

**Charakterisierung von Calcium-Transienten
in Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von
Kai Härtel
aus
Kassel**

Göttingen 2007

D7

Referent:

Prof. Dr. Reinhold Hustert

Korreferent:

Prof. Dr. Ralf Heinrich

Tag der mündlichen Prüfung:

31.10.2007

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Gliazellen.....	1
1.1.1 Struktur und Funktion von Astrozyten.....	2
1.1.2 Die Bedeutung der Kir4.1 Kanaluntereinheit in Gliazellen.....	6
1.1.3 Calciumhomöostase in Gliazellen.....	7
1.2 Das Atemzentrum.....	9
1.2.1 Funktionelle Anatomie.....	9
1.2.2 Die Bedeutung der Glia innerhalb des respiratorischen Systems.....	10
1.3 Zielsetzung.....	11
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Verwendete Mausmodelle.....	12
2.1.1.1 Die Kir4.1 <i>Knock-out</i> -Maus.....	12
2.1.1.2 Die Mauslinien TgN(hGFAP-EGFP) und TgN(hGFAP-mRFP1)	12
2.1.1.3 Die Mauslinie TgN(Thy1.2-EYFP)	13
2.1.1.4 Die Mauslinie TgN(PLP-DsRed1)	13
2.1.2 Verwendete Zelllinien	13
2.1.3 Lösungen, Puffer und Medien.....	14
2.1.3.1 Superfusionslösungen.....	14
2.1.3.2 Extrazellulär applizierte Pharmaka.....	15
2.1.3.3 Intrazelluläre Lösungen.....	15
2.1.3.4 Pufferlösungen für Immunfärbungen.....	16
2.1.4 Antikörper und Seren.....	16
2.1.5 Calciumindikatoren.....	17
2.2 Methoden.....	18
2.2.1 Anfertigung von akuten Hirnschnittpräparaten.....	18
2.2.2 Versuchsaufbau für optische und elektrophysiologische Messungen.....	20
2.2.3 Ca ²⁺ -Imaging Experimente in akuten Hirnschnitten.....	22
2.2.4 Ca ²⁺ -Imaging Experimente in Zellkultur.....	23

2.2.5 Whole-cell-voltage-clamp Messungen.....	24
2.2.6 Feldpotentialableitung respiratorischer Aktivität.....	26
2.2.7 Immunhistochemische Methoden.....	26
2.2.7.1 Fixierung von Gewebe durch intrakardiale Perfusion.....	26
2.2.7.2 Anfertigung von Vibratomschnitten von fixiertem Gewebe.....	27
2.2.7.3 Immunhistochemische Analyse von Vibratomschnitten.....	27
2.2.8 Zellkultur.....	28
2.2.8.1 Kultivierung von Zelllinien.....	28
2.2.8.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien.....	28
2.2.8.3 Transiente Transfektion mit Lipofectamin.....	29
2.2.9 Software zur Aufnahme und Analyse der Messdaten.....	30
2.2.10 Auswertung der Messdaten.....	30
3 Ergebnisse.....	31
3.1 Ca ²⁺ Signale induziert durch Absenken des extrazellulären K ⁺ in Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe.....	31
3.2 In Neuronen fehlt das niedrig-[K ⁺] _e induzierte Ca ²⁺ -Signal.....	33
3.3 Auch in Oligodendrozyten fehlt das niedrig-[K ⁺] _e induzierte Ca ²⁺ -Signal.....	34
3.4 Beteiligung des Kir4.1 Kanals am niedrig-[K ⁺] _e induzierten Ca ²⁺ -Signal.....	37
3.4.1 Die niedrig-[K ⁺] _e induzierten Ca ²⁺ -Antworten sind in Kir4.1 ^{-/-} Astrozyten reduziert	37
3.4.2 Die Calciumhomöostase in Kir4.1 ^{-/-} Schnittpräparaten ist nicht gestört.....	43
3.4.3 Heterologe Expression des Kir4.1-EGFP-Konstruktes führt zu einem veränderten Ruhemembranpotential.....	45
3.4.4 Kir4.1 transfizierte Zellen antworten auf niedrig-[K ⁺] _e mit einem Ca ²⁺ -Signal.....	45
3.4.5 Das depolarisierte RMP von Kir4.1 KO Astrozyten hat keinen Einfluss auf den niedrig-[K ⁺] _e induzierten Ca ²⁺ -Influx.....	48
3.5 Untersuchungen zu Neuromodulator induzierten Ca ²⁺ -Signalen in Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe.....	50
3.5.1 Serotonin und α-methyl-5-HT evozieren Ca ²⁺ -Signale in Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe.....	50
3.5.2 5-HT _{2a} -R vermittelte Ca ²⁺ -Freisetzung in Astrozyten der VRG	52
3.5.3 Eine Subpopulation von niedrig-[K ⁺] _e identifizierten Astrozyten der VRG antwortet auf α-methyl-5-HT mit einem Ca ²⁺ -Signal.....	52

3.5.4 Cyclopizonsäure führt zu einer Reduktion der Anzahl, der auf α -methyl-5-HT antwortenden Astrozyten.....	55
3.5.5 Die durch Serotonin induzierten Calciumtransienten werden nicht über adrenerge Rezeptoren vermittelt.....	56
3.5.6 Astrozyten der VRG exprimieren den 5-HT _{2a} -Rezeptor.....	57
3.5.7 TRH und Substanz P induzieren Ca ²⁺ -Signale in mRFP1 markierten Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe.....	60
3.5.8 TRH-R vermittelte Ca ²⁺ -Freisetzung in Astrozyten der VRG.....	60
3.5.9 Astrozyten der VRG exprimieren den TRH Rezeptor.....	63
3.5.10 NK1-Rezeptor vermittelte Ca ²⁺ -Freisetzung in Astrozyten der VRG.....	65
3.5.11 Astrozyten der VRG exprimieren den NK1-Rezeptor.....	67
3.5.12 Eine Subpopulation von niedrig-[K ⁺] _e identifizierten Astrozyten antwortet auf TRH und SP mit einem Ca ²⁺ -Signal.....	69
3.5.13 Die Neuromodulatoren bewirken eine Frequenzzunahme in der Summenableitung respiratorischer Aktivität im Schnittpräparat	70
4 Diskussion	72
4.1 Astrozyten, nicht aber Oligodendrozyten und Neurone zeigen das niedrig-K ⁺ induzierte Ca ²⁺ -Signal	72
4.2 Permeation von Ca ²⁺ durch Kir4.1-Kanäle.....	75
4.3 Funktionelle Bedeutung des Kir4.1 vermittelten Ca ²⁺ -Signals in Astrozyten	77
4.4 Neuromodulatoren induzieren Ca ²⁺ -Signale in Astrozyten der VRG in situ.....	78
4.5 Eine Teilmenge der Astrozyten antwortet auf die Neuromodulatoren.....	80
4.6 Neuromodulatoren induzierten unterschiedliche [Ca ²⁺] _i -Antwortmuster	81
4.7 Astrozyten exprimieren Rezeptoren für Serotonin, Substanz P und TRH.....	82
4.8 Funktionelle Bedeutung der induzierten Ca ²⁺ -Signale im respiratorischen Netzwerk	85
4.9 Fazit.....	89
5 Zusammenfassung	90
6 Literaturverzeichnis	91
7 Anhang	102
A: Abbildungsverzeichnis.....	102
B: Tabellenverzeichnis.....	104
C: Abkürzungen.....	105
Danksagung	107
<i>Curriculum vitae</i>	108

1 Einleitung

1.1 Gliazellen

Höherentwickelte Nervensysteme bestehen aus zwei grundsätzlichen Zelltypen, zum einen den elementaren, elektrisch erregbaren Kommunikationseinheiten des Nervensystems, den Neuronen und zum anderen den nicht erregbaren, bis vor kurzem als eher passiv eingestuften Gliazellen. Obwohl Gliazellen ca. 50% des Gehirnvolumens einnehmen und im menschlichen Gehirn 10 bis 50 mal häufiger vorkommen als Nervenzellen (Kandel et al., 2000), ist der Wissensstand über diese Zellgruppe im Vergleich zu Neuronen noch immer gering. Dabei wurden Gliazellen bereits in der Mitte des 19. Jahrhunderts von dem Berliner Pathologen Rudolf Virchow erstmalig beschrieben (Virchow, 1846). Virchow vermutete eine rein mechanische Funktion als Halte- und Stützzellen für die Nervenzellen des Gehirns und nannte sie aus diesem Grund Gliazellen (griechisch glia = Kitt, Leim). Da sie nicht elektrisch erregbar sind, dachte man über Jahrzehnte, dass diese Zellen ausschließlich als Nähr- und Stützelemente für den Neuronenverband dienen und keinen Einfluss auf die neuronale Plastizität haben. Forschungsergebnisse der letzten Jahre wendeten aber die Sicht auf die Funktionsweise von Gliazellen und zeigten eine aktive Beteiligung an den informationstragenden Vorgängen, wie z.B. der synaptischen Transmission innerhalb des Nervensystems.

Gliazellen von Vertebraten werden in Mikroglia- und Makrogliazellen unterteilt. Mikrogliazellen sind mesodermalen Ursprungs und gehören zu den phagozytierenden, immunkompetenten Zellen des Gehirns. Im Gegensatz dazu stehen die Makrogliazellen, die ektodermalen Ursprung sind, sich folglich vom Neuralrohr ableiten und dementsprechend auch Neuroglia genannt werden. Zu ihnen zählt man die Oligodendrozyten, die Schwann'schen Zellen, die Ependymzellen und die Astrozyten, wobei neuere Studien auch noch eine weitere Makroglia-Gruppe vorschlagen, die nach der Expression eines Membran-Proteoglykans NG2-Zellen genannt wird (Butt et al., 2005). Die Oligodendrozyten bilden im zentralen Nervensystem die Myelinscheide um die Axone, ihr Analogon im peripheren Nervensystem sind die Schwann'schen Zellen. Durch ihre

elektrische Isolierfunktion wird eine saltatorische Fortleitung von Aktionspotentialen ermöglicht. Ependymzellen bilden eine Zellschicht, die das Ventrikelsystem und den Zentralkanal auskleiden. Mit ihren Kinozilien sorgen sie für eine ständige Bewegung der Cerebrospinalflüssigkeit. Die Astrozyten als wichtigste Gruppe der Makroglia, bilden die Mehrheit der Gliazellen und sind mit bis zu 80% der Gesamtzahl an Zellen im zentralen Nervensystem vom Menschen auch der häufigste Zelltyp (Kettenmann & Ransom, 2005).

1.1.1 Struktur und Funktion von Astrozyten

Astrozyten sind eine heterogene Zellpopulation, sie sich nach morphologischen und funktionellen Kriterien differenzieren lassen. Morphologisch können sie grob in drei Untergruppen eingeteilt werden: Die protoplasmatischen Astrozyten, die hauptsächlich in der grauen Substanz vorkommen und relativ kurze feine verzweigte Prozesse besitzen, die fibrilliären Astrozyten, die vorwiegend in der weißen Substanz zu finden sind und deren Prozesse weniger verzweigt, dafür aber länger sind. Als letzte Gruppe die radialen Astrozyten, die sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz vorkommen und zu denen u.a. die Bergmann-Glia aus dem Cerebellum (Bergmann, 1875) und die Müller-Zellen aus der Retina zählen (Schultze, 1866).

Astrozyten zeigen eine hohe funktionale Diversität, die im Folgenden kurz näher erläutert werden sollen. Die Fortsätze von Astrozyten bilden sogenannte Endfüßchen aus, die in engem Kontakt zu Neuronen und dem Endothel des Gefäßsystems stehen können. Diese strukturelle Beziehung gibt Astrozyten die Möglichkeit Neuronen mit Nährstoffen zu versorgen und den Abtransport neuronaler Stoffwechselprodukte zu gewährleisten (Magistretti et al. 1999; Hülsmann et al. 2000). Neben dieser metabolischen Funktion sind sie auch an der Regulation der cerebralen Durchblutung und an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Des weiteren ist bekannt, dass Astrozyten am Wachstum von Neuronen und an der Synaptogenese partizipieren (Hatten & Mason, 1990; Slezak & Frieger, 2003). Astrozyten bilden ein reich verzweigtes Netzwerk von Fortsätzen aus, das in einem engen Kontakt zu Synapsen steht. Ein einzelner Astrozyt kann im Extremfall über 100.000 Synapsen kontaktieren (Bushong et al., 2002). Dieser Kontakt scheint dynamischer Natur zu sein und sich in einem

Zeitraum von Minuten ändern (Hirrlinger et al., 2004). Funktionell wird dieser Assoziation von astrozytären und neuronalen Strukturen eine Beteiligung bei der Signalübertragung an der Synapse zugeschrieben. Astrozyten exprimieren eine große Vielfalt von Rezeptoren (Porter & McCarthy, 1997), welche durch Aktivierung exogen applizierter Neurotransmitter zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} führen (Porter & McCarthy, 1997; Verkhratsky et al., 1998; Kettenmann & Ransom, 2005). In Studien an akuten Hirnschnitten konnte demonstriert werden, dass diese Ca^{2+} -Anstiege durch an der Synapse freigesetzte Neurotransmitter, wie z.B. Glutamat (Porter & McCarthy, 1996; Pasti et al., 1997; Bezzi et al., 1998; Latour et al., 2001), GABA (Kang et al., 1998), Acetylcholin (Araque et al., 2002), Noradrenalin (Kulik et al., 1999) und Stickstoffmonoxid (Matyash et al., 2001), induziert werden können. Astrozyten nehmen aber nicht nur die synaptische Aktivität wahr, sondern können auch direkt an integrativen Prozessen im Gehirn beteiligt sein. Eine Modulation der synaptischen Transmission ist z.B. über astrozytäre Transportsysteme möglich, die Neurotransmitter wie Glutamat (Bergles & Jahr, 1997) oder Glycin (Gomez et al. 2003) aus dem synaptischen Spalt entfernen. Darüber hinaus haben Ca^{2+} -Signale in Astrozyten eine Freisetzung von so genannten Gliotransmittern zur Folge, die die neuronale Erregbarkeit beeinflussen (Fellin et al., 2004) oder direkt die synaptische Transmission modulieren (Haydon, 2001). Astrozyten setzen dabei verschiedene Transmittersubstanzen frei, einschließlich Glutamat (Parpura et al. 1994; Bezzi et al., 1998), ATP (Coco et al., 2003) und D-Serin (Mothet et al., 2005). Diese bidirektionale Kommunikation zwischen Neuronen und Gliazellen führte zu dem Konzept der „*Tripartite Synapse*“ (Araque et al., 1999). Zusätzlich zum prä- und postsynaptischen Neuron werden in diesem Modell die Fortsätze der Astrogliazelle als dritte Komponente der Synapse angesehen (Abb.1-1).

Eine weitere wichtige Funktion von Astrozyten ist die Regulation der extrazellulären Kaliumkonzentration (Kofuji & Newman, 2004). Eine hohe selektive Permeabilität für Kaliumionen (K^+) und ein stark negatives Ruhemembranpotential (RMP) sind grundlegende Eigenschaften von Gliazellen (Kuffer et al., 1966; Orkand et al. 1966) und Voraussetzung für Regulationsprozesse wie das so genannte „*K⁺ spatial buffering*“ oder „*K⁺ siphoning*“. Durch

neuronalen Aktivität freigesetztes Kalium wird von Astrozyten über einwärts gerichtete Kaliumkanäle (K^+ inwardly rectifying; Kir) aufgenommen. Da Astrozyten untereinander über Gap-Junctions zu einem Synzytium gekoppelt sind (Giaume & McCarthy, 1996), können sie das aufgenommene Kalium innerhalb des Zellverbandes speichern (*spatial buffering*) oder von Orten mit hoher extrazellulärer Kaliumkonzentration ($[K^+]_e$) zu Orten mit niedriger $[K^+]_e$, wie z.B. Blutgefäßen, umverteilen (*siphoning*). Funktionieren diese Mechanismen nicht korrekt, kann es zur Initiierung von pathologischen Zuständen wie Depolarisationswellen (*spreading depression*) oder epileptischer Aktivität kommen (Somjen, 2001; Seifert et al., 2006).

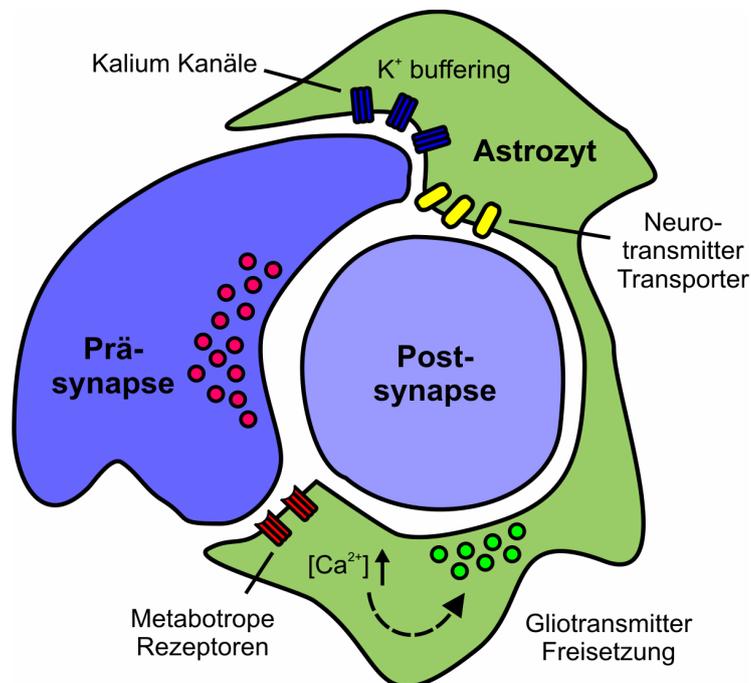


Abb.1-1 Schematische Darstellung der Dreiteiligen Synapse (*Tripartite synapse*). Die prä- und postsynaptischen Endigungen werden von einem Astrozyten umschlossen. Die enge Assoziation der neuronalen und glialen Elemente begünstigt sowohl die astrozytäre Aufnahme des durch neuronale Aktivität angefallenen extrazellulären Kaliums (K^+ buffering) als auch die Modulation der synaptischen Transmission durch Aufnahme von z.B. Glutamat oder Glycin über Transporter. Des Weiteren kann die Freisetzung von Neurotransmittern über die präsynaptische Endigung zu einer Aktivierung von astrozytären metabotropen Rezeptoren führen, diese können dann über eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung die Freisetzung von Gliotransmittern mobilisieren. Modifiziert nach Halassa et al. (2007).

Untersuchungen in jüngster Vergangenheit konnten eine Unterteilung der Astrozyten nach funktionellen Kriterien zeigen. Verschiedene elektrophysiologische Studien haben demonstriert, dass eine heterogene Makrogliazellpopulation bezüglich der Membranstrommuster im Hippocampus und Rückenmark existiert (Pastor et al., 1995; Jabs et al., 1994; Steinhäuser et al., 1992). In einer funktionellen Studie in Bezug auf spannungsabhängige Leitfähigkeiten wurde zwischen „complex cells“ und „passiv cells“ unterschieden (Steinhäuser et al., 1994). Während in diesen Studien, die Identifizierung der Gliazellen über die Elektrophysiologie gelöst wurde, konnte mit der Generierung einer transgenen Mauslinie, die unter dem astrozytenspezifischen GFAP (glial fibrillar acidic protein) Promotor das GFP (*green fluorescent protein*) exprimiert (Nolte et al. 2001), eine Vereinfachung der Identifizierung von Gliazellen geschaffen werden. Verschiedene Arbeiten konnten mit Hilfe dieser Mauslinie zeigen, dass innerhalb der EGFP exprimierenden Astrozyten eine funktionelle Diversität existiert. So konnte in einer Studie von Szöke et al. (2006) in der TgN(hGAP-EGFP) Mauslinie gezeigt werden, dass nur protoplasmatische Astrozyten den Glycin Transporter 1 (GlyT1) im respiratorischen Netzwerk exprimiert. Einen weiteren Unterschied bezüglich der Kopplung von Astrozyten untereinander durch *gap junctions* konnten Wallraff et al. (2004) für den Hippocampus in der gleichen Mauslinie zeigen. In einer elektrophysiologischen Studie von Grass et al. (2004), konnte anhand von Strom-Spannungs-Mustern drei verschiedene Subpopulationen von astroglialen Zellen im respiratorischen Netzwerk identifiziert werden. Die erste Gruppe besaß nichtrektifizierende, symmetrische, spannungsunabhängige Kaliumströme und eine durch D-Aspartat vermittelte Glutamattransporter Antwort (*passive astrocytes*). Die zweite Gruppe, die beschrieben wurde, zeigte zusätzliche A-Typ- Kaliumströme (*intermediate astrocytes*). Die dritte Gruppe, zeigte eine Immunoreaktivität gegenüber dem Proteoglykan NG2, sowie auswärts gleichrichtende Kaliumströme, schwächere Kalium-Einwärtsströme und nur minimale D-Aspartat induzierte Transporterströme.

1.1.2 Die Bedeutung der Kir4.1 Kanaluntereinheit in Gliazellen

Die Familie der einwärts gleichrichtenden Kalium-Kanäle (K^+ inwardly rectifying; Kir) wird basierend auf molekularen und elektrophysiologischen Eigenschaften in sieben Subfamilien (Kir1.0 - Kir7.0) unterteilt (Reimann & Ashcroft, 1999; Hille, 2001; Nichols & Lopatin, 1997). Wichtige Eigenschaften, die Kir-Kanäle definieren, sind ein größerer einwärtsgerichteter als auswärtsgerichteter K^+ -Strom, eine funktionelle Abhängigkeit vom extrazellulärem Kalium und eine starke Modulierbarkeit durch intrazelluläre Faktoren und *second messenger* (Hagiwara et al. 1976; Hille, 2001; Ruppersberg, 2000). Kir-Kanäle besitzen eine tetramere Struktur, die sich aus verschiedenen (heteromer) bzw. identischen (homomer) Kir-Untereinheiten zusammensetzen kann und den Kanal dementsprechend mit unterschiedlichen Eigenschaften ausstattet (Isomoto et al. 1997; Nichols & Lopatin, 1997). Gliazellen können die meisten, wenn nicht sogar alle Vertreter der Kir-Kanal-Subtypen exprimieren (Butt & Kalsi, 2006). Die Funktion von Kir-Kanälen in Gliazellen umfasst die Regulation des Ruhemembranpotentials, den Transport von K^+ und H^+ , die Regulation des Zellvolumens und die Zelldifferenzierung (Neusch et al. 2006; Neusch et al. 2001; Newman et al. 1984; Nagelhus et al., 2004). Im ZNS weit verbreitet ist die Expression der schwach einwärts gleichrichtenden Kir4.1-Kanal-Untereinheit (KCNJ10), welche fast ausschließlich in Gliazellen exprimiert wird und bisher in Astrozyten, Oligodendrozyten, Bergmann-Glia und Müller-Glia nachgewiesen wurde (Takumi et al. 1995; Ishii et al. 1997; Higashi et al. 2001; Konfuji et al. 2002; Neusch et al. 2001). Allerdings konnte mRNA der Kir4.1 Untereinheit auch in Neuronen detektiert werden (Bredt et al. 1995; Jiang et al. 2001; Li et al. 2001; Wu et al. 2004). Innerhalb und zwischen den verschiedenen Hirnregionen kann eine heterogene Expression der Kir4.1 Kanaluntereinheit in Gliazellen beobachtet werden (Poopalasundaram et al. 2000). Im Hirnstamm konnte die Kir4.1 Kanaluntereinheit in Astrozyten der respiratorisch relevanten Hirnregionen nachgewiesen werden, einschließlich der ventralen respiratorischen Gruppe (VRG) und dem Prä-Bötzinger Komplex (Neusch et al., 2006).

Funktionell konnte der Kir4.1-Kanaluntereinheit eine Beteiligung an der Regulation des extrazellulären Kaliums im Hirnstamm (Neusch et. al 2006) und im Rückenmark (Olsen et al., 2006) zugewiesen werden. Studien an einem

Mausmodell mit inaktivierter Kir4.1-Gensequenz zeigten, dass Kir4.1^{-/-} Gliazellen ein depolarisiertes Membranpotential besitzen (Kofuji et al., 2000; Neusch et al. 2001; Neusch et al. 2006). Diese Beobachtungen belegen eine Beteiligung des Kir4.1-Kanals an der Regulation des Ruhemembranpotentials.

1.1.3 Calciumhomöostase in Gliazellen

Astrozyten sind im Gegensatz zu Neuronen elektrisch nicht erregbar, zeigen allerdings eine andere Form transzellulärer Signale, basierend auf intrazellulären Ca²⁺ Konzentrationsanstiegen (*Calcium-signaling*; Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al. 1991). Diese Ca²⁺-Signale können spontan auftreten (Nett et al., 2002; Parri et al., 2001) aber auch durch synaptische Aktivität induziert und moduliert werden. Die astrozytären cytoplasmatischen Ca²⁺-Anstiege fungieren dabei als intrazelluläres und interzelluläres Signal, welches sowohl innerhalb der Zelle als auch zwischen benachbarten Astrozyten als Ca²⁺-Welle propagieren kann (Aguado et al., 2002; Araque et al., 2002; Dani et al., 1992; Pasti et al., 1997; Porter & McCarthy, 1996). Diese Calciumsignale stellen eine neue Form der Informationsverarbeitung dar, welche jedoch im Vergleich zu der neuronalen auf Bioelektrizität basierenden um Größenordnungen langsamer ist.

Bedingung für das Entstehen von Ca²⁺ Signalen ist ein Ca²⁺ Gradient zwischen extrazellulärer und intrazellulärer Umgebung bzw. zwischen intrazellulären Ca²⁺-Speichern und Cytoplasma. Die Konzentration von freiem, ungebundenem Ca²⁺ beträgt im Cytoplasma von Astrozyten 50 - 200 nM verglichen mit dem Extrazellulärraum, wo eine Ca²⁺ Konzentration von ca. 1 mM zu finden ist (Kettenmann & Ransom, 2005). Astrozyten besitzen im Vergleich zu anderen Zellen eine sehr geringe Pufferkapazität für Ca²⁺, so dass schon ein sehr geringer Ca²⁺ Einstrom in das Cytoplasma zu einem signifikanten Ca²⁺-Anstieg führt. Die Variation des cytoplasmatischen Ca²⁺ in Astrozyten lässt sich auf vier verschiedene grundlegende Prozesse zurückführen, die schematisch in Abb.1-2 dargestellt sind (Deitmer et al. 1998; Kettenmann & Ransom, 2005).

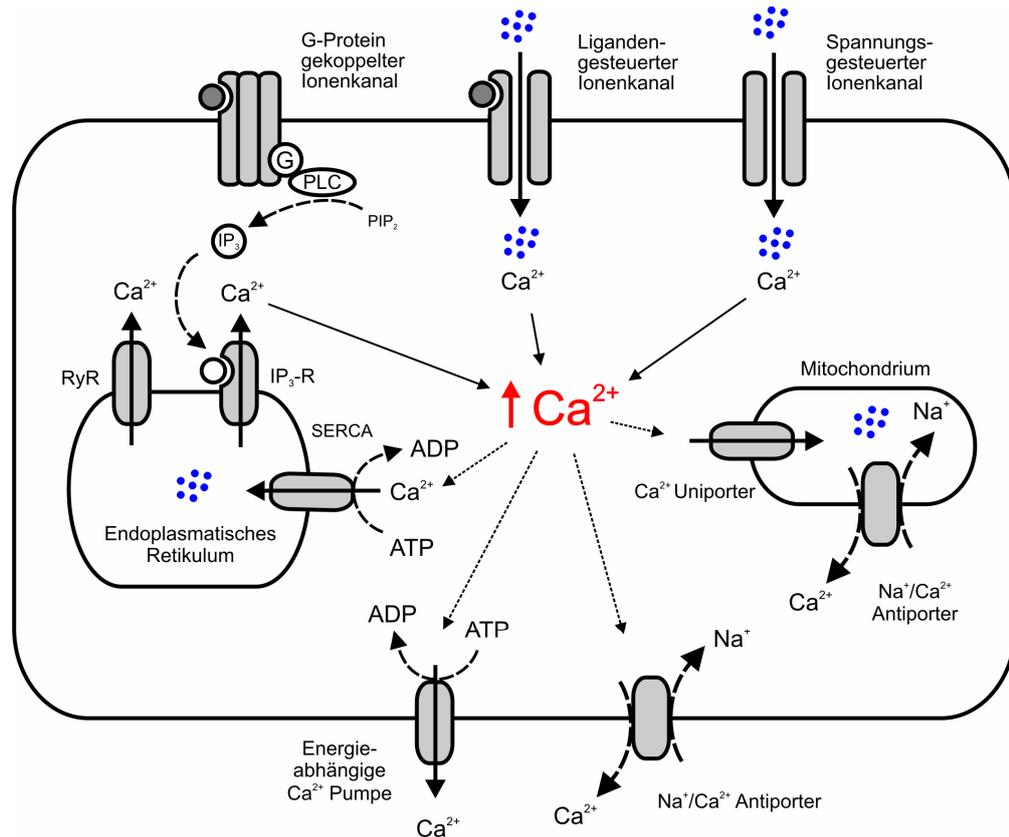


Abb.1-2 Calciumhomöostase in Astrozyten. Das Diagramm zeigt die wichtigsten physiologischen Mechanismen zur Kontrolle des cytosolischen Ca^{2+} . ADP: Adenosin-Diphosphat; ATP: Adenosin-Triphosphat; IP_3 : Inositol 1,4,5-trisphosphat; IP_3 -R: IP_3 -Rezeptor; PIP_2 : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat; PLC: Phospholipase C; RyR: Ryanodinrezeptor; SERCA: Sarco-Endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase. Modifiziert nach Kettenmann & Ransom (2005).

Zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} kann ein Ca^{2+} -Influx aus dem Extrazellulärraum über die Zellmembran in das Zellinnere oder eine Ca^{2+} -Freisetzung in das Cytoplasma aus intrazellulären Speichern führen. Ein Wiederherstellen des cytoplasmatischen Ca^{2+} -Ruhewertes wird erreicht indem eine Ca^{2+} -Extrusion über die Zellmembran erfolgt oder cytoplasmatischen Ca^{2+} in intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher aufgenommen wird. Jeder der vier genannten Prozesse kann über verschiedene Mechanismen ablaufen. So ist ein Influx über die Zellmembran über spannungsabhängige (Westenbroek et al., 1998), ligandengesteuerte (Shelton & McCarthy, 1999), speicher-gesteuerte (*store-operated*; Lo et al., 2002) und mechano-sensitve (Niggel et al. 2000) Ca^{2+} permeable Ionenkanäle möglich. Die intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} kann aus Mitochondrien oder dem endoplasmatischen Retikulum erfolgen, wobei

letztgenannter Ca^{2+} Speicher über Ryanodin oder Inositol 1,4,5-triphosphat (IP_3) sensitive Rezeptoren angesprochen werden kann (Langley & Pearce, 1994; Porter & McCarthy, 1996; Verkhratsky et al., 1998). Während die genannten Prozesse der Richtung des Ca^{2+} Konzentrationsgradienten folgen und somit passiver Natur sind, ist sowohl die Extrusion von Ca^{2+} aus dem Cytoplasma in den Extrazellulärraum als auch das Zurückführen von cytoplasmatischen Ca^{2+} in die intrazellulären Speicher ein energieabhängiger Prozess, der über Ca^{2+} ATPasen oder $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Antiporter ermöglicht wird.

1.2 Das Atemzentrum

1.2.1 Funktionelle Anatomie

Das bilateral angelegte Atemzentrum liegt ventrolateral im Hirnstamm in einer Zellsäule, die von der Medulla bis zur Pons reicht. Die rhythmische neuronale Aktivität mit der letztendlich die Atembewegungen des Brustkorbs und des Zwerchfells gesteuert werden, wird von einem neuronalen Netzwerk produziert, welches in der ventralen respiratorischen Gruppe (VRG) lokalisiert ist (Richter & Spyer, 2001). In diesem Netzwerk wurden mehrere funktionelle Klassen von respiratorischen Neuronen (inspiratorische, postinspiratorische und expiratorische) identifiziert, die sich auf verschiedene Regionen der VRG verteilen. Eine dominierende Funktion für die Rhythmusgeneration als Ganzes nimmt der Prä-Bötzinger Komplex ein. Dieser innerhalb der VRG caudal gelegene Bereich, enthält einen Teil des Netzwerkes, der essentiell für die Generierung des Atemrhythmus ist (Ramirez et al. 1998; Smith et al. 1991). Um das System an Veränderungen der Umwelt oder des Verhaltens anzupassen, unterliegt das respiratorische Netzwerk einer permanenten Modulation durch verschiedene Neurotransmittersysteme und Modulatoren, die u.a. Serotonin (Richter et al., 2003) und Noradrenalin (Viemari & Ramirez, 2006), sowie Substanz P (Pena & Ramirez, 2004) *thyreotropin-releasing-hormone* (TRH; Mutollo et al., 1999) einschließen. Da sich das respiratorische Netzwerk in einer aktiven und für Stunden vitalen Form in einer akuten Hirnschnittpräparation isolieren lässt, ist es besonders für *in vitro* Untersuchungen geeignet (Ramirez et al. 1996) und gilt neben dem stomatogastrischen Nervensystem der Crustaceen

(Marder & Bucher 2007) als ein Modellsystem für ein rhythmisch aktives neuronales Netzwerk.

1.2.2 Die Bedeutung der Glia innerhalb des respiratorischen Systems

Die weitere Aufklärung der Bedeutung von Astrozyten innerhalb des respiratorischen Netzwerkes war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Astrozyten einen modulierenden und stabilisierenden Einfluss auf die neuronale Aktivität im respiratorischen Netzwerk haben. In pharmakologischen Studien konnte eine metabolische Kopplung zwischen Gliazellen und Neuronen nachgewiesen werden, die essentiell für eine normale Netzwerkaktivität ist (Hülsmann et al., 2000b; Young et al. 2005). Auch konnte der Nachweis erbracht werden, dass Gliazellen über Neurotransmittertransportsysteme, wie z.B. für Glycin, die synaptische Transmission innerhalb des respiratorischen Netzwerkes regulieren und dadurch einen stabilisierenden Effekt auf den respiratorischen Rhythmus ausüben (Gomez et al., 2003; Szöke et al., 2006). Astrozyten des Prä-Bötzinger Komplexes mit ihrer hohen Kaliumleitfähigkeit (Graß et al., 2004), leisten offensichtlich einen Beitrag zur Regulation des extrazellulären Kaliums im Atemzentrum, da die gemessenen K^+ Änderungen vergleichsweise gering ausfallen (Brockhaus et al., 1993). Tatsächlich konnte die Expression der Kir4.1-Kanaluntereinheit auf Astrozyten der VRG nachgewiesen werden und dem Kanal eine funktionelle Rolle in der extrazellulären Kaliumregulation zugewiesen werden (Neusch et al. 2006).

1.3 Zielsetzung

Unsere Sichtweise auf Gliazellen, insbesondere Astrozyten, hat sich über die Jahre stark geändert. Durch die Entwicklung von chemisch synthetisierten fluoreszenten Ionenindikatoren und dem parallel verlaufenden Fortschritt in der Fluoreszenzmikroskopie konnte der Nachweis erbracht werden, dass Gliazellen eine Form der Erregbarkeit basierend auf Ca^{2+} -Signalen, besitzen und in die Informationsverarbeitung im Nervensystem aktiv involviert sind. Ziel der vorliegenden Studie war es, Ca^{2+} -Signale in Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe näher zu definieren und deren Bedeutung für die Netzwerkaktivität aufzuklären.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte ein astrozytenspezifisches Calciumsignal, welches durch Absenken des extrazellulären Kaliums induziert wird, untersucht werden und dessen Bedeutung sowohl für die Identifizierung von Zellen als auch für die Netzwerkfunktion herausgearbeitet werden. Mit Hilfe eines Knock-out-Mausmodells sollte die Abhängigkeit des Kir4.1-Kanals auf das Calciumsignal untersucht werden. Diese Methode und die zusätzliche Verwendung einer Mauslinie mit transgen markierten Gliazellen war dann Voraussetzung für den zweiten Teil der vorliegenden Arbeit, in der über Ca^{2+} -Messungen der Einfluss von Neuromodulatoren auf Astrozyten des respiratorischen Systems untersucht werden sollte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Mausmodelle

Für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurden abhängig von der experimentellen Zielsetzung unterschiedliche Mauslinien benutzt. Die Wildtyp Mauslinien wurden in dem institutseigenen Tierstall (Zentrum Physiologie und Pathophysiologie, Universität Göttingen) gezüchtet, alle anderen in dieser Studie verwendeten Mauslinien wurden dem Tierstall des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin (Göttingen) entnommen. Die Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen mit Wasser und Trockenfutter im 12/12h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Tötung der Tiere wurde von der Bezirksverwaltung Braunschweig genehmigt und dem Tierschutzbeauftragten des Instituts mitgeteilt (Aktenzeichen T8.03). Die Experimente wurden so geplant und ausgeführt, dass nur die unbedingt erforderliche Menge an Tieren getötet werden musste. Es wurden Mäuse im Alter von P1 bis P9 verwendet.

2.1.1.1 Die Kir4.1 Knock-out-Maus

Die verwendete *Knock-out*-Mauslinie Kir4.1^{-/-} wurde ursprünglich in der Abteilung von Henry Lester vom California Institute of Technology generiert und weist eine Inaktivierung der Gensequenz für die Kir4.1 Kanaluntereinheit auf (Kofuji et al., 2000). Der Phänotyp homozygoter Kir4.1 Knockout-Tiere ist im Vergleich zu heterozygoten und wildtyp Mäusen deutlich verändert. Die Körpergröße ist reduziert und die Mortalitätsrate erhöht (100% bei P24, Neusch et al., 2001). Zusätzlich zeigen diese Tiere eine entwicklungsabhängige gestörte motorische Koordination, die sich nach der zweiten postnatalen Woche deutlich zeigt (Neusch et al., 2001). Es wurden Mäuse im Alter von P7 bis P10 verwendet.

2.1.1.2 Die Mauslinien TgN(hGFAP-EGFP) und TgN(hGFAP-mRFP1)

Um an identifizierten Astrozyten optische, elektrophysiologische und immun-histochemische Experimente vornehmen zu können, wurden transgene Mauslinien benutzt, bei denen fluoreszierende Proteine unter der Kontrolle des

humanen GFAP-Promotors in Astrozyten exprimiert werden. Der GFAP Promotor kontrolliert die Expression des glialen fibrillären sauren Proteins (*glial fibrillary acid protein*), ein astrozytenspezifisches Strukturprotein (Brenner et al. 1994). Für Immunhistochemische Färbungen wurde die Mauslinie TgN(hGFAP-EGFP) benutzt, die das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) in Astrozyten exprimiert (Nolte et al. 2001). Astroglia der Mauslinie TgN (hGFAP-mRFP1) exprimieren das im roten Spektrum fluoreszierende *monomeric red fluorescent Protein* (mRFP1) unter der Kontrolle des hGFAP Promotors. Die Fluoreszenz des Proteins im roten Bereichs des Lichtspektrums lässt in dieser Mauslinie eine Anwendung von im grünen Spektrum emittierenden Calciumindikatoren zu (Hirrlinger et al. 2005). Es wurden Mäuse im Alter von P1 bis P9 verwendet.

2.1.1.3 Die Mauslinie TgN(Thy1.2-EYFP)

Diese Mauslinie wurde verwendet um Experimente an fluoreszent markierten Neuronen durchzuführen. Der neuronale Thy1.2-Promotor (Caroni 1997) kontrolliert in dieser Linie die Expression des *enhanced yellow fluorescent protein* (EYFP; Feng et al., 2000), eine Variante des GFP Proteins. Es wurden Mäuse im Alter von P1 bis P9 verwendet.

2.1.1.4 Die Mauslinie TgN(PLP-DsRed1)

In der Mauslinie TgN (PLP-DsRed1) exprimieren unter der Kontrolle des murinen Proteolipid Promotors PLP (Wight et al. 1993) Oligodendrozyten das im roten Bereich des Lichtspektrums fluoreszierende Protein DsRed1 (Hirrlinger et al., 2005). Es wurden Mäuse im Alter von P1 bis P9 verwendet.

2.1.2 Verwendete Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Zelllinien für die heterologe Expression eines Kir4.1-EGFP Konstrukts verwendet. Zum einen COS-7-Zellen, aus einer Tumorzelllinie, die ursprünglich aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) gewonnen wurde (American Type Culture Collection: ATCC, No. CRL-1651, Manassas, USA). Zum Anderen wurde als weitere Zelllinie *Chinese Hamster Ovary Cells* (CHO-K1) verwendet (American Type Culture Collection: ATCC, No. CCL 61 oder ATCC

9606-CRL, Manassas, USA). Diese Tumorzelllinie stammt ursprünglich aus den Ovarien des chinesischen Zwerghamsters (*Cricetulus griseus*).

2.1.3 Lösungen, Puffer und Medien

2.1.3.1 Superfusionslösungen

Für die Präparation von akuten Hirnschnitten und die anschließenden Experimente, wurde eine bikarbonatgepufferte physiologische Salzlösung verwendet, deren Zusammensetzung der cerebrospinalen Flüssigkeit nachempfunden ist und im folgenden ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*) genannt wird. Zur Identifikation von Astrozyten diente eine modifizierte physiologische Salzlösung, die im folgenden mit niedrig-[K⁺]_e-Lösung bezeichnet wird. Die Kaliumkonzentration ist in dieser Lösung von 3 mM auf 0,2 mM reduziert. Ausschließlich Astrozyten zeigen in dieser Umgebung intrazelluläre Calciumanstiege, wodurch eine Identifizierung während Ca²⁺-Imaging-Experimenten möglich ist (Dallwig et al., 2000; Dallwig & Deitmer, 2002). Um die Osmolarität konstant zu halten wurde der Natriumchlorid Anteil in der Lösung entsprechend erhöht. Zur Depolarisation von Neuronen in der rhythmischen Schnittpräparation (siehe Abschnitt 2.2.1) wurde eine Superfusionslösung mit erhöhter Kaliumkonzentration verwendet. Alle Superfusionslösungen wurden vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt und für ca. 20 min mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast um einen pH-Wert von 7,4 ± 0,5 einzustellen und die Lösung mit Sauerstoff zu sättigen. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der genannten Lösungen bei Raumtemperatur (Tab.1). Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOH auf 7,4 eingestellt.

Tab.2-1 Zusammensetzung der Superfusionslösungen

Substanz	ACSF (in mM)	Niedrig [K ⁺] _e (in mM)
NaCl	118,0	120,8
NaHCO ₃	25,0	25,0
NaH ₂ PO ₄	1,0	1,0
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1,0	1,0
KCl	3,0	0,2
CaCl ₂	1,5	1,5
Glucose	30,0	30,0

2.1.3.2 Extrazellulär applizierte Pharmaka

Alle in dieser Arbeit verwendeten pharmakologisch aktive Substanzen sind in Stammlösungen angesetzt worden (bis zu 1000fach konzentriert und in Aqua. dest. gelöst) und im Gefrierschrank bei -20°C gelagert worden. Vor dem Beginn der Experimente wurden die Pharmaka in ACSF auf die entsprechende Konzentration verdünnt und extrazellulär über das Badsuperfusionssystem (Flussrate 9 - 11 ml/min) zugeführt. Wenn nicht anders angegeben fand die Applikation der Substanzen in den folgenden Konzentrationen statt (Angaben in μM): Serotonin (50), α -methyl-5-Hydroxytryptamin (50), Substanz P (2), TRH (5), TTX (0,5), CPA (30), Prazosin (100), Noradrenalin (10), Glutamat (1000).

2.1.3.3 Intrazelluläre Lösungen

Mikropipetten für Patch Clamp Experimente wurden abhängig von der experimentellen Zielsetzung mit den in Tab. 2 angegebenen HEPES gepufferten Intrazellulärlösungen über einen mit einem Sterilfilter (Porengröße $0,2\ \mu\text{m}$; Nalge Nunc, Rochester, NY) versetztem Mikroloader (Eppendorf, Hamburg) befüllt. Frisch angesetzte Pipettenlösungen wurden stets auf ihre Osmolarität (300 - 310 mOsm) mit einem Osmometer (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) überprüft. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von KOH auf 7,2 eingestellt. Fura-2 war als Stammlösung in Aqua dest. gelöst und wurde zu Beginn der Experimente der Pipettenlösung zugefügt. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der genannten Lösungen bei Raumtemperatur (Tab.2).

Tab.2-2 Zusammensetzung der Pipettenlösungen

Substanz	InK (in mM)	InK Fura (in mM)
KCl	140	160
CaCl ₂	1	-
MgCl ₂ * 6H ₂ O	2	2,2
Na ₂ ATP	4	-
HEPES	10	11
EGTA	10	-
Mg ₂ ATP	-	4,4
Na-GTP	-	0
Fura-2	-	0,1

2.1.3.4 Pufferlösungen für Immunfärbungen

Zur immunhistochemischen Aufarbeitung von Gewebe wurden zwei verschiedene phosphatgepufferte Lösungen benutzt. Während der intrakardialen Fixierung wurde zum Ausspülen des Blutes aus dem Gefäßsystem des Tieres die Magnesium und Calciumfreie Variante von Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco-Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Für die anschließende weitere Prozessierung des fixierten Gewebes wurde Phosphatpuffer (phosphate buffered saline; PBS) benutzt. Der pH-Wert von PBS betrug 7,4 und wurde mit Hilfe von NaOH bzw. HCl eingestellt. Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der genannten Lösungen bei Raumtemperatur.

Tab.2-3 Zusammensetzung der Pufferlösungen

Substanz	PBS (in mM)	HBSS (in mM)
NaCl	137	138
KCl	2,7	5,3
Na ₂ HPO ₄	8,1	0,3
KH ₂ PO ₄	1,4	0,4
NaHCO ₃	-	4,2
D-Glukose	-	5,6
Phenolrot	-	0,03
pH-Wert	7,4	7,4

2.1.4 Antikörper und Seren

Die für die immunhistochemische Analyse verwendeten primären und sekundären Antikörper sind mit Angaben zur Herstellerherkunft in Tab.2-4 aufgeführt. Die Angaben zur Verdünnung beziehen sich stets auf die vom Hersteller gelieferte Stammlösung. War eine Langzeitaufbewahrung der Antikörper im Gefrierschrank möglich, so wurde die gelieferte Antikörperlösung mit Glycerol laut Herstellerangaben verdünnt und bei -20°C aufbewahrt. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden das Serum der Tierspezies benutzt aus dem der sekundäre Antikörper gewonnen wurde.

Tab.2-4 Übersicht primärer AK , dazugehörigen sekundären AK und deren Verdünnungen

Epitop	5-HT _{2a} R	TRH-R	NK1-R
Primärer AK	SR-2A (A15) (Polyklonal)	IMG-71813 (Polyklonal)	AB-5060 (Polyklonal)
Herkunft	Ziege	Kaninchen	Kaninchen
Bezugsquelle	Santa Cruz Biotec	Imgenex	Chemicon
Verdünnung	1:50	1:400	1:400
Sekundärer AK	Anti Ziege (Cy3 konjugiert)	Anti Kaninchen (Cy3 konjugiert)	Anti Kaninchen (Cy3 konjugiert)
Herkunft	Esel	Ziege	Ziege
Bezugsquelle	Dianova	Dianova	Dianova
Verdünnung	1:1000	1:1500	1:2000

2.1.5 Calciumindikatoren

Um intrazelluläre Calciumkonzentrationsänderungen in akuten Hirnschnitten und in Zellkultur messen zu können, wurden die Calciumindikatoren Oregon Green BAPTA-1 AM (Invitrogen, Karlsruhe), Calcium Orange AM (Invitrogen, Karlsruhe;) und Fura-2 AM (Invitrogen, Karlsruhe) benutzt. Für die Färbung von Astrozyten in akuten Hirnschnittpräparaten eignete sich besonders der Calciumfarbstoff Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (im folgenden OregonGreen AM genannt). Das Salz des Calciumindikators wurde mit Bromomethoxyacetat verestert. Die Carboxylgruppen des Moleküls tragen Acetoxymethylreste, wodurch das Molekül eine lipophile Eigenschaft erhält. AM-Calciumindikatoren sind somit membrangängig und lassen sich über eine Badfärbung (*bulk-loading* Methode) in lebende Zellen über Diffusion einbringen. Anschließend spalten intrazelluläre Esterasen die Esterbindung (Abb.2-1, B), es entsteht Formaldehyd, Acetat und die Säureform des Farbstoffes. Durch die Esterspaltung wird eine Diffusion des Farbstoffmoleküls zurück in den Extrazellulärraum verhindert und der Farbstoff kann als Ca²⁺ Indikator in der Zelle fungieren. OregonGreen AM gehört zu der Stoffgruppe der Ca²⁺-Chelatoren. Das Molekül besitzt eine hohe Affinität gegenüber Calcium (K_d 170 nM). Bindet dieser Farbstoff Calcium so ändern sich seine optischen Eigenschaften. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich nach rechts in den längerwelligen Bereich des Lichtspektrums und die Intensität des

emittierten Fluoreszenzlichtes steigt mit höherer Calciumkonzentration (Abb. 2-1, A). Der Farbstoff OregonGreen AM hat in seiner gebundenen Form das Absorptionsmaximum bei 494 nm und sein Emissionsmaximum bei 523 nm.

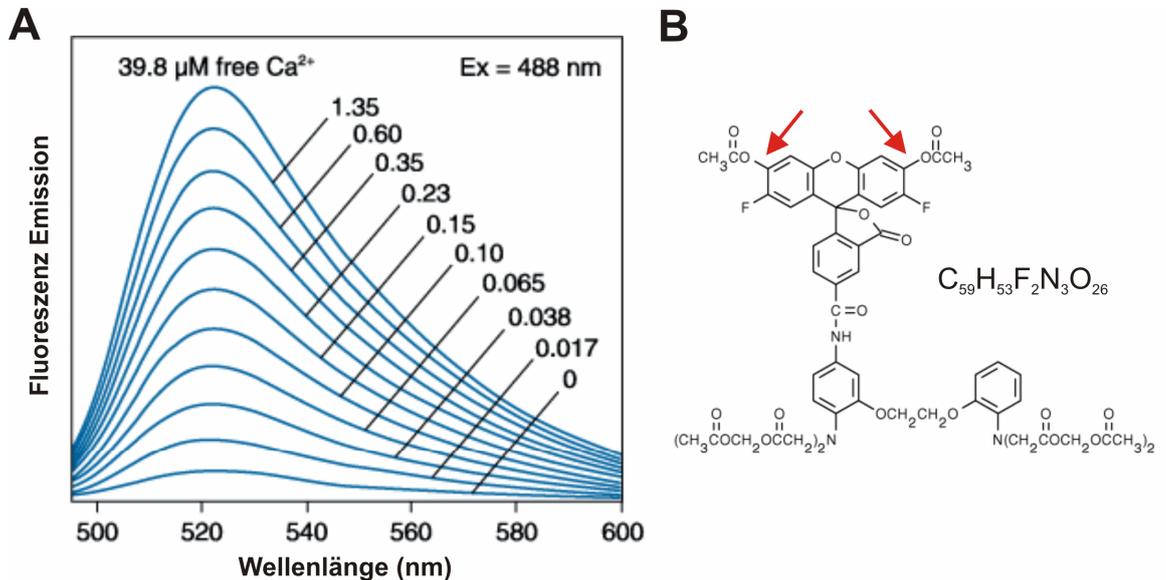


Abb. 2-1 Eigenschaften von Oregon Green 488 BAPTA-1 AM. **A:** Emissionsspektren von Oregon Green bei unterschiedlichen Ca^{2+} Konzentrationen (Anregungswellenlänge 488 nm). **B:** Strukturformel mit Spaltungsstellen der Esterbindung (Peile). Modifiziert nach Haugland, 2005.

2.2 Methoden

2.2.1 Anfertigung von akuten Hirnschnittpräparaten

Es wurden optischen und elektrophysiologischen Messungen an akuten Hirnschnittpräparaten durchgeführt. Abhängig von der experimentellen Zielsetzung wurden sowohl Dünnschnittpräparate mit Schnittdicken zwischen 150 μm bis 250 μm als auch dickere Schnitte (Rhythmische Schnitte) mit Schnittgrößen von 650 μm bis 750 μm angefertigt (siehe auch 2.2.5.2). Wenn nicht anders angegeben stammen die Schnitte aus der *Medulla oblongata* und wurden im Bereich der ventralen respiratorischen Gruppe geschnitten (Abb.3). Zur Herstellung der Schnittpräparate wurden die Mäuse (postnataler Tag 1 bis 10) dekapitiert und das Gehirn durch Öffnen der Schädelkalotte herauspräpariert. Das Gehirn wurde sofort in eine mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) begaste eiskalte (1-2°C) artifizielle Cerebrospinal-Flüssigkeit (ACSF) überführt und für ca. 1 min gekühlt. Anschließend wurde das Gehirn in eine Petrischale mit

4°C kalter begaster ACSF überführt und erst das Großhirn, dann das Kleinhirn mit Hilfe eines Skalpells vom Hirnstamm abgetrennt. Unmittelbar danach wurde der Hirnstamm mit Hilfe eines Cyanoacrylatklebers (Roth, Karlsruhe) dorsal auf einen auf einer Metallplatte befestigten abgeschrägten Agarblock geklebt. Der so fixierte Hirnstamm wurde dann in das Schneidebecken eines Vibratoms (Leica VT1000S, Bensheim) mit der rostralen Seite nach oben und der ventralen Oberfläche zur Klinge, eingespannt.

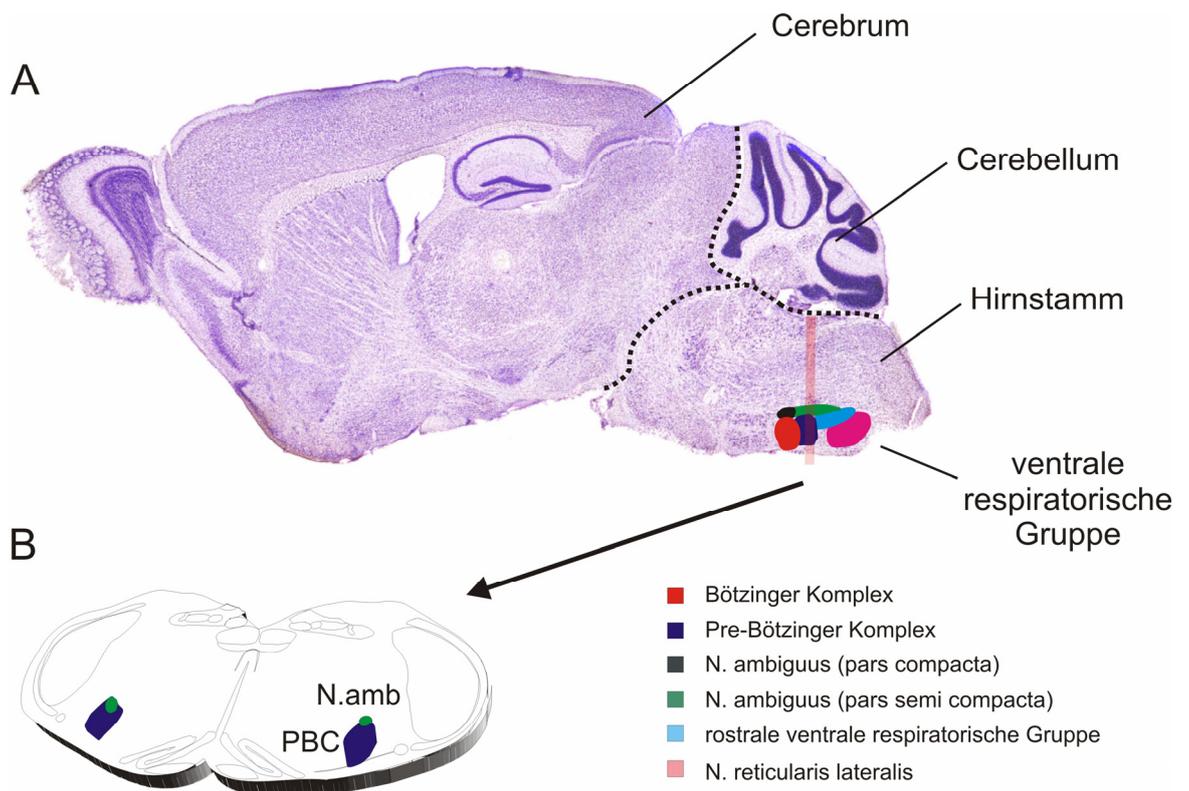


Abb. 2-2 Darstellung der anatomischen Lage der ventralen respiratorischen Gruppe (VRG) innerhalb des Gehirns der Maus. A: Saggitalschnitt durch ein adultes Gehirn. Der rote Balken gibt die Schnittführung wieder. **B:** Schematische Darstellung eines Hirnschnittpräparates mit farblich hervorgehobenen Anteilen der VRG: PBC, Prä-Bötzing Komplex; N.amb, Nucleus ambiguus. Modifiziert nach G. Paxinos & K. Franklin (2001).

Der gesamte Hirnstamm war dabei um ca. 20° in seiner Längsachse in dorsaler Richtung gekippt und wurde in ventro-dorsaler Richtung geschnitten. Für das Anfertigen der Coronalschnitte wurden Rasierklingen (ASR Company, Cedar Knolls, NJ) verwendet. Nach der Präparation wurden die Schnitte in eine Aufbewahrungskammer mit begastem ACSF überführt und mindestens 1h bei

Zimmertemperatur zu Regenerationszwecken belassen. Die Schnitte wurden, wenn nicht anders angegeben, bis maximal 6h nach der Präparation für Messungen verwendet.

Zusätzlich wurden coronale Hippocampus- bzw. Cortexschnitte aus dem Cerebrum angefertigt. Die Präparation erfolgte analog zum Hirnstamm, mit dem Unterschied, dass das abgetrennte Cerebrum mit der Schnittfläche auf einem flachen Agarblock aufgeklebt wurde und dann die coronalen Schnitte von dorsoal nach ventral geschnitten wurde.

2.2.2 Versuchsaufbau für optische und elektrophysiologische Messungen

Für optische und elektrophysiologische Messungen an akuten Hirnschnittpräparaten und Zellkulturen wurde eine Messkammer verwendet, die über ein Perfusionssystem ständig mit Carbogen begastem ACSF durchspült wurde (Flussrate 9 - 11 ml/min). Über einen an ein Wasserbad angeschlossenen Wärmetauscher wurde die Temperatur der zugeführten Lösung geregelt. Alle Experimente fanden bei einer Temperatur von 30°C statt. Die Schnittpräparate wurden wie unter Abschnitt 2.2.2 angegeben hergestellt und mit einer Pipette in die Messkammer überführt. Mit Hilfe eines U-förmig gebogenem Platindrahtes der mit Nylonfäden bespannt war, wurden die Schnitte fixiert. Wurde mit Zellkulturen gearbeitet, so wurden die Zellkulturplättchen in die dafür vorgesehene Versenkung gelegt und ebenfalls mit Platindraht beschwert. Die Präparate wurden über ein Axioskop FS Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) ausgestattet mit einem 40x Wasserimmersionsobjektiv (NA 0.75; Achroplan, Zeiss) betrachtet. Bei der Durchführung von Patch-Clamp-Experimenten kam zusätzlich ein 63x Wasserimmersionsobjektiv (NA 0.9; Achroplan, Zeiss) zum Einsatz. Für die Identifikation und Bilddarstellung von transgen markierten Zellen und um Ca^{2+} -Messungen durchführen zu können, wurde ein polychromatisches Beleuchtungssystem (Polychrom II, T.I.L.L. Photonics, Gräfelfing) und eine CCD Digitalkamera (SensiCam, PCO, Kelkheim) in den Strahlengang des Mikroskops integriert. Der Monochromator ermöglichte die Erzeugung einer Anregungs-Wellenlänge im Bereich von ca. 250 – 690 nm. Das von dem Fluorochrom emittierte Licht passierte zunächst das Objektiv, dann den für die benutzten Fluorophore spezifischen Filtersatz (vgl. Tab.2-5), bestehend aus dichroiden Spiegel und Emissionsfilter um schließlich über ein

Linsensystem (x 0.63) von dem Kamerachip detektiert zu werden (Abb.2-3). Das Kamerasignal wurde anschließend über einen Personal Computer mit Hilfe der Software Imaging Workbench 5.2 (INDEC BioSystems, Santa Clara, CA) weiterverarbeitet und gespeichert. Um eine schwingungsfreie Umgebung für elektrophysiologische Experimente zu erhalten, war der Messplatz auf einem druckluftgefederten Tisch aufgebaut. Elektromagnetische Störeinflüsse wurden mit einem um den Messstand aufgebauten Faraday-Käfig minimiert. Über zwei in das Setup integrierte Mikromanipulatoren, konnten zusätzliche Elektroden für Patch-Clamp Experimente bzw. Feldpotentialableitungen in der Messkammer positioniert werden. Der Versuchsaufbau für elektrophysiologische Experimente ist unter Abschnitt 2.2.5 näher beschrieben.

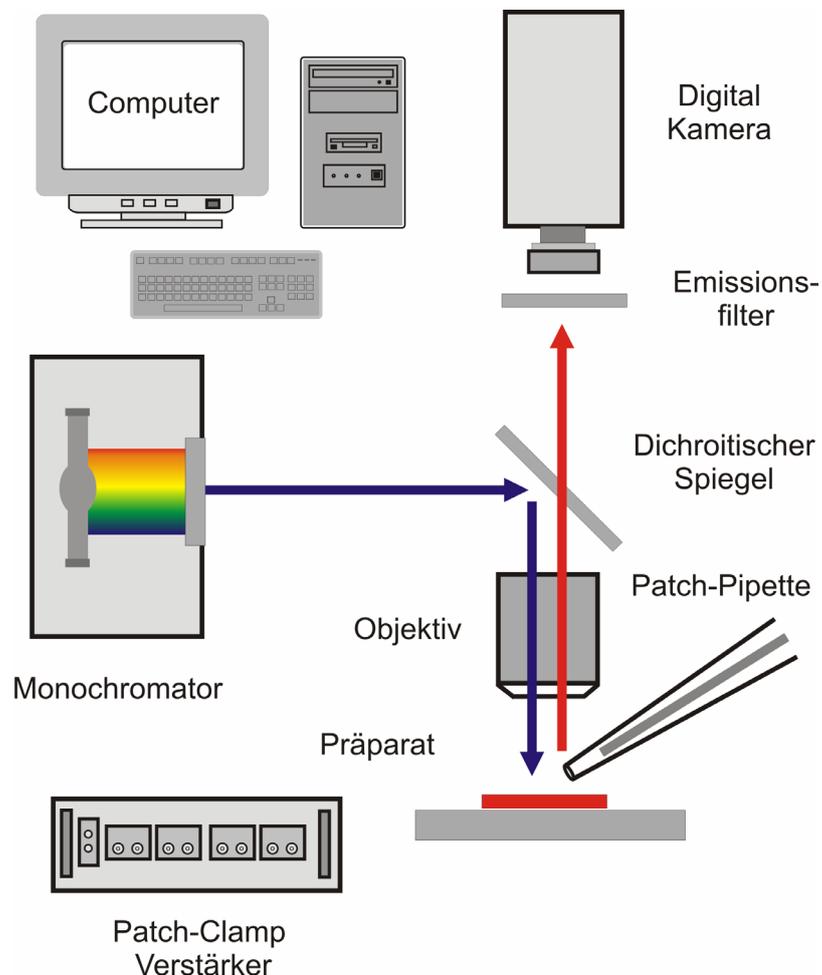


Abb. 2-3 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für optische und elektrophysiologische Messungen (nähere Erläuterung siehe Text).

Tab.2-5 Übersicht der verwendeten Fluorochrome und der dazugehörigen Filtersätze

Fluorochrom	Strahlenteiler	Emissionsfilter	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Anregungswellenlänge
EGFP	495	525/50*	489	516	480
mRFP	595	645/75	584	607	584
EYFP	530	560/40	514	527	514
Oregon Green	530	560/40	494	523	494
Calcium Orange	560	645/75	549	576	549
Fura-2	435	470 LP	335/363	505/512	350/380

* nicht in allen Experimenten verwendet

2.2.3 Ca²⁺ Imaging Experimente in akuten Hirnschnitten

Schnittpräparate für Calcium-Imaging-Experimente wurden wie unter Abschnitt 2.2.1 angegeben mit einer Schnittdicke von 200 µM angefertigt. Vor der Beladung mit dem Calciumfarbstoff wurden die Schnitte für ca. 1h bei 34°C in einer mit begastem ACSF gefüllten Aufbewahrungskammer gelagert. Dieser Arbeitsschritt diente dazu, durch die Präparation abgestorbene oder beschädigte Zellen von der Schnittoberfläche zu entfernen. Die Qualität der anschließenden Calciumfärbung konnte dadurch im Gegensatz zu einer Färbung ohne vorherige Inkubation entscheidend verbessert werden (21,8 ± 2,9 gef. Zellen, n=5 Schnitte vs. 30,2 ± 5,4 gef. Zellen, n=9 Schnitte). Im nächsten Schritt wurden die Schnittpräparate in eine Färbekammer (Institutseigene Werkstatt) überführt und für ca. 45-50 min bei 30°C in einer Calciumfarbstofflösung (Oregon Green 5 µM, Calcium Orange 8 µM, Fura-2 4 µM; in ACSF mit 1% DMSO) inkubiert. Die Beladung der Zellen fand über die so genannte *bulk-loading* Methode statt. Die zusätzliche Zugabe von 0,1% Pluronsäure erleichterte die Membrangängigkeit des Calciumfarbstoffs. Um Schaumbildung zu vermeiden erfolgte die Carbogen-Begasung über die Oberfläche der Färbelösung. Durch eine exzentrische Rotation der Färbekammer und die dadurch erzeugte Flüssigkeitsbewegung war eine Durchmischung und damit optimale Begasung der gesamten Lösung gewährleistet. Um den verbleibenden extrazellulär vorkommenden Farbstoff aus dem Gewebe rauszuwaschen wurden die Schnitte nach der Färbeprozedur für mindestens 30 min bei RT aufbewahrt, bevor sie für Messungen benutzt wurden. Nach Transfer des Präparates in die Messkammer wurde über visuelle Kontrolle im Bereich der ventralen respiratorischen Gruppe (siehe Abb.2-2, B) auf die Schnittoberfläche fokussiert. Mit Hilfe der Ca²⁺ Imaging-Software Imaging

Workbench 5.2 konnten *regions of interest* (ROIs) im Kamerabild definiert werden. Innerhalb der ROIs wurde die Calciumkonzentration über die Zeit gemittelt und in Echtzeit durch die Software auf dem Bildschirm dargestellt. In allen Experimenten wurden die ROIs so gelegt, das nur im Bereich des Somas der betreffenden Zelle gemessen wurde (Abb.2-4, A). Die Aufnahme der Calciumkonzentrationen fand in einem Hirnareal von 250 μm x 191 μm statt. Zellen die sich im Randbereich befanden wurden nicht in die Messung und anschließende Auswertung miteinbezogen, da die Probe an diesen Stellen nicht mit gleicher Intensität ausgeleuchtet war (Abb.2-4, B). Oregon Green und Calcium Orange sind nicht-ratiometrischer Farbstoffe mit denen sich im Gegensatz zu Fura-2 nur relative Änderungen der Fluoreszenzintensität messen lassen. Alle mit Oregon Green und Calcium Orange gemessenen Fluoreszenzintensitäten (F) wurden $\Delta F/F_0$ korrigiert, d.h. das Fluoreszenzänderungen (ΔF) auf einen Fluoreszenzbasiswert (F_0 ; *Baseline* - Fluoreszenz) bezogen sind. Als F_0 wurde die Fluoreszenz definiert, welches 10 s vor Applikation eines Pharmakons aufgenommen wurde. Die errechnete relative Änderung der Fluoreszenzintensität erfolgte nach Gleichung [1].

$$\Delta F = \frac{F - F_0}{F_0} \quad [1]$$

2.2.4 Ca^{2+} -Imaging Experimente in Zellkultur

Die Ca^{2+} -Imaging Experimente an Zellkultur wurden wie unter Abschnitt 2.2.3 angegeben durchgeführt. Die Beladung der Zellen fand in den *four-well*-Zellkulturplatten im Inkubator statt. Vor der Beladung mit dem Calciumfarbstoff wurde das Vollmedium gegen antibiotikafreies Medium getauscht. Als Calciumindikator diente der ratiometrische Farbstoff Fura-2. Die Zellkulturen wurden für 20 min mit 2 μM Fura-2 (im Zellkulturmedium mit 0,07% Pluronsäure und 0,01% DMSO) im Inkubator beladen. Nach einem anschließenden Waschschrift mit Vollmedium wurde ca. 20 min gewartet, um eine komplette De-Esterifizierung des Farbstoffes zu gewährleisten.

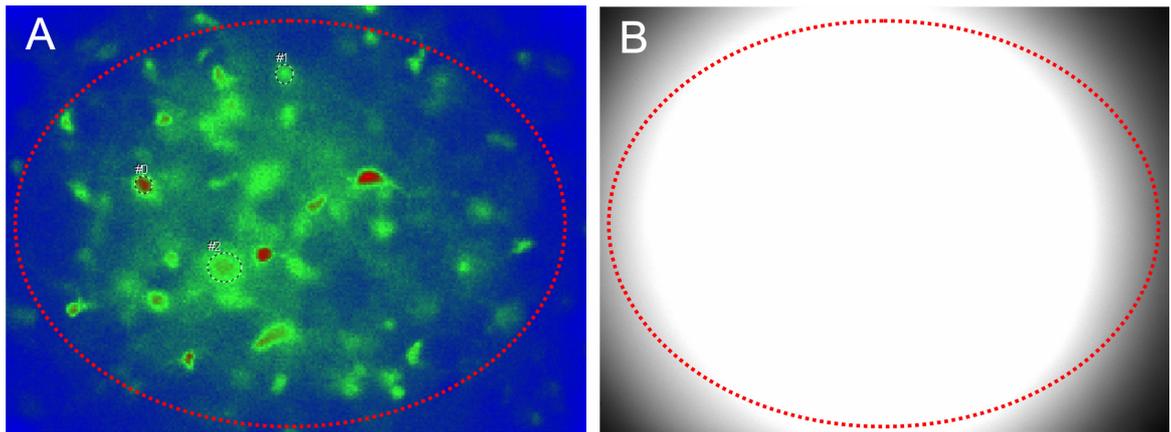


Abb. 2-4 Vergleich des Auswertungsbereiches im CCD-Bild mit der Ausleuchtung eines standardisierten Fluoreszenzpräparates.

A: CCD-Kamera Bild eines OregonGreen AM gefärbten Gehirnschnittes. Das Bild ist in Falschfarben kodiert dargestellt. Die gepunktete Kreislinie markiert das in die Auswertung miteinbezogene Gewebeareal. Beispielhaft sind drei *region of interest* (ROI) eingezeichnet. **B:** Das Bild zeigt die Ausleuchtung eines standardisierten Fluoreszenzpräparates (Chroma Technology, Rockingham, VT).

2.2.5 Whole-cell-voltage-clamp Messungen

Die Anfertigung von Schnittpräparaten für *whole-cell-voltage-clamp* Experimente erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.1 angegeben. Die Dicke der Schnitte betrug bei diesen Messungen nur 150 μm was den Vorteil hatte, dass das Gewebe eine höhere Transparenz im Durchlicht aufwies, die Konturen von einzelnen Zellen dadurch deutlicher waren und bei gleichzeitiger Epifluoreszenz die Patch-Pipette leichter an transgen fluoreszenzmarkierte Zellen herangeführt werden konnte. Patch-Clamp-Messungen an Zellkulturen wurden mit Hilfe einer Phasenkontrast Optik durchgeführt. Die elektrophysiologischen Messungen wurde mit einem an den Vorverstärker angeschlossenen Patch-Clamp-Verstärker (MultiClamp 700A, Axon Instruments, Foster City, CA) durchgeführt. Für die Messungen wurden Mikropipetten aus Borosilikat-Glas Kapillaren (Biomedical Instruments, Zöllnitz) mit einem Horizontalpuller (Zeitz-Instrumente, München) gezogen. Nach dem Befüllen mit der Pipettenlösung betrug der Widerstand der Patch-Pipetten 2 bis 3 MOhm (InK) bzw. 4-5 MOhm (InK-Fura). Die Pipetten wurden in einen Pipettenhalter eingespannt der an einem Vorverstärker (Axon Instruments, Foster City, CA) befestigt war. Der Vorverstärker inklusive der Pipettenhalterung konnte über einen Mikromanipulator (Institutseigene Herstellung) in drei Dimensionen

sowohl mechanisch als auch mit Hilfe einer Piezosteuerung (Institutseigene Herstellung) bewegt werden. Während die Patch-Pipette an die Zelle herangeführt wurde, befand sich ein positiver Druck auf der Pipette, so dass ein ständiger Ausfluss der Pipettenlösung aus der Pipettenspitze gewährleistet war. Auf diese Weise wurde Zelltrümmer weggespült und die Spitze der Pipette konnte verschmutzungsfrei auf der Zelloberfläche platziert werden. Es wurde in allen Experimenten der *whole-cell* Modus der Patch-Clamp-Technik verwendet (Hamill et al., 1981). Die Signale wurden mit 3 kHz (Bessel-Filter) gefiltert und mit einer Aufnahmerate von 10 kHz gespeichert. Als Aufnahme- und Analysemedium diente ein konventioneller PC. Zur digitalen Konvertierung der analogen Signale wurde ein 16 Bit AD-Wandler (Digidata 1322A, Axon Instruments, Foster City, CA) verwendet. Die Aufnahme und Analyse der erhaltenen Messdaten wurde mit dem pClamp 9.2 Softwarepaket (Axon Instruments, Foster City, CA) ausgeführt. Zur Darstellung von Strom-Spannungs-Mustern von Astrozyten wurde ein Protokoll verwendet, das aus 23 Spannungssprüngen mit einer Dauer von 200 ms pro angelegter Spannung bestand. Zur elektrophysiologischen Charakterisierung wurden die Zellen jeweils ausgehend vom Haltepotential (-80 mV) auf Potentiale von -160 mV bis +60 mV hyper- bzw. depolarisiert (10 mV Schritte) (Abb. 2-5).

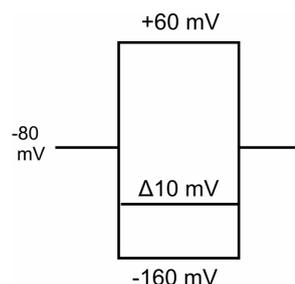


Abb.2-5 Schematische Darstellung des Spannungsprotokolls zur Aufnahme von Strom-Spannungs-Mustern bei Astrozyten.

2.2.6 Feldpotentialableitung respiratorischer Aktivität

In einer Schnittpräparation mit Schnittdicken von 650 μm - 750 μm , lässt sich das respiratorische Netzwerk postnataler Mäuse (P0-P8) in einer aktiven und für mehrere Stunden vitalen Form für *in vitro* Experimente isolieren (Rhythmischer Schnitt siehe Abschnitt 2.2.1; Ramirez et al. 1996; Smith et al. 1991). Dazu wurde der Gewebeschnitt nach der Präparation in eine Messkammer überführt und mit Hilfe eines mit Nylonfäden bespannten U-förmig gebogenen Platindrahtes fixiert. Zur Reaktivierung des Rhythmusgenerators war es notwendig die extrazelluläre Kaliumkonzentration schrittweise auf 8 mM zu erhöhen um eine allgemeine Depolarisation der Neurone zu erreichen. Um die Aktivität des Netzwerkes darzustellen wurde das rhythmische Signal elektrisch mit Hilfe einer extrazellulären Feldpotentialelektrode von der Schnittoberfläche abgeleitet. Die Elektrode wurde dabei direkt auf die Geweberegion des Prä-Bötzinger-Komplexes platziert. Durch Anlegen eines leichten Unterdruckes, konnten die Ableitbedingungen an der Elektrodenspitze verbessert werden. Über einen Vorverstärker wurde das Signal an einen Extrazellulärverstärker (Institutseigene Elektrowerkstatt) weitergegeben und mit einem 0,25 - 1,5 kHz Bandpassfilter gefiltert. Das 5000 bis 10000fach verstärkte Signal wurde mit einem A/D Wandler (MiniDigi 1A, Axon Instruments, Foster City, CA) mit einer Aufnahmezeit von 1 kHz digitalisiert und mit Hilfe der Software Axoscope 9.2 (Axon Instruments, Foster City, CA) aufgezeichnet. Über einen zusätzlich angeschlossenen Integrator (Paynter Filter; Zeitkonstante 50-100 ms; Institutseigene Herstellung) ließ sich das gemessene rhythmische Rohsignal deutlicher darstellen.

2.2.7 Immunhistochemische Methoden

2.2.7.1 Fixierung von Gewebe durch intrakardiale Perfusion

Für die immunhistochemische Analyse von transgen markierten Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe wurde die Mauslinie TgN (hGFAP-EGFP) benutzt. Nach tödlicher Inhalationsanästhesierung mit Diethyläther (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden der neonatalen Maus (P4 bis P8) der Thorax geöffnet und das Herz freipräpariert. In den linken Herzventrikel wurde eine Infusionskanüle (Valu-Set 0,5 x 13 mm, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) eingeführt und ein Schnitt in den rechten Vorhof gesetzt. Das Ausspülen des

Blutes über die Kanüle mit ca. 20 ml Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) erfolgte mit Hilfe einer Rollenpumpe (505S, Watson-Marlow Wilmington, MA). Anschließend wurde das Tier mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in Natriumphosphatpuffer (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) über ca. 5 min fixiert. Das perfundierte Gehirn wurde herauspräpariert und über Nacht in der Fixationslösung bei 4°C nachfixiert. Kurzfristige Lagerungen des Gewebes bis zu einer Woche fanden in PBS mit 0,01% (w/v) NaN_3 statt.

2.2.7.2 Anfertigung von Vibratomschnitten von fixiertem Gewebe

Der perfusionsfixierte Hirnstamm wurde in eine mit PBS gefüllte Perischale überführt und vom restlichen Hirngewebe getrennt. Die Arbeitsschritte zur Gewinnung der Schnitte erfolgte wie in Abschnitt 2.2.1 angegeben, wobei die Schnittdicke 40 bis 50 μm betrug. Der Prozess des Schneidens am Vibratom (Leica VT1000S) erfolgte ebenfalls in PBS. Die gewonnenen Schnitte wurden zur weiteren immunhistochemischen Bearbeitung in eine 24-well-Zellkulturplatte überführt. Dies hatte den Vorteil, dass die Serienschritte für eine spätere immunhistochemische Analyse in einer überschaubaren rostro-caudalen Reihenfolge blieben.

2.2.7.3 Immunhistochemische Analyse von Vibratomschnitten

Die Serienschritte des perfusionsfixierten Hirnstammes wurden insgesamt zwei mal für fünf Minuten in PBS gewaschen, bevor sie für 30 min in 0,4% Triton-X100/PBS permeabilisiert und anschließend für weitere 30 min in Blockierungslösung inkubiert wurden. Darauf folgend fand die Inkubation mit dem in 1% Serum, 0,05% Triton-X100/PBS verdünnten primären Antikörper bei 4°C über Nacht statt (Tab.2-4). Nachdem drei mal für fünf Minuten in PBS gewaschen wurde, erfolgte eine Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur in 1,5% Serum/PBS verdünnter sekundären Antikörper Lösung. Abschließend wurden die Schnitte drei mal für 10 min in PBS gewaschen und darauf folgend mit Hilfe eines Pinsels auf Objektträger aufgezogen und mit Fluomount (Dako Industries, Carpinteria, CA) eingedeckelt. Es wurde eine Negativ-Kontrolle gegen eine mögliche unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers mitgeführt. Hierbei wurde anstatt des Primärantikörpers nur das antikörperspezifische Trägermedium zur Inkubation benutzt. Der sekundäre Antikörper war mit einem Fluochrom (Cy3)

konjugiert. Die optische Analyse der gefärbten Schnitte erfolgte deshalb mit einem Konfokalen Laserscan Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen).

2.2.8 Zellkultur

2.2.8.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden auf 100 mm Zellkulturschalen (Nunc, Wiesbaden) in einem Zellkulturinkubator (Labotect, Göttingen) mit 5% CO₂ (v/v) Atmosphäre und annähernd 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Nährmedium für CHO Zellen wurde Ham's F12 (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% FKS und 0,5% Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet. Die Kultivierung von COS-7 Zellen fand in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Gibco-Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% FKS und 0,5% Penicillin-Streptomycin statt. Das Passagieren der Zellen erfolgte zwei bis drei mal pro Woche durch Ablösen der Zellen mit 1 ml Trypsin- EDTA (0,5% Trypsin / 0,5% EDTA in PBS). Durch die anschließende Zugabe von D-MEM mit 10% FCS wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen konnten 1:6 bis 1:12 verdünnt ausplattiert werden. Sollten die Zellen für spätere Experimente verwendet werden, so wurden diese auf sterilen Glasplättchen (Menzel, Braunschweig) in *four-well*-Zellkulturplatten ausgesät. Beide Zelllinien wurden maximal bis zur 30. Passage benutzt.

2.2.8.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien

Die Kryokonservierung diente der längerfristigen Lagerung von Zelllinien. Es wurde dabei wie folgt vorgegangen. Die bis zu einer Konfluenz von 80-90% gewachsenen Zellen wurden mit Hilfe von 1 ml Trypsin-EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und in 10 ml Vollmedium resuspendiert. Die Zellsuspension von insgesamt sechs Kulturschalen wurde anschließend in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und bei 4°C für 5 min bei 1500 U min⁻¹ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gesamte Zellpellet in 10 ml Einfriermedium (90% FKS, 10% DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde danach in mit einem Schraubverschluss versehene Kryoröhrchen aliquotiert und für 2 h bei -18°C und anschließend für 24 h bei -80°C eingefroren. Die endgültige Lagerung erfolgte im Anschluss in flüssigen Stickstoff bei -196°C.

Um kryokonservierte Zellen zu revitalisieren wurden das Kryoröhrchen nach der Entnahme aus dem Stickstoffbehälter in einem 37°C Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 10 ml Falkonröhrchen mit dem 5-fachen Volumen des Zelllinienspezifischen Nährmediums aufgefüllt und bei 4°C für 5 min bei 1500 U min⁻¹ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gesamte Zellpellet in 10 ml Vollmedium resuspendiert und anschließend in Zellkulturplatten ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um Zellen die den Auftauprozess nicht überlebt haben zu entfernen.

2.2.8.3 Transiente Transfektion mit Lipofectamin

Bei dieser Methode wird DNA mit Hilfe des Transfektionsreagenz *Lipofectamin 2000* (Invitrogen, Karlsruhe) in eukaryontische Zellen eingebracht. Lipofectamin bildet dabei mit der Plasmid-DNA spontan einen Lipidkomplex, dieser verschmilzt anschließend mit der Zellmembran und das Plasmid kann in das Cytosol abgegeben werden. Es wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Die Zellen wurden auf sterile Deckgläschen in einer vier-*well*-Zellkulturplatte ausgesät und solange im Inkubator kultiviert bis die gewünschte Zelldichte (80-90% Konfluenz) erreicht war. Anschließend wurde das Nährmedium durch ein antibiotikafreies Medium ausgetauscht, um die pharmakologische Belastung für die Zellen während der Transfektion so gering wie möglich zu halten. Für die Lipofektion war das Vorbereiten der Transfektionslösung nötig. Hierfür wurden 1 µg DNA auf 50 µl Optimem (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe) gegeben. In einem zweiten Ansatz wurden 2 µl Lipofectamin in 50 µl Optimem gelöst und nach ca. 5 min mit dem ersten Ansatz vermischt. Nach anschließendem vorsichtigem vortexen wurde die Lösung für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die Liposomen-DNA-Komplexe bilden können. Danach wurden die zu transfizierenden Zellen mit dem Transfektionsansatz überschichtet und für 4 h im Inkubator (5% CO₂, 37°C) belassen. Im Anschluss wurden die Zellen mit frischem Vollmedium zweimal gewaschen und für weitere 24 h kultiviert, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

2.2.9 Software zur Aufnahme und Analyse der Messdaten

Für die Aufnahme, Speicherung, Analyse und Darstellung von Daten wurde folgende Software verwendet:

Für Calcium Imaging Experimente wurde Imaging Workbench 5.2 (INDEC Biosystems, Santa Clara, CA) und ImSpector 3.2 (LaVision Biotec, Bielefeld) benutzt. Für elektrophysiologische Experimente wurden Axoscope 9.2 (Axon Instruments Inc., Burlingame, CA), pCLAMP 9.2 (Axon Instruments Inc., Burlingame, CA) und Clampfit 9.2 (Axon Instruments Inc., Burlingame, CA) verwendet. Die statistische Analyse und grafische Darstellung der Daten fand mit Sigmaplot 9 und Sigmastat 3.1 (Systat Software Inc., San Jose, CA), MS Excel 2003 (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim) sowie Corel Draw X3 (Corel Coporation, Ottawa) und ImageJ (NIH, Bethesda, MD; Internetadresse: <http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/imagej>) statt.

2.2.10 Auswertung der Messdaten

Die Messdaten sind wenn nicht anders angegeben als Mittelwert (m) \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Zur Ermittlung statistischer Signifikanzen wurde der paired t-test, Mann-Whitney-Rank-Sum oder Kruskal-Wallis one-way ANOVA Test mit Hilfe der Software Sigmastat 3.1 durchgeführt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p < 0,05$) wurden die Unterschiede in den verglichenen Mittelwerten als statistisch signifikant angesehen und in den Abbildungen bzw. Tabellen mit einem Stern (*) markiert. Die Auswertung von gemessenen Calciumsignalen erfolgte u.a. mit der Software Clampfit 9.2. Es wurde eine manuelle *Baseline* Korrektur durchgeführt und anschließend eine semi-automatische *Event-Detection* um Ca^{2+} Signale erfassen zu können und deren Parameter (*half-width*, Dauer, maximale Amplitude) zu bestimmen.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Astrozyten mittels zwei prinzipiell unterschiedlichen Methoden identifiziert. Zum einen wurden transgene Mauslinien verwendet, in denen Astrozyten unter der Kontrolle des astrozytenspezifischen GFAP (*glial fibrillary acid protein*) Promotors fluoreszente Proteine exprimierten. Zum anderen wurden Astrozyten durch ihre bei Absenkung der extrazellulären K^+ -Konzentration auftretenden Ca^{2+} -Signale identifiziert. Dieses Phänomen konnte bisher nur an kultivierten Cerebellum-Astrozyten und an akuten hippocampalen Hirnschnittpräparaten aus Ratten beobachtet werden (Dallwig et al. 2000). Zunächst wurde getestet, ob diese Methode für die Experimentalumgebung der vorliegende Studie verwendet werden kann. Dazu wurden akute Hirnschnittpräparate aus dem Stammhirn von transgenen Mauslinien mit einem membrangängigen Calciumindikator beladen und anschließend eine modifizierte ACSF Lösung, in der die Kaliumkonzentration von 3 mM auf 0,2 mM erniedrigt ist (im folgenden niedrig- $[K^+]_e$ genannt), appliziert.

3.1 Ca^{2+} -Signale induziert durch Absenken des extrazellulären K^+ in Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe

Astrozyten der Mauslinie TgN(hGFAP-EGFP) exprimieren das im grünen Bereich des Spektrums fluoreszierende *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) unter der Kontrolle des GFAP Promotors (Nolte et al. 2001). Um in diesen Zellen Calciumkonzentrationsänderungen messen zu können, wurde der im langwelligen Bereich des Lichtspektrums emittierende Calciumsensor CalciumOrange-AM in die Zellen eingebracht (Abb. 3-1, A-C). Über die beschriebene *bulk-loading* Methode konnten $91,7 \pm 11,8$ % ($n=5$) der TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten pro Schnitt angefärbt werden. Die Applikation der niedrig $[K^+]_e$ Lösung evozierte in $85,0 \pm 22,4$ % ($n=5$) der gefärbten TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten ein Calciumsignal (Abb. 3-1, A-C).

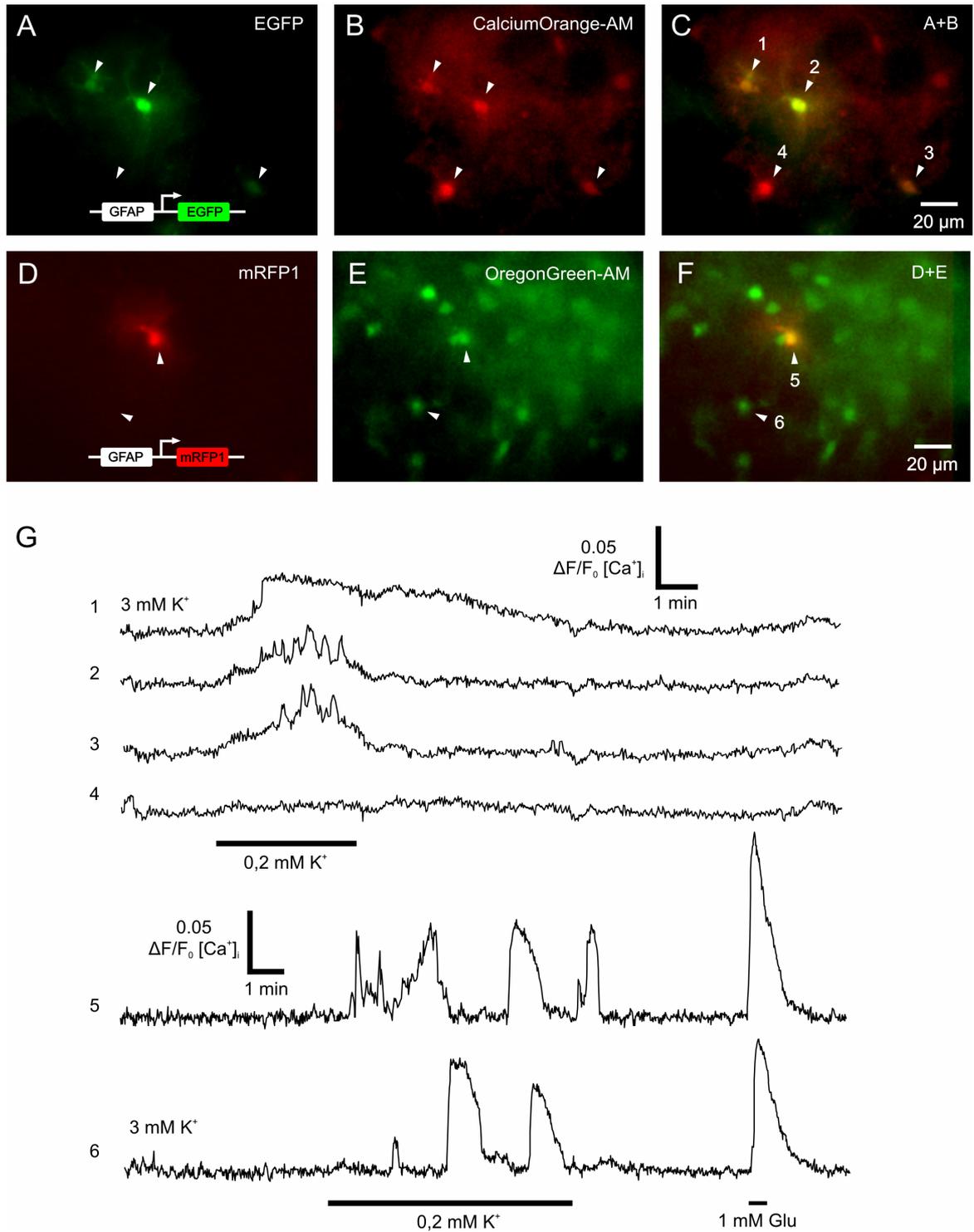


Abb.3-1 Niedrig $[K^+]_e$ induzierte Calciumsignale in transgen markierten Astrozyten der VRG. **A-F:** Fluoreszenzaufnahmen von CalciumOrange-AM beladenen TgN(hGFAP-EGFP) und OregonGreen-AM beladenen TgN (hGFAP-mRFP1) akuten Stammhirnschnitten. **G:** Mit CalciumOrange bzw. OregonGreen gemessene Calciumtransienten aus EGFP exprimierenden Astrozyten (1-3) und aus einem mRFP1 exprimierenden Astrozyten (5). Beispielhaft sind nicht transgen markierten Zelle gezeigt, die eine Ca^{2+} -Antwort (6) bzw. keine Reaktion auf das Absenken des extrazellulären K^+ zeigen.

Calcium Orange AM besitzt einen geringen dynamischen Bereich ($F_{Ca}/F_{free} \approx 3$; Haugland, 2005). Messungen mit diesem Farbstoff besitzen somit ein ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis. Die cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration in Gliazellen variiert in Ruhe zwischen 30 und 200 nM (Verkhatsky et al., 1998). Da die apparente Bindungskonstante (*in situ*) von Calcium Orange (1100 ± 400 nM) über diesem Wert liegt (Thomas et al., 2000), können Ca^{2+} Konzentrationsänderungen die unter $1 \mu M$ bleiben, nicht detektiert werden. Da z.B. Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (im folgenden mit OregonGreen-AM bezeichnet) günstigere Eigenschaften bietet ($F_{Ca}/F_{free} \approx 14$; Haugland, 2005) und auch die apparente Bindungskonstante (430 ± 80 nM) deutlich näher an der cytoplasmatisch Ca^{2+} Konzentration von Gliazellen liegt (Thomas et al., 2000), wurde eine andere im späteren Verlauf der Studie zur Verfügung stehende transgene Mauslinie für Ca^{2+} -Messungen verwendet, in der es möglich war OregonGreen-AM als Calciumindikator zu benutzen.

In der Mauslinie TgN (hGFAP-mRFP1) exprimieren Astrozyten das im roten Bereich des Spektrums fluoreszierende Protein mRFP1 (*monomeric red fluorescent protein*; Hirrlinger et al., 2005). Über die beschriebene *bulk-loading* Methode konnten $60,6 \pm 22,5$ % ($n=9$) der TgN (hGFAP-mRFP1) Astrozyten pro Schnitt angefärbt werden. Die Applikation der niedrig- $[K^+]_e$ Lösung führte in $91,2\% \pm 10,1\%$ ($n=84$ Zellen, 12 Schnitte) der gefärbten mRFP-Astrozyten zu einem Ca^{2+} Signal (Abb.3-1, D-F).

3.2 In Neuronen fehlt das niedrig- $[K^+]_e$ induzierte Ca^{2+} -Signal

Um auszuschließen, dass im Hirnstamm der Maus neben Astrozyten auch Neurone auf ein Absenken des extrazellulären Kaliums mit einem Calciumsignal reagieren, wurden Kontrollmessungen an transgen markierten Nervenzellen durchgeführt. In der Mauslinie TgN(Thy1.2-EYFP) exprimieren Neurone unter einem im ZNS neuronal spezifischen Promotor Thy1.2 (Caroni, 1997) das gelb fluoreszierende Protein EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*; Feng et al., 2000). In diesem Mausmodell wurde der Farbstoff Fura-2 zum Messen von intrazellulären Calciumänderungen verwendet. Über die *bulk-loading* Methode konnten $73,3 \pm 46,2$ % ($n=4$) der TgN(Thy1.2-EYFP)

Neurone pro Schnitt angefärbt werden. Calciummessungen in diesem Mausmodell ergaben, dass in keinem der gefärbten EYFP exprimierenden Neuron die intrazelluläre Calciumkonzentration während der Applikation von niedrig-[K⁺]_e anstieg (n=23 Neurone, 4 Schnitte). Die Abbildung 3-2 zeigt Calciummessungen in akuten TgN(Thy1.2-EYFP) Stammhirnschnitten.

3.3 Auch in Oligodendrozyten fehlt das niedrig-[K⁺]_e induzierte Ca²⁺-Signal

Neben den Astrozyten wurde eine zweite Gruppe von Gliazellen auf das niedrig-[K⁺]_e induzierte Ca²⁺ Signal untersucht. Oligodendrozyten exprimieren in der transgenen Mauslinie TgN(PLP-DsRed1) unter der Kontrolle des murinen PLP Promotors das im roten Bereich des Spektrums fluoreszierende Protein DsRed1 (Hirrlinger et al., 2005). OregonGreen-AM färbte über die *bulk-loading* Methode 54,7 ± 42,0 % der TgN(PLP-DsRed1) Oligodendrozyten pro Schnitt an. Calciummessungen an akuten Hirnstammschnitten dieser Mauslinie zeigten, dass die gefärbten Oligodendrozyten keine Ca²⁺-Konzentrationsänderung während der Applikation von niedrig-[K⁺]_e aufweisen (n=26 Zellen aus n=9 Schnitten; P6 - P11; Abb. 3-3).

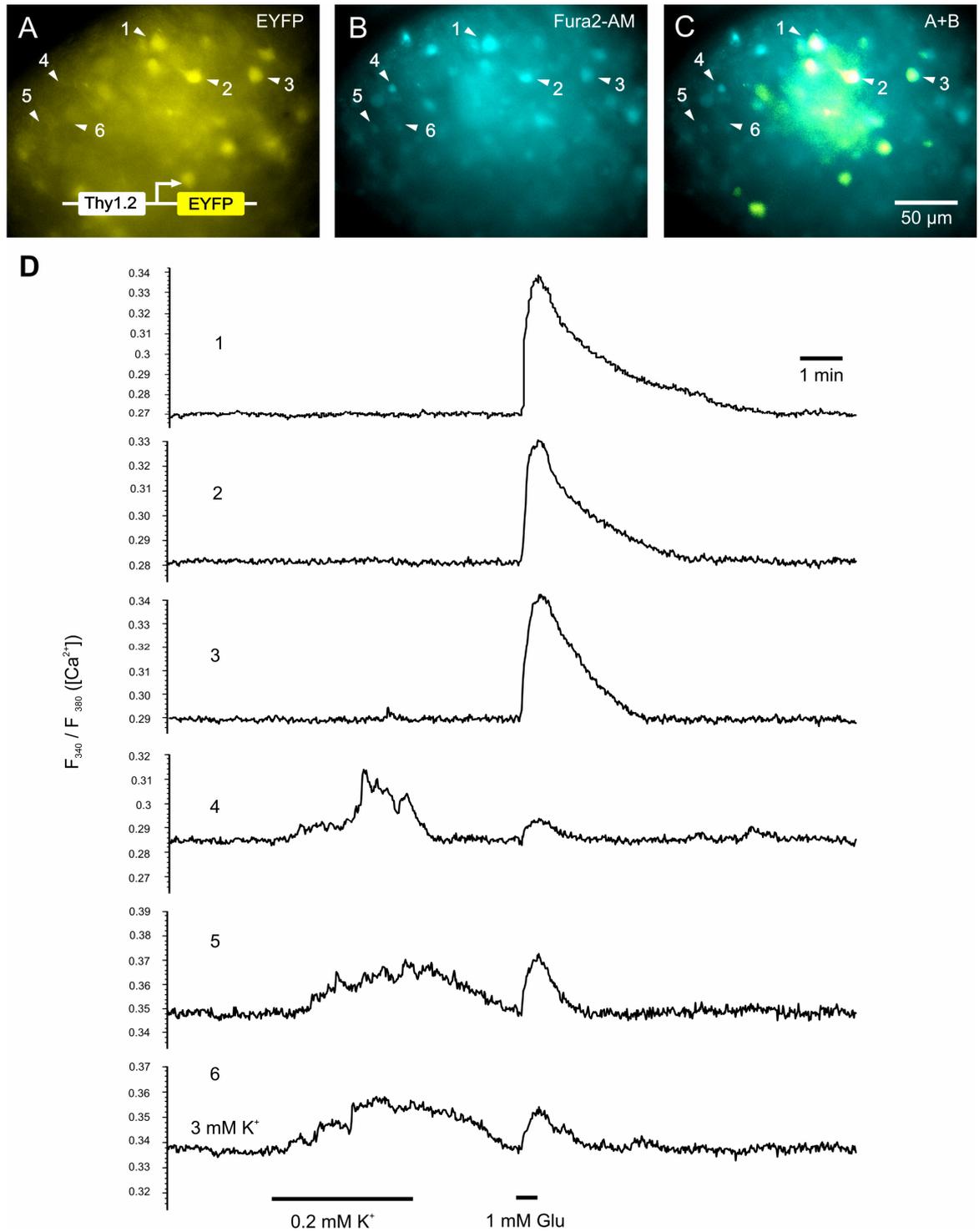


Abb.3-2 Calciummessungen in akuten TgN(Thy1.2-EYFP) Hirnschnitten.
A-C: Fluoreszenzaufnahmen von Fura-2 AM beladenen TgN(Thy1.2-EYFP) akuten Stammhirnschnitten. **D:** Gegenübergestellt sind mit Fura-2 AM gefärbte EYFP markierte Neurone (1-3) die während der Applikation der niedrig- $[\text{K}^+]_e$ Lösung keinen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aufweisen und nicht transgen markierte Zellen (4-6) die auf die Absenkung des $[\text{K}^+]_e$ mit Ca^{2+} Transienten antworten.

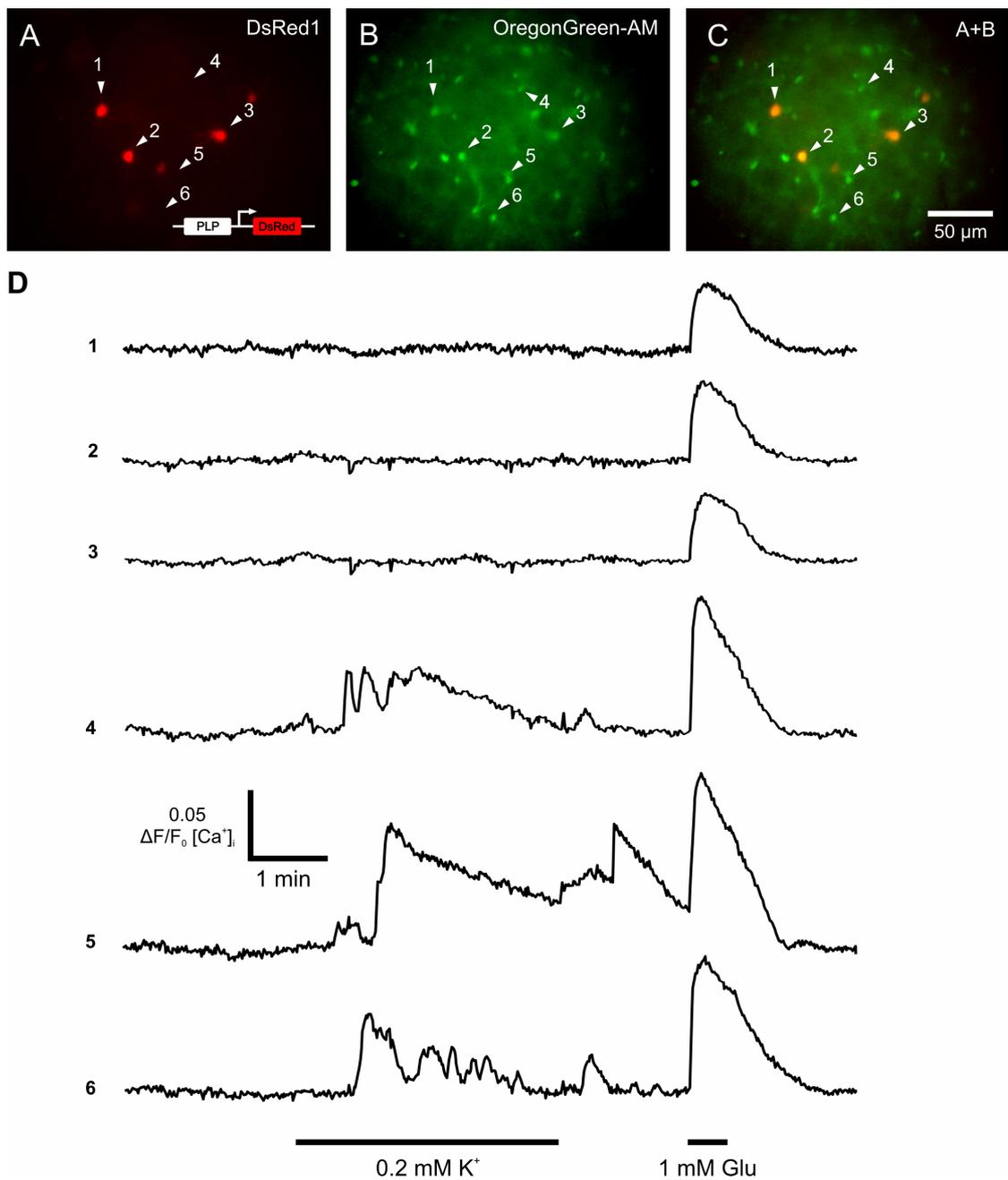


Abb.3-3 Calciummessungen in akuten TgN(PLP-DsRed1) Hirnschnitten.

A-C: Fluoreszenzaufnahmen von OregonGreen-AM beladenen TgN(PLP-DsRed1) akuten Stammhirnschnitten. **D:** Vergleichende Darstellung von mit OregonGreen-AM gemessene Calciumkonzentrationsänderungen in transgen und nicht transgen markierten Zellen. Die DsRed1 exprimierenden Oligodendrozyten (1-3) zeigen keine Reaktion auf die Applikation der niedrig-[K⁺]_e Lösung. Im Vergleich dazu zeigen nicht transgen markierten Zellen (4-6) Calciumoszillationen auf das Absenken des [K⁺]_e.

3.4 Beteiligung des Kir4.1 Kanals am niedrig-[K⁺]_e induzierten Ca²⁺-Signal

Das Erniedrigen der extrazellulären Kaliumkonzentration unter 1 mM induziert Calcium Transienten in Astrozyten. Da die Ca²⁺-Signale durch extrazelluläres Barium geblockt werden können, wurde die Hypothese aufgestellt, dass einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (Kir-Kanäle) an dieser Art des Calcium-Influges beteiligt sind (Dallwig et al., 2000).

Im respiratorischen Netzwerk exprimieren Astrozyten hauptsächlich den schwach einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal Kir4.1 (KCNJ10). Diesem Kanal wird eine wichtige Rolle bei der extrazellulären Kaliumregulation zugeschrieben (Neusch et al., 2006). Um zu klären, ob der Kir4.1-Kanal an dem niedrig-[K⁺]_e Calcium-influx beteiligt ist, wurden Ca²⁺-Imaging-Experimente an akuten Hirnschnitten und transfizierten Zellkulturen durchgeführt.

3.4.1 Die niedrig-[K⁺]_e induzierten Ca²⁺-Antworten sind in Kir4.1^{-/-}-Astrozyten reduziert

Es wurden niedrig-[K⁺]_e induzierte Ca²⁺ Antworten in Kir4.1^{-/-} Mäusen mit denen von Wildtyp Mäusen (*littermates*) verglichen (Abb.3-4). Um zu untersuchen ob der Kir4.1-Kanal an der Entstehung des Signals beteiligt ist, wurden die Anzahl der Zellen bestimmt, die auf die Applikation der niedrig-[K⁺]_e Lösung reagieren. In Hirnstammschnitten (ventrale respiratorische Gruppe) von Wildtyp Mäusen antworteten 64,2 ± 11,6 % der mit OregonGreen-AM gefärbten Zellen (n=50 Zellen, 3 Schnitte). Da OregonGreen-AM neben Astrozyten auch Neurone und Oligodendrozyten anfärbt repräsentiert dieser Wert somit einen sehr gut den prozentualen Anteil der Astrozyten im analysierten Gesichtsfeld (vgl. Abb. 2-4). Im Gegensatz dazu blieben die niedrig-[K⁺]_e induzierten Antworten in Hirnschnitten der Kir4.1^{-/-} Maus fast vollständig aus. Nur 7,5 ± 2,4 % aller gefärbten Zellen antworteten mit einem Ca²⁺-Signal (n=24 Zellen, 14 Schnitte). Die Anzahl der gefärbten Zellen im analysierten Gesichtsfeld war mit 31 ± 4 in den WT und

26 ± 1 in den Kir4.1^{-/-} Schnitten annähernd gleich (n.s.). Zellen, welche Spontanaktivität vor der Applikation der niedrig-[K⁺]_e Lösung zeigten (8,1 ± 6,1 % in Kir^{-/-} versus 15,8 ± 8,8 % in WT, n.s.), wurden nicht in die folgende Auswertung miteinbezogen.

Zusätzlich zu dieser signifikanten Reduktion der antwortenden Zellen in den Kir4.1^{-/-}-Schnitten, konnte eine Änderung in der Form der verbliebenen Ca²⁺-Signale beobachtet werden. Die Ca²⁺-Signale in reagierenden Kir4.1^{-/-}-Zellen waren signifikant kleiner und kürzer verglichen mit denen in WT Mäusen. Gelegentlich war nur ein einzelner kurzer Transient zu beobachten (Abb. 3-4, E und G). Die Gesamtdauer der Ca²⁺-Signale war im Vergleich zu WT Zellen (135,0 ± 10,8 s) in Kir4.1^{-/-}-Zellen (76,6 ± 11,5 s; p<0,001) signifikant reduziert. Die Dauer an der halb-maximalen Amplitude (*half-width*) der Ca²⁺-Signale (größter Peak bei einer Oszillation) in Kir4.1^{-/-} -Zellen (10,0 ± 4,1 s) war signifikant kürzer im Vergleich zu WT Zellen (26,0 ± 4,2 s; p<0,001). Daraus folgend war auch die Fläche unter der Kurve ($\Delta F/F_0$ s) als Maß für den Gesamt Ca²⁺-Influx in den antwortenden Zellen signifikant reduziert von 2,47 ± 0,42 $\Delta F/F_0$ s in Zellen von WT Mäusen zu 1,42 ± 0,41 $\Delta F/F_0$ s in Kir4.1^{-/-}-Zellen (p<0,05). Die Latenz bis zum ersten intrazellulären Ca²⁺-Anstieg nach Absenken des [K⁺]_e war jedoch nicht signifikant unterschiedlich (p>0,2). In WT Schnitten betrug sie 61,5 ± 6,8 s gegenüber 78,4 ± 11,1 s in Kir4.1^{-/-}-Schnitten. Die maximale Amplitude des Ca²⁺-Signals in Kir4.1^{-/-} (0,05 ± 0,01 $\Delta F/F_0$) war ebenfalls nicht signifikant verschieden im Vergleich zu WT Zellen (0,04 ± 0,03 $\Delta F/F_0$; p>0,4).

Um einen eventuellen Gen-Dosis Effekt zu detektieren, wurden zusätzlich auch die Messungen der heterozygoten Tieren analysiert und mit den Ca²⁺-Antworten in Wildtyp und Kir4.1^{-/-} verglichen. Die statistische Analyse zeigte, dass die meisten der untersuchten Parameter in den heterozygoten Tieren keine Signifikanz im Vergleich zum Wildtyp aufwies (P>0,05; ANOVA). Allein bei der Betrachtung der Anzahl der antwortenden Zellen wurde eine Reduktion gegenüber dem Wildtyp gefunden (P<0,05; t-test) (Abb. 3-5; Tabelle 1-1).

Um zu prüfen, ob diese Beteiligung des Kir4.1 Kanals am Ca^{2+} -Signal auch in anderen Hirnregionen existiert, wurden zusätzliche Experimente an Cortex- und Hippocampusschnitten durchgeführt. Ähnlich der Ca^{2+} -Antworten in der ventralen respiratorischen Gruppe im Hirnstamm, war auch in Kir4.1^{-/-} Schnittpräparaten vom Cerebralen Cortex und Hippocampus die Anzahl der Zellen die auf niedrig- $[\text{K}^+]_e$ reagierten deutlich reduziert. In Corticalen Schnitten konnte in nur $2,7 \pm 0,9$ % der Zellen aus Kir4.1^{-/-} eine Antwort detektiert werden (n=11 Schnitte, WT: $57,2 \pm 3,3$ %: n=4 Schnitte, Tab.1). Alle anderen Parameter der niedrig- $[\text{K}^+]_e$ induzierten Ca^{2+} -Antworten die im Hirnstamm analysiert wurden, waren auch im Cortex in Kir4.1^{-/-}-Schnitten signifikant reduziert (Tab.3-1).

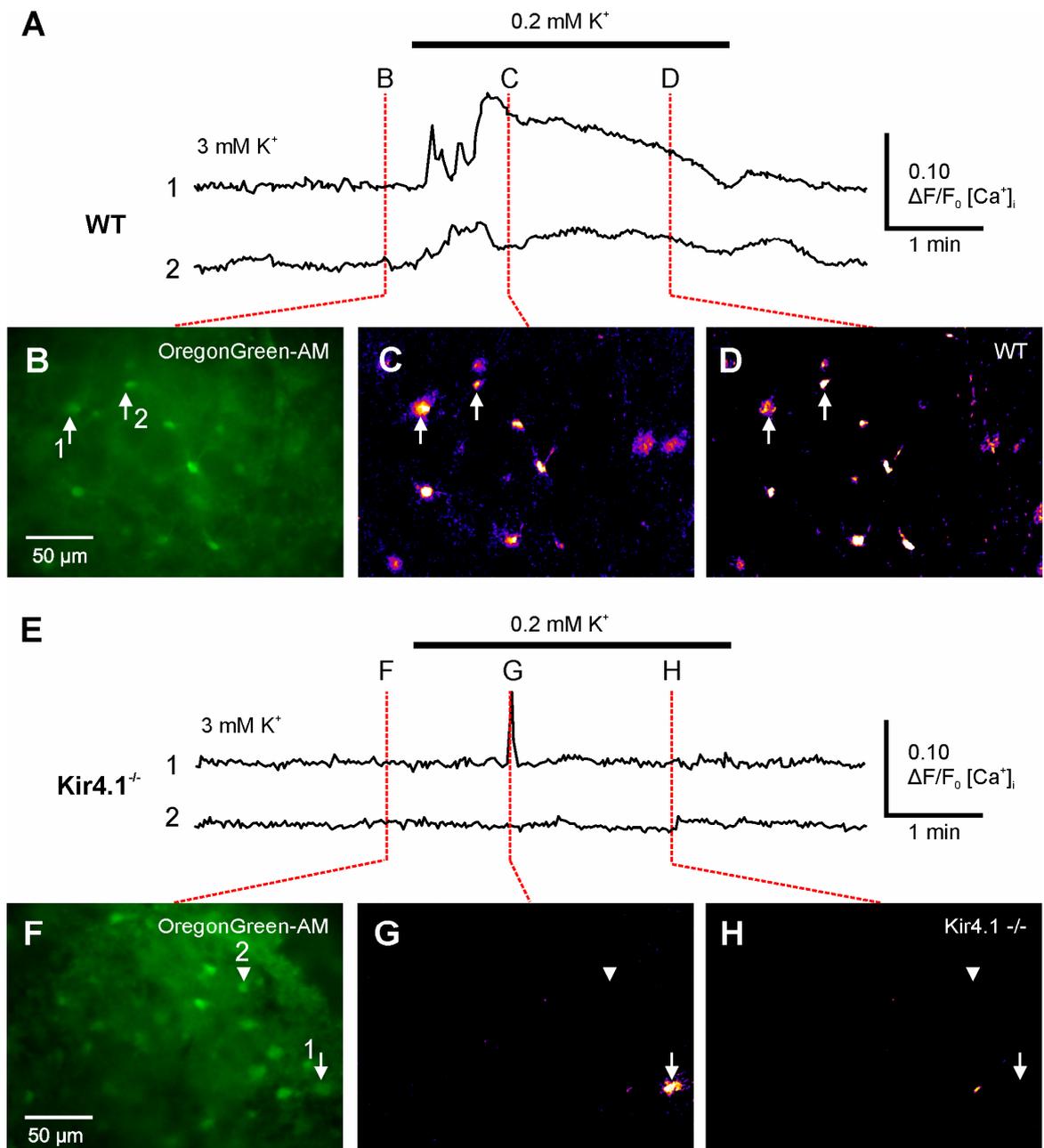


Abb. 3-4 Gegenüberstellung von niedrig- $[K^+]_e$ induzierten Calciumsignalen in akuten Hirnschnitten einer Wildtyp- (A-D) und einer Kir4.1^{-/-}-Maus (E-H). Mit OregonGreen-AM gemessene Calciumkonzentrationsänderungen in je zwei Zellen aus einer WT Maus (A) dargestellt in (B-D) und einer Kir4.1^{-/-}-Maus (E) dargestellt in (F-H). B,F: OregonGreen-AM Baseline-Fluoreszenzbild (= F_0) aufgenommen vor der Applikation der niedrig- $[K^+]_e$ Lösung. C,D,G,H: Die Bilder zeigen die Fluoreszenzintensitätsänderungen F/F_0 des Calciumindikators zu verschiedenen Zeitpunkten während und nach der Applikation von niedrig- $[K^+]_e$.

Im Hippocampus können häufig spontane Ca^{2+} -Oszillationen beobachtet werden (siehe auch Zur Nieden 2004). Auch in der Gegenwart von 500 nM TTX wurden in WT Schnitten noch in $20,0 \pm 4,4\%$ der Zellen spontane Ca^{2+} -Oszillationen beobachtet. In Kir4.1^{-/-}-Schnitten waren es $17,8 \pm 4,2\%$ der gefärbten Zellen die spontan aktiv sind (n.s.). Der Anteil der Zellen die auf die Applikation von niedrig- $[\text{K}^+]_e$ in WT Schnitten antworteten war im Vergleich zu den anderen untersuchten Hirnregionen ähnlich ($61,2 \pm 2,9\%$, n=12 Schnitte).

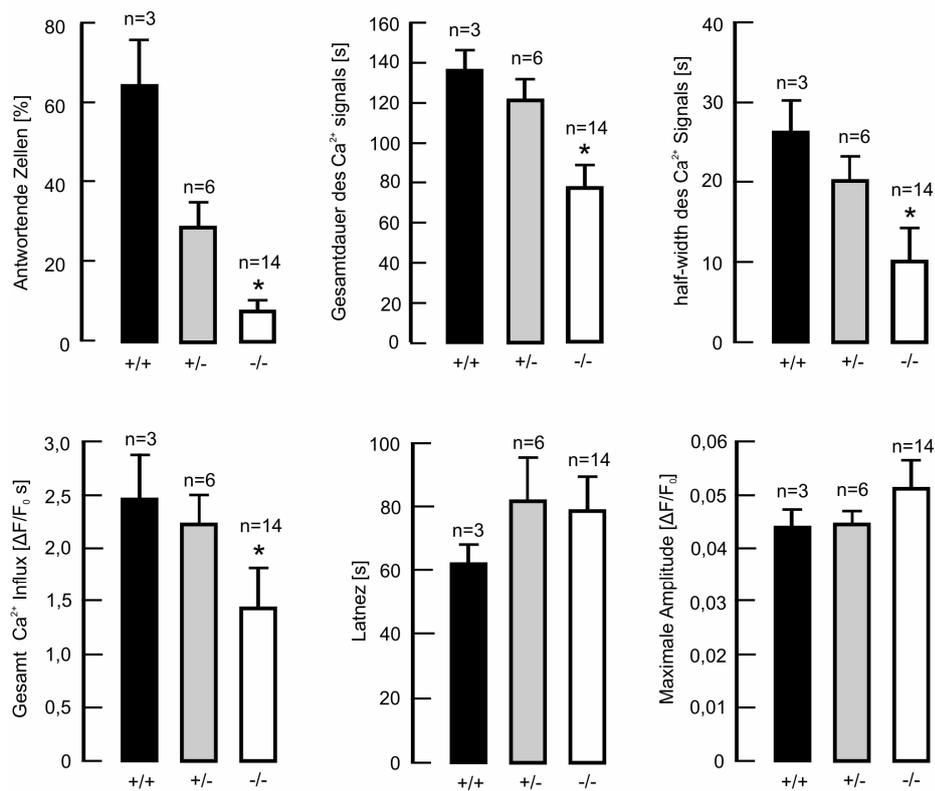


Abb. 3-5 Statistische Analyse des niedrig $[\text{K}^+]_e$ induzierten Ca^{2+} Signals in wildtyp (+/+), heterozygoten (+/-) und Kir4.1^{-/-} (-/-) Hirnstammschnitten.
* $p < 0,05$; die Daten sind als Mittelwert \pm SE dargestellt.

Betrachtet man die Antworten in Kir4.1^{-/-}-Schnitten, so war auch hier wieder eine deutliche Reduktion auf $3,2 \pm 1,0\%$ (n=23 Schnitte; $p < 0,001$) zu beobachten. Die Änderungen in den Antwortmustern der Ca^{2+} -Signale unterschieden sich nicht im Vergleich zu den anderen untersuchten Hirnregionen und sind in einer vergleichenden Übersicht in Tab.3-1 zusammengefasst.

Tab.3-1 Übersicht der gemessenen Parameter zu den niedrig-[K⁺]_e induzierten Ca²⁺-Antworten in akuten Hirnstamm-, Hippocampus- (CA1) und Cortexschnitten.

	Hirnstamm			Hippocampus		Cortex	
	WT	HZ	Kir4.1 ^{-/-}	WT	Kir4.1 ^{-/-}	WT	Kir4.1 ^{-/-}
Gesamtanzahl der gefärbten Zellen im Gesichtsfeld	31 ± 4 (n=3) ^a	27 ± 4 (n=6) ^a	26 ± 1 (n=14) ^a	34 ± 2 (n=12) ^a	29 ± 1 (n=23) ^a	21 ± 5 (n=4) ^a	25 ± 4 (n=11) ^a
Zellen (pro Schnitt) die auf 0,2 mM [K ⁺] _e antworten [%]	64,2 ± 11,6 (n=3) ^a	27,8 ± 7,0 (n=6) ^a	7,5 ± 2,4* (n=14) ^a	61,2 ± 2,9 (n=12) ^a	3,2 ± 1,0* (n=23) ^a	57,2 ± 3,3 (n=4) ^a	2,7 ± 0,9* (n=11) ^a
Half-width (größter Peak) [s]	26,0 ± 4,2 (n=50) ^b	19,9 ± 3,6 (n=26) ^b	10,0 ± 4,1* (n=24) ^b	29,4 ± 2,0 (n=194) ^b	10,5 ± 2,6* (n=15) ^b	41,6 ± 4,3 (n=47) ^b	11,5 ± 4,9* (n=7) ^b
Gesamtdauer der Oszillationen [s]	135,0 ± 10,8 (n=50) ^b	119,7 ± 11,4 (n=26) ^b	76,6 ± 11,5* (n=24) ^b	114,9 ± 5,4 (n=194) ^b	43,7 ± 9,7* (n=15) ^b	132,3 ± 8,2 (n=47) ^b	37,7 ± 12,4* (n=7) ^b
Latenz [s]	61,5 ± 6,8 (n=50) ^b	81,1 ± 14,2 (n=26) ^b	78,4 ± 11,1 (n=24) ^b	68,8 ± 3,1 (n=194) ^b	89,2 ± 15,9 (n=15) ^b	74,1 ± 5,6 (n=47) ^b	58,1 ± 19,9 (n=7) ^b
Gesamt Ca ²⁺ Influx [ΔF/F ₀ s]	2,47 ± 0,42 (n=50) ^b	2,23 ± 0,29 (n=26) ^b	1,42 ± 0,41 (n=24) ^b	6,11 ± 0,47 (n=194) ^b	1,87 ± 0,53 (n=15) ^b	3,97 ± 0,43 (n=47) ^b	0,74 ± 0,24 (n=7) ^b
Maximale Amplitude [ΔF/F ₀]	0,04 ± 0,03 (n=50) ^b	0,04 ± 0,05 (n=26) ^b	0,05 ± 0,01 (n=24) ^b	0,11 ± 0,01 (n=194) ^b	0,16 ± 0,05 (n=15) ^b	0,06 ± 0,01 (n=47) ^b	0,08 ± 0,03 (n=7) ^b

Anm.: Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der gemessenen Schnitte (^a) bzw. Zellen (^b) an.
* p<0,05; Die Daten sind als Mittelwert ± SE dargestellt.

3.4.2 Die Calciumhomöostase in Kir4.1^{-/-}-Schnittpräparaten ist nicht gestört

In Kir4.1^{-/-}-Astrozyten ist das Ruhemembranpotential depolarisiert (Neusch et al. 2006). Weiterhin konnte in diesem Mausmodell nachgewiesen werden, dass Gliazellen im Rückenmark Apoptose aufwiesen (Neusch et al. 2001). Um auszuschließen, dass auf Grund dieser Beobachtungen in Kir4.1^{-/-}-Astrozyten die Calciumhomöostase gestört ist, wurde Glutamat als ein Teststimulus appliziert. Glutamat führte zu einem intrazelluläre Ca²⁺-Anstieg. Der Vorgang der zum Absenkens des [Ca²⁺]_i auf den Ruhewert führt, ist energieabhängig und wurde als Nachweis für einen funktionierenden Zellmetabolismus genutzt (Verkhatsky et al. 1998).

Glutamat induzierte Ca²⁺-Antworten in Zellen aus WT Hirnschnitten wurden mit denen aus Kir4.1^{-/-}-Schnitten verglichen. Die Applikation von 1 mM Glutamat führte in annähernd allen OregonGreen-AM gefärbten Zellen aus WT Hirnstammschnitten zu einem Ca²⁺-Signal (99,2 ± 1,5%; n=4 Schnitte). Verglichen mit den Antworten aus Kir4.1^{-/-}-Schnitten zeigte sich kein signifikanten Unterschied (99,2 ± 2,8% der Zellen; n=13 Schnitte). Betrachtet man die anderen untersuchten Hirnregionen, so konnte auch hier kein signifikanten Unterschied im Antwortverhalten festgestellt werden (Tab.3-2; Abb.3-6).

Tab. 3-2 Prozentualer Anteil gefärbten Zellen, die auf die Applikation von 1 mM Glutamat in WT und Kir4.1 KO Hirnschnittpräparaten antworten.

	WT	Kir 4.1 ^{-/-}
Hirnstamm	99,2 ± 1,5 (n=4)	99,2 ± 2,8 (n=13)
Cortex	100,0 ± 0,0 (n=4)	97,2 ± 7,1 (n=11)
Hippocampus (CA1)	100,0 ± 0,0 (n=12)	100,0 ± 0,0 (n=22)

Anm.: Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der gemessenen Schnitte an.

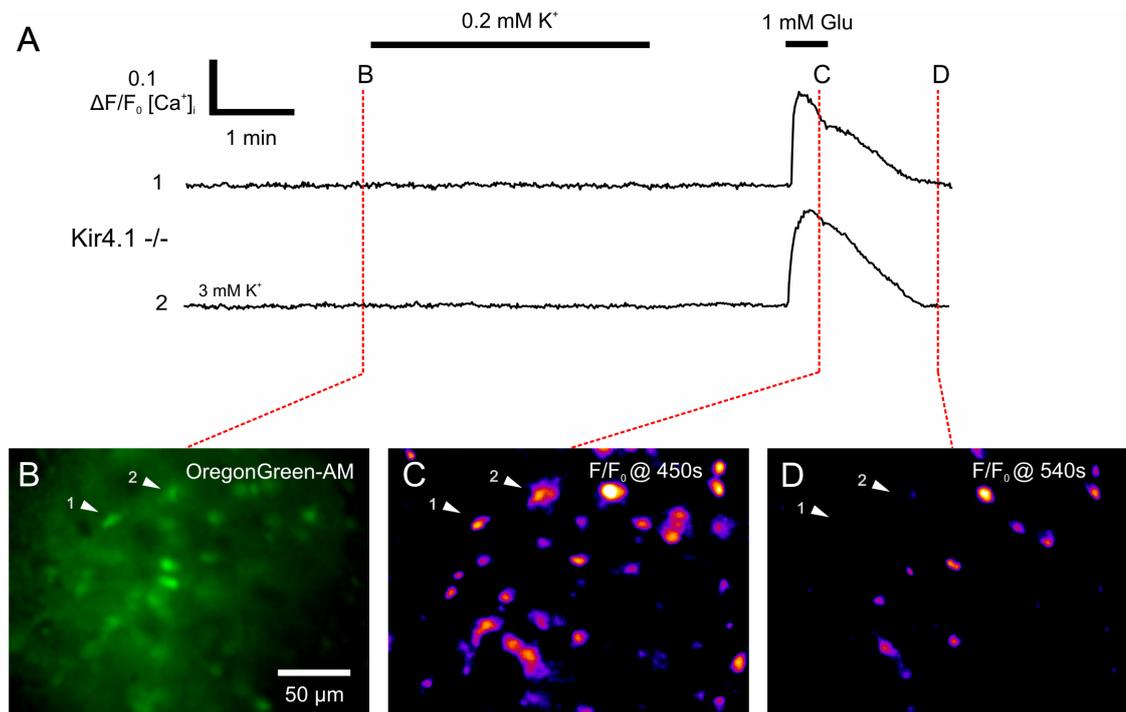


Abb. 3-6 Glutamat induzierte Calciumsignale als Teststimulus zur Überprüfung der Calciumhomöostase. **A:** Ca^{2+} -Messung mit OregonGreen-AM in einem Kir4.1^{-/-}-Schnittpräparat während einer Glutamat Applikation. Die beiden oberen Spuren zeigen beispielhaft die Veränderung der Fluoreszenzintensität über die Zeit in zwei Zellen. Den Fluoreszenzgraphen zugeordnet sind drei CCD-Bilder (**B-D**), die die Fluoreszenzintensität des OregonGreen-AM gefärbten Schnittes zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor, während und nach der Applikation von Glutamat zeigen. Um Variationen in der Fluoreszenz des Calciumsensors deutlicher darzustellen, wurden die Intensitätsänderungen in den Bildern (C) und (D) auf Bild (B) bezogen ($\Delta F/F_0$). Zu erkennen ist, dass keine der markierten Zellen (1,2) auf die Applikation von niedrig- $[\text{K}^+]_e$ reagiert. Wurde jedoch als Teststimulus Glutamat zugeführt, so zeigen beide Zellen einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Nach ca. 100 s kehrte die in den Zellen gemessene $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Änderung auf ihren vor der Zugabe von Glutamat gemessenen Wert zurück. Bild (C) und das nachfolgende Bild (D) verdeutlichen, dass dieses Antwortverhalten in annähernd allen gefärbten Zellen beobachtet werden konnte.

3.4.3 Heterologe Expression des Kir4.1-EGFP-Konstruktes führt zu einem veränderten Ruhemembranpotential

Der Kir4.1-Kanal stellt die hauptsächliche K^+ -Ruheleitfähigkeit in Astrozyten dar und ist maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotential (RMP) beteiligt (Sontheimer, 1994; Verkhratsky & Steinhauser, 2000; Kofuji & Newman, 2004). Um das niedrig- $[K^+]_e$ induzierte Signal näher zu untersuchen, wurde ein Kir4.1-EGFP-Fusionsprotein (Abb. 3-7, D) in eukaryontischen Zelllinien exprimiert. Ein elektrophysiologischer Nachweis über die funktionelle Expression der Kir4.1-Kanaluntereinheit fand über die Bestimmung des Ruhemembranpotentials (RMP) statt.

Die transiente Transfektion des pKir4.1-EGFP-C1-Plasmids in CHO-K1 und COS-7 Zellen führte zu einem signifikanten Unterschied im Ruhemembranpotential gegenüber nativen Zellen. Der Wert des Ruhemembranpotential von transfizierte CHO-K1 Zellen betrug $-12,6 \pm 2,4$ mV (n=5) gegenüber $-83,5 \pm 4,0$ mV bei nativen Zellen (n=4). Bei transfizierten COS-7 Zellen ($-83,0 \pm 7,6$ mV; n=6) konnte ein ähnlicher Unterschied zu nativen Zellen ($-14,8 \pm 3,3$ mV; n=6) beobachten werden (Abb.3-7, E).

3.4.4 Kir4.1 transfizierte Zellen antworten auf niedrig $[K^+]_e$ mit einem Ca^{2+} Signal

CHO-K1-Zellkulturen wurden mit einem Kir4.1-EGFP-Konstrukt transient transfiziert und mit Fura-2 AM angefärbt (Abb. 3-8). Während der Applikation der niedrig- $[K^+]_e$ Lösung zeigten transfizierte Zellen einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} (Abb. 3-8; n=13 Zellen, 4 Kulturen). Dagegen konnte in nicht-transfizierten nativen CHO-K1 Zellen keine niedrig- $[K^+]_e$ induzierte Ca^{2+} -Antwort beobachtet werden (Abb. 3-8; n=29 Zellen, 4 Kulturen).

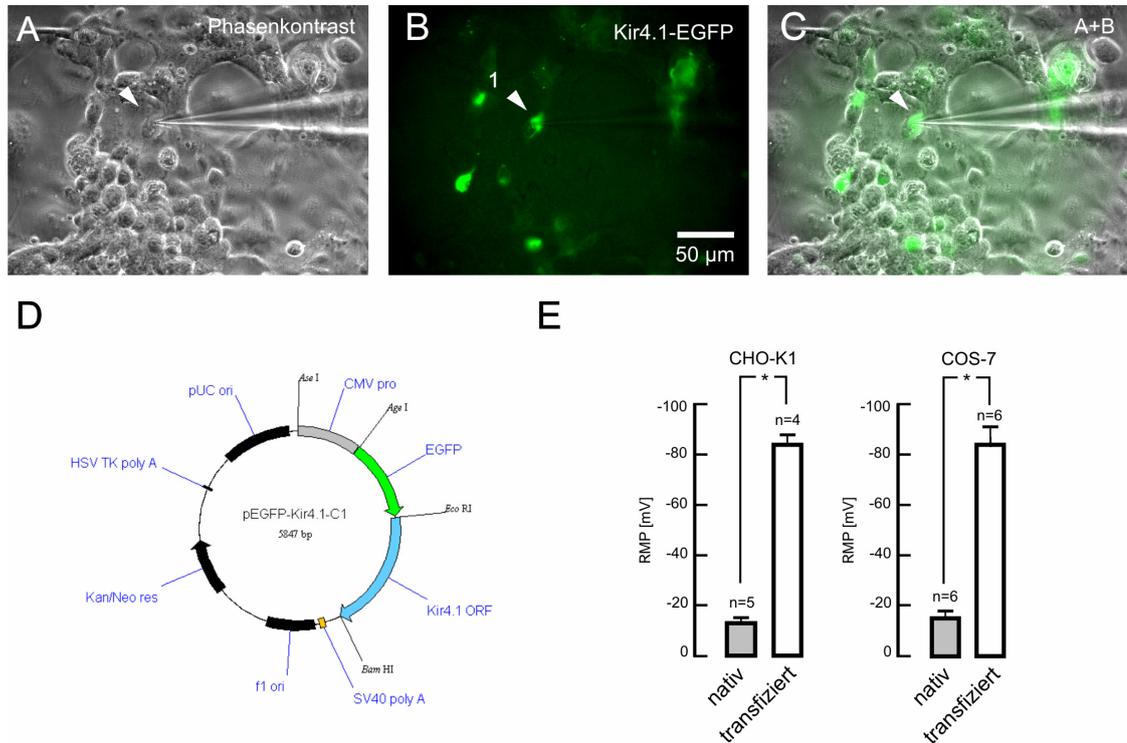


Abb. 3-7 Die Transfektion des Kir4.1-EGFP Plasmids in CHO-K1 und COS-7 Zellkulturen führt zur funktionellen Expression der Kir4.1-Kanaluntereinheit. (A) Phasenkontrastbild und **(B)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Kir4.1-EGFP exprimierenden COS-7 Zellen. **(C)** Übereinanderlagerung der Bilder A und B. Beispielhaft ist eine Patchpipette an einer transfizierte COS-7 Zelle gezeigt. **(D)** Schematische Darstellung des pEGFP-Kir4.1-Plasmids. **(E)** Die Balkendiagramme zeigen die Ruhemembranpotentiale transfizierter und nicht transfizierter CHO-K1 und COS-7 Zellen. * $p < 0,05$; die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt.

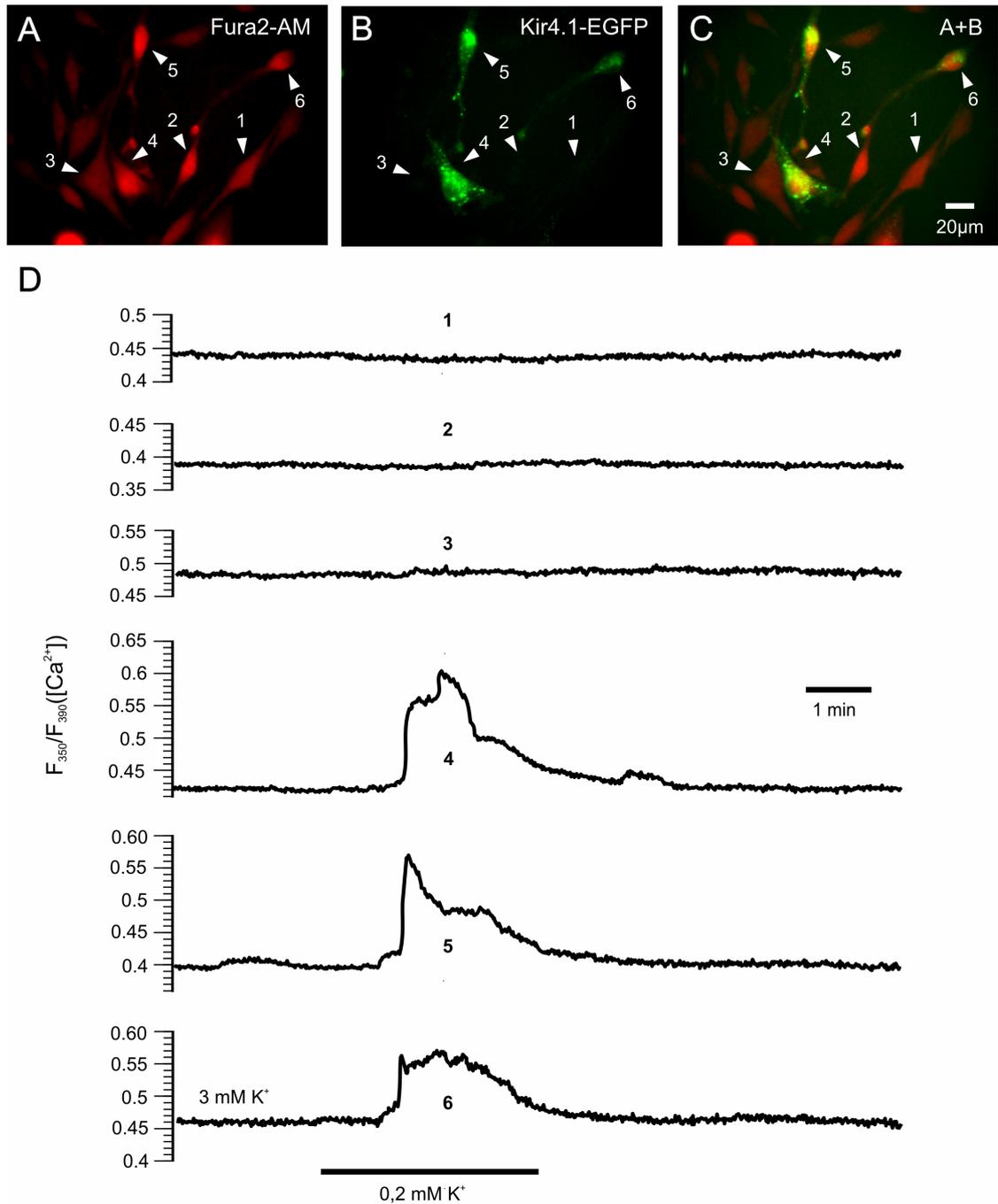


Abb.3-8 Calciummessungen in nativen und Kir4.1-EGFP transfizierten CHO-K1 Zellen. A: Fluoreszenzbild von Fura-2-AM beladenen CHO-K1 Zellen. **B:** Kir4.1-EGFP exprimierende Zellen. **C:** Die Bildüberlagerung zeigt drei transfizierte Fura-2-AM beladene CHO-K1 Zellen (Pfeile 4-6). **D:** Mit Fura-2-AM gemessene Calciumkonzentrationsänderungen in nativen (1-3) und transfizierten (4-6) CHO Zellen während der Applikation von niedrig- $[K^+]_e$.

3.4.5 Das depolarisierte RMP von Kir4.1 KO Astrozyten hat keinen Einfluss auf den niedrig-[K⁺]_e induzierten Ca²⁺-Influx

Um weitere Einblicke in die Natur des niedrig-[K⁺]_e induzierten Ca²⁺-Signals zu bekommen und um die Möglichkeit auszuschließen, dass das depolarisierte Ruhemembranpotential in Kir4.1^{-/-}-Astrozyten (Neusch et al. 2006) verantwortlich für die Reduktion der niedrig-[K⁺]_e induzierten Ca²⁺-Antworten ist, wurden simultan Membranströme und das cytosolische Ca²⁺ an identifizierten Astrozyten *in situ* gemessen. Astrozyten von TgN(hGFAP-mRFP1) Mäusen wurden über eine Patch-Pipette mit Fura-2 beladen. Simultan zu *whole-cell-voltage-clamp* Messungen wurde die cytosolische Calciumkonzentration analysiert (Abb. 3-9). Es wurden die Antworten von auf -80 mV geklemmten Astrozyten mit -50 mV geklemmten Astrozyten verglichen. Das Absenken der extrazellulären Kaliumkonzentration von 3 mM auf 0,2 mM führte in auf -80 mV geklemmten Astrozyten (nicht gezeigt) zu einem initialen auswärtsgerichteten Strom dem gleichzeitig beim Ansteigen des cytosolischen Ca²⁺ ein einwärtsgerichteter Strom folgte. Das gleiche Antwortmuster konnte in Astrozyten beobachtet werden, die auf -50 mV geklemmt wurden (Abb. 3-9, F). Niedrig-[K⁺]_e induzierte Ca²⁺ Transienten konnten in 93% (12 von 13) der auf -50 mV und in allen der auf -80 mV geklemmten Astrozyten beobachtet werden (Abb. 3-9, E). Der Zelltyp wurde über die Aufnahmen eines Strom-Spannung-Musters des geklemmten Astrozyten vor der Messung überprüft (Abb.3-9, D). Alle gemessenen TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten konnten dem „passiven Typ“ zugeordnet werden (n=21; vgl. Graß et al., 2004).

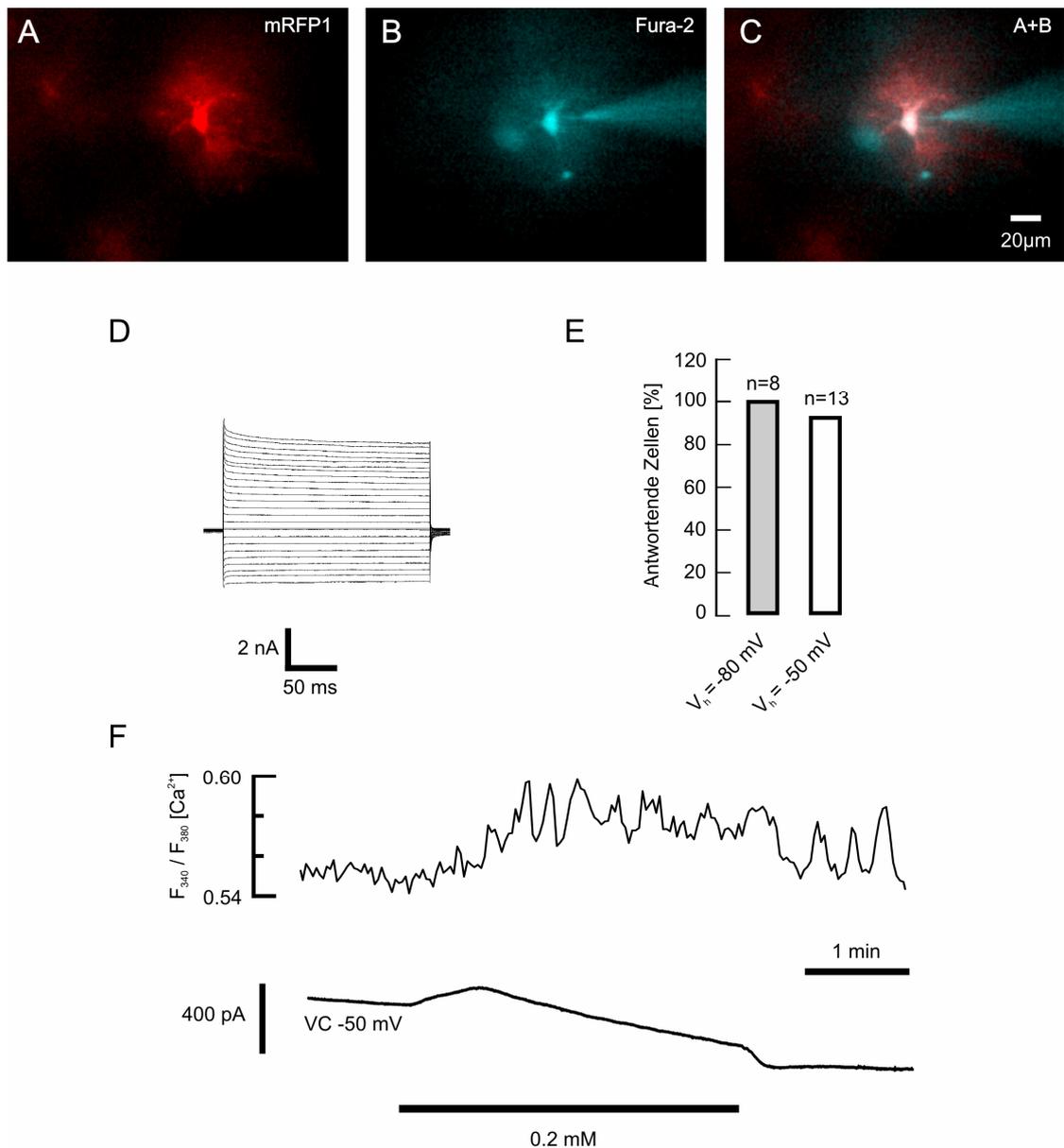


Abb.3-9 Simultane Calcium- und whole-cell-voltage-clamp-Messung an mRFP1 markierten Astrozyten der VRG. A: Fluoreszenzbild eines mRFP1 exprimierenden Astrozyten. **B:** Beladung des Astrozyten mit Fura-2 über eine Patch-Pipette. **C:** Überlagerung der Bilder A und B. **D:** Strom-Spannungs-Muster eines passiven Astrozyten. **E:** Prozentualer Anteil der gepatchten Zellen die auf die niedrig- $[K^+]_e$ Lösung mit einem Calciumsignal antworten bei Haltepotentialen von -80 mV und -50 mV (n=Zellzahl). **F:** Simultane Calcium- (obere Spur) und whole-cell-voltage-clamp Messung bei -50 mV (untere Spur). Das Absenken der extrazellulären Kaliumkonzentration von 3 mM auf 0,2 mM führte in dem Astrozyten zu einem initialen auswärtsgerichteten Strom dem gleichzeitig beim Ansteigen des cytosolischen Ca^{2+} ein einwärtsgerichteter Strom folgte.

3.5 Untersuchungen zu Neuromodulator induzierten Ca^{2+} -Signalen in Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe

Der respiratorische Rhythmus wird generiert von einer spezifischen Neuronenpopulation in der ventrolateralen Medulla oblongata. Es konnte gezeigt werden, dass Gliazellen diesen Rhythmus stabilisieren (Hülsmann et al., 2000). Die Neuropeptide Thyreoliberin (TRH; *thyrotropin releasing hormone*) und Substanz P sowie das biogene Amin Serotonin stimulieren den respiratorischen Rhythmus, indem sie direkt respiratorische Neurone modulieren (Pena & Ramirez, 2002; Rekling et al., 1996; Pena & Ramirez, 2004). Da in anderen Geweben Rezeptoren von Neuromodulatoren auf Astrozyten beschrieben wurden (Bernstein et al. 1996), sollte geprüft werden ob es auch indirekte Effekte über Gliazellen innerhalb der ventralen respiratorischen Gruppe vermittelt werden.

3.5.1 Serotonin und α -methyl-5-HT evozieren Ca^{2+} -Signale in Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe

Um den Einfluss von Neuromodulatoren auf Astrozyten der VRG zu untersuchen, wurden akute Hirnstammschnitte von TgN(hGFAP-mRFP1) Mäusen mit OregonGreen-AM beladen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Badapplikation von 5-HT als auch des selektive 5-HT_{2a}-Agonisten α -methyl-5-HT Ca^{2+} -Signale in OregonGreen-AM beladenen TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten der VRG hervorruft (Abb. 3-10). α -methyl-5-HT ist ein 5-HT_{2a}-Rezeptor Agonist. Aktivierung des G-Protein gekoppelte 5-HT₂ Rezeptors bewirkt eine Stimulation der Phospholipase C (PLC), die über Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern bewirkt (Richardson et al., 1985).

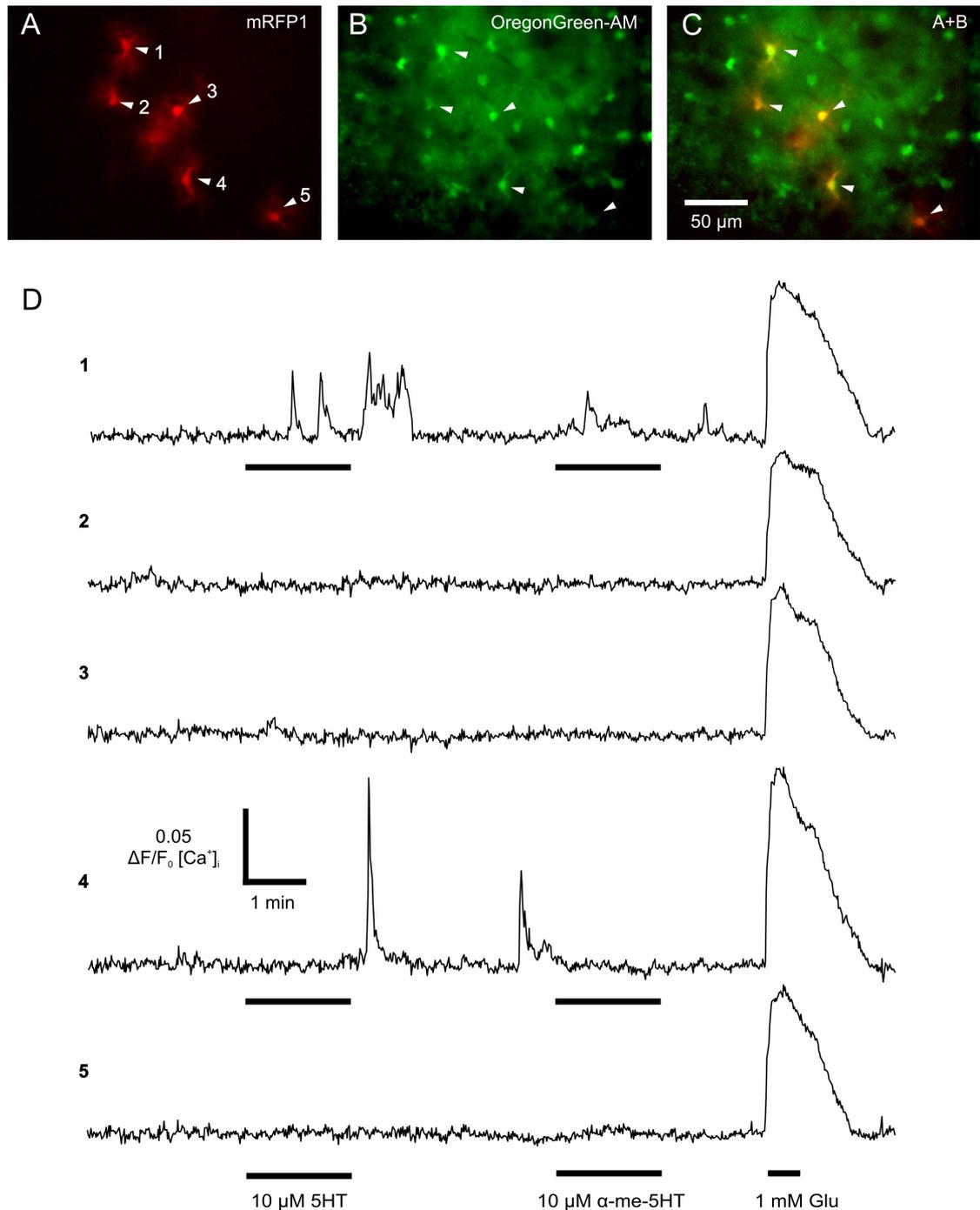


Abb.3-10 5-HT und α -methyl-5-HT induzierte Calciumsignale in TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten der VRG. **A:** Fluoreszenzaufnahme von mRFP1 exprimierenden Astrozyten. **B:** Fluoreszenzaufnahme des OregonGreen-AM beladenen Schnittes. **C:** Die Überlagerung der Bilder zeigt mehrere mit dem Calciumindikator beladene mRFP1 exprimierende Astrozyten (Pfeile 1-5). **D:** Gemessene Calciumkonzentrationsänderungen in TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten (1-5) während der Applikation von 5-HT und α -methyl-5-HT. Zwei der Fünf Astrozyten zeigen Ca^{2+} Signale. Astrozyt (1) antwortet sowohl auf das Ein- als auch auf das Auswaschen von 5-HT bzw. α -methyl-5-HT mit einem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg, der mit (4) markierte Astrozyt nur auf das Auswaschen von 5-HT.

3.5.2 5-HT_{2a}-R vermittelte Ca²⁺-Freisetzung in Astrozyten der VRG

Es wurde gezeigt, dass bestimmte Neuromodulatoren Ca²⁺-Signale in einem Teil der Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe hervorrufen. Um ausschließen zu können, dass diese Signale eine astrozytäre Reaktion auf eine Agonisten induzierte Modulation der neuronalen Aktivität darstellt, wurden alle Folgeexperimente in Gegenwart von 500 nM Tetrodotoxin (TTX) durchgeführt. Auch nach Blockade selektiv spannungsabhängige Na⁺ Kanäle und somit der Weiterleitung von Aktionspotentialen, konnten in TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten Ca²⁺-Antworten auf die Applikation der Neuromodulatoren beobachtet werden (Abb.3-11). Die quantitative Analyse ergab, dass auf die Badapplikation von 5-HT 22,4 ± 20,9%, auf α-methyl-5-HT 14,0 ± 18,0% der gefärbten TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten mit einem Ca²⁺-Signal antworten (n=59 Zellen, 10 Schnitte).

3.5.3 Eine Subpopulation von niedrig-[K⁺]_e identifizierten Astrozyten der VRG antwortet auf α-methyl-5-HT mit einem Ca²⁺ Signal

Die niedrig-[K⁺]_e Methode bietet gegenüber der TgN(hGFAP-mRFP1) Mauslinie den Vorteil, dass sich ein größerer Anteil von gefärbten Astrozyten im Schnittpräparat identifizieren lässt (20 ± 7 Astrozyten pro Schnitt, n=53 vs. 8 ± 4 mRFP1-Astrozyten pro Schnitt, n=35). Um Astrozyten die auf Serotonin mit einem Ca²⁺-Signal antworten quantitativ zu erfassen, wurden daher Hirnstammschnitte von WT Mäusen für weitere Messungen benutzt. Die Identifizierung von Astrozyten erfolgte mit Hilfe der niedrig-[K⁺]_e Lösung. Die Schnitte wurden mit OregonGreen-AM beladen und anschließend in der ventralen respiratorischen Gruppe Ca²⁺ Messungen durchgeführt (Abb. 3-12). Eine quantitative Analyse ergab, dass auf α-methyl-5-HT 30.2 ± 16.7 % (n= 272 Zellen; n=9 Schnitte) der mit niedrig-[K⁺]_e identifizierten Astrozyten pro Schnitt reagieren.

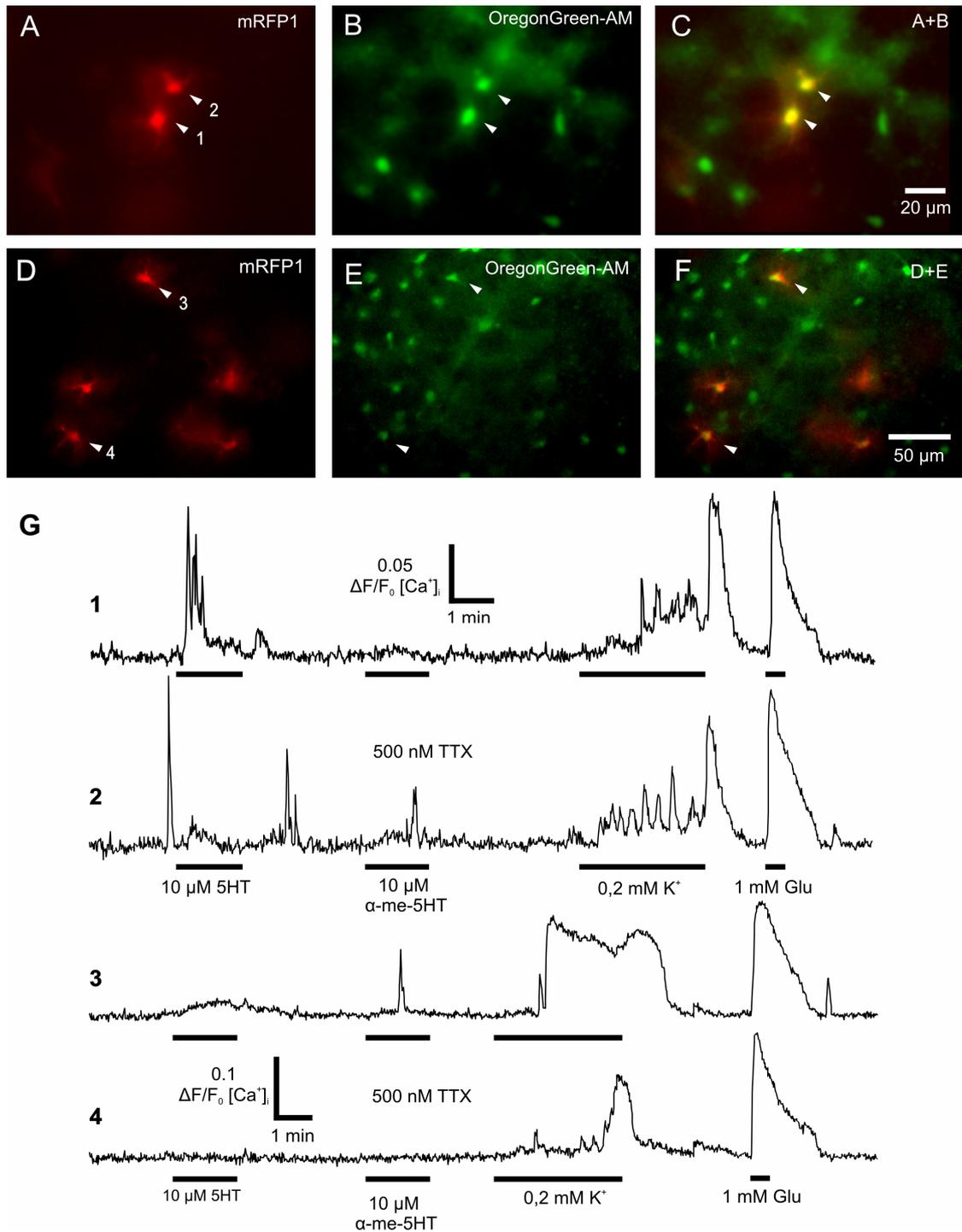


Abb. 3-11 5-HT und α -methyl-5-HT induzierte Calciumsignale in TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten der VRG in Gegenwart von TTX. **A,D:** Fluoreszenzaufnahme von mRFP1 exprimierenden Astrozyten. **B,E:** Fluoreszenzaufnahmen der OregonGreen-AM beladenen Schnitte. **C,F:** Die Überlagerung der Bilder zeigt mehrere mit dem Calciumindikator beladene mRFP1 exprimierende Astrozyten (Pfeile 1-4). **G:** Mit OregonGreen-AM gemessene Calciumkonzentrationsänderungen in TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten (1-5) während der Applikation von 5-HT und α -methyl-5-HT. Zwei Astrozyten zeigen eine Ca²⁺-Antwort entweder auf 5-HT (1) oder auf α -methyl-5-HT (3). Der mit (2) markierte Astrozyt reagiert auf beide Pharmaka mit einer Antwort, →

wohingegen der mit (4) markierte Astrozyt keine Reaktion zeigt. In den Astrozyten (1) und (2) lässt sich auch beim Auswaschen von 5-HT eine Ca^{2+} -Antwort beobachten. Spontanaktivität vor Applikation von Serotonin ist in Astrozyt (2) zu erkennen. Eine relativ schwache Reaktion auf 5-HT zeigt Astrozyt (3).

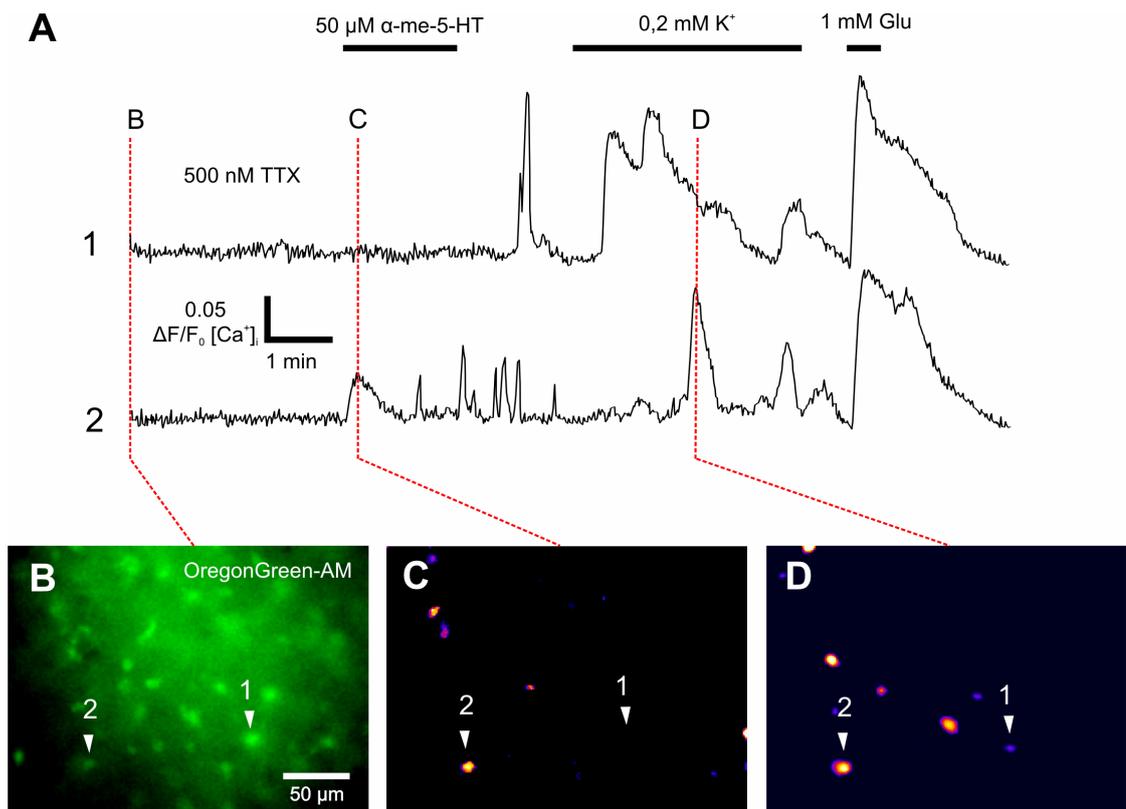


Abb. 3-12 Quantitative Analyse der α -methyl-5-HT induzierte Calciumsignale in Wildtyp Hirnstammschnitten. **A:** Mit OregonGreen-AM gemessene Calciumkonzentrationsänderungen in zwei Astrozyten aus dem Auswertungsbereich. Beide Zellen zeigen auf die Applikation der niedrig-[K⁺]_e Lösung einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. α -methyl-5-HT induziert in einem der beiden Astrozyten (2) Calciumoszillationen, der Andere (1) zeigt nach dem Auswaschen des Pharmakons einen Calciumtransienten **B:** OregonGreen-AM Baseline-Fluoreszenzbild (= F₀) aufgenommen vor der Applikation des Pharmakons. **C,D:** Fluoreszenzintensitätsänderungen F/F₀ des Calciumsensors während der Applikation von α -methyl-5-HT und niedrig-[K⁺]_e. Auf den CCD-Aufnahmen ist zu erkennen, dass mehrere gefärbte Zellen im Schnitt auf die Applikation von α -methyl-5-HT (C) bzw. niedrig-[K⁺]_e (D) mit einem Calciumanstieg reagieren.

3.5.4 Cyclopizonsäure führt zu einer Reduktion der Anzahl, der auf α -methyl-5-HT antwortenden Astrozyten

Um das α -methyl-5-HT induzierten Calciumsignal näher zu untersuchen wurde Cyclopizonsäure (CPA), ein spezifischer reversibler Inhibitor der endoplasmatischen Ca^{2+} ATPase, verwendet. Wurde α -methyl-5-HT in Gegenwart von CPA appliziert, so war die Anzahl der antworteten Astrozyten pro Schnitt signifikant auf $7,0 \pm 5,7\%$ ($n=8$) reduziert, gegenüber $30,2 \pm 16,7\%$ ($n=9$) ohne vorherige CPA Inkubation des Schnittpräparates (Abb. 3.13, E).

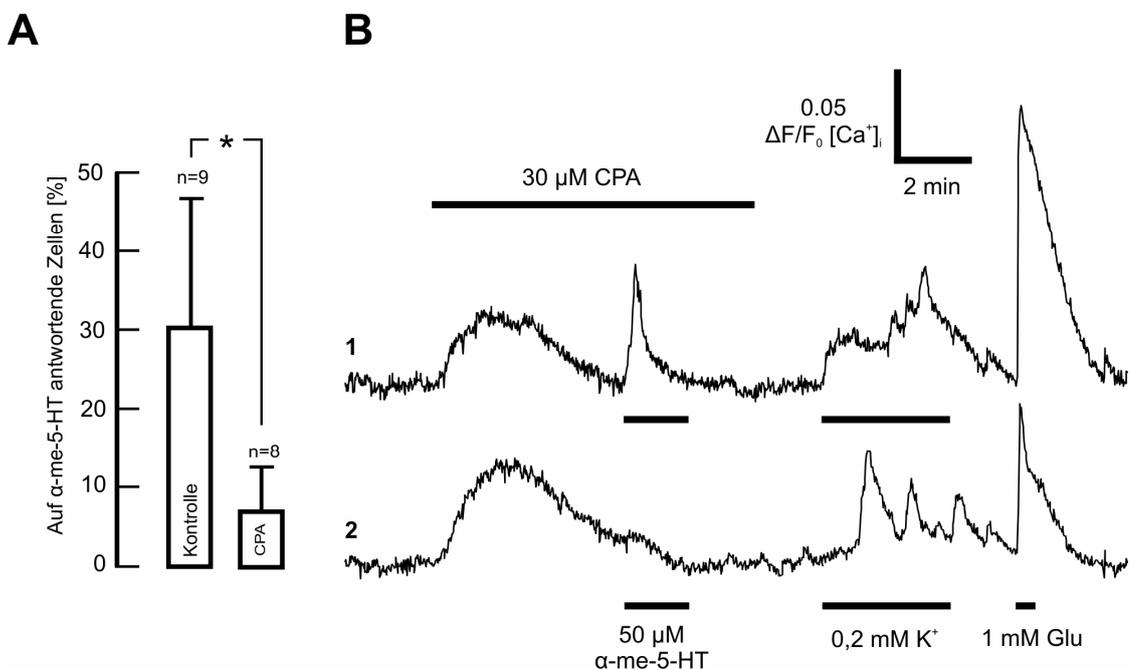


Abb. 3.13 CPA führt zu einer Reduktion der auf α -methyl-5-HT antwortenden Astrozyten. **A:** Prozentualer Anteil gefärbten Astrozyten pro Schnitt, die auf α -methyl-5-HT (Kontrolle) und auf α -methyl-5-HT nach vorheriger CPA Zugabe mit einem Calciumsignal antworten. **B:** Mit OregonGreen-AM gemessene Calciumkonzentrationsänderungen in zwei verschiedenen Astrozyten während der Applikation von CPA und α -methyl-5-HT. Die Inkubation mit 30 μM CPA führt zu einem Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} Konzentration. Bei anschließender Applikation von α -methyl-5-HT in Gegenwart von CPA zeigt einer der Astrozyten einen Calciumtransienten (1), wohingegen der Andere nicht reagiert. Das Absenken des extrazellulären Kaliums führt in beiden Zellen zu einem Calciumsignal und identifiziert die Zellen als Astrozyten. n = Anzahl der Schnitte; * $P < 0,05$.

3.5.5 Die durch Serotonin induzierten Calciumtransienten werden nicht über adrenerge Rezeptoren vermittelt

α 1-Adrenorezeptoren konnten bisher auf Astrozyten von hippocampalen Hirschnittpräparaten (Duffy et al., 1995) und auf Bergmann-Glia (Kirischuk et al., 1996) nachgewiesen werden. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Noradrenalin Calciumsignale in Astrozyten der VRG hervorruft ($97,2 \pm 2,4$ %; $n= 3$ Schnitte) (Abb. 3-14, B). Um ausschließen zu können, dass 5-HT oder α -methyl-5-HT einen Effekt über α 1-Adrenorezeptoren auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von Astrozyten hat, wurden Kontroll-Experimente in Gegenwart des α 1-spezifischen Antagonisten Prazosin durchgeführt. Ein Vergleich des Antwortverhaltens ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Messungen mit 5-HT ($25,1 \pm 10,4$ %; $n=118$) und 5-HT in der Gegenwart von Prazosin ($20,1 \pm 9,4$ %; $n=378$, n. s., $P > 0,05$) sowie Messungen mit α -methyl-5-HT ($25,4 \pm 11,9$ %, $n=110$) und α -methyl-5-HT in der Gegenwart von Prazosin ($30,2 \pm 16,7$ %, $n=272$, n. s., $P > 0,05$; Abb. 3.14, D).

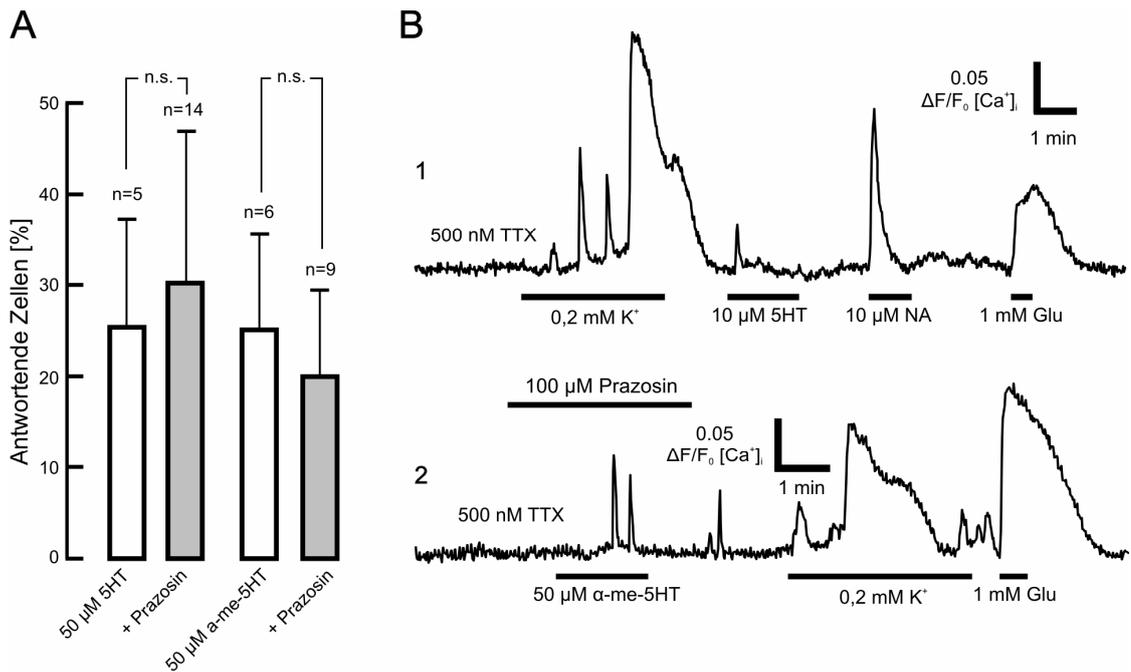


Abb. 3-14 Noradrenalin induziert Calciumsignale in Astrozyten der VRG. **A:** Das Balkendiagramm zeigt den Vergleich von auf 5-HT und α -methyl-5-HT antwortenden Astrozyten mit und ohne vorheriger Zugabe von Prazosin. **B:** Mit OregonGreen-AM gemessene Calciumkonzentrationsänderungen in niedrig- $[K^+]_e$ identifizierten Astrozyten (1,2). Der obere Fluoreszenzgraph (1) zeigt beispielhaft das Antwortverhalten eines Astrozyten auf die Applikation von niedrig- $[K^+]_e$, 5-HT und Noradrenalin. Die Applikation der niedrig- $[K^+]_e$ Lösung induziert Calciumoszillationen und identifiziert die Zelle als Astrozyt. 5-HT und Noradrenalin rufen einen einzelnen Calciumtransienten in dieser Zelle hervor. Der untere Fluoreszenzgraph (2) zeigt einen Astrozyten, der in Gegenwart des α 1-Adrenorezeptor spezifischen Antagonisten Prazosin ein α -methyl-5-HT induziertes Calciumsignal zeigt. n = Anzahl der Schnitte; n.s. = nicht signifikant; $p > 0,05$.

3.5.6 Astrozyten der VRG exprimieren den 5-HT_{2a} Rezeptor

Um die physiologische Evidenz für den 5-HT_{2a}-Rezeptor zu bekräftigen, wurden immunhistochemische Färbungen mit einem 5HT_{2a}R-Antikörper durchgeführt. Dazu wurden Vibratomschnitte aus dem Hirnstamm von TgN(hGFAP-EGFP) Mäusen angefertigt, mit dem Antikörper inkubiert und anschließend mit Hilfe eines konfokalen Mikroskop analysiert (Abb. 3-15). Um eine Fehlinterpretation des Signals auszuschließen und sicherzustellen, dass es sich bei der Detektion nicht um Überlagerungseffekte handelt, wurde zusätzlich eine Bildstapelaufnahme mit rekonstruierter Seitenansicht angefertigt (Abb.3-16).

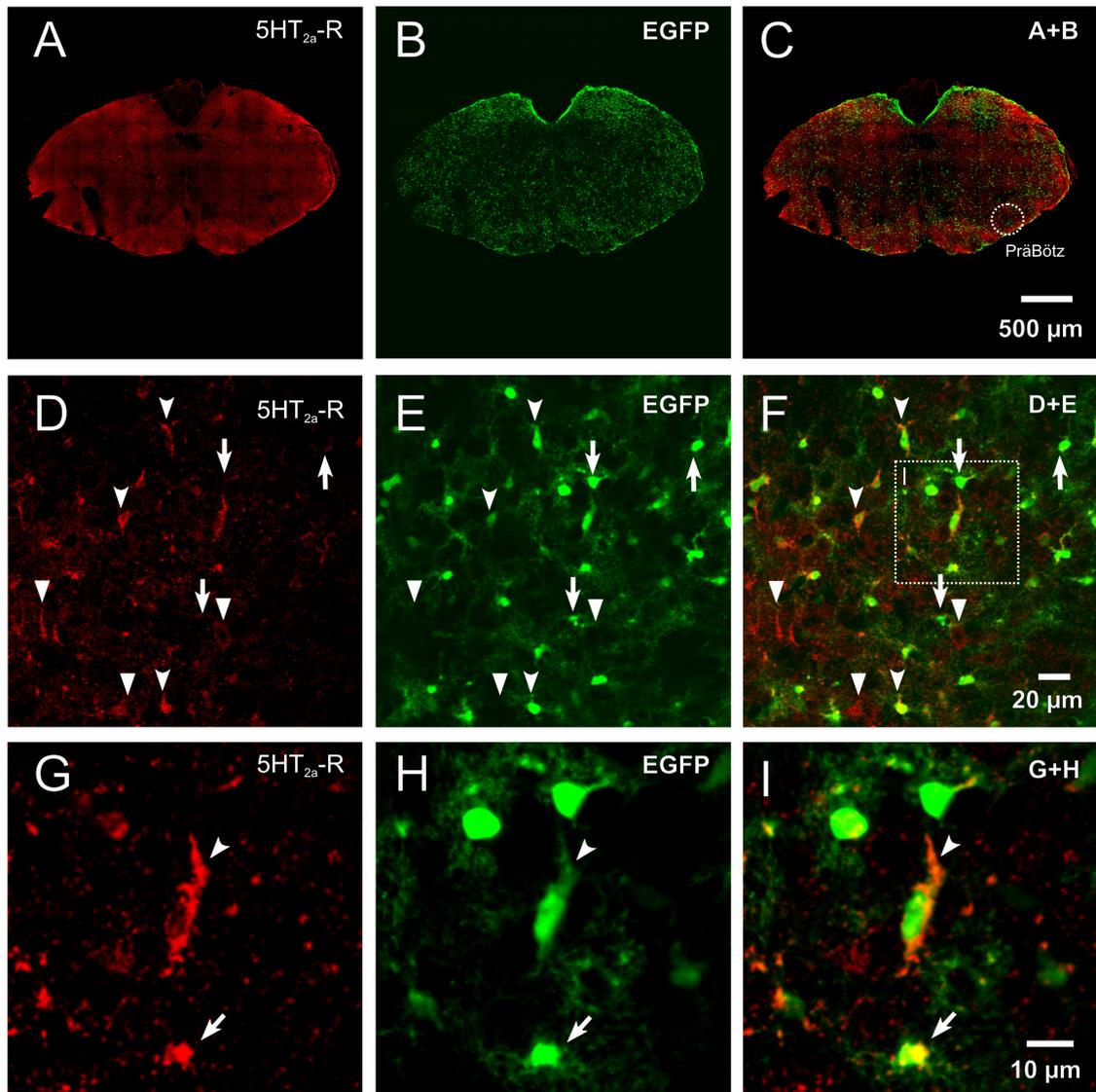


Abb. 3-15 Immunhistochemische Analyse der Expression des 5-HT_{2a}-Rezeptors auf transgen markierten Astrozyten der VRG. Konfokale Aufnahme einer 5-HT_{2a}R Antikörperfärbung (A) in einem TgN(hGFAP-EGFP) Hirnschnitt (B) mit der Region des Prä-Bötzinger-Komplexes (C). D-F: Übersichtsaufnahme innerhalb des Prä-Bötzinger-Komplexes. Zu erkennen ist, dass eine Vielzahl der TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten ein 5-HT_{2a}R-Signal aufweisen (offene Pfeilspitzen). Nur vereinzelt sind EGFP exprimierende Astrozyten zu sehen, die keine Immunfärbung zeigen (Pfeile). Eine zusätzliches Signal deutet auf nicht transgen markierte Zellen mit Immunreaktivität hin (geschlossene Pfeilspitzen) G-I: Die Detailansicht der Region markiert in (F) zeigt die Expression des Rezeptors auf astrozytären Prozessen (Pfeilspitze). Das aber auch eine somatische Detektion vorhanden ist, verdeutlicht der im unteren Bereich der Tafel abgebildete Astrozyt (Pfeil). PräBötz, Prä-Bötzinger Komplex.

3.5.7 TRH und Substanz P induzieren Ca^{2+} -Signale in mRFP1 markierten Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe

Neben Serotonin wurden die Effekte von zwei weiteren wichtigen Neuromodulatoren des respiratorischen Netzwerkes auf Astrozyten untersucht. In Ca^{2+} -Imaging-Experimenten an akuten Hirnstammschnitten von TgN(hGFAP-mRFP1) Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Badapplikation der Neuropeptide TRH und Substanz P im Gewebebereich der VRG Ca^{2+} -Signale in Astrozyten evoziert (Abb.3-17).

3.5.8 TRH-R vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung in Astrozyten der VRG

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass TRH Ca^{2+} -Signale in Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe hervorrufen. Um auch bei diesen Experimenten ausschließen zu können, dass die Signale eine astrozytäre Reaktion auf eine erhöhte neuronale Aktivität darstellen, wurden alle Folgeexperimente in Gegenwart von 500 nM TTX durchgeführt (Abb.3-18). Trotz der unterdrückten neuronalen Aktivität konnten in $33,9 \pm 23,4\%$ der TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten Ca^{2+} -Signale während der Applikation von 5 μM TRH beobachtet werden (n=125 Zellen, 13 Schnitte).

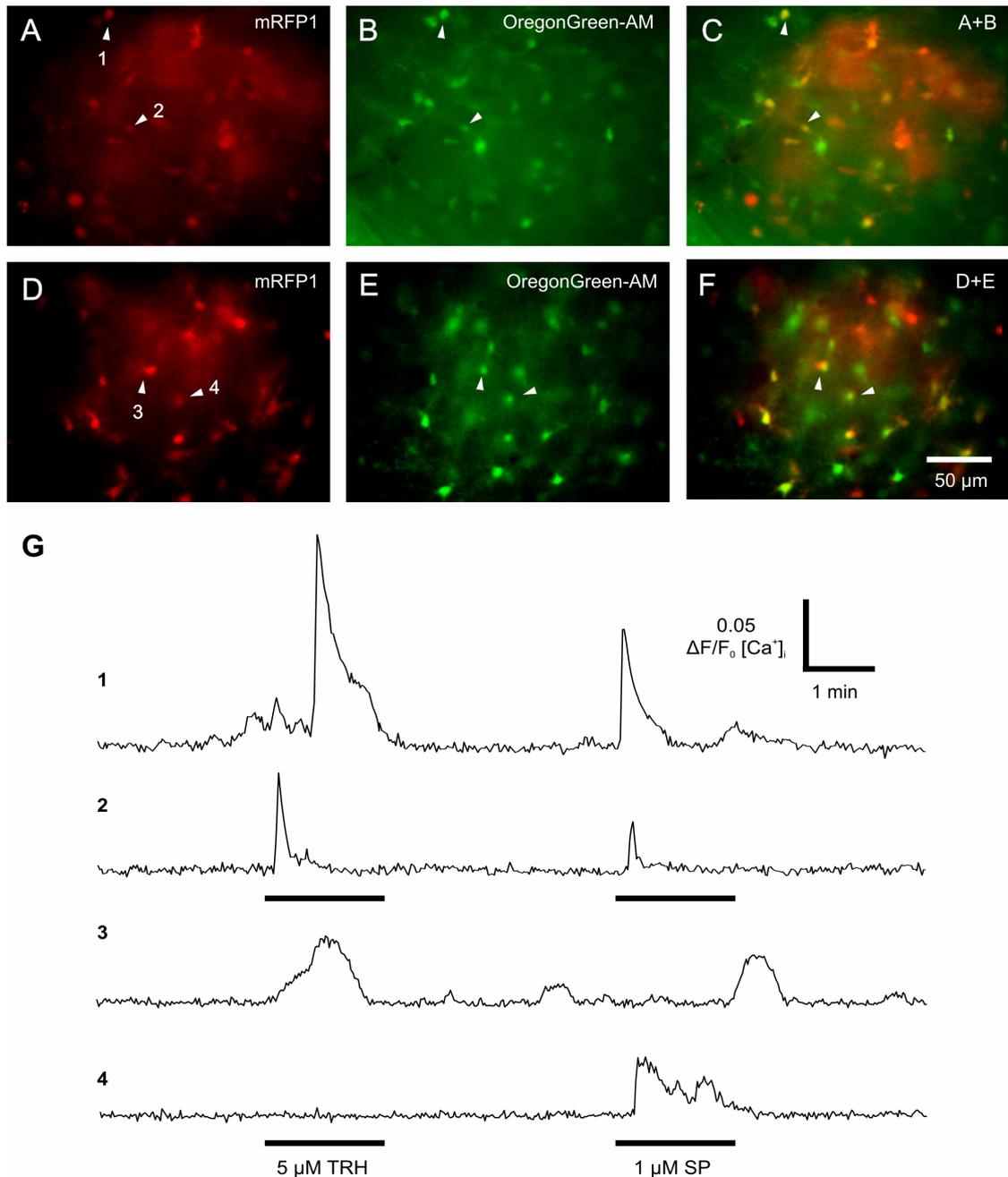


Abb.3-17 TRH und Substanz P induzierte Calciumsignale in TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten der VRG. A,D: Fluoreszenzaufnahme von mRFP1 exprimierenden Astrozyten. **B,E:** Fluoreszenzaufnahmen der OregonGreen-AM beladenen Schnitte. **C,F:** Die Überlagerung der Bilder zeigt mehrere mit dem Calciumindikator beladene TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten (Pfeile 1-4). **G:** Mit OregonGreen-AM gemessene Calciumkonzentrationsänderungen in vier identifizierten Astrozyten (1-4) während der Applikation von TRH und Substanz P. Die Badapplikation von 5 μM TRH führt in drei (1-3) der vier dargestellten Astrozyten zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Auf die Applikation von 1 μM Substanz P antworten drei der Zellen (1,2,4) mit einem Ca^{2+} -Signal. Das Auswaschen, jedoch nicht das Einwaschen von Substanz P evoziert in Astrozyt (3) einen Ca^{2+} -Transienten. In den Astrozyten (1) und (2) konnte eine Reaktion sowohl auf TRH als auch auf Substanz P beobachtet werden.

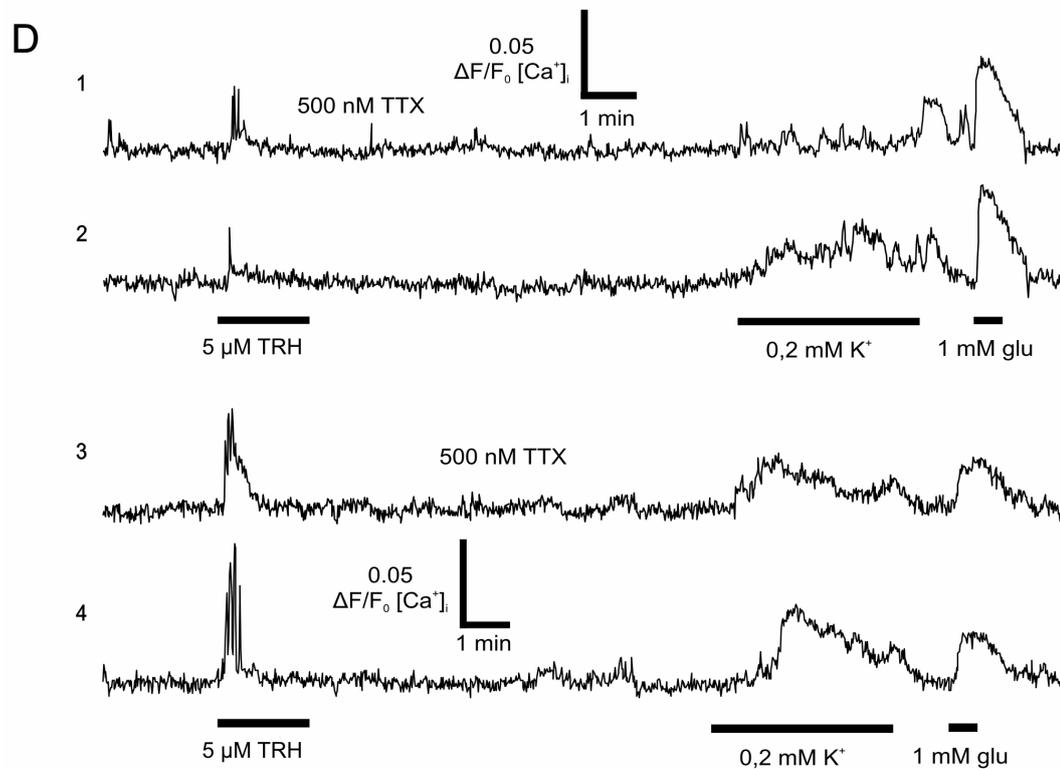
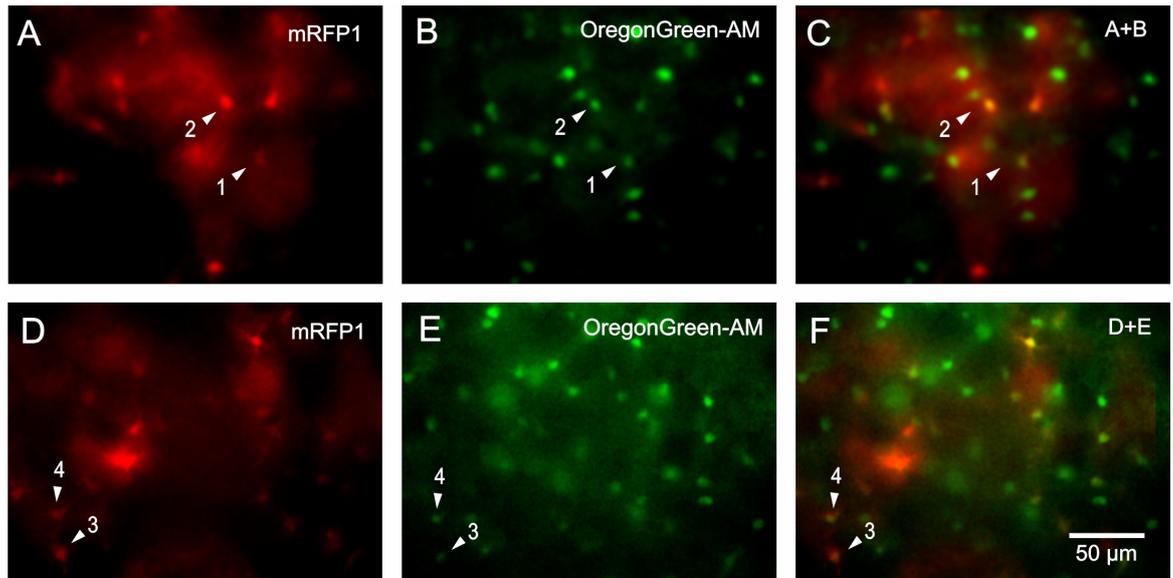


Abb.3-18 TRH induziert Calciumoszillationen in TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten der VRG in Gegenwart von TTX. A,D: Fluoreszenzaufnahme von mRFP1 exprimierenden Astrozyten. **B,E:** Fluoreszenzaufnahmen der OregonGreen-AM beladenen Schnitte. **C,F:** Die Überlagerung der Bilder zeigt mehrere mit dem Calciumsensor beladene mRFP1 exprimierende Astrozyten (Pfeile 1-4). **G:** Mit OregonGreen-AM gemessene Calciumkonzentrationsänderungen in identifizierten Astrozyten (1-4) während der Applikation von TRH. Alle vier markierten TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten zeigen eine Ca^{2+} -Antwort auf die Badapplikation von TRH in der Gegenwart von TTX.

3.5.9 Astrozyten der VRG exprimieren den TRH Rezeptor

Um die physiologische Evidenz auch für den TRH-Rezeptor zu bekräftigen wurden immunhistochemische Färbungen mit einem gegen den TRH-Rezeptor gerichteten Antikörper in TgN(hGFAP-EGFP) Hirnstammschnitten durchgeführt (Abb. 3-19). Auch bei dieser Färbung wurde zusätzlich eine Bildstapelaufnahme mit rekonstruierter Seitenansicht angefertigt (Abb. 3-20).

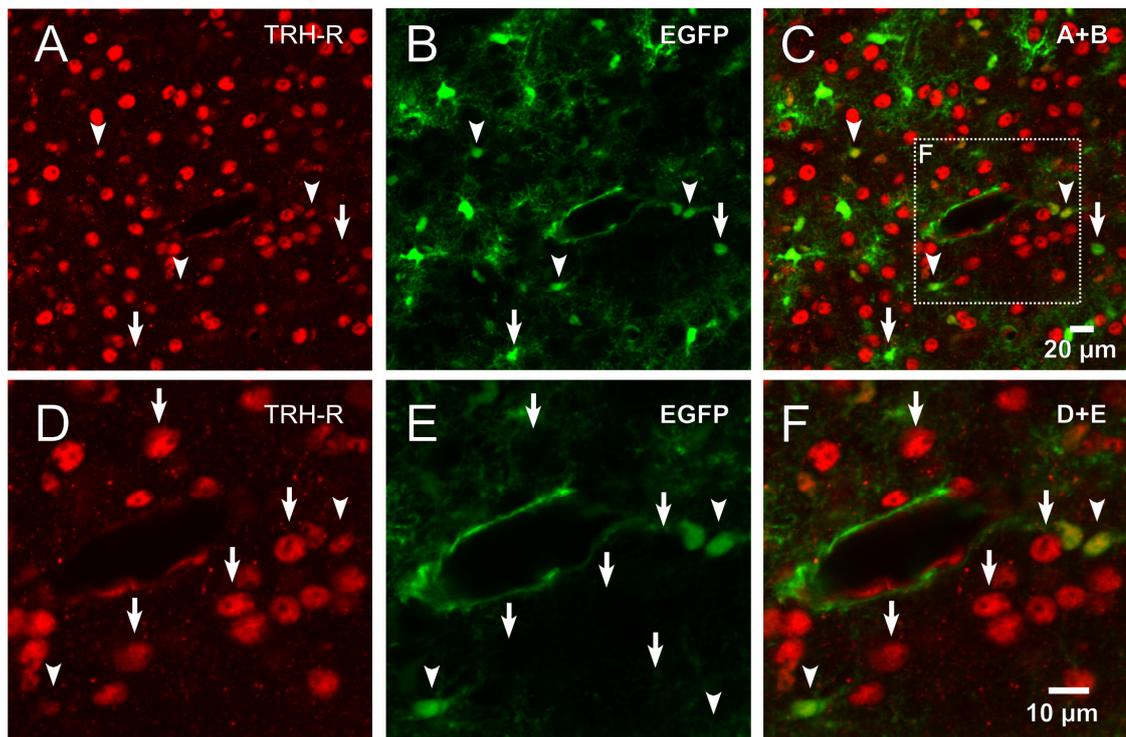


Abb. 3-19 Immunhistochemische Analyse der Expression des TRH Rezeptors auf transgen markierten Astrozyten der VRG. Konfokale Aufnahme einer TRH-R Antikörperfärbung (A) in einem TgN(hGFAP-EGFP) Hirnschnitt (B). Abbildung (C) zeigt die Überlagerung der beiden Bilder. Deutlich zu erkennen ist eine Immunreaktivität in TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten (Pfeilspitzen). Ebenfalls zu sehen ist, dass nicht alle TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten ein Signal zeigen (Pfeile) D-F: Detailansicht der Region markiert in (C). Neben den immunpositiven TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten (Pfeilspitzen) sind nicht transgen markierte Zellen zu erkennen, die ebenfalls eine Immunreaktivität aufzeigen (Pfeile).

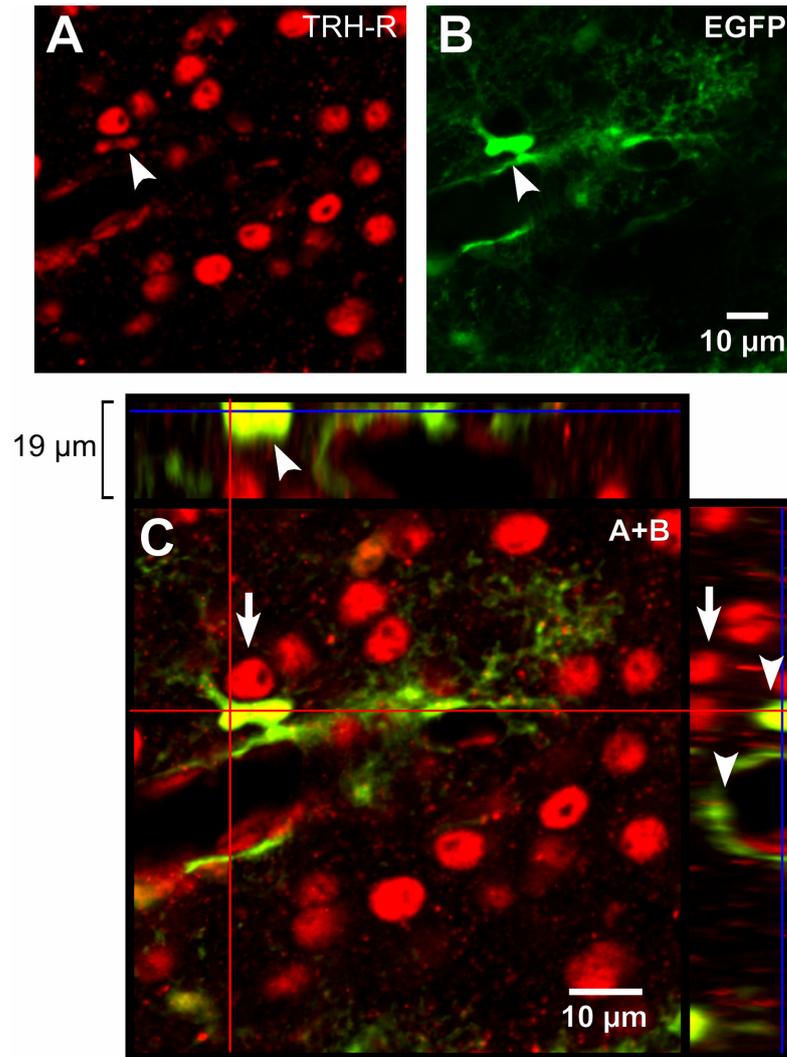


Abb. 3-20 Konfokale Bildstapelaufnahme mit rekonstruierter Seitenansicht.
A-C: Konfokale Aufnahme einer TRH-R Immunfärbung (**A**) in einem TgN(hGFAP-EGFP) Hirnstammschnitt (**B**). **C:** Bildstapelaufnahme, die am oberen und rechten Bildrand die rekonstruierte orthogonale Ansicht zu den rot markierten Linien zeigt. Die blauen Linien in der Seitenansicht markieren die Fokusebene in der z-Achse. Die Rekonstruktion veranschaulicht, dass die Signaldetektion im Cytoplasma der TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten (Pfeilspitzen) und anderer nicht transgen markierten Zellen (Pfeile) erfolgt.

3.5.10 NK1-Rezeptor vermittelte Ca^{2+} Freisetzung in Astrozyten der VRG

Die Badapplikation von Substanz P induziert Ca^{2+} -Signale in Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe. Um wie bei den vorangegangenen untersuchten Neuromodulatoren auszuschließen zu können, dass die Signale nicht eine astrozytäre Reaktion auf eine erhöhte neuronale Aktivität darstellen, wurden auch für diese Substanz Experimente in Gegenwart von 500 nM TTX durchgeführt (Abb.3-21). Unter Bedingungen mit ausgeschalteter neuronaler Aktivität antworteten $11,5 \pm 8,7\%$ der TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten mit Ca^{2+} Transienten auf die Applikation von 2 μM Substanz P (n=125 Zellen, 13 Schnitte).

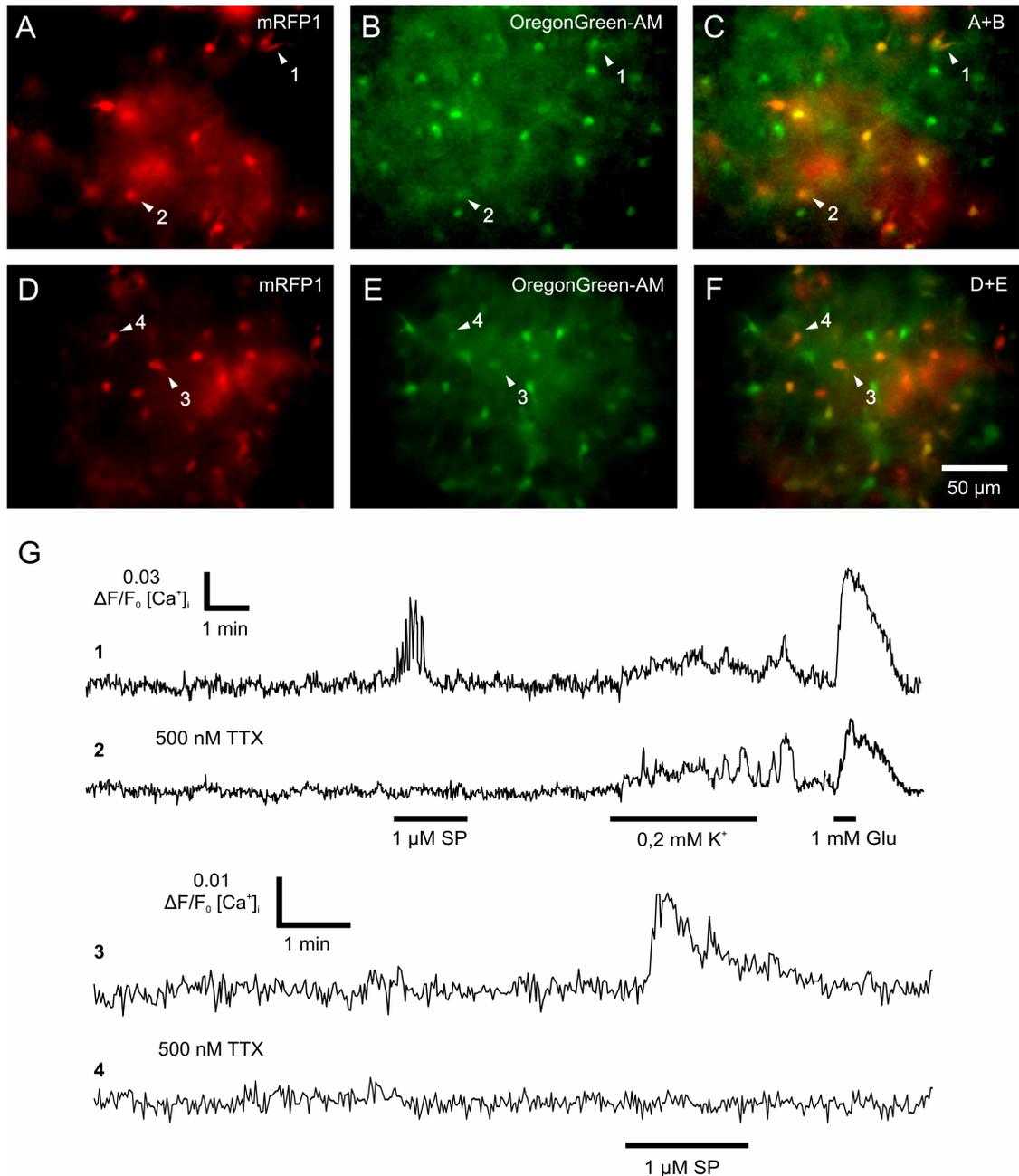


Abb. 3-21 Substanz P induziert Calciumoszillationen in TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten der VRG in Gegenwart von TTX. A,D: Fluoreszenzaufnahme von mRFP1 exprimierenden Astrozyten. B,E: Fluoreszenzaufnahmen der OregonGreen-AM beladenen Schnitte. C,F: Die Überlagerung der Bilder zeigt vier mit dem Calciumindikator beladene mRFP1 exprimierende Astrozyten (Pfeile 1-4). G: Mit OregonGreen-AM gemessene Calciumkonzentrationsänderungen in identifizierten Astrozyten (C,F Pfeile 1-4) während der Applikation von Substanz P. Zwei der markierten Astrozyten (1,3) zeigen eine Ca²⁺-Antwort auf die Badapplikation von Substanz P (G). Die Charakteristik des Calciumsignals ist unterschiedlich. Astrozyt (1) zeigt mehrere Calciumoszillationen im Gegensatz zu Astrozyt (3), der einen einzigen Calciumtransienten aufweist. Beispielfhaft sind zwei weitere Astrozyten darstellt, die keine Reaktion auf die Applikation des Neuromodulators zeigen.

3.5.11 Astrozyten der VRG exprimieren den NK1-Rezeptor

Substanz P induzierten Ca^{2+} -Signalen in identifizierten Astrozyten der VRG. Um die gewonnenen physiologischen Daten durch den Nachweis des Neurokinin-1 Rezeptor (NK1-R) auf Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe zu vervollständigen wurde eine immunhistochemische Analyse in TgN(hGFAP-EGFP) Hirnstammschnitten durchgeführt (Abb. 3-22). Auch bei dieser Färbung wurde zusätzlich eine Bildstapelaufnahme mit rekonstruierter Seitenansicht angefertigt (Abb. 3-23).

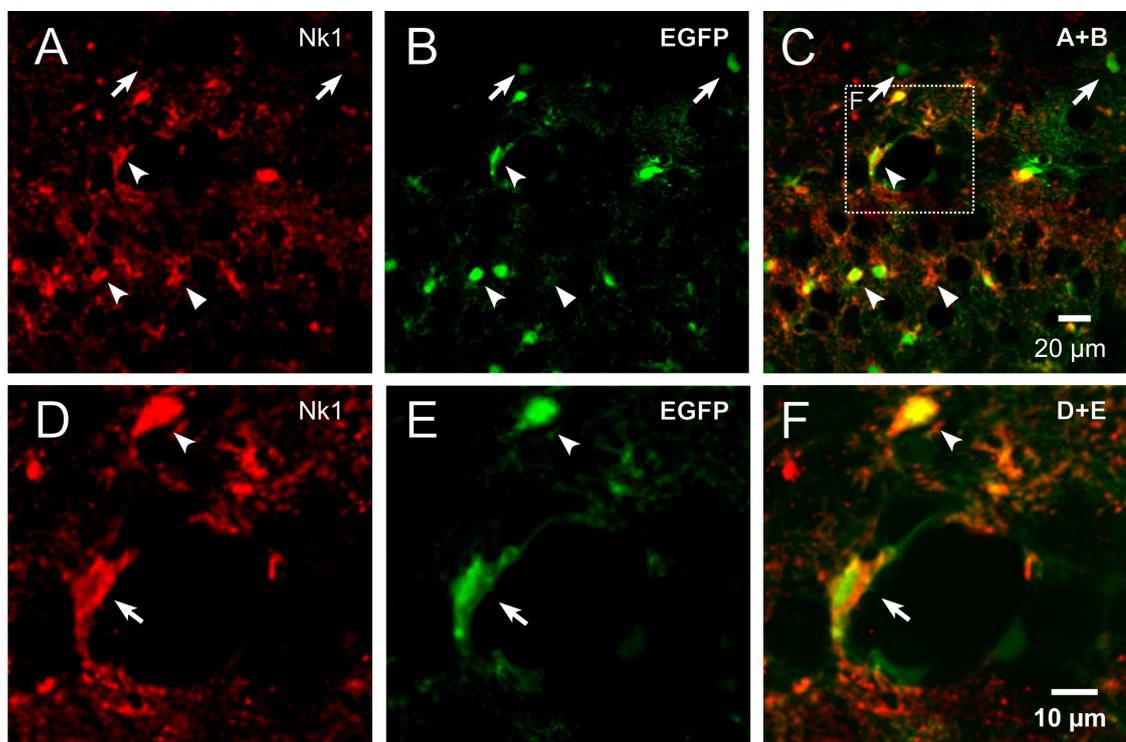


Abb. 3-22 Immunhistochemische Analyse der Expression des NK1-Rezeptors auf transgen markierten Astrozyten der VRG. Konfokale Übersichtsaufnahme einer NK1-Antikörperfärbung (A) in einem TgN(hGFAP-EGFP) Hirnschnitt (B) im Gewebereich der ventralen respiratorischen Gruppe. Abbildung (C) zeigt die Überlagerung der beiden Bilder. Zu erkennen sind mehrere TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten die eine Immunreaktivität zeigen. Beispielfhaft sind zwei NK1 positive TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten markiert (Pfeilspitzen). Zwei weitere TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten zeigen kein NK1-R Signal (Pfeile). Ein zusätzliches Signal deutet auf eine nicht transgen markierte Zelle mit Immunreaktivität hin (geschlossene Pfeilspitzen) D-F: Detailansicht der Region markiert in (C). Zu erkennen ist ein quergeschnittenes Gefäß, welches von einem NK1 positiven Astrozyten halb umwickelt wird (Pfeil). Ein weiterer immunreaktiver Astrozyt ist im oberen Bildbereich zu sehen (Pfeilspitze).

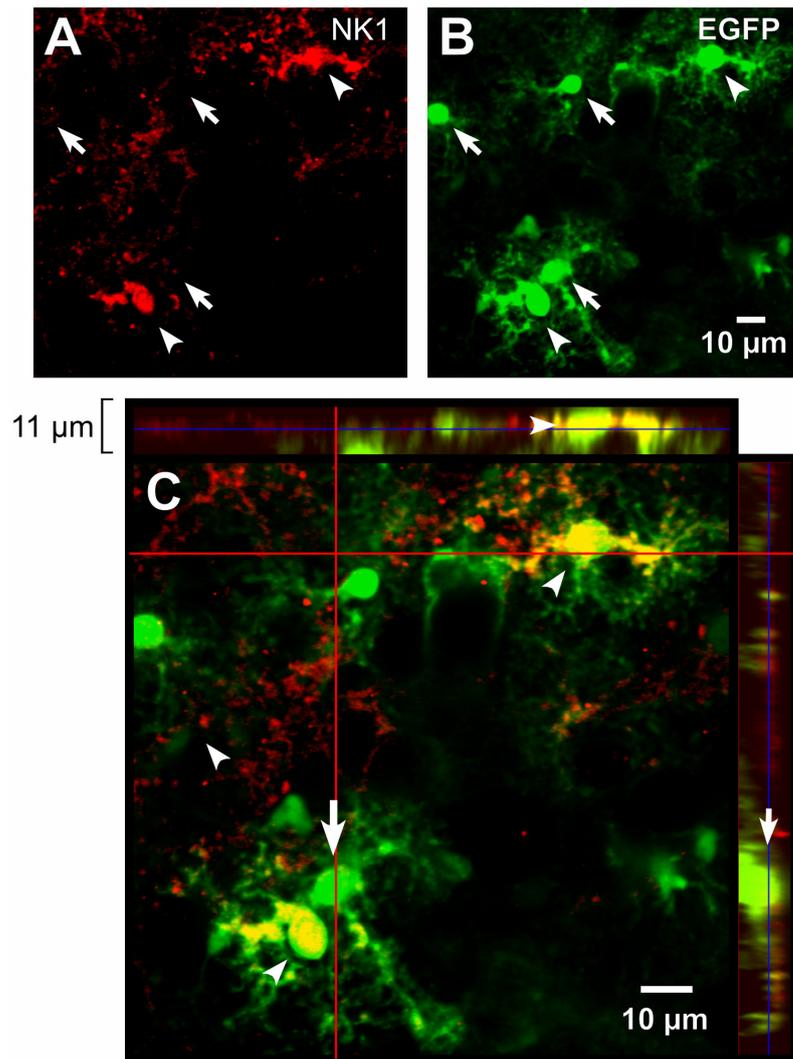


Abb. 3-23 Konfokale Bildstapelaufnahme mit rekonstruierter Seitenansicht. A-C: Konfokale Aufnahme einer NK1-Immunfärbung (A) in einem TgN(hGFAP-EGFP) Hirnstammschnitt (B). C: Bildstapelaufnahme, die am oberen und rechten Bildrand die rekonstruierte orthogonale Ansicht zu den rot markierten Linien zeigt. Die blauen Linien in den Seitenansichten markieren die Fokusebene des Bildes in der z-Achse. Die Bildstapelaufnahme zeigt zwei immunpositive TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten (Pfeilspitzen). In der Seitenansicht wird deutlich, dass der NK1-Rezeptor sowohl auf dem Soma als auch auf den Prozessen der Astrozyten exprimiert wird. Zu sehen ist auch, dass nicht alle transgen markierten Astrozyten eine Immunreaktion zeigen (Pfeile).

3.5.12 Eine Subpopulation von niedrig-[K⁺]_e identifizierten Astrozyten antwortet auf TRH und SP mit einem Ca²⁺ Signal

Entsprechend der Analyse von niedrig-[K⁺]_e identifizierten Astrozyten die auf α -methyl-5-HT antworten (siehe 3-12), wurde die Methode auch zur quantitativen Erfassung von TRH und Substanz P induzierten Ca²⁺-Antworten herangezogen. Eine Auszählung der reagierenden Zellen innerhalb der VRG in NMRI Hirnstammschnitten ergab, dass $11,8 \pm 5,5$ % (14 Schnitte, n=422 Zellen) auf TRH und $10,3 \pm 8,6$ % (12 Schnitte, n=335 Zellen) der Astrozyten auf Substanz P mit einem Ca²⁺-Signal antworteten. Eine Übersicht über die quantitativen Analyse der diskutierten Neuromodulatoren bietet Tab.3-3. Die Anzahl der gefärbten Zellen im analysierten Gesichtsfeld war bei α -methyl-5-HT ($30,2 \pm 5,4$ %), Substanz P ($27,9 \pm 7,5$) und TRH ($30,1 \pm 11,1$) annähernd gleich.

Tab.3-3 Quantitative Darstellung der Neuromodulator induzierte Ca²⁺-Antworten in niedrig-[K⁺]_e identifizierten Gliazellen. Die Experimente wurden in Gegenwart von TTX durchgeführt.

	α -methyl-5-HT (50 μ M)	Substanz P (2 μ M)	TRH (5 μ M)
Gesamtanzahl der gefärbten Zellen im Gesichtsfeld	30.2 ± 5.4 (n=9) ^a	27.9 ± 7.5 (n=12) ^a	30.1 ± 11.1 (n=14) ^a
Auf niedrig-[K ⁺] _e antwortende Zellen [%]	70.4 ± 20.1 (n=272) ^b	64.1 ± 17.5 (n=335) ^b	73.6 ± 16.4 (n=422) ^b
Auf den Neuromodulator antwortende Astrozyten [%]	30.2 ± 16.7 (n=272) ^b	10.3 ± 8.6 (n=335) ^b	11.8 ± 5.5 (n=422) ^b
Auf den Neuromodulator antwortende Zellen insgesamt [%]	30.3 ± 16.0 (n=272) ^b	12.3 ± 11.2 (n=335) ^b	13.2 ± 6.2 (n=422) ^b

Anm.: Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, der Wert in Klammern gibt die Anzahl der Schnitte (a) bzw. Zellen (b) an.

3.5.13 Die Neuromodulatoren bewirken eine Frequenzzunahme in der Summenableitung respiratorischer Aktivität im Schnittpräparat

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass α -methyl-5-HT (Pena & Ramirez, 2002), TRH (Rekling et al., 1996) und Substanz P (Pena & Ramirez, 2004) einen modulatorischen Effekt auf den respiratorischen Rhythmus haben. Um zu untersuchen, ob die verwendeten Neuromodulatoren in den verwendeten Konzentrationen innerhalb der Experimentalumgebung der vorliegende Studie auch tatsächlich einen modulatorischen Effekt auf das rhythmische Netzwerk haben, wurden Experimente am sogenannten „rhythmischen Schnitt“ durchgeführt. Dieses 650 μm bis 750 μm dicke Schnittpräparat enthält den maßgeblich Rhythmus generierenden Anteil der VRG, den Prä-Bötzinger-Komplex. Das Präparat erlaubt das respiratorische Netzwerk in einer aktiven und für mehrere Stunden vitalen Form für *in vitro* Experimente zu isolieren. Mit Hilfe einer Extrazellulärelektrode wurde an der Schnittoberfläche vom Prä-Bötzinger-Komplex die Summenaktivität respiratorisch aktiver Neurone abgeleitet (Abb.3.24). Die Badapplikation von α -methyl-5-HT führte zu einer signifikanten Zunahme der *burst* Frequenz von $0,11 \pm 0,05$ Hz auf $0,25 \pm 0,03$ Hz ($n=3$ Schnitte, $p<0,05$). Für die beiden Neuropeptide TRH und Substanz P konnte ebenfalls eine Depolarisation in der Summenaktivität respiratorisch aktiver Neurone festgestellt werden (nicht gezeigt).

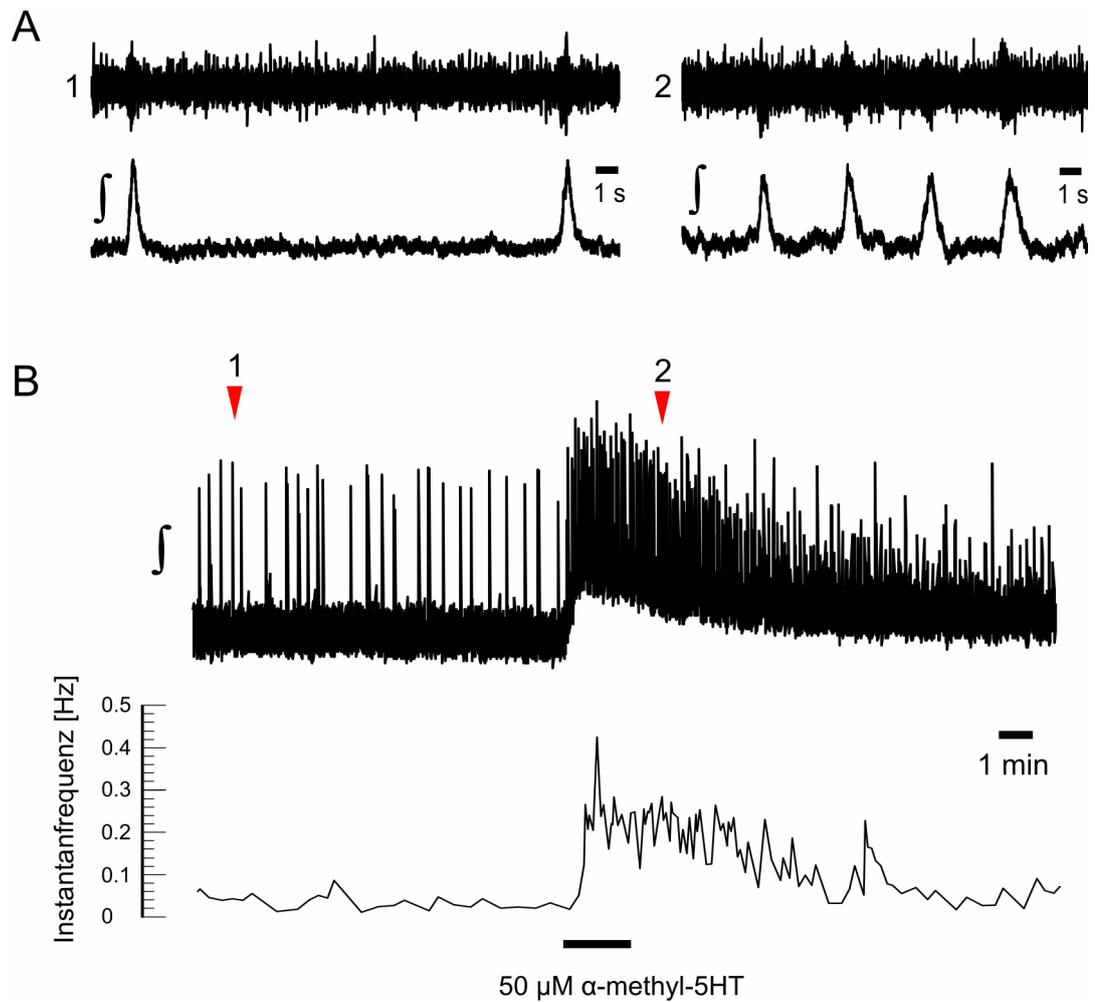


Abb. 3-24 Rhythmische Summenaktivität respiratorische Neurone im Hirnschnittpräparat. A: Extrazelluläre Ableitung aktiver Neurone des Prä-Bötzinger-Komplexes. Die untere Spur zeigt die Signale der Ableitung zeitlich integriert. **B:** Integrierte Summenaktivität vor, während und nach der Applikation von α -methyl-5-HT. Die roten Pfeile markieren die Positionen der zeitlich gestreckten Darstellung in **(A)**. Die untere Spur zeigt die Instantanfrequenz der Aufnahme. Die Badapplikation von α -methyl-5-HT führte zu einer signifikanten Zunahme der *burst* Frequenz.

4 Diskussion

4.1 Astrozyten, nicht aber Oligodendrozyten und Neurone zeigen das niedrig-[K⁺]_e induzierte Ca²⁺-Signal

Astrozyten in akuten Hirnschnittpräparaten lassen sich mit verschiedenen Methoden identifizieren. Neben dem Erfassen der Zellmorphologie, der elektrophysiologischen Messung von Strom-Spannungs-Mustern (Graß et al. 2004), der immunhistochemischen Detektion von astrozytenspezifischen Markern wie GFAP (Pekny & Pekna, 2004) oder S100β (Schäfer & Heizmann, 1996) und der Verwendung von transgenen Mauslinien (Nolte et al. 2001; Hirrlinger et al. 2005) wurde eine weitere Methode von Dallwig et al. (2000) beschrieben, welche ein „physiologisches Phänomen“ beschreibt, das zu Identifikationszwecken benutzt werden kann. Das Absenken der extrazellulären Kaliumkonzentration induziert in Astrozyten einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Das Ca²⁺-Signal wurde bisher an kultivierten Cerebellum-Astrozyten und an akuten hippocampalen Hirnschnittpräparaten der Ratte beobachtet. Die Identifikation der Zelltypen wurde in dieser Studie u.a. mit Hilfe von physiologischen Lösungen, die eine unterschiedliche Kaliumkonzentration aufwiesen, durchgeführt. Da die Identifikation nicht eindeutig war, wurde zwischen „presumed astrocytes“ und „presumed neurons“ unterschieden (vgl. Dallwig & Deitmer, 2002). In der vorliegenden Studie konnte das niedrig-[K⁺]_e induzierte Ca²⁺-Signal zum ersten Mal *in situ* in eindeutig identifizierten Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten mit Hilfe von transgenen Mausmodellen (Hirrlinger et al., 2005) untersucht werden.

Die Applikation der niedrig-[K⁺]_e Lösung führte in ca. 90% der gefärbten mRFP-Astrozyten und in ca. 85% der gefärbten EGFP exprimierenden Astrozyten zu einem Ca²⁺-Signal (Abschn.3.1). Dieses Ergebnis konnte auch von Dallwig et al. (2000) in hippocampalen Hirnschnitten beobachtet werden, in denen 88% der Astrozyten mit Ca²⁺-Signale reagierten. Die Ursache, dass nicht alle Astrozyten mit einem Ca²⁺-Signal antworten, könnte in einer heterogenen Astrozytenpopulation zu finden sein. Graß et al. (2004) charakterisierte in der TgN(hGFAP-EGFP) Maus drei verschiedene EGFP exprimierende

Astrozytenklassen. Eine dieser Gruppen, die sogenannten *outwardly rectifying Astrocytes* besitzen auswärts-gleichrichtende Kaliumströme und schwächere Kalium-Einwärtsströme. Diese Eigenschaften sprechen gegen eine Expression des einwärts gleichrichtenden Kir4.1 Kanals oder zumindest für ein sehr schwaches Expressionslevel in diesem Zelltyp. Als ein weiterer Grund kommt ein unterschiedlicher Entwicklungsstand innerhalb der Astrozytenpopulation in Frage. In einer Studie von Neusch et al. (2006) wurde eine Änderung des Expressionsmusters des Kir4.1-Kanals auf Astrozyten in der VRG in den ersten beiden postnatalen Wochen festgestellt. In Abhängigkeit vom Entwicklungsstand könnte es verschiedene Kir4.1-Expressionslevel in den einzelnen Zellen geben. Möglich wäre, dass eine kritische Kanaldichte in der Zellmembran vorhanden sein muss, damit es zu einem niedrig-[K⁺] induzierten Ca²⁺-Signal kommt. Eine Evidenz für diese Vermutung liefern die Ergebnisse aus Messungen in heterozygoten Tieren, in denen die Anzahl der antwortenden Zellen gegenüber dem WT reduziert ist, jedoch nicht den Wert erreicht, der in den Kir4.1^{-/-} Tieren beobachtet wurde (Abb.3-5). Geht man hier von einem Gen-Dosis-Effekt aus, dann ist vorstellbar, dass die Reduktion der antwortenden Zellen in einer durchschnittlich niedrigeren Kanaldichte in der Membran innerhalb der Zellpopulation begründet ist.

Um auszuschließen, dass im Hirnstamm der Maus neben Astrozyten auch Neurone auf ein Absenken des extrazellulären Kaliums mit einem Calciumsignal reagieren, wurden Kontrollmessungen in TgN(Thy1.2-EYFP) Neuronen durchgeführt. Calciummessungen ergaben, dass in keinem der gefärbten TgN(Thy1.2-EYFP) Neurone die intrazelluläre Calciumkonzentration während der Applikation von niedrig-[K⁺]_e-Lösung anstieg (Absch.3.2). Eine ähnliche Beobachtung wurde von Dallwig et al. (2000) an kultivierten Neuronen aus dem Cortex der Ratte gemacht. Allerdings besitzen Zellen in Kultur oftmals ein anderes Expressionsmuster von Membranproteinen als *in vivo* (Cai & Kimelberg, 1997; Kimelberg et al., 1997). Die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen an Neuronen erweitern den Kenntnisstand über dieses Calciumsignal mit *in situ* gewonnenen Daten.

Obwohl die mRNA der Kir4.1-Kanaluntereinheit in verschiedenen Studien in Neuronen der VRG nachgewiesen werden konnte (Jiang et al. 2001; Li et al. 2001; Bredt et al. 1995), das niedrig-[K⁺]_e induzierte Signal in TgN(Thy1.2-EYFP) Neuronen der VRG in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden. Ein Grund hierfür könnte ein heterogenes Verteilungsmuster der Kir4.1-Expression im Gehirn sein.

Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Kir4.1-Untereinheit nur in Kombination mit der Kir5.1-Untereinheit als Heteromer in Neuronen der VRG vorkommt. Es ist bekannt, daß die Kir4.1 und Kir5.1 Kanaluntereinheiten einen heteromeren Kanal, mit einer im Gegensatz zum homomeren Kir4.1-Kanal, starken Rektifizierung und pH sensitiven Eigenschaft, bilden (Tanemoto et al. 2000; Yang et al. 2000). Es konnten Kir4.1 und Kir5.1 mRNA in respiratorisch relevanten Regionen inklusive der VRG und dem prä-Bötzing-Komplex nachgewiesen werden (Wu et al., 2004). Auch belegt eine Studie von Jiang et al. (2001) die Coexpression von Kir4.1 und Kir5.1 mRNA in Neuronen des Hirnstammes.

Zur Prüfung, ob auch Oligodendrozyten niedrig-[K⁺]_e induzierte Ca²⁺-Signale zeigen, wurden in der vorliegenden Studie zum ersten Mal Ca²⁺-Messungen in TgN(PLP-DsRed1) Oligodendrozyten aus dem Hirnstamm durchgeführt (Abb. 3-3). Es konnten keine intrazellulären Ca²⁺-Anstiege in den Zellen beobachtet werden. Eine oligodendrogliale Expression der Kir4.1-Kanaluntereinheit konnte in verschiedenen Bereichen des ZNS nachgewiesen werden (Kalsi et al., 2004; Neusch et al., 2001; Poopalasundaram et al., 2000). Dabei wurde innerhalb des ZNS ein stark heterogenes Expressionsmuster beobachtet (Poopalasundaram et al., 2000). Ein Grund für das fehlende Ca²⁺-Signal in Oligodendrozyten des Hirnstamms könnte daher in einer nicht vorhandenen Expression in diesem Bereich des ZNS zu finden sein. Möglich wäre auch, wie weiter oben beschrieben, eine kritische Kanaldichte in der Zellmembran, die überschritten werden muss, damit es zu einem niedrig-[K⁺]_e induzierten Ca²⁺-Signal kommt. Neben der im Gegensatz zu Astrozyten unterschiedlichen subzellulären Expression des Kir4.1-Kanals, die sich bei Oligodendrozyten nur auf das Soma konzentriert (Kalsi et al., 2004; Poopalasundaram et al., 2000) konnte in einer Studie von Neusch et al., (2001)

auch eine entwicklungsabhängige und regional unterschiedliche Expression beobachtet werden.

Es gibt Hinweise aus Experimenten an Zellkulturen, daß an dem niedrig-[K⁺]_e induzierten Ca²⁺-Signal auch intrazelluläre Speicher beteiligt sind (Härtel et al. 2007). In verschiedenen Studien wird eine noch nicht vollständig geklärtes Antwortverhalten von Oligodendrozyten gegenüber Coffein und Ryandodin beschrieben (Kirischuk et al., 1995; Simpson et al., 1998). Möglich wäre, dass die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speicher in Oligodendrozyten anderen Regulationsmechanismen unterliegt als in Astrozyten und dies ein Grund für das Fehlen des niedrig-[K⁺]_e induzierten Ca²⁺-Signals darstellt.

4.2 Permeation von Ca²⁺ durch Kir4.1-Kanäle

In der Studie von Dallwig et al. (2000) wurde als Mechanismus für den niedrig [K⁺]_e induzierte Ca²⁺-Anstieg die Permeation von Ca²⁺ durch einwärts gleichrichtende Kanäle vorgeschlagen. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Kir4.1^{-/-}-Astrozyten *in situ* fast keine niedrig-[K⁺]_e induzierten Ca²⁺-Antworten aufweisen (Abb. 3-4, Abb. 3-5) und das Kir4.1 transfizierte CHO-K1 Zellen im Gegensatz zu nicht transfizierten CHO-K1 Zellen das niedrig-[K⁺]_e induzierte Ca²⁺-Signal zeigen (Abb.3-8; vgl. Härtel et al., 2007). Die Schlussfolgerung aus diesen Erkenntnissen ist, dass der Kir4.1-Kanal das molekulare Substrat für den cytosolischen Ca²⁺-Anstieg in Astrozyten darstellt. Vermutlich wird dieser Kanal permeabel für divalente Kationen, wenn die extrazelluläre Kaliumkonzentration abfällt. Dieser Selektivitätsverlust ist somit der wahrscheinlichste Grund für den Ca²⁺-Influx in Astrozyten, welcher es erlaubt, diesen Zelltyp darüber zu identifizieren (Dallwig & Deitmer, 2002; Beck et al. 2004). Ein bekanntes Phänomen von K⁺-Kanälen ist der Verlust der Ionenselektivität, wenn die native permeierende Ionenspezies des Kanals in der externen Lösung reduziert vorliegt oder ganz entfernt wird (Yellen 2002; Chorry & Chung 2006). Zum Beispiel zeigen spannungsgesteuerte Kv2.1 K⁺-Kanäle, die unter normalen Bedingungen eine hohe Selektivität gegenüber Kalium Ionen

besitzen, eine Leitfähigkeit für Na^+ , nachdem das extrazelluläre K^+ entfernt wurde (Korn & Ikeda, 1995).

Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe weisen eine starke Expression des schwach einwärts gleichrichtenden K^+ -Kanals Kir4.1 auf. Es konnte gezeigt werden, dass dem Kanal eine bedeutende Rolle bei der Regulation des extrazellulären K^+ zugeordnet wird (Neusch, 2006). Es war auf Grund dessen naheliegend zu spekulieren, dass eine Inaktivierung des Kir4.1-Gens eine direkte Auswirkung auf das niedrig- $[\text{K}^+]_e$ induzierte Ca^{2+} -Signal haben könnte. Die Ergebnisse der Experimente aus Kir4.1^{-/-} Hirnschnittpräparaten der vorliegenden Studie zeigen, dass der Kir4.1 Kanal tatsächlich essentiell für die Generierung dieses Ca^{2+} -Signal ist. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere Mechanismen zu dem niedrig- $[\text{K}^+]_e$ induzierten Ca^{2+} -Signal beitragen. In Kir4.1^{-/-} Hirnschnittpräparaten konnte in einigen Fällen Ca^{2+} -Antworten zum Zeitpunkt der Applikation der niedrig- $[\text{K}^+]_e$ -Lösung beobachtet werden (Abb.3-4). Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass auch andere Kanäle der Kir-Familie von Astrozyten exprimiert werden (Verkhatsky & Steinhäuser 2000), die zusätzlich in der Entstehung des Ca^{2+} -Signals involviert sind. In einer Arbeit von Horio et al. (1996) konnte dies für mRNA von Kir2.1, Kir2.2 und Kir2.3 Kanälen beobachtet werden.

In Endothelzellen führt eine Membran-Hyperpolarisation induziert durch das Erniedrigen des extrazellulären K^+ , zu einem Ca^{2+} -Influx, dem ein Ausschütten von vasoaktiven Substanzen, wie z.B. NO, folgt (He et al., 1994; Kamouchi et al. 1999). In Astrozyten könnte die Hyperpolarisation der Membran ebenfalls ein Grund für diesen Ca^{2+} -Influx in die Zelle sein, da wie erwartet, auch in Experimenten der vorliegenden Studie ein Absenken des $[\text{K}^+]_e$ zu einer Hyperpolarisation der Membran führt. Da aber auch unter kontrollierter Membranspannung im Voltage-Clamp-Modus noch niedrig- $[\text{K}^+]_e$ induzierte Ca^{2+} -Transienten beobachtet werden (Abb. 3-9), ist anzunehmen, dass allein das Entfernen von K^+ ausreicht, um eine aberrante Permeation von Ca^{2+} durch Kir4.1-Kanäle hervorzurufen. Folglich muss man annehmen, dass sich in Kir4.1 Kanälen der Selektivitäts-Filter unabhängig vom Membranpotential ändert.

4.3 Funktionelle Bedeutung des Kir4.1 vermittelten Ca^{2+} -Signals in Astrozyten

Es konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre K^+ -Konzentration durch epileptische Aktivität auf Werte nahe 2 mM absinken kann (Heinemann & Gutnick, 1979) oder durch Hypoxie induzierte Depolarisationswellen (*hypoxic spreading depression*; Roberts & Sick, 1987; Müller & Somjen, 2000) sogar darunter. Die physiologischen Mechanismen, die Änderungen in der extrazellulären K^+ -Konzentration kompensieren, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. In vor kurzem veröffentlichten Studien konnte gezeigt werden, dass der astrogliale Kir4.1-Kanal eine bedeutende Rolle in der Regulation der extrazellulären K^+ -Konzentration einnimmt (Kofuji & Newman, 2004; Neusch et al. 2006). Zusätzlich zu der K^+ -Pufferungsfunktion, die zum Tragen kommt, wenn die extrazelluläre Kaliumkonzentration ansteigt, bei z.B. erhöhter neuronaler Aktivität, sind Kir-Kanäle auch in das Absinken des extrazellulären Kaliums involviert, induziert z.B. durch die verlängerte Aktivität der Na^+/K^+ Pumpe (D'Ambrosio et al., 2002). Während die Größe des K^+ *undershoot* hauptsächlich von der Na^+/K^+ Pumpe abhängt, ist es möglich, dass Kir-Kanäle zumindest teilweise an der Kompensation des K^+ *undershoot* teilnehmen, indem sie als Mediatoren für eine Kalium-Extrusion in den perineuralen Raum fungieren (Neusch et al., 2006). Während des K^+ *undershoots* könnten niedrig- $[\text{K}^+]_e$ induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege zusätzliche K^+ -Leitfähigkeiten, wie z.B. Ca^{2+} abhängige K^+ -Kanäle, aktivieren. Solche Kanäle konnten in Astrozyten nachgewiesen werden (Verkhatsky & Steinhäuser, 2000; Gebremedhin et al., 2003; Armstrong et al., 2005; Chen et al., 1997). Die astrogliale K^+ -Extrusion, aktiviert durch astrozytäre Ca^{2+} -Oszillationen, in den perineuralen Raum, während verlängerter Na^+/K^+ -Pumpenaktivität könnte somit einen Stabilisierungsfaktor für neurale Aktivität darstellen.

Der Kir4.1-Kanäle konnte auf Astrozyten innerhalb der VRG nachgewiesen werden (Neusch et al. 2006). Vorstellbar ist, dass der oben beschriebene prinzipielle Mechanismus der Kaliumregulation auch im respiratorischen Netzwerk zur Stabilisierung der neuronalen Aktivität beiträgt. Vor diesem Hintergrund kann man das in Abb. 4-1 dargestellte hypothetische Modell postulieren, welches die funktionelle Bedeutung des Kir4.1-Kanals verdeutlicht.

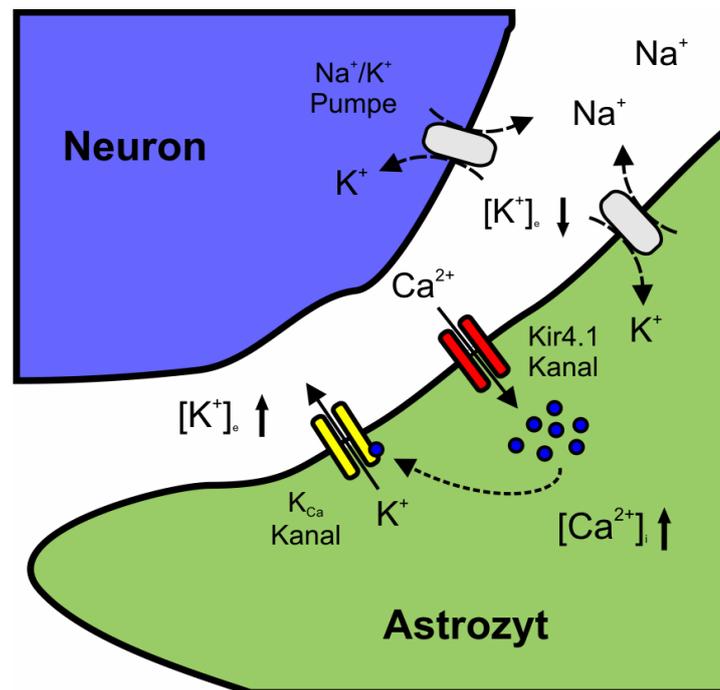


Abb.4-1 Modellvorstellung zur funktionellen Bedeutung des niedrig [K⁺]_e induzierten Ca²⁺-Signals. Ein Abfall der extrazellulären Kaliumkonzentration, z.B. verursacht durch eine verlängerte Aktivität der Na⁺/K⁺ Pumpe, induziert einen Ca²⁺ Influx durch astrozytäre Kir4.1-Kanäle. Der darauf folgende Anstieg des cytoplasmatischen Ca²⁺ aktiviert Ca²⁺ abhängige Kaliumkanäle und führt so zu einer Extrusion von Kalium aus dem Astrozyten.

4.4 Neuromodulatoren induzieren Ca²⁺-Signale in Astrozyten der VRG *in situ*

In der vorliegenden Studie sollte der Einfluss von Neuromodulatoren, die einen modulatorischen Effekt auf das respiratorischen Systems haben, auf Astrozyten untersucht werden. Calcium-Imaging-Experimente im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Agonisten über die Aktivierung spezifischer astrozytärer Rezeptoren (5HT_{2a}R, THR-R, NK1-R) Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern freisetzen.

Dass Astrozyten eine große Vielfalt von vorwiegend metabotropen Rezeptoren exprimieren, die bei Aktivierung zu einem Anstieg des cytoplasmatischen Ca^{2+} führen, konnte in verschiedenen Studien belegt werden (Porter & McCarthy, 1996; Verkhratsky & Steinhauser, 2000). Ein Großteil der Studien erfolgte an kultivierten Astrozyten und zeigte, dass Astrozyten in der Lage sind, die betreffenden Rezeptoren zu exprimieren, jedoch nicht, ob dies auch im Gewebeverband geschieht, da sich das astrogliale Expressionsmuster *in vitro* im Vergleich zu dem *in vivo* stark unterscheiden kann (Cai and Kimelberg, 1997; Kimelberg et al., 1997). Eine Schwierigkeit bei Experimenten *in situ* zur funktionellen Rezeptorexpression auf Astrozyten ist deren Identifikation. Während in früheren Studien hauptsächlich elektrophysiologische Methoden dafür verwendet wurden (Verkhratsky & Steinhauser, 2000), konnte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Calcium-Imaging-Experimenten in transgen markierten Astrozyten (Hirrlinger et al., 2005) und einer anschließenden immunhistochemischen Analyse eine funktionelle Expression von Transmitter-Rezeptoren nachgewiesen werden. Ein Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass man eine Vielzahl von eindeutig identifizierten Astrozyten gleichzeitig untersuchen kann und so eine quantitative Aussage über den Anteil der Astrozyten, die den Rezeptor funktionell exprimieren, möglich wird.

Bei der TgN(hGFAP-mRFP1) und TgN(hGFAP-EGFP) Mauslinie handelt es sich allerdings nicht um klassische *Knock-in*-Tiere, bei denen ein Gen gezielt an eine bestimmte Stelle im Genom eingebaut wurde, sondern das Transgen wurde bei diesen Tieren an einer unbekannt Stelle im Genom integriert und unterliegt somit unbekannt Regulationsmechanismen (Hirrlinger et al., 2005; Nolte et al. 2001). In der TgN(hGFAP-mRFP1) Mauslinie exprimieren daher nicht alle Astrozyten das Markerprotein (Hirrlinger et al., 2005) und durch die nicht bekannten genetischen Regulationsmechanismen ist es möglich, dass in diesem Tier eine unbeabsichtigte Vorauswahl einer Astrozytensubpopulation getroffen wurde. In früheren Studien konnten z.B. zwei Populationen von hippocampalen Astrozyten beschrieben werden, die sich in ihrer GFAP-Expression unterschieden und korreliert dazu unterschiedliche elektrophysiologische Profile besaßen (Walz & Lang, 1998; Walz & Wuttke, 1999). Diese Nachteile können mit Hilfe der

niedrig $[K^+]_e$ -Methode umgangen werden. Zusätzlich bietet diese Methode gegenüber der Verwendung der TgN(hGFAP-mRFP1) Mauslinie die Möglichkeit, eine wesentlich größere Anzahl von Astrozyten im Messbereich zu identifizieren (Abschnitt 3.5.3, Abb.3-12).

4.5 Eine Teilmenge der Astrozyten antwortet auf die Neuromodulatoren

Die in der vorliegenden Studie mit Hilfe TgN(hGFAP-mRFP1) Mauslinie und der niedrig K^+ Methode angefertigte quantitative Analyse zeigt, dass nur eine Teilmenge der gefärbten Astrozyten auf die applizierten Neuromodulatoren antwortete und es zwischen den Neuromodulatoren Unterschiede in der Anzahl der antwortenden Zellen gab (Tab.3-3). Diese Daten zeigen, dass auch bezüglich der Expression der Neuromodulator Rezeptoren keine einheitliche Zellpopulation existiert. Der Grund für diese Beobachtung könnte in dem Vorhandensein einer heterogenen Astrozytenpopulation liegen, die ein unterschiedliches Expressionsmuster für u.a. Rezeptorproteine aufweist. In einer Studie von Matthias et al. (2003) konnten in der auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten TgN(hGFAP-EGFP) Maus (Abb.3-1, A-C), die transgen markierte Astrozyten enthält, zwei verschiedene Klassen von Astroglia demonstriert werden. Die beiden Subpopulationen unterschieden sich u.a. in der Expression von Glutamat-Rezeptoren vom AMPA-Typ und Glutamat-Transportern. Ein weiterer Hinweis für eine heterogene Astrozytenpopulation speziell in der ventralen respiratorischen Gruppe liefert die schon erwähnte elektrophysiologische Studie von Graß et al. (2004), in der zwischen drei verschiedenen Klassen von Astrozyten innerhalb der VRG unterschieden wurde.

Ferner deuten Zellkultur Experimente auf eine heterogene Rezeptorexpression hin. Einen Nachweis für eine funktionelle Expression des TRH-Rezeptors in Astrozyten *in vitro* u.a aus dem Hirnstamm konnte McDermott et al. (1992) erbringen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das Expressionslevel zwischen den untersuchten Hirnregionen unterschiedlich ist und die Rezeptorexpression anscheinend auf eine Astrozytensubpopulation beschränkt ist. Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie von Marriott & Wilkin, (1993) für

den NK1 Rezeptor, die die Expression auf einer Teilmenge der untersuchten Gliazellen demonstriert. Auch Nilsson et al. (1991b) konnte über den 5HT₂-Rezeptor vermittelte Calciumsignale in corticaler Primärkultur in einer Subpopulation der untersuchten Astrozyten beobachten.

4.6 Neuromodulatoren induzierten unterschiedliche $[Ca^{2+}]_i$ -Antwortmuster

In der vorliegenden Studie konnten verschiedene Neuromodulator induzierte $[Ca^{2+}]_i$ Antwortmuster in Astrozyten beobachtet werden. Die $[Ca^{2+}]_i$ Antwortmuster waren nicht eindeutig einem Neuromodulator zuzuordnen, d.h auf die Applikation eines Neuromodulators konnten unterschiedliche $[Ca^{2+}]_i$ Kinetiken in Astrozyten beobachtet werden (Bsp. α -methyl-5-HT: vgl. Abb.3-11 vs. Abb.3-12). Die beobachteten Muster lassen sich in drei Kategorien unterteilen: 1) Mehrere aufeinanderfolgende $[Ca^{2+}]_i$ Änderungen (Oszillationen) (Bsp. Abb.3-21, Spur 1), 2) Ein einzelner kurzer, *spike*-ähnlicher $[Ca^{2+}]_i$ Transient (Bsp. Abb.3-11, Spur 3), 3) Ein länger andauernder einzelner $[Ca^{2+}]_i$ Transient (Bsp. Abb.3-21, Spur 3). Zu einem vergleichbaren Ergebnis kommt eine Studie von Bernstein et al. (1996) in Corpus Callosum Hirschnitten, in der unterschiedliche $[Ca^{2+}]_i$ Kinetiken auf die Applikation von Neuroliganden, u.a. Serotonin und Substanz P, beobachtet wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Neuromodulatoren über ein Superfusionssystem appliziert. Aufgrund des Superfusionsprinzips existiert ein Konzentrationsgradient von der Oberfläche des Schnittes in die Tiefe. Die optische Messung der Ca^{2+} -Signale erfolgte in Zellen in unterschiedlichen Schnitttiefen, so dass eine unterschiedliche Neuromodulorkonzentration an den Zellen vorgeherrscht haben könnte. Das die Transmitterkonzentration einen Einfluss auf die Anzahl der induzierten Ca^{2+} -Transienten haben kann, konnte Woods et al. (1986) in isolierten Hepatozyten zeigen. Pasti et al. (1997) konnte zeigen, dass die Frequenz von astrozytären Ca^{2+} -Oszillationen korreliert ist mit stimulierter neuronaler Aktivität. Die unterschiedlichen Antwortmuster lassen aber auch noch eine andere Interpretationen zu. Denkbar wäre, dass die $[Ca^{2+}]_i$ -Kinetiken für unterschiedliche Funktionen kodieren, die wiederum könnten

zellspezifisch vorkommen, d.h. eine gegebene Zelle kann nur ein $[Ca^{2+}]_i$ -Antwortmuster generieren. Um dies zu klären, müsste ein Neuromodulator wiederholt appliziert werden und das Antwortverhalten beobachtet werden.

4.7 Astrozyten exprimieren Rezeptoren für Serotonin, Substanz P und TRH

Es konnte gezeigt werden, dass Astrozyten in Kultur ein breites Spektrum an Transmitterrezeptoren exprimieren (Porter & McCarthy, 1997). Bisher konnte der Nachweis für eine funktionelle Expression des 5-HT_{2a}-Rezeptors in Astrozyten nur in Zellkultur erbracht werden (Deecher et al., 1993; Nilsson et al., 1991; Hagberg et al., 1998). Einen Nachweis für eine funktionelle Expression des TRH-Rezeptors in Astrozyten, u.a. des Hirnstamms, konnte McDermott et al. (1992) *in vitro* ebenfalls mit Hilfe von Zellkulturen erbringen. In einer Studie von Too et al. (1994) konnte mRNA für den NK1 Rezeptor in kultivierten Astrozyten nachgewiesen werden. Allerdings weichen, wie schon erwähnt, die Expressionsmuster kultivierter Astrozyten von denen *in situ* bzw. *in vivo* stark ab (Cai and Kimelberg, 1997; Kimelberg et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine Kombination aus funktionellem Nachweis *in situ* und einer immunhistochemische Detektion *in vivo* gewählt, um zu einem aussagekräftigerem Ergebnis zu kommen. Die immunhistochemisch gewonnenen Daten werden im folgenden Abschnitt näher diskutiert.

Insgesamt konnten drei bis dato noch nicht an Astrozyten des Hirnstammes beschriebene Rezeptoren für bekannte Neuromodulatoren des respiratorischen Systems immunhistochemisch *in vivo* detektiert werden. Die in vorangegangenen Experimenten physiologisch gewonnene Evidenz für eine Rezeptorexpression des betreffenden Neuromodulators konnten dadurch bestätigt werden.

5-HT_{2a}-Rezeptor

In der vorliegenden Arbeit konnte der 5HT_{2a}-Rezeptor zum ersten Mal immunhistochemisch *in vivo* in TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten innerhalb der ventralen respiratorischen Gruppe detektiert werden. In vorangegangenen Arbeiten konnte der 5-HT_{2a}-Rezeptor *in vivo* auf Astrozyten im Neocortex,

Hippocampus und im Rückenmark der Ratte nachgewiesen werden (Maxishima et al., 2001; Xu & Pandey, 2000).

Der 5HT_{2a} Rezeptor konnte sowohl auf den proximalen Prozessen als auch auf dem Somata der TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten beobachtet werden (Abb.3-15, G-I), wobei nicht alle TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten eine Immunreaktivität zeigten (Abb.3-15, D-F). Zusätzlich war ein schwächeres Signal vorhanden, das einer Rezeptordetektion auf nicht transgen markierten Zellen zuzuordnen ist (Abb.3-15, D-F). Eine Studie von Maxishima et al. (2001) zeigt teilweise ähnliche Ergebnisse im Rückenmark der Ratte. Auch hier wurde eine Detektion des Rezeptors auf den Somata und den proximalen Fortsätzen beobachtet, jedoch wurde auf virtuell allen immunhistochemisch GFAP-positiven Zellen ein Signal detektiert. Die in dieser Arbeit beobachtete Immunreaktivität bestätigt die physiologisch gewonnenen Daten aus den Ca²⁺-Imaging-Experimenten, die eine 5-HT_{2a}-vermittelte Ca²⁺-Antwort in nur ca. 30% der Astrozyten zeigen und unterstreicht noch einmal die Vermutung, dass betreffend der Neuromodulatorrezeptoren eine heterogene Astrozytenpopulation in der VRG existiert.

α -methyl-5-HT ist ein 5-HT_{2a} Rezeptor Agonist (Richardson et al., 1985). Die Aktivierung des G-Protein gekoppelte 5-HT_{2a} Rezeptors bewirkt eine Stimulation der Phospholipase C (PLC), die über Inositoltriphosphat (IP₃) eine Ca²⁺ Freisetzung aus intrazellulären Speichern bewirkt. Um das α -methyl-5-HT induzierte Signal näher zu untersuchen, wurde die intrazellulären Ca²⁺-Speicher durch Cyclopizonsäure (CPA), ein reversibler Inhibitor der endoplasmatischen Ca²⁺-ATPase, entleert. Die Anzahl, der auf α -methyl-5-HT antwortenden Astrozyten, war nach vorheriger Zugabe von CPA signifikant reduziert (Abb.3-13). Dieses Ergebnis zeigt, dass die intrazellulären Speicher in der Generierung des α -methyl-5-HT induzierte Ca²⁺-Signals involviert sind. Der Grund für eine verbleibende Anzahl von antwortenden Zellen könnte in nicht völlig entleerten intrazellulären Speichern zu finden sein. Hagberg et al. (1998) berichteten von zusätzlichen spannungsunabhängigen Ca²⁺-Kanälen, die in der Entstehung des 5-HT_{2a} Rezeptor vermittelten Ca²⁺ Anstiegs involviert sind und ordnete diese Kanäle aufgrund ihrer Abhängigkeit von den intrazellulären Speichern der Klasse der *store operated calcium channel* (SOCC) zu. Es ist

somit vorstellbar, dass ein Teil des α -methyl-5-HT vermittelten Ca^{2+} Signals von SOCCs getragen wird.

Thyreotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor (TRH-R)

In der vorliegenden Studie konnte der TRH-Rezeptor immunhistochemisch auf Astrozyten in der ventralen respiratorischen Gruppe *in vivo* nachgewiesen werden. Fernández-Agulló (2001) wies den Rezeptor im Rückenmark und in primärer kortikaler Astrozytenkultur nach. Eine Immunreaktivität für den TRH-R Rezeptor konnte in TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten hauptsächlich im Cytoplasma, jedoch nicht auf den Fortsätzen detektiert werden (Abb.3-19). Dabei war zu beobachten, dass nicht alle TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten ein Signal zeigen (Abb.3-19, A-C). Dieses Ergebnis geht konform mit den Daten aus den Ca^{2+} -Imaging-Experimenten, die zeigen, dass nur eine Teilmenge der Astrozyten auf TRH antwortet. Ein weiteres Signal war vorhanden, welches vermutlich nach seiner Form zu urteilen, eine cytoplasmatische Detektion des TRH-R Rezeptor, in einer oder mehrerer unbekanntem Zellpopulationen, anzeigt. Es kann nur spekuliert werden, dass diese Signale angefärbte Somata von TRH-R positiven Interneuronen sind (Abb.3-19, D-F). In einer Studie von Greer et al. (1996) konnte gezeigt werden, dass druckinjiziertes TRH in der Region des Prä-Bötzingers Komplexes zu einer Stimulierung des respiratorischen Rhythmus führt. Ergänzend dazu konnte Sun et al. 1996 immunoreaktive TRH-Fasern in der VRG detektieren. Diese Ergebnisse und die in dieser Studie gemachten Beobachtungen könnten für eine astrozytäre Beteiligung in der TRH vermittelten Modulation des respiratorischen Systems sprechen.

Neurokinin-1 Rezeptor (NK1)

Hinweise für eine Expression des NK1-Rezeptors in Astrozyten existieren bisher nur aus Studien an Primärkulturen aus der weißen Substanz (Marriott & Wilkin, 1993; Beaujouan et al. 1991;) sowie aus dem Cortex (Martin et al., 1992; Torrens et al., 1989). Eine Immunreaktivität für den NK1-Rezeptor konnte in der vorliegenden Studie sowohl auf dem Soma als auch auf den Fortsätzen der TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten detektiert werden (Abb.3-23). Auch bei dieser Färbung konnten TgN(hGFAP-EGFP) Astrozyten beobachtet werden, die keine Immunreaktivität aufweisen (Abb.3-22, A-C). Auch diese Ergebnisse bestätigen

die physiologisch gewonnenen Daten, die eine Substanz P vermittelte Ca^{2+} -Antwort in einer Teilmenge der gefärbten Astrozyten zeigen.

4.8 Funktionelle Bedeutung der induzierten Ca^{2+} Signale im respiratorischen Netzwerk

In der vorliegenden Arbeit konnte die funktionelle Expression des 5-HT_{2a} , NK1 und TRH-Rezeptors auf Astrozyten der VRG nachgewiesen werden. Die Aktivierung dieser Rezeptoren über exogen applizierte Pharmaka führt zu einer Erhöhung der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration. Ein rezeptorvermittelter Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} kann diverse Ca^{2+} , abhängige zelluläre Prozesse initiieren (Verkhatsky et al., 1998). In einer Studie von Pentreath et al. (1986) konnte gezeigt werden, dass intrazelluläre Ca^{2+} -Anstiege zu einer Erhöhung der Glykogenolyse führen. Der Hauptanteil des Hirnglykogens wird in Astrozyten gespeichert (Phelps, 1972). Eine Versorgung von Neuronen mit Substraten des Energiemetabolismus durch Astrozyten konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (Magistretti et al. 1999; Tsacopoulos, 1997). Eine direkte metabolische Kopplung von Astrozyten und Neuronen im respiratorischen Netzwerk konnten Hülsmann et al. (2000) nachweisen. In einer Studie von Poblete & Azmitia (1995) konnte dem 5-HT_{2a} Rezeptor eine Funktion in der Induktion der astrozytären Glykogenolyse zugeschrieben werden. Es ist daher vorstellbar, dass die Neuromodulator evozierten Ca^{2+} -Signale eine Steigerung der astrozytären Glykogenolyse induzieren, um den erhöhten Energiebedarf, ausgelöst durch die stimulierende Wirkung der Modulatoren auf das respiratorische Netzwerk, zu kompensieren.

Ein Anstieg des astroglialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann zu einer Modulierung von astrozytären Transportsystemen führen, wie dies von Gomez et al. (1991) für die Aufnahme von GABA demonstriert werden konnte. Die Neuromodulatoren Serotonin und Noradrenalin, die zu einem Anstieg des astroglialen intrazellulären Ca^{2+} führen (Abb. 3-11, 3-14), könnten die Kinetik astrozytärer Taurin- bzw. Glutamat-Transporter beeinflussen (Hansson et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des 5-HT_2 Rezeptors zu einer Inhibition des Taurin-Transporters

führt (Hansson et al., 1991). Dass astrozytäre Transportsysteme eine essentielle Rolle in der Stabilisierung des respiratorischen Rhythmus spielen, konnte für den Glycin-Transporter GlyT1 demonstriert werden (Gomez et al., 2003). Vor diesem Hintergrund wäre es denkbar, dass Neuromodulatoren eine indirekte Modulation der synaptischen Transmission im respiratorischen Netzwerk über astrozytäre Transportsysteme bewirken.

Eine Eigenschaft des respiratorischen Netzwerkes ist die Generierung von rhythmischen Aktionspotential-Entladungsmustern (*bursts*), die zu einer wiederholten ansteigenden extrazellulären Kaliumkonzentration führen (Richter et al., 1978; Brockhaus et al., 1993). Einer durch Neuromodulatoren induzierte gesteigerte neuronale Aktivität folgt dementsprechend ein Ansteigen der extrazellulären Kaliumkonzentration. Vortstellbar wäre, dass eine parallel dazu verlaufender Neuromodulator induzierter Anstieg des astroglialen Ca^{2+} zu einer Aktivierung von Ca^{2+} abhängigen K^+ Kanälen führt (Verkhratsky & Steinhäuser, 2000; Gebremedhin et al., 2003; Armstrong et al., 2005; Chen et al., 1997). Dadurch könnte die Kalium-Pufferungs-Kapazität erhöht werden. Es wäre denkbar, dass bei erhöhter neuronaler Netzwerkaktivität dieser hypothetische Mechanismus einen zusätzlichen Stabilisierungsfaktor darstellt.

Es ist bekannt, daß intrazelluläre Ca^{2+} -Signale in Astrozyten die Freisetzung von Gliotransmittern auslösen können (Halassa et al., 2007). In verschiedenen Studien konnte die Freisetzung von diversen astrozytären Gliotransmittern nachgewiesen werden (Parpura et al. 1994; Bezzi et al., 2001; Coco et al., 2003; Mothet et al., 2000; Zonta et al. 2003). Glutamat als astrozytärer Gliotransmitter wurde dabei am weitgehendsten untersucht (Parpura et al. 1994; Jeremic et al., 2001; Hua et al., 2004; Innocenti et al., 2000; Montana et al., 2004; Bezzi et al., 2004; Pasti et al., 2001). Die Freisetzung von astrozytärem Glutamat kann verhindert werden, indem cytoplasmatische Ca^{2+} -Anstiege blockiert werden (Araque et al., 1998a,b; Kang et al., 1998). Es ist deshalb verlockend zu spekulieren, dass die in dieser Studie beobachteten Neuromodulator induzierten Ca^{2+} -Signale zu einer Freisetzung von astrozytärem Glutamat führen, welches die synaptische Transmission im respiratorischen Netzwerk beeinflusst. Ionotrope und metabotrope Glutamat-Rezeptoren modulieren den respiratorischen

Rhythmus (Robinson and Ellenberger, 1997). Vorstellbar wäre, dass astrozytär freigesetztes Glutamat die synaptische Transmission im respiratorischen Netzwerk an der prä- oder postsynaptischen Seite beeinflussen kann, wobei denkbar ist das es auch in den synaptischen Spalt freigesetzt wird und die Transmission direkt beeinflusst (Haydon, 2001). Das von Astrozyten ausgeschüttete Glutamat könnte zu einer Synchronisierung von respiratorischen Neuronen führen, indem die Aktivität von in räumlicher Nähe zueinander liegenden Neurone durch Glutamat induzierte *slow inward currents* (SICs) aufeinander abgestimmt wird (Fellin et al., 2004; Kozlov et al., 2006; Pascual et al. 2005), wie dies für den Hippocampus gezeigt wurde (Angulo et al. 2004). In einer Studie von Halassa et al. (2007b) wurde errechnet, dass ein einzelner hippocampaler Astrozyt bis zu 140.000 Synapsen kontaktieren kann. Ein, wie in der vorliegenden Studie gezeigt, lokal auftretendes Ca^{2+} -Signal in einem einzelnen Astrozyten wäre somit in der Lage eine Vielzahl von benachbarten Neuronen im Netzwerk zu beeinflussen und evtl. zu synchronisieren. Vor diesem Hintergrund wäre das in Abb.4-2 dargestellte hypothetische Modell denkbar, welches die funktionelle Bedeutung der Neuromodulator induzierten Ca^{2+} -Signale an Synapsen innerhalb des respiratorischen Netzwerks darstellt.

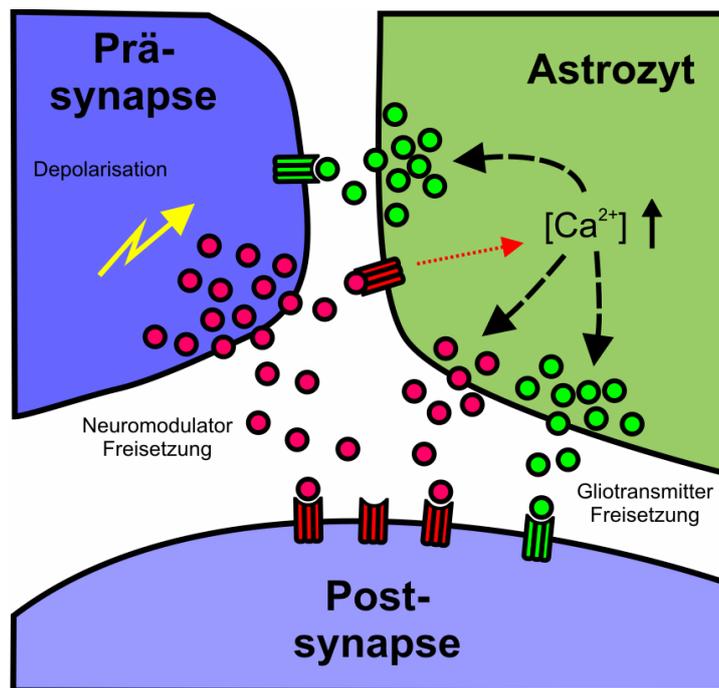


Abb.4-2 Modellvorstellung zur funktionellen Bedeutung des Neuromodulator induzierten astrozytären Ca^{2+} -Signals an der dreiteiligen Synapse im respiratorischen Netzwerk. Die präsynaptische Freisetzung eines Neuromodulators an der Dreiteiligen Synapse führt über metabotrope Rezeptoren zu einem intrazellulärem Ca^{2+} -Anstieg im Astrozyten. Dieser Ca^{2+} -Transient löst eine Freisetzung von einem Gliotransmitter aus, welcher an der prä- und postsynaptischen Seite zu einer Modulation der neuronalen Aktivität führen könnte oder direkt die synaptische Transmission beeinflusst.

Allerdings wird die Hypothese, dass Liganden-induzierte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten zu einer Gliotransmitterfreisetzung führen, die die synaptische Transmission beeinflussen, kontrovers diskutiert. Zumindest eine kürzlich veröffentlichte Studie, die eine neue transgene Mauslinie nutzt, in der ein G-Protein gekoppelter, im Gehirn der Maus nicht vorkommender Rezeptor, transgen in Astrozyten exprimiert wurde, stellte diese Hypothese in Frage. Die Aktivierung dieses Fremdrezeptors führte nicht zu der erwarteten Modulation neuronaler Aktivität (Fiacco et al., 2007), wobei letztlich nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Expression des ursprünglich in nozizeptiven Fasern im PNS der Maus vorkommenden Rezeptors, zu einer unbeabsichtigten Veränderung der Zellphysiologie und damit zu einer Beeinflussung der Ca^{2+}

vermittelten astrozytären Glutamat-Freisetzung führen könnte (Tritsch & Bergles, 2007).

4.9 Fazit

Es existieren verschiedene astrozytäre Ca^{2+} -Signale in der ventralen respiratorischen Gruppe. Ein durch den Kir4.1-Kanal vermitteltes Ca^{2+} -Signal, kann verwendet werden, um Astrozyten von Neuronen und Oligodendrozyten innerhalb der VRG zu unterscheiden. Neben diesem methodischen Nutzen ist es möglich, dass dieses Signal als ein weiterer Faktor in der Regulation der extrazellulären Kalium-Homöostase eine Rolle spielt. Neuromodulatoren induzieren über astrogliale Rezeptoren Ca^{2+} -Signale mit unterschiedlichen Kinetiken in Subpopulationen von Astrozyten innerhalb der VRG. Diese induzierten cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen können eine Vielzahl zum Teil noch nicht vollständig geklärter Funktionen besitzen, die die Möglichkeit einer Stabilisierung der neuronalen Aktivität im respiratorischen Netzwerk einschließt.

5 Zusammenfassung

Astrozyten stellen eine der größten Zellpopulation im Gehirn von Säugetieren dar und besitzen eine Form der Erregbarkeit basierend auf intrazellulären Ca^{2+} Konzentrationsänderungen. Astrozyten sind aktiv an der Integration und Modulation synaptischer Vorgänge im Gehirn beteiligt. Ziel dieser Arbeit war es Ca^{2+} -Signale in Astrozyten im Atemzentrum zu definieren und deren Bedeutung für das neuronale Netzwerk weiter aufzuklären.

Es konnte gezeigt werden, dass der einwärts gleichrichtende Kaliumkanal Kir4.1 das essenzielle molekulare Substrat für ein astrozytenspezifisches Calciumsignal darstellt, welches durch Absenken des extrazellulären Kaliums induziert wird. Mit Hilfe transgener Mäuse mit fluoreszenzmarkierten Zellpopulationen konnte das Signal *in situ* in Astrozyten, nicht aber in Neuronen und Oligodendrozyten, nachgewiesen werden.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit die funktionelle Expression von metabotropen Rezeptoren in Astrozyten des Atemzentrums nachgewiesen werden. Damit gelang erstmalig der Nachweis, dass atmungsmodulierende Neurotransmitter wie Serotonin und andere neuroaktive Substanzen mit atmungsstimulatorischer Wirkung wie Thyreotropin Releasing Hormon und Substanz P auch direkt auf Astrozyten Effekte ausüben. Über die intrazelluläre Calcium-Freisetzung, die durch 5HT_{2a} -, Neurokinin-1- und TRH-Rezeptoren vermittelt wird, besteht somit die Möglichkeit, dass Astrozyten auf eine aktivitätsabhängige Ausschüttung dieser für das respiratorische System wichtigen Neuromodulatoren reagieren und so Einfluss auf die neuronale Aktivität des respiratorischen Netzwerkes nehmen können.

6 Literaturverzeichnis

- Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, Soriano E** (2002) Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J Neurosci* 22: 9430–9444.
- Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E** (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci*. 24(31): 6920-7.
- Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buno W** (2002) Synaptically-released acetylcholine evokes Ca^{2+} elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22: 2443–2450.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG** (1998a) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10: 2129–2142.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG** (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. 22, 208-215.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG** (1998b) Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18: 6822–6829.
- Armstrong WE, Rubrum A, Teruyama R, Bond CT, Adelman JP** (2005) Immunocytochemical localization of small-conductance, calcium-dependent potassium channels in astrocytes of the rat supraoptic nucleus. *J. Comp. Neurol.* 491: 175–185.
- Beaujouan JC, Teutsch B, Saffroy M, Petitet F, Torrens Y, Glowinski J** (1991) NK-1 receptors are the only class of tachykinin receptors found on mouse cortical astrocytes. *Peptides* 12: 813–820.
- Beck A, Nieden RZ, Schneider HP, Deitmer JW** (2004) Calcium release from intracellular stores in rodent astrocytes and neurons in situ. *Cell Calcium* 35(1): 47-58.
- Bergles DE, Jahr CE** (1997) Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron* 19:1297–308.
- Bergmann C** (1875) Notiz über einige Strukturverhältnisse des Cerebellum und des Rückenmarks. *Z Rationelle Med* 360-363.
- Bernstein M, Lyons SA, Möller T, Kettenmann H** (1996) Receptor-mediated calcium signalling in glial cells from mouse corpus callosum slices. *J Neurosci Res*. 46(2):152-63.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini B, Pozzan T, Volterra A** (1998) Prostaglandins stimulate Ca^{2+} -dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281-285.
- Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, 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.
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E, Volterra A** (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7: 613–620.

- Bredt DS, Wang TL, Cohen NA, Guggino WB, and Snyder SH** (1995) Cloning and expression of two brain-specific inwardly rectifying potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6753–6757.
- 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.
- Brockhaus J, Ballanyi K, Smith JC, Richter DW** (1993) Microenvironment of respiratory neurons in the in vitro brainstem-spinal cord of neonatal rats. *J Physiol* 462: 421–445.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH** (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci.* 22(1):183-92.
- Butt AM & Kalsi A** (2006) Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial function
- Butt AM, Hamilton N, Hubbard P, Pugh M, Ibrahim M.** (2005) Synantocytes: the fifth element. *J Anat.* 207(6):695-706.
- Cai Z & Kimelberg HK** (1997) Glutamate receptor-mediated calcium responses in acutely isolated hippocampal astrocytes. *Glia* 21: 380–389.
- Calzá L, Giardino L, Ceccatelli S, Zanni M, Elde R, Hökfelt T** (1992) Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in the rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience.* 51(4): 891-909.
- Caroni P** (1997) Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J. Neurosci. Methods* 71, 3-9.
- Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ** (1991) Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6: 983–992.
- Chen J, Backus KH, Deitmer JW** (1997) Intracellular calcium transients and potassium current oscillations evoked by glutamate in cultured rat astrocytes, *J. Neurosci.* 17: 7278–7287.
- Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C** (2003) Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem* 278:1354–1362.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ** (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247: 470–473.
- Corry B & Chung SH** (2006) Mechanisms of valence selectivity in biological ion channels, *Cell Mol. Life Sci.* 63: 301–315.
- D'Ambrosio R, Gordon DS, Winn HR** (2002) Differential role of Kir channel and Na⁺/K⁺-pump in the regulation of extracellular K⁺ in rat hippocampus, *J. Neurophysiol.* 87 87–102.
- Dallwig R, Deitmer JW** (2002) Cell-type specific calcium responses in acute rat hippocampal slices. *J Neurosci Methods.* 116(1): 77-87.
- Dallwig R, Vitten H, Deitmer JW** (2000) A novel barium-sensitive calcium influx into rat astrocytes at low external potassium. *Cell Calcium* 28: 247-259.
- D'Ambrosio R, Gordon DS, Winn HR** (2002) Differential role of KIR channel and Na(+)/K(+)-pump in the regulation of extracellular K(+) in rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 87(1): 87-102

- Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ** (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron* 8: 429–440.
- Deecher DC, Wilcox BD, Dave V, Rossman PA, Kimelberg HK** (1992) Detection of 5-hydroxytryptamine receptors by radioligand binding, northern blot analysis, and Ca^{2+} responses in rat primary astrocyte cultures. *J Neurosci Res* 35: 246–256.
- Deitmer JW, Verkhratsky AJ, Lohr C** (1998) Calcium signalling in glial cells. *Cell Calcium* 24(5-6): 405-16.
- Duffy S, MacVicar BA** (1995) Adrenergic calcium signaling in astrocyte networks within the hippocampal slice. *J Neurosci.* 15(8): 5535-50.
- Fellin T, Pascual O, Gobo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G** (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43, 729–743.
- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW und Sanes JR** (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41-51.
- Fernández-Agulló T** (2001) Thyrotropin-releasing hormone and its receptor in glia. *Glia* 33(4):267-76.
- Fiacco TA, Agulhon C, Taves SR, Petravicz J, Casper KB, Dong X, Chen J, McCarthy KD** (2007) Selective stimulation of astrocyte calcium in situ does not affect neuronal excitatory synaptic activity. *Neuron.* 54(4): 611-26.
- Finkbeiner SM** (1993) Glial calcium. *Glia.* 9(2): 83-104.
- Gebremedhin D, Yamaura K, Zhang C, Bylund J, Koehler RC, Harder DR** (2003) Metabotropic glutamate receptor activation enhances the activities of two types of Ca^{2+} -activated K^+ channels in rat hippocampal astrocytes. *J. Neurosci.* 23: 1678–1687
- Giaume C & McCarthy KD** (1996) Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci.* 19: 319–325
- Gomez J, Casado M, Gimenez C, Aragon C** (1991) Inhibition of high-affinity gamma-aminobutyric acid uptake in primary astrocyte cultures by phorbol esters and phospholipase C. *Biochem J.* 275: 435-439.
- Gomez J, Hülsmann S, Ohno K, Eulenburg V, Szöke K, Richter D, Betz H** (2003) Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron* 40(4):785-96.
- Gomez J, Hülsmann S, Ohno K, Eulenburg V, Szöke K, Richter D, Betz H** (2003) Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron* 40: 785–796.
- Graß D, Pawlowski PG, Hirrlinger J, Papadopoulos N, Richter DW, Kirchhoff F, Hülsmann S** (2004) Diversity of functional astroglial properties in the respiratory network. *J. Neurosci.* 24, 1358-1365.
- Greer JJ, al-Zubaidy Z, Carter JE** (1996) Thyrotropin-releasing hormone stimulates perinatal rat respiration in vitro. *Am J Physiol.* 271: 1160-4.
- Hagberg GB, Blomstrand F, Nilsson M, Tamir H, Hansson E** (1998) Stimulation of 5-HT_{2A} receptors on astrocytes in primary culture opens voltage-independent Ca^{2+} channels. *Neurochem Int.* 32(2):153-62.

- Hagiwara S, Miyazaki S, Rosenthal NP** (1976) Potassium Current and the Effect of Cesium on this Current during Anomalous Rectification of the Egg cell Membrane of a Starfish. *J Gen Physiol.* 67(6):621-38.
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG** (2007) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med.* 13(2):54-63.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG** (2007b) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci.* 27(24): 6473-7
- Hansson E, Rönnbäck L** (1991) Receptor regulation of the glutamate, GABA and taurine high-affinity uptake into astrocytes in primary culture. *Brain Res.* 548(1-2): 215-21.
- Härtel K, Singaravelu K, Kaiser M, Neusch C, Hülsmann S, Deitmer JW** (2000) Calcium influx mediated by the inwardly rectifying K⁺ channel Kir4.1 (KCNJ10) at low external K⁺ concentration. *Cell Calcium.* 2007 Sep;42(3):271-80.
- Hatten ME, Mason CA** (1990) Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia* 46:907–916.
- Haugland RP** (2005) Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. 10th edition. Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
- Haydon PG** (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 185-193.
- He GW, Yang CQ, Wilson GJ, Rebeyka IM** (1994) Tolerance of epicardial coronary endothelium and smooth muscle to hyperkalemia. *Ann. Thorac. Surg.* 57: 682–688
- Heinemann U, Gutnick MJ** (1979) Relation between extracellular potassium concentration and neuronal activities in cat thalamus (VPL) during projection of cortical epileptiform discharge, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 47: 345–347.
- Higashi K, Fujita A, Inanobe A, Tanemoto M, Doi K, Kubo T, Kurachi Y** (2001) An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281(3): 922-31.
- Hille B** (2001) Ionic channels of Excitable Membranes. 3rd ed. Sutherland, Sinauer; p.131–67.
- Hirrlinger J, Hülsmann S, Kirchhoff F** (2004) Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. *Eur J Neurosci.* 20(8): 2235-9.
- Hirrlinger PG, Scheller A, Braun C, Quintela-Schneider M, Fuss B, Hirrlinger J, Kirchhoff F** (2005) Expression of reef coral fluorescent proteins in the central nervous system of transgenic mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 30 (2005) 291 – 303.
- Horio Y, Morishige K, Takahashi N and Kurachi Y** (1996) Differential distribution of classical inwardly rectifying potassium channel mRNAs in the brain: comparison of IRK2 with IRK1 and IRK3. *FEBS Lett* 379, 239 – 243
- Hua X, Malarkey EB, Sunjara V, Rosenwald SE, Li WH, Parpura V** (2004) Ca²⁺-dependent glutamate release involves two classes of endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores in astrocytes. *J Neurosci Res* 76: 86–97.
- Hülsmann S, Oku Y, Zhang W, Richter DW** (2000) Metabolic coupling between glia and neurons is necessary for maintaining respiratory activity in transverse medullary slices of neonatal mouse. *Eur J Neurosci* 12: 856–862.
- Innocenti B, Parpura V, Haydon PG** (2000) Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *J Neurosci* 20:1800–1808.

- Ishii M, Horio Y, Tada Y, Hibino H, Inanobe A, Ito M, Yamada M, Gotow T, Uchiyama Y, Kurachi Y** (1997) Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, KAB-2/Kir4.1, on mammalian retinal Müller cell membrane: their regulation by insulin and laminin signals. *J Neurosci.* 17(20): 7725-35.
- Isomoto S, Kondo C, Kurachi Y** (1997) Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function. *Jpn J Physiol.* 47: 11–39.
- Jabs R, Kirchhoff F, Kettenmann H, Steinhäuser C.** (1994) Kainate activates Ca^{2+} -permeable glutamate receptors and blocks voltage-gated K^+ currents in glial cells of mouse hippocampal slices. *Pflugers Arch.* 426(3-4):310-9.
- Jeremic A, Jeftinija K, Stevanovic J, Glavaski A, Jeftinija S** (2001) ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes. *J Neurochem* 77: 664–675.
- Jiang C, Xu H, Cui N, and Wu J** (2001) An alternative approach to the identification of respiratory central chemoreceptors in the brainstem. *Respir Physiol* 129: 141–157.
- Kalsi AS, Greenwood K, Wilkin G, Butt AM** (2004) Kir4.1 expression by astrocytes and oligodendrocytes in CNS white matter: a developmental study in the rat optic nerve. *J Anat.* 204(6): 475-85.
- Kamouchi M, Philipp S, Flockerzi V, Wissenbach U, Mamin A, Raeymaekers L, Eggermont J, Droogmans G, Nilius B** (1999) Properties of heterologously expressed hTRP3 channels in bovine pulmonary artery endothelial cells, *J. Physiol.* 518: 345–358.
- Kandel E, Schwartz J, Jessel T** (2000) *Principles of Neural Science.* 4th Ed. New York: McGraw–Hill; 2000. p. 20.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M** (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1: 683–692.
- Kettenmann H & Ransom BR** (2005). *Neuroglia.* 2nd ed. Oxford University Press.
- Kimelberg HK, Cai Z, Rastogi P, Charniga CJ, Goderie S, Dave V, Jalonen TO** (1997) Transmitter-induced calcium responses differ in astrocytes acutely isolated from rat brain and in culture. *J. Neurochem.* 68: 1088–1098.
- Kirischuk S, Scherer J, Moller T, Verkhratsky A, Kettenmann H** (1995) Subcellular heterogeneity of voltage-gated Ca^{2+} channels in cells of the oligodendrocyte lineage. *Glia* 13: 1–12.
- Kirischuk S, Tuschick S, Verkhratsky A, Kettenmann H** (1996) Calcium signalling in mouse Bergmann glial cells mediated by alpha1-adrenoreceptors and H1 histamine receptors. *Eur J Neurosci.* 8(6):1198-208.
- Kofuji P & Newman EA** (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129: 1045–56.
- Kofuji P, Biedermann B, Siddharthan V, Raap M, Iandiev I, Milenkovic I, Thomzig A, Veh RW, Bringmann A, Reichenbach A** (2002) Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. *Glia* 39(3): 292-303.
- Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, Newman EA** (2000) Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci* 20: 5733-5740.
- Korn SJ & Ikeda SR** (1995) Permeation selectivity by competition in a delayed rectifier potassium channel. *Science* 269: 410–412.

- Kozlov AS, Angulo MC, Audinat E, Charpak S** (2006) Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 03(26): 10058-63.
- Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK** (1966) Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29: 768–87.
- Kulik A, Haentzsch A, Luckermann M, Reichelt W, Ballanyi K** (1999) Neuron-glia signaling via α 1-adrenoceptor-mediated Ca^{2+} release in Bergmann glial cells in situ. *J Neurosci* 19:8401–8408.
- Langley D & Pearce B** (1994) Ryanodine-induced intracellular calcium mobilization in cultured astrocytes. *Glia* 12: 128-134.
- Latour I, Gee CE, Robitaille R, Lacaille JC** (2001) Differential mechanisms of Ca^{2+} responses in glial cells evoked by exogenous and endogenous glutamate in rat hippocampus. *Hippocampus* 11:132–145.
- Li L, Head V, and Timpe LC** (2001) Identification of an inward rectifier potassium channel gene expressed in mouse cortical astrocytes. *Glia* 33: 57–71, 2001.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG** (1999) Energy on demand. *Science* 283: 496–497.
- Marder E & Bucher D** (2007) Understanding circuit dynamics using the stomatogastric nervous system of lobsters and crabs. *Annu Rev Physiol*. 69:291-316.
- Marriott DR & Wilkin GP** (1993) Substance P receptors on O-2A progenitor cells and type-2 astrocytes in vitro. *J Neurochem*. 61(3): 826-34.
- Martin FC, Charles AC, Sanderson MJ, Merrill JE** (1992) Substance P stimulates IL-1 production by astrocytes via intracellular calcium. *Brain Res* 599: 13–18.
- Matthias K, Kirchhoff F, Seifert G, Huttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhäuser C** (2003) Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J. Neurosci*. 23, 1750-1758.
- Matyash V, Filippov V, Mohrhagen K, Kettenmann H** (2001) Nitric oxide signals parallel fiber activity to Bergmann glial cells in the mouse cerebellar slice. *Mol Cell Neurosci* 18:664–670.
- Maxishima M, Shiga T, Shutoh F, Hamada S, Maeshima T, Okado N** (2001) Serotonin 2A receptor-like immunoreactivity is detected in astrocytes but not in oligodendrocytes of rat spinal cord. *Brain Res*. 889(1-2): 270-3.
- McDermott AM, Dickinson SL, Wilkin GP** (1992) Thyrotropin releasing hormone (TRH) and a degradation stabilized analogue (RX77368) stimulate phosphoinositide turnover in cultured astrocytes in a regionally specific manner. *Neurochem Int*. 20(3): 307-13.
- Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X, Parpura V** (2004) Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 24: 2633–2642.
- Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G** (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 5606–5611.
- Müller M & Somjen GG** (2000) Na^+ and K^+ concentrations, extra- and intracellular voltages, and the effect of TTX in hypoxic rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol*. 83 (2000) 735–745.

- Mutolo D, Bongiani F, Carfi M, Pantaleo T** (1999) Respiratory responses to thyrotropin-releasing hormone microinjected into the rabbit medulla oblongata. *Am J Physiol.* 277:1331-8.
- Muyderman H, Hansson E, Nilsson M** (1997) Adrenoceptor-induced changes of intracellular K^+ and Ca^{2+} in astrocytes and neurons in rat cortical primary cultures. *Neurosci Lett.* 28: 238(1-2):33-6.
- Nagelhus EA, Mathiesen TM, Ottersen OP** (2004) Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 129(4):905-13.
- Nett WJ, Oloff SH, McCarthy KD** (2002) Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiol.* 87(1):528-37.
- Neusch C, Papadopoulos N, Müller M, Maletzki I, Winter SM, Hirrlinger J, Handschuh M, Bähr M, Richter DW, Kirchhoff F, Hülsmann S** (2006) Lack of the Kir4.1 channel subunit abolishes K^+ buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K^+ regulation. *J. Neurophysiol.* 95: 1843–1852.
- Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester HA, Kofuji P** (2001) Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J Neurosci.* 21(15):5429-38.
- Newman EA** (1986) High potassium conductance in astrocyte endfeet. *Science* 233:453-4.
- Newman EA, Frambach DA, Odette LL** (1984) Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K^+ siphoning. *Science* 225:1174–1175.
- Newman EA, Frambach DA, Odette LL** (1984) Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K^+ siphoning. *Science* 225: 1174–5.
- Nichols CG, Lopatin AN** (1997) Inward rectifier potassium channels. *Ann Rev Physiol.* 59: 171–91.
- Niggel J, Sigurdson W, Sachs F** (2000) Mechanically induced calcium movements in astrocytes, bovine aortic endothelial cells and C6 glioma cells. *J Membr Biol.* 15;174(2):121-34.
- Nilsson M, Hansson E, Rönnbäck L** (1991) Adrenergic and 5-HT₂ receptors on the same astroglial cell. A microspectrofluorimetric study on cytosolic Ca^{2+} responses in single cells in primary culture. *Brain Res Dev Brain Res.* 63(1-2): 33-41.
- Nilsson M, Hansson E, Rönnbäck L** (1991) Heterogeneity among astroglial cells with respect to 5HT-evoked cytosolic Ca^{2+} responses. A microspectrofluorimetric study on single cells in primary culture. *Life Sci.* 49(18): 1339-50.
- 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.
- Olsen ML, Higashimori H, Campbell SL, Hablitz JJ, Sontheimer H** (2006) Functional expression of Kir4.1 channels in spinal cord astrocytes. *Glia* 53: 516–528
- Onimaru H, Shamoto A, Homma I** (1998) Modulation of respiratory rhythm by 5-HT in the brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Pflügers Arch.* 435(4): 485-94.
- Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW** (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29: 788–806.

- Palay SL & Chan-Palay V** (1974) Cerebellar Cortex, Cytology and Organization. Stuttgart and New York: Springer-Verlag, pp. 288-311.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG** (1994) Glutamate-mediated astrocyte–neuron signalling. *Nature* 369, 744–747.
- Parri HR, Gould TM, Crunelli V** (2001) Spontaneous astrocytic Ca^{2+} oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci.* 4(8): 803-12.
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG** (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310: 113–116.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G** (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 17: 7817–7830.
- Pasti L, Zonta M, Pozzan T, Vicini S, Carmignoto G** (2001) Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J Neurosci* 21:477–484.
- Pastor A, Chvátal A, Syková E, Kettenmann H.** (1995) Glycine- and GABA-activated currents in identified glial cells of the developing rat spinal cord slice. *Eur J Neurosci.*7(6):1188-98.
- Pekny M & Pekna M.** (2004) Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol* 204, 428-437.
- Pena F & Ramirez JM** (2004) Substance P mediated modulation of pacemaker properties in the mammalian respiratory network. *J. Neurosci.* 24, 7549–7556.
- Peña F, Ramirez JM** (2002) Endogenous activation of serotonin-2A receptors is required for respiratory rhythm generation in vitro. *J Neurosci.* 22(24):11055-64.
- Pentreath VW, Seal LH, Morrison JH, Magistretti PJ** (1986) Transmitter mediated regulation of energy metabolism in nervous tissue at the cellular level. *Neurochem Int* 9: 1-10.
- Phelps CH** (1972) Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain. An electron microscopic study. *Brain Res.* 39(1): 225-34.
- Poblete JC & Azmitia EC** (1995) Activation of glycogen phosphorylase by serotonin and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in astroglial-rich primary cultures: involvement of the 5-HT_{2A} receptor. *Brain Res.*680(1-2): 9-15.
- Poopalasundaram S, Knott C, Shamotienko OG, Foran PG, Dolly JO, Ghiani CA, Gallo V, Wilkin GP** (2000) Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K^+ channel, Kir4.1, in adult rat CNS. *Glia* 30: 362–72.
- Porter JT & McCarthy KD** (1995) Adenosine receptors modulate $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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.
- Porter JT & McCarty KD** (1997). Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 51:439-455.
- Ramirez JM, Quellmalz UJ, Richter DW** (1996) Postnatal changes in the mammalian respiratory network as revealed by the transverse brainstem slice of mice. *J Physiol* 491: 799-812.

- Ramirez JM, Schwarzacher SW, Pierrefiche O, Olivera BM, and Richter DW** (1998) Selective lesioning of the cat pre-Botzinger complex in vivo eliminates breathing but not gasping. *J Physiol* 507: 895–907
- Reimann F, Ashcroft FM** (1999) Inwardly rectifying potassium channels. *Curr Opin Cell Biol* 11: 503–508.
- Rekling JC, Champagnat J, Denavit-Saubié M** (1996) Thyrotropin-releasing hormone (TRH) depolarizes a subset of inspiratory neurons in the newborn mouse brain stem in vitro. *J Neurophysiol.* 75(2): 811-9.
- Richardson BP, Engel G, Donatsch P, Stadler PA** (1985) Identification of serotonin m-receptor subtypes and their specific blockade by a new class of drugs. *Nature* 316, 126–131.
- Richter DW & Spyer KM** (2001) Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models. *Trends Neurosci* 24: 464–472.
- Richter DW, Camerer H, Sonnhof U** (1978) Changes in extracellular potassium during the spontaneous activity of medullary respiratory neurones. *Pflügers Arch* 376: 139–149.
- Richter DW, Manzke T, Wilken B, Ponimaskin E** (2003) Serotonin receptors: guardians of stable breathing. *Trends Mol Med.* 9(12):542-8.
- Roberts EL & Sick TJ** (1987) Recovery of synaptic transmission predicted from extracellular K⁺ undershoots following brief anoxia in hippocampal slices, *Brain Res.* 402 (1987) 178–181
- Robinson D & Ellenberger H** (1997) Distribution of N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunits on respiratory motor and premotor neurons in the rat. *J Comp Neurol* 389: 94–116.
- Ruppersberg JP** (2000) Intracellular regulation of inward rectifier K⁺ channels. *Pflügers Arch.* 441: 1–11.
- Schäfer BW, Heizmann CW** (1996) The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 21:134–140.
- Schultze M** (1866) *Zur Anatomie und Physiologie der Retina* (Cohen & Sohn, Bonn, Germany).
- Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C** (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7:194 –206.
- Shelton MK & McCarthy KD** (1999) Hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors in situ. *Glia* 26(1):1-11.
- Simpson PB, Holtzclaw LA, Langley DB, Russell JT** (1998) Characterization of ryanodine receptors in oligodendrocytes, type 2 astrocytes, and O-2A progenitors. *J Neurosci Res.* 52(4):468-82.
- Slezak M, Pfrieger FW** (2003) New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 26: 531-535.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, and Feldman JL** (1991) Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254: 726-729.
- Somjen GG** (2001) Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev* 81:1065–1096.

- Sontheimer H** (1994) Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia* 11: 156–72.
- Steinhäuser C, Berger T, Frotscher M, Kettenmann H** (1992) Heterogeneity in the Membrane Current Pattern of Identified Glial Cells in the Hippocampal Slice. *Eur J Neurosci.* 992;4(6):472-484.
- Steinhäuser C, Jabs R, Kettenmann H.** (1994) Properties of GABA and glutamate responses in identified glial cells of the mouse hippocampal slice. *Hippocampus.* 4(1):19-35.
- Sun QJ, Llewellyn-Smith I, Minson J, Arnolda L, Chalmers J, Pilowsky P** (1996) Thyrotropin-releasing hormone immunoreactive boutons form close appositions with medullary expiratory neurons in the rat. *Brain Res.* 715(1-2):136-44.
- Szöke K, Härtel K, Grass D, Hirrlinger PG, Hirrlinger J, Hülsmann S** (2006) Glycine transporter 1 expression in the ventral respiratory group is restricted to protoplasmic astrocytes. *Brain Res.* 2006 Nov 13;1119(1):182-9.
- Takumi T, Ishii T, Horio Y, Morishige K, Takahashi N, Yamada M, Yamashita T, Kiyama H, Sohmiya K, Nakanishi S** (1995) A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. *J Biol Chem.* 270(27): 16339-46.
- Tanemoto M, Kittaka N, Inanobe A, Kurachi Y** (2000) In vivo formation of a proton-sensitive K⁺ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J Physiol* 525: 587-592.
- Thomas D, Tovey SC, Collins TJ, Bootman MD, Berridge MJ, Lipp P** (2000) A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell Calcium* 28 (4), 213–223.
- Too HP, Marriott DR, Wilkin GP** (1994) Preprotachykinin-A and substance P receptor (NK1) gene expression in rat astrocytes in vitro. *Neurosci Lett.* 182(2):185-7.
- Torrens Y, Daguet De Montety MC, el Etr M, Beaujouan JC, Glowinski J** (1989) Tachykinin receptors of the NK1 type (substance P) coupled positively to phospholipase C on cortical astrocytes from the newborn mouse in primary culture. *J Neurochem.* 52(6): 1913-8.
- Tritsch NX & Bergles DE** (2007) Defining the role of astrocytes in neuromodulation. *Neuron.* 54(4): 497-500.
- Tsacopoulos M, Poitry-Yamate CL, Poitry S, Perrottet P, Veuthey AL** (1997) The nutritive function of glia is regulated by signals released by neurons. *Glia* 21(1): 84-91.
- Tsuchihashi H, Maruyama K, Baba S, Mano F, Kinami J, Nagatomo T** (1991) Comparison of alpha 1-adrenoceptors between rat brain and spleen. *Jpn J Pharmacol.* 56(4):523-30.
- Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H** (1998). Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* 78: 99-141.
- Verkhratsky A, Steinhäuser C.** (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res Rev.* 2000; 32: 380–412.
- Viemari JC & Ramirez JM** (2006) Norepinephrine differentially modulates different types of respiratory pacemaker and nonpacemaker neurons. *J Neurophysiol.* 95(4):2070-82.
- Virchow R** (1846) Über das granuliert Aussehen der Wandungen der Gehirnvventrikel. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medicin* 3: 242-250.
- Wallraff A, Odermatt B, Willecke K, Steinhäuser C.** (2004) Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia.* 48(1):36-43.

- Walz W, Lang MK** (1998) Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 257(3):127-30.
- Walz W, Wuttke WA** (1999) Independent mechanisms of potassium clearance by astrocytes in gliotic tissue. *J Neurosci Res.* 56(6):595-603.
- Westenbroek RE, Bausch SB, Lin RC, Franck JE, Noebels JL, Catterall WA** (1998) Upregulation of L-Type Ca²⁺ Channels in Reactive Astrocytes after Brain Injury, Hypomyelination, and Ischemia. *J. Neurosci.* 18:2321-2334.
- Wight PA, Duchala CS, Readhead C und Macklin WB** (1993) A myelin proteolipid protein-LacZ fusion protein is developmentally regulated and targeted to the myelin membrane in transgenic mice. *J. Cell Biol.* 123: 443-454.
- Woods NM, Cuthbertson KS, Cobbold PH** (1986) Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature.* 319: 600-2.
- Wu J, Xu H, Shen W, and Jiang C** (2004) Expression and coexpression of CO₂-sensitive Kir channels in brainstem neurons of rats. *J Membr Biol* 197: 179–191.
- Xu T, Pandey SC** (2000) Cellular localization of serotonin(2A) (5HT(2A)) receptors in the rat brain. *Brain Res Bull.* 51(6):499-505.
- Yang F, Moss LG, Phillips GN Jr.** (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14, 1246-1251.
- Yang Z, Xu H, Cui N, Qu Z, Chanchevalap S, Shen W, Jiang C** (2000) Biophysical and molecular mechanisms underlying the modulation of heteromeric Kir4.1-Kir5.1 channels by CO₂ and pH. *J Gen Physiol.* 116(1):33-45.
- Yellen G** (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419 (2002) 35–42
- Young JK, Dreshaj IA, Wilson CG, Martin RJ, Zaidi SI, Haxhiu MA** (2005) An astrocyte toxin influences the pattern of breathing and the ventilatory response to hypercapnia in neonatal rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 147(1): 19-30.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G** (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6: 43–50.
- Zur Nieden R, Deitmer JW** (2006) The role of metabotropic glutamate receptors for the generation of calcium oscillations in rat hippocampal astrocytes in situ. *Cereb Cortex.* 16(5): 676-87.

Anhang A: Abbildungsverzeichnis

- Abb.1-1** Schematische Darstellung der Dreiteiligen Synapse (*Tripartite synapse*).
- Abb.1-2** Calciumhomöostase in Astrozyten.
- Abb.2-1** Eigenschaften von Oregon Green 488 BAPTA-1 AM.
- Abb.2-2** Darstellung der anatomischen Lage der ventralen respiratorischen Gruppe (VRG) innerhalb des Gehirns der Maus.
- Abb.2-3** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für optische und elektrophysiologische Messungen.
- Abb.2-4** Vergleich des Auswertungsbereiches im CCD-Bild mit der Ausleuchtung eines standardisierten Fluoreszenzpräparates.
- Abb.2-5** Schematische Darstellung des Spannungsprotokolls zur Aufnahme von Strom-Spannungs-Mustern bei Astrozyten
- Abb.3-1** Niedrig-[K⁺]_e induzierte Calciumsignale in transgen markierten Astrozyten der VRG.
- Abb.3-2** Calciummessungen in akuten TgN(Thy1.2-EYFP) Hirnschnitten.
- Abb.3-3** Calciummessungen in akuten TgN(PLP-DsRed1) Hirnschnitten.
- Abb.3-4** Gegenüberstellung von niedrig-[K⁺]_e induzierten Calciumsignalen in akuten Hirnschnitten einer Wildtyp- und einer Kir4.1^{-/-}-Maus.
- Abb.3-5** Statistische Analyse des niedrig-[K⁺]_e induzierten Ca²⁺ Signals in Wildtyp, Heterozygoten und Kir4.1^{-/-} Hirnstammschnitten.
- Abb.3-6** Glutamat evozierte Calciumsignale als Teststimulus zur Überprüfung der Calciumhomeöostase.
- Abb.3-7** Die Transfektion des Kir4.1-EGFP-Plasmids in CHO-K1 und COS-7 Zellkulturen führt zur funktionellen Expression der Kir4.1 Kanaluntereinheit.
- Abb.3-8** Calciummessungen in nativen und Kir4.1-EGFP transfizierten CHO Zellen.
- Abb.3-9** Simultane Calcium- und whole-cell-voltage-clamp-Messung an mRFP1 markierten Astrozyten der VRG.
- Abb.3-10** 5-HT und α -methyl-5-HT induzierte Calciumsignale in TgN (hGFAP-mRFP1) Astrozyten der VRG.
- Abb.3-11** 5-HT und α -methyl-5-HT induzierte Calciumsignale in TgN (hGFAP-mRFP1) Astrozyten der VRG in Gegenwart von TTX.
- Abb.3-12** Quantitative Analyse der α -methyl-5-HT induzierte Calciumsignale in Wildtyp Hirnstammschnitten.
- Abb.3-13** CPA führt zu einer Reduktion der auf α -methyl-5-HT antwortenden Astrozyten.
- Abb.3-14** Noradrenalin induziert Calciumsignale in Astrozyten der VRG.
- Abb.3-15** Immunhistochemische Analyse der Expression des 5-HT_{2a}-Rezeptors auf transgen markierten Astrozyten der VRG.
- Abb.3-16** Konfokale Bildstapel Aufnahme mit rekonstruierter Seitenansicht.

-
- Abb.3-17** TRH und Substanz P induzierte Calciumsignale in TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten der VRG.
- Abb.3-18** TRH induziert Calciumoszillationen in TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten der VRG in Gegenwart von TTX.
- Abb.3-19** Immunhistochemische Analyse der Expression des TRH-Rezeptors auf transgen markierten Astrozyten der VRG.
- Abb.3-20** Konfokale Bildstapelaufnahme mit rekonstruierter Seitenansicht.
- Abb.3-21** Substanz P induziert Calciumoszillationen in TgN(hGFAP-mRFP1) Astrozyten der VRG in Gegenwart von TTX.
- Abb.3-22** Immunhistochemische Analyse der Expression des NK1-Rezeptors auf transgen markierten Astrozyten der VRG.
- Abb.3-23** Konfokale Bildstapelaufnahme mit rekonstruierter Seitenansicht.
- Abb.3-24** Rhythmische Summenaktivität respiratorische Neurone im Hirnschnitt-präparat.
- Abb.4-1** Modellvorstellung zur funktionellen Bedeutung des niedrig- $[K^+]_e$ induzierten Ca^{2+} Signals.
- Abb.4-2** Modellvorstellung zur funktionellen Bedeutung des Neuromodulator induzierten astrozytären Ca^{2+} -Signals an der Dreiteiligen Synapse im respiratorischen Netzwerk.

Anhang B: Tabellenverzeichnis

- Tab.2-1** Zusammensetzung der Superfusionslösungen
- Tab.2-2** Zusammensetzung der Pipettenlösungen
- Tab.2-3** Zusammensetzung der Pufferlösungen
- Tab.2-4** Übersicht primärer AK , dazugehörigen sekundären AK und deren Verdünnungen
- Tab.2-5** Übersicht der verwendeten Fluorochrome und der dazugehörigen Filtersätze
- Tab.3-1** Übersicht der gemessenen Parameter zu den niedrig $[K^+]_e$ induzierten Ca^{2+} Antworten in akuten Hirnstamm-, Hippocampus- (CA1) und Cortex-schnitten.
- Tab.3-2** Prozentualer Anteil gefärbten Zellen, die auf die Applikation von 1 mM Glutamat in WT und Kir4.1 KO Hirnschnittpräparaten antworten.
- Tab.3-3** Quantitative Darstellung der Neuromodulator induzierte Ca^{2+} Antworten in niedrig $[K^+]_e$ identifizierten Gliazellen. Die Experimente wurden in Gegenwart von TTX durchgeführt.

Anhang C: Abkürzungsverzeichnis

$[Ca^{2+}]_e$	Calciumkonzentration im Extrazellulärraum
$[Ca^{2+}]_i$	Calciumkonzentration intrazellulär
5-HT	5-Hydroxytryptamin
ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
AK	Antikörper
AM	Acetoxymethylester
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
CCD	<i>charge-coupled-device</i>
CHO-K1	Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters
COS-7	Zelllinie aus der afrikanischen grünen Meerkatze
CPA	<i>cyclopiazonic acid</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
F	Fluoreszenzintensität
F ₀	Fluoreszenzintensität zu Beginn einer Messung
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFAP	Gliales fibrilläres saures Protein
Glu	Glutamat
HBSS	<i>Hank`s Balanced Salt Solution</i>
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Kir4.1 ^{-/-}	Kir4.1 <i>Knock-out</i> -Maus
KOH	Kaliumhydroxid
mRFP	<i>monomeric red fluorescent protein 1</i>
n	Anzahl
NA	Numerische Apertur
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid

NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NK1	Neurokinin-1 Rezeptor
P	Postnataler Tag
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PLC	Phospholipase C
PNS	Peripheres Nervensystem
RMP	Ruhemembranpotential
ROI	<i>region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodinrezeptor
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SP	Substanz P
TRH	<i>Thyreotropin Releasing Hormon</i>
TTX	Tetrodotoxin
VC	<i>voltage-clamp</i>
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben.

Zu allererst möchte ich mich bei Priv. Doz. Dr. Swen Hülsmann für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung und die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Für die technische Unterstützung bedanke ich mich bei Anja-Annett Grützner.

Ich danke den Mitarbeitern der Feinmechanik- und Elektronikwerkstatt besonders Herrn Gräbe und Herrn Nägel für ihre präzise Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei PD Dr. Frank Kirchoff für die Bereitstellung der transgenen Tiermodelle bedanken.

Bei PD Dr. Clemens Neusch und Melanie Kaiser bedanke ich mich für die Zusammenarbeit betreffend der Kir4.1 Knock-out-Maus.

Ich bedanke mich bei Anja Scheller für die Kooperation betreffend der „roten Maus“ und den netten „Paper-Lieferservice“.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Reinhold Hustert und bei Prof. Dr. Ralf Heinrich aus dem Institut für Zoologie und Anthropologie für die Übernahme des Referates und Korreferates dieser Arbeit.

Auch bedanke ich mich bei Prof. Dr. Diethelm W. Richter für die Möglichkeit in seinem Institut diese Arbeit anzufertigen.

Prof. Joachim W. Deitmer möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit im Rahmen unserer gemeinsamen Publikation danken.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des „U-Bootes“ für die überaus nette Arbeitsatmosphäre, insbesondere bei PD Dr. Matthias Dutschmann, Anja-Annett Grützner, Jens Fresemann, Dr. Frank Funke, Florian Gerich, Belinda Hildebrandt, Miriam Kron, Tobias Latal, Prof. Dr. Michael Müller und Stefan Winter.

Curriculum vitae

von Kai Härtel

Adresse

Wendenstrasse 7
37073 Goettingen
Germany
Telefon: +49 (0) 551-3793119
Email: Kai.Haertel@gmx.net

Persönliche Angaben

Geburtsdatum	05. Juli 1975
Geburtsort	Kassel, Deutschland
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Ausbildung

2004-2007	Georg-August-Universität Göttingen, Zentrum Physiologie und Pathophysiologie, Abteilung Neurophysiologie Doktorarbeit (Betreuer: PD Dr. Swen Hülsmann) <i>Charakterisierung von Calcium-Transienten in Astrozyten der ventralen respiratorischen Gruppe</i>
2003	Georg-August-Universität Göttingen, Institut für Zoologie und Anthropologie, Abteilung Neurobiologie Diplomarbeit (Betreuer: Prof. Dr. Reinhold Hustert) <i>Neuronale Verarbeitung visueller Reize über das Protocerum von <i>Locusta migratoria</i></i>
1999-2003	Georg-August-Universität Göttingen Diplomstudiengang Biologie
1999	Vordiplom, Universität Kassel
1996	Abitur, Herderschule, Kassel

Publikationen

Peer-reviewed-publications

- K. Härtel**, K. Singaravelu, M. Kaiser, C. Neusch, S. Hülsmann and Joachim W. Deitmer (2007). Calcium influx mediated by the inwardly rectifying K⁺ channel Kir 4.1 (KCNQ10) at low external K⁺ concentration. *Cell Calcium* 42 (2007) 271–280
- K. Szőke, **K. Härtel**, D. Graß, P.G. Hirrlinger, J. Hirrlinger and S. Hülsmann (2006). Glycine transporter 1 expression in the ventral respiratory group is restricted to protoplasmic astrocytes. *Brain Res.* 2006 Nov 13;1119(1):182-9.

Conference proceedings

- Papadopoulos, N., S.M. Winter, **K. Härtel**, M. Handschuh, C. Neusch, S. Hülsmann (2007). Possible Roles of the Weakly Inward Rectifying K⁺ Channel KIR4.1 (KCNJ10) in the Pre-Bötzing Complex, in: *Integration in Respiratory Control: From Genes to Systems, Advances in Experimental Medicine and Biology Series Vol. 605*. Eds: M.J. Poulin and R.J.A. Wilson. Springer Publishers, New York.

Konferenzvorträge

- K. Härtel**, A. Scheller, P.G. Hirrlinger, F. Kirchhoff, S. Hülsmann. Neuromodulator-induced calcium transients in mRFP1-labeled astrocytes of the mouse respiratory network. *85th Meeting of the German Society of Physiology, Munich 2006*.
- K. Härtel**, K. Singaravelu, M. Handschuh, C. Neusch, J.W. Deitmer, S. Hülsmann. Calcium influx into mouse brainstem astrocytes mediated by the inwardly rectifying K⁺ channel Kir4.1. *85th Meeting of the German Society of Physiology, Munich 2006*.

Poster Präsentationen

- K. Härtel**, K. Singaravelu, M. Kaiser, C. Neusch, Joachim W. Deitmer and S. Hülsmann (2007). Calcium influx into astrocytes mediated by the inwardly rectifying K⁺ channel Kir 4.1 (KCNQ10) at low external K⁺ concentration. *7th Meeting of the German Neuroscience Society and 31st Göttingen Neurobiology Conference, Göttingen 2007, Germany*.
- K. Härtel** and S. Hülsmann (2007). Imaging of serotonin-induced calcium transients in astrocytes. *86th Annual Meeting of the German Physiological Society, Hannover 2007, Germany*
- K. Härtel**, K. Singaravelu, M. Handschuh, C. Neusch, J.W. Deitmer and S. Hülsmann (2006). The inwardly rectifying K⁺ channel Kir4.1 is involved in a low potassium induced calcium influx into astrocytes. *5th Forum of European Neuroscience, Program No. A050.6 Poster 294, 2006. Online*.
- K. Härtel**, K. Singaravelu, M. Handschuh, C. Neusch, J.W. Deitmer, S. Hülsmann (2006). Calcium influx into mouse brainstem astrocytes mediated by the inwardly rectifying K⁺ channel Kir4.1. *European Young Physiologists Symposium, Joint Meeting, Munich 2006, Germany*
- K. Härtel** and S. Hülsmann (2005) Substance P and TRH induced modulation of glial Ca²⁺-signalling in the mouse respiratory network. *Program No. 385.18. 2005 Abstract Viewer and Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2005. Online*.
- K. Härtel** and R. Hustert (2005). Looming sensitive neurons in the brain of the locust, *Locusta migratoria*. In: *Zimmermann H, Krieglstein K (eds.) Proceedings of the 6th Meeting of the German Neuroscience Society and 30th Göttingen Neurobiology Conference, Göttingen 2005, Germany*
- H. Lahmann, R. Hustert and **K. Härtel** (2001). Brain control and motor organisation of turning when locusts hide. *Proceedings 6th International Congress of Neuroethology, Bonn 2001, Germany*