

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Puffer und Lösungen

2.1.1 Bikarbonatlösung

Als Perfusionspuffer für Experimente an akuten Hirnschnitten wurde eine bikarbonatgepufferte Salzlösung verwendet, die im folgenden als Bikarbonatlösung bezeichnet wird und die folgenden Substanzen enthält:

NaCl (134 mM)

KCl (2,5 mM)

MgCl₂ (1,3 mM)

CaCl₂ (2 mM)

K₂HPO₄ (1,25 mM)

NaHCO₃ (26 mM)

D-Glucose (10 mM)

Vor der Verwendung wurde die Bikarbonatlösung mindestens eine halbe Stunde lang mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast, um einen pH von 7,4 zu erreichen und die Lösung mit Sauerstoff zu sättigen. Die Begasung der Lösung wurde während des gesamten Experimentes in allen verwendeten Lösungen beibehalten.

Wurden Substanzen gelöst, die die Osmolarität der Lösung um weniger als 5 Milliosmol erhöhten, wurden diese zur oben beschriebenen Lösung zugegeben, bei höherosmolaren Zugaben wurde der Natriumchloridanteil soweit verringert, daß die Osmolarität der unmodifizierten Bikarbonatlösung entsprach.

2.1.2 Lösungen extrazellulär applizierter Substanzen

Pharmakologisch aktive Substanzen wurden, in Bikarbonatlösung gelöst, extrazellulär appliziert. Dazu wurde die Perfusion für mindestens 5min auf Puffer, der die entsprechende Substanz enthielt, umgestellt. Substanzen wurden in den folgende Konzentrationen appliziert, alle Konzentrationen in μM : NMDA 100, MK-801 20, TTX 1, CNQX 20, PDC 50, MCPG 50, Cd^{2+} 100, Octanol 500, Reactive-Blue-2 30, Suramin 100, Thapsigargin 20.

2.1.3 Intrazelluläre Perfusionslösung, Pipettenlösung

Zum Füllen der bei den elektrophysiologischen Untersuchungen verwendeten Mikropipetten wurde eine HEPES-gepufferte Lösung benutzt, die im folgenden Pipettenlösung genannt wird und die die folgende Zusammensetzung hatte:

KCl (130 mM)

MgCl_2 (2 mM)

CaCl_2 (0,5 mM)

EGTA (5 mM)

HEPES (10 mM)

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von KOH auf 7,2 eingestellt.

Der Pipettenlösung wurde in manchen Experimenten der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 1 mg/ml zugesetzt.

2.1.4 Pipettenlösung für Calciumimagingversuche

In Versuchen, in denen die Zellen über die Pipette mit dem Salz von Fluoreszenzfarbstoffen gefüllt wurden, wurde eine Calcium- und EGTA-freie Pipettenlösung verwendet. Die Farbstoffe wurden in folgenden Konzentrationen in der Pipettenlösung gelöst:

Fluo-4, Pentapotassiumsalz (50 μ M)

Calcium-Orange, Pentapotassiumsalz (50 μ M)

2.1.5 Pufferlösungen für Färbungen (PBS)

Fixiertes Gewebe zur weiteren Untersuchung mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop oder für Antikörperfärbungen wurde in phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) aufbewahrt bzw. prozessiert, die folgende Substanzen enthielt:

NaCl (137 mM)

KCl (2,5 mM)

MgCl₂ (0,5 mM)

CaCl₂ (1 mM)

KH₂PO₄ (1,5 mM)

Na₂HPO₄ (7,2 mM)

Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

2.2 *Verwendete Tiere*

Die GFAP-EGFP-transgenen Mäuse wurden durch Oozyten-Injektion des Konstruktes (Eurogentec, Seraing, Belgien) in Oozyten des FVB/N-Stammes

hergestellt. Das transgene Konstrukt, das für die Mikroinjektion in FVB/N Oozyten verwendet wurde, bestand aus dem 2,2 kb großen DNA Fragment der humanen GFAP-Promotorsequenz, die vor die kodierende Sequenz in das pEGFP-1-Plasmid (Clontech, Heidelberg) hineinkloniert wurde. Transgene Tiere wurden im institutseigenen Tierhaus mit nicht-transgenen FVB/N-Tieren verpaart. Genomische DNA, die aus Schwanzspitzen isoliert wurde, wurde mit PCR auf die Insertion des EGFP-Gens getestet. Für die Zucht wurden lediglich heterozygote Tiere eingesetzt, da bereits für das transgen heterozygote Tiere eine robuste EGFP-Expression in Astrozyten in allen Hirnregionen zeigten.

Für die Experimente wurden verschiedene Gruppen von Versuchstieren verwendet: Für Patch-Clamp-Untersuchungen wurden sowohl NMRI-Mäuse, sowie auch GFAP-EGFP-transgene Tiere des Stammes FVB/N im Alter von 1 Tag bis 3 Monate verwendet. Für Calcium-Imaging-Versuche wurden dieselben Tierstämme, jedoch nur im Alter von 5 bis 7 Tagen verwendet. NMRI-Mäuse wurden von der Tierzucht Schönwalde (Schönwalde bei Berlin) bezogen.

2.3 Anfertigen von Hirnschnitten für elektrophysiologische

Untersuchungen

Junge Tiere (1-15 Tage) wurden durch Dekapitieren, ältere Mäuse durch Überstrecken und Genickbruch getötet und das Gehirn herauspräpariert. Das Gesamthirn wurde sofort in eiskalte Badlösung überführt und für ca. 1 min gekühlt. Das Kleinhirn wurde mit einer Rasierklinge entfernt, das Großhirn mit dem Mittelhirn auf einen aufgerauhten Glasblock aufgeklebt und dieser Glasblock in das Schneidegefäß eines Vibratoms (Vibracut, FTB Feinwerktechnik, Bensheim) eingespannt. Zum Schneiden wurden Rasierklingen der Marke Gillette Platinum

verwendet. Es wurden 150 µm dicke Schnitte in frontaler Orientierung angefertigt. Das Anfertigen der Schnitte erfolgte in auf 6°C abgekühlter Badlösung, die kein Ca²⁺ enthielt. Die Schnitte wurden für mindestens 30 min in calciumhaltiger Badlösung bei Raumtemperatur aufbewahrt, bevor sie für die Versuche in die Beobachtungskammer unter dem Mikroskop überführt wurden. Für die elektrophysiologischen Messungen wurden die Schnitte in die Meßkammer des aufrechten Mikroskopes überführt. In der mit Badlösung konstant durchspülten Kammer (3-5 ml pro min) wurden die Schnitte durch beschweren mit einem mit Nylonfäden bespannten U-förmigen Platindraht fixiert. Die Badlösung, die konstant mit Carbogen begast wurde, hatte Raumtemperatur. Substanzen wurden durch wechseln der Badlösung appliziert.

Die Somata der Zellen, die gepatcht wurden, waren mit einem 40x Wasserimmersionsobjektiv gut sichtbar, und die Patch-Pipette konnte so unter visueller Kontrolle langsam an die Zellen angenähert werden.

Es wurden Zellen ausgewählt, deren Somata etwa 10-20µm unter der Schnittoberfläche liegen. Während die Patch-Pipette an die Zelle herangeführt wurde, wurde ein positiver Druck an die Pipette angelegt. So wurden Zelltrümmer und extrazelluläre Matrix weggeblasen und die Spitze der Pipette konnte verschmutzungsfrei auf der Zelloberfläche platziert werden. Membranströme wurden nach Erreichen der Ganzzellkonfiguration mit der Patch-Clamp-Technik gemessen. Die gemessenen Signale wurden mit einem Patch-Clamp-Verstärker vom Typ EPC-7 oder EPC-9 verstärkt (HEKA Electronics, Lambrecht, Pfalz). Die Signale wurden mit 3 kHz gefiltert und mit einer Aufnahmezeit von 5 kHz aufgenommen. Als Stimulusgenerator sowie auch als Aufnahmemedium diente ein konventioneller PC, der über eine Karte (HEKA) mit dem Verstärker verbunden war. Alle Aufnahmen und

die Auswertung der erhaltenen Patch-Clamp-Daten wurden mit dem WinTida Softwarepaket (HEKA) ausgeführt.

Der Widerstand der Patch-Pipetten gefüllt mit Standard-Pipettenlösung in Standard-Badlösung betrug 4-7 M Ω .

2.4 Verwendete Stimulations- und Messprotokolle für elektrophysiologische Messungen

Zum Messen der Membranströme wurden verschiedene Spannungssprungprotokolle verwendet. Das erste bestand aus je neun Spannungssprüngen in de- und hyperpolarisierender Richtung mit einer Änderung der Spannung von 10 mV und einer Dauer von 50 ms pro Sprung. Zwischen den einzelnen Sprüngen lagen jeweils 800 ms. Mit diesem Protokoll sollten die Zellen auf konstitutiv exprimierte Kanäle, bekannterweise Kaliumströme, untersucht werden. Das Protokoll wurde von einem Haltepotential von -80 mV aus angewandt. In der Zeit zwischen den Spannungssprüngen wurde die Datenaufnahme unterbrochen, so daß einzelne Blöcke entstanden, die zur übersichtlicheren Darstellung überlagert wurden. Das zweite Protokoll bestand aus im Abstand von fünf Sekunden wiederholten Sprungsequenzen mit sechs Sprüngen in de- und vier in hyperpolarisierender Richtung mit je 100 ms Sprungdauer und 25 mV Spannungsdifferenz. Zwischen den einzelnen Sprüngen einer Sequenz lagen je 100 ms. Dieses Protokoll wurde benutzt, um langsame Stromänderungen zu untersuchen. Es ermöglicht die Ermittlung des Umkehrpotentials hinzugekommener oder blockierter Ströme durch Subtraktion der einzelnen Stromwerte und anschließender Auftragung gegen die entsprechende Klemmspannung. Das Umkehrpotential kann aus einer solchen Strom-Spannungs-Kennlinie entweder direkt als Schnittpunkt mit der X-Achse

abgelesen oder durch eine Geradenanpassung ermittelt werden. Geradenanpassungen wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft, Redmond, USA) durchgeführt. Mit Hilfe dieses Programms wurden auch Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

2.5 Anfärben der Zellen für morphologische Analysen

Die Morphologie der grün fluoreszenten Astrozyten wurde durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (Sarastro 2000, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) sichtbar gemacht. Der Scan-Kopf war auf einem aufrechten Zeiss-Axioskop (Carl Zeiss, Jena) montiert, es wurden Wasserimmersionsobjektive verwendet, um die Zellen in akuten Schnitten zu visualisieren. Normalerweise wurde ein 40x Objektiv mit einer Apertur von 0,75 verwendet. Zellen, die nicht durch die Expression von EGFP eine intrinsische grüne Fluoreszenz zeigten, wurden während des Patchen durch intrazelluläre Dialyse des Cytoplasmas mit 0,1% LuciferYellow-CH-Lösung (Sigma, Deisenhofen), was der Pipettenlösung zugesetzt wurde, mit fluoreszentelem Farbstoff gefüllt. Bei dieser Methode wurde nach Beendigung der elektrophysiologischen Messung eine stark hyperpolarisierende Spannung angelegt, um das Beladen der Zellen mit LuciferYellow (Sigma, Deisenhofen) zu verstärken. Die Patch-Pipette wurde dann vorsichtig von der Zelloberfläche abgezogen, um die Morphologie der Zelle zu erhalten. Schnitte mit LuciferYellow-gefüllten Zellen wurden nach der Messung mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 2 Stunden fixiert. Die Schnitte wurden 1 Stunde mit PBS gewaschen und dann mit Mowiol eingedeckelt. Die Zellen wurden am Laser-Scanning-Mikroskop visualisiert und die Daten auf einer Indigo Workstation gespeichert und bearbeitet.

2.6 Immunhistochemie

Die Mäuse wurden mit Pentobarbital (100mg/kg Körpergewicht) betäubt und intrakardial zunächst mit PBS und dann mit 4% Paraformaldehyd in PBS perfundiert. Die perfundierten Gehirne wurden herauspräpariert und für 2 Stunden in 4% Paraformaldehyd bei 4°C nachfixiert. Der Formaldehyd wurde mit PBS wieder ausgewaschen und die Gehirne über Nacht in 30% Saccharose in PBS eingelegt. Das so vorbereitete Gehirn wurde in Isopentan auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt, bis Schnitte angefertigt wurden. Die am Cryotom angefertigten Schnitte, 20 µm dick, wurden auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen und für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das Gewebe wurde mit 0,1% Triton X-100 in PB für 20 min permeabilisiert und darauffolgend für 1 Stunde mit Block-Puffer (0,5% BSA, 1% Pferdeserum, 4% Ziegenserum) inkubiert um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Der polyklonale Kaninchen-anti-GFAP-Antikörper wurde in PB, 1% BSA, 1% Pferdeserum, verdünnt. Der Antikörper wurde über Nacht bei 4°C mit den Schnitten inkubiert. Die Bindung des Primärantikörpers wurde durch Applikation eines Cy3-konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörpers aus der Ziege in einer Verdünnung von 1:250 in oben genanntem Puffer detektiert. Die Schnitte wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Antikörper inkubiert, bevor sie drei Mal mit PB gewaschen und dann mit Mowiol eingedeckelt wurden. Unspezifische Bindung des Kontrollantikörpers wurde an Schnitten, die anstatt mit dem Primärantikörper nur mit Puffer inkubiert wurden getestet. In diesen Kontrollexperimenten waren keine immunzytochemischen Reaktionen sichtbar.

2.7 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

Für die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) wurden die Gehirne von maximal zwei Wochen alten Tieren herauspräpariert. Die Hirnhäute wurden mit feinen Pinzetten unter dem Binokular entfernt. Das Gewebe wurde mit einem Skalpell in kleine Stücke zerschnitten und für 30-45 min bei 37°C in Hank's balanced salt solution (HBSS) mit Papain inkubiert. Die so angedauten Gewebestücke wurden mit einer in der Flamme abgerundeten Pasteur-Pipette in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) in Anwesenheit von 0,5 mg/ml DNase vorsichtig trituiert. Die so vereinzelteten Zellen wurden bei 800 Umdrehungen pro Minute in einer Tischzentrifuge für 10 min zentrifugiert und pelletiert. Für die Durchflußzytometrie wurden die Zellen in einer Zelldichte von $0,5-1 \times 10^6$ Zellen /250 µl in DMEM/FCS suspendiert.

Typischerweise konnten etwa 1×10^4 EGFP-positive Zellen pro Tier in einem Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Bedford, MA) sortiert werden.

2.8 RT-PCR für NMDA-Rezeptoruntereinheiten aus FACS-isolierten

Astrozyten

Gesamt-RNA aus dem Gesamthirn oder aus sortierten Astrozyten wurde mit der Trizolmethode isoliert (LifeTechnologies, Eggenstein, Germany). Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben (Superscript RT™ LifeTechnologies) und in einem Thermocycler (Thermocycler 9600, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) mittels hot-start PCR (5 min, 94 °C) amplifiziert. Die Amplifikation lief über 35 bis 40 Zyklen (30 s, 94 °C Denaturierung; 30 s, 55 to 60 °C Annealing; 30 s +1 s pro Zyklus, 72 °C Elongation, und nochmals 10 min at 72 °C für die finale Elongation). Die Amplifikationsprodukte wurden mittels Agarosegelelektrophese analysiert.

Primersequenzen für NMDA-Rezeptoruntereinheiten, GFAP, Tyrosinhydroxylase und EGFP wurden aus der in der EMBL abgelegten Datenbank entnommen: Sequenzen (Zugangsnummern in Klammern): GFAP (K01347), sense: 5'-TCC TCC GCC AAG CCA AAC ACG A-3', antisense: 5'-CCT CAC CAT CCC GCA TCT CCA CA-3', 438 bp; Tyrosinhydroxylase (M69200), sense: 5'-TGT CAG AGC AGC CCG AGG TC-3', antisense: 5'-CCA AGA GCA GCC CAT CAA AG-3', 412 bp; EGFP (CV55761), sense: 5'-GCC GCT ACC CCG ACC AC-3', antisense: 5'-TTC ACC TTG ATG CCG TTC TTC T-3', 272 bp; NR1 (D10028), sense: 5'-CTG CTG ACA TTC GCC CTG CTT -3', antisense: 5'-ACG CGC ATC ATC TCA AAC CAG AC -3', 455 bp; NR2A (D10217), sense: 5'-AGT TTC CAT CGG GTC TCA TTT CA -3', antisense: 5'-ACT TCG CCT ATC ATT CCA TTC CA -3', 688 bp; NR2B (D10651), sense: 5'-TCA CCC CCT TTC CGC TTT G -3', antisense: 5'-GTT CTT CCA TCT CCC CAT CTC CA -3', 343 bp; NR2C (D10694), sense: 5'-CCT TCT TCG CTG TCA TCT TCC TC -3', antisense: 5'-TGC TGC TCA TCA CCT CGT TCT TC -3', 528 bp; NR2D (D12822), sense: 5'-CCT GGG GGA CGA TGA GAT TGA GA -3', antisense: 5'-GAG CGG GCG GAG ATG GAA AG -3', 662 bp; rat NR3 (U29873), sense: 5'-TGT CTG CTA TGC CCT TCT GTT TG -3', antisense: 5'-CTG GTT TTG TCC TTC CTC GTC A -3', 949 bp. Die Primerpaare wurden so gewählt, daß sie über Exongrenzen hinweg liegen, um eine Amplifikation aus Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen.

2.9 Auslösung und Imaging von astrozytären Calciumsignalen

2.9.1 Elektrische Stimulation zum Auslösen der Calciumwelle

Die elektrische Stimulation zum Auslösen der Calciumwelle wurde mit einer konventionellen Glaselektrode, gefüllt mit Badlösung durchgeführt. Die verwendeten

Pipetten hatten einen Widerstand von etwa 1 M Ω , was einer Spitzenöffnung von etwa 15 μm entspricht. Die Spitze dieser Pipette wurde vorsichtig auf der Schnittoberfläche platziert, so daß die oberste Zellschicht leicht berührt wurde. Vor der elektrischen Stimulation wurde mindestens 2 min gewartet, damit der Schnitt sich von der mechanischen Beanspruchung erholen konnte. Wurden Substanzen eingewaschen, bzw. in calciumfreier Badlösung gearbeitet, so wurde der Schnitt für mindestens 2 min vor der Stimulation mit entsprechender Badlösung superfundiert. Die Welle wurde durch eine 4s lange Stimulation mit 10 Hz ausgelöst. Die Calciumwelle konnte 4x wiederholt an der selben Stelle ausgelöst werden, wenn der Schnitt in den Zwischenzeiten jeweils mindestens 5 min mit calciumhaltiger Badlösung superfundiert wurde.

2.9.2 Imaging der Calciumsignale in Astrozyten

Wie für die Patch-Clamp-Untersuchungen bereits beschrieben, wurden die Tiere getötet, die Hirne herauspräpariert und Schnitte angefertigt. Schnitte, die lediglich für Imaging-Experimente verwendet wurden, wurden in einer Dicke von 250-300 μm angefertigt. Vor der Beladung mit Calcium-Indikator-Farbstoffen wurden die Schnitte für mindestens 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Zellen in den Schnitten wurden mit der „bulk-loading-Methode“ mit calciumsensitivem Farbstoff beladen: Die Schnitte wurden mit Fluo-4-Acetoxymethylester (Fluo-4-AM) oder anderen Farbstoffen in der AM-Form inkubiert. Die AM-Gruppe verleiht den Farbstoffen Membrangängigkeit. In den Zellen werden die AM-Gruppen von Esterasen abgespalten und der Farbstoff liegt dann in der freien Form in den Zellen vor. Die Inkubation mit dem Farbstoff erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ für 40 min oder bei Raumtemperatur für 90-120 min. Die Schnitte wurden

dann in die Beobachtungskammer überführt und für mind. 15 min gespült, bevor mit den Messungen begonnen wurde. Substanzen wurden durch Ändern der Badlösung appliziert. Änderungen der Fluoreszenz und damit der intrazellulären Calciumkonzentration wurden entweder mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop oder einer gekühlten CCD-Kamera (Till Photonics, Planegg) detektiert. Zur Anregung der Fluo-4-Fluoreszenz wurde die 488 nm Bande eines Ar⁺/Kr⁺-Lasers (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) oder das Licht eines auf 488 nm gestellten Monochromators verwendet (Polychrome 4, Till Photonics, Planegg). Am konfokalen Mikroskop wurde ein Bildfrequenz von 0,25 Hz erreicht, mit der CCD-Kamera eine Frequenz von 1Hz.