

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Puffer und Lösungen**

##### 3.1.1 ACSF

Als Perfusionspuffer für Experimente an akuten Hirnschnitten wurde eine bicarbonatgepufferte Salzlösung verwendet, die in der Zusammensetzung der cerebrospinalen Flüssigkeit entspricht. Diese, ACSF (artificial cerebrospinal fluid) genannte Lösung enthielt bei Raumtemperatur in mM:

NaCl (134)

KCl (2,5)

MgCl<sub>2</sub> (1,3)

CaCl<sub>2</sub> (2)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,25)

NaHCO<sub>3</sub> (26)

D-Glucose (10)

Vor der Verwendung wurde die Bikarbonatlösung mindestens eine halbe Stunde lang mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begast, um einen pH-Wert von 7,4 einzustellen und die Lösung mit Sauerstoff zu sättigen. Die Begasung der Lösung wurde während des gesamten Experimentes in allen verwendeten Lösungen beibehalten. Sollte der Puffer auf 32 bis 34 °C erwärmt werden, wurde die Konzentration des NaHCO<sub>3</sub> auf 21,5 mM verringert, da sich in der Wärme weniger Carbogen löst.

##### 3.1.2 HEPES-Puffer

Für Experimente mit kultivierten Astrozyten wurde eine HEPES-gepufferte Lösung mit folgender Zusammensetzung in mM verwendet (im Folgenden HEPES genannt):

NaCl (150)

KCl (5,4)

MgCl<sub>2</sub> (1)

CaCl<sub>2</sub> (2)

HEPES (5)

D-glucose (10)

### 3.1.3 Lösungen extrazellulär applizierter Substanzen

Pharmakologisch aktive Substanzen wurden, in ACSF oder HEPES gelöst, extrazellulär appliziert, indem für mindestens 5 min zu dem Puffer, der die entsprechende Substanz enthielt, gewechselt wurde. Substanzen wurden, wenn nicht anders angegeben, in den folgende Konzentrationen appliziert (alle Konzentrationen in  $\mu\text{M}$ ): ATP (100), Bicucullin (100), CNQX (50), CPT (4), Carbenoxolon (100), L-NNA (2000), LY367385 (200), MK801 (40), MPEP (100), RB 2 (30), S-MCPG (500), SR95331 (10), Suramin (100), TTX (1)

### 3.1.4 Intrazelluläre Lösungen

Zum Füllen der bei den elektrophysiologischen Untersuchungen verwendeten Mikropipetten wurden verschiedene HEPES-gepufferte Lösungen benutzt (Konzentrationen in mM).

Für Astrozyten:

KCl (130)

MgCl<sub>2</sub> (2)

CaCl<sub>2</sub> (0,5)

EGTA (5)

HEPES (10)

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

Für Neurone:

K-Gluconat (140)

MgCl<sub>2</sub> (2)

EGTA (4)

Glucose (2)

Na<sub>2</sub>-ATP (2)

## HEPES (10)

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von KOH auf 7,3 eingestellt.

Die Osmolarität aller neu hergestellten intrazellulären Lösungen wurde mit einem Vapro 5520 Osmometer der Firma Wescor überprüft und lag stets zwischen 280 und 300 mOsm. Für Farbstofftransferexperimente wurde Biocytin in einer Konzentration von 0,5 % gelöst. Alle intrazellulären Lösungen wurden vor der Verwendung sorgfältig durch einen Millipore-Filter (Porengröße 0,2 µm) gefiltert.

### 3.1.5 Pufferlösungen für Färbungen

#### **PB** (in mM)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (100)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (100)

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOH auf 7,4 eingestellt.

#### **PBS** (in mM)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (100)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (100)

NaCl (137)

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOH auf 7,4 eingestellt.

#### **TB** (in mM)

Tris-HCl (100 mM)

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von HCl auf 7,4 oder 7,6 eingestellt.

#### TBS (in mM):

Tris-HCl (100)

NaCl (100)

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von HCl auf 7,4 eingestellt.

**Fixierpuffer:** 4 % Paraformaldehyd und 0,1 % Glutaraldehyd in 0,1 % PB

**Sucroslösung:** 10% oder 30% in PB

**Kongorotlösung:** 1% Kongorot in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, filtriert

## **3.2 Verwendete Tiere**

### 3.2.1 NMRI

Nicht transgene (wildtyp) NMRI-Mäuse wurden zum Teil im institutseigenen Tierhaus gezüchtet, zum Teil von Charles River, Berlin bezogen. Wenn nicht anders angegeben, wurden Tiere im Alter von 10 bis 14 Tagen verwendet. Dieses Alter stellte einen Kompromiss zwischen möglichst fortgeschrittener Entwicklung und gutem Ca<sup>2+</sup>-Farbstoff-Färbeergebnis dar. In älteren Tieren gelangt der Farbstoff nicht mehr ausreichend in die Zellen.

### 3.2.2 Connexin-defiziente Tiere

Connexin43/30-defiziente Tiere wurden durch Kreuzung von Connexin30-Knockout- (Teubner et al., 2003) mit Connexin43<sup>fl/fl</sup>-GFAP-cre Mäusen ((Theis et al., 2003) erhalten. In letzteren flankieren so genannte lox-Seiten das betreffende Allel, welches dann durch die Aktivität der cre-Recombinase aus dem Genom herausgeschnitten wird. Dadurch, dass die cre-Rekombinase unter dem astrozyten-spezifischen GFAP-Promotor exprimiert wird, erreicht man eine selektive Deletion des Connexin43 in Astrozyten. Komplette Cx43-Knockouts sind wegen einer Herzinsuffizienz nicht lebensfähig. Verwendet wurden Tiere im Alter von 10 bis 14 Tagen.

### 3.2.3 GFAP-EGFP

Die GFAP-EGFP-transgenen Mäuse entstanden durch Injektion eines Fragments der humanen GFAP-Promotorsequenz, das vor die kodierende Sequenz in das pEGFP-1-Plasmid hinein kloniert wurde, in Oozyten des FVB/N-Stammes (Nolte et al., 2001). Dadurch erhält man eine selektive Fluoreszenzmarkierung in Astrozyten. Die Tiere

wurden im institutseigenen Tierhaus gezüchtet und routinemäßig mittels PCR auf EGFP-Expression getestet. Verwendet wurden wiederum Tiere im Alter von 10 bis 14 Tagen.

### 3.2.4 PDAPP/GFAP-EGFP

Die PDAPP-Mäuse stellen ein Tiermodell für Alzheimer-Erkrankung dar. Dies erfolgt durch Überexpression des mutierten humanen V717F beta-Amyloid Precursor Proteins ( $\beta$ -APP), in dem Valin an Position 717 gegen Phenylalanin ausgetauscht ist unter dem PDGF-Promotor (platelet derived growth factor, Thrombozyten-Wachstumsfaktor). Durch Verwendung des PDGF-Promotors erhält man bevorzugt Expression in Neuronen von Cortex, Hippokampus, Cerebellum und Hypothalamus. Die Tiere entwickeln viele Zeichen der Alzheimer-Erkrankung, darunter zahlreiche extrazelluläre Thioflavin-S-positive  $A\beta$ -Ablagerungen (Plaques), deformierte Neuriten, Verlust an Synapsen, Astrozytosis und Mikroglia.  $A\beta$ -Plaques lassen sich im cerebralen Cortex, im Hippokampus und im Corpus callosum nachweisen (Games et al., 1995). Erste Zuchtpaare stammen von der Elly Lilly Company, (via Taconic USA), die dann im institutseigenen Tierhaus vermehrt wurden. PDAPP-positive und -negative Mäuse wurden mit GFAP-EGFP-Mäusen gekreuzt, um die grün fluoreszierenden Astrozyten in Relation zu  $A\beta$ -Plaques zu untersuchen.

### **3.3 Anfertigen von Hirnschnitten für elektrophysiologische Untersuchungen**

Für die Schnittpräparation wurden zehn bis 14 Tage alte Mäuse (P10-P14-Mäuse) durch Dekapitieren, ältere durch Überstrecken getötet. Das vorsichtig aus der Schädelkapsel entfernte Gehirn wurde zunächst etwa eine Minute in mind. 4 °C kaltem Bicarbonat-Puffer gekühlt. Für frontale Schnitte wurde anschließend das Kleinhirn und basal ein kleines Stück des Großhirns mit einer Rasierklinge abgeschnitten. Das derart getrimmte Hirn wurde in frontaler Orientierung mit Sekundenkleber vor einem Block aus zweiprozentigem Agar angebracht. Der

Agarblock soll dem Gehirn beim Scheidevorgang eine gewisse Stabilität geben, so dass definierte Schnittflächen entstehen. Für semicoronale Schnitte, die den Barrel Cortex enthielten, wurde das Kleinhirn in einem Winkel von etwa 30 ° abgetrennt und mit der Schnittfläche aufgeklebt. Mit einem Vibratom (VT 1000 S; Leica, Heidelberg, Deutschland, oder HM 650 V, Microm, Walldorf, Deutschland) wurden Schnitte mit einer Dicke von 150 bis 300 µm angefertigt. Die einzelnen Schnitte ließen sich in ACSF bei Raumtemperatur bis zu zehn Stunden aufheben und zur Messung verwenden. Sie wurden für mindestens 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt, bevor sie in die Färbelösung oder direkt in die Beobachtungskammer unter dem Mikroskop überführt wurden. In der mit Badlösung konstant durchspülten Kammer (3-5 ml pro min) wurden die Schnitte durch einen mit Nylonfäden bespannten U-förmigen Platindraht fixiert. Die Badlösung, die konstant mit Carbogen begast wurde, hatte 32 bis 34 °C.

### 3.4 Imaging von astrozytären Calciumsignalen

Die Sichtbarmachung (Imaging) von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen erfolgte mit dem sehr empfindlichen Farbstoff Fluo4. Die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ändert die optischen Eigenschaften des Fluo-4, so dass es bei entsprechender Anregung fluoresziert.

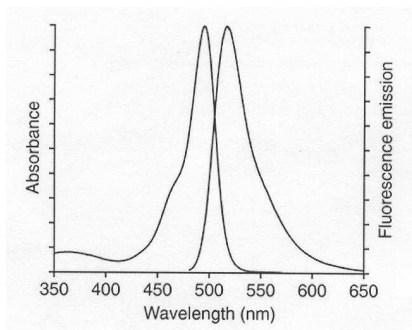


Abbildung 3.1: Absorptions- und Emissionsspektrum von mit  $\text{Ca}^{2+}$  gesättigtem Fluo-4

Das Absorptionsmaximum für an  $\text{Ca}^{2+}$  gebundenes Fluo-4 liegt bei etwa 480 nm, das Emissionsmaximum bei etwa 520 nm (Abb. 3.1). Der Acetoxymethylester des Farbstoffs kann durch die Zellmembran diffundieren und wird anschließend durch intrazelluläre Esterasen gespalten (Abb. 3.2).

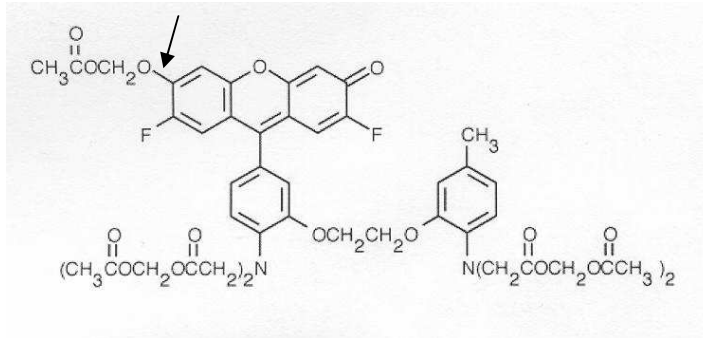


Abbildung 3.2:  
Strukturformel von Fluo-4-AM mit Markierung der Spaltungsstelle des Acetoxymethylesters

Inkubation bei 37 °C kann die Spaltung des Acetoxymethylesters verstärken, so dass möglichst viel Farbstoff in den Zellen eingeschlossen wird. Für den gespaltenen Farbstoff ist die Zellmembran undurchlässig. Der Farbstoff wurde zunächst in DMSO gelöst und anschließend 1:500 mit ACSF verdünnt (Endkonzentration 10 µM). Zusätzlich wurde 0,02 % Pluronic Acid zugegeben, was die Löslichkeit des Farbstoffesters erhöht und damit die Aufnahme in die Zelle steigert. Kultivierte, auf Deckgläschen ausgesäte Astrozyten wurden für 30 min in 5 µM Fluo-4-AM in HEPES (+0,02 % Pluronic) inkubiert. Akute Hirnschnitte wurden für 45 min bei Raumtemperatur und anschließend 10 min bei 37 °C im Brutschrank gefärbt.

Die Anregung des Farbstoffes erfolgte mit einem auf 488 nm eingestellten Monochromator (T.I.L.L. Photonics, München), die Detektion des emittierten Lichtes durch eine gekühlten CCD-Kamera (SensiCam; PCO, Kelheim). Zur Filterung des Lichtes wurden geeignete Exzitations- und Emissionsfilter verwendet. Aufnahme der Daten erfolgte mit dem Programm ICE (AG Kettenmann, Mathias Hasselmann für HEKA), Analyse und Bearbeitung mit Image-Pro Plus, Media Cybernetics, LP, Silver Spring, USA.

### 3.5 Auslösen von Ca<sup>2+</sup>-Wellen

Die Ca<sup>2+</sup>-Wellen wurden durch Applikation eines elektrischen Stimulus ausgelöst. Dazu wurde eine mit ACSF gefüllte Glaspipette mit einer Öffnung von ca. 20 µm verwendet, was etwa einem Widerstand von 0,5 MOhm entspricht. Die Pipette wurde auf einen konventionellen Silberdraht montiert, der mit einem Stimulusisolator (NeuroLog, NL 800, Digitimer Ltd, Hertfordshire, England) verbunden war. Der

Stimulusisolator wiederum war durch einen Patch Clamp-Verstärker (EPC9/2 HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) über den Rechner ansteuerbar. Die Spitze der Pipette wurde vorsichtig auf der Schnittoberfläche platziert, so dass die oberste Zellschicht leicht berührt wurde. Nach der Positionierung wurden dem Schnitt etwa zwei Minuten Zeit gegeben, um sich von mechanischem Stress zu erholen. Das Auslösen der Welle erfolgte nach Abschalten der Perfusion durch eine 4 s lange Stimulationssequenz von 4 V und 10 Hz. Eine wiederholte Erregung war möglich, wenn man den Schnitt während einer mindestens fünfminütigen Erholungszeit mit ACSF überspülte. Zur Induzierung neuronaler Erregung wurde auch eine nur 300 ms lange 100 Hz Stimulation verwendet.

### ***3.6 Auslösen und Imaging von Cortical Spreading Depression***

Cortical Spreading Depression (CSD) wurde im Schnitt durch Druckapplikation von etwa 10 nl KCl ausgelöst. Dazu wurde eine Glaspipette mit 3 M KCl gefüllt und leicht in der Oberfläche des Schnitts versenkt. Die Druckapplikation wurde über den Rechner gesteuert. Die Depolarisationswelle lässt sich im Durchlicht durch das so genannte intrinsische optische Signal (IOS) beobachten. Durch Ionenumverteilung kommt es während der CSD zu Änderungen im Extrazellulärraum, die wiederum in einer veränderten Lichtbrechung resultieren. Um simultan  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale aufnehmen zu können, wurde mittels einer ebenfalls rechnergesteuerten Blende im Sekundenabstand zwischen Durchlicht und 488 nm Beleuchtung gewechselt.

### ***3.7 Nachweis von ATP mittels Sniffer-cell-assay***

Um ATP-Freisetzung aus Schnitten zu messen, wurde die Maus-Glioma-Zelllinie GL261 (Saic-Frederick, Inc., MD, USA), die stabil mit dem rot fluoreszierenden Protein dsRedII (BD Bioscience, Heidelberg, Germany) transfiziert war, verwendet. Die Zelle wuchsen bis zur Konfluenz in DMEM Medium, das 10% fetales Kälberserum enthielt und wurden unmittelbar vor dem Experiment trypsiniert und auf eine Dichte von 1000 Zellen/ $\mu\text{l}$  verdünnt. 100000 bis 200000 Zellen wurden der Fluo-4-AM Färbelösung



zugegeben (Volumen 500  $\mu$ l). Zusammen mit den Schnitten wurden die Gl261-Zellen für 75 bis 90 min bei Raumtemperatur gefärbt. Während dieser Zeit hefteten sich die Zellen an die Schnittoberfläche an, so dass sie zusammen mit diesen in die Mikroskopkammer transferiert werden konnten.

### **3.8 Patch Clamp-Messungen**

Für Patch Clamp-Messungen wurden Hirnschnitte wie beschrieben hergestellt. Die Somata der Neurone, die gepatcht wurden, waren mit einem 40x oder 60x Wasserimmersionsobjektiv im Durchlicht gut sichtbar. Astrozyten wurden in den transgenen GFAP-EGFP-Tieren oder in mit Fluo-4-gefärbten nicht transgenen Mäusen mit 488 nm Beleuchtung identifiziert. Die Patchpipette konnte in beiden Fällen unter visueller Kontrolle langsam an die Zellen angenähert werden. Es wurden Zellen ausgewählt, deren Somata im Idealfall etwa 20 bis 40  $\mu$ m unter der Schnittoberfläche liegen. Während des Heranführens der Patchpipette an die Zelle 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 sowohl im Voltage Clamp (Spannungsklemme) als auch im Current Clamp (Stromklemme) gemessen, letzterer hauptsächlich, um nach Strominjektionen Aktionspotentiale in Neuronen zu messen (siehe Kapitel Stimulationsprotokolle). Die Signale wurden mit einer Frequenz von 5 kHz aufgenommen, mit einem Patch Clamp-Verstärker vom Typ EPC-9 verstärkt (HEKA Electronics, Lambrecht, Pfalz) und mit 3 kHz gefiltert. Als Stimulusgenerator sowie auch als Aufnahmemedium diente ein konventioneller PC, der über eine Karte (HEKA) mit dem Verstärker verbunden war. Alle Messungen und die Auswertung der erhaltenen Patch Clamp-Daten wurden mit dem WinTida Softwarepaket (HEKA) ausgeführt.

Der Widerstand der mit interner Lösung gefüllten Patchpipetten betrug 4-7 M $\Omega$ .

### 3.9 Verwendete Stimulations- und Messprotokolle

Zum Messen der Membranströme wurden verschiedene Spannungssprungprotokolle verwendet. Das erste Protokoll für Astrozyten bestand aus je neun Spannungssprüngen in de- und hyperpolarisierende Richtung mit einer Änderung der Spannung um je 10 mV mehr und einer Dauer von 50 ms pro Sprung. Zwischen den einzelnen Sprüngen lagen jeweils 50 ms. In der Zeit zwischen den Spannungssprüngen wurde die Datenaufnahme unterbrochen, so dass einzelne Blöcke entstanden, die zur übersichtlicheren Darstellung überlagert wurden (Abb. 3.3 links). Mit diesem Protokoll sollten die Zellen auf konstitutiv exprimierte Kanäle untersucht werden. Das Protokoll wurde von einem Haltepotential von  $-70$  mV aus angewandt.

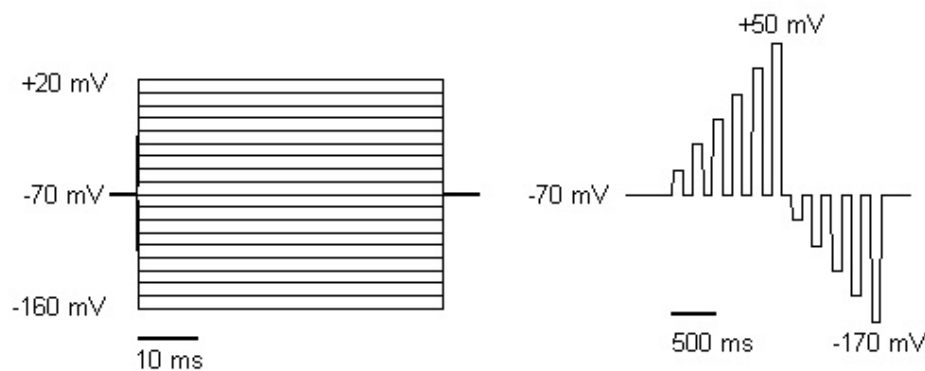


Abbildung 3.3: Spannungssprotokolle zur elektrophysiologischen Charakterisierung von Astrozyten. Links: Ausgehend von einem Membranpotential von  $-70$  mV wurden die Zellen bis  $+20$  mV depolarisiert und anschließend auf  $-170$  mV hyperpolarisiert. Rechts: Repetitiv werden die Zellen von  $-70$  mV auf  $+50$  mV de- und auf  $-170$  mV hyperpolarisiert. Zwischen den einzelnen Sequenzen liegen  $3,3$  s.

Das zweite Protokoll bestand aus im Abstand von  $3,3$  Sekunden wiederholten Sprungsequenzen mit sechs Sprüngen in de- und fünf in hyperpolarisierende Richtung mit je  $100$  ms Sprungdauer und  $20$  mV Spannungsdifferenz. Zwischen den einzelnen Sprüngen einer Sequenz lagen je  $100$  ms. Dieses Protokoll wurde benutzt, um langsame Stromänderungen zu untersuchen (Abb. 3.3 rechts).

Für Neurone wurden Protokolle sowohl für Voltage Clamp, als auch für Current Clamp verwendet. Das Spannungssprungprotokoll bestand aus zehn Spannungssprüngen in depolarisierender Richtung mit einer Änderung der Spannung um je  $10$  mV mehr und einer Dauer von  $200$  ms pro Sprung ausgehend von  $-70$  mV. Anschließend wurde

zehnmal um -20 mV auf -90 mV hyperpolarisiert. Zwischen den Sprüngen lagen jeweils 40 ms (Abb. 3.4 links). Im Current Clamp-Modus wurden je nach Verstärkungsmodus Stromschritte von 1 oder 10 pA injiziert, um die Membran zu depolarisieren (Abb. 3.4 rechts). Bei genügend starker Depolarisierung werden in erregbaren Zellen Aktionspotentiale ausgelöst. Wiederum wurde die Datenaufnahme der einzelnen Sprünge bei beiden Protokollen blockweise vorgenommen.

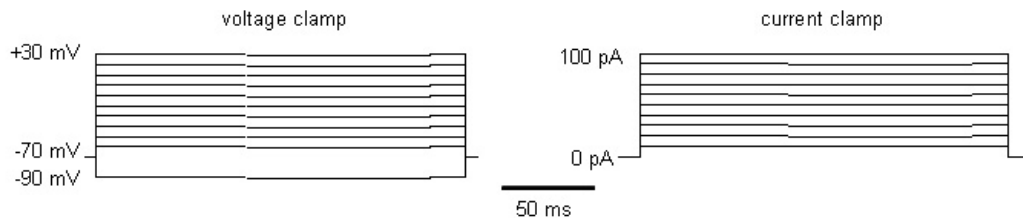


Abbildung 3.4: Spannungs- und Stromprotokoll zur Charakterisierung von Neuronen. Links: Ausgehend von einem Membranpotential von -70 mV wurden die Zellen bis +30 mV depolarisiert und anschließend zehnmal auf -90 mV hyperpolarisiert. Rechts: Strominjektionen im Current Clamp-Modus erfolgten entweder in 10er- (hier gezeigt) oder in 1er Schritten.

### **3.10 Anfärben von Zellen für morphologische Analysen**

Schnitte, in denen einzelne Zellen durch die eine Patchpipette mit Biocytin gefüllt worden waren, wurden zunächst über Nacht bei 4°C in Fixierpuffer fixiert. Biocytin an sich ist farblos. Erst durch Kopplung an Avidin/Meerrettich-proxidase und anschließender Diaminobenzidin-Reaktion wird eine braune Färbung entwickelt. Sollten 300 µm dicke Schnitte mit einem Kryostaten (Leica) in dünnere Präparate geschnitten werden, wurde ihnen zunächst Wasser entzogen. Dies erfolgte nach Waschen durch zunächst einstündige Inkubation in zehnprozentiger Sucrose-Lösung, anschließend zwölfstündiger Inkubation bei 4 °C in 30prozentiger Sucrose-Lösung. Vor dem Kryoschnitt wurde erneut mit PB gewaschen. Da durch die Kryoschnittprozedur oft viel Material verloren ging, wurde ein Hauptteil der dann nur 150 µm dicken Schnitte direkt der Färbeprozedur unterzogen.

Dazu erfolgte Blocken der endogenen Peroxidasen durch zweistündige Inkubation in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TB, Permeabilisierung und Reduktion des unspezifischen Hintergrundes durch einstündige Inkubation in 2% BSA und 0,25 % DMSO in TBS. Die eigentliche Färbung wurde mit dem ABC-elite Kit von Vector Laboratories und anschließender

Peroxidasereaktion mit Diaminobenzidin nach Standardprotokoll durchgeführt (D'Ambrosio et al., 1998).

### **3.11 Sulforhodamin-Färbung**

Um selektiv Astrozyten in einem Hirnschnitt zu markieren, wurden akute Schnitte mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Sulforhodamin101 gefärbt (Nimmerjahn et al., 2004). Für eine Minute erfolgte eine Inkubation in 50  $\mu\text{M}$  SR101 in ACSF, dann wurde die Lösung schnell entfernt. Nach einer Zeitspanne von etwa 20 Minuten hatte sich der Farbstoff gleichmäßig in den Astrozyten verteilt und war aus dem Extrazellulärraum weitgehend ausgewaschen.

### **3.12 Kongorot-Färbung**

Mit Kongorot lassen sich A $\beta$  -Plaques anfärben. Dazu wurden die Schnitte 60 s in 1% Kongorot-Lösung inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe, zunächst 15 s mit gesättigter LiCO<sub>3</sub> -Lösung, dann zwei- bis dreimal je 10 min mit 30%igem Ethanol, die dreimal wiederholt wurden, bis die Schnitte nicht mehr rot waren. Anschließend wurden sie in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> 15 bis 20 min inkubiert.