

**Einfluss des Aquaporin 4 Kanals auf die  
Kaliumpufferung und die *Gap junction* Kopplung  
im Hippocampus der Maus**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Susan Stroschein**

aus

Rodewisch

Bonn, Oktober 2011

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Steinhäuser

2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Bleckmann

Tag der Promotion: 19. 10. 2012

Erscheinungsjahr: 2012

## **Danksagung**

Ich möchte mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Christian Steinhäuser für die Bereitstellung des Themas, die engagierte Betreuung und die hilfreichen Kommentare zu dieser Arbeit bedanken.

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

Bei Herrn Prof. Dr. Uwe Heinemann bedanke ich mich für die Möglichkeit, die Kaliummessung in seiner Arbeitsgruppe „Physiologie und Pathophysiologie hippocampaler Formationen“ am Institut für Neurophysiologie der Charité durchzuführen. Besonders herzlich danke ich Frau Dr. Sigrun Gabriel, die eine große Hilfe bei der Realisierung der Messung war.

Herrn PD Dr. Ronald Jabs danke ich für die Unterstützung und hilfreichen Diskussionen bei allen Fragen rund um die FRAP Experimente.

Für die technische Unterstützung bedanke ich mich bei Ina Fiedler und Thomas Erdmann.

Für die Motivation während der Erstellung des Manuskripts und die kritische Durchsicht des Textes geht ein riesen großes Danke an Dr. Alexandra Wyczynski, Dr. Ines Nauroth und Christian Haberlandt. Außerdem möchte ich ihnen für die vielen vergnüglichen Stunden, in denen wir die rheinländische Frohnatur erforscht haben, danken.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung und die aufmunternden Worte in den schwierigen Momenten, die mit einer Dissertation verbunden sind.

---

Abkürzungsverzeichnis .....	7
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>9</b>
1.1. Anatomie und Funktion des Hippocampus .....	9
1.2. Gliazellen .....	11
1.2.1 NG2 Zellen und GluR Zellen .....	11
1.2.2 Astrozyten.....	12
1.3. <i>Gap junctions</i> vermitteln die interzelluläre Kommunikation zwischen Astrozyten....	13
1.3.1 Allgemeiner Aufbau von <i>Gap junctions</i> .....	13
1.3.2 <i>Gap junctions</i> in Astrozyten.....	14
1.4. K <sup>+</sup> - Kanäle.....	15
1.4.1 Aufbau und Klassifizierung von K <sup>+</sup> - Kanälen .....	15
1.4.2 K <sup>+</sup> - Kanäle in Astrozyten .....	15
1.4.3 K <sup>+</sup> - Homöostase im ZNS .....	17
1.5. Transmembrantransport von Wasser .....	18
1.5.1 AQP4 Kanal .....	19
1.5.2 Rolle des AQP4 Kanals bei pathologischen Prozessen .....	20
1.6. Zusammenhang zwischen dem Kir4.1 Kanal und dem AQP4 Kanal.....	21
1.7. Zielsetzung.....	23
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1. Tiere.....	24
2.1.1 AQP4 <sup>tm1Ask</sup> Maus .....	24
2.1.2 ICR - (CD1®) Maus .....	24
2.1.3 C57black/6J Maus.....	24
2.1.4 Cx30 <sup>-/-</sup> ,Cx43 <sup>fl/fl</sup> :hGFAPcre Maus .....	24
2.1.5 NG2 - EYFP Maus .....	25
2.1.6 Cx43 - ECFP Maus .....	25
2.2. Material .....	26
2.2.1 Lösungen für Patch - Clamp Messungen .....	26
2.2.2 Lösungen für histochemische Analyse .....	27
2.2.3 Lösungen für extrazelluläre K <sup>+</sup> - Messungen .....	27

---

2.3. Kopplungsanalysen mit der gap - FRAP Methode .....	28
2.3.1 Prinzip der Messungen .....	28
2.3.2 Präparation der coronalen Hippocampusschnitte .....	29
2.3.3 Vorversuch: Relaxation von CFDA .....	30
2.3.4 Vorversuch: Aufnahme von CFDA in Astrozyten .....	30
2.3.5 Applikation von CFDA .....	31
2.3.6 gap - FRAP Experimente .....	32
2.3.7 Auswertung der gap - FRAP Experimente .....	34
2.4. Patch - Clamp Messungen und Kopplungsanalysen.....	36
2.4.1 Prinzip der Messungen .....	36
2.4.2 Elektrophysiologischer Messplatz .....	37
2.4.3 Elektrophysiologische Messungen .....	37
2.4.4 Stimulationsprotokolle .....	38
2.4.5 Identifikation der Astrozyten.....	39
2.4.6 Biozytinvisualisierung .....	39
2.4.7 Auswertung der Kopplungsexperimente.....	40
2.5. Messung des Feldpotentials und der $[K^+]_o$ .....	40
2.5.1 Prinzip der Messungen .....	40
2.5.2 Präparation der horizontalen Hippocampusschnitte .....	41
2.5.3 Herstellung ionensensitiver Mikroelektroden.....	42
2.5.4 Herstellung bipolarer Reizelektroden.....	43
2.5.5 Interfacekammer .....	43
2.5.6 Positionierung der Meß- und Stimulationselektrode.....	43
2.5.7 Messung und Auswertung der Feldpotentiale und der $[K^+]_o$ .....	44
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
3.1. Einfluss des AQP4 Kanals auf die Kopplungseigenschaften von Astrozyten im Hippocampus der Maus .....	46
3.1.1 Kopplungsanalysen mit der gap - FRAP Methode .....	46
3.1.2 CFDA ist ein geeigneter Farbstoff für gap - FRAP Experimente .....	47
3.1.3 Astrozyten können durch Inkubation der Schnitte in einer CFDA - Lösung gefärbt werden .....	50
3.1.4 Mit der gap - FRAP Methode war die quantitative Bestimmung der Kopplung begrenzt realisierbar.....	51
3.1.5 Untersuchung der Gap junction Kopplung durch Biozytininjektion.....	58

---

---

3.1.6 Die Gap junction Kopplung in der CA1 Region ist in adulten AQP4ko Mäusen höher.....	58
3.1.7 In juvenilen AQP4ko Mäusen erfolgt vermutlich eine schnellere Reifung der astrozytären Kopplung.....	60
3.2. Einfluss des AQP4 Kanals auf die K <sup>+</sup> - Pufferung im Hippocampus der Maus.....	68
3.2.1 Nach neuronaler Stimulation ist der Anstieg der [K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> in AQP4ko Mäusen geringer.....	69
3.2.2 Der Abbau der [K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> ist in AQP4ko Mäusen verzögert .....	76
3.2.3 Die Verteilung des [K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> im astroglialen Syncytium der CA1 Region ist in AQP4ko Mäusen verändert .....	80
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>83</b>
4.1. Einfluss des AQP4 Kanals auf die <i>Gap junction</i> Kopplung.....	83
4.1.1 Untersuchung der Kopplung mit der gap - FRAP Methode.....	83
4.1.2 Schlussfolgerungen für die weitere Anwendung der gap - FRAP Methode.....	86
4.1.3 Einfluss des AQP4 Kanals auf die Gap junction Kopplung in adulten Mäusen.....	87
4.1.4 Einfluss des AQP4 Kanals auf die Entwicklung der Gap junction Kopplung in juvenilen Mäusen .....	88
4.1.5 Zusammenfassung der Kopplungsanalysen .....	89
4.2. Einfluss des AQP4 Kanals auf die K <sup>+</sup> - Pufferung in adulten Mäusen.....	90
4.2.1 Messung der [K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> im Stratum pyramidale nach neuronaler Stimulation.....	91
4.2.2 Abfall der [K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> nach neuronaler Stimulation .....	92
4.2.3 Umverteilung des [K <sup>+</sup> ] <sub>o</sub> im EZR .....	93
4.3. Zusammenhang zwischen der K <sup>+</sup> - Pufferung und der höheren Gap junction Kopplung in AQP4ko Mäusen.....	94
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>95</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>97</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
Eidesstattliche Erklärung.....	108

---

**Abkürzungsverzeichnis**

$[K^+]_o$	extrazelluläre Kalium - Konzentration
$[Na^+]_i$	intrazelluläre Natrium - Konzentration
$\Delta[K^+]_o$	Veränderung der extrazellulären Kaliumkonzentration
$\Delta F$	Differenz zwischen dem Maximum der Fluoreszenz und der Rest - Fluoreszenz nach dem Bleichen
ACSF	artefizielle Zerebrospinalflüssigkeit ( <i>artificial cerebrospinal fluid</i> )
AMPA Rezeptor	ionotroper Glutamatrezeptor, der mit $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA) aktiviert wird
AN2	Homolog zu NG2 in Mäusen
AQP	Aquaporin
CA	Ammonshorn ( <i>Cornu ammonis</i> )
CFDA	5,6-Carboxyfluoresceindiacetat
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxaline 2,3-dion
Cx	Connexin
Cy3	Cyanin
DGC	Dystrophin - Glykoproteinkomplex ( <i>dystrophin glycoprotein complex</i> )
DKO Maus	doppel <i>knock out</i> Maus (Cx30 <sup>-/-</sup> , Cx43 <sup>fl/fl</sup> :hGFAPcre Maus)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECFP	verstärktes, blau fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced cyan fluorescent protein</i> )
$E_K$	Kalium - Gleichgewichtspotential
EYFP	verstärktes, gelb fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced yellow fluorescent protein</i> )
EZR	Extrazellularraum
FRAP	Fluoreszenzrückkehr nach Ausbleichen eines Farbstoffes ( <i>fluorescence recovery after photobleaching</i> )
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
gap - FRAP	Fluoreszenzrückkehr durch Farbstoffdiffusion aus gekoppelten Zellen

---

GFAP	gliales fibrilläres saures Protein ( <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
GluR	ionotroper Glutamatrezeptor
IR - DIC	Infrarot Interferenz Kontrast ( <i>infrared differential interference contrast</i> )
ISM	ionensensitive Mikroelektrode
K <sub>2P</sub> Kanal	zwei - Porendomänen Kalium - Kanal
ki	<i>knock in</i>
K <sub>ir</sub> Kanal	einwärtsgerichteter Kalium - Kanal ( <i>K<sup>+</sup> inwardly rectifying</i> )
ko	<i>knock out</i>
K <sub>v</sub> Kanal	spannungsaktivierter Kalium - Kanal
L-APV	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
LSM	konfokales Laserscanmikroskop
mRNA	messenger - Ribonukleinsäure
n	Anzahl der Stichprobenelemente
NG2	Chondroitinsulfat - Proteoglykan
NMDA Rezeptor	ionotroper Glutamatrezeptor, der durch N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) aktiviert wird
OAP	orthogonaler Partikelkomplex ( <i>orthogonal arrays of particles</i> )
p	postnatales Alter (in Tagen)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
RMP	Ruhemembranpotential
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
SR101	Sulforhodamin 101
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem



## 1. Einleitung

### 1.1. Anatomie und Funktion des Hippocampus

Der Hippocampus als ein Teil des zentralen Nervensystems (ZNS) besitzt vielfältige Aufgaben, die bis heute noch nicht vollständig erforscht sind. Neben seiner Bedeutung für kognitive Prozesse (Lernfunktionen, Gedächtnis) ist vor allem seine Beteiligung an verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie Epilepsie und Alzheimer zu erwähnen.

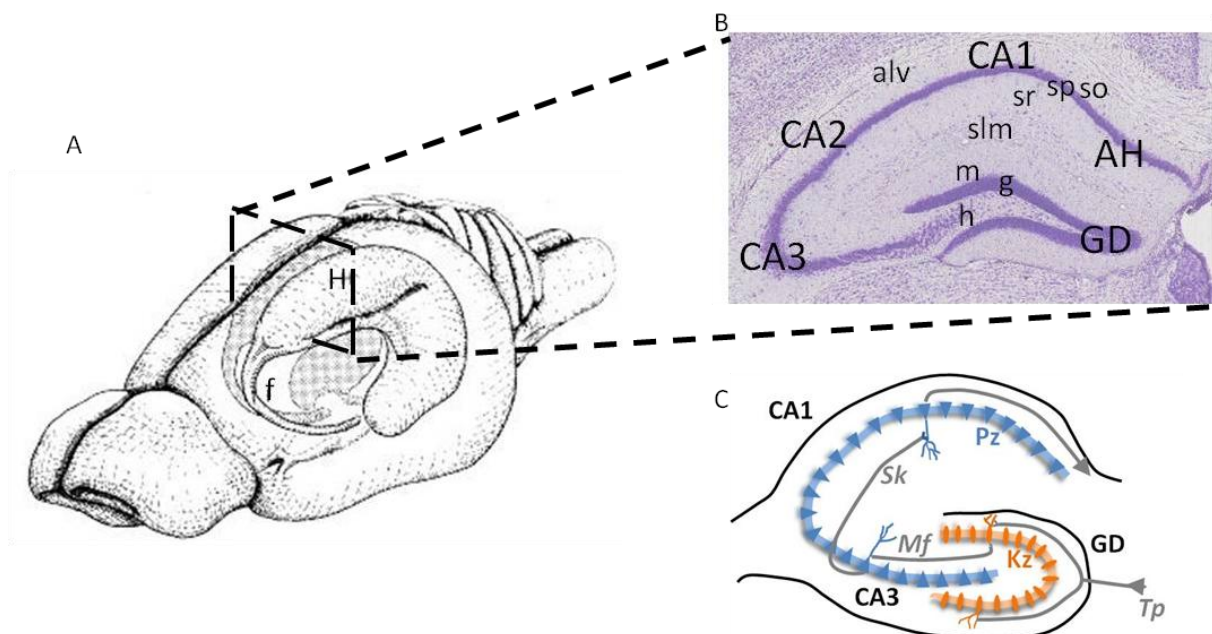
Der Hippocampus ist einer der zentralen Bestandteile des limbischen Systems und gehört zum Archicortex oder Allocortex. Der Hippocampus liegt bogenförmig ausgezogen entlang des Unterhorns des Seitenventrikels im mesialen Temporallappen (Abb. 1A).

Die Hippocampusformation wird in mehrere große Regionen unterteilt: Subiculum, Cornu ammonis (CA; Ammonshorn) und Gyrus dentatus. Das Ammonshorn wird in transversaler Richtung in die Regionen CA1 bis CA3 unterteilt. Jede Region besteht aus vier Schichten: dem Stratum oriens, Stratum pyramidale, Stratum radiatum und dem Stratum lacunosum moleculare. Das Stratum pyramidale wird von den Somata der Pyramidenzellen gebildet. Das Stratum oriens grenzt an den Alveus, der unter dem Ependym des Seitenventrikels liegt. Das Subiculum ist der Übergang vom dreischichtigen, archicorticalen Hippocampus zum sechsschichtigen Neocortex und befindet sich zwischen der CA1 - Region und dem entorhinalen Cortex. Im Gyrus dentatus unterscheidet man drei Schichten: das relativ zellarme Stratum moleculare (Molekularschicht), das Stratum granulare (Körnerzellschicht), das von dicht gepackten Körnerzellen gebildet wird und die polymorphe Schicht im Hilus, die einen hohen Anteil an Mooszellen und verschiedene Interneurontypen aufweist (Abb. 1B).

Der Hippocampus ist durch verschiedene Faserbahnen mit anderen Hirnregionen über extrinsische Verbindungen und zwischen seinen eigenen Regionen über intrinsische Verbindungen synaptisch verknüpft. Informationen erreichen den Hippocampus aus dem Neocortex via entorhinalen Cortex über den Tractus perforans, der hauptsächlich an den Dendriten der Körnerzellen des Gyrus dentatus terminiert. Der Gyrus dentatus stellt somit die Eingangsstruktur des Hippocampus dar. Die Axone der Körnerzellen projizieren unter Ausbildung zahlreicher Kollateraler zu den Pyramidenzellen der CA3 Region im Ammonshorn und bilden das so genannte Moosfasersystem. Von den CA3 Pyramidenzellen entspringen wiederum Axone (Schaffersche Kollaterale), die die CA2 Region durchqueren und die CA1 Pyramidenzellen innervieren.

Vom apikalen Pol der Pyramidenzellen geht ein Dendritenstamm hervor, der bis in das Stratum lacunosum moleculare reicht. Am basalen Pol entspringen zahlreiche Dendriten, welche in das Stratum oriens eindringen. Von den Axonen der CA1 Pyramidenzellen ziehen Kollaterale zu den Pyramidenzellen im Subiculum. Die Axone der Pyramidenzellen des Subiculum bilden mit den Axonen der CA1 und CA3 Pyramidenneurone ein Faserbündel und verlassen als Efferenz den Hippocampus über die Fimbria und ziehen zurück zum entorhinalen Cortex (Abb. 1C).

Somit ergibt sich im Hippocampus eine trisynaptische Verschaltungskette in der i) glutamaterge Afferenzen aus dem entorhinalen Cortex die Körnerzellen des Gyrus dentatus aktivieren, ii) die Körnerzellen über den Moosfasertrakt CA3 Pyramidenzellen innervieren und iii) CA3 Pyramidenzellen über die Schafferschen Kollateralen die CA1 Pyramidenzellen erregen (Frotscher et al., 1988; Amaral und Witter, 1995).



**Abb. 1 Der Hippocampus**

A) Schematische Darstellung der räumlichen Lage der hippocampalen Formation im Rattengehirn (Amaral und Witter, 1995). H, Hippocampus; f, fimbria. B) Nisselfärbung eines coronalen Schnittes im Bereich des Hippocampus. Das Ammonshorn (AH) ist gegliedert in vier gut zu unterscheidende Schichten: Stratum oriens (so), Stratum pyramidale (sp), Stratum radiatum (sr) und Stratum lacunosum moleculare (slm). An das Stratum oriens grenzt der Alveus (alv). Der Gyrus dentatus (GD) ist in drei Schichten unterteilt: Stratum moleculare (m), Stratum granulare (g) und Hilus (h) (Paxinos und Franklin, 2001). C) Schemazeichnung des synaptischen Schaltkreises innerhalb der hippocampalen Formation. Durch den Tractus perforans (Tp) erreichen Axone aus dem entorhinalen Cortex die Dendriten der Körnerzellen (Kz). Die Axone der Körnerzellen, die Moosfasern (Mf), ziehen zu den Pyramidenzellen (Pz) der CA3 Region. Deren Axone, die Schafferschen Kollateralen (Sk), projizieren zu den Pyramidenzellen der CA1 Region. Die Axone der CA1 Pyramidenzellen ziehen u.a. zurück zum entorhinalen Cortex (nach Amaral und Witter, 1995).

## 1.2. Gliazellen

Neurone sind die Zellen des ZNS denen klassischerweise die Aufgabe der Informationsweiterleitung, -kodierung und -speicherung zugeschrieben wird. 1846 wurde von Rudolf Virchow eine weitere Gruppe von Zellen des ZNS entdeckt, die er als Gliazelle (vom Griechischen: Leim) bezeichnete. Die intensive Forschung in den letzten Jahrzehnten in diesem Bereich zeigte, dass die Aufgabe von Gliazellen weit mehr ist, als das von Virchow beschriebene Nervenkitt.

Gliazellen werden in Makrogliazellen und Mikrogliazellen unterteilt. Die Mikrogliazellen sind mesodermalen Ursprungs und eng verwandt mit den Makrophagen und somit die immunkompetenten Zellen des ZNS. Nach Verletzungen oder Infektionen des Gehirns sorgen sie für die erste Immunantwort (Kreutzberg, 1996). Makrogliazellen sind ektodermalen Ursprungs. Man unterscheidet Oligodendrozyten und Astrozyten. Die Oligodendrozyten bilden die Myelinscheide um die Axone und ermöglichen so die schnelle Informationsweiterleitung entlang der Axone (Kettenmann und Ransom, 1995). Den zahlenmäßig größten Anteil der Gliazellen bilden die Astrozyten. Eine Untergruppe der Astrozyten sind die radialen Gliazellen. Zu den radialen Gliazellen zählen u.a. die Bergmann Zellen im Cerebellum und die Müller Zellen in der Retina. Ein weiterer Typ der Makrogliazellen sind die NG2- oder GluR-Zellen (Peters, 2004).

### 1.2.1 NG2 Zellen und GluR Zellen

NG2 Zellen wurden nach der Expression des Chondroitinsulfat - Proteoglykans NG2 benannt. Das Chondroitinsulfat Proteoglykan NG2 ist ein integrales Membranprotein, das zuerst als Oberflächenantigen neuraler Zellen in der Ratte identifiziert und charakterisiert wurde (Stallcup, 1981; Nishiyama et al., 1991; Levine und Nishiyama, 1996). Das Homolog zu NG2 in Mäusen ist AN2. Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich bei diesen Zellen um Oligodendrozytenvorläuferzellen handelt (Bergles et al., 2000; Lin und Bergles, 2004). Inzwischen werden NG2 Zellen als neuer, eigenständiger Typ von Makrogliazellen beschrieben (Polito und Reynolds, 2005; Nishiyama et al., 2009). NG2 Zellen entziehen sich bislang einer Zelltypklassifizierung, da sie sowohl gliale als auch neuronale Eigenschaften aufweisen, beispielsweise die Expression der messenger - Ribonukleinsäure (mRNA) für den neuronalen Glutamat-Transporter EAAC1 (Matthias et al., 2003). Da NG2 Zellen keine Aktionspotentiale generieren, können sie klar von Neuronen abgegrenzt werden. Zu den Astrozyten können sie ebenfalls nicht gezählt werden, da sie nicht das gliale fibrilläre Protein

---

(*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) exprimieren, keinen funktionellen Glutamat-Transporter besitzen und nicht über *Gap junctions* gekoppelt sind (Wallraff et al., 2004). Eine weitere Gruppe von Gliazellen exprimieren funktionelle Glutamat-Rezeptoren (GluR) des AMPA Subtyps (Matthias et al., 2003). Diese Gliazellen werden deshalb als GluR Zellen bezeichnet. Sie weisen eine ähnliche Morphologie wie NG2 Zellen auf. Sowohl NG2 Zellen als auch GluR Zellen werden synaptisch innerviert von glutamatergen und GABAergen Neuronen (Bergles et al., 2000; Lin und Bergles, 2004; Jabs et al., 2005). Die innervierten GluR Zellen sind außerdem NG2 positiv (Jabs et al., 2005). Ein weiteres gemeinsames Merkmal von GluR Zellen und NG2 Zellen sind ihre elektrischen Membraneigenschaften. Das Strommuster von GluR Zellen bzw. NG2 Zellen wird durch spannungs- und zeitabhängige Ströme geprägt, weswegen diese Zellen auch als komplexe Gliazellen bezeichnet werden (Steinhäuser et al., 1994). Das Strommuster dieser Zellen wird durch mehrere Kanal - Typen vermittelt, zum einen von einwärts gleichrichtenden  $K^+$ -Kanäle, die eine höhere Leitfähigkeit in Einwärts- als in Auswärtsrichtung aufweisen und an der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials (RMP) der Zelle beteiligt sind, zum anderen existieren zwei Typen spannungsgesteuerter  $K^+$ -Kanäle, verzögert gleichrichtende  $K^+$ -Kanäle und transiente  $K^+$ -Kanäle, die bei Depolarisation öffnen (Christie, 1995). Des Weiteren spielen spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle (Akopian et al., 1996), verschiedene Typen von  $Cl^-$ -Kanälen (Walz, 2002) sowie spannungsabhängige  $Na^+$ -Kanäle (Verkhratsky und Steinhäuser, 2000) ebenfalls eine Rolle bei der Bildung des Strommusters der komplexen Gliazellen, GluR Zellen bzw. NG2 Zellen.

### 1.2.2 Astrozyten

Astrozyten werden auf Basis ihrer Morphologie und ihrer Lokalisation in zwei Typen eingeteilt, die protoplasmatischen Astrozyten und die fibrillären Astrozyten. Protoplasmatische Astrozyten befinden sich in der grauen Substanz. Diese Astrozyten haben prominente Fortsätze mit zahlreichen kleinen, gleichmäßig verteilten Verzweigungen. Der zweite Typ von Astrozyten, die fibrillären Astrozyten, befindet sich in der weißen Substanz. Typisch für diese Astrozyten sind ihre langen, faserähnlichen Fortsätze, die Kontakte zu den Ranvierschen Knoten ausbilden (Sofroniew und Vinters, 2010). Gemeinsames Merkmale fast aller Astrozyten ist die Expression spezifischer Proteine wie GFAP und des  $Ca^{2+}$  bindenden Proteins S100 $\beta$  (Verkhratsky et al., 1998). Die Fortsätze von Astrozyten bilden auf dem Endothel der Blutgefäße sogenannte Endfüßchen. Diese Endfüßchen

---

beeinflussen den Blutfluss und induzieren die Bildung von *tight junctions* an den Blutgefäßen, welche die Blut - Hirn Schranke bilden. Die Fortsätze der Astrozyten stehen in engen Kontakt mit den Synapsen der Neurone und haben durch die Aufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt Einfluss auf die synaptische Signalübertragung (Kang et al., 1998; Volterra und Steinhäuser, 2004; Angulo et al., 2004). So nehmen Astrozyten über die Glutamatrezeptoren, GLAST und GLT-1, Glutamat aus dem synaptischen Spalt auf. In den Astrozyten wird Glutamat von der Glutaminsynthetase in Glutamin umgewandelt und anschließend wieder in den Extrazellularraum (EZR) abgegeben. Hier wird Glutamin in die Neurone aufgenommen und wieder in einen aktiven Transmitter umgewandelt (Bergles et al., 1999; Oliet et al., 2004).

Eine weitere Aufgabe von Astrozyten ist die Aufrechterhaltung der Ionen- und Wasserhomöostase. Für diese Aufgaben befinden sich auf den Fortsätzen der Astrozyten u.a. Wasserkanäle,  $K^+$ - Kanäle und verschiedene Protonentransporter, wie der  $Na^+/H^+$  Austauscher,  $Na^+$ - Bicarbonattransporter und Monocarbonsäure Transporter. Auf die Regulation der  $K^+$ - und Wasserhomöostase und die hierfür notwendigen Kanäle, wird in den Kapiteln 1.4 und 1.5 näher eingegangen. Essentiell für viele Funktionen von Astrozyten ist die Ausbildung eines astrozytären Netzwerkes (Synzytium). Über dieses Synzytium werden Ionen, Metaboliten und Neurotransmitter umverteilt und somit eine schädliche Akkumulation verhindert (Hansson et al., 2000). Für die Bildung des Synzytiums werden in Astrozyten Connexine (Cx) exprimiert (Brightman und Reese, 1969). Diese Proteine bilden *Gap junctions*, über die benachbarte Astrozyten elektrisch und chemisch verbunden sind (Kuffler et al., 1966).

### **1.3. *Gap junctions* vermitteln die interzelluläre Kommunikation zwischen Astrozyten**

#### *1.3.1 Allgemeiner Aufbau von Gap junctions*

Als *Gap junctions* werden kanalbildende Proteinkomplexe bezeichnet, die benachbarte Zellen miteinander verbinden und der direkten zellulären Kommunikation zwischen den Zellen dienen (Saez et al., 2003). Über diese Kanäle werden durch passive Diffusion Ionen und kleine Moleküle (bis zu 1 kDa) zwischen benachbarten Zellen transportiert. *Gap junctions* werden durch die Proteinfamilie der Connexine (Cx) gebildet. Jedes Connexin besitzt vier Transmembrandomänen mit zwei extrazellulären Schleifen, eine cytoplasmatische Schleife und intrazelluläre Carboxy - und Amino - Enden. Jeweils sechs Connexine bilden in der Zellmembran einen Halbkanal (Connexon), der eine hydrophile Pore

mit einem Durchmesser von 1,6 nm bildet. Über hydrophobe Wechselwirkungen können sich Connexone der Nachbarzellen zu einer durchgehenden Pore (*Gap junction*) verbinden. In der Zellmembran sind *Gap junction* Kanäle als sogenannte *Gap junction* Plaques organisiert, die aus bis zu 1000 Einzelkanälen bestehen. Diese Plaques befinden sich in enger Beziehung zu benachbarten Zellen, so dass ein Spalt von nur 2,5 nm entsteht (Saez et al., 2003). Die Modulation der Leitfähigkeit der *Gap junctions* erfolgt durch Transkriptionsregulation, Modifikation der mRNA - Stabilität, Insertion oder Abbau von *Gap junction* Kanälen sowie durch Schließung der Kanäle z.B. über interne Ansäuerung oder einen Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$  - Konzentration. Alle Connexine außer Cx26 können an verschiedenen Stellen phosphoryliert werden, was die Durchlässigkeit, Stabilität und Öffnung der *Gap junction* Kanäle beeinflusst. Bis heute sind im Gewebe von Säugetieren über 20 verschiedene Connexine bekannt (Söhl und Willecke, 2003). Die Unterschiede der molekularen Masse von Connexinen, die vor allem durch die erheblichen Unterschiede der C - terminalen Enden bedingt sind, werden für die Nomenklatur der Connexine verwendet.

### 1.3.2 *Gap junctions in Astrozyten*

Cx43 ist das in Astrozyten am weitesten verbreitete Connexin und wird bereits pränatal exprimiert. Ab einem Alter von zwei Wochen nach der Geburt kann auch Cx30 in Astrozyten nachgewiesen werden (Kunzelmann et al., 1999). Cx30 wird in verschiedenen Hirnregionen unterschiedlich stark exprimiert. Die Bereiche des Zwischen- und Hinterhirns weisen eine höhere Expression, als das Vorderhirn auf. Im Bereich der weißen Substanz fehlt die Expression von Cx30 vollständig (Nagy et al., 1999). Kontrovers diskutiert wird die Cx26 Expression in Astrozyten. Nagy et al. (2001) zeigten, dass Cx26 in Astrozyten in subcorticalen Hirnregionen exprimiert wird. Andere Studien konnten die Expression von Cx26 zwar in embryonalen und adulten Meningen nachweisen, jedoch nicht in Astrozyten (Dermitzel et al., 1989; Filippov et al., 2003). Weder in Oligodendrozyten noch in Neuronen wird eins der drei astrozytären Connexine exprimiert (Nagy et al., 2004). Zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten können heterotypische *Gap junctions* gebildet werden (Nagy und Rash, 2003; Altevogt und Paul, 2004).

Die interzelluläre Kommunikation zwischen den Astrozyten dient dem Transport von Nährstoffen aus dem Blut zu den Neuronen, der Verteilung von Glutamat und der räumlichen Umverteilung von extrazellulär aufgenommenem  $K^+$ . Die *Gap junctions* in Astrozyten haben also eine wichtige Aufgabe bei der Aufrechterhaltung der Homöostase im

---

Gehirn und der extrazellulären Bedingungen für die neuronale Signalübertragung (Theis et al., 2005).

## 1.4. K<sup>+</sup>- Kanäle

### 1.4.1 Aufbau und Klassifizierung von K<sup>+</sup>- Kanälen

K<sup>+</sup>- Kanäle sind die häufigsten und vielfältigsten aller bekannten Ionenkanäle. Sie kommen in allen Geweben und Organen vor und sind an einer Vielzahl von Funktionen, wie der K<sup>+</sup>- Homöostase, sekretorischen Prozessen, Signaltransduktion und der Regulation des Membranpotentials von erregbaren als auch nicht erregbaren Zellen, beteiligt (Coetzee et al., 1999). In Neuronen regulieren sie das Niveau des Ruhepotentials und bestimmen die Frequenz und den Verlauf von Aktionspotentialen.

Gemeinsames Merkmal aller K<sup>+</sup>- Kanäle ist eine hochkonservierte porenbildende Domäne (P - Loop) mit folgender Aminosäuresequenz: thr-X-X-thr-X-gly-tyr-gly-glu. Dieser Abschnitt ist für die K<sup>+</sup>- Ionenselektivität verantwortlich (Jan und Jan, 1997; Hille, 2001) und befindet sich zwischen zwei Transmembrandomänen. K<sup>+</sup>- Kanäle können anhand ihrer Struktur in drei Gruppen eingeteilt werden. Der einfachste Kanal, mit zwei Transmembrandomänen und einer porenbildenden Domäne ist der „einwärts - gleichrichtende K<sup>+</sup>- Kanal“ (*K<sup>+</sup> inwardly rectifying channel*; K<sub>ir</sub> Kanal). K<sub>ir</sub> Kanäle bilden Tetramere. Diese Kanäle sind bei negativem Membranpotential geöffnet und wichtig für den Erhalt des RMP. Die erst vor wenigen Jahren entdeckten „Zwei Porendomänen K<sup>+</sup>- Kanäle“ (K<sub>2p</sub>) bilden die zweite Gruppe. Sie besitzen vier Transmembran- und zwei porenbildende Domänen. Zur dritten und größten Gruppe gehören die spannungsabhängigen K<sup>+</sup>- Kanäle (K<sub>v</sub>), die Ca<sup>2+</sup> aktivierten K<sup>+</sup>- Kanäle und die *ether-a-gogo* (eag) Kanäle. Diese Gruppe besteht aus Proteinen mit sechs Transmembrandomänen und einer porenbildenden Domäne. K<sub>v</sub> Kanäle sind tetramere Proteinkomplexe, die auf Grundlage ihrer Inaktivierungseigenschaften unterteilt werden in sogenannte A-Typ-Kanäle, welche nach einer überschwelligem Membrandepolarisation schnell aktivieren und inaktivieren und langsam inaktivierende Kanäle, die als „*delayed rectifier*“ Kanäle bezeichnet werden.

### 1.4.2 K<sup>+</sup>- Kanäle in Astrozyten

K<sup>+</sup>- Leitfähigkeiten dominieren das Membranstrommuster von Astrozyten. Adulte Astrozyten im Hippocampus weisen ein lineares Strom- / Spannungsverhältnis auf und Ströme die nicht inaktivierend sind. Diese Ströme werden als passive Ströme bezeichnet. Jedoch wurden in

---

Astrozyten juveniler Ratten und Mäuse und in akut isolierten Astrozyten zeit- und spannungsabhängige Stromkomponenten beobachtet (Matthias et al., 2003; Zhou et al., 2006), die darauf hindeuten, dass die passiven Ströme in adulten Astrozyten durch verschiedene  $K^+$ -Leitfähigkeiten hervorgerufen werden.

Weit verbreitet im ZNS ist die Expression der schwach einwärts gleichrichtenden  $K_{ir}4.1$  Kanal - Untereinheit, die in Astrozyten, Oligodendrozyten, Bergmann Zellen und Müller Zellen nachgewiesen wurde (Higashi et al., 2001; Neusch et al., 2001; Kofuji et al., 2002).  $K_{ir}4.1$  Kanäle werden von Astrozyten in verschiedenen Regionen des ZNS exprimiert, vor allem im Kleinhirn und im Hippocampus (Poopalasundaram et al., 2000). Innerhalb des Hippocampus ist die Konzentration des  $K_{ir}4.1$  Proteins am höchsten im Bereich des Stratum oriens sowie in der subgranulären Schicht des Gyrus dentatus, wo die neuronale  $K^+$ -Freisetzung am stärksten ist (Poopalasundaram et al., 2000). Higashi et al. (2001) zeigten, dass der  $K_{ir}4.1$  Kanal vor allem in astrozytären Membranen in der Nähe von Synapsen und Blutgefäßen lokalisiert ist. Die Kanäle sind bei einem Membranpotential geöffnet, das dem  $K^+$ -Gleichgewichtspotentials ( $E_K$ ) nahe ist. Bei zunehmender Depolarisierung wird die Kanalpore durch intrazelluläres  $Mg^{2+}$  oder positiv geladene Polyamine wie Spermin und Spermidin blockiert und somit ein weiterer  $K^+$ -Ausstrom verhindert (Ruppersberg, 2000). Studien an einem Mausmodell mit inaktivierter  $K_{ir}4.1$  Gensequenz zeigten, dass  $K_{ir}4.1$  defiziente Gliazellen ein depolarisiertes Membranpotential besitzen (Kofuji et al., 2000; Neusch et al., 2001; Neusch et al., 2006). Diese Beobachtungen belegen eine Beteiligung des  $K_{ir}4.1$  Kanals an der Regulation des RMP. Eine wichtige Aufgabe der  $K_{ir}$  Kanäle ist die Regulation der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration ( $[K^+]_o$ ) durch Prozesse wie das „ $K^+$  spatial buffering“ oder „ $K^+$  siphoning“ (siehe Kap. 1.4.3). Außerdem gibt es funktionelle und molekulare Anhaltspunkte dafür, dass auf verschiedenen Populationen von Astrozyten unterschiedliche  $K_{ir}$  Kanäle existieren. Während im Hippocampus und Thalamus kein  $K_{ir}5.1$  exprimiert wird, wurden im Vorderhirn und im Bulbus olfactorius heteromere  $K^+$ -Kanäle aus  $K_{ir}4.1$  und  $K_{ir}5.1$  Untereinheiten nachgewiesen. Des Weiteren wurden in Astrozyten verschiedener Hirnregionen Mitglieder der  $K_{ir}2$  und  $K_{ir}6$  Familie nachgewiesen. Jedoch ist nicht klar welchen Anteil die verschiedenen  $K_{ir}$  Untereinheiten an der  $K^+$ -Pufferung haben (Seifert et al., 2006). Neben den  $K_{ir}$  Kanälen sind  $K^+$ -Kanäle aus der Familie der  $K_{2P}$  Kanäle an der Vermittlung der Ströme in Astrozyten beteiligt (Päsler et al., 2007; Seifert et al., 2009; Zhou et al., 2009).



---

Die Kanäle dieser Familie vermitteln weitgehend zeit- und spannungsunabhängige Ströme.  $K_{2P}$  Kanäle sind verantwortlich für die  $K^+$ -Hintergrundleitfähigkeiten und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Membranpotentials. Im Bereich des RMP sind die  $K_{2P}$  Kanäle geöffnet, dabei sind die Auswärtsströme bei physiologischer  $K^+$ -Konzentration größer als die Einwärtsströme.  $K_{2P}$  Kanäle sind unempfindlich gegen die klassischen  $K^+$ -Kanalblocker wie  $Ba^{2+}$ ,  $Cs^+$ , Triethanolamin und 4-AP blockiert werden. Seifert et al. (2009) zeigten, dass in Astrozyten juveniler Mäuse TREK-1 und wahrscheinlich auch TREK-2 aus der Familie der  $K_{2P}$  Kanäle exprimiert werden. Für TREK-1 wurde gezeigt, dass die Auswärtsströme nach Depolarisation größer sind als Einwärtsströme nach Hyperpolarisation. Deshalb wurde TREK-1 funktionell als auswärts gleichrichtender  $K^+$ -Kanal klassifiziert (Fink et al., 1996).

#### 1.4.3 $K^+$ -Homöostase im ZNS

Während neuronaler Aktivität wird  $K^+$  von Neuronen in den EZR freigesetzt. Die unkontrollierte Zunahme von extrazellulärem  $K^+$  würde zu einer Depolarisation der Neuronen führen und die Aktivierungsschwelle des Aktionspotentials und die synaptischen Übertragungen verändern (Walz, 2000). Eine Möglichkeit der Umverteilung von  $K^+$  ist die Diffusion im EZR. Aufgrund des geringen Volumens des EZR und seiner hohen Tortuosität ist dies aber ein sehr langsamer Prozess (Nicholson und Sykova, 1998). Durch die neuronale  $Na^+/K^+$  ATPase kann ebenfalls extrazelluläres  $K^+$  in die Neuronen aufgenommen werden. Die neuronale  $Na^+/K^+$  ATPase wird durch die intrazelluläre Akkumulation von  $Na^+$  aktiviert. Jedoch wurde auch nach der iontophoretischen Applikation von  $K^+$ , extrazelluläres  $K^+$  effektiv aus dem EZR entfernt. Da hierbei die neuronale  $Na^+/K^+$  ATPase nicht stimuliert wird, müssen noch andere Prozesse an der  $K^+$ -Aufnahme beteiligt sein. Eine weitere Möglichkeit für eine schnelle Umverteilung von  $K^+$  ist die Beteiligung von Astrozyten an diesem Prozess (Walz, 2000; Kofuji und Newman, 2004). Für die  $K^+$ -Pufferung durch die Astrozyten existieren zwei Konzepte. Zum einen die Aufnahme und Akkumulation von  $K^+$  in die Astrozyten und zum anderen die Aufnahme und Umverteilung von  $K^+$  über *Gap junctions* im Synzytium. Im ersten Fall erfolgt die Aufnahme von  $K^+$  über  $Na^+/K^+/2Cl^-$  Cotransporter. Die  $K^+$ -Aufnahme muss durch die Aufnahme von  $Cl^-$  über Cotransporter oder separate  $Cl^-$  Kanäle ausgeglichen werden. Die Aufnahme von  $K^+$  und  $Cl^-$  würde eine Zunahme der intrazellulären Osmolarität verursachen und zum Anschwellen der Astrozyten führen. Die zweite Möglichkeit der  $K^+$ -Pufferung ist die räumliche Umverteilung von  $K^+$ . Die von Orkand et al.

---

(1966) aufgestellte Theorie des „*spatial buffering*“ besagt, dass Astrozyten bei einer Akkumulation der  $[K^+]_o$ ,  $K^+$  aufnehmen, über *Gap junctions* im Synzytium verteilen und im Bereich geringer  $[K^+]_o$  wieder in den EZR freisetzen. Bedingung hierfür ist, dass die Astrozyten über eine hohe  $K^+$ -Membranpermeabilität verfügen. Die treibende Kraft für die  $K^+$ -Umverteilung ist die Differenz zwischen dem  $E_K$  und dem RMP der Astrozyten.

Die Freisetzung von  $K^+$  in den EZR führt zu einer Depolarisation des RMPs in Richtung des  $E_K$ , das durch die Nernst Gleichung gegeben ist. Auf Grund der elektrischen Kopplung der Astrozyten ist im Bereich hoher  $[K^+]_o$  die Depolarisation des RMP geringer, als die Depolarisation des  $E_K$ . Die resultierende Differenz zwischen dem  $E_K$  und dem RMP ist die treibende Kraft für den Einstrom von  $K^+$  in die Astrozyten. Innerhalb des Synzytiums erfolgt die Umverteilung von  $K^+$  in Regionen mit geringer  $[K^+]_o$ . In diesen Bereichen ist das RMP größer, als das  $E_K$  und die treibende Kraft für den Ausstrom von  $K^+$  in den EZR (Orkand et al., 1986).

Die Freisetzung von  $K^+$  erfolgt in den Subarachnoidalraum oder in den EZR zwischen den glialen Endfüßen und den von Endfüßen umgebenden Gefäßen. Die räumliche Pufferung von  $K^+$  ruft einen osmotischen Gradienten hervor, der durch einen gerichteten Wasserfluss kompensiert werden muss (Dietzel et al., 1980). Dies bedeutet, dass die  $K^+$ -Aufnahme in Astrozyten mit einer Zunahme der Osmolarität verbunden ist, die durch Aufnahme von Wasser kompensiert wird. Im Bereich des  $K^+$ -Ausstroms nimmt die Osmolarität im EZR zu, so dass in diesem Bereich Wasser aus den Astrozyten austritt (Dietzel et al., 1980; Newman, 1993). In einzelnen, verlängerten Astrozyten, wie den Müller Zellen, wurde eine unterschiedliche Verteilung der  $K_{ir}$  Kanal Expression gezeigt. Dies ermöglicht die Aufnahme und Umverteilung der  $K^+$  entlang der Achse der Müller Zellen. Dieser Prozess wird „*K<sup>+</sup>-siphoning*“ bezeichnet (Newman et al., 1984; Newman, 1993).

### 1.5. Transmembrantransport von Wasser

Zwischen den verschiedenen Kompartimenten des Gehirns sowie zwischen Blut und Gehirn und Gehirn und EZR findet ein kontinuierlicher Wasserfluss statt. Eine Form des Wassertransportes ist die Diffusion durch die Doppellipidmembran. Allerdings ist diese Form des Transports sehr langsam und nicht reguliert. An der Aufrechterhaltung der Wasserhomöostase im Gehirn sind verschiedene Cotransporter beteiligt. Diese Cotransporter sind membrandurchspannende Proteine, die mit den zu transportierenden Stoffen Wassermoleküle binden und diese auch gegen einen osmotischen Gradienten

---

transportieren. Hierzu gehören der  $K^+/Cl^-$  Cotransporter (KCC), der  $K^+/Na^+/Cl^-$  Cotransporter (NKCC1), der Glucose Cotransporter (SGLT-19), der gliale Glutamattransporter (EAAT-1), der GABA Transporter (GAT-1), der Monocarboxylat Transporter (MCT-1), der Dicarboxylat Transporter 1 (NaDC-1) sowie die Glucose - Uniporter (GLUT1 und GLUT2) (MacAulay und Zeuthen, 2010).

Ein wichtiger Schritt bei der Aufklärung des Wassertransports über die Zellmembran war Anfang der 1990 Jahre die Entdeckung des Proteins CHIP28, das nach der Expression in *Xenopus* Oozyten einen Wasserkanal bildet (Preston et al., 1992). Dieses Protein und alle verwandten Proteine werden Aquaporine (AQP) genannt. Sie sind für den grundlegenden Transmembrantransport von Wasser in zahlreichen Organen verantwortlich.

AQP besitzen eine gemeinsame Struktur. Diese besteht aus sechs membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helices, die über Loops miteinander verbunden sind. Sie kommen in der Plasmamembran vorwiegend als Tetramere vor, von dem jedes Monomer eine wassertransportierende Pore bildet. Die treibende Kraft für den Transport von Wasser ist der osmotische Gradient zwischen dem Intra- und Extrazellularraum (Amiry-Moghaddam und Ottersen, 2003). Bisher wurden in Säugetieren 12 verschiedene AQP (AQP1 - AQP12) mit unterschiedlicher Verteilung im Gewebe identifiziert (Zelenina et al., 2005). Im Gehirn sind drei AQP bekannt. AQP1 wird in den Epithelzellen des Plexus choroideus exprimiert. AQP9 wurde in Astrozyten und Epithelzellen von subpialen Blutgefäßen nachgewiesen und ist das einzige AQP, das auch in Neuronen exprimiert wird. Der dominierende Wasserkanal im Gehirn ist AQP4 (Zelenina, 2010).

### 1.5.1 AQP4 Kanal

1994 zeigten zwei unabhängige Studien, dass im Hirngewebe die mRNAs von AQP exprimiert werden (Jung et al., 1994; Hasegawa et al., 1994). Eines der korrespondierenden Proteine wurde in der Membran von Astrozyten und Epidermalzellen detektiert (Nielsen et al., 1997) und als AQP4 bezeichnet. AQP4 wird vor allem in Astrozyten der grauen Substanz exprimiert und im Rückenmark in Astrozytenendfüßen, die die Blutkapillaren umhüllen (Oshio et al., 2004). Die Untersuchung von retinalen Müller Zellen zeigte eine deutlich höhere Expression des AQP4 Proteins im Bereich der Astrozytenendfüße, als auf den restlichen Fortsätzen (Nagelhus et al., 1999). Aufgrund dieses Expressionsmusters liegt die Vermutung nahe, dass der AQP4 Kanal am Wassertransport zwischen Blut und Gehirn sowie

zwischen Gehirn und EZR beteiligt ist (Verkman et al., 2006) und somit eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Wasserhomöostase im Gehirn spielt. Neben dieser Regulation des Wassertransportes beeinflusst der AQP4 Kanal die Migration von Astrozyten und die neuronale Aktivität (Badaut et al., 2007).

AQP4 hat drei Isoformen, die sich in der Länge ihres N - Terminus unterscheiden (Jung et al., 1994; Hasegawa et al., 1994). Die kürzeste Isoform AQP4 - M23 besteht aus 301 Aminosäuren. Die längere Isoform AQP4 - M1 hat zusätzlich 22 Aminosäuren am N - Terminus und die längste Isoform AQP4 - Mz ist am N - Terminus um weitere 41 Aminosäuren länger, als die M1 Isoform. Die kürzeste Isoform AQP4 - M23 bildet große, regelmäßige Aggregate in der Plasmamembran, die als orthogonale Partikelkomplexe (*orthogonal arrays of particles; OAP*) bezeichnet werden (Rash et al., 1998). Für die Bildung stabiler OAPs ist auch die M1 Isoform notwendig. Der Anteil der M1 und M23 Isoform ist hierbei gewebeabhängig. Im Gehirn beträgt das Verhältnis von AQP4 - M23 : AQP4 - M1 ungefähr 3:1 (Neely et al., 1999). Die Funktion der OAPs ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich verstärken die OPAs die Wasserpermeabilität des AQP4 Kanals, halten die Polarisation des AQP4 Kanals an den Endfüßchen der Astrozyten aufrecht und sind an der Vermittlung von Zell - Zell Adhäsionen beteiligt (Crane et al., 2010).

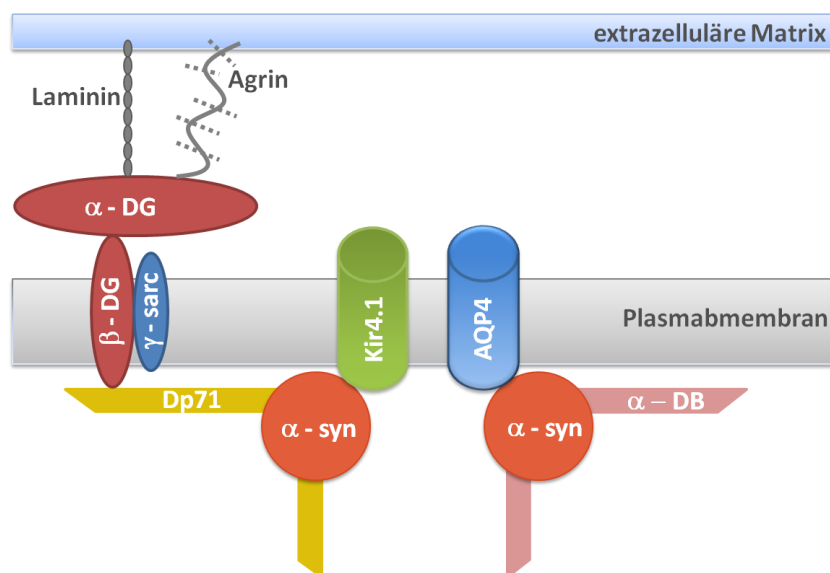
### *1.5.2 Rolle des AQP4 Kanals bei pathologischen Prozessen*

Die Veränderung des Wasserflusses unter pathologischen Bedingungen kann fatale Folgen für die Hirnfunktion haben. Wasserakkumulationen im Gehirn können Erkrankungen wie Ischämie, Blutungen oder Hirntraumata zur Folge haben. Bei pathologischen Prozessen innerhalb des Gehirns wie z.B. fokalen Ischämien, mechanischen Verletzungen, Hyponatriämie und insbesondere bei Neoplasien und Glioblastomen kommt es zu einer Überexpression von AQP4 (Saadoun et al., 2002; Zelenina, 2010). Für die nachfolgende Entstehung von Ödemen ist nicht endgültig geklärt, ob erst die Überexpression von AQP4 zum ödematösen Anschwellen der Astrozytenendfüße führt oder ob dieses Ereignis einen Kompensationsmechanismus als Reaktion auf den Integritätsverlust der Blut - Hirn Schranke und die dadurch einströmende Flüssigkeit darstellt. Von Untersuchungen an AQP4ko Mäusen ist bekannt, dass sich der Verlust von AQP4 protektiv auf eine Ödementstehung auswirkt (Manley et al., 2000), weshalb eine Ödementstehung in Folge einer Überexpression von AQP4 als wahrscheinlich gilt. Weiterhin wird vermutet, dass AQP4 auch bei der Entstehung von Anfällen und Epilepsie eine Rolle spielt

(Amiry-Moghaddam et al., 2003b). In AQP4 *knock out* (ko) Mäusen wurden eine erhöhte Anfallsschwelle und eine Verlängerung der Anfallsdauer nachgewiesen (Binder et al., 2004; Binder et al., 2006). Bei Patienten mit mesialer Temporallappenepilepsie wurde eine Zunahme der AQP4 Expression gezeigt, wobei in sklerotischen Bereichen auf den astrozytären Endfüßen in der Nähe der Blutgefäße keine AQP4 Expression nachgewiesen werden konnte (Lee et al., 2004; Eid et al., 2005). Die Charakterisierung der Funktion des AQP4 Kanal kann somit zur Aufklärung von pathologischen Prozessen wie Epilepsie und der Ödementwicklung beitragen.

### 1.6. Zusammenhang zwischen dem $K_{ir}4.1$ Kanal und dem AQP4 Kanal

Der  $K_{ir}4.1$ . Kanal und der AQP4 Kanal spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn. Beide Kanäle sind jeweils über den Dystrophin - Glykoproteinkomplex (*dystrophin glycoprotein complex*; DGC) in der Zellmembran verankert. Bestandteil des DGC ist u.a.  $\alpha$  - Syntrophin. Sowohl das AQP4 Protein als auch das  $K_{ir}4.1$  Protein haben eine PDZ Domäne über welche die Bindung an  $\alpha$  - Syntrophin erfolgt und somit die Assoziation an den DGC (Abb. 2).



**Abb. 2 Modell für die Bindung von AQP4 und  $K_{ir}4.1$  an den DGC**

AQP4 und  $K_{ir}4.1$  binden jeweils an ein Syntrophin Molekül ( $\alpha$ -syn), so dass beide Kanäle Teil des gleichen Komplexes sind.  $\alpha$ -syn kann entweder an Dystrobrevin ( $\alpha$ -DB) oder an Dp71 binden. Dp71 ist assoziiert mit dem membrandurchspannenden Protein  $\beta$ -Dystroglycan ( $\beta$ -DG) welches wiederum an  $\alpha$ -Dystroglycan im EZR bindet. Ein weiterer Bestandteil des DGC ist  $\gamma$ -Sarcoglycan ( $\gamma$ -sarc) (nach Connors et al., 2004).

Die quantitative Immunogoldanalyse von retinalen Müller Zellen zeigt eine strikte Colokalisation zwischen AQP4 und  $K_{ir}4.1$ . Vor allem im Bereich der Astrozytenendfüße, die an Blutgefäße grenzen, ist eine große Anzahl von AQP4 und  $K_{ir}4.1$  Kanälen zu finden (Amiry-Moghaddam et al., 2003a; Nagelhus et al., 2004; Connors et al., 2004). In  $\alpha$ -Syntrophin ko Mäusen wurde gezeigt, dass an den Endfüßen der Astrozyten im Neocortex und im Cerebellum zwar die Verteilung des AQP4 Kanals verändert ist, jedoch nicht die des  $K_{ir}4.1$  Kanals. Außerdem wurde in diesen Mäusen nach neuronaler Stimulation eine zweifach verlängerte Aufnahme von extrazellulärem  $K^+$  gemessen (Amiry-Moghaddam et al., 2003b). Diese Arbeiten führten zu der Hypothese, dass es zwischen dem Wasserfluss durch den AQP4 Kanal und der  $K^+$ - Pufferung nach neuronaler Aktivität durch den  $K_{ir}4.1$  Kanal einen funktionellen Zusammenhang gibt (Amiry-Moghaddam et al., 2003b; Nagelhus et al., 2004; Kofuji und Newman, 2004).

### 1.7. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des AQP4 Kanals auf die *Gap junction* Kopplung und die  $K^+$ - Pufferung im Hippocampus zu untersuchen. Hierfür sollten vergleichende Experimente in akuten Hirnschnitten von Mäusen mit AQP4 - defizienten Astrozyten und Wildtyp Mäusen durchgeführt werden.

Der Einfluss des AQP4 Kanals auf die Größe des Synzytiums sollte durch Analyse der *Gap junction* Kopplung in adulten Mäusen bestimmt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob AQP4 die Reifung der astrozytären Kopplung beeinflusst. Hierfür sollten Kopplungsanalysen in juvenilen Mäusen durchgeführt werden. Die Bestimmung der Farbstoffausbreitung im Synzytium ist in der Arbeitsgruppe eine etablierte Methode für die Analyse von Kopplungen. Bei dieser Methode werden die Astrozyten subjektiv durch den Experimentator ausgewählt. Um diese subjektive Auswahl von Astrozyten zu vermeiden, sollte die gap - FRAP Methode für *in situ* Analysen der *Gap junction* Kopplung getestet werden.

Für die Bestimmung des Einflusses von AQP4 auf die  $K^+$ - Pufferung sollte der stimulationsinduzierte Anstieg der  $[K^+]_o$  im Stratum pyramidale gemessen werden. Ein weiteres Kriterium für die Beurteilung der Pufferung war die räumliche Umverteilung des extrazellulären  $K^+$ . Ausgehend vom dem Stratum pyramidale wurde der stimulationsinduzierte Anstieg der  $[K^+]_o$  bis zur hippocampalen Fissur bestimmt.

---

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Tiere

#### 2.1.1 *AQP4<sup>tm1Ask</sup> Maus*

In der *AQP4<sup>tm1Ask</sup>* Maus (*AQP4ko* Maus) wurde innerhalb der kodierenden Sequenz für den AQP4 Kanal ein Teil des Exons 1 durch eine Neomycin - Kasette ersetzt (Ma et al., 1997). In Homogenaten vom Gehirn homozygoter *AQP4ko* Mäuse wurde nur eine geringe Menge der verkürzten AQP4 mRNA detektiert. In Western blot Analysen wurde in diesen Homogenaten kein AQP4 Protein detektiert ([www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)). Die Deletion des AQP4 Gens hat keine Auswirkung auf die Letalität, das Wachstum und die Organmorphologie dieser *ko* Mäuse (Saadoun et al., 2009).

Die *AQP4ko* Mäuse wurden zur Verfügung gestellt von A. Verkman (University of California, San Francisco, Department of Medicine).

#### 2.1.2 *ICR - (CD1®) Maus*

CD1 - Mäuse sind ein Auszuchtstamm. Ursprung dieses Mausstammes ist eine Gruppe „Swiss“ Mäuse, bestehend aus 9 Albino Mäusen aus einem Nicht - Inzucht Stamm.

1926 wurden sie aus dem Labor von Dr. de Coulon, Centre Romand Anticancéreux, Lausanne, Schweiz durch Dr. Clara Lynch in die USA importiert. Alle Tiere, die für die Experimente benötigt wurden, wurden von Charles River (Charles River Laboratories International, Inc., Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

#### 2.1.3 *C57black/6J Maus*

Die C57BL/6J Mauslinie ist eine der am häufigsten verwendeten Inzuchtstämme. Dieser Stamm wurde 1921 im Tierzuchtzentrum Miss Abby Lathrop in den USA entwickelt.

(<http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>).

#### 2.1.4 *Cx30<sup>-/-</sup>, Cx43<sup>fl/fl</sup>:hGFAPcre Maus*

*Cx30<sup>-/-</sup>, Cx43<sup>fl/fl</sup>:hGFAPcre* Mäuse erhält man durch die Kreuzung von *Cx30<sup>-/-</sup>* Mäusen (Teubner et al., 2003) mit *Cx43<sup>fl/fl</sup>:hGFAP-cre* Mäusen (*Cx43ko* Maus) (Theis et al., 2003). In *Cx43ko* Mäusen wird die Cx43 kodierende Region durch loxP flankiert. Außerdem wird unter der Kontrolle des astrozytenspezifischen GFAP Promotors die cre Recombinase exprimiert, so dass in Astrozyten eine selektive Deletion von Cx43 erfolgt kann. Da Cx30 und Cx43 an der



Bildung von *Gap junctions* zwischen den Astrozyten beteiligt sind, (Theis et al., 2005) fehlt in  $Cx30^{-/-}$ ,  $Cx43^{fl/fl}$ :hGFAPcre Mäusen die astrozytäre Kopplung (Wallraff et al., 2006). Im Folgenden werden  $Cx30^{-/-}$ ,  $Cx43^{fl/fl}$ :hGFAPcre Mäuse als Doppel *knock out* (DKO) Mäuse bezeichnet.

### 2.1.5 NG2 - EYFP Maus

Bei diesen Mäusen erfolgte, die Integration des Gens für ein gelb - fluoreszierendes Protein (*enhanced yellow fluorescent protein*; EYFP) in das Startcodon des Exon 1 des NG2 - Gens, dem eine loxP-flankierte Neomycinresistenzkassette folgt (Karram et al., 2008). Dieser *knock in* (ki) hat die spezifische Expression von EYFP in NG2 Zellen zur Folge, so dass in Hirnpräparaten eine schnelle und einfache Identifizierung dieser Zellen möglich ist.

### 2.1.6 Cx43 - ECFP Maus

Diese Mauslinie ist hervorgegangen aus  $Cx43$ ko Mäusen (Theis et al., 2003). Unter Kontrolle des  $Cx43$  Promotors wird hier, statt  $Cx43$ , ein blau - fluoreszierendes Protein (*enhanced cyan fluorescent protein*; ECFP) exprimiert. Die Expression von ECFP ist heterozygot. Mit Hilfe des spezifisch in Astrozyten exprimierten ECFP ist es möglich Astrozyten in Hirnschnitten dieser Mäuse sicher zu detektieren (unveröffentlichte Daten).

## 2.2. Material

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

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

### 2.2.1 Lösungen für Patch - Clamp Messungen

Sucrosepräparationslösung:	87 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	1,25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	7 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,5 mM CaCl <sub>2</sub>
	25 mM NaHCO <sub>3</sub>
	25 mM Glucose
	75 mM Sucrose
	pH 7,6 bei 5°C und 35°C und Begasung mit Carbogen
artefizielle Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF) für Raumtemperatur (RT)	126 mM NaCl
	3 mM KCl
	1,25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	2 mM MgSO <sub>4</sub>
	2 mM CaCl <sub>2</sub>
	26 mM NaHCO <sub>3</sub>
	10 mM Glucose
	pH 7,38 bei RT und Begasung mit Carbogen
Pipettenlösung mit Biozytin	130 mM K – Gluconat
	1 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM EGTA
	20 mM Hepes
	1 mM Na <sub>2</sub> ATP
	0,5 % (w/v) Biozytin
	pH 7,26 mit KOH

---

### 2.2.2 Lösungen für histochemische Analyse

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) (10x)	83 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1,5 M $\text{NaCl}$ 17 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,4 mit $\text{HCl}$
Fixierungslösung (4 %ige Paraformaldehyd Lösung)	800 ml Aqua dest. auf 60°C erwärmen 40 g Paraformaldehyd darin lösen NaOH tropfenweise zugeben, bis die Lösung klar ist; abkühlen lassen
100 ml PBS (10x)	mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen pH 7,4 mit $\text{HCl}$ oder $\text{NaOH}$ einstellen

### 2.2.3 Lösungen für extrazelluläre $\text{K}^+$ - Messungen

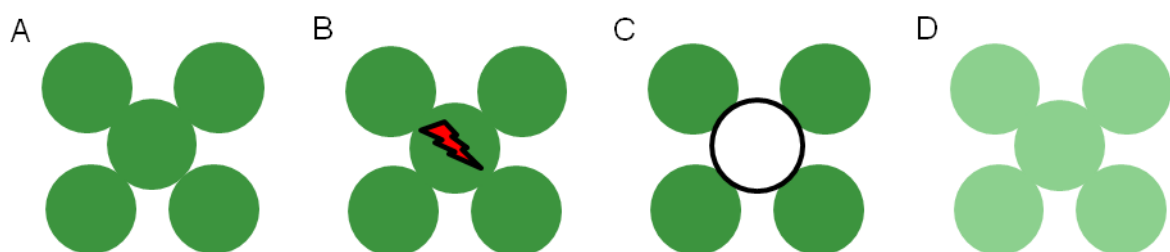
ACSF für 35°C	129 mM $\text{NaCl}$ 3 mM $\text{KCl}$ 1,25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 1,8 mM $\text{MgSO}_4$ 2 mM $\text{CaCl}_2$ 21 mM $\text{NaHCO}_3$ 10 mM Glucose pH 7,38 bei 35°C und Begasung mit Carbogen
ACSF für 35°C mit folgenden Antagonisten	30 $\mu\text{M}$ L-APV 30 $\mu\text{M}$ CNQX 5 $\mu\text{M}$ Bicucullin

### 2.3. Kopplungsanalysen mit der gap - FRAP Methode

#### 2.3.1 Prinzip der Messungen

Die Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge und die fast gleichzeitige Emission von Licht mit einer größeren Wellenlänge wird als Fluoreszenz bezeichnet. In Fluorochromen, die oftmals eine aromatische Ringstruktur besitzen, werden delokalisierte Elektronen in bindenden  $\pi$ -Orbitalen durch Absorption von Photonen vom Grundzustand in einen angeregten Zustand angehoben. Dieser Zustand ist extrem kurzlebig und beim Zurückfallen in den Grundzustand wird die frei werdende Energie als Photon emittiert. Bei sehr hoher Anregungsintensität, wie sie z.B. durch einen Laser hervorgerufen wird, können Fluorophore vom Singulettzustand in einen Triplettzustand übergehen. Da der Triplettzustand langlebiger ist, können die Fluorophore mit anderen Molekülen interagieren. Die hieraus resultierenden kovalenten Modifikationen führen zum permanenten Verlust der Fluoreszenzeigenschaften der Fluorophore. Dieser Prozess wird als *Photobleaching* bezeichnet.

*Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP, Fluoreszenzrückkehr nach Ausbleichen eines Farbstoffes) ist eine Methode, bei der mit sehr hoher Laserintensität die Fluoreszenzeigenschaft eines Farbstoffes innerhalb eines bestimmten Gebietes zerstört wird. Anschließend wird mit geringer Laserintensität, die Diffusion des nicht zerstörten Farbstoffes aus den umliegenden Bereichen in den gebleichten Bereich beobachtet. Bei der gap - FRAP Methode erfolgt die Farbstoffdiffusion aus benachbarten Zellen, die über *Gap junction* verbunden sind (Abb. 3). Diese Diffusion erreicht einen stationären Zustand. Aus der Fluoreszenzintensität im stationären Zustand können Rückschlüsse über den Umfang der *Gap junction* Kopplung gezogen werden (Abbaci et al., 2008).



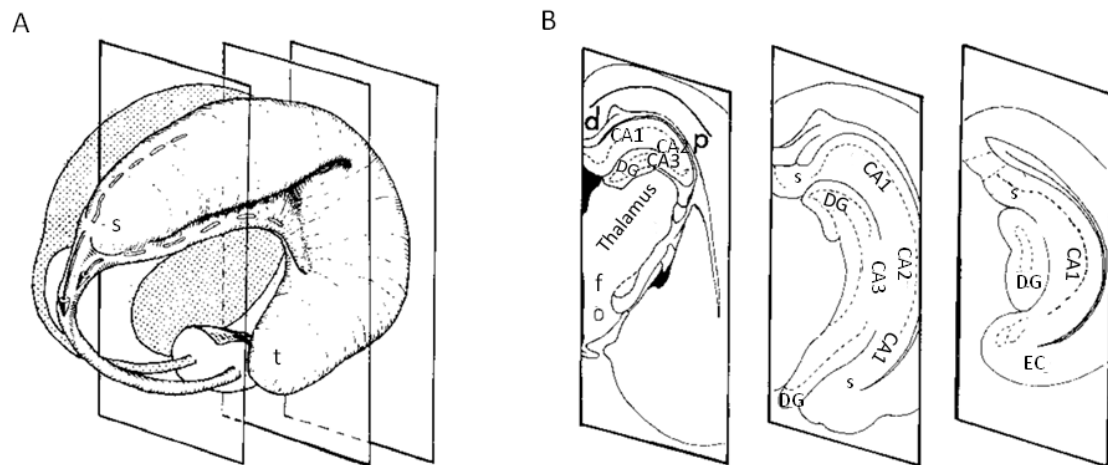
**Abb. 3** Prinzip der gap - FRAP Methode

A) Zellen nach der Aufnahme des Farbstoffes. B) Zellen während des Bleichens einer Zielzelle. C) Zellen nach dem Bleichen. D) Zellen am Ende der Farbstoffdiffusion, bei Erreichen des stationären Zustands (nach Abbaci et al., 2008).

Als Farbstoff für die gap - FRAP Experimente wurde 5,6-Carboxyfluoresceindiacetat (CFDA) (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) verwendet. CFDA ist ein verestertes Fluorescein, das membranpermeabel ist und in seiner Esterform nicht fluoreszent. In der Zelle erfolgt durch zelleigene Esterasen die Hydrolyse der Estergruppe. Hierdurch wird der Farbstoff fluoreszent und verliert seine Membranpermeabilität. Außerdem ist dieser Farbstoffe in seiner nicht - veresterten Form ausreichend klein, um die *Gap junctions* passieren zu können.

### 2.3.2 Präparation der coronalen Hippocampuschnitte

Die Mäuse wurden mit Isofluran (DeltaSelect, London, Großbritannien) narkotisiert und anschließend dekapitiert. Der Schädel wurde auf einem Wachsblock fixiert und die Kopfhaut mit einer kleinen Schere geöffnet. Ausgehend von der Fontanelle wurde mit einer kleinen gebogenen Schere der Schädel lateral geöffnet und das Schädeldach entfernt. Das freigelegte Hirn wurde mit eiskalter Sucrosepräparationslösung gekühlt, mit einem kleinen Spatel aus der Schädelgrube herausgeholt und auf einem kalten Gummiblock abgelegt. Dann wurden ein Drittel des Frontalhirns und des Kleinhirns entfernt und auf der Frontalhirnseite mit einem cyanoacrylhaltigen Klebstoff (Sekundenkleber, UHU GmbH & Co. Kg, Bühl, Deutschland) auf dem Probenhalter der Schneidekammer fixiert. Die Kammer wurde mit eiskalter, carbogenbegaster Sucrosepräparationslösung gefüllt. Mit einem Vibratom (VT1200S, Leica, Nussloch, Deutschland) wurden auf Höhe des Hippocampus 200 µm dicke coronale Schnitte angefertigt (Abb. 4B). Die Schnitte wurden in eine 35°C warme und carbogenbegaste Sucrosepräparationslösung überführt und anschließend 20 min auf RT abgekühlt. Danach wurden die Schnitte in ein Gefäß mit carbogenbegasten ACSF überführt und in dieser Lösung bis zum Beginn der Messungen bei RT aufbewahrt.



**Abb. 4 Schema zur Präparation der coronalen Hippocampuschnitte**

A) Die Oberfläche der hippocampalen Formationen. s, septaler Pol; t, temporaler Pol B) Die drei coronalen Ebenen aus Abb. A. Dargestellt sind verschiedene Ebenen durch die rostrocaudalen hippocampalen Formationen. d, distaler Pol; p, proximaler Pol; CA1 - CA3, Abschnitte des Rindenbandes des Hippocampus (Cornum ammonis); DG, Gyrus dentatus; EC, entorhinale Cortex; S, Subiculum (Amaral und Witter, 1995).

### 2.3.3 Vorversuch: Relaxation von CFDA

In diesem Vorversuch wurde die Relaxation von CFDA nach dem Bleichen untersucht. Die Experimente wurden an primären Astrozytenkulturen durchgeführt, die aus dem Cortex junger Ratten gewonnen wurden. Diese Zellkulturen wurden von PD A. Derouiche zur Verfügung gestellt. Die kultivierten Astrozyten befanden sich auf Objektträgern, die direkt in die Badkammer gelegt wurden. Für die Färbung der Zellen wurden 0,7 mg CFDA in 100  $\mu$ l DMSO gelöst, mit ACSF 1:1000 verdünnt und über eine Pumpe (ISMATEC IPC 4, IDEX Health & Science GmbH, Wertheim, Deutschland) 5 min mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min in die Badkammer (Luigs - Neumann, Ratingen, Deutschland) eingewaschen. Anschließend wurden die Zellen ~20 min mit ACSF gewaschen. Die gap - FRAP Experimente wurden, wie in Kap. 2.3.6 beschrieben, durchgeführt.

### 2.3.4 Vorversuch: Aufnahme von CFDA in Astrozyten

In diesen Vorversuchen wurde die selektive Aufnahme von CFDA in die Astrozyten untersucht. Um die Astrozyten spezifisch zu markieren, wurden die Schnitte mit Sulforhodamin 101 (SR101) gefärbt. SR101 ist ein Farbstoff der spezifisch von Astrozyten aufgenommen wird (Nimmerjahn et al., 2004). Die coronalen Schnitte wurden in ACSF für 35 °C mit 8  $\mu$ M SR101 und 15  $\mu$ M CFDA 30 min bei 35°C gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mindestens 20 min in ACSF für 35°C (siehe Kap. 2.2.3) gewaschen. Färben und

Waschen wurden unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Schnitte wurden anschließend in die Badkammer transferiert, mechanisch fixiert und mit carbogenbegastem ACSF umspült. Mit einem konfokalen Laserscanmikroskop (LSM) (SP5, Leica, Mannheim, Deutschland) wurden Aufnahmen von der CA1 Region erstellt. Die Größe des aufgenommenen Bereichs betrug 455,88  $\mu\text{m}$  x 455,88  $\mu\text{m}$ . Die Anregung von CFDA erfolgte bei 488 nm und die Emission wurde bei 500 - 535 nm detektiert. SR101 wurde mit 543 nm angeregt und die Emission bei 581 - 700 nm detektiert. In den Aufnahmen wurde dem Signal der SR101 Fluoreszenz die Falschfarbe Rot und der CFDA Fluoreszenz die Falschfarbe Grün zugeordnet. Für die Auswertung wurden die Aufnahmen der SR101 Fluoreszenz und der CFDA Fluoreszenz übereinandergelegt. Zellen, die mit SR101 und CFDA gefärbt waren, wurde die Falschfarbe Gelb zugeordnet.

### 2.3.5 Applikation von CFDA

Für alle im Folgenden beschriebenen Versuche wurde eine CFDA - Stammlösung verwendet, für die 0,4 - 0,6 mg CFDA in 100  $\mu\text{l}$  DMSO gelöst wurden. Die weitere Verdünnung der CFDA - Stammlösung ist entsprechend angegeben. Um die Fluoreszenz in den Schnitten zu untersuchen, wurden diese in eine Badkammer transferiert, fixiert und mit carbogenbegastem ACSF umspült. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 488 nm und die Emission wurde bei 500 - 650 nm detektiert.

Für die Applikation von CFDA wurden drei Strategien getestet i) Injektion des Farbstoffes *in vivo* in den Hippocampus, ii) Injektion des Farbstoffes in den Schnitt mit einer Pipette, iii) Inkubation des Schnittes in einer CFDA Lösung.

I) Vor der *in vivo* Injektion wurde die Maus mit Ketaminehydrochlorid und Medetomidinehydrochlorid im Verhältnis 2:3 durch intraperitoneale Injektion narkotisiert (3,3  $\mu\text{l/g}$  Körpergewicht; Ketamin: 115,34 mg/ml, Pharmanovo, Hannover, Deutschland; Cepetor<sup>®</sup> KH: 1 mg/ml, CP Pharma, Burgdorf, Deutschland). Nach dem keine Reaktion auf Schmerzreize mehr erfolgte, wurde die Maus in einer stereotaktischen Apparatur (TSE-Systeme, Bad Homburg, Deutschland) fixiert. Der Schädel wurde freigelegt und ausgehend vom Bregmapunkt bei den Koordinaten 2,1 caudal und 1,5 lateral ein Loch gebohrt ( $\emptyset$  0,9 mm; Hager & Meisinger Bohrer, Neuss, Deutschland). Die CFDA - Stammlösung wurde mit steriler 0,9 % NaCl Lösung 1:1000 verdünnt. Ausgehend von der Dura mata wurde in einer Tiefe von 2,1 mm mit einer Mikroliterspritze

(Hamilton, Benaduz, Schweiz) 200 nl der verdünnten CFDA Lösung injiziert. 1,5 h, 4 h bzw. 24 h nach der Injektion wurden coronale Schnitte angefertigt (siehe Kap. 2.3.2).

II) Die CFDA - Stammlösung wurde 1:10, 1:100 bzw. 1:1000 mit einer 0,9 % NaCl Lösung verdünnt. Die Schnitte wurden in eine Badkammer transferiert, mechanisch fixiert und mit carbogenbegastem ACSF umspült. Eine Pipette wurde unter optischer Kontrolle unter der Oberfläche des Schnittes in den Bereich der CA1 Region positioniert. Die Pipetten hatten einen Öffnungsdurchmesser zwischen 8 und 31  $\mu\text{m}$ . Durch geringen Überdruck wurde die CFDA - Lösung 5 min appliziert. Anschließend wurde die Pipette entfernt. Zur Entfernung von überschüssigem Farbstoff und zur Gewährleistung der Esterabspaltung in den Zellen wurden die Schnitte nach der Farbstoffapplikation mindestens 20 min mit ACSF gewaschen.

III) Die Schnitte wurden 30 min in einer 15  $\mu\text{M}$  CFDA - Lösung bei 35°C inkubiert. Nach dem Färben wurde die Schnitte ~20 min in ACSF bei 35°C gewaschen. Das Färben und Waschen erfolgte unter Lichtausschluss. Sowohl für die Verdünnung der CFDA - Lösung als auch für das anschließende Waschen der Schnitte wurde ACSF für 35°C (siehe Kap. 2.2.3) verwendet.

### 2.3.6 gap - FRAP Experimente

Jedes gap - FRAP Experiment bestand aus drei Schritten i) Bestimmung der Ausgangsintensität der Fluoreszenz, ii) Bleichen, iii) Messung der *Recovery*. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität erfolgt anhand von Aufnahmen, die mit dem LSM erstellt wurden. Alle gap - FRAP Experimente wurden in der CA1 Region des Stratum radiatum durchgeführt. Der Bleichschritt von ~9 s erfolgte durch fünf bis sieben Expositionen. Die *Recovery* wurde über einen Zeitraum von 8 bis 10 min gemessen. Die Methodenentwicklung erfolgte in zwei Versuchsreihen.

In der ersten Versuchsreihe wurde die Fluoreszenzintensität in einer z - Ebene bestimmt. Der aufgenommene Bereich hatte eine Größe von 455,88  $\mu\text{m}$  x 455,88  $\mu\text{m}$ . Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 488 nm mit einem Argon - Laser. Die verfügbare Laserleistung betrug ~30 mW. Die Anregungsintensität des Lasers wurde über den AOTF (*Acousto Optic Tunable Filter*) verändert. Für die Bestimmung der Ausgangsintensität und für die Messung der *Recovery* wurde die Fluoreszenz mit 1 % der verfügbaren Laserleistung angeregt (~30  $\mu\text{W}$ ). Die Detektion erfolgte in einem Wellenlängenbereich von 500 - 650 nm und bei einem Blendenöffnungsdurchmesser von 59,4  $\mu\text{m}$ . Aus der Wellenlänge der Emission und dem Öffnungsdurchmesser ergab sich eine optische Schnittdicke zwischen 1,7 - 2,3  $\mu\text{m}$ . Die Scangeschwindigkeit betrug 700 Hz und die Aufnahmen hatten eine Auflösung von



1024 x 1024 Pixel. Aus der Scangeschwindigkeit und der Auflösung ergibt sich die Zeit für die Bestrahlung eines Bildpunktes (Pixelzeit). Die Pixelzeit betrug 0,4  $\mu$ s. Die Pixel hatten eine Größe von 0,45  $\mu$ m x 0,45  $\mu$ m.

Geblichen wurde eine Fläche von 50  $\mu$ m x 100  $\mu$ m, in der mindestens ein gut gefärbtes Soma eines Astrozyten zu erkennen war. Während des Bleichens betrug die Pixelgröße 0,051  $\mu$ m x 0,098  $\mu$ m. Geblichen wurde mit 100 % der verfügbaren Laserleistung. Die Mikroskop- und Lasereinstellungen in den drei Phasen des Experimentes wurden durch ein Makro für Bleichexperimente, das Bestandteil der Leica Software ist, gesteuert.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Fluoreszenz für die Bestimmung der Ausgangsintensität und während der *Recovery* mit einem IR - Laser angeregt. Die Fluoreszenz wurde in mehreren z - Ebenen detektiert (xyz - Stapel) (Abb. 5A). Aufgenommen wurde eine Fläche von 258,33  $\mu$ m x 258,33  $\mu$ m. Die Größe des Stapels in z - Richtung betrug 10 - 25  $\mu$ m. Der Abstand zwischen den z - Ebene betrug 1  $\mu$ m. Die Multiphotonenanregung des Fluorochromes erfolgte mit einem gepulsten Infrarotlaser (IR - Laser, MaiTai, Spectra Physics, Darmstadt, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 800 nm. Das emittierte Licht wurde mit einem *Non-Descanned Detektor* (NDD) mit einem IR Sperrfilter bis 680 nm detektiert. Die Scangeschwindigkeit betrug 1000 Hz und die Auflösung 1024 x 1024 Pixel.

Für den Bleichschritt wurde der Argon - Laser verwendet. Geblichen wurde mit 100 % der verfügbaren Laserleistung bei 488 nm und einer Geschwindigkeit von 700 Hz. Die Pixelzeit betrug 0,4  $\mu$ s. Die Größe des Bleichbereiches betrug 100  $\mu$ m x 100  $\mu$ m bzw. 50  $\mu$ m x 50  $\mu$ m mit einer Pixelgröße von 0,098  $\mu$ m x 0,098  $\mu$ m bzw. 0,051  $\mu$ m x 0,051  $\mu$ m. Das Umstellen der Geräteparameter in den drei Phasen des Experiments sowie das Ein- und Ausschalten des IR - Lasers bzw. des Argon - Lasers wurde durch die Erstellung eines Makros, innerhalb der Leica LAS AF Software realisiert.

### 2.3.7 Auswertung der gap - FRAP Experimente

Mit Hilfe der Leica LAS AF Software wurde im Soma des geblichenen Astrozyten und in einer nicht geblichenen Region (Hintergrund) die Fluoreszenzintensität im Verlauf des Experiments bestimmt (Abb. 5A). Die Fluoreszenzanregung während der *Recovery* führte zu einer geringen Abnahme der Fluoreszenzintensität (Bleicheffekt). Die Korrektur dieses Bleicheffektes erfolgte mit Hilfe der Hintergrundfluoreszenz (Abb. 5C). Hierfür wurde zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messpunkten der Hintergrundkurve eine Regressionsgerade bestimmt. Für diese Gerade wurde der Anstieg berechnet und dieser Wert auf das Fluoreszenzsignal des Somas summiert. Zusammengefasst wurde diese Korrektur in folgender Formel:

$$s(i)_{\text{korr}} = s(i) \cdot \left( 1 + \left( 1 - \frac{bg(i)}{bg_{\text{max}}} \right) \right)$$

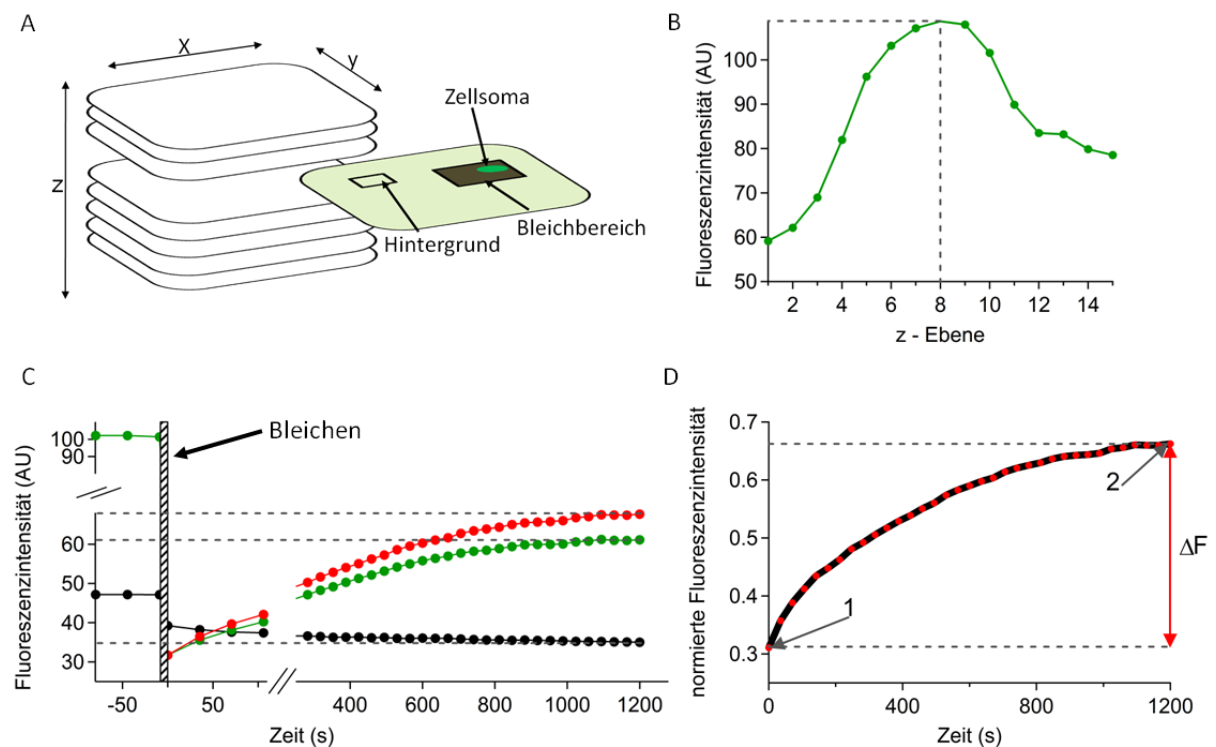
$s(i)_{\text{korr}}$  korrigierte Fluoreszenzintensität des Astrozyten zum Zeitpunkt  $i$

$s(i)$  Fluoreszenzintensität des Astrozyten zum Zeitpunkt  $i$

$bg(i)$  Fluoreszenzintensität des Hintergrundes zum Zeitpunkt  $i$

$bg_{\text{max}}$  maximale Fluoreszenzintensität des Hintergrundes

Diese korrigierten Werte der Fluoreszenzintensität der *Recovery* wurden auf die Ausgangsintensität des jeweiligen Astrozyten normiert. Für die Auswertung der xyz - Stapel, in der zweiten Versuchsreihe, wurden für jedes Soma im Bleichbereich die  $z$  - Ebene mit der größten Fluoreszenzintensität bestimmt (Abb. 5A und B). In dieser  $z$  - Ebene wurde dann der Verlauf der Fluoreszenzintensität im Soma und im Hintergrund bestimmt. Diese Daten wurden wie oben beschreiben korrigiert und normiert. Da in den Experimenten der Abstand zwischen den einzelnen Messpunkten variierte, wurde die Zeitbasis für alle Messungen durch Interpolation der *Recovery* - Kurven vereinheitlicht. Hierfür erfolgte zwischen zwei Messpunkten eine lineare Regression und die Fluoreszenzintensität wurde im Abstand von 0,1 s interpoliert (Abb. 5D). In der korrigierten und normierten *Recovery* - Kurve wurde die Differenz zwischen der maximalen Fluoreszenz (Punkt 2; Abb. 5D) und der Rest - Fluoreszenz nach dem Bleichen (Punkt 1; Abb. 5D) bestimmt. Diese Differenz wird im Folgenden als  $\Delta F$  bezeichnet. Durch monoexponentiellen Fit der *Recovery* - Kurve wurde die Zeitkonstante  $\tau$  bestimmt.



**Abb. 5 Auswertung der gap - FRAP Experimente**

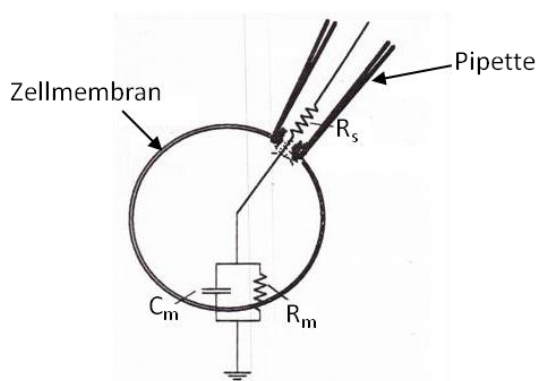
A) Schema eines xyz - Stapels der zweiten Versuchsreihe. Die grüne Fläche symbolisiert die Ebene mit der größten Fluoreszenzintensität des Somas. In der ersten Versuchsreihe wurde nur in einer z - Ebene die Fluoreszenzintensität bestimmt. B) Bestimmung der z - Ebene mit der größten Fluoreszenzintensität für ein Soma innerhalb des Bleichbereiches (nur für Experimente der zweiten Versuchsreihe). C) Fluoreszenzintensität während eines gap - FRAP Experiments (grüne Kurve: Soma; schwarze Kurve Hintergrund). Mit den Daten der Hintergrundkurve erfolgte die Korrektur des Bleicheffekts. Die rote Kurve zeigt den Verlauf der *Recovery* nach der Korrektur des Bleicheffektes. Der schraffierte Balken symbolisiert den Zeitraum des Bleichens. D) Die korrigierte und normierte *Recovery* - Kurve (rote Punkte) wurde interpoliert (schwarze Kurve). Punkt 1 Fluoreszenzintensität nach dem Bleichen. Punkt 2 maximale Fluoreszenzintensität nach dem Bleichen. Die Differenz aus Punkt 2 und Punkt 1 entspricht  $\Delta F$ .

Die mit Hilfe der Leica Software bestimmten Fluoreszenzwerte wurden mit Igor Pro 6 (WaveMetrix Inc., Lake Oswego, USA) ausgewertet. Mit diesem Programm erfolgten die Korrektur des Bleicheffekts, die Normierung der Fluoreszenzintensitäten, die Interpolation der *Recovery* Kurven sowie der monoexponentielle Fit der *Recovery* - Kurve. Diese Berechnungen erfolgten mit Makros, die von PD R. Jabs erstellt wurden. Mit einer ANOVA und einem *post hoc* Tukey Test wurden die Unterschiede zwischen den Genotypen auf Signifikanz getestet. Die Unterschiede zwischen den beiden Versuchsreihen wurden mit einem *Student's t* - Test analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPadPrism5 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA). Als statistisch signifikant galt ein Unterschied mit  $p < 0,05$ .

## 2.4. Patch - Clamp Messungen und Kopplungsanalysen

### 2.4.1 Prinzip der Messungen

Die in situ Messungen der Membranströme erfolgten mit Hilfe der *Patch - Clamp* Technik in der Ganz - Zell Konfiguration (*whole - cell* Konfiguration). Die Membran einer biologischen Zelle verfügt sowohl über ohmsche als auch kapazitive ( $C_m$ ) elektrische Eigenschaften. Mit Hilfe einer elektrolytgefüllten Elektrode (*Patch - Pipette*) verschafft man sich in der *whole - cell* Konfiguration einen elektrischen, nach außen isolierten Zugang zum Zellinneren. Dieser Zugang ist ebenfalls durch einen Widerstand gekennzeichnet, welcher in Serie mit dem Membranwiderstand ( $R_m$ ) verbunden ist und deshalb als Serienwiderstand ( $R_s$ ) bezeichnet wird (Abb. 6). Dieser Aufbau zusammen mit einem Verstärker ermöglicht es, der Zellmembran definierte Potentiale und Potentialänderungen aufzuzwingen. Der bei den Messungen verwendete Verstärker besitzt zwei verschiedene Operationsmodi, die Spannungsklemme (engl. *voltage clamp*) und die Stromklemme (engl. *current clamp*). In der Spannungsklemme wird das Membranpotential der Zelle mit dem vorgegebenen Potential des Verstärkers verglichen. Bei einer Differenz wird über die Messelektrode Strom in die Zellen injiziert. Dieser Strom wird als Reaktion der Zelle dargestellt. Wird die Stromklemme verwendet, so wird die Spannung angegeben, bei der kein Strom in die Zelle injiziert wird. Dieser Modus ist für die Analyse physiologischer Erregungsmuster geeignet, da die Zelle nicht durch die Strominjektionen des Verstärkers beeinflusst wird.



**Abb. 6 Ersatzschaltbild für Messungen in der *whole - cell* Konfiguration**

In der *whole - cell* Konfiguration ist die Pipette mit dem Zellinneren leitend verbunden. Die Zellmembran einer kugelförmigen Zelle kann elektrisch durch den Membranwiderstand ( $R_m$ ) und die parallel dazu geschalteten Membrankapazität ( $C_m$ ) beschrieben werden (Numberger und Draguhn, 1996).

### 2.4.2 Elektrophysiologischer Messplatz

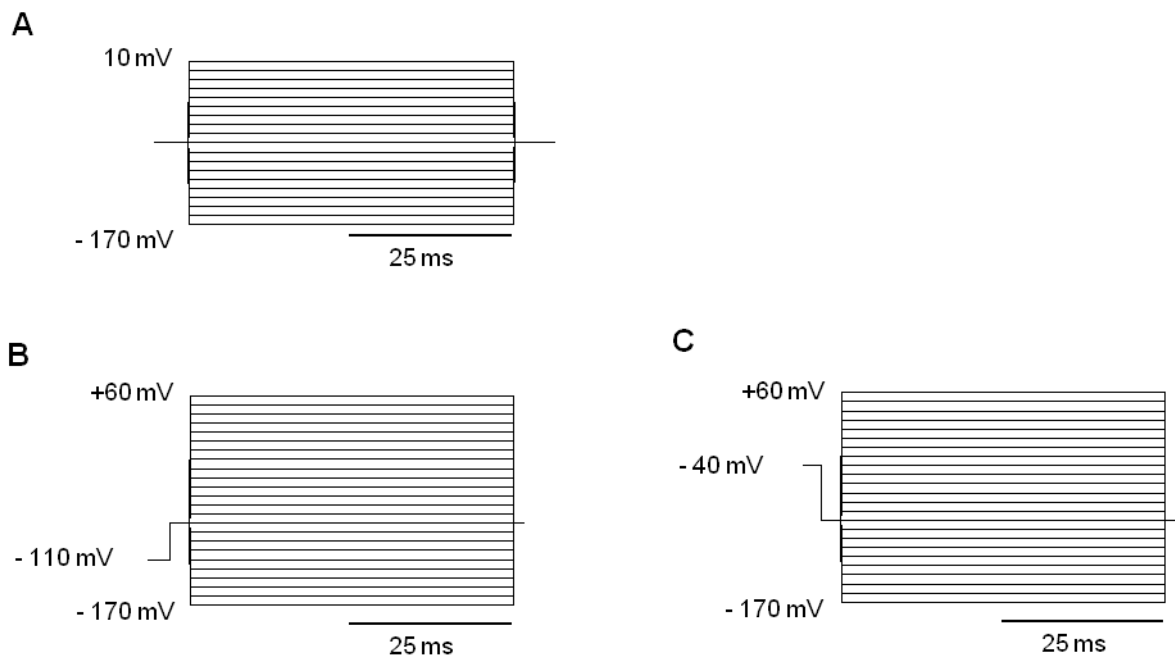
Die elektrophysiologischen Messungen wurden mit einem EPC7 - Verstärker durchgeführt (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland). Die gemessenen Ströme wurden im Hauptverstärker amplifiziert, über einen AD/DA Wandler (ITC-16, HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) digitalisiert und dem Rechner zu Speicherung übermittelt. Für die Aufzeichnung und Speicherung der Daten wurde die TIDA Software (HEKA Elektronik) verwendet. Die Daten wurden mit einer Frequenz von 6 oder 30 kHz aufgezeichnet und mit 10 kHz gefiltert. Die *Patch* - Pipetten wurden aus Borosilicatglaskapillaren (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) mit Hilfe eines horizontalen Pipettenziehgerätes (P2000 Micropipette Puller, Sutter Instruments, Novato, USA) hergestellt und hatten, wenn sie mit Pipettenlösung gefüllt waren, einen Widerstand zwischen 3 und 6 M $\Omega$ . Als Messelektrode diente ein chlorierter Silberdraht und als Badelektrode eine Ag/AgCl-Elektrode. Der Messplatz wurde mit einem schwingungsgedämpften Tisch (Newport Corporation, Irvine, USA) vor mechanischen Schwingungen und Erschütterungen geschützt. Mit einem Faraday Käfig wurde die elektrische Abschirmung gewährleistet.

### 2.4.3 Elektrophysiologische Messungen

Auf die *Patch* - Pipette wurde über ein wassergefülltes U - Rohr Überdruck übertragen, wodurch verhindert wurde, dass Badlösung in die *Patch* - Pipette floss oder die Pipettenspitze durch Gewebefragmente verstopft wurde. Die Pipette wurde an die Zelloberfläche herangeführt und zwischen Zellmembran und Pipette eine hochohmige Verbindung hergestellt (Gigaseal, *cell - attached* Konfiguration). Der Wechsel von der *cell - attached* Konfiguration in die *whole - cell* Konfiguration erfolgte durch Öffnen der Zelle, das durch vorsichtiges Saugen erreicht wurde. Gleichzeitig wurde eine Haltespannung von -80 mV angelegt. Vor und nach dem Durchbrechen der Zellmembran wurden die kapazitiven Ladeströme bestimmt. Hierfür wurden 10 Spannungssprünge appliziert, bei denen die Zelle jeweils 50 ms von -80 mV auf -70 mV depolarisiert wurde. Aus der Differenz der kapazitiven Umladeströme vor und nach dem Durchbrechen der Zellmembran wurden der Membranwiderstand und der Serienwiderstand bestimmt. Das Membranpotential wurde durch einen kurzzeitigen Wechsel vom *voltage clamp* in den *current clamp* Modus des Verstärkers bestimmt. Die Kapazität der *Patch* - Pipette und das *Liquid Junction Potential* der Pipettenlösung mit Biozytin (siehe Kap. 2.2.1) von 7 mV wurden kompensiert. Alle Messungen wurden bei RT durchgeführt.

#### 2.4.4 Stimulationsprotokolle

Die Aufnahme des Gesamtstrommusters der Zelle erfolgte durch Verwendung eines Stimulationsprotokolls, bei dem die Zellmembran ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV in 10 mV Schritten auf 10 mV depolarisiert und auf -170 mV hyperpolarisiert wurde (Abb. 7A). Bei den Kopplungsanalysen in juvenilen Mäusen wurden außerdem Stimulationsprotokolle verwendet, bei denen die Zellmembran vor dem Anlegen der Spannungssprünge für 300 ms auf -110 mV hyperpolarisiert bzw. auf -40 mV depolarisiert wurde (Abb. 7B und C). Mit diesen Vorpulsen wurden transiente Auswärtsströme aktiviert oder deaktiviert. Aus der Differenz dieser beiden Strommuster konnte der Anteil der transienten  $K^+$ - Auswärtsströme bestimmt werden (Matthias et al., 2003).



**Abb. 7 Elektrophysiologische Stimulationsprotokolle**

Alle Zellen wurden auf ein Haltepotential von -80 mV geklemmt. A) Das Standardprotokoll bestand aus neun aufeinanderfolgenden depolarisierenden und hyperpolarisierenden 10 mV Sprüngen von je 50 ms Dauer. B, C) Stimulationsprotokolle mit 14 depolarisierenden und neun hyperpolarisierenden 10 mV Sprüngen von je 50 ms Dauer. Beiden Protokollen geht ein 300 ms langer Vorpuls auf -110 mV (B) oder auf -40 mV (C) voraus.

### 2.4.5 Identifikation der Astrozyten

Für die Experimente wurden coronale Hippocampusschnitte verwendet. Die Präparation und Lagerung der Schnitte erfolgte wie in Kap. 2.3.2 beschrieben. Die Schnitte wurden in eine Badkammer überführt und mit Hilfe eines U - förmigen Platindrahts, der mit Nylonfäden bespannt war, fixiert. Die Badkammer wurde auf dem Objektivtisch des Mikroskops (Nikon Eclipse FN1, Düsseldorf, Deutschland) fixiert und die Schnitte über einen kontinuierlichen Zu- und Abfluss mit carbogenbegastem ACSF versorgt.

Für die 40- und 600fache Vergrößerung wurde ein Nikon Plan (4x / NA 0,1) Objektiv und ein Nikon NIR Apo Wasserimmersionsobjektiv (60x / NA 1,0) verwendet. Im Stratum radiatum der CA1 Region wurden, mit Hilfe der Infrarot Interferenz Kontrast Optik (IR - DIC) des Mikroskops, die Astrozyten nach morphologischen Kriterien ausgewählt. Typisch für Astrozyten sind ihre ovalen Somata und die prominenten Fortsätze mit ihren vielen kleinen Verzweigungen. Diese Morphologie war bei 600facher Vergrößerung unter der IR - DIC Optik des Mikroskops gut zu erkennen.

### 2.4.6 Biozytinvisualisierung

Für die Kopplungsanalysen wurde die Pipettenlösung mit 0,5 % N-biotinyl-L-Lysin (Biozytin, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) versetzt und Astrozyten in der *whole - cell* Konfiguration 20 min mit dieser Lösung gefüllt. Für die Überprüfung einer stabilen *whole - cell* Konfiguration wurden das Membranpotential, der Serienwiderstand und der Membranwiderstand während der Ableitzeit bestimmt. Nur Astrozyten, bei denen diese Parameter konstant waren, wurden für die weitere Auswertung berücksichtigt. Je Schnitt wurde ein Astrozyt mit Biozytin gefüllt. Sofort nach Ende der Messungen wurde der Schnitt in der Fixierlösung für mindestens 24 h fixiert und anschließend immunhistochemisch entwickelt.

Vor dem Färben wurden die Schnitte 3x mit 0,1 M PBS gewaschen und anschließend die unspezifischen Antigenbindungsstellen 2 h bei RT blockiert (10 % normales Ziegen Serum, 2 % Triton in 0,1 M PBS). Über Nacht erfolgte die Inkubation mit Streptavidin, das konjugiert war mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (1 : 100 Streptavidin - Cy3, 2 % NGS, 0,1 % Triton). Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit 0,1 M PBS 3x gewaschen, auf Objektträger aufgetragen und mit Eindeckmedium Vectashield® (Mounting Medium, Vectorlabs, Burlingame, USA) konserviert.

Mit einem konfokalen LSM (TCS NT) (Objektiv: PLAN APOCHROMAT, 40x / 0,75) (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Deutschland) oder einem Axiophot Mikroskop (Objektiv: Plan APOCHROMAT, 20x / NA 0,8) (Zeiss, Jena, Deutschland) und einer Digital Spot Kamera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, Michigan, USA) und der MetaVue Software (Universal Imaging Corporation, West Chester, USA) wurden Aufnahmen der gefärbten Schnitte erstellt. Die Schnitte wurden als xyz - Stapel aufgenommen. Der Abstand zwischen den z - Ebenen betrug 1 - 2  $\mu\text{m}$ .

### 2.4.7 Auswertung der Kopplungsexperimente

Die Aufnahmen der gefärbten Schnitte wurden mit ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA) bearbeitet und ausgewertet. Die Berechnung der Zellmembraneigenschaften erfolgte mit Igor Pro 6. Für diese Berechnungen wurden von PD R. Jabs programmierte Makros verwendet.

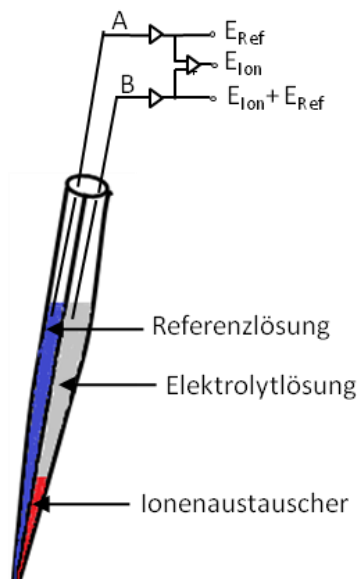
Mit Hilfe der Software GraphPadPrism 5 wurden die Unterschiede zwischen den Genotypen mit einer ANOVA und einem *post hoc* Tukey Test bzw. einem *Student's t* - Test auf Signifikanz getestet. Alle Mittelwerte sind mit  $\pm$  SEM angeben. Als statistisch signifikant galt ein Unterschied mit  $p < 0,05$ .

## 2.5. Messung des Feldpotentials und der $[\text{K}^+]_o$

### 2.5.1 Prinzip der Messungen

Die  $[\text{K}^+]_o$  in den Hirnschnitten wurde mit einer ionensensitiven Mikroelektrode (ISM) bestimmt. ISM messen ein Potential zwischen einer Lösung mit bekannter Konzentration und einer Messlösung. Sie bestehen aus einem Referenzkanal und einem ionensensitiven Kanal. Der Referenzkanal ist mit einer hochkonzentrierten Lösung gefüllt, welche das zu messende Ion in definierter Konzentration enthält. In der Spitze des ionensensitiven Kanals befindet sich ein Ionenaustauscher (organische Phase). In diesem Ionenaustauscher sind Ionentransporter - Moleküle gelöst, die dem zu messenden Ion den Eintritt aus der Versuchslösung in die organische Phase ermöglichen. Hierbei entsteht ein Grenzflächenpotential. Dieses Grenzflächenpotential ist vom Eintritt der Messionen in den Ionenaustauscher abhängig und verhält sich proportional zum Logarithmus der Konzentration des Messions. Am ionenselektiven Kanal wird das Summenpotential aus Ionenpotential und Referenzpotential gemessen. Für die Bestimmung des Ionenpotentials muss das Referenzpotential vom Summenpotential subtrahiert werden (Abb. 8).



**Abb. 8 Schematische Darstellung einer ISM**

Mit Hilfe eines chlorierten Silberdrahtes wurde das Referenzpotential ( $E_{Ref}$ ) auf den Eingang A und das Summenpotential des ionensensitiven Kanals ( $E_{Ion} + E_{Ref}$ ) auf den Eingang B eines Differenzverstärkers geleitet. Durch Subtraktion des Referenzpotentials A vom Summenpotential B wurde das Ionenpotential ( $E_{Ion}$ ) ermittelt (nach Trosiner, 2003).

Das Ionenpotential wurde mit einer modifizierten Nernst Gleichung in die  $K^+$ -Konzentration (mM) umgerechnet.

$$\log[Ion_1] = E_m \cdot (S \cdot v) \exp(-1) + \log[Ion_0]$$

$E_m$  gemessenes Potential

S Anstieg der Elektrode (dieser wurde vor jeder Messung durch Kalibrierung bestimmt)

V Wertigkeit des Ions

$[Ion_0]$  Konzentration von  $K^+$  im Ruhezustand

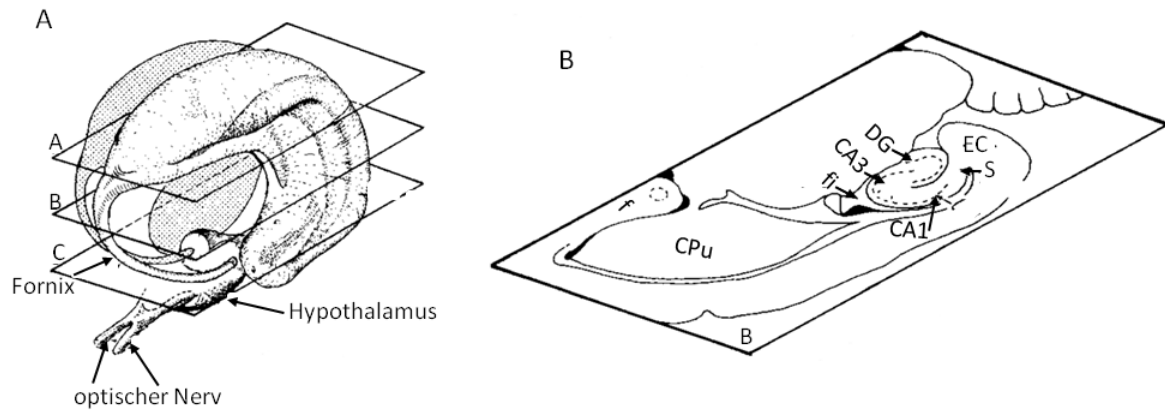
$[Ion_1]$  Konzentration von  $K^+$  während der Stimulation

### 2.5.2 Präparation der horizontalen Hippocampuschnitte

Aufgrund der Anordnung der Dendriten der Pyramidenneuronen wurden für die Messungen der Feldpotentiale und der  $[K^+]_o$  horizontale Schnitte verwendet. Die Mäuse wurden in eine tiefe Ethernarkose versetzt und, nachdem keine Reaktion auf Schmerzreize mehr erfolgte, dekapitiert. Das Gehirn wurde entfernt (siehe Kap. 2.3.2) und mit der Hirnbasis nach unten auf einer gekühlten Petrischale abgelegt.

Mit einer Rasierklinge wurden das Kleinhirn abgesetzt, die beiden Hemisphären voneinander getrennt und anschließend vorsichtig auf die Mantelkante gedreht. Parallel zur Hippocampusformation wurde dann durch einen Transversalschnitt jeweils der

hochparietale Anteil der Hemisphäre abgetrennt. Die hierdurch entstandene Fläche wurde genutzt, um die Gehirnhälften, auf der mit Sekundenkleber präparierten Plattform, in der Schneidekammer des Vibratoms nebeneinander zu fixieren (Campden Instruments, Leicester, Großbritannien). Vom caudalen Teil wurden mit einer Rasierklinge 400 µm dicke hippocampale Schnitte angefertigt (Abb. 9).



**Abb. 9 Schema zur Präparation der horizontalen Hippocampuschnitte**

A) Oberfläche der hippocampalen Formation. B) Ebene B aus Abb. A. Für die Experimente wurden nur Schnitte verwendet, die der medial - dorsoventralen Ebene (B) entsprachen. CA1 - CA3, Abschnitte des Rindenbandes des Hippocampus (Cornum ammonis); DG, Gyrus dentatus; EC, entorhinale Cortex; S, Subiculum; CPU, Caudatum - Putamen; fi, Fimbria; F, Fornix (Amaral und Witter, 1995).

### 2.5.3 Herstellung ionensensitiver Mikroelektroden

Die ISM wurden aus doppelwelligem Borosilikatglas (Thetaglas) hergestellt. Mit einem Elektrodenziehgerät (vertikaler Chicago-Puller, Eigenbau der technischen Abteilung des Instituts für Neurophysiologie der Charité) wurden die Kapillaren ausgezogen und auf einen Spitzendurchmesser von 2 - 3 µm zurückgebrochen. Der Referenzkanal wurde mit 150 mM NaCl Lösung gefüllt. Die Spitze des ionensensitiven Kanals wurde mit 5 % Trimethyl-1-Chlorsilan (FLUKA; Buchs, Schweiz) in 95 % CCl<sub>4</sub> lipophilisiert. Diese Silanisierung macht die Glasoberfläche hydrophob und verhindert, dass der hydrophobe Ionenaustauscher durch die Elektrolytlösungen von der Glasoberfläche verdrängt wird. Als Elektrolytlösungen wurde eine 100 mM KCl Lösung verwendet und die Spitze des Kanals mit einem K<sup>+</sup>-selektiven Ionenaustauscher (K<sup>+</sup>- Ionophore Cocktail A 60031, FLUKA; Buchs, Schweiz) gefüllt. Über das Elektrodenende wurde in den ionensensitiven Kanal und den Referenzkanal jeweils ein chlorierter Silberdraht in die KCl - bzw. NaCl - Lösung eingetaucht und die Silberdrähte mit Dentalwachs am Elektrodenende fixiert.

### 2.5.4 Herstellung bipolarer Reizelektroden

Für die Herstellung der Reizelektroden wurden ebenfalls doppelumige Thetaglas - Kapillaren verwendet, die mit einem Elektrodenziehgerätes ausgezogen und auf einen Spitzendurchmesser von über 100  $\mu\text{m}$  zurückgebrochen wurden. Zwei Silberdrähte wurden mit je einem 20  $\mu\text{m}$  dünnen Platin - Iridium Draht (Goodfellow; Cambridge, Großbritannien) verlötet und so in die Lumina eingeführt, dass die Platindrähte im Abstand von maximal 100  $\mu\text{m}$  aus der Elektrodenspitze herausragten. Diese Drähte wurden anschließend an der Spitze der Glaskapillare mit Schellack fixiert und auf eine Länge von etwa 2 mm zurückgeschnitten. Am anderen Elektrodenende wurden die herausragenden Silberdrähte mit Dentalwachs fixiert.

### 2.5.5 Interfacekammer

Die Durchführung der Experimente erfolgte unter Interfacebedingungen. Dazu wurden die Schnitte in einer mit Linsenpapier (Kodak, Stuttgart, Deutschland) ausgelegten Interfacekammern an der Grenze zwischen gasförmiger und flüssiger Phase der Badlösung platziert. Unterhalb der Interfacekammer befand sich ein Zylinder, der mit 35°C warmem, destilliertem Wasser gefüllt war und kontinuierlich mit Carbogen begast wurde. Das angewärmte und wasserdampfgesättigte Gas stieg über seitliche Schlitze in die Perfusionskammer auf und bildete die gasförmige Phase. Die flüssige Phase wurde durch 34°C warmes, mit Carbogen gesättigtem ACSF, das mit einer Geschwindigkeit von 1,8 ml/min eingeleitet wurde, gebildet. In der Kammer befand sich außerdem eine Referenzelektrode, die aus einem Ag/AgCl Pellet bestand.

### 2.5.6 Positionierung der Meß- und Stimulationselektrode

Die Elektroden wurden unter der optischen Kontrolle eines Binokulars positioniert. Die ISM wurde an der Grenze zwischen dem Stratum pyramidale und dem Stratum oriens in der Mitte der CA1 Region platziert. Die bipolare Reizelektrode wurde im Alveus platziert, um hier antidrome Stimulationen auszulösen. Für die Bestimmung der  $[\text{K}^+]_o$  im laminaren Profil wurde die Messelektrode in 100  $\mu\text{m}$  Schritten vom Stratum pyramidale in Richtung hippocampaler Fissur mit Hilfe eines Mikromanipulators (MPC-100, Sutter Instrument, Novato, CA, USA) bewegt. Alle Messungen wurden 100  $\mu\text{m}$  unter der Schnittoberfläche durchgeführt.

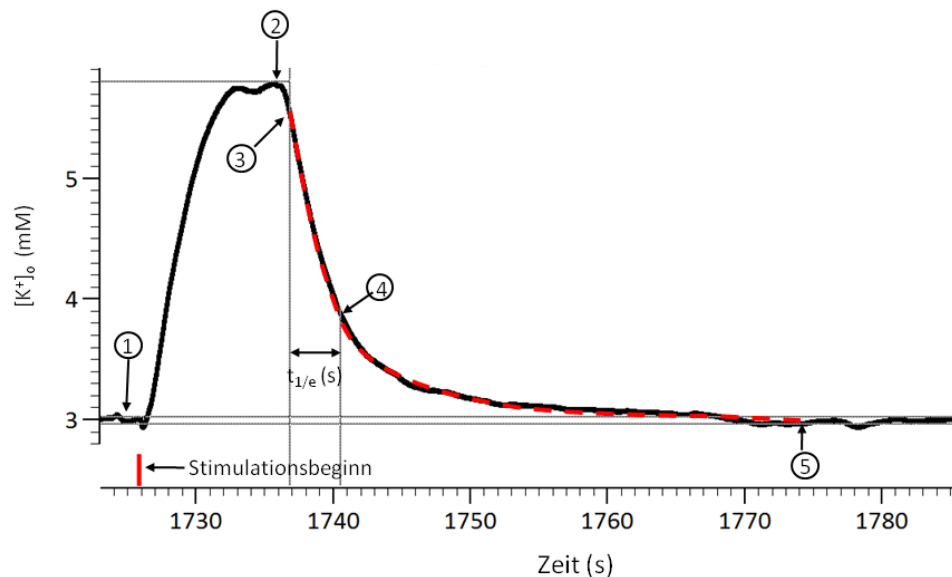
---

### 2.5.7 Messung und Auswertung der Feldpotentiale und der $[K^+]_o$

Vor Beginn der Messungen wurden die Schnitte mindestens 20 min mit ACSF mit Blockern inkubiert (siehe Kap. 2.2.3), um synaptische Übertragungen zu blockieren. Als Blocker wurden L-APV als Antagonist für NMDA Rezeptoren, CNQX als Antagonist für AMPA/Kainat Rezeptoren und Bicucullin als Antagonist für  $GABA_A$  Rezeptoren eingesetzt.

Stimuliert wurde mit kurzen, gepaarten Pulsen (Doppelpulsen) von 0,1 ms Dauer im Abstand von 50 ms. Für jede Messung wurden fünf Doppelpulse appliziert. Der Abstand zwischen den Doppelpulsen betrug 20 s. Die langsamen Feldpotentiale wurden mit Stimulationstrains hervorgerufen. Die Stimulationstrains bestanden aus Pulsen von 0,1 ms Länge, die über einen Zeitraum von 10 s mit einer Frequenz von 20 Hz appliziert wurden (Wallraff et al., 2006; Gabriel et al., 1998). Ausgelöst wurden die Pulse mit einem Master - 8 Pulsstimulator (A.M.P.I., Jerusalem, Israel). Durch die Stimulation wurden axonale Aktionspotentiale ausgelöst, die extrazellulär als Summenaktionspotentiale registriert (Populationsspike) wurden. Stimuliert wurde mit 25, 50, 75 und 100 % Intensität. Dabei entsprachen 100 %, der Stimulationsintensität mit dem ein maximales Summenaktionspotential ausgelöst wurde. Die Datenaufnahme erfolgte mit der Spike 2 Software (Cambridge Electronic Design, Cambridge, Großbritannien). Die Feldpotentiale wurden mit einer Rate von 10 kHz und einem 3 kHz Filter gemessen. Die Messung der  $[K^+]_o$  erfolgte mit 100 Hz und einem 1,6 Hz Filter. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit der Spike 2 Software. Mit diesem Programm wurde die  $[K^+]_o$  vor der Stimulation, die maximale  $[K^+]_o$  sowie die Zeit für den Abfall von 90 % der  $[K^+]_o$  auf  $1/e$  der  $[K^+]_o$  ( $t_{1/e}$ ) bestimmt (Abb. 10). Der Abfall der  $[K^+]_o$  kann mit einer schnellen und einer langsamen Zeitkonstante beschrieben werden. Für die Bestimmung dieser beiden Zeitkonstanten ( $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$ ) wurde der Abfall biexponentiell zwischen 90 % und dem Minimum der  $[K^+]_o$  mit einem Levenberg - Marquardt Algorithmus gefittet (Abb. 10). Diese Berechnungen erfolgten mit IGOR Pro 6.

Die Messungen wurden am Institut für Neurophysiologie der Charité in der Projektgruppe „Physiologie und Pathophysiologie hippocampaler Formationen“, durchgeführt.



**Abb. 10 Schema zur Auswertung der  $[K^+]_o$ .**

Die Abbildung zeigt einen  $[K^+]_o$  - Peak hervorgerufen durch einen Stimulationstrain (10 s, 20 Hz). Gekennzeichnet sind der Stimulationsbeginn sowie die für die Auswertung notwendigen Punkte. 1, Grundlinie der  $[K^+]_o$ . 2, maximale  $[K^+]_o$ . 3, 90 % des Maximums der  $[K^+]_o$ . 4, Abfall auf  $1/e$ , ausgehend von 90 % der  $[K^+]_o$ . 5, tiefster Punkt der  $[K^+]_o$ . Die rote, gestrichelte Linie kennzeichnet den Bereich, der für die Bestimmung der Zeitkonstanten biexponentiell gefittet wurde. Die Zeit für den Abfall der  $[K^+]_o$  von Punkt 3 nach Punkt 4 entspricht  $t_{1/e}$ . Die Differenz der  $[K^+]_o$  zwischen Punkt 1 und Punkt 5 entspricht dem *undershoot*.

Die Unterschiede zwischen den Genotypen wurden mit einem *Student's t* - Test, einer zweifaktoriellen ANOVA und durch Kovarianzanalyse auf Signifikanz getestet. Alle Mittelwerte sind mit  $\pm$  SEM angegeben. Als statistisch signifikant galt ein Unterschied mit  $p < 0,05$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Einfluss des AQP4 Kanals auf die Kopplungseigenschaften von Astrozyten im Hippocampus der Maus

In kultivierten Astrozyten der Maus hatte der *knock down* der AQP4 Expression mit Hilfe von siRNA die zeitabhängige Reduktion der Cx43 Expression zur Folge (Nicchia et al., 2005). Die Autoren zeigten weiterhin, dass der *knock down* der AQP4 Expression auch zur Reduktion der Kopplung führte. Für die Überprüfung dieser Befunde *in situ* wurde in dieser Arbeit in Hirnschnitten von AQP4ko Mäusen die *Gap junction* Kopplung in der CA1 Region des Hippocampus untersucht.

##### 3.1.1 Kopplungsanalysen mit der gap - FRAP Methode

Die Größe von astrozytären Netzwerken kann durch die Ausbreitung von Biozotin im Synzytium bestimmt werden (Theis et al., 2003; Wallraff et al., 2004). Bei dieser Methode werden die Astrozyten nach morphologischen Kriterien unter der IR - DIC Optik des Mikroskops ausgewählt. Die Auswahl der Zellen durch den Experimentator ist deshalb subjektiv. Ziel in diesem Teil der Arbeit war, eine Methode zu etablieren, die eine höhere Objektivität bei der Bestimmung der Kopplung ermöglicht.

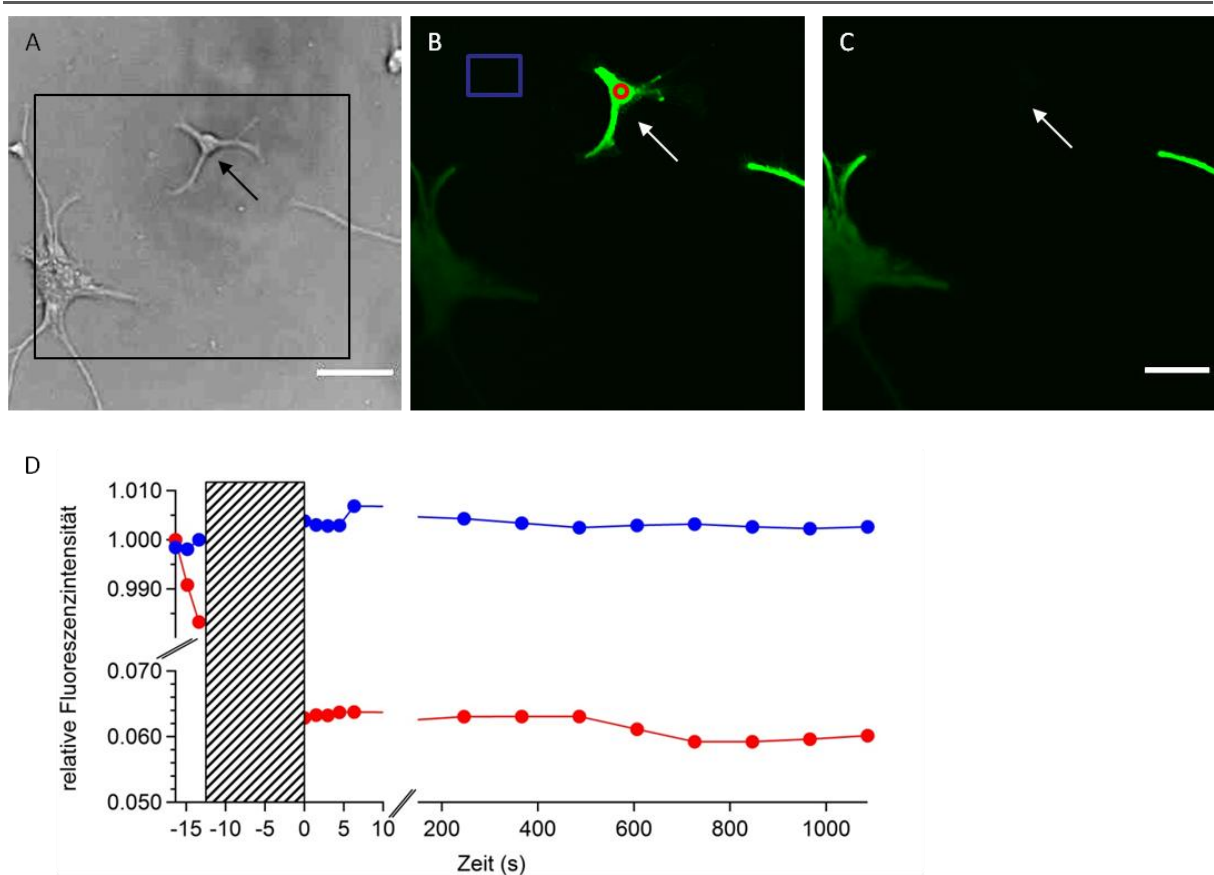
Eine weitere Methode zur Bestimmung von *Gap junction* Kopplung ist die gap - FRAP Methode. Bei dieser Methode werden Astrozyten mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Dann wird ein definierter Bereich mit hoher Laserintensität gebleicht und anschließend die Rückkehr der Fluoreszenz bis zum Erreichen eines stationären Zustandes beobachtet (siehe Kap. „2. Methoden“; Abb. 3). Durch die Bestimmung der Fluoreszenzintensität nach Erreichen des stationären Zustandes können Rückschlüsse auf den Kopplungsumfang gezogen werden (Abbaci et al., 2008). Da sich innerhalb des Bleichbereiches mehrere Astrozyten befinden, wird eine subjektive Auswahl einzelner Astrozyten vermieden. Grundlage für die Untersuchung der Kopplung mit der gap - FRAP Methode waren die Arbeiten von Cotrina et al., 2001, Frantseva et al., 2002 und Wentlandt et al., 2006. In diesen Arbeiten wurden mit der gap - FRAP Methode in kultivierten Schnitten von Ratten die Veränderungen der *Gap junction* Kopplung durch Hirntrauma und Anästhetika untersucht (Frantseva et al., 2002; Wentlandt et al., 2006), sowie *in situ* die Veränderungen der Kopplung beim Alterungsprozess von Mäusen

---

(Cotrina et al., 2001). Anhand dieser Arbeiten erfolgte die Auswahl des Farbstoffes und seiner eingesetzten Konzentration.

### 3.1.2 CFDA ist ein geeigneter Farbstoff für gap - FRAP Experimente

Als Farbstoff für die gap - FRAP Experimente wurde CFDA verwendet. In einem ersten Vorversuch wurde die Relaxation von CFDA untersucht. Neben der Farbstoffdiffusion über *Gap junctions* und aus ungeblichenen Bereichen innerhalb des Astrozyten (Frantseva et al., 2002) kann die Relaxation des Farbstoffes an der Fluoreszenzrückkehr beteiligt sein. Die Relaxation des Farbstoffes wurde an kultivierten Astrozyten von Mäusen untersucht. Für die Untersuchung der Farbstoffrelaxation musste die Diffusion von CFDA aus benachbarten Zellen ausgeschlossen werden. Da kultivierte Astrozyten erst nach einigen Tagen Verbindungen zu benachbarten Zellen ausbilden, wurden diese Experimente mit kultivierten Astrozyten realisiert, die noch nicht mit Nachbarzellen verbunden waren (Abb. 11A). Die Astrozyten wurden mit einer CFDA - Lösung gefärbt und zwischen 9 und 20 s gebleicht (Abb. 11B). Die Größe des Bleichbereiches betrug  $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ . Nach dem Bleichen wurde über einen Zeitraum von 15 - 18 min die Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Untersuchung der Farbstoffrelaxation erfolgte in vier gap - FRAP Experimenten. In keinem Versuch wurde eine Rückkehr der Fluoreszenz beobachtet (Abb. 11C und D). Mit diesem Vorversuch wurde gezeigt, dass die Relaxation des Farbstoffes keinen wesentlichen Beitrag bei der *Recovery* der Fluoreszenz leistet. Die Rückkehr der Fluoreszenz nach dem Bleichen ist somit auf die Diffusion des Farbstoffes aus den ungeblichenen Bereichen zurückzuführen.



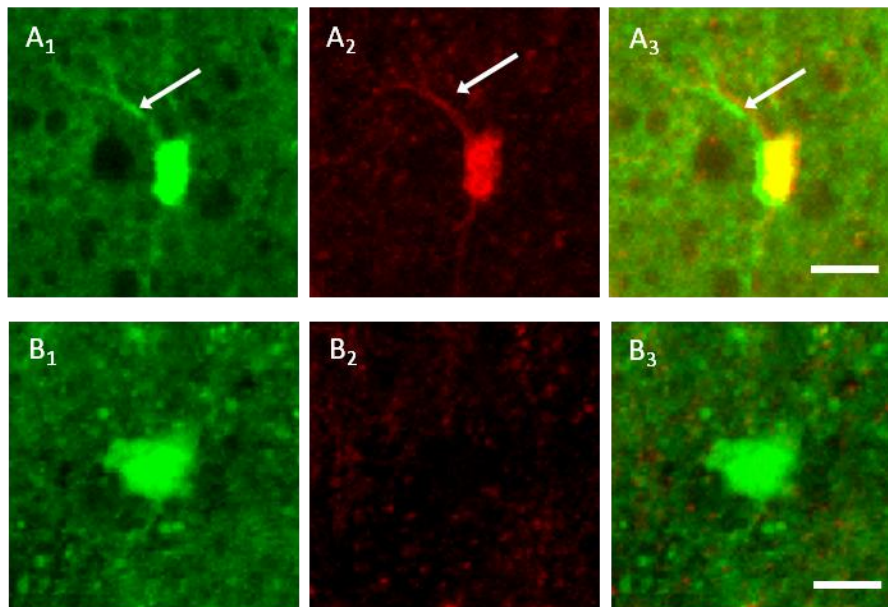
**Abb. 11 Farbstoffrelaxation von CFDA in Zellkulturen**

A) IR - DIC Bild von primären Astrozyten in der Zellkultur. Der Pfeil kennzeichnet einen Astrozyten, der noch keine Verbindungen zu seinen Nachbarzellen ausgebildet hatte. Der schwarze Rahmen kennzeichnet den Ausschnitt, der in den Abbildungen B und C aufgenommen wurde. Skalierung 50  $\mu\text{m}$ . B) Aufnahme der CFDA Fluoreszenz vor dem Bleichen. C) Aufnahme ~18 min nach dem Bleichen. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Argon - Laser bei 488 nm. Skalierung 50  $\mu\text{m}$ . D) Verlauf der normierten Fluoreszenzintensität vor und nach dem Bleichen. Die rote Kurve zeigt den Verlauf der Fluoreszenzintensität in der geblichenen Zelle (roter Kreis, Abb. B). Die blaue Kurve zeigt den Verlauf der Fluoreszenzintensität im Hintergrund (blaues Rechteck, Abb. B). Während der *Recovery* nimmt die Fluoreszenzintensität in der geblichenen Zelle um 8 % ab. Im Hintergrund schwankt die Fluoreszenzintensität während der *Recovery* um 1 %.

In einem weiteren Vorversuch wurde die selektive Aufnahme von CFDA in die Astrozyten untersucht. Für die spezifische Markierung der Astrozyten wurden diese mit SR101 gefärbt. (Nimmerjahn et al., 2004; Kafitz et al., 2008). Von den mit CFDA und SR101 gefärbten Schnitten wurden Aufnahmen als xyz - Stapel mit dem LSM erstellt (Abb. 13). Für die Auswertung wurden im Bereich des Stratum radiatum die Zellen gezählt, die mit SR101 und CDFA gefärbt waren und anhand ihrer prominenten Fortsätze und ovalen Somata als Astrozyten identifiziert wurden (Abb. 12A) (Kafitz et al., 2008). In fünf Schnitten von zwei AQP4ko Mäusen wurden insgesamt 269 Astrozyten gezählt. Als Kontrolle wurden sechs Schnitte einer C57BL/6J Maus ausgewertet. Insgesamt wurden hier 312 Astrozyten gezählt

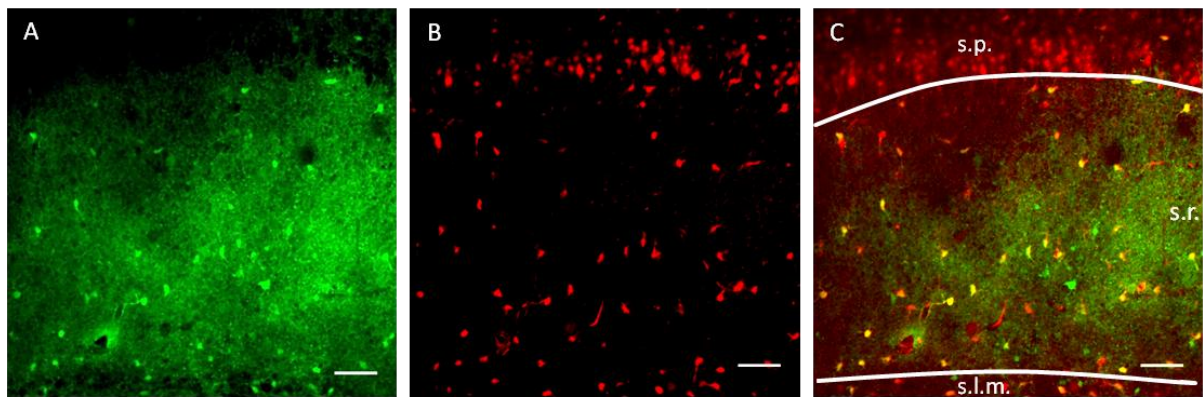


(Abb. 13). Des Weiteren gab es Zellen, die nur mit CFDA gefärbt waren und nicht die morphologischen Merkmale eines Astrozyten aufwiesen (Abb. 12B). In den Schnitten der AQP4ko Mäuse betraf das 17 Zellen und in den Schnitten der C57BL/6J Maus 21 Zellen (Abb. 13). Mit diesem Vorversuch wurde gezeigt, dass in AQP4ko Mäusen und C57BL/6J Mäusen CFDA vorwiegend von Astrozyten aufgenommen wurde.



**Abb. 12 Morphologie der SR101 und CFDA gefärbten Zellen**

A) Aufnahme eines CFDA und SR101 gefärbten Astrozyten. Zu erkennen ist das ovale Soma sowie ein Fortsatz (weißer Pfeil). B) Aufnahme einer Zelle, die nur mit CFDA gefärbt war. A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>) Aufnahmen der CFDA Fluoreszenz. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 488 nm mit dem Argon - Laser. A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>) Aufnahmen der SR101 Fluoreszenz. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 543 nm mit dem Helium - Neon Laser. A<sub>3</sub>, B<sub>3</sub>) Übereinandergelegte Aufnahmen der CFDA und SR101 Fluoreszenz. Skalierung 20 µm.



**Abb. 13 Färbung mit CFDA und SR101**

Die Abb. zeigen A) die CFDA Fluoreszenz und B) die SR101 Fluoreszenz im Bereich der CA1 Region einer C57Bl/6J Maus. Die Anregung der CFDA Fluoreszenz erfolgte mit dem Argon - Laser bei 488 nm. Die SR101 Fluoreszenz wurde mit dem Helium - Neon Laser bei 543 nm angeregt. C) Zeigt die übereinandergelegten Aufnahmen A und B. Zu sehen ist der Bereich des Stratum pyramidale (s.p.), des Stratum radiatum (s.r.) und am unteren Rand des Stratum lacunosum moleculare (s.l.m.). Die weißen Linien grenzen den Bereich des Stratum radiatum ab. Innerhalb dieses Bereiches wurden die gefärbten Zellen gezählt (gelb: Zellen, die mit CFDA und SR101 gefärbt waren, grün: nur CFDA gefärbte Zellen). Die Fluoreszenz wurde mit dem LSM als xyz - Stapel mit einem Volumen von 488  $\mu\text{m}$  x 488  $\mu\text{m}$  x 29  $\mu\text{m}$  (Länge x Breite x Tiefe) aufgenommen. Die Abbildungen zeigen jeweils die Maximalprojektion des xyz - Stapels. Skalierung 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3 Astrozyten können durch Inkubation der Schnitte in einer CFDA - Lösung gefärbt werden

Für die Applikation von CFDA wurden drei verschiedene Strategien getestet (siehe „2. Methoden“ Kap. 2.3.5).

I) Injektion von CFDA *in vivo* in den Hippocampus. Zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion wurden Schnitte angefertigt. Da in keinem der Schnitte Fluoreszenz detektiert wurde, wurde diese Methode als nicht geeignet verworfen.

II) Mit einer Pipette wurden durch einen geringen Überdruck unterschiedliche Konzentrationen der CFDA - Lösung in die Schnitte appliziert. Unabhängig von der CFDA - Konzentration war die Ausbreitung des Farbstoffes in den Schnitten lokal begrenzt. Außerdem waren innerhalb des Ausbreitungsbereiches nur sehr wenige Astrozyten gefärbt. Somit war auch diese Methode nicht geeignet.

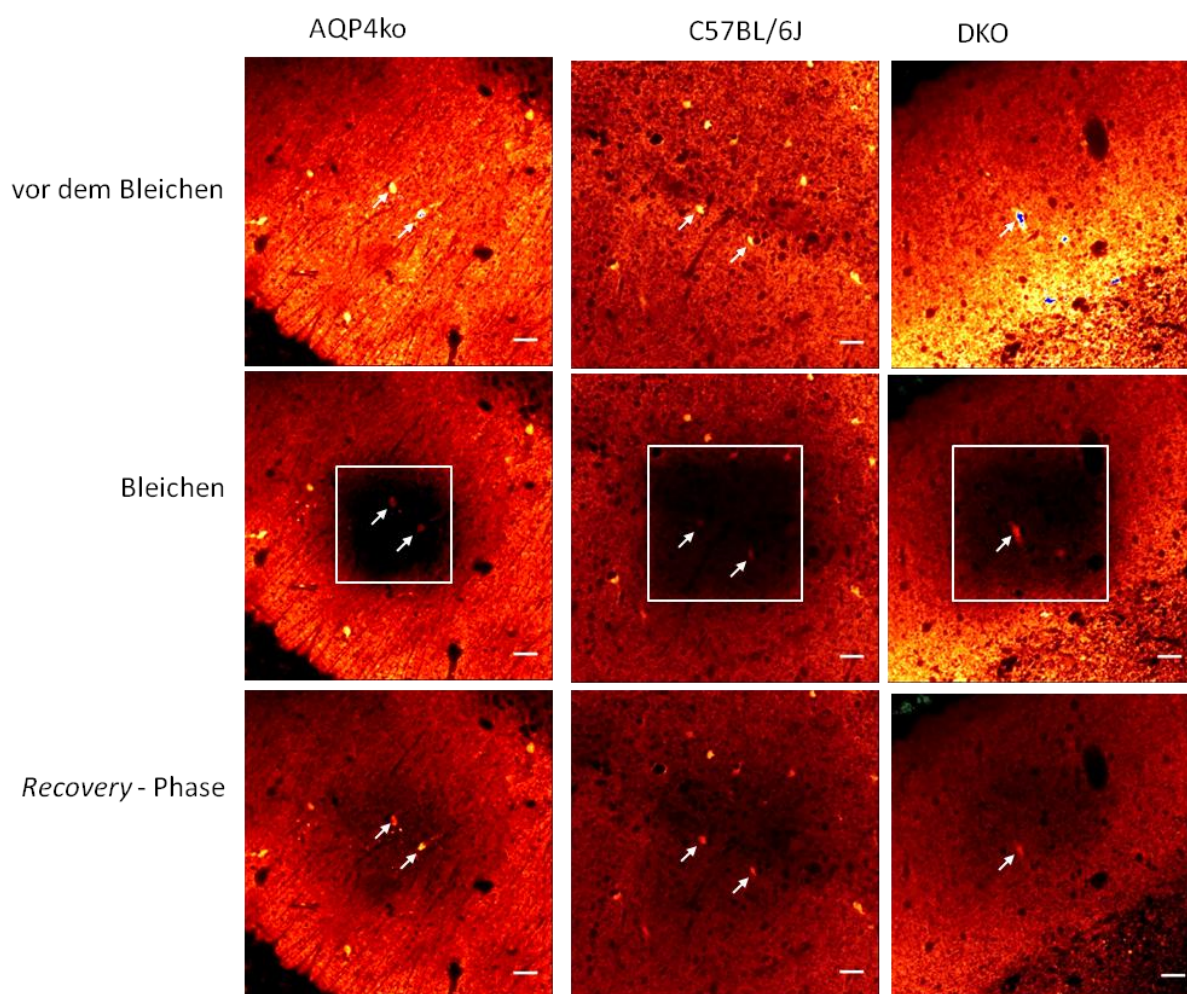
III) Inkubation der Schnitte in einer 15  $\mu\text{M}$  CFDA - Lösung. Die Qualität der Fluoreszenzfärbungen war sehr unterschiedlich. Neben Schnitten mit sehr vielen gefärbten Astrozyten gab es auch Schnitte, in denen nur sehr wenige oder gar keine Astrozyten gefärbt waren. Im Vergleich zu den beiden erst genannten Methoden wurden durch die Inkubation

---

der Schnitte in der CFDA - Lösung, die besten Färbeergebnisse erzielt. Für alle gap - FRAP Experimente in Kap. 3.1.4 wurden die Astrozyten mit dieser Methode gefärbt.

*3.1.4 Mit der gap - FRAP Methode war die quantitative Bestimmung der Kopplung begrenzt realisierbar*

Mit der gap - FRAP Methode wurde die *Gap junction* Kopplung in adulten AQP4ko Mäusen untersucht. Als Kontrollen wurden adulte C57BL/6J Mäuse verwendet. Astrozyten haben große, weit verzweigte Fortsätze. Ein Teil dieser Fortsätze kann sich außerhalb des Bleichbereiches befinden, so dass die Diffusion von CFDA aus ungeblichenen Fortsätzen Anteil an der Fluoreszenzrückkehr hat (Frantseva et al., 2002). Der Anteil der CFDA Diffusion aus ungeblichenen Bereichen des Astrozyten wurde in DKO Mäusen untersucht. Da Astrozyten in DKO Mäusen im Hippocampus nicht gekoppelt sind (Wallraff et al., 2006), ist die Fluoreszenzrückkehr in diesen Mäusen auf Diffusion aus ungeblichenen Bereichen des Astrozyten zurück zu führen. Die Mäuse der drei Genotypen waren zwischen 60 - 100 Tage alt (p, postnatales Alter in Tagen).



**Abb. 14 gap - FRAP Experimente mit AQP4ko-, C57BL/6J- und DKO Mäusen**

Dargestellt sind exemplarisch für die drei Genotypen Aufnahmen aus den drei Phasen eines gap - FRAP Experiments. Die Schnitte wurden 30 min in einer 15  $\mu$ M CFDA - Lösung inkubiert. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit dem IR - Laser. Die Pfeile kennzeichnen die Somata der Astrozyten. In den Spalten sind die drei Genotypen dargestellt (links: AQP4ko Maus, Mitte: C57BL/6J Maus, rechts: DKO Maus). Die erste Reihe zeigt die Aufnahmen vor dem Bleichen. In der zweiten Reihe sind die Aufnahmen unmittelbar nach dem Bleichen zu sehen. Die Quadrate kennzeichnen den Bereich im Stratum radiatum, der geblichen wurde (AQP4ko Maus 50  $\mu$ m x 50  $\mu$ m; C57BL/6J- und DKO Mäuse 100  $\mu$ m x 100  $\mu$ m). In der dritten Reihe ist die letzte Aufnahme der *Recovery* - Phase zu sehen. Skalierung: 20  $\mu$ m.

Jedes gap - FRAP Experiment bestand aus drei Schritten. Als erstes wurde die Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen (Ausgangsintensität) bestimmt (Abb. 14, erste Reihe). Dann wurde ein definierter Bereich mit dem Argon - Laser geblichen (Abb. 14, zweite Reihe). Im dritten Schritt wurde die Rückkehr der Fluoreszenz (*Recovery*) innerhalb des geblichenen Bereiches gemessen (Abb. 14, dritte Reihe).

Für die Auswertung der Experimente wurde der Verlauf der Fluoreszenzintensität in den Somata der Astrozyten bestimmt, die sich innerhalb des Bleichbereiches befanden. Durch die Fluoreszenzanregung während der *Recovery* wurden Bleicheffekte hervorgerufen. Diese

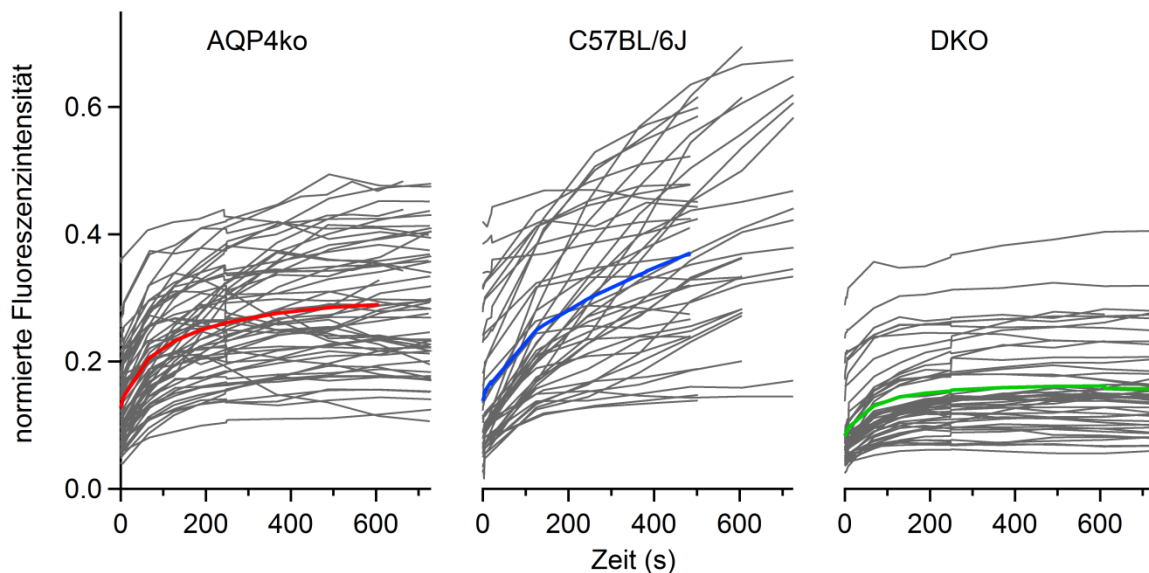
---

Bleicheffekte wurden korrigiert und die Fluoreszenz der *Recovery* auf die Ausgangsintensität normiert. Da der zeitliche Abstand zwischen den Messpunkten für die verschiedenen der *Recovery* - Kurven variierte, wurden die normierten *Recovery* - Kurven interpoliert. Hierdurch erhielt man für alle *Recovery* - Kurven die gleiche Zeitbasis. Dies ermöglichte den Vergleich der *Recovery* - Kurven und die Berechnung einer Mittelwertkurve für den jeweiligen Genotyp. In der *Recovery* - Kurve wurde die Differenz zwischen der Rest - Fluoreszenz und der maximalen Fluoreszenz nach dem Bleichen bestimmt. Dieser Wert wurde als  $\Delta F$  angegeben (siehe „2. Methoden“ Kap. 2.3.7; Abb. 5). Außerdem wurde die *Recovery* - Kurve monoexponentiell gefittet und die Zeitkonstante  $\tau$  bestimmt.

Die Untersuchung der *Gap junction* Kopplung erfolgte in zwei Versuchsreihen. In der ersten Versuchsreihe erfolgte die Anregung der Fluoreszenz vor dem Bleichen und während der *Recovery* mit dem Argon - Laser bei 488 nm. Die Fluoreszenzintensität wurde in einer z - Ebene bestimmt.

In der ersten Versuchsreihe wurde zwischen 7,4 - 10,4 s gebleicht. Die Länge des Bleichschrittes musste für die jeweiligen Experimente variiert werden, um so eine geringe Rest - Fluoreszenz nach dem Bleichen zu erreichen. Nach dem Bleichen betrug die Fluoreszenzintensität in den Somata der Astrozyten von AQP4ko Mäusen zwischen 4 und 36 %, in C57BL/6J Mäusen zwischen 3 und 42 % und in DKO Mäusen zwischen 3 und 29 % der Ausgangsintensität. Die Anzahl der ausgewerteten Astrozyten ist für alle Genotypen in Tab. 1 angegeben. Die Dauer der *Recovery* - Messung wurde ebenfalls variiert. Ziel war es, die *Recovery* so lange zu messen, bis die Fluoreszenzintensität einen konstanten Wert erreicht hatte. In AQP4ko Mäusen wurde die *Recovery* 606 - 726 s gemessen.  $\Delta F$  betrug zwischen 5 - 36 % und  $\tau$  zwischen 18 - 325 s. Die *Recovery* für C57BL/6J Mäuse wurde 483 - 724 s gemessen.  $\Delta F$  betrug in C57BL/6J Mäusen zwischen 4 - 63 % und  $\tau$  zwischen 33 - 733 s. Bei allen Experimenten mit DKO Mäusen wurde die *Recovery* über einen Zeitraum von 730 s gemessen. In dieser Zeit betrug die Zunahme der Fluoreszenzintensität zwischen 2 - 22 % und  $\tau$  variierte zwischen 17 und 240 s. Aufgrund der heterogenen CFDA Färbung der Schnitte ist zu vermuten, dass die Beladung der Astrozyten mit CFDA unterschiedlich war und hierdurch die Variabilität der Bleichdauer und *Recovery* hervorgerufen wurde.





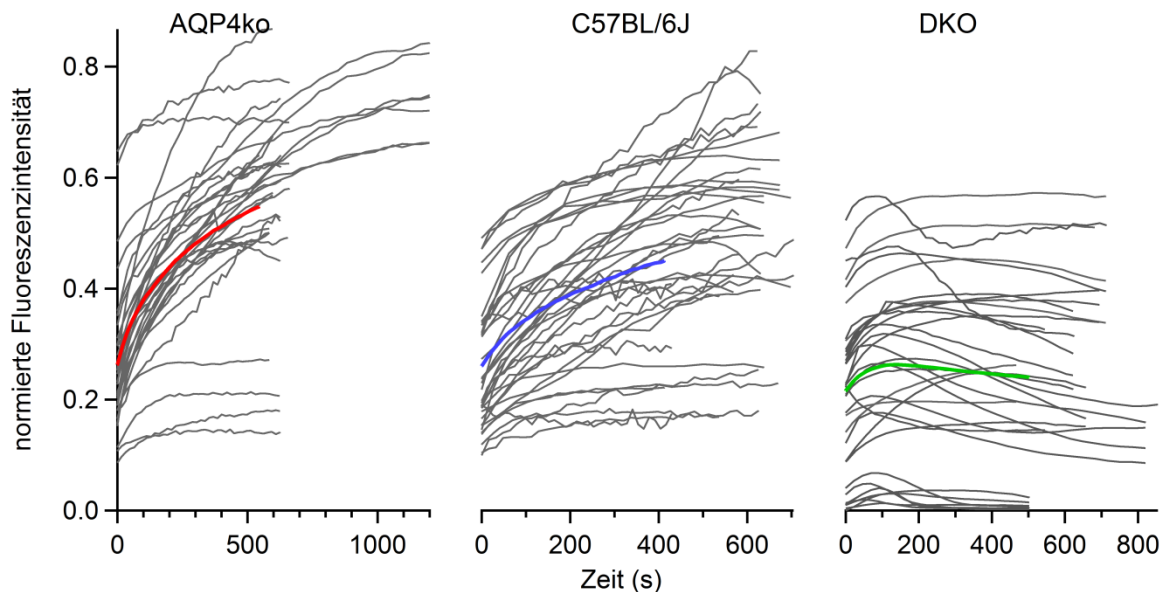
**Abb. 15 Recovery - Kurven der ersten Versuchsreihe für AQP4ko-, C57BL/6J- und DKO Mäuse**

In der ersten Versuchsreihe erfolgte die Anregung der Fluoreszenz bei 488 nm mit dem Argon - Laser in einer z - Ebene. Die interpolierten *Recovery* - Kurven in AQP4ko Mäusen (links), C57BL/6J Mäusen (Mitte) und DKO Mäusen (rechts) sind in grau dargestellt. Die Mittelwertkurve der *Recovery* ist für den jeweiligen Genotyp ebenfalls dargestellt (AQP4ko Maus: rote Kurve; C57BL/6J Maus: blaue Kurve; DKO Maus: grüne Kurve).

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Fluoreszenz vor dem Bleichen und während der *Recovery* mit einem IR - Laser angeregt. Geblichen wurde weiterhin mit dem Argon - Laser. Durch die Multiphotonenanregung erfolgte die Fluoreszenzanregung nur im Fokuspunkt, so dass Bleicheffekte verringert und eine bessere Auflösung in der z - Ebene erzielt wurden. In dieser zweiten Versuchsreihe erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenzintensität vor und nach dem Bleichen in mehreren z - Ebenen. Das Ziel war, eine größere Anzahl von Astrozyten im Bleichbereich zu erfassen. Bei der Auswertung der Experimente wurde für jedes Soma innerhalb des Bleichbereiches die z - Ebene mit der größten Fluoreszenzintensität ermittelt und in dieser Ebene die *Recovery* bestimmt (siehe „2. Methoden“ Kap. 2.3.7; Abb. 5B).

Auch in der zweiten Versuchsreihe mussten, auf Grund der heterogenen Färbung der Schnitte, die Länge des Bleichschrittes und der *Recovery* - Messung variiert werden. Geblichen wurde zwischen 6 - 14 s. Die Rest - Fluoreszenz nach dem Bleichen betrug in Astrozyten der AQP4ko Mäuse zwischen 9 - 65 %, in denen der C57BL/6J Mäuse zwischen 10 - 49 % und in denen der DKO Mäuse zwischen 0 - 20 % der Ausgangsintensität. Die *Recovery* in AQP4ko Mäusen wurde über einen Zeitraum von 544 - 1200 s und in C57BL/6J Mäusen über einen Zeitraum von 412 - 696 s bestimmt.  $\Delta F$  variierte für AQP4ko Mäuse zwischen 4 - 61 % und  $\tau$  zwischen 64 - 752 s. Für die C57BL/6J Mäuse betrug

$\Delta F$  zwischen 4 - 64 % und  $\tau$  zwischen 45 - 924 s. In den DKO Mäusen wurde die *Recovery* über einen Zeitraum von 467 - 819 s bestimmt. Während dieser Zeit nahm die Fluoreszenzintensität zwischen 1 - 25 % zu und  $\tau$  variierte zwischen 1 - 202 s. In 11 / 22 Somata von DKO Mäusen nahm die Fluoreszenzintensität nach einem kurzen Anstieg wieder ab (Abb. 16). Die Anzahl der ausgewerteten Astrozyten ist für jeden Genotyp in Tab. 1 angegeben.



**Abb. 16 Recovery der Fluoreszenz in der zweiten Versuchsreihe für AQP4ko-, C57BL/6J- und DKO Mäuse**

In der zweiten Versuchsreihe erfolgte die Anregung der Fluoreszenz mit den IR - Laser. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte in mehreren z - Ebenen. Für jedes Soma innerhalb des Bleichbereiches wurde die z - Ebene mit der höchsten Fluoreszenzintensität ermittelt und in dieser Ebene die Fluoreszenz während der *Recovery* bestimmt. Dargestellt sind die interpolierten *Recovery* - Kurven (grau) in AQP4ko Mäusen (links), C57BL/6J Mäusen (Mitte) und DKO Mäusen (rechts) aus den Einzelmessungen. Die Mittelwertkurve für den jeweiligen Genotyp ist ebenfalls dargestellt (AQP4ko Maus: rote Kurve; C57BL/6J Maus: blaue Kurve; DKO Maus: grüne Kurve).

In alle Experimente wurde die *Recovery* mindestens 412 s lang gemessen. Deshalb wurde für den Vergleich der Daten  $\Delta F$  zum Zeitpunkt  $t = 412$  s in allen Experimenten bestimmt. Für die Bestimmung von  $\tau$  wurden die *Recovery* Kurven über den gesamten Verlauf monoexponentiell gefittet. Mit einer ANOVA und einem *post hoc* Tukey Test wurden die Rest - Fluoreszenz,  $\Delta F$  und  $\tau$  zwischen den Genotypen innerhalb einer Versuchsreihe verglichen. Weiterhin wurden die Daten für den jeweiligen Genotyp zwischen den beiden Versuchsreihen mit einem *Student's t* - Test verglichen. Die Daten für beide Versuchsreihen sind in Tab. 1 zusammengefasst.

---

In der ersten Versuchsreihe war die Rest - Fluoreszenz nach dem Bleichen in AQP4ko Mäusen größer, als in C57BL/6J Mäusen und DKO Mäusen. Für AQP4ko Mäuse war  $\Delta F$  kleiner, als für C57BL/6J Mäuse. Weiterhin war  $\Delta F$  für DKO Mäuse kleiner, als für AQP4ko Mäuse und C57BL/6J Mäuse. Der Vergleich der Zeitkonstante zeigte, dass  $\tau$  für C57BL/6J Mäuse größer war, als für AQP4ko Mäuse und DKO Mäuse. Zwischen den DKO Mäusen und den AQP4ko Mäusen wurde kein Unterschied für  $\tau$  festgestellt (Tab. 1).

In der zweiten Versuchsreihe unterschied sich die Rest - Fluoreszenz nach dem Bleichen zwischen den Genotypen nicht.  $\Delta F$  war für AQP4ko Mäuse größer, als für C57BL/6J Mäuse. Für DKO Mäuse waren  $\Delta F$  und  $\tau$  kleiner, als für AQP4ko- und C57BL/6J Mäuse. Zwischen AQP4ko Mäusen und C57BL/6J Mäusen wurde kein Unterschied für  $\tau$  festgestellt (Tab. 1). Der Vergleich der beiden Versuchsreihen zeigte, dass in der ersten Versuchsreihe für alle Genotypen eine geringere Rest - Fluoreszenz erzielt wurde. Des Weiteren war in der ersten Versuchsreihe  $\Delta F$  für AQP4ko Mäuse um 10 % kleiner, als in der zweiten Versuchsreihe. Für C57BL/6J Mäuse und für die DKO Mäuse unterschied sich  $\Delta F$  zwischen den beiden Versuchsreihen nicht. Die Zeitkonstante  $\tau$  war für AQP4ko Mäuse und C57BL/6J Mäuse in der ersten Versuchsreihe kleiner, als in der zweiten Versuchsreihe. Für DKO Mäuse unterschied sich  $\tau$  zwischen den beiden Versuchsreihen nicht.



**Tab. 1 Rest - Fluoreszenz,  $\Delta F$  und  $\tau$  für AQP4ko-, C57BL/6J- und DKO Mäuse in beiden Versuchsreihen**

In der Tabelle sind für beide Versuchsreihen die Mittelwerte  $\pm$  SEM für die Rest - Fluoreszenz,  $\Delta F$  nach 412 s und  $\tau$  angegeben. Die Daten innerhalb der Versuchsreihe wurden verglichen. Die hochgestellten Zahlen symbolisieren jeweils den Genotypen, der verschieden war (1: AQP4ko Maus; 2: C57BL/6J Maus; 3: DKO Maus). Weiterhin wurden die beiden Versuchsreihen verglichen. Unterschiede zwischen den Versuchsreihen wurden für den jeweiligen Genotyp mit # gekennzeichnet.

	Rest - Fluoreszenz nach dem Bleichen	$\Delta F$ nach 412 s	$\tau$ (s)
	Erste Versuchsreihe		
AQP4ko Maus (n = 58 Astrozyten, 13 Schnitte, 4 Tiere)	11,0 $\pm$ 0,6 % <sup>2,3; #</sup>	14,6 $\pm$ 0,9 % <sup>2,3; #</sup>	92,6 $\pm$ 7,6 <sup>2; #</sup>
C57BL/6J Maus (n = 46 Astrozyten, 6 Schnitte, 2 Tiere)	8,0 $\pm$ 0,6 % <sup>1; #</sup>	18,3 $\pm$ 1,4% <sup>1,3</sup>	155,8 $\pm$ 13,4 <sup>1,3; #</sup>
DKO Maus (n = 51 Astrozyten, 6 Schnitte, 2 Tiere)	6,4 $\pm$ 0,3 % <sup>1; #</sup>	7,2 $\pm$ 0,4 % <sup>1,2</sup>	63,5 $\pm$ 5,5 <sup>2</sup>
Zweite Versuchsreihe			
AQP4ko Maus (n = 33 Astrozyten, 9 Schnitte, 2 Tiere)	25,1 $\pm$ 0,2 % <sup>#</sup>	24,9 $\pm$ 1,8 % <sup>2,3; #</sup>	283,1 $\pm$ 32,3 <sup>3; #</sup>
C57BL/6J Maus (n = 38 Astrozyten, 11 Schnitte, 4 Tiere)	26,0 $\pm$ 1,9 % <sup>#</sup>	18,8 $\pm$ 1,5 % <sup>1,3</sup>	238,3 $\pm$ 26,8 <sup>3; #</sup>
DKO Maus (n = 34 Astrozyten, 6 Schnitte, 2 Tiere)	19,5 $\pm$ 2,3 % <sup>#</sup>	6,7 $\pm$ 0,9 % <sup>1,2</sup>	57,8 $\pm$ 7,0 <sup>1,2</sup>

#### Zusammenfassung der FRAP - Experimente:

In beiden Versuchsreihen wurde für alle drei Genotypen eine hohe Variabilität der Rest - Fluoreszenz nach dem Bleichen, von  $\Delta F$  und  $\tau$  festgestellt. In der ersten Versuchsreihe war  $\Delta F$  für AQP4ko Mäuse kleiner, als für C57BL/6J Mäuse. In der zweiten Versuchsreihe war  $\Delta F$  für AQP4ko Mäuse größer, als für C57BL/6J Mäuse. Mit Hilfe von  $\Delta F$  sollte die Größe des astrozytären Synzytiums verglichen werden. Für die vorliegenden Daten bedeutet dies, dass in der ersten Versuchsreihe die Kopplung in AQP4ko Mäusen kleiner war, als in C57BL/6J Mäusen. Im Vergleich dazu lassen die Daten der zweiten Versuchsreihe vermuten, dass die Kopplung in AQP4ko Mäusen größer war, als in C57BL/6J Mäusen. Die Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe stimmen überein, mit den Kopplungsanalysen durch Biozitininjektion, die in Strohschein et al. (2011) publiziert wurden. Auch in den

---

DKO Mäusen wurde eine geringe Rückkehr der Fluoreszenz nach dem Bleichen gemessen. Da die Astrozyten in DKO Mäusen nicht über *Gap junction* verbunden sind, war die Fluoreszenzrückkehr auf Diffusion von CFDA aus den ungeblichenen Regionen des jeweiligen Astrozyten zurückzuführen.

### 3.1.5 Untersuchung der *Gap junction* Kopplung durch Biozytininjektion

Ein weiterer Ansatz für die Bestimmung der Kopplung war die Analyse der Biozytin - Ausbreitung im Synzytium. Über eine *Patch* - Pipette wurden Astrozyten in der *whole - cell* Konfiguration mit Biozytin gefüllt. Aufgrund seiner Größe von 373 Dalton kann Biozytin durch die *Gap junctions* diffundieren und sich so im Synzytium verteilen. Nach 20 min wurde die *Patch* - Pipette vorsichtig von der Zelle abgelöst, der Schnitt in 4 % PFA fixiert und mit Streptavidin - Cy3 gefärbt. Die Kopplungswolken wurden als Bildstapel aufgenommen und die gefärbten Astrozyten gezählt.

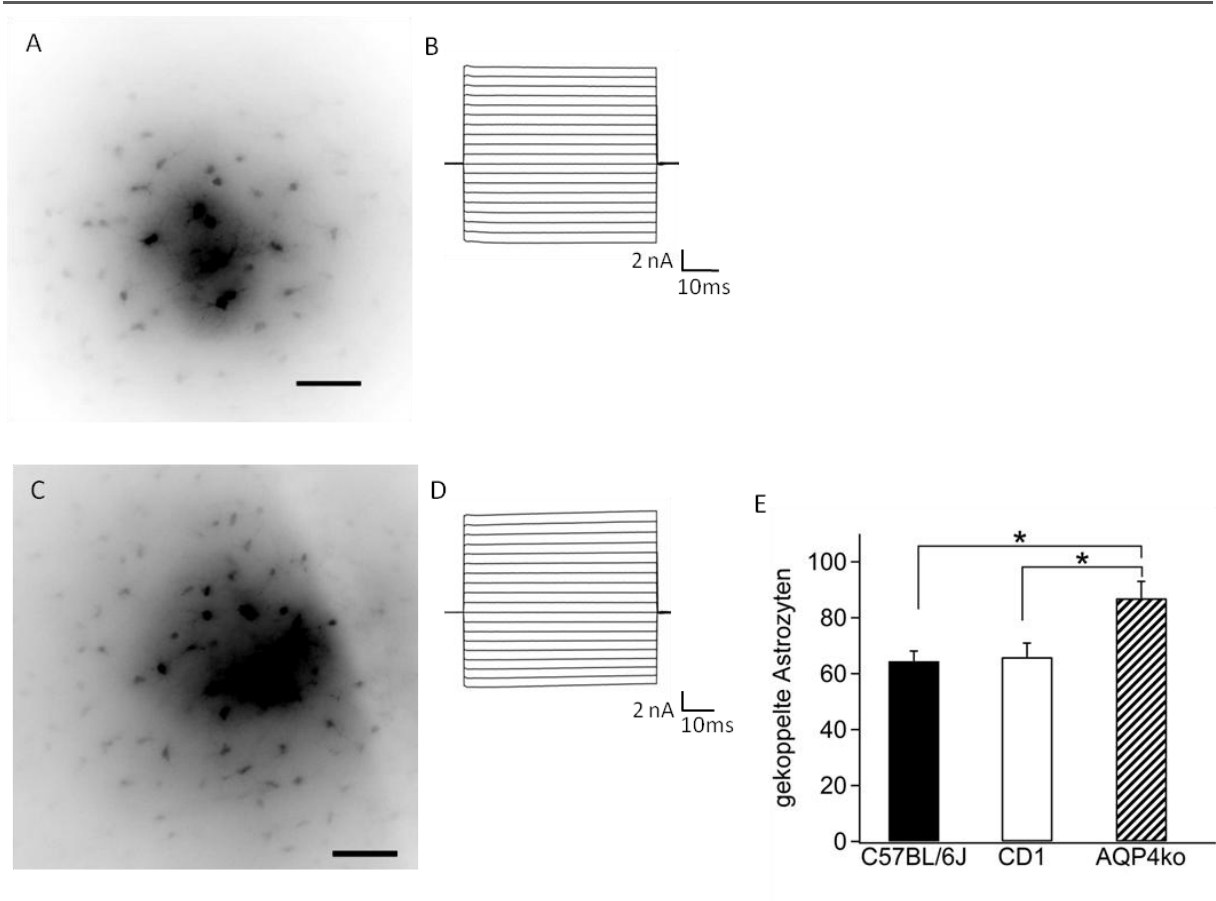
Untersucht wurden AQP4ko Mäuse und als Kontrollen die beiden Wildtyp (WT) Mauslinien CD1 und C57BL/6J. Die CD1 Mäuse bilden den überwiegenden Anteil des genetischen Hintergrunds der AQP4ko Mäuse (Ma et al., 1997; Zhang und Verkman, 2008). Mit der Untersuchung der C57BL/6J Mäuse sollte ein genetisch bedingter Einfluss der Mauslinien auf die *Gap junction* Kopplung überprüft werden.

### 3.1.6 Die *Gap junction* Kopplung in der CA1 Region ist in adulten AQP4ko Mäusen höher

In diesem Teil der Arbeit wurde der Einfluss des ko von AQP4 auf die *Gap junction* Kopplung in adulten Mäusen analysiert. Hierfür wurden AQP4ko Mäuse, CD1 Mäuse und C57BL/6J Mäuse im Alter zwischen p60 - p90 untersucht. Die Astrozyten wurden anhand ihrer Morphologie unter dem IR - DIC Filter des Mikroskops ausgewählt. Typisch für die Morphologie von Astrozyten sind ihre rundlichen Somata mit wenigen, prominenten Fortsätzen an denen sich zahlreiche, feine Verzweigungen befinden (Matthias et al., 2003; Wallraff et al., 2004). Die eindeutige Zellidentifizierung erfolgte über die elektrophysiologische Charakterisierung. Hierfür wurden die Zelle mit Spannungssprüngen á 10 mV auf Potentiale zwischen 10 mV und -170mV de- und hyperpolarisiert. Ein Merkmal von Astrozyten sind ihre zeit- und spannungsunabhängigen Ströme, aus denen ein typisches, passives Strommuster resultiert (Abb. 17B und D) (Matthias et al., 2003; Wallraff et al., 2004). Astrozyten mit diesem Strommuster wurden  $21 \pm 0,1$  min ( $n = 103$ ) abgeleitet und dabei mit Biozytin gefüllt. Das Membranpotential betrug in der *whole - cell* Konfiguration  $-83 \pm 0,4$  mV und veränderte sich während der 21 min um  $2 \pm 0,3$  mV. Die

Genotypen unterschieden sich in ihrem Membranpotential nicht signifikant. Die Genotypen wurden mit einer ANOVA und einem *post hoc* Tukey Test verglichen. Für AQP4ko Mäuse war die durchschnittliche Kopplung mit  $84 \pm 6$  Zellen ( $n = 33$  Astrozyten, 6 Tiere) signifikant größer, als für die beiden WT - Genotypen. In C57BL/6J Mäusen waren durchschnittlich  $63 \pm 4$  Zellen ( $n = 32$  Astrozyten, 6 Tiere) und in CD1 Mäusen  $65 \pm 5$  Zellen ( $n = 35$  Astrozyten, 8 Tiere) gekoppelt (Abb. 17E). Beide WT - Genotypen unterschieden sich nicht, so dass ausgeschlossen werden kann, dass der genetische Hintergrund der Mäuse Einfluss auf die *Gap junction* Kopplung hat.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in AQP4ko Mäusen die Kopplung signifikant größer war und der *knock out* des AQP4 Kanals die *Gap junction* Kopplung beeinflusst.



**Abb. 17 Kopplung und Strommuster von Astrozyten in der CA1 Region von adulten WT- und AQP4ko Mäusen**

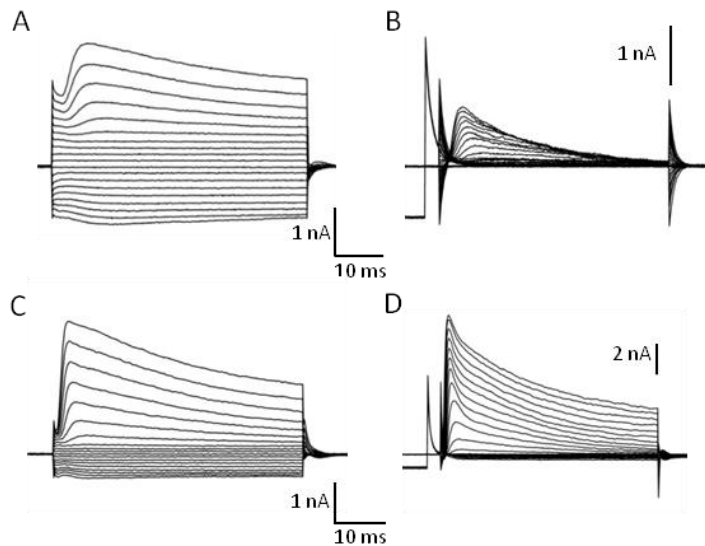
Die Astrozyten wurden in der *whole-cell* Konfiguration 21 min mit Biozytin gefüllt und anschließend mit Streptavidin - Cy3 gefärbt. A) Maximalprojektion eines Bildstapels mit gekoppelten Astrozyten in einer CD1 Maus. B) Passives Strommuster des gefüllten Astrozyten in der CD1 Maus. C) Maximalprojektion eines Bildstapels mit gekoppelten Astrozyten in einer AQP4ko Maus. D) Passives Strommuster des gefüllten Astrozyten in der AQP4ko Maus. E) Dargestellt sind die Mittelwerte der Kopplung in den beiden WT Genotypen (C57BL/6J Maus, CD1 Maus) und der AQP4ko Maus. Die Kopplung in den AQP4ko Mäusen ist signifikant größer, als in beiden WT Genotypen. Die WT Mauslinien unterschieden sich nicht (\*  $p < 0,05$ ). Die Abb. A und C wurden mit dem Axiophot Mikroskop bei 20facher Vergrößerung aufgenommen. Skalierung in A und C: 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.7 In juvenilen AQP4ko Mäusen erfolgt vermutlich eine schnellere Reifung der astrozytären Kopplung

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob der ko des AQP4 Kanals auch die Entwicklung der *Gap junction* Kopplung beeinflusst. Der Ablauf der Experimente erfolgte wie in Kap. 3.1.5 beschrieben. Für die entwicklungsabhängige Kopplungsanalyse wurden AQP4ko Mäuse, CD1 Mäuse und C57BL/6J Mäuse im Alter von p8 - p13 untersucht. In juvenilen Astrozyten von Mäusen (bis ca. p12) wurden neben den typischen „passiven“ Strommustern auch Strommuster mit zeit- und spannungsabhängigen Auswärtsströmen identifiziert (Seifert et al., 2009). Ähnliche Beobachtungen gab es auch in Astrozyten von juvenilen

---

Ratten (Zhou et al., 2006). Da das Strommuster mit zeit- und spannungsabhängigen Auswärtsströmen in Astrozyten dem komplexen Strommuster von NG2 Zellen ähnelt, können in juvenilen Mäusen Astrozyten und NG2 Zellen anhand ihrer Strommuster nicht eindeutig unterschieden werden (Seifert et al., 2009). Aus diesem Grund wurden Vorversuche mit Mäusen durchgeführt, in denen Astrozyten bzw. NG2 Zellen fluoreszierende Proteine exprimieren. Hierfür wurden p8 alte NG2 - EYFP Mäuse und p8 alte Cx43 - ECFP Mäuse untersucht. NG2 - EYFP Mäuse exprimieren in den NG2 Zellen ein gelb fluoreszierendes Protein und Cx43 - ECFP Mäuse in Astrozyten ein blau fluoreszierendes Protein. Mit Hilfe dieser Proteine wurden NG2 Zellen bzw. Astrozyten sicher identifiziert und unter der IR - DIC Optik des Mikroskops die morphologischen Eigenschaften der NG2 Zellen und der Astrozyten bestimmt. Dies wurde als Referenz genutzt, um Astrozyten in juvenilen AQP4ko Mäusen, CD1 Mäusen und C57BL/6J Mäusen zu identifizieren. Für die Aufnahme des Strommusters der Astrozyten wurden, ausgehend von einer Haltespannung von -80 mV, 10 mV Sprüngen zwischen -170 mV und 10 mV appliziert (Abb. 19A und C). Außerdem wurden mit konditionierenden Vorpulsen auf -110 mV auswärts gleichrichtende Ströme aktiviert und mit Vorpulsen auf -40 mV deaktiviert. Aus der Differenz dieser beiden Strommuster wurde der Anteil des transienten  $K^+$ - Auswärtsstromes bestimmt. Mit diesen Protokollen wurden zunächst NG2 Zellen in den NG2 - EYFP Mäusen und Astrozyten in Cx43 - ECFP Mäusen elektrophysiologisch untersucht. Es wurde gezeigt, dass in Cx43 - ECFP Mäusen 10 von 14 Astrozyten transiente  $K^+$ - Auswärtsströme besaßen. In NG2 - EYFP Mäusen hatten alle 12 NG2 Zellen transiente  $K^+$ - Auswärtsströme (Abb. 18B und D). Abb. 18 zeigt exemplarisch das Ganzzellstrommuster eines Astrozyten einer Cx43 - ECFP Maus (Abb. 18A) und einer NG2 Zelle einer NG2 - EYFP Maus (Abb. 18C). Vergleicht man die Strommuster miteinander, ist erkennbar, dass die Amplitude des einwärts gerichteten Stromes in Astrozyten größer war, als in NG2 Zellen. Auf den Abbildungen ist außerdem zu erkennen, dass die Amplitude des transienten  $K^+$ - Auswärtsstroms in Astrozyten (Abb. 18B) kleiner war, als in NG2 Zellen (Abb. 18D).



**Abb. 18 Strommuster von Astrozyten in juvenilen Cx43 - ECFP Mäusen und von NG2 Zellen in juvenilen NG2 - EYFP Mäusen**

A, C) Ausgehend von einem Haltepotential von  $-80$  mV wurde die Zellmembran durch Spannungssprünge von jeweils  $10$  mV zwischen  $+10$  mV und  $-170$  mV de- bzw. hyperpolarisiert. B, D) Mit einem Vorpuls auf  $-110$  mV werden transiente Auswärtsströme aktiviert und mit einem Vorpuls auf  $-40$  mV inaktiviert. Aus der Differenz dieser beiden Spannungsprotokolle wurden die transienten  $K^+$ - Auswärtsströme isoliert. A, B) Elektrophysiologische Eigenschaften eines Astrozyten in einer p8 alten Cx43 - ECFP Maus. Die Identifizierung der Astrozyten erfolgte über die Fluoreszenz. Neben den für Astrozyten typischen einwärts gleichrichtenden  $K^+$ - Strömen hatten die Astrozyten in Cx43 - ECFP Mäusen auch transiente Auswärtsströme (B). C, D) Elektrophysiologische Eigenschaften einer NG2 Zelle in einer p8 alten NG2 - EYFP Maus. Die NG2 Zelle wurde ebenfalls über ihre Fluoreszenz identifiziert. Die Amplitude der einwärts gleichrichtenden  $K^+$ - Ströme der NG2 Zelle war im Vergleich zu den Einwärtsströmen des Astrozyten kleiner (C). Typisch für NG2 Zellen sind u.a. die inaktivierenden, spannungsgesteuerten  $K^+$ - Auswärtsströme (D).

Für AQP4ko Mäuse und WT Mäuse wurden zeit- und spannungsabhängige Strommuster von Zellen, die unter der IR - DIC Optik als Astrozyten identifiziert wurden, mit den Strommustern der Astrozyten von Cx43 - ECFP Mäusen und den NG2 Zellen in NG2 - EYFP Mäusen verglichen. Zellen mit Strommustern, das denen der Astrozyten der Cx43 - ECFP Maus ähnelte (Abb. 18A und B; kleine Amplitude des transienten Auswärtsstroms, große Amplitude des Einwärtsstroms), wurden den Astrozyten zugeordnet.

In AQP4ko Mäusen wurden zwischen p8 und p9 in  $12 / 26$  Astrozyten transiente Auswärtsströme gemessen, in CD1 Mäusen zwischen p8 - p12 in  $26 / 46$  Astrozyten und in C57BL/6J Mäusen zwischen p8 - p13 in  $9 / 27$  Astrozyten.

**Tab. 2 Anzahl der ausgewerteten Astrozyten in p8 - p13 alten WT- und AQP4ko Mäusen**

Angegeben ist für das jeweilige Alter die Anzahl der gefüllten Astrozyten und der AQP4ko- und WT Mäuse (C57BL/6J und CD1). In jedem Schnitt wurde jeweils ein Astrozyt gefüllt.

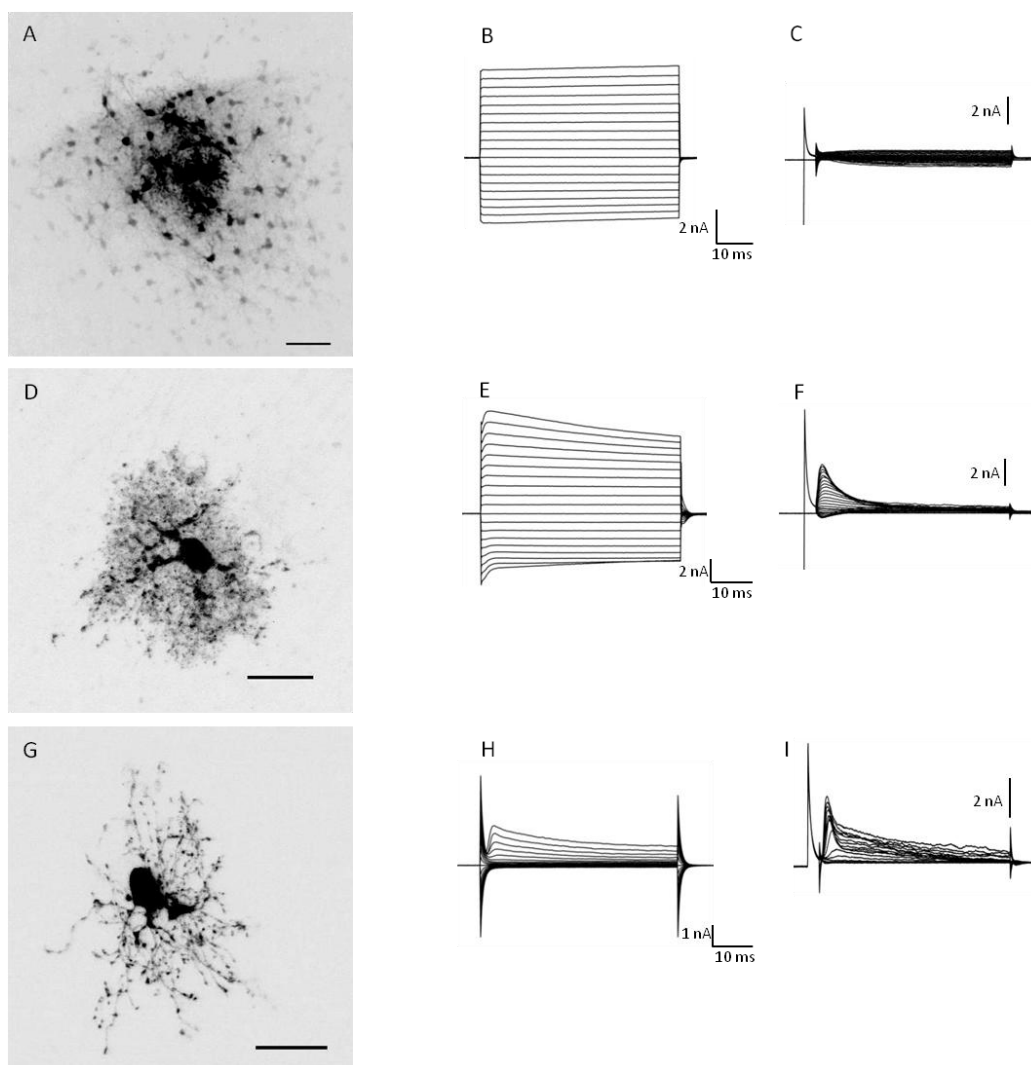
	p8			p9			p10			p11			p12			p13		
	C57BL/6J Maus	CD1 Maus	AQP4ko Maus	C57BL/6J Maus	CD1 Maus	AQP4ko Maus	C57BL/6J Maus	CD1 Maus	AQP4ko Maus	C57BL/6J Maus	CD1 Maus	AQP4ko Maus	C57BL/6J Maus	CD1 Maus	AQP4ko Maus	C57BL/6J Maus	CD1 Maus	AQP4ko Maus
<b>Astrozyten</b>	3	9	14	6	10	12	6	12	12	4	6	9	5	9	12	3	16	16
<b>Mäuse</b>	2	3	5	3	3	4	2	3	3	1	3	4	1	2	4	1	3	3

Die Astrozyten ( $n = 156$ ) wurden  $20 \pm 0,1$  min in der *whole - cell* Konfiguration mit Biozytin gefüllt. Das Membranpotential zwischen den Genotypen wurde für jedes Alter mit einer ANOVA und einem *post hoc* Tukey Test verglichen. Es wurde gezeigt, dass sich das Membranpotential für das jeweilige Alter zwischen den Genotypen nicht unterschied (Tab. 3). Während der Ableitzeit änderte sich das Membranpotential um  $3 \pm 0,2$  mV.

**Tab. 3 Vergleich des Membranpotentials der Astrozyten in p8 - p13 alten WT- und AQP4ko Mäusen**

Das Membranpotential der Astrozyten unterschied sich für das jeweilige Alter zwischen den Genotypen nicht.

	p8	p9	p10	p11	p12	p13
C57BL/6J Maus	$-84 \pm 2,0$ mV n = 3	$-84 \pm 1,9$ mV n = 6	$-88 \pm 2,2$ mV n = 6	$-84 \pm 1,2$ mV n = 4	$-84 \pm 0,5$ mV n = 5	$-85 \pm 2,5$ mV n = 3
CD1 Maus	$-83 \pm 0,9$ mV n = 9	$-83 \pm 0,7$ mV n = 10	$-84 \pm 0,6$ mV n = 12	$-83 \pm 1,5$ mV n = 6	$-81 \pm 0,6$ mV n = 9	$-84 \pm 1,0$ mV n = 16
AQP4ko Maus	$-85 \pm 0,5$ mV n = 14	$-85 \pm 0,7$ mV n = 12	$-82 \pm 1,8$ mV n = 12	$-86 \pm 0,7$ mV n = 9	$-84 \pm 1,0$ mV n = 12	$-84 \pm 0,5$ mV n = 16

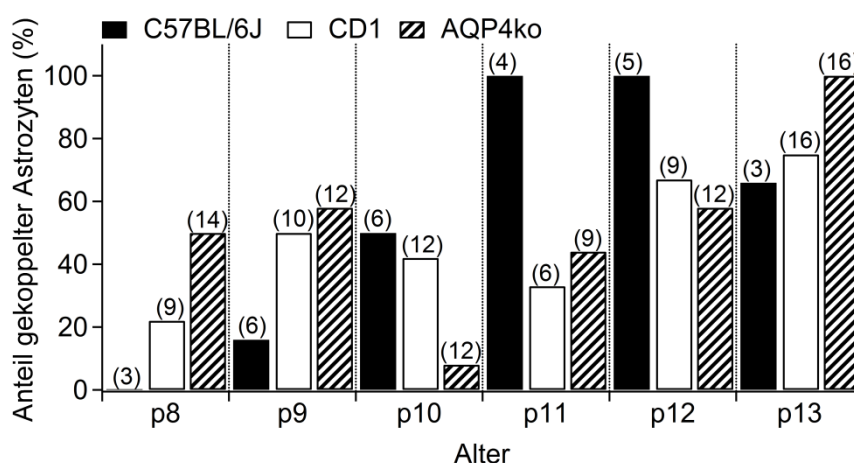


**Abb. 19 Morphologische und elektrophysiologische Eigenschaften von gekoppelten und ungekoppelten Astrozyten im Vergleich zu NG2 Zellen in juvenilen AQP4ko Mäusen**

A, D, G) Die Zellen wurden 20 min in der *whole - cell* Konfiguration mit Biozytin gefüllt und anschließend mit Streptavidin - Cy3 gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Axiphot Mikroskop. B, E, H) Ganzzellstrommuster nach De- und Hyperpolarisierung zwischen 10 mV und -170 mV durch Applikation von 10 mV Sprüngen. C, F, I) Isolierung der transienten  $K^+$ - Auswärtsströme. A) Maximalprojektion einer Kopplungswolke eines Astrozyten in einer p8 alten AQP4ko Maus. B) Das Strommuster des gefüllten Astrozyten wurde von passiven Leitfähigkeiten dominiert. C) In dem Astrozyt wurden keine transienten Auswärtsströme identifiziert. D) Abbildung eines ungekoppelten Astrozyten in einer p8 AQP4ko Maus. Die Identifizierung des Astrozyten erfolgte anhand der prominenten Fortsätze und dem dichten Netz kleiner Verzweigungen. E) Strommuster des gefüllten Astrozyten. Neben den einwärts gleichrichtenden  $K^+$ - Strömen treten auch transiente Auswärtsströme auf. F) Isolierung der transienten Auswärtsströme. G) Abbildung einer NG2 Zelle in einer p9 AQP4ko Maus. Die NG2 Zelle wurde anhand ihrer vielen, dünnen Fortsätze mit ihren kleinen Verdickungen identifiziert. Anhand ihrer Morphologie konnten NG2 Zellen und ungekoppelte Astrozyten unterschieden werden. H) Strommuster der NG2 Zelle. Sie hatte eine kleine Amplitude einwärts gleichrichtender  $K^+$ - Ströme. I) Isolierung der inaktivierenden, spannungsgesteuerten  $K^+$ - Ströme. Skalierung in A, D, G: 20  $\mu$ m.



Schools et al. (2006) zeigten, dass in juvenilen Ratten gekoppelte und ungekoppelte Astrozyten vorliegen. Die Autoren zeigten weiterhin, dass mit fortschreitendem Alter der Anteil ungekoppelter Astrozyten abnimmt. In den untersuchten Genotypen (AQP4ko Maus, CD1 Maus und C57BL/6J Maus) dieser Arbeit wurden ebenfalls gekoppelte und ungekoppelte Astrozyten identifiziert. Anhand ihrer Morphologie waren Streptavidin - Cy3 gefärbten Astrozyten und NG2 Zellen gut zu unterscheiden. Abb. 19D zeigt einen ungekoppelten Astrozyten. Zu erkennen sind die wenigen, prominenten Fortsätze mit den zahlreichen kleinen Verzweigungen. Im Vergleich dazu haben NG2 Zellen (Abb. 19G) zahlreiche dünne Fortsätze mit kleinen Verdickungen (Matthias et al., 2003). Für die Datenauswertung wurde der Anteil gekoppelter Astrozyten in Abhängigkeit vom Alter bestimmt (Abb. 20). In AQP4ko Mäusen ist mit fortschreitendem Alter eine Zunahme des Anteils gekoppelter Astrozyten zu erkennen. Eine Ausnahme bilden die p10 alten AQP4ko Mäuse. Hier war von 12 gefüllten Astrozyten nur einer gekoppelt. Im Alter von p13 waren 100 % der gefüllten Astrozyten gekoppelt. Auch für CD1 Mäuse nahm der Anteil gekoppelter Astrozyten zu, jedoch waren im Alter von p13 nur 75 % der gefüllten Astrozyten gekoppelt. Der Anteil gekoppelter Astrozyten nahm für C57BL/6J Mäuse ebenfalls zu, erreichte 100 % im Alter von p11 und p12 und fiel bei p13 auf einen Anteil von 66 % ab.

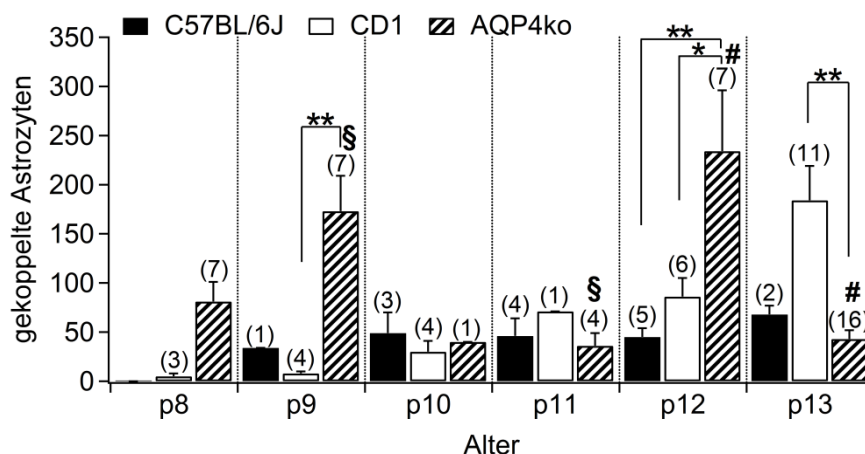


**Abb. 20 Anteil der Astrozyten mit *Gap junction* Kopplung in juvenilen WT- und AQP4ko Mäusen**

Dargestellt ist für die Tage p8 - p13 der Anteil gekoppelter Astrozyten in AQP4ko Mäusen und den beiden WT - Mauslinien (C57BL/6J und CD1). In p8 alten C57BL/6J Mäusen gab es keine gekoppelten Astrozyten. Die Anzahl der gefüllten Astrozyten ist jeweils oberhalb der Balken in Klammern angegeben.

---

Weiterhin wurden die Mittelwerte der Kopplung für das jeweilige Alter zwischen den Genotypen verglichen (Abb. 21). Für p8 alte AQP4ko Mäuse betrug der Mittelwert der Kopplung  $81 \pm 20$  Zellen ( $n = 7$  Astrozyten) und war somit größer, als für p8 alte CD1 Mäuse ( $5 \pm 3$  Zellen,  $n = 2$  Astrozyten). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant, was vermutlich daran lag, dass in p8 alte CD1 Mäusen nur zwei Astrozyten gekoppelt waren. Im Alter von p9 war die Kopplung für AQP4ko Mäuse signifikant größer, als für CD1 Mäuse (AQP4ko =  $173 \pm 36$  Zellen,  $n = 7$  Astrozyten; CD1 =  $30 \pm 11$  Zellen,  $n = 4$  Astrozyten). Für p10 und p11 alte AQP4ko Mäuse nahm die Kopplung ab (p10: 40 Zellen;  $n = 1$  Astrozyt; p11:  $36 \pm 13$  Zellen;  $n = 4$  Astrozyten) und unterschied sich nicht signifikant von den gleich alten CD1- bzw. C57BL/6J Mäusen. Für p12 AQP4ko Mäuse war die Kopplung mit  $234 \pm 63$  Zellen ( $n = 7$  Astrozyten) größer, als für p12 CD1 Mäuse ( $86 \pm 19$  Zellen;  $n = 6$  Astrozyten) und C57BL/6J Mäuse ( $45 \pm 9$  Zellen,  $n = 5$  Astrozyten). Für p13 AQP4ko Mäuse ( $43 \pm 9$  Zellen,  $n = 16$  Astrozyten) war die Anzahl gekoppelter Astrozyten um 81 % geringer, als für p12 AQP4ko Mäuse. Im Alter von p13 war die Kopplung für AQP4ko Mäuse kleiner, als für p13 CD1 Mäuse ( $184 \pm 35$  Zellen,  $n = 11$  Astrozyten) und unterschied sich nicht von der Kopplung in C57BL/6J Mäusen ( $68 \pm 9$  Zellen,  $n = 2$  Astrozyten). Zwischen den beiden WT Genotypen wurde zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied festgestellt



**Abb. 21 Vergleich der *Gap junction* Kopplung in juvenilen WT- und AQP4ko Mäusen**

Dargestellt ist der Mittelwert der Kopplung  $\pm$  SEM für WT Mäuse (C57BL/6J und CD1) und AQP4ko Mäuse in Abhängigkeit vom Alter. In p8 C57BL/6J Mäusen waren alle Astrozyten ungekoppelt. In p9 C57BL/6J Mäusen, p10 AQP4ko Mäusen sowie in p11 CD1 Mäusen war jeweils nur ein Astrozyt gekoppelt. Aus diesem Grund wurden für p8 - p11 nur jeweils zwei Genotypen mit dem *Student's t* - Test verglichen. Für p12 und p13 wurden alle drei Genotypen mit einer ANOVA und einem *post hoc* Tukey Test verglichen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; § Unterschied zwischen p9 und p11 AQP4ko Mäusen  $p < 0,05$ ; # Unterschied zwischen p12 und p13 AQP4ko Mäusen  $p < 0,05$ ). Die Anzahl der Astrozyten, aus denen der jeweilige Mittelwert gebildet wurde, ist oberhalb der Balken in Klammern angegeben.

Insgesamt sind die vorliegenden Daten sehr heterogen. Ein großes Problem hierbei ist die hohe Variabilität bei der Anzahl der gekoppelten Astrozyten. Selbst bei Erhöhung der Zahl gefüllter Astrozyten wird die Entwicklungsabhängigkeit bei der Etablierung astrozytärer Kopplung immer zu großer Streuung führen. Die Analyse von Kopplung in juvenilen Entwicklungsstadien ist mit dieser Methode daher nur begrenzt machbar.

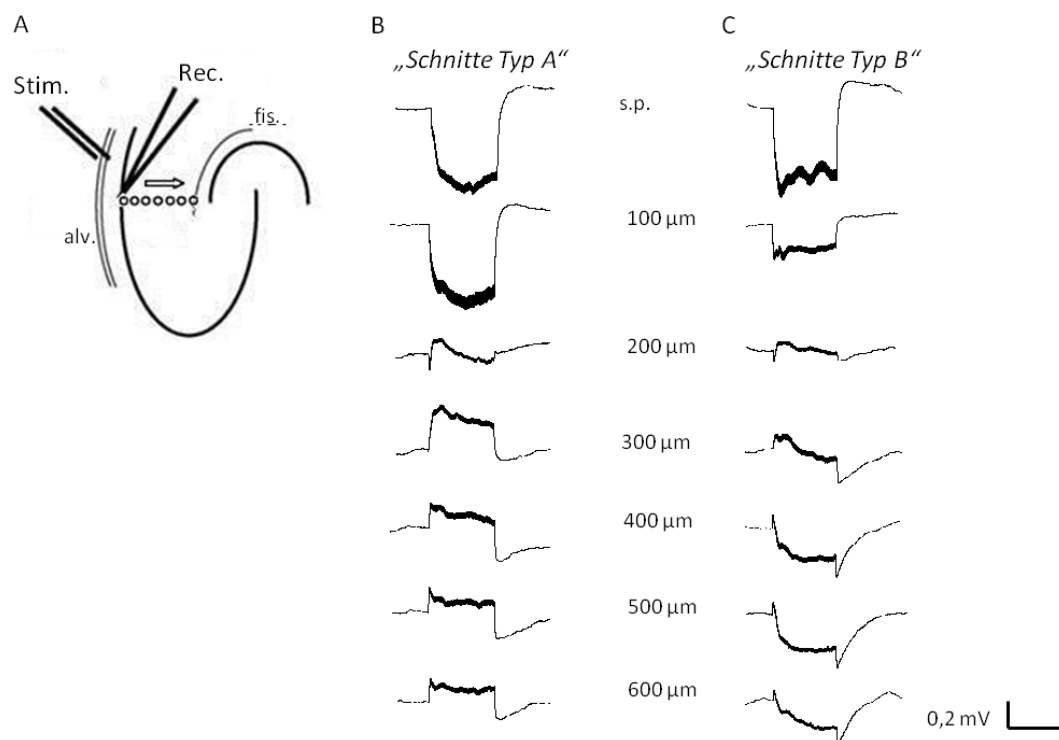
Zusammenfassend wurde bei der Analyse der Entwicklung der *Gap junctions* für AQP4ko Mäuse gezeigt, dass nur bei p8 und p9 alten Tieren zeit- und spannungsabhängige Auswärtsströme auftraten, bei p13 alle Astrozyten gekoppelt waren und die Kopplung im Alter von p8, p9 und p12 deutlich größer war, als in den WT Mäusen. Dies könnte ein erster Hinweis dafür sein, dass der fehlende AQP4 Kanal zu einer schnelleren Reifung der *Gap junction* Kopplung führt. Da zwischen den beiden WT Genotypen keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden, ist ein Einfluss des genetischen Hintergrundes der Mäuse auf die Kopplung wenig wahrscheinlich.

---

### 3.2. Einfluss des AQP4 Kanals auf die $K^+$ -Pufferung im Hippocampus der Maus

Die Analyse der AQP4 Expression zeigte eine hohe Expressionsdichte dieses Kanals im Bereich der Astrozytenendfüßchen und eine Colokalisation mit dem  $K_{ir}4.1$  Kanal in diesem Bereich (Nagelhus et al., 2004). Auf Grund dieser Expressionsanalysen wurde die Hypothese aufgestellt, dass es zwischen diesen beiden Kanälen auch einen funktionellen Zusammenhang gibt. Daten aus funktionellen Studien deuten jedoch darauf hin, dass es diesen Zusammenhang nicht gibt (Badaut et al., 2002; Ruiz-Ederra et al., 2007; Zhang und Verkman, 2008).

Ziel in diesem Teil der Arbeit war es, den Einfluss des AQP4 Kanals auf die  $K^+$ -Pufferung zu untersuchen. Für diese Analyse wurde in adulten AQP4ko Mäusen (p60 - p90) nach der Aktivierung der Pyramidenneuronen die  $[K^+]_o$  in der CA1 Region des Hippocampus bestimmt. Weiterhin wurden die Kinetik des Abfalls der  $[K^+]_o$  und der Einfluss des AQP4 Kanals auf die Umverteilung der  $[K^+]_o$  im Gewebe untersucht. Als WT Kontrollen wurden adulte CD1 Mäuse (p60 - p90) untersucht. In der nachfolgenden Auswertung wurden die Ergebnisse in zwei Gruppen getrennt, die als „Schnitte Typ A“ und „Schnitte Typ B“ bezeichnet wurden. Grundlage für diese Unterscheidung war die Veränderung der Feldpotentiale bei zunehmenden Abstand von der Pyramidenzellschicht (Abb. 22). Gabriel et al. (1998) untersuchten in juvenilen Ratten den Anstieg der  $[K^+]_o$  zwischen dem Stratum pyramidale und der hippocampalen Fissur. Sie zeigten, dass bis 150  $\mu\text{m}$  Entfernung von der Pyramidenzellschicht das Feldpotential eine negative Amplitude hatte, während ab 250  $\mu\text{m}$  Entfernung positive Amplituden beobachtet wurden. Ein ähnlicher Verlauf der Feldpotentiale wurde in dieser Arbeit erwartet. Bei einigen Messungen wurde jedoch diese Repolarisation nicht beobachtet (Abb. 22C). Die Daten dieser Schnitte wurden als „Schnitt Typ B“ bezeichnet. Dieser unerwartete Verlauf der Feldpotentiale trat sowohl in AQP4ko Mäusen als auch in CD1 Mäusen auf. Die mögliche Ursache für diese Veränderung wird in der Diskussion (Kap. 4.2) erläutert.



**Abb. 22 Elektrodenanordnung und Feldpotentiale zwischen dem Stratum pyramidale und hippocampaler Fissur**

A) Experimenteller Aufbau für die Untersuchung der Umverteilung der  $[K^+]_o$  in der CA1 Region. Mit der Stimulationselektrode (Stim.) wurde im Alveus (alv.) mit 75 % der maximalen Intensität stimuliert. Für die Messungen wurde die  $K^+$ -selektive Messelektrode (Rec.) vom Stratum pyramidale in Richtung hippocampaler Fissur (fis.) in 100  $\mu\text{m}$  Schritten bewegt. Die weißen Kreise symbolisieren die Messpunkte. B) Beispiel für die Feldpotentiale in „Schnitten Typ A“. C) Beispiel für die Feldpotentiale in „Schnitten Typ B“. Die Werte zwischen den Feldpotentialen geben den Abstand vom Stratum pyramidale (s.p.) an.

### 3.2.1 Nach neuronaler Stimulation ist der Anstieg der $[K^+]_o$ in AQP4ko Mäusen geringer

Die Pyramidenneurone wurden durch antidrome Stimulation im Alveus aktiviert. Um sicherzustellen, dass der Anstieg des  $[K^+]_o$  ausschließlich durch die Aktionspotentiale der Pyramidenneurone hervorgerufen wird, wurde die synaptische Übertragung durch Antagonisten für Glutamat- und GABA Rezeptoren blockiert. Stimuliert wurde mit fünf kurzen Doppelpulsen (0,1 ms, 50 ms Intervall) oder mit langen Stimulationstrains (10 s, 20 Hz). Ausgehend von der maximalen Amplitude des Summenaktionspotentials (Populationsspike) wurde mit 25, 50, 75 und 100 % der maximalen Spannung stimuliert. Die  $K^+$ -selektive Messelektrode wurde auf der Grenze zwischen Stratum oriens und Stratum pyramidale platziert und die  $[K^+]_o$  in einer Tiefe von 100  $\mu\text{m}$  gemessen (Abb. 23A). Die Amplituden des Populationsspikes unterschieden sich zwischen den beiden Genotypen bei der jeweiligen Stimulationsintensität (20, 50, 75 und 100 %) nicht (Tab. 4). Deshalb wurde geschlossen, dass die Anzahl der erregten Neurone in beiden Genotypen gleich

groß war. Dies betraf sowohl die „Schnitte Typ A“ als auch die „Schnitte Typ B“. Vor Beginn der Stimulation wurde die  $[K^+]_o$  im Ruhezustand bestimmt. Diese unterschied sich zwischen den Genotypen in den „Schnitten Typ A“ und in den „Schnitten Typ B“ nicht (Tab. 4).

**Tab. 4 Amplituden des Populationsspike und der  $[K^+]_o$  vor der Stimulation in AQP4ko- und WT Mäusen**

Exemplarisch angegeben sind die Amplituden des Populationsspikes bei 100 % Stimulationsintensität und die  $[K^+]_o$  im Ruhezustand vor der Stimulation mit 100 % Intensität. Die Amplituden des Populationsspikes und die  $[K^+]_o$  vor der Stimulation unterschied sich zwischen den beiden Genotypen nicht.

	<b>„Schnitt Typ A“</b>	<b>„Schnitt Typ B“</b>
	WT Maus (n= 8 Schnitte, 7 Tiere) AQP4ko Maus (n= 6 Schnitte, 5 Tiere)	WT Maus (n= 6 Schnitte, 5 Tiere) AQP4ko Maus (n= 13 Schnitte, 9 Tiere)
	<b>Amplitude des Populationsspike bei 100 % Stimulationsintensität</b>	
WT Maus	$8,0 \pm 0,9$ mV	$5,7 \pm 1,3$ mV
AQP4ko Maus	$7,0 \pm 1,2$ mV	$9,3 \pm 1,4$ mV
	<b><math>[K^+]_o</math> im Ruhezustand vor Stimulation mit 100 % Intensität</b>	
WT Maus	$3,0 \pm 0,004$ mM	$3,1 \pm 0,081$ mM
AQP4ko Maus	$2,9 \pm 0,04$ mM	$3,0 \pm 0,004$ mM

Für die Auswertung der Doppelpulse wurden die fünf Amplituden der  $[K^+]_o$  bestimmt, die mit 50, 75 und 100 % Stimulationsintensität hervorgerufen wurden (Abb. 23B). Bei einer Stimulationsintensität von 25 % war der Anstieg der  $[K^+]_o$  sehr klein und unterschied sich kaum von der Grundlinie. Deshalb wurde die  $[K^+]_o$  bei 25 % Stimulationsintensität nicht ausgewertet. Für 50, 75 und 100 % Stimulationsintensität wurde der Mittelwert aus den fünf Amplituden der  $[K^+]_o$  gebildet und auf den jeweiligen Populationsspike normiert. Dieser normierte Wert für den Anstieg der  $[K^+]_o$  ( $\Delta[K^+]_o$ ) war somit unabhängig vom Umfang der neuronalen Aktivität.

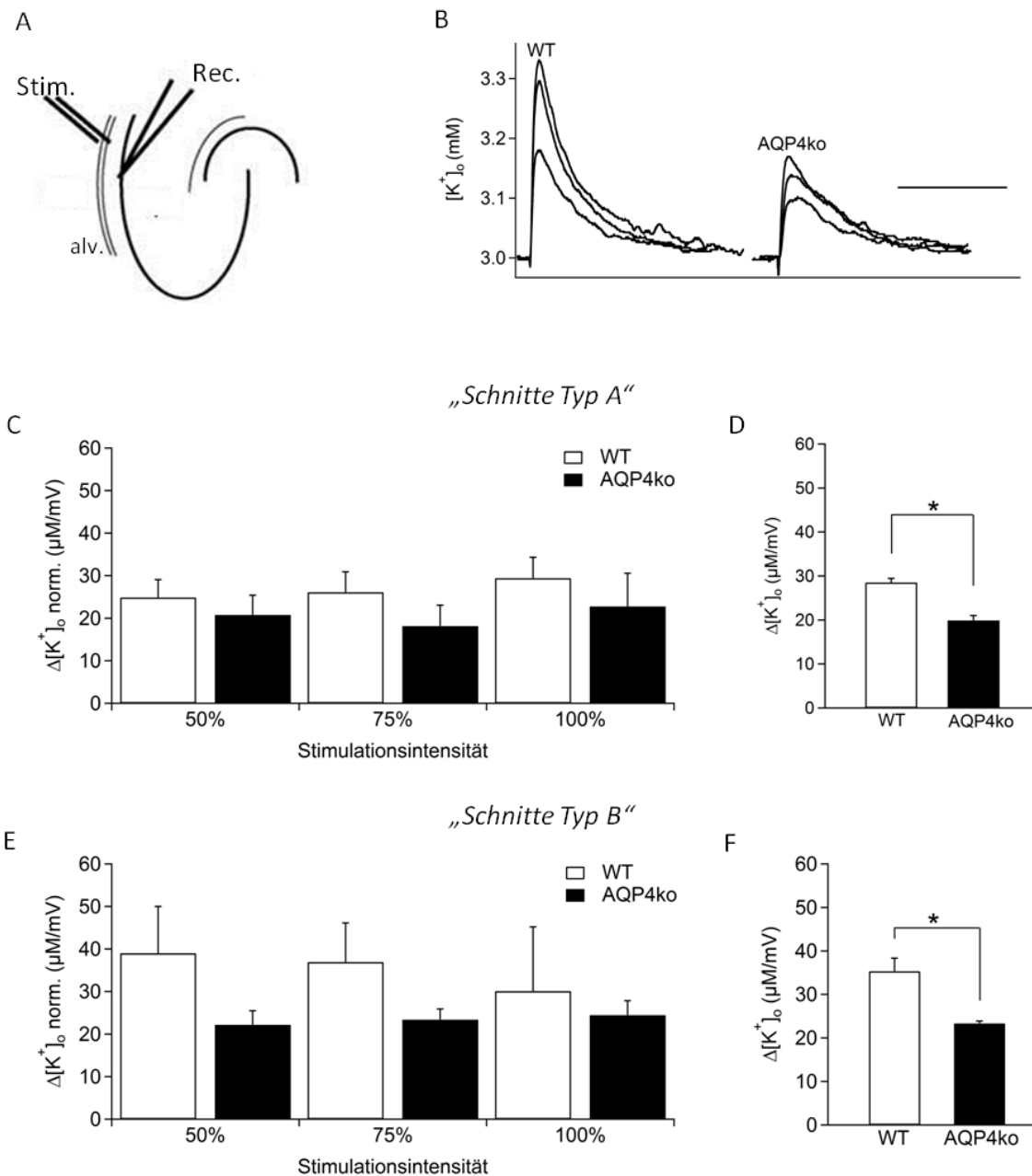
Im ersten Schritt wurde der normierte  $\Delta[K^+]_o$  in den AQP4ko Mäusen und WT Mäusen bei der jeweiligen Stimulationsintensität verglichen (*Student's t* - Test). Der normierte  $\Delta[K^+]_o$  unterschied sich bei 50, 75 und 100 % Stimulationsintensität zwischen AQP4ko Mäusen und WT Mäusen nicht (Abb. 23C und E). Anschließend wurden die Werte mit einer zweifaktoriellen ANOVA analysiert. Hierbei wurde getestet ob sich i) der normierte  $\Delta[K^+]_o$  innerhalb eines Genotyps zwischen den Stimulationsintensitäten unterschied und ii) der über die Intensität gemittelte  $\Delta[K^+]_o$  zwischen den Genotypen verschieden war.

Da die Analyse mit der zweifaktoriellen ANOVA zeigte, dass der normierte  $\Delta[K^+]_o$  in beiden Genotypen unabhängig von der Stimulationsintensität war ( $p = 0,16$  in den Schnitten Typ A und B), wurde der Mittelwert des normierten  $\Delta[K^+]_o$  über alle Intensitäten berechnet.

---

Dieser Mittelwert betrug in den „Schnitten Typ A“ der WT Mäuse  $28,5 \pm 0,9 \mu\text{M} / \text{mV}$  ( $n = 10$  Schnitte; 6 Tiere) und in den AQP4ko Mäusen  $19,9 \pm 1,1 \mu\text{M} / \text{mV}$  ( $n = 5$  Schnitte, 5 Tiere). In den „Schnitten Typ B“ betrug der Mittelwert in WT Mäusen  $35,3 \pm 2,2 \mu\text{M} / \text{mV}$  ( $n = 6$  Schnitte; 5 Tiere) und in AQP4ko Mäusen  $23,3 \pm 0,5 \mu\text{M} / \text{mV}$  ( $n = 9$  Schnitte; 8 Tiere) (Abb. 23D und F). Der Mittelwert des normierten  $\Delta[\text{K}^+]_o$  war in AQP4ko Mäusen signifikant kleiner, als in WT Mäusen ( $p = 0,004$  für die Schnitte Typ A und B).

Der Unterschied zwischen den Schnitttypen wurde für den jeweiligen Genotyp mit dem *Student's t* - Test analysiert. Für AQP4ko Mäuse und WT Mäusen wurde gezeigt, dass der normierte  $\Delta[\text{K}^+]_o$  bei 25, 50, 75 und 100 % Stimulationsintensität und der Mittelwert des  $\Delta[\text{K}^+]_o$  über alle Intensitäten sich zwischen den Schnitttypen nicht unterschied.



**Abb. 23 Anstieg der  $[K^+]_o$  hervorgerufen durch Doppelpuls - Stimulation**

A) Schema für die Positionierung der Stimulationselektrode (stim) im Alveus (alv) und der Messelektrode (rec) an der Grenze zwischen Stratum oriens und Stratum pyramidale. B) Beispiel für den Anstieg der  $[K^+]_o$  in WT- und AQP4ko Mäusen, hervorgerufen durch Doppelpuls - Stimulation im Alveus mit 50, 75, 100 % Intensität. Skalierung 10 s. C, D) Ergebnisse für die „Schnitte Typ A“. Der normierte  $\Delta[K^+]_o$  unterschied sich zwischen den Genotypen bei den verschiedenen Stimulationsintensitäten nicht (C). Der Mittelwert des normierten  $\Delta[K^+]_o$  über alle Intensitäten war in AQP4ko Mäusen kleiner, als in den WT Mäusen (D). E, F) Ergebnisse für die „Schnitte Typ B“. Die WT- und AQP4ko Mäuse unterschieden sich bei der jeweiligen Stimulationsintensität nicht (E). Der Mittelwert des normierten  $\Delta[K^+]_o$  über alle Intensitäten war in AQP4ko Mäusen kleiner, als in WT Mäusen (F). (\*  $p < 0,05$ ).



Mit Stimulationstrains (10 s, 20 Hz) wurde eine große Anzahl Pyramidenneurone aktiviert und hierdurch ein deutlich höherer Anstieg der  $[K^+]_o$ , als bei der Doppelpuls - Stimulation hervorgerufen. Auch bei einer Stimulationsintensität von 25 % wurde ein deutlicher Anstieg der  $[K^+]_o$  hervorgerufen. Somit wurde die  $[K^+]_o$  nach Stimulationstrains mit 25, 50, 75 und 100 % Intensität ausgewertet (Abb. 24A). Die maximale  $[K^+]_o$  von 12 mM (*ceiling level*) (Heinemann und Lux, 1977) wurde auch bei 100 % Stimulationsintensität nicht erreicht (Tab. 5.).

**Tab. 5  $[K^+]_o$  nach Stimulationstrains mit 100 % Stimulationsintensität in AQP4ko- und WT Mäusen**

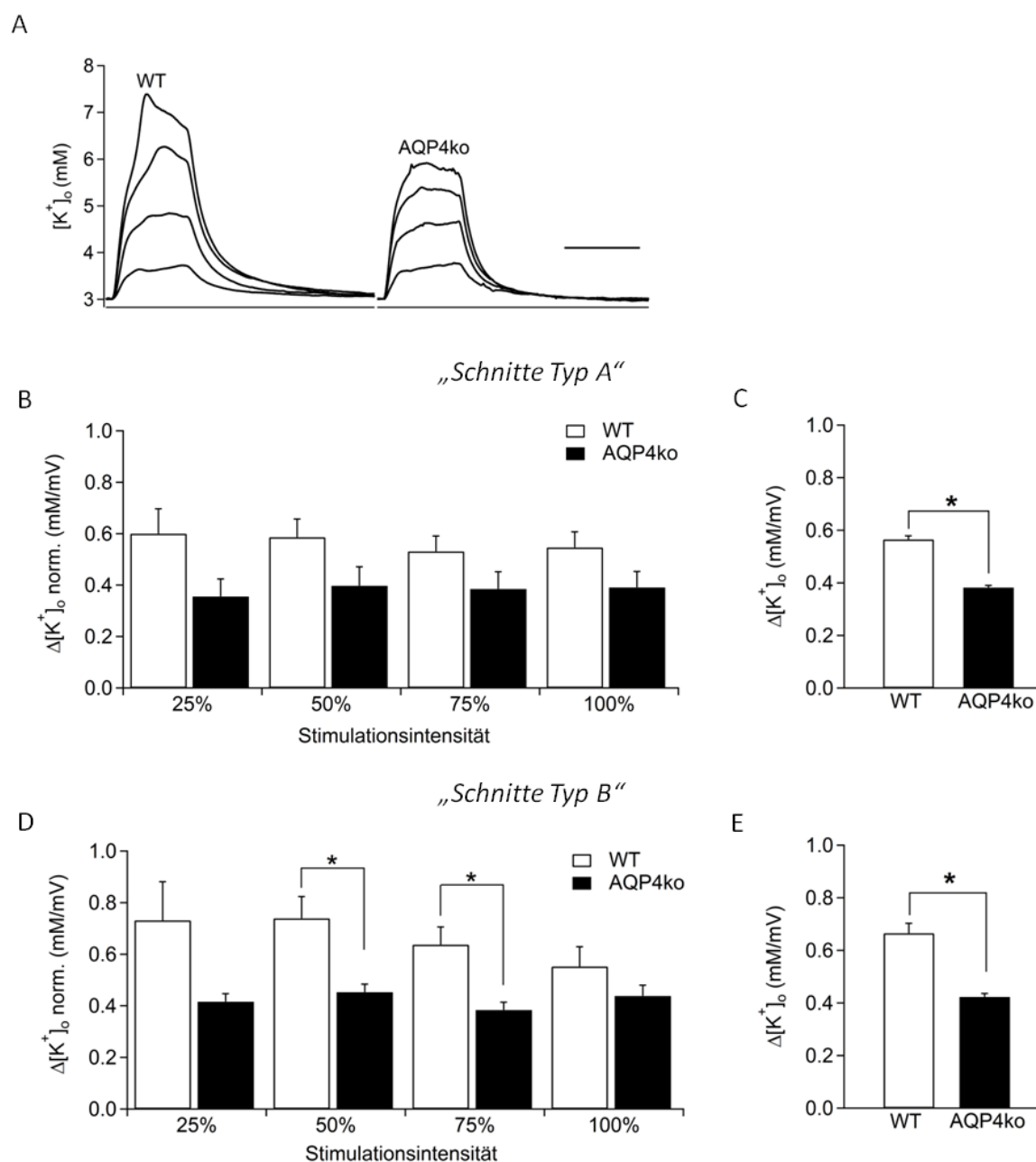
	<b><math>[K^+]_o</math> bei 100 % Stimulationsintensität</b>
	<b>„Schnitt Typ A“</b>
WT Maus (n = 10 Schnitte, 7 Tiere)	7,3 ± 0,6 mM
AQP4ko Maus (n = 7 Schnitte, 6 Tiere )	5,8 ± 0,4 mM
	<b>„Schnitt Typ B“</b>
WT Maus (n = 6 Schnitte, 5 Tiere)	6,8 ± 0,6 mV
AQP4ko Maus (n = 13 Schnitte, 9 Tiere)	6,5 ± 0,4 mV

Die Auswertung der Daten erfolgte wie bereits für die Doppelpuls - Stimulation beschrieben. Die Amplitude der  $[K^+]_o$  wurde zunächst auf den jeweiligen Populationsspike normiert. Die Unterschiede zwischen den AQP4ko Mäusen und den WT Mäusen wurden jeweils für 25, 50, 75 und 100 % Stimulationsintensitäten mit einem *Student's t* - Test verglichen. Anschließend wurden die Daten über die Stimulationsintensitäten mit einer zweifaktoriellen ANOVA analysiert. In den „Schnitten Typ A“ (WT, n = 11 Schnitte, 7 Tiere; AQP4ko, n = 7 Schnitte, 5 Tiere) unterschied sich der normierte  $\Delta[K^+]_o$  zwischen WT Mäusen und AQP4ko Mäusen bei 25, 50, 75 und 100 % Stimulationsintensität nicht (Abb. 24B). Für die „Schnitte Typ B“ (WT, n = 5 Schnitte, 5 Tiere; AQP4ko, n = 11 Schnitte, 8 Tiere) waren die Unterschiede des normierten  $\Delta[K^+]_o$  bei 50 und 75 % Stimulationsintensität zwischen WT Mäusen und AQP4ko Mäusen signifikant (50 %: WT = 0,74 ± 0,09 mM / mV; AQP4ko = 0,45 ± 0,03 mM / mV und 75 %: WT = 0,64 ± 0,07 mM / mV; AQP4ko = 0,38 ± 0,03 mM / mV). Die Unterschiede zwischen den Genotypen bei 25 % und 100 % Stimulationsintensität waren nicht signifikant (Abb. 24D). Ebenso wie bei der Doppelpuls - Stimulation zeigte die Datenanalyse mit einer zweifaktoriellen ANOVA für den

---

jeweiligen Genotyp die Unabhängigkeit des normierten  $\Delta[K^+]_o$  von der Stimulationsintensität („Schnitte Typ A“  $p = 0,76$ ; „Schnitte Typ B“  $p = 0,44$ ). Deshalb wurde für die AQP4ko Mäuse und WT Mäuse jeweils der Mittelwert des normierten  $\Delta[K^+]_o$  über die Stimulationsintensitäten gebildet. Der Mittelwerte der „Schnitte Typ A“ betrug in WT Mäusen  $0,57 \pm 0,01$  mM / mV und in AQP4ko Mäusen  $0,38 \pm 0,01$  mM / mV (Abb. 24 E). Bei den „Schnitten Typ B“ betrug der Mittelwert in WT Mäusen  $0,67 \pm 0,04$  mM / mV und  $0,42 \pm 0,01$  mM / mV in AQP4ko Mäusen (Abb. 24C). Der Mittelwert des normierten  $\Delta[K^+]_o$  war in AQP4ko Mäusen in beiden Schnitttypen kleiner, als in WT Mäusen („Schnitte Typ A“  $p = 0,004$ ; „Schnitte Typ B“  $p = 0,012$ ) (Abb. 24C und E). Der normierte  $\Delta[K^+]_o$  bei den verschiedenen Stimulationsintensitäten und der Mittelwert des  $\Delta[K^+]_o$  unterschied sich zwischen den „Schnitten Typ A“ und den „Schnitten Typ B“ für den jeweiligen Genotyp nicht. Der Vergleich erfolgte durch einen *Student's t* - Test.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der stimulationsinduzierte Anstieg der  $[K^+]_o$  sowohl im physiologischen Bereich der  $K^+$ - Konzentrationen (Doppelpuls - Stimulation) als auch bei hoher  $K^+$ - Konzentration (Stimulationstrain) durch das Fehlen des AQP4 Kanals beeinflusst wurde.



**Abb. 24 Anstieg der  $[K^+]_o$  hervorgerufen durch Stimulationsstrains**

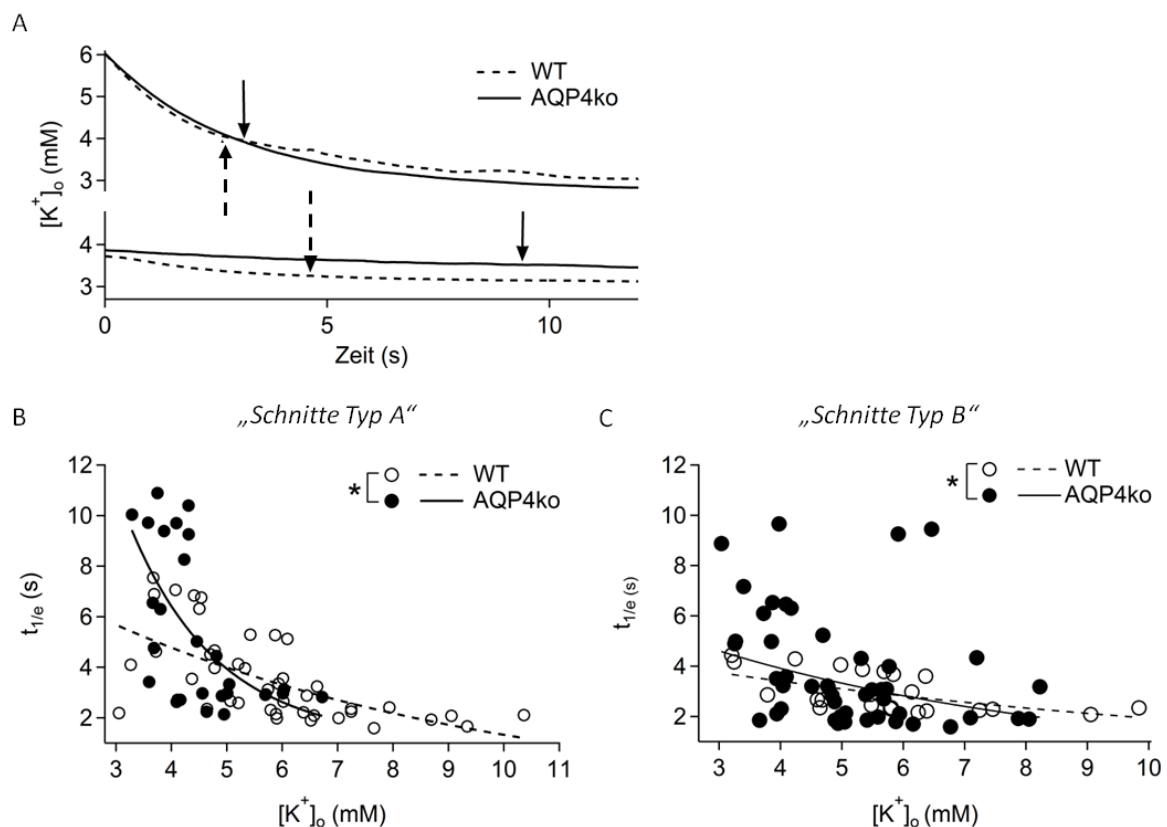
A) Beispiel für den  $K^+$ -Anstieg im EZR in WT Mäusen und AQP4ko Mäusen, hervorgerufen durch Stimulationsstrains (10 s; 20 Hz) mit 25, 50, 75 und 100 % Intensität. Skalierung 10 s. B, C) Ergebnisse für die „Schnitte Typ A“. Beim Vergleich des normierten  $\Delta[K^+]_o$  für die verschiedenen Intensitäten wurde kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen festgestellt (B). Der Mittelwert über alle Stimulationsintensitäten war in AQP4ko Mäusen signifikant kleiner, als in den WT Mäusen (C). D, E) Ergebnisse für die „Schnitte Typ B“. In AQP4ko Mäusen war der normierte  $\Delta[K^+]_o$  bei 50 und 75 % Stimulationsintensität signifikant kleiner, als in den WT Mäusen (D). Der Mittelwert über alle Stimulationsintensitäten war in AQP4ko Mäusen signifikant kleiner, als in WT Mäusen (E). (\* $p < 0,05$ ).

---

### 3.2.2 Der Abbau der $[K^+]_o$ ist in AQP4ko Mäusen verzögert

Frühere Untersuchungen im Cortex zeigten, dass durch Stimulation freigesetztes extrazelluläres  $K^+$  in AQP4ko Mäusen schneller durch den EZR diffundiert und langsamer abgebaut wird (Binder et al., 2004; Binder et al., 2006). Um zu bestimmen, ob in AQP4ko Mäusen die  $K^+$ - Gleichgewichtseinstellung verzögert ist, wurde die Kinetik des Abfalls der  $[K^+]_o$  nach der Stimulation untersucht. Der Abfall der  $[K^+]_o$  erfolgt in mehreren Phasen. Dem relativ schnellen Abfall am Anfang folgt eine langsamere Phase, die oft mit einem Abfall der  $[K^+]_o$  unter die Ausgangskonzentration verbunden ist. Zunächst wurde die Zeit für den Abfall der  $[K^+]_o$  auf  $1/e$  der Konzentration bestimmt ( $t_{1/e}$ ). Unabhängig vom Genotyp zeigte sich, dass bei Zunahme von  $[K^+]_o$  der Wert für  $t_{1/e}$  kleiner wurde. Für die Untersuchung dieses Zusammenhangs wurde  $t_{1/e}$  gegen  $[K^+]_o$  aufgetragen (Abb. 25B und C). Die Verteilung der Daten konnte am besten durch eine exponentielle Funktion beschrieben werden. Durch logarithmische Transformation wurden die Daten linearisiert und der Zusammenhang zwischen  $t_{1/e}$  und  $[K^+]_o$  durch die Bestimmung des *Pearson* Koeffizienten untersucht („Schnitt Typ A“, WT:  $r = -0,64$ ,  $n = 43$  Wertepaare, AQP4ko:  $r = -0,61$ ,  $n = 27$  Wertepaare) („Schnitt Typ B“ WT:  $r = -0,60$ ,  $n = 24$  Wertepaare, AQP4ko:  $r = -0,40$ ,  $n = 47$  Wertepaare). Mit Hilfe der Kovarianzanalyse wurden der Anstieg und der  $y$ - Achsendurchgang der linearisierten Daten der beiden Genotypen verglichen. Bei den „Schnitten Typ A“ unterschied sich der Anstieg (WT:  $-0,39$ ; AQP4ko:  $-0,17$ ;  $F = 5,4$ ) und der Schnittpunkt mit der  $y$  - Achse (WT:  $8,8$  s AQP4ko:  $27,6$  s,  $F = 497,2$ ) zwischen AQP4ko Mäusen und WT Mäusen signifikant. Auch bei den „Schnitten Typ B“ unterschied sich der Schnittpunkt mit der  $y$  - Achse zwischen den Genotypen signifikant (WT:  $5,0$  s; AQP4ko:  $7,5$  s;  $F = 275,4$ ). Für den Anstieg wurde bei den „Schnitten Typ B“ zwischen AQP4ko Mäusen und WT Mäusen kein Unterschied festgestellt (WT:  $-0,09$ ; AQP4ko:  $-0,16$ ;  $F = 0,87$ ). Der Vergleich der „Schnitte Typ A“ und „Schnitte Typ B“ erfolgte ebenfalls durch Kovarianzanalyse. Es wurde gezeigt, dass der  $y$  - Achsendurchgang zwischen den Schnitttypen für AQP4ko Mäuse bzw. WT Mäuse verschieden war.

Die Daten der „Schnitte Typ A“ zeigten, dass in AQP4ko Mäusen der Abfall der  $[K^+]_o$  vor allem im Bereich geringer  $[K^+]_o$  (bis  $\sim 4$  mM) langsamer war, als in WT Mäusen (Abb. 25A).

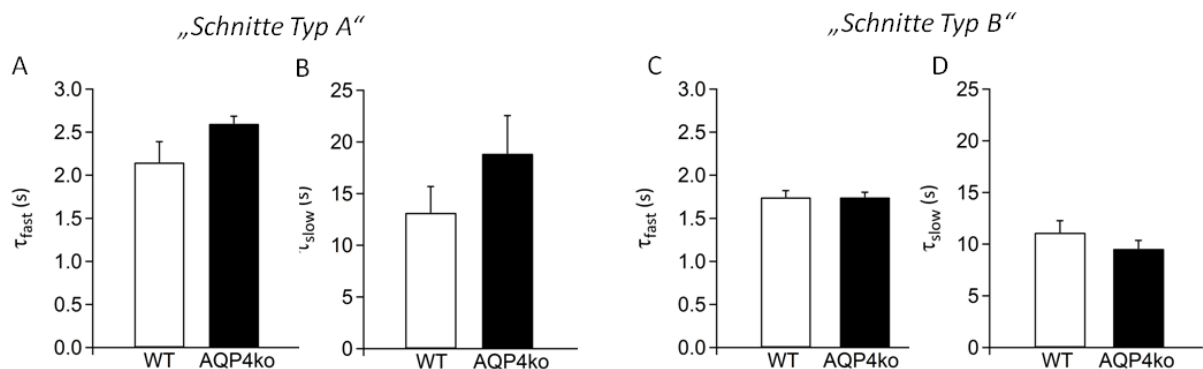


**Abb. 25** Abfalls der  $[K^+]_o$  nach Stimulationstrains

A) Beispiel für den Abfall der  $[K^+]_o$  nach Stimulationstrains (10 s, 20 Hz) mit geringer (unten, WT 25 %; AQP4ko 50 %) und hoher (oben, 100 %) Intensität (WT, gestrichelte Linie; AQP4ko, durchgezogene Linie) der „Schnitte Typ A“. Die Pfeile kennzeichnen den Abfall auf  $1/e$  der  $K^+$ -Amplitude. Bei geringer Stimulation und geringer  $[K^+]_o$  ist in AQP4ko Mäusen der Abfall langsamer, während bei hoher Stimulationsintensität und hoher  $[K^+]_o$  der Abfall in beiden Genotypen ähnlich schnell ist. B) Für die „Schnitte Typ A“ wurde  $t_{1/e}$  gegen  $[K^+]_o$  aufgetragen. Der Zusammenhang zwischen den beiden Parametern kann durch eine Exponentialfunktion beschrieben werden (WT,  $8,82 e^{-0,18x}$ ; AQP4ko,  $27,60 e^{-0,39x}$ ). C) Für die „Schnitte Typ B“ kann der Zusammenhang zwischen  $t_{1/e}$  und  $[K^+]_o$  ebenfalls durch eine Exponentialfunktion beschrieben werden (WT,  $4,97 e^{-0,09x}$ ; AQP4ko,  $7,51 e^{-0,16x}$ ). Durch logarithmische Transformation erfolgte die für die Kovarianzanalyse notwendige Linearisierung. Die Kovarianzanalyse ergab, dass sich in den „Schnitten Typ A“ der Anstieg und der y-Achsendurchgang zwischen den Genotypen unterschied. Für die „Schnitte Typ B“ unterschied sich der y-Achsendurchgang zwischen den Genotypen signifikant.

Untersuchungen am optischen Nerv und im Gyrus dentatus von Ratten zeigten, dass dem schnellen Abfall der  $[K^+]_o$  am Anfang ein langsamerer Abfall folgt (Ransom et al., 2000; Santhakumar et al., 2003). Dieser Abfall kann durch die Zeitkonstanten  $\tau_{fast}$  für den schnellen Abfall und  $\tau_{slow}$  für den langsamen Abfall beschrieben werden (Santhakumar et al., 2003). Die Bestimmung dieser Zeitkonstanten erfolgte durch biexponentiellen Fit von 90 % des Abfalls bis zum Minimum der  $[K^+]_o$  (siehe „2. Methoden“ Kap. 2.5.7; Abb. 9). Die Unterschiede zwischen den Genotypen für  $\tau_{fast}$  bzw.  $\tau_{slow}$  bei 25, 50, 75 und 100 % Stimulationsintensität wurden mit einem *Student's t*-Test überprüft. Hierbei wurde festgestellt, dass sich die

Zeitkonstanten bei den verschiedenen Stimulationsintensitäten zwischen den Genotypen nicht unterschieden. Diese betraf sowohl die „Schnitte Typ A“ als auch die „Schnitte Typ B“ (Daten nicht gezeigt). Die weitere Analyse mit einer zweifaktoriellen ANOVA ergab, dass sich innerhalb des Genotyps die Zeitkonstanten bei den verschiedenen Stimulationsintensitäten nicht unterschieden. Auch die Mittelwerte für  $\tau_{fast}$  bzw.  $\tau_{slow}$  über alle Stimulationsintensitäten unterschieden sich zwischen den Genotypen nicht. In den „Schnitten Typ A“ der WT Mäuse (n = 11 Schnitte, 7 Tiere) betrug der Mittelwert für  $\tau_{fast}$   $2,1 \pm 0,2$  s und für  $\tau_{slow}$   $13,2 \pm 2,5$  s. Für AQP4ko Mäuse (n = 6 Schnitte, 5 Tiere) betrug der Mittelwert für  $\tau_{fast}$   $2,6 \pm 0,1$  s und für  $\tau_{slow}$   $18,9 \pm 3,7$  s. In den „Schnitten Typ B“ betrug der Mittelwert der WT Mäuse (n = 6 Schnitte, 5 Tiere) für  $\tau_{fast}$   $1,7 \pm 0,1$  s und für  $\tau_{slow}$   $11,1 \pm 1,2$  s. Für AQP4ko Mäusen (n = 11 Schnitte, 8 Tiere) betrug der Mittelwert für  $\tau_{fast}$   $1,7 \pm 0,1$  s und für  $\tau_{slow}$   $9,5 \pm 0,8$  s (Abb. 26). Der Vergleich der Schnitttypen mit einem Student's t - Test zeigte, dass die Mittelwerte für  $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$  der AQP4ko Mäuse in den „Schnitten Typ A“ größer war, als in den „Schnitten Typ B“. Für die WT Mäuse wurden keine Unterschiede zwischen den Schnitttypen für  $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$  festgestellt.



**Abb. 26 Mittelwerte über alle Stimulationsintensitäten für  $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$  in AQP4ko- und WT Mäusen**

Der Abfall der  $[K^+]_o$  kann durch eine schnelle und langsame Zeitkonstante beschrieben werden ( $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$ ). Die beiden Zeitkonstanten wurden durch biexponentiellen Fit von 90 % des Abfalls bis zum Minimum der  $[K^+]_o$  bestimmt. Über die verschiedenen Stimulationsintensitäten wurden die Mittelwerte für  $\tau_{fast}$  bzw.  $\tau_{slow}$  bestimmt. A, B) Ergebnisse für „Schnitte Typ A“. Für  $\tau_{fast}$  (A) bzw.  $\tau_{slow}$  (B) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt. C, D) Ergebnisse für „Schnitte Typ B“.  $\tau_{fast}$  (C) bzw.  $\tau_{slow}$  (D) unterschieden sich zwischen den Genotypen nicht.

Weiterhin wurde der Zusammenhang zwischen der  $[K^+]_o$  mit  $\tau_{fast}$  und  $\tau_{slow}$  durch Bestimmung des Pearson Koeffizienten überprüft. Die in Tab. 6 zusammengefassten Daten zeigen, dass der Pearson Koeffizient sehr klein und somit der Zusammenhang zwischen  $[K^+]_o$  und  $\tau_{fast}$  bzw.  $\tau_{slow}$  gering waren.

**Tab. 6 Pearson Koeffizient für  $\tau_{fast}$ ,  $\tau_{slow}$  und  $[K^+]_o$  in WT- und AQP4ko Mäusen**

Mit Hilfe des Pearson Koeffizient wurde der Zusammenhang zwischen  $\tau_{fast}$  und  $[K^+]_o$  sowie zwischen  $\tau_{slow}$  und  $[K^+]_o$  für AQP4ko Mäuse und WT Mäuse in beiden Schnitttypen analysiert.

	$\tau_{fast} - [K^+]_o$	$\tau_{slow} - [K^+]_o$
	<b>„Schnitte Typ A“</b>	
WT Maus 40 Wertepaare	0.27	0.35
AQP4ko Maus 20 Wertepaare	-0.39	-0.33
<b>„Schnitte Typ B“</b>		
WT Maus 45 Wertepaare	0.37	0.10
AQP4ko Maus 39 Wertepaare	0.05	0.24

Der stimulationsinduzierte Anstieg der  $[K^+]_o$  folgt dem Anstieg der intrazellulären  $Na^+$ -Konzentration  $[Na^+]_i$  in den Neuronen. Der Anstieg der  $[Na^+]_i$  führt zur Aktivierung der neuronalen  $Na^+/K^+$  ATPase. Da die neuronale  $Na^+/K^+$  ATPase verzögert aktiviert wird und die  $[K^+]_o$  durch die gliale Aufnahme bereits reduziert ist, kann der weitere  $Na^+ - K^+$  Austausch durch die neuronale  $Na^+/K^+$  ATPase zu einem Abfall der  $[K^+]_o$  unter die Konzentration vor der Stimulation führen. Dieser Abfall der  $[K^+]_o$  unter die Grundlinie wird als *undershoot* bezeichnet (Heinemann und Lux, 1975; Ransom et al., 2000). Die Amplitude des *undershoot* wurde nach Stimulationstrains mit 100 % Stimulationsintensität bestimmt und auf den  $\Delta[K^+]_o$  bei 100 % Stimulationsintensität normiert (siehe „2. Methoden“ Kap. 2.5.7; Abb. 10). Die Daten wurden mit einem *Student's t* - Test verglichen und es wurde gezeigt, dass sich der *undershoot* zwischen AQP4ko Mäusen und WT Mäusen nicht unterschied. Dies trifft für beide Schnitttypen zu (Tab. 7).

**Tab. 7 Undershoot der  $[K^+]_o$  in AQP4ko - und WT Mäusen**

Die Amplituden des *undershoot* nach Stimulationstrains mit 100 % Intensität wurden normiert auf den  $\Delta[K^+]_o$  bei 100 % Stimulationsintensität. Die beiden Genotypen unterschieden sich nicht.

	<b><i>undershoot</i> normiert auf <math>\Delta[K^+]_o</math></b>
	<b>„Schnitte Typ A“</b>
WT Maus (n = 9 Schnitte; 7 Tiere)	0,018 ± 0,002 mM/mM
AQP4ko Maus (n = 7 Schnitte; 5 Tiere)	0,016 ± 0,003 mM/mM
	<b>„Schnitte Typ B“</b>
WT Maus (n = 6 Schnitte; 5 Tiere)	0,016 ± 0,004 mM/mM
AQP4ko Maus (n = 12 Schnitte; 9 Tiere)	0,017 ± 0,003 mM/mM

Zusammenfassend lässt sich für den Abbau der stimulationsinduzierten  $[K^+]_o$  in den „Schnitten Typ A“ feststellen, dass im Bereich geringer  $[K^+]_o$  der Abbau in AQP4ko Mäusen deutlich langsamer war. Deshalb wird vermutet, dass der *knock out* des AQP4 Kanals die  $K^+$ -Pufferung bei geringer  $[K^+]_o$  beeinflusst.

### 3.2.3 Die Verteilung des $[K^+]_o$ im astroglialen Syncytium der CA1 Region ist in AQP4ko Mäusen verändert

Der Einfluss des AQP4 Kanals auf die Umverteilung der  $[K^+]_o$  im EZR der CA1 Region wurde durch die Bestimmung des laminaren Profils untersucht. Hierfür wurden die Pyramidenneurone durch Stimulationstrains (10 s, 20 Hz) mit 75 % der maximalen Intensität antidrom aktiviert und die  $K^+$ -selektive Messelektrode ausgehend vom Stratum pyramidale in 100  $\mu$ m Schritten in Richtung hippocampaler Fissur bewegt (Abb. 22A) (Gabriel et al., 1998b; Wallraff et al., 2006). So konnte der stimulationsinduzierte Anstieg der  $[K^+]_o$  vom Stratum pyramidale, durch das Stratum radiatum und Stratum lacunosum moleculare bis hin zur hippocampalen Fissur bestimmt werden.

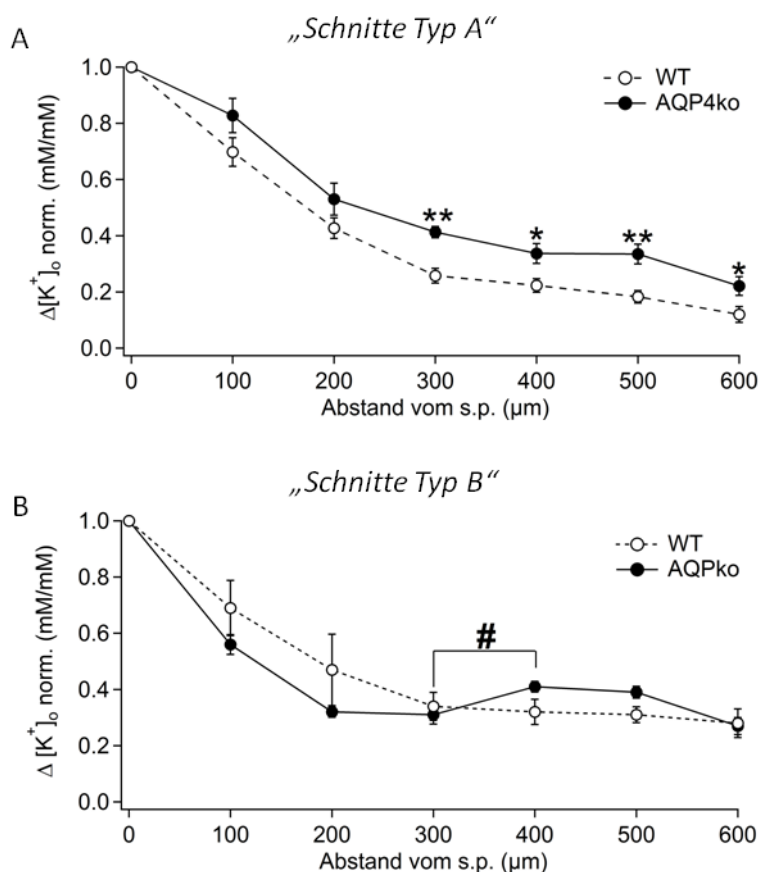
Die durch antidrome Stimulation hervorgerufenen Populationsspikes nahmen in Richtung hippocampaler Fissur in AQP4ko Mäusen und WT Mäusen ab. Der Vergleich der Populationsspikes zeigte, dass sich die beiden Genotypen bei der jeweiligen Entfernung nicht unterschieden (Daten nicht gezeigt). Somit kann davon ausgegangen werden, dass in beiden Genotypen die Ausbreitung der dendritischen Aktionspotentiale ähnlich war.



---

Um die  $[K^+]_o$  im Bereich der Dendriten mit dem Bereich des Somas zu vergleichen, wurden die Veränderungen der  $[K^+]_o$  auf den Wert im Stratum pyramidale normiert und gegen den Abstand zum Stratum pyramidale aufgetragen.

Im Bereich des Stratum radiatum, also 100 - 200  $\mu\text{m}$  vom Stratum pyramidale entfernt, unterschieden sich die normierte  $[K^+]_o$  zwischen den Genotypen in beiden Schnitttypen nicht. Zwischen 300 - 600  $\mu\text{m}$  Entfernung vom Stratum pyramidale, also im Bereich des Stratum lacunosum moleculare, war in den „Schnitten Typ A“ (WT, n = 11 Schnitte, 7 Tiere; AQP4ko, n = 9 Schnitte, 6 Tiere) die normierte  $[K^+]_o$  in AQP4ko Mäusen signifikant größer (Abb. 27A). Die normierte  $[K^+]_o$  in den „Schnitten Typ B“ (WT, n = 6 Schnitte; 5 Tiere; AQP4ko, n = 12 Schnitte; 8 Tiere) unterschied sich bei einem Abstand von 300 - 600  $\mu\text{m}$  vom Stratum pyramidale zwischen den Genotypen nicht. Im Vergleich zu den „Schnitten Typ A“ nahm im Abstand zwischen 300 - 400  $\mu\text{m}$  vom Stratum pyramidale in den „Schnitten Typ B“ die normierte  $[K^+]_o$  in AQP4ko Mäusen zu (Abb. 27B) (*Student's t* - Test).



**Abb. 27 Umverteilung der  $[K^+]_o$  in der CA1 Region der WT- und AQP4ko Mäuse**

Der stimulationsinduzierte Anstieg der  $[K^+]_o$  (Stimulationstrains mit 75 % Intensität) wurde normiert auf den Anstieg im Stratum pyramidale (s.p.) und die Mittelwerte wurden gegen den Abstand zum Stratum pyramidale aufgetragen. Die weißen Kreise repräsentieren die Mittelwerte der WT Mäuse und die schwarzen Kreise die Mittelwerte der AQP4ko Mäuse. A) Verlauf der normierten  $[K^+]_o$  im laminaren Profil der „Schnitte Typ A“. In AQP4ko Mäusen ist die normierte  $[K^+]_o$  bei einem Abstand zwischen 300 - 600  $\mu\text{m}$  vom Stratum pyramidale größer, als in WT Mäusen (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). B) Verlauf der normierten  $[K^+]_o$  im laminaren Profil der „Schnitte Typ B“. Die beiden Genotypen unterscheiden sich nicht. In AQP4ko Mäusen nahm die normierte  $[K^+]_o$ , bei einem Abstand zwischen 300 - 400  $\mu\text{m}$  von der Pyramidenzellschicht, zu (#  $p < 0,05$ ).

Die Daten der „Schnitte Typ A“ zeigten, dass in AQP4ko Mäusen eine effizientere Umverteilung der  $[K^+]_o$  erfolgte. Der Verlauf der  $[K^+]_o$  in den „Schnitten Typ B“ unterschied sich von den „Schnitten Typ A“. Aufgrund des untypischen Verlaufs der Feldpotentiale (siehe Kap. 3.2; Abb. 22) wurden diese Daten für die Beurteilung des Einflusses des AQP4 Kanals auf die Umverteilung der  $[K^+]_o$  nicht berücksichtigt.

---

## 4. Diskussion

### 4.1. Einfluss des AQP4 Kanals auf die *Gap junction* Kopplung

Astrozyten bilden ein Puffersystem, das u.a. notwendig ist für die Verteilung des lokalen Anstiegs der  $[K^+]_o$ , der aus der neuronalen Aktivität resultiert. Für solch ein globales Pufferungssystem ist eine umfangreiche Kopplung von Astrozyten notwendig (Binmöller und Müller, 1992).

#### 4.1.1 Untersuchung der Kopplung mit der *gap* - FRAP Methode

Der Einfluss des AQP4 Kanals auf die *Gap junction* Kopplung wurde mit der *gap* - FRAP Methode untersucht. Da diese Methode in der Arbeitsgruppe bisher nicht etabliert war, war der erste Schritt die Methodenentwicklung. Grundlage waren Arbeiten *in situ* und an kultivierten Hirnschnitten, in denen mit der *gap* – FRAP Methode Veränderungen der *Gap junction* Kopplung untersucht wurden (Cotrina et al., 2001; Wentlandt et al., 2006; Samoilova et al., 2008). Auf Grundlage dieser Arbeiten wurde für die *gap* - FRAP Experimente CFDA als Fluoreszenzfarbstoff ausgewählt. Im ersten Schritt wurden folgende Fragen bearbeitet i) hat die Farbstoffrelaxation Anteil an der Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen und ii) wird CFDA selektiv von Astrozyten aufgenommen. Außerdem wurden verschiedene Strategien für die Färbung der Astrozyten getestet.

Die Relaxation des Farbstoffes wurde in kultivierten Astrozyten untersucht. Hierfür wurden Astrozyten in einem Kulturstadium geblichen, in dem diese noch keine Verbindung zu ihren Nachbarzellen ausgebildet hatten. So konnte die Diffusion des Farbstoffes aus ungeblichenen, benachbarten Astrozyten ausgeschlossen werden. Da während der *Recovery* keine Fluoreszenzrückkehr gemessen wurde, hatte also die Relaxation von CFDA kaum Anteil an der Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen.

Die spezifische Aufnahme von CFDA in die Astrozyten wurde durch Doppelfärbung mit SR101 überprüft. Nimmerjahn et al. (2004) und Kafitz et al. (2008) zeigten, dass SR101 spezifisch von Astrozyten aufgenommen wird. Die mit SR101 und CFDA gefärbten Zellen wurden auch anhand ihres ovalen Somas und ihrer prominenten Fortsätzen als Astrozyten identifiziert (Matthias et al., 2003). Andere Zellen, die nur mit CFDA gefärbt waren, konnten nicht als Astrozyten identifiziert werden. Der Anteil dieser Zellen betrug in WT Mäusen und in AQP4ko Mäusen jeweils 6 %. In diesem Vorversuch wurde gezeigt, dass die Mehrzahl der

---

CFDA - gefärbten Zellen auch mit SR101 gefärbt waren. Auf Grund dieser Daten wurde geschlussfolgert, dass CFDA vorwiegend von Astrozyten aufgenommen wurde.

Die Färbung der Astrozyten erfolgte durch Inkubation der Schnitte in einer CFDA - Lösung. Hierbei wurde beobachtet, dass in einigen Schnitten nur sehr wenige oder gar keine Astrozyten mit CFDA gefärbt waren. Ähnliche Probleme beim Färben wurden von Frantseva et al. (2002) beschrieben. Bei ihren Kopplungsuntersuchungen in kultivierten Schnitten von Ratten waren auf Grund der Färbung nur 50 % der Schnitte für gap - FRAP Experimente geeignet. Bei Arbeiten in Zellkulturen konnten Milzzellen und Tumorzelllinien von Mäusen ebenfalls nicht mit CFDA gefärbt werden (Brenan und Parish, 1984). Da der genaue Mechanismus der CFDA Aufnahme in Astrozyten nicht bekannt ist, konnte die Ursache für die heterogene Färbung der Astrozyten nicht geklärt werden.

Die gap - FRAP Experimente wurden in zwei Versuchsreihen durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurde die Fluoreszenz vor dem Bleichen und während der *Recovery* mit geringer Intensität eines Argon - Lasers angeregt. Da ein Ausbleichen der Fluoreszenz während der *Recovery* nicht vermieden werden konnte, wurde der Bleicheffekte rechnerisch korrigiert (siehe „2. Methoden“ Kap. 2.3.7). Neben dem Bleicheffekt ist das Auftreten von Phototoxizität ein weiteres Problem bei der Fluoreszenzanregung mit dem Argon - Laser (Abbaci et al., 2008). Durch Phototoxizität können Zellschäden hervorgerufen werden und somit die Vitalität der Zellen beeinträchtigt werden. Um den Bleicheffekt und die Phototoxizität zu verringern, erfolgte in einer zweiten Versuchsreihe die Fluoreszenzanregung vor dem Bleichen und während der *Recovery* mit einem IR - Laser. Vorteile der Multiphotonenmikroskopie waren, dass die Anregung nur im Fokuspunkt erfolgte, die Eindringtiefe größer und die Streuung des Lichtes geringer waren. Hierdurch wurden der Bleicheffekt und die Phototoxizität auf einen kleinen Punkt beschränkt und die Auflösung in der z - Ebene verbessert (Diaspro et al., 2006). In der zweiten Versuchsreihe konnten deshalb der zeitliche Abstand zwischen den Aufnahmen während der *Recovery* verringert und die Fluoreszenz in mehreren z - Ebenen detektiert werden. Somit wurde ein exakterer Verlauf der *Recovery* bestimmt und eine größere Anzahl an Astrozyten erfasst.

Um eine subjektive Auswahl einzelner Astrozyten für die gap - FRAP Experiment zu vermeiden, wurde ein möglichst großer Bereich mit mehreren Astrozyten gebleicht. In der ersten Versuchsreihe wurde eine Fläche von 50  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$  gebleicht und in der zweiten Versuchsreihe eine Fläche bis zu 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$ . Die Bleichzeit betrug in der ersten Versuchsreihe 7 - 10 s und in der zweiten Versuchsreihe 6 - 14 s. Obwohl die Laserleistung

---

für beide Versuchsreihen gleich groß war, war die Rest - Fluoreszenz nach dem Bleichen für alle Genotypen in der ersten Versuchsreihe kleiner, als in der zweiten Versuchsreihe. Vermutlich wurden diese Unterschiede der Rest - Fluoreszenz zwischen den beiden Versuchsreihen durch die Größe des Bleichbereiches verursacht.

Um den Einfluss des AQP4 Kanals auf die Kopplung zu untersuchen, wurden gap - FRAP Experimente in hippocampalen Schnitten von adulten AQP4ko Mäusen durchgeführt. Als Kontrollen wurden C57BL/6J Mäuse untersucht, da Analysen mit Biozytin zeigten, dass sich adulte C57BL/6J Mäuse und CD1 Mäuse bezüglich ihrer Kopplung nicht unterscheiden (siehe „3. Ergebnisse“ Kap. 3.1.6) und C57BL/6J Mäuse auf Grund der eigenen Zucht permanent zur Verfügung standen. Des Weiteren wurden gap - FRAP Experimente mit DKO Mäusen durchgeführt. Hintergrund für diese Experimente war, den Anteil der Farbstoffdiffusion aus den ungeblichenen Bereichen des individuellen Astrozyten zu bestimmen. In kultivierten Hirnschnitten von Ratten wurde diese Diffusion durch Blockierung der *Gap junctions* mit Octanol, Carbenoxolon und Propionsäure untersucht. Außerdem wurden Schnitte mit Fluoreszin - Dextran geladen. Dieser Farbstoff kann auf Grund seines Molekulargewichts (~4000 Da) *Gap junctions* nicht passieren. Bei der Blockierung der *Gap junctions* und der Verwendung von Fluorescin - Dextran betrug die Fluoreszenzrecovery ~10 % (Frantseva et al., 2002; Wentlandt et al., 2006). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten DKO Mäusen exprimieren kein Cx43 und Cx30. Somit können zwischen den Astrozyten keine *Gap junctions* ausgebildet werden (Wallraff et al., 2006). Die Zunahme der Fluoreszenz nach dem Bleichen in DKO Mäusen um ~7 % in beiden Versuchsreihen war somit auf die Diffusion des Farbstoffes aus ungeblichenen Fortsätzen des Astrozyten zurückzuführen.

Während der *Recovery* sollte sich der ungebliche Farbstoff gleichmäßig in den gekoppelten Astrozyten verteilen, so dass sich innerhalb des geblichenen Bereiches die Fluoreszenzintensität nach einiger Zeit nicht mehr verändert (siehe Abb. 3). Eine gleichmäßige Farbstoffverteilung liegt vor, wenn die *Recovery* Kurve ein Plateau erreicht hat. Die *Recovery* wurde über einen Zeitraum von 6 - 20 min gemessen. In einigen Experimente mit AQP4ko Mäusen und C57BL/6J Mäusen wurde das Plateau der *Recovery* Kurve nicht erreicht. Bei Experimenten mit DKO Mäusen wurde in einigen *Recovery* - Kurven nach dem Anstieg der Fluoreszenzintensität ein Abfall beobachtet. Für die Abnahme der Fluoreszenz waren möglicherweise Bleicheffekte oder phototoxische Effekte verantwortlich. Mit Hilfe von  $\Delta F$  sollten Aussagen über den Kopplungsumfang der Astrozyten getroffen werden, da

---

bei einer größeren astrozytären Kopplung mehr ungeblichener Farbstoff in den geblichen Bereich diffundieren kann. Die *Recovery* wurde in allen Experimenten mindestens 412 s gemessen. Deshalb wurde für den Vergleich der drei Genotypen und der beiden Versuchsreihen  $\Delta F$  nach einer *Recovery* - Zeit von 412 s bestimmt. In der ersten Versuchsreihe war  $\Delta F$  für AQP4ko Mäuse geringer, als für die Kontrollen. Dies wäre so zu interpretieren, dass in der ersten Versuchsreihe in AQP4ko Mäusen weniger Astrozyten gekoppelt waren, als in den Kontrollen. In der zweiten Versuchsreihe war  $\Delta F$  für AQP4ko Mäuse größer, als für die Kontrollen. Ergebnis der zweiten Versuchsreihe wäre also, dass in AQP4ko Mäusen mehr Astrozyten gekoppelt waren, als in den Kontrollen. Die Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe stimmen gut mit denen der Biozytin - Injektionsexperimenten überein, so dass gap - FRAP Experimente zukünftig als unabhängiger Ansatz zur Kopplungsanalyse dienen könnten.

Bei der Bestimmung der Zeitkonstante  $\tau$  wurde eine große Variabilität der Daten festgestellt. So war  $\tau$  für AQP4ko Mäuse und für die Kontrollen in der erste Versuchsreihe kleiner, als in der zweiten Versuchsreihe. Der Vergleich innerhalb der Versuchsreihen zeigte, dass in der ersten Versuchsreihe  $\tau$  in AQP4ko Mäusen kleiner war, als in den Kontrollen. In der zweiten Versuchsreihe unterschied sich  $\tau$  zwischen AQP4ko Mäusen und den Kontrollen nicht. In beiden Versuchsreihen war  $\tau$  für DKO Mäuse kleiner, als für die Kontrollen und in der zweiten Versuchsreihe auch kleiner, als für AQP4ko Mäuse. Für  $\tau$  ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Farbstoffdiffusion über die *Gap junctions* ein langsamerer Prozess war, im Vergleich zu der Diffusion aus den ungeblichenen Bereichen des individuellen Astrozyten.

Ein großes Problem dieser Methode stellte die heterogene Färbung der Astrozyten dar. Die Beurteilung der CFDA Färbung erfolgte unter subjektiven Gesichtspunkten. Die hieraus resultierende Verwendung von unterschiedlich gut gefärbten Schnitten könnte eine Ursache für die große Streuung von  $\Delta F$  und  $\tau$  sowie für die Variabilität der *Recovery* Zeiten sein.

#### 4.1.2 Schlussfolgerungen für die weitere Anwendung der gap - FRAP Methode

Vor einer Anwendung der gap - FRAP Methode für quantitative Kopplungsanalysen muss diese weiter optimiert werden. Die wichtigste Aufgabe hierbei ist, die Färbung der Astrozyten zu verbessern. Eine Möglichkeit ist, die CFDA Konzentration zu variieren. Bei der intrazellulären Hydrolyse der Estergruppe von CFDA entstehen als Nebenprodukte freie Radikale und reaktive Sauerstoffverbindungen. Diese Nebenprodukte können die

---

*Gap junction* Kommunikation beeinträchtigen und zu Apoptose führen (Abbaci et al., 2008). Bei einer hohen Farbstoffkonzentration ist die Konzentration dieser Nebenprodukte entsprechend groß. Möglicherweise war die eingesetzte Farbstoffkonzentration von 15  $\mu\text{M}$  CFDA zu groß und beeinflusste die Vitalität der Astrozyten. Für weitere Experimente wäre es also lohnenswert zu testen, ob mit einer geringeren Farbstoffkonzentration eine bessere Beladung der Astrozyten erreicht werden kann. Weiterhin können für die Optimierung der Methode andere Farbstoffe getestet werden. In der Literatur werden 5(6)-Carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat, 2',7'-Bis(2-carboxyethylen)-5(6)-carboxy-fluorescein-Acetoxy-methylester und Calcein-Acetoxy-methylester (Abbaci et al., 2007; Abbaci et al., 2008) als geeignete Farbstoffe für gap - FRAP Experimente beschrieben.

Eine Möglichkeit, um die Variabilität der *Recovery* - Dauer und von  $\Delta F$  zu reduzieren, ist die Verwendung von Schnitten, in denen die Astrozyten eine ähnlich gute Beladung mit Farbstoff aufweisen. Um die subjektive Beurteilung der Fluoreszenzfärbung durch den Experimentator auszuschließen, sollte ein Kriterium entwickelt werden, das den objektiven Vergleich der Färbung ermöglicht. Ein solches Kriterium könnte beispielsweise eine Mindestanzahl gefärbter Astrozyten innerhalb eines bestimmten Bereiches sein. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei einer Zunahme des Bleichbereiches die Rest - Fluoreszenz nach dem Bleichen zunimmt. Dies könnte kompensiert werden durch eine längere Bleichdauer. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass durch hohe Laserintensität Zellschäden hervorgerufen werden (Dakin et al., 2005), so dass eine lange Bleichzeit die Vitalität der Astrozyten beeinträchtigen kann. Für den Bleichprozess muss also ein guter Kompromiss zwischen der Größe des Bleichbereichs, der Laserintensität, der Bleichzeit und der hierdurch zu erreichenden Rest - Fluoreszenz nach dem Bleichen gefunden werden.

Bei der Messung der *Recovery* ist zu berücksichtigen, dass die Zeit bis zum Erreichen der stationären Phase deutlich länger sein kann, als die bei Cortina et al. (2001) angegebenen 2 min bzw. 8 - 10 min, die von Wentlandt et al. (2006) und Frantseva et al. (2002) angegeben wurden.

#### 4.1.3 Einfluss des AQP4 Kanals auf die *Gap junction* Kopplung in adulten Mäusen

Aufgrund der variablen Ergebnisse bei den Kopplungsuntersuchungen mit der gap - FRAP Methode wurde die *Gap junction* Kopplung zusätzlich mit einer weiteren Methode analysiert. Hierfür wurde die Größe des Synzytiums im Stratum radiatum der CA1 Region durch die Ausbreitung von Biozytin bestimmt. Die Experimente wurden an

---

adulten AQP4ko Mäusen durchgeführt. Als WT Kontrollen wurden CD1 Mäuse und C57BL/6J Mäuse verwendet. Die Auswahl der Astrozyten erfolgte anhand ihrer Morphologie unter der IR - DIC Optik des Mikroskops. Über eine *Patch - Pipette* wurden die Astrozyten in der *whole - cell* Konfiguration mit Biozytin gefüllt. Elektrophysiologisch wurden die Astrozyten an ihrem Strommuster in der *whole - cell* Konfiguration identifiziert. Alle Astrozyten hatten ein typisches zeit- und spannungsunabhängiges Strommuster („passives Strommuster“) (Matthias et al., 2003), das sich zwischen den Genotypen nicht unterschied. Zhang et al. (2008) zeigten, dass sich das Membranpotential von Astrozyten in AQP4ko Mäusen und WT Mäusen nicht unterscheidet. Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigten diesen Befund. Die Daten zeigten weiterhin, dass die Anzahl der gekoppelten Astrozyten in AQP4ko Mäusen größer war, als in CD1 Mäusen und C57BL/6J Mäusen. Zwischen den beiden WT Kontrollen (CD1 Mäusen und C57BL/6J Mäusen) wurden keine Unterschiede bezüglich der Anzahl der gekoppelten Astrozyten festgestellt. Aus diesem Grund konnte ein Einfluss des genetischen Hintergrunds auf die *Gap junction* Kopplung mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Somit konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass der *knock out* von AQP4 in adulten Mäusen zu einer Zunahme der Synzytiumsgröße in der CA1 Region führt.

#### 4.1.4 Einfluss des AQP4 Kanals auf die Entwicklung der *Gap junction* Kopplung in juvenilen Mäusen

Der Einfluss des AQP4 Kanals auf die Entwicklung der *Gap junction* Kopplung wurde an 8 - 13 Tage alten AQP4ko Mäusen untersucht. Als Kontrollen wurden CD1 Mäuse und C57BL/6J Mäuse im gleichen Alter verwendet. Die Größe des Synzytiums wurde auch hier durch die Ausbreitung von Biozytin bestimmt. Das Membranpotential der Astrozyten unterschied sich zwischen den Genotypen zu den verschiedenen Zeitpunkten nicht.

Sowohl für AQP4ko Mäuse als auch für die beiden WT Kontrollen wurden Astrozyten mit zeit- und spannungsabhängigen Auswärtsströmen nachgewiesen. Für die AQP4ko Mäuse wurde dieses Strommuster in p8 und p9 alten Mäuse gemessen. Im Vergleich dazu wurden für CD1 Mäuse zwischen p8 - p12 und für C57BL/6J Mäuse zwischen p8 - p13 Strommuster mit zeit- und spannungsabhängigen Auswärtsströmen gemessen. Diese Auswärtsströme werden durch zwei Typen spannungsgesteuerter  $K^+$  - Kanäle, den verzögert gleichrichtende  $K^+$  - Kanal und den transienten  $K^+$  - Kanal, vermittelt (Matthias et al., 2003).



---

Bei Untersuchungen im Hippocampus von 4 - 21 Tage alten Ratten durch Schools et al. (2006) wurden während der beiden ersten postnatalen Wochen gekoppelte und ungekoppelte Astrozyten identifiziert und eine Zunahme der Synzytiumgröße in diesem Zeitraum gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl in AQP4ko Mäusen als auch in den Kontrollen gekoppelte und ungekoppelte Astrozyten identifiziert. Für die Analyse der Entwicklung der *Gap junction* Kopplung wurde der Anteil gekoppelter Astrozyten in jeder Altersgruppe bestimmt und die Kopplung der Astrozyten für das jeweilige Alter zwischen den Genotypen verglichen. In p13 alten AQP4ko Mäusen waren alle gemessenen Astrozyten gekoppelt. Im gleichen Alter waren in CD1 Mäusen 75 % der Astrozyten gekoppelt und in C57BL/6J Mäusen 66 %. Der Vergleich gekoppelter Astrozyten zeigte, dass im Alter von p8, p9 und p12 in AQP4ko Mäusen mehr gekoppelte Astrozyten vorlagen, als in den Kontrollen. In der Gruppe der p13 alten Mäuse waren in AQP4ko Mäusen weniger Astrozyten gekoppelt, als in CD1 Mäusen. Für die AQP4ko Mäuse konnte keine kontinuierliche Zunahme der Kopplung gezeigt werden. Der Vergleich der Kopplung in AQP4ko Mäuse zeigte, dass in p11 AQP4ko Mäusen signifikant weniger Astrozyten gekoppelt waren, als in p9 AQP4ko Mäusen. In p13 AQP4ko Mäusen nahm die Kopplung im Vergleich zu p12 AQP4ko Mäusen deutlich ab. Auf Grund der großen Streuung der Kopplungszahlen können die vorliegenden Daten nur ein erster Hinweis für eine frühere Etablierung der astrozytären Kopplung in AQP4ko Mäusen sein. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass in p13 AQP4ko Mäusen alle Astrozyten gekoppelt waren.

#### 4.1.5 Zusammenfassung der Kopplungsanalysen

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die *Gap junction* Kopplung in adulten AQP4ko Mäusen größer ist, als in den Kontrollen. Für die Reifung der astrozytären Kopplung gibt es Hinweise, dass diese in AQP4ko Mäusen schneller erfolgt. Nicchia et al. (2005) untersuchten *in vitro* den Einfluss des AQP4 *knock down* durch siRNA auf die Cx43 Expression. Die Autoren zeigten durch Western Blot Analyse, dass die Cx43 Expression abnimmt und konnten durch *scrap loading* Experimente nachweisen, dass die *Gap junction* Kopplung ebenfalls reduziert war. Die Daten der vorliegenden Arbeit stehen im Widerspruch mit der Arbeit von Nicchia et al. (2005). Möglicherweise wird die Regulation der Cx43 Expression *in vivo* durch weitere Faktoren beeinflusst. Für den Zusammenhang zwischen dem ko des AQP4 Kanals und der Cx43 Expression *in vivo* sind deshalb weitere Untersuchungen notwendig.

---

#### 4.2. Einfluss des AQP4 Kanals auf die $K^+$ -Pufferung in adulten Mäusen

Der AQP4 Kanal und der  $K_{ir}$  4.1 Kanal spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Wasser- und  $K^+$ -Homöostase im Gehirn. Morphologische, biochemische und physiologische Untersuchungen führten zu der Hypothese, dass zwischen diesen beiden Kanälen auch funktionelle Interaktionen bestehen (Nagelhus et al., 1999; Connors et al., 2004). Ein solcher Zusammenhang zwischen AQP4 Kanal und  $K_{ir}$ 4.1 Kanal konnte jedoch bisher nicht bestätigt werden (Ruiz-Ederra et al., 2007; Zhang und Verkman, 2008).

Deshalb wurde in dieser Arbeit der Einfluss des AQP4 Kanals auf die  $K^+$ -Homöostase untersucht. Hierfür wurde in adulten AQP4ko Mäusen die  $[K^+]_o$  nach antidormer Stimulation im Alveus gemessen. Als WT Kontrollen wurden CD1 Mäuse untersucht. Für die Beurteilung der  $K^+$ -Homöostase wurden drei stimulationsabhängige Parameter bestimmt: die maximale Zunahme der  $[K^+]_o$  im Stratum pyramidale, der Abfall der  $[K^+]_o$  und die Verteilung der  $[K^+]_o$  zwischen dem Stratum pyramidale und der hippocampalen Fissur.

Bei der Auswertung der Experimente wurden die Daten in zwei Gruppen unterteilt („Schnitte Typ A“ und „Schnitte Typ B“). Diese Einteilung erfolgte anhand der Feldpotentiale bei der Analyse der  $K^+$ -Umverteilung. Der stimulationsinduzierte Anstieg der  $[K^+]_o$  führt im Bereich der maximalen  $K^+$ -Akkumulation zu einer Depolarisation des RMP, die jedoch geringer ist, als die Depolarisation des  $E_K$ . Die Differenz zwischen RMP und  $E_K$  ist die treibende Kraft für die  $K^+$ -Aufnahme in Astrozyten. Diese Aufnahme von  $K^+$  kann an der Generierung eines negativen, langsamen Feldpotentials beteiligt sein. In Regionen mit einer geringeren  $[K^+]_o$  fließt  $K^+$  aus den Astrozyten in den EZR. Dieser Ausstrom von  $K^+$  führt wahrscheinlich zur Generierung eines positiven, langsamen Feldpotentials (Gabriel et al., 1998b). Untersuchungen des Feldpotentials im Hippocampus von Ratten durch Gabriel et al. (1998b) zeigten eine Umkehr der Amplitude des Feldpotentials im Abstand von 150 - 200  $\mu\text{m}$  vom Stratum pyramidale. Für die Feldpotentialamplituden in dieser Arbeit wurde ein ähnlicher Verlauf beobachtet. Jedoch erfolgte in einigen Schnitten im Abstand von 300 - 600  $\mu\text{m}$  vom Stratum pyramidale im Verlauf der Stimulation eine Repolarisation der Feldpotentialamplitude (siehe „3. Ergebnisse“ Abb. 22; „Schnitte Typ B“). Als Ursache vermuten wir eine zusätzliche Stimulation von Oriens - Lacunosum moleculare Interneuronen. Die Somata der Oriens - Lacunosum moleculare Interneurone befinden sich im Stratum oriens und ihre Dendriten zwischen Stratum oriens und Alveus. Die Axone projizieren ins Stratum lacunosum (Sik et al., 1995; Lien et al., 2002). Wir vermuten, dass in

---

einigen Schnitten während der Stimulation im Alveus auch Oriens - Lacunosum moleculare Interneurone aktiviert wurden. Die Stimulation von Oriens - Lacunosum moleculare Interneuronen könnte im Bereich des Stratum lacunosum moleculare durch axonale Freisetzung zu einem Anstieg der  $[K^+]_o$  führen und somit zu einer Depolarisation des  $E_K$ . Der hieraus resultierende Einstrom von  $K^+$  in die Astrozyten könnte die Repolarisation der Feldpotentialamplitude verursachen. Abb. 27 zeigt die Verteilung der normierten  $[K^+]_o$  zwischen dem Stratum pyramidale und der hippocampalen Fissur. In den „Schnitten Typ B“ der AQP4ko Mäuse ist eine signifikante Zunahme der  $[K^+]_o$  im Abstand von 300 - 400  $\mu\text{m}$  vom Stratum pyramidale zu sehen. Da die genaue Ursache für den Verlauf der Feldpotentiale in den „Schnitte Typ B“ nicht abschließend geklärt werden konnte, wurden für die weitere Diskussion nur die Daten der „Schnitte Typ A“ berücksichtigt. Die Daten der „Schnitte Typ A“ sind Teil der Publikation Strohschein et al., 2011.

#### 4.2.1 Messung der $[K^+]_o$ im Stratum pyramidale nach neuronaler Stimulation

Binder et al. (2004) zeigten durch Diffusionsmessungen von Makromolekülen, dass der EZR in AQP4ko Mäusen vergrößert ist. In dieser Arbeit betrug die  $[K^+]_o$  vor der neuronalen Stimulation sowohl in AQP4ko Mäusen und als auch in den WT Kontrollen  $\sim 3$  mM. Dies bedeutet, dass trotz der Volumenzunahme des EZR die  $[K^+]_o$  in AQP4ko Mäusen im Ruhezustand nicht verändert war. Durch neuronale Stimulation mit kurzen, gepaarten Pulsen wurde ein Anstieg der  $[K^+]_o$  im physiologischen Bereich hervorgerufen. Ein hoher Anstieg der  $[K^+]_o$  wurde durch eine 10 s lange Stimulation erreicht. In beiden Fällen war die normierte  $[K^+]_o$  in AQP4ko Mäusen kleiner, als in den WT Mäusen. Die Aufnahme des extrazellulären  $K^+$  erfolgt durch  $K_{ir}4.1$  Kanäle der Astrozyten (Kofuji und Newman, 2004). Ruiz-Ederra et al. (2007) und Zhang et al. (2008) zeigten, dass der ko von AQP4 keinen Einfluss auf die Expression von  $K_{ir}4.1$  hatte. Weiterhin zeigten die Autoren durch *Patch - Clamp* Messungen, dass auch der  $K^+$ - Strom durch den Barium - sensitiven  $K_{ir}4.1$  Kanal in AQP4ko Mäusen nicht verändert war. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte geringere normierte  $[K^+]_o$  nach neuronaler Stimulation ist deshalb nicht auf Veränderungen der Interaktionen zwischen dem AQP4 Kanal und dem  $K_{ir}4.1$  Kanal zurückzuführen. Vielmehr lassen die Daten vermuten, dass die geringere  $[K^+]_o$  in AQP4ko Mäusen durch Veränderungen des Wasserflusses hervorgerufen wurden. Bei der Aufnahme von extrazellulärem  $K^+$  nimmt die Osmolarität in den Astrozyten zu. Dies führt zu einem Wassereinstrom in die Astrozyten (Dietzel et al., 1980). Durch diesen begleitenden

---

Wasserstrom nimmt das Volumen der Astrozyten zu und das Volumen des EZR ab. Aufgrund des fehlenden Wasserkanals in AQP4ko Mäusen ist dieser kompensierende Wasserstrom wahrscheinlich nur begrenzt möglich. Dies würde in AQP4ko Mäusen zu einer geringeren Volumenabnahme des EZR führen, so dass sich extrazelluläres  $K^+$  in einem größeren Volumen verteilt und somit die  $[K^+]_o$  geringer ist. Möglicherweise wird die geringere Zunahme der  $[K^+]_o$  auch durch die von Binder et al. (2004) gemessene Volumenvergrößerung des EZR in AQP4ko Mäusen beeinflusst.

Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass die geringere  $[K^+]_o$  nach neuronaler Stimulation in AQP4ko Mäusen eher auf ein größeres Volumen des EZR zurückzuführen ist, als auf eine fehlende Interaktion zwischen AQP4 und  $K_{ir}4.1$  Kanal.

#### 4.2.2 Abfall der $[K^+]_o$ nach neuronaler Stimulation

Die Analyse des Abfalls der  $[K^+]_o$  nach neuronaler Stimulation zeigte, dass dieser in AQP4ko Mäusen langsamer war, als in den WT Mäusen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieser verlangsamte Abfall konzentrationsabhängig war. Bei einem Anstieg der  $[K^+]_o$  bis 4 mM war die  $K^+$ - Aufnahme in AQP4ko Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen verzögert. Nur bei einer hohen  $[K^+]_o$  war die Zeitkonstante in beiden Genotypen ähnlich.

Wie bereits erwähnt, ist die Funktion des  $K_{ir}4.1$  Kanals in den AQP4ko Mäusen nicht verändert. Es stellt sich also die Frage, welcher Mechanismus für die verzögerte  $K^+$ - Aufnahme in AQP4ko Mäusen verantwortlich sein kann. D`Ambrosio et al. (2002) zeigten, dass bei einer Blockierung der  $Na^+/K^+$  ATPasen der Abfall der  $[K^+]_o$  nach neuronaler Aktivität verzögert war und schlussfolgerten, dass gliale und neuronale  $Na^+/K^+$  ATPasen an der  $K^+$ - Pufferung beteiligt sind. Untersuchungen am optischen Nerv durch Ransom et al. (2002) zeigten, dass eine geringe Erhöhung der  $[K^+]_o$  vor allem gliale  $Na^+/K^+$  ATPasen aktiviert und die neuronalen  $Na^+/K^+$  ATPasen eher bei einer hohen  $[K^+]_o$  aktiviert werden.

Bei einer hohen  $[K^+]_o$  kann ein Abfall unter die Ausgangskonzentration der  $[K^+]_o$  erfolgen (*undershoot*) (Heinemann und Lux, 1975). Dieser *undershoot* kann nach der Blockierung der neuronalen Aktivität und iontophoretischer Applikation von  $K^+$  nicht mehr beobachtet werden (Jauch et al., 2002). Deshalb wurde vermutet, dass der *undershoot* durch die Aktivität der neuronalen  $Na^+/K^+$  ATPasen hervorgerufen wird. Die vorliegenden Daten zeigten, dass sich die Amplitude des *undershoots* zwischen den AQP4ko Mäusen und den WT Mäusen nicht unterschied. Somit hatte der ko des AQP4 Kanal auf die Aktivität der neuronalen  $Na^+/K^+$  ATPase vermutlich keinen Einfluss.

---

Illarionova et al. (2010) zeigten in Zellkulturen, dass die gliale  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase mit der M23 Isoform des AQP4 Kanals interagiert und schlussfolgerten, dass AQP4 und die gliale  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase einen makromolekularen Komplex bilden, der an der Regulation der Wasser- und  $\text{K}^+$ - Homöostase im Gehirn beteiligt ist. Der Ko des AQP4 Kanals verursacht möglicherweise eine Veränderung der Aktivität der glialen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, die eine verzögerte Aufnahme von extrazellulären  $\text{K}^+$  zur Folge hat. Die Untersuchung der  $\text{K}^+$ - Pufferung in AQP4ko Mäusen nach der Blockierung der neuronalen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasen mit Strophanthidin und iontophoretischer  $\text{K}^+$ - Applikation könnte Aufschluss über den Einfluss des AQP4 Kanals auf die Aktivität der glialen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase geben. Durch immunohistochemische Analysen könnte die Lokalisierung der glialen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase in AQP4 defizienten Astrozyten untersucht werden.

#### 4.2.3 Umverteilung des $[\text{K}^+]_o$ im EZR

Aktivierung der Pyramidenneurone in der CA1 Region führt zu einem Gradienten der  $[\text{K}^+]_o$  vom Stratum pyramidale in Richtung hippocampaler Fissur (Gabriel et al., 1998a). Dieser Gradient wird hervorgerufen durch die Umverteilung von  $\text{K}^+$  im Gewebe. Bei der Umverteilung strömt  $\text{K}^+$  im Bereich hoher  $[\text{K}^+]_o$  aus dem EZR in die Astrozyten. Über die *Gap junctions* wird  $\text{K}^+$  im Synzytium umverteilt und fließt im Bereich geringerer  $[\text{K}^+]_o$  aus den Astrozyten wieder in den EZR ( *$\text{K}^+$  spatial buffering*) (Orkand et al., 1966). Für die Beantwortung der Frage, ob der Ko von AQP4 die  $\text{K}^+$ - Umverteilung beeinflusst, wurde die  $[\text{K}^+]_o$  nach neuronaler Stimulation zwischen dem Stratum pyramidale und der hippocampalen Fissur gemessen und auf die  $[\text{K}^+]_o$  im Stratum pyramidale normiert. Die Populationsspiques unterschieden sich bei der jeweiligen Entfernung vom Stratum pyramidale zwischen den Genotypen nicht, so dass die Ausbreitung der dendritischen Aktionspotentiale in beiden Genotypen ähnlich war. Die vorliegenden Daten zeigten, dass die normierte  $[\text{K}^+]_o$  im Bereich des Stratum radiatum (100 - 200  $\mu\text{m}$  entfernt vom Stratum pyramidale) sich zwischen den Genotypen nicht unterschied. Erst ab 300 - 600  $\mu\text{m}$  Entfernung vom Stratum pyramidale, also im Bereich zwischen dem Stratum moleculare lacunosum und der hippocampalen Fissur, nahm die normierte  $[\text{K}^+]_o$  in den WT Mäusen stärker ab, als in AQP4ko Mäusen. In diesen weiter entfernten Bereichen mit einer geringen  $[\text{K}^+]_o$  fließt  $\text{K}^+$  aus den Astrozyten in den EZR, wodurch die Osmolarität im EZR in diesem Bereich zunimmt. Dies muss durch einen Wasserfluss aus den Astrozyten in den EZR kompensiert werden (Dietzel et al., 1980). Auf Grund des Wasserflusses nimmt das Volumen der Astrozyten ab

---

und das Volumen des EZR zu. Da in den AQP4ko Mäusen der Wasserfluss aus den Astrozyten verändert ist, fließt weniger Wasser in den EZR, so dass die Volumenzunahme des EZR geringer und somit die  $[K^+]_o$  Zunahme größer ist.

### **4.3. Zusammenhang zwischen der $K^+$ -Pufferung und der höheren Gap junction Kopplung in AQP4ko Mäusen**

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in adulten AQP4ko Mäusen eine höhere Kopplung vorlag. Durch Wallraff et al. (2006) wurde gezeigt, dass die *Gap junction* Kopplung wichtig für die  $K^+$ -Verteilung im Hippocampus ist. Des Weiteren ist die Wasserhomöostase essentiell für die Aufrechterhaltung der Hirnfunktionen. Die höhere Kopplung in AQP4ko Mäusen ist möglicherweise ein Mechanismus, um die Verringerung des Wasserflusses zu kompensieren. Hierfür ist folgender Zusammenhang zwischen der Zunahme der Kopplung und der  $K^+$ -Pufferung denkbar:

Auf Grund der höheren astrozytären Kopplung in AQP4ko Mäusen kann das aufgenommene  $K^+$  über einen größeren Bereich umverteilt werden, so dass  $K^+$  innerhalb des Synzytiums schneller vom Ort hoher  $[K^+]_o$  zu Bereichen geringer  $[K^+]_o$  transportiert wird. Auf Grund der schnelleren Umverteilung von  $K^+$  im Synzytium wäre der Anstieg der Osmolarität in den Astrozyten im Bereich der  $K^+$ -Aufnahme geringer, so dass die Einschränkung des Wasserflusses in den AQP4ko Mäusen kompensiert werden würde.

Möglicherweise gilt ein ähnlicher Zusammenhang für die vermutete schnellere Reifung der astrozytären Kopplung in juvenilen AQP4ko Mäusen. Seifert et al. (2009) zeigten, dass in p3 - p12 alten Mäusen die Zunahme der  $K_{ir}4.1$  Expression von der Zunahme des  $Ba^{2+}$  sensitiven Einwärtsstromes begleitet wird. Eine frühere Etablierung der astrozytären Kopplung in juvenilen AQP4ko Mäusen, würde in diesen Mäusen eine Zunahme des  $K^+$ -Einstroms ermöglichen, da aufgrund der besseren Umverteilung die Einschränkung des begleitenden Wasserfluss kompensiert werden könnte.

Zusammengefasst würde dies bedeuten, dass durch den ko des AQP4 Kanals im Hippocampus eine größere astrozytäre Kopplung hervorgerufen wird, die zu einer besseren Umverteilung von extrazellulären  $K^+$  führt und somit die Verringerung des Wasserflusses kompensiert.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des *knock out* von AQP4 auf die *Gap junction* Kopplung und die  $K^+$ -Pufferung nach neuronaler Stimulation untersucht. Für diese Untersuchungen wurden Experimente in akuten Hirnschnitten von AQP4ko Mäusen und WT Mäusen durchgeführt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die gap - FRAP Methode für die Analyse der *Gap junction* Kopplung *in situ* getestet. Es wurden gap - FRAP Experimente in zwei Versuchsreihen durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe erfolgte die Anregung der Fluoreszenz mit dem Argon - Laser und in der zweiten mit dem IR - Laser. Für den Vergleich der astrozytären Kopplung wurde die maximale Fluoreszenzrückkehr nach dem Bleichen bestimmt. Die Daten der ersten Versuchsreihe lassen für AQP4ko Mäuse eine geringere astrozytäre Kopplung vermuten, als für WT Mäuse. Die Daten der zweiten Versuchsreihe sind Hinweis auf eine höhere Kopplung in AQP4ko Mäusen. Ursache für diese variablen Daten war vermutlich die heterogene Beladung der Astrozyten mit Fluorescein.

Eine weitere Analyse der *Gap junction* Kopplung erfolgte durch die Bestimmung der Farbstoffausbreitung im Synzytium, nach der Injektion in einen einzelnen Astrozyten. Es wurde gezeigt, dass in adulten AQP4ko Mäusen mehr Astrozyten gekoppelt waren, als in den WT Mäusen. Auf Grund der Übereinstimmung dieser Daten mit den Ergebnissen der gap - FRAP Experimente der zweiten Versuchsreihe, wird vermutet, dass der *knock out* von AQP4 die astrozytäre Kopplung beeinflusst.

Die Etablierung der astrozytären Kopplung wurde in juvenilen Mäusen bis p13 untersucht. Die Bestimmung des Anteils gekoppelter Astrozyten zeigte, dass am Ende des untersuchten Zeitraums in AQP4ko Mäusen alle gemessenen Astrozyten gekoppelt waren, während in WT Mäusen noch ungekoppelte Astrozyten identifiziert wurden. Für AQP4ko Mäuse wurde für einige Zeitpunkte eine höhere Kopplung, als für WT Mäuse gezeigt. Obwohl keine kontinuierliche Zunahme der Kopplung nachgewiesen wurde, können die vorliegenden Daten ein erster Hinweis für eine beschleunigte Etablierung der astrozytären Kopplung in AQP4ko Mäusen sein.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss des AQP4 Kanals auf die  $K^+$ -Pufferung untersucht. Nach antidromer Stimulation im Alveus wurde mit einer  $K^+$ -selektiven Mikroelektrode die  $[K^+]_o$  im Stratum pyramidale gemessen. Es wurde gezeigt, dass in AQP4ko Mäusen der normierte  $\Delta[K^+]_o$  im Stratum pyramidale geringer war, als in den

---

WT Mäusen. Der kompensierende Wasserfluss bei der Aufnahme von  $K^+$  aus dem EZR ist in AQP4ko Mäusen eingeschränkt. Damit verbunden ist eine geringere Volumenabnahme des EZR in AQP4ko Mäusen, so dass die resultierende  $[K^+]_o$  im Vergleich zu WT Mäusen kleiner ist. Die Analyse der Kinetik zeigte, dass bei einer geringen  $[K^+]_o$  die Aufnahme von extrazellulären  $K^+$  in AQP4ko Mäusen verzögert ist. Dies ist vermutlich auf Veränderungen der gliale  $Na^+/K^+$  ATPase in AQP4ko Mäusen zurückzuführen.

Für die Untersuchung der Umverteilung des extrazellulären  $K^+$  wurde die  $K^+$ - selektive Mikroelektrode schrittweise vom Stratum pyramidale zur hippocampalen Fissur bewegt. Die stimulationsinduzierte, normierte  $[K^+]_o$  war ab einem Abstand von 300  $\mu m$  vom Stratum pyramidale in AQP4ko Mäusen größer, als in WT Mäusen. In diesem Bereich strömt  $K^+$  und Wasser aus den Astrozyten in den EZR. Dies führt zur Volumenzunahme des EZR. Auf Grund des eingeschränkten Wasserflusses in AQP4ko Mäusen ist die Volumenzunahme des EZR geringer, so dass die resultierende  $[K^+]_o$  höher ist, als in WT Mäusen.

Diese Arbeit zeigt, dass der *knock out* des AQP4 Kanals vermutlich zu einer früheren Etablierung des astrozytären Netzwerkes in juvenilen Mäusen führt und in adulten Mäusen eine höhere astrozytäre Kopplung bewirkt. Weiterhin wurde gezeigt, dass die  $K^+$ - Pufferung nach neuronaler Stimulation in AQP4ko Mäusen verändert war. Vermutlich ermöglicht die höhere *Gap junction* Kopplung in AQP4ko Mäusen nach neuronaler Stimulation die schnellere Umverteilung des aufgenommenen  $K^+$  und kompensiert somit den eingeschränkten Wasserfluss.



## 6. Summary

In the present work the influence of an AQP4 knock out in mice on gap junction coupling and  $K^+$  buffering after neuronal stimulation was investigated.

In a first step the gap - FRAP method was evaluated *in situ* using an argon or IR laser. To compare gap junctional coupling maximal fluorescence recovery after photobleaching was detected in hippocampal slices of AQP4ko mice and WT mice. Data obtained with the argon - laser suggest a smaller astrocytic coupling in AQP4ko mice as in WT mice. However, data obtained with the IR - laser are more indicative of a higher coupling in AQP4ko mice than in WT mice. These contradictory results could be due to heterogeneous loading of astrocytes with fluorescein.

Hence, further analysis of the gap junction coupling was done by the detection of tracer filling in the syncytium, after a single injection of tracer into single astrocytes. It was shown that in adult AQP4ko mice more astrocytes were coupled, as in the WT mice. The establishment of astrocytic coupling was followed in juvenile mice until p13. In AQP4ko mice all astrocytes were coupled at the end of examined period, whereas uncoupled astrocytes could still be identified in WT mice. At several time points a higher coupling of astrocytes was found in AQP4ko mice compared to WT mice, though the increase was not continuously. However, the present data suggests an accelerated maturation of astrocytic coupling in AQP4ko mice compare to WT mice.

In the second part of this work the influence of the AQP4 channel on  $K^+$  buffering was investigated. After antidromic stimulation in the alveus the  $[K^+]_o$  in stratum pyramidale was measured with a  $K^+$ - selective microelectrode. It was shown that the normalized  $\Delta[K^+]_o$  in the stratum pyramidale was lower in AQP4ko mice than in WT mice. Furthermore, water flow during uptake of  $K^+$  is restricted in AQP4ko mice. This is associated with a reduced enlargement of the ECS in AQP4ko mice compared to WT mice, also resulting in a lower  $[K^+]_o$ . Analysis of the kinetics showed that the uptake of extracellular  $K^+$  is delayed in AQP4ko mice, which could be due to changes in the glial  $Na^+/K^+$  ATPase in AQP4ko mice.

To investigate the redistribution of extracellular  $K^+$ , a  $K^+$ - selective microelectrode was moved stepwise from the stratum pyramidale to the hippocampal fissure. The stimulation - induced  $[K^+]_o$  was higher in AQP4ko mice at a distant greater than 300  $\mu m$  from the stratum pyramidal. In this area, water and the  $K^+$  drain from astrocytes into the ECS, which leads to a volume increase of the ECS. However, the volume increase of the ECS is lower in AQP4ko mice, resulting in a higher  $[K^+]_o$ , than in WT mice.

In this study it was shown that the *knock out* of the AQP4 channel presumably leads to an earlier establishment of the astrocytic network in juvenile mice and affects the size of the syncytium in adult mice. Furthermore it could be demonstrated that neuronal stimulation in AQP4ko mice leads to a change of the  $K^+$ - buffering. This is probably due to an enhanced gap junction coupling in and faster redistribution of  $K^+$  in AQP4ko mice after neuronal stimulation compared to WT mice.

---

## 7. Literaturverzeichnis

**Abbaci M, Barberi-Heyob M, Blondel W, Guillemin F, Didelon J. 2008.** Advantages and limitations of commonly used methods to assay the molecular permeability of gap junctional intercellular communication. *Biotechniques*. 45: 33-62.

**Abbaci M, Barberi-Heyob M, Stines JR, Blondel W, Dumas D, Guillemin F, Didelon J. 2007.** Gap junctional intercellular communication capacity by gap-FRAP technique: a comparative study. *Biotechnol.J.* 2: 50-61.

**Akopian G, Kressin K, Derouiche A, Steinhäuser C. 1996.** Identified glial cells in the early postnatal mouse hippocampus display different types of Ca<sup>2+</sup> currents. *Glia* 17: 181-194.

**Altevogt BM, Paul DL. 2004.** Four classes of intercellular channels between glial cells in the CNS. *J.Neurosci.* 24: 4313-4323.

**Amaral DG, Witter MP. 1995.** Hippocampal formation. In: The Rat Nervous System. Paxinos G, ed. *Academic Press*, 443-493.

**Amiry-Moghaddam M, Otsuka T, Hurn PD, Traystman RJ, Haug FM, Froehner SC, Adams ME, Neely JD, Agre P, Ottersen OP, Bhardwaj A. 2003a.** An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100: 2106-2111.

**Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. 2003.** The molecular basis of water transport in the brain. *Nat.Rev.Neurosci.* 4: 991-1001.

**Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, Eid T, de Lanerolle NC, Nagelhus EA, Adams ME, Froehner SC, Agre P, Ottersen OP. 2003b.** Delayed K<sup>+</sup> clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100: 13615-13620.

**Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E. 2004.** Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J.Neurosci.* 24: 6920-6927.

**Badaut J, Brunet JF, Regli L. 2007.** Aquaporins in the brain: from aqueduct to "multi-duct". *Metab Brain Dis.* 22: 251-263.

**Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, Regli L. 2002.** Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 22: 367-378.

**Bergles DE, Diamond JS, Jahr CE. 1999.** Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr.Opin.Neurobiol.* 9: 293-298.

**Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE. 2000.** Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 405: 187-191.

**Binder DK, Papadopoulos MC, Haggie PM, Verkman AS. 2004.** In vivo measurement of brain extracellular space diffusion by cortical surface photobleaching. *J.Neurosci.* 24: 8049-8056.

- 
- Binder DK, Yao X, Zador Z, Sick TJ, Verkman AS, Manley GT. 2006.** Increased seizure duration and slowed potassium kinetics in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Glia*. 53: 631-636.
- Binmöller FJ, Müller CM. 1992.** Postnatal development of dye-coupling among astrocytes in rat visual cortex. *Glia*. 6: 127-137.
- Brenan M, Parish CR. 1984.** Intracellular fluorescent labelling of cells for analysis of lymphocyte migration. *J.Immunol.Methods* 74: 31-38.
- Brightman MW, Reese TS. 1969.** Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J.Cell Biol.* 40: 648-677.
- Christie MJ. 1995.** Molecular and functional diversity of K<sup>+</sup> channels. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 22: 944-951.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de ME, Rudy B. 1999.** Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 868: 233-285.
- Connors NC, Adams ME, Froehner SC, Kofuji P. 2004.** The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J.Biol.Chem.* 279: 28387-28392.
- Cotrina ML, Gao Q, Lin JH, Nedergaard M. 2001.** Expression and function of astrocytic gap junctions in aging. *Brain Res.* 901: 55-61.
- Crane JM, Tajima M, Verkman AS. 2010.** Live-cell imaging of aquaporin-4 diffusion and interactions in orthogonal arrays of particles. *Neuroscience.* 168: 892-902.
- Dakin K, Zhao Y, Li WH. 2005.** LAMP, a new imaging assay of gap junctional communication unveils that Ca<sup>2+</sup> influx inhibits cell coupling. *Nat.Methods* 2: 55-62.
- Dermietzel R, Traub O, Hwang TK, Beyer E, Bennett MV, Spray DC, Willecke K. 1989.** Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86: 10148-10152.
- Diaspro A, Bianchini P, Vicidomini G, Faretta M, Ramoino P, Usai C. 2006.** Multi-photon excitation microscopy. *Biomed.Eng Online.* 5:36.: 36.
- Dietzel I, Heinemann U, Hofmeier G, Lux HD. 1980.** Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration. *Exp.Brain Res.* 40: 432-439.
- Eid T, Lee TS, Thomas MJ, Amiry-Moghaddam M, Bjornsen LP, Spencer DD, Agre P, Ottersen OP, de Lanerolle NC. 2005.** Loss of perivascular aquaporin 4 may underlie deficient water and K<sup>+</sup> homeostasis in the human epileptogenic hippocampus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102: 1193-1198.
- Filippov MA, Hormuzdi SG, Fuchs EC, Monyer H. 2003.** A reporter allele for investigating connexin 26 gene expression in the mouse brain. *Eur.J.Neurosci.* 18: 3183-3192.
-

- 
- Fink M, Duprat F, Lesage F, Reyes R, Romey G, Heurteaux C, Lazdunski M. 1996.** Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K<sup>+</sup> channel. *EMBO J.* 15: 6854-6862.
- Frantseva MV, Kokarovtseva L, Naus CG, Carlen PL, MacFabe D, Perez Velazquez JL. 2002.** Specific gap junctions enhance the neuronal vulnerability to brain traumatic injury. *J.Neurosci.* 22: 644-653.
- Frotscher M, Kugler P, Misgeld U, Zilles K. 1988.** Neurotransmission in the hippocampus. *Adv.Anat.Embryol.Cell Biol.* 111: 1-103.
- Gabriel S, Eilers A, Kivi A, Kovacs R, Schulze K, Lehmann TN, Heinemann U. 1998a.** Effects of barium on stimulus induced changes in extracellular potassium concentration in area CA1 of hippocampal slices from normal and pilocarpine-treated epileptic rats. *Neurosci.Lett.* 242: 9-12.
- Gabriel S, Kivi A, Eilers A, Kovacs R, Heinemann U. 1998b.** Effects of barium on stimulus-induced rises in [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> in juvenile rat hippocampal area CA1. *Neuroreport.* 9: 2583-2587.
- Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, Thorlin T, Nilsson M, Ronnback L. 2000.** Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem.Int.* 37: 317-329.
- Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthay MA, Verkman AS. 1994.** Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J.Biol.Chem.* 269: 5497-5500.
- Heinemann U, Lux HD. 1975.** Undershoots following stimulus-induced rises of extracellular potassium concentration in cerebral cortex of cat. *Brain Res.* 93: 63-76.
- Heinemann U, Lux HD. 1977.** Ceiling of stimulus induced rises in extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat. *Brain Res.* 120: 231-249.
- Higashi K, Fujita A, Inanobe A, Tanemoto M, Doi K, Kubo T, Kurachi Y. 2001.** An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 281: C922-C931.
- Hille B. 2001.** Ion channels of excitable membranes. *Sinauer Associates, Inc.*
- Jabs R, Pivneva T, Huttmann K, Wyczynski A, Nolte C, Kettenmann H, Steinhäuser C. 2005.** Synaptic transmission onto hippocampal glial cells with hGFAP promoter activity. *J.Cell Sci.* 118: 3791-3803.
- Jan LY, Jan YN. 1997.** Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu.Rev.Neurosci.* 20: 91-123.
- Jauch R, Windmuller O, Lehmann TN, Heinemann U, Gabriel S. 2002.** Effects of barium, furosemide, ouabaine and 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) on ionophoretically-induced changes in extracellular potassium concentration in hippocampal slices from rats and from patients with epilepsy. *Brain Res.* 925: 18-27.

- 
- Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P. 1994.** Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91: 13052-13056.
- Kafitz KW, Meier SD, Stephan J, Rose CR. 2008.** Developmental profile and properties of sulforhodamine 101--Labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus. *J.Neurosci.Methods.* 169: 84-92.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M. 1998.** Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat.Neurosci.* 1: 683-692.
- Karram K, Goebbels S, Schwab M, Jennissen K, Seifert G, Steinhäuser C, Nave KA, Trotter J. 2008.** NG2-expressing cells in the nervous system revealed by the NG2-EYFP-knockin mouse. *Genesis.* 46: 743-757.
- Kettenmann H, Ransom BR. 1995.** Neuroglia. *Oxford University Press.*
- Kofuji P, Biedermann B, Siddharthan V, Raap M, Iandiev I, Milenkovic I, Thomzig A, Veh RW, Bringmann A, Reichenbach A. 2002.** Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. *Glia* 39: 292-303.
- Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, Newman EA. 2000.** Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J.Neurosci.* 20: 5733-5740.
- Kofuji P, Newman EA. 2004.** Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience.* 129: 1045-1056.
- Kreutzberg GW. 1996.** Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19: 312-318.
- Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK. 1966.** Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J.Neurophysiol.* 29: 768-787.
- Kunzelmann P, Schroder W, Traub O, Steinhäuser C, Dermietzel R, 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.
- Lee TS, Eid T, Mane S, Kim JH, Spencer DD, Ottersen OP, de Lanerolle NC. 2004.** Aquaporin-4 is increased in the sclerotic hippocampus in human temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol.(Berl)* 108: 493-502.
- Levine JM, Nishiyama A. 1996.** The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells. *Perspect.Dev.Neurobiol.* 3: 245-259.
- Lien CC, Martina M, Schultz JH, Ehmke H, Jonas P. 2002.** Gating, modulation and subunit composition of voltage-gated K(+) channels in dendritic inhibitory interneurons of rat hippocampus. *J.Physiol* 538: 405-419.
- Lin SC, Bergles DE. 2004.** Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nat.Neurosci.* 7: 24-32.
-

- 
- Ma T, Yang B, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. 1997.** Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial-insensitive water channel aquaporin-4. *J.Clin.Invest.* 100: 957-962.
- MacAulay N, Zeuthen T. 2010.** Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. *Neuroscience.* 168: 941-956.
- Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS. 2000.** Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat.Med.* 6: 159-163.
- Matthias K, Kirchhoff F, Seifert G, Huttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhäuser C. 2003.** Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J.Neurosci.* 23: 1750-1758.
- Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, Kurachi Y, Ottersen OP. 1999.** Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia.* 26: 47-54.
- Nagelhus EA, Mathiisen TM, Ottersen OP. 2004.** Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience.* 129: 905-913.
- Nagy JI, Dudek FE, Rash JE. 2004.** Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 47: 191-215.
- Nagy JI, Li X, Rempel J, Stelmack G, Patel D, Staines WA, Yasumura T, Rash JE. 2001.** Connexin26 in adult rodent central nervous system: demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43. *J.Comp Neurol.* 441: 302-323.
- Nagy JI, Patel D, Ochalski PA, Stelmack GL. 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.
- Nagy JI, Rash JE. 2003.** Astrocyte and oligodendrocyte connexins of the glial syncytium in relation to astrocyte anatomical domains and spatial buffering. *Cell Commun.Adhes.* 10: 401-406.
- Neely JD, Christensen BM, Nielsen S, Agre P. 1999.** Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry.* 38: 11156-11163.
- Neusch C, Papadopoulos N, Muller M, Maletzki I, Winter SM, Hirrlinger J, Handschuh M, Bahr M, Richter DW, Kirchhoff F, Hulsmann S. 2006.** Lack of the Kir4.1 channel subunit abolishes K<sup>+</sup> buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K<sup>+</sup> regulation. *J.Neurophysiol.* 95: 1843-1852.
- Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester HA, Kofuji P. 2001.** Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J.Neurosci.* 21: 5429-5438.
-

- 
- Newman EA. 1993.** Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Muller) cells. *J.Neurosci.* 13: 3333-3345.
- Newman EA, Frambach DA, Odette LL. 1984.** Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K<sup>+</sup> siphoning. *Science.* 225: 1174-1175.
- Nicchia GP, Srinivas M, Li W, Brosnan CF, Frigeri A, Spray DC. 2005.** New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: cell cytoskeleton and functional relationship with connexin43. *FASEB J.* 19: 1674-1676.
- Nicholson C, Sykova E. 1998.** Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci.* 21: 207-215.
- Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. 1997.** Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J.Neurosci.* 17: 171-180.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Kerr JN, Helmchen F. 2004.** Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat.Methods.* 1: 31-37.
- Nishiyama A, Dahlin KJ, Stallcup WB. 1991.** The expression of NG2 proteoglycan in the developing rat limb. *Development.* 111: 933-944.
- Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X. 2009.** Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat.Rev.Neurosci.* 10: 9-22.
- Numberger M, Draguhn A. 1996.** Patch-Clamp-Technik. *Spektrum Akademischer Verlag.*
- Oliet SH, Piet R, Poulain DA, Theodosis DT. 2004.** Glial modulation of synaptic transmission: Insights from the supraoptic nucleus of the hypothalamus. *Glia* 47: 258-267.
- Orkand RK. 1986.** Glial-interstitial fluid exchange. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 481:269-72.: 269-272.
- Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW. 1966.** Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J.Neurophysiol.* 29: 788-806.
- Oshio K, Binder DK, Yang B, Schecter S, Verkman AS, Manley GT. 2004.** Expression of aquaporin water channels in mouse spinal cord. *Neuroscience.* 127: 685-693.
- Päsler D, Gabriel S, Heinemann U. 2007.** Two-pore-domain potassium channels contribute to neuronal potassium release and glial potassium buffering in the rat hippocampus. *Brain Res.* 1173: 14-26.
- Paxinos G, Franklin KBJ. 2001.** The mouse brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press.*
- Peters A. 2004.** A fourth type of neuroglial cell in the adult central nervous system. *J.Neurocytol.* 33: 345-357.
- Polito A, Reynolds R. 2005.** NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J.Anat.* 207: 707-716.



- 
- Poopalasundaram S, Knott C, Shamotienko OG, Foran PG, Dolly JO, Ghiani CA, Gallo V, Wilkin GP. 2000.** Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, in adult rat CNS. *Glia* 30: 362-372.
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. 1992.** Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*. 256: 385-387.
- Ransom CB, Ransom BR, Sontheimer H. 2000.** Activity-dependent extracellular K<sup>+</sup> accumulation in rat optic nerve: the role of glial and axonal Na<sup>+</sup> pumps. *J.Physiol.* 522 Pt 3:427-42.: 427-442.
- Rash JE, Yasumura T, Hudson CS, Agre P, Nielsen S. 1998.** Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95: 11981-11986.
- Ruiz-Ederra J, Zhang H, Verkman AS. 2007.** Evidence against functional interaction between aquaporin-4 water channels and Kir4.1 potassium channels in retinal Muller cells. *J.Biol.Chem.* 282: 21866-21872.
- Ruppersberg JP. 2000.** Intracellular regulation of inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Pflugers Arch.* 441: 1-11.
- Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Krishna S, Bell BA. 2002.** Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 72: 262-265.
- Saadoun S, Tait MJ, Reza A, Davies DC, Bell BA, Verkman AS, Papadopoulos MC. 2009.** AQP4 gene deletion in mice does not alter blood-brain barrier integrity or brain morphology. *Neuroscience.* 161: 764-772.
- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. 2003.** Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev.* 83: 1359-1400.
- Samoilova M, Wentlandt K, Adamchik Y, Velumian AA, Carlen PL. 2008.** Connexin 43 mimetic peptides inhibit spontaneous epileptiform activity in organotypic hippocampal slice cultures. *Exp.Neurol.* 210: 762-775.
- Santhakumar V, Voipio J, Kaila K, Soltesz I. 2003.** Post-traumatic hyperexcitability is not caused by impaired buffering of extracellular potassium. *J.Neurosci.* 23: 5865-5876.
- Seifert G, Huttmann K, Binder DK, Hartmann C, Wyczynski A, Neusch C, Steinhäuser C. 2009.** Analysis of astroglial K<sup>+</sup> channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4.1 subunit. *J.Neurosci.* 29: 7474-7488.
- Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C. 2006.** Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat.Rev.Neurosci.* 7: 194-206.
- Sik A, Penttonen M, Ylinen A, Buzsaki G. 1995.** Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *J.Neurosci.* 15: 6651-6665.
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010.** Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119: 7-35.
-

- 
- Söhl G, Willecke K. 2003.** An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun. Adhes.* 10: 173-180.
- Stallcup WB. 1981.** The NG2 antigen, a putative lineage marker: immunofluorescent localization in primary cultures of rat brain. *Dev. Biol.* 83: 154-165.
- Steinhäuser C, Kressin K, Kuprijanova E, Weber M, Seifert G. 1994.** Properties of voltage-activated sodium and potassium currents in mouse hippocampal glial cells in situ and after acute isolation from tissue slices. *Pflugers Arch.* 428: 610-620.
- Strohschein S, Hüttmann K, Gabriel S, Binder DK, Heinemann U, Steinhäuser C. 2011.** Impact of aquaporin-4 channels on K<sup>+</sup> buffering and gap junction coupling in the hippocampus. *Glia* 59: 973-980.
- Teubner B, Michel V, Pesch J, Lautermann J, Cohen-Salmon M, Sohl G, Jahnke K, Winterhager E, Herberhold C, Hardelin JP, Petit C, Willecke K. 2003.** Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum. Mol. Genet.* 12: 13-21.
- Theis M, Jauch R, Zhuo L, Speidel D, Wallraff A, Doring B, Frisch C, Sohl G, Teubner B, Euwens C, Huston J, Steinhäuser C, Messing A, Heinemann U, Willecke K. 2003.** Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J. Neurosci.* 23: 766-776.
- Theis M, Sohl G, Eiberger J, Willecke K. 2005.** Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci.* 28: 188-195.
- Trosiner NA. 2003.** Elektrophysiologische und mikrofluorimetrische Charakterisierung von Neurotransmitter- und K<sup>+</sup>-induzierten Volumenänderungen bei Retzius- und P-Neuronen im Blutegel-Zentralnervensystem. *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.*
- Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H. 1998.** Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev.* 78: 99-141.
- Verkhratsky A, Steinhäuser C. 2000.** Ion channels in glial cells. *Brain Res. Rev.* 32: 380-412.
- Verkman AS, Binder DK, Bloch O, Auguste K, Papadopoulos MC. 2006.** Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758: 1085-1093.
- Volterra A, Steinhäuser C. 2004.** Glial modulation of synaptic transmission in the hippocampus. *Glia.* 47: 249-257.
- Wallraff A, Kohling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhäuser C. 2006.** The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J. Neurosci.* 26: 5438-5447.
- Wallraff A, Odermatt B, Willecke K, Steinhäuser C. 2004.** Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia.* 48: 36-43.

**Walz W. 2000.** Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem.Int.* 36: 291-300.

**Walz W. 2002.** Chloride/anion channels in glial cell membranes. *Glia* 40: 1-10.

**Wentlandt K, Samoiloa M, Carlen PL, El BH. 2006.** General anesthetics inhibit gap junction communication in cultured organotypic hippocampal slices. *Anesth.Analg.* 102: 1692-1698.

**Zelenina M. 2010.** Regulation of brain aquaporins. *Neurochem.Int.* 57: 468-488.

**Zelenina M, Zelenin S, Aperia A. 2005.** Water channels (aquaporins) and their role for postnatal adaptation. *Pediatr.Res.* 57: 47R-53R.

**Zhang H, Verkman AS. 2008.** Aquaporin-4 independent Kir4.1 K<sup>+</sup> channel function in brain glial cells. *Mol.Cell Neurosci.* 37: 1-10.

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

**Zhou M, Xu G, Xie M, Zhang X, Schools GP, Ma L, Kimelberg HK, Chen H. 2009.** TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices. *J.Neurosci.* 29: 8551-8564.

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Susan Strohschein

Rheinische Friedrich - Wilhelms - Universität Bonn

Institut für Zelluläre Neurowissenschaften

Universitätsklinikum Bonn, 53105 Bonn

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

Ort, Datum

Unterschrift