

Entkopplung von Astrozyten als Ursache von Temporallappenepilepsie

Funktionelle Analysen im Tiermodell

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von
Alexander Dupper

aus
Tallin

Bonn, Januar 2014

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

Erstgutachter:

Prof. Dr. Christian Steinhäuser

Institut für Zelluläre Neurowissenschaften

Universitätsklinikum Bonn

Zweigutachter:

Prof. Dr. med. Klaus Mohr

Pharmazeutisches Institut

Universität Bonn

Tag der Promotion:

24.06.2014

Erscheinungsjahr:

2014

Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Universität als Dissertation eingereicht wurde.

Bonn, Januar 2014

.....

Alexander Dupper

Danksagung

Ungeachtet der oben aufgeführten eidesstattlichen Erklärung ist die vorliegende wissenschaftliche Arbeit nicht ausschließlich das Werk einer einzelnen Person, deshalb möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mir die Erstellung dieser Dissertation ermöglichen haben.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Steinhäuser für das Überlassen eines interessanten Themas und für die freundliche Unterstützung danken. Er hat mir stets die Möglichkeit gegeben, meine eigenen Ideen zu verfolgen und stand mir mit seinem wertvollen akademischen Rat zur Seite.

Ich danke Herrn Professor Klaus Mohr für die Betreuung als Cosupervisor während meiner Ausbildung bei der BiotechPahrma und für seine Bereitschaft als Zweitgutachter zu fungieren. Ebenso geht mein Dank an die Professoren Andreas Zimmer und Karl Schilling, die sich bereit erklärt haben, das Koreferat zu übernehmen.

Meinen ehemaligen Kollegen am Institut für Neurowissenschaften der Universität Bonn danke ich dafür, dass sie stets Ansprechpartner waren und mein Forschungsprojekt durch ihre Ideen, Anregungen und konstruktive Kritik bereicherten. Aber viel wichtiger war die angenehme Arbeitsatmosphäre, geprägt von Hilfsbereitschaft und Humor. Eine besondere Rolle fiel dabei auf meinen Betreuer Dr. Peter Bedner, dem ich an dieser Stelle herzlich danken möchte.

Eine herausragende Stellung in jeglicher Hinsicht nehmen meine Familie und besonders meine Frau Katharina ein, ohne ihre liebevolle Fürsorge wäre diese Arbeit nicht fertig geworden. Sie haben mir geholfen, die Anstrengungen der letzten Jahre zu überstehen und mussten auf so manchen gemeinsamen Abend verzichten.

*Man soll nicht glauben, etwas machen zu müssen,
sondern man soll etwas machen, woran man glaubt.*

Prof. Dr. med. Gerhard Uhlenbruck (*1929)

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
TABELLENVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Gliazellen.....	1
1.1.1 Oligodendrozyten.....	1
1.1.2 Mikroglia	2
1.1.3 NG2-Zellen	3
1.1.4 Astrozyten.....	3
1.2 Das Interleukin-1-System	8
1.2.1 Interleukin-1 α	9
1.2.2 Interleukin-1 β	10
1.2.3 Interleukin-1Ra	10
1.2.4 Interleukin-1-Rezeptoren	12
1.2.5 Signalkaskade von Interleukin-1	12
1.3 Tumor-Nekrosis-Faktor-alpha.....	13
1.4 Lipopolysaccharid	15
1.5 Levetiracetam	16
1.6 Dibutyryl cAMP / Propentofyllin.....	19
1.7 Fieberkrämpfe	20
1.8 Temporallappenepilepsie.....	21
1.9 Zielsetzung dieser Arbeit	22
2 VERSUCHSTIERE, MATERIALIEN UND METHODEN	24
2.1 Versuchstiere	24

2.2	Materialien	25
2.2.1	Chemikalien.....	25
2.2.2	Lösungen.....	26
2.2.3	Geräte und Materialien	33
2.3	Methoden	36
2.3.1	Präparation von Hirngewebe der Maus	36
2.3.2	Astrozytenmarkierung mit Sulforhodamin 101	36
2.3.3	Inkubation der akuten Hirnschnitte mit Zytokinen und Chemikalien	37
2.3.4	Intraperitoneale Injektionen.....	37
2.3.5	Elektrophysiologische Untersuchungen	38
2.3.6	Biozytinvisualisierung	39
2.3.7	Kardiale Perfusion und Fixierung.....	40
2.3.8	Anfertigung der Kryoschnitte	41
2.3.9	Iba I -Färbungen.....	41
2.3.10	Gesamtprotein-Extraktion aus Geweben	41
2.3.11	SDS-Page und Western Blot.....	42
2.3.12	Mikroskopische Aufnahmen.....	43
2.3.13	Körpertemperaturmessungen	43
2.3.14	Hyperthermie-induzierte Fieberkrämpfe	44
2.3.15	Implantation der EEG-Elektroden und Video-Monitoring.....	45
2.3.16	Datenanalyse	46
3	ERGEBNISSE	47
3.1	Funktionelle interastrozytäre Kopplung unter entzündlichen Bedingungen	47
3.1.1	Einfluss der proinflammatorischen Zytokine und LPS auf die astrozytäre Kopplung <i>in situ</i>	47
3.1.2	Einfluss von Entzündungsprozessen auf das astrozytäre Synzytium <i>in vivo</i> ..	56
3.1.3	Einfluss von Entzündung auf die astrozytäre Proteinexpression <i>in vivo</i>	66

3.2	Hyperthermie-induzierte Krampfanfälle in Mäusen	76
3.2.1	Allgemeine HT-Parameter.....	76
3.2.2	Verhaltensanalyse der Tiere während der Hyperthermie.....	79
3.2.3	Funktionelle Kopplung der Astrozyten nach der Hyperthermie.....	79
3.2.4	Langzeiteffekte der Hyperthermie.....	81
3.3	Altersbedingte Unterschiede in der astrozytären Kopplung	84
4	DISKUSSION	85
4.1	Entkopplung der Astrozyten unter entzündlichen Bedingungen	85
4.2	Mechanismus der Entkopplung der Astrozyten	90
4.2.1	Reduzierte Proteinexpression.....	90
4.2.2	Verändertes Phosphorylierungsmuster.....	94
4.2.3	Verhinderung der Entkopplung mit Hilfe von LEV und db-cAMP.....	95
4.3	GS-Expression	96
4.4	Expression von TAK-1 und p38	97
4.5	Hyperthermie-induzierte Fieberkrämpfe	98
4.5.1	Verhaltensanalyse.....	98
4.6	Altersabhängige astrozytäre Kopplung im Hippokampus	99
5	ZUSAMMENFASSUNG	101
6	SUMMARY	103
7	LITERATUR	105

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Im Vergleich zu den murinen Astrozyten, sind die humanen viel größer und haben stärker verzweigte Fortsätze.	5
Abbildung 2: Strategien zur Hemmung der TNF α -Effekte.....	15
Abbildung 4: Strommuster eines Astrozyten.	48
Abbildung 5: Proinflammatorische Zytokine und LPS reduzieren die Gap Junction-vermittelte Tracerdiffusion <i>in situ</i>	51
Abbildung 6: Wirkung der proinflammatorischer Zytokine auf die astrozytäre Kopplung <i>in situ</i>	52
Abbildung 7: Effekt von LPS auf die astrozytäre Kopplung in TLR4 KO Mäusen.	53
Abbildung 8: db-cAMP verhindert die Zytokine-induzierte Reduktion der funktionellen Kopplung <i>in situ</i>	54
Abbildung 9: Wiederherstellung der Kopplung mit db-cAMP <i>in situ</i>	54
Abbildung 10: XPro 1595 unterbindet die inhibitorische Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen auf die Gap Junction-vermittelte Kopplung.....	55
Abbildung 11: Verlauf der Körpertemperatur vor und nach einer einmaligen i.p. Injektion von LPS (5 mg/kg Gewicht).....	58
Abbildung 12: LPS-Injektion aktiviert die Mikroglia im Hippokampus.	60
Abbildung 13: Quantifizierung der Iba I Färbung im Hippokampus vor und nach LPS-Injektion.	61
Abbildung 14: Funktionelle Kopplung der Astrozyten nach LPS-Injektion.....	63
Abbildung 15: Levetiracetam stellt die funktionelle Kopplung <i>in vivo</i> wieder her.	65
Abbildung 16: Western Blot-Analysen zum Einfluss von LPS-induzierter Entzündung auf die Cx43-Expression im Hippokampus.	68
Abbildung 17: Western Blot-Analysen zum Einfluss von LPS-induzierter Entzündung auf die Cx30-Expression im Hippokampus.	70

Abbildung 18: Western Blot-Analysen zum Einfluss von LPS-induzierter Entzündung auf die TAK1-Expression im Hippokampus.	72
Abbildung 19: Western Blot-Analysen zum Einfluss von LPS-induzierter Entzündung auf die p38-Expression im Hippokampus.	74
Abbildung 20: Expression von GS bleibt unverändert nach Applikation von LPS und LPS/LEV.....	75
Abbildung 21: Typischer Temperaturverlauf einer HT-Behandlung.	78
Abbildung 22: Gap Junction-vermittelte Kopplung im Hippokampus 1 Tag nach HT.	80
Abbildung 23: Gap Junction-vermittelte Kommunikation im Hippokampus der hGFAP-EGFP-Mäuse 5 Tage nach einer 30-minütigen HT-Behandlung.	81
Abbildung 24: Spontane Anfälle nach HT in hGFAP-EGFP-Mäusen.	82
Abbildung 25: Spontaner Anfall nach der HT in einer CSS2-B16-A/J-Maus.....	83
Abbildung 26: Altersabhängige Kopplung in hGFAP-EGFP Mäusen.	84

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primär-Antikörper.	32
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Sekundär-Antikörper.	33
Tabelle 3: Zusammenfassung der Mittelwerte der Zellparameter (V_R , R_S und R_M) bei den Inkubationsexperimenten.	50
Tabelle 4: Zusammenfassung der Mittelwerte der Zellparameter (V_R , R_S und R_M) bei den <i>in vivo</i> Experimenten.	62
Tabelle 5: Vergleich der HT-Parameter zwischen unterschiedlichen Mausstämmen.	77

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[Ca²⁺]_i	Intrazelluläre Kalziumkonzentration
ACSF	Artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
ADE	Akute disseminierte Enzephalomyelitis
ADEM	Akute disseminierte Enzephalomyelitis
AED	Antiepileptic-drug
Ala	Alanin
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
ANOVA	Analysis of variance
APS	Ammoniumpersulfat
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumin
CA	Cornu ammonis/Ammonshorn; Hippokampusregion
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CK1	Casein Kinase 1
CSS2	Chromosome substitution strain 2
Cx	Connexin
DAMP	Danger/damage-associated molecular pattern molecules
db-cAMP	Dibutyryl-cAMP
DIC	Differentieller Interferenzkontrast
DNA	Deoxyribonucleic acid
E. coli.	Escherichia coli
EAAT1	Excitatory amino acid transporter 1
EAAT2	Excitatory amino acid transporter 2
EEG	Elektroenzephalogramm
EGFP	Green fluorescent protein
ER	Endoplasmatischen Reticulum
ERK1/2	Extracellular-signal regulated kinases 1/2
FK	Fieberkrämpfe
FVB	Friend virus B-Type
GABA	γ-Aminobuttersäure
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GS	Glutaminsynthetase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hGFAP	Human GFAP-Promoter
HK	Halbkanal
hrIL-1β	Human recombinant IL-1β
HRP	Horseradish peroxidase
HT	Hyperthermie
i.c.v.	Intra-cerebro-ventrikular
i.p.	Intraperitoneal
ICE	IL-1β converting enzyme
icIL-1Ra	Intracellular IL-1Ra
IFN-γ	Interferon-gamma
IHC	Immunhistochemie

Abkürzungsverzeichnis

IKK	I- κ B Kinase Komplex
IL	Interleukin
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
IL-1RAcP	IL-1 Rezeptor akzessorisches Protein
IL-1RI	Interleukin-1Rezeptor I
IL-1RII	Interleukin-1Rezeptor II
IL-1α	Interleukin-1 α
IL-1β	Interleukin-1 β
IL-3	Interleukin-3
IL-4	Interleukin-4
IP₃	Inositoltriphosphat
IR	Infrarot
IRAK	IL-1RI-assozierte Kinase
IκB	Inhibitor of κ B
JNK1	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
Kir	Kalium inward rectifier
LEV	Levetiracetam
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MG	Mikroglia
MGI	Mouse genome informatics
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
mRNA	Messenger ribonucleinic acid
mrTNFα	Mouse recombinant TNF α
MS	Multiple Sklerose
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
MΩ	MegaOhm
NF-κB	Nuklear factor kappa B
NG2	Nerve/glial antigen 2
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NR2B	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor Typ 2B
OPC	Oligodendrocytes precursor cells
p34/Cdc2	Cell division cycle protein 2 homolog
PAMP	Pathogen-associated molecules pattern
Panx	Pannexin
PCR	Polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterase
PDS	Paroxysmal depolarizing shift
PI3K	Phosphoinositol 3 Kinase
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PPT	Propentofyllin
P-TAK-1	Phosphorylated transforming growth factor β -activated kinase 1

PVDF	Polyvinylidenfluorid
R_M	Membranwiderstand
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RPM	Rotationen pro Minute
R_S	Serienwiderstand
RT	Raumtemperatur
SD	Standartabweichung
SDS-Page	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamidgel
SE	Status epilepticus
sIL-1Ra	Secreted IL-1Ra
sIL-1RI	Soluble Interleukin-1Rezeptor I
sIL-1RII	Soluble Interleukin-1Rezeptor II
solTNF	Soluble TNF
SR101	Sulforhodamin 101
Src	Akronym aus <u>c</u> ellular und <u>s</u> arcoma
SV2A	Synaptic vesicle glucoprotein 2A
TACE	TNF α converting enzyme
TAK-1	Transforming growth factor β -activated kinase 1
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGFβ	Transforming growth factor- β
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TLE	Temporallappen-Epilepsie
TLR4	Toll-like receptor 4
TNFR1	TNF α Rezeptor 1
TNFR2	TNF α Rezeptor 2
TNFR6	TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
ü.N.	Über Nacht
V_h	Haltepotential
V_R	Ruhemembranpotential
WB	Western Blot
XPro1595	Dominant negativer Inibitor von TNF α
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Gliazellen

Im zentralen Nervensystem sind die Neurone für die schnelle und genaue Übertragung von Signalen und Reizen über lange Strecken verantwortlich. Sie können jedoch ihre Funktion ohne die Unterstützung von Gliazellen nicht erfüllen. Der Begriff "Glia" wurde von Rudolf Virchow (1821-1902) Mitte des 19. Jahrhunderts eingeführt und bedeutet übersetzt aus dem Griechischen so viel wie "Leim" oder "Kitt". Dem lag die Überzeugung zugrunde, dass diese Zellen ausschließlich für das Stützen und Halten der Neurone zuständig sind. Heute weiß man, dass die Gliazellen wesentlich mehr zu der neuronalen Physiologie beitragen als zunächst gedacht. So wäre zum Beispiel eine schnelle Informationsweiterleitung ohne die Oligodendrozyten undenkbar, denn sie bilden die Myelinscheide und isolieren somit die Axone elektrisch. Für den Schutz gegen Infektionen sind die Mikroglia (MG) zuständig. So hat jeder Zelltyp eine wichtige Funktion im Gehirn und ist somit für die Homöostase unentbehrlich.

Grundsätzlich lassen sich die Gliazellen in Makroglia (Astrozyten, Oligodendrozyten und NG2-Zellen) und MG unterteilen.

1.1.1 Oligodendrozyten

Wie bereits oben erwähnt bilden die Oligodendrozyten eine Isolierschicht um die Axone der Neurone von Wirbeltieren, die vielschichtige und lipidreiche Myelinscheide (Butt, 2005). Diese Isolierung ist durch Ranvier'sche-Schnürringe unterbrochen. Dies dient in erster Linie der Beschleunigung der Signalweiterleitung, denn die Aktionspotentiale können nur an den Ranvier-Schnürringen entstehen ("saltatorische Erregungsleitung") (Huxley and Stampfli, 1949). Die Myelinschicht dient wahrscheinlich nicht nur der elektrischen Isolation, sondern hat auch eine neuroprotektive und neurotrophe Wirkung (Nave, 2010). Eine Demyelinisierung und somit eine gestörte Signalweiterleitung findet während einiger neurodegenerativer Erkrankungen wie Multiple Sklerose (MS) oder einer akuten disseminierten Enzephalomyelitis (ADEM oder ADE) statt. Dabei spielen das Immunsystem und die Überproduktion von Zytokinen wie Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) und Interferon eine zentrale Rolle (Ledeen and Chakraborty, 1998).

1.1.2 Mikroglia

Mikroglia repräsentieren das Immunsystem des Gehirns (Kreutzberg, 1996). Es sind die einzigen Zellen des Gehirns, die nicht vom Neuroektoderm abstammen. Es handelt sich um phagozytierende Abkömmlinge des Mesoderms, die während der Embryonalentwicklung ins Gehirn einwandern (Vilhardt, 2005). Eine charakteristische Eigenschaft der MG ist ihre Aktivierung zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach einer Verletzung oder Infektion. Dabei reagieren die Zellen nicht nur auf grobe Verletzungen der strukturellen Integrität, sondern auch auf subtilere Veränderungen in der Umgebung, wie Abweichungen im Ionengleichgewicht (Kreutzberg, 1996). Im ruhenden Zustand haben die MG eine verästelte Morphologie, ein kleines Zellsoma mit feinen Fortsätzen. Mithilfe dieser sich aktiv bewegenden Fortsätze überwachen sie ihre Umgebung ohne die neuronale Integrität zu stören. Die Oberfläche der Fortsätze ist mit zahlreichen Rezeptoren für Chemokine, Zytokine und Rezeptoren aus der Komplementfamilie besetzt (Kettenmann et al., 2011). Pathologische Veränderungen des Gewebes haben zur Folge, dass die Mikrogliazellen sich schnell in einen aktivierten Typ umwandeln. Dieser ist dadurch gekennzeichnet, dass unterschiedliche proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden. Außerdem findet eine Proliferation und morphologische Umwandlung der Zellen zu einem abgerundeten, phagozytierenden Typ statt (Banati et al., 1993). Es darf an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass die Mikrogliazellen einen Informationsaustausch mit Neuronen betreiben. Einerseits findet man auf der Oberfläche von Nervenzellen Rezeptoren für Zytokine wie z.B. Interleukin-1 β (IL1 β), die einen Einfluss auf die neuronale Aktivität ausüben (Viviani et al., 2003). Andererseits exprimieren die MG Rezeptoren für unterschiedliche Neurotransmitter, die je nach Situation entzündliche oder neuroprotektive Prozesse auslösen können (Pocock and Kettenmann, 2007). Interessanterweise variiert die Morphologie der MG und deren Dichte in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation im Gehirn (Lawson et al., 1990). Die Mikroglia-dichte im Hippokampus, vor allem im Gyrus dentatus, gehört dabei zu den höchsten im Gehirn. Zu den Aufgaben der MG gehören neben dem Unschädlichmachen der Eindringlinge, dem Entfernen der Zelltrümmer auch der Abbau von Synapsen, zum Beispiel während der postnatalen Entwicklung (Tremblay et al., 2011).

1.1.3 NG2-Zellen

Die Bezeichnung NG2 leitet sich von **n**erve/**g**lial antigen **2** ab, bei dem es sich um ein auf der Oberfläche dieser Zellen exprimiertes Proteoglykan handelt. Ursprünglich wurden NG2-positive Zellen ausschließlich als Vorläufer von Oligodendrozyten (oligodendrocytes precursor cells, OPCs) angesehen (Polito and Reynolds, 2005). Es häufen sich jedoch die Hinweise, dass es sich um einen eigenständigen glialen Zelltyp handelt (Nishiyama et al., 2009; Peters, 2004). Im Jahr 2000 ist es Bergles und Kollegen gelungen, die Existenz funktionierender Synapsen zwischen Neuronen und Gliazellen im Hippokampus nachzuweisen (Bergles et al., 2000). Die postsynaptischen Gliazellen wurden als NG2-positive OPCs identifiziert. Zu den weiteren Eigenschaften dieser Zellen zählten die Expression von AMPA- und GABA_A-Rezeptoren, fehlende Gap Junction-vermittelte Kopplung und die Abwesenheit von Glutamattransportern.

1.1.4 Astrozyten

Diese Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit der Untersuchung der Astrozyten im Hippokampus. Im menschlichen Gehirn sind die Astrozyten der häufigste Zelltyp, sie machen rund 80 % aller Zellen aus (Kettenmann and Ransom, 1995). Da die Astrozyten über Connexin (Cx-) 43 und Cx 30 miteinander gekoppelt sind, bilden sie das größte Netzwerk im Gehirn. Zu den Hauptaufgaben der Astrozyten gehören die Versorgung der Neurone mit Nährstoffen, das Entfernen und Recycling von Glutamat von den Synapsen und die Pufferung extrazellulärer K⁺-Ionen. Die funktionelle Kopplung spielt dabei eine Schlüsselrolle. Die Gap Junction-Kanäle sind permeabel für Substanzen kleiner als 1 kDa- und werden durch eine Reihe von Faktoren (pH-Wert, Ca₂₊-Konzentration, interzelluläre Spannungsdifferenzen etc.) reguliert (Meme et al., 2004b; Meme et al., 2006; Rouach et al., 2002).

Der Umstand, dass das Verhältnis zwischen Gliazellen und Neuronen, Gliaindex genannt, mit dem Entwicklungsgrad des Lebewesens steigt ist das erste Indiz, dass Astrozyten an der Informationsverarbeitung beteiligt sind. Der Name Astrozyt leitet sich von der typischen sternförmigen Morphologie der Zellen ab. Es wird unterschieden zwischen den protoplasmischen Astrozyten (auch Kurzstrahler) vor allem in der Grauen Substanz und der Faserglia (auch Langstrahler), die vor allem in der Weißen Substanz anzutreffen sind. Die Faserglia haben eine längliche Form und sind oft parallel zu den Axonen ausgerichtet. Die

protoplasmischen Astrozyten zeichnen sich dagegen durch eine kompaktere Form aus, verursacht durch ein sehr dichtes Netz von seitlichen Abzweigungen, die den dickeren primären Fortsätzen entspringen. Diese Fortsätze umschließen oft die synaptischen Verbindungen. Man spricht in diesen Zusammenhang auch von den dreiteiligen Synapsen (Nedergaard and Verkhratsky, 2012). Die Astrozyten nehmen dabei nicht nur K^+ -Ionen und Glutamat auf sondern beteiligen sich aktiv an der Informationsverarbeitung. Sie können sowohl Signale von den Neuronen empfangen und darauf reagieren, als auch selbst Neurotransmitter freisetzen und die neuronale Aktivität beeinflussen (Haydon, 2001; Volterra and Meldolesi, 2005). Das Hauptkomponente der Intermediärfilamente aller Astrozyten ist das fibrilläre, saure Gliaprotein (glial fibrillary acidic protein, GFAP), welches zelltypspezifisch von adulten Astrozyten exprimiert wird (Brenner et al., 1994). Abbildung 1 zeigt GFAP-Färbungen von je einem humanen (B) und murinen (A) Astrozyten. Untersuchungen haben ergeben, dass dieser Zelltyp beim Menschen ca. 2,5 mal größer ist und ein um Faktor 10 dichteres Netz an Hauptfortsätzen besitzen (Oberheim et al., 2009). Die feinen Fortsätze sind jedoch frei von GFAP und lassen sich zum Beispiel durch Verwendung lipophiler Carbocyanine-Farbstoffe (diOlistic labeling) sichtbar machen. Eine solche Färbung eines humanen Astrozyten ist in Abbildung 1 C zu sehen. Auffällig ist das extrem dichte Netz aus feinen Fortsätzen, die den ganzen Raum auszufüllen scheinen und diese Astrozyten als protoplasmisch definieren. Mit Hilfe unterschiedlicher Färbungen ist festgestellt worden, dass protoplasmische Astrozyten in Domänen organisiert sind (Bushong et al., 2002; Ogata and Kosaka, 2002). Dabei beansprucht eine Zelle einen polyedrisch geformten Raum, so dass alle Synapsen und Blutgefäße in diesem Raum mit nur einem Astrozyten in Kontakt stehen. So kann ein Astrozyt mehrere Tausend Synapsen kontaktieren. Nur an den äußeren Grenzen überlappen die Domänen von benachbarten Zellen geringfügig. Dies konnte sowohl für murine als auch humane Astrozyten im Kortex und im Hippokampus gezeigt werden (Oberheim et al., 2006). Es gibt jedoch auch Belege, dass die Größe der Astrozyten und deren Überlappungsgrad nicht konstant sind, sondern sich im Laufe des Lebens ändern. So konnte am Neokortex und Hippokampus von Mäusen gezeigt werden, dass die Astrozyten in alten Tieren (21 Monate alt) mehr als doppelt so groß sind verglichen mit den in adulten Tieren (5 Monate alt). Der Überlappungsgrad ist ebenfalls um den Faktor 2 vergrößert (Grosche et al., 2013).

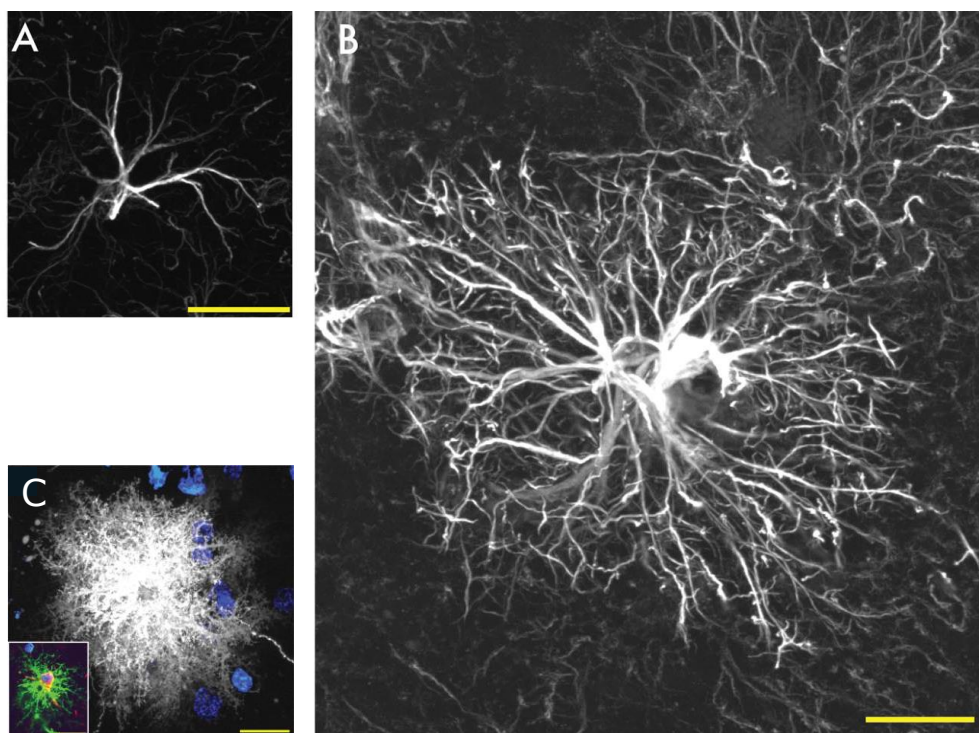


Abbildung 1: Im Vergleich zu den murinen Astrozyten, sind die humanen viel größer und haben stärker verzweigte Fortsätze. A: Ein typischer protoplasmischer muriner Astrozyt, dargestellt mittels GFAP-Färbung. **B:** Ein typischer protoplasmischer humaner Astrozyt im gleichen Maßstab (GFAP-Färbung). **C:** Humaner Astrozyt gefärbt mit diOlistic labeling. Inset: Humaner protoplastischer Astrozyt gefärbt mit diOlistic labeling und mit Antikörpern gegen GFAP. Weiß: diolistische Färbung mit Dil; Blau: diolistische Färbung mit Sytox. Maßbalken 20 μm (mod. nach (Oberheim et al., 2009)).

An den Enden der Fortsätze, die Kontakt zu den Blutgefäßen haben, bilden Astrozyten Endfüße aus. Diese Struktur kann als ein spezielles Kompartiment angesehen werden, mit einer erhöhten Expression bestimmter Proteine wie zum Beispiel Aquaporin 4 (AQP4), Cx43 und Kir-4.1. Die Astrozyten stellen eine Verbindung zwischen den Kapillaren und den Neuronen her (Nagelhus et al., 2004; Simard and Nedergaard, 2004) und spielen somit eine zentrale Rolle in der neurometabolischen Kopplung. Bei einer erhöhten neuronalen Aktivität werden Kalziumsignale in Astrozyten freigesetzt. Dies führt zur Freisetzung von vasoaktiven Substanzen, die den lokalen Blutfluss regeln. Dadurch kann die Versorgung der Neurone mit den Metaboliten an die tatsächliche neuronale Aktivität angepasst werden. Eine weitere Besonderheit ist der Umstand, dass die funktionelle Kopplung unter Astrozyten an die neuronale Aktivität angepasst wird. Eine erhöhte neuronale Aktivität bedarf natürlich mehr

Energie und löst eine Steigerung der Gap Junction-vermittelten Kopplung aus (Escartin and Rouach, 2013). Andererseits zeigen Untersuchungen der Hippokampi von Epilepsiepatienten, dass die Astrozyten im letzten chronischen Stadium der Erkrankung entkoppelt sind. Experimentelle Tiermodelle liefern ein ähnliches Ergebnis (Bedner et al., submitted). Das Transportieren der Stoffwechselfsubstrate wie Glucose, Lactat und Aminosäuren zu den Neuronen dient nicht nur der Energieversorgung, sondern auch der Synthese der Neurotransmitter wie GABA.

Nachdem die Neurone diese Neurotransmitter an den Synapsen freigesetzt haben, werden diese von den Astrozyten aus dem Extrazellulärraum wieder aufgenommen. Eine besondere Rolle kommt hierbei den Glutamattransportern zu, weil das Glutamat potentiell neurotoxisch ist und hauptsächlich von den Astrozyten aufgenommen wird. Diese Transporter sind sehr effektiv und halten die extrazelluläre Glutamatkonzentration im nM-Bereich (Danbolt, 2001). Eine Runterregulation der astrozytären Glutamattransporter führt zu einer Akkumulation des Transmitters im Extrazellulärraum und folglich zu einer andauernden Erregung der Neurone, was letztendlich zu deren Tod führen kann (Herman and Jahr, 2007; Jabaudon et al., 1999; Sah et al., 1989). So ist es nicht verwunderlich, dass Fehlfunktionen der Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2 bei pathologischen Veränderungen einschließlich Epilepsie beobachtet wurden (Seifert et al., 2006). Ein weiterer Mechanismus, der zur Anhäufung von Glutamat im Extrazellulärraum führt und wahrscheinlich zu der Entstehung der Epilepsie beiträgt, ist der Verlust der Aktivität des Enzyms Glutaminsynthetase (GS) (Eid et al., 2008; van der Hel et al., 2005). Dieses Enzym ist in Astrozyten aktiv und wandelt das aufgenommene Glutamat zu Glutamin um, das wieder über den Extrazellulärraum an die Neurone abgegeben wird.

Bei neuronaler Aktivität werden K^+ -Ionen freigesetzt. Diese Ionen müssen schnell wieder entfernt werden, sonst führen sie zu einer anhaltenden Depolarisation der Membran und beeinflussen somit die Ionenkanäle, Rezeptoren und Transporter. Während einer pathologisch verstärkten neuronalen Aktivität kann die Konzentration von K^+ -Ionen außerhalb der Zellen von 3 mM auf 10-12 mM steigen (Heinemann and Lux, 1977). Die Aktivität der in den Zellen vorhandenen Na^+/K^+ -Pumpen reicht nicht aus, um so viel K^+ -Ionen schnell in die Zellen zu transportieren. Es wurden zwei weitere Mechanismen für die Kaliumpufferung beschrieben, der $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransporter und das "spatial buffering" (räumliche Pufferung). Ersterer spielt wahrscheinlich eher eine untergeordnete Rolle. Das Konzept der räumlichen Pufferung dagegen besagt, dass Astrozyten in Regionen hoher neuronaler Aktivität die überschüssigen

K^+ -Ionen aufnehmen und durch das astrozytäre Netzwerk zu Regionen niedrigerer Kaliumkonzentrationen abtransportieren, wo es dann wieder in den extrazellulären Raum abgegeben wird. Aufnahme sowie Abgabe der K^+ -Ionen findet dabei über einwärtsgerichtete Kaliumkanäle Kir4.1 statt. Die Effektivität der Kaliumpufferung hängt noch von der richtigen Funktion und Verteilung von Kaliumkanälen, Wasserkanälen (AQP4) und Gap Junctions ab (Hibino et al., 2010; Reimann and Ashcroft, 1999).

Die räumliche Nähe der Astrozyten und der Neurone in den dreiteiligen Synapsen impliziert auch, dass die von Neuronen freigesetzten Neurotransmitter die Astrozyten erreichen können. Tatsächlich findet man auf Astrozyten ähnliche Rezeptoren wie auf Neuronen. Dazu gehören, je nach Gehirnregion, Rezeptoren für Glutamat, Purinrezeptoren, GABA, Noradrenalin, Histamin und andere (Aguilhon et al., 2008; Dani and Smith, 1995; Martin, 1992). So sind Astrozyten in der Lage, Signale von den Neuronen zu empfangen. Bei den meisten handelt es sich um metabotrope Rezeptoren, die eine Verbindung zu dem Second Messenger System haben, einschließlich der Phospholipase C, Inositoltrisphosphat (IP_3), Ca^{2+} und cAMP (Verkhratsky et al., 1998; Volterra and Meldolesi, 2005). Dani und Kollegen haben 1992 an akuten Hippokampuschnitten zeigen können, dass neuronale Aktivität an den Moos-Fasern-CA3-Synapsen eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) und interastrozytären Ca^{2+} -Wellen auslöst (Dani et al., 1992). Dies gilt nicht nur für Glutamat. Ähnliche Kalziumsignale im Hippokampus konnten durch die Freisetzung von Acetylcholin ausgelöst werden (Araque, 2008). Weitere Analysen haben gezeigt, dass diese Signale in zwei Gruppen aufgeteilt werden können: 1) Ca^{2+} -Oszillationen, definiert als wiederkehrende Erhöhungen von $[Ca^{2+}]_i$ innerhalb einer Zelle und 2) Ca^{2+} -Wellen, definiert als sich radial ausbreitende Steigerung von $[Ca^{2+}]_i$, die von einer Zelle ausgehen und sich anschließend auf benachbarte Zellen ausbreiten (Berridge et al., 1998). Als Auslöser für die Ca^{2+} -Oszillationen können neben Glutamat auch GABA und ATP sein (Dani and Smith, 1995). Die Astrozyten sind aber nicht nur in der Lage, Signale von den Neuronen zu empfangen. Kalziumsignale in den Astrozyten können ihrerseits die Freisetzung neuroaktiver Substanzen in den Extrazellulärraum bewirken. Dazu gehören Transmitter, Eicosanoide, Steroide, Neuropeptide und Wachstumsfaktoren (Araque, 2008; Araque and Navarrete, 2010; Haydon and Carmignoto, 2006; Martin, 1992). Eine mögliche Funktion dieser Fähigkeit der Astrozyten auf neuronale Aktivität Einfluss zu nehmen ist die Synchronisation größerer Nervenzellverbände. Wenn man bedenkt, dass die Fortsätze eines einzelnen Astrozyten

Kontakt mit Tausenden von Synapsen haben und die Astrozyten ihrerseits das größte Netzwerk im Gehirn bilden, wird das Potential dieses Zelltyps deutlich.

1.2 Das Interleukin-1-System

Der Terminus Interleukin-1 (IL-1) wurde 1979 während des “International Lymphokine Workshop” in Ermatingen (Schweiz) vorgeschlagen und sollte einen Hinweis auf deren Funktion geben: Kommunikation zwischen (inter) den Immunzellen (Leukozyten). Zu IL-1 gehören IL-1 α und IL-1 β , multifunktionelle, hormonähnliche Polypeptide. Sie werden vorrangig von Makrophagen, Monocyten, neutrophilen Granulocyten, Fibroblasten, Chondrozyten, Keratinozyten, Hepatozyten und MG als Wirtsantwort auf Infektion, Entzündung und Fieber produziert. IL-1 wirkt auf nahezu jeden Zelltyp, lokal wie auch systemisch. (Dinarello, 1996; Roux-Lombard, 1998). Die IL-1-Familie besteht aus drei Mitgliedern, IL-1 α , IL-1 β und IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), die sowohl beim Menschen als auch in der Maus auf dem langen Arm des Chromosoms 2 kodiert sind (Webb et al., 1986); (MGI Database <http://www.informatics.jax.org/searchtool/Search.do?query=il-1>). Die IL-1-Rezeptoren (IL-1R Typ I und II), die ebenso auf dem langen Arm des Chromosoms 2 kodiert sind, werden im Zusammenhang mit der IL-1-Familie betrachtet, werden aber nicht zu derselben gezählt (Dinarello, 2000; Roux-Lombard, 1998; Webb et al., 1986).

Die Stimuli für die Transkription von IL-1 während entzündlicher und infektiöser Prozesse sind: Proteine der Komplement-Kaskade, Neuropeptide, bestimmte Gerinnungsfaktoren, virale und bakterielle Produkte (wie z.B. Lipopolysaccharid, LPS) und Fieber (Dinarello, 1991). Außerdem haben einige Zytokine einen induzierenden oder verstärkenden Effekt auf die Produktion von IL-1. Dazu gehören unter anderem, Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), Interferon-gamma (IFN γ), TNF α (Dinarello, 1996; Nawroth et al., 1986; Sisson and Dinarello, 1988; UCLA et al., 1990). Weiterhin gibt es Untersuchungen, die belegen, dass IL-1 sich selbst induzierende Eigenschaften hat (Dinarello et al., 1987; Warner et al., 1987). Es ist denkbar, dass diese Selbstinduktion von IL-1 β bei Autoimmunerkrankungen die treibende Kraft bildet (Dinarello et al., 1987; Goldbach-Mansky et al., 2006). *In vitro* Untersuchungen an Monozyten haben gezeigt, dass eine Inkubation mit LPS zu einer Vermehrung der IL-1 α und IL-1 β mRNA innerhalb von 15 min führt. Diese hält über 4 h an und erlebt dann einen Rückgang (Fenton et al., 1988). Andererseits, wenn IL-1 selbst als Stimulus dient, hält die vermehrte mRNA Transkription für mehr als 24 h an (Schindler et al., 1990b). Unter bestimmten Bedingungen kommt es allerdings zu einer

Anhäufung von IL-1 mRNA, jedoch ohne dass diese zum Protein translatiert wird. Hierbei könnte es sich um einen der vielen Regulationsmechanismen des IL-1 Systems handeln (Schindler et al., 1990a). Es existiert noch ein endokriner negativer Feedback-Mechanismus für die IL-1 Produktion. Dieses Zytokin stimuliert über die Produktion von Hormonen aus dem Hypothalamus und der Hypophyse die Freisetzung von Cortikosteroiden, die ihrerseits einen hemmenden Effekt auf die Produktion von IL-1 und TNF α haben (Berkenbosch et al., 1987; Besedovsky et al., 1986).

Es gibt Hinweise, dass im Gehirn die Zytokine wie IL-1 und TNF α für die normale Funktion der Neurone notwendig sind. Man findet diese Moleküle, wenn auch in niedriger Konzentration, sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen von gesundem Gewebe. Dort sind sie unter anderem an der Schlafregulation, synaptischen Plastizität, neuronalen Signalübertragung und Ca²⁺-Signalen beteiligt (Vitkovic et al., 2000). Ein weiteres Indiz für die Notwendigkeit der Zytokine für die normale Hirnfunktion liefern die Untersuchungen der Zytokinexpression im Gehirn während der Ontogenese. Dabei zeigte sich, dass die Expression einiger Zytokine, z.B. IL-1 α , von dem Entwicklungsstadium und der Gehirnregion abhängt (Gadient and Otten, 1994; Pousset, 1994). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass IL-1 als astroglialer Wachstumsfaktor bei der Gehirnentwicklung eine unterstützende Rolle spielt (Giulian et al., 1988a; Giulian et al., 1988b). Dies legt den Schluss nahe, dass die Zytokine an der normalen Entwicklung des zentralen Nervensystems beteiligt sind.

1.2.1 Interleukin-1 α

Die unreife Form von IL-1 α , das Pro-IL-1 α , besitzt die gleiche biologische Aktivität wie die reife IL-1 α Form (Mosley et al., 1987). Sowohl Pro-IL-1 α als auch IL-1 α werden nur in Fällen ernsthafter Erkrankungen im extrazellulären Raum gefunden, wo die Moleküle ihren Ursprung wahrscheinlich in lysierten Zellen haben (Roux-Lombard, 1998; Wakabayashi et al., 1991). Pro-IL-1 α kann durch Calpain, eine Calcium-abhängige Membran-Protease, gespalten werden und so entsteht das reife IL-1 α . Dieser Prozess ist aber nicht ubiquitär, da eine Reihe von Zellen nicht in der Lage sind diese Spaltung zu vollziehen und daher das Pro-IL-1 α anreichern. (Kobayashi et al., 1990). Das Pro-IL-1 α enthält eine N-terminale nukleare Signalsequenz (KVLKKRR), die eine Translokation des Proteins in den Zellkern bewirkt. Es wird vermutet, dass in einigen Zelltypen, wie Endothelien, Epithelien und Keratinocyten, das Pro-IL-1 α im Zellkern als autokriner Wachstumsfaktor aktiv ist und Zelldifferenzierung und

Wachstum reguliert (Hauser et al., 1986; Maier et al., 1994; Wessendorf et al., 1993). Ungefähr 10-15 % von Pro-IL-1 α werden mit Myristyl-Gruppen konjugiert und anschließend in die Membran integriert (Stevenson et al., 1993). Das membrangebundene IL-1 α spielt wahrscheinlich eine Rolle bei lokalen Entzündungsprozessen, da es als ein autokriner Aktivator die Nachbarzellen stimulieren kann. Das reife IL-1 α kann nach der Bindung an den IL-1-Rezeptor internalisiert und in den Zellkern transportiert werden. Dort bindet der Komplex an die DNS, wo es als Transkriptionsfaktor aktiv ist (Mizel et al., 1987; Weitzmann and Savage, 1992).

1.2.2 Interleukin-1 β

Der Hauptunterschied von IL-1 β zu IL-1 α liegt in der Regulation der Transkription und der Aktivierung des Proteins. Im Gegensatz zu IL-1 α ist in der Promoterregion von IL-1 β eine TATA-Box zu finden, ein typisches Merkmal für induzierbare Gene (Shirakawa et al., 1993). Die überwiegende Anzahl der inaktiven 31 kDa großen Pro-IL-1 β -Moleküle verbleibt nach der Translation im Zytosol (Singer et al., 1988). Das Pro-IL-1 β kann mit Myristyl-Gruppen konjugiert werden, aber im Gegensatz zu Pro-IL-1 α wird das Molekül anschließend nicht in die Membranen eingebaut und ist nur geringfügig aktiv (Jobling et al., 1988). Die Aktivierung von IL-1 β erfolgt durch Spaltung mit Caspase-1, auch IL-1 β converting enzyme (ICE) genannt. Das Enzym wird seinerseits durch ein Proteinkomplex namens Inflammasom aktiviert (Martinon and Tschopp, 2007). ICE gehört zu der Gruppe der Cystein Proteasen und spaltet Pro-IL-1 β spezifisch zwischen den Aminosäuren Aspartat (Asp 116) und Alanin (Ala 117). So entsteht die 18 kDa große und biologisch aktive IL-1 β Form, die in den extrazellulären Raum transportiert wird (Black et al., 1989; Kostura et al., 1989). Somit entfaltet IL-1 β seine Wirkung vorwiegend extrazellulär (Roux-Lombard, 1998). Auch andere, extrazelluläre Proteasen können das Pro-IL-1 β spalten und aktives IL-1 β generieren. Dazu gehören unter anderem Proteinase-3, Serinproteasen (Fantuzzi et al., 1997), Trypsin (Kobayashi et al., 1991) und Elastase (Black et al., 1989).

1.2.3 Interleukin-1Ra

Das natürliche Vorkommen eines Rezeptorantagonisten ist einzigartig in der Zytokinbiologie (Dinarello, 1996). Durch die Klonierung der zugehöriger Gene ist festgestellt worden, dass die Struktur von IL-1Ra homolog zu IL-1 α (18 %) und zu IL-1 β (26 %) ist (Carter et al., 1990; Eisenberg et al., 1990). Das IL-1Ra bindet an die gleichen Rezeptoren wie IL-1 α und

IL-1 β und hemmt diese kompetitiv, da es nach der Bindung kein Signal auslöst (Arend, 1993; Hannum et al., 1990). Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der IL-1 Familie enthält das Gen für IL-1Ra eine Signalsequenz, die es dem Protein erlaubt, prozessiert und sezerniert zu werden. Diese Isoform wird sIL-1Ra genannt. Die Isolierung und Charakterisierung des sIL-1Ra zeigte, dass es sich um ein 22-25 kDa (nicht glykosiliert 17 kDa) großes Protein handelt (Hannum et al., 1990). Direkte Mutagenese-Experimente brachten ans Licht, dass IL-1Ra nur über eine Bindedomäne für den Rezeptor verfügt, IL-1 β dagegen über zwei. Das erklärt das Ausbleiben einer Signaltransmission (Evans et al., 1995) Daneben gibt es noch eine weitere intrazelluläre IL-1Ra (icIL-1Ra) Isoform, die zuerst im Jahre 1991 beschrieben wurde (Haskill et al., 1991). In der Zwischenzeit sind drei weitere humane IL-1Ra Isoformen beschrieben worden, die meist in der Zelle verbleiben. Sie werden als icIL-1Ra 1, 2 und 3 bezeichnet (Arend and Guthridge, 2000). Alle IL-1Ra Isoformen stammen vom gleichen Gen ab und entstehen durch alternatives Spleißen. Bei icIL-1Ra handelt es sich um ein 18 kDa großes Molekül, das konstitutiv in gastrointestinalen Epithelzellen und Keratinozyten exprimiert wird, also in den Zellen, in denen auch große Mengen an intrazellulärem IL-1 α gefunden wurden. Man nimmt daher an, dass IL-1Ra eine regulierende Wirkung auf die IL-1 α Aktivität ausübt (Arend, 1993; Haskill et al., 1991). Die intrazellulären Isoformen 2 und 3 hat man in weiteren Zelltypen gefunden, jedoch ist deren genaue Aufgabe noch nicht ganz klar (Malyak et al., 1998a; Malyak et al., 1998b; Muzio et al., 1999; Muzio et al., 1995). Stimuliert wird die IL-1Ra Produktion unter anderem durch LPS, IL-1 α und IL-1 β , IL-3, Transforming Growth Factor- β (TGF- β) und die anti-inflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 (Arend, 1993; Roux-Lombard, 1998).

Vergleicht man die Kinetik der Expression von IL-1 β und IL-1Ra nach einer Stimulation mit LPS, stellt man eine zeitliche Verzögerung der IL-1Ra Expression fest. In Zellkultur erreicht IL-1 β ein Maximum schon nach zwei Stunden, IL-1Ra erst nach vier (Vannier et al., 1992). Im Serum von Freiwilligen, die eine LPS Injektion erhielten, wurde ein Konzentrationspeak von IL-1 β bereits nach einer Stunde gemessen, während der für IL-1Ra nach zwei Stunden vorgefunden wurde (Granowitz et al., 1991). Interessanterweise können höhere Konzentrationen von LPS die Produktion von IL-1Ra inhibieren ohne IL-1 β zu beeinträchtigen (Arend et al., 1991; Marsh et al., 1994). Anscheinend werden IL-1 β und IL-1Ra von den gleichen Zellen produziert, unterliegen jedoch unterschiedlichen Regulationsmechanismen (Roux-Lombard, 1998). Die Produktion von IL-1Ra ist außerdem

von der Zelldifferenzierung abhängig. So konnte gezeigt werden, dass periphere Blutmonozyten während einer *in vitro* Differenzierung zu Macrophagen spontan IL-1Ra produzieren und gleichzeitig die Produktion von IL-1 runterregulieren (Roux-Lombard et al., 1989).

1.2.4 Interleukin-1-Rezeptoren

Zu der Interleukin-1 Rezeptorfamilie gehören drei Rezeptoren: IL-1RI, IL-1RII und IL-1 Rezeptor akzessorisches Protein (IL-1RAcP). Es handelt sich um glycosylierte Transmembranproteine, die drei extrazelluläre, immunoglobulinähnliche Domänen besitzen. Es existieren zusätzlich noch lösliche Formen von IL-1RI und IL-1RII (sIL-1RI und sIL-1RII). Diese Rezeptoren haben die Funktion eines Ligandenfängers, lösen keine Reaktion aus und haben somit eine regulatorische Funktion (Dinarello, 1996). Die löslichen IL-1 Rezeptoren entstehen durch proteolytische Spaltung des extrazellulären Teils der membranständigen Rezeptoren durch Proteasen, die in der Membran verankert sind. Der Hauptunterschied zwischen den membranständigen Rezeptoren vom Typ I und Typ II ist das Vorhandensein einer großen zytoplasmatischen Domäne beim IL-1RI, die für die Signalweiterleitung notwendig ist. Damit bleibt auch für den membrangebundenen IL-1RII nur die Rolle eines "decoy-receptors" (Köder-Rezeptor) wie bei den löslichen Formen (Sims et al., 1994). IL-1RI kann sowohl durch IL-1 α als auch durch IL-1 β aktiviert werden. Das letzte Mitglied der IL-1Rezeptorfamilie ist IL-1RAcP. Dieses Protein hat große Ähnlichkeiten mit dem IL-1RI, kann jedoch selbst kein IL-1 binden. Es fungiert als Korezeptor und bildet Heterodimere mit dem Rezeptor vom Typ I nachdem dieser den Liganden gebunden hat. Diese Dimerisierung ist unerlässlich für das Auslösen eines Signals (Greenfeder et al., 1995; Wesche et al., 1998).

1.2.5 Signalkaskade von Interleukin-1

Die Aktivierung des IL-1RI durch IL-1 führt zur Rekrutierung von IL-1RAcP. Anschließend lagert sich der Faktor mit der Bezeichnung myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) an die intrazelluläre Domäne von IL-1RI. Im nächsten Schritt bilden die IL-1RI-assoziierten Kinasen (IRAK) I und II einen Komplex mit IL-1RAcP (Huang et al., 1997) und aktivieren anschließend weitere Proteine, einschließlich des TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TNFR6), Transforming Growth Factor β -Activated Kinase 1 (TAK-1) und Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B). Die Phosphorylierung des NF- κ B Inhibitors I κ B führt zur Freisetzung von NF- κ B und seiner Translokation in den Zellkern, wo es die Transkription

zahlreicher Gene aktiviert. Eine weitere Möglichkeit des TRAF6-abhängigen Weges ist die Aktivierung unterschiedlicher Proteinkinasen, einschließlich Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK), c-Jun N-terminalen Kinase 1 (JNK1), Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2 (ERK1/2), p38 und der dahinter geschalteten Gene (O'Neill and Greene, 1998). Diese Signalkaskaden können auch als die langsame Antwort bezeichnet werden, denn es dauert mindestens 30 Minuten bis mehrere Stunden bis die ersten strukturellen und funktionellen Änderungen in den glialen und neuronalen Netzwerken eintreten (Vezzani et al., 2008). Darüber hinaus gibt es noch den schnellen Weg, der durch enzymatische Aktivität wirkt und zur Aktivierung von Src Tyrosinkinase und Phosphoinositol 3 Kinase (PI3K)/Akt führt (Sanchez-Alavez et al., 2006; Stellwagen et al., 2005; Viviani et al., 2003).

Im Hinblick auf die Epileptogenese sind mehrere Mechanismen bekannt, die einen Beitrag zu der erhöhten Erregbarkeit der Neurone leisten. Zum einen kann die Src-Kinase die NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors phosphorylieren und so einen stärkeren Ca^{2+} -Eintritt in die Neurone auslösen. Außerdem scheint die Phosphorylierung der NR2B-Untereinheit dazu zu führen, dass diese in der Membran stabilisiert und so gegen Endozytose und den damit verbundenen Abbau durch Calpain geschützt wird (Viviani et al., 2003). Zusätzlich kann IL-1 β die extrazelluläre Glutamatkonzentration durch Störung der Wiederaufnahme (Hu et al., 2000) und durch eine gesteigerte astrozytäre Freisetzung (Bezzi et al., 2001) erhöhen. Inkubationsexperimente an humanen Astrozytenkulturen mit IL-1 β zeigten außerdem einen deutlichen Einfluss des Zytokins auf die funktionelle Kopplung der Zellen. Die reduzierte Farbstoffdiffusion wurde begleitet durch eine reduzierte Expression sowohl der mRNA als auch des Proteins von Cx43 (John et al., 1999).

1.3 Tumor-Nekrosis-Faktor-alpha

Das Zytokin TNF α spielt eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem und ist an lokaler und systemischer Entzündung beteiligt. Der Name leitet sich von einem Experiment ab, welches von Dr. Lloyd Old im Jahre 1975 durchgeführt wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein zytotoxischer Faktor in der Lage ist, bestimmte Tumore direkt abzutöten. Dieses Molekül wurde TNF α genannt. Zu den wichtigsten Quellen dieses Zytokins gehören Makrophagen und Monozyten. Im Gehirn kann TNF α nach einer Stimulation mit LPS oder

Ischämie durch unterschiedliche Zelltypen wie MG, Astrozyten sowie Neurone produziert werden (Breder et al., 1994; Buttini et al., 1996; Chung and Benveniste, 1990; Liu et al., 1994). Bei einer Reihe neurologischer Erkrankungen sind erhöhte Mengen an TNF α im Gehirn gefunden worden. Dazu zählen Epilepsie, Parkinson, Alzheimer und MS. Es sind mehrere Effekte von TNF α im Gehirn bekannt. Dazu gehören neben der Aktivierung von MG und Astrozyten und der Regulation der Blut-Hirn-Schranke auch direkte Wirkungen auf die Signalweiterleitung. Zu diesen zählen unter anderem eine stärkere Expression von AMPA-Rezeptoren und eine reduzierte Expression von GABA_A-Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Beattie et al., 2002; Stellwagen et al., 2005; Stellwagen and Malenka, 2006).

TNF α wird als monomeres Transmembranprotein synthetisiert (membrangebundenes TNF α , mTNF α), das anschließend als Homotrimer in die Membran eingebaut wird. Eine Metalloprotease (TNF α converting enzyme, TACE) kann das Molekül schneiden und die lösliche Form (solTNF) freisetzen. Beide Formen sind biologisch aktiv (Idriss and Naismith, 2000). Es gibt jedoch Unterschiede in der Rezeptoraffinität. Das solTNF α hat eine höhere Affinität zu dem TNF α -Rezeptor 1 (TNFR1) und löst dadurch Apoptose und chronische Entzündung aus (Holtmann and Neurath, 2004). Im Gegensatz dazu bindet die membrangebundene Form von TNF α bevorzugt an den TNF α -Rezeptor 2 (TNFR2) (Grell et al., 1995) und löst somit ein Programm aus, das für das Überleben der Zellen, für das Auflösen der Entzündung, für die Aufrechterhaltung der Immunität und der Myelinisierung wichtig ist (Arnett et al., 2001; Canault et al., 2004; Olleros et al., 2005). Der TNFR2 kann nur durch mTNF α voll aktiviert werden, während TNFR1 von beiden Liganden voll aktiviert werden kann. Die Effekte von TNF α lassen sich grob in zwei Gruppen unterteilen, je nachdem welcher Rezeptor aktiviert wird. TNFR2 hat eine neuroprotektive Wirkung, während die TNFR1-vermittelten Effekte sich eher schädigend auf das zentrale Nervensystem (ZNS) auswirken.

Es sind grundsätzlich mehrere Strategien denkbar, um die Effekte von TNF α zu blockieren (für eine Übersicht s. Abbildung 2). Es stehen Techniken bereit, um die Liganden, die Rezeptoren und die den Rezeptoren nachgeschaltete intrazellulären Signalkaskaden mithilfe von Antikörpern oder Pharmaka zu unterbinden. In Rahmen dieser Arbeit sollte ein möglicher Weg zur Unterdrückung der schädlichen Wirkung von TNF α bei gleichzeitiger Verstärkung der Neuroprotektion untersucht werden. Der Einsatz der Substanz XPro1595 schien für diesen Zweck am besten

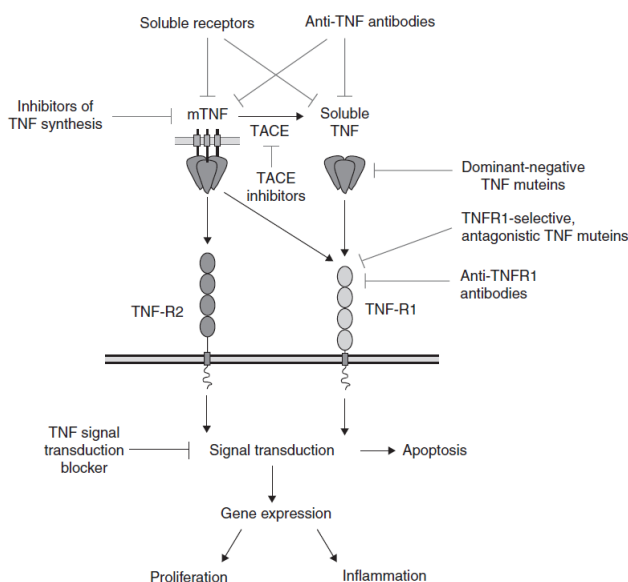


Abbildung 2: Strategien zur Hemmung der TNF α -Effekte.

mTNF: membrangebundener TNF; TACE: TNF α konvertierendes Enzym; TNFR1: TNF α -Rezeptor 1; TNFR2: TNF α -Rezeptor 2 (aus (Kontermann et al., 2009)).

geeignet. Xpro1595 ist ein dominant negativ wirkendes mutiertes Protein, das selektiv die Wirkung des solTNF α blockiert (Olleros et al., 2009; Zalevsky et al., 2007). Das Molekül bindet im Verhältnis 1:2 oder 2:1 natives lösliches TNF α und bildet so Trimere, die nicht mehr in der Lage sind an die Rezeptoren zu binden. Das membrangebundene TNF α wird davon nicht betroffen und kann weiter seine Wirkung ausüben (Kontermann et al., 2009).

1.4 Lipopolysaccharid

Die wichtigste proinflammatorische Komponente der gramnegativen Bakterien ist das LPS (Rietschel et al., 1996). Dieses Molekül hat eine aktivierende Wirkung auf die Zellen des Immunsystems einschließlich der MG und Astrozyten im Gehirn (Bourdiol et al., 1991; Kitchens, 2000). Als Folge dessen setzen die aktivierten Zellen unterschiedliche Entzündungsmediatoren wie z.B. IL-1 β und TNF α frei (Chung and Benveniste, 1990; Szczepanik et al., 1996). Für die Aktivierung der Signalkaskade durch LPS ist der Toll-like Receptor 4 (TLR4) verantwortlich. Er gehört zu der Gruppe der TLR-Rezeptoren, die eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunität einnehmen. Diese Rezeptoren erkennen

unterschiedliche pathogenassoziierte Moleküle (Pathogen-associated Molecules Pattern: PAMP) wie Teile der Zellwand, virale bzw. bakterielle RNA oder DNA (Miller et al., 2005) und Alarmine (danger/damage-associated molecular pattern molecules: DAMP). Die letzteren sind meistens zytosolische oder nukleare Proteine, die als Folge der Zerstörung oder Schädigung der Zellen freigesetzt werden. Die TLR-Rezeptorfamilie und IL-1-Rezeptoren gehören zu der gleichen Superfamilie der Transmembranrezeptoren, die eine gemeinsame intrazelluläre Domäne namens Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) teilen und somit auch gleiche Signalkaskaden auslösen (O'Neill and Bowie, 2007).

Zu den wichtigsten gramnegativen und somit LPS enthaltenden Erregern zählt *Escherichia coli* (*E. coli*). Dieses Bakterium ist für die meisten Meningitis-Erkrankungen im Säuglingsalter verantwortlich. Trotz potenter Antibiotikatherapien korrelieren die Meningitiden, verursacht durch gramnegative und grampositive Bakterien, mit hohen Komplikations- und Sterblichkeitsraten. Bei bis zu 70 % der Patienten mit septischer Meningitis entwickeln septische Enzephalopathie (Schumann et al., 1998). Laut Milne Anderson treten bei 40 % der Patienten mit bakterieller Meningitis Anfälle auf (Anderson, 1993). Pathologische Befunde im EEG sollen sogar bei 2/3 der Patienten festgestellt worden sein (Pomeroy et al., 1990). Die experimentellen Befunde untermauern diese Beobachtungen. An Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass LPS die Schwelle für das Auslösen der Anfälle herabsetzt (Galic et al., 2008; Sayyah et al., 2003).

1.5 Levetiracetam

Levetiracetam (LEV, UCB L059, KeppraTM) ist ein reines S-Enantiomer von α -Ethyl-2-Oxo-1-Pyrrolidine-Azetamide. Strukturell ist Levetiracetam mit dem Nootropikum Piracetam (Nootropil[®]) verwandt (De et al., 2007).

Das Medikament ist seit November 1999 auf dem Markt und stellt ein neues vielversprechendes Antiepileptikum (AED, anti-epileptic drug) dar. Ursprünglich ist LEV bei random screening Studien entdeckt worden, in denen die Substanz einen schützenden Effekt bei audiogenem Kindling in geräuschempfindlichen Mäusen zeigte (Gower et al., 1992). Die potente Unterdrückung der Anfallsaktivität in genetischen und auf Kindling-basierten Epilepsiemodellen von LEV steht im Widerspruch zu der fehlenden Wirksamkeit im Maximal-Elektroschock-Krampf-Modell oder dem Pentylentetrazol-Modell, beides klassische Modelle, um die Wirksamkeit von AEDs zu testen. Das unterscheidet LEV von den

herkömmlichen Antiepileptika, die in akuten und chronischen Modellen meist gleichstarke Wirkung zeigen (Gower et al., 1992; Klitgaard et al., 1998; Loscher and Honack, 1993). Viele Untersuchungen zur Aufklärung der molekularen Wirkmechanismen von LEV haben ergeben, dass die bisher bekannten Wirkprinzipien anderer Antiepileptika bei diesem Medikament nicht zum Tragen zu kommen scheinen (Klitgaard et al., 1998; Zona et al., 2001). Auf der neuronalen Ebene sind einige durch LEV ausgelöste Veränderungen festgestellt worden. Dazu gehört die Modifizierung der durch Kindling induzierten Genexpression im Temporallappen von Ratten (Gu et al., 2004). Darüber hinaus wurde eine Modulation des intrazellulären pH-Wertes in hippocampalen CA3 Neuronen adulter Meerschweinchen beschrieben. Dieser Effekt beruht auf der Hemmung des Na^+ -abhängigen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers (Leniger et al., 2004). LEV beeinflusste nicht die GABA-ergen Ströme in paired-pulse Experimenten (Margineanu and Klitgaard, 2003). Die Blockade von spannungsabhängigen Na^+ - und Ca^+ -Kanälen sowie der NMDA-Rezeptoren konnte ebenso nicht beobachtet werden (Gorji et al., 2002; Zona et al., 2001). In den CA1-Neuronen konnte jedoch eine selektive und irreversible Blockade der N-Typ Ca^{2+} -Kanäle beobachtet werden (Lukyanetz et al., 2002). Weiterhin wurde es eine unvollständige Hemmung der spannungsabhängigen K^+ -Ströme festgestellt (Madeja et al., 2003).

Es ist anzunehmen, dass das ungewöhnliche Wirkungsprofil von LEV zum Teil von einem anderen Mechanismus herrührt. Es ist in mehreren Studien nachgewiesen worden, dass LEV an das synaptic vesicle glucoprotein 2A (SV2A) bindet. Es handelt sich um ein ca. 90 kDa großes Protein, welches strukturell mit Transmembrantransportproteinen verwandt ist, jedoch ohne eigene Transportaktivität. Es wirkt wahrscheinlich als Modulator der Vesikelfreisetzung. Andere Antiepileptika binden nicht an SV2A (Gillard et al., 2006; Lynch et al., 2004).

Eine weitere interessante Studie an Gehirnschnitten zeigte, dass LEV das Auftreten von spontanen Entladungen (Bursting) und Ca^{2+} -abhängiger Übererregbarkeit der Neurone hinauszögert. Die Hemmung der verstärkten Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Kompartimenten trägt zu der verringerten Erregbarkeit der Neurone bei und somit auch zu der antikonvulsiven Wirkung von LEV (Angehagen et al., 2003). Die Arbeitsgruppe von Cataldi hatte das Ergebnis bestätigt und gezeigt, dass LEV die Ca^{2+} -Freisetzung aus den IP_3 -abhängigen intrazellulären Kompartimenten hemmt (Cataldi et al., 2005). In epileptischen

Neuronen wird die Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Kompartimenten als die wichtigste Ursache für den anhaltenden Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ betrachtet (Pal et al., 2001).

Der letztgenannte Effekt auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist hinsichtlich einer astrozytären Beteiligung an der Wirkungsweise von LEV von Interesse. Es ist bekannt, dass Astrozyten eine Vielfalt von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in der Membran exprimieren, die durch Neurotransmitter aktiviert werden können. Dazu gehören auch die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR). Die Aktivierung dieser Rezeptoren bewirkt eine Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Kompartimenten (Porter and McCarthy, 1995a; Porter and McCarthy, 1995b; Porter and McCarthy, 1996). Erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ können die Freisetzung von Gliotransmittern und ATP in den extrazellulären Raum bewirken, die entweder an neuronalen oder astrozytären Rezeptoren andocken können. (Bezzi et al., 2001; Halassa et al., 2009; Petzold et al., 2008; Wang et al., 2006). Für die Epileptogenese hat das zweierlei Konsequenzen. Zum einen führt die Aktivierung von mGluR wie eben erwähnt zur Ausbreitung von Ca^{2+} -Wellen, die durch weitere Freisetzung von Gliotransmittern die Aktivität neuronaler Netzwerke über weite Strecken miteinander verbinden und synchronisieren. Zum anderen führt die Aktivierung von mGluR zu einer verminderten Expression von Glutamattransportern EAAT1 und EAAT2 (Aronica et al., 2003) und zu einer höheren extrazellulären Konzentration an Glutamat. Es gibt Untersuchungen die zeigen, dass in akuten chemisch induzierten Epilepsiemodellen die Ca^{2+} -Oszillation und Glutamatfreisetzung zu einer paroxysmalen depolarisierenden Verschiebung (paroxysmal depolarizing shift, PDS) in Neuronen führt (Tian et al., 2005). Eine andere Studie hat gezeigt, dass Glutamatfreisetzung während des Status Epilepticus (SE) zum neuronalen Tod beiträgt. Dieser Prozess konnte durch Blockade von mGluR in Astrozyten und von ionotropen Glutamatrezeptoren in den Neuronen rückgängig gemacht werden (Ding et al., 2007). Angesichts der oben aufgelisteten Effekte der Calciumsignale in Astrozyten, wäre es denkbar, dass sich die antiepileptische Wirkung von LEV wenigstens zum Teil über die Hemmung der Ca^{2+} -Freisetzung in den Astrozyten entfaltet.

Eine weitere positive Wirkung von LEV ist im Kainat-induzierten Epilepsiemodell gefunden worden. Marini und Kollegen haben an Ratten gezeigt, dass Kainat die Lipidperoxidation erhöht, die endogene Antioxidantienvorräte aufbraucht und die IL-1 β mRNA erhöht. Mit anderen Worten die Schäden durch freie Radikale und Entzündungsvorgänge werden verstärkt. Diese Effekte werden abgeschwächt, wenn man den Tieren 30 min vor der Kainatinjektion LEV verabreicht (Marini et al., 2004).

In letzter Zeit steigt die Zahl der Publikationen, die die Effekte von LEV auf die Astrozyten untersucht. Die von Marini berichtete schützende Wirkung des Medikaments im Kainatmodell rührt sehr wahrscheinlich von den Astrozyten her, denn diese zahlenmäßig stärkste Zellgruppe des Gehirns ist der größte Freisetzer von Entzündungsfaktoren und reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS). Ein weiteres Beispiel für die Effekte von LEV auf Astrozyten ergibt sich aus der Arbeit von Haghikia et al (2008), die in einer Zellkulturstudie zeigen konnten, dass LEV anti-inflammatorische Wirkungen auf Astrozyten ausübt, gemessen an der Expression von Cx43, Kopplungseigenschaften und dem Ruhemembranpotential (V_R) (Haghikia et al., 2008). Ein möglicher Wirkmechanismus könnte über den TGF β 1 vermittelt werden (Stienen et al., 2011).

1.6 Dibutyryl cAMP / Propentofyllin

Propentofyllin (PPT) wurde ursprünglich als mögliches Therapeutikum bei Demenzerkrankungen und zerebralen Ischämien (Frampton et al., 2003) und bei Alzheimer betrachtet. In der klinischen Phase IIIb hatte sich jedoch herausgestellt, dass eine Behandlung über einen Zeitraum von 72 Wochen zu keinem signifikanten Unterschied zu der Placebo-Gruppe geführt hat. Aus diesem Grund steht das Medikament nicht als Humantherapeutikum zur Verfügung (MEDSCAPE MEDICAL NEWS, 2000). Es ist aber zugelassen zur Behandlung von zerebralen Durchblutungsstörungen beim Hund (Karsivan®, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim).

PPT ist ein Xanthinderivat [1-(5'-oxohexyl)-3-methyl-7-propylxanthine], das eine hemmende Wirkung auf Phosphodiesterasen (PDE) des Typs I, II und IV und Adenosintransporter ausübt (Meskini et al., 1994; Ohkubo et al., 1991). Die pharmakologischen Effekte von PPT beruhen auf der Erhöhung der intrazellulären Konzentration zyklischer Nukleotide durch Hemmung der PDE. Im Fall von cAMP wird die Erhöhung der intrazellulären Konzentration durch die Erhöhung der extrazellulären Adenosinkonzentration und der anschließenden Aktivierung des an die Adenylatzyklase gekoppelten Adenosinrezeptors verstärkt (Fredholm et al., 1992; Fredholm and Lindstrom, 1986). Die Anwendung von PPT führt somit zu höheren cAMP-Konzentrationen in den Zellen und lässt sich durch das membrangängige Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) simulieren. Zu den Effekten gehören antioxidative, immunmodulatorische und neuro- und kardioprotektive Wirkungen (Scaramuzzi and Baker, 2003). Außerdem fördert

PPT eine stärkere Durchblutung des Gewebes durch die Wirkung auf die glatte Muskulatur peripherer Gefäße (Hudlicka et al., 1981).

In *vitro* reduziert PPT sowohl die Proliferation von MG als auch die Endotoxin-induzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und TNF α (Si et al., 1998; Si et al., 1996). Außerdem hemmt die Substanz die Produktion von ROS unter anderem in MG (Banati et al., 1994). Das ist aus dem Grund interessant, weil eine Reihe von Studien aktivierte MG als eine der Hauptquellen für ROS identifiziert haben (Giulian and Baker, 1986; Woodrooffe et al., 1989). Der dadurch entstehende oxidative Stress wird bei einigen Erkrankungen wie z.B. der Ischämie als die Ursache für den neuronalen Tod betrachtet (Chan and Fishman, 1980; Kogure et al., 1982). Es wurde auch beschrieben, dass PPT die Morphologie differenzierter Astrozyten nach der Aktivierung wiederherstellt, indem es die K⁺- und Cl⁻-Kanalexpression ändert (Schubert et al., 1997; Schubert and Rudolphi, 1998). Diese Fähigkeit hat PPT auch in *vivo* und verhindert die Aktivierung von Astrozyten und MG nach der Ischämie (DeLeo et al., 1987).

1.7 Fieberkrämpfe

Fieberkrämpfe (FK) sind die häufigste Form epileptischer Krampfanfälle bei Kindern. Die Häufigkeit der Anfälle in Amerika und Europa beträgt 2-5 %, in Japan 8 % und auf den Marianen Inseln rund 14 % (Heida and Pittman, 2005; Stanhope et al., 1972; Tsuboi and Okada, 1984). Das Auftreten kann sporadisch sein, aber auch familiär gehäuft vorkommen. Es ist wahrscheinlich, dass bei der Entstehung sowohl die genetischen als auch die Umweltfaktoren eine Rolle spielen (Berg et al., 1999).

Die FK treten im Alter von 6 Monaten bis 5 Jahren auf, die meisten jedoch im Alter zwischen 2 und 3 Jahren und können in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Die einfachen Krämpfe dauern weniger als 15 Minuten, wiederholen sich nicht und man kann keine Hirnregion als den Herd identifizieren. Die komplexen FK dagegen haben einen fokalen Ursprung, dauern mehr als 15 Minuten und wiederholen sich in 15-20 % der Fälle innerhalb von 24 Stunden (Nelson and Ellenberg, 1976). Rund 30 % der FK sind komplex. Bei experimentellen FK an Ratten konnte gezeigt werden, dass die komplexen Anfälle ihren Ursprung im Hippokampus oder in der Amygdala haben (Dube et al., 2009).

Die Rolle der FK bei der Entstehung von Epilepsie ist umstritten. Die einfachen FK scheinen keinen messbaren Einfluss auf die Entstehung der Epilepsie oder der anderen kognitiven

Defizite zu haben. Das hat man sowohl bei pro- als auch retrospektiven Studien festgestellt (Berg and Shinnar, 1996; Verity et al., 1985; Verity et al., 1998). Mit komplexen FK verhält es sich anders, sie können das Risiko an Temporallappen-Epilepsie (TLE) zu erkranken um das 10fache steigern. Die Hypothese, dass FK an der Entstehung der TLE beteiligt sein können, wird zusätzlich durch retrospektive Studien untermauert, im Rahmen derer festgestellt wurde, dass 30-50 % der Patienten mit TLE an FK in der Kindheit gelitten haben (Cendes et al., 1993; Dube et al., 2012). Untersuchungen mittels Magnetic-Resonance-Imaging haben ergeben, dass diejenigen TLE-Patienten mit einer Vorgeschichte mit FK eine stärkere Sklerose im Hippokampus zeigen als die Patienten ohne FK (Sagar and Oxbury, 1987).

Wie bereits oben erwähnt gibt es genetische Faktoren, die das Auslösen von FK begünstigen. So hat man sowohl beim Menschen als auch bei Nagern Mutationen an Natriumkanälen und an GABA-Kanälen gefunden (Escayg et al., 2000; Harkin et al., 2002; Wallace et al., 1998), die zu einer höheren Erregbarkeit der Neurone führen.

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung der FK spielt IL-1 β . IL-1 β ist ein starkes Pyrogen, das heißt, dass es Fieber erzeugt. Fieber wiederum bewirkt die Freisetzung weiterer Zytokine, einschließlich IL-1 β , in der Peripherie und im Gehirn (Alheim and Bartfai, 1998; Cartmell et al., 1999). Neuere Untersuchungen unterstützen die Rolle von IL-1 β bei der Epileptogenese nach FK. Es ist gezeigt worden, dass IL-1 β im Hippokampus während experimenteller FK in Nagern freigesetzt wird (Dube et al., 2005). Außerdem ist die Synthese von IL-1 β während und nach dem fieberinduziertem Status epilepticus (SE) erhöht. Dieser Zustand hält bis zu 48 Stunden an (Dube et al., 2010). Die Menge an diesem Zytokin war auch im Hippokampus von Ratten erhöht, die nach fieberinduziertem SE Epilepsie generierten verglichen mit nichtepileptischen Tieren. Neben mehreren experimentellen Belegen für die anfallfördernde Wirkung von IL-1 β gibt es nur eine Arbeit die zeigt, dass dieses Zytokin *per se* Anfälle auszulösen kann. Das war jedoch nur möglich durch eine direkte Injektion hoher Dosen in den Lateralventrikel bei jungen Mäusen (Dube et al., 2005).

1.8 Temporallappenepilepsie

Epilepsie ist ein Zustand des Gehirns, der rund 1 % der Bevölkerung weltweit betrifft. Sie ist gekennzeichnet durch das Auftreten nicht vorhersehbarer sich wiederholender Anfälle. Rund

80 % aller komplexen Anfälle haben ihren Ursprung im Temporallappen und werden unter dem Begriff TLE zusammengefasst. Etwa ein Drittel der Patienten spricht auf die medikamentöse Behandlung nicht an. Bei der Suche nach neuen AEDs hat man sich bisher auf Substanzen konzentriert, die die neuronale Aktivität beeinflussen. Dieser Weg hat sich während der letzten Jahrzehnte als wenig erfolgversprechend erwiesen. Alle bekannte AEDs unterdrücken lediglich die Symptome, ohne dabei auf die Ursache einzuwirken (Loscher and Schmidt, 2011). Auf der Suche nach neuen Konzepten in der Behandlung der Epilepsie sind Gliazellen, besonders die Astrozyten, in den Vordergrund gerückt. Wie bereits oben beschrieben, sind diese Zellen an der Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn beteiligt und tragen wesentlich zum reibungslosen Ablauf der neuronalen Prozesse bei. Funktionsverlust der Astrozyten ist bei einer Reihe von neurologischen Erkrankungen einschließlich Epilepsie beobachtet worden (Seifert et al., 2006; Seifert et al., 2010).

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Untersuchung von humanem Gewebe, das chirurgisch aus dem Hippokampus von therapieresistenten Epilepsiepatienten entnommen wurde, hat ergeben, dass wesentliche funktionelle Eigenschaften der Astrozyten verändert sind. Zum einen verschwinden die typischen zeit- und spannungsunabhängigen Strommuster. Zum anderen sind die Astrozyten im Hippokampus komplett entkoppelt. Es ist unmöglich eine Aussage darüber zu treffen, ob diese Veränderungen der Astrozyten im chronischen Zustand Folge kompensatorischer Effekte aufgrund der permanenten Hyperaktivität, oder ursächlich für die Entstehung der Krankheit sind. Um die der Epileptogenese zugrundeliegenden Prozesse identifizieren zu können, wurde ein Tiermodell etabliert, das sich einer intrakortikalen Kainatinjektion bedient, um spontane epileptische Anfälle bei Mäusen auszulösen. Das Modell ermöglicht es, die zeitliche Abfolge von Veränderung astrozytärer Eigenschaften und Generierung spontaner generalisierter Entladungen zu ermitteln. Im Rahmen dieser Experimente konnte festgestellt werden, dass die Entkopplung der Astrozyten bereits in der frühen Latenzphase, vor dem Auftreten der ersten spontanen epileptischen Anfälle einsetzt. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass der Verlust astrozytärer Kopplung kritisch für die Epileptogenese ist.

Ausgehend von diesem Kenntnisstand sollten im Rahmen meiner Arbeit die folgenden Fragen beantwortet werden:

1) Welche Mechanismen führen zu der frühen Entkopplung der Astrozyten in der Latenzphase im Kainatmodell?

Der Fokus sollte dabei auf dem Einfluss entzündlicher Veränderungen liegen, denn eine erhöhte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wurde sowohl bei chirurgisch entferntem humanem Gewebe als auch im Tiermodell beobachtet. Außerdem finden sich erhöhte Mengen an IL-1 β in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit bei frühkindlichen Fieberkrämpfen.

Das intrakortikale Kainatmodell reproduziert fast die gleichen chronischen morphologischen und funktionellen Veränderungen, die man bei humaner TLE-Sklerose findet. Allerdings hat das Kainatmodell den Nachteil, dass der Status epilepticus durch einen unnatürlichen Stimulus ausgelöst wird. In der Epilepsieforschung geht man zunehmend davon aus, dass entzündliche Veränderungen im Zusammenhang mit Fieberkrämpfen im frühkindlichen Alter eine Ursache von TLE sein können. Ein Modell, um diese frühkindlichen Krämpfe zu simulieren ist das sogenannte Hyperthermie(HT)-induzierte Epilepsiemodell in der Maus. Die zweite Fragestellung meiner Arbeit lautete daher:

2) Kommt es im HT-Modell ebenfalls zu einer Entkopplung von Astrozyten, die längerfristig über die Generierung von Hyperaktivität ursächlich für die Entstehung der humanen TLE sein könnte?

Dazu sollte zunächst das HT-Modell für frühkindliche FK an Mäusen im Labor etabliert werden, um anschließend mögliche Veränderungen astrozytärer Funktionen elektrophysiologisch zu identifizieren.

2 VERSUCHSTIERE, MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Alle Tiere wurden im Haus für Experimentelle Therapie des Universitätsklinikums Bonn gehalten. Die Haltung erfolgte im Einklang mit den Richtlinien der europäischen und deutschen Tierschutzgesetze. Die Tiere wurden *ad libitum* gefüttert. Es sind nur männliche Tiere verwendet worden.

Bis auf Ausnahmen, die gesondert erwähnt werden, wurden in allen Experimenten die hGFAP-EGFP Mäuse vom FVB-Stamm verwendet. Bei diesen Tieren wird das grün-fluoreszierende Protein (enhanced green fluorescent protein, EGFP) unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promotors exprimiert (Nolte et al., 2001). Im Hippokampus sind zwei Populationen von fluoreszierenden Zellen sichtbar: NG2-Gliazellen erscheinen schwach leuchtend und haben feinere, weniger verzweigte Fortsätze. Dahingegen fluoreszieren Astrozyten stärker, sind in der Regel größer und zeigen stark verzweigte Fortsätze (Wallraff et al., 2004). Die Identifizierung der Astrozyten, an denen alle Experimente durchgeführt worden sind, erfolgte folgenderweise: zuerst wurde nach stark fluoreszierenden Zellen mit fein verzweigten Fortsätzen gesucht. Solche Zellen wurden anschließend elektrophysiologisch untersucht. Zeigte eine fluoreszierende Zelle ein spannungs- und zeitunabhängiges Strommuster (Abbildung 3), so wurde die Zelle für weitere Experimente verwendet.

Die Inkubationsexperimente (*in situ*) wurden mit Tieren im Alter von 90 bis 170 Tagen (p90-p170) durchgeführt. Für das *in vivo* LPS-Entzündungsmodell bzw. LPS-LEV-Koapplikation kamen jüngere Tiere zum Einsatz (p56-p70). Die HT-Experimente wurden an Tieren unterschiedlicher Genotypen im Alter von 12-15 Tagen (p12-p15) durchgeführt. Die darauffolgenden Analysen der Kopplung erfolgten zu unterschiedlichen Zeitpunkten (s. 2.3.14). Auf Abweichungen von diesen Angaben wird ausdrücklich im Text und in der Abbildungsbeschriftung hingewiesen.

Die CSS2-BL6-A/J- Mäuse wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppen Pierre de Graan (Utrecht, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Die Bezeichnung „CSS2“ leitet sich von „Chromosome substitution strain 2“ ab und deutet darauf hin, dass das Chromosom 2 aus BL6-Mäusen durch das aus A/J-Mäusen ersetzt wurde. Die CSS2-Tiere haben sich im Laufe der Experimente in der Arbeitsgruppe von Pierre de Graan als besonders empfänglich für die HT-induzierte FK erwiesen (van Gassen et al., 2008).

Zur Untersuchung der Rolle von TLR4 bei der LPS-induzierten Reduktion der astrozytären Kopplung wurde eine weitere transgene Mauslinie analysiert, die C57Bl/10ScNJ-Mauslinie (The Jackson Laboratories). Diese Tiere haben eine spontane Deletion beider Allele des *Tlr4*-Gens erfahren. Dies hat zur Folge, dass sowohl die mRNA als auch das Protein fehlt und Stimulation des TLR4 mit LPS nicht mehr möglich ist. Diese Tiere werden weiter im Text als TLR4-KO bezeichnet.

Alle Untersuchungen erfolgten im Hippokampus. Dabei lag der Fokus auf dem *Stratum radiatum* der CA1-Region. In dieser Region sind sowohl alle Färbungen als auch die Kopplungsanalysen durchgeführt worden

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Chemikalien und Lösungen folgender Hersteller verwendet:

Applied Biosystems (California, USA), Applichem (Darmstadt, Deutschland), Biostatus (Shephed, UK), B.Braun (Melsungen, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Dianova (Hamburg, Deutschland), Cell Signaling (Danvers, USA), Invitrogen (Darmstadt, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Millipore (Darmstadt, Deutschland), Polysciences (Warrington, USA) Promega (Madison, USA), Qiagen (Hilden, Deutschland), Roche (Manheim, Deutschland), R & D Systems (Deutschland), Sakura Finetek Europe (Zoeterwoude, Niederlande), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Sigma Aldrich (München, Deutschland), Thermo Scientific (Waltham, MA, USA), Vector Laboratories (Burlingame, USA), Xencor (Monrovia, USA).

2.2.2 Lösungen

2.2.2.1 Fertige Lösungen und Chemikalien

Acrylamid Lösung	Carl Roth
Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1)	
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth
Biozytin	Sigma Aldrich
Super Signal West dura extended duration substrate	Thermo-Scientific
Pierce BCA protein assay Kit	Thermo-Scientific
Roti-Load buffer (4x)	Carl Roth
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Carl Roth
Levetiracetam (LEV)	LKT Laboratories
Halt Protease-Phosphatase-Inhibitor-Single-Use Cocktail	Thermo-Scientific
Tissue-Tek (O.C.T compound)	Sakura Finetek
Triton X-100	Sigma Aldrich
Draq5	Biostatus Limited
Hoechst	Invitrogen
Aqua Poly/Mount	Polysciences
hrIL-1 β	R & D Systems
mrTNF α	R & D Systems
XPro1595	Xencor
db-cAMP	Sigma Aldrich
Protein Marker Page Ruler	Thermo Scientific
Protein Marker Novex® Sharp Standard	Invitrogen
Stripping Buffer	Thermo Scientific

2.2.2.2 Lösungen für die Patch-Clamp-Experimente

Sucrose-Präparationslösung	NaCl	87	mM
	KCl	2,5	mM
	NaH ₂ PO ₄	1,25	mM
	MgCl ₂	7	mM
	CaCl ₂	0,5	mM
	NaHCO ₃	25	mM
	Glucose	25	mM
	Sucrose	75	mM
pH 7,0 bei 5°C und 7,6 bei 35°C, begast mit 95 % O ₂ und 5 % CO ₂			
Na-Pyruvat-Präparationslösung	NaCl	150	mM
	KCl	5	mM
	MgSO ₄	2	mM
	Na-Pyruvat	1	mM
	Glukose	10	mM
	HEPES	10	mM
pH 7,38, begast mit O ₂			
Badlösung / ACSF	NaCl	126	mM
	KCl	3	mM
	MgSO ₄	2	mM
	CaCl ₂	2	mM
	Glukose	10	mM

	NaH ₂ PO ₄	1,25	mM
	NaHCO ₃	26	mM
	pH 7,4, begast mit 95 % O ₂ /5 % CO ₂		
Pipettenlösung (mit Biozytin)	K-Glukonat	130	nM
	MgCl ₂	1	nM
	Na ₂ -ATP	3	nM
	HEPES	20	nM
	EGTA	10	nM
	Biozytin (N-biotinyl-L-lysin)	0,5 %	w/v
	pH 7,2		

2.2.2.3 Lösungen für die Immunchistochemie

Phosphat buffered saline (PBS) 10x	NaCl	1,5	M
	Na ₂ HPO ₄	83	mM
	Na H ₂ PO ₄	17	mM
	pH 7,4 eingestellt mit HCl		

Fixierungslösung (4 % PFA)	Aqua dest (A. dest.)	800	ml
	Paraformaldehyd	40	g
	- auflösen und NaOH dazugeben bis die Lösung klar wird		
	PBS (10x)	100	ml
	- mit A. dest auf 1000ml auffüllen		

pH 7,4 eingestellt mit NaOH oder NaCl

Fixierungslösung für Streptavidin-Cy3	Normal goat serum (NGS)	10 %	v/v
	Triton X-100	2 %	v/v
	in PBS , pH 7,4		
Streptavidin Cy3-Lösung	Streptavidin	1:300	
	NGS	2 %	v/v
	Triton X-100	0,1 %	v/v
	in PBS		
Kernfärbung	Hoechst	1:100	
	in A. dest		
Fixierungslösung für IbaI	NGS	10 %	v/v
	Triton X-100	0,5 %	v/v
Primärantikörperlösung für IbaI	rabbit anti IbaI	1:400	
	NGS	2 %	v/v
	in PBS, pH 7,4		
Sekundärantikörperlösung für IbaI	goat anti rabbit Alexa 594	1:500	
	NGS	2 %	v/v
	in PBS, pH 7,4		

Kernfärbung	Draq 5	1:1000
	in PBS, pH 7,4	

2.2.2.4 Lösungen für die Proteinanalytik (SDS und WB)

Lysispuffer	Tris	50	mM
	NaCl	150	mM
	NP-40	0,5 %	v/v
	Na-Deoxycholat (10 %)	0,5 %	v/v
	Triton X-100	1 %	v/v

auf 500 ml A. dest auffüllen, pH 7,5

10 x SDS-Page Laufpuffer	Tris	25	mM
	Glyzin	192	mM
	SDS	1 %	w/v

pH 8,3 (nicht einstellen, nur messen)

10 x Transferpuffer (WB)	Tris	25	mM
	Glycin	192	mM

pH 8,3 (nicht einstellen, nur messen)

10 x TBST (Waschpuffer) (Tris-Buffered Saline und Tween 20)	Tris	25	mM
	NaCl	150	mM

	Tween 20	0,05 %	v/v
	pH 7,4 (einstellen mit HCL oder NaOH)		
Blockierungslösung (WB)	Magermilchpulver	5 %	w/v
	in Waschpuffer auflösen		
Ammoniumpersulfat (APS) (10 %)	APS	0,1	g
	in 1 ml deionisiertem Wasser		
Protein-Sammelgelpuffer	Tris	0,5	M
	SDS	0,4 %	w/v
	pH 6,3		
Protein-Trenngelpuffer	Tris	1,5	M
	SDS	0,4 %	w/v
	pH 8,8		

2.2.2.5 Primär-Antikörper

Antigen	Spezies/Isotype	Reaktivität	Verdünnung im WB	Quelle
Cx 43	Rb /Ig G	H, B, R, M, H, Ch	1:5000	Sigma #C6219
Cx30	Rb / Ig G	R, M, C, H	IB 1:250	Invitrogen #71-2200
TAK-1	Rb / Ig G	H, M, R, Mk, B	IB 1:1000	Cell Signaling #4505
P-TAK-1	Rb / Ig G	H	IB 1:1000	Cell Signaling #4536
p38	Rb / Ig G	H, M, R, Mk, GP	IB 1:1000	Cell Signaling #9212
GS	M /Ig G 2a	M, H	IB 1:1000	BD Transduction #610517
α -Tubulin	M /Ig G1	Y, H, Ch, R, A, F, B, M	IB 1:10.000	Sigma Aldrich #T9026
Iba I	Rb /Ig G	H, M, R	IF 1:400	WAKO # 019-19741

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primär-Antikörper. Abkürzungen: H=human, B=bovine, R=rat, M=mouse, Mk=monkey, Ch=chicken, GP=guniea pig, Rb=rabbit, Y=yeast, F=fungi, A=amphibian, IF: Immunofluorescent; IB: Immunoblot.

2.2.2.6 Sekundär-Antikörperlösungen für WB

Antigen	Spezies	Verdünnung im WB (in Blockierungslösung)	Quelle
Anti mouse HRP	sheep anti mouse	IB 1:10.000	GE Healthcare
Anti rabbit HRP	donkey anti rabbit	IB 1:10.000	GE Healthcare
Streptavidin Cy3	anti biocytin	IF: 1: 300	Sigma Aldrich
Alexa fluor 594	goat anti rabbit	IF: 1: 500	Molecular probes
Alexa fluor 488	goat anti mouse	IF: 1: 500	Molecular probes

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Sekundär-Antikörper. Abkürzungen: IF: Immunfluoreszenz; IB: Immunoblot.

2.2.3 Geräte und Materialien

Vibratom	VT 1000S Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Puller (Pipettenziehgerät)	P-87 und P-2000 Sutter Instruments, Novato, USA
Badkammer	Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland
Glaspipetten	Borosilikatglas GB150F-10 Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland
Mikroskop (Patch-Clamp)	Axioskop FS 1 Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Wasserimmersion Objektiv	LUMPlanFI/IR 60x Olympus, Japan

Infrarotkamera	Optronis VX45 Optronis GmbH, Deutschland
Schwingungsgedämpfter Tisch	Newport Corporation, Irvine, USA
Mikroskop (Immunofluoreszenz)	Axiophot Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Deutschland mit Software Metaview, Universal Imaging, West Chester, USA
Mikromanipulator	Mikromanipulator 5171 Eppendorf, Deutschland
Patch-Clamp Verstärker	EPC 9 und Software Tida 5.x HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland -sonstige Software: IGOR Pro 6.x WaveMetrics, Lake Oswego, USA mit Makros programmiert von Dr. R. Jabs
Schlauchpumpe	ISM 930C Ismatec/Idex, Wertheim/Mondfeld, Deutschland
PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm)	Milipore, Darmstadt, Deutschland
SDS-Page-System	Mini-PROTEAN® 3 Cell # 165-3301 Bio-Rad, Hemel Hempstead, England
WB-System	Mini Trans-Blot® # 170-3930 Bio-Rad, Hemel Hempstead, England
Spannungsquelle für SDS-Page und WB	PowerPac™ HC Power Supply Bio-Rad, Hemel Hempstead, England
Kryostat	Cryostat Microm HM560,

	Thermoscientific, Waltham, MA, USA
Photometer	Molecular Devices, Opti _{MAX} Sunnyvale, USA
Software zum Bearbeiten der Bilder	ImageJ Software NIH, Bethesda, USA
Software zur Analyse der Mikroplatte am Photometer	SoftAmx Pro Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Chemolumineszenzkammer	Gene Gnome 5 inkl. GeneSys Software Syngene, Cambridge, England
Fön (6-Stufen)	Magic, SD-28, 1800 Watt, Deutschland
Wasserbad	WB-10 PD-Industriegesellschaft mbH, Deutschland
Halterung für stereotaktische Injektion	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland
EEG-Transmitter (telemetrisch)	TA10EA-F20 DataSciences International, St. Paul, USA
Empfängerplatte für EEG-Transmitter	RPC-1 DataSciences International, St. Paul, USA
Analysesoftware für die EEGs	Dataquest A.R.T. 4.00 Gold/Platinum software DataSciences International, St. Paul, USA
Überwachungssystem mit Infrarotkameras	SeeTec Axis 221 Indoor Vario

Software	SeeTec Office 5 Philippsburg, Deutschland
Transponder zur Messung der Körpertemperatur	IPTT-300 BioMedic Data Systems, Seaford, USA
Lesegerät für Temperaturtransponder	DAS-7007s BioMedic Data Systems, Seaford, USA

2.3 Methoden

2.3.1 Präparation von Hirngewebe der Maus

Mäuse wurden mit einer Mischung aus 50 % CO₂ und 50 % O₂ anästhesiert und dekapitiert. Die Schädeldecke und das Zerebellum wurden sofort entfernt und das Gehirn auf einen Probenteller mit Sekundenkleber befestigt. Anschließend wurde der Probenteller samt Gehirn in die mit eisgekühlter Präparationslösung gefüllte Kammer des Vibratoms überführt. Das Gehirn wurde in 200 µm dünne Scheiben in koronaler Orientierung geschnitten. Der Raum um die Schnittkammer war dabei mit einem Wasser-Eis-Gemisch gefüllt. Bei der Verwendung der Na-Pyruvat-Präparationslösung wurde das frisch geschnittene Gewebe sofort in die artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) überführt. Der Einsatz der Sucrose-Präparationslösung bedurfte einer alternativen Vorgehensweise. Nach dem Schneiden kamen die Schnitte für 20 Minuten in eine 35°C-warme Sucrose-Lösung und erst anschließend in das ACSF bei Raumtemperatur (RT, 22°C). Die Sucrose-Lösung wurde bei allen Hyperthermieexperimenten, bei Inkubationen mit XPro1595 und bei TLR4KO-Mäusen verwendet.

Alle Lösungen wurden ständig begast, die HEPES-gepufferten Lösungen mit reinem Sauerstoff, die Lösungen auf Hydrogenkarbonat-Basis mit einem Gemisch aus 5 %-CO₂ und 95 %-O₂. Die Schnitte wurden in ACSF bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.3.2 Astrozytenmarkierung mit Sulforhodamin 101

Die Verwendung der hGFAP-EGFP Mäuse diente als ein Hilfsmittel zur Identifizierung der Astrozyten (siehe oben). Es gab jedoch einen wesentlichen Nachteil: nicht alle Astrozyten exprimierten EGFP. Außerdem sank die Aktivität des hGFAP-Promoters mit steigendem

Alter, so dass nur noch wenige Zellen grün markiert erschienen. Aus diesem Grund wurde eine alternative Methode zur *in vivo* Markierung der Astrozyten verwendet. Die Zellen wurden mit 1 μ M Sulforhodamin 101 (SR101) gefärbt und konnten so unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden (Nimmerjahn et al., 2004; Schnell et al., 2012).

Die Methode bedurfte der Verwendung der Sucrose-Präparationslösung. Nach der 20-minütigen Inkubation in der Sucrose-Lösung bei 35°C wurden die Gehirnschnitte in eine ACSF-Lösung mit 1 μ M SR101 überführt. Dieser Schritt dauerte weitere 20 Minuten und fand bei 35°C statt. Anschließend kamen die Schnitte zur Aufbewahrung in eine ACSF-Lösung bei RT.

Diese Methode wurde angewandt bei HT-Experimenten, den Experimenten mit den TLR4-KO-Mäusen und bei den Inkubationen mit XPro1595.

2.3.3 Inkubation der akuten Hirnschnitte mit Zytokinen und Chemikalien

Die akuten Hirnschnitte wurden wie oben beschrieben hergestellt. Die Inkubation erfolgte in ACSF bei RT. Dem ACSF wurden rekombinantes humanes IL-1 β (hrIL-1 β) und rekombinanter muriner TNF α (mrTNF α) in einer Endkonzentration von 10 ng/ml hinzugefügt. Um das Anheften der Substanz an Gefäßoberflächen zu vermindern, wurden die Lösungen entsprechend der technischen Anleitung des Herstellers im Wasser mit 5 mg/L BSA angesetzt. Bei Kontrollexperimenten enthielt die ACSF-Lösung, in der die Schnitte aufbewahrt wurde, dieselbe Konzentration BSA. In weiteren Experimenten kamen folgende Substanzen zum Einsatz: LPS, 1 μ g/ml; db-cAMP, 100 μ M; XPro1595 10 μ g/ml. Die Inkubationsdauer betrug 3-5 h. Anschließend wurden die Schnitte elektrophysiologisch untersucht und immunhistochemisch gefärbt.

2.3.4 Intraperitoneale Injektionen

Für die intraperitoneale (i.p.) Injektion von LPS und LEV wurden p56-p70 alte Mäuse benutzt. Die Konzentration der Lösungen wurde so angesetzt, dass das Injektionsvolumen für eine 25 g schwere Maus 100 μ l betrug (0,4 %, m/v). Die Substanzen wurden in einer sterilen 0,9 % NaCl-Lösung aufgelöst. Die eingesetzte Konzentration von LPS lag bei 5 mg/kg Gewicht, die von LEV bei 150 mg/kg. Die Applikation von LPS fand immer vormittags statt, zwischen 9-12 Uhr. Die erste Injektion von LEV wurde 6 Stunden nach einer LPS-Injektion

verabreicht. Die Tiere bekamen jeweils zwei LEV-Gaben täglich für die Dauer von 5 Tagen. Bei Kontrollexperimenten (Abbildung 14 E) wurde LEV ohne die vorangegangene LPS-Injektion 5 Tage lang verabreicht.

2.3.5 Elektrophysiologische Untersuchungen

Die elektrophysiologischen Messungen der Membranströme wurden mit der Patch-Clamp Technik in der Whole-Cell Konfiguration (Ganzzelleableitung) durchgeführt. Für die Messung wurden die Schnitte in eine Perfusionskammer des Mikroskops platziert, die permanent mit einer begasten ACSF-Lösung durchspült wurde. Die Schnitte wurden mit einem Grid, einem U-förmigen Platindraht mit elastischen Nylonfäden zwischen den beiden Seiten, am Kammerboden fixiert. Zur Messung der Ströme durch die Membran wurden zwei Elektroden benutzt. Eine befand sich in der Badkammer (Badelektrode), die andere in der mit der Innenlösung gefüllten Pipette. Nachdem eine Verbindung zwischen dem Zellsoma und der Pipettenlösung hergestellt wurde, war es möglich, die Ströme zwischen den zwei Elektroden zu messen und so eine Auskunft über die elektrophysiologischen Eigenschaften der Membran zu erhalten. Es wurde folgenderweise vorgegangen: Auf die mit der Innenlösung gefüllten Pipette wurde ein leichter Überdruck angelegt, damit beim Eintauchen in die Badlösung und beim Manövrieren der Pipette zu der Zelle keine Schmutzpartikel die Öffnung verstopfen konnten. Der Durchmesser der Pipette lag bei etwa $0,5 \mu\text{m}$. Die stärker fluoreszierenden Zellen mit größeren Fortsätzen wurden ausgewählt und in die Mitte des Gesichtsfeldes platziert. Unter optischer Kontrolle wurde die Pipette an die Plasmamembran der Zelle herangeführt und dann der anliegende Überdruck abgeschaltet. Dadurch kam es zu einer engen Verbindung zwischen der Membran und der Glaspipette, die sich in einem sehr hohen Widerstand, idealerweise im GigaOhm-Bereich, widerspiegelte (Cell-attached Modus). Als nächstes wurde die Zelle auf -70 mV Haltepotential (V_h) geklemmt (Voltage-clamp). Durch das Anlegen eines 10 mV depolarisierenden Impulses ließen sich die kapazitive Umladungsströme aufnehmen, die später zu der Berechnung von dem Membran- (R_M) und Serienwiderstand (R_S) benutzt wurden. Anschließend erfolgte das Aufreißen des an der Pipettenöffnung anliegenden Membranstückes durch kurzes ruckartiges Ansaugen (Whole-cell Konfiguration). In dieser Konfiguration flossen die Ströme zwischen der Badelektrode und der Elektrode in der Glaspipette durch die gesamte Membran. Durch kurzes Umschalten in den Current-clamp Modus konnte das V_R gemessen werden. Anschließend wurde ein weiterer depolarisierender 10mV -Impuls angelegt. Die entstandenen Umladungsströme

wurden von den Umladungsströmen in Cell-attached Modus subtrahiert und R_S und R_M bestimmt. Die Berechnungen wurden mithilfe des Programms IGOR durchgeführt. Als Ausschlusskriterien wurden folgende Parameter festgelegt: V_R positiver als -60 mV und/oder R_S+R_M größer als 30 MegaOhm ($M\Omega$). Das Mikroskop befand sich in einem faradayschen Käfig, um eine Isolierung von elektromagnetischen Störungen von außen zu gewährleisten. Die Isolierung von mechanischen Vibrationen erfolgte dadurch, dass der Messplatz auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut wurde. Die Patch-Pipetten wurden aus Borosilicatglas Kapillaren mit den Pipettenziehgeräten P-2000 und P-87 gezogen. Der Widerstand der Patch-Pipetten lag nach dem Befüllen mit der Biozytinlösung bei 3,5 - 5,5 $M\Omega$. Die Schnitte wurden unter einer 50- oder 600-fachen Vergrößerung mit differentieller Interferenzkontrast-Optik (DIC) untersucht. Für die 600-fache Vergrößerung wurde infrarotes Licht (IR) verwendet. Diese Untersuchungen fanden mithilfe einer IR-Kamera am Monitor statt. Die Ströme wurden mit einem EPC 9-Verstärker verstärkt, bei 10 oder 30 kHz abgetastet und bei 3 oder 10 Kilohertz (kHz) gefiltert. Als Messprogramm wurde TIDA für Windows verwendet. Der R_S sowie das Liquid Junction Potential wurden kompensiert. Alle Messungen wurden bei RT (22°C) durchgeführt.

2.3.6 Biozytinvisualisierung

Die Untersuchung der funktionellen Kopplung basierte auf der Biozytin-Diffusionsmethode. Das Biozytin-Molekül ist klein genug (372,48 Da), um durch die Gap Junctions zu diffundieren und seine Ausbreitung im Netzwerk gibt Aufschluss über den Kopplungsstatus der Zellen. Um die Initialzelle mit Biozytin zu befüllen, wurde die Substanz der Pipettenlösung beigefügt. Die Konzentration betrug 0,5 % (m/v). Die zu untersuchenden Zellen wurden 20 Minuten lang in der Ganzzelleableitung gehalten. Dabei bestand eine Verbindung zwischen dem Zellsoma und dem Inhalt der Patch-Pipette, wodurch das Biozytin in die Zelle und ggf. durch die Gap Junctions in die benachbarten Zellen gelangen konnte. Dabei wurde die ganze Zeit die Verbindung zwischen der Zellmembran und der Pipette kontrolliert und alle 10 Minuten das Membranpotential und R_M und R_S protokolliert. Sofort nach Ablauf der 20 Minuten wurden die Schnitte in eine 4 %ige Paraformaldehyd (PFA) Lösung überführt und bei 4°C über Nacht (ü.N.) inkubiert, um das Biozytin in den Zellen zu fixieren und weiteres Ausbreiten zu verhindern. Von diesem Schritt bis zum Aufziehen des

Gewebes auf Objektträger befanden sich die Schnitte in den Kammern einer 24-Well-Plate. Pro Well wurden ca. 250 µl Lösung verwendet.

Am nächsten Tag erfolgte das Waschen der Schnitte in PBS. Alle Waschschritte fanden auf einem Schüttler bei RT statt und dauerten 10 min. Darauf folgte die Inkubation mit der Blockierungslösung für 2 h bei RT auf dem Schüttler. Danach wurde die Blockierungslösung gegen die Antikörperlösung (Cy3-Streptavidin) ausgetauscht und die Platte mit dem Gewebe ü.N. bei +4°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte drei Mal gewaschen und 10 min mit Hoechst inkubiert. Nach dem letzten Schritt wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen. Dabei wurde auf die Orientierung der Schnitte geachtet, damit die mit Biozytin gefüllte Gewebeseite oben lag. In der Regel kamen drei Schnitte auf einen Objektträger. Die überflüssige Waschlösung wurde mithilfe von Filterpapier entfernt. In die Mitte der leicht angetrockneten Schnitte wurde ein Tropfen Eindeckmedium aufgetragen und anschließend mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nach einer Aushärtungszeit von mindestens 30 min wurden die Schnitte am Mikroskop fotografiert. Dabei kam das Programm Metaview zum Einsatz. Da sich das Biozytin im Gehirnschnitt in alle drei Dimensionen ausbreitet, wurden mehrere Ebenen mit einem Abstand von 1,5 µm aufgenommen, so dass die gesamte Kopplungswolke erfasst wurde. Für das Auszählen der Biozytin-positiven Zellen wurde das Programm ImageJ Software benutzt.

2.3.7 Kardiale Perfusion und Fixierung

Zur Herstellung der Gehirnschnitte für Immunhistochemie (IHC) wurde die Methode der kardialen Perfusion angewandt. Erst wurden die Tiere mit einer i.p. Injektion von Cepetor-KH (1 mg/ml) und Ketamin (10 %) im Verhältnis 3:2 anästhesiert. Mit einer feinen Schere wurde der Brustkorb geöffnet und das Perikard freigelegt. Anschließend wurde in den linken Ventrikel eine 25-G Kanüle eingestochen. Der rechte Vorhof wurde mit der Schere aufgeschnitten, damit das Blut herausfließen kann. Während der Perfusion wurden durch die 25-G-Kanüle zuerst 30 ml PBS (pH 7,4) langsam injiziert, um das Blut zu ersetzen. Dem folgten 30 ml 4 % PFA, um eine Fixierung des Gewebes zu erreichen, die sich durch eine Starre des Mauskörpers erkennbar machte. Danach wurde das Gehirn herauspräpariert und weiter in 4 % PFA ü.N bei 4°C fixiert. Anschließend kam das Gewebe in eine Lösung mit 30 % Sucrose in PBS für mindestens drei Tage.

2.3.8 Anfertigung der Kryoschnitte

Nach drei Tagen in Sucroslösung wurde das Gehirn in Tissue-tec (Sakura Finetek, Europe) eingebettet und bei -80°C eingefroren. Die Schnitte für IHC waren 40 µm dünn und wurden am Kryostat (Microm HM560) geschnitten. Das Aufbewahren erfolgte in 24-Well-Platten gefüllt mit PBS (pH 7,4) und 0,01 % Natriumazid als Konservierungsmittel, um eine längere Haltbarkeit zu gewährleisten.

2.3.9 Iba I -Färbungen

Die Iba I-Färbungen wurden an Kryoschnitten durchgeführt. Nachdem die Schnitte dreimal in PBS (pH 7,4) bei RT gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation in der Permeabilisierungs- und Blockierungslösung für 1 h bei RT. Diese enthielt 10 % NGS und 0,5 % Triton X-100 in PBS (pH7,4). Danach wurde die Lösung abgesaugt und gegen die Primärantikörper-Lösung mit rabbit anti Iba I (1:400) ausgetauscht. Die Primär- und Sekundärantikörperlösungen wurden in PBS mit 2 % NGS angesetzt. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte ü.N. bei 4°C. Als nächstes wurden die Schnitte dreimal in PBS für je 10 min gewaschen und mit folgenden Sekundärantikörpern für 1,5 h inkubiert: goat anti rabbit konjugiert mit Alexa 594 (1:500). Diesem Schritt folgte wieder dreimaliges Waschen a 10 min, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Als nächstes wurde die Kernfärbung mit Draq5 in PBS (1:1000) für 10 min durchgeführt, gefolgt von einem 5-minütigen Waschschrift in PBS. Danach wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und eingedeckelt.

2.3.10 Gesamtprotein-Extraktion aus Geweben

Für die Proteinextraktion wurden ausschließlich die Hippokampi der Mäuse benutzt. Alle Schritte fanden auf Eis statt. Als Unterlage diente eine umgedrehte Petrischale, die mit Filterpapier bedeckt war. Das Gehirn wurde herauspräpariert (s.o.) und mit eiskaltem PBS mit gewaschen, um Blutreste zu entfernen. Nachdem das Zerebellum entfernt wurde, erfolgte das Trennen des Gehirns in zwei Hemisphären. Zwecks leichter Handhabung des Gewebes wurde ein Teil des Frontalkortex mit dem olfaktorischen Bulbus gerade abgeschnitten. So entstand eine ebene Fläche, auf der das Gehirn fixiert wurde. Mithilfe von zwei kleinen Spachteln wurde anschließend der Kortex vorsichtig abgetrennt. Unter Zuhilfenahme der stumpfen Seiten der Spatel konnten die Hippokampi vom Mittelhirn getrennt und in ein Eppendorfgefäß mit eiskaltem Lysispuffer, der einen Mix aus Phosphatase- und

Proteaseinhibitor enthielt, überführt werden. Pro Hippokampus kamen ca. 300 µl der Lösung zum Einsatz. Das Gewebe wurde sofort mit einem Plastikstößel und anschließend mit einer 27G Kanüle homogenisiert. Dem folgte ein 30 minütiger Inkubationsschritt auf Eis, der durch drei Behandlungen mit Ultraschall a 10 s unterbrochen wurde. Der letzte Schritt bestand in der Zentrifugation der Lösung für 30 min bei 13.000 x RPM und 4°C. Die Überstände wurden abgenommen und in frische Eppendorfgeläße überführt. Um häufiges Auf- und Abtauen der Proben zu vermeiden, sind Aliquots mit ca. 70 µl Volumen angefertigt worden. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Kit ermittelt. Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

2.3.11 SDS-Page und Western Blot

Für Immunblot-Untersuchungen wurden in jeder Probe 50 µg Protein analysiert. Die Lysate wurden mit dem "Lämmli"-Probenpuffer (Rotiload 4x) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Danach wurden die Proben kurz zentrifugiert und in einem diskontinuierlichen denaturierendem Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamidgel (SDS-Page) aufgetrennt. Alle Proteine wurden mit einem 10 %-SDS-Trenngel aufgetrennt, mit Ausnahme von Cx30, hier kam ein 12 %-Gel zum Einsatz. Die Auftrennung dauerte 1-1,5 h bei 80-180 V. Um die Größe der Proteine abzuschätzen wurde ein Proteinstandart neben den Proben aufgetragen. Da die verwendeten Marker mit einem Farbstoff konjugiert waren, um direkt das Laufen der Proteine im Gel beobachten zu können, gab es kleine Laufungenauigkeiten bei einzelnen Banden (Abbildungen 16-20). Die aufgetrennten Proteine wurden nach der Western Blot (WB) Methode auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran transferiert (100 V, 1 h). Anschließend wurden die Membranen 1 h lang mit der Blockierungslösung (5 % Milchpulver in TBST) inkubiert. Als nächstes fand die Inkubation mit den Primärantikörpern bei +4°C ü.N. statt: rabbit anti Cx43 (1:5000), rabbit anti Cx30 wurde als Einziger 2 x ü.N. inkubiert (1:250), rabbit anti TAK-1 (1:1000), rabbit polyklonal anti P-TAK-1 (1:1000), rabbit anti p38 (1:1000), mouse anti GS (1:1000), mouse anti α -Tubulin (1:10.000). Alle Antikörper wurde im TBS-Puffer mit 0,05 % Tween-20 und 5 % Magermilchpulver (pH 7,4) aufgelöst. Die Visualisierung erfolgte mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern. Für diesen Zweck wurden die Membranen erst dreimal für 10 min mit TBST gewaschen, um die ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Darauf folgte eine Inkubation mit den Sekundärantikörpern für 1 h bei RT. Für die Entwicklung der Signale kam Super Signal West Dura Substrat zum Einsatz. Die Chemolumineszenz wurde am GeneGnome-System detektiert und aufgezeichnet.

Die Kontrolle der korrekten Beladung der Gele wurde mithilfe von α -Tubulin durchgeführt. Für das Entfernen der Antikörper wurde Stripping Buffer benutzt. Die Inkubation der Membranen dauerte jeweils 10 min bei RT auf einem Schüttler. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageJ Software. Die Intensität der Chemolumineszenz jeder Bande wurde vermessen und gegenüber der dazugehörigen Tubulin-Bande normiert. Da alle Proben einer Membran der identischen Entwicklungsbedingung (Substrat und Zeit) ausgesetzt wurden, war dadurch ein relativer Vergleich der Proteinexpression zwischen unterschiedlichen Proben möglich.

2.3.12 Mikroskopische Aufnahmen

Die Dokumentation der gefärbten Schnitte erfolgte am Axiophot Mikroskop, das mit einer digitalen SPOT Kamera und MetaView Software ausgestattet war. Um die unterschiedlichen Fluoreszenzsignale aufnehmen zu können, wurden folgende Filterkombinationen benutzt (Anregung/Emission): 340/425 nm (blau), 500/550 nm (grün) und 580/630 nm (rot). Die Bilder wurden mit ImageJ Software analysiert. Veränderungen wurden nur an den Parametern Farbe, Kontrast und Helligkeit durchgeführt.

2.3.13 Körpertemperaturmessungen

Für die Messungen der Körpertemperatur wurden den Mäusen zwei Tage vor der Messung temperatursensitive Transponder implantiert. Diese Transponder waren ca. 2 x 10 mm groß und ließen sich mit einer Spezialspritze leicht unter die Haut einführen. Danach wurden die Tiere beobachtet. Wichtig für das weitere Vorgehen war, dass die Wunde gut verheilte und dass keine Anzeichen einer Entzündung erkennbar waren. Bei Ausbleiben von Entzündung wurden die Tiere für weitere Experimente freigegeben. Die Benutzung der Transponder ermöglichte die Körpertemperatur der Tiere zu messen, ohne sie aus dem Käfig nehmen zu müssen. Das hat Vorteile gegenüber den sonst üblichen rektalen Messungen, da dadurch die Tiere bei gleicher Umgebungstemperatur im Käfig bleiben können. Die Handhabung der Tiere für rektale Messungen ist auch eine Quelle für mögliche Abweichungen, denn die Tiere werden vor allem bei Messreihen über einen längeren Zeitraum massiv gestresst, was zu einem Temperaturanstieg führen würde.

2.3.14 Hyperthermie-induzierte Fieberkrämpfe

In allen Versuchen wurde die HT an Tieren im Alter von 14-15 Tagen (p14-p15) durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt zeigen die Tiere die höchste Empfänglichkeit für FK (Dube et al., 2000; Dube et al., 2005). Die Ausnahme von dieser Regel bildeten die repetitiven HT-Behandlungen an CSS2-Mäusen. Damit hier das für die Entstehung der FK optimale Alter von 14-15 Tagen nicht überschritten wurde, erfolgten die ersten Experimente an p12-p13 alten Mäusen. Für repetitive Behandlungen ergaben sich folgende Schemata: p12-p13-p14 oder p13-p14-p15, die Tiere bekamen je eine 35-minütige HT-Sitzung an drei aufeinander folgenden Tagen.

Für die Experimente, die das Auftreten spontaner Anfälle untersuchten, sind die Tiere 35 Minuten lang behandelt worden. Die hGFAP-EGFP-Mäuse nur einmal, während die CSS2-Mäuse drei HT-Behandlungen bekamen (s. oben).

Das Gewicht der Tiere sollte mindestens 6 g betragen, um die Überlebenschancen zu erhöhen und eine Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsreihen zu gewährleisten. Für diesen Zweck wurde die Anzahl der Tiere pro Wurf auf 4-5 Tiere reduziert. Es kamen nur Männchen zum Einsatz. Alle Versuche wurden zwischen 8 und 12 Uhr durchgeführt, die einzige Ausnahme bildeten hGFAP-EGFP-Mäuse mit zwei HT-Behandlungen am gleichen Tag (siehe oben).

Aufgrund des jungen Alters der Versuchstiere befanden sich diese vor und nach den Experimenten bei der Mutter und den Geschwistern im Käfig. Zu Beginn jedes Experiments wurden die Mäuse gewogen, anschließend erfolgte die Messung der Körpertemperatur. Für die HT wurden die Tiere auf den Boden eines 3 l Becherglases gesetzt. Der Boden war mit einem zwei-lagigen Baumwolltuch bedeckt. Das Becherglas befand sich in einem Wasserbad, das auf 39°C vorgewärmt war, um ein Abkühlen der Tiere zu vermeiden. Zusätzlich konnte so auch die überflüssige Hitze abgeleitet werden. Die Tiere wurden mit einem ca. 48°C-warmen Luftstrahl eines Föns erwärmt. Von den 6 möglichen Einstellungen für die Hitze und die Geschwindigkeit des Luftstrahls wurde die zweit-schwächste gewählt, um ein zu schnelles Aufheizen und Verbrennungen der Tiere zu verhindern. Der Abstand zwischen dem Fön und den Tieren betrug rund 50 cm. Die angestrebte Körpertemperatur von 41,5°C wurde innerhalb von wenigen Minuten erreicht. Die Temperatur von 42°C sollte zu keinem Zeitpunkt überschritten werden. Die Kontrolle der Temperatur erfolgte im Minutentakt. Ab einer gemessenen Körpertemperatur von 41,7°C wurde entweder die Stärke und Temperatur des Luftstrahls reduziert oder der ganze Luftstrahl neben das Becherglas umgeleitet bis die

Körpertemperatur Werte um 41,3°C erreicht hatte. Während der gesamten Dauer des Experiments wurde das Verhalten der Tiere beobachtet. Die Dauer der HT wurde gemessen ab dem Zeitpunkt, an dem die Tiere das Verhalten „plötzliche Immobilität“ zeigten. In diesem Stadium entstehen die ersten Spikes im Elektroenzephalogramm (EEG) (Dube et al., 2000; Dube et al., 2005). Die Dauer einer Behandlung betrug 30-35 min. Nach der HT-Sitzung wurden die Mäuse gewogen, auf eine kühle (RT) Nierenschale aus Stahl gelegt bis die normale Körpertemperatur erreicht wurde und anschließend zurück in den Käfig zu der Mutter gebracht.

Die Analyse der funktionellen Kopplung in hGFAP-EGFP-Mäusen erfolgte 1 oder 5 Tage nach einer 30-minütigen HT-Behandlung. Bei den Langzeitexperimenten wurde die astrozytäre Kopplung erst nach 88 Tagen (hGFAP-EGFP) und nach 109 Tagen (CSS2) untersucht.

Für die Kontrollexperimente wurden die nicht behandelten Geschwistertiere verwendet.

2.3.15 Implantation der EEG-Elektroden und Video-Monitoring

Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Peter Bedner durchgeführt. Die Mäuse wurden mit einem Gemisch aus Medetomidin (0,3 mg/kg, i.p.) und Ketamin (40 mg/kg, i.p.) anästhesiert und in dem stereotaktischen Rahmen fixiert. Der Schädelknochen wurde im Bereich des Bregmas mit einem Hautschnitt freigelegt und die Knochenhaut in diesem Bereich entfernt. Anschließend erfolgten zwei Bohrungen von jeweils 0,7 mm Durchmesser jeweils 1,9 mm caudal und 1,5 mm lateral des Bregmas durch den Schädelknochen. In beide Bohrlöcher wurden Schrauben eingedreht (2 mm Länge und 0,8 mm Durchmesser). Für die Implantation der telemetrischen Transmitter wurde im Bereich der Flanke mit einem ca. 15 mm langen Schnitt die Haut eröffnet und eine Hauttasche in der Größe des Transmitters freipräpariert. Die Elektroden wurden subkutan nach cranial gezogen und an den Schrauben fixiert. Zusätzlich wurden die Schrauben mit Zahnzement fixiert und die Haut darüber vernäht. Der desinfizierte Sender wurde in die vorher präparierte Hauttasche eingesetzt und die Haut mit Wundklammern verschlossen. Danach bekamen die Mäuse drei Tage lang Injektionen mit Carprofen (4 mg/kg, i.p.) zur Schmerzlinderung. Die Zugabe von 0,25 % Enrofloxacin zum Trinkwasser sollte das Risiko einer Infektion reduzieren. Die Käfige mit den zu untersuchenden Tieren wurden auf Receiver Platten (RPC-1) gehalten, die die Signale

der Transmitter empfangen, die dann an einen Computer unter Nutzung der Dataquest A.R.T. 4.00 Gold/Platinum Software ausgewertet wurden.

Gleichzeitig war es möglich das Verhalten der Tiere über ein mit zwei Infrarotkameras (Axis 221 Indoor Vario) ausgestattetes Videoüberwachungssystem zu beobachten. Die Videoaufnahmen wurden mithilfe der Software SeeTec Office 5 aufgenommen, wiedergegeben und gespeichert.

2.3.16 Datenanalyse

Alle Fehlerbalken in den Balkendiagrammen repräsentieren die Standardabweichung (SD). Die Zahlen im unteren Bereich der Balken geben die Anzahl der untersuchten Tiere an. Für die statistische Auswertung sind folgende Verfahren angewandt worden: beim Vergleich zweier Gruppen kam der Student'sche T-Test zum Einsatz; bei mehr als zwei Gruppen ist die zweiseitige Varianzanalyse (ANOVA) und anschließend der Tukey-Test benutzt worden. In allen Fällen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % angenommen ($p < 0,05$).

Auf Ausnahmen von diesen Regeln wird ausdrücklich im Text und in der Abbildungsbeschriftung hingewiesen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Funktionelle interastrozytäre Kopplung unter entzündlichen Bedingungen

3.1.1 Einfluss der proinflammatorischen Zytokine und LPS auf die astrozytäre Kopplung *in situ*

Im Mittelpunkt dieser Experimentenreihe stand die Frage, ob proinflammatorisch wirkende Substanzen die Kopplung zwischen Astrozyten im intakten Gewebe beeinflussen können. Für diesen Zweck wurden 200µm dicke akute Hirnschnitte von Mäusen in einer Lösung aus ACSF und dem jeweiligen Reagenz für mindestens 3 bis 5 h inkubiert und anschließend der funktionalen Kopplungsanalyse unterzogen. Folgende Substanzen kamen zum Einsatz: IL-1β (10 ng/ml), TNFα (10 ng/ml), Kombination aus IL1β und TNFα (je 10 ng/ml), LPS (1 µg/ml). Die Entscheidung, die Dauer der Inkubation auf mindestens drei Stunden festzulegen, beruhte darauf, dass die erwartete Entkopplung sowohl durch schnelle enzymatische Reaktionen als auch durch die langsamer ablaufende Modulation der Genexpression ablaufen könnte. Die Gap Junction-vermittelte funktionelle Kommunikation zwischen den Astrozyten im Hippokampus wird hauptsächlich durch Cx43 vermittelt (Dermietzel et al., 1991; Giaume et al., 1991). Die Turnover-Zeit dieses Proteins wurde als Grundlage für die Beurteilung einer angemessenen Inkubationszeit herangezogen. Genaue Angaben über die Eigenschaft in den Astrozyten im Hippokampus der Mäuse liegen nicht vor. Es gibt jedoch einige Studien an kultivierten Astrozyten und Myozyten, die einen Rahmen von 1 bis 3 Stunden für die Umsatzrate von Cx43 Kanälen festgestellt haben (Beardslee et al., 1998; Hertzberg et al., 2000; Laird et al., 1991). Somit war die Annahme vertretbar, dass sich mögliche Veränderungen der Cx43 Expression nach 3 Stunden auf die Kopplung auswirken. Die Kontrollschnitte wurden gleich behandelt und ebenfalls mindestens drei Stunden lang in reiner ACSF Lösung inkubiert.

Alle Kopplungsanalysen wurden mit hGFAP-EGFP Mäusen durchgeführt (Nolte et al., 2001). In diesen Tieren wird das Gen für das grünfluoreszierende Protein (enhanced green fluorescent protein, EGFP) unter der Kontrolle des GFAP-Promotors exprimiert. Folglich sind im Hippokampus zwei Populationen von fluoreszierenden Zellen sichtbar: NG2-Gliazellen erscheinen schwach leuchtend und haben feinere, weniger verzweigte Fortsätze. Dahingegen

fluoreszieren Astrozyten stärker, sind in der Regel größer und zeigen stark verzweigte Fortsätze (Wallraff et al., 2004). Der letztere Zelltyp wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die Identifizierung der Astrozyten erfolgte anhand der Fluoreszenz und des typischen zeit- und spannungsunabhängigen Strommusters.

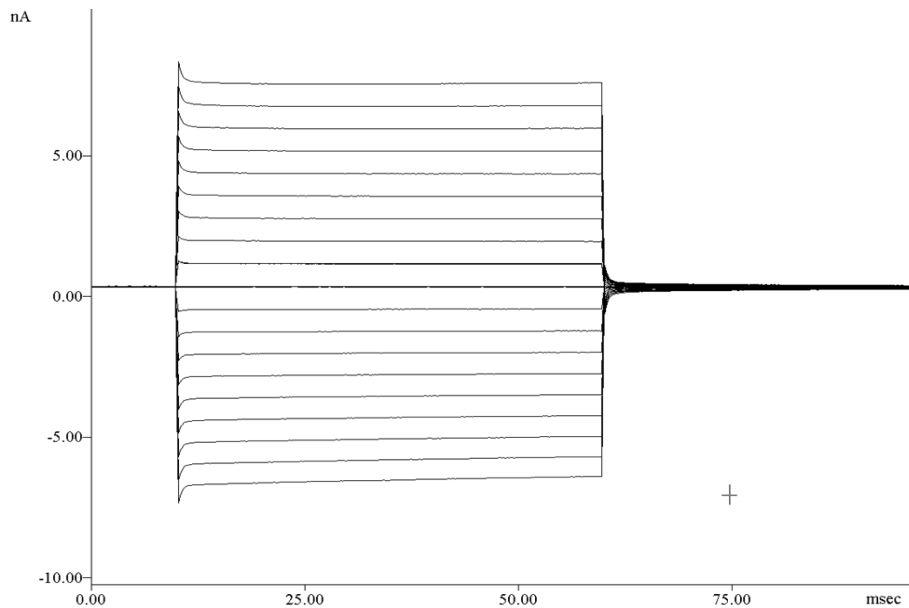


Abbildung 3: Strommuster eines Astrozyten. Ein Astrozyt aus dem *Stratum radiatum* der CA1-Region wurde in der Ganzzell-Konfiguration abgeleitet. Dargestellt ist das Ergebnis eines Stimulationsprotokolls mit jeweils 10 de- und hyperpolarisierenden Impulsen von 10 mV. Ein Spannungssprung von 10 mV führt zu einer linearen Veränderung des Stroms durch die Membran. Es entsteht ein sogenanntes „Strickleitermuster“.

Die elektrophysiologische Charakterisierung der Zellen erfolgte mittels der Patch-Clamp-Technik. Dabei wurden in der Ganzzellkonfiguration die Ströme über die gesamte Zellmembran abgeleitet und anhand des Musters der Zelltyp identifiziert. Für diesen Zweck wurde ein Stimulationsprotokoll durchgeführt, das in unserem Labor als R50 bezeichnet wird. Hierbei wird das Membranpotential der Zellen ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV auf Werte zwischen -180 mV und +20 mV in 10 mV-Schritten geklemmt. Das Muster der resultierenden Ströme ist in der Abbildung 3 dargestellt. Astrozyten zeichnen sich durch eine hohe Kaliumleitfähigkeit und die daraus resultierenden großen Ströme durch die Membran aus. Da bei den meisten beteiligten Kanälen es sich um passive Kaliumkanäle handelt, führt jeder Spannungssprung zu einem linearen An- oder Abstieg des Stromes über die Membran, es entsteht das typische zeit- und spannungsunabhängige „Strickleitermuster“.

Zellen, die anhand der Fluoreszenz und des Strommusters als Astrozyten identifiziert wurden, wurden anschließend für 20 min in der Ganzzellkonfiguration gehalten. Während dieser Zeit konnte das in der Pipetten-Innenlösung enthaltene Biozytin in das Soma der abgeleiteten Zelle diffundieren und sich gegebenenfalls durch die Gap Junction Kanäle in benachbarte Zellen ausbreiten. Biozytin wurde erstmals im Jahr 1988 zur Markierung von Neuronen in Gehirn verwendet (Horikawa and Armstrong, 1988). Darauf folgten Kopplungsuntersuchungen an Neuronen (Christie and Jelinek, 1993; Colling et al., 1996), bis die Methode für die Analyse der astrozytären Kopplung weiter entwickelt wurde (Ransom and Kettenmann, 1990). Die Ausbreitung des Biozytins durch das gliale Netzwerk reflektiert somit das Maß der Kopplung zwischen den Zellen. Während der Füllzeit von 20 Minuten wurden das Membranpotential und der Zugangswiderstand kontinuierlich beobachtet. Als Ausschlusskriterien galten folgende Parameter: 1) V_R positiver als -60 mV und /oder 2) $R_S + R_M$ höher als 30 MOhm.

	V_R (mV)	$R_S + R_M$ (M Ω)	Anzahl der Tiere	Anzahl der Messungen
Kontrollen	$72,9 \pm 5,7$	$12,9 \pm 3,1$	18	42
IL-1β	$74,5 \pm 5,3$	$12,7 \pm 1,6$	7	15
IL-1β und TNFα	$74,1 \pm 4,8$	$13,5 \pm 2,9$	11	31
LPS	$73,4 \pm 5,4$	$18,1 \pm 5,8$	5	16
db-cAMP	$72,7 \pm 4,3$	$15,3 \pm 5,1$	5	16
Kontrollen	$72,1 \pm 2,3$	$14,2 \pm 5,5$	5	16
IL-1β + TNFα+ XPro1595	$73,1 \pm 2,7$	$13,9 \pm 3,2$	3	11
Kontrollen (TLR4 KO)	$72,6 \pm 3,1$	$19,5 \pm 3,9$	2	10
TLR4 KO-LPS	$72,2 \pm 5,8$	$18,2 \pm 6,2$	2	10

Tabelle 3: Zusammenfassung der Mittelwerte der Zellparameter (V_R , R_S und R_M) bei den Inkubationsexperimenten.

In Tabelle 3 sind die Membraneigenschaften der vermessenen Zellen zusammengefasst. Die einzelnen Versuchsreihen mit vergleichbaren Versuchsbedingungen sind durch dicke Umrahmung hervorgehoben. Die erhobenen Messwerte wurden nur innerhalb einer Versuchsreihe verglichen und statistisch analysiert. Eine Ausnahme bildet die letzte Gruppe mit TLR4KO-Mäusen. Aufgrund der Tatsache, dass die Tiere sich nur sehr schwer verpaaren ließen, konnte nur eine begrenzte Zahl von Experimenten durchgeführt werden. Mit den Ergebnissen von nur zwei Versuchstieren ist keine sinnvolle statistische Auswertung möglich, so dass hier die Messparameter nur der Vollständigkeit halber angegeben werden, jedoch ohne jegliche Signifikanzprüfung. Weitere Experimente müssen durchgeführt werden, um mögliche Unterschiede in diesem experimentellen Ansatz zu enthüllen. Der Vergleich innerhalb der Gruppen offenbarte lediglich einen signifikanten Unterschied: Der

Eingangswiderstand im Inkubationsexperiment mit LPS mit $18,1 \pm 5,8 \text{ M}\Omega$ war deutlich höher als unter allen anderen Bedingungen. Die in der Literatur beschriebene depolarisierende Wirkung der Entzündungsmediatoren auf das V_R der Astrozyten konnte in diesen Experimenten nicht bestätigt werden (Haghikia et al., 2008).

Nach dem Ablauf von 20 Minuten Füllzeit mit Biozytin wurden die Schnitte in 4 % PFA-Lösung bei 4°C über Nacht fixiert und anschließend mit Streptavidin-Cy3 angefärbt. Abbildung 4 zeigt beispielhaft drei Aufnahmen solcher Färbungen. Da sich das Biozytin im Gehirnschnitt in allen drei Dimensionen ausbreitet, wurden mehrere z-Ebenen mit einem Abstand von $1,5 \mu\text{m}$ aufgenommen, die die gesamte Kopplungswolke einschlossen. In Abbildung 4 sind zur besseren Anschaulichkeit der Kopplungswolken unter unterschiedlichen Bedingungen Projektionen solcher Stapel auf eine z-Ebene dargestellt. Rot leuchtende Punkte repräsentieren dabei die mit Biozytin gefüllten Zellsomata. In Abbildung 4A ist das Ergebnis der Kopplungsanalysen nach Inkubation in reinem ACSF dargestellt. Hier zeigt die Kopplungswolke die größte Ausdehnung, während der Zusatz von $10 \text{ ng/ml IL-1}\beta$ (Abbildung 4B) oder $1 \mu\text{g/ml LPS}$ (Abbildung 4C) zu einer signifikanten Reduktion der Zahl gekoppelter Zellen führte.

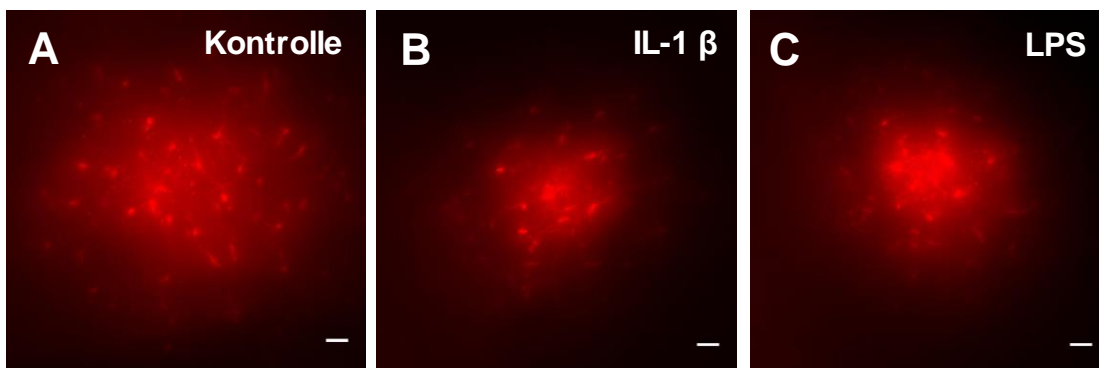


Abbildung 4: Proinflammatorische Zytokine und LPS reduzieren die Gap Junction-vermittelte Tracerdiffusion *in situ*. Maximumprojektion eines $200 \mu\text{m}$ Schnitts. **A:** Unter Kontrollbedingungen wurden die Schnitte für 3-5 h in ACSF inkubiert. **B:** Inkubation der Schnitte in ACSF mit $10 \text{ ng/ml IL-1}\beta$. **C:** Inkubation der Schnitte in ACSF mit $1 \mu\text{g/ml LPS}$. Maßstabsbalken: $20 \mu\text{m}$.

Die Auszählung der Biozytin-positiven Zellen erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ Software. Die Werte der jeweiligen Inkubationen wurden anschließend statistisch analysiert. Für jede Stichprobe wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Werte, die

mehr als die zweifache Standardabweichung von dem Mittelwert abweichen, wurden als Ausreißer definiert und aus der Berechnung ausgeschlossen. Dies war jedoch nur bei vier von insgesamt 151 Messpunkten der Fall.

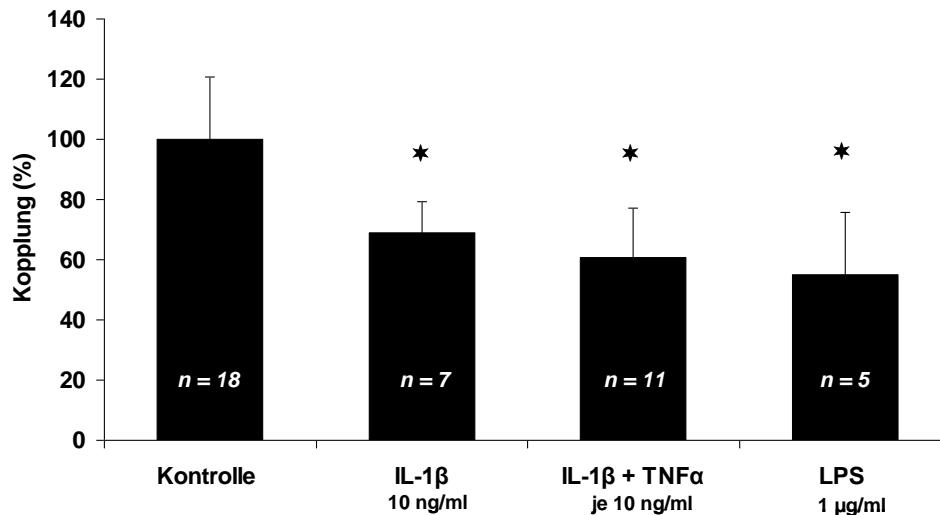


Abbildung 5: Wirkung der proinflammatorischer Zytokine auf die astrozytäre Kopplung *in situ*. Die Kopplung war signifikant reduziert nach Inkubation mit 10 ng/ml IL-1 β (69 %), Koapplikation von jeweils 10 ng/ml IL-1 β und TNF α (61 %) und 1 μ g/ml LPS (55 %). Die Werte geben das prozentuale Verhältnis zu den Kontrollen an (Kontrolle: $87,8 \pm 18,1$ Zellen, 42 Schnitte, 18 Tiere; IL-1 β : $60,5 \pm 9,1$ Zellen, 15 Schnitte, 7 Tiere; IL-1 β + TNF α : $53,4 \pm 14,4$ Zellen, 31 Schnitte, 11 Tiere; LPS: $48,3 \pm 18,1$ Zellen, 16 Schnitte, 5 Tiere). * signifikanter Unterschied, $p < 0,05$.

Für die Untersuchung der Wirkung der Immunmodulatoren auf die astrozytäre Kopplung *in situ* kamen folgende Substanzen und Konzentrationen zum Einsatz: IL-1 β (10 ng/ml), ein Gemisch aus TNF α und IL-1 β (jeweils 10 ng/ml) und LPS (1 μ g/ml). Das Ergebnis ist in der Abbildung 5 zusammengefasst. Alle drei Ansätze führten zu einer signifikanten Reduktion der Gap Junction-vermittelten Kommunikation.

Zur Untersuchung der Rolle von TLR4 bei der LPS-induzierten Reduktion der astrozytären Kopplung wurden eine weitere transgene Mauslinie analysiert, die C57Bl/10ScNJ-Mauslinie (The Jackson Laboratories). Diese Tiere haben eine spontane Deletion beider Allele des *Tlr4*-Gens erfahren. Dies hat zur Folge, dass sowohl die mRNA als auch das Protein fehlt und Stimulation mit LPS nicht mehr möglich ist. Die Tiere waren nur in begrenzter Zahl verfügbar, so dass diese Experimentenreihe nicht abgeschlossen werden konnte. Soweit war

die astrozytäre Kopplung in diesen Mäusen um rund 15 %, von $211,9 \pm 4,1$ auf $180,4 \pm 26,3$ Zellen reduziert (Abbildung 6).

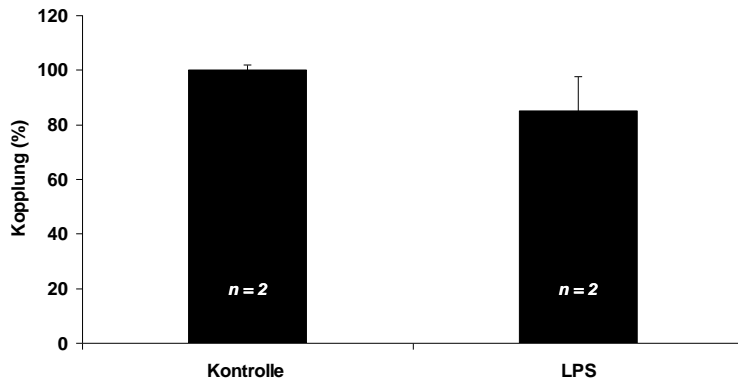


Abbildung 6: Effekt von LPS auf die astrozytäre Kopplung in TLR4 KO Mäusen. Hirnschnitte von TLR4 KO Mäusen (p138-141) wurden für 3-4,5 Stunden in ACSF (Kontrolle) bzw. ACSF mit $1\mu\text{g/ml}$ LPS inkubiert. Die durchschnittliche Anzahl der gekoppelten Zellen sank auf rund 15 %. Die Werte geben das prozentuale Verhältnis zur Kontrolle an (Kontrolle: $211,9 \pm 4,1$ Zellen, 10 Schnitte, 2 Tiere; LPS: $180,4 \pm 26,3$ Zellen, 9 Schnitte, 2 Tiere).

3.1.1.1 Wiederherstellung der funktionellen Kopplung *in situ* mit Hilfe von dibutyryl-cAMP

Experimente an kultivierten MG aus Ratten haben gezeigt, dass db-cAMP in der Lage ist die durch LPS induzierte Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ zu hemmen (Si et al., 1998). Um festzustellen, ob diese Hemmung der Freisetzung von Immunmodulatoren auch *in vivo* stattfindet und in der Lage ist, die funktionelle Kopplung zu beeinflussen, wurden die nächsten Experimente mit $100\mu\text{M}$ db-cAMP durchgeführt. Die akuten Schnitte wurden mit einem Gemisch aus $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und db-cAMP für 3-4,5 Stunden inkubiert. Abbildung 7C zeigt exemplarisch den Effekt von db-cAMP auf die Kopplung. Es ist eine deutliche Zunahme in der Zahl der gekoppelten Zellen im Vergleich zu der Inkubation nur mit $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ (Abbildung 7B) zu sehen.

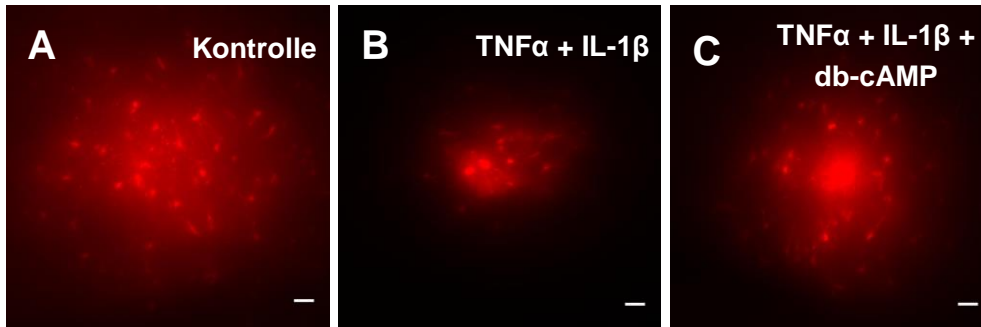


Abbildung 7: db-cAMP verhindert die Zytokine-induzierte Reduktion der funktionellen Kopplung *in situ*. Maximumprojektion eines 200µm Schnittes. **A:** Unter Kontrollbedingungen wurden die Schnitte für 3-4,5 h in ACSF inkubiert. **B:** Inkubation der Schnitte mit je 10 ng/ml IL-1β und TNFα für 3-4,5 Stunden. **C:** Inkubation der Schnitte wie in B jedoch zusätzlich mit 100 µM db-cAMP. Maßstabsbalken: 20 µm.

Die statistische Analyse bestätigte, dass die ursprüngliche Reduktion der Kopplung hervorgerufen durch Inkubation mit IL-1β und TNFα durch die Applikation von 100 µM db-cAMP wieder rückgängig gemacht werden konnte (Abbildung 8).

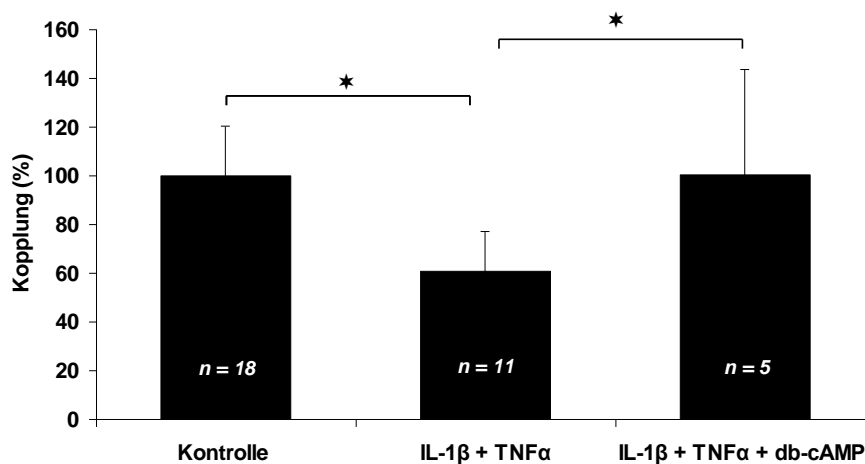


Abbildung 8: Wiederherstellung der Kopplung mit db-cAMP *in situ*. Die signifikante Reduktion der Kopplung durch IL-1β und TNFα (61 %) konnte mit 100 µM db-cAMP rückgängig gemacht werden (100,4 %). Die Werte geben das prozentuale Verhältnis zu den Kontrollen an (Kontrolle: 87,8 ± 18,1 Zellen, 42 Schnitte, 18 Tiere; IL-1β + TNFα: 53,4 ± 14,4 Zellen, 31 Schnitte, 11 Tiere; IL-1β + TNFα + db-cAMP: 88, 2 ± 38 Zellen, 16 Schnitte, 5 Tiere). Die Werte für Kontrolle und für die Inkubation mit IL-1β und TNFα entsprechen denen aus der Abbildung 5. * signifikanter Unterschied, p < 0,05.

3.1.1.2 Die protektive Wirkung des dominant-negativen TNF α Inhibitors XPro1595

Die Suche nach einem weiteren möglichen Therapeutikum gegen die Entkopplung der Astrozyten führte zur Untersuchung einer Substanz namens XPro1595. Es handelt sich hierbei um eine dominantnegativ wirkende Variante des TNF α , das hocheffektiv die Wirkung des löslichen TNF α hemmt, gleichzeitig das membrangebundene TNF α aber funktionstüchtig lässt (Brambilla et al., 2011; Sama et al., 2012).

Das experimentelle Vorgehen entsprach dem oben beschriebenen mit dem Unterschied, dass der Inkubationslösung 10 μ g/ml XPro1595 zugegeben wurde. Nach einer Inkubationsdauer von 3 Stunden wurden die Kopplungsanalysen gestartet. Diese Experimente wurden eigenständig behandelt, da hier die neue Methode der Astrozytenmarkierung mit SR101 zum Einsatz kam. Für diesen Zweck wurden neue Kontrollen gemessen. Das Ergebnis dieser Messungen ist in der Abbildung 9 dargestellt. Das Applizieren eines Gemisches aus je 10 ng/ml IL-1 β , TNF α und 10 μ g/ml XPro1595 führte zu keiner signifikanten Reduktion der interzellulären astrozytären Kommunikation.

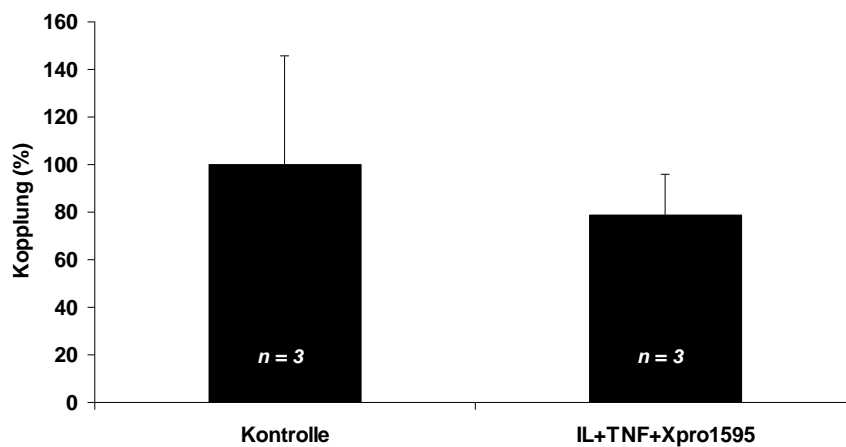


Abbildung 9: XPro 1595 unterbindet die inhibitorische Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen auf die Gap Junction-vermittelte Kopplung. In den Kontrollschnitten wurden $125,4 \pm 57,1$ Biozytin-positive Zellen gezählt (3 Tiere, 16 Schnitte), während nach der Inkubation mit einem Gemisch aus je 10 ng/ml IL-1 β und TNF α mit 10 μ g/ml XPro 1595 im Durchschnitt $98,8 \pm 21,6$ Zellen gekoppelt waren (3 Tiere, 11 Schnitte).

3.1.2 Einfluss von Entzündungsprozessen auf das astrozytäre Synzytium *in vivo*

3.1.2.1 Physiologische Veränderung bei den Mäusen nach einer intraperitonealen Injektion von LPS

Die reduzierte Kopplung nach Inkubation der akuten Gehirnschnitte mit Immunmodulatoren warf die Frage auf, ob diese Effekte auch *in vivo* reproduziert werden können. Zu diesem Zweck wurde ein Entzündungsmodell etabliert, bei dem durch eine einmalige i.p. Injektion von LPS eine langanhaltende Freisetzung von Entzündungsfaktoren wie IL-1 β und TNF α im Gehirn hervorgerufen wird (Qin et al., 2007). So war es möglich, eine endogene Sezernierung proinflammatorischer Zytokine zu induzieren, ohne dabei das Gehirn mechanisch zu verletzen. Um ein möglichst vollständiges Bild von den ablaufenden Prozessen zu bekommen, sind eine Reihe unterschiedlicher physiologischer Faktoren dokumentiert worden.

3.1.2.1.1 Änderung der Körpertemperatur.

Als erstes wurde die Frage untersucht, wie sich die Körpertemperatur durch die Injektion von LPS ändert. Die Messung der Körpertemperatur wurde sofort nach der LPS-Injektion gestartet und dauerte sechs Tage. Eine Übersicht darüber ist in der Abbildung 10 zu sehen.

Um die Änderung der Körpertemperatur beurteilen zu können, wurden zuerst Kontrollmessungen durchgeführt. Dazu wurde die Körpertemperatur von unbehandelten Tieren drei Tage lang beobachtet und aufgezeichnet. Wie in der Abbildung 10A zu sehen, pendelten die Werte in Abhängigkeit von der Aktivität der Tiere zwischen 35°C und 37°C. Die Messungen erfolgten nur tagsüber, so dass der genaue zirkadiane Rhythmus der Körpertemperatur nicht aufgezeichnet werden konnte. Jedoch schien die Aktivität der Tiere einen größeren Einfluss auf die Temperatur zu haben als die Tageszeit. Wie in Abbildung 10A ersichtlich, schwankte die Körpertemperatur der beiden vermessenen Mäuse im Tagesverlauf beträchtlich.

Die individuellen Unterschiede in der Körpertemperatur wurden durch die i.p. Injektion von 5 mg/kg LPS wieder angeglichen. Die Abbildung 10B zeigt die dazugehörigen Kurven. Innerhalb von 10 Minuten stieg die Körpertemperatur der Mäuse von 35,6°C (Maus 1) bzw. 36,2°C (Maus 2) auf 37°C bzw. 37,8°C an. Dieser Anstieg war sowohl zu gering als auch zu schnell um auf eine direkte Wirkung von LPS zurückgeführt werden zu können. Sehr

wahrscheinlich handelte es sich dabei um die Folge der Aufregung und erhöhter Aktivität der Tiere während der Injektion. Rund 20 Minuten nach der Injektion setzte jedoch ein stetiger und starker Abfall der Temperatur ein. Dieser Effekt ist bekannt und gut beschrieben für hohe Dosen von LPS (Ochalski et al., 1993; Steiner et al., 2011). Zeitgleich setzte auch die motorische Hypoaktivität ein. Die normalen Nahrungsaufnahme und Agilität stellten sich erst am Tag 4 wieder ein. Im Laufe des ersten Tages sank die Temperatur auf rund 25°C und war bei beiden Tieren nahezu identisch. Zu Beginn des zweiten Tages lagen die Werte bei ca. 30°C, entwickelten sich jedoch unterschiedlich. Gegen 19 Uhr betrug die Körpertemperatur der ersten Maus nur noch 29,5°C, während die zweite Maus knapp 34°C warm war. In den Tagen darauf normalisierte sich die Temperatur der Mäuse allmählich und nahm Werte zwischen 35°C und 37°C an.

Bei der Dekapitierung am Tag 5 nach der LPS-Injektion war eine Besonderheit gegenüber unbehandelten Tieren zu beobachten. Nach der Dekapitation tritt normalerweise viel Blut aus, zuweilen spritzt es aus der Wunde. Bei den mit LPS behandelten Tieren war das jedoch nicht der Fall. Die Wunde blieb immer blutarm, man konnte nie die sonst üblichen Blutspritzer beobachten. Die Ohren und Schwänze der Tiere erschienen auch ausgesprochen blass. Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass der Blutdruck der Tiere nach einer einmaligen Injektion von LPS absinkt und auch noch am Tag 5 niedrig bleibt.

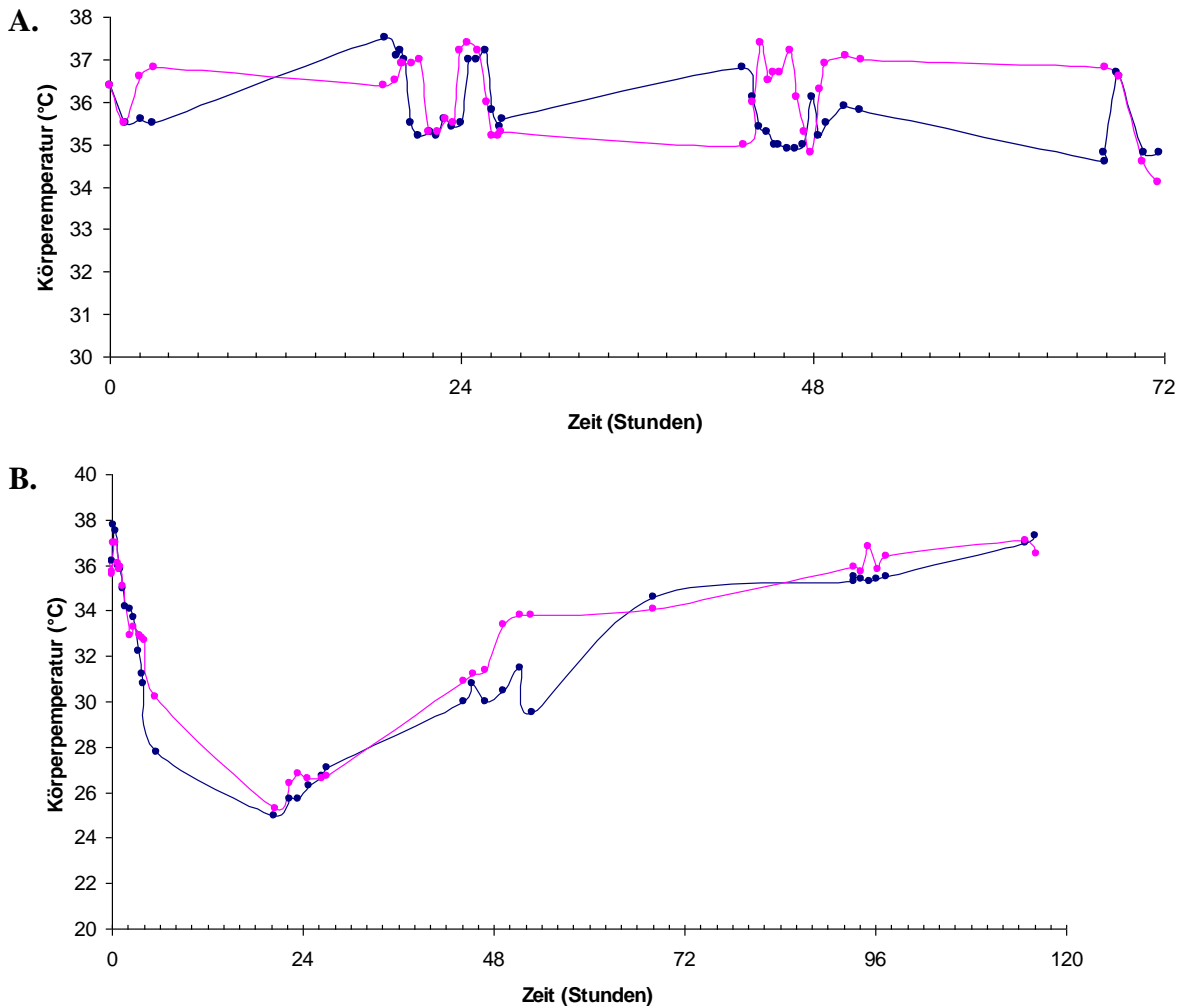


Abbildung 10: Verlauf der Körpertemperatur vor und nach einer einmaligen i.p. Injektion von LPS (5 mg/kg Gewicht). **A:** Änderung der Körpertemperatur im Tagesverlauf in unbehandelten Tieren (Maus 1 blaue Linie, Maus 2 rosa Linie). **B:** Körpertemperatur adulter Mäuse nach einer einmaligen Injektion von 5 mg/kg LPS. Die i.p. Injektion erfolgte zum Zeitpunkt 0. In beiden Graphen entspricht der Zeitpunkt 0 Stunden der Tageszeit von 14:30.

3.1.2.1.2 Aktivierung der Mikroglia nach LPS-Stimulation

Eines der typischen Merkmale einer Entzündung im Gehirn ist die Aktivierung der MG. Unter anderem haben diese Zellen die Funktion der Immuneffektorzellen. Damit ist gemeint, dass MG auf pathologische Veränderungen des Gehirns, wie z.B. erhöhte Zytokinkonzentrationen, reagieren können. Dieses beinhaltet eine Umwandlung zu einem aktivierten Phänotyp und Freisetzung von weiteren proinflammatorischen Substanzen (Banati et al., 1993). Um

festzustellen, ob die MG nach einer einmaligen i.p. Injektion von 5mg/kg LPS aktiviert werden, wurden Immunfärbungen mit Iba I Antikörper angefertigt. Dieser Antikörper färbt sowohl ruhende als auch aktivierte MG. Drei Gewebetypen wurden untersucht: von Kontrolltieren sowie von solchen 1 bzw. 5 Tage nach der LPS-Injektion.

Das Ergebnis der Iba I-Färbungen ist in Abbildung 11 dargestellt. Es handelt sich hierbei um eine Maximumprojektion der rund 30 optischen Schnitte. Dargestellt ist das *Stratum radiatum* der CA1 Region im Hippokampus. Der Phänotyp und die Größe der MG ist unter Kontrollbedingungen (A, D) und einen Tag nach der LPS-Injektion (Bilder B und E) sehr ähnlich. Die Zellkörper erscheinen rund, oval bis länglich mit wenigen dünnen Fortsätzen. Im Gegensatz dazu, sind die Zellen 5 Tage nach LPS-Injektion (C, F) größer und anders geformt. Die Umriss der Zellkörper sind nicht mehr so rund wie an Tag 1 oder bei unbehandelten Tieren. Die Fortsätze treten stärker in Erscheinung und dadurch ändert sich das Erscheinungsbild des Zellkörpers, er nimmt eine eckigere Form an. Es sind mehr Fortsätze sichtbar, diese sind größer und dabei stärker verzweigt. Charakteristisch ist auch das Auftreten von kleinen rundlichen Verdickungen, die das Gewebe perforiert erscheinen lassen.

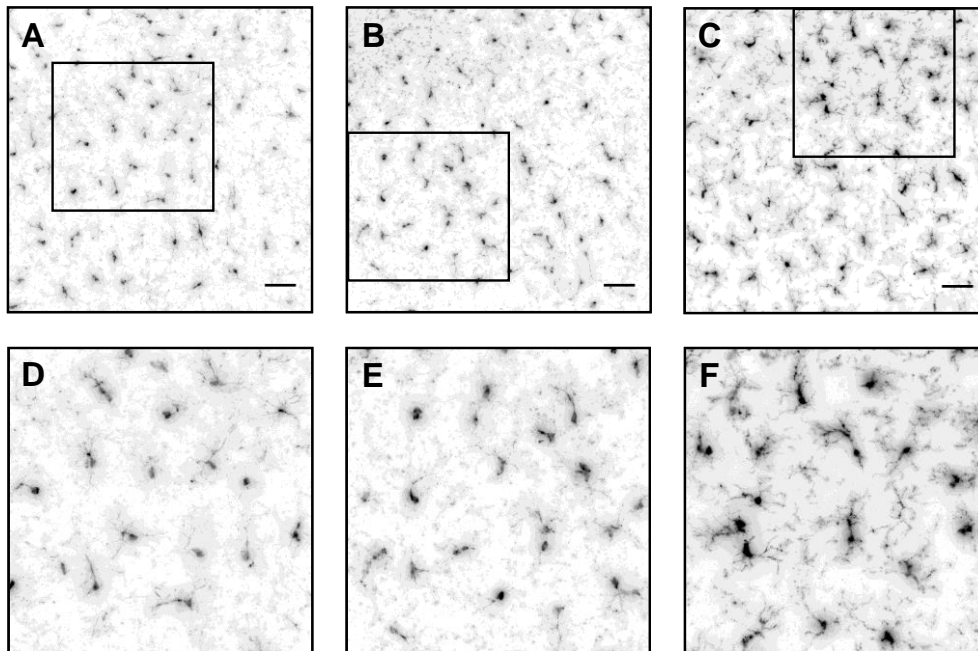


Abbildung 11: LPS-Injektion aktiviert die Mikroglia im Hippokampus. Maximumprojektion von 40 µm Schnitten. Unter Kontrollbedingungen (A und D) sieht man die MG in ihrem ruhenden Zustand. Das Aussehen der Zellen 1 Tag nach LPS-Injektion (B, E) ist unverändert. Die Bilder C und F zeigen eine deutliche Aktivierung der MG 5 Tage nach der LPS-Injektion. Bilder D, E und F stellen jeweils die Vergrößerung des gekennzeichneten Bereichs der darüber liegenden Bilder A, B und C dar. Messbalken = 50 µm.

Um eine genauere Aussage über die Mikrogliaaktivierung treffen zu können, wurde die relative Fluoreszenzintensität der Iba I-Signale miteinander verglichen. Für diesen Zweck wurden alle Aufnahmen mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen. Die relative Fluoreszenzintensität von je drei gleich großen Arealen des *Stratum radiatum* der CA1 Region wurde zusammengefasst und als Mittelwert dargestellt. Abbildung 12 zeigt die Mittelwerte aus jeweils drei Aufnahmen unter Kontrollbedingungen, sowie 1 und 5 Tage nach der LPS-Injektion. Die statistische Analyse bestätigt, dass nur 5ds Tage nach LPS-Injektion die MG signifikant aktiviert wurden. Setzt man den Kontrollwert auf 100 %, so beträgt der Mittelwert einen Tag nach LPS Injektion rund 103 % und erhöht sich signifikant nach 5 Tagen auf 163 %.

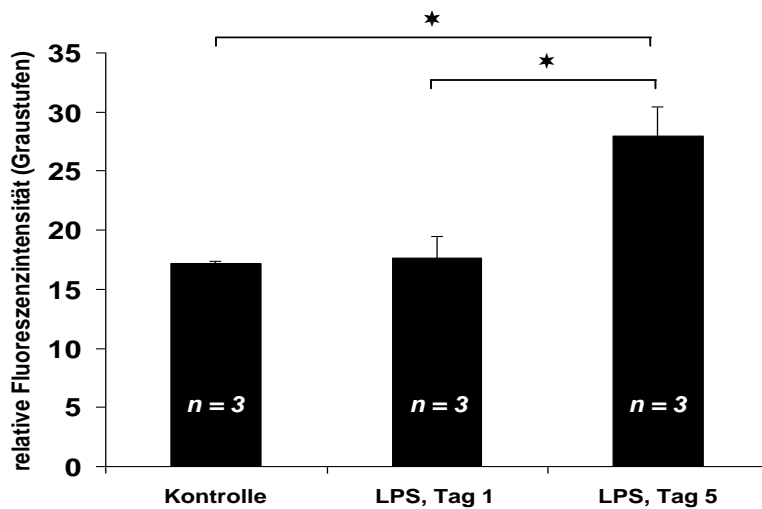


Abbildung 12: Quantifizierung der Iba I Färbung im Hippokampus vor und nach LPS-Injektion. Das Iba I-Signal war 5 Tage nach der LPS-Injektion (5 mg/kg i.p.) mit 163 % (relative Fluoreszenzintensität = 27,9) verglichen mit dem Kontrollwert (relative Fluoreszenzintensität = 17,2) signifikant erhöht. 1 Tag nach der Injektion wurde keine signifikante Erhöhung gemessen (relative Fluoreszenzintensität = 17,7). * signifikanter Unterschied, $p < 0,05$.

3.1.2.2 *In vivo* Auswirkung der Entzündung auf die funktionelle Kopplung

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass eine einmalige LPS-Injektion mit 5 mg/kg ausreichend ist, um die MG im Hippokampus zu aktivieren und somit eine endogene Freisetzung von Zytokinen zu ermöglichen. Zur Untersuchung der Effekte der Zytokine auf die Gap Junction-vermittelte Kopplung zwischen Astrozyten *in vivo* wurde die Biozytin-Diffusionsmethode angewandt.

Diese Serie von Experimenten wurde mit hGFAP-EGFP Mäusen durchgeführt, die zwischen 8 und 10 Wochen alt waren. Da es Hinweise darauf gab, dass die interzelluläre Kommunikation der Astrozyten sich altersabhängig verändert, war es notwendig, neue Kontrollen zu messen. Somit handelt es sich um eine neue, in sich abgeschlossene Experimentreihe. In Tabelle 4 sind V_R , R_m und R_s der verschiedenen Ansätze zusammengefasst. Die Varianzanalyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen.

	V_R (mV)	R_m (M Ω)	R_s (M Ω)	Anzahl der Tiere	Anzahl der Messungen
Kontrollen	77,3 \pm 3,6	3,1 \pm 1,6	14,2 \pm 3,3	5	18
LPS, Tag 1	73,7 \pm 6,4	2,8 \pm 1,2	13,9 \pm 4,1	8	38
LPS, Tag 5	72,8 \pm 5,7	4,1 \pm 1,7	10,6 \pm 4,3	6	21
LPS + LEV, Tag 5	77,1 \pm 2,8	3,1 \pm 1,5	12,8 \pm 5,2	5	19
Kontrollen + LEV	78,2 \pm 1,7	3,6 \pm 1,3	15,1 \pm 3,2	3	10

Tabelle 4: Zusammenfassung der Mittelwerte der Zellparameter (V_R , R_S und R_M) bei den *in vivo* Experimenten.

In der Abbildung 13 (A, B und C) sind drei repräsentative Bilder der Biozytinfärbungen zu sehen. Im Einklang mit den Iba I Färbungen, sieht man zwischen der Kontrolle und einem Tag nach LPS-Injektion keinen Unterschied in der astrozytären Kopplung, während 5 Tage nach Injektion die Gap Junction-vermittelte Kommunikation stark reduziert war. Dieses Ergebnis wurde durch die statistische Auswertung bestätigt (Abbildung 13D). Unter Kontrollbedingungen waren $104 \pm 19,7$ (100 %) Zellen gekoppelt, einen Tag nach der LPS-Injektion $112,6 \pm 24$ (108 %). Am Tag 5 waren jedoch im Durchschnitt nur $56,5 \pm 25,2$ Biozytin-positive Zellen (54,3 %) gezählt worden. Die Varianzanalyse (ANOVA) zeigte, dass die Biozytinausbreitung an Tag 5 sich signifikant von den anderen Messungen unterscheidet.

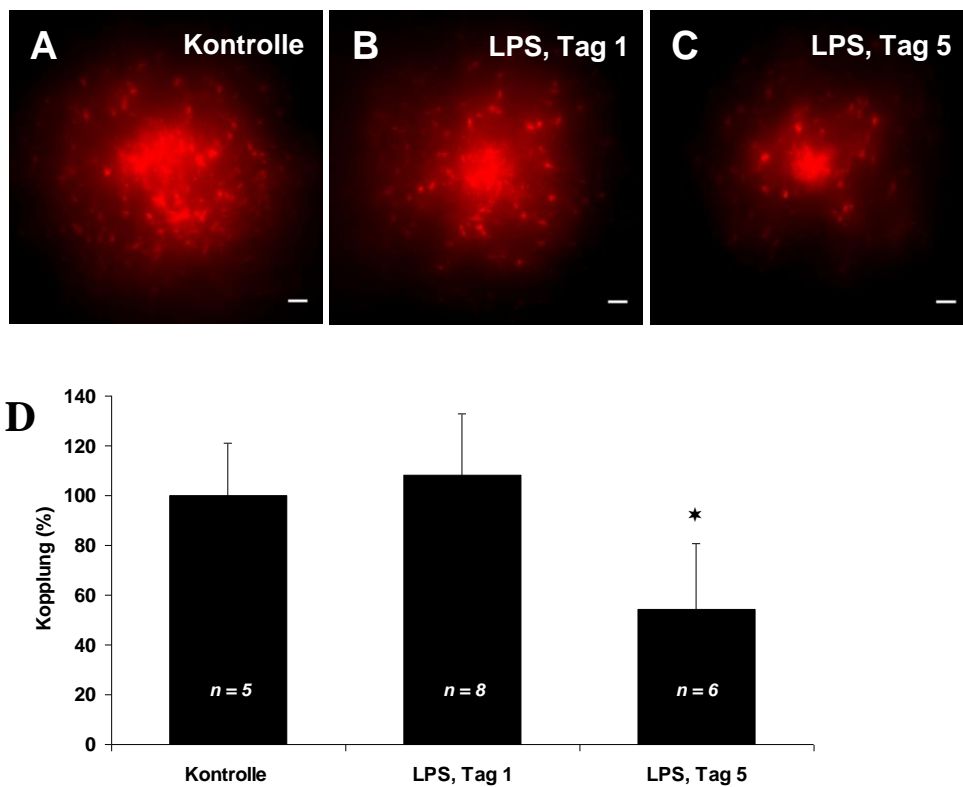


Abbildung 13: Funktionelle Kopplung der Astrozyten nach LPS-Injektion. A, B und C zeigen repräsentative Aufnahmen der mit Biozitin gefüllten Astrozyten in akuten Gehirnschnitten unter den jeweiligen Bedingungen. Die Entzündung wurde durch eine einmalige i.p. Injektion mit 5mg/kg LPS ausgelöst. Die Kopplungswolken unter Kontrollbedingungen und 1 Tag nach der LPS-Injektion sind vergleichbar gleich groß. Nach 5 Tagen ist die Kopplung stark reduziert. Maßstabsbalken = 20 μ m. **D:** Statistische Auswertung der Kopplungszahlen. Nur 5 Tage nach der LPS-Injektion war die Kopplung signifikant auf rund 54 % reduziert (Kontrolle: $103,9 \pm 19,7$ Zellen, 18 Schnitte, 5 Tiere; Tag 1 nach LPS: $112,6 \pm 24$ Zellen, 38 Schnitte, 8 Tiere; Tag 5 nach LPS: $56,5 \pm 25$ Zellen, 21 Schnitte, 6 Tiere). * signifikanter Unterschied, $p < 0,05$.

3.1.2.2.1 Verhinderung der Entkopplung mit Hilfe von Levetiracetam

In Anlehnung an die *in situ* Experimente ist auch in dieser Versuchsreihe die Frage untersucht worden, ob es möglich ist die verminderte astrozytäre Kopplung wiederherzustellen. Zu diesem Zweck wurde LEV verwendet, das erfolgreich als AED eingesetzt wird. Das besondere an LEV ist, dass es bereits Hinweise darauf gibt, dass es in Zellkultur entzündungshemmende Eigenschaften besitzt (Haghikia et al., 2008). Laut Grim (Grim et al., 2003) weisen Patienten nach 4 Wochen Behandlung mit ausreichender Dosis LEV eine Serumkonzentration von knapp 50 μ g/ml auf. Um diese Situation in den Mäuse nachzuahmen, wurde basierend auf den Ergebnissen von Margineanu (Margineanu et al., 2008) eine

Tagesdosis von 300 mg/kg pro Tag berechnet. Um eine möglichst gleichmäßige Konzentrationsverteilung des Wirkstoffs im Blut zu gewährleisten, wurde die Gabe auf zwei i.p. Injektionen täglich verteilt, eine morgens und eine abends.

Nach 5 Tagen erfolgte die auf der Methode der Biozytin-Diffusion basierende Untersuchung der interastrozytären Kommunikation. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 14 dargestellt. Die Bilder A, B und C zeigen wieder drei repräsentative Aufnahmen der Biozytin-positiven Astrozyten. Dabei fällt sofort ins Auge, dass die Behandlung mit LEV die Ausdehnung der Biozytin-Diffusion deutlich erhöht hat. Die quantitative Auswertung der Kopplungszahlen bestätigt diese Beobachtung (Abbildung 14D). Die durch LPS auf 54 % reduzierte Kopplung konnte mit LEV auf 134 % gesteigert werden.

Die Erhöhung der Kopplung um mehr als 30 % gegenüber Kontrollen warf die Frage auf, ob LEV in der Lage ist, die Gap Junction-vermittelte Kommunikation auch im gesunden Gewebe zu beeinflussen. Für diesen Zweck erhielten Mäuse des gleichen Genotyps und Alters wie in den vorangegangenen Experimenten 5 Tage lang die gleiche Menge LEV wie während der LPS-LEV-Applikation. Das Ergebnis der Untersuchung ist in der Abbildung 14E zusammengefasst. LEV hat offensichtlich keinen signifikanten Effekt auf die Kopplung der Astrozyten im gesunden Gewebe.

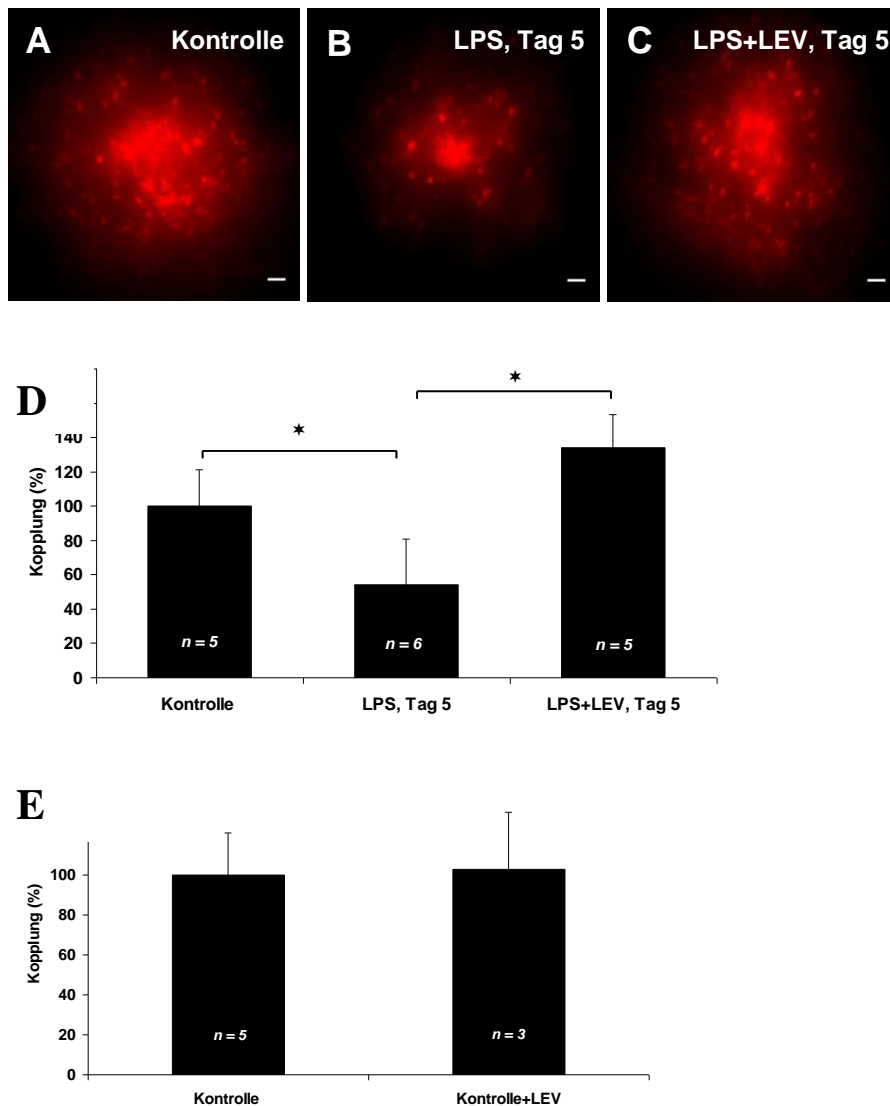


Abbildung 14: Levetiracetam stellt die funktionelle Kopplung *in vivo* wieder her. Astrozyten in akuten Gehirnschnitten von GFAP-EGFP Mäusen im Alter von 8-10 Wochen wurden mit Biozytin gefüllt. **A**, **B** und **C** zeigen exemplarische Aufnahmen der Kopplungswolken unter Kontrollbedingungen, fünf Tage nach der LPS Injektion und 5 Tage nach der LPS-Injektion mit anschließender LEV-Behandlung (300 mg/kg/Tag). Maßstabsbalken = 20 μ m. **D**: Statistische Auswertung der Kopplungszahlen. Fünf Tage nach LPS-Injektion war die Kopplung signifikant auf rund 54 % reduziert (Kontrolle: $103,9 \pm 19,7$ Zellen, 18 Schnitte, 5 Tiere; Tag 5 nach LPS: $56,5 \pm 25$ Zellen, 21 Schnitte, 6 Tiere). Die Werte für Kontrolle und Tag 5 nach LPS entsprechen den aus der Abbildung 13. Die Behandlung mit LEV führte zu einer Erhöhung der Gap Junction-vermittelten Kopplung auf 134 % ($139,3 \pm 19,9$ Zellen, 19 Schnitte, 5 Tiere). **E**: Astrozytäre Kopplung nach fünftägiger Behandlung mit LEV (300 mg/kg/Tag). LEV hatte keinen Einfluss auf die Gap Junction-vermittelte Biozytin-Diffusion in Kontroll-Mäusen (Kontrolle: $103,9 \pm 19,7$ Zellen, 18 Schnitte, 5 Tiere; Kontrolle + LEV: $107,1 \pm 28,4$ Zellen, 10 Schnitte, 3 Tiere). Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrolle. * signifikanter Unterschied, $p < 0,05$.

3.1.3 Einfluss von Entzündung auf die astrozytäre Proteinexpression *in vivo*

3.1.3.1 Expression von Cx43

Die Reduktion der Gap Junction-vermittelten Kommunikation der Astrozyten *in vivo* bestätigte die Ergebnisse der vorangegangenen Inkubationsexperimente. Somit kann mit großer Sicherheit angenommen werden, dass es sich dabei tatsächlich um einen Effekt der proinflammatorischen Zytokine handelt. Dies wirft natürlich die Frage nach dem zugrunde liegenden Mechanismus auf. An der Kopplung der Astrozyten im Hippokampus sind maßgeblich zwei Connexine beteiligt, Cx43 und Cx30 (Dermietzel et al., 2000). Für die interastrozytäre Kommunikation scheint dabei Cx43 eine wichtigere Rolle zu spielen als Cx30 (Gosejacob et al., 2010). Eine reduzierte Kopplung kann unter anderem auf zwei Wegen zustande kommen: über eine verminderte Expression des Protein, aber auch durch Modifikation des Phosphorylierungsmusters (John et al., 1999; Pahujaa et al., 2007; Solan and Lampe, 2009). Um die Proteinexpression zu untersuchen, wurden Lysate von Hippokampi der hGFAP-EGFP Mäuse im Alter von 8-10 Wochen angefertigt. Um eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden jeweils 3 Tiere pro Ansatz verwendet. Der eingesetzte Cx43-Antikörper erkannte alle Phosphorylierungsformen des Cx43 Proteins und ist daher gut geeignet, die drei aus der Literatur bekannten elektrophoretischen Isoformen (P0 bei ca. 41 kDa, P1 bei 43 kDa und P2 bei 46 kDa) auf dem Blot sichtbar zu machen (Abbildung 15A). Die Stärke der P0-Bande war bei allen Proben nahezu unverändert. Unter Kontrollbedingungen waren die die P1 und P2 Banden am stärksten ausgeprägt. Die Blots von Tieren 5 Tage nach einer einmaligen Injektion von 5 mg/kg LPS zeigt ein verändertes Bandenmuster. Die Ausprägung der P1-Bande ging zurück. Die P2-Bande hatte bei dieser Behandlung zwar die stärkste Ausprägung, ihre Intensität jedoch betrug nur noch knapp 50 % der unter Kontrollbedingungen. Nach Applikation von LPS und LEV hat die P0-Bande die schwächste Ausprägung. Die P2-Bande wurde durch die Behandlung mit LEV nicht beeinflusst, die Stärke der P1-Bande erhöhte sich jedoch um mehr als das Doppelte. Abbildung 15 B zeigt die Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse. Dafür wurde die Fluoreszenzintensität jeder Bande einzeln vermessen und gegenüber der Tubulinbanden normiert. Diese Darstellung veranschaulicht den Einfluss der Behandlungen auf die unterschiedlichen Formen des Proteins deutlich. Die wurde die Ausprägung der P1-Bande durch die Entzündung von 78 % auf rund 30 % signifikant reduziert. LEV beeinflusst das Phosphorylierungsmuster, was sich in einer veränderten P1-Bande äußert. Die Intensität

dieser Bande steigt signifikant auf knapp 68 %. Dieses Ergebnis unterscheidet sich nicht mehr von der Kontrolle. Die Ausprägung der P2-Bande sank durch die Behandlung mit LPS signifikant von 97 % auf knapp 53 % und wurde durch LEV kaum beeinflusst (50 %). Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass das Phosphorylierungsmuster von Cx43 durch die Behandlung mit LPS und LPS+LEV verändert wurde.

Die Auswertung der Gesamtexpression von Cx43 ist in der Abbildung 15 C dargestellt. Die höchste Proteinkonzentration wurde unter Kontrollbedingungen gemessen. Die Anwendung von LPS führt zu einem signifikanten Rückgang der Proteinmenge auf ca. 61 % des Kontrollwertes. Die Koapplikation von LPS und LEV ließ die Expression wieder ansteigen auf 74,5 %. Beide Behandlungen unterschieden sich signifikant von der Kontrolle.

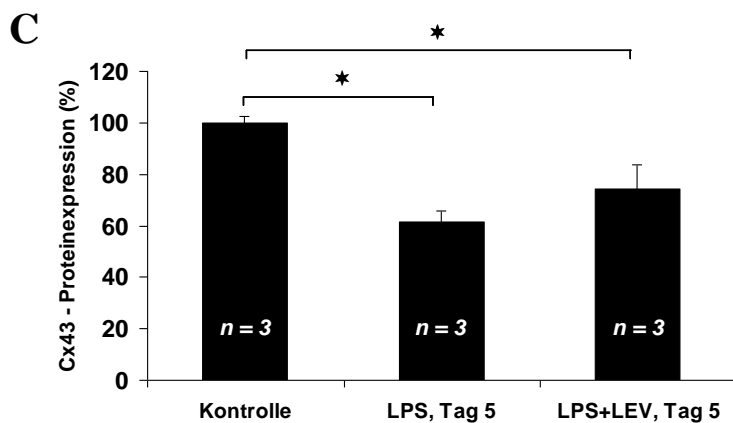
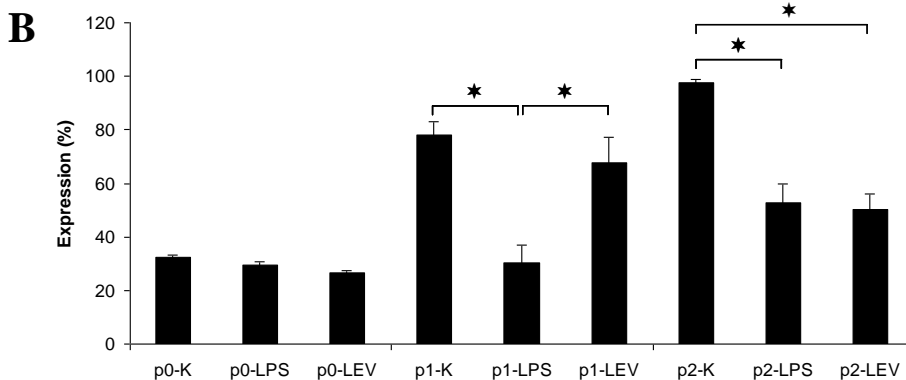
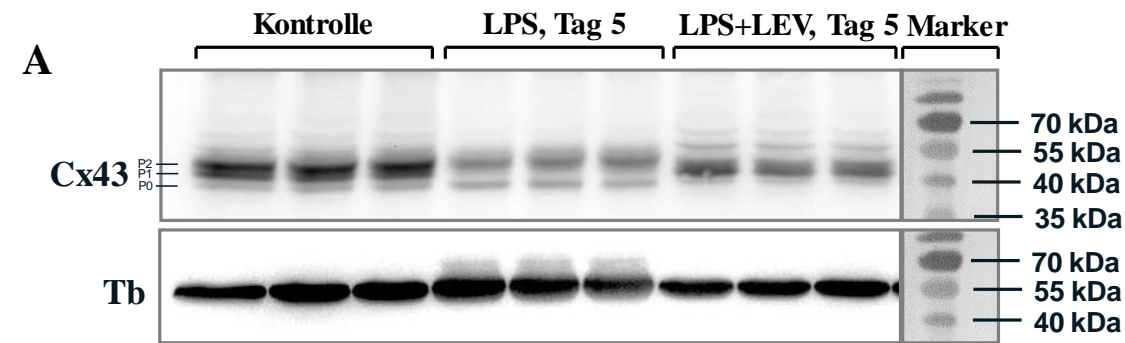


Abbildung 15: Western Blot-Analysen zum Einfluss von LPS-induzierter Entzündung auf die Cx43-Expression im Hippokampus. A: Im Western Blot waren drei Isoformen des Cx43 Proteins erkennbar: P0 um 41 kDa, P1 um 43 kDa und P2 um 46 kDa. Kontrolltieren wurde 100 μ l sterile Ringerlösung injiziert. Die Proben aus der zweiten Gruppe stammten von Tieren 5 Tage nach einer LPS-Injektion von 5 mg/kg. Bei den letzten drei Proben wurden die Mäuse erst mit LPS injiziert und anschließend 5 Tage lang mit 300 mg/kg/Tag LEV behandelt. P0, P1, P2 : unterschiedliche Phosphorylierungsformen von Cx43 **B**: Quantifizierung der einzelnen Cx43-Banden. K = Kontrolle; LPS = LPS, Tag 5; LEV = LPS+LEV, Tag 5. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus drei Banden. **C**: Quantifizierung der gesamten Cx43 Proteinexpression. Die Gesamtmenge des Proteins sank signifikant auf 61 % 5 Tage nach LPS-Injektion. Der Effekt von LEV war nicht signifikant. Die relative Expression der Proteine wurde mit Hilfe der Tubulin Banden normiert. * signifikanter Unterschied, $p < 0,05$.

Die Untersuchung der Cx43-Expression zeigte, dass sowohl das veränderte Phosphorylierungsmuster als auch die reduzierte Proteinexpression als mögliche Ursache für die verminderte Gap Junction-vermittelte Kommunikation in Frage kommen.

3.1.3.2 Expression von Cx30

Als nächstes wurde die Expression von Cx30 untersucht. Obwohl Reporteranalysen auf eine sehr niedrige Expression des Cx30-Proteins im Hippokampus hindeuteten (Theis et al., 2005), scheint eine kompensatorische Hochregulation des Proteins in Abwesenheit von Cx43 zu erfolgen. So zeigten Biozytin-Diffusionsexperimente an Tieren mit deletiertem Cx43-Gen eine Reduktion der Kopplung von nur 50 % (Gosejacob et al., 2010;Theis et al., 2003).

Es wurde daher mittels Western Blot-Analysen untersucht, ob ein solcher Effekt auch bei dem LPS-Entzündungsmodell eine Rolle spielt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 16 dargestellt. Bei diesen Experimenten ist eine große Variabilität aufgetreten. Das hatte unter anderem zur Folge, dass die dokumentierten Unterschiede nicht signifikant waren.

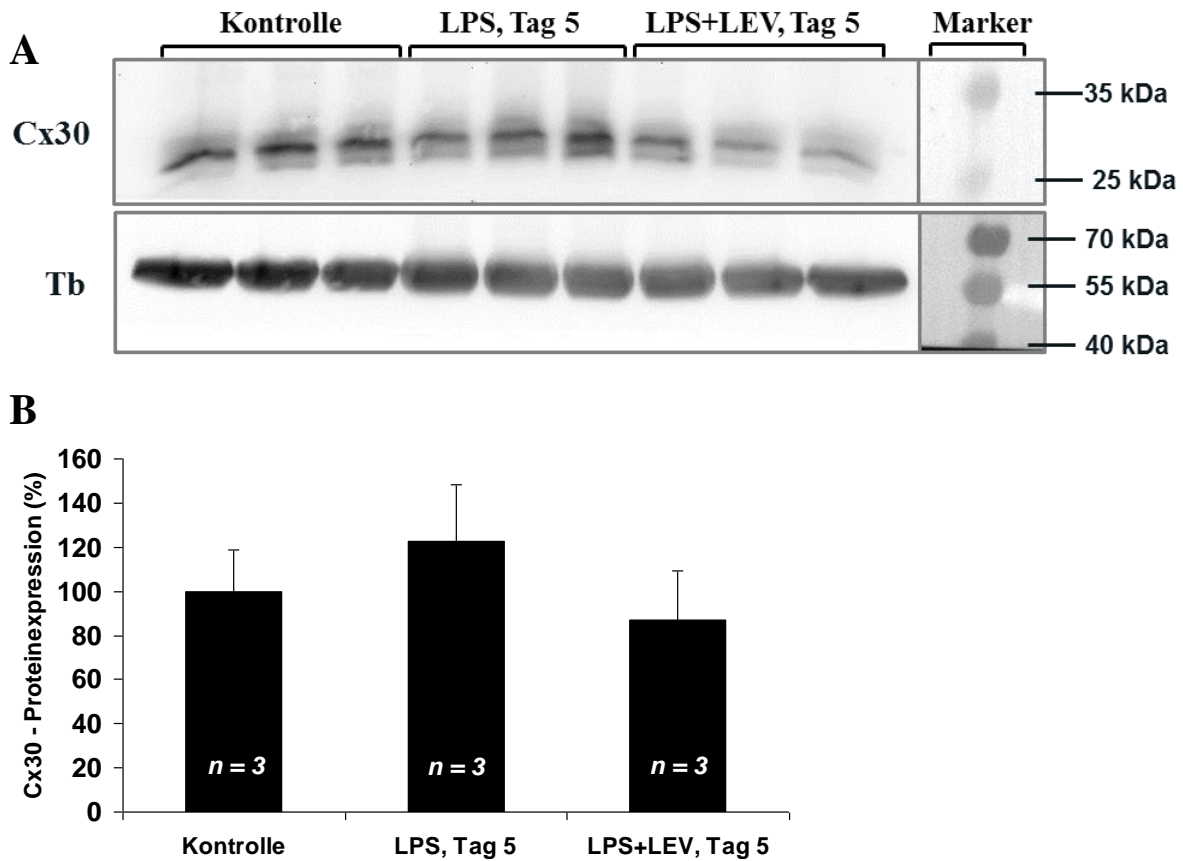


Abbildung 16: Western Blot-Analysen zum Einfluss von LPS-induzierter Entzündung auf die Cx30-Expression im Hippokampus. Die Cx30 Expression wurde im Hippokampus von 8-10 Wochen alten GFAP-EGFP Mäusen untersucht. **A:** Kontrolltieren wurde 100 μ l sterile Ringerlösung injiziert. Die Proben aus der zweiten Gruppe stammen von Tieren, denen 5 Tage zuvor 5 mg/kg LPS injiziert wurde. Bei den letzten drei Proben wurde den Mäusen erst LPS injiziert und anschließend 5 Tage lang 300 mg/kg/Tag LEV. In allen Proben war eine Bande bei 30 kDa zu sehen und eine weitere, schwache unspezifische Bande bei ca. 26 kDa. **B:** Quantifizierung der Cx30-Expression. Die relative Expression des Proteins wurde mit Hilfe der Tubulin-Banden normalisiert.

3.1.3.3 Expression von TAK-1

Die Entzündungsreaktion wird durch mehrere proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF α) und LPS ausgelöst. Diese Moleküle binden an ihre jeweiligen Membranrezeptoren und lösen dadurch intrazelluläre Signalkaskaden aus. Als gemeinsamer Faktor der durch die oben genannten Moleküle ausgelösten Signalkaskaden wurde TAK-1 identifiziert, die im Zuge der Aktivierung unterschiedliche Modifikationen erfährt (Pathak et al., 2012).

Um das Expressionsmuster dieses Proteins im LPS-Entzündungsmodell zu untersuchen, wurden Immunoblotanalysen durchgeführt. In Abbildung 17A ist das Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt. Alle Proben zeigen eine einzige Bande mit einem Gewicht von 78 kDa. Die quantitative Auswertung der Banden im Teilbild B zeigt, dass die TAK-1-Expression im Hippokampus 5 Tage nach LPS-Injektion auf 39 % der Kontrolle reduziert wurde. Dieser Effekt wurde durch LEV verhindert, hier betrug die Expression 116 % der Kontrolle. Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Cx43 und Cx30, war in diesem Experiment eine Zuordnung des Proteins zu einem bestimmten Zelltyp nicht möglich, da TAK-1 im Hippokampus ubiquitär exprimiert wird. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass man lediglich eine Bande erkennt. Der Antikörper wäre grundsätzlich in der Lage auch die phosphorylierte (aktivierte) Form des Proteins zu binden, was eine zusätzliche Bande um 82 kDa zur Folge hätte.

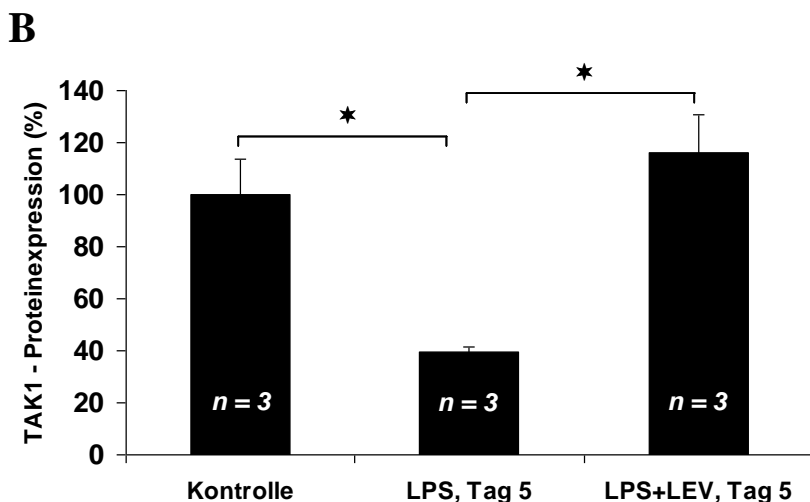
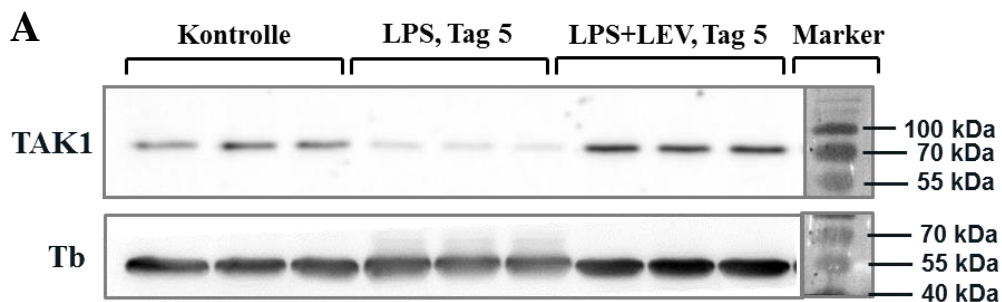


Abbildung 17: Western Blot-Analysen zum Einfluss von LPS-induzierter Entzündung auf die TAK1-Expression im Hippokampus. A: Kontrolltieren wurde 100 μ l sterile Ringerlösung injiziert. Die Proben aus der zweiten Gruppe stammen von Tieren, denen 5 Tage zuvor 5 mg/kg LPS injiziert wurde. Bei den letzten drei Proben wurde den Mäusen erst LPS injiziert und anschließend 5 Tage lang 300 mg/kg/Tag LEV. In allen Proben war lediglich eine Bande bei etwa 78 kDa sichtbar. **B:** Quantifizierung der TAK-1-Expression. Die relative Expression des Proteins wurde mit Hilfe der Tubulin Banden normalisiert. * signifikanter Unterschied, $p < 0,05$.

3.1.3.4 Expression von p38

TAK-1 ist ein wichtiges Schlüsselenzym, das unter anderem die Expression mehrerer Entzündungsmediatoren induziert. Es entfaltet seine Wirkung durch Phosphorylierung mehrerer MAP-Kinasen wie JNK1/JNK2, ERK1/2 und p38 α MAP-Kinase, sowie durch Aktivierung von NF- κ B (Sato et al., 2005; Shim et al., 2005; Wang et al., 2001). Dabei kommt der p38 α MAP-Kinase eine besondere Rolle zu, da sie in der Lage ist, die Aktivität von TAK-1 durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus zu regulieren, indem es TAK-1 am Ser423 und Thr431 phosphoryliert (Cheung et al., 2003).

Abbildung 18 zeigt die Expression von p38 im Hippokampus der Tiere nach der Behandlung mit LPS, LEV und unter Kontrollbedingungen. Wie auch bei TAK-1 ist die Expression des Proteins während der Entzündung auf 42 % der Kontrolle reduziert. LEV ist auch hier fähig die Proteinmenge zu erhöhen, wenn auch nur auf 80 % (Abbildung 18C). In Abbildung 18A erscheint in allen Proben eine Bande bei 38 kDa, die in den Bahnen 4-6 schwächer ausgeprägt war. Es wurde zusätzlich eine längere Auftrennung der Proben durchgeführt, um eine genauere Aussage über die Beschaffenheit des Signals machen zu können. So führt eine um 30 Minuten verlängerte Auftrennung der Proteine im SDS-Page zu klaren Doppelbanden, wie in der Abbildung 18B gezeigt. Die untere Bande (P0) repräsentiert das nicht aktivierte p38, während die obere bei ca. 40 kDa (P1) die phosphorylierte Form darstellt. Fünf Tage nach LPS-Injektion war jedoch die untere Bande fast ganz verschwunden. Zu diesem Zeitpunkt war die Gesamtmenge des Proteins stark reduziert, und p38 lag fast ausschließlich in der aktivierten Form vor. Lediglich in Bahn 6 ließ sich noch ein leichter Schatten bei 38 kDa erkennen. Die Ergebnisse der p38 Expressionsstudie dürfen nicht nur den Astrozyten angerechnet werden, denn genau wie TAK-1 wird dieses Protein von allen Zelltypen im Hippokampus exprimiert.

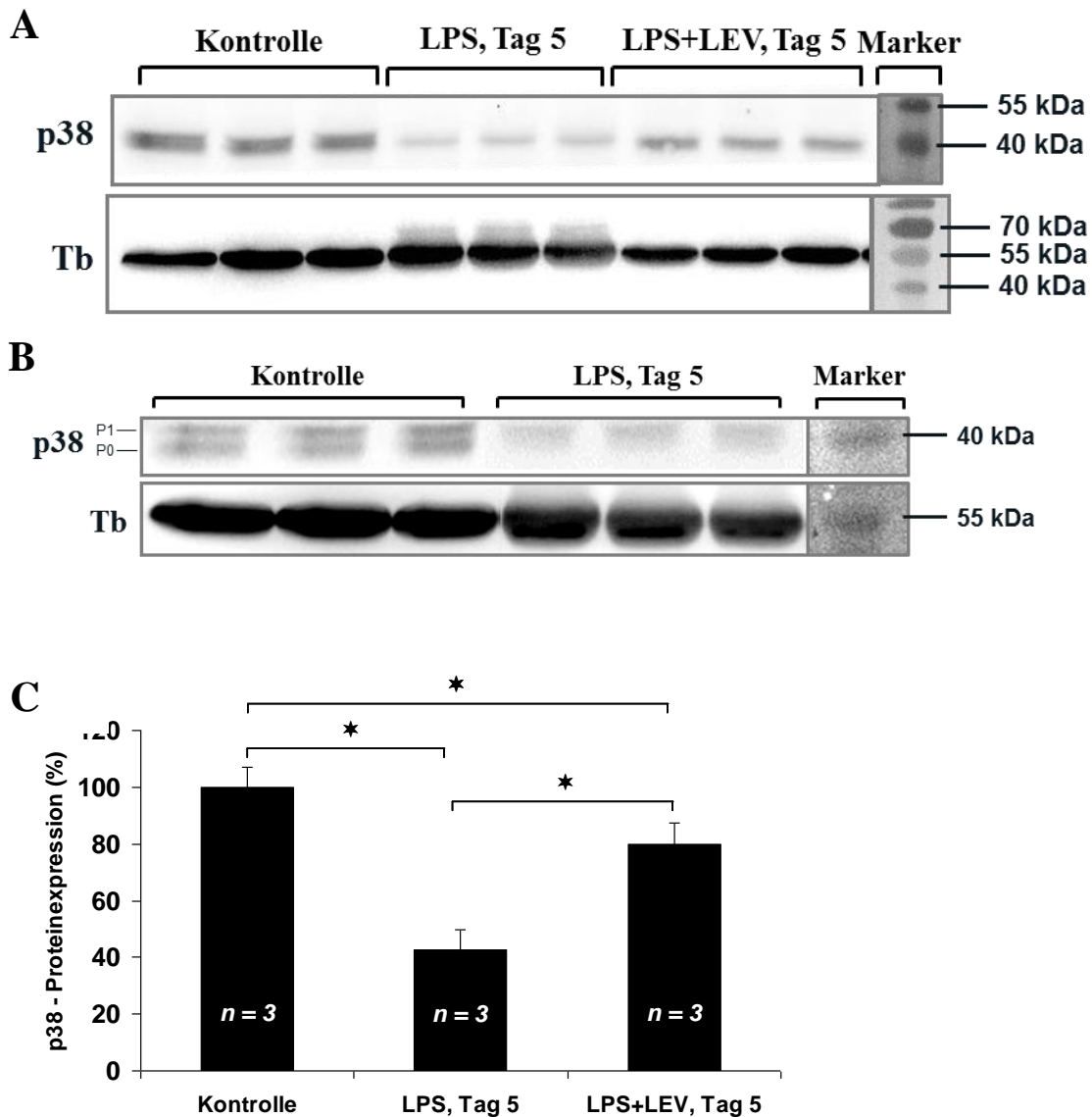


Abbildung 18: Western Blot-Analysen zum Einfluss von LPS-induzierter Entzündung auf die p38-Expression im Hippokampus. A: Kontrolltieren wurde 100 μ l sterile Ringerlösung injiziert. Die Proben aus der zweiten Gruppe stammen von Tieren, denen 5 Tage zuvor 5 mg/kg LPS injiziert wurde. Bei den letzten drei Proben wurde den Mäusen erst LPS injiziert und anschließend 5 Tage lang 300 mg/kg/Tag LEV. In allen Proben war eine Bande bei etwa 38 kDa sichtbar. **B:** Ergebnis einer längeren Auftrennung der ersten 6 Proben aus Abbildung A (Kontrolle, Tag 5 nach LPS). Bei Kontrollen ist eine deutliche Doppelbande zu sehen. P0: unphosphoryliertes Protein, P1: aktiviertes, phosphoryliertes p38 **C:** Quantifizierung der p38-Gesamtexpression. Die relative Expression des Proteins wurde mit Hilfe der Tubulin Banden normiert. * signifikanter Unterschied, $p < 0,05$.

3.1.3.5 Expression von GS

Es gibt mehrere Untersuchungen, die eindeutig belegen, dass es während Epilepsie zu Veränderungen in der Aktivität und in der Expression von GS kommt (Eid et al., 2008; Eid et al., 2004; van der Hel et al., 2005). Die Untersuchung der GS-Expression in diesem Modell hat ergeben, dass die LPS-Stimulation keine signifikante Auswirkung auf die Expression des Enzyms hat (Abbildung 19). Die Proteinexpression ändert sich lediglich um 0,8 % (LPS) bzw. 2,7 % (LPS+LEV).

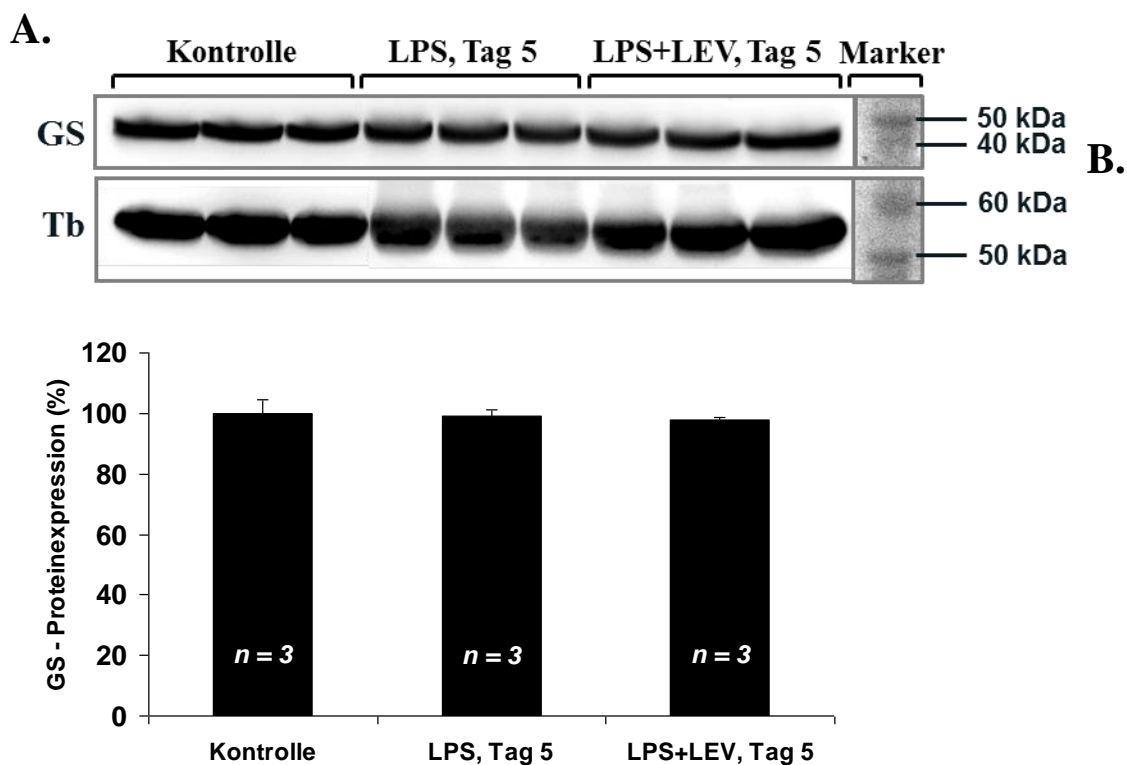


Abbildung 19: Expression von GS bleibt unverändert nach Applikation von LPS und LPS/LEV.

A: In allen Proben ist eine klare Bande bei ca. 45 kDa zu sehen. Die Kontrolltiere bekamen eine Injektion aus sterilen Ringerlösung (100µl). Die Proben aus der zweiten Gruppe stammen von den Tieren 5 Tage nach einer LPS-Injektion von 5 mg/kg. Bei den letzten drei Proben wurden den Mäusen erst LPS injiziert und anschließend 5 Tage lang 300 mg/kg/Tag LEV. **B:** Quantitative Analyse der GS Expression. Die relative Expression des Proteins wurde mithilfe der Tubulin Banden normiert.

3.2 Hyperthermie-induzierte Krampfanfälle in Mäusen

Ziel dieses Versuchsvorhabens war die Etablierung eines alternativen Mausmodells für Epilepsie, das zur Erforschung der Epileptogenese genutzt werden kann. Ein Vorteil dieses Modells gegenüber anderen Modellen (wie z.B. der intrakortikalen Injektion von Kainat) ist, dass HT keinen neuronalen Zelltod im Hippokampus hervorruft (Dube et al., 2006). Außerdem handelt es sich um ein endogenes Modell, das auf jegliche invasive Einwirkung auf das Gehirn von außen verzichtet.

3.2.1 Allgemeine HT-Parameter

Da das optimale Alter für die Generierung der Fieberkrämpfe bei 14-15 Tagen lag, war eine EEG-Analyse der Gehirnaktivität nicht möglich, da die Tiere zu klein sind, um telemetrische EEG-Elektroden einzupflanzen. Die Verhaltensanalyse blieb die einzige Möglichkeit, um den Erregungsstatus der Tiere zu beurteilen (siehe 3.2.2).

Da die Größe der Mäuse und deren Entwicklungsstand eng zusammenhängen, ist darauf geachtet worden, dass die Tiere keine großen Unterschiede im Gewicht zum Zeitpunkt des Experiments aufwiesen. Das sollte eine Vergleichbarkeit der Experimente untereinander gewährleisten. Eine Übersicht über alle wichtigen Parameter ist in Tabelle 5 zusammengefasst. Das mittlere Gewicht wie auch andere aufgelisteten Parameter der Tiere verschiedener Mausstämme unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Ergebnisse

	<i>Zeit bis zum Auslösen der Fieberkrämpfe (min)</i>	<i>Auslösetemperatur für die Fieberkrämpfe (°C)</i>	<i>Durchschnittliche Temperatur (°C)</i>	<i>Gewicht (g)</i>
GFAP-EGFP (FVB)				
<i>MW</i>	3,49	40,36	41,42	7,49
<i>SD</i>	0,79	0,95	0,14	1,68
<i>n</i>	31	31	31	31
BL6/J				
<i>MW</i>	4,39	40,75	41,39	7,08
<i>SD</i>	0,68	0,54	0,14	1,07
<i>n</i>	8	8	8	8
CSS2-BL6- A/J				
<i>MW</i>	4,15	40,61	41,54	6,45
<i>SD</i>	0,80	0,90	0,12	0,56
<i>n</i>	10	10	10	10

Tabelle 5: Vergleich der HT-Parameter zwischen unterschiedlichen Mausstämmen. Plötzliche Immobilität (Stadium II) wurde als Kriterium zur Beurteilung des Einsetzens epileptiformer Aktivität benutzt. Die Spalten 1-2 zeigen die Zeit und die entsprechende Temperatur beim Eintreten dieses Verhaltens. Spalte 3 fasst die durchschnittliche Körpertemperatur und Spalte 4 das Gewicht der Tiere zu Beginn der Experimente zusammen.

Der typische Temperaturverlauf einer HT-Sitzung ist in Abbildung 20 dargestellt. Eine normaltemperierte Maus wurde in die Kammer platziert und mit einem warmen Luftstrahl erwärmt. Der Zeitpunkt, an dem die Tiere ihre Hyperaktivität einstellten und für 2-10 s regungslos am Boden verharrten, wurde als Startpunkt für das Auftreten der Fieberkrämpfe festgelegt. Die Temperatur und die Zeit bis zu diesem Ereignis wurden dokumentiert (siehe Tabelle 5, Spalte 2 und 3). Am schnellsten ließen sich die Fieberkrämpfe in den GFAP-EGFP Mäusen induzieren, während es bei BL6/J am längsten dauerte. Entsprechend erfolgte die Induktion der FK bei GFAP-EGFP Mäusen bei der niedrigsten und bei BL6/J Mäusen bei der höchsten Temperatur. Die 42°C Marke, bei der der neuronale Zelltod einsetzt, wurde nicht überschritten.

Die Dehydrierung ist definiert als Verlust des Körpergewichts um mehr als 5 %. Die Kontrolle des Körpergewichts nach den Experimenten zeigte, dass bei der angewandten Versuchsmethode die Tiere keine Anzeichen für eine Dehydrierung vorwiesen. Die Änderung des Körpergewichts betrug $0,27 \pm 0,05$ g bei hGFAP-EGFP Mäusen, $0,25 \pm 0,04$ g bei BL6/J Mäusen und $0,25 \pm 0,03$ g bei CSS2-BL6-A/J Mäusen.

Die Auswertung aller Daten zeigten, dass alle 3 benutzten Mausstämme eine vergleichbare Empfänglichkeit für die Induktion der Fieberkrämpfe mittels HT aufweisen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

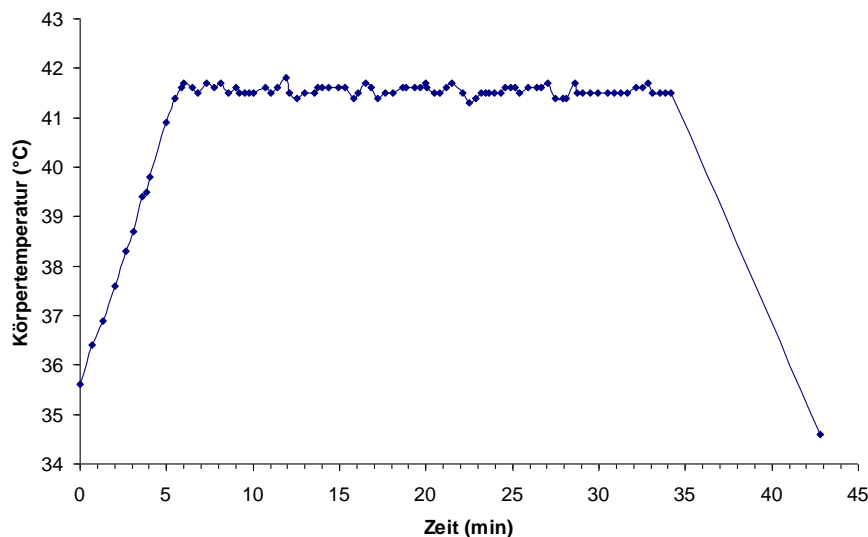


Abbildung 20: Typischer Temperaturverlauf einer HT-Behandlung. Eine hGFAP-EGFP Maus wurde in einen 3 Liter Glaszylinder mit einem auf 39°C temperierten Boden platziert und mit einem Strahl warmer Luft erwärmt. Die Temperatur des Luftstrahls wurde so gewählt, dass die Tiere eine Körpertemperatur zwischen 41,5°C und 42°C erreichten.

Das Ziel war es, die komplexe Fieberkrämpfe nachzuahmen, weil sie die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von der TLE um den Faktor mehr als 10 erhöhen (French et al., 1993). Komplexe Anfälle sind gekennzeichnet durch eine Dauer von mehr als 15 min, wiederholtes Auftreten und einen fokalen Ursprung. Darum wurden neben Einzelbehandlungen auch repetitive Behandlungen mit HT durchgeführt. Um festzustellen, ob bei der wiederholten HT-Behandlung die Tiere schneller zu krampfen anfangen, sind die notwendigen Parameter analysiert worden (Zeit bis zum Erreichen von Stadium 2 und Temperatur beim Erreichen von

Stadium 2). Bei 5 Mäusen des CSS2-BL6-A/J Stammes wurden HT-Behandlungen an drei konsekutiven Tagen durchgeführt. Die Zeit bis zum Eintreten erster Fieberkrämpfe, die dabei herrschende Körpertemperatur und das Körpergewicht der Tiere hatten sich nicht signifikant von den Kontrollen unterschieden (Zeit: $4,26 \pm 0,43$ vs. $4,73 \pm 1,07$ vs. $4,4 \pm 0,72$ min; Körpertemperatur: $40,4 \pm 0,46^{\circ}\text{C}$ vs. $41,02 \pm 0,92^{\circ}\text{C}$ vs. $40,88 \pm 1,13^{\circ}\text{C}$).

3.2.2 Verhaltensanalyse der Tiere während der Hyperthermie

Das Verhalten wurde in fünf Stadien unterteilt (Hessel et al., 2009): I) Hyperaktivität, II) plötzliche Immobilität, III) Rennen in engen Kreisen, IV) Zittern und V) tonisch-klonische Anfälle. In Analogie zu bereits etablierten Modellen in Ratte und Maus wurde das Erreichen des Stadiums II (plötzliche Immobilität) als das Hauptkriterium für das Auftreten erster Fieberkrämpfe benutzt (Dube et al., 2000; Dube et al., 2005).

Die Verhaltensanalysen haben gezeigt, dass nur das Eintreten der plötzlichen Immobilität sich als ein sicheres Indiz für das Auftreten der ersten epileptiformen Aktivitäten im Gehirn eignete. Alle Tiere zeigten dieses Verhaltensmuster. Die anderen, darauf folgenden Verhaltensweisen sind entweder sporadisch (nicht bei allen Experimenten) aufgetreten oder ließen sich nur schwer erkennen. Es waren zwei Phasen des Verhaltens feststellbar. Anfangs zeigten die Tiere eine ausgeprägte Hyperaktivität, die sich im hin und her Rennen und zahlreichen Sprüngen in die Höhe äußerte. Mit zunehmender Dauer des Experiments fielen die Tiere immer öfter in Starre. Dabei verharrten sie regungslos am Boden. In sehr seltenen Fällen trat zum Ende des Experiments ein Zucken /Zittern einer der hinteren Extremitäten auf, ein sicheres Anzeichen für das Auftreten der tonisch-klonischen Anfälle.

3.2.3 Funktionelle Kopplung der Astrozyten nach der Hyperthermie

Die HT führt zur Freisetzung von Interleukin-1 β sowohl in der Peripherie als auch im Hippokampus und Hypothalamus (Haveman et al., 1996; Heida and Pittman, 2005). Aus den vorangegangenen Experimenten war bekannt, dass Interleukin-1 β in der Lage ist, die Gap Junction-vermittelte Kommunikation zwischen den Astrozyten zu reduzieren. In dieser Experimentenreihe sollte untersucht werden, ob das Auslösen der Fieberkrämpfe zu einer verminderten Kopplung im Hippokampus führt.

Bei dem HT-Modell muss eine Besonderheit berücksichtigt werden, die mithilfe der Arbeiten von C. Dube (Irvine, USA) erläutert werden soll, die das HT-Modell erfolgreich an Ratten anwendet (Dube et al., 2010). Dabei entwickeln nur einige Tiere, die in den ersten Wochen nach der Geburt einer HT-Behandlung unterzogen wurden, spontane Anfälle. Das betrifft rund 35 % der Ratten. In weiteren Experimenten wurde festgestellt, dass in den Tieren mit Anfällen die Menge des IL-1 β Proteins im Hippokampus viel höher war, als in den nicht epileptischen Tieren. Da die Menge des IL-1 β auch für die Entkopplung der Astrozyten von entscheidender Bedeutung ist, wurden die Daten darauf untersucht, ob sich bei den HT-Tieren zwei Subpopulationen erkennen lassen, die trotz gleicher Behandlung im Kopplungsverhalten sich signifikant voneinander unterscheiden. Dies war tatsächlich der Fall. Es lassen sich zwei Subpopulationen unterscheiden, eine mit starker Reduktion der Gap Junction-vermittelten Kommunikation und eine ohne signifikante Entkopplung. Bei der ersten Gruppe (4 Mäuse) betrug der Mittelwert der Kopplung nur noch 28 % gegenüber der Kontrolle. In der anderen Subpopulation von 3 Tieren unterschied sich die Kopplung mit 82 % nicht signifikant von den Kontrollen. Die grafische Darstellung davon ist in der Abbildung 21 zu sehen.

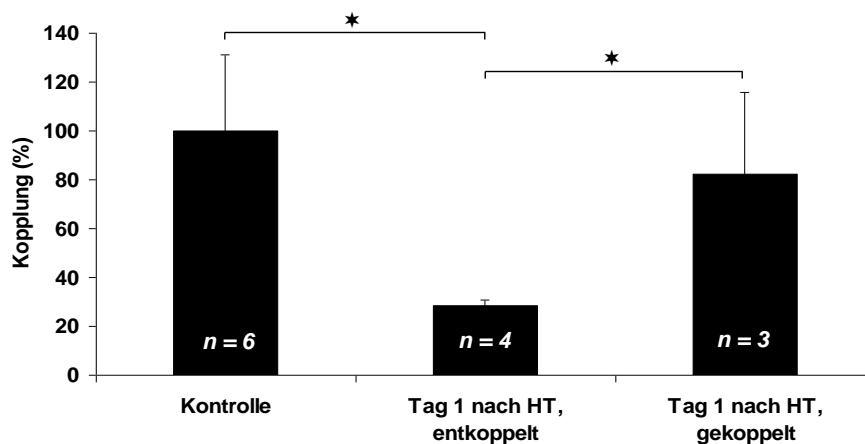


Abbildung 21: Gap Junction-vermittelte Kopplung im Hippokampus 1 Tag nach HT. Eine Subpopulation der hGFAP-EGFP-Tiere zeigt einen signifikanten Rückgang der astrozytären Kopplung nach einer 30-minütigen HT-Behandlung auf rund 28 %, während die anderen mit 82 % sich nicht von den Kontrollen unterscheiden. Die Zahlen sind als Verhältnis in Prozent gegenüber der Kontrolle dargestellt (Kontrolle: $195,23 \pm 60,95$ Zellen, 19 Schnitte, 6 Tiere; 1 Tag nach der HT: gekoppelt: $160,3 \pm 65,4$ Zellen, 7 Schnitte, 3 Tiere; entkoppelt: $55,9 \pm 4,4$ Zellen, 11 Schnitte, 4 Tiere). * signifikanter Unterschied, $p < 0,05$.

Die Abbildung 22 zeigt das entsprechende Ergebnis 5 Tage nach HT. Hier war die Kopplung bei einem Tier auf rund 44 % reduziert. Die Prüfung auf Signifikanz konnte nicht

durchgeführt werden. Die restlichen drei Tiere unterschieden sich nicht signifikant von den Kontrollen. Die Gap Junction-vermittelte Kommunikation lag hier bei 87 %.

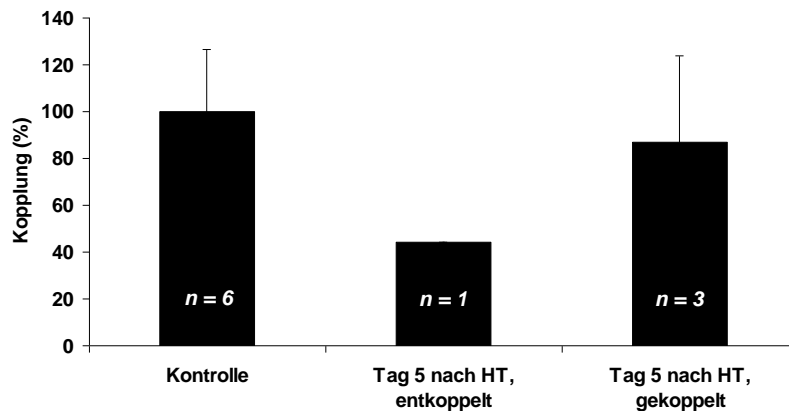


Abbildung 22: Gap Junction-vermittelte Kommunikation im Hippokampus der hGFAP-EGFP-Mäuse 5 Tage nach einer 30-minütigen HT-Behandlung. Eins von vier Tieren zeigt eine stark verminderte Kopplung (auf 44 %) im Vergleich zu den Kontrollen (100 %) und den anderen Tieren nach der HT (87 %). Die Zahlen sind als Verhältnis in Prozent gegenüber der Kontrolle dargestellt (Kontrolle: $135,8 \pm 36,2$ Zellen, 21 Schnitte, 6 Tiere; 5 Tage nach HT: gekoppelt: $118,3 \pm 49,8$ Zellen, 12 Schnitte, 3 Tiere; entkoppelt: $60,3 \pm 21,9$ Zellen, 3 Schnitte, 1 Tier).

In der Auswertung einen Tag nach HT zeigten 4 von 7 Tieren, das sind 57 %, eine stark reduzierte Kopplung. Am Tag 5 konnte nur eines von 4 Tieren (25 %) identifiziert werden, das eine geringe Kopplung aufwies. Fasst man die Ergebnisse beider Experimente zusammen, so erhält man einem Wert von 41 %. So viele Tiere zeigen eine reduzierte Kopplung nach HT.

3.2.4 Langzeiteffekte der Hyperthermie

Für die Untersuchung, ob die HT zu spontanen Anfällen führt, sind 4 hGFAP-EGFP-Mäuse einer einmaligen 35-minütigen HT-Sitzung am p14-15 unterzogen worden. Sobald die Tiere ein Körpergewicht von 25 g erreicht hatten, wurden ihnen EEG-Elektroden implantiert und die Hirnaktivität gemessen. Von den 4 Mäusen hat nur ein Tier spontane Anfälle im Erwachsenenalter gezeigt. Das entspricht einem Anteil von 25 %. Die EEG-Analyse erfolgte über einen Zeitraum von 13 Tagen. In diesem Zeitintervall sind 12 Ereignisse festgestellt worden, was eine Häufigkeit von 0,92 Anfällen pro Tag bedeutet. In zwei Fällen konnten die Überwachungskameras zum Zeitpunkt der EEG-Aktivitäten deutliches anfallstypisches Verhalten wie mehrfaches Überschlagen der Tiere aufnehmen. Die meisten Anfälle traten gehäuft auf, das heißt 2 bis 4 epileptiforme Aktivitäten pro Tag. An zwei Tagen konnten

jeweils ein Anfall detektiert werden, 7 Tage waren anfallsfrei. Die durchschnittliche Anfallsdauer betrug $28,8 \pm 8,9$ sec. In der Abbildung 23 sind exemplarisch zwei Anfälle zu sehen.

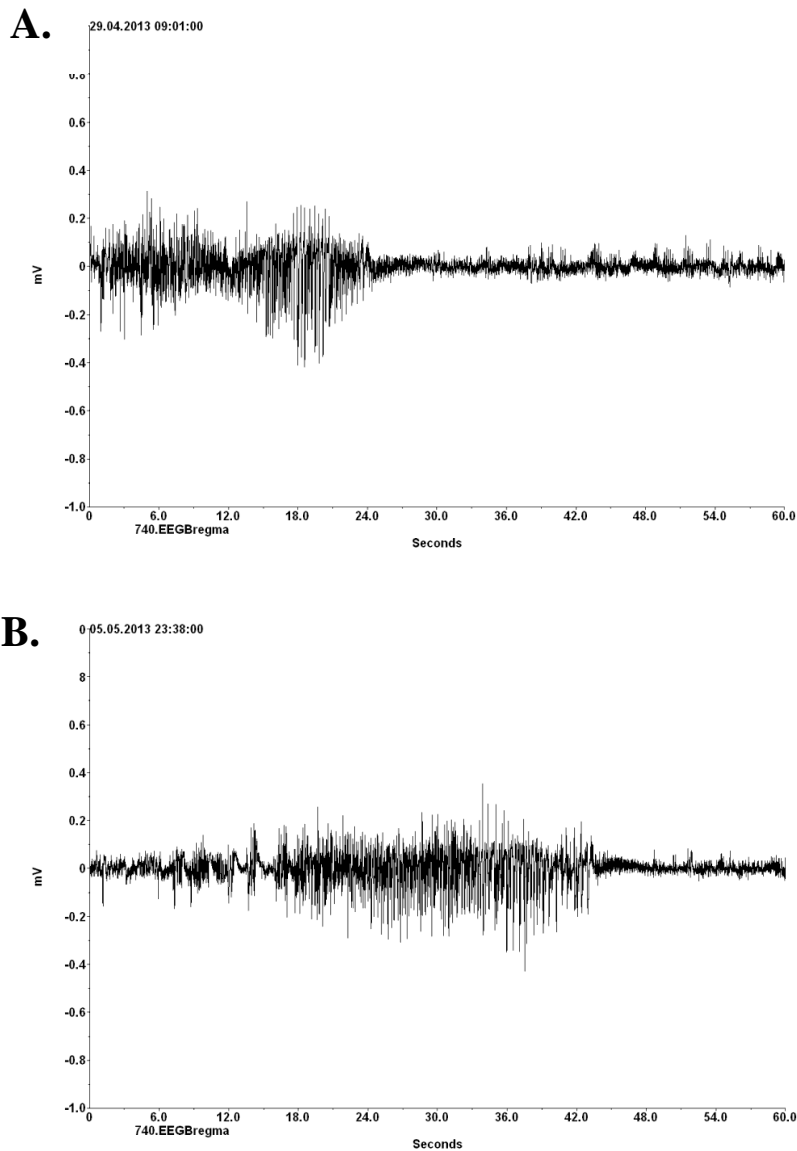


Abbildung 23: Spontane Anfälle nach HT in hGFAP-EGFP-Mäusen. Zwei exemplarische EEGs von einem erwachsenen Tier (p88) mit spontanen Anfällen, nachdem es am Tag 14 nach der Geburt einer 35-min HT-Behandlung unterzogen wurde. **A:** Ein Anfall um 9 Uhr morgens mit einer Dauer von rund 24 sec. **B:** Anfallsdauer rund 30 s um 23:38 Uhr.

Von den CSS2-B16-A/J-Mäusen konnten nur 2 für die Langzeituntersuchungen verwendet werden, denn die Tiere lassen sich nur schwer verpaaren. Hier wurde ein anderes HT-Protokoll angewandt. Die Tiere erhielten 3 HT-Behandlungen à 35 min. Von 2 Mäusen hat nur eine spontane Anfälle entwickelt. Die Auswertung der EEGs umfasste einen Zeitraum von 7 Tagen. In diesem Zeitraum sind nur zwei spontane epileptiforme Entladungen detektiert worden. Die Durchschnittliche Dauer betrug $35,5 \pm 2,1$ s.

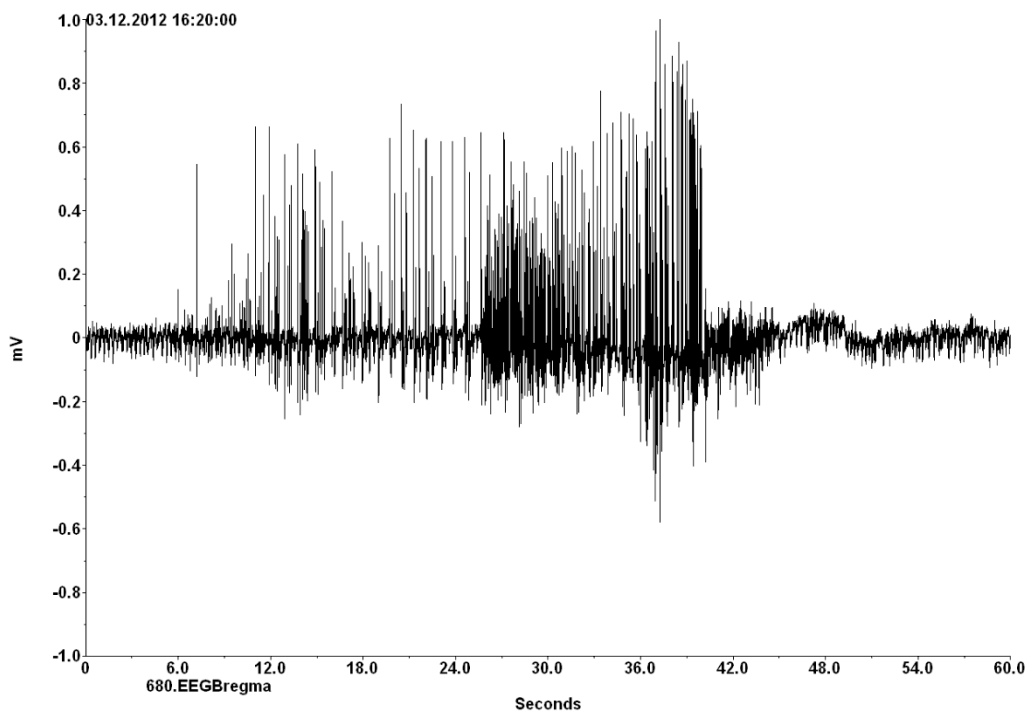


Abbildung 24: Spontaner Anfall nach der HT in einer CSS2-B16-A/J-Maus. Dargestellt ist einer von insgesamt zwei Anfällen in einem erwachsenen Tier (p109) nachdem es a Tagen 13-15 nach der Geburt drei HT-Behandlungen von 35 min Dauer erhielt.

3.3 Altersbedingte Unterschiede in der astrozytären Kopplung

Die im Laufe dieser Arbeit gesammelten Daten wurden einer zusätzlichen Auswertung unterzogen hinsichtlich der interastrozytären Kopplung. Es sind mehrere Altersgruppen von männlichen Tieren des Stammes hGFAP-EGFP untersucht worden. In Abbildung 25 ist das Ergebnis dieses Vergleichs dargestellt. Die astrozytäre Kopplung ist in der frühen postnatalen Periode (p15-16) am höchsten (195 ± 61 Zellen). Hier zeigen die Werte aber auch die größte Streuung. Mit steigendem Alter nehmen sowohl die Kopplungszahlen als auch die Standardabweichung ab. Die Gap Junction-vermittelte Kommunikation sinkt im Intervall p90-170 mit $87,8 \pm 18,1$ gekoppelten Zellen auf weniger als die Hälfte gegenüber dem Ausgangswert gemessen an p15-16.

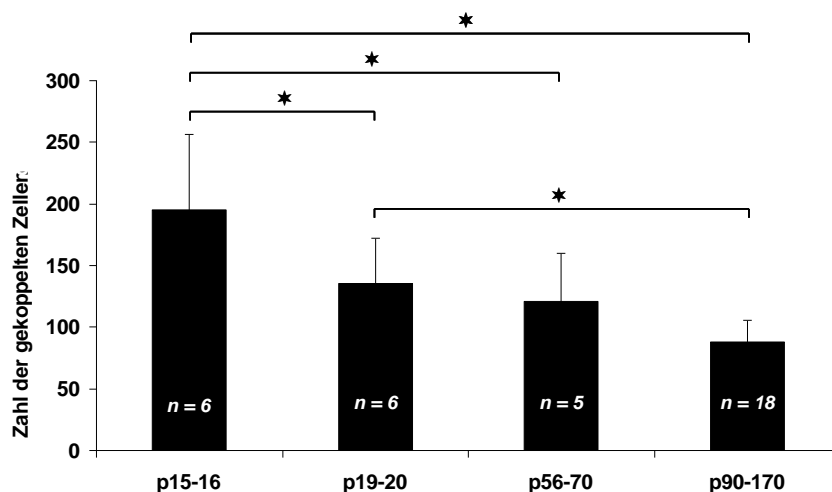


Abbildung 25: Altersabhängige Kopplung in hGFAP-EGFP Mäusen. Es sind die absoluten Kopplungszahlen angegeben (p15-16: $195,8 \pm 61$ Zellen, 19 Schnitte, 6 Tiere; p19-20: $135,8 \pm 36,2$ Zellen, 21 Schnitte, 6 Tiere; p56-70: $120,7 \pm 39$ Zellen, 18 Schnitte, 5 Tiere; p90-170: $87,8 \pm 18,1$ Zellen, 42 Schnitte, 18 Tiere). * signifikanter Unterschied, $p < 0,05$

4 DISKUSSION

4.1 Entkopplung der Astrozyten unter entzündlichen Bedingungen

Ungefähr 1 % der Weltbevölkerung leidet an Epilepsie. Trotz intensiver Bemühungen ist bis heute wenig über die Ursachen der Erkrankung bekannt, was sich in der geringen Effektivität der vorhandenen Medikamente äußert und die Entwicklung neuer Konzepte notwendig macht (Loscher and Schmidt, 2011). Rund 30 % der Epilepsiepatienten sprechen auf medikamentöse Behandlung nicht an. Tritt die Sklerose im Hippokampus mit weiteren Entwicklungsdefekten wie der fokalen Dysplasie zusammen auf, so kann diese Zahl mehr als 90 % erreichen (Wahab et al., 2010). Das ist kein zufriedenstellender Zustand, denn damit die Patienten ein normales Leben führen können, ist eine vollständige Kontrolle der Anfälle notwendig.

Auf der Suche nach neuen Konzepten zur Behandlung der Epilepsie rücken die Astrozyten immer mehr in den Vordergrund, nicht zuletzt seit bekannt ist, dass sie in der Lage sind, über verschiedene Botenstoffe mit den Neuronen zu kommunizieren und auf sie Einfluss zu nehmen (Agulhon et al., 2008; Dani and Smith, 1995; Halassa and Haydon, 2010; Martin, 1992; Pannasch et al., 2011). Es gibt Belege für den Funktionsverlust der Astrozyten bei einer Reihe von neurologischen Erkrankungen einschließlich der Epilepsie (Seifert et al., 2006; Seifert et al., 2010). Bei der Epilepsie scheint die astrozytäre Kopplung, bzw. deren Verlust, eine Schlüsselrolle zu spielen. So ist bekannt, dass die Entkopplung der Astrozyten zu einer verminderten Kaliumpufferung und als Folge zu einer erhöhten neuronalen Aktivität bei Mäusen führt (Wallraff et al., 2006). Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass astrozytäre Entkopplung sowohl im Hippokampus von Epilepsiepatienten als auch in experimentellen Modellen an der Maus beobachtet wurde (Bedner et al., submitted). Es gibt Hinweise, dass die Entzündung eine ursächliche Rolle bei der Reduktion der Gap Junction-vermittelten Kommunikation zwischen den Astrozyten spielen könnte. Zum einen lösen Kainat-induzierte Anfälle bei Mäusen die Freisetzung von IL-1 β und TNF α durch Astrozyten und Mikroglia aus. Die Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit und das Serum von Epilepsiepatienten zeigen auch erhöhte Mengen an diesen Zytokinen (Vezzani et al., 2008). Zum anderen ist in der Zellkultur gezeigt worden, dass proinflammatorische Zytokine zu Entkopplung der Astrozyten führen können (John et al., 1999; Meme et al., 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, dass die funktionelle Gap Junction-vermittelte Kopplung zwischen Astrozyten durch proinflammatorische Zytokine und LPS reduziert werden kann. Das gilt sowohl für die *in situ* als auch für die *in vivo* Situation.

Die bis zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit veröffentlichte Publikationen hatten entkoppelnde Effekte der Immunmodulatoren nur in Zellkultur zeigen können. Dazu zählen Untersuchungen an fetalen humanen Astrozyten (John et al., 1999), die eine verminderte Expression von Cx43 und einen Verlust der Kopplung zwischen Astrozyten nach Inkubation mit IL-1 β feststellten. Des Weiteren wurde an kortikalen Astrozytenkulturen neugeborener Mäuse gezeigt, dass Inkubationen der Zellen mit einer Kombination aus IL-1 β und TNF α oder mit LPS die Kopplung signifikant reduzieren (Meme et al., 2004a; Meme et al., 2006). Diese Befunde sind im Einklang mit den hier präsentierten Resultaten. Jedoch gibt es auch Unterschiede. So zeigt die Behandlung mit IL-1 β allein in Zellkultur keinen signifikanten Effekt, während im Rahmen dieser Arbeit an akuten Schnitten IL-1 β allein die Kopplung signifikant reduzieren konnte. Mögliche Gründe für diesen Unterschied sind die Verwendung von unreifen Astrozyten (siehe Abschnitt 4.6) und die Veränderung der Zellen in Zellkultur. Bei Zellkulturexperimenten wurden Zellen von Föten oder Neugeborenen benutzt. Das Alter der untersuchten Zellen ist aber wichtig, weil die Expression der astrozytären Connexine von der Reife der Astrozyten abhängt (Konietzko and Muller, 1994; Nagy et al., 1999; Schools et al., 2006; Wallraff et al., 2004; Yamamoto et al., 1992). Die Verwendung von kultivierten Zellen für physiologische Untersuchungen hat sowohl Nach- als auch Vorteile. Zum einen sind die Astrozyten aus ihrem Verband gelöst und verlieren durch die gestörten Integrität wichtige Signalgeber, zum Beispiel die Neurone und die Oligodendrozyten (Agulhon et al., 2008; Dani and Smith, 1995; Nagy and Rash, 2000). Darüber hinaus ist das Gewebe der akuten Schnitte dichter und die Zellen sind anders räumlich zueinander orientiert als in Zellkultur (Cho et al., 2007). Außerdem übt die Verwendung von Serumproteinen und Antibiotika im Nährmedium einen nicht genau definierbaren Einfluss auf die Physiologie der Zellen aus. Ein Vorteil der *in vitro* Untersuchungen ist, dass die Zellen über einen langen Zeitraum am Leben erhalten werden können. Dadurch sind längere Inkubationen möglich. Bei den oben erwähnten Arbeiten dauerte die Inkubation der Astrozyten mit den Zytokinen 24 h (John et al., 1999; Meme et al., 2004a; Meme et al., 2006). Die Verwendung von akuten Schnitten bedarf einer alternativen Herangehensweise. Bei der Festlegung der Inkubationszeit müssen zwei Faktoren berücksichtigt werden: (i) es muss gewährleistet sein, dass die Schnitte in ihrer Vitalität nicht beeinträchtigt werden und (ii) die Inkubation sollte lange genug

andauern, damit die Wirkung der Substanzen sich möglichst voll entfalten kann. Allein durch die höhere Dichte des Gewebes ist die Versorgung mit Nährstoffen und der Abtransport von Abfällen begrenzt. Da die proinflammatorischen Zytokine und anderen Immunmodulatoren sich nicht vorteilhaft auf die Vitalität der Zellen auswirken, ist es ratsam die Inkubationszeit so kurz wie nötig zu halten, denn mit fortschreitender Dauer steigt die Gefahr von unerwünschten und nicht absehbaren Neben- und Wechselwirkungen. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen Cx43 und Cx30. Über die Regulation des letzteren gibt es bis dato nur wenige Erkenntnisse. Der Turnover des Cx43-Proteins dagegen ist besser untersucht. Es gibt mindestens vier mögliche Wege, wie die Cx43-vermittelte funktionelle Kopplung reguliert werden kann: Expression des Proteins, Phosphorylierung, zelluläre Lokalisation und Internalisierung/Abbau des Proteins. Arbeiten an Myozyten und kultivierten Astrozyten lassen die Annahme zu, dass innerhalb von 1 bis 3 h die Cx43-Kanäle einer Zelle ausgetauscht werden (Beardslee et al., 1998; Hertzberg et al., 2000; Laird et al., 1991). Posttranslationale Modifikationen gehen in der Regel schneller von statten (Li et al., 1998; Nagy and Li, 2000). Im Vorfeld der Experimente war nicht bekannt, welche Signalwege an der Regulation der Connexine in diesen Modellen beteiligt sind. Deshalb wurde die Inkubationsdauer auf 3 h bis 5 h festgelegt, um sicher sein zu können, dass alle Effekte genug Zeit haben sich zu entfalten. Die maximale Inkubationszeit von 5 h befand sich innerhalb des Intervalls, in dem die Schnitte noch vital waren. Es wurde statistisch überprüft, ob die Kopplung der Schnitte nach 3 h signifikant unterschiedlich von der nach 3,5 h, 4 h und 4,5 h ist, was nicht der Fall war.

Zu den weiteren Effekten von Zytokinen gehören die erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke durch die Aktivierung der Endothelzellen, die Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen auf die zerebralen Endothelzellen und anschließende Aktivierung der ansässigen Gliazellen sowie das Einwandern von Immunzellen aus der Peripherie (Blamire et al., 2000; Claudio et al., 1994; Quagliariello et al., 1991; Wong and Dorovini-Zis, 1992). Ein Teil dieser Effekte, wie z.B. die Aktivierung der Gliazellen, kann in *in situ* Systemen reproduziert und untersucht werden. Für die Simulation der Effekte auf die Blut-Hirn-Schranke und auf die Endothelzellen benötigt man ein *in vivo* Modell. Außerdem würde mindestens ein weiterer Faktor in einem *in vivo* Modell zum Tragen kommen: Die IL-1 β Konzentrationen *in vivo* und *in vitro* unterscheiden sich möglicherweise. Es gibt Experimente, die belegen, dass im Hippokampus von Nagern nach einer i.p. LPS-Injektion IL-1 β aus der

Peripherie nachweisbar ist und somit eine Verstärkung der entkoppelnder Wirkung zu erwarten wäre (Csolle and Sperlagh, 2010).

Eine chronische endogene Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in Gehirn wurde mit einer einmaligen i.p. Injektion von 5 mg/kg LPS erreicht (Qin et al., 2007). Kennzeichnend ist dabei die Tatsache, dass die Tiere eine sehr starke Hypothermie entwickeln (Abbildung 10). Der Temperaturabfall um rund 9°C war deutlich ausgeprägter als in anderen Arbeiten, in denen nur 2-4°C Differenz gemessen wurden (Ochalski et al., 1993; Skelly et al., 2013; Steiner et al., 2011). Für diese Abweichungen kommen zwei Faktoren in Frage. Zum einen kamen unterschiedliche Serotypen von LPS zum Einsatz. LPS ist eine Sammelbezeichnung für eine große Gruppe von Substanzen, die in der äußeren Membran von Bakterien enthalten sind. Die Struktur ist bei allen Molekülen gleich: Lipid A, Kernregion und ein Polysaccharid bilden das Gerüst des Moleküls. Die einzelnen Teilbereiche sind jedoch unterschiedlich in ihrer Zusammensetzung, so dass LPS sogar zur serologischen Charakterisierung der Bakterien eingesetzt werden kann. Dementsprechend kann sich die Toxizität der Moleküle sehr stark voneinander unterscheiden. Die Schlüsselrolle scheint dabei das Lipid A zu spielen (Netea et al., 2002; Seydel et al., 2000). Zum anderen sind die Experimente an Mäusen unterschiedlicher Stämme durchgeführt worden. Offensichtlich ruft die Injektion von 5 mg/kg LPS (O111:B4) in hGFAP-EGFP-Mäusen eine starke Sepsis hervor, die einen starken und lang anhaltenden Abfall der Körpertemperatur und des Blutdrucks zur Folge hat. Wahrscheinlich werden dabei noch weitere Prozesse ausgelöst, die die astrozytäre Physiologie beeinflussen. Dies äußert sich in der Tatsache, dass am Tag 1 nach der Injektion weder eine Aktivierung der MG (Abbildung 11) noch eine reduzierte Kopplung (Abbildung 13) feststellbar war. Das ist insofern ungewöhnlich, als in allen LPS-Modellen bereits Stunden nach der Injektion erhöhte Mengen an Zytokinen in Gehirn detektiert werden und diese innerhalb von mindestens 3 h in der Lage sind, die Gap Junction-vermittelte Kopplung zu reduzieren. Der um mehrere Tage nach Applikation von LPS verzögerte Rückgang der Expression von Cx43 wurde auch in anderen Experimenten beobachtet (Sayyah et al., 2012) und wird später näher beleuchtet (s. 4.2.1). Das Experimentdesign von Qin und Kollegen (Qin et al., 2007) diente als Grundlage für das *in vivo* LPS-Entzündungs-Modell, da dabei eine chronische, über Monate andauernde Freisetzung von Zytokinen im Gehirn beobachtet wurde. Angesichts des verzögerten Eintritts der MG-Aktivierung und der Entkopplung stellt sich die Frage, ob nicht vielleicht auch kleinere Dosen von LPS eine chronische Entzündung im Gehirn ausgelöst hätten. Ohne die schwere Sepsis würde man das Leiden der Tiere mindern

können. Außerdem würde dadurch das Auftreten von Nebenwirkungen, die die Interpretation der Ergebnisse erschweren, reduziert. Zu diesen Nebenwirkungen gehören unter anderem Cannabinoid 1 Rezeptor-vermittelte Symptome wie die Hypothermie und der niedrige Blutdruck, die beide auch bei den hGFAP-EGFP-Mäusen beobachtet wurden (Steiner et al., 2011; Varga et al., 1998). Betrachtet man den Abfall der Kopplungszahlen nach Anwendung von LPS *in situ* (55%) und *in vivo* 5 Tage nach der LPS-Injektion (54%) so fällt auf, dass die Werte sehr nah beieinander liegen. Es kann einerseits so gedeutet werden, dass die Bedingungen der Inkubationsexperimente, wie die Konzentration und die Inkubationsdauer, die Situation *in vivo* optimal imitiert haben. Andererseits darf die Möglichkeit nicht außer Acht gelassen werden, dass Zytokine im Hippokampus die interastrozytären Kommunikation zwar reduzieren nicht jedoch vollständig inhibieren können, Entsprechend kann möglicherweise ein bestimmter Grad der Entkopplung auch durch höhere Zytokinkonzentrationen nicht überschritten werden. Die verbleibende Restkopplung könnte durch Cx30 vermittelt werden (Gosejacob et al., 2010).

Bezüglich der astrozytären Entkopplung wird ein weiteres Thema kontrovers diskutiert: die Halbkanalaktivität. Ein Gap Junction Kanal besteht aus zwei Halbkanälen. Benachbarte Zellen stellen jeweils einen Halbkanal (HK) zur Verfügung, die bei Kontakt einen interzellulären Gap Junction Kanal bilden. Die Halbkanäle sind vor dem Andocken an den anderen Kanal grundsätzlich geschlossen (Bennett et al., 2003). Bedenkt man die sehr hohe Leitfähigkeit eines HK von ca. 200-300 pS wird deutlich, dass bei einem geöffneten Zustand zahlreicher Kanäle die Zellen nicht mehr in der Lage sind, das Membranpotential und das lebensnotwendige Ionengleichgewicht aufrechtzuerhalten. Ein Beleg dafür sind Experimente mit Cx46 an *Xenopus* Oozyten, die zur Schwellung und zum Tod der Zellen geführt haben, weil Cx46 hier geöffnete HK bilden (Paul et al., 1991). Die Leitfähigkeit von Cx46 (250-300 pS) unterscheidet sich nicht maßgeblich von der anderer Connexine (Saez et al., 2005). Es gibt aber einen wichtigen Unterschied: die meisten untersuchten HK lassen sich unter physiologischen Bedingungen wie negative Ruhemembranpotentiale und das Vorhandensein von divalenten Kationen in der extrazellulären Lösung nicht öffnen (Bennett et al., 2003; Saez et al., 2005; Valiunas and Weingart, 2000). Bei einer Entkopplung der Astrozyten, so die Annahme, gehen die Halbkanäle auseinander (Contreras et al., 2002; Retamal et al., 2007) und bilden offene HK, die aktiv am Stoffaustausch (ATP, Ca²⁺, Glutamat) zwischen Zytosol und dem extrazellulären Raum teilnehmen (Stout et al., 2002; Ye et al., 2003). Die

astrozytären Cx-HK öffnen jedoch nur in Abwesenheit divalenter Kationen und bei einem Ruhemembranpotential positiver als 0 mV. Die HK sind grundsätzlich in der Lage, Signalmoleküle wie ATP, Ca²⁺ oder Glutamat über die Membran zu leiten, eine Funktion die wahrscheinlich nur unter pathologischen Bedingungen eine Rolle spielt. Es gibt jedoch grundsätzliche Zweifel, ob Cx43 HK an der Freisetzung von Molekülen, wie z.B. ATP, beteiligt sind. Vor wenigen Jahren wurde bei Säugern eine neue Gruppe von Proteinen identifiziert, die hohe Homologie zu den Innexinen (Gap Junction Proteine der Invertebraten) zeigen, aber keine interzellularen Kanäle bilden (Bruzzone et al., 2003; Scemes et al., 2007). Diese Proteine, die eine sehr hohe Einzelkanalleitfähigkeit besitzen (400-500 pS), werden als Pannexine (Panx) bezeichnet. In Astrozyten wurde die Expression von Panx1 nachgewiesen. Mithilfe von Cx43- und Panx1- Nullmutanten konnte gezeigt werden, dass die HK-Aktivität in Astrozyten auf Panx1 zurückzuführen ist (Huang et al., 2007). Angesichts der noch größeren Leitfähigkeit gelten für das Öffnen der Pannexine die gleichen Bedenken wie für Cx43 HK, mit der Ausnahme, dass für Panx gezeigt werden konnte, dass diese durch mechanische Stimulation der Zellen oder durch Stimulation der P2-Rezeptoren auch in Anwesenheit von divalenten Kationen geöffnet werden können (Scemes et al., 2009).

4.2 Mechanismus der Entkopplung der Astrozyten

4.2.1 Reduzierte Proteinexpression

Für die Untersuchung möglicher Mechanismen, die der Entkopplung zu Grunde liegen, wurden WB von Hippokampi der Mäuse aus dem *in vivo* Model angefertigt. Mithilfe von WB-Analysen lassen sich die Expression des Proteins und sein Phosphorylierungsstatus überprüfen.

Die i.p. Anwendung von LPS führt sowohl zu einer Reduktion der Expression des Cx43 Gesamtproteins (Abbildung 15C) als auch zu einem veränderten Phosphorylierungsmuster (Abbildung 15B). Es gibt zahlreiche Untersuchungen, die im Einklang mit diesem Befund sind, jedoch auch kontroverse Ergebnisse. Eine Reihe von Experimenten an Zellkulturen stellt eine Reduktion der Expression von Cx43 nach Inkubation mit aktivierten MG, IL-1 β oder TNF α fest (Faustmann et al., 2003; Haghikia et al., 2008; John et al., 1999; Meme et al., 2006). Eine Untersuchung an Astrozyten in der weißen Substanz nach Applikation von Freund-Adjuvans zusammen mit *Mycobacterium tuberculosis* zeigt eine Reduktion der Expression des Cx43-Proteins. Dieses Ergebnis wurde von immunohistochemischen

Färbungen bestätigt (Brand-Schieber et al., 2005). Es wird auch eine Herunterregulation der Cx43-Expression im Herzen nach i.p. Injektion von LPS (1 mg/kg) beobachtet (Fernandez-Cobo et al., 1999). Experimentelle Ischämie an Ratten zeigt ein variables Ergebnis. Läsionsnahe Regionen wiesen erhöhte Cx43-Expression vor, während in weiter entfernten Bereichen eine reduzierte Expression detektiert wurde (Wasielowski et al., 2012). Eine erhöhte Expression von Cx43 scheint ein typisches Merkmal Ischämie-induzierter Schäden zu sein, auch beim Menschen (Nakase et al., 2006).

Es gibt eine weitere Arbeit, die dem hier verwendeten LPS-Entzündungs-Modell recht nahe kommt (Sayyah et al., 2012). In dieser wurde mittels intracerebroventrikularen (i.c.v.) LPS-Injektionen eine chronische Entzündung im Hippokampus ausgelöst. Die Tiere bekamen für einen Zeitraum von 14 Tage jeweils 2,5 mg/kg LPS täglich injiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der 1., 7. und 14. Injektion wurde das Gewebe für real-time PCR, WB und Konzentrationsbestimmung von IL-1 β gesammelt. Veränderungen der Cx43 mRNA-Expression wurden dabei nicht vorgefunden. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass der Proteingehalt 6 h nach der 7. Injektion also am Tag 7 signifikant auf rund 40 % reduziert war, während die Werte nach der 1. und der 14. Injektion nicht unterschiedlich waren. Die Reduktion des Proteins kann durch verminderte Translation oder einen schnelleren Abbau des Proteins zustande gekommen sein. Die Menge des IL-1 β -Proteins verhielt sich jedoch anders: Die erste Injektion rief eine enorme Erhöhung der Expression hervor, die dann innerhalb von 7 Tage wieder abfiel. Es soll die Tatsache unterstrichen werden, dass sowohl in der oben genannten Arbeit von Sayyah und Kollegen als auch in dem hier verwendeten LPS-Entzündungs-Modell die Expression von Cx43 erst mit einer Verzögerung von mehreren Tagen nach Anstieg der IL-1 β -Expression im Hippokampus reduziert war. Es liegen zwar nur die Ergebnisse von den Tagen 1 und 7 (Ratte), bzw. 1 und 5 (hGFAP-EGFP-Maus) vor, jedoch lässt sich trotzdem eine gemeinsame Tendenz in der Expression von Cx43 während chronischer Entzündungen erkennen. Zu den wichtigsten Unterschieden zwischen dieser Arbeit und den Experimenten von Sayyah und Kollegen (2012) zählt die Tatsache, dass statt Mäusen Ratten benutzt wurden. Der Speziesunterschied erklärt wahrscheinlich den Umstand, dass bei den Ratten keine Hypothermie nach der Applikation von LPS festgestellt wurde. Stattdessen stieg die Körpertemperatur einmalig nach der ersten Injektion von LPS um 1°C. Des Weiteren kam ein anderer LPS-Serotyp (O26:B6) zum Einsatz. Die Applikationsmethode hat auch einen Einfluss auf das Ergebnis. Die Methode der i.c.v. Injektion unterscheidet sich

von der i.p. Injektion. Die letztere verursacht keinerlei mechanische Schäden am Gehirn und macht keine weiteren Behandlungen der Tiere notwendig. Bei i.c.v. Applikation mussten den Tieren im Vorfeld eine Kanüle ins Gehirn implantiert werden. Diese Operation bedarf zusätzlicher Medikation mit Anästhetika und Antibiotika. Des Weiteren können mechanische Reizungen des Gehirns durch Volumenerhöhung während der Injektion und bei Bewegungen des Kopfes nicht ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Beleg für den Einfluss einer i.p. Injektion von LPS auf die Cx43-Expression sind Experimente am Herzen von Ratten, wo die Menge der Cx43-mRNA innerhalb von 2 h nach Injektion von 1 mg/kg LPS um mehr als 50 % sinkt (Fernandez-Cobo et al., 1999). In weiteren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass dieser Effekt auf die reduzierte Promotoraktivität zurückzuführen ist. Es war möglich die Aktivität des basalen Promotors von Cx43 durch Inkubation mit dem Serum von LPS-behandelten Ratten oder durch TNF α zu hemmen.

An kultivierten Astrozyten juveniler Ratten konnte gezeigt werden, dass die Abnahme des Cx43-Proteingehalts durch Aktivierung des JNK-Signalweges und des Ubiquitin-Proteasom-Abbaus ausgelöst wird. Es wurden außerdem erhöhte Mengen an NF- κ B gefunden. Eine Hemmung des NF- κ B-Signalweges durch den Blocker BAY11-7082 hatte aber keinen Einfluss auf die Cx43-Proteinmenge (Liao et al., 2013). Einen weiteren Hinweis auf mögliche Mechanismen der Herunterregulation der Cx43-Expression liefern Experimente an humanen Astrozyten, in denen die Aktivierung des TLR3 zum Verlust von Cx43 mRNA und Protein durch den NF- κ B- und IP₃-Signalweg geführt hat (Zhao et al., 2006). Diese Befunde haben insofern eine Relevanz, als TLR3, TLR4 und IL-1R1 zu der gleichen Rezeptorfamilie mit einer zytoplasmischen TIR-Domäne gehören, die die NF- κ B- und IP₃- abhängigen Signalwege aktivieren können (O'Neill and Bowie, 2007; O'Neill and Greene, 1998; Sanchez-Alavez et al., 2006; Stellwagen et al., 2005; Viviani et al., 2003).

Die oben genannten Arbeiten geben einen Überblick über mögliche Signalwege, die zur reduzierten Expression von Cx43 führen. Um Gewissheit über die Mechanismen der Entkopplung während der Epileptogenese zu bekommen, benötigt man *in vivo* Experimente und einen möglichst natürlichem Stimulus, wie zum Beispiel HT-induzierte FK. Damit ließe sich möglicherweise feststellen, welche Signalwege bei Astrozyten der Maus zur Entkopplung führen.

Es ist grundsätzlich nicht geklärt, ob den Änderungen in der Kopplung und in der Expression von Cx43 eine schützende oder schädigende Wirkung zuzusprechen ist. Es gibt experimentelle Belege, dass die Gap Junction-vermittelte Kopplung zu einer größeren Verteilung der Stressmoleküle und somit zu höheren neuronalen Schäden beiträgt (de Pina-Benabou et al., 2005; Frantseva et al., 2002; Kielian, 2008). Darüber hinaus bedarf hohe neuronale Aktivität, wie sie z.B. während der Epilepsie vorkommt, einer erhöhten Versorgung mit Metaboliten wie Glukose und Laktat. Das ist jedoch nur mit einem intakten astrozytären Netzwerk möglich (Rouach et al., 2008). Diese Befunde deuten auf eine pro-epileptische Funktion des astrozytären Netzwerks hin. Andererseits gibt es auch Studien die eher für eine anti-epileptische Funktion sprechen. So zeigen Mäuse mit geringerer Cx43-Expression größere Schäden nach einer Ischämie (Nakase et al., 2003). An akuten Schnitten konnte gezeigt werden, dass reduzierte Kopplung der Astrozyten eine verminderte Kaliumpufferung nach sich zieht und somit weitere Übererregbarkeit der Neurone und weitere Schäden zur Folge haben kann (Wallraff et al., 2006). Trotz der teils widersprüchlichen Daten, die durch vielen unterschiedlichen Methoden und Modelle begründet sind, haben wir in unserer Arbeitsgruppe den berechtigten Verdacht, dass in der frühen Phase der Epileptogenese die Entkopplung eine essentielle Rolle spielt. Diese Annahme basiert auf den Ergebnissen aus unserem Epilepsiemodell, das sich der intrakortikalen Kainat-Injektion bedient (Bedner et al., submitted). Hier wurde festgestellt, dass die Entkopplung der Astrozyten zu den ersten Vorgängen gehört, die sehr früh nach der Kainat-Gabe stattfinden und tatsächlich zu einer verringerten Kaliumpufferung und zu einer Übererregbarkeit der Neurone führen.

Neben der verminderten Gap Junction-vermittelten Kommunikation ist Cx43 an einer Reihe weiterer Prozesse beteiligt. Die C-terminale Domäne des Cx43 enthält Bindungsstellen für unterschiedliche Proteine und scheint mit dem Zellzyklus, der Transkriptionskontrolle und dem Zytoskelett zu interagieren (Giepmans, 2004). Für astrozytäre Gap Junctions sind bis dato mindestens zwei kanalunabhängige Funktionen bekannt. Das sind die Regulation der neuronalen Wanderung und Differenzierung (Elias et al., 2007; Kunze et al., 2009; Prochnow and Dermietzel, 2008; Wiencken-Barger et al., 2007) sowie die Regulation der Expression von P2Y1-Rezeptoren (Scemes, 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Cx43 die Transkription einer Reihe von Genen im Gehirn von Mäusen reguliert (Iacobas et al., 2007; Spray and Iacobas, 2007).

4.2.2 Verändertes Phosphorylierungsmuster

Neben der verringerten Cx43 Proteinmenge ist bei den *in vivo* Experimenten auch ein verändertes Phosphorylierungsmuster festgestellt worden (Abbildung 15A-B). Es ist deutlich erkennbar, dass die Behandlung mit LPS die Ausprägung der P1- und P2-Bande stark reduziert, während die P0-Bande unverändert bleibt. Es ist nicht möglich die verschiedenen Banden den Aktivitäten bestimmter Kinasen oder Phosphatasen zuzuordnen. So kann die P1-Bande unter anderem durch Phosphorylierung mittels PKA oder MAPK entstehen. Bei der P2-Bande ist es ähnlich, hier kommen wenigstens 2 Enzyme in Frage, CK1 und p34/Cdc2. Hinter einer P0-Bande kann sich sowohl ein unphosphoryliertes als auch ein durch PKC modifiziertes Protein verbergen. (Übersicht in (Lampe and Lau, 2004; Solan and Lampe, 2009)). Wie in der Übersichtsarbeit von Solan und Lampe diskutiert, ist die Verschiebung um 2-4 kDa zwischen den einzelnen Phosphorylierungsformen nicht lediglich durch die Masse des angehefteten Phosphat-Restes zu erklären, das rein rechnerisch eine Verschiebung lediglich um 80 Da verursachen würde. Die spezifischen Phosphorylierungen sollen Konformationsänderungen des Cx43 Proteins bewirken. Es wird vom Lampe und Kollegen aber nicht erklärt, warum diese Änderungen nach der Auftrennung der Proteine im SDS-Gel sichtbar bleiben. Die hier und in anderen Untersuchungen verwendete Methode der Auftrennung der Proteine in einem SDS-Gel basiert darauf, dass die Proteine komplett denaturiert werden. Das Natrium Dodecyl Sulphate (SDS) ist ein anionisches Tensid, das im Überschuss der Probe zugegeben wird und nach kurzem Erhitzen (5 min bei 95°C) alle Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Aufbrechen der H-Brücken zerstört. Um eventuelle Disulfidbrücken aufzulösen, wird dem Probenpuffer zusätzlich Mercaptoethanol (5%) beigemischt. Nach dieser Behandlung liegen die Proteine linearisiert vor und deren Wandergeschwindigkeit wird nur durch ihr Gewicht bestimmt, da das SDS die Eigenladung des Proteins abschirmt. Die Frage nach der Natur der Konformationsänderungen, die für die veränderte Mobilität des Cx43 Proteins im SDS Gel zuständig sind, bleibt offen. Das rund 150 AS lange C-terminale Ende des Proteins beherbergt mehrere Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen. Dabei führen Phosphorylierung durch die Src (an Threonin-Resten Y247, Y265), MAPK (an Serin-Resten S255, S279, S282), PKC (S368) und p34/cdc2 (S262) zu einer Reduktion der Kopplung wohingegen CK1 (S325, S328, S330) und PKA (S364, S365, S369, S373) die Kopplung erhöhen. Die Veränderungen der Gap Junction-vermittelten Kommunikation werden durch Modifikation des Zusammenbaus, der zellulären Lokalisation

sowie der Öffnungskinetik der Kanäle gesteuert. So stimuliert die Aktivität der PKA den Transport der Cx43-HK vom ER über den Golgi-Apparat zur Membran. Die Phosphorylierung durch CK1 fördert das Zusammensetzen von fertigen Gap Junction Kanälen aus den HK. Dagegen blockiert die PKC den Zusammenbau der Kanäle und reduziert ihre Einzelkanalleitfähigkeit (von 100 pS auf 50 pS). Die Wirkung von Src und MAPK führt zur Schließung der Kanäle. Das Thema Phosphorylierung des Cx43 ist sehr komplex und die hier angewandte Methode eignet sich nur grundsätzliche Veränderungen in dem Phosphorylierungsmuster festzustellen. Um eine genaue Aussage über die beteiligten Enzyme zu machen, können z.B. Phosphorylierungsstellen-spezifischen Antikörper eingesetzt werden. Angesichts der rund 20 bekannten Phosphorylierungsstellen wären viele Antikörper und Experimente notwendig, um alle Möglichkeiten zu untersuchen. Eine alternative Methode ist die Untersuchung mittels der Massenspektrometrie. Dieses Verfahren bedarf aufwendiger Versuche, um Aufreinigung und Konzentrierung der gesuchten Proteine zu gewährleisten.

Das veränderte Phosphorylierungsmuster nach LPS-Behandlung (Abbildung 15A-B) steht im Widerspruch mit einigen Ergebnissen aus Zellkulturexperimenten. So berichteten Meme et al. (2004 & 2006) über einen Rückgang der Cx43-Expression, während das Aussehen des Phosphorylierungsmuster des Proteins im WB nach Behandlungen mit LPS, IL-1 β , TNF α unverändert geblieben ist (Meme et al., 2004b; Meme et al., 2006).

4.2.3 Verhinderung der Entkopplung mit Hilfe von LEV und db-cAMP

Die Behandlung mit LEV veränderte die Gesamtmenge des Cx43-Proteins nicht signifikant (Abbildung 15), bewirkte jedoch eine Normalisierung der funktionellen Kopplung in akuten Hirnschnitten (Abbildung 14). Analyse der Expression und des Phosphorylierungsmusters zeigten, dass LEV die posttranslationale Modifikation des Proteins beeinflusst, die sich hauptsächlich in einer stärker ausgeprägten P1-Bande äußerte (Abbildung 15). Die erste Applikation von LEV wurde 6 h nach der LPS-Injektion durchgeführt, um sicher zu gehen, dass die entzündlichen Vorgänge im Gehirn, wie die Freisetzung von IL-1 β und TNF α , anlaufen konnten bevor das Medikament seine Wirkung entfaltete. Die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine setzt in der Regel innerhalb von 2-3 h nach der LPS-Applikation ein (Csolle and Sperlagh, 2010; Gabellec et al., 1995; Nguyen et al., 1998; Qin et al., 2007; Turrin et al., 2001).

Bis heute ist nicht ganz klar, wie die anti-entzündliche Wirkung von LEV zu Stande kommt. Einerseits verhindert es Schäden durch freie Radikale, wirkt also antioxidativ (Marini et al., 2004). Andererseits verstärkt LEV die Freisetzung von TGFβ1 (Stienen et al., 2011). TGFβ1 ist seinerseits ein Inhibitor der Interleukin-Produktion (Tiemessen et al., 2003; Wahl et al., 1988). Im Lithium-Pilocarpin Modell an Ratten konnte gezeigt werden, dass LEV die Freisetzung von Prostaglandinen (PGE₂) und Stickoxid verhindert ohne die Menge an IL-1β und TNFα zu reduzieren (Al-Shorbagy et al., 2013).

Ein weiteres Molekül, das die Entkopplung erfolgreich verhindern konnte, war db-cAMP (Abbildung 7). Ziel dieser Experimente war es, weitere Signalwege zu identifizieren, die der durch die Entzündung hervorgerufenen Reduktion der astrozytären Kommunikation entgegen wirken. Das Experimentdesign machte es erforderlich, die Substanz gleichzeitig mit den Zytokinen zu applizieren. Idealerweise sollte db-cAMP erst nach einer 3-stündigen Inkubation der Schnitte mit den Zytokinen zugegeben werden, wenn die Astrozyten bereits entkoppelt sind (Abbildung 5). Die Inkubation mit db-cAMP sollte dann weitere 2-3 h betragen, damit die Substanz ausreichend Zeit hat, um ihre Wirkung auf Gap Junction-vermittelte Kopplung zu entfalten. Zuzüglich der Zeit für das Befüllen der Zellen mit Biozytin wären die akuten Schnitte bei diesem Vorgehen viel zu lange in Behandlung, so dass toxische Nebeneffekte nicht mehr ausgeschlossen werden könnten. Eine weitere Möglichkeit, die Wirkung von cAMP auf die Kopplung *in vivo* zu untersuchen, wäre die Tiere mit PPT zu behandeln, denn wie db-cAMP erhöht auch PPT den cAMP-Gehalt in der Zelle. Die Hauptwirkung von cAMP geht auf die Aktivierung der PKA zurück. Cx43 enthält im C-Terminus Serin-Reste (S364, S365, S369, S373), die mittels PKA phosphoryliert werden können, was eine Erhöhung der Kopplung bewirkt. Dadurch wird der Transport der Cx43-HK vom ER über den Golgi-Apparat zur Membran stimuliert (Lampe and Lau, 2004; Solan and Lampe, 2009). Darüber hinaus gibt es einen direkten Einfluss von cAMP auf die Zytokinproduktion, und umgekehrt sind die Zytokine in der Lage, die intrazelluläre cAMP-Konzentration zu reduzieren (Caggiano and Kraig, 1999; Ghosh et al., 2012). Das heißt, dass cAMP die Kopplung auf zwei Wegen verstärken kann: direkt, durch Phosphorylierung von Cx43, sowie indirekt, durch Reduktion der Expression proinflammatorischer Zytokine.

4.3 GS-Expression

Bei der Entstehung der Epilepsie spielt Glutamat eine wichtige Rolle. Zum einen führt das Binden an die ionotropen Glutamatrezeptoren (NMDA-, AMPA und Kainat-Rezeptoren) zu

einem starken Kalziumeinstrom und somit zu einer Übererregung der Neurone. Zum anderen wird durch einen langsamer verlaufenden Prozess die neuronale Zystin-Aufnahme blockiert. Da Zystin jedoch unerlässlich für die Produktion des Antioxidans Glutathion ist, führt das zum Zelltod durch oxidativen Stress (Lewerenz et al., 2006; Tan et al., 2001). Eine Reduktion der GS-Expression ist tatsächlich in Hippokampi von Epilepsiepatienten beobachtet worden (Eid et al., 2004). Die Entfernung von Glutamat aus dem extrazellulären Raum durch Astrozyten mittels Glutamattransporter ist bereits mehrfach beschrieben worden und wirkt neuroprotektiv. Einer der Gründe für dieses Phänomen ist der Umstand, dass durch den astrozytären Glutamat-Glutamin-Zyklus die synaptische Freisetzung von GABA unterstützt wird (Liang et al., 2006). Zu den möglichen Effektoren der GS-Expression gehört $\text{TNF}\alpha$, der einen hemmenden Einfluss ausübt (Zou et al., 2010). Experimente an humanen Astrozytenkulturen haben gezeigt, dass LPS zusammen mit γIFN die Expression und Aktivität der GS reduziert (Muscoli et al., 2005). Eine verminderte Expression von GS unter entzündlichen Bedingungen konnte in Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Expression von GS *in vivo* war durch die Applikation von LPS und die damit zusammenhängende Entzündung im Hippokampus nicht betroffen (Abbildung 18).

4.4 Expression von TAK-1 und p38

TAK-1 ist eine Serin/Threonin Kinase, die eine zentrale Rolle bei der Weiterleitung der durch die IL-1R1, TLR4 und TNFR1 vermittelten Signale spielt. Stimulation der Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen oder mikrobiellen Pathogenen führt zur Aktivierung von TAK-1, die anschließend den I- κ B Kinase Komplex (IKK) und MAP Kinasen aktiviert (Adhikari et al., 2007; Wang et al., 2001). Den MAP Kinasen sind die Kinasen JNK1/2, ERK 1/2 und p38 nachgeschaltet. Der p38-Kinase kommt eine besondere Rolle zu. Dieses Molekül stellt einen negativen Rückkopplungsmechanismus her, der die Aktivierung von TAK-1 unterdrückt (Pathak et al., 2012). So ist es dem Organismus möglich, bei einer langanhaltenden, chronischen Entzündung, wie sie z. B. nach einer i.p. Injektion von LPS auftritt, die Produktion von Zytokinen zu reduzieren. So wirkt p38 sowohl proinflammatorisch, indem es Transkriptionsfaktoren und weitere MAP Kinasen aktiviert, als auch antiinflammatorisch, indem es das Schlüsselenzym TAK-1 hemmt. Die im Rahmen dieser Arbeit festgestellten Veränderungen der Expressionsmuster entsprechen diesem Konzept. 5 Tage nach LPS-Injektion war sowohl die TAK-1- als auch p38-Proteinmenge

signifikant reduziert (Abbildung 17, Abbildung 18). Die Applikation von LEV macht diesen Effekt wieder rückgängig. Darüber hinaus lässt sich auch eine Änderung im Phosphorylierungsmuster von p38 erkennen (Abbildung 18 B). Unter Kontrollbedingungen lag das Molekül sowohl aktiviert (phosphoryliert, obere Bande) als auch nicht aktiviert vor (untere Bande). Die chronische Entzündung führte dazu, dass fast alle p38-Moleküle aktiviert wurden (obere Bande). In Bezug auf TAK-1 kann man keine Aussage über den Phosphorylierungsstatus machen. Es ist in allen Proben nur eine Bande sichtbar, obwohl der Antikörper laut Hersteller in der Lage wäre, beide Formen des Proteins zu erkennen.

4.5 Hyperthermie-induzierte Fieberkrämpfe

4.5.1 Verhaltensanalyse

Das Verhalten von Mäusen während HT kann grundsätzlich in 5 Phasen unterteilt werden: Hyperaktivität, plötzliche Immobilität, Rennen in engen Kreisen, Zittern und tonisch-klonische Anfälle. Die Gruppe um T. Baram (Irvine, Kalifornien) fand eine Korrelation zwischen dem Auftreten der ersten Entladungen in EEG und plötzlicher Immobilität (Dube et al., 2006). Ein alternativer Ansatz favorisiert dagegen tonisch-klonische Konvulsionen als Marker für Fieberkrämpfe (Hessel et al., 2009). Da eine Implantierung der EEG-Transmitter bei 14-15 Tage alten Tieren wegen der geringen Körpergröße nicht möglich war, musste ein verlässliches Zeichen für das Auftreten der Anfälle bestimmt werden. Das Auftreten der plötzlichen Immobilität diente als ein solches Zeichen, denn die anderen Verhaltensweisen waren entweder sporadisch aufgetreten oder ließen sich nur schwer erkennen.

Trotz der Tatsache, dass nicht alle 5 möglichen Stadien des Verhaltens während HT sich immer eindeutig bestimmen ließen, war die Etablierung des HT-Modells an GFAP-EGFP-Mäusen möglich. Rund 33 % der Tiere zeigen reduzierte Astrozyten-Kopplung nach einer einmaligen HT-Behandlung (Abbildung 21, Abbildung 22). Dieses Ergebnis bewegt sich im Rahmen der 35% der Ratten, bei denen spontane Anfälle beobachtet wurden. Diese Ratten zeigen auch erhöhte Konzentrationen an IL-1 β im Hippokampus verglichen mit denen, die keine Anfälle entwickelten (Dube et al., 2010). Im ersten Teil dieser Arbeit ist die entkoppelnde Wirkung von IL-1 β auf Astrozyten bestätigt worden (Abschnitt 3.1 und 3.1.2). Es ist anzunehmen, dass dieses Zytokin auch bei HT zu reduzierter Gap Junction-vermittelten Kommunikation führt, denn IL-1 β wird bei HT stärker exprimiert und senkt die Schwelle für das Auslösen von Anfällen (Dube et al., 2005; Dube et al., 2010). Eine EEG-Analyse der

Tiere während HT würde eine Verbesserung der Aussagekraft der Experimente ermöglichen. So könnte man den genauen Zeitpunkt, die Dauer und eventuell den Ursprung der Anfälle detektieren. Damit ließen sich, in Analogie zu den Experimenten an Ratten, Voraussagen darüber machen, welche Tiere stärkere Anfälle entwickeln und somit mehr IL-1 β freigesetzt haben. Für diesen Zweck müssten Tiefenelektroden eingesetzt werden. Die Untersuchung der Langzeiteffekte der HT (Abbildung 23, Abbildung 24) erfolgte mit monopolaren Elektroden, die an der Kortexoberfläche platziert wurden und sich nur zur Detektion generalisierter Anfälle eigneten. Mit dieser Methode konnten bei 25 % der Mäuse spontane Anfälle rund zwei Monate nach HT detektiert werden. Es bedarf weiterer Experimente, um die Zahl der Untersuchungen zu erhöhen und eine statistisch gesichertere Aussage machen zu können. Die Experimente an Ratten haben keine generalisierten, sondern nur fokale Anfälle ausgelöst, die in dem hier verwendeten Tiermodell nicht detektiert werden konnten. Ungeachtet dessen bleibt festzuhalten, dass die hier etablierte HT-Methode einen robusten Effekt bei Mäusen hatte, der bisher in keiner Arbeit dokumentiert wurde. Erstmals haben wir spontane generalisierte Anfälle durch HT bei Mäusen auslösen können. Die Tatsache, dass sich bei einer epileptischen Maus während den EEG-Entladungen tonisch-klonische Konvulsionen beobachten ließen, bestätigt die Vermutung, dass es sich um generalisierte Anfälle gehandelt hat. Somit ist HT ein brauchbares Modell, um spontane Anfälle in Mäusen auszulösen. Verglichen mit dem Kainat-Modell ist die Anfallsdauer mit 30 s rund 40 % kürzer (Bedner et al., submitted). Außerdem entwickeln nicht alle Tiere spontane Anfälle. Es ist jedoch möglich spontane Anfälle mit HT auszulösen, ohne das Gehirn mechanisch durch Injektionskanülen zu verletzen und ohne chemische Substanzen von außen zuzuführen. Damit ergibt sich eine Möglichkeit, die frühkindlichen FK beim Menschen zu simulieren und Ursachen sowie den zeitlichen Verlauf der Epileptogenese zu untersuchen.

4.6 Altersabhängige astrozytäre Kopplung im Hippokampus

Die Reifung der Astrozyten in der postnatalen Phase ist unter anderem gekennzeichnet dadurch, dass die Expression von Kir 4.1 und AQR4 erst im Verlauf der ersten zwei Wochen zunimmt (Gupta and Kanungo, 2013; Seifert et al., 2009). Offensichtlich unterliegt auch die Expression von Connexinen und somit die Gap Junction-vermittelte Kopplung einer altersabhängigen Regulation. Wie in der Abbildung 25 zu sehen ist, sind die Astrozyten in jungen Tieren am stärksten gekoppelt. Maximale Kopplung wurde zum Zeitpunkt p15-16

ermittelt. Zu diesem Zeitpunkt war die Standardabweichung auch am größten, mehr als zweimal so groß wie bei adulten Tieren (p90-170). Das spiegelt die starke Heterogenität der Astrozyten im Hinblick auf die Kopplung in diesem Alter wieder. Morphologisch ließen sich die Zellen nicht unterscheiden. Andere Arbeiten zeigen, dass die Anzahl der unreifen Astrozyten bei noch jüngeren Tieren höher ist. Neun Tage alte hGFAP-EGFP-Mäuse zeigten eine durchschnittliche Kopplung von 234 ± 182 Zellen (Wallraff et al., 2004). Die Standardabweichungen in der von Anke Wallraff durchgeführten Studie waren grundsätzlich etwas höher verglichen mit denen dieser Arbeit. Ungeachtet dessen gibt es eine eindeutige Tendenz: die Standardabweichung wird mit zunehmendem Alter geringer, was auf ein einheitliches Kopplungsverhalten schließen lässt, aber auch die absoluten Kopplungszahlen gehen zurück. Ähnliche Berichte gibt aus Experimenten mit Ratten (Konietzko and Muller, 1994; Schools et al., 2006). Dieses Kopplungsverhalten der Astrozyten bietet eine Erklärungsmöglichkeit für den Umstand, dass sowohl bei Nagern als auch bei Menschen die Empfänglichkeit für die FK in der frühen postnatalen Periode sehr hoch ist. Zumindest bei Nagern konnte experimentell ermittelt werden, dass die Kopplung in den ersten Wochen nach der Geburt am höchsten ist und dementsprechend eine Entkopplung der Astrozyten einen starken Effekt hat.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Astrozyten sind der häufigste Zelltyp im menschlichen Gehirn. Die ursprüngliche Sichtweise, dass die Astrozyten nur als eine Art Kitt für die Neurone dienen, ist seit mehreren Jahren widerlegt. Zahlreiche Versuche zeigen, dass Astrozyten unerlässlich für die Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn sind. Zu ihren Aufgaben zählen das Versorgen der Neurone mit Metaboliten, die Pufferung der extrazellulären Kalium Ionen und Neurotransmitter nach neuronalen Aktivität, die Regulation des Wasserhaushalts und vieles mehr. Darüber hinaus exprimieren Astrozyten Kanäle und Rezeptoren für unterschiedliche Neurotransmitter und Second Messenger. Dadurch sind diese Zellen in der Lage, direkt mit Neuronen zu kommunizieren. Das beinhaltet sowohl die Fähigkeit, neuronale Signale zu empfangen und darauf zu reagieren, als auch die Fähigkeit, auf die neuronale Aktivität einen Einfluss auszuüben und sogar über größere Distanzen neuronale Aktivität zu koordinieren. Bei einer Reihe von neurologischen Erkrankungen, einschließlich der Epilepsie, sind Fehlfunktionen der Astrozyten festgestellt worden. Dazu zählt die Entkopplung der Astrozyten, die im Gehirngewebe von Epilepsiepatienten beobachtet wird. Es ist aber nicht klar, ob diese Fehlfunktionen Folge oder Ursache der Pathologie darstellen. Mithilfe eines Kainat-induzierten Epilepsiemodells konnte in der Maus gezeigt werden, dass die Entkopplung der Astrozyten bereits vor dem Auftreten erster spontaner Anfälle auftritt und somit einen kausalen Effekt darstellt. Eine weitere gemeinsame Komponente, die sowohl bei Epilepsiepatienten als auch in Epilepsiemodellen bei Nagern auftritt, ist eine erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und TNF α .

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die gefundene Entkopplung der Astrozyten durch proinflammatorische Zytokine induziert wird. Für die Untersuchung der funktionellen Kopplung wurde die Biozotin-Diffusionsmethode angewandt, die auf der Patch-Clamp-Methode basiert. Inkubation akuter hippokampaler Gewebeschnitte mit den Zytokinen IL-1 β und/oder TNF α oder LPS führte tatsächlich zu einer signifikanten Reduktion der Kopplung. Die entkoppelnde Wirkung von IL-1 β und TNF α konnte mit db-cAMP verhindert werden. Des Weiteren wurde eine chronische Entzündung durch eine einmalige i.p. Injektion von LPS ausgelöst und deren Auswirkung auf die Kopplung der Astrozyten und die Expression einiger Proteine im Hippokampus untersucht. Am Tag 5 nach LPS-Injektion war die Kopplung zwischen den Astrozyten signifikant reduziert. Das stimmt mit unserer These überein, dass

proinflammatorische Zytokine eine hemmende Wirkung auf die Gap Junction-vermittelte Kommunikation *in vivo* ausüben. Weiterhin konnte eine Entkopplung durch Behandlung der Tiere mit dem Antiepileptikum Levetiracetam verhindert werden. Damit wurde ein weiterer potentieller antiepileptischer Wirkmechanismus von Levetiracetam identifiziert. Die Analyse der Proteinexpression ergab, dass die Entkopplung sowohl mit verminderter Expression von Cx43 als auch mit einem veränderten Phosphorylierungsmuster des Proteins einhergeht. Darüber hinaus hatte die chronische Entzündung sich auf die Expression von TAK-1 und p38 ausgewirkt. Die LPS-induzierte Reduktion der Expression von TAK-1 und p38 konnte mit LEV rückgängig gemacht werden.

Ergänzend wurde im Rahmen dieser Arbeit ein HT-induziertes Epilepsiemodell an hGFAP-EGFP-Mäusen etabliert. In Analogie zu Experimenten an Ratten hatten rund ein Viertel der untersuchten Mäuse spontane Anfälle entwickelt. Bei rund 30 % der Tiere konnte eine signifikante Reduktion der Kopplung festgestellt werden. Da während HT verstärkt proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden, ist das ein weiteres Indiz dafür, dass die Entkopplung der Astrozyten zu den grundlegenden Mechanismen der Epileptogenese gehört.

6 SUMMARY

Astrocytes are the most common cell type of the human brain. For decades they were considered as a kind of lute, but during the past 20 years this concept was disproved. Multitudinous experiments have shown that astrocytes are vital for preservation of homoeostasis of the brain. Besides buffering of extracellular potassium ions and neurotransmitters after neuronal activity and the regulating cellular water balance, astrocytes express ion channels and transmitter receptors to directly communicate with the neurons. Notably, they affect and coordinate the neuronal activity even over larger distances. There are several neuronal diseases including epilepsy which are associated with malfunctions of astrocytes. Unpublished work from our group demonstrates that astrocytes in neurosurgical samples from patients with temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis (TLE-HS) completely lack gap junction coupling. It is however mostly unclear whether the malfunctions are effect or cause of the pathology. With the help of a kainate induced epilepsy mouse model we could now show that the uncoupling of astrocytes appears before the first spontaneous epileptic seizures so that there is evidence for causal link. This raises the question of the mechanism(s) underlying uncoupling of astrocytes during epileptogenesis.

Early childhood febrile seizures are considered a predisposing event in TLE, and increasing evidence suggests a role of pro-inflammatory cytokine in its pathogenesis. The goal of this study was to investigate in a mouse model of TLE-HS whether uncoupling of astrocytes is induced through pro-inflammatory cytokines. The biocytin-diffusion method, which is based on patch-clamp-recordings, was used to analyze functional coupling. Incubation of acute hippocampal tissue sections with the cytokines IL-1 β and/or TNF α or LPS led to a significant reduction of astrocytic coupling. The uncoupling effect of IL-1 β and TNF α could be prevented by co-incubation with db-cAMP. In another set of experiments, chronic inflammation was induced with a single i.p. injection of LPS and the impact on coupling of astrocytes and protein expression was studied. On the 5th day after LPS injection coupling of astrocytes was significantly reduced. These results were in line with our hypothesis that pro-inflammatory cytokines inhibit gap junction mediated communication in vivo. Intriguingly, uncoupling of astrocytes in vivo could be rescued by treatment with the antiepileptic drug, Levetiracetam, revealing a new target of this drug. Analysis of protein expression revealed that astrocyte uncoupling is accompanied by reduced expression of Cx43 and changed

phosphorylation patterns of the proteins. Moreover, chronic inflammation had an impact on expression of TAK-1 and p38, which are key down-stream inflammatory regulator molecules. LPS-induced reduction of the expression of TAK-1 and p38 could also be rescued with the antiepileptic drug Levetiracetam.

Finally, a hyperthermia-induced mouse model of human febrile seizures could be established. A proportion of these mice developed epileptic seizures, which was in line with previous analyses in rat. Importantly, in about 30% of the animals exposed to hyperthermia a significant reduction of astrocytic coupling in the hippocampus was noticed. Together, these results identify astrocyte gap junction coupling as promising targets for the development of new anti-epileptogenic therapies.

7 LITERATUR

Adhikari A, Xu M, Chen ZJ (2007) Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* 26:3214-3226.

Agulhon C, Petravicz J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiocco TA, McCarthy KD (2008) What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 59:932-946.

Al-Shorbagy MY, El Sayeh BM, Abdallah DM (2013) Additional antiepileptic mechanisms of levetiracetam in lithium-pilocarpine treated rats. *PLoS One* 8:e76735.

Alheim K, Bartfai T (1998) The interleukin-1 system: receptors, ligands, and ICE in the brain and their involvement in the fever response. *Ann N Y Acad Sci* 840:51-8.:51-58.

Anderson M (1993) Management of cerebral infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56:1243-1258.

Angehagen M, Margineanu DG, Ben-Menachem E, Ronnback L, Hansson E, Klitgaard H (2003) Levetiracetam reduces caffeine-induced Ca²⁺ transients and epileptiform potentials in hippocampal neurons. *Neuroreport* 14:471-475.

Araque A (2008) Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol* 4:3-10.

Araque A, Navarrete M (2010) Glial cells in neuronal network function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365:2375-2381.

Arend WP (1993) Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 54:167-227.

Arend WP, Guthridge CJ (2000) Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann Rheum Dis* 59 Suppl 1:i60-i64.

Arend WP, Smith MF, Jr., Janson RW, Joslin FG (1991) IL-1 receptor antagonist and IL-1 beta production in human monocytes are regulated differently. *J Immunol* 147:1530-1536.

Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP (2001) TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4:1116-1122.

Aronica E, Gorter JA, Ijlst-Keizers H, Rozemuller AJ, Yankaya B, Leenstra S, Troost D (2003) Expression and functional role of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: opposite regulation of glutamate transporter proteins. *Eur J Neurosci* 17:2106-2118.

Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7:111-118.

- Banati RB, Schubert P, Rothe G, Gehrmann J, Rudolphi K, Valet G, Kreutzberg GW (1994) Modulation of intracellular formation of reactive oxygen intermediates in peritoneal macrophages and microglia/brain macrophages by propentofylline. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:145-149.
- Beardslee MA, Laing JG, Beyer EC, Saffitz JE (1998) Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res* 83:629-635.
- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von ZM, Beattie MS, Malenka RC (2002) Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science* 295:2282-2285.
- Bennett MV, Contreras JE, Bukauskas FF, Saez JC (2003) New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci* 26:610-617.
- Berg AT, Shinnar S (1996) Unprovoked seizures in children with febrile seizures: short-term outcome. *Neurology* 47:562-568.
- Berg AT, Shinnar S, Levy SR, Testa FM (1999) Childhood-onset epilepsy with and without preceding febrile seizures. *Neurology* 53:1742-1748.
- Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE (2000) Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 405:187-191.
- Berkenbosch F, van OJ, del RA, Tilders F, Besedovsky H (1987) Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science* 238:524-526.
- Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature* 395:645-648.
- Besedovsky H, del RA, Sorkin E, Dinarello CA (1986) Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233:652-654.
- Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De CE, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4:702-710.
- Black RA, Kronheim SR, Sleath PR (1989) Activation of interleukin-1 beta by a co-induced protease. *FEBS Lett* 247:386-390.
- Blamire AM, Anthony DC, Rajagopalan B, Sibson NR, Perry VH, Styles P (2000) Interleukin-1 β -induced changes in blood-brain barrier permeability, apparent diffusion coefficient, and cerebral blood volume in the rat brain: a magnetic resonance study. *J Neurosci* 20:8153-8159.
- Bourdiol F, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, Scatton B (1991) Increase in omega 3 (peripheral type benzodiazepine) binding sites in the rat cortex and striatum after local injection of interleukin-1, tumour necrosis factor- α and lipopolysaccharide. *Brain Res* 543:194-200.
- Brambilla R, Ashbaugh JJ, Magliozzi R, Dellarole A, Karmally S, Szymkowski DE, Bethea JR (2011) Inhibition of soluble tumour necrosis factor is therapeutic in experimental

autoimmune encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination. *Brain* 134:2736-2754.

Brand-Schieber E, Werner P, Jacobas DA, Jacobas S, Beelitz M, Lowery SL, Spray DC, Scemes E (2005) Connexin43, the major gap junction protein of astrocytes, is down-regulated in inflamed white matter in an animal model of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 80:798-808.

Breder CD, Hazuka C, Ghayur T, Klug C, Huginin M, Yasuda K, Teng M, Saper CB (1994) Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11393-11397.

Brenner M, Kisseberth WC, Su Y, Besnard F, Messing A (1994) GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J Neurosci* 14:1030-1037.

Bruzzo R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H (2003) Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13644-13649.

Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22:183-192.

Butt AM (2005) Structure and function of oligodendrocytes In: *Neuroglia*, second edition (Kettenmann H, Ransom BR, eds). pp 36-47. New York, NY: Oxford University Press, Inc.

Buttini M, Appel K, Sauter A, Gebicke-Haerter PJ, Boddeke HW (1996) Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischaemia in the rat. *Neuroscience* 71:1-16.

Caggiano AO, Kraig RP (1999) Prostaglandin E receptor subtypes in cultured rat microglia and their role in reducing lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta production. *J Neurochem* 72:565-575.

Canault M, Peiretti F, Mueller C, Kopp F, Morange P, Rihs S, Portugal H, Juhan-Vague I, Nalbone G (2004) Exclusive expression of transmembrane TNF-alpha in mice reduces the inflammatory response in early lipid lesions of aortic sinus. *Atherosclerosis* 172:211-218.

Carter DB, Deibel MR, Jr., Dunn CJ, Tomich CS, Laborde AL, Slightom JL, Berger AE, Bienkowski MJ, Sun FF, McEwan RN, . (1990) Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 344:633-638.

Cartmell T, Luheshi GN, Rothwell NJ (1999) Brain sites of action of endogenous interleukin-1 in the febrile response to localized inflammation in the rat. *J Physiol* 518 (Pt 2):585-594.

Cataldi M, Lariccia V, Secondo A, di RG, Annunziato L (2005) The antiepileptic drug levetiracetam decreases the inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent [Ca²⁺]_i increase induced by ATP and bradykinin in PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 313:720-730.

Cendes F, Andermann F, Dubeau F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, Olivier A, Andermann E, Robitaille Y, Lopes-Cendes I, . (1993) Early childhood prolonged febrile

convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology* 43:1083-1087.

Chan PH, Fishman RA (1980) Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling. *J Neurochem* 35:1004-1007.

Cheung PC, Campbell DG, Nebreda AR, Cohen P (2003) Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. *EMBO J* 22:5793-5805.

Cho S, Wood A, Bowlby MR (2007) Brain slices as models for neurodegenerative disease and screening platforms to identify novel therapeutics. *Curr Neuropharmacol* 5:19-33.

Christie MJ, Jelinek HF (1993) Dye-coupling among neurons of the rat locus coeruleus during postnatal development. *Neuroscience* 56:129-137.

Chung IY, Benveniste EN (1990) Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J Immunol* 144:2999-3007.

Claudio L, Martiney JA, Brosnan CF (1994) Ultrastructural studies of the blood-retina barrier after exposure to interleukin-1 beta or tumor necrosis factor-alpha. *Lab Invest* 70:850-861.

Colling SB, Man WD, Draguhn A, Jefferys JG (1996) Dendritic shrinkage and dye-coupling between rat hippocampal CA1 pyramidal cells in the tetanus toxin model of epilepsy. *Brain Res* 741:38-43.

Contreras JE, Sanchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, Bukauskas FF, Bennett MV, Saez JC (2002) Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:495-500.

Csolle C, Sperlagh B (2010) Peripheral origin of IL-1beta production in the rodent hippocampus under in vivo systemic bacterial lipopolysaccharide (LPS) challenge and its regulation by P2X(7) receptors. *J Neuroimmunol* 219:38-46.

Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.

Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8:429-440.

Dani JW, Smith SJ (1995) The triggering of astrocytic calcium waves by NMDA-induced neuronal activation. *Ciba Found Symp* 188:195-205.

de Pina-Benabou MH, Szostak V, Kyrozis A, Rempe D, Uziel D, Urban-Maldonado M, Benabou S, Spray DC, Federoff HJ, Stanton PK, Rozental R (2005) Blockade of gap junctions in vivo provides neuroprotection after perinatal global ischemia. *Stroke* 36:2232-2237.

De ST, Raedt R, Vonck K, Boon P (2007) Levetiracetam: the profile of a novel anticonvulsant drug-part I: preclinical data. *CNS Drug Rev* 13:43-56.

- DeLeo J, Toth L, Schubert P, Rudolphi K, Kreutzberg GW (1987) Ischemia-induced neuronal cell death, calcium accumulation, and glial response in the hippocampus of the Mongolian gerbil and protection by propentofylline (HWA 285). *J Cereb Blood Flow Metab* 7:745-751.
- Dermietzel R, Gao Y, Scemes E, Vieira D, Urban M, Kremer M, Bennett MV, Spray DC (2000) Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins. *Brain Res Brain Res Rev* 32:45-56.
- Dermietzel R, Hertberg EL, Kessler JA, Spray DC (1991) Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *J Neurosci* 11:1421-1432.
- Dinarello CA (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87:2095-2147.
- Dinarello CA (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* 118:503-508.
- Dinarello CA (1991) Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77:1627-1652.
- Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJ, Orencole SF, Lonnemann G, Cannon JG, Libby P (1987) Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* 139:1902-1910.
- Ding S, Fellin T, Zhu Y, Lee SY, Auberson YP, Meaney DF, Coulter DA, Carmignoto G, Haydon PG (2007) Enhanced astrocytic Ca²⁺ signals contribute to neuronal excitotoxicity after status epilepticus. *J Neurosci* 27:10674-10684.
- Dube C, Chen K, Eghbal-Ahmadi M, Brunson K, Soltesz I, Baram TZ (2000) Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term. *Ann Neurol* 47:336-344.
- Dube C, Richichi C, Bender RA, Chung G, Litt B, Baram TZ (2006) Temporal lobe epilepsy after experimental prolonged febrile seizures: prospective analysis. *Brain* 129:911-922.
- Dube C, Vezzani A, Behrens M, Bartfai T, Baram TZ (2005) Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Ann Neurol* 57:152-155.
- Dube CM, Brewster AL, Baram TZ (2009) Febrile seizures: mechanisms and relationship to epilepsy. *Brain Dev* 31:366-371.
- Dube CM, McClelland S, Choy MK, Brewster AL, Noam Y, Baram TZ (2012) Fever, febrile seizures and epileptogenesis. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*.
- Dube CM, Ravizza T, Hamamura M, Zha Q, Keebaugh A, Fok K, Andres AL, Nalcioglu O, Obenaus A, Vezzani A, Baram TZ (2010) Epileptogenesis provoked by prolonged experimental febrile seizures: mechanisms and biomarkers. *J Neurosci* 30:7484-7494.
- Eid T, Thomas MJ, Spencer DD, Runden-Pran E, Lai JC, Malthankar GV, Kim JH, Danbolt NC, Ottersen OP, de Lanerolle NC (2004) Loss of glutamine synthetase in the human

epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet* 363:28-37.

Eid T, Williamson A, Lee TS, Petroff OA, de Lanerolle NC (2008) Glutamate and astrocytes-key players in human mesial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia* 49 Suppl 2:42-52.

Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, Verderber E, Brewer MT, Hannum CH, Thompson RC (1990) Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 343:341-346.

Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR (2007) Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448:901-907.

Escartin C, Rouach N (2013) Astroglial networking contributes to neurometabolic coupling. *Front Neuroenergetics* 5:4.

Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, Baulac S, Huberfeld G, An-Gourfinkel I, Brice A, LeGuern E, Moulard B, Chaigne D, Buresi C, Malafosse A (2000) Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet* 24:343-345.

Evans RJ, Bray J, Childs JD, Vigers GP, Brandhuber BJ, Skalicky JJ, Thompson RC, Eisenberg SP (1995) Mapping receptor binding sites in interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 beta by site-directed mutagenesis. Identification of a single site in IL-1ra and two sites in IL-1 beta. *J Biol Chem* 270:11477-11483.

Fantuzzi G, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Sipe JD, Kuida K, Flavell RA, Dinarello CA (1997) Response to local inflammation of IL-1 beta-converting enzyme-deficient mice. *J Immunol* 158:1818-1824.

Faustmann PM, Haase CG, Romberg S, Hinkerohe D, Szlachta D, Smikalla D, Krause D, Dermietzel R (2003) Microglia activation influences dye coupling and Cx43 expression of the astrocytic network. *Glia* 42:101-108.

Fenton MJ, Vermeulen MW, Clark BD, Webb AC, Auron PE (1988) Human pro-IL-1 beta gene expression in monocytic cells is regulated by two distinct pathways. *J Immunol* 140:2267-2273.

Fernandez-Cobo M, Gingalewski C, Drujan D, De MA (1999) Downregulation of connexin 43 gene expression in rat heart during inflammation. The role of tumour necrosis factor. *Cytokine* 11:216-224.

Frampton M, Harvey RJ, Kirchner V (2003) Propentofylline for dementia. *Cochrane Database Syst Rev* CD002853.

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.

Fredholm BB, Fastbom J, Kvanta A, Gerwins P, Parkinson F (1992) Further evidence that propentofylline (HWA 285) influences both adenosine receptors and adenosine transport. *Fundam Clin Pharmacol* 6:99-111.

- Fredholm BB, Lindstrom K (1986) The xanthine derivative 1-(5'-oxohexyl)-3-methyl-7-propyl xanthine (HWA 285) enhances the actions of adenosine. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 58:187-192.
- French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, Spencer DD (1993) Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol* 34:774-780.
- Gabellec MM, Griffais R, Fillion G, Haour F (1995) Expression of interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor antagonist mRNA in mouse brain: regulation by bacterial lipopolysaccharide (LPS) treatment. *Brain Res Mol Brain Res* 31:122-130.
- Gadient RA, Otten U (1994) Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat brain during postnatal development. *Brain Res* 637:10-14.
- Galic MA, Riazi K, Heida JG, Mouihate A, Fournier NM, Spencer SJ, Kalynchuk LE, Teskey GC, Pittman QJ (2008) Postnatal inflammation increases seizure susceptibility in adult rats. *J Neurosci* 28:6904-6913.
- Ghosh M, Garcia-Castillo D, Aguirre V, Golshani R, Atkins CM, Bramlett HM, Dietrich WD, Pearce DD (2012) Proinflammatory cytokine regulation of cyclic AMP-phosphodiesterase 4 signaling in microglia in vitro and following CNS injury. *Glia* 60:1839-1859.
- Giaume C, Fromaget C, el AA, Cordier J, Glowinski J, Gros D (1991) Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron* 6:133-143.
- Giepmans BN (2004) Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res* 62:233-245.
- Gillard M, Chatelain P, Fuks B (2006) Binding characteristics of levetiracetam to synaptic vesicle protein 2A (SV2A) in human brain and in CHO cells expressing the human recombinant protein. *Eur J Pharmacol* 536:102-108.
- Giulian D, Baker TJ (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* 6:2163-2178.
- Giulian D, Woodward J, Young DG, Krebs JF, Lachman LB (1988a) Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci* 8:2485-2490.
- Giulian D, Young DG, Woodward J, Brown DC, Lachman LB (1988b) Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J Neurosci* 8:709-714.
- Goldbach-Mansky R, et al. (2006) Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *N Engl J Med* 355:581-592.
- Gorji A, Hohling JM, Madeja M, Straub H, Kohling R, Tuxhorn I, Ebner A, Wolf P, Panneck HW, Behne F, Lahl R, Speckmann EJ (2002) Effect of levetiracetam on epileptiform discharges in human neocortical slices. *Epilepsia* 43:1480-1487.

Gosejacob D, Dublin P, Bedner P, Huttmann K, Zhang J, Tress O, Willecke K, Pfrieger F, Steinhauser C, Theis M (2010) Role of astroglial connexin30 in hippocampal gap junction coupling. *Glia* 59:511-519.

Gower AJ, Noyer M, Verloes R, Gobert J, Wulfert E (1992) ucb L059, a novel anti-convulsant drug: pharmacological profile in animals. *Eur J Pharmacol* 222:193-203.

Granowitz EV, Santos AA, Poutsiaka DD, Cannon JG, Wilmore DW, Wolff SM, Dinarello CA (1991) Production of interleukin-1-receptor antagonist during experimental endotoxaemia. *Lancet* 338:1423-1424.

Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G (1995) Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem* 270:13757-13765.

Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83:793-802.

Grim SA, Ryan M, Miles MV, Tang PH, Strawsburg RH, deGrauw TJ, Fakhoury TA, Baumann RJ (2003) Correlation of levetiracetam concentrations between serum and saliva. *Ther Drug Monit* 25:61-66.

Grosche A, Grosche J, Tackenberg M, Scheller D, Gerstner G, Gumprecht A, Pannicke T, Hirrlinger PG, Wilhelmsson U, Huttmann K, Hartig W, Steinhauser C, Pekny M, Reichenbach A (2013) Versatile and simple approach to determine astrocyte territories in mouse neocortex and hippocampus. *PLoS One* 8:e69143.

Gu J, Lynch BA, Anderson D, Klitgaard H, Lu S, Elashoff M, Ebert U, Potschka H, Loscher W (2004) The antiepileptic drug levetiracetam selectively modifies kindling-induced alterations in gene expression in the temporal lobe of rats. *Eur J Neurosci* 19:334-345.

Gupta RK, Kanungo M (2013) Glial molecular alterations with mouse brain development and aging: up-regulation of the Kir4.1 and aquaporin-4. *Age (Dordr)* 35:59-67.

Haghikia A, Ladage K, Hinkerohe D, Vollmar P, Heupel K, Dermietzel R, Faustmann PM (2008) Implications of antiinflammatory properties of the anticonvulsant drug levetiracetam in astrocytes. *J Neurosci Res* 86:1781-1788.

Halassa MM, Florian C, Fellin T, Munoz JR, Lee SY, Abel T, Haydon PG, Frank MG (2009) Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron* 61:213-219.

Halassa MM, Haydon PG (2010) Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol* 72:335-355.

Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thompson RC (1990) Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 343:336-340.

Harkin LA, Bowser DN, Dibbens LM, Singh R, Phillips F, Wallace RH, Richards MC, Williams DA, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE, Petrou S (2002) Truncation of the GABA(A)-receptor gamma2 subunit in a family with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet* 70:530-536.

Haskill S, Martin G, Van LL, Morris J, Peace A, Bigler CF, Jaffe GJ, Hammerberg C, Sporn SA, Fong S, . (1991) cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3681-3685.

Hauser C, Saurat JH, Schmitt A, Jaunin F, Dayer JM (1986) Interleukin 1 is present in normal human epidermis. *J Immunol* 136:3317-3323.

Haveman J, Geerdink AG, Rodermond HM (1996) Cytokine production after whole body and localized hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 12:791-800.

Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2:185-193.

Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* 86:1009-1031.

Heida JG, Pittman QJ (2005) Causal links between brain cytokines and experimental febrile convulsions in the rat. *Epilepsia* 46:1906-1913.

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.

Herman MA, Jahr CE (2007) Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *J Neurosci* 27:9736-9741.

Hertzberg EL, Saez JC, Corpina RA, Roy C, Kessler JA (2000) Use of antibodies in the analysis of connexin 43 turnover and phosphorylation. *Methods* 20:129-139.

Hessel EV, van Gassen KL, Wolterink-Donselaar IG, Stienen PJ, Fernandes C, Brakkee JH, Kas MJ, de Graan PN (2009) Phenotyping mouse chromosome substitution strains reveal multiple QTLs for febrile seizure susceptibility. *Genes Brain Behav* 8:248-255.

Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90:291-366.

Holtmann MH, Neurath MF (2004) Differential TNF-signaling in chronic inflammatory disorders. *Curr Mol Med* 4:439-444.

Horikawa K, Armstrong WE (1988) A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Methods* 25:1-11.

Hu S, Sheng WS, Ehrlich LC, Peterson PK, Chao CC (2000) Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. *Neuroimmunomodulation* 7:153-159.

- Huang J, Gao X, Li S, Cao Z (1997) Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12829-12832.
- Huang Y, Grinspan JB, Abrams CK, Scherer SS (2007) Pannexin1 is expressed by neurons and glia but does not form functional gap junctions. *Glia* 55:46-56.
- Hudlicka O, Komarek J, Wright AJ (1981) The effect of a xanthine derivative, 1-(5' oxohexyl)-3-methyl-7-propylxanthine (HWA 285), on heart performance and regional blood flow in dogs and rabbits. *Br J Pharmacol* 72:723-730.
- Huxley AF, Stampfli R (1949) Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibres. *J Physiol* 108:315-339.
- Iacobas DA, Iacobas S, Spray DC (2007) Connexin43 and the brain transcriptome of newborn mice. *Genomics* 89:113-123.
- Idriss HT, Naismith JH (2000) TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 50:184-195.
- Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gahwiler BH, Gerber U (1999) Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8733-8738.
- Jobling SA, Auron PE, Gurka G, Webb AC, McDonald B, Rosenwasser LJ, Gehrke L (1988) Biological activity and receptor binding of human prointerleukin-1 beta and subpeptides. *J Biol Chem* 263:16372-16378.
- John GR, Scemes E, Suadicani SO, Liu JS, Charles PC, Lee SC, Spray DC, Brosnan CF (1999) IL-1beta differentially regulates calcium wave propagation between primary human fetal astrocytes via pathways involving P2 receptors and gap junction channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11613-11618.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461-553.
- Kettenmann H, Ransom BR (1995) Neuroglia. Oxford University Press.
- Kielian T (2008) Glial connexins and gap junctions in CNS inflammation and disease. *J Neurochem* 106:1000-1016.
- Kitchens RL (2000) Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. *Chem Immunol* 74:61-82.
- Klitgaard H, Matagne A, Gobert J, Wulfert E (1998) Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *Eur J Pharmacol* 353:191-206.
- Kobayashi Y, Oppenheim JJ, Matsushima K (1991) Human pre-interleukin 1 alpha and beta: structural features revealed by limited proteolysis. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 39:1513-1517.

Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K (1990) Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5548-5552.

Kogure K, Watson BD, Busto R, Abe K (1982) Potentiation of lipid peroxides by ischemia in rat brain. *Neurochem Res* 7:437-454.

Konietzko U, Muller CM (1994) Astrocytic dye coupling in rat hippocampus: topography, developmental onset, and modulation by protein kinase C. *Hippocampus* 4:297-306.

Kontermann RE, Scheurich P, Pfizenmaier K (2009) Antagonists of TNF action: clinical experience and new developments. *Expert Opin Drug Discov* 4:279-292.

Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, Chartrain NA, Schmidt JA (1989) Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5227-5231.

Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.

Kunze A, Congreso MR, Hartmann C, Wallraff-Beck A, Huttmann K, Bedner P, Requardt R, Seifert G, Redecker C, Willecke K, Hofmann A, Pfeifer A, Theis M, Steinhauser C (2009) Connexin expression by radial glia-like cells is required for neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:11336-11341.

Laird DW, Puranam KL, Revel JP (1991) Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J* 273:67-72.

Lampe PD, Lau AF (2004) The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1171-1186.

Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-170.

Ledeen RW, Chakraborty G (1998) Cytokines, signal transduction, and inflammatory demyelination: review and hypothesis. *Neurochem Res* 23:277-289.

Leniger T, Thone J, Bonnet U, Hufnagel A, Bingmann D, Wiemann M (2004) Levetiracetam inhibits Na⁺-dependent Cl⁻. *Br J Pharmacol* 142:1073-1080.

Lewerenz J, Klein M, Methner A (2006) Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system X_c⁻ protects from oxidative glutamate toxicity. *J Neurochem* 98:916-925.

Li WE, Ochalski PA, Hertzberg EL, Nagy JI (1998) Immunorecognition, ultrastructure and phosphorylation status of astrocytic gap junctions and connexin43 in rat brain after cerebral focal ischaemia. *Eur J Neurosci* 10:2444-2463.

- Liang SL, Carlson GC, Coulter DA (2006) Dynamic regulation of synaptic GABA release by the glutamate-glutamine cycle in hippocampal area CA1. *J Neurosci* 26:8537-8548.
- Liao CK, Jeng CJ, Wang HS, Wang SH, Wu JC (2013) Lipopolysaccharide Induces Degradation of Connexin43 in Rat Astrocytes via the Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway. *PLoS One* 8:e79350.
- Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ (1994) Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* 25:1481-1488.
- Loscher W, Honack D (1993) Profile of ucb L059, a novel anticonvulsant drug, in models of partial and generalized epilepsy in mice and rats. *Eur J Pharmacol* 232:147-158.
- Loscher W, Schmidt D (2011) Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. *Epilepsia* 52:657-678.
- Lukyanetz EA, Shkryl VM, Kostyuk PG (2002) Selective blockade of N-type calcium channels by levetiracetam. *Epilepsia* 43:9-18.
- Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, Fuks B (2004) The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9861-9866.
- Madeja M, Margineanu DG, Gorji A, Siep E, Boerrigter P, Klitgaard H, Speckmann EJ (2003) Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action? *Neuropharmacology* 45:661-671.
- Maier JA, Statuto M, Ragnotti G (1994) Endogenous interleukin 1 alpha must be transported to the nucleus to exert its activity in human endothelial cells. *Mol Cell Biol* 14:1845-1851.
- Malyak M, Guthridge JM, Hance KR, Dower SK, Freed JH, Arend WP (1998a) Characterization of a low molecular weight isoform of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol* 161:1997-2003.
- Malyak M, Smith MF, Jr., Abel AA, Hance KR, Arend WP (1998b) The differential production of three forms of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils and monocytes. *J Immunol* 161:2004-2010.
- Margineanu DG, Klitgaard H (2003) Levetiracetam has no significant gamma-aminobutyric acid-related effect on paired-pulse interaction in the dentate gyrus of rats. *Eur J Pharmacol* 466:255-261.
- Margineanu DG, Matagne A, Kaminski RM, Klitgaard H (2008) Effects of chronic treatment with levetiracetam on hippocampal field responses after pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res Bull* 77:282-285.
- Marini H, Costa C, Passaniti M, Esposito M, Campo GM, Ientile R, Adamo EB, Marini R, Calabresi P, Altavilla D, Minutoli L, Pisani F, Squadrito F (2004) Levetiracetam protects against kainic acid-induced toxicity. *Life Sci* 74:1253-1264.

- Marsh CB, Pope HA, Wewers MD (1994) Fc gamma receptor cross-linking down-regulates IL-1 receptor antagonist and induces IL-1 beta in mononuclear phagocytes stimulated with endotoxin or *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 152:4604-4611.
- Martin DL (1992) Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* 5:81-94.
- Martinon F, Tschopp J (2007) Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 14:10-22.
- Meme W, Calvo CF, Froger N, Ezan P, Amigou E, Koulakoff A, Giaume C (2006) Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by beta-amyloid. *FASEB J* 20:494-496.
- Meme W, Ezan P, Venance L, Glowinski J, Giaume C (2004a) ATP-induced inhibition of gap junctional communication is enhanced by interleukin-1 beta treatment in cultured astrocytes. *Neuroscience* 126:95-104.
- Meme W, Ezan P, Venance L, Glowinski J, Giaume C (2004b) ATP-induced inhibition of gap junctional communication is enhanced by interleukin-1 beta treatment in cultured astrocytes. *Neuroscience* 126:95-104.
- Meskini N, Nemoz G, Okyayuz-Baklouti I, Lagarde M, Prigent AF (1994) Phosphodiesterase inhibitory profile of some related xanthine derivatives pharmacologically active on the peripheral microcirculation. *Biochem Pharmacol* 47:781-788.
- Miller SI, Ernst RK, Bader MW (2005) LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 3:36-46.
- Mizel SB, Kilian PL, Lewis JC, Paganelli KA, Chizzonite RA (1987) The interleukin 1 receptor. Dynamics of interleukin 1 binding and internalization in T cells and fibroblasts. *J Immunol* 138:2906-2912.
- Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, Gillis S, Dower SK (1987) The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J Biol Chem* 262:2941-2944.
- Muscoli C, Visalli V, Colica C, Nistico R, Palma E, Costa N, Rotiroti D, Nistico G, Mollace V (2005) The effect of inflammatory stimuli on NMDA-related activation of glutamine synthase in human cultured astroglial cells. *Neurosci Lett* 373:184-188.
- Muzio M, Polentarutti N, Facchetti F, Peri G, Doni A, Sironi M, Transidico P, Salmona M, Introna M, Mantovani A (1999) Characterization of type II intracellular IL-1 receptor antagonist (IL-1ra3): a depot IL-1ra. *Eur J Immunol* 29:781-788.
- Muzio M, Polentarutti N, Sironi M, Poli G, De GL, Introna M, Mantovani A, Colotta F (1995) Cloning and characterization of a new isoform of the interleukin 1 receptor antagonist. *J Exp Med* 182:623-628.

- 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, Li WE (2000) A brain slice model for in vitro analyses of astrocytic gap junction and connexin43 regulation: actions of ischemia, glutamate and elevated potassium. *Eur J Neurosci* 12:4567-4572.
- 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 (2000) Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res Brain Res Rev* 32:29-44.
- Nakase T, Fushiki S, Naus CC (2003) Astrocytic gap junctions composed of connexin 43 reduce apoptotic neuronal damage in cerebral ischemia. *Stroke* 34:1987-1993.
- Nakase T, Yoshida Y, Nagata K (2006) Enhanced connexin 43 immunoreactivity in penumbral areas in the human brain following ischemia. *Glia* 54:369-375.
- Nave KA (2010) Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468:244-252.
- Nawroth PP, Bank I, Handley D, Cassimeris J, Chess L, Stern D (1986) Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. *J Exp Med* 163:1363-1375.
- Nedergaard M, Verkhratsky A (2012) Artifact versus reality--how astrocytes contribute to synaptic events. *Glia* 60:1013-1023.
- Nelson KB, Ellenberg JH (1976) Predictors of epilepsy in children who have experienced febrile seizures. *N Engl J Med* 295:1029-1033.
- Netea MG, van DM, Kullberg BJ, Cavaillon JM, Van der Meer JW (2002) Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol* 23:135-139.
- Nguyen KT, Deak T, Owens SM, Kohno T, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF (1998) Exposure to acute stress induces brain interleukin-1beta protein in the rat. *J Neurosci* 18:2239-2246.
- 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, Komitova M, Suzuki R, Zhu X (2009) Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci* 10:9-22.
- Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke CG, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kirchhoff F, Kettenmann H (2001) GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33:72-86.

- O'Neill LA, Bowie AG (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7:353-364.
- O'Neill LA, Greene C (1998) Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 63:650-657.
- Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JH, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M (2009) Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* 29:3276-3287.
- Oberheim NA, Wang X, Goldman S, Nedergaard M (2006) Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci* 29:547-553.
- Ochalski SJ, Hartman DA, Belfast MT, Walter TL, Glaser KB, Carlson RP (1993) Inhibition of endotoxin-induced hypothermia and serum TNF-alpha levels in CD-1 mice by various pharmacological agents. *Agents Actions* 39 Spec No:C52-C54.
- Ogata K, Kosaka T (2002) Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 113:221-233.
- Ohkubo T, Mitsumoto Y, Mohri T (1991) Characterization of the uptake of adenosine by cultured rat hippocampal cells and inhibition of the uptake by xanthine derivatives. *Neurosci Lett* 133:275-278.
- Olleros ML, Guler R, Vesin D, Parapanov R, Marchal G, Martinez-Soria E, Corazza N, Pache JC, Mueller C, Garcia I (2005) Contribution of transmembrane tumor necrosis factor to host defense against *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-guerin and *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Am J Pathol* 166:1109-1120.
- Olleros ML, Vesin D, Lambou AF, Janssens JP, Ryffel B, Rose S, Fremond C, Quesniaux VF, Szymkowski DE, Garcia I (2009) Dominant-negative tumor necrosis factor protects from *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG) and endotoxin-induced liver injury without compromising host immunity to BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 199:1053-1063.
- Pahujaa M, Anikin M, Goldberg GS (2007) Phosphorylation of connexin43 induced by Src: regulation of gap junctional communication between transformed cells. *Exp Cell Res* 313:4083-4090.
- Pal S, Sun D, Limbrick D, Rafiq A, DeLorenzo RJ (2001) Epileptogenesis induces long-term alterations in intracellular calcium release and sequestration mechanisms in the hippocampal neuronal culture model of epilepsy. *Cell Calcium* 30:285-296.
- Pannasch U, Vargova L, Reingruber J, Ezan P, Holcman D, Giaume C, Sykova E, Rouach N (2011) Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:8467-8472.

- Pathak S, Borodkin VS, Albarbarawi O, Campbell DG, Ibrahim A, van Aalten DM (2012) O-GlcNAcylation of TAB1 modulates TAK1-mediated cytokine release. *EMBO J* 31:1394-1404.
- Paul DL, Ebihara L, Takemoto LJ, Swenson KI, Goodenough DA (1991) Connexin46, a novel lens gap junction protein, induces voltage-gated currents in nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol* 115:1077-1089.
- Peters A (2004) A fourth type of neuroglial cell in the adult central nervous system. *J Neurocytol* 33:345-357.
- Petzold GC, Albeanu DF, Sato TF, Murthy VN (2008) Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron* 58:897-910.
- Pocock JM, Kettenmann H (2007) Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci* 30:527-535.
- 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.
- Pomeroy SL, Holmes SJ, Dodge PR, Feigin RD (1990) Seizures and other neurologic sequelae of bacterial meningitis in children. *N Engl J Med* 323:1651-1657.
- Porter JT, McCarthy KD (1995a) GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligands with increases in $[Ca^{2+}]_i$. *Glia* 13:101-112.
- Porter JT, McCarthy KD (1995b) Adenosine receptors modulate $[Ca^{2+}]_i$ in hippocampal astrocytes in situ. *J Neurochem* 65:1515-1523.
- Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16:5073-5081.
- Pousset F (1994) Developmental expression of cytokine genes in the cortex and hippocampus of the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 81:143-146.
- Prochnow N, Dermietzel R (2008) Connexons and cell adhesion: a romantic phase. *Histochem Cell Biol* 130:71-77.
- Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55:453-462.
- Quagliarello VJ, Wispelwey B, Long WJ, Jr., Scheld WM (1991) Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J Clin Invest* 87:1360-1366.
- Ransom BR, Kettenmann H (1990) Electrical coupling, without dye coupling, between mammalian astrocytes and oligodendrocytes in cell culture. *Glia* 3:258-266.
- Reimann F, Ashcroft FM (1999) Inwardly rectifying potassium channels. *Curr Opin Cell Biol* 11:503-508.

- Retamal MA, Froger N, Palacios-Prado N, Ezan P, Saez PJ, Saez JC, Giaume C (2007) Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *J Neurosci* 27:13781-13792.
- Rietschel ET, et al. (1996) Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* 216:39-81.
- Rouach N, Avignone E, Meme W, Koulakoff A, Venance L, Blomstrand F, Giaume C (2002) Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell* 94:457-475.
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C (2008) Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322:1551-1555.
- Roux-Lombard P (1998) The interleukin-1 family. *Eur Cytokine Netw* 9:565-576.
- Roux-Lombard P, Modoux C, Dayer JM (1989) Production of interleukin-1 (IL-1) and a specific IL-1 inhibitor during human monocyte-macrophage differentiation: influence of GM-CSF. *Cytokine* 1:45-51.
- Saez JC, Retamal MA, Basilio D, Bukauskas FF, Bennett MV (2005) Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1711:215-224.
- Sagar HJ, Oxbury JM (1987) Hippocampal neuron loss in temporal lobe epilepsy: correlation with early childhood convulsions. *Ann Neurol* 22:334-340.
- Sah P, Hestrin S, Nicoll RA (1989) Tonic activation of NMDA receptors by ambient glutamate enhances excitability of neurons. *Science* 246:815-818.
- Sama DM, Mohmmad AH, Furman JL, Artiushin IA, Szymkowski DE, Scheff SW, Norris CM (2012) Inhibition of soluble tumor necrosis factor ameliorates synaptic alterations and Ca²⁺ dysregulation in aged rats. *PLoS One* 7:e38170.
- Sanchez-Alavez M, Tabarean IV, Behrens MM, Bartfai T (2006) Ceramide mediates the rapid phase of febrile response to IL-1beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2904-2908.
- Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, Matsumoto K, Takeuchi O, Akira S (2005) Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6:1087-1095.
- Sayyah M, Javad-Pour M, Ghazi-Khansari M (2003) The bacterial endotoxin lipopolysaccharide enhances seizure susceptibility in mice: involvement of proinflammatory factors: nitric oxide and prostaglandins. *Neuroscience* 122:1073-1080.
- Sayyah M, Kaviani B, Khoshkholgh-Sima B, Bagheri M, Olad M, Choopani S, Mahdian R (2012) Effect of chronic intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide on connexin43 protein expression in rat hippocampus. *Iran Biomed J* 16:25-32.

- Scaramuzzi RJ, Baker DJ (2003) Possible therapeutic benefits of adenosine-potentiating drugs in reducing age-related degenerative disease in dogs and cats. *J Vet Pharmacol Ther* 26:327-335.
- Scemes E (2008) Modulation of astrocyte P2Y1 receptors by the carboxyl terminal domain of the gap junction protein Cx43. *Glia* 56:145-153.
- Scemes E, Spray DC, Meda P (2009) Connexins, pannexins, innexins: novel roles of "hemichannels". *Pflugers Arch* 457:1207-1226.
- Scemes E, Suadicani SO, Dahl G, Spray DC (2007) Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biol* 3:199-208.
- Schindler R, Clark BD, Dinarello CA (1990a) Dissociation between interleukin-1 beta mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* 265:10232-10237.
- Schindler R, Ghezzi P, Dinarello CA (1990b) IL-1 induces IL-1. IV. IFN-gamma suppresses IL-1 but not lipopolysaccharide-induced transcription of IL-1. *J Immunol* 144:2216-2222.
- Schnell C, Hagos Y, Hulsmann S (2012) Active sulforhodamine 101 uptake into hippocampal astrocytes. *PLoS One* 7:e49398.
- Schools GP, Zhou M, Kimelberg HK (2006) Development of gap junctions in hippocampal astrocytes: evidence that whole cell electrophysiological phenotype is an intrinsic property of the individual cell. *J Neurophysiol* 96:1383-1392.
- Schubert P, Ogata T, Marchini C, Ferroni S, Rudolphi K (1997) Protective mechanisms of adenosine in neurons and glial cells. *Ann N Y Acad Sci* 825:1-10.
- Schubert P, Rudolphi K (1998) Interfering with the pathologic activation of microglial cells and astrocytes in dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12 Suppl 2:S21-8.:S21-S28.
- Schumann RR, Pfeil D, Freyer D, Buerger W, Lamping N, Kirschning CJ, Goebel UB, Weber JR (1998) Lipopolysaccharide and pneumococcal cell wall components activate the mitogen activated protein kinases (MAPK) erk-1, erk-2, and p38 in astrocytes. *Glia* 22:295-305.
- Seifert G, Carmignoto G, Steinhauser C (2010) Astrocyte dysfunction in epilepsy. *Brain Res Rev* 63:212-221.
- Seifert G, Huttmann K, Binder DK, Hartmann C, Wyczynski A, Neusch C, Steinhauser C (2009) Analysis of astroglial K⁺ channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4.1 subunit. *J Neurosci* 29:7474-7488.
- Seifert G, Schilling K, Steinhauser C (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7:194-206.
- Seydel U, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, Brandenburg K (2000) Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur J Biochem* 267:3032-3039.

- Shim JH, Xiao C, Paschal AE, Bailey ST, Rao P, Hayden MS, Lee KY, Bussey C, Steckel M, Tanaka N, Yamada G, Akira S, Matsumoto K, Ghosh S (2005) TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev* 19:2668-2681.
- Shirakawa F, Saito K, Bonagura CA, Galson DL, Fenton MJ, Webb AC, Auron PE (1993) The human prointerleukin 1 beta gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. *Mol Cell Biol* 13:1332-1344.
- Si Q, Nakamura Y, Ogata T, Kataoka K, Schubert P (1998) Differential regulation of microglial activation by propentofylline via cAMP signaling. *Brain Res* 812:97-104.
- Si QS, Nakamura Y, Schubert P, Rudolphi K, Kataoka K (1996) Adenosine and propentofylline inhibit the proliferation of cultured microglial cells. *Exp Neurol* 137:345-349.
- Simard M, Nedergaard M (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129:877-896.
- Sims JE, Giri JG, Dower SK (1994) The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clin Immunol Immunopathol* 72:9-14.
- Singer II, Scott S, Hall GL, Limjoco G, Chin J, Schmidt JA (1988) Interleukin 1 beta is localized in the cytoplasmic ground substance but is largely absent from the Golgi apparatus and plasma membranes of stimulated human monocytes. *J Exp Med* 167:389-407.
- Sisson SD, Dinarello CA (1988) Production of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor by human mononuclear cells stimulated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 72:1368-1374.
- Skelly DT, Hennessy E, Dansereau MA, Cunningham C (2013) A Systematic Analysis of the Peripheral and CNS Effects of Systemic LPS, IL-1Beta, TNF-alpha and IL-6 Challenges in C57BL/6 Mice. *PLoS One* 8:e69123.
- Solan JL, Lampe PD (2009) Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J* 419:261-272.
- Spray DC, Iacobas DA (2007) Organizational principles of the connexin-related brain transcriptome. *J Membr Biol* 218:39-47.
- Stanhope JM, Brody JA, Brink E, Morris CE (1972) Convulsions among the Chamorro people of Guam, Mariana islands. II. Febrile convulsions. *Am J Epidemiol* 95:299-304.
- Steiner AA, Molchanova AY, Dogan MD, Patel S, Petervari E, Balasko M, Wanner SP, Eales J, Oliveira DL, Gavva NR, Almeida MC, Szekely M, Romanovsky AA (2011) The hypothermic response to bacterial lipopolysaccharide critically depends on brain CB1, but not CB2 or TRPV1, receptors. *J Physiol* 589:2415-2431.

Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY, Malenka RC (2005) Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . *J Neurosci* 25:3219-3228.

Stellwagen D, Malenka RC (2006) Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* 440:1054-1059.

Stevenson FT, Bursten SL, Fanton C, Locksley RM, Lovett DH (1993) The 31-kDa precursor of interleukin 1 α is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7245-7249.

Stienen MN, Haghikia A, Dambach H, Thone J, Wiemann M, Gold R, Chan A, Dermietzel R, Faustmann PM, Hinkerohe D, Prochnow N (2011) Anti-inflammatory effects of the anticonvulsant drug levetiracetam on electrophysiological properties of astroglia are mediated via TGF β 1 regulation. *Br J Pharmacol* 162:491-507.

Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC (2002) Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 277:10482-10488.

Szczepanik AM, Fishkin RJ, Rush DK, Wilmot CA (1996) Effects of chronic intrahippocampal infusion of lipopolysaccharide in the rat. *Neuroscience* 70:57-65.

Tan S, Schubert D, Maher P (2001) Oxytosis: A novel form of programmed cell death. *Curr Top Med Chem* 1:497-506.

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.

Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, Oberheim N, Lou N, Wang X, Zielke HR, Kang J, Nedergaard M (2005) An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med* 11:973-981.

Tiemessen MM, Kunzmann S, Schmidt-Weber CB, Garssen J, Bruijnzeel-Koomen CA, Knol EF, van HE (2003) Transforming growth factor- β inhibits human antigen-specific CD4⁺ T cell proliferation without modulating the cytokine response. *Int Immunol* 15:1495-1504.

Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A (2011) The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 31:16064-16069.

Tsuboi T, Okada S (1984) Seasonal variation of febrile convulsion in Japan. *Acta Neurol Scand* 69:285-292.

Turrin NP, Gayle D, Ilyin SE, Flynn MC, Langhans W, Schwartz GJ, Plata-Salaman CR (2001) Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res Bull* 54:443-453.

Ucla C, Roux-Lombard P, Fey S, Dayer JM, Mach B (1990) Interferon gamma drastically modifies the regulation of interleukin 1 genes by endotoxin in U937 cells. *J Clin Invest* 85:185-191.

Valiunas V, Weingart R (2000) Electrical properties of gap junction hemichannels identified in transfected HeLa cells. *Pflugers Arch* 440:366-379.

van der Hel WS, Notenboom RG, Bos IW, van Rijen PC, van Veelen CW, de Graan PN (2005) Reduced glutamine synthetase in hippocampal areas with neuron loss in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 64:326-333.

van Gassen KL, Hessel EV, Ramakers GM, Notenboom RG, Wolterink-Donselaar IG, Brakkee JH, Godschalk TC, Qiao X, Spruijt BM, van NO, de Graan PN (2008) Characterization of febrile seizures and febrile seizure susceptibility in mouse inbred strains. *Genes Brain Behav* 7:578-586.

Vannier E, Miller LC, Dinarello CA (1992) Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4076-4080.

Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G (1998) Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J* 12:1035-1044.

Verity CM, Butler NR, Golding J (1985) Febrile convulsions in a national cohort followed up from birth. II--Medical history and intellectual ability at 5 years of age. *Br Med J (Clin Res Ed)* 290:1311-1315.

Verity CM, Greenwood R, Golding J (1998) Long-term intellectual and behavioral outcomes of children with febrile convulsions. *N Engl J Med* 338:1723-1728.

Verkhatsky A, Orkand RK, Kettenmann H (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* 78:99-141.

Vezzani A, Balosso S, Ravizza T (2008) The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain Behav Immun* 22:797-803.

Vilhardt F (2005) Microglia: phagocyte and glia cell. *Int J Biochem Cell Biol* 37:17-21.

Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C (2000) "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem* 74:457-471.

Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens MM, Bartfai T, Binaglia M, Corsini E, Di LM, Galli CL, Marinovich M (2003) Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci* 23:8692-8700.

- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.
- Wahab A, Albus K, Gabriel S, Heinemann U (2010) In search of models of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia* 51 Suppl 3:154-159.
- Wahl SM, Hunt DA, Wong HL, Dougherty S, Cartney-Francis N, Wahl LM, Ellingsworth L, Schmidt JA, Hall G, Roberts AB, . (1988) Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. *J Immunol* 140:3026-3032.
- Wakabayashi G, Gelfand JA, Jung WK, Connolly RJ, Burke JF, Dinarello CA (1991) *Staphylococcus epidermidis* induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. Comparison to *Escherichia coli*. *J Clin Invest* 87:1925-1935.
- Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL, Jr., Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC (1998) Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet* 19:366-370.
- Wallraff A, Kohling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhauser 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, Steinhauser C (2004) Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia* 48:36-43.
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412:346-351.
- Wang X, Lou N, Xu Q, Tian GF, Peng WG, Han X, Kang J, Takano T, Nedergaard M (2006) Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat Neurosci* 9:816-823.
- Warner SJ, Auger KR, Libby P (1987) Interleukin 1 induces interleukin 1. II. Recombinant human interleukin 1 induces interleukin 1 production by adult human vascular endothelial cells. *J Immunol* 139:1911-1917.
- Wasielewski B, Jensen A, Roth-Harer A, Dermietzel R, Meier C (2012) Neuroglial activation and Cx43 expression are reduced upon transplantation of human umbilical cord blood cells after perinatal hypoxic-ischemic injury. *Brain Res* 1487:39-53.
- Webb AC, Collins KL, Auron PE, Eddy RL, Nakai H, Byers MG, Haley LL, Henry WM, Shows TB (1986) Interleukin-1 gene (IL1) assigned to long arm of human chromosome 2. *Lymphokine Res* 5:77-85.
- Weitzmann MN, Savage N (1992) Nuclear internalisation and DNA binding activities of interleukin-1, interleukin-1 receptor and interleukin-1/receptor complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1166-1171.

Wesche H, Resch K, Martin MU (1998) Effects of IL-1 receptor accessory protein on IL-1 binding. *FEBS Lett* 429:303-306.

Wessendorf JH, Garfinkel S, Zhan X, Brown S, Maciag T (1993) Identification of a nuclear localization sequence within the structure of the human interleukin-1 alpha precursor. *J Biol Chem* 268:22100-22104.

Wiencken-Barger AE, Djukic B, Casper KB, McCarthy KD (2007) A role for Connexin43 during neurodevelopment. *Glia* 55:675-686.

Wong D, Dorovini-Zis K (1992) Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 39:11-21.

Woodrooffe MN, Hayes GM, Cuzner ML (1989) Fc receptor density, MHC antigen expression and superoxide production are increased in interferon-gamma-treated microglia isolated from adult rat brain. *Immunology* 68:421-426.

Yamamoto T, Vukelic J, Hertzberg EL, Nagy JI (1992) Differential anatomical and cellular patterns of connexin43 expression during postnatal development of rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 66:165-180.

Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR (2003) Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci* 23:3588-3596.

Zalevsky J, Secher T, Ezhevsky SA, Janot L, Steed PM, O'Brien C, Eivazi A, Kung J, Nguyen DH, Doberstein SK, Erard F, Ryffel B, Szymkowski DE (2007) Dominant-negative inhibitors of soluble TNF attenuate experimental arthritis without suppressing innate immunity to infection. *J Immunol* 179:1872-1883.

Zhao Y, Riviuccio MA, Lutz S, Scemes E, Brosnan CF (2006) The TLR3 ligand polyI: C downregulates connexin 43 expression and function in astrocytes by a mechanism involving the NF-kappaB and PI3 kinase pathways. *Glia* 54:775-785.

Zona C, Niespodziany I, Marchetti C, Klitgaard H, Bernardi G, Margineanu DG (2001) Levetiracetam does not modulate neuronal voltage-gated Na⁺ and T-type Ca²⁺ currents. *Seizure* 10:279-286.

Zou J, Wang YX, Dou FF, Lu HZ, Ma ZW, Lu PH, Xu XM (2010) Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochem Int* 56:577-584.

