewirkt. In der Stromklemme (Current-Clamp-Modus) ist der Strom durch die Pipette vorgegeben und das Potential bleibt variabel.

Zu Beginn wurde ein Hirnschnitt in eine Badkammer gelegt und kontinuierlich mit aCSF oder aCSF versetzt mit 0,5 μM TTX und 0,5 μM CTX bei Raumtemperatur umspült. Die Lösungen wurden mit Carbogen kontinuierlich begast. Es wurde ein Aufrecht-Mikroskop am Setup verwendet, das auf einem schwingungsgedämpften Tisch gelagert und von externen elektrischen Interferenzquellen abgeschirmt war.

Zunächst wurden thalamische Barreloide ausfindig gemacht und anschließend ein Astrozyt innerhalb eines Barreloid Feldes anhand von SR101 Fluoreszenz und morphologischen Charakteristika ausgewählt. Die Patchpipetten wurden mit Intrazellulärlösung (130 mM K-Gluconat, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3 mM $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 20 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure (HEPES), 10 mM Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA), pH 7.2) gefüllt, die mit 0,5 % N-biotinyl-l-lysine (Biozytin) und 0,1 % Texas Red Dextran (TRD) versetzt war. Biozytin kann die gap junction Kanäle passieren und sich über benachbarte Zellen im Kopplungsnetzwerk ausbreiten. TRD hat ein höheres Molekulargewicht und kann die initial gefüllte Zelle über gap junction Kanäle nicht verlassen. Die Patchpipetten wiesen, wenn sie in die Badkammer eingetaucht waren, einen Widerstand von 3 – 6 M Ω auf.

Es wurde der Voltage-Clamp-Modus genutzt, bei welchem für Astrozyten ein Haltepotential von -80 mV vorgegeben wurde. Zur Korrektur des Flüssigkeitsübergangspotentials (liquid junction potential, LJP) wurde bei den verwendeten Innen- und Außenlösungen ein LJP von -7 mV berechnet. Dieses wurde während der Messungen durch Anpassung des Haltepotentials korrigiert. Der Current-Clamp-Modus wurde kurzzeitig verwendet, um das Membranpotential der Zelle zu überwachen. Der Membranwiderstand, das Membranpotential und der Serienwiderstand wurden regelmäßig überprüft. Hierüber wurde die gepatchte Zelle charakterisiert. Astrozyten weisen ein typisches passives Strommuster, einen geringen Membranwiderstand und ein sehr negatives Membranpotential auf. Hierzu wurden 10 mV Spannungssprünge von -160 mV bis +20 mV für je 50 ms durchgeführt und das Strommuster aufgezeichnet (Baum et al., 2024, Fig. 1A). Zur Berechnung des Membran- und Serienwiderstandes wurden 10 mV Spannungssprünge appliziert. Zellen, welche ein Membranpotential positiver als -60 mV, einen Membranwiderstand größer als 10 MΩ und einen Serienwiderstand größer als 20 MΩ aufwiesen, wurden aus den Analysen ausgeschlossen. Offsetpotentiale wurden nach Eintauchen der Pipette in die Badlösung und kurz vor der Sealbildung korrigiert. Nach 20-minütiger Füllung der Zelle mit Biozytin- und TRD-haltiger Lösung wurde der Hirnschnitt über Nacht in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und danach in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) bis zur Färbung gelagert.

Visualisierung der Kopplungswolke

Zur Visualisierung des Biozytins und zur weiteren Charakterisierung der Zellen wurden die Hirnschnitte zunächst in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie, zur Verbesserung der Permeabilität der Zellen, mit einem nicht-ionischen Tensid (Triton X-100) inkubiert. Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden mit normalem Ziegenserum (normal goat serum, NGS) blockiert. Primäre Antikörper mit einem fluoreszierenden Marker (Alexa Fluor™ Farbstoff), der an das Biotin-bindende Protein Streptavidin gekoppelt ist, wurden zur Darstellung des Biozytin genutzt. Die Inkubation erfolgte mit Alexa Fluor 647 Streptavidin-Konjugat, Alexa Fluor 488 Streptavidin-Konjugat oder Streptavidin-Cy3 Konjugat. In Schnitten von Cx30kiLacZ Mäusen wurde Kaninchen-anti-beta-Galactosidase und Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 oder Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor 647 zur Charakterisierung von Astrozyten verwendet.

Schnitte von hGFAPcre x Cx43 fl/fl und Cx32 KO Mäusen wurden mit den Antikörpern Maus-anti-adenomatöse Polyposis coli (anti-APC, CC1) und Ziege-anti-Maus Alexa Fluor 488 oder Ziege-anti-Maus Alexa Fluor 647 inkubiert, um Oligodendrozyten zu identifizieren. Zur Darstellung des in Oligodendrozyten exprimierten EGFP in Cx47kiEGFP Mäusen, wurden die Schnitte mit Huhn-anti-GFP und Ziege-anti-Huhn Alexa Fluor 488 inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht.

Immunhistochemie

Zur Charakterisierung der Zellzusammensetzung der Kopplungsnetzwerke musste ein geeigneter Marker zum Anfärben von Astrozyten oder Oligodendrozyten gefunden werden. Ein zuverlässiger Marker für Astrozyten und Oligodendrozyten im Thalamus war nicht bekannt (Griemsmann et al., 2015). Mir gelang es jedoch, für diese Region einen Marker für das Anfärben von Oligodendrozyten zu finden. Hierfür wurden 40 µm dicke PFA fixierte Gehirnschnitte von PLP-GFP und NG2kiYFP Mäusen mit unterschiedlichen Markern gefärbt (Baum et al., 2024). Nach Inkubation mit NGS und Triton X-100 wurden Huhn-anti-GFP, Maus-anti-Glutathion S-Transferase Pi (GSTpi) (1:500) und Maus-anti-APC (CC1) in unterschiedlichen Konzentrationen (1:300 und 1:500) verwendet. Als Zweit-Antikörper wurden Ziege-anti-Huhn Alexa Fluor 488 und 1:500 Ziege-anti-Maus Alexa Fluor 647 gewählt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt.

Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkriptase (RT-qPCR)

C57BL6/J, Cx30kiLacZ, Cx32 KO, Cx47kiEGFP und hGFAPcre x Cx43 fl/fl Mäuse (p14 – p17) wurden anästhesiert und dekapitiert. Das Gehirn wurde entnommen und 200 µm dicke Gehirnschnitte wurden wie beschrieben angefertigt (Baum et al., 2024). Das Gewebe des VPM wurde ausgeschnitten und für die Boten-Ribonukleinsäure-Isolation verwendet. Als Referenzgen diente β -Aktin. Die Zahl der PCR-Zyklen zum Erreichen der Fluoreszenz-Schwellenwerte der Zielgene wurde mit der von β -Aktin verglichen. Hieraus wurde die relative Genexpression berechnet. Die jeweilige Expression wurde ins Verhältnis zu der der Kontrollgruppe (C57BL6/J) gesetzt.

Datenanalyse und statistische Auswertung

Zur weiteren Analyse der gefärbten Gehirnschnitte habe ich von diesen mit einem Konfokalmikroskop Bilder aufgenommen. Das Biozytin-Kopplungsnetzwerk habe ich durch Zählen aller Biozytin-positiven Zellen in den Ebenen entlang der z-Achse quantifiziert. Durch Bestimmung der Kolo-kalisation mit entsprechenden zelltypischen Markern für Astrozyten oder Oligodendrozyten wurde zudem die Zellzusammensetzung bestimmt. Hierfür wurde die Anzahl der Astrozyten oder Oligodendrozyten ins Verhältnis zur Anzahl der Biozytin-positiven Zellen gesetzt. Zur Identifizierung eines geeigneten zelltypspezifischen Markers im Thalamus habe ich zunächst die gesamte Anzahl der Zellen (PLP-GFP-positiv oder NG2-YFP-positiv) in der aufgenommenen thalamischen Region gezählt. Nachfolgend bestimmte ich die Kolo-kalisation mit dem jeweils zu testenden Marker (CC1 oder GSTpi).

Zur statistischen Auswertung habe ich das Programm R (R Core Team (2020), R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich, Version 4.0.2) genutzt. Der Levene-Test wurde zur Überprüfung der Gleichheit der Varianzen gewählt. Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Anschließend wurde der Zweistichproben-t-Test durchgeführt. Bei mangelnder Varianzhomogenität wurde dieser mit Welch-Korrektur angewandt. Bei nicht normalverteilten Daten habe ich diese entweder mittels Tukeys-Potenzleiter transformiert oder den nicht parametrischen Wilcoxon-Rangsummentest gewählt (Tukey, 1977). Mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse habe ich Interaktionseffekte der Variablen überprüft. Extreme Ausreißer (mehr als das 3-fache des Interquartilsabstandes vom ersten oder dritten Quartil) wurden aus dem Datensatz entfernt. Interaktionseffekte einzelner Variablen wurden mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse ausgeschlossen (analysis of variance, ANOVA). Die hier genannten Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung oder als Median und 25 % Quartil und 75 % Quartil angegeben.

1.4 Ergebnisse

Das erste Ziel war die Identifizierung der Connexin Isoformen, welche die aktivitätsabhängige Modulation der Kopplung im Thalamus vermitteln. Im zentralen Nervensystem

(ZNS) spielen Astrozyten durch extrazelluläre Ionen- und Neurotransmitter-Homöostase, neurometabolische Kopplung und Freisetzung von Neurotransmittern eine aktive Rolle bei der neuronalen Informationsverarbeitung (Butt et al., 2014; Gundersen et al., 2015; Nagelhus et al., 2004; Pannasch et al., 2011; Philippot et al., 2021; Rose et al., 2018; Rouach et al., 2008; Verkhratsky und Nedergaard, 2018). Dabei üben gliale gap junction Netzwerke einen wichtigen Einfluss auf die Detektion synaptischer Aktivität und die aktivitätsabhängige Rückkopplung aus. Im Thalamus wurde ein ausgedehntes pangliales Netzwerk aus Astrozyten und Oligodendrozyten beobachtet, wobei Cx30 das vorherrschende astrozytäre Connexin ist (Griemsmann et al., 2015). In olfaktorischen Glomeruli konnte gezeigt werden, dass Cx30 die aktivitätsabhängige Kopplung vermittelt (Roux et al., 2011). Daher wurden erste Experimente mit Cx30kiLacZ Mäusen durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten C57BL6/J Mäuse. Die Gehirnschnitte von 14 bis 17 Tagen alten Mäusen wurden entweder mit aCSF oder für neuronale Deprivation mit TTX (0,5 mM) und CTX (0,5 mM) für 3 – 4 h inkubiert. Anschließend wurde ein SR101 positiver Astrozyt innerhalb eines Barreloid Feldes identifiziert und durch die Patchpipette mit Intrazellulärlösung versetzt mit Biozytin (0,5 %) und TRD (0,1 %) für 20 min gefüllt. In Cx30kiLacZ Mäusen war der Median von Biozytin-positiven Zellen unter aCSF Kontrollbedingungen 37,0 (24,0 – 48,0) (17 Schnitte (n), 13 Mäuse (N)), während die Kopplung nach Inhibition von neuronaler Aktivität signifikant auf 1,0 ((1,0 – 5,1), n = 18, N = 12, p = 0,0003, Wilcoxon-Rangsummentest) reduziert war (Baum et al., 2024, Fig. 1B, Tbl. 2). Einige Zellen, insbesondere in der deprivierten Gruppe, zeigten keine Kopplung (n = 9, N = 7) (Baum et al., 2024, Fig. 1D2). Die Kontrollgruppe C57BL6/J zeigte eine signifikante Reduktion der Kopplung nach neuronaler Deprivation (aCSF 79,8 (68,0 – 134,5), n = 22, N = 13; TTX/CTX 56,5 (45,5 – 76,8), n = 15, N = 11, p = 0,008 Zweistichproben-t-Test auf logarithmisch transformierte Daten) (Baum et al., 2024, Fig. 1B, Tbl. 2). Cx30kiLacZ Tiere zeigten unter aCSF Kontrollbedingungen eine signifikante Reduktion der Kopplungseffizienz im Vergleich zu C57BL6/J Tieren unter aCSF Kontrollbedingungen (p = 8,348e-05, Zweistichproben-t-Test auf logarithmisch transformierte Daten), da Cx30 als dominante Connexin Isoform in thalamischen Astrozyten exprimiert ist (Griemsmann et al., 2015).

Heterotypische gap junction Kanäle aus dem astrozytären Cx30 mit dem oligodendrozytären Cx32 überwiegen in der pangliale Kopplung im Thalamus (Griemsmann et al., 2015). Da sich die Vermutung bezüglich der Sensitivität von Cx30 gegenüber neuronaler Aktivität nicht bestätigte, konzentrierten sich weitere Experimente auf Mäuse mit Cx32 Knockout. In Cx32 KO Mäusen war die Biozytin-Kopplungseffizienz durch den Einfluss von TTX und CTX nicht betroffen (aCSF 128,3 (94,1 – 157,3), n = 21, N = 14; TTX/CTX 122,3 (77,3 – 168,4), n = 16, N = 14, p = 0,479 Zweistichproben-t-Test) (Baum et al., 2024, Fig. 1B, Tbl. 2). Weitere Untersuchungen an Cx47kiEGFP Mäusen zeigten, dass in Anwesenheit von TTX und CTX die Ausbreitung des Biozytins nicht vermindert war (aCSF 142,5 (108,9 – 166,5), n = 12, N = 7; TTX/CTX 106,4 (54,1 – 130,7), n = 13, N = 8, p = 0,125 Zweistichproben-t-Test) (Baum et al., 2024, Fig. 1B, Tbl. 2). In Experimenten mit hGFAPcre x Cx43 fl/fl Mäusen war die Zahl der Biozytin-positiven Zellen unter neuronaler Deprivation signifikant reduziert (aCSF 114,5 (88,1 – 121,3), n = 11, N = 7; TTX/CTX 62,0 (43,1 – 82,8), n = 13, N = 7, p = 0,003 Zweistichproben-t-Test) (Baum et al., 2024, Fig. 1B, Tbl. 2). Die Daten zeigten, dass nach Verlust der Connexin Isoformen Cx32 und Cx47 die aktivitätsabhängige Reduktion der panglialen Kopplung in den Barreloiden verloren ging.

Es stellte sich die Frage, ob sich der Anteil von Astrozyten und Oligodendrozyten im Biozytin-Netzwerk unter neuronaler Deprivation verändert. Hierfür war es notwendig, einen Marker zu finden, der eine klare Unterscheidung der Zelltypen im Thalamus erlaubte. Übliche Marker für immunhistochemische Färbungen von Astrozyten und Oligodendrozyten sind aufgrund überlappender Antigenprofile nicht zuverlässig (Griemsmann et al., 2015). GSTpi und CC1 sind Marker für Oligodendrozyten, welche zunächst getestet wurden (Bin et al., 2016; Brakeman et al., 1999; Tansey und Cammer, 1991). Erste immunhistochemische Färbungen mit GSTpi in PLP-GFP Mäusen zeigten im juvenilen Thalamus eine sehr unspezifische Färbung mit schlechtem Signal und sehr geringer Kolokalisation.

CC1 wurde als nächster Marker für Oligodendrozyten angewendet und in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (1:300, 1:500) für immunhistochemische Färbungen im VPM ausgewertet. In Gehirnschnitten von PLP-GFP Mäusen (p15), die mit einer CC1 Konzentration von 1:300 gefärbt wurden, waren über 90 % (92,31 % $\pm$ 3,20 %, n = 4,

N = 2) der CC1 positiven Zellen mit PLP-GFP kolokalisiert. Nicht PLP-GFP positiv waren $7,69 \% \pm 3,20 \%$ ($n = 4$, $N = 2$) der CC1 positiven Zellen. Die Konzentration von CC1 im Färbungsprotokoll wurde auf 1:500 angepasst. Hierdurch wurden unspezifische Antikörperbindungen und Hintergrundfärbung reduziert, bei ebenso gutem Ergebnis für die visuelle Auswertung. Es zeigte sich, dass in 15 und 16 Tagen alten PLP-GFP Mäusen 90 % ($90,09 \% \pm 2,60 \%$, $n = 13$, $N = 4$) der CC1 positiven Zellen auch PLP-GFP exprimierten (Baum et al., 2024, Fig. 2A1 – 2A5). 10 % ($9,91 \% \pm 2,60 \%$) der CC1 positiven Zellen zeigten keine Kolokalisation mit PLP-GFP (Baum et al., 2024, Fig. 2A1 – 2A5). Alle PLP-GFP positiven Zellen waren CC1 positiv (Baum et al., 2024, Fig. 2A5). Zellen, welche nur CC1 positiv waren, zeigten eine etwas andere Morphologie, was zu der Frage führte, ob auch NG2 Gliazellen hierdurch angefärbt werden.

Färbungen in NG2kiYFP Mäusen (p15) zeigten, dass 25 % ($25,32 \% \pm 5,28 \%$, $n = 7$, $N = 3$) der CC1 positiven Zellen NG2-YFP positiv waren und $74,68 \% \pm 5,28 \%$ der CC1 positiven Zellen keine Kolokalisation mit NG2-YFP aufwiesen (Baum et al., 2024, Fig. 2B1 – 2B5). Von NG2-YFP positiven Zellen waren 34 % ($34,60 \% \pm 1,12 \%$) mit CC1 kolokalisiert und 65 % ($65,40 \% \pm 1,12 \%$) nicht (Baum et al., 2024, Fig. 2B1 – 2B5). NG2 Gliazellen sind nicht Teil der panglialen Kopplungsnetzwerke im Thalamus (Griemsmann et al., 2015). Es wurde somit gezeigt, dass CC1 zur Identifizierung von Oligodendrozyten im Thalamus geeignet ist.

Mit dem Marker CC1 wurde untersucht, ob sich der Anteil der Astrozyten und Oligodendrozyten in den Biozytin-Kopplungsnetzwerken unter neuronaler Deprivation und in den Connexin deletierten Gruppen verändert. In C57BL6/J Mäusen waren unter Kontrollbedingungen 55 % ($55,0 \% (50,2 - 58,2 \%)$, $n = 11$, $N = 6$) der Biozytin-positiven Zellen CC1 positive Oligodendrozyten, wobei sich der Anteil nicht von der deprivierten Gruppe unterschied (TTX/CTX $48,3 \% (18,3 - 49,2 \%)$, $n = 8$, $N = 5$, $p = 0,18$ Zweistichproben-t-Test) (Baum et al., 2024, Tbl. 3, Fig. 3A). In Cx30kiLacZ Mäusen wurde über eine β Gal-Färbung der Anteil der Astrozyten im Biozytin-Netzwerk bestimmt, der sich in den beiden Gruppen auch nicht unterschied (aCSF $34,4 \% (24,4 - 35,2 \%)$, $n = 6$, $N = 5$; TTX/CTX $42,9 \% (32,5 - 49,1 \%)$, $n = 3$, $N = 3$, $p = 0,40$ Zweistichproben-t-Test) (Baum et al., 2024, Tbl. 3, Fig. 3B). In hGFAPcre x Cx43 fl/fl Mäusen war keine Änderung der Zelltypzusammensetzung der gap junction Kopplungsnetzwerke nach Deprivation

axonaler Aktivitäten und präsynaptischer Transmitterausschüttung durch TTX und CTX festzustellen (aCSF 33,0 % (24,8 – 37,2 %) CC1 positive Zellen, $n = 11$, $N = 7$; TTX/CTX 34,9 % (21,4 – 41,1 %) CC1 positive Zellen, $n = 13$, $N = 7$, $p = 0,81$ Zweistichproben-t-Test) (Baum et al., 2024, Tbl. 3, Fig. 3C). Im Gegensatz dazu waren in Cx32 KO Mäusen unter Kontrollbedingungen wenige CC1 positive Oligodendrozyten am Biozytin-Netzwerk beteiligt (aCSF 4,6 % (3,3 – 6,8 %), $n = 9$, $N = 6$) und es kam durch Inkubation mit TTX und CTX zu einer Zunahme der CC1 positiven Oligodendrozyten auf 16,3 % (TTX/CTX 16,3 % (15,4 – 26,2 %), $n = 6$, $N = 5$, $p = 0,008$ Zweistichproben-t-Test) (Baum et al., 2024, Tbl. 3, Fig. 3D). In Cx47kiEGFP zeigte sich ein Biozytin-Zellnetzwerk, welches aus 40,6 % EGFP positiven Oligodendrozyten in der aCSF-Gruppe bestand (aCSF 40,6 % (37,7 – 44,9 %), $n = 10$, $N = 6$) (Baum et al., 2024, Tbl. 3, Fig. 3E). Unter neuronale Deprivation mit TTX und CTX kam es zu einer Zunahme des Anteils EGFP positiver Oligodendrozyten auf 57,1 % (TTX 57,1 % (44,7 – 60,2 %), $n = 8$, $N = 7$, $p = 0,04$ Zweistichproben-t-Test) (Baum et al., 2024, Tbl. 3, Fig. 3E). Der geringe Anteil von gekoppelten Oligodendrozyten unter Kontrollbedingungen in Cx32 KO Mäusen zeigte, dass Cx32 das dominante oligodendrozytäre Connexin im Thalamus ist. Neuronale Deprivation veränderte nicht die Zusammensetzung des panglialen Kopplungsnetzwerkes in Kontrollmäusen oder Astrozyten-spezifischen Connexin knockout Mäusen. In TTX/CTX-haltiger Lösung gab es eine Zunahme des Anteils gekoppelter Oligodendrozyten in Cx32 KO und Cx47kiEGFP Mäusen.

Es stellte sich dann die Frage, ob die Regulation der Connexin Expression ein Grund für die Änderung der Zelltypzusammensetzung des Biozytin-Netzwerkes in den Connexin knockout Mäusen war. In entsprechenden Mauslinien (C57BL6/J, Cx30kiLacZ, hGFAPcre x Cx43 fl/fl, Cx32 KO, Cx43kiEGFP) wurde im Alter von p14 bis p17 die Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid, mRNA) Expression der Connexin Isoformen im VPM analysiert. Cx30 mRNA war in Mäusen mit Fehlen des oligodendrozytären Connexins Cx32 um das 1,7-fache ($p = 0,002085$ Wilcoxon-Rangsummentest) und beim Fehlen von Cx47 um das 2,6-fache ($p = 0,0008823$ Welch-Test) hochreguliert (Baum et al., 2024, Fig. S2A). In hGFAPcre x Cx43 fl/fl Mäusen war das Cx30 Transkriptlevel herunterreguliert (Baum et al., 2024, Fig. S2A). Beim Fehlen von Cx47 zeigte sich ebenfalls eine Hochregulation von Cx32 um den Faktor 1,6 ($p = 0,003541$

Zweistichproben-t-Test auf logarithmisch transformierte Daten) (Baum et al., 2024, Fig. S2B). Cx43 und Cx47 waren in den knockout Mäusen von keiner Regulation betroffen.

Sensorische Deprivation in vivo

In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass die Kopplungseffizienz in thalamischen Barreloiden von neuronaler Aktivität abhängig ist (Claus et al., 2018). Die bisherigen Untersuchungen erfolgten *in situ*. Ein zentrales Ziel meiner Arbeit war es, die Interaktion von gap junction gekoppelten panglialen Netzwerken mit neuronaler Aktivität erstmals *in vivo* genauer zu untersuchen. Es stellte sich die Frage, ob eine Deprivation neuronaler Aktivität *in vivo* zu einer Modulation der panglialen Kopplung im Thalamus führt. Zur Reduktion des sensorischen Inputs in die thalamischen Barreloide diente die einseitige Tastaarkürzung (Trimming) bei jungen Mäusen.

Für die Experimente mit Tastaarkürzung mussten einige Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen musste das Trimmingprotokoll zu dem Alter der Mäuse passen, in dem Barreloide im VPM des Thalamus sichtbar und ausgebildet sind. Dies war in dem gewählten Zeitraum von p13 bis p17 der Fall. Mit fortschreitendem Alter nimmt die Myelinisierung in dieser Region stark zu, wodurch die Strukturen an dem Setup mit Hellfeldmikroskopie schlechter sichtbar sind (Bjelke und Seiger, 1989; Downes und Mullins, 2014). Die kritische Periode der Strukturierung der Tastaarverschaltung im ZNS endet mit p3 (Durham und Woolsey, 1984; Erzurumlu und Gaspar, 2012). Zum anderen sollte eine aktive Nutzung der Tastaare und das Explorieren der Umgebung in den Mäusen bereits entwickelt sein. Dies geht normalerweise dem Zeitpunkt der Augenöffnung voraus (Landers und Zeigler, 2006). Bei C57BL6/J Mäusen wird die Augenöffnung zwischen p12 und p13 beobachtet (Roubertoux et al., 1985). Aktives Explorieren mit den Tastaaren beginnt zwischen p10 und p11, wobei Objekterkennung um p13 beobachtet wird (Arakawa und Erzurumlu, 2015).

Von mir wurde ein Trimming-Protokoll ausgearbeitet, welches die Beantwortung der Fragestellung unter den genannten experimentellen Randbedingungen erlaubte. Durch einseitiges Trimmen der Tastaare, wurde die sensorisch deprivierte Seite im kontralateralen Thalamus repräsentiert (contralateral, contra) und die ungetrimmte Seite diente als Kontrolle (ipsilateral, ipsi) (Baume et al., 2024, Fig. 4A) (Killackey und Fleming, 1985;

Simons und Carvell, 1989). Zunächst wurden Mäuse im Alter von p13 getrimmt und einen Tag nach dem Trimmen wurden die Kopplungsanalysen durchgeführt. Diese Gruppe zeigte keine Veränderung des Biozytin-Kopplungsnetzwerkes (ipsi $204,2 \pm 34,0$, $n = 6$, $N = 5$; contra $172,4 \pm 34,1$, $n = 6$, $N = 5$, $p = 0,18$ Zweistichproben-t-Test). Um zu überprüfen, ob der Entwicklungsstand der Mäuse zum Zeitpunkt des Trimmens Einfluss auf die Kopplungseffizienz hatte, wurden Mäuse im Alter von p15 und p16 getrimmt und die Kopplung wurde einen Tag danach analysiert (ipsi $161,9 \pm 44,7$, $n = 7$, $N = 5$; contra $173,6 \pm 74,6$, $n = 6$, $N = 5$; $p = 0,7722$ Zweistichproben-t-Test). Auch unter diesen Bedingungen zeigte sich kein Effekt des Trimmens auf die Größe des Biozytin-Netzwerkes. Zusammengenommen zeigten die Daten der Gruppe einen Tag nach Trimmen (1dpt, 1-day-post-trimming) keinen Unterschied zwischen der getrimmten Seite und der Kontrollseite (1dpt: ipsi $183,1 \pm 43,6$, $n = 13$, $N = 10$; contra $173,0 \pm 54,7$, $n = 12$, $N = 10$, $p = 0,65$ Zweistichproben-t-Test) (Baum et al., 2024, Fig. S3).

Da in der Literatur zumeist Daten zu Studien vorliegen, die die Veränderung von neuronalen Verschaltungen nach wenigen Tagen zeigen, konzentrierten sich nachfolgende Experimente auf zwei Tage nach Trimmen (2dpt) (Glazewski et al., 1998; Oberlaender et al., 2012; Wallace et al., 2001; Wimmer et al., 2010). Auch in dieser Gruppe war die Anzahl der Biozytin-positiven Zellen zwischen ipsilateralem und contralateralem Thalamus unverändert (2dpt: ipsi $172,8 \pm 45,8$, $n = 9$, $N = 7$; contra $159,6 \pm 28,3$, $n = 12$, $N = 7$; $p = 0,53$ Zweistichproben-t-Test) (Baum et al., 2024, Fig. S3).

Da die genannten Zeitpunkte keine Veränderung der Biozytin-Netzwerke zeigten, verkürzte ich die Zeitspanne zwischen Trimmen und Analyse und näherte sie dem Zeitraum der in situ Experimente mit TTX und CTX an. Kopplungsanalysen 13 – 23 h nach Trimmen zeigten keinen Einfluss auf die Biozytin-Kopplung (ipsi $161,4 \pm 46,7$, $n = 11$, $N = 4$; contra $118,1 \pm 15,9$, $n = 9$, $N = 4$; $p = 0,13$ Zweistichproben-t-Test) (Baum et al., 2024, Fig. S3). Eine weitere Verkürzung des Zeitraumes auf 7 – 11 h nach Trimmen zeigte ebenfalls keinen Unterschied (ipsi $178,8 \pm 18,3$, $n = 3$, $N = 2$; contra $164,5 \pm 48,9$, $n = 4$, $N = 2$, $p = 0,66$ Zweistichproben-t-Test). Kopplungsanalysen 3 – 6 h nach Trimmen zeigten jedoch einen signifikanten Rückgang der Biozytin-Kopplungseffizienz zwischen der nicht getrimmten Seite (ipsi $157,0 \pm 42,6$, $n = 12$, $N = 7$) und der getrimmten Seite (contra $103,9 \pm 28,9$, $n = 12$, $N = 7$, $p = 0,018$ Zweistichproben-t-Test) (Baum et al., 2024, Fig. 4B).

und 4C). Schein-getrimmte Mäuse zeigten diese Veränderung in der Anzahl der Biozytin-positiven Zellen 3 – 6 h nach Trimmen nicht (ipsi $114,8 \pm 25,6$, $n = 10$, $N = 6$; contra $106,0 \pm 40,0$, $n = 9$, $N = 6$, $p = 0,66$ Zweistichproben-t-Test) (Baum et al., 2024). Ein Einfluss auf den Haupteffekt der Biozytin-Netzwerkgröße durch die Seite des Trimmens (linkes vs. rechtes Tasthaarkissen) wurde ausgeschlossen (ANOVA). Ebenfalls ausgeschlossen wurde ein Interaktionseffekt durch die Tageszeit, als unabhängige Variable (ANOVA).

Wie in vorangegangenen Experimenten wurde auch die Zellzusammensetzung des Biozytin-Kopplungsnetzwerkes analysiert. Die CC1 Färbung diente zur Identifikation von Oligodendrozyten im Thalamus. In der Gruppe 3 – 6 h nach Trimmen veränderte sich der Anteil der CC1 positiven Zellen im Netzwerk durch das Trimmen nicht (ipsi $33,1 \% \pm 5,0 \%$, $n = 11$, $N = 7$; contra $32,7 \% \pm 11,6 \%$, $n = 12$, $N = 7$, $p = 0,92$ Welch-Test) (Baum et al., 2024, Fig. 4B2 – 4B6 und 4D). Gleiches galt für die Schein-getrimmte Gruppe (ipsi $29,4 \% \pm 7,3 \%$, $n = 10$, $N = 6$; contra $25,7 \% \pm 10,7 \%$, $n = 9$, $N = 6$, $p = 0,49$ Zweistichproben-t-Test) (Baum et al., 2024). Der Anteil an CC1 positiven Zellen in der Gruppe 13 – 23 h nach Trimmen unterschied sich zwischen ipsilateral und contralateral nicht (ipsi $29,9 \% \pm 6,4 \%$, $n = 5$, $N = 11$; contra $28,5 \% \pm 7,6 \%$, $n = 5$, $N = 10$, $p = 0,76$ Zweistichproben-t-Test).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Kopplungseffizienz der panglialen Netzwerke im Thalamus nicht nur in situ, sondern auch in vivo abhängig ist von neuronaler Aktivität.

1.5 Diskussion

Diese Arbeit diente dem Ziel eines besseren Verständnisses des Zusammenhangs zwischen panglialer Kopplung und neuronaler Aktivität im Thalamus. Bisherige Studien konnten zeigen, dass sich der Thalamus in den Aufgaben und Eigenschaften der Gliazellen von anderen Hirnregionen unterscheidet und dass pangliale gap junction Netzwerke in situ in ihrer Kopplungseffizienz von neuronaler Aktivität abhängig sind (Claus et al., 2018; Griemsmann et al., 2015). In den olfaktorischen Glomeruli wird diese Aktivitäts-

abhängigkeit über Cx30 vermittelt (Roux et al., 2011). Griemsmann et al. (2015) haben gezeigt, dass im Thalamus Cx30 die vorherrschende astrozytäre Connexin Isoform ist. Dies konnte durch die hier gezeigte reduzierte Kopplung in Cx30^{kiLacZ} Mäusen bestätigt werden. Jedoch musste die daraus resultierende erste Hypothese dieses Forschungsprojektes, dass im Thalamus Cx30 sensitiv für neuronale Aktivität ist, verworfen werden. Im Gegenteil zeigten meine Ergebnisse, dass Mäuse mit Deletion der oligodendrozytären Connexin Isoformen Cx32 und Cx47 die aktivitätsabhängige pangliale Kopplung in den Barreloiden verloren. Dies betont die wichtige Rolle von Oligodendrozyten im Thalamus. Sie begrenzen nicht nur die Kopplung auf die Barreloide, wie Claus et al. (2018) gezeigt haben, sondern stehen hinsichtlich ihrer Ausbildung funktioneller gap junctions auch unter dem Einfluss neuronaler Aktivität. Kürzlich konnte auch im Thalamus gezeigt werden, dass Oligodendrozyten eine wesentliche Rolle beim Metabolitentransfer haben und zur Aufrechterhaltung von neuronaler Aktivität beitragen (Philippot et al., 2021). Des Weiteren wird die pangliale Kopplung hauptsächlich durch Cx30:Cx32 Kanäle vermittelt. Daten von Cx32^{-/-};Cx47EGFP(+/-) Mäusen haben gezeigt, dass der Anteil der Oligodendrozyten im Netzwerk auf 27 % reduziert ist (Philippot et al., 2021). Der sehr geringe Anteil an Oligodendrozyten im Biozytin-Netzwerk bei Cx32 KO Mäusen in meinen Versuchsergebnissen zeigt, dass Cx32 die dominante oligodendrozytäre Connexin Isoform im Thalamus ist. Bei der Zellkopplung im thalamischen Glianetzwerk spielen Cx47 und Cx43, die jeweils in Oligodendrozyten und Astrozyten exprimiert sind, dagegen eine geringere Rolle.

Obwohl die Kopplungseffizienz unter neuronaler Deprivation in C57BL6/J, Cx30^{kiLacZ} und hGFAP^{cre} x Cx43^{fl/fl} Mäusen reduziert war, blieb der Anteil von Astrozyten und Oligodendrozyten im Netzwerk unverändert. Dies impliziert eine Regulation der Zelltypzusammensetzung des Netzwerks. In Cx32 KO und Cx47^{kiEGFP} Mäusen nahm unter neuronaler Deprivation der Anteil von Oligodendrozyten im Netzwerk zu. Da das Biozytin-Netzwerk sich in seiner Größe nicht veränderte, müssen Oligodendrozyten Vorrang beim Koppeln haben und Astrozyten entkoppeln. Es scheint naheliegend, dass in Cx32 KO Mäusen die Oligodendrozyten über Cx47 und in Cx47^{kiEGFP} Mäusen über Cx32 koppeln. Die Änderung der Zelltypzusammensetzung des Netzwerks kann durch eine Reduzierung von heterotypischer Kopplung erreicht werden, wenn bei panglialer

Kopplung vorwiegend heterotype gap junction Kanäle eine Rolle spielen und die aktivitätsabhängige Kopplung über Cx32 und Cx47 vermittelt wird. Andere Studien konnten in Cx32 KO Mäusen kein Cx30 an den Somata von Oligodendrozyten nachweisen (Altevogt und Paul, 2004; Nagy et al., 2003). In Cx47 KO Mäusen waren Cx30, Cx43 und Cx32 nicht an den Oligodendrozyten Somata zu finden, jedoch Cx32 stark an myelinisierten Fortsätzen (Li et al., 2008). Es ist möglich, dass kompensatorische Veränderungen in Connexin-KO Tieren zu bestimmten bevorzugten Veränderungen der Zusammensetzung von gap junction Kanälen führen. Auch kann es zu einer Verschiebung der verfügbaren Connexin Isoformen kommen, da das Proteinlevel von Cx30 und Cx43 mit zunehmendem Alter im Thalamus ansteigt (Griemsmann et al., 2015). Die in Cx30^{kiLacZ} Mäusen, insbesondere in der TTX/CTX Gruppe, beobachteten ungekoppelten Zellen können aus der von Griemsmann et al. (2015) beschriebenen geringen Expression von Cx43 in thalamischen Astrozyten resultieren. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Cx43:47 Kanäle die Kopplung nicht aufrechterhalten können.

Die zweite zentrale Fragestellung meines Projektes war, ob eine Reduktion des sensorischen Inputs durch Tasthaarkürzung zu einer Veränderung glialer Kopplung in thalamischen Barreloiden in vivo führt. Der Whisker-Barrel-Pfad in Mäusen oder Ratten ist ein gängiges Modell zur Untersuchung von Plastizität und Kommunikationsnetzwerken. Die einzelnen Tasthaare (Vibrissen) des Tasthaarkissens der Schnauze sind in den nachgeschalteten Strukturen des ZNS somatotopisch repräsentiert. Dies zeigt sich in getrennten Clustern von Neuronen als Barrelettes im nucleus principalis nervi trigemini, als Barreloide im VPM des Thalamus und als Barrels im somatosensorischen Cortex (Ma und Woolsey, 1984; Senft und Woolsey, 1991; Van der Loos, 1976). Dem Ganglion trigeminale ist der nucleus principalis nervi trigemini nachgeschaltet. Dieser projiziert in den contralateralen VPM und der contralaterale VPM weiter in den primären somatosensorischen Cortex (Erzurumlu und Gaspar, 2012). Neurone im VPM reagieren mit Aktionspotentialen auf eine Auslenkung der contralateralen Tasthaare (Petersen, 2007; Simons und Carvell, 1989).

Meine Ergebnisse haben gezeigt, dass die Unterdrückung neuronaler Aktivität in vivo zu einer Modulation panglialer Kopplung im VPM des Thalamus führt. Frühere Deprivationsstudien im VPM zeigten oftmals keine Plastizität (Erzurumlu und Gaspar, 2012; Fox und Wallace, 1999; Glazewski et al., 1998; Wallace et al., 2001). Andere Daten zeigten

hingegen, dass neuronale Deprivation die Länge von thalamocorticalen Axonen beeinflusst und sensorische Deprivation über thalamocorticalen Input Einfluss auf die Proliferation von NG2-Gliazellen hat (Mangin et al., 2012; Oberlaender et al., 2012). Zudem wurde gezeigt, dass es kein kritisches Alter für die anatomische thalamocorticale Plastizität gibt (Wimmer et al., 2010). Viele der bisher durchgeführten Studien zu dem Thema wurden mit adulten Tieren durchgeführt und konzentrierten sich auf Langzeitplastizität. Junge Mäuse haben eine hohe Kompensationsfähigkeit für Deprivationseffekte, sodass sich auf corticaler Ebene keine Veränderungen zeigen (Watanabe et al. 2011). Im VPM sind mit p3 die Barreloide sichtbar ausgeprägt und auch das kritische Alter, in dem Läsionen der Tasthaarfollikel zu Veränderungen der Somatotopie führen, ist abgeschlossen (Durham und Woolsey, 1984; Erzurumlu und Gaspar, 2012). Nach p5 ist im primär somatosensorischen Cortex der Zeitraum für kritische strukturelle Veränderungen durch Follikelschäden beendet (Durham und Woolsey, 1984).

Die von mir vorgelegten Daten zeigen einen Effekt von kurzzeitiger Deprivation durch einseitiges Tasthaartrimmen auf das pangliale Kopplungsnetzwerk im VPM in juvenilen Mäusen. Der Effekt trat 3 – 6 h nach dem Trimmen auf und verschwand mit fortschreitenden Zeitintervallen. Dies legt Mechanismen in der Kommunikationskaskade nahe, die schnell eingefügt werden können und reversibel sind. Diese Regulationsmechanismen könnten als eine Überbrückung bis zu einsetzenden kompensatorischen Effekten dienen oder diese sogar initiieren. Für den Cortex konnte gezeigt werden, dass repetitive Tasthaarstimulation über 24 h in adulten Mäusen zu einer Zunahme von exzitatorischen und insbesondere inhibitorischen Synapsen an den Dornenfortsätzen von Dendriten im korrespondierenden corticalen Barrel führt (Knott et al., 2002). Dieses Stimulationsprotokoll führte auch zu einer Zunahme der Expression von Glutamat-Transportern in Astrozyten in den korrespondierenden Barrel-Feldern und zu einer verstärkten Einhüllung glutamaterger Synapsen im Cortex durch Gliazellen (Genoud et al., 2006). Diese Studien zeigen für den Whisker-Barrel-Schaltkreis eine Plastizität, an der gliale Zellen in der Glia-Neuron-Kommunikation beteiligt sind (Perea et al., 2009).

Für die Aufrechterhaltung von neuronaler Aktivität ist die Zufuhr von energiereichen Metaboliten von entscheidender Bedeutung (Meyer et al., 2018; Philippot et al., 2021; Rouach et al., 2008). Umgekehrt können Neurotransmitter, Zytokine und endogene

Substanzen die gap junction Kopplung modulieren (Giaume et al., 2010; Mème et al., 2004; Mème et al., 2006; Orellana et al., 2013; Retamal et al., 2007; Theis und Giaume, 2012). Oligodendrozyten haben über den Transport von energiereichen Metaboliten Einfluss auf die regelrechte Ausbildung und Aufrechterhaltung der Funktion von Axonen im Glia-Neuron-Kommunikationsnetzwerk (Fünfschilling et al., 2012; Lee et al., 2012; Philippot et al., 2021; Saab et al., 2016).

Der corticothalamische Input und der sensorische Input in den ventrobasalen Thalamus sind glutamaterg (Parri et al., 2010). In vorangegangenen Arbeiten konnten funktionale Glutamatrezeptoren in thalamischen Astrozyten nachgewiesen werden (Höft et al., 2014). Von Interesse für zukünftige Studien könnte der Einfluss von ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren auf die Kopplung und die Leitfähigkeit von gap junction Kanälen im Thalamus sein. Da die neuen Daten eine Sensitivität von oligodendrozytären Connexinen gegenüber neuronaler Aktivität zeigen, sollten weitere Studien nicht nur Astrozyten, sondern auch Oligodendrozyten auf ihre Sensitivität gegenüber dem Einfluss von Glutamatrezeptoren untersuchen.

1.6 Zusammenfassung

Im Thalamus bilden Astrozyten und Oligodendrozyten über gap junction Kopplung pangliale Netzwerke aus. Neuronale Deprivation durch Tetrodotoxin und ω -Conotoxin GVIA Applikation führt zu einer Reduktion panglialer Kopplungseffizienz in thalamischen Barreloiden in situ. Diese Arbeit ging der Frage nach, welche Connexine die aktivitätsabhängige Modulation der panglialen Kopplung vermitteln. Ich konnte zeigen, dass die oligodendrozytären Connexine Cx32 und Cx47 die aktivitätsabhängige Modulation der Kopplung im Thalamus vermitteln. In meinem Projekt untersuchte ich weiterhin, ob eine Reduktion des sensorischen Inputs in die thalamischen Barreloide zu einer Veränderung der panglialen Kopplung in vivo führt. Einseitige Tasthaarkürzung in juvenilen Mäusen zeigte, dass die Kopplungseffizienz der panglialen Netzwerke im Thalamus nicht nur in situ, sondern auch in vivo von neuronaler Aktivität abhängig ist. Die Reduktion der Kopplungseffizienz trat 3 bis 6 h nach Trimmen der Tasthaare der Mäuse auf und war zu späteren Zeitpunkten nicht mehr nachweisbar. Dies indiziert eine neue Form von

Plastizität des Thalamus als Reaktion auf Veränderungen im Informationstransfer von den Tastaaren bis zum primären somatosensorischen Cortex. Zusammenfassend legen meine Ergebnisse dar, dass neuronale Aktivität mit gap junction gekoppelten panglialen Netzwerken interagiert und beide Phänomene sich gegenseitig beeinflussen. Insbesondere vor dem Hintergrund der metabolischen Versorgung von Neuronen über pangliale Kopplung, weisen die Daten meiner Studie nach, dass Oligodendrozyten im Thalamus ein grundlegender Bestandteil im neuronalen Kommunikationsnetzwerk sind.

1.7 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Altevogt BM, Paul DL. Four Classes of Intercellular Channels between Glial Cells in the CNS. *J Neurosci* 2004; 24: 4313–4323

Arakawa H, Erzurumlu RS. Role of whiskers in sensorimotor development of C57BL/6 mice. *Behav Brain Res* 2015; 287: 146–155

Baum P, Beinhauer A, Zirwes L, Loenneker L, Jabs R, Narayanan RT, Oberlaender M, Seifert G, Kettenmann H, Steinhäuser C. Activity dependent modulation of glial gap junction coupling in the thalamus. *iScience* 2024; 27: 111043

Bedner P, Steinhäuser C, Theis M. Functional redundancy and compensation among members of gap junction protein families? *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2012; 1818: 1971–1984

Bin JM, Harris SN, Kennedy TE. The oligodendrocyte-specific antibody ‘ CC 1’ binds Quaking 7. *J Neurochem* 2016; 139: 181–186

Bjelke B, Seiger Å. Morphological distribution of MBP-like immunoreactivity in the brain during development. *Int J Dev Neurosci* 1989; 7: 145–164

Brakeman J, Gu S, Wang X, Dolin G, Baraban J. Neuronal localization of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein. *Neuroscience* 1999; 91: 661–672

Brecht M, Preilowski B, Merzenich MM. Functional architecture of the mystacial vibrissae. *Behav Brain Res* 1997; 84: 81–97

Butt AM, Fern RF, Matute C. Neurotransmitter signaling in white matter. *Glia* 2014; 62: 1762–1779

Claus L, Philippot C, Griemsmann S, Timmermann A, Jabs R, Henneberger C, Kettenmann H, Steinhäuser C. Barreloid Borders and Neuronal Activity Shape Panglial Gap Junction-Coupled Networks in the Mouse Thalamus. *Cereb Cortex* 2018; 28:213-222

Crick F, Koch C. A framework for consciousness. *Nat Neurosci* 2003; 6: 119–126

Downes N, Mullins P. The Development of Myelin in the Brain of the Juvenile Rat. *Toxicol Pathol* 2014; 42: 913–922

Durham D, Woolsey TA. Effects of neonatal whisker lesions on mouse central trigeminal pathways. *J Comp Neurol* 1984; 223: 424–447

Erzurumlu RS, Gaspar P. Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *Eur J Neurosci* 2012; 35: 1540–1553

Fox K, Wallace H. The effect of vibrissa deprivation pattern on the form of plasticity induced in rat barrel cortex. *Somatosens Mot Res* 1999; 16: 122–138

Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, ..., Nave K-A. 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

Genoud C, Quairiaux C, Steiner P, Hirling H, Welker E, Knott GW, Stevens C. Plasticity of Astrocytic Coverage and Glutamate Transporter Expression in Adult Mouse Cortex. *PLoS Biology* 2006; 4: e343

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

Glazewski S, McKenna M, Jacquin M, Fox K. Experience-dependent depression of vibrissae responses in adolescent rat barrel cortex: Plasticity in barrel cortex. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 2107–2116

Goldberg GS, Valiunas V, Brink PR. Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2004; 1662: 96–101

Griemsmann S, Höft SP, Bedner P, ..., Steinhäuser 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

Gundersen V, Storm-Mathisen J, Bergersen LH. Neuroglial Transmission. *Physiol Rev* 2015; 95: 695–726

Höft S, Griemsmann S, Seifert G, Steinhäuser 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

Karram K, Goebbels S, Schwab M, Jennissen K, Seifert G, Steinhäuser C, Nave K-A, Trotter J. NG2-expressing cells in the nervous system revealed by the NG2-EYFP-knockin mouse. *Genesis* 2008; 46: 743–757

Killackey HP, Fleming K. The role of the principal sensory nucleus in central trigeminal pattern formation. *Developmental Brain Research* 1985; 22: 141–145

Knott GW, Quairiaux C, Genoud C, Welker E. Formation of Dendritic Spines with GABAergic Synapses Induced by Whisker Stimulation in Adult Mice. *Neuron* 2002; 34: 265–273

Landers M, Philip Zeigler H. Development of rodent whisking: Trigeminal input and central pattern generation. *Somatosens Mot Res* 2006; 23: 1–10

Lee Y, Morrison BM, Li Y, ..., Rothstein JD. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 2012; 487: 443–448

Li X, Penes M, Odermatt B, Willecke K, Nagy JI. Ablation of Cx47 in transgenic mice leads to the loss of MUPP1, ZONAB and multiple connexins at oligodendrocyte–astrocyte gap junctions. *Eur J Neurosci* 2008; 28: 1503–1517

Long SY. Hair-nibbling and whisker-trimming as indicators of social hierarchy in mice. *Anim Behav* 1972; 20: 10–12

Ma PM, Woolsey TA. Cytoarchitectonic correlates of the vibrissae in the medullary trigeminal complex of the mouse. *Brain Res* 1984; 306: 374–379

Magnotti LM, Goodenough DA, Paul DL. Deletion of oligodendrocyte Cx32 and astrocyte Cx43 causes white matter vacuolation, astrocyte loss and early mortality. *Glia* 2011 b; 59: 1064–1074

Magnotti LM, Goodenough DA, Paul DL. Functional heterotypic interactions between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *Glia* 2011 a; 59: 26–34

Mangin J-M, Li P, Scafidi J, Gallo V. Experience-dependent regulation of NG2 progenitors in the developing barrel cortex. *Nat Neurosci* 2012; 15: 1192–1194

Même W, Calvo C-F, Froger N, Ezan P, Amigou E, Koulakoff A, Giaume C. Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by β -amyloid. *FASEB J* 2006; 20: 494–496

Même W, Ezan P, Venance L, Glowinski J, Giaume C. ATP-induced inhibition of gap junctional communication is enhanced by interleukin-1 β treatment in cultured astrocytes. *Neuroscience* 2004; 126: 95–104

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

Meyer N, Richter N, Fan Z, Siemonsmeier G, Pivneva T, Jordan P, Steinhäuser C, Semtner M, Nolte C, Kettenmann H. Oligodendrocytes in the Mouse Corpus Callosum Maintain Axonal Function by Delivery of Glucose. *Cell Rep* 2018; 22: 2383–2394

Nagelhus EA, Mathiisen TM, Ottersen OP. Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 2004; 129: 905–913

Nagy JI, Ionescu A-V, 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

Nelles E, Bützler C, Jung D, ..., Willecke K. Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9565–9570

Oberlaender M, Ramirez A, Bruno RM. Sensory Experience Restructures Thalamocortical Axons during Adulthood. *Neuron* 2012; 74: 648–655

Orellana JA, Martinez AD, Retamal MA. Gap junction channels and hemichannels in the CNS: Regulation by signaling molecules. *Neuropharmacology* 2013; 75: 567–582

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

Pannasch U, Rouach N. Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends Neurosci* 2013; 36: 405–417

Pannasch U, Vargová L, Reingruber J, Ezan P, Holcman D, Giaume C, Syková E, Rouach N. Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 8467–8472

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

Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 2009; 32: 421–431

Petersen CC. The Functional Organization of the Barrel Cortex. *Neuron* 2007; 56: 339–355

Philippot C, Griemsmann S, Jabs R, Seifert G, Kettenmann H, Steinhäuser C. Astrocytes and oligodendrocytes in the thalamus jointly maintain synaptic activity by supplying metabolites. *Cell Rep* 2021; 34: 108642

Retamal MA, Froger N, Palacios-Prado N, Ezan P, Sáez PJ, Sáez JC, Giaume C. Cx43 Hemichannels and Gap Junction Channels in Astrocytes Are Regulated Oppositely by Proinflammatory Cytokines Released from Activated Microglia. *J Neurosci* 2007; 27: 13781–13792

- Rose CR, Felix L, Zeug A, Dietrich D, Reiner A, Henneberger C. Astroglial Glutamate Signaling and Uptake in the Hippocampus. *Front Mol Neurosci* 2018; 10: 451
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission. *Science* 2008; 322: 1551–1555
- Roubertoux P, Semal C, Ragueneau S. Early development in mice: II. Sensory motor behavior and genetic analysis. *Physiol Behav* 1985; 35: 659–666
- Roux L, Benchenane K, Rothstein JD, Bonvento G, Giaume C. Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 18442–18446
- Saab AS, Tzvetavona ID, Trevisiol A, ..., Nave K-A. Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. *Neuron* 2016; 91: 119–132
- Sáez JC, Berthoud VM, Brañes MC, Martínez AD, Beyer EC. Plasma Membrane Channels Formed by Connexins: Their Regulation and Functions. *Physiol Rev* 2003; 83: 1359–1400
- Senft SL, Woolsey TA. Growth of Thalamic Afferents into Mouse Barrel Cortex. *Cereb Cortex* 1991; 1: 308–335
- Simons DJ, Carvell GE. Thalamocortical response transformation in the rat vibrissa/barrel system. *J Neurophysiol* 1989; 61: 311–330
- Steinhäuser C, Dietrich D. Neuron-Glia Synapsen im Gehirn: Eigenschaften, Diversität und Funktionen von NG2 Glia. *eNeuroforum* 2015; 21: 106–111
- Steinhäuser 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. *Pflügers Arch* 1994; 428: 610–620
- Steinhäuser C, Seifert G, Bedner P. Astrocyte dysfunction in temporal lobe epilepsy: K⁺ channels and gap junction coupling. *Glia* 2012; 60: 1192–1202
- Strozik E, Festing MFW. Whisker trimming in mice. *Lab Anim* 1981; 15: 309–312

Sugitani M, Yano J, Sugai T, Ooyama H. Somatotopic organization and columnar structure of vibrissae representation in the rat ventrobasal complex. *Exp Brain Res* 1990; 81: 346–352

Tansey FA, Cammer W. A Pi Form of Glutathione- S -Transferase Is a Myelin-and Oligodendrocyte-Associated Enzyme in Mouse Brain. *J Neurochem* 1991; 57: 95–102

Teubner B. Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 13–21

Theis M, Giaume C. Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res* 2012; 1487: 88–98

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

Tress O, Maglione M, May D, ..., Willecke K. Panglial Gap Junctional Communication is Essential for Maintenance of Myelin in the CNS. *J Neurosci* 2012; 32: 7499–7518

Tukey JW. *Exploratory data analysis*. Reading, Massachusetts – Menlo Park, California – London – Amsterdam – Don Mills, Ontario – Sydney: Addison-Wesley Publishing Company, 1977

Van Der Loos H. Barreloids in mouse somatosensory thalamus. *Neurosci Lett* 1976; 2: 1–6

Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev* 2018; 98: 239–389

Virchow R. *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*. Zwanzig Vorlesungen, gehalten während der Monate Februar, März und April 1858 im pathologischen Institut zu Berlin. Berlin: August Hirschwald, 1858

Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 626–640

Wallace H, Glazewski S, Liming K, Fox K. The Role of Cortical Activity in Experience-Dependent Potentiation and Depression of Sensory Responses in Rat Barrel Cortex. *J Neurosci* 2001; 21: 3881–3894

Watanabe K, Kamatani D, Hishida R, Shibuki K. Timing-dependent effects of whisker trimming in thalamocortical slices including the mouse barrel cortex. *Brain Res* 2011; 1385: 93–106

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, Güldenagel M, Deutsch U, Söhl G. Structural and Functional Diversity of Connexin Genes in the Mouse and Human Genome. *Biol Chem* 2002; 383: 725–737

Wimmer VC, Broser PJ, Kuner T, Bruno RM. Experience-induced plasticity of thalamocortical axons in both juveniles and adults. *J Comp Neurol* 2010; 518: 4629–4648

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Baum P, Beinhauer A, Zirwes L, Loenneker L, Jabs R, Narayanan RT, Oberlaender M, Seifert G, Kettenmann H, Steinhäuser C. Activity dependent modulation of glial gap junction coupling in the thalamus. iScience 2024; 27: 111043

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.111043>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde im Institut für Zelluläre Neurowissenschaften unter der Betreuung von Prof. Dr. Christian Steinhäuser durchgeführt. Die Planung der wissenschaftlichen Arbeit und die Konzeptualisierung erfolgten durch mich in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Christian Steinhäuser, PD Dr. Gerald Seifert und Prof. Dr. Helmut Kettenmann (Max Delbrück Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association, Berlin). Die Planung und Durchführung der Experimente mit Datenerhebung und -auswertung wurden von mir persönlich und eigenständig vorgenommen. Die Gewebepräparation für die RT-qPCR wurde von mir zusammen mit PD Dr. Gerald Seifert durchgeführt. Teile des zur Auswertung verwendeten Gewebematerials für die RT-qPCR wurden mit Unterstützung von Anna Beinhauer, Lara Zirwes und Linda Loenneker gewonnen. PD Dr. Gerald Seifert führte für mich die RT-qPCR durch.

Für die Durchführung der Experimente wurde ein Tierversuchsantrag (81-02.04.2020.A226) genehmigt, welcher mir die Durchführung der Tierversuchsvorhaben erlaubte. Die Technik des Trimmens erlernte ich durch einen methodischen Austausch mit Dr. Rajeevan T. Narayanan aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marcel Oberlaender (Max-Planck-Institut für Neurobiologie des Verhaltens – caesar, Bonn). Sämtliche Experimente, welche das Kürzen der Tasthaare (whisker trimming) erforderten wurden von mir eigenständig durchgeführt.

Die gesamte Quantifizierung, die statistische Auswertung und die Visualisierung erfolgten durch mich. Statistische Rückfragen wurden mit PD Dr. Ronald Jabs diskutiert. Die Interpretation und Diskussion der Ergebnisse erfolgten durch mich im Austausch mit Prof. Dr. Christian Steinhäuser und PD Dr. Gerald Seifert.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

Zunächst spreche ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Steinhäuser einen großen Dank aus. Insbesondere danke ich ihm für die Überlassung dieses spannenden Projektes, die fortwährend ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Planung und das Vertrauen in die Durchführung. Seine stete Bereitschaft zur Diskussion von Einzelproblemen und Forschungsergebnissen waren Leitfaden für das Fortschreiten der Arbeit. Ich habe es sehr geschätzt, dass er nicht nur am Wohlergehen des Projektes interessiert war, sondern auch immer um das menschliche Wohlergehen und eine gute Arbeitsatmosphäre besorgt war.

Ein weiterer großer Dank geht an PD Dr. Gerald Seifert für die ausgefeilte Zuchtplanung und Genotypisierung der Mäuse. Ich bin ihm für die Unterstützung bei Materialfragen und bei allen Fragen den Baukasten der Chemie betreffend sehr dankbar. Für Ratschläge, wertvolle Hinweise und die persönliche Betreuung im Laboralltag danke ich ihm darüber hinaus.

Bei PD Dr. Ronald Jabs möchte ich mich für die spannenden technischen und statistischen Diskussionen bedanken, die oft den „korrekten“ Weg aufzeigten und den Dingen auf den Grund gingen. Die Einführung und Unterstützung bei Fragen zum Patch-Clamp-Setup, Konfokalmikroskop sowie die Versorgung mit Werkzeug habe ich sehr geschätzt.

Mein Dank geht auch an Thomas Erdmann für die zuverlässige Materialbeschaffung und Unterstützung bei Materialanträgen, die um die halbe Welt gingen und uns mit verschiedenen Regierungen in Kontakt treten ließen. Ebenso danke ich Dr. Silke Künzel für die Klärung aller administrativen Fragen und ihr gut sortiertes Schreibwarenarsenal.

Unglaublich wertvoll und hilfreich war die Einarbeitung sowie die Bereitschaft für Fragen zur Verfügung zu stehen, insbesondere von Dr. Aline Timmermann, Dr. Camille Philippot, Dr. Dmitry Fedorov, Dr. Lukas Henning und allen anderen Mitarbeitern des IZN. Bei Dr. Dario Tascio bedanke ich mich für sein unermüdliches Gegenzählen, für die Gesellschaft auf den einsamen Laborfluren bei Wochenend-Experimenten und das zuverlässige Abklären, wer den Geschirrspüler einschaltet.

Mein Dank geht auch an Prof. Dr. Marcel Oberlaender und Dr. Rajeevan T. Narayanan für den methodischen Austausch über die Technik des Trimmens. Prof. Dr. Benjamin Odermatt danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Für die finanzielle Unterstützung des Forschungsvorhabens bedanke ich mich beim EKFS-Promotionskolleg „NeuroImmunology“ BonnNi.

Zuletzt geht ein großer Dank an meine Familie für ihre stetige emotionale, moralische und kulinarische Unterstützung bei meinen Projekten und meinem Studium. Sie und das mir von ihr entgegengebrachte bedingungslose Verständnis haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

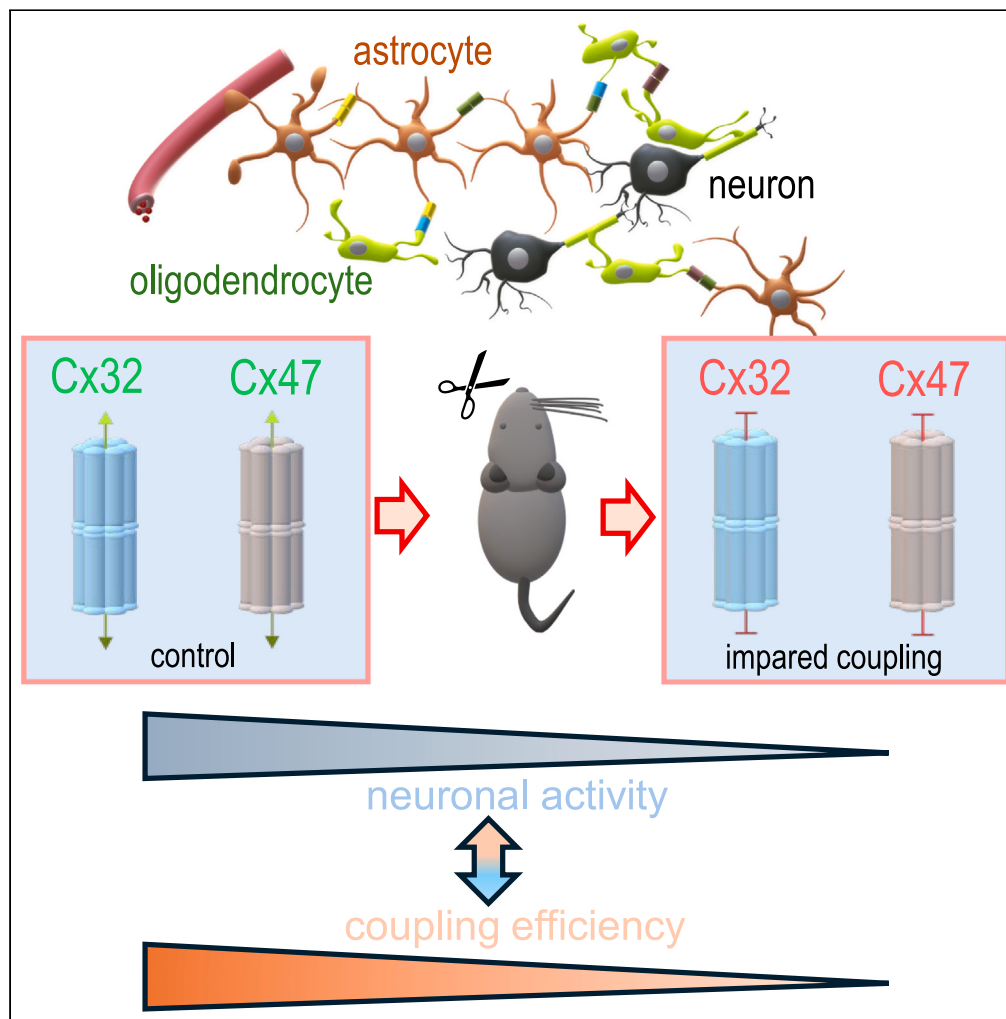
5. Publikation (PDF-Version)

Urheberrechtshinweis: © 2024 Paula Baum, Anna Beinhauer, Lara Zirwes, Linda Loenneker, Ronald Jabs, Rajeevan T. Narayanan, Marcel Oberlaender, Gerald Seifert, Helmut Kettenmann, Christian Steinhäuser. Veröffentlicht von Elsevier Inc. Der nachfolgend aufgeführte Artikel wurde in der Zeitschrift „iScience“ von „Cell Press“ (Band 27, Heft 10) veröffentlicht (<https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.111043>). Dies ist ein frei zugänglicher Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> veröffentlicht wird.

Copyright notice: © 2024 Paula Baum, Anna Beinhauer, Lara Zirwes, Linda Loenneker, Ronald Jabs, Rajeevan T. Narayanan, Marcel Oberlaender, Gerald Seifert, Helmut Kettenmann, Christian Steinhäuser. Published by Elsevier Inc. The article was published in the journal iScience from Cell Press (Volume 27, Issue 10) (<https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.111043>). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

Activity dependent modulation of glial gap junction coupling in the thalamus



Paula Baum, Anna Beinhauer, Lara Zirwes, ..., Gerald Seifert, Helmut Kettenmann, Christian Steinhäuser

christian.steinhaeuser@uni-bonn.de

Highlights

In the thalamus, panglial gap junction coupling is regulated by synaptic activity

In juvenile mice, sensory deprivation *in vivo* reduces coupling efficiency

Oligodendroglial Cx32 and Cx47 are the targets of this modulation

Neuronal activity and coupling-mediated metabolite transfer influence each other

Baum et al., iScience 27, 111043
October 18, 2024 © 2024 The Author(s). Published by Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.111043>

Article

Activity dependent modulation of glial gap junction coupling in the thalamus

Paula Baum,¹ Anna Beinhauer,¹ Lara Zirwes,¹ Linda Loenneker,¹ Ronald Jabs,¹ Rajeevan T. Narayanan,^{2,6} Marcel Oberlaender,^{2,3} Gerald Seifert,¹ Helmut Kettenmann,^{4,5} and Christian Steinhäuser^{1,7,*}

SUMMARY

Astrocytes and oligodendrocytes in the ventrobasal thalamus are electrically coupled through gap junctions. We have previously shown that these cells form large panglial networks, which have a key role in the transfer of energy substrates to postsynapses for sustaining neuronal activity. Here, we show that the efficiency of these transfer networks is regulated by synaptic activity: preventing the generation and propagation of action potentials resulted in reduced glial coupling. Systematic analyses of mice deficient for individual connexin isoforms revealed that oligodendroglial Cx32 and Cx47 are the targets of this modulation. Importantly, we show that during a critical time window, sensory deprivation through whisker trimming reduces the efficiency of the glial transfer networks also *in vivo*. Together with our previous results the current findings indicate that neuronal activity and provision of energy metabolites through panglial coupling are interdependent events regulated in a bidirectional manner.

INTRODUCTION

The thalamus is involved in controlling and passing on information to the neocortex. The ventral posterior nucleus (VP), operating as a somatosensory relay, contains elongated structures called barreloids, representing the somatotopic vibrissae organization.^{1,2} Part of the VP is the ventroposteromedial nucleus (VPM), which receives input from the contralateral vibrissae of the whisker pad³ and projects to the primary somatosensory neocortex.^{4–6} Astrocytes and oligodendrocytes in the thalamus are abundantly coupled through gap junctions, constituting large panglial networks, while panglial coupling is much less prevalent in the neocortex and hippocampus.⁷ Gap junction channels are formed by different connexin (Cx) isoforms and the expression pattern varies with cell type, brain region, and developmental stage.^{8–10} In the neocortex and hippocampus, functional coupling of astrocytes mainly depends on Cx43 (gene name, *Gja1*) and to a minor extent on Cx30 (*Gjb6*). In the thalamus, in contrast, most astrocytes express Cx30 and many even lack Cx43.⁷ Oligodendrocyte coupling relies on Cx47 (*Gjc2*) or Cx32 (*Gjb1*). Panglial networks require heterotypic gap junction channels made by Cx30:Cx32, Cx47:Cx43, or Cx47:Cx30 while Cx43 and Cx32 do not form functional channels.^{11–14} In the thalamus, panglial coupling is mainly mediated by Cx30:Cx32 channels.⁷ Cx30 levels increase after the second postnatal week^{15,16} although in the thalamus, Cx30 and Cx43 protein and functional coupling are already present earlier, with coupling efficiency remaining constant from p13 onward.⁷ The borders of barreloids in the VPM are formed by weakly coupled oligodendrocytes, which prevent expansion of coupling networks across multiple barreloid fields.¹⁷

A common approach to evaluate sensory input into the rodent thalamus is manipulation of the whiskers, e.g., by trimming of vibrissae. The long macrovibrissae of the mystacial pad provide spatial information, e.g., by distance detection, and are represented in the barreloids of the VPM. The shorter microvibrissae are important for object recognition.^{1,18} In mice, active whisking with exploration of the environment begins at p10/11 while object exploration is first observed at around p13, when eyes open.^{19–21} Whisker trimming leads to reversible changes of thalamocortical axons throughout postnatal life.^{22,23} Much less is known about consequences of sensory deprivation on thalamic networks,^{24,25} and neuron-glia interactions in particular.

Glial coupling plays an important role in supplying energy metabolites for maintenance of neuronal activity.^{26–28} In this study, we now address the question whether neuronal activity could influence the efficiency of panglial coupling and hence the transfer of energy substrates. Such neuronal impact on glial coupling has indeed been shown in olfactory glomeruli where Cx30-based astrocytic gap junctions are sensitive to action potential firing and changes in extracellular K⁺ levels.²⁹ Similarly, inhibition of action potentials and presynaptic transmitter release in the thalamus resulted in reduced spread of biocytin and the fluorescent glucose derivative, 2-(N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)Amino)-2-Desoxyglucose

¹Institute of Cellular Neurosciences, Medical Faculty, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany

²In Silico Brain Sciences Group, Max Planck Institute for Neurobiology of Behavior - caesar, 53175 Bonn, Germany

³Department of Integrative Neurophysiology, Center for Neurogenetics and Cognitive Research, VU Amsterdam, 081 Amsterdam, the Netherlands

⁴Cellular Neurosciences, Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association, 13125 Berlin, Germany

⁵Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen, China

⁶Present address: Department of Neurology, University of Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

⁷Lead contact

*Correspondence: christian.steinhaeuser@uni-bonn.de

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.111043>



Table 1. Primers, probes, and assays used for RT-qPCR

Gene	Gene expression assay number Primer and probe sequence	Product length	Position	GenBank accession number
Cx30 (Gjb6)	Mm00433661_s1	67 bp	910–976	NM_001010937.3
Cx32 (Gjb1)	Mm01950058_s1	65 bp	434–498	AK 134742.1
Cx43 (Gja1)	Mm01179639_S1	168 bp	2853–3020	NM_010288.3
Cx47 (Gjc2)	Mm00519131_s1	87 bp	502–588	NM_080454.4
β-actin (ACTB)	Mm00607939_s1	115 bp	1140–1254	BC138611.1
Primers used for developmental expression study				
Cx30 (Gjb6)	se 5'-CGTACACCAGCAGCATTTTCTT as 5'-ACCCATTGTAGAGGAAGTAG AACACAT probe FAM-5'-CGCATCA TCTTCGAAGCCGCCT-TAMRA	78 bp	705–726 756–783 728–754	NM_001010937.3
Cx43 (Gja1)	se 5'-TTTGACTTCAGCCTCCAAGGA as 5'-TCTGGGCACCTCTCTTCACTTA probe FAM-5'-TTCCACCACTTTGGC GTGCCG-TAMRA	79 bp	153–173 209–231 175–195	NM_010288.3
Cx32, Cx47, β-actin	As above	–	–	–

Length of PCR products is indicated as base pairs (bp). “Se” and “as” mark sense and antisense primers. All sense and antisense primers are located on different exons, respectively. Cx TaqMan probes were labeled with 6-carboxyfluorescein; 5'-end (FAM), 6-carboxytetramethylrhodamine; 3'-end (TAMRA), or a non-fluorescent minor groove binder at the 3'-end.

(2-NBDG) within the glial network.¹⁷ Here, we asked which connexin isoform(s) mediate the activity-dependence of panglial coupling in thalamic barreloids and whether these glial transfer networks are controlled by sensory input *in vivo*.

RESULTS

Postnatal regulation of connexin transcript expression in the thalamus

Little is known about the expression of connexin transcripts during postnatal development of the thalamus. We performed semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction (sqRT-PCR) to systematically compare the mRNA levels for astrocytic (Cx30 and Cx43) and oligodendroglial connexins (Cx32 and Cx47) between p5 and p45 in the ventrobasal thalamus (for primers and probes, see Table 1). Between p5 and p11, expression of Cx30, Cx32, and Cx47 strongly increased and then remained constant (Figures S1A–S1C, and S1D) while Cx43 transcripts reached adult level already at p5, the earliest time point investigated here (Figure S1B). Our data thus indicate that in the 11-day-old thalamus, all four connexin isoforms are present at quasi-adult level, at least on the transcript level.

Oligodendroglial gap junction coupling depends on neuronal activity

Thalamic astrocytes and oligodendrocytes form large panglial gap junction networks, which are predominantly mediated by heterotypic Cx30:Cx32 channels.⁷ Coupling efficiency in the barreloids depends on neuronal activity¹⁷ although the underlying mechanisms remain unclear. We asked which of the glial connexin channels in these structures are sensitive to neuronal activity. Therefore, thalamic slices from wild type (C57BL6/J) and connexin-deficient mice were incubated in tetrodotoxin (TTX) to block action potentials (0.5 μM) and ω-conotoxin GVIA (CTX) to reduce transmitter release (0.5 μM; 3–4 h) prior to filling an SR101-positive astrocyte within the barreloid with biocytin (0.5%) and Texas Red Dextran (0.1%) for 20 min through the patch clamp pipette (Figure 1). To allow visualization of barreloid structures in acute slices, the experiments were performed between p14 and p17. In accordance with previous reports,¹⁷ neuronal inhibition reduced coupling in slices from wild-type mice (Table 2; Figures 1B and 1C). In mice lacking astrocytic connexins (i.e., Cx30kiLacZ and hGFAPcre x Cx43 fl/fl mice), the coupling networks retained their sensitivity to neuronal activity (Table 2; Figures 1B, 1D, and 1E). Some astrocytes in barreloids from Cx30kiLacZ mice were even completely uncoupled after deprivation of neuronal activity ($n = 9$, $N = 7$; Figure 1D2). In contrast, after deletion of oligodendroglial connexins gap junction coupling in the barreloids was no longer sensitive to neuronal activity. Thus, in Cx32 KO mice dye coupling was not affected by TTX and CTX treatment and, similarly, coupling in Cx47kiEGFP mice was also not affected by deprivation of neuronal activity (Table 2; Figures 1B, 1F, 1G). These experiments suggest that within the thalamic panglial networks, the efficiency of oligodendroglial gap junction coupling is dependent on the activity neighboring neurons.

In comparison to panglial coupling in barreloids of C57BL6/J mice the number of coupled cells in Cx30 knockout mice under control conditions was reduced, because Cx30 is the main astrocytic connexin in the thalamus and dominate number of cell contacts by gap junctions to neighboring astrocytes and oligodendrocytes.⁷ In contrast, coupling in the other connexin KO vs. C57BL6/J mice was similar under control conditions.

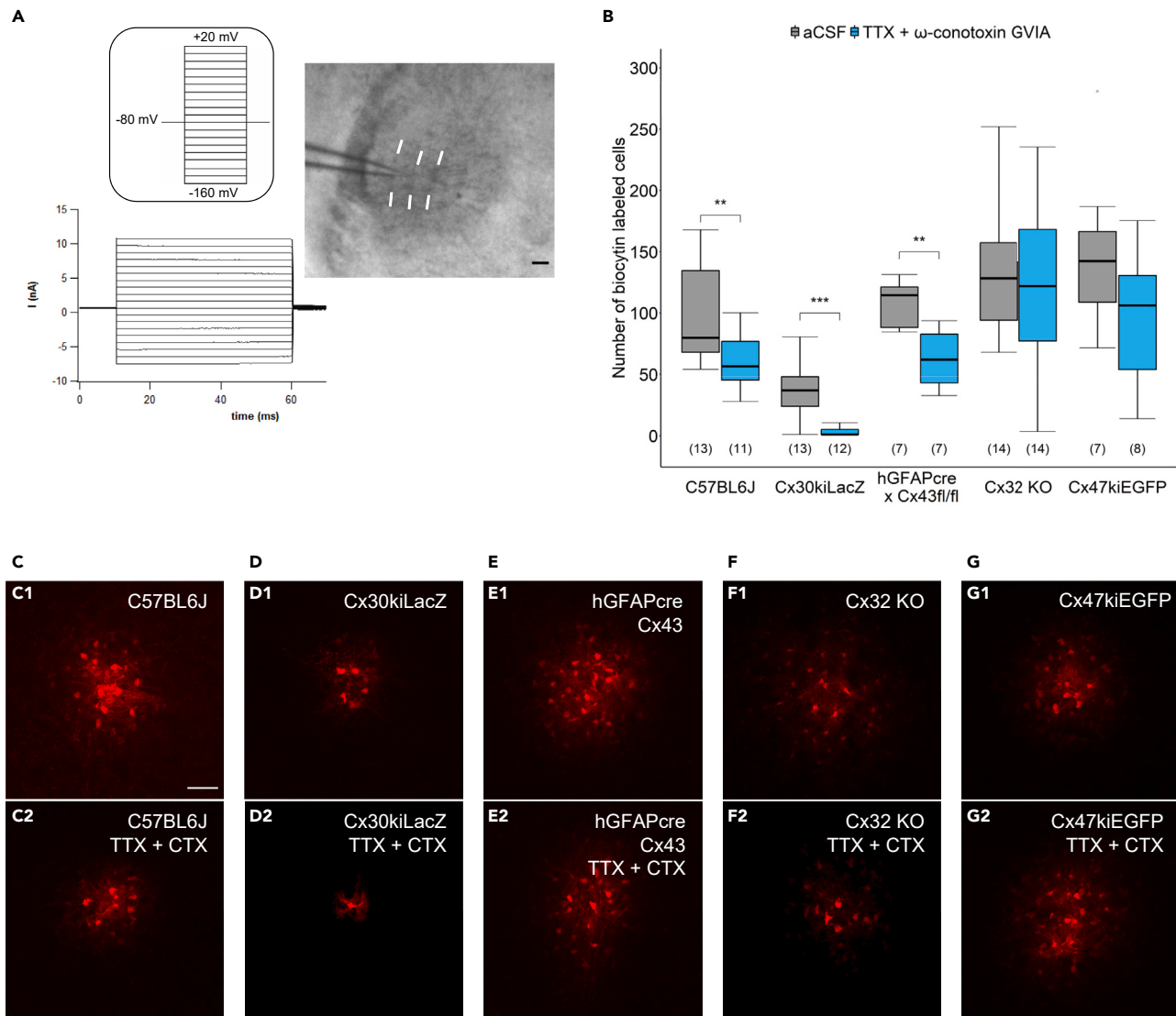


Figure 1. Activity dependent modulation of gap junction coupling in the thalamus

(A) A slice containing barreloids was prepared from a C57BL6/J mouse brain (bright field; right). An astrocyte within the barreloid field was approached by the patch pipette. White lines indicate barreloid borders. Scale bar: 100 μ m. De- and hyperpolarizing voltage steps (from -160 mV to $+20$ mV, 10 mV increments, duration 50 ms; inset) evoked a membrane current pattern typical of astrocytes (left). Holding potential was -80 mV.

(B) Boxplots indicating the number of biocytin-positive cells as a measure of coupling efficiency under control condition (aCSF) and after pre-incubation with aCSF or aCSF with TTX (0.5 μ M) + ω -conotoxin GVIA (CTX) (0.5 μ M) for 3–4 h. Inhibition of neuronal activity decreased the spread of biocytin in C57BL6/J mice, Cx30kiLaZ mice and hGFAPcre x Cx43 fl/fl mice. Number of mice is given in brackets. Boxplots represent median and quartiles. Two sample t-test (hGFAPcre x Cx43 fl/fl mice, log-transformed data for C57BL6/J mice) or Wilcoxon rank-sum test (Cx30kiLaZ mice). Stars indicate statistical significance: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

(C–G) Representative maximum intensity projections (MIPs) of biocytin-filled astrocytes in the barreloids of the VPM in different mouse lines in aCSF (upper row) and aCSF supplemented with TTX + CTX (lower row). Images depict representative brightness and contrast adjusted regions of interest (ROI). Scale bar: 50 μ m.

CC1 as a marker for oligodendrocytes in the thalamus

Thalamic glial cells express unusual antigen profiles with overlapping expression of common markers for astrocytes and oligodendrocytes, for example glutamine synthetase, Aldh1L1, and Olig2.⁷ To address the question whether the proportion of astrocytes and oligodendrocytes in the coupled networks changes if neuronal activity is suppressed we tested the antibody CC1, which labels mature oligodendrocytes in other brain regions by binding to the RNA-binding protein Quaking 7 (QKI7). QKI7 is highly expressed in oligodendrocytes already at p14 and further increases during maturation and myelin formation.^{30,31} In the thalamus of mice where the PLP promotor drives GFP expression (PLP-GFP mice³²), about 90% ($90.09\% \pm 2.6\%$; $n = 13$, $N = 4$) of the CC1 positive cells also expressed PLP-GFP (p15–p16, Figures 2A1–2A5) and

Table 2. Number of biocytin-positive cells in barreloids under control conditions and after application of 0.5 μ M TTX + 0.5 μ M CTX

Mouse line	ACSF	ACSF + TTX + CTX	p value
C57BL6	79.8 (68.0–134.5) $n = 22$, $N = 13$	56.5 (45.5–76.8) $n = 15$, $N = 11$	0.008 two-sample t test on log-transformed data
Cx30kiLacZ	37.0 (24.0–48.0) $n = 17$, $N = 13$	1.0 (1.0–5.1) $n = 18$, $N = 12$	0.0003 Wilcoxon rank-sum test
hGFAP ^{cre} x Cx43 fl/fl	114.5 (88.1–121.3) $n = 11$, $N = 7$	62.0 (43.1–82.8) $n = 13$, $N = 7$	0.003 two-sample t test
Cx32 KO	128.3 (94.1–157.3) $n = 21$, $N = 14$	122.3 (77.3–168.4) $n = 16$, $N = 14$	0.479 two-sample t test
Cx47kiEGFP	142.5 (108.9–166.5) $n = 12$, $N = 7$	106.4 (54.1–130.7) $n = 13$, $N = 8$	0.125 two-sample t test

Data are given as median and interquartile range (quartile 25% - quartile 75%), n = cell numbers, N = number of animals.

all PLP-GFP expressing oligodendrocytes were CC1 positive. Only a few CC1 positive cells lacked co-localization with PLP-GFP ($9.91\% \pm 2.6\%$) and all PLP-GFP positive oligodendrocytes were CC1 positive (Figure 2A5). To decide whether CC1 positive cells lacking PLP-GFP are NG2 glia, thalamic slices from NG2-YFP mice were stained against CC1 and YFP. Indeed, 25% ($25.32\% \pm 5.28\%$; $n = 7$, $N = 3$) of the CC1 positive cells were also NG2-YFP positive (Figures 2B1–2B5) and 34% ($34.60\% \pm 1.12\%$) of NG2-YFP expressing cells were stained by CC1 antibody. Two-thirds ($65.40\% \pm 1.12\%$) of the NG2-YFP expressing cells lacked co-localization with CC1, and $74.68\% \pm 5.28\%$ of the CC1 positive cells were devoid of NG2-YFP (Figure 2B5). Given that thalamic NG2 glial cells are not gap junction coupled,⁷ this data confirmed CC1 as useful marker for oligodendrocytes among the biocytin-positive cells in the barreloids.

Characterization of the cellular composition of panglial coupling networks

Thalamic astrocytes and oligodendrocytes equally contribute to panglial gap junction networks⁷ and are crucial for proper glial-neuron cross-talk.^{26,33} We asked whether after genetic ablation of glial connexins, neuronal activity affects the cellular composition of these networks. In wild-type mice, the biocytin labeled coupling networks contained 55% CC1 positive oligodendrocytes, and this proportion did not change after TTX + CTX treatment (Table 3; Figure 3A). In Cx30kiLacZ mice, expression of the reporter β Gal was used to identify astrocytes in the biocytin network. In the control group, 34.4% were astrocytes and in this proportion remained unchanged after TTX + CTX incubation (Table 3; Figure 3B). As mentioned previously, some astrocytes lacking Cx30 were completely uncoupled after TTX + CTX application (Figure 1D2); these cells were not considered in the network analysis shown in Figure 3B3. Similarly, no differences in network composition were found in the barreloids of hGFAP^{cre} x Cx43 fl/fl mice after deprivation of neuronal activity. In control solution: 33% of the biocytin-positive cells were CC1 positive and this proportion did not change after TTX + CTX application (Table 3; Figure 3C). Since Cx32 is the dominating oligodendroglial connexin isoform in the thalamus,⁷ CC1 positive cells were rarely found in thalamic coupling networks of Cx32 KO mice, but its proportion increased after adding TTX + CTX (Table 3; Figure 3D). A similar increase in the proportion of oligodendrocytes in the coupled networks after deprivation of neuronal activity was observed in barreloids of Cx47kiEGFP mice. In control solution, 40.6% of the biocytin positive cells also expressed EGFP, compared to 57.1% after application of TTX + CTX (Table 3; Figure 3E). In conclusion, in the barreloids of mice lacking oligodendroglial connexins, the composition of the coupling networks was dependent on neuronal activity, whereas this effect was not observed in mice deficient for astroglial connexin isoforms.

Connexin transcript expression in knockout mice

The aforementioned data demonstrate the impact of neuronal activity on panglial coupling, but connexin expression and coupling might also be affected by interactions between isoforms.^{33,34} To test for potential compensatory regulation, we compared the thalamus of C57BL6/J mice (control) with that of mice lacking Cx30, Cx32, Cx43, or Cx47 for expression of the respective remaining connexin isoforms on the transcript level. While expression of Cx43 or Cx47 was not altered in Cx KO mice, Cx30 was upregulated in mice deficient for oligodendroglial Cx32 or Cx47, and downregulated if Cx43 was lacking (Figure S2A). Upregulation of Cx32 was found in Cx47kiEGFP mice (Figure S2B). Thus, the unexpected finding of an increased proportion of oligodendrocytes in the coupling network after deprivation of neuronal activity in mice lacking Cx32 or Cx47 (Figures 3D and 3E) might have been due to compensatory upregulation of Cx30 and enhanced Cx30:Cx47 or Cx30:Cx32 panglial coupling.

Reduced sensory input impairs panglial coupling in the barreloids *in vivo*

The finding that coupling efficiency *in situ* depends on neuronal activity prompted us to test whether deprivation of activity also affects glial coupling *in vivo*. In juvenile mice, whisker trimming reduces the sensory input to the somatosensory cortex via the barreloids.²⁰ Coupling analyses were performed between p13 to p17, a period in which barreloids are visible in acute tissue slices.¹⁷ Mice retained whiskers on one side of the snout (ipsilateral, control) whereas the other side, which is represented in the contralateral thalamus, was trimmed (Figure 4A). First, mice were sacrificed one (1dpt) or two-days-post-trimming (2dpt). Acute brain slices were prepared and the coupling efficiency in the barreloids was examined. Under these conditions, trimming did not affect coupling (1dpt: ipsilateral 183.1 ± 43.6 biocytin-positive cells, $n = 13$, $N = 10$; contralateral 173.0 ± 54.7 cells, $n = 12$, $N = 10$,

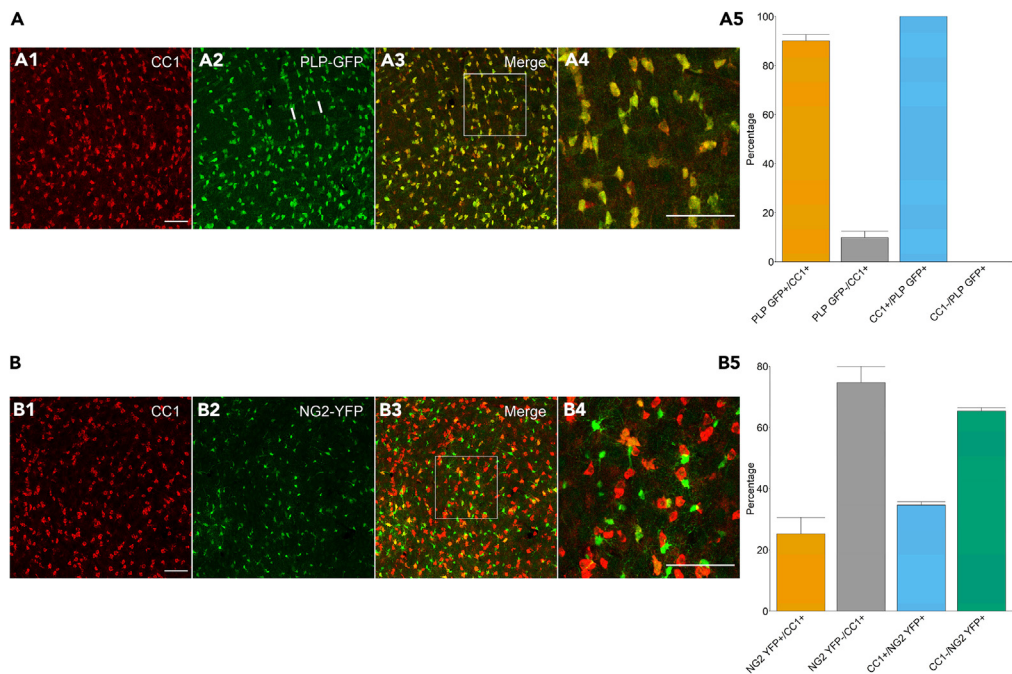


Figure 2. CC1 as a marker for oligodendrocytes in the thalamus

(A) Co-staining against CC1 and GFP was performed in PLP-GFP mice at p15/16 (A1–A4). Representative MIPs of combined CC1 and GFP staining in the VPM. Quantitative analysis revealed abundant co-localization of CC1 and PLP-GFP ($n = 13$, $N = 4$; Figure A5). Note the aligned pattern of some PLP-GFP⁺ cells indicating barreloid borders (white bars; A2). (A4) Blowup of boxed area in (A3). (B) CC1 immunostaining was performed in NG2-YFP mice at p15 (B1–B4). Only a minority of cells showed co-localization ($n = 7$; $N = 3$; Figure B5). (B4) Blowup of boxed area in (B3). Bar graphs represent mean $\pm$ SD. Scale bars: 75 μ m.

$p = 0.65$; 2dpt: ipsi 172.8 ± 45.8 cells, $n = 9$, $N = 7$; contra, 159.6 ± 28.3 cells, $n = 12$, $N = 7$; $p = 0.53$, two sample t-test) (Figure S3). Next, we looked at an earlier time point and counted biocytin-positive cells 13–23 h after trimming, which again did not reveal differences in coupling between ipsi- (161.4 ± 46.7 cells, $n = 11$, $N = 4$) and contralateral sides (118.1 ± 15.9 , $n = 9$, $N = 4$; $p = 0.13$, two sample t test) (Figure S3). Finally, we tried to mimic the experimental setting *in situ* where coupling was affected 3–4 h after TTX + CTX application. Indeed, performing coupling analysis in the barreloids at 3–6 h after whisker trimming revealed a significant decrease in coupling efficiency (contralateral 103.9 ± 28.9 , $n = 12$, $N = 7$ vs. ipsilateral (157.0 ± 42.6 , $n = 12$, $N = 7$; $p = 0.018$, two sample t test) (Figures 4B and 4C). Sham manipulation (whisker claspings) did not affect coupling efficiency 3–6 h later (ipsilateral 114.8 ± 25.6 , $n = 10$, $N = 6$; contralateral 106.0 ± 40.0 , $n = 9$, $N = 6$; $p = 0.66$, two sample t test) (not shown). Interaction effect of trimmed side of snout (left vs. right) on the main effect of biocytin network size was ruled out (checked with ANOVA), and daytime did also have no effect.

We also addressed the question whether sensory deprivation affects the cell composition of the panglial network *in vivo*. Three to 6 h after trimming, no changes were observed in the proportion of CC1 positive cells within the biocytin labeled network, neither in trimmed mice (ipsi: $33.1 \pm 5.0\%$, $n = 11$, $N = 7$; contra: $32.7 \pm 11.6\%$, $n = 12$, $N = 7$; $p = 0.92$, Welch two sample t test) (Figures 4B and D) nor in sham control mice (ipsi: $29.4 \pm 7.3\%$, $n = 10$, $N = 6$; contra: $25.7 \pm 10.7\%$, $n = 9$, $N = 6$; $p = 0.49$, two sample t test).

Table 3. Proportion (%) of CC1- or GFP- positive oligodendrocytes and LacZ-positive astrocytes (in case of Cx30kiLacZ mice) in panglial gap junction networks in thalamic barreloids under control conditions and after application of 0.5 μ M TTX + 0.5 μ M CTX

Mouse line	ACSF	ACSF + TTX + CTX	p value
C57BL6	55.0 (50.2–58.2) $n = 11$, $N = 6$	48.3 (18.3–49.2) $n = 8$, $N = 5$	0.18 two-sample t test
Cx30kiLacZ	34.4 (24.4–35.2) $n = 6$, $N = 5$	42.9 (32.5–49.1) $n = 3$, $N = 3$	0.40 two-sample t test
hGFAP ^{cre} x Cx43 fl/fl	33.0 (24.8–37.2) $n = 11$, $N = 7$	34.9 (21.4–41.1) $n = 13$, $N = 7$	0.81 two-sample t test
Cx32 KO	4.6 (3.3–6.8) $n = 9$, $N = 6$	16.3 (15.4–26.2) $n = 6$, $N = 5$	0.008 two-sample t test
Cx47kiEGFP	40.6 (37.7–44.9) $n = 10$, $N = 6$	57.1 (44.7–60.2) $n = 8$, $N = 7$	0.04 two-sample t test

Data are given as median and interquartile range (quartile 25% - quartile 75%), n = cell numbers, N = number of animals.

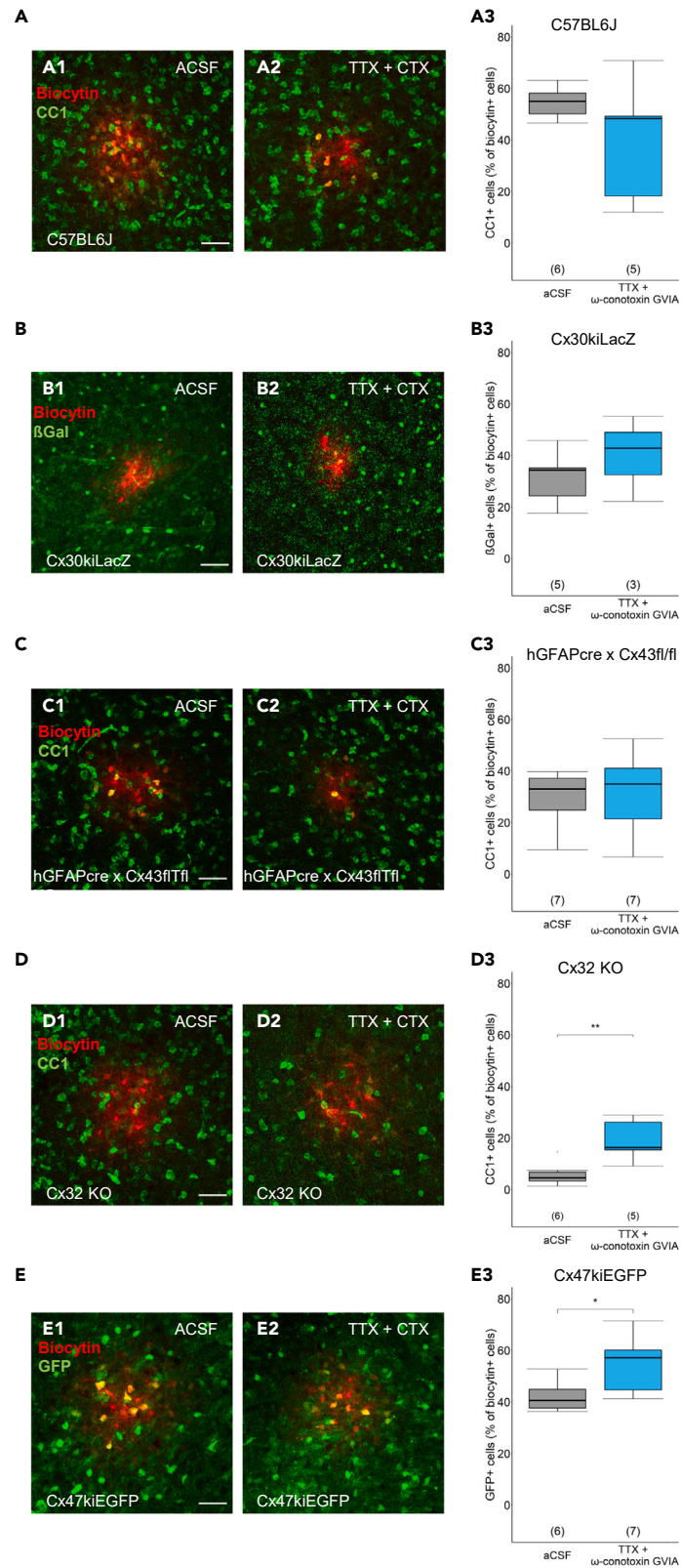


Figure 3. Characterization of panglial coupling networks in barreloid fields

(A–E) (A1 and A2–E1 and E2) Representative MIPs of biocytin-filled astrocytes and histochemical staining against CC1, β Gal, or GFP as indicated. Scale bar: 50 μ m. (A3–E3) Quantification of the proportion CC1, β Gal, or GFP positive cells among the biocytin labeled cells in aCSF and aCSF supplemented with TTX (0.5 μ M) + CTX (0.5 μ M). Data are displayed as boxplots representing median and quartiles. Number of mice is given in brackets. Two sample t test. Stars indicate statistical significance. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

In conclusion, short-term sensory deprivation through whisker trimming recapitulated the effect of neuronal deprivation *in situ* on the efficiency of panglial coupling, while the proportion of oligodendrocytes in the panglial coupling network remained unaffected.

DISCUSSION

Previous work revealed that glial gap junction coupling critically contributes to proper brain function. For example, loss of astrocyte coupling due to deletion of Cx30 and/or Cx43 impaired the uptake and redistribution of K^+ and glutamate, generated aberrant neuronal activity, and impaired spatial learning and memory.^{35–38} Oligodendrocytes interact closely with axons and support their function by supplying energy-rich substrates through myelin ensheathment.^{39–41} However, both astrocytes and oligodendrocytes also supply neurons with glucose, pyruvate and lactate via their coupling networks, to ensure long-term functionality of axons and synapses.^{26–28} The latter studies have shown that impairment of junctional communication profoundly influences synaptic activity and myelination. Thalamic oligodendrocytes and astrocytes express glutamine synthetase.⁷ This enzyme might also be distributed through the panglial network to support synaptic transmission⁴² and behavior, as in spinal cord where oligodendroglial GS is important for glutamine supply to motor neurons and control of forelimb force.⁴³ N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor signaling in oligodendrocytes and glutamate transporter activation in astrocytes may be involved in regulating these forms of cellular communication.^{44,45}

Whisker-specific patterning of thalamocortical terminals in rodents emerges during the first days after birth. Each barreloid and barrel receives sensory information from a single whisker. The principal sensory nucleus of the trigeminal nerve is targeted by axons from the trigeminal ganglion and after crossing of axons to the contralateral hemisphere, information is transferred into the thalamic VPM where in mice barreloids become visible at p3. Two days later, patterning and topographic organization into barrels appears in the primary somatosensory cortex,⁴⁶ which is dependent on intrinsic molecular cues and involves signaling to NMDA receptors⁴⁷ and mGluR5.^{48,49} We show here that unilateral whisker trimming recapitulates *in vivo* effects of TTX + CTX application on coupling in the slice preparation. While the players modulating gap junctions in the barreloids are yet unknown, glial networks in neocortical barrels were thought to be influenced by extracellular matrix molecules and proteoglycans.⁵⁰ No plastic changes upon sensory deprivation were found in the VPM in earlier studies, but they were often performed in adult animals and focused on long term plasticity.^{25,51} After clipping of whiskers, thalamocortical axons from the VPM are shortened, independent of animals' age.^{22,23} Our data reveal another type of plasticity within the VPM, induced by short-term deprivation in young mice. The changes in glial coupling efficiency occurred within an early, short time window after trimming and reversed over time. The question of how these glial changes influence the transfer of information from the thalamus to the sensorimotor cortex should be the subject of future studies.

While glial coupling is crucial for maintenance of neuronal activity, in the present study we asked whether, conversely, as a kind of possible feedback mechanism, transfer of metabolic substrates through coupling might also be influenced by neuronal activity. Indeed, such a relation exists in olfactory glomeruli where inhibition of neuronal activity by TTX or sensory deprivation entailed reduced astrocytic coupling through modulation of Cx30-formed channels.²⁹ Coupling in the barreloids is reduced after application of TTX and CTX.¹⁷ Because of its dominant expression in thalamic astrocytes⁷ we wondered whether in this brain region, Cx30 channel function is also activity dependent. After Cx30 deletion, thalamic astrocytes displayed reduced tracer spread, but this remaining coupling was still sensitive to neuronal firing. In contrast, in barreloids of mice lacking Cx32 or Cx47, the panglial networks were no longer affected by neuronal activity, suggesting that junctional channels in oligodendrocytes are the target. In the thalamus of Cx32^{−/−};Cx47^{EGFP(+/-)} mice the proportion of oligodendrocytes in the panglial coupling network is strongly reduced,²⁶ and it is even lower in Cx32 knockout mice (this study). Obviously, heterotypic coupling of Cx47 with Cx43, i.e., between oligodendrocytes and astrocytes, is unable to restore coupling in Cx32 KO mice. Together, our data confirm the view that in the thalamus, Cx32 is the dominant oligodendroglial isoform and astrocyte-to-oligodendrocyte coupling is predominantly mediated through Cx30:Cx32 channels.⁷

The question of through which mechanism(s) neuronal activity influences glial coupling remains open. Neurotransmitters, cytokines, or other endogenous molecules might be candidates. In the cerebellum, the coupling efficiency of Bergmann glia is decreased by activation of 2-Amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)propanoic acid (AMPA) receptors, probably through receptor-mediated Ca^{2+} influx.⁵² A similar scenario is conceivable in the VPM where the sensory fibers to thalamocortical neurons are glutamatergic. Thalamic astrocytes also express functional AMPA receptors,⁵³ and Ca^{2+} elevations have been observed in these cells after mGluR activation.⁵⁴ Whether oligodendrocytes in the VPM are sensitive to glutamate is not known. In the optic nerve, oligodendrocytes express Ca^{2+} permeable NMDARs on their myelin sheaths, which besides modulation of GLUT1 trafficking and axonal energy supply^{41,55} might also affect coupling.

In control mice and mice lacking astroglial connexins, coupling efficiency was reduced when dampening neuronal firing, but the proportion of astrocytes vs. oligodendrocytes within the network remained unchanged. This was different in Cx32 KO and Cx47kiEGFP mice where the proportion of oligodendrocytes within the coupling became larger when TTX and CTX were added. Since overall coupling efficiency did not change in these mice, as judged by tracer injection, it is likely that oligodendrocytes were preferred to couple in the ko mice, while astrocyte coupling was impaired. This could mean that under conditions of neuronal suppression, as a kind of homeostatic scaling, the respective remaining isoform is compensatorily upregulated to keep oligodendrocytes in the panglial network.

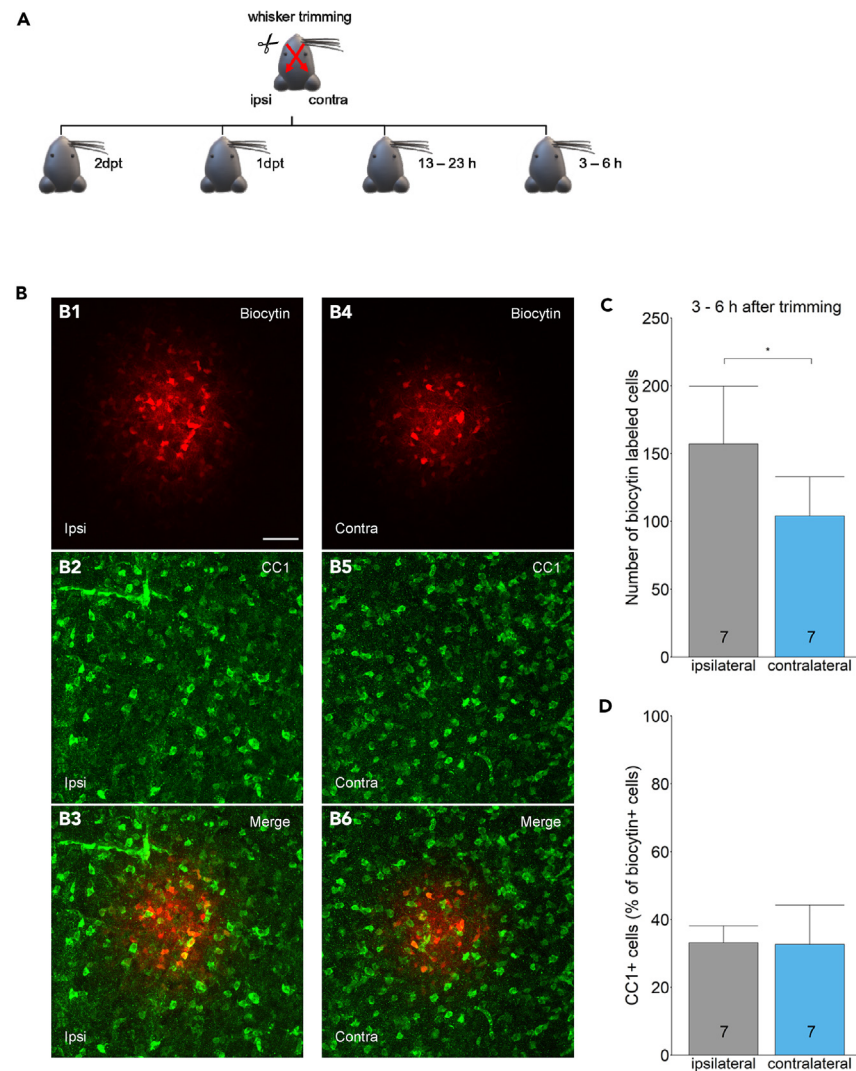


Figure 4. Sensory deprivation impairs panglial coupling *in vivo*

(A) Schematic of unilateral whisker trimming. The trimmed side of the snout is represented in the contralateral thalamus (top, red arrows). Coupling analyses were performed after trimming at time points as indicated (dpt, days post trimming).

(B) Individual astrocytes within barreloids, ipsi-, and contralaterally to the trimmed side were filled with biocytin for 20 min. Representative MIPs of biocytin-positive (B1 and B4) and CC1-positive cells (B2 and B5) are shown, together with the merged pictures (B3 and B6), 3–6 h after trimming (C57BL6/J mice). Scale bar: 50 μ m.

(C) Quantitative analyses in C57BL6/J mice (p13–15) 3–6 h after trimming revealed a lower number of biocytin-positive cells, i.e., reduced coupling efficiency, in the contralateral thalamus.

(D) The proportion of CC1-positive oligodendrocytes among the biocytin labeled cells was not affected 3–6 h after trimming. Bar graphs represent mean $\pm$ SD. Number of mice is given in bar graph. Two sample t test or Welch two sample t test. * $p < 0.05$.

Taken together, we show that in the ventrobasal thalamus, the efficiency of panglial coupling is regulated by synaptic activity. Systematic analyses of mice lacking individual connexin isoforms revealed that the target of this functional modulation is not astrocytes but the oligodendroglial connexins Cx32 and Cx47. Under conditions of suppressed neuronal activity, the proportion of oligodendrocytes within the coupling network increased if Cx32 or Cx47 were deleted. In Cx30 ko mice, the size of the coupling networks was reduced, confirming the assumption that this isoform dominates in thalamic astrocytes. Finally, we show that during a critical time window, sensory deprivation reduces thalamic coupling also *in vivo*. Together with our previous results²⁶ the current findings indicate that neuronal activity and provision of energy metabolites through panglial coupling are interdependent events regulated in a bidirectional manner.

Limitations of the study

In this work, we have shown that the efficiency of panglial coupling is regulated by synaptic activity, and that oligodendroglial Cx32 and Cx47 are the targets of this modulation. Importantly, we show that during a critical time window, sensory deprivation through whisker trimming reduces the efficiency of the glial transfer networks also *in vivo*. While our data reveal a previously unknown type of plasticity within the VPM, the important question of how these glial changes influence the transfer of information from the thalamus to the sensorimotor cortex remains to be addressed in future studies.

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Christian Steinhäuser (christian.steinhaeuser@uni-bonn.de).

Materials availability statement

This study did not generate new unique reagents.

Data and code availability

- All data in this paper will be shared by the [lead contact](#) upon request.
- This paper does not report original code.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the [lead contact](#) upon request.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Thomas Erdmann and Dario Tascio for excellent technical assistance. This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (STE 552/4, KE329/28) and a stipend from the Else-Kröner-Fresenius foundation (EKFS Q-614.1154, to P.B.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, C.S. and H.K.; methodology, P.B., R.J., R.T.N., M.O., and G.S.; investigation, P.B., A.B., L.Z., L.L., and G.S.; software, R.J.; supervision, G.S. and C.S.; writing – original draft, P.B., G.S., and C.S.; writing – review and editing, P.B., G.S., H.K., and C.S.; funding acquisition, C.S. and H.K.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- [KEY RESOURCES TABLE](#)
- [EXPERIMENTAL MODEL](#)
 - Mice
- [METHOD DETAILS](#)
 - Slice preparation
 - Electrophysiological recordings
 - Visualization of tracer coupling
 - Immunohistochemistry
 - Whisker trimming
 - Preparation of brain tissue for RT-qPCR
 - RT-qPCR
- [QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS](#)

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.111043>.

Received: April 30, 2024

Revised: July 2, 2024

Accepted: September 23, 2024

Published: September 26, 2024

REFERENCES

- Van Der Loos, H. (1976). Barreloids in mouse somatosensory thalamus. *Neurosci. Lett.* 2, 1–6. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(76\)90036-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(76)90036-7).
- Sugitani, M., Yano, J., Sugai, T., and Ooyama, H. (1990). Somatotopic organization and columnar structure of vibrissae representation in the rat ventrobasal complex. *Exp. Brain Res.* 81, 346–352. <https://doi.org/10.1007/BF00228125>.
- Simons, D.J., and Carvell, G.E. (1989). Thalamocortical response transformation in the rat vibrissa/barrel system. *J. Neurophysiol.* 61, 311–330. <https://doi.org/10.1152/jn.1989.61.2.311>.
- Senft, S.L., and Woolsey, T.A. (1991). Growth of Thalamic Afferents into Mouse Barrel Cortex. *Cereb. Cortex* 1, 308–335. <https://doi.org/10.1093/cercor/1.4.308>.
- Petersen, C.C.H. (2007). The Functional Organization of the Barrel Cortex. *Neuron* 56, 339–355. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.017>.
- Woolsey, T.A. (2009). Sensorimotor Integration: Barrels, Vibrissae and Topographic Representations. In *Encyclopedia of Neuroscience*, L.R. Squire, ed. (Elsevier), pp. 601–606. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01109-8>.
- Griemsmann, S., Höft, S.P., Bedner, P., Zhang, J., Von Staden, E., Beinhauer, A., Degen, J., Dublin, P., Cope, D.W., Richter, N., et al. (2015). Characterization of Panglial Gap Junction Networks in the Thalamus, Neocortex, and Hippocampus Reveals a Unique Population of Glial Cells. *Cereb. Cortex* 25, 3420–3433. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu157>.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U., and Söhl, G. (2002). Structural and Functional Diversity of Connexin Genes in the Mouse and Human Genome. *Biol. Chem.* 383, 725–737. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.076>.
- Nagy, J.I., Dudek, F.E., and Rash, J.E. (2004). Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res. Rev.* 47, 191–215. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.05.005>.
- Bedner, P., Steinhäuser, C., and Theis, M. (2012). Functional redundancy and compensation among members of gap junction protein families? *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1818, 1971–1984. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.016>.
- White, T.W., Paul, D.L., Goodenough, D.A., and Bruzzone, R. (1995). Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *MBoC* 6, 459–470. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.4.459>.
- Orthmann-Murphy, J.L., Freidin, M., Fischer, E., Scherer, S.S., and Abrams, C.K. (2007). Two Distinct Heterotypic Channels Mediate Gap Junction Coupling between Astrocyte and Oligodendrocyte Connexins. *J. Neurosci.* 27, 13949–13957. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3395-07.2007>.
- Magnotti, L.M., Goodenough, D.A., and Paul, D.L. (2011). Functional heterotypic interactions between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *Glia* 59, 26–34. <https://doi.org/10.1002/glia.21073>.
- Magnotti, L.M., Goodenough, D.A., and Paul, D.L. (2011). Deletion of oligodendrocyte Cx32 and astrocyte Cx43 causes white matter vacuolation, astrocyte loss and early mortality. *Glia* 59, 1064–1074. <https://doi.org/10.1002/glia.21179>.
- Kunzelmann, P., Schröder, W., Traub, O., Steinhäuser, C., Dermietzel, R., and Willecke, K. (1999). Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes. *Glia* 25, 111–119. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(19990115\)25:2<111::AID-GLIA2>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(19990115)25:2<111::AID-GLIA2>3.0.CO;2-I).
- Nagy, J.I., Patel, D., Ochalski, P.A., and Stelmack, G.L. (1999). Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience* 88, 447–468. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00191-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00191-2).
- Claus, L., Philippot, C., Griemsmann, S., Timmermann, A., Jabs, R., Henneberger, C., Kettenmann, H., and Steinhäuser, C. (2018). Barrel Borders and Neuronal Activity Shape Panglial Gap Junction-Coupled Networks in the Mouse Thalamus. *Cereb. Cortex* 28, 213–222. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw368>.
- Brecht, M., Preilowski, B., and Merzenich, M.M. (1997). Functional architecture of the mystacial vibrissae. *Behav. Brain Res.* 84, 81–97. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(97\)83328-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(97)83328-1).
- Arakawa, H., and Erzurumlu, R.S. (2015). Role of whiskers in sensorimotor development of C57BL/6 mice. *Behav. Brain Res.* 287, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.03.040>.
- Landers, M., and Philip Zeigler, H. (2006). Development of rodent whisking: Trigeminal input and central pattern generation. *Somatosens. Mot. Res.* 23, 1–10. <https://doi.org/10.1080/08990200600700768>.
- Roubertoux, P., Semal, C., and Ragueneau, S. (1985). Early development in mice: II. Sensory motor behavior and genetic analysis. *Physiol. Behav.* 35, 659–666. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(85\)90393-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(85)90393-2).
- Wimmer, V.C., Broser, P.J., Kuner, T., and Bruno, R.M. (2010). Experience-induced plasticity of thalamocortical axons in both juveniles and adults. *J. Comp. Neurol.* 518, 4629–4648. <https://doi.org/10.1002/cne.22483>.
- Oberlaender, M., Ramirez, A., and Bruno, R.M. (2012). Sensory Experience Restructures Thalamocortical Axons during Adulthood. *Neuron* 74, 648–655. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.022>.
- Wallace, H., and Fox, K. (1999). Local cortical interactions determine the form of cortical plasticity. *J. Neurobiol.* 41, 58–63.
- Glazewski, S., McKenna, M., Jacquin, M., and Fox, K. (1998). Experience-dependent depression of vibrissae responses in adolescent rat barrel cortex: Plasticity in barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2107–2116. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00222.x>.
- Philippot, C., Griemsmann, S., Jabs, R., Seifert, G., Kettenmann, H., and Steinhäuser, C. (2021). Astrocytes and oligodendrocytes in the thalamus jointly maintain synaptic activity by supplying metabolites. *Cell Rep.* 34, 108642. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108642>.
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., and Giaume, C. (2008). Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission. *Science* 322, 1551–1555. <https://doi.org/10.1126/science.1164022>.
- Meyer, N., Richter, N., Fan, Z., Siemonsmeier, G., Pivneva, T., Jordan, P., Steinhäuser, C., Semtner, M., Nolte, C., and Kettenmann, H. (2018). Oligodendrocytes in the Mouse Corpus Callosum Maintain Axonal Function by Delivery of Glucose. *Cell Rep.* 22, 2383–2394. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.022>.
- Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J.D., Bonvento, G., and Giaume, C. (2011). Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 18442–18446. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107386108>.
- Bin, J.M., Harris, S.N., and Kennedy, T.E. (2016). The oligodendrocyte-specific antibody 'CC 1' binds Quaking 7. *J. Neurochem.* 139, 181–186. <https://doi.org/10.1111/jnc.13745>.
- Hardy, R.J., Loushin, C.L., Friedrich, V.L., Jr., Chen, Q., Ebersole, T.A., Lazzarini, R.A., and Artzt, K. (1996). Neural Cell Type-Specific Expression of QKI Proteins Is Altered in *quaking* viable Mutant Mice. *J. Neurosci.* 16, 7941–7949. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-24-07941.1996>.
- Fuss, B., Mallon, B., Phan, T., Ohlemeyer, C., Kirchhoff, F., Nishiyama, A., and Macklin, W.B. (2000). Purification and Analysis of in Vivo-Differentiated Oligodendrocytes Expressing the Green Fluorescent Protein. *Dev. Biol.* 218, 259–274. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9574>.
- Tress, O., Maglione, M., May, D., Pivneva, T., Richter, N., Seyfarth, J., Binder, S., Zlomuzica, A., Seifert, G., Theis, M., et al. (2012). Panglial Gap Junctional Communication Is Essential for Maintenance of Myelin in the CNS. *J. Neurosci.* 32, 7499–7518. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0392-12.2012>.
- May, D., Tress, O., Seifert, G., and Willecke, K. (2013). Connexin47 Protein Phosphorylation and Stability in Oligodendrocytes Depend on Expression of Connexin43 Protein in Astrocytes. *J. Neurosci.* 33, 7985–7996. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5874-12.2013>.
- Wallraff, A., Köhling, R., Heinemann, U., Theis, M., Willecke, K., and Steinhäuser, C. (2006). The Impact of Astrocytic Gap Junctional Coupling on Potassium Buffering in the Hippocampus. *J. Neurosci.* 26, 5438–5447. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0037-06.2006>.
- Pannasch, U., Vargová, L., Reingruber, J., Ezan, P., Holcman, D., Giaume, C., Syková, E., and Rouach, N. (2011). Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 8467–8472. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016650108>.
- Pannasch, U., and Rouach, N. (2013). Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends Neurosci.* 36, 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.004>.
- Hösl, L., Binini, N., Ferrari, K.D., Thieren, L., Looser, Z.J., Zuend, M., Zanker, H.S., Berry, S., Holub, M., Möbius, W., et al. (2022). Decoupling astrocytes in adult mice impairs synaptic plasticity and spatial learning. *Cell Rep.* 38, 110484. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110484>.

39. Lee, Y., Morrison, B.M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M.H., Hoffman, P.N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P.-W., et al. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487, 443–448. <https://doi.org/10.1038/nature11314>.
40. Fünfschilling, U., Supplie, L.M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A.S., Edgar, J., Brinkmann, B.G., Kassmann, C.M., Tzvetanova, I.D., Möbius, W., et al. (2012). Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485, 517–521. <https://doi.org/10.1038/nature11007>.
41. Saab, A.S., Tzvetanova, I.D., Trevisiol, A., Baltan, S., Dibaj, P., Kusch, K., Möbius, W., Goetze, B., Jahn, H.M., Huang, W., et al. (2016). Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. *Neuron* 91, 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.016>.
42. Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (2012). Sweet sixteen for ANLS. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1152–1166. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.149>.
43. Ben Haim, L., Schirmer, L., Zulji, A., Sabeur, K., Tiret, B., Ribon, M., Chang, S., Lamers, W.H., Boillée, S., Chaumeil, M.M., and Rowitch, D.H. (2021). Evidence for glutamine synthetase function in mouse spinal cord oligodendrocytes. *Glia* 99, 2812–2827. <https://doi.org/10.1002/glia.24071>.
44. Pellerin, L., Bouzier-Sore, A., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., and Magistretti, P.J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: An update. *Glia* 55, 1251–1262. <https://doi.org/10.1002/glia.20528>.
45. Bak, L.K., Schousboe, A., and Waagepetersen, H.S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* 98, 641–653. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x>.
46. Erzurumlu, R.S., and Gaspar, P. (2012). Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* 35, 1540–1553. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08075.x>.
47. Iwasato, T., Datwani, A., Wolf, A.M., Nishiyama, H., Taguchi, Y., Tonegawa, S., Knöpfel, T., Erzurumlu, R.S., and Itohara, S. (2000). Cortex-restricted disruption of NMDAR1 impairs neuronal patterns in the barrel cortex. *Nature* 406, 726–731. <https://doi.org/10.1038/35021059>.
48. Ballester-Rosado, C.J., Albright, M.J., Wu, C.-S., Liao, C.-C., Zhu, J., Xu, J., Lee, L.-J., and Lu, H.-C. (2010). mGluR5 in Cortical Excitatory Neurons Exerts Both Cell-Autonomous and -Nonautonomous Influences on Cortical Somatosensory Circuit Formation. *J. Neurosci.* 30, 16896–16909. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2462-10.2010>.
49. Hannan, A.J., Blakemore, C., Katsnelson, A., Vitalis, T., Huber, K.M., Bear, M., Roder, J., Kim, D., Shin, H.-S., and Kind, P.C. (2001). PLC- β 1, activated via mGluRs, mediates activity-dependent differentiation in cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* 4, 282–288. <https://doi.org/10.1038/85132>.
50. Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., and Giaume, C. (2008). Gap Junction-Mediated Astrocytic Networks in the Mouse Barrel Cortex. *J. Neurosci.* 28, 5207–5217. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5100-07.2008>.
51. Wallace, H., Glazewski, S., Liming, K., and Fox, K. (2001). The Role of Cortical Activity in Experience-Dependent Potentiation and Depression of Sensory Responses in Rat Barrel Cortex. *J. Neurosci.* 21, 3881–3894. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-11-03881.2001>.
52. Müller, T., Möller, T., Neuhaus, J., and Kettenmann, H. (1996). Electrical coupling among Bergmann glial cells and its modulation by glutamate receptor activation. *Glia* 17, 274–284. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199608\)17:4<274::AID-GLIA2>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199608)17:4<274::AID-GLIA2>3.0.CO;2-#).
53. Höft, S., Griemsmann, S., Seifert, G., and Steinhäuser, C. (2014). Heterogeneity in expression of functional ionotropic glutamate and GABA receptors in astrocytes across brain regions: insights from the thalamus. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 369, 20130602. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0602>.
54. Parri, H.R., Gould, T.M., and Crunelli, V. (2010). Sensory and cortical activation of distinct glial cell subtypes in the somatosensory thalamus of young rats. *Eur. J. Neurosci.* 32, 29–40. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07281.x>.
55. Li, S., and Sheng, Z.-H. (2023). Oligodendrocyte-derived transcellular signaling regulates axonal energy metabolism. *Curr. Opin. Neurobiol.* 80, 102722. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102722>.
56. Kram, K., Goebbels, S., Schwab, M., Jennissen, K., Seifert, G., Steinhäuser, C., Nave, K.-A., and Trotter, J. (2008). NG2-expressing cells in the nervous system revealed by the NG2-EYFP-knockin mouse. *genesis* 46, 743–757. <https://doi.org/10.1002/dvg.20440>.
57. Teubner, B., Michel, V., Pesch, J., Lautermann, J., Cohen-Salmon, M., Söhl, G., Jahnke, K., Winterhager, E., Herberhold, C., Hardelin, J.P., et al. (2003). Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum. Mol. Genet.* 12, 13–21. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg001>.
58. Nelles, E., Bützler, C., Jung, D., Temme, A., Gabriel, H.D., Dahl, U., Traub, O., Stümpel, F., Jungermann, K., Zielasek, J., et al. (1996). Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9565–9570. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9565>.
59. Long, S.Y. (1972). Hair-nibbling and whisker-trimming as indicators of social hierarchy in mice. *Anim. Behav.* 20, 10–12. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(72\)80167-2](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(72)80167-2).
60. Strozik, E., and Festing, M.F. (1981). Whisker trimming in mice. *Lab. Anim.* 15, 309–312. <https://doi.org/10.1258/002367781780953040>.
61. Tukey, J.W. (1977). *Exploratory Data Analysis* (Reading, Mass.: Addison-Wesley Pub. Co.), pp. 83–91.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies and biotin-binding proteins (streptavidin)		
Chicken anti-GFP	Abcam	Cat# ab13970; RRID:AB_300798
Rabbit anti-β-Gal	Invitrogen	Cat# A-11132; RRID:AB_221539
Mouse anti-APC mAB	Calbiochem	Cat# OP80
Goat anti-chicken Alexa Fluor 488	Invitrogen	Cat# A-11039; RRID:AB_142924
Goat anti-mouse Alexa Fluor 488	Invitrogen	Cat# A-11029; RRID:AB_2534069
Goat anti-mouse Alexa Fluor 647	Invitrogen	Cat# A-21235; RRID:AB_2535805
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488	Invitrogen	Cat# A-11034; RRID:AB_2576217
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 647	Invitrogen	Cat# A-21244; RRID:AB_2535812
Streptavidin, Alexa Fluor 647 conjugate	Invitrogen	Cat# S-32357; RRID:AB_2336066
Streptavidin, Alexa Fluor 488 conjugate	Invitrogen	Cat# S-11223; RRID:AB_2315383
Streptavidin, Cy3 conjugate	Sigma-Aldrich	Cat# S6402
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
Tetrodotoxin citrate	Abcam	Cat# ab120055; CAS: 18660-81-6
ω-conotoxin GVIA	Sigma-Aldrich	Cat# C9915; CAS: 106375-28-4
ω-conotoxin GVIA	Alomone Labs	Cat#C-300; CAS: 106375-28-4
Biocytin	Sigma-Aldrich	Cat# B4261; CAS: 576-19-2
Texas Red Dextran MW 3000	Invitrogen	Cat# D-3328
Sulforhodamine 101	Sigma-Aldrich	Cat# S7635; CAS: 60311-02-6
Hoechst 33342	Invitrogen	Cat# H1399; CAS: 23491-52-3
Sulforhodamine 101	Sigma-Aldrich	Cat# S7635; CAS: 60311-02-6
Experimental models: Organisms/strains		
Mouse: C57BL6/J (Charles River, Sulzfeld; Germany)	Colony maintained at the facility of the University of Bonn	N/A
Mouse: PLP-GFP (Fuss et al. ³²)	Colony maintained at the facility of the University of Bonn	N/A
Mouse: NG2kiYFP (Karram et al. ⁵⁶)	Colony maintained at the facility of the University of Bonn	N/A
Mouse: Cx30kiLacZ (Teubner et al. ⁵⁷)	Colony maintained at the facility of the University of Bonn	N/A

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Mouse: Cx32 KO (Nelles et al. ⁵⁸)	Colony maintained at the facility of the University of Bonn	N/A
Mouse: hGFAPcre x Cx43 fl/fl (Tress et al. ³³)	Colony maintained at the facility of the University of Bonn	N/A
Mouse: Cx47kiEGFP (Tress et al. ³³)	Colony maintained at the facility of the University of Bonn	N/A

Software and algorithms

ImageJ	NIH	https://fiji.sc/or https://imagej.nih.gov/ij/ ; RRID:SCR_002285
Igor Pro 7.0	WaveMetrics	https://www.wavemetrics.com RRID:SCR_000325
R v3.5.2	R Core Team (2018)	http://www.R-project.org/ RRID:SCR_001905
LAS AF/LAS X	Leica	https://www.leica-microsystems.com/products/microscope-software/p/leica-las-x-ls/ RRID:SCR_013673
MC Stimulus II	Multi Channels Systems	https://www.multichannelsystems.com/software/mc-stimulus-ii
Tida v5.24	HEKA	https://www.heka.com/ RRID:SCR_014582

EXPERIMENTAL MODEL

Mice

Experiments were performed in wildtype C57BL6/J (Charles River, Sulzfeld, Germany or bred in-house), Cx30kiLacZ,⁵⁷ Cx32KO,⁵⁸ Cx47kiEGFP,³³ hGFAPcre x Cx43fl/fl,³³ myelin proteolipid protein-GFP (PLP-GFP)³² and NG2kiYFP⁵⁶ mice of either sex. Age of mice was between postnatal days (p) p14-17, if not indicated otherwise; for whisker trimming experiments mice of p12-17 were used. Mice were kept under standard housing conditions with 12 h day/night shift and food/water *ad libitum*. All experiments were carried out in accordance with local, state, and European regulations (animal license 81-02.04.2020.A226).

METHOD DETAILS

Slice preparation

Mice were anesthetized with isoflurane (Primal Healthcare, Morpeth, UK) and decapitated. Brains were dissected, cut into two hemispheres, and the cutting surface was placed on a 30° block. A small piece of the ventral part was cut off vertically at the angular edge, and the hemisphere was glued with the ventral cutting surface facing down on a 5° block, rostral part pointing downwards. This preparation resulted in a cutting plane tilted up 5° anteriorly and 30° laterally from the horizontal allowing visualization of barreloids in acute brain slices.¹⁷ The specimen holder was transferred to a chamber filled with ice-cold, preparation solution (87 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 7 mM MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 25 mM glucose, 61 mM sucrose) bubbled with carbogen (95% O₂/5% CO₂) and the tissue was cut into 200 μm thick horizontal slices using a vibratome (VT1200S, Leica Microsystems). Subsequently, slices were transferred into preparation solution for 20 min (35°C, gassed with carbogen) and then incubated in artificial cerebrospinal fluid (aCSF: 1.25 mM NaH₂PO₄, 126 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 26 mM NaHCO₃, gassed with carbogen) (pH 7.4), supplemented with 1 μM sulforhodamine 101 (SR101; S7635, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) at 35°C for 20 min. Afterward, the slices were stored in aCSF gassed with carbogen at room temperature. For activity-dependent coupling experiments slices were incubated either in aCSF with 0.5 μM tetrodotoxin (TTX) (Abcam, ab120055) and 0.5 μM CTX (Sigma Aldrich, C9915; C-300, Alomone Labs, Jerusalem, Israel) or just with aCSF (room temperature, 3–4 h). Finally, slices were checked for visible barreloids on an upright microscope (Eclipse E600FN, Nikon, Germany). If not stated otherwise, chemicals were purchased from AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany), Fluka and Carl Roth (Karlsruhe, Germany).

Electrophysiological recordings

Slices were transferred to a recording chamber and continuously perfused with carbogen-gassed aCSF with or without 0.5 μM TTX and 0.5 μM CTX (room temperature). Cells were visualized using an upright microscope equipped with infrared differential interference contrast using 60× water immersion objectives (Eclipse E600FN, Nikon). Patch pipettes were fabricated from borosilicate glass capillaries (Science Products, Hofheim, Germany) by a horizontal puller (DMZ Zeitz-Puller, Zeitz, Martinsried, Germany) and had a resistance of 3–6 MΩ. Pipette solution was composed of (in mM): 130 K-gluconate, 1 MgCl₂, 3 Na₂-ATP, 10 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES), 10 ethylene-glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid (EGTA), supplemented with 0.5% N-biotinyl-L-lysine (Biocytin, Sigma Aldrich,

B4261) and 0.1% Texas Red Dextran (3000 MW, Invitrogen, D3328) (pH 7.2). In this study, recordings were exclusively obtained from astrocytes located in the center of the barreloid fields. They were identified by their SR101 fluorescence, their morphological characteristics, passive current patterns, very negative resting membrane potentials and a low membrane resistance. For the analysis of gap junction coupling, an astrocyte within the barreloid field was filled with biocytin and Texas Red Dextran by the patch pipette (20 min, room temperature). Recordings were performed in the whole cell configuration with a holding potential of -80 mV; liquid junction potential (-7 mV) was corrected online. Currents were recorded by applying 10 mV voltage steps every 10 min to determine input and series resistance. The following exclusion criteria have been defined: resting potential > -60 mV, membrane resistance >10 M Ω , series resistance >20 M Ω . An EPC9 amplifier (Heka, Lambrecht, Germany) was used; signals were filtered at 3 or 10 kHz and sampled at 10 or 30 kHz. TIDA 5.25 software (HEKA) and Igor Pro 6.37 software (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) were used for data acquisition and analysis. After recording, slices were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4, 4°C, overnight) and stored in 0.1 M PBS.

Visualization of tracer coupling

To assess cell-to-cell coupling after recording, biocytin spread within the glial networks was visualized. Therefore, slices were washed (3x with 0.1 M PBS, 10 min each) and subsequently incubated with 2 or 5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) and 10% normal goat serum (NGS) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) in PBS (2 h, room temperature) to block unspecific bindings sites. Afterward, slices were incubated with primary antibodies in PBS containing 2% NGS and 0.1% Triton over night at 4°C. The following antibodies were used: 1:600 Alexa Fluor 647 streptavidin conjugate (Invitrogen, S32357); 1:600 Alexa Fluor 488 streptavidin conjugate (Invitrogen, S11223); 1:300 streptavidin conjugated Cy3 (Sigma S6402); 1:500 chicken-*anti*-GFP (Abcam ab13970); 1:500 rabbit-*anti*- β -Gal (Invitrogen, A-11132); 1:500 mouse-*anti*-APC (CC-1) mAb (Calbiochem, OP80, monoclonal). The next day, slices were washed (3x times in PBS, 10 min each), and then incubated in PBS with 2% NGS and 0.1% Triton together with the corresponding secondary antibody (room temperature, 2 h). The following secondary antibodies were used: 1:500 goat-*anti*-chicken Alexa Fluor 488 (Invitrogen A-11039); 1:500 goat-*anti*-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen A-11034); 1:500 goat-*anti*-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen A-11029); 1:500 goat-*anti*-mouse Alexa Fluor 647 (Invitrogen A-21235); 1:500 goat-*anti*-rabbit Alexa Fluor 647 (Invitrogen A-21244). Since SR101 is not fixable it did not interfere with biocytin visualization. The slices were washed with PBS (3x, 10 min each), stained with Hoechst 33342 (1:100 in dH₂O) (Invitrogen, H1399) (10 min, room temperature) and washed again with PBS (3x, 10 min each). Then, slices were mounted on microscope slides covered with cover glasses using Aqua-Poly/Mount (Polysciences Europe, 18606) and stored at 4°C.

Immunohistochemistry

Mice were anesthetized and transcardially perfused with ice-cold PBS followed by 4% ice-cold PFA in PBS.¹⁷ Dissected brains were postfixed in 4% PFA overnight and transferred to PBS (4°C). Brains were cut on a vibratome (VT1200 S, Leica Microsystems) into 40 μ m thick horizontal slices with the cutting plane tilted up 5° anteriorly and 30° laterally from the horizontal and stored until staining in PBS supplemented with NaN₃ (100 mg/L). They were washed (PBS, 3x, 10 min each) and blocked with 10% NGS (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) in PBS (2 h, room temperature). After washing (PBS, 3x, 10 min each), slices were incubated with primary antibodies in PBS containing 5% NGS and 0.1% Triton X-100 (4°C, overnight). The following antibodies were used: 1:500 chicken-*anti*-GFP (Abcam ab13970); 1:500 mouse-*anti*-APC (CC-1) mAb (Calbiochem, OP80, monoclonal). The next day, slices were washed (PBS, 3x, 10 min each) and incubated in PBS with 5% NGS and 0.1% Triton containing the corresponding secondary antibodies (room temperature, 2 h): 1:500 goat-*anti*-chicken Alexa Fluor 488 (Invitrogen A-11039); 1:500 goat-*anti*-mouse Alexa Fluor 647 (Invitrogen A-21235). The slices were washed (PBS, 3x, 10 min each) and stained with 1:100 Hoechst 33342 (Invitrogen H1399) in dH₂O (10 min, room temperature). After wash (PBS, 3x, 10 min each), slices were mounted on microscope slides covered with cover glasses using Aqua-Poly/Mount (Polysciences Europe 18606) and stored at 4°C.

Whisker trimming

Trimming experiments were performed with C57Bl6/J mice between p12 and p16, a period in which the barreloids are visible in the VPM, whisking is active and eyes are open.²⁰ Before trimming, the animals were allowed to get familiar with the experimenter's hand, microscope stage and trimming devices. Animals were carefully fixed by hand during trimming, and macrovibrissae of the rows A-E were trimmed on one side of the snout down to follicle base (length <1 mm) under microscopic control (Stemi 2000 with eyepiece PL 10x/23 spectacle focusing, Zeiss) using microsurgical scissors. The trimmed snout side was alternated among litter. Sham control animals were handled similarly, except their whiskers were not trimmed but mimicked to be trimmed using flat scissors or a pair of tweezers. After trimming, animals were kept together with their mother and littermates in an enriched cage (cardboard tube, square) to enhance whisker-based exploration.²² Mice were not re-trimmed, and gap junction coupling was investigated at different time points after trimming (3–6 h, 13–23 h, 1dpt and 2dpt). Time after trimming refers to the time point when a cell was electrophysiologically characterized and filled with the tracer. Mice with damaged or not normally developed whisker architecture, as a consequence of natural whisker trimming by littermates or the parents,^{59,60} were excluded. Whisker pad architecture is always represented in the contralateral thalamic barreloids. Thus, ipsilateral slices of the VPM represent the untrimmed control side, and contralateral slices the trimmed side of the snout. Data were always compared in corresponding ipsi-vs. contralateral slices.

Preparation of brain tissue for RT-qPCR

To examine connexin expression, reverse transcription-semiquantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed. Tissue samples of the VPM of the thalamus from mice of both genders (p5 – 45) were dissected from 200 μ m thick brain slices. Total RNA was isolated with Trizol (Ambion), precipitated with isopropanol, washed and dissolved in 10 μ L DEPC-treated water. Genomic DNA was removed by DNase treatment in a mixture containing PCR buffer, 2.5 mm MgCl₂, 10 mm DTT (all Invitrogen), 20 U DNaseI (Roche), and 40 U RNase inhibitor (Promega; final volume 20 μ L; incubation at 37°C for 30 min). Subsequently, mRNA was isolated using oligo(dT)25-linked Dynabeads (Invitrogen). Dynabeads suspended in lysis buffer (20 μ L) were added to the reaction tube. After wash (100 μ L), beads with the adherent mRNA were suspended in DEPC-treated water (20 μ L), frozen, and stored at –20°C.

RT-qPCR

The reaction mix of the RT reaction contained first strand buffer, dithiothreitol (10 mM), deoxynucleoside triphosphates (4 $\times$ 250 μ M; all from Thermo Fisher Scientific), random hexamer primers (50 μ M; Roche Diagnostics), RNase inhibitor (40 U; Promega), and SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U; Thermo Fisher Scientific). The reaction mix (21 μ L) and mRNA (20 μ L) were incubated at 37°C for 1 h. The reaction volume for real-time PCR contained PCR mastermix (Taqyon, Eurogentec), TaqMan gene expression assay, and 1 μ L cDNA; final volume was 12.5 μ L. The reaction mix without cDNA served as a negative control. Samples were incubated at 50°C (2 min) and denatured at 95°C (10 min), followed by 50 cycles of PCR (denaturation at 95°C for 15 s; primer annealing and extension at 60°C for 1 min). Fluorescence intensity was readout during each annealing/extension step (CFX384 PCR System, Bio-Rad Laboratories). Information about the TaqMan gene expression assay is listed in Table 1. Relative gene expression was determined by comparing threshold cycle values of the target genes with those of the reference gene β -actin at the same fluorescence emission intensity. The relative quantification of different genes was determined according to the equation:

$$X_{Cx} / X_{\beta\text{-actin}} = E_{\beta\text{-actin}}^{CT_{\beta\text{-actin}}} / E_{Cx}^{CT_{Cx}} \quad (\text{Equation 1})$$

where $X_{Cx}/X_{\beta\text{-actin}}$ is the gene ratio, and $CT_{\beta\text{-actin}}$ and CT_{Cx} are the threshold cycle numbers of β -actin and Cx, and $E_{\beta\text{-actin}}$ and E_{Cx} the amplification efficiencies of β -actin and Cx genes, respectively.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

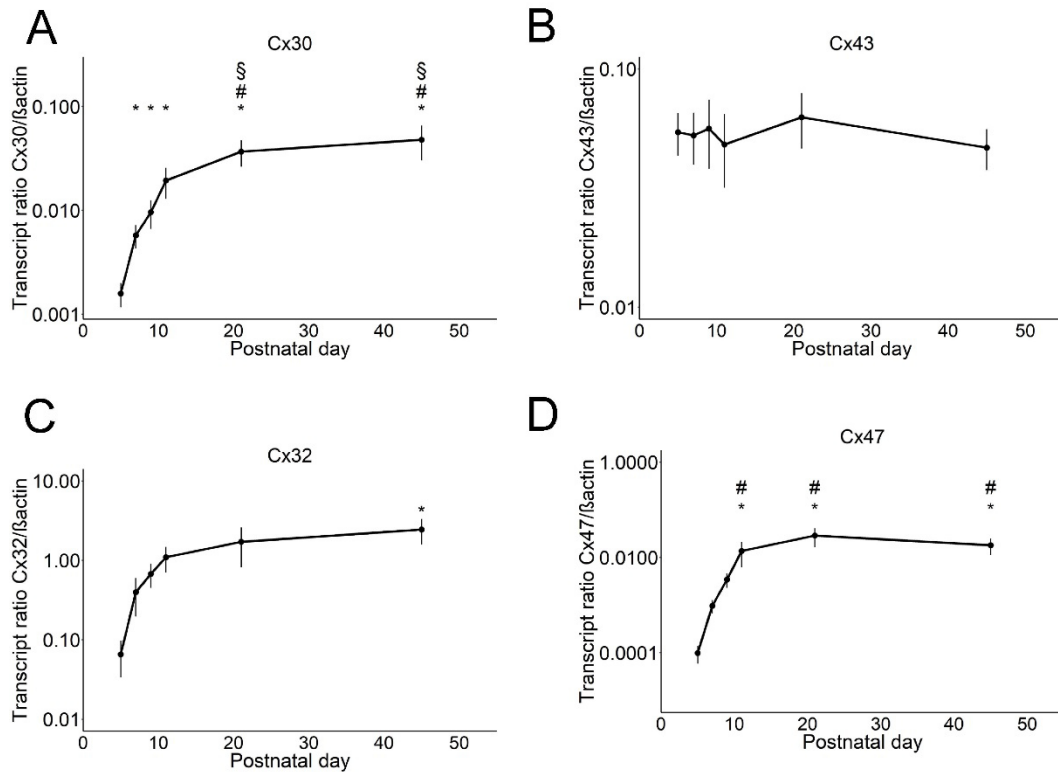
Images were acquired with a confocal laser scanning microscope (TCS SP8 Leica) using 10 $\times$ and 20 $\times$ objectives. Individual optical planes were taken at an interval of 2 μ m (gap junction coupling) or 1 μ m (co-localization with cell markers). Biocytin-positive cells were counted through the z stack with the cell counter plugin of Fiji/ImageJ. Data were averaged per mouse and finally averaged over the number of mice. To identify oligodendrocytes or astrocytes in the biocytin-labeled network, tissue was co-stained with respective cell type-specific markers. In Cx30kILacZ mice, uncoupled biocytin-positive cells were not considered in the analysis. To test whether anti-CC1 antibody is suited to identify oligodendrocytes in the thalamus, co-localization with fluorescent cells in z-planes of PLP-GFP and NG2-YFP mice was quantified. Counting was performed by two different persons blinded to the experimental condition. Images displayed in the figures are maximum intensity projections (MIPs) of a representative region of interest (ROI). Hoechst staining and Texas Red Dextran are not shown in the figures. Data were analyzed using R software (R Core Team (2020), R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, version 4.0.2). Homogeneity of variance between groups was tested using Levene's test. Normal distribution was checked with Shapiro-Wilk test. In case of violation of normality, data were transformed using Tukey's Ladder of Powers⁶¹ or an appropriate non-parametric test was used. A two sample t-test with or without Welch correction for equal or diverse variance and Wilcoxon rank-sum test was applied for comparison of two independent groups. Interaction effects of variables were checked by running two-way analysis of variance (ANOVA). Data are given as mean $\pm$ standard deviation (SD) or as boxplots representing median (central line), first and third quartiles (25th and 75th percentile). Whiskers extend to the highest and lowest observation within 1.5 times the interquartile range (IQR). Extreme outliers (first quartile minus 3 times IQR or third quartile plus IQR) were excluded from the analysis. Number of mice (N) per condition is given in the figures, number of slices or cells (n) is given in figure legends or results. Differences in means were regarded as significant at $p < 0.05$.

Supplemental information

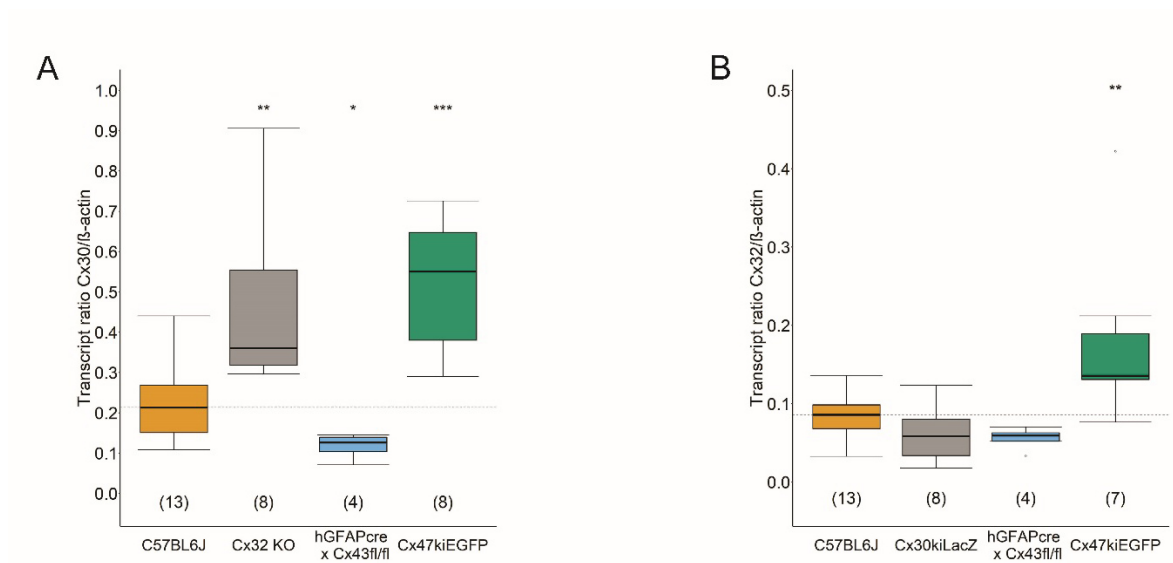
Activity dependent modulation of glial gap junction coupling in the thalamus

Paula Baum, Anna Beinhauer, Lara Zirwes, Linda Loenneker, Ronald Jabs, Rajeevan T. Narayanan, Marcel Oberlaender, Gerald Seifert, Helmut Kettenmann, and Christian Steinhäuser

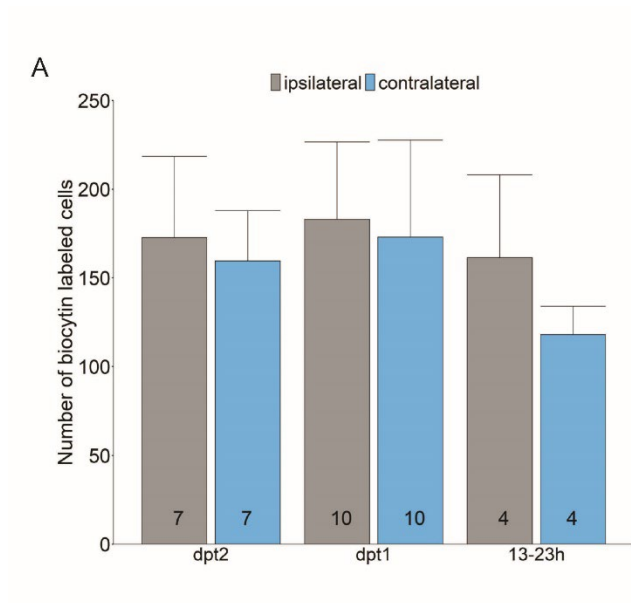
Supplemental Information



Suppl. Figure 1. Developmental regulation of Cx30, 43, 32 and 47 mRNA expression in the VPM. Gene expression ratios of Cx isoform/ β -actin according to equation (1) were plotted against postnatal age (p5, 7, 9, 11, 21, 45) ($n = 4$ to 9 samples per isoform). Data are depicted as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Significant differences between p5 and other ages are indicated by (*), between p7 and older (#), and between p9 and older by (§). One way ANOVA and Tukey post-hoc test ($p < 0.05$) on log-transformed data or Kruskal-Wallis test followed by Dunn test. (A) Cx30: p5: 0.0016 ± 0.0004 ; p7: 0.0057 ± 0.0015 ; p9: 0.0096 ± 0.0029 ; p11: 0.0194 ± 0.0065 ; p21: 0.0368 ± 0.0104 ; p45: 0.0479 ± 0.0176 . (B) Cx43: p5: 0.0543 ± 0.0110 ; p7: 0.0526 ± 0.0130 ; p9: 0.0562 ± 0.0180 ; p11: 0.0482 ± 0.0164 ; p21: 0.0627 ± 0.0164 ; p45: 0.0467 ± 0.0091 . (C) Cx32: p5: 0.0656 ± 0.0319 ; p7: 0.3983 ± 0.2021 ; p9: 0.6769 ± 0.2288 ; p11: 1.0953 ± 0.3913 ; p21: 1.7105 ± 0.8907 ; p45: 2.4444 ± 0.8633 . (D) Cx47: p5: $9.88e-05 \pm 3.96e-05$; p7: $0.0010 \pm 3.01e-04$; p9: $0.0034 \pm 1.16e-03$; p11: $0.0137 \pm 7.48e-03$; p21: $0.0288 \pm 1.23e-02$; p45: $0.0181 \pm 6.77e-03$.



Suppl. Figure 2. (A) Altered Cx30 mRNA expression in the thalamus of Cx ko mice. Box plots compare Cx30 vs. β -actin transcript levels for VPM samples from control mice (0.2133, 0.1510 to 0.2687, $n = 48$, $N = 13$) with samples from Cx ko mice (Cx32 KO: 0.3603, 0.3181 to 0.5546, $n = 24$, $N = 8$, $p = 0.002085$; Cx47kiEGFP: 0.5511, 0.3801 to 0.6476, $n = 25$, $N = 8$, $p = 0.0008823$; hGFAPcre x Cx43fl/fl: 0.12623, 0.10379 to 0.13952, $n = 12$, $N = 4$, $p = 0.04515$). Dashed line indicates mRNA level in control samples. Asterisks indicate statistically significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Two sample t-test (hGFAPcre x Cx43fl/fl), Welch two sample t-test (Cx47kiEGFP) or Wilcoxon rank sum test (Cx32 KO). (B) Altered Cx32 mRNA expression in the thalamus of Cx ko mice. Box plots compare Cx32 vs. β -actin transcript levels for VPM samples from control mice (0.08605, 0.06821 to 0.09851, $n = 48$, $N = 13$) with Cx ko mice (Cx30kiLacZ: 0.05852, 0.03390 to 0.08035, $n = 24$, $N = 8$; hGFAPcre x Cx43fl/fl: 0.05941, 0.05206 to 0.06297, $n = 12$, $N = 4$; Cx47kiEGFP: 0.13547, 0.13094 to 0.18927, $n = 22$, $N = 7$, $p = 0.003541$. Two sample t-test on log-transformed data). Box plots represent median and quartiles. Number of mice is given in brackets.



Suppl. Figure 3. Glial coupling efficiency in the VPM recovers at later time points after whisker trimming. Unilateral whisker trimming in C57BL6/J mice at p13-16 and analysis of tracer spread 2dpt, 1dpt or 13 – 23 h later did not reveal changes in coupling efficiency between the trimmed (contralateral) and control side (ipsilateral). Bar graphs represent mean $\pm$ SD. Number of mice is given in bar graphs. Two sample t-test.