

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Neurowissenschaften

(Direktor: Prof. Dr. Arthur Konnerth)

**Die Rolle des Calcium-Signals für Gliazellen bei der
Verarbeitung sensorischer Informationen im Maus
Kortex *in vivo***

Rita Förster

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Prof. Dr. Thomas Misgeld
Prüfer der Dissertation:	1. Prof. Dr. Arthur Konnerth
	2. Prof. Dr. Michael Schemann

Diese Dissertation wurde am 14.01.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.04.2020 angenommen.

Zusammenfassung

Astrozyten stellen hinsichtlich ihrer Morphologie und Funktionsweisen eine heterogene Population dar und sind sehr zahlreich im gesamten Zentralnervensystem verbreitet. Lange Zeit wurde den Astrozyten nur eine Nebenrolle innerhalb des zentralen Nervensystems zugeschrieben. In den letzten 20 Jahren wurde bekannt, dass Astrozyten nicht nur als passive Stützzellen des zentralen Nervensystems fungieren, sondern unter anderem an synaptischer Übertragung und der Plastizität von neuronalen Schaltkreisen beteiligt sind. Neueste Studien weisen darauf hin, dass Astrozyten darüber hinaus eine Rolle in der Gedächtnisbildung spielen können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss von Astrozyten auf die Gedächtnisbildung mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie erstmals auf Einzelzellebene *in vivo* untersucht und die beteiligten zellbiologischen Mechanismen detailliert charakterisiert werden.

Dazu galt es im ersten Teil der Arbeit, die Rahmenbedingungen für die Messung von astrozytären Ca^{2+} -Ausschüttung, welche zur Aktivierung und Signalübertragung in Astrozyten von zentraler Bedeutung ist, festzulegen, um daraufhin die Methodik der weiteren Untersuchungen zu etablieren. Zunächst wurden die Antworteigenschaften und Ausbreitung von sensorisch-evozierten Ca^{2+} -Transienten von kortikalen Astrozyten, unter Berücksichtigung einer schwachen Anästhesietiefe mittels einer CCD-Kamera, unter Verwendung eines Ca^{2+} -spezifischen fluoreszierenden Markers untersucht. Ein geringer elektrischer Reiz, gesetzt an der Hinterpfote der Maus, diente als sensorischer Stimulus, der zu intrazellulärer Ca^{2+} -Ausschüttung in Astrozyten führte. Darüber hinaus wurde eine großflächige, kortikale Ausbreitung des astrozytären Ca^{2+} -Signals beobachtet.

Für die Analyse von Neuron-Glialen Kreisläufen im Bereich Lernen und Gedächtnisbildung wurde ein assoziatives Lernparadigma, wie die klassische Konditionierung, herangezogen. Im Einzelnen wurden in 1-2 Monate alten, anästhesierten Mäusen Astrozyten mit dem Ca^{2+} -spezifischen Marker Fluo-8 AM angefärbt und unter der Verwendung eines Zwei-Photonen-Mikroskops im auditorischen Kortex der Schicht 1 und 2/3 auf Einzelzellebene analysiert. Mittels dieser innovativen Methodik konnte zum ersten Mal eine persistente Gedächtnisspur in einem Neuron-Glialen Kreislauf im auditorischen Kortex

der Maus identifiziert werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass Astrozyten im auditorischen Kortex von cholinergen Axonen des basalen Vorderhirns aktiviert werden können, was einen neuen Mechanismus in der Neuron-Glialen Interaktion darstellt. Das Antwortverhalten von Astrozyten konnte im Untersuchungsverlauf durch mehrmaliges Abrufen des konditionierten Stimulus im Tier wieder gelöscht werden. Die gewonnenen Erkenntnisse zeigten, dass Astrozyten nicht nur an der dynamischen Regulierung neuronaler Reaktionen beteiligt sind, sondern auch eine Schlüsselrolle bei der Langzeitspeicherung von Informationen im Gehirn spielen können.

Abstract

In respect of their morphology and functions, astrocytes are a heterogeneous population and can be found in high quantities throughout the central nervous system. For a long time, these glial cells were only credited with a secondary role in the central nervous system. In the last 20 years, however, it has been discovered that glial cells are more than just passive supporting cells and, among other functions, are involved in synaptic transmission and the plasticity of neuronal circuits. Recent studies indicate that astrocytes may also play a role in memory formation.

In this work, the aim was to examine the influence of astrocytes on memory formation using two-photon microscopy *in vivo* at the single-cell level for the first time and to characterize the cytological mechanisms involved in detail.

To this end, the first part of the project was to determine the framework conditions for the measurement of the release of Ca^{2+} in astrocytes, which is of central importance for activation and signalling in astrocytes, in order to establish the methodology for subsequent investigations. The response properties and distribution of Ca^{2+} transients of cortical astrocytes evoked by sensory stimulation were investigated allowing for a low depth of anaesthesia with a high-resolution CCD-camera and using a Ca^{2+} -specific fluorescent marker. A small electrical stimulus, administered to the hind paw of the mouse, served as the sensory stimulus for intracellular Ca^{2+} release in astrocytes and distribution in the cortex.

An associative learning paradigm in the manner of classic conditioning was used to analyse neuron-glia circuits in relation to learning and memory formation. Specifically, in anaesthetised mice aged 1-2 months old, astrocytes were coloured with the Ca^{2+} -specific marker Fluo-8 AM and analysed using a two-photon microscope in the auditory cortex at layer 1 and 2/3 at the single-cell level. This innovative method made it possible, for the first time, to identify a persistent memory trace in a neuron-glia circuit in the auditory cortex of the mouse. Furthermore, it was shown that astrocytes in the auditory cortex of cholinergic axons in the basal forebrain can be activated, which represents a new mechanism in neuron-glia interaction. It was also possible to erase the response behaviour of astrocytes through repeated recall of the conditioned stimulus in the ani-

mal. The insights gained show that astrocytes are not only involved in the dynamic regulation of neuronal reactions but can also play a key role in the long-term storage of information in the brain.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Abstract	4
Inhaltsverzeichnis	6
Abkürzungen	9
1 Einleitung	12
1.1 Gliazellen des zentralen Nervensystems	12
1.1.1 Astroglia: hohe Heterogenität und komplexe Funktionen	13
1.1.2 Grundlagen der Ca ²⁺ -Signalgebung in Astrozyten	14
1.1.3 Neuron-Glia Kreislauf	16
1.2 Ziel der Arbeit	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Versuchstiere	19
2.2 Vorbereitung des zu untersuchenden Gewebes	19
2.2.1 Anästhesie und Präparation von Versuchstieren	19
2.2.2 Fluoreszenzfarbstoff	21
2.2.3 Intrakranielle Injektion genetisch kodierter Ca ²⁺ -Indikatoren	25
2.3 Methoden der Ca ²⁺ -abhängigen Fluoreszenzmessung <i>in vivo</i>	26
2.3.1 Zwei-Photon-Mikroskopie	27
2.3.2 Instrumenteller Aufbau	27
2.3.3 CCD-Kamera Aufnahme	28
2.4 Elektrophysiologische Aufnahmen	30
2.4.1 Lokale Feldpotentiale	30
2.4.2 Elektrokortikogramm	31
2.5 Sensorische Stimulation	31
2.5.1 Auditorische Stimulation	31
2.5.2 Elektrische Stimulation	32
2.5.3 Lern Paradigma	32
2.6 Pharmakologische Substanzen	33

2.7 Verhaltenstest	33
2.7.1 Nicht assoziatives Lernparadigma	33
2.7.2 Assoziatives Lernparadigma	34
2.8 Daten Analyse.....	34
3 Ergebnisse	36
3.1 Darstellung von großflächigen astrozytären Ca ²⁺ -Wellen im Maus Kortex <i>in vivo</i>	36
3.1.1 Dosisabhängige Wirkung von volatilen Anästhetika auf Ca ²⁺ -Wellen	37
3.1.2 Analyse der sensorisch evozierter Ca ²⁺ -Wellen	39
3.1.3 Langstreckenausbreitung elektrisch evozierter Ca ²⁺ -Wellen	43
3.1.4 Darstellung elektrisch evozierter Ca ²⁺ -Wellen in Astrozyten in Korrelation zur neuronalen Aktivität	48
3.2 Einzelzell-Analyse von elektrisch evozierten astrozytären Ca ²⁺ -Transienten im auditorischen Kortex der Maus <i>in vivo</i>	50
3.2.1 Etablierung einer Ca ²⁺ - spezifischen Fluoreszenzfärbung.....	51
3.2.2 Analyse des sensorisch-evozierten Aktivitätsmusters von Astrozyten.....	53
3.2.3 Ursprung sensorisch-evozierter astrozytärer Ca ²⁺ -Transienten.....	55
3.2.4 Analyse von Ca ²⁺ -Transienten während der Verwendung eines assozia-tiven Lernparadigmas.....	60
3.2.5 Ursprung evozierter astrozytärer Ca ²⁺ -Transienten unter einem assoziativen Lernparadigma Stimulus	63
3.2.6 Persistenz und Löschung der evozierten Ca ²⁺ -Transienten nach einem assoziativen Lernparadigma Stimulus.....	64
4 Diskussion.....	71
4.1 Analyse des zellulären Mechanismus der Entstehung und Weiterleitung sensorisch-evozierter astrozytärer Ca ²⁺ -Transienten <i>in vivo</i>	72
4.1.1 Beschreibung der Ausbreitung und Weiterleitung von Ca ²⁺ -Wellen.....	72
4.1.2 Intrazellulärer Mechanismus der sensorisch-evozierten Signalweiterleitung auf zellulärer Ebene.....	73
4.1.3 Ursprung der sensorisch-evozierten astrozytären Ca ²⁺ -Transienten	74
4.2 Analyse der langanhaltenden glialen Gedächtnisspur	75

4.3 Ausblick	77
5 Literaturverzeichnis	80
6 Danksagung	87
7 Eidesstattliche Erklärung	88

Abkürzungen

ΔF	Fluoreszenzänderung
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
3D	dreidimensional
%	Prozent
AAV	Adeno-Assoziierte Virusvektoren
Abb	Abbildung
AM	Acetoxymethyl Gruppe
AOM	Akustooptische Modulatoren
ATP	Adenosintriphosphat
AZSF	Artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit
$[\text{Ca}^{2+}]$	Calciumionenkonzentration
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	intrazelluläre Calciumionenkonzentration
CCD	<i>Charge-coupled device</i> (ladungsgekoppeltes Bauteil)
CO_2	Kohlendioxid
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CPA	Cyclopiazonsäure
CaCl_2	Calciumchlorid
cm	Zentimeter
Ca^{2+}	Calcium Ion
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ECoG	Elektrokortikogramm
EOM	Elektrooptische Modulatoren
F_0	Fluoreszenzgrundwert

$F_1(t)$	Fluoreszenzlevel zum Zeitpunkt t
Gq-GPCRs	<i>G-protein (Typ q) coupled receptors</i> (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren)
GCaMP6s	<i>genetically encoded calcium indicator</i> (genetisch-kodierte Calcium-Indikatoren)
Glu	Glutamat
HEPES	2 - (4-(2-Hydroxyethyl) - 1-piperazinyl) -ethansulfonsäure
Hz	Hertz
h	Stunde
InsP ₃	Inositoltrisphosphat
KCl	Kaliumchlorid
kHz	Kilohertz
LFP	Lokales Feldpotenzial
LY367385	(S) - (+) - α -Amino-4-carboxy-2-methylbenzoesäure
l/min	Liter pro Minute
ms	Millisekunde
Mhz	Megahertz
MAC-Wert	Minimale alveoläre Konzentration
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MLA	Methyllycaconitine
MPEP	2-Methyl-6-(phenylethynyl) pyridine
MCBL	<i>multi cell bolus loading</i> (Beladung von multiplen Zellen gleichzeitig)
M Ω	Megaohm
mm	Millimeter
nm	Nanometer

mW	Milliwatt
n	Anzahl
nM	Nanomolar
NA	Numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
O ₂	Sauerstoff
OGB-1	Oregon Green BAPTA-1
patch clamp technique	Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemm-Technik
PMT	<i>photonmultiplier tube</i> (Photonenverstärkerröhre)
P	Postnatal
ROI	<i>region(s) of interest</i> (interessierender Bereich, Messregion zur Fluoreszenzsignal-Auswertung)
Vaporizier	Zerstäuber
VOC	<i>Vaporizer out of Circuit</i> = Verdampfer außerhalb des Kreissystems
Vol.-%	Volumen %
VU0255035	N - [3 - Oxo - 3 - [4 - (4 - pyridinyl) -1-piperazinyl] propyl] 2,1,3-benzothiadiazole-4-sulfonamide
SPSS	Superior Performing Software System
SR101	Sulforhodamin 101
SERCA-Pumpen	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
THz	Terrahertz
TTX	Tetrodotoxin
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden in der Wissenschaft viele physiologische Funktionseigenschaften von Astrozyten entdeckt. Die Ergebnisse zeigen, dass Astrozyten sowohl einen direkten Einfluss auf die Aktivität von Neuronen, als auch auf die synaptische Übertragung, die Neuromodulation und die Plastizität, nehmen können (Araque et al., 2014; Eroglu and Barres, 2010; Haydon, 2001; Volterra and Meldolesi, 2005).

1.1 Gliazellen des zentralen Nervensystems

Gliazellen bilden zusammen mit den Neuronen die Hauptzellklassen im Gehirn, wobei Gliazellen im menschlichen Gehirn zu 90% vertreten sind (Herculano-Houzel, 2014; von Bartheld et al., 2016). Ein grundlegender Unterschied dieser beiden Zellklassen liegt in der elektrischen Erregbarkeit. Während Neurone elektrisch erregbar sind, sind Gliazellen unfähig ein Aktionspotenzial zu generieren.

Den Namen „Glia“ vergab der Mediziner Rudolf Virchow (1821-1902) in einem Kommentar zu seinem 1846 veröffentlichten Artikel (Virchow, 1846) und führte damit das Konzept der Neuroglia als passives Bindegewebe ein. Virchow bezeichnete in einer Vorlesereihe „Neuroglia als Nerven Kitt“, ein „Kitt der die Nervenmasse zusammenhält“ (Virchow, 1858) und für die Informationsübertragung im Gehirn nicht wichtig sei. Es folgte für fast ein Jahrhundert eine weitgehende Vernachlässigung dieser Zellen in Bezug auf ihrer Rolle im zentralen Nervensystem (ZNS), der Physiologie und der Funktion. Als Glia wird im ZNS eine Vielzahl von Zelltypen bezeichnet, von denen angenommen wird, dass sie in der Neurophysiologie unterschiedliche Funktionen ausüben. So werden Zellen, die von Makrophagen abstammen als Mikroglia bezeichnet.

Makroglia umfassen die drei Zelltypen Oligodendrozyten, Ependymzellen und Astroglia, (= Astrozyten), wobei unter dem Begriff „Astroglia“ alle nicht-myelinisierten Makrogliazellen im ZNS zusammengefasst werden.

1.1.1 Astroglia: hohe Heterogenität und komplexe Funktionen

Die Astroglia, auch Astrozyten genannt, bilden die Mehrheit der Gliazellen im zentralen Nervensystem von Säugetieren. Es war der Mediziner Michael von Lenhossek (1863-1937) der 1895 den Begriff „Astrozyt“ nach der sternförmigen Morphologie der Gliazelle prägte (von Lenhossek, 1895). Wie man mittlerweile weiß, ist die sternförmige Silhouette kein archetypisches Merkmal von Astrozyten. Morphologisch werden zwar auch heute noch Astrozyten unterschieden in „Protoplasmatische Astrozyten“ mit kurzen dicken, stärker verzweigten Fortsätzen vorwiegend in der grauen Hirnsubstanz und in „Fibrilläre Astrozyten“, die in der weißen Hirnsubstanz mit zahlreichen langen dünnen, wenig verzweigten Fortsätzen zu finden sind (Iadecola and Nedergaard, 2007). Aufgrund ihrer sehr hohen Heterogenität gibt es derzeit allerdings keine eindeutige Definition von Astrozyten (Bushong et al., 2002). Fibrilläre Astrozyten sind in der weißen Substanz lokalisiert und bilden 50 bis 60 Verzweigungsprozesse, die ausgehend vom Zellkörper in die obere Schicht des Gehirns, in der Pia mater als Endfüße an Blutgefäßen oder frei zwischen Axonen, enden.

Der Marker saure Gliafaserprotein (GFAP) wird in den meisten Astrozyten exprimiert. Da jedoch die Expression von GFAP nicht in allen Astrozyten stattfindet, ist GFAP nicht als alleiniger spezifischer Marker zur Identifizierung von Astrozyten geeignet. Somit scheint eine Einteilung in „Protoplasmatische Astrozyten“ und „Fibrilläre Astrozyten“ möglicherweise nicht ausreichend, um das volle Ausmaß der Astrozyten-Diversität zu erfassen. Helmut Kettenmann schrieb zu diesem Problem, dass Astrozyten die Zellpopulation sei, die nach dem Subtrahieren von Neuronen, Oligodendrozyten und Mikroglia übrig bliebe (Kettenmann and Verkhratsky, 2011).

Die Hauptfunktion der Astroglia ist die Aufrechterhaltung der Homöostase auf allen Ebenen der ZNS-Organisation. Das umfasst den Transport von Glukose und Laktat, die Aufnahme von Transmittern, die während der synaptischen Aktivität freigesetzt wurden, die Kontrolle der Ionen- und Wasserhomöostase und die Beteiligung an der Bildung und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke (Nedergaard and Verkhratsky, 2018). Aufgedeckt wurden diese Funktionen durch die ständige Weiterentwicklung von molekular- und zellbiologischen Methoden. Elektrophysiologische Messungen in Kombination mit biochemische Methoden enthüllten erste komplexe physiologische Eigenschaften der Gliazellen und läuteten somit die moderne Ära der Glia-Physiologie in den späten 50er Jahren des letzten Jahrhunderts ein (Coombs et al., 1955; Hild et al., 1958; Koelle and

Wagner, 1955). Weitere 20 Jahre später veränderte sich die Vorstellung der Glia als stille Gehirnzellen durch die Kombination der Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemm-Technik (engl. = *patch clamp technique*) und der Anwendung von Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen (Verkhratsky and Butt, 2007). Parallel zur Entwicklung der Fluoreszenz Ca^{2+} -Indikatoren wurden neue bildgebende Instrumente entwickelt. Ein großer Fortschritt war in den frühen 90er Jahren die Einführung des Zwei-Photonen-Mikroskops durch Winfried Denk und Kollegen (Denk et al., 1990) und deren Einsatz für die Ca^{2+} -Bildgebung im Nervensystem (Yuste and Denk, 1995). In den darauffolgenden Jahren führte die Anwendung der Zwei-Photonen- Ca^{2+} -Messungen, die überwiegend in Hirnschnitten durchgeführt wurde, zu der Entdeckung, dass Astrozyten bei synaptischer Aktivität mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration reagierten (Pasti et al., 1997; Porter and McCarthy, 1996).

In den späten 90er Jahren etablierte sich die dreigliedrige Synapse als ein neues Konzept in der Physiologie des ZNS. Dabei spielen Astrozyten eine aktive Rolle, indem sie Informationen mit den synaptischen Elementen austauschen und in einer langsameren Zeitskala über verschiedene Mechanismen weiterleiten (Araque et al., 1999). In Übereinstimmung mit diesem Konzept konnten Perea et al. zeigen, dass Astrozyten, zusätzlich zum klassischen zweiseitigen Informationsfluss zwischen prä- und postsynaptischen Neuronen, Informationen mit den synaptischen neuronalen Elementen austauschen, auf synaptische Aktivität reagieren und die synaptische Übertragung regulieren (Perea and Araque, 2005).

1.1.2 Grundlagen der Ca^{2+} -Signalgebung in Astrozyten

Die vielseitigsten und universellsten intrazellulären Botenstoffe im Säugetierkörper sind Ca^{2+} -Ionen. Diese Ionen sind an der Regulierung fast aller bekannten zellulären Funktionen und Reaktionen beteiligt und weisen dabei zeitliche Spannbreiten von Mikrosekunden bis zu Monaten oder sogar Jahren (z.B. Speicherprozesse) auf.

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wird durch die Wechselwirkung von Ca^{2+} -Transportern in der Membran und den zytoplasmatischen Ca^{2+} -Puffern bestimmt. Wenn Astrozyten aus dem intrazellulären Speicher Ca^{2+} ausschütten, wird die Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma (Ca^{2+}); von 100 Nanomol (nM) auf bis zu 100-1000 Mikromol (μM) erhöht.

Als Ca^{2+} -Transporter in Astrozyten dienen mehrere Superfamilien von Ca^{2+} -permeablen Transmembrankanälen, Adenosintrisphosphat (ATP)- angetriebenen Ca^{2+} -Pumpen und dem elektrochemisch angetriebenen Ca^{2+} -Austausch. Die resultierenden Ca^{2+} -Flüsse können entweder Ca^{2+} ins Zytoplasma abgeben oder aus dem Zytoplasma entfernen. Beim Eintritt in das Zytoplasma wird das meiste Ca^{2+} von Ca^{2+} -bindenden Proteinen gebunden, dies bestimmt die Ca^{2+} -Pufferkapazität der Zelle.

Ca^{2+} -Transporter sind in der Zellmembran und in der Membran intrazellulärer Organellen (z.B. endoplasmatisches Retikulum (ER), Mitochondrien und Golgi-Komplex) lokalisiert. In Zellorganellen befindet sich fast der gesamte Anteil des intrazellulären Ca^{2+} , während das freie zytoplasmatische Ca^{2+} in Gliazellen nur einen geringen Anteil (<0,001%) des gesamten Ca^{2+} -Anteils ausmacht (Pozzan et al., 1994). Akkumuliertes Ca^{2+} wird an intraluminale Proteine gebunden und kann schnell über intrazelluläre Ca^{2+} -Kanäle freigesetzt werden. Dieses allgemeine Schema gilt für alle Arten von Gliazellen (Verkhatsky and Kettenmann, 1998).

Ein besonderes Merkmal von Gliazellen ist die hohe Heterogenität in Bezug auf die Expression verschiedener molekularer Kaskaden, die an der $(\text{Ca}^{2+})_i$ Regulierung beteiligt sind.

Mittels elektrophysiologischer Techniken wurde die überraschende Feststellung gemacht, dass einige Gliazellen eine Vielzahl von spannungsabhängigen Ionenkanälen aufweisen, von denen angenommen wurde, dass sie nur in elektrisch erregbaren Zellen vorhanden sind (Sontheimer et al., 1996). So wurde gezeigt, dass mehrere Populationen sowohl der peripheren als auch der zentralen Makroglia spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle exprimieren, die den in Neuronen gefundenen ähnlich sind (Sontheimer, 1994). Ca^{2+} kann unter anderem über ligandengesteuerte Ionenkanäle in das Gliazytoplasma eintreten, die in fast allen Gliazellsubtypen reichlich exprimiert werden (Steinhauser and Gallo, 1996). Durch eine Vielzahl von Experimenten an Neurogliazellen *in vitro*, *in situ* und *in vivo* wurde die Expression mehrerer metabotroper Rezeptoren identifiziert, die bei Aktivierung durch physiologische Stimulation die Produktion von Inositol-1,4,5-Trisphosphat (InsP_3) und die anschließende InsP_3 -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER auslösen (Finkbeiner, 1993; Hamilton et al., 2008; Kastritsis et al., 1992; Kirischuk et al., 2007; McCarthy and Salm, 1991; Porter and McCarthy, 1995).

1.1.3 Neuron-Glia Kreislauf

Gliazellen sind morphologisch komplexe Zellen, die durch anatomische Spezialisierungen gekennzeichnet sind und lokale Wechselwirkungen mit anderen ZNS Elementen, einschließlich neuronaler Synapsen, Blutgefäßen und anderen Gliazellen, kontrollieren (Manninen and Linne, 2018). Astrozyten weisen eine besondere Organisationsstruktur auf, wobei jeder Astrozyt sein eigenes dreidimensionales (3D) anatomisches Territorium kontrolliert (Bushong et al., 2002).

Protoplasmatische Astrozyten der grauen Substanz sind die häufigste Gliazellenklasse. Die komplexe Morphologie dieser Zellen erinnert an einen Busch mit Verzweigungen, die Kontakte zu vielen Zelltypen in Gehirn und Spinalbereich ausbilden (Nedergaard and Verkhratsky, 2018). So berühren protoplasmatische Astrozyten Blutgefäße über perivaskuläre Endfüße. In der grauen Substanz sind Astrozyten des Weiteren eng mit neuronalen Membranen und insbesondere mit synaptischen Regionen verbunden, sodass Astroglia-Membranen in vielen Fällen mit präsynaptischen Terminalen und postsynaptischen Strukturen umschlossen sind (Kettenmann and Verkhratsky, 2011). Dabei umhüllen Astrozyten nahezu jede im ZNS vorkommende Synapse und die Verzweigungen eines einzelnen Astrozyten können bis zu 140.000 Synapsen umschließen. Mit Hilfe der „Iontophoretischen Injektion“ konnte gezeigt werden, dass Astrozyten den Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow, welcher für Gap-Junctions-Kanäle durchlässig ist, schnell weiterleiten können und somit nach Applikation bis zu mehrere tausend Astrozyten mit dem Farbstoff angereichert waren (Konietzko and Müller, 1994).

Astrozytenmembranen weisen eine große Anzahl von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) auf, die mit der Ca^{2+} -Mobilisierung aus internen Speichern verbunden sind, wobei es sich meist um Gq-GPCRs (engl. = *G-protein coupled receptors*; G-Protein-gekoppelte Rezeptoren = Gq-GPCRs) handelt. *In situ* konnte gezeigt werden, dass diese Rezeptoren über die Applikation von Agonisten aktiviert werden können, was darauf schließen lässt, dass Gq-GPCRs durch Neurotransmitter, die von präsynaptischen Terminalen freigesetzt werden, aktiviert werden (Araque et al., 2002; Pasti et al., 1997; Perea and Araque, 2005). Somit konnte die Existenz der Kommunikation von Neuronen zu Astrozyten belegt werden, wobei astrozytische Gq-GPCRs eine primäre Verbindung zwischen neuronaler Aktivität und der astrozytären Ca^{2+} -Erhöhungen darstellen (Nedergaard and Verkhratsky, 2018). Darauf aufbauend wurde eine Wechselwirkung von Astrozyten auf die synaptische Übertragung beobachtet. Über die Verwendung von Gq-

GPCR Agonisten konnte ein Ca^{2+} -Signal in Astrozyten hervorrufen werden, das dann wiederum eine Veränderung der neuronalen ionotropen Glutamatrezeptoraktivität auslöste. Weiter wurde gezeigt, dass Gliazellen funktionelle Neurotransmitter-Rezeptoren und spannungsabhängige Kanäle exprimieren (Bowman and Kimelberg, 1984; Kettenmann et al., 1984) und neuroaktive Moleküle wie Glutamat und GABA, auch Gliotransmitter genannt, freisetzen (Parpura et al., 1994; Pasti et al., 1997). Mehrere Labore entdeckten weitere Gliotransmitter wie ATP und D-Serin, die an dem prä- oder postsynaptischen neuronalen Rezeptor zur Modulation der synaptischen Übertragung und Aktivität wirken. (Bezzi et al., 1998; Navarrete and Araque, 2008; Pascual et al., 2005). Das führte zu der Erkenntnis, dass Astrozyten nicht nur passiv, sondern auch aktiv über die Freisetzung von Gliotransmittern am Informationsaustausch zwischen Neuronen teilnehmen und schließlich als aktives Element im ZNS wahrgenommen wurden (Parpura et al., 1994).

1.2 Ziel der Arbeit

Neurowissenschaftliche Forschung auf dem Gebiet der Gedächtnisbildung trägt zum Verständnis der Entstehung und des Verlaufs von Krankheiten wie der Alzheimerkrankheit und anderen Demenzformen bei und ermöglicht somit neue Ansätze für deren Behandlung.

In der Neurowissenschaft wird aktuell weitgehend anerkannt, dass Astrozyten neuronale Informationen über eine Vielzahl von Membranrezeptoren und weiteren sensorischen Mechanismen erhalten und in einen komplexen intrazellulären Ca^{2+} -Code und andere Signaltransduktionswege übersetzen (Perea et al., 2009). Neueste *in vivo* Studien weisen darauf hin, dass Astrozyten neuronale Schaltkreise modulieren und an vielen Gehirnfunktionen beteiligt sein könnten, möglicherweise auch an Gedächtnisbildung und Verhalten, indem sie die synaptische Übertragung und Plastizität benachbarter Synapsen durch Ca^{2+} -abhängige Gliotransmitter-Freisetzung erkennen und effektiv regulieren (Chen et al., 2012a; Haydon and Nedergaard, 2014; Henneberger et al., 2010; Navarrete et al., 2012; Perea et al., 2009; Poskanzer, 2016; Schummers et al., 2008; Suzuki et al., 2011; Wang et al., 2006a).

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, erstmals Mechanismen der Astrozyten-Neuronen Wechselwirkung bei der Bildung von Gedächtnisfunktionen, wie der klassischen Konditionierung, unter Verwendung der Zwei-Photonen-Mikroskopie *in vivo* auf Einzelzellebene in Gewebsschichten von 250 μ m bis zu 300 μ m zu analysieren.

Dazu sollte zunächst die Methodik der Messung von Ca²⁺-Ausschüttung in Astrozyten etabliert werden, um im nächsten Schritt Ca²⁺-Transienten in Astrozyten und die zellulären Mechanismen zur Entstehung und Ausbreitung von Ca²⁺-Wellen im Gehirn detailliert zu charakterisieren. Dafür wurden unter Verwendung des Ca²⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-8 AM Fluoreszenzmessungen in Astrozytenpopulationen des kortikalen Netzwerkes der Maus *in vivo* durchgeführt. Ein geringer elektrischer Reiz, gesetzt an der Hinterpfote der Maus, diente als sensorischer Stimulus um die intrazelluläre Ca²⁺-Ausschüttung in Astrozyten mittels einer hoch sensitiven CCD-Kamera zu messen. Zusätzlich wurde die Ausbreitung von sensorisch-evozierten Ca²⁺-Signalen in Astrozyten in der Großhirnrinde untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde evaluiert, ob Astrozyten bei einer einfachen Lernform eine zeitlich persistierende Veränderung des Aktivitätsmusters der interzellulären Ca²⁺-Ausschüttung aufweisen. Dazu wurde ein assoziatives Angstkonditionierungsparadigma verwendet, wobei an ein bis zwei Monate alten, anästhesierten Mäusen, ein konditionierter Stimulus (CS, Ton) sowie ein unkonditionierter aversiver Stimulus (US, elektrischer Stimulus) unter zeitlicher Abfolge präsentiert wurden. Zur Analyse des Neuron-Glialen Kreislaufes wurden, mittels einer Ca²⁺-spezifischen Fluo-8 AM Färbung unter der Verwendung eines Zwei-Photonen-Mikroskops, Einzelzellmessungen im auditorischen Kortex durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die wissenschaftlichen Experimente wurden unter Berücksichtigung der ethischen Tierschutzrichtlinien der Regierung von Oberbayern durchgeführt. Für diese Studie wurde als Model System Mäuse (*Mus Musculus*) mit der Wildtyp-Linie C56Bl/6 beiden Geschlechts im Alter von 20 bis zu 70 Tagen (P20-P70) verwendet. Die Versuchstiere stammen aus der institutseigenen Einrichtung und wurden in speziellen klimatisierten Tierhaltungsräumen gehalten. Die Temperatur im Tierstall betrug konstante 21-24°C. Eine Beleuchtungsanlage sorgte per Zeitschaltuhr für einen alternierenden andauernden 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus. Die Mäuse wurden in Gruppen bis zu sechs Tiere in Makrolon®-Käfigen Typ IV (innen Maße 550x330mm) gehalten und erhielten Futter (Ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser *ad libitum*.

2.2 Vorbereitung des zu untersuchenden Gewebes

In Vorbereitung auf einen chirurgischen Eingriff wurde auf eine kurze, nicht-traumatische Präparationstechnik geachtet. Allen vorausgehend war die möglichst stressfreie Handhabung des Versuchstiers, dieses vom Wachzustand in einen vollnarkotisierten Zustand zu begleiten. Nach der subkutanen Gabe eines Lokalanästhetikums (50µl von einer 2% Lidocain-Lösung) wurde mit der Kraniotomie begonnen. Die Zellen wurden mit einem Ca^{2+} -Indikator Fluo-8 AM über eine Farbstoffinjektion in das Gewebe angefärbt. Nach Einhaltung der Zeit, die zur Beladung der Zellen notwendig war, wurde das Experiment begonnen.

2.2.1 Anästhesie und Präparation von Versuchstieren

Die Betäubung des Tieres wurde durch das volatile Anästhetikum Isofluran (Abbott Wiesbaden, Deutschland) mit einem speziell kalibrierten Inhalationsanästhesiegerät, einem modernen Präzisionsverdampfer (Dräger Medical, Lübeck, Deutschland) durch-

geführt. Im Verdampfer (engl. = *vaporizer out of circuit*, VOC) wurde das Narkosemittel mengenreguliert und dem Trägergas Sauerstoff (100%iger Sauerstoffmischung mit einer Flussrate von 0,2 l/min) zugemischt. Anästhetische Dosierung und Potenz wurden in der minimalen alveolären Konzentration (MAC) (Merkel and Eger, 1963) definiert. Isofluran hat einen MAC-Wert von 1,35% (EGER, 2004) und ein Blut/Gas-Verteilungskoeffizient von 1,4 bei einer Isofluran Konzentration von 1Vol.-%. Die geringe Löslichkeit des Narkosegases Isofluran, erlaubt eine schnelle Aufnahme in das Blut und eine rasche Abgabe an das zentrale Nervensystem. Das hat zur Folge, dass die Anästhesietiefe einer schnellen Regulierung unterliegt. Zudem kommt es im Körper zu fast keiner Biotransformation und das Gas wird nahezu komplett wieder ausgeatmet (Flecknell, 2015). Der Verdampfer erlaubte eine stufenregulierbare Einstellung der Anästhetika Konzentration von 0,1 bis 2 Vol.-% und ermöglichte eine schnelle An- und Abflutung des Gases.

Zur Bestimmung der Narkosetiefe wurde ein Aufzeichnungsprogramm benutzt (AD Instruments GmbH, Spechbach, Deutschland), das die hämodynamischen Parameter (Herzfrequenz, Atmungsfrequenz und Körpertemperatur) überwachte.

Der Präparation am Versuchstier ging ein Narkoseverfahren, genannt Kammerinhalation, voraus. Das Tier befand sich während der Einleitung in einem durchsichtigen, abgeschlossenen Behälter, der mit einem Gemisch aus Sauerstoff und Anästhetikum (1,2-1,8Vol.-%) befüllt war. Alle folgenden Eingriffe fanden unter sterilen Bedingungen statt. Nach Einleitung der Narkose wurde das Tier in einen nicht-traumatischen, stereotaktischen Kopfhalter (Stoelting Co., Wood Dale, USA) eingebracht. Die Narkoseweiterführung fand nun über eine, speziell am Institut entwickelte, Narkosemaske statt. Die Körpertemperatur des Versuchstieres wurde mit Hilfe einer Wärmeplatte und unter Kontrolle eines rektalen Thermometers (Votcraft, Hirschau, Deutschland) konstant auf 37-38°C gehalten. Es wurde auf eine kurze, nicht-traumatische Präparationstechnik geachtet. Zu Beginn der Präparation am Versuchstier diente der stereotaktische Hirnatlas der Maus (Paxinos and Franklin, 2001) als Grundlage zur anatomischen Orientierung.

Paxinos stereotaktische Daten basieren auf zwei Referenzpunkten (Bregma und Lambda) auf dem Schädelknochen der Maus. Für das Experiment wurden die Augen mit Isopto-Max Creme (Alcon Pharma, Freiburg, Deutschland) abgedeckt, um die Hornhaut vor Austrocknung und Entzündung zu schützen.

Nach der subkutanen Gabe eines Lokalanästhetikums (Einwirkungszeit: 10 Minuten, 50µl einer 2% Xylocain-Lösung, AstraZeneca, Wedel, Deutschland), wurde der Skalp

(1mm x 1mm) und je nach Lokalisation der später durchzuführenden Messung auch die Muskeln mit medizinischen Präparierbesteck (Pinzette fein, Standard Skalpell, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) reseziert. Der freigelegte Schädelknochen wurde luftgetrocknet, um danach die perfundierbare Messkammer mit zentraler Öffnung mit Klebstoff (UHU Sekundenkleber, Bühl, Deutschland) auf den gesäuberten Schädel zu befestigen. Die weiteren Schritte wurden mittels eines Dissektionsmikroskops (STEMI DV4, Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Zunächst wurde mit einem zahnmedizinischen Bohrer (Master C2, Schick Dentalgeräte, Schemmerhofen, Deutschland), dessen Bohrspitze einen Durchmesser von 0,45mm hatte, im Bereich der zentralen Öffnung der Messkammer die darunter befindliche Schädelregion ausgedünnt. Anschließend wurde der ausgedünnte Knochendeckel mit einer feinen Pinzette ausgelöst. Für vereinzelte Experimente wurde die harte Hirnhaut Dura Mater mit einer stumpfen, feinen Pinzette entfernt, ohne dass darunter liegende Gewebe zu beschädigen. Zur Stabilisierung der freigelegten, pulsierenden Region der Großhirnrinde wurde diese mit einer temperierten (37°C) schnellschmelzenden Agarose (1,5%, Invitrogen GmbH Karlsruhe, Deutschland) betropft, um danach mit Carbogen begaster, artifizieller Zerebrospinalflüssigkeit, (AZSF; 125mM NaCl, 4.5mM KCl, 26mM NaHCO₃, 1.25mM NaH₂PO₄, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 20mM Glucose; pH 7.4) die mit 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid (CO₂) versehen wurde, perfundiert. Nach dem Eingriff wurde die Maus in die Messkammer auf ein Wärmekissen transferiert und die Anästhesie wurde auf 0.5-0,8% Isofluran in 100% Sauerstoff (Vol/Vol, O₂) angepasst. Eine elektrische rektale Körperinnensonde maß permanent die Körpertemperatur der Maus (36,5-37,5°C) und gewährleistete ein physiologisches Monitoring.

2.2.2 Fluoreszenzfarbstoff

Das Ziel der Fluoreszenzmessung bestand in der Visualisierung des räumlich-zeitlichen intrazellulären Ca²⁺-Signals in Astrozyten. Dazu wurde ein hochempfindlicher Ca²⁺-Indikator verwendet, der durch Anregung von kurzwelligem Laserlicht mit freiliegenden Ca²⁺-Ionen einen Chelatkomplex bildet und fluoresziert. Zum Anfärben der Astrozyten in der Schicht 1 bis 2/3 des auditorischen Kortex wurde der Ca²⁺-sensitive Fluoreszenzfarbstoff Fluo-8 AM (Acetoxymethylester; AAT Bioquest, Sunnyvale, USA), (*K_d*= 345nM

und Emissionsmaximum bei $\lambda = 516\text{nm}$) benutzt. Der Indikator wurde mit Licht der Wellenlänge 490nm angeregt und emittierte bei Licht der Wellenlänge 516nm (Abb. 1). Dabei ist die emittierende Fluoreszenz proportional zur Ca^{2+} -Menge, sodass es bei der Bindung von Ca^{2+} zu einer 20-fach erhöhten Fluoreszenz kommt (Busche et al., 2012).

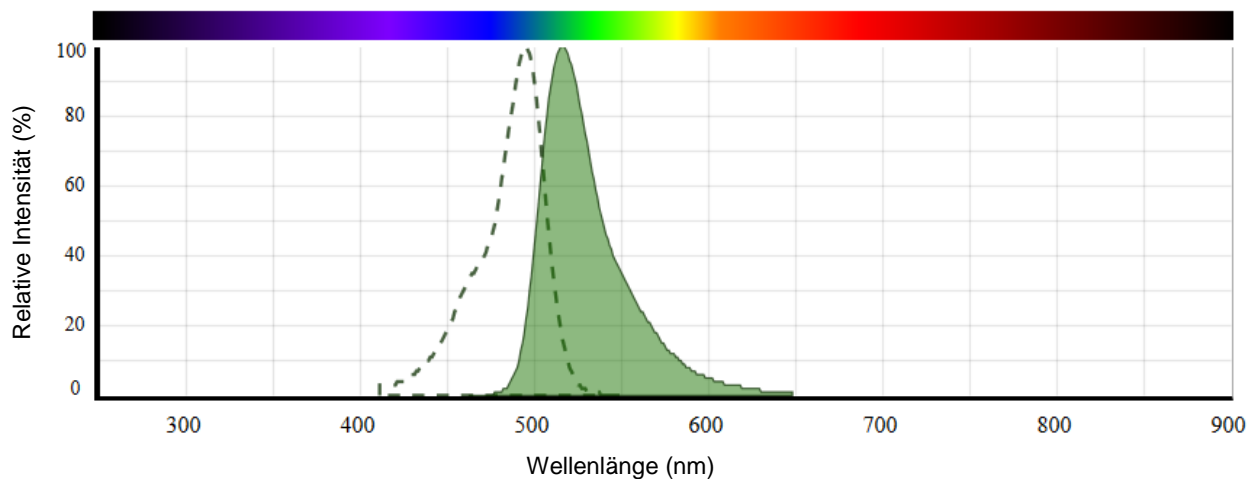


Abb. 1 Spektrum des Fluo-8 AM Farbstoffes

Spektrum des Farbstoffes Fluo-8 AM, der mit der Wellenlänge 490nm angeregt wird (gestrichelte Linie) und bei Licht der Wellenlänge 516nm (grüne Linie) emittiert (AAT Bioquest).

Die Beladung der Zellen mit AM-Ester verhalf dem lipophilen und membrangängigen Farbstoff Fluo-8 AM die Plasmamembran der Hirnzellen zu durchdringen. Dabei spalten die intrazellulären Esterasen die Esterreste des hydrophilen Fluo-8 Farbstoffs ab und ermöglichen die Bindung an das Ca^{2+} -Ion, wobei gleichzeitig das Austreten des Farbstoffs aus der Zelle verhindert wird. Der gefriergetrocknete Fluoreszenzfarbstoff wurde als Detergenz in einer 20%igen Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) hergestellt. Danach wurde dieser in Dimethylsulfoxid (DMSO, z.B. 2g Pluronic F-127 in 10ml DMSO, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einer Konzentration von 10mM gelöst und anschließend in einem Verhältnis von 1 zu 10 in einer extrazellulären Pufferlösung (150mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM HEPES) verdünnt. Die endgültige Konzentration des Farbstoffes von 1mM wurde vor Verwendung zur Injektion in das Hirngewebe mittels eines Filters mit einem Porendurchmesser von $0.45\mu\text{m}$ (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) gefiltert. Zur Applikation des Farbstoffs wurde eine Glaspipette, bestehend aus Borosilika, (Hilgenberg, GmbH, Malsfeld, Deutschland) benutzt.

In einem Kapillarieziehgerät (PP830, Narishige, Japan) wurde die Pipette in die gewünschte Pipetten-Form (Widerstand von 2,5-3M Ω) gezogen.

Für die Färbung der Zellpopulationen *in vivo* in den Hirnschichten 1 und 2/3 wurden zwei Zellfärbemethoden verwendet. Für die Anfärbung der Zellpopulationen im auditorischen Kortex wurde die in diesem Labor etablierte Methode (engl. = *multi cell bolus loading*, MCBL) (Abb. 2) (Stosiek et al., 2003) verwendet. Dazu wurde der Ca²⁺-Indikator (farbstoffhaltige Pufferlösung) in eine Injektionspipette pipettiert, um diese dann in eine stereotaktische Halterung (Stoelting Co., Wood Dale, USA) zu geben und schließlich durch maschinelle Koordinierung in das Hirngewebe einzubringen (Abb. 2). Um Zellen im auditorischen Kortex anzufärben war ein Winkel von 60° relativ zur Mittellinie notwendig. Mit einem Mikromanipulator (Märzhäuser GmbH, Wetzla, Deutschland) einer Präzisions-Injektionstechnik wurde die Glaspipette 400 μ m tief in den auditorischen Kortex eingebracht. Die Applikation von Flüssigkeitsvolumen, wie Farbstoffe oder auch pharmakologische Stoffe, wurde mit einer speziellen Druck-Applikations-Technik (WPI, PicoPump Berlin, Deutschland) durchgeführt. Der Druck betrug circa 0,5bar. Um das maximale Fluoreszenzlevel zu erreichen, wurde erst nach 45-60 Minuten Dauer die Messung mit dem Laser-Mikroskop begonnen.

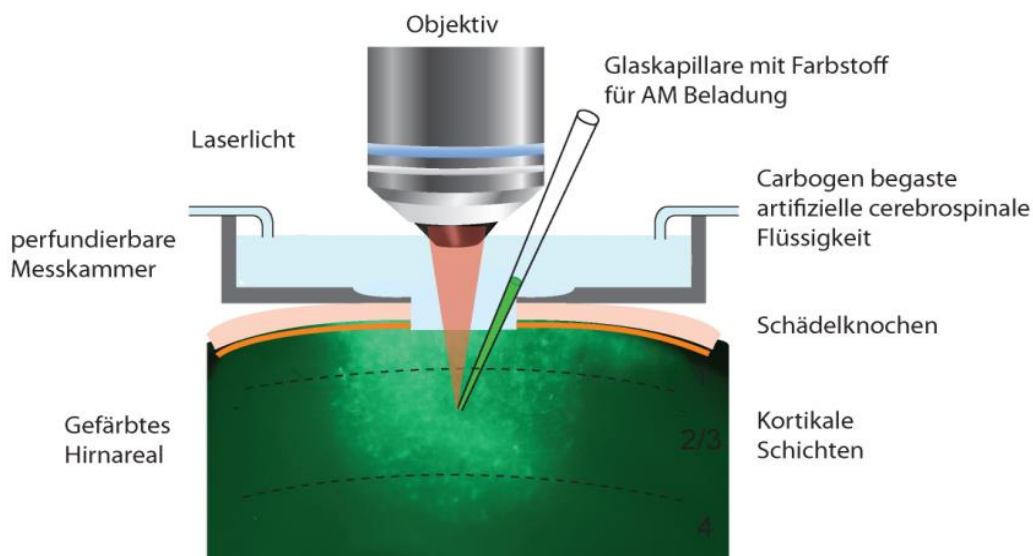


Abb. 2 Experimenteller Aufbau für die *in vivo* Färbung der Astrozytenpopulation mit dem Calciumindikator Fluo-8 AM

In der Glaspipette befindet sich der Ca²⁺-Indikator Fluo-8 AM. Mit einem Mikromanipulator wird die Glaspipette 400 μ m tief in die Hirnschicht 2/3 des Kortex der Maus mittels Druck-Applikations-Technik eingebracht.

Für die Experimente im Bereich der oberen kortikalen Schichten wurde die Färbemethode der Oberflächenbeladung mit dem Ca^{2+} -Indikator Fluo-8 AM verwendet (Hirase et al., 2004). Diese Methode bot sich hauptsächlich für die oberen Zellschichten des Kortex an und ermöglichte eine selektive Beladung von Astrozyten, da Neurone und andere Zelltypen keinen direkten Kontakt mit der Oberfläche des Kortex bilden (Tian et al., 2006). Im Gegensatz dazu, wird bei der AM Beladungstechnik (Stosiek et al., 2003), die auf einer Druck-Injektion (für 1-5 Minuten) des Kalzium-Indikators in den Extrazellulärraum der jeweiligen Hirnregion (Garaschuk et al., 2006) beruht, eine selektive Analyse der astrozytären Ca^{2+} -Signalgebung über einen größeren räumlichen Bereich hinweg ermöglicht (Hirase et al., 2004; Takano et al., 2006). Die Färbemethode diente dazu, Ca^{2+} -Transienten sichtbar zu machen, die entweder aus der spontanen zytosolischen Ca^{2+} -Fluktuation in Astrozytenpopulation im Säugetier-Hirn stammen oder durch sensorische Stimulationen (A-M Systems, Carlsborg, USA) ausgelöst wurden. Dazu wurde der in einer Pufferlösung gelöste Farbstoff Fluo-8 AM (20 μl) großflächig und topisch auf der gesamten Kraniotomie-Öffnung (4,5mm x 3mm) einer anästhesierten Maus aufgetragen. Der Ca^{2+} Sensor diffundierte durch die weiche Hirnhaut der Pia Mater in die Schichten 1 bis 2/3 des Kortex über die Dauer von 40-60 Minuten durch das Zellgewebe und gelangte so mehrere Mikrometer tief (300 μm). Anschließend wurde das freigelegte Hirngewebe mit 38°C angewärmten Puffer perfundiert. Der Vorteil dieser Färbemethode war die Instandhaltung des Hirngewebes. Für Untersuchungen am Gehirn wurde oberhalb des Untersuchungsbereiches ein Schädelfenster geöffnet, das zugleich den Zugang für die Aufnahme-Elektroden zuließ. Ein Problem der *in vivo* Bildgebung waren Gewebepulsationen, die durch die Atmung und den Herzschlag des Versuchstieres verursacht waren. Zur Limitierung dieser Artefakte wurde eine selbst angefertigte Aufnahmekammer, die ein zentrales Loch aufwies, auf den freigelegten Schädelknochen aufgeklebt. In der mittigen Aussparung der Kammer wurde das Gehirn freigelegt. Um Pulsationen so weit wie möglich zu dämpfen, wurde Agar auf die Öffnung des Schädels gegeben, was zu einer sehr guten Stabilität für die Bildaufnahme führte (Garaschuk et al., 2006). Zusätzlich wurde die am Schädel aufgeklebte Kammer in eine Fixier-Halterung gegeben, um zusätzlich Bewegungsartefakte herauszufiltern. Diese Anpassungen ließen nun eine stabile Bildgebung mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop zu.

2.2.3 Intrakranielle Injektion genetisch kodierter Ca²⁺-Indikatoren

Die Verwendung eines hochauflösenden Mikroskopie-Verfahrens in Kombination mit einem genetisch kodierten Ca²⁺-Indikator (GECIs) GCaMP6slow (engl. = *genetically encoded calcium indicator*; genetisch-kodierte Ca²⁺-Indikatoren) ermöglichte eine weitgehend spezifische Expression lichtsensitiver Fluoreszenzproteine in Astrozyten im ZNS. GCaMP6slow wurde mittels Adeno-Assoziierten Virusvektor (AAV) unter der Kontrolle eines GFAP Promoter (Abb. 3) exprimiert. Das GCaMP6slow Konstrukt stammt aus der Arbeitsgruppe von Bruno Weber, erstellt von Jillian Stobart. Dieser Promoter ist weitgehend spezifisch für Astrozyten und ermöglicht die Langzeitbeobachtung der Anatomie sowie der Aktivität von individuellen Astrozyten im Kortex. Für die in diesem Rahmen verwendete Methode der Injektion viraler Vektoren, befand sich das Tier während der Einleitung in einem durchsichtigen, abgeschlossenen Behälter, der mit einem Gemisch aus Sauerstoff und Anästhetikum (1,2-1,8Vol.-% Isofluran) gefüllt war. Alle folgenden Eingriffe fanden unter sterilen Bedingungen statt, so auch das Aufbringen von Augensalbe zum Schutz der Hornhaut. Nach Einleitung der Narkose wurde das Tier in einen nicht-traumatischen, stereotaktischen Kopfhalter (Stoelting Co., Wood Dale, USA) eingebracht. Die Narkoseweiterführung fand nun über eine Narkosemaske statt. Die Körpertemperatur des Versuchstieres wurde mit Hilfe einer Wärmplatte und unter Kontrolle eines rektalen Thermometers konstant auf 37-38°C gehalten. Die Narkosetiefe wurde unter ständiger Kontrolle (Abwesenheit von Schmerzreflexen und Vibrissenbewegungen) und bei Bedarf durch Justage der Isofluran Konzentration eingestellt. Nach der subkutanen Gabe eines Lokalanästhetikums (Xylocain 2%), wurde der Kopf rasiert und mit Braunol®-Lösung (Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Danach wurde der Skalp mit medizinischem Präparierbesteck reseziert (1mm x 1mm). Nach Trocknen des Schädelknochens wurde mit einem zahnmedizinischen Bohrer (Bohrspitzendurchmesser 0,45mm) die Schädelregion ausgedünnt, um schließlich mit einer stumpfen feinen Pinzette den ausgedünnten Knochendeckel auszulösen. Über diesen Zugang zum freigelegten Gehirn wurde eine Injektionskapillare mittels eines stereotaktischen Geräts (Institutseigene Werkstatt, Elemente von (Anilam, Schaumburg, USA), (Cartesian Research, Sandy, USA) in die gewünschte Gehirnregion eingebracht. In der Injektion befanden sich 100nl virionenhaltige Lösung, die via Luftpresse in das Hirngewebe einbracht wurden. Anschließend wurde die verbliebene Injektionskapillare nach 10 Minuten wie-

der entfernt. Die Öffnung der Schädelkalotte (Durchmesser 0.4mm) wurde nicht verschlossen, da dies nach unseren Erfahrungen zu Entzündungen führen konnte. Die Wunde wurde mit einem Wundfaden vernäht (Perma-Hand, 6-0, Ethicon, USA).

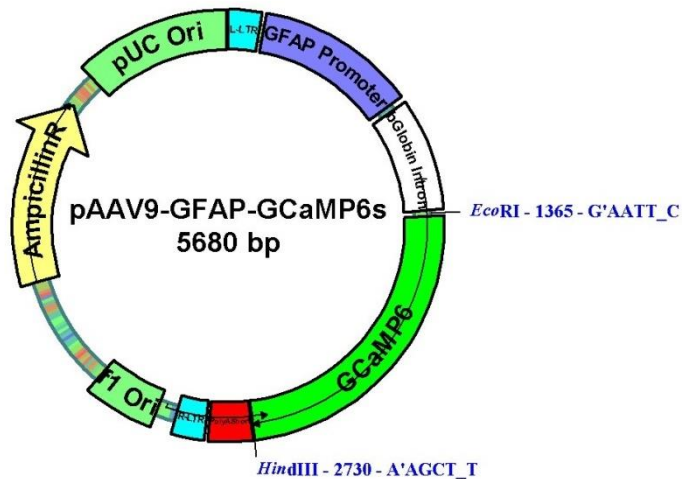


Abb. 3 Plasmid Karte von: pAAV9-GFAP-GCaMP6s

Restriktionsenzym EcoRI (sticky ends) und HindIII, GCaMP6s = GCaMP6 (slow). Das GCaMP6s Konstrukt stammt aus der Arbeitsgruppe von Bruno Weber und wurde von Jillian Stobart erstellt.

2.3 Methoden der Ca²⁺-abhängigen Fluoreszenzmessung *in vivo*

Für einen direkten Einblick in das intakte Gehirn wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit die bildgebenden Untersuchungsverfahren der CCD-Kamera Messung und der Zwei-Photonen-Mikroskopie verwendet. Diese Schlüsseltechnologien (Boyle and Smith, 1970; Denk et al., 1990) zusammen mit der AM-Beladungsmethode (Stosiek et al., 2003) ermöglichten zum einen die Darstellung von großen Populationen neuronaler Ca²⁺-Wellen auf der kortikalen Oberfläche (Busche et al., 2015; Stroh et al., 2013) und zum anderen die selektive neuronale Einzelzelldarstellung als hochauflösende Bildgebung in tieferen Zellschichten des Gehirns (Chen et al., 2012b; Tischbirek et al., 2015).

2.3.1 Zwei-Photon-Mikroskopie

2.3.2 Instrumenteller Aufbau

Je nach Fragestellung und Experimentaufbau wurde ein jeweils passender Messstand für das zu untersuchende, biologische Feld verwendet. Um das intrazelluläre Ca^{2+} -Fluoreszenzverhalten einer Population von Astrozyten zu verfolgen, wurde eine CCD-Kamera (engl. = *charge-coupled device*) (ladungsgekoppeltes Bauelement) verwendet. Dies ermöglichte die Aufnahme und Beobachtung von einer breiten Palette astrozytischer Ca^{2+} -Signale. Wir haben *in vivo* Aufnahmen mit einer Hochgeschwindigkeits-Digitalkamera (Neuro CCD, RedShirt Imaging) durchgeführt, die mit einem Makro-Zoom-Fluoreszenzmikroskop gekoppelt war. Der fluoreszierende Ca^{2+} -Indikator OGB-1 wurde mit einem blauen Licht emittierenden Laserdiode (PL 450B, Osram Opto Semiconductor) bei 450nm angeregt. Die Bilder wurden mit 125Hz (80 x 80 Pixel) mit einem benutzerdefinierten LabView-Datenerfassungsprogramm (National Instruments) aufgenommen. Die Beziehung zwischen Ca^{2+} -Fluoreszenzsignalen und der fortlaufenden elektrischen Aktivität wurde durch Lokale-Feldpotential (LFP)-Aufzeichnungen, unter Verwendung einer mit artifizieller Zerebrospinalflüssigkeit (AZSF) gefüllten Glasmikropipette bewertet. Die Technik der Zwei-Photonen-Mikroskopie mit der hochauflösenden Bildgebung ermöglichte nun die Einzelzelluntersuchungen in tieferen Gewebeschichten des Gehirns. Dafür wurde als Lichtquelle ein Mode-locked Ti:sapphire Laser (Spectra Physics) MaiTai Deepsee verwendet. Der Titan-Saphir-Laser hatte eine Bandbreite von circa 400nm (670nm - 1070nm). Der Laserpuls mit einer Frequenz von 920nm bestand aus einem Wellenlängenspektrum zwischen 900nm und 940nm. Für die Laserpulse im Scanvorgang wurden zwei Spiegel benötigt.

Die Zwei-Photonen-Bildgebung wurde an einem speziell angefertigten Messstand durchgeführt. Dieser bestand aus einer kombinierten Scaneinheit (GSI Lumonics, Unterschleißheim, Deutschland) aus dem 12kHz schnellen Resonanzspiegel und einem langsamen 8kHz Standard galvanometrischen Spiegel, um eine hohe Geschwindigkeit und eine hervorragende Auflösung des abgetasteten Objektes zu gewährleisten. Dieses Laser-Scanner-System wurde kombiniert mit einem aufrechten Lichtmikroskop (BX51; Olympus, Japan), angebracht auf einem schwingungsfreien Tisch (Microplan Schwingungstechnik, Saarbrücken), der mit einem Wasser-Immersion Objektiv (40x/0.8; Nikon,

Japan) verwendet wurde. Die Exzitations-Laser Wellenlänge für Fluo-8 AM gefärbten Astrozyten betrug 920nm und für den Intrazellulärraum wurde Alexa Fluor 954 Hydrazide (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Für die gleichzeitige Darstellung von astrozytärer, emittierter Fluoreszenz und der gesamten emittierten Fluoreszenz bei 570nm wurde diese über jeweils einen dichroitischen Strahlenteiler spektral aufgeteilt und konnte jeweils von einer Photonenverstärkerröhre (photomultiplier tube PMT) (Hamamatsu Photonics, Japan), einer speziellen Elektronenröhre zur Messung der Fluoreszenz, detektiert werden. Die Erfassung der Messdaten erfolgte mit einem Aufnahme-Programm, das in der Programmiersprache LabView (Version 8.2, National Instruments, Austin, Texas, USA) geschrieben war.

Die Technik der Zwei-Photonen-Mikroskopie mit der hochauflösenden Bildgebung ermöglicht eine schonende, nicht invasive Analyse im Bereich der Einzelzelluntersuchungen in tieferen Gewebeschichten des Gehirns *in vivo*. Der Zwei-Photoneneffekt zur Anregung fluoreszierender Moleküle ist ein nichtlinearer Absorptionsprozess und wird für die Fluoreszenzmikroskopie von dreidimensionalen biologischen Zellpopulationen und Geweben genutzt.

Um das Fluoreszenzverhalten von Astrozyten in tieferen Hirnschichten zu detektieren, wurde ein hochauflösendes Zwei-Photon-Mikroskop verwendet. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Ausschüttung in Astrozyten wurde mit Hilfe der fluoreszierenden Ca^{2+} -Messung beobachtet, dessen zeitliche Auflösung im Millisekundenbereich und die hohe räumliche Auflösung im Mikrometerbereich lagen. Da Astrozyten sehr empfindlich auf Laseranregung reagieren, wurde die durchschnittliche Laserenergie an die Messtiefe im Gehirn angepasst und betrug im Durchschnitt 10-20mW. Das Schreiben und Lesen dieser Bilddaten-Dateien wurde mit der NI Software Technologie verbunden.

2.3.3 CCD-Kamera Aufnahme

Zur Visualisierung des Fluoreszenzverhaltens von angefärbtem, intrazellulärem Ca^{2+} , freigesetzt aus einer Population von Astrozyten, wurde eine CCD-Kamera Technik (engl. = *charge coupled device*, ladungsgekoppeltes Bauelement); (80 x 80Pixel, Aufnahmegeschwindigkeit 40Hz); (NeuroCCD, RedShirtImaging, Decatur, USA) verwendet. Bei einer anästhesierten Maus wurde eine Kraniotomie (4,5mm x 3mm) durchgeführt, die den anterioren Bereich des visuellen Kortex umschloss und bis einschließlich zum

präfrontalen Kortex verlief. Im *in vivo* Experiment wurde zur Limitierung von Gewebepulsationen und um das freigelegte Hirngewebe mit einer Nährlösung perfundieren zu können, eine selbst angefertigte Kammer mit einem Loch in der Mitte auf die Kraniotomie aufgeklebt. Dann wurden mit der Färbetechnik der Oberflächenbeladung selektiv, großflächige Astrozytenpopulationen mit dem Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoff Fluo-8 AM angefärbt. Die Färbelösung ($80\mu\text{l}$) wurde mit einer Mikropipette (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) auf das freipräparierte Hirngewebe der Kortexoberfläche für 45-60 Minuten aufgetragen. Ein schmaler Ring, bestehend aus Dental Zement (Charisma, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland), aufgetragen am Rand der Kraniotomie sollte ein Abfließen des Farbstoffes verhindern (Abb. 4). Danach wurde die Aufnahmekammer mit Normal-Ringer-Lösung perfundiert, um den Farbstoff auszuwaschen. Der Messstand bestand aus einer CCD-Kamera, die an einem Fluoreszenzmikroskop (MacroView MVX10, Olympus, Tokio, Japan) installiert war sowie einem PMT und einem dichroiden Spiegel. Die Aufzeichnung der Zellsignale, erzeugt über das Anregungslicht (Wellenlänge 450nm) der Photodiode, erfolgte über die Spannungserfassungs-Karte NI-PCI6221 (National Instruments, Austin, Texas, USA) und einem Analog-Digital-Wandler. Die Darstellung in Echtzeit mittels eines Computers (DELL Inc., Round Rock, Texas, USA) und die Datenspeicherung wurden durch ein im Institut geschriebenen Computerprogramm, welches in der Programmiersprache LabView (National Instruments, Austin, Texas, USA) erstellt war, gewährleistet.

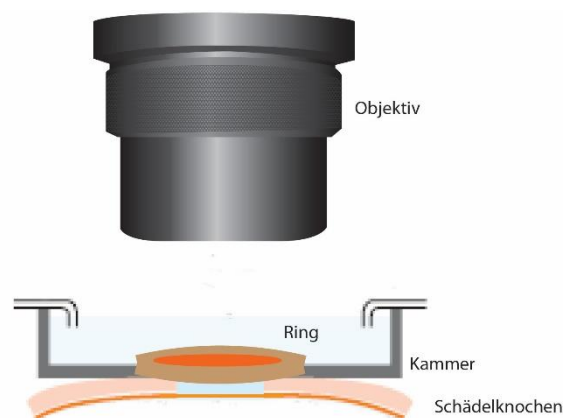


Abb. 4 Färbetechnik der Oberflächenbeladung zur Anfärbung von Zellpopulation

Der Ca^{2+} -Farbstoff ($80\mu\text{l}$) Fluo-8 AM wurde auf die freigelegte Oberfläche des Kortex mittels

einer Mikropipette aufgetragen. Ein schmaler Ring, der am Rand der Kraniotomie mit Dental Zement gebildet wurde, verhinderte das Ablaufen des Farbstoffes.

2.4 Elektrophysiologische Aufnahmen

Für die Untersuchung der Netzwerkaktivität im Kortex, wurde die Messung der lokalen Feldpotentiale (LFP) durchgeführt. Als Indikator für die Anästhesietiefe und zur Auslese der globalen elektrischen neuronalen Aktivität, wurde ein Elektrokortikogramm (*engl. electrocorticogram*, ECoG) verwendet. Das ECoG Signal wurde über der ipsilateralen Hirnhälfte abgeleitet und spiegelte die Summe aller postsynaptischen Potentialen im Messgebiet wider (Buzsaki et al., 2012).

2.4.1 Lokale Feldpotentiale

Für die Untersuchung der neuronalen Netzwerkaktivität im Kortex, wurde die Messung der lokalen Feldpotentiale (LFP) durchgeführt (Buzsaki et al., 2012). Das LFP-Signal diente dabei auch als Kontrollmessung um auszuschließen, dass es nach Durchführung der Kraniotomie, zu einer Beeinträchtigung der Hirnfunktion gekommen war. Für die Datenerfassung wurde ein EPC10 Verstärker (USB Quadro Amplifier, HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) sowie ein Filter verwendet. Zur weiteren Abschirmung von Störsignalen im Bereich von 60Hz wurde die Messsonde mit Aluminiumfolie ummantelt und damit abgeschirmt. Während der Messung befand sich das anästhesierte Tier auf einer Wärmeplatte und ein besonders Augenmerk wurde auf die Kontrolle der physiologischen Parameter gelegt. Zur Messung der LFP Signale wurde eine Borosilikat-Glaskapillare aus dem Kapillarziehgerät (PP830, Narishige, Japan) in die Pipettenform mit einem Widerstand von 2,5M-3M gezogen. Bevor die Pipette mit einem Mikromanipulator mehrere μm tief in das Gehirn positioniert wurde, wurde die Pipette mit AZSF (148mM Kaliumgluconat, 10mM HEPES, 10mM NaCl, 0.5mM MgCl₂, 4mM MgATP, 0.4mM Na₂GTP 20mM Glucose; pH 7.4) und zur Sichtbarmachung mit 50 μM Alexa 594 (Invitrogen, Carlsbad, USA) befüllt, um eine physiologische Messung der Zellen zu gewährleisten.

2.4.2 Elektrokortikogramm

Das Elektrokortikogramm (*engl. electrocorticogram, ECoG*) wurde als Indikator für die Anästhesietiefe und zur Auslese der globalen neuronalen Aktivität verwendet. Das ECoG Signal wurde über der ipsilateralen Hirnhälfte abgeleitet, es bestand aus der Summe aller postsynaptischen Potentialen im Messgebiet (Buzsaki et al., 2012). Zur Vorbereitung der folgenden Arbeitsschritte wurde der anästhesierten Maus der Skalp abgetrennt und der Schädelknochen freigelegt. Es wurde über den frontalen bzw. parietalen Anteilen der Großhirnrinde (1. Elektrode: 1mm anterior zu Bregma/ 1mm lateral zur Mittellinie; 2. Elektrode: 3mm posterior zu Bregma/ 3mm lateral zur Mittellinie in der ipsilateralen Hemisphäre) mit dem zahnmedizinischen Bohrer jeweils eine Öffnung (1mm) gebohrt, um die zwei Messelektroden (zwei Silberdrähte mit jeweils 0.25mm Durchmesser) unter den Schädelknochen zu schieben und anzubringen. Dort wurden die Elektroden mit Dental Zement fixiert. Eine Erdungselektrode wurde in den Nackenmuskel befestigt. Das Signal wurde mit einem Verstärker EXT 10-2F (npi Electronic, Tamm, Deutschland) aufgezeichnet, bei 0,1Hz (Hochpassfilter) und 1kHz (Tiefpassfilter) gefiltert und mit einer Spannungserfassungs-Karte NI-PCI 6221 (National Instruments, Austin, Texas, USA) bei 2kHz digitalisiert.

2.5 Sensorische Stimulation

2.5.1 Auditorische Stimulation

Die Tonstimulation im anästhesierten Tier (Isofluran 0,6%; Vol/Vol) fanden in einem Frequenzbereich von 10Hz bis 20kHz statt und variierten zwischen der Präsentation von weißem Rauschen oder reinen Tönen. Erzeugt wurden die Tonsignale mit Hilfe eines grafischen Programmiersystems von National Instruments (LabView, Austin, Texas, USA). Eine Audiokarte (NI-PCI 6731, National Instruments) gab das Signal an und ein elektrostatischer Lautsprecher (ES1, Tucker Davis Technologies, Gainesville, Florida, USA), der sich in einem 5cm Abstand kontralateral zum Tier befand, ab. Das Protokoll

der Furchtkonditionierung beinhaltete einen reinen Tonstimulus (8kHz, 70dB Schalldruckpegel), bestehend aus 33 Rechteckpulsen von 50ms Dauer mit einem Interstimulus Intervall von 250ms, sodass der Stimulus insgesamt 9.9s dauerte.

2.5.2 Elektrische Stimulation

Als weitere, sensorische Stimulation wurde die elektrische Stimulation verwendet, um eine intrazelluläre Ca^{2+} -Ausschüttung in Astrozyten hervorzurufen. Das anästhesierte Tier bekam über eine Elektrode, die am Hinterlauf befestigt wurde, einen elektrischen Impuls für 1s mit einer Intensität von 0.8mA - 1mA. Angesteuert wurde die Elektrode über ein graphisches Programmiersystem von National Instruments und über einen EPC10 Verstärker (USB Quadro Amplifier, HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland).

2.5.3 Lern Paradigma

Für die Messung, ob durch Furchtlernen ein Einfluss auf Astrozyten provoziert werden kann, verwendeten wir ein assoziiertes Furchtkonditionierungs-Paradigma. Der konditionierte Stimulus (CS, ein auditorischer Hinweisreiz) wurde mit der Präsentation eines un konditionierten aversiven Stimulus (US, ein elektrischer Reiz) gepaart. Es wurde im auditorischen Kortex der kopffixierten, anästhesierten Maus ein gepaarter Ton mit elektrischen-Stimulus davor, während und nach der Präsentation der Konditionierung verabreicht. Der konditionierte Stimulus ist ein 9.9s andauernder, sich wiederholender reiner Ton (8kHz, 70dB), bestehend aus 33 Rechteckpulsen mit 50ms Dauer und einem Interpuls-Intervall von 250ms (ES1, Tucker Davis Technologies, Gainesville, Florida, USA). Der un konditionierte Stimulus ist ein Stromimpuls von 1s Dauer mit einer Stromstärke von 1mA und dieser wurde dem Tier, über eine am Gelenk der Hinterpfote befestigte Metallschleife, abgegeben. Der Beginn des Strompulses war das Ende des letzten Tonimpulses. Das Intervall zwischen den Paarungen betrug 3 Minuten. Der Lautsprecher war ~5cm vom kontralateralen Ohr der Maus entfernt, befestigt. Nach 10 – 15 Paarungen des Stimulus unter Anästhesie (0.5-0.8% Isofluran) stellte sich eine Furchtkonditionierung ein (Abb. 20).

2.6 Pharmakologische Substanzen

Zur Untersuchung des Signalwegmechanismus in Astrozyten wurden ausgesuchte pharmakologische Substanzen verwendet. Dazu gehörten die chemisch hergestellten Rezeptor-Agonisten sowie -Antagonisten. Für die größere Kraniotomie wurde die Applikation einer Badlösung bevorzugt, während bei den kleinen Kraniotomien die lokale Einspritzung mit einer Druckapplikation unter visueller Führung verwendet wurde. Es kamen die im Folgenden hier aufgelisteten Substanzen zur Anwendung: Cyclopiazonsäure (CPA), 50µm, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland); Thapsigargin, 10µm, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland); Ryanodine, 50µm, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland); Methyllaconitine (MLA), 100µm, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland); N-[3-Oxo-3-[4-(4-pyridinyl)-1-piperazinyl]propyl]-2,1,3-benzothia-diazole-4Sulfonamide (VU0255035), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland); 2-Methyl-6-(phey lethynyl) pyridine (MPEP), 100µm, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland); (S)-(+)-α-Amino-4-carboxy-2-methylbenzeneaceticacid (LY367385) 100µm, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland); Phentolamine, 50µm, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland); Tetrodotoxin (TTX), 0,5µM, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland).

2.7 Verhaltenstest

2.7.1 Nicht assoziatives Lernparadigma

Es wurde eine Gewöhnung der Umgebung als nicht assoziatives Lernparadigma verwendet. Dabei sollte das Versuchstier, das auf einem Edelstahl Bodengitter (eine Anfertigung der institutseigenen Werkstatt) in einer Acrylglasbox (30cm x 20cm x 20cm) saß, nicht auf einen wiederholenden Reizstimulus reagieren. Aufgezeichnet wurde das Verhaltensexperiment mit einer CCD-Kamera (Bildgebungsrate 30Hz) und der Tonstimulus wurde über einen elektrostatischen Lautsprecher (ES1, Tucker Davis Technologies, Gainesville, Florida, USA), welcher über der Box befestigt war, gesendet. Der Messstand war zudem mit einer Digital Kamera (DCR-HC96E, Sony, Tokio, Japan), die oberhalb der Plastikbox befestigt war, ausgerüstet.

2.7.2 Assoziatives Lernparadigma

Es wurde unter der Anwendung eines assoziativen Lernparadigmas, dem assoziativem Furchtkonditionierungs-Paradigma, untersucht, ob es in Astrozyten zu einer Ca^{2+} -Ausschüttung kommt. Für die Kontrollexperimente wurden wache Tiere in eine Plastikbox mit einem Edelstahl Bodenrost gesetzt. Der Messstand war zudem mit einer Digital Kamera (DCR-HC96E, Sony, Tokio, Japan), die oberhalb der Plastikbox befestigt war, ausgerüstet. Die Kamera diente dazu, das regungslose Verharr-Verhalten (engl. = *freezing*) bei Stimulus Abfolge im wachen Tier beobachten zu können und aufzuzeichnen. Es wurde eine Stimulus Abfolge von drei zu fünf Paarungen des Konditionierungsvorgangs, mit einem Intervall von 3 Minuten, durchgeführt. Danach wurde die Maus in ihren Käfig zurückgesetzt. Nach 1 bis 15 Tagen nach der Konditionierung wurden die Mäuse entweder im Verhaltenstest auf die erlernte Konditionierung des „freezing“ getestet, oder in Narkose im *in vivo* Experiment am Zwei-Photonen-Messstand darauf untersucht.

2.8 Daten Analyse

Die Weiterverarbeitung der Bilddaten-Dateien aus der Zwei-Photonen-Messungen erfolgte über ein institutsintern geschriebenes Computerprogramm, basierend auf der Programmiersprache von LabView (National Instruments, Austin, Texas, USA). Die graphischen Anwendungen der Bildverarbeitungssoftware ermöglichte eine Definition von Zellstrukturen mittels der Festlegung eines interessierenden Bereichs (Messregion zur Fluoreszenzsignal-Auswertung (engl. = *regions of interest*, ROI)), dass das Aufnahme-feld in einzelne Zellen und Neuropil unterteilte. Das Programm maß dabei die Fluoreszenz-Intensität der Ca^{2+} -Ausschüttung in Astrozyten. Zur Detektion und graphischen Darstellung der Ca^{2+} -Transienten wurde das Software Programm Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon, USA) verwendet. Die gemessene Fluoreszenz der Ca^{2+} -Transienten von Astrozyten wurde in relative Fluoreszenzänderung ($\frac{\Delta F}{F}$) im Vergleich zur Ruhefluoreszenz (F_0) gemessen. Die Formel dazu lautet:

$$\frac{\Delta F}{F} = \frac{F - F_0}{F_0}$$

Die Kriterien zur Detektion eines Ca^{2+} -Transienten beinhalteten eine relative Fluoreszenzänderung die größer war, als die dreifache Standardabweichung des Ruhefluoreszenzwertes. Für die statistische Auswertung wurde das Software-Programm (engl. = *Statistical Package for the Social Sciences*) (SPSS inc., Chicago, USA) verwendet. Nach der Prüfung der Normverteilung wurden der gepaarte und der ungepaarte t-Test verwendet. $P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Für die Auswertung der Videodaten aus dem Verhaltensversuch wurde ein institutsinternes geschriebenes Computerprogramm basierend auf der Programmiersprache von LabView (National Instruments, Austin, Texas, USA) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Darstellung von großflächigen astrozytären Ca^{2+} -Wellen im Maus Kortex *in vivo*

Im ersten Teil der Dissertation galt es evozierte, astrozytäre Ca^{2+} -Signale detailliert zu charakterisieren. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Ausschüttung in Astrozyten wurde mittels einer CCD-Kamera gemessen. Zur sensorischen Stimulation diente ein geringer elektrischer Impuls, gesetzt an der Hinterpfote der Maus. Für die Untersuchung von astrozytären Ca^{2+} -Transienten *in vivo*, wurden zunächst die optimale Konzentration des Anästhetikums sowie auch die optimale elektrische Stimulationsstärke etabliert. Dabei wurde erstmalig die Langstreckenausbreitung von elektrisch evozierten, astrozytären Ca^{2+} -Transienten auf Populationsebene in der Großhirnrinde gemessen. Des Weiteren wurden die Rahmenbedingungen und die Methoden zur Detektion der Ca^{2+} -Ausschüttung in Astrozyten etabliert. Evozierte astrozytäre Ca^{2+} -Wellen, die sich über mehrere kortikalen Regionen des Mausgehirns ausbreiten, wurden mit einer CCD-Kamera (80 x 80Pixel) *in vivo* untersucht. Zuvor wurden die Versuchstiere mittels des volatilen Anästhetikums Isofluran in einen vollnarkotisierten Zustand versetzt. Darauf folgte eine großflächige Kraniotomie von 4,5mm x 3mm vom anterioren Ende des visuellen Kortex bis zum präfrontalen Kortex (Abb. 7A-B, gestrichelte Linie). Diese Art der Kraniotomie wurde benötigt, um große fluoreszierende Astrozytenpopulationen messen und die Ausbreitung des Ca^{2+} -Signals anschließend analysieren zu können.

Eine selektive Anfärbung von Astrozyten in der kortikalen Schicht 1 und 2/3 (Abb. 5) erfolgte über den Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-8 AM. Dieser wurde auf die Oberfläche der Kraniotomie und der dabei erhalten gebliebenen Dura Mater (äußere Hirnhaut) aufgetragen. Die Messung des Markers Sulforhodamin 101 (SR 101), der spezifisch von kortikalen Astrozyten aufgenommen wird, diente als Kontrolle für die Selektivität des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-8 AM (Abb. 16). Danach erfolgte eine Analyse astrozytärer Ca^{2+} -Transienten nach elektrischer Stimulation (Abb. 9).

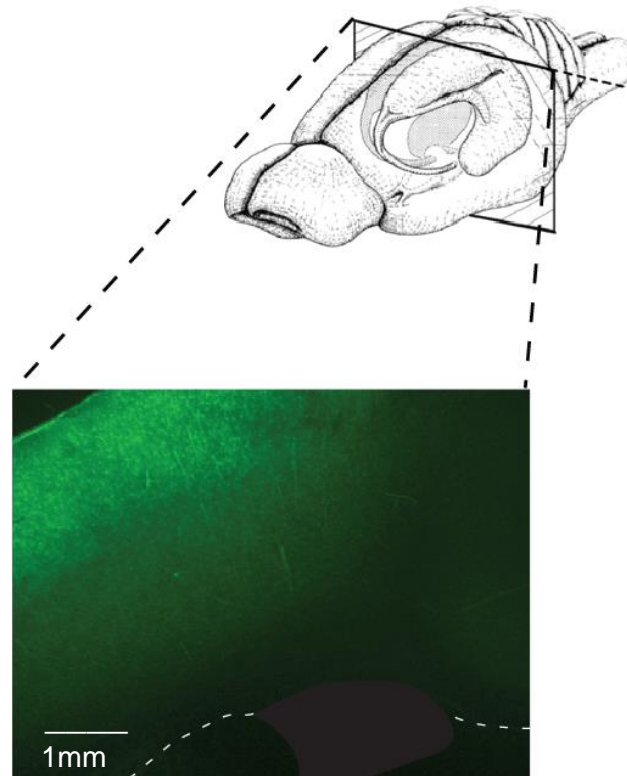


Abb. 5 Koronaler Gewebeschnitt mit fluoreszierenden Zellen

Übersichtsbild zeigt einen koronalen Gewebeschnitt, der mittels der Oberflächen-Beladung des Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fluo-8 AM im Bereich der Schicht 1 und 2/3 des Kortex der Maus *in vivo* angefärbt wurde. (Gestrichelte Linie Korpus Kallosum, in schwarz gezeigt der laterale Ventrikel).

3.1.1 Dosisabhängige Wirkung von volatilen Anästhetika auf Ca^{2+} -Wellen

Anästhetika werden im klinischen invasiven operativen Gebrauch zur Erzeugung eines schlafähnlichen Zustandes verwendet. Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Anästhetikum Isofluran mittels eines Vaporisierers (Zerstäuber) eingesetzt. Um zu gewährleisten, dass es während der Untersuchung von astrozytären Ca^{2+} -Transienten *in vivo* zu keiner Anästhetika-induzierten Blockierung des astrozytären Ca^{2+} -Signals kommt, war es wichtig, vor Beginn der Experimentreihen eine optimale Anästhesiekonzentration zu etablieren (Abb. 6). In Anbetracht der Tatsache, dass astrozytäre Antworten Anästhesie empfindlich sind, wurden alle Experimente unter einer minimalen Anästhesie durchgeführt (Thrane and Nedergaard, 2012). Für die Visualisierung des astrozytären

Ca²⁺-Signals wurde eine hoch sensitive CCD-Kamera verwendet. Als nächstes wurde eine potentielle Wirkung verschiedener Anästhesiekonzentrationen auf die Amplitude von spontanen Ca²⁺-Wellen im auditorischen Kortex der Maus untersucht. Als Indikator für die Anästhesietiefe und zur Auslese der globalen elektrischen neuronalen Aktivität wurde ein Elektrokortikogramm (*engl. electrocorticogram*, ECoG) durchgeführt. Das ECoG Signal wurde über der ipsilateralen Hirnhälfte abgeleitet und bestand aus der Summe aller postsynaptischen Potentialen im Messgebiet (Buzsaki et al., 2012). Die Abbildung 6A zeigt die simultane Detektion von spontanen Ca²⁺-Wellen, die in einem Zeitraum von 110s aufgenommen wurden und einem ECoG Signal, das unter den Isoflurankonzentration von 0,5 %, 1,8% und 2,5 % gemessen wurde. In der Abbildung ist die Ca²⁺-Wellenfrequenz (obere Spur) in Bezug auf die applizierte Isoflurankonzentration dargestellt. Daraus geht hervor, dass die Frequenz der spontanen Ca²⁺-Transienten in Astrozyten mit steigender Anästhesietiefe abnahm. Während bei einer schwachen Anästhesietiefe, die in einem Bereich von 0,5% - 1% Isofluran Konzentration lag, eine deutliche Erhöhung der spontanen Ca²⁺-Transienten in Astrozyten messbar war (Abb. 6B).

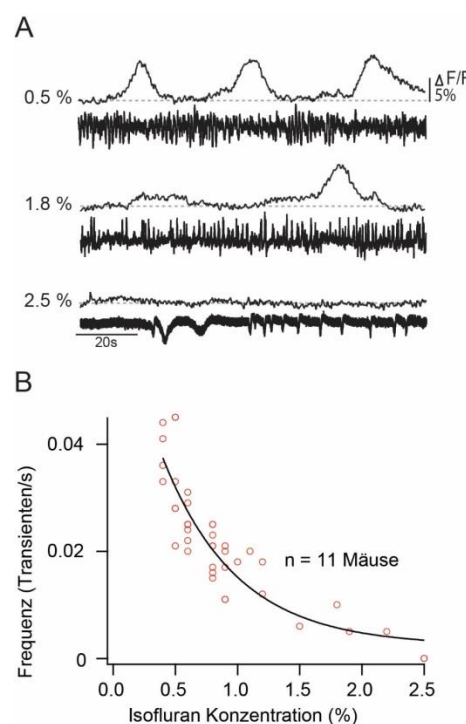


Abb. 6 Astrozytären Ca²⁺-Transienten in Abhängigkeit von der Narkosetiefe (A)
Messung von spontanen astrozytären Ca²⁺-Signalen (obere Spur) unter Verwendung von

verschiedenen Isofluran Konzentrationen und die simultane Messung des ECoG (untere Spur). **(B)** Frequenz der Ca^{2+} -Transienten in Abhängigkeit der Isofluran Konzentration. $n=11$ Mäuse.

3.1.2 Analyse der sensorisch evozierter Ca^{2+} -Wellen

Die Abbildung 7C-E zeigt evozierte Ca^{2+} -Transienten in einem leicht anästhesierten Tier. Das Ca^{2+} -Signal wurde abgeleitet aus einer großen, nicht zählbaren Astrozytenpopulation. Deren Ca^{2+} -Wellen wurden in einem Zeitraum von 3 Minuten unter Einsatz einer Isoflurankonzentration von 0.8Vol%, mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet. In der Abbildung 7D werden 20 verschiedene Einzeltransienten, die aus 20 Tieren stammen, gezeigt. Der gemittelte Transient dieser 20 konsekutiv aufgenommenen Transienten ist in Abbildung 7E dargestellt. Im ersten Schritt der Analyse von astrozytären Ca^{2+} -Transienten sollte durch die Verwendung von verschiedene Reizstärken (0.7mA - 1mA) des elektrischen Stimulus herausgefunden werden, ob ein messbarer Unterschied in der Kinetik von Ca^{2+} -Transienten besteht (Abb. 8). Im nächsten Schritt wurde eine quantitative Datenerhebung der kinetischen Parameter wie Amplitude, Stimulus Latenzzeit und Anstiegszeit des Ca^{2+} -Transienten erhoben (Abb. 9).

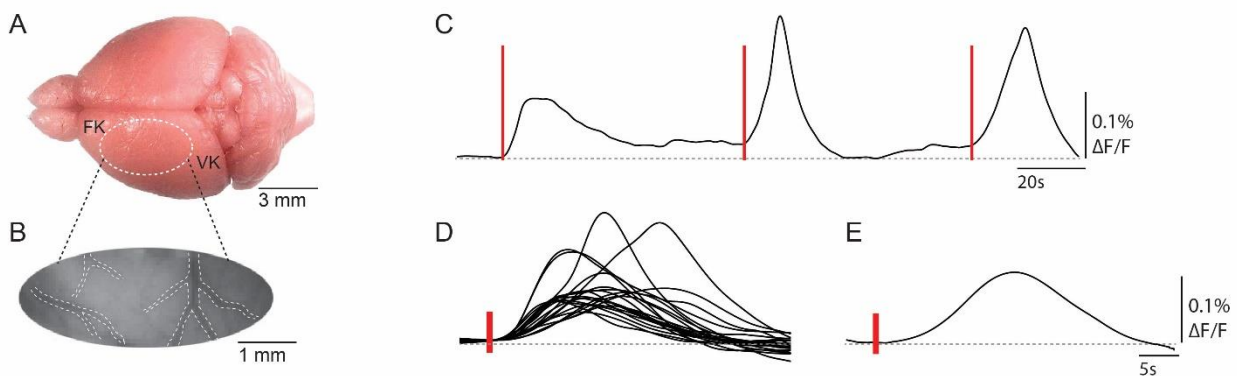


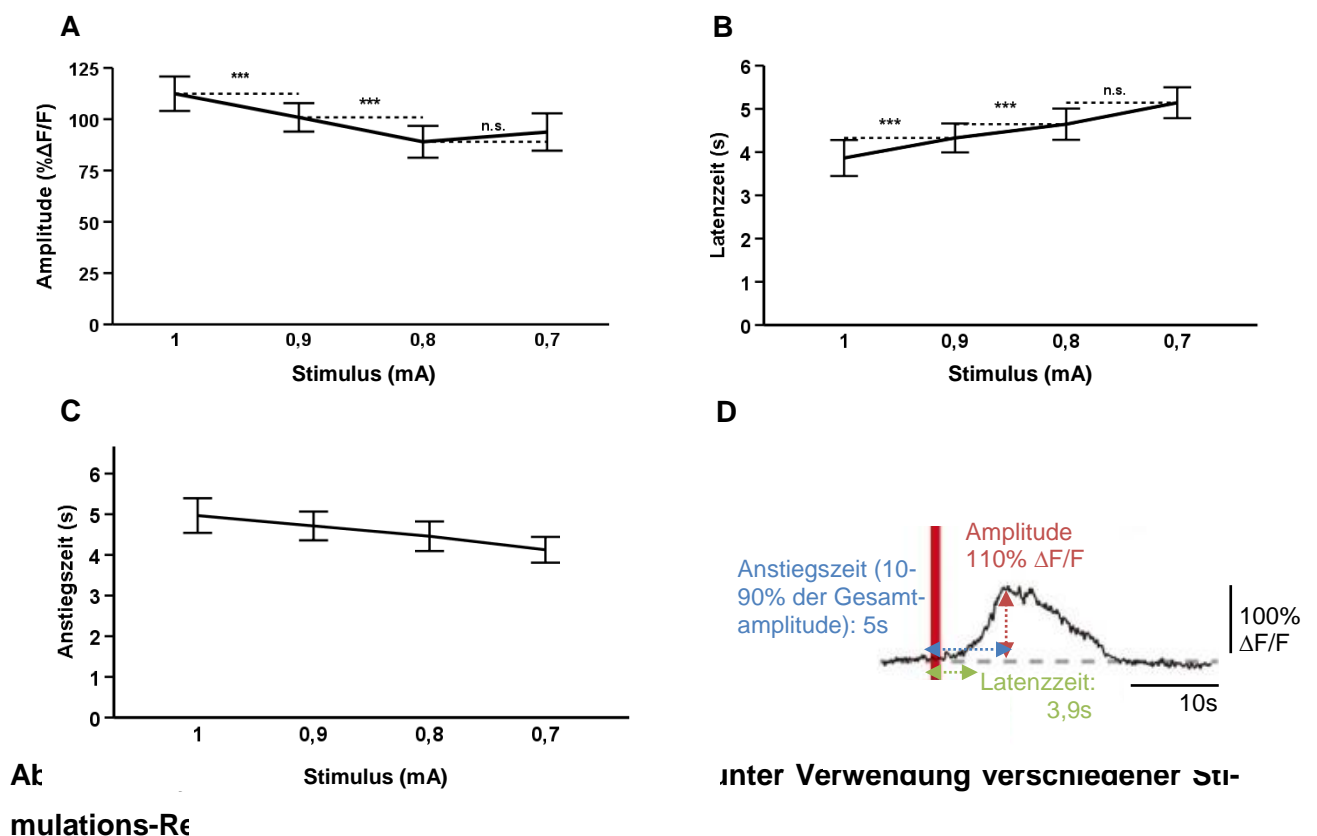
Abb. 7 Messung von großflächigen, sensorisch-evozierten Ca^{2+} -Transienten im anästhesierten Tier

(A) Abbildung eines Mausgehirns; gestrichelte Linien zeigen das Aufnahmefeld der CCD-Kamera (FK = Frontaler Kortex; VK = Visueller Kortex). **(B)** Hoch sensitive CCD-Kamera Fluoreszenzaufnahme (80 x 80Pixel) der angefärbten großflächigen Kraniotomie des Frontal- und Parietallappens des Kortex mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fluo-8 AM; gestrichelte Linien zeigen Blutgefäße. **(C)** Sensorisch-evozierte Ca^{2+} -Transienten aus der gesamten Messregion $\Delta\text{F}/\text{F}$

0,1% **(D)** 20 Ca²⁺-Transienten übereinander gelagert dargestellt n=20. **(E)** Mittelwert aus 20 Einzeltransienten.

Aus den Daten der Einzelzelluntersuchen geht hervor, dass unter Verwendung von absteigenden Reizstärken (1mA bis 0,7mA) der elektrischen Stimulation die Parameter Amplitude (Abb. 8A und D), Latenzzeit (Abb. 8B und D) und Anstiegszeit (Abb. 8C und D) bezogen auf die Ca²⁺-Wellen variieren. Genauer gesagt, die Amplitude der Ca²⁺-Transienten nahm mit der Abnahme der Reizstärke der Stimulation in der Abbildung 8A signifikant ab.

Die Latenzzeit nahm hingegen mit Abnahme der Reizstärken zu (Abb. 8B). Die Anstiegszeit nahm mit Abnahme der Reizstärken tendenziell ab, jedoch war keine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die abnehmenden Reizstärken erkennbar (Abb. 8C). Mit der Erkenntnis, dass es unter Verwendung von einer höheren Stimulus-Intensität zu einer besseren Antworteigenschaft der Ca²⁺-Transienten in Astrozyten kommt, wurden die weiteren Messungen mit einer Reizstärke von 1mA durchgeführt.



(A) Amplitude ($\Delta F/F$) der Ca^{2+} -Transienten unter Testung von verschiedenen Reizstärken des elektrischen Stimulus. Für den Stimulus Parameter 1mA wurden $1.19 \pm 0.539 \Delta F/F$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) aus $n=121 \text{ Ca}^{2+}$ -Transienten und $n=12$ Mäuse ermittelt. Für den Stimulus Parameter 0.9mA wurden $1.522 \pm 0.640 \Delta F/F$ aus $n=155 \text{ Ca}^{2+}$ -Transienten und $n=12$ Mäuse ermittelt. Für den Stimulus Parameter 0.8mA wurden $1.016 \pm 0.744 \Delta F/F$ aus $n=109 \text{ Ca}^{2+}$ -Transienten und $n=11$ Mäuse ermittelt. Für den Stimulus Parameter 0.7mA wurden $0.937 \pm 0.478 \Delta F/F$ aus $n=185 \text{ Ca}^{2+}$ -Transienten und $n=12$ Mäusen ermittelt. Der Wilcoxon-Rangsummentest wies bei 1mA vs. 0,9mA, $p=0,0003$ bei $n=121 \text{ Ca}^{2+}$ -Transienten in $n=12$ Mäusen auf und bei 0,9mA vs. 0,8mA, $p=0,0001$ bei $n=155 \text{ Ca}^{2+}$ -Transienten in $n=12$ Mäusen einen signifikanten Unterschied auf, während bei der Reizstärken 0,7mA vs. 0,8mA, $p=0,531$ bei $n=109 \text{ Ca}^{2+}$ -Transienten in $n=12$ Mäusen bestand kein signifikanter Unterschied.

(B) Stimulus Latenz (s) der Ca^{2+} -Transienten unter der Zunahme der Stimulus Dauer. Für den Stimulus Parameter 1mA: $3.863 \pm 2.352\text{s}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) aus $n=169$ Zellen und $n=12$ Mäusen ermittelt. Für den Stimulus Parameter 0.9mA wurden $4.350 \pm 2.149\text{s}$ aus $n=157 \text{ Ca}^{2+}$ -Transienten und $n=12$ Mäusen ermittelt. Für den Stimulus Parameter 0.8mA wurden $4.629 \pm 2.491\text{s}$ aus $n=185 \text{ Ca}^{2+}$ -Transienten in $n=12$ Mäusen ermittelt und in dem Stimulus Parameter 0.7mA wurden $5.142 \pm 1.862\text{s}$ aus $n=108 \text{ Ca}^{2+}$ -Transienten in $n=13$ Mäusen ermittelt. Der Wilcoxon-Rangsummentest zeigt bei 1mA vs. 0,9mA, $p=0,023$ bei $n=169$ Zellen und $n=12$ Mäusen und bei 0,9mA vs. 0,8mA, $p=0,026$ in $n=157 \text{ Ca}^{2+}$ -Transienten in $n=12$ Mäusen und bei 0,8mA vs. 0,7mA, $p=0,469$ in $n=185 \text{ Ca}^{2+}$ -Transienten und $n=12$ Mäusen. **(C)** Die Messung der Anstiegszeit der Ca^{2+} -Transienten unter Testung der Zunahme des Stimulus Reizstärken. Für den Stimulus Parameter 0.7mA wurden $4.100 \pm 1.892\text{s}$ aus $n=139 \text{ Ca}^{2+}$ -Transienten in $n=13$ Mäusen ermittelt. In dem Stimulus Parameter 0.8mA wurden $4.629 \pm 2.491\text{s}$ aus $n=185 \text{ Ca}^{2+}$ -Transienten in $n=12$ Mäusen und für den Stimulus Parameter 0.9mA wurden $4.712 \pm 2.132\text{s}$ aus $n=143 \text{ Ca}^{2+}$ -Transienten in $n=12$ Mäusen ermittelt. Für den Stimulus Parameter 1 mA, $p=0,502 \pm 2.432\text{s}$. Der Kruskal-Wallis-Test ergab $\chi^2=7,62$, $p=0,054$. Die Daten stammen aus der Einzelzellmessung mittels eines Zwei-Photonen Mikroskop. **(D)** Beispiel zur Analyse der Anstiegszeit (blau), der Latenzzeit (grün) und der Amplitude (rot). Anhand eines sensorisch evozierten Calcium Transienten, aufgenommen im auditorischen Kortex, wird die Bestimmung dieser drei Parameter verdeutlicht.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie die Zellen auf den Stimulus in Bezug auf Stimulus Latenz, die Anstiegszeit und Dauer eines Ca^{2+} -Transienten ansprechen. Die Latenzzeit in Abbildung 9A zeigt, dass der größte Anteil von evozierten Astrozyten eine kurze Latenzzeit von 0.1s-3s aufwies, während der kleinste Anteil von Astrozyten eine

Latenzzeit von mehr als 3s zeigte. Für die Messung der Anstiegszeit wurde ermittelt, dass der größte Anteil von Astrozyten, der bei 45% lag, eine schnelle Antwortzeit von 0s-3s zeigte. Der mittlere Anteil der gemessenen Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten betrug einen Anteil von 38% und zeigte eine Antwortzeit von 3-6s, während der zweitmittlere Anteil bei 10% lag und eine Antwortzeit von 6-9s aufwies. Der kleinste Anteil der Ca^{2+} -Transienten wiederum lag bei 8% und hatte eine Anstiegszeit von 9-12s (Abb. 9B). Des Weiteren wurde die Dauer der Ca^{2+} -Transienten nach einer elektrischen Stimulation gemessen. Dabei zeigte sich, dass der größte Anteil (Bereich zusammengefasst 85%) von antwortenden Zellen 3s bis 30s benötigte, während bei dem kleinsten Anteil, der bei 15% lag, die Zellen eine Dauer von ≥ 31 s aufwiesen (Abb. 9C).

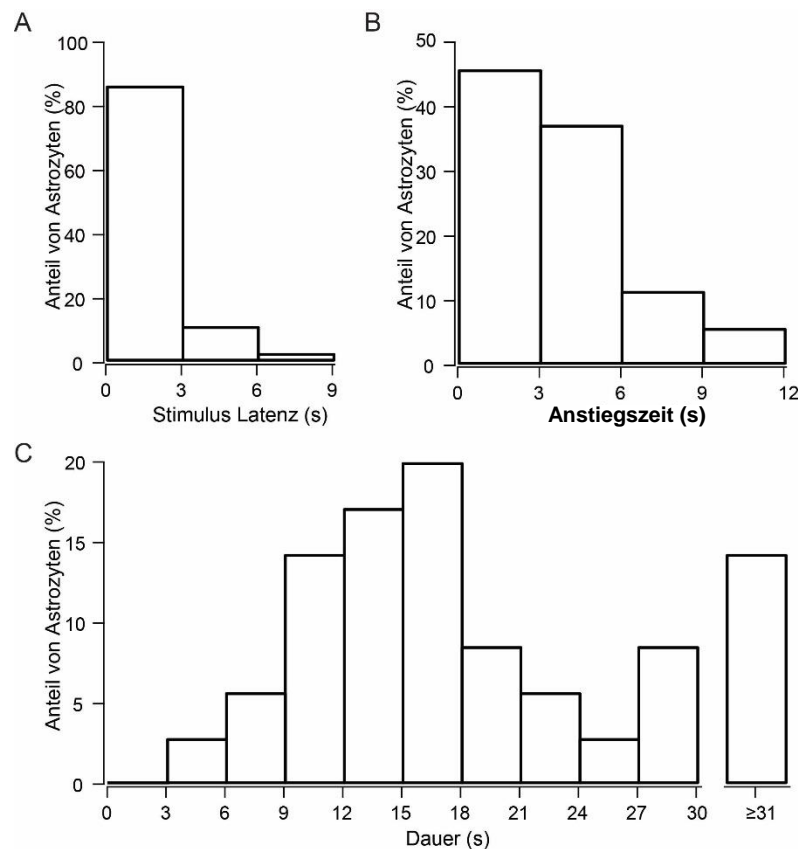


Abb. 9 Analyse der Stimulus Latenz, Anstiegszeit und der Dauer von evozierten Ca^{2+} -Transienten

Analyse der Kinetik der Ca^{2+} -Transienten anhand folgender Parameter: Stimulus Latenz (die Dauer von Stimulus-Gabe bis zum Beginn der Ca^{2+} -Ausschüttung) **(A)** Anstiegszeit (Anstiegsverlauf der Ca^{2+} -Ausschüttung) **(B)** Dauer (Messbarer Zeitverlauf von Ca^{2+} -Transienten) nach einem elektrischen Stimulus (1mA) **(C)** gemessen in 189 Zellen aus n=15 Mäusen.

Die Daten wurden durch Einzelzellmessung unter Verwendung eines Zwei-Photonen Mikroskops ermittelt.

3.1.3 Langstreckenausbreitung elektrisch evozierter Ca^{2+} -Wellen

Für eine genauere Untersuchung in der großflächigen Kraniotomie im Frontal- und Parietallappen des Kortex wurde, unter Verwendung der anatomischen Lage- und Richtungsbezeichnung, die Kraniotomie im Bereich des Kortex in blau, grün und rot markierte Messbereiche unterteilt (Abb. 10A-B). Das blau gestrichelte Oval umschließt das Ende des visuellen Kortex, das rot gestrichelte Oval umschließt den Bereich des präfrontalen Kortex und das grün gestrichelte Oval liegt in der Mitte dieser oben genannten Ovale (Abb. 10B).

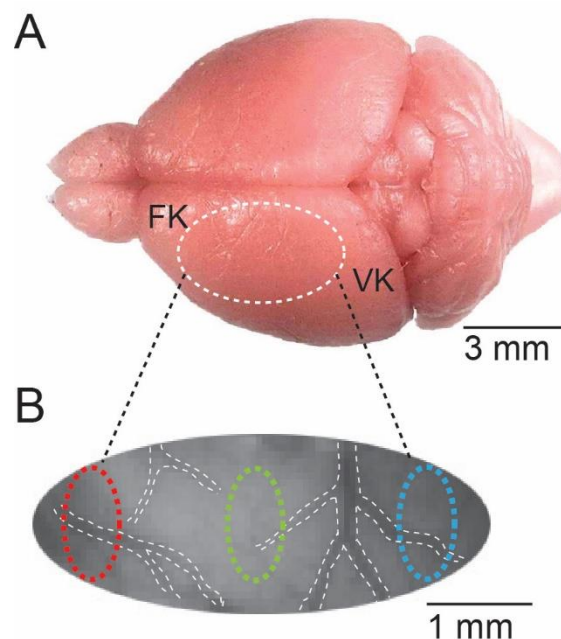


Abb. 10 Übersicht der unterteilten Messregionen im Mausgehirn

(A) Mausgehirn mit eingezeichnetem Messbereich aufgenommen von einer CCD-Kamera (gestrichelte Linie, FK = Frontaler Kortex, VK = visueller Kortex). (B) Hoch sensitive CCD-Kamera Aufnahmen (80 x 80Pixel) der angefärbten großflächigen Kraniotomie des Frontal- und Parietallappens des Kortex mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fluo-8 AM; weiß gestrichelte Linien zeigen Blutgefäße; das blau gestrichelte Oval umschließt das Ende des visuellen Kortex, das

rot gestricheltes Oval umschließt den präfrontalen Kortex und das grün gestrichelte Oval zeigt den Bereich zwischen den beiden Hirnregionen auf.

Die Messung der evozierten Ca^{2+} -Transienten in den unterteilten Bereichen der großflächigen Kraniotomie des Frontal- und Parietallappens des Kortex ermöglichte eine präzisere Zuordnung des Ca^{2+} -Signals, das sich auf der Kortexoberfläche ausgebreitet hatte. Visualisiert wurden die astrozytären Ca^{2+} -Transienten nach drei konsekutiv gesetzten Stimuli in Abbildung 11A. Dabei sind die jeweiligen Transienten, entsprechend der in Abbildung 10 vorgestellten drei eingezeichneten Hirnregionen, farblich markiert (Abb. 11A-B). Die Ca^{2+} -Spuren aus der unterteilten Messregion weisen nach dem geringen elektrischen Stimulus einen signifikanten Unterschied in der Latenzzeit auf (Abb. 12A).

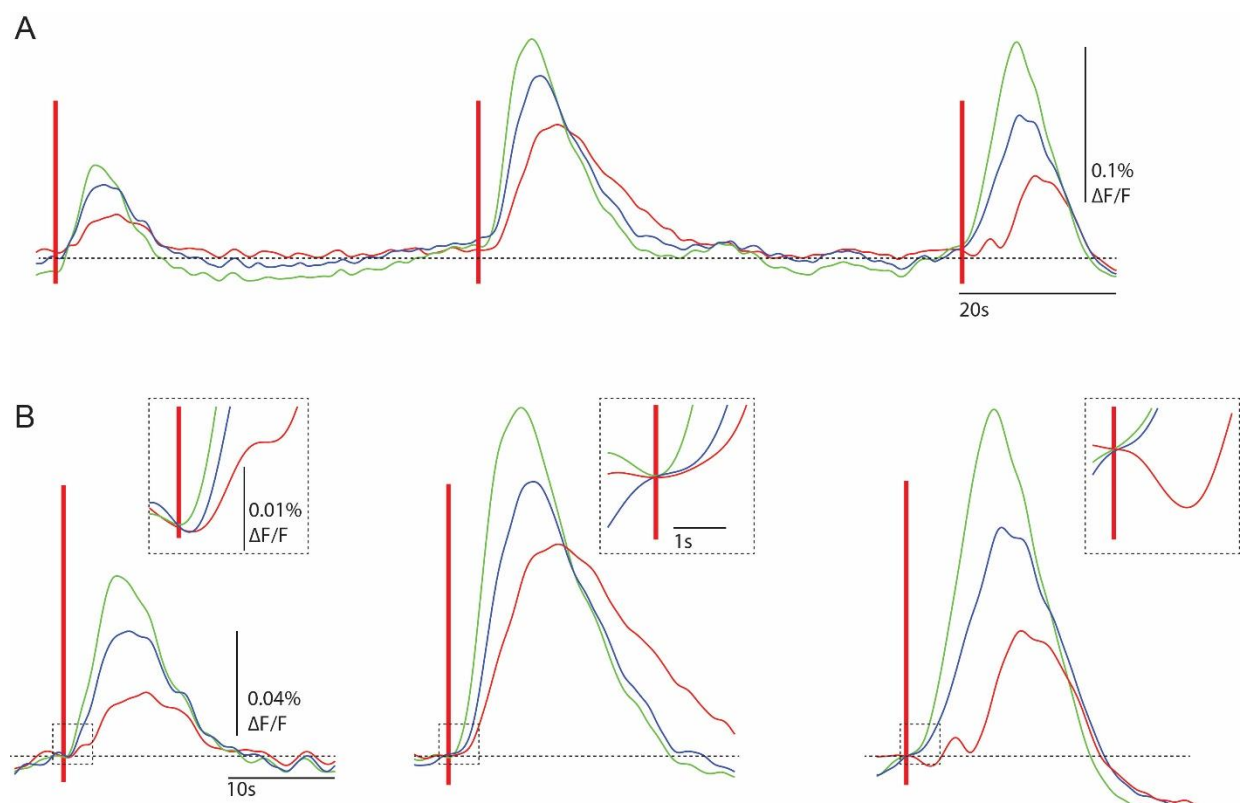


Abb. 11 Evozierte astrozytäre Ca^{2+} -Transienten entsprechend der unterteilten Messregionen im Mausgehirn.

(A) Roter Balken = Stimulus 1mA; blau markierter Transient entstammt visuellen Kortex (= blau gestrichelten Areal in Abb.10); rot markierter Transient entstammt dem präfrontalen Kortex (= rotes Areal in Abb.10); grün markierter Transient entstammt dem Bereich zwischen den beiden

oben genannten Hirnregionen (= grünes Areal in Abb.10). Drei elektrische Stimuli (1mA) wurden jeweils eingesetzt um drei zeitlich versetzte Ca^{2+} -Signale in den jeweiligen Hirnregionen zu evokieren. **(B)** Einzeldarstellung der drei Stimuli aus **(A)** mit einer Vergrößerung nach Stimulusabgabe rechts oben, entsprechend der gepunkteten Kästchen im Diagramm.

Die Latenzzeit im präfrontalen Kortex lag im Mittel bei $1,95 \pm 1,84\text{s}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung), während sie im visuellen Kortex im Mittel $1,78 \pm 1,61\text{s}$ betrug, im visuellen Kortex war sie mit $-0,17\text{s}$ signifikant kürzer. Im Vergleich dazu lag die Latenzzeit in dem Bereich zwischen präfrontalem Kortex und visuellem Kortex im Mittel bei $1,46 \pm 1,3\text{s}$, das zeigt eine signifikant kürzere Latenz von $-0,49\text{s}$ im Vergleich zum präfrontalen Kortex (Abb. 12A). Hinsichtlich der gemessenen Dauer (Messbarer Zeitverlauf von Ca^{2+} -Transienten) der Ca^{2+} -Wellen waren in den unterschiedlichen Bereichen keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Diese lag im präfrontalen Kortex bei $19,26 \pm 10,51\text{s}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung), während sie im visuellen Kortex bei $18,98 \pm 11,19\text{s}$ und im Zwischenbereich bei $18,93 \pm 11,8\text{s}$ lag (Abb.12B).

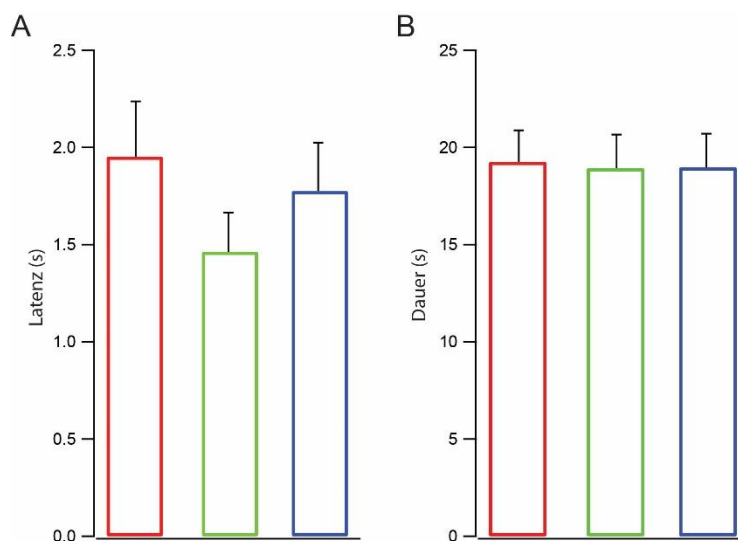


Abb.12 Latenzzeiten und messbarer Zeitverlauf der Ca^{2+} -Spur in ausgewählten Bereichen des Kortex(A)

Latenzzeiten der Ca^{2+} -Transienten gemessen im präfrontalen Kortex (rot), im visuellen Kortex (blau) und in dem Hirnbereich dazwischen (grün) (= gestrichelte Areale in Abb. 10A). Mittelwert roter Balken: $1,95 \pm 1,84\text{s}$; $n=30$ Ca^{2+} -Transienten aus $n=4$. Mittelwert blau Balken: $1,78 \pm 1,61\text{s}$; $n=30$ Ca^{2+} -Transienten aus $n=4$; Mittelwert grünen Balken: $1,46 \pm 1,3\text{s}$; $n=30$ Ca^{2+} -Transienten aus $n=4$. Der Wilcoxon-Rangsummentest ergab im roten Bereich vs. grüner Bereich

$p=0,001$ und im grünen Bereich vs. blauer Bereich $p=0,001$. **(B)** Dauer der astrozytären Ca^{2+} -Ausschüttung nach elektrischer Stimulation. Mittelwert roter Balken $19,26 \pm 10,51\text{s}$ $n=30$ Ca^{2+} -Transienten aus $n=4$. Mittelwert blauer Balken $18,98 \pm 11,19\text{s}$ $n=30$ Ca^{2+} -Transienten aus $n=4$; Mittelwert grüner Balken: $18,93 \pm 11,8\text{s}$ $n=30$ Ca^{2+} -Transienten aus $n=4$.

Im nächsten Schritt sollte der Ausbreitungscharakter lokaler evozierter Ca^{2+} -Transienten von Astrozytenpopulationen mittels einer CCD-Kamera untersucht werden. Dazu wurden Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration, die auf der kortikalen Oberfläche stattfanden, mit einer Bildaufzeichnungsgeschwindigkeit von 125 Bilder/s aufgezeichnet. In Abbildung 13A ist anhand des Falschfarbenbildes die relative Fluoreszenzänderung zwischen $0\% \Delta F/F$ (visueller-) und $0,1\% \Delta F/F$ (präfrontaler Hirnbereich) dargestellt. Im Falschfarbenbild ist zu sehen, dass nach elektrischer Stimulation (1mA, 1s) die räumliche Ausbreitung dieser Ca^{2+} -Signale einer Astrozytenpopulation im grünen Areal des Bildausschnittes beginnt. Danach fand eine Ausbreitung der Ca^{2+} -Transienten in die blauen und roten Areale statt. Schließlich kam die Ca^{2+} -Aktivität erst im roten Areal zum Erliegen (Abb. 13A). Die dazu gehörigen Ca^{2+} -Spuren aus den eingezeichneten Arealen rot, grün und blau sind in der Abbildung 13B gezeigt. Die Ausbreitung der Ca^{2+} -Spuren ist in den deutlichen Latenzzeitunterschieden der besagten Spuren zu sehen. Die größte Amplitudenzunahme lag bei etwa 8s für die grün und blau eingezeichneten Areale, während das rote Areal bei 10.1s die höchste Amplitudenzunahme zeigte. Der steilste Anstieg der Amplitude für die Ca^{2+} -Transienten war im grünen Areal zu verzeichnen. Nach 19s war das Aktivitätsmuster nicht mehr sichtbar (Abb. 13).

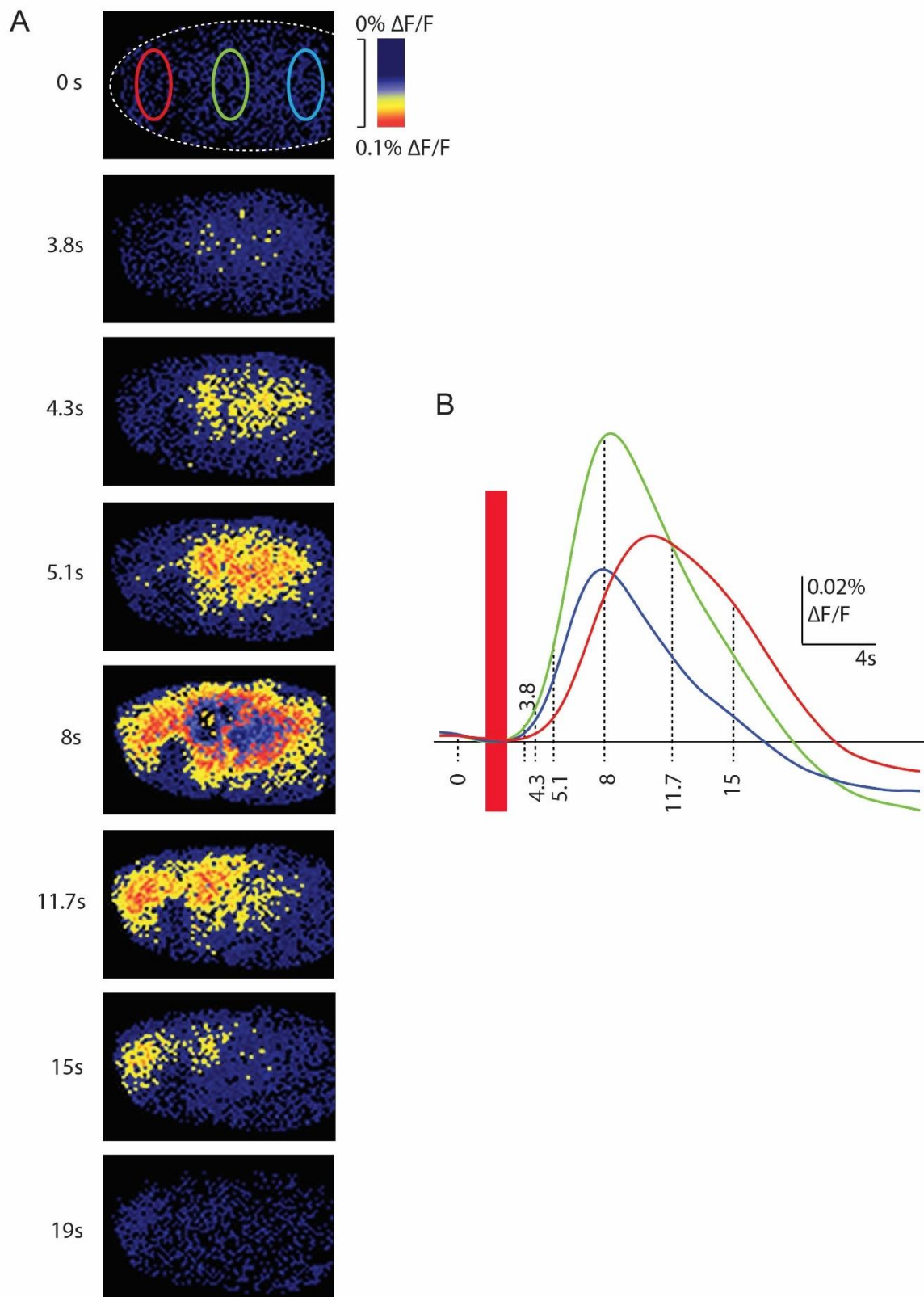


Abb. 13 Ausbreitung des Aktivitätsmusters von astrozytären Ca^{2+} -Transienten

(A) Das Falschfarbenbild der Fluoreszenzemission: Relative Fluoreszenzänderung $\Delta F/F$ zwischen 0% (blau) und 0,1% (rot) aufgenommen von einer CCD-Kamera. Die einzelnen Bilder zeigen den Verlauf der Ausbreitung des Fluoreszenz Signals. Das blaue Oval zeigt das Ende

des visuellen Kortex, das rote Oval stellt den präfrontalen Kortex dar und das grüne Oval umfasst den Bereich dazwischen. **(B)** Ca^{2+} -Transienten gemessen in den drei markierten Kortex-Bereichen nach sensorischer Stimulation. Repräsentative Aufnahme aus einer Maus. Roter Balken: Elektrischer Reiz, (Intensität 1mA, Dauer 1s).

3.1.4 Darstellung elektrisch evozierter Ca^{2+} -Wellen in Astrozyten in Korrelation zur neuronalen Aktivität

Das astrozytäre Ca^{2+} -Signal hat eine wichtige Rolle innerhalb der Neuron-Astrozyten-Kommunikation. Astrozyten bilden mit der Mehrzahl der Synapsen im ZNS Kontakte aus. Dieses Konzept der dreiteiligen Synapse beinhaltet, dass Astrozyten im Kortex auf synaptische Aktivität von Neuronen direkt mit einer intrazellulären Ca^{2+} -Ausschüttung reagieren. Im nächsten Schritt sollte daher gezeigt werden, wie eine leichte elektrische Stimulation an den Hinterpfoten der narkotisierten Maus, eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung in Astrozyten und eine Aktivierung der elektrischen Aktivität in Neuronen, gemessen mittels Lokaler-Feldpotentiale (LFP)-Aufzeichnungen, auslöst (Abb. 14).

In der Abbildung ist zu sehen, dass sich abhängig von der Amplitude des evozierten Ca^{2+} -Signals das LFP-Signal verändert. Mittels dieser Messung war der zeitliche Verlauf jedoch nicht zu klären.

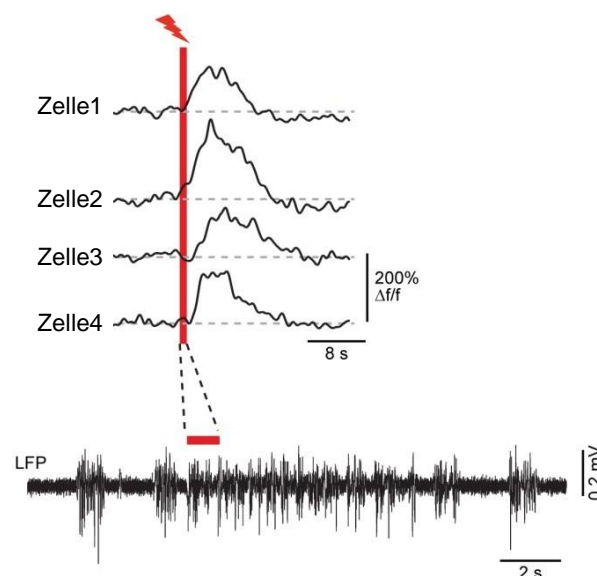


Abb. 14 Astrozytäre und neuronale Aktivität im auditorischen Kortex

Simultane Visualisierung von astrozytären Ca^{2+} -Transienten, gemessen mit einem Zwei-Photonen-Mikroskop und der lokalen neuronalen Aktivität, gemessen mit der Technik der Aufzeichnung der Lokalen Feld Potenziale. Oben: Evozierte Ca^{2+} -Transienten in vier Astrozyten, ausgelöst durch einen geringen elektrischen Stromreiz (1mA). Rote Linie, elektrischer Stimulus (1mA, 1s), LFP 0,1-2kHz gefiltert und bei 2kHz digitalisiert. Unten: Lokales Feldpotential gemessen mit dem Elektrokortikogramm.

Es stellte sich somit die Frage, ob neuronale Aktivität für die Aktivierung von evozierten astrozytären Ca^{2+} -Transienten nötig war. Um zu klären, ob die Aktivierung von astrozytären Ca^{2+} -Transienten von neuronaler Aktivität abhängt, wurde letztere *in vivo* im auditorischen Kortex mittels Natrium (Na^+) Kanal Antagonisten TTX gehemmt. Dies führte auf Einzelzellebene zu einer Blockierung von elektrisch evozierten astrozytären Ca^{2+} -Transienten. Der Anteil von aktiven Astrozyten war signifikant geringer als in der Kontrollgruppe (gepaarter *t* Test, $***p < 0.001$, $n=62$ Zellen von 5 Mäusen) (Abb. 15C). Die Datenauswertung weist daraufhin, dass elektrisch evozierte astrozytäre Ca^{2+} -Transienten im auditorischen Kortex von neuronaler Aktivität abhängig sind.

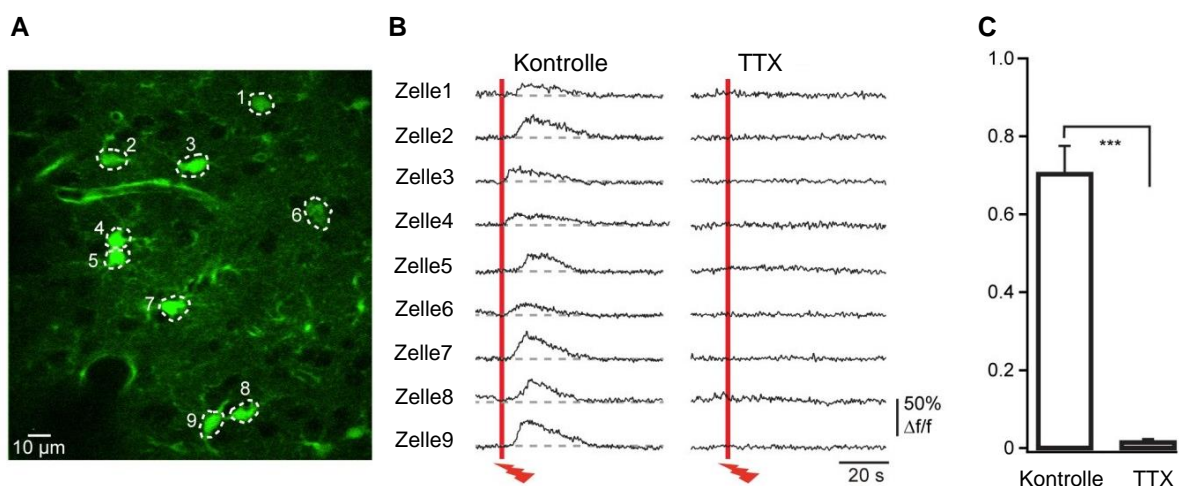


Abb. 15 TTX blockiert elektrisch evozierte Ca^{2+} -Signale in Astrozyten im Kortex

(A) Zwei-Photon-Bildgebung von Fluo-8 AM gefärbten Astrozyten in Schicht 2/3 des auditorischen Kortex der Maus *in vivo* – gestrichelte Linie: Astrozyten. (B) Elektrisch induzierte Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten, gezeigt in Bild A, vor und nach lokaler Applikation von dem Natrium

(Na⁺) Kanal Antagonisten TTX (0.5µM). **(C)** Zusammenfassung vom TTX Experiments. *** $p < 0.001$, gepaarter t Test, $n=62$ Zellen von 5 Mäusen.

Zusammenfassend galt es für den ersten Abschnitt dieser Arbeit ein tieferes Verständnis für die Entstehung und Ausbreitung von Ca²⁺-Transienten in Astrozyten zu erlangen und diese zu charakterisieren. Dabei konnte eine Ausbreitung des elektrisch evozierten Ca²⁺-Signals gemessen und nachgewiesen werden und es zeigte sich, dass sich die Ca²⁺-Signale vom Entstehungsort zentral über angrenzende Hirnareale ausbreiten. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse darauf hin, dass im auditorischen Kortex elektrisch evozierte astrozytäre Ca²⁺-Transienten von neuronaler Aktivität abhängig sind.

3.2 Einzelzell-Analyse von elektrisch evozierten astrozytären Ca²⁺-Transienten im auditorischen Kortex der Maus *in vivo*

Gliazellen haben einen großen Einfluss auf die Funktionsweise des Gehirns und sind für die Homöostase im Gehirn unverzichtbar. Die maßgeblichen Aufgaben bestehen in der Belieferung und Steuerung der Energie für Neurone. Gliazellen sind auch ein Barriere-Bildner im Bereich der Blut-Hirn-Schranke. So stellen diese Zellen eine räumliche Ordnung her, indem sie Synapsen voneinander trennen, aber auch Kontakte zu einzelnen Synapsen bilden. Es gibt Hinweise, dass Astrozyten auf die Gedächtnisbildung Einfluss nehmen könnten. Um diese Zusammenhänge im Bereich Lernen und Gedächtnisbildung näher zu analysieren, wurden im Rahmen der Doktorarbeit zum ersten Mal Experimente durchgeführt, die die Aktivität von Astrozyten unter der Verwendung eines assoziativen Lernparadigmas, wie der klassischen Konditionierung, *in vivo* untersuchen. Es wurde näher analysiert, ob Astrozyten bei einer einfachen Lernform eine zeitlich persistierende Veränderung des Aktivitätsmusters der interzellulären Ca²⁺-Ausschüttung aufweisen. Für die Analyse wurde ein assoziatives Angstkonditionierungsparadigma verwendet, wobei sowohl ein konditionierter Stimulus (CS, Ton) als auch ein unkonditionierten aversiven Stimulus (US, elektrischer Stimulus) unter zeitlicher Abfolge (CS = reinen Tonstimulus 8kHz, 70dB Schalldruckpegel, bestehend aus 33 Rechteckpulsen von 50ms Dauer mit einem Interstimulus Intervall von 250ms, sodass der Stimulus insgesamt 9.9s dauerte und US elektrischer Stimulus mit einer Intensität von 1mA für 1s), präsentiert wurden. Dazu wurden Astrozyten mit Ca²⁺-spezifischen Fluo-8 AM angefärbt

und die Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten mittels der *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie gemessen.

Der weiterführende Teil handelt von der Entstehung und Charakterisierung einer langanhaltenden, glialen Gedächtnisspur, erstellt nach assoziativem Angsterlernen. Dazu wurden präzise Analysen des Antwortverhaltens von Neuronen und Astrozyten mittels eines Zwei-Photonen-Mikroskops auf Einzelzellebene durchgeführt.

3.2.1 Etablierung einer Ca^{2+} - spezifischen Fluoreszenzfärbung

Für die Analyse von elektrisch evozierten Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten im auditorischen Kortex der Maus, ist die Visualisierung der Zellen als erster von weiterführenden Schritten einer Experimentdurchführung notwendig. Wichtige Voraussetzungen für einen Ca^{2+} - spezifischen Farbstoff sind, dass dieser bis in das Innere der Zelle gelangt, um dann vom Laserlicht angeregt zu werden und idealerweise eine selektive Wirkung ohne Nebenwirkung erzielt. Es wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-8 AM auf die spezifische Anfärbung von Astrozyten überprüft.

Zur Durchführung des Experiments wurde vorausgehend eine Kraniotomie (~1mm x mm) im Bereich des linken primären auditorischen Kortex (Bregma -2.5mm, 4,5mm lateral zur Mittellinie) in 1-2 Monate alten, narkotisierten Mäusen durchgeführt. Der Ca^{2+} -Indikator Fluo-8 AM wurde unter Verwendung der AM Beladungstechnik (Stosiek et al., 2003), die eine Injektion des Farbstoffes in den Extrazellulärraum der Hirnschichten 1 und 2/3 des auditorischen Kortex beinhaltete, injiziert (Garaschuk et al., 2006). Der Fluoreszenzfarbstoff Sulforhodamin 101 (SR 101), der spezifisch von kortikalen Astrozyten aufgenommen wird, diente als morphologisch spezifischer Farbstoff, der überwiegend zur Gegenfärbung verwendet wurde.

Der spezifische Astrozyten Marker SR 101 wurde mittels Badapplikation auf die freigelegte Oberfläche des Kortex aufgebracht (Nimmerjahn et al., 2004). Ermöglicht wurde die parallele Darstellung zweier, emittierender Fluoreszenzsignale Fluo-8 AM (grün) und SR 101 (pink), mittels eines dichroitischen Strahlenteilers und einer Photonenverstärkerröhre (engl.= *photomultiplier tube*, *PMT*), die zu der Bildgebungstechnik des Zwei-Photonen-Mikroskop gehört. Zur Überprüfung der Spezifität des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-8 AM wurden beide emittierten Fluoreszenzbilder überlagert und als grau angefärbtes Fluoreszenzbild dargestellt. Die gleichzeitige Darstellung beider Farbstoffe,

sichtbar gemacht in mehreren Gewebeschichten, zeigte, dass der Farbstoffe Fluo-8 AM Astrozyten spezifisch anfärbt (Abb. 16).

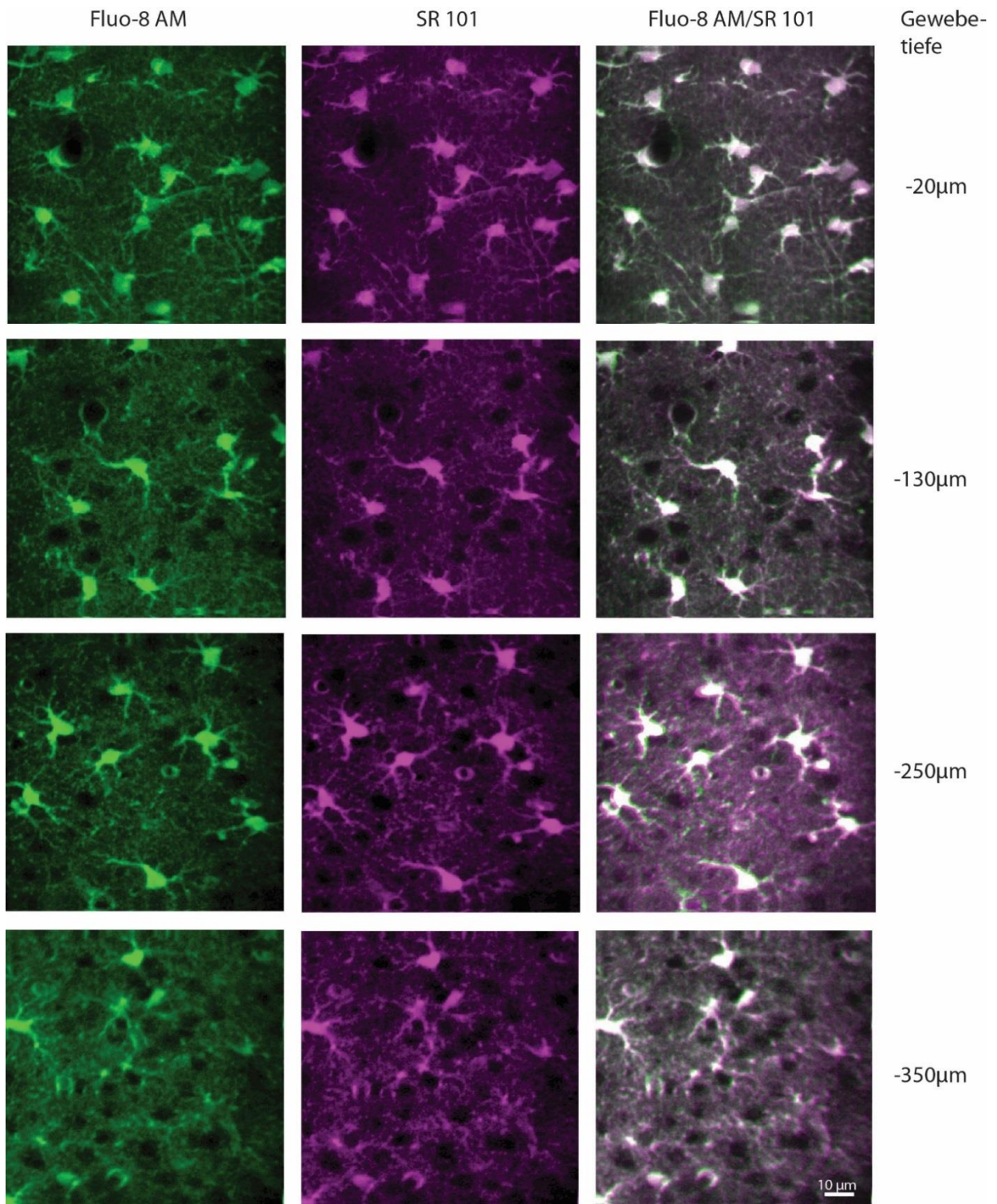


Abb. 16: Spezifische Anfärbung von Astrozyten mit fluoreszierenden Farbstoffen

Gezeigt werden in den Spalten untereinander die verschiedenen Gewebetiefen im Gehirn.

Die von rechts nach links gezeigten Bilder bilden angefärbte Astrozyten ab. Links: Mit der MCBL Methode wurde Fluor-8 AM (grün) injiziert. Mitte: Der für Astrozyten selektive Ca^{2+} -Farbstoff SR 101 (pink). Rechts: Beide genannten Farbstoff gleichzeitig aufgetragen. Aufgezeichnet wurden die Bilder mit einer Zwei-Photonen-Bildgebung.

3.2.2 Analyse des sensorisch-evozierten Aktivitätsmusters von Astrozyten

In diesem Experiment ging es um die Analyse der Aktivität sensorisch-evozierter astrozytärer Ca^{2+} -Einzelzellsignale. Dafür wurden im murinen auditorischen Kortex in Schicht 1 und 2/3 Ca^{2+} -Transienten mit der bildgebenden Mikroskopie-Technik des Zwei-Photonen Mikroskops gemessen. Diese Hirnregion wurde mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluo-8 AM Farbstoff angefärbt (Abb. 17A). Es wurde im weiteren Verlauf des Experimentes auf eine leichte Narkose (0,5% Isofluran) geachtet, um zu gewährleisten, dass es zu keiner Anästhetika-induzierten Blockierung des Ca^{2+} -Signals kommt (Abb. 6) (Thrane and Nedergaard, 2012). Im Rahmen des Experiments wurde zum einen an der Hinterpfote des Versuchstieres ein leichter elektrischer Stimulus (1mA) induziert und zum anderen ein reiner Ton induzierter Stimulus (Frequenzbereich 0kHz bis 50kHz) verabreicht. Keine der getesteten Astrozyten reagierte auf die Tonstimulation, während jedoch vier von acht Astrozyten (4/8) verlässlich mit Ca^{2+} -Transienten auf den leichten elektrischen Stimulus reagierten (Abb. 17A-B). Die Zellen, die auf den elektrischen Stimulus antworteten wurden auch als „Antwörter“ bezeichnet (Abb. 17A-B). Diese Ergebnisse bestätigten die Beobachtung, dass ein großer Anteil von Astrozyten auf einen elektrischen Stimulus antworteten, aber dass nur eine kleine Minderheit auf einen Ton Stimulus antworteten (Abb. 17E-F). Um diese Ergebnisse zu verifizieren und zu validieren, wurde das oben beschriebene Experiment mit einem genetisch-codierter Ca^{2+} -Indikator GCaMP6s (Chen et al., 2013) mit Hilfe von (AAV)-GFAP-GCaMP6s Viren (Lee et al., 2008) wiederholt (Abb.17B). Das Experiment mit GCaMP6s gefärbten Astrozyten zeigte, dass auch hier Astrozyten mit Ca^{2+} -Transienten auf einen sensorisch-evozierten Stimulus antworteten (Abb. 17A-B). Die gewonnenen Ergebnisse dieser zwei Färbemethoden beinhalteten, dass 64% der Astrozyten ein stabiles Reiz-Antwort-Signal auf den elektrischen Stimulus zeigten, während nur 8% dieser gemessenen Zellen auf die Tonstimulation Antwort gaben (Abb. 17C).

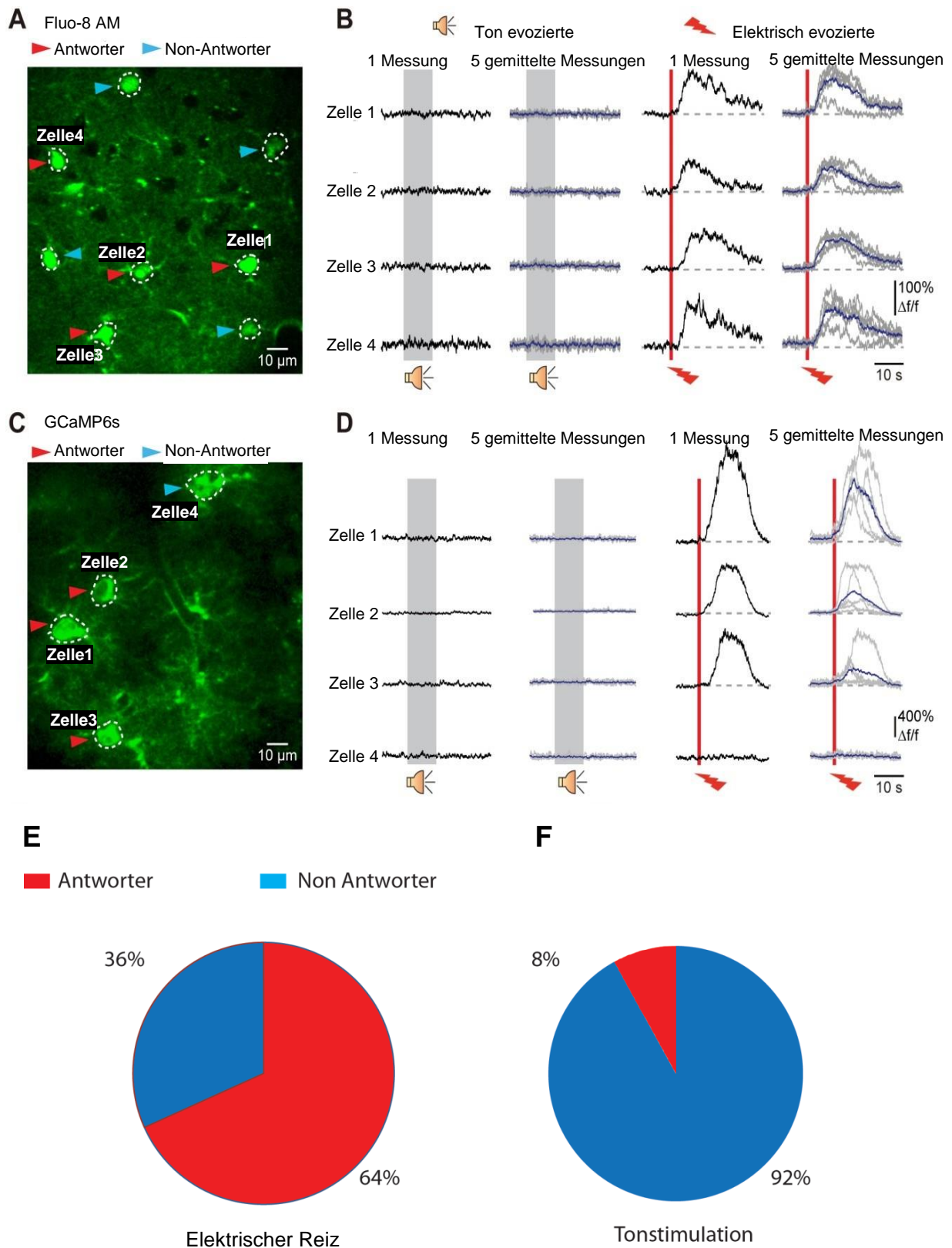


Abb.17 Sensorisch-evozierte Ca²⁺-Signale in Astrozyten im auditorischen Kortex der Maus

(A) *In vivo* Zwei-Photonen-Aufnahme Fluoreszenz Bilder mit Fluo-8 AM gefärbten Astrozyten, aufgenommen in Schicht 2/3 im auditorischen Kortex der Maus. Die Aufnahmetiefe lag bei

171µm unterhalb der Kortex-Oberfläche. Die roten Pfeile zeigen Astrozyten, die auf den Elektrischen Stimulus reagierten „Antworte“, während die blauen Pfeile auf keine Reaktion auf den Elektrischen Stimulus hinweisen „Non-Antworte“. **(B)** Die grauen Balken zeigen die Tonstimulation an; Dauer 9.9s, reiner Ton mit einer 8kHz Frequenz, Intensität 70dB; der rote Balken induziert den elektrischen Stimulus; Dauer: 1s, Intensität: 1mA. Der erste Abschnitt mit Ca²⁺-Transienten, zeigt eine Einzelmessung und der darauffolgende Block mit Ca²⁺-Transienten sind 5 gemittelte Messungen. (n=15 Tieren, 189 Zellen) **(C)** *In vivo* Zwei-Photonen-Aufnahme. Die Astrozyten wurden in Schicht 2/3 im auditorischen Kortex der Maus mit einem genetisch-coordinierten Ca²⁺-Indikator GCaMP6s angefärbt. Die Ca²⁺-Signal Messung fand in einer Tiefe von 171µm unterhalb der Kortex-Oberfläche statt. Die roten Pfeile zeigen Astrozyten, die auf den elektrischen Stimulus reagierten („Antworte“), während die blauen Pfeile auf keine Reaktion hinweisen („Non-Antworte“). **(D)** Ton- und sensorisch-evozierte Ca²⁺-Transienten in Astrozyten ($\Delta F/F$) siehe Zellen in Abbildung (A); graue Balken zeigen die Tonstimulation an; Dauer 9.9s, reiner Ton von 8kHz Frequenz, Intensität 70dB; roter Balken zeigte den elektrischen Stimulus an; Dauer 1s, Intensität 0.7mA-1mA. Der erste Abschnitt mit Ca²⁺-Transienten, zeigt eine Einzelmessung und der darauffolgende Block mit Ca²⁺-Transienten sind 5 gemittelte Messungen. **(E)** Das Kuchendiagramm (links) illustriert den Anteil der Astrozyten, die auf den elektrischen Stimulus antworten (64%). **(F)** Anteil der Zellen die auf die Tonstimulation antworteten (8%). (Insgesamt 328 Zellen in 25 Tieren getestet, bestehen aus 189/15 Mäuse für Fluo-8 AM und 139 Zellen/10 Mäuse für GCaMP6s) verwendet.

3.2.3 Ursprung sensorisch-evozierter astrozytärer Ca²⁺-Transienten

Zahlreiche Belege aus vorangegangenen *in vitro* und *in vivo* Studien weisen darauf hin, dass Ca²⁺-Transienten in Astrozyten häufig durch G_q-gekoppelte, Rezeptor-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung aus dem Endoplasmatischen-Retikulum (ER) aktiviert werden (Chen et al., 2012a; Navarrete et al., 2012; Perea and Araque, 2005; Sharma and Vijayaraghavan, 2001; Takata et al., 2011). Um zu spezifizieren, welcher zelluläre Mechanismus an der sensorisch-evozierten Ca²⁺-Aktivität in Astrozyten beteiligt ist, wurden dazu pharmakologische Antagonisten, die eine Entleerung der Ca²⁺-Speicher des ER blockieren, verwendet. Begonnen wurde mit dem Antagonist Cyclopiazonsäure (CPA) der die Ca²⁺-ATPase (SERCA) im sarkoplasmatisches Retikulum (SR) blockiert (Abb. 18 A und D). Daraufhin wurde der Antagonist Thapsigargin verwendet, der ER Ca²⁺-Speicher (Abb. 18 B und D) blockiert und abschließend wurde der Antagonist Rya-

nodine, der das Entweichen des Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen (sarkoplasmatischen) Retikulum in das Zytoplasma unterdrückt und demnach großenteils die Ca^{2+} -Ausschüttung in Astrozyten nach elektrischer Stimulation blockiert, verwendet (Abb. 18C und D).

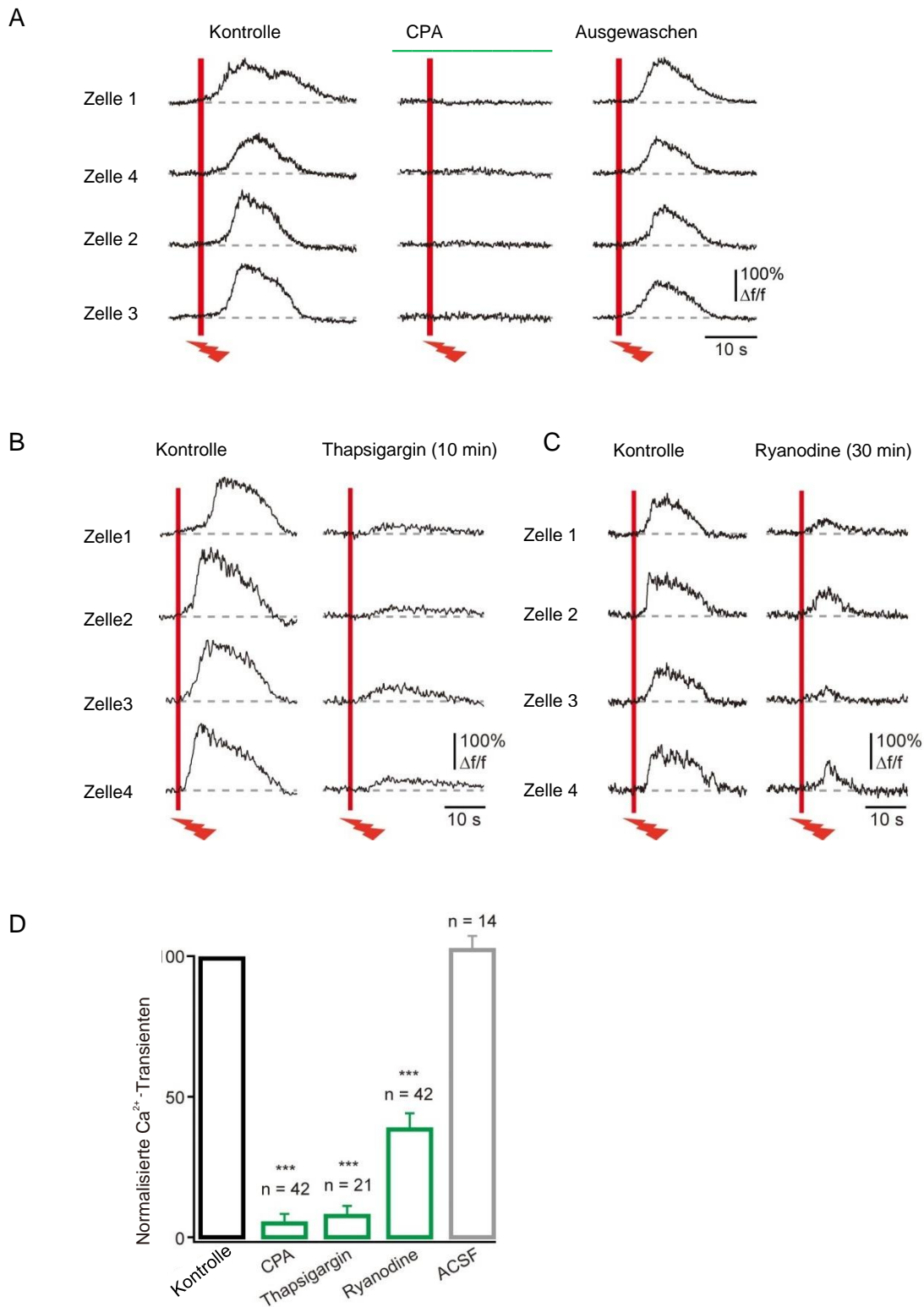


Abb. 18 Pharmakologische Analyse des elektrisch evozierten Ca^{2+} -Signals in Astrozyten des auditorischen Kortex der Maus.

Für die Untersuchung mit pharmakologischen Substanzen wurden diese zusammen mit dem Farbstoff Alexa594 (50 μM) in einer Pipette (4-6M Ω) lokal im Bildgebungsfeld der Zwei-Photonenaufnahme mittels Druck appliziert. **(A)** Zu sehen sind elektrisch evozierte Ca^{2+} -Transienten in 4 repräsentativen Zellen (gleiches Sichtfeld) vor, während und nach der lokalen pharmakologischen Applikation von CPA (grüner Balken). **(B)** Zu sehen sind elektrisch evozierte Ca^{2+} -Transienten in 4 repräsentativen Zellen (gleiches Sichtfeld) vor und während der lokalen pharmakologischen Applikation von Thapsigargin (Applikationsdauer 10 Minuten). **(C)** Zu sehen sind elektrisch evozierte Ca^{2+} -Transienten in 4 repräsentativen Zellen (gleiches Sichtfeld) vor und während der lokalen pharmakologischen Applikation von Ryanodine (Applikationsdauer 30 Min.). **(D)** Das Balkendiagramm fasst die Auswirkung von CPA, Thapsigargin, Ryanodine und artifizieller Zerebrospinalflüssigkeit (AZSF) (Kontrolllösung) auf die durch den elektrischen Reiz hervorgerufene astrozytäre Ca^{2+} -Aktivität zusammen. Die Amplitude der Ca^{2+} -Transienten wurde auf das Kontrollniveau normalisiert (Wert vor der Gabe von pharmakologischen Substanzen). Die Anzahl von getesteten Zellen für CPA n=42, für Thapsigargin n=21, für Ryanodin n=42, AZSF n=14, ***P < 0.001, gepaarter t-Test.

Es konnte gezeigt werden, dass alle oben genannten pharmakologischen Substanzen eine signifikant blockierende Wirkung auf die evozierten Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten hatten (Abb. 18C). Diese Daten deuteten darauf hin, dass alle getesteten zellulären Mechanismen beteiligt sind. Weiterhin ist bekannt, dass bei elektrischer Stimulation an Versuchstieren die Weiterleitung von Information mittels cholinergen Afferenzen, die aus dem basalen Vorderhirn im Kortex stammen, verarbeitet werden (Letzkus et al., 2011). Daraufhin wurde analysiert, ob auch Astrozyten an dem Mechanismus mitbeteiligt sind. Dazu wurde während der Messung der Ca^{2+} -Transienten mit pharmakologischen Substanzen jeweils nikotinerge Acetylcholin Rezeptoren, muskarinische Acetylcholin Rezeptoren und metabotrope Glutamat Rezeptoren blockiert. Dabei wurde festgestellt, dass Methyllycaconitine (MLA) ein nikotinerger Acetylcholin Rezeptor (nAChR) Antagonist die evozierten Ca^{2+} -Transienten komplett hemmte (Abb. 19A und E). Im Gegensatz dazu, konnte weder der muskarinische Acetylcholin Rezeptor (mAChR) Antagonist VU0255035 (Abb. 19C und 19D) noch die Kombination aus metabotropen Glutamat Rezeptor (mGluR) Antagonist MPEP (mGluR5 Antagonist) und LY367385 (mGluR1 Antagonist; Abb. 19D und 19E) die evozierten Ca^{2+} -Signale in

Astrozyten effektiv blockieren. Die Beteiligung des nAChRs wurde im weiteren Verlauf des Experiments durch das Ergebnis unterstützt, dass solche Astrozyten, die auf den elektrischen Stimulus antworteten, genannt „Antwörter“, ebenso nach der direkten Applikation von Nikotin mit Ca^{2+} -Transienten antworteten (zusammen mit der Gabe von TTX, um die Reaktion von nahen umliegenden Neuronen zu verhindern, n=69 Zellen getestet; Abb. 19B, 19E und 19F). Tatsächlich konnten die meisten „Non-Antwörter“ nicht über Nikotin aktiviert werden (Abb. 19F).

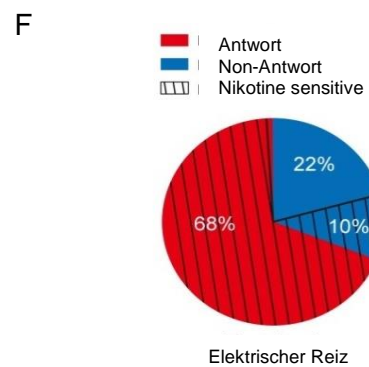
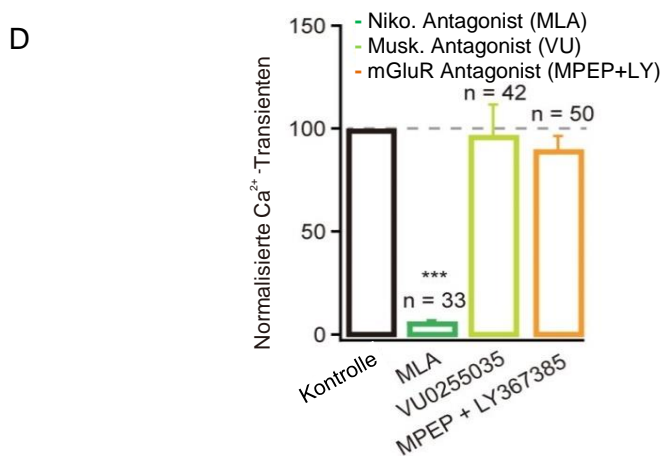
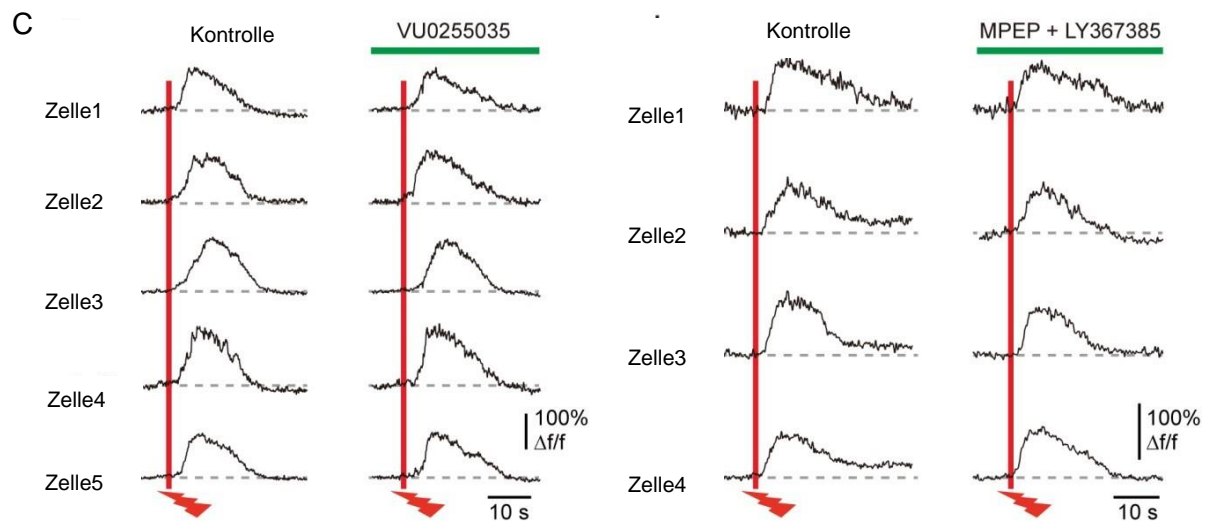
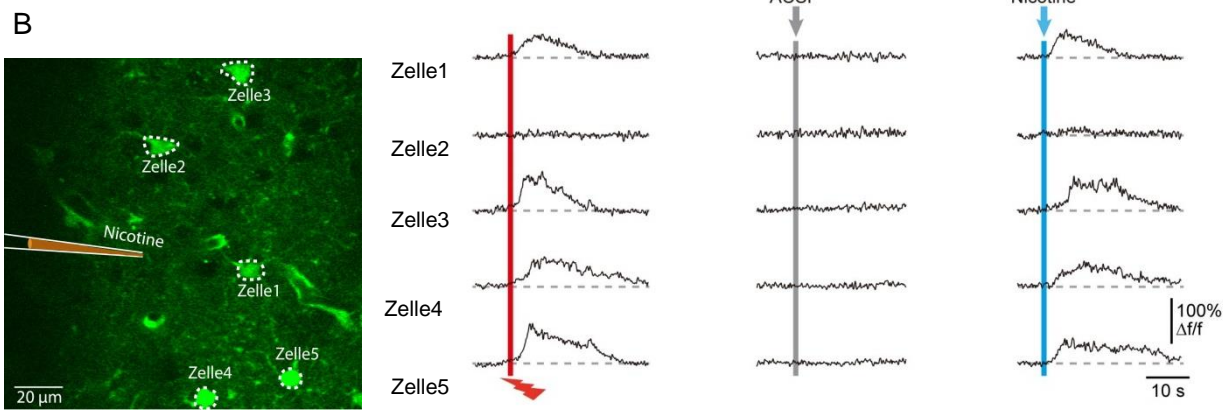
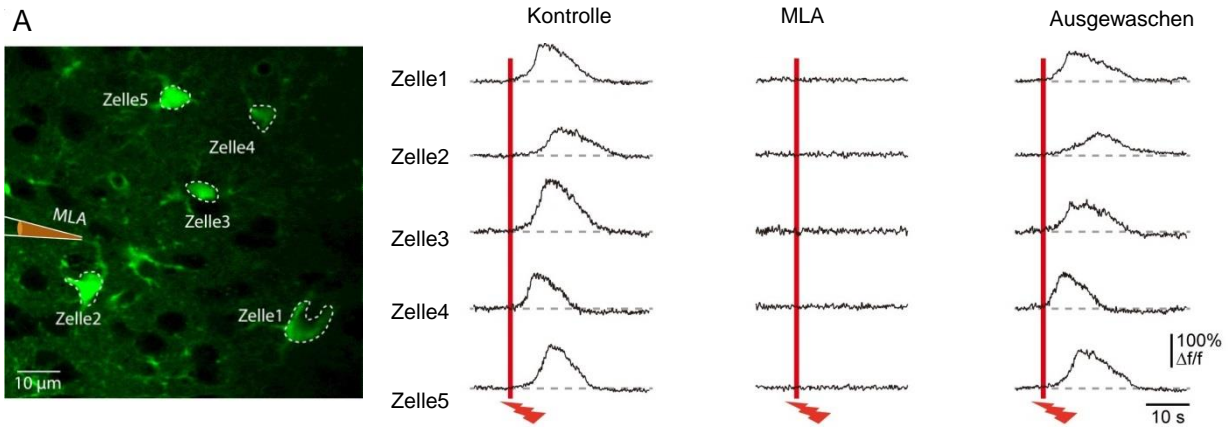


Abb. 19 Die Beteiligung von Nikotinrezeptoren auf die sensorisch-evozierten astrozytären Ca^{2+} -Transienten

(A) Links: Fluo-8 AM gefärbte Astrozyten (1-5 weiß gestrichelte Umrandung). Mitte links: Schema einer Glass-Pipette zur lokalen Injektion von MLA zusammen mit Fluoreszenzfarbstoff Alexa 594, Bildgebungstiefe $250\mu\text{m}$. Rechts: Histogramme von elektrisch evozierten Ca^{2+} -Transienten der Astrozyten 1-5 vor, während und nach Auswaschung der MLA Injektion. **(B)** Kontrollexperiment, mit der Applikation von artifizieller Zerebrospinalflüssigkeit (AZSF) um danach den Agonisten Nikotin (in Gegenwart von TTX, Bildgebungstiefe $125\mu\text{m}$) zu applizieren. **(C)** Repräsentative Zellen zeigen Kontrollstimulus (elektrischen Stimulus) dieser induziert astrozytische Ca^{2+} -Transienten mit oder ohne mAChR Antagonist VU0255035 und Gruppe I mGluR Antagonisten MPEP und LY367385. **(D)** Balkendiagramm, das die Auswirkungen von MLA, VU0255035 und die Kombination von MPEP und LY367385 (beide Gruppen I mGluR Antagonisten) zusammenfasst. Die Amplituden der Ca^{2+} -Transienten wurden normalisiert und auf die Kontrollwerte (Wert vor der pharmakologischen Applikation) angepasst. MLA $n=33$, VU0255035 $n=42$, MPEP und LY367385 $n=50$. $***P < 0.001$ versus Kontrolle, gepaarter t-Test. **(F)** Kuchen-diagramm illustriert die Nikotinsensitivität (gestricheltes Areal) von antworteten Zellen (Antwörter) oder nicht antworteten Zellen (Non-Antwörter) auf den elektrischen Stimulus ($n=69$ Zellen).

3.2.4 Analyse von Ca^{2+} -Transienten während der Verwendung eines assoziativen Lernparadigmas

Im nächsten Schritt wurde nun weiter untersucht, ob Furchterlernen einen Einfluss auf die Aktivität von Astrozyten hat. Dazu wurde ein *in vivo* Zwei-Photonen-Experiment von kopffixierten, anästhesierten Mäusen im auditorischen Kortex durchgeführt. Für ein Experiment im Rahmen eines assoziativen Lernparadigmas wie Furchtkonditionierung, wurde das Prinzip der klassischen Konditionierung verwendet. Dazu wurde vor, während und nach der Präsentation des konditionierten Stimulus (konditionierten Stimulus = CS, Ton) mit der Präsentation eines unkonditionierten aversiven Stimulus (unkonditionierten Stimulus = US, elektrischer Stimulus) die Ca^{2+} -Aktivität in Astrozyten (unkonditionierten Reiz/konditionierter Reiz = UR/CR) gemessen. Für den konditionierten Stimulus wurde eine reine Tonfolge von 9,9s Dauer (8kHz, 70 dB Schalldruckpegel), bestehend aus 33 Rechteckimpulsen von 50ms Dauer mit einem Intervall zwischen den Impulsen von 250ms verwendet. Der unkonditionierte Stimulus bestand aus einem leichten elektrischen Stimulus und wurde mit einer Reizstärke von 1mA für die Dauer von 1s

verabreicht (Abb.20). In der Abbildung 20A-B werden die Ca^{2+} -Spuren der 5 Astrozyten, die im Bild A markiert wurden, gezeigt. Diese Zellen reagierten auf den unconditionierten Stimulus (elektrischer Stimulus) mit Ca^{2+} -Transienten, zu sehen in der ersten Spalte der Abbildung 20B. Unter der Präsentation des konditionierten Stimulus (Ton) konnten keine Ca^{2+} -Transienten bei den Astrozyten gemessen werden (Abb. 20B/Spalte 2 und 3). Danach wurde mit der gleichzeitigen Präsentation (Paarung) der beiden Stimuli (US+CS) begonnen (Abb. 20C). Bei der Stimulus Paarung #1 konnten im Ton-Stimulusbereich des gepaarten Stimulus keine Ca^{2+} -Transienten gemessen werden, jedoch nach dem unmittelbar darauffolgenden elektrischen Stimulusbereich konnten in allen 5 eingezeichneten Zellen Ca^{2+} -Transienten (rot angefärbter Teil der Ca^{2+} -Transienten, in der Abbildung 20B) gemessen werden. Bereits nach der Stimulus Paarung #3 konnte ein erster Trend, in Form einer leichten Erhöhung in den Ca^{2+} -Transienten der Zelle 1 und der Zelle 5 im Ton Stimulusbereich (blauer Pfeil zeigt auf blau angefärbten Teil der Ca^{2+} -Transienten in Abb. 20C), verzeichnet werden. Innerhalb der nächsten 15 Stimulus-Paarungen konnte weiterhin in der Zelle 1 und Zelle 5 sowie zusätzlich in der Zelle 2 und Zelle 3, jedoch nicht in der Zelle 4, Ca^{2+} -Transienten schon während der Präsentation des Tonstimulus im ersten von zwei gepaarten Stimulusbereichen gemessen werden. Diese Ca^{2+} -Transienten in den Zellen 1, 5, 2 und 3 konnten auch weiterhin, bei alleiniger Applikation des Ton Stimulus, gemessen werden (Abb. 20B, 4 und 5 Spalte). Diese Messung beweist, dass eine konditionierte Reaktion (CR) Ca^{2+} -Transienten in den Spalten vier und fünf der Abbildung 20B, generiert über den konditionierten Stimulus (Ton), induzieren konnte. Danach wurde noch eine Kontrollmessung mit der Gabe eines alleinigen elektrischen Stimulus durchgeführt, worauf alle 5 Zellen aus der Abbildung 20A, wie zu Beginn des Experiments, mit Ca^{2+} -Transienten antworteten.

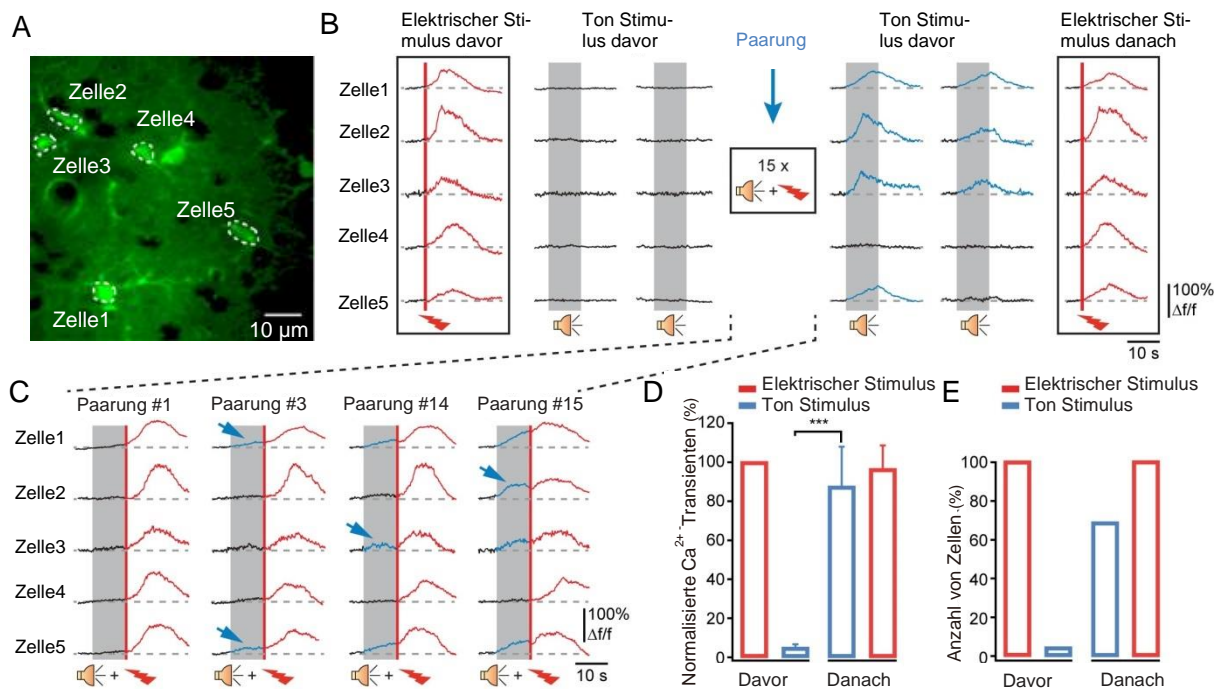


Abb. 20 Konditionierung löst astrozytäre Ca²⁺-Transienten aus.

(A) Zwei-Photonen-Bildgebung von Fluo-8 AM gefärbten Astrozyten im auditorischen Kortex (Bildgebungstiefe 269µm). (B) Die ersten drei Spalten dienen der Kontrollphase in der Ca²⁺-Transienten (siehe Astrozyten Bild A) ausschliesslich nach elektrischen Reizen (rote Linie, erste Kolumne) antworten, jedoch nicht nach Ton Stimulation (schwarze Bildspur, zweite Kolumne). Danach folgte die Konditionierung unter der Paarung der Stimuli (US+CS) (siehe Bild C) die nach häufiger Paarung eine Ton-evozierte Antwort in den ersten drei Zellen aus dem Bild 22A zeigten (blaue Bildspur) und eine Zelle (Zelle 4) die nicht antwortete (schwarze Bildspur). Die letzte Spalte diente als Kontrolle in der ein leichter elektrischer Reiz (rote Bildspur) stabile Ca²⁺-Spuren in Astrozyten auslöste. (C) Astrozyten die während der häufigen Paarung auf den Stimulus (US) mit Ca²⁺-Transienten reagierten und erst im Verlauf der präsentierten Paarungen die allmähliche Entwicklung des Aktivitätsmusters von Astrozyten auf die Stimulation des Tons (blaue Pfeile und Spuren) für Zelle1, Zelle2, Zelle3 und Zelle5 reagierten. (D) Das Balkendiagramm zeigt die Amplitudenänderungen von evozierten Ca²⁺-Transienten (%). Im ersten Block zeigen die roten und blauen Balken die Amplitudenänderungen von evozierten Ca²⁺-Transienten vor der Konditionierung (Davor). Der rote Balken beinhaltet die Daten aus den Ca²⁺-Transienten aller untersuchten Einzelzellen bei elektrischer Stimulation. Der blaue Balken beinhaltet die Daten aus den Ca²⁺-Transienten aller untersuchten Einzelzellen bei reiner Ton Stimulation. Im zweiten Block zeigen die roten und blauen Balken die Amplitudenänderungen von evozierten Ca²⁺-Transienten nach der Konditionierung (Danach). Der blaue Balken zeigt einen signifikanten Anstieg der Amplitudenänderungen von evozierten Ca²⁺-Transienten bei reiner Ton Stimulation. Alle Amplituden wurden auf die Amplitude der jeweiligen Ca²⁺-

Transienten, die von elektrischen Stimulus erzeugt wurden normiert oder versus nach Tonstimulation ($n=30$ Zellen von $n=4$ Mäusen, $*** P < 0.001$, gepaarter t -Test). **(E)** Das Balkendiagramm zeigt den Zellanteil von Astrozyten (%) die evozierte Ca^{2+} -Transienten aufweisen. Im ersten Block der roten und blauen Balken wird der Zellanteil von Astrozyten von evozierten Ca^{2+} -Transienten vor der Konditionierung gezeigt (Davor). Der rote Balken beinhaltet die Daten aus den Ca^{2+} -Transienten aller untersuchten Einzelzellen bei elektrischer Stimulation. Der blaue Balken nach der Konditionierung zeigt einen Anstieg des Zellanteiles der mit Ca^{2+} -Transienten antwortet, an. Die Anzahl der Zellen, die vor der Konditionierung auf den elektrischen Stimulus reagierten, wurden auf 100% gesetzt ($n=30$ Zellen von $n=4$ Mäusen).

Die Analyse der konditionierten Reaktion aller untersuchten Amplitudenänderungen und der untersuchten Einzelzellen ergab, dass die Konditionierung nach 15 Paarungen durch einen signifikanten Anstieg der Reaktion auf den Tonstimulus bestätigt werden konnte (Abb. 20D-E, unveröffentlichtes Manuskript von Chen und Förster). Außerdem haben nur diese Astrozyten eine gute Antwortreaktion auf den Tonstimulus (~68%, $n=30$ Zellen, $n=4$ Mäusen) erworben, die auch auf den elektrischen Stimulus antworteten.

3.2.5 Ursprung evozierter astrozytärer Ca^{2+} -Transienten unter einem assoziativen Lernparadigma Stimulus

Im nächsten Schritt sollte der Ursprung evozierter astrozytärer Ca^{2+} -Transienten unter einem assoziativen Lernparadigma Stimulus untersucht werden. Aus den Vorversuchen geht hervor, dass Methyllycaconitine (MLA) ein nikotinerger Acetylcholine Rezeptor (nAChR) Antagonist die evozierten Ca^{2+} -Transienten komplett hemmte (Abb. 21A, B und E). In der Abbildung 21 wird demonstriert, dass die Applikation von MLA die elektrisch evozierten Ca^{2+} -Transienten, die vor, als auch nach der Konditionierung verabreichten Ton Stimuli, signifikant blockierten (Abb. 21C, unveröffentlichtes Manuskript von Chen und Förster). Diese Empfindlichkeit der Ton Antwort gegenüber dem nAChR Antagonist unterstreicht die wichtige Rolle, der cholinergen Afferenzen des Basalen Vorderhirns für die plastischen Veränderungen der astrozytären Ca^{2+} -Transienten.

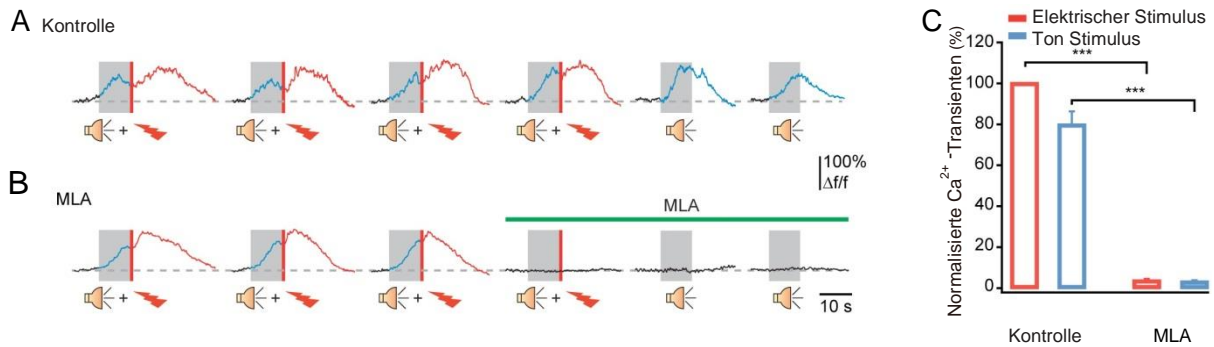


Abb. 21 Effekt von MLA auf elektrische- und Ton-induzierte Ca²⁺-Transienten nach Konditionierung

(A) Zeigt einen Ausschnitt über einen Verlauf einer Konditionierung. Hier sind im Verlauf die ersten vier Paarungen der Stimuli (US (elektrischer Stimulus) + CS (Ton Stimulus)) gezeigt. Danach erfolgt die reine Ton Stimulation, die zwei aufeinanderfolgende Antworten auf den konditionierten Ton Stimulus geben. (B) In den aufeinanderfolgenden Ca²⁺-Transienten unter Paarung der Stimuli (US (elektrischer Stimulus) +CS (Ton Stimulus)) ist zu sehen, dass nach Gabe von MLA, sowohl die Antwort auf den elektrischen Stimulus als auch auf den Ton Stimulus blockiert ist. Die Dauer der MLA Applikation wird durch einen grünen Balken angezeigt. (C) Das Balkendiagramm fasst die Ca²⁺-Transienten zusammen, die unter der Applikation von MLA blockiert wurden. Im ersten Block der Balken ist die Amplitude der Ca²⁺-Transienten zu sehen, die auf der anfänglichen Reaktionen durch elektrische Stimulation normalisiert wurde (n=27 Zellen von 4 Mäuse; *** $P < 0.001$, davor versus danach MLA Applikation, gepaarter t -Test).

3.2.6 Persistenz und Löschung der evozierten Ca²⁺-Transienten nach einem assoziativen Lernparadigma Stimulus

Im nächsten Schritt wurde nach Durchführung einer Konditionierung die zeitlich persistierende Ca²⁺-Ausschüttung in Astrozyten untersucht. Wie verläuft die Extinktion der Ca²⁺-Transienten auf die konditionierte Ton Antwort? Dabei fiel auf, dass die zelluläre Antwort von astrozytären Ca²⁺-Transienten nach Gabe des elektrischen Stimulus eine extrem stabile Auftrittswahrscheinlichkeit zeigte (Abb.21C), während demgegenüber der reine Ton Stimulus, nach der Präsentation der Paarung der beiden Stimuli (US+CS), nur eine kurzzeitig stabile Auftrittswahrscheinlichkeit aufwies um schon kurz darauf nicht mehr nachweisbar war (Abb. 22A).

Für die Untersuchung auf zellulärer Ebene wurde das Versuchstier in einen narkotisierten Zustand versetzt, um eine Kraniotomie mit anschließender Zellfärbung und darauffolgender Bilddarstellung der Einzelzellen durchführen zu können. Es folgte zu Beginn des Experiments mit der naiven Maus ein Kontrollexperiment. Dies zeigte durch die Gabe reiner Tonstimuli, dass astrozytäre Ca^{2+} -Aktivität kaum bis nicht nachweisbar gemessen wurde. Im weiteren Verlauf des Experimentes wurde die Maus in einen konditionierten Zustand gebracht, um dann eine Extinktion nach 5-10 aufeinanderfolgenden reinen Ton Stimuli mit einem Intervall von 3 Minuten nachzuweisen (Abb. 23A). Das Experiment wurde im wachen Tier wiederholt, um auch dabei den Verlauf der Extinktion zu belegen (Abb. 22A-B). Der Verhaltenstest untersucht das regungslose Verharr-Verhalten (engl. = freezing), wenn eine Konditionierung erfolgreich durchgeführt wurde. Dazu wurde das Versuchstier in eine Acrylglasbox mit einem Edelstahl Bodengitter gesetzt. Zu Beginn des Experiments wurden im naiven Zustand des Versuchstieres reine Tonstimulationen gegeben (Abb. 22A-B siehe rosa Balken). Es zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie im *in vivo* Experiment und es waren kaum bis keine Verharr-Verhaltensweisen nachweisbar (Abb. 23B, unveröffentlichtes Manuskript von Chen und Förster; generiert sich aus der Abb. 22A). Nach der Durchführung der Konditionierung wurde im wachen Tier in einem Experiment nach einem Tag und im anderen Experiment nach 15 Tagen nach der Gabe von 10 Ton-Stimuli das erlernte regungslose Verharr-Verhalten getestet und es kam zu einer Abnahme des erlernten Verhaltens (Abb. 22A-B). Beim Vergleich der beiden Experimentreihen fiel auf, dass die Extinktion des erlernten Verhaltens im leicht anästhesierten Tier deutlich schneller (4 CS) (Abb. 23A) verlief als im frei beweglichen Tier (≥ 5 CS) (Abb. 23B).

Im nächsten Schritt ging es um die Langzeitwirkung des Furchtverhaltens, die im wachen, wie auch im anästhesierten Tier getestet wurde. Für die Konditionierung im Wachzustand wurden nur 3-5 Stimulus-Paarungen in einem Experiment benötigt. Um herauszufinden wie lange das erlernte Verhalten persistiert, wurde nach der Konditionierung im Wachzustand an darauffolgenden Tagen (≥ 1 Tag) die Extinktion der astrozytären Ca^{2+} -Ausschüttung im narkotisierten Versuchstier mit einem Zwei-Photonen-Mikroskop gemessen (Abb. 23C). Zu Beginn des Experiments wurden naive Mäuse (welche exakt gleich behandelt, wie auch die Mäuse im Experiment des Lernparadigmas) ein reiner Ton Stimulus gegeben, wovon im Verlauf des Experiments (von Tag 2 auf Tag 3) nur 2 Zellen von 32 Zellen auf den Stimulus antworteten (Abb. 23D, oberes Bild). Die Mäuse hingegen, die im Wachzustand konditioniert worden waren und erst 1-3 Tage später *in*

vivo gemessen wurden, hatten einen massiven Anstieg der Anzahl von „Ton-Antwörter“ Astrozyten, die auf den Ton Stimulus antworteten (Abb. 23D, mittleres Bild). Ein ähnlicher persistierender Anstieg in den „Ton-Antwörter“ Astrozyten konnte auch noch 13-15 Tage nach der Konditionierung gemessen werden (Abb. 23D, unteres Bild). Über alle Experimente hinweg war der Anteil der „Ton-Antwörter“ Astrozyten über den getesteten Zeitraum von bis zu 15 Tagen nach der Konditionierung bemerkenswert stabil (Abb. 23E unveröffentlichtes Manuskript von Chen und Förster; generiert sich aus der Abb. 22A-B). Im nächste Experiment ist zu erkennen, das nach der Gabe von 10 Ton-Stimuli das erlernte Verhalten der „Ton-Antwortenden“ Astrozyten reduzierte (Abb. 23), ebenso fiel auch der Anteil der „Ton-Antwortenden“ Astrozyten auf das Kontrollniveau (Abb. 22F, unveröffentlichtes Manuskript von Chen und Förster; generiert sich aus der Abb. 23A-B).

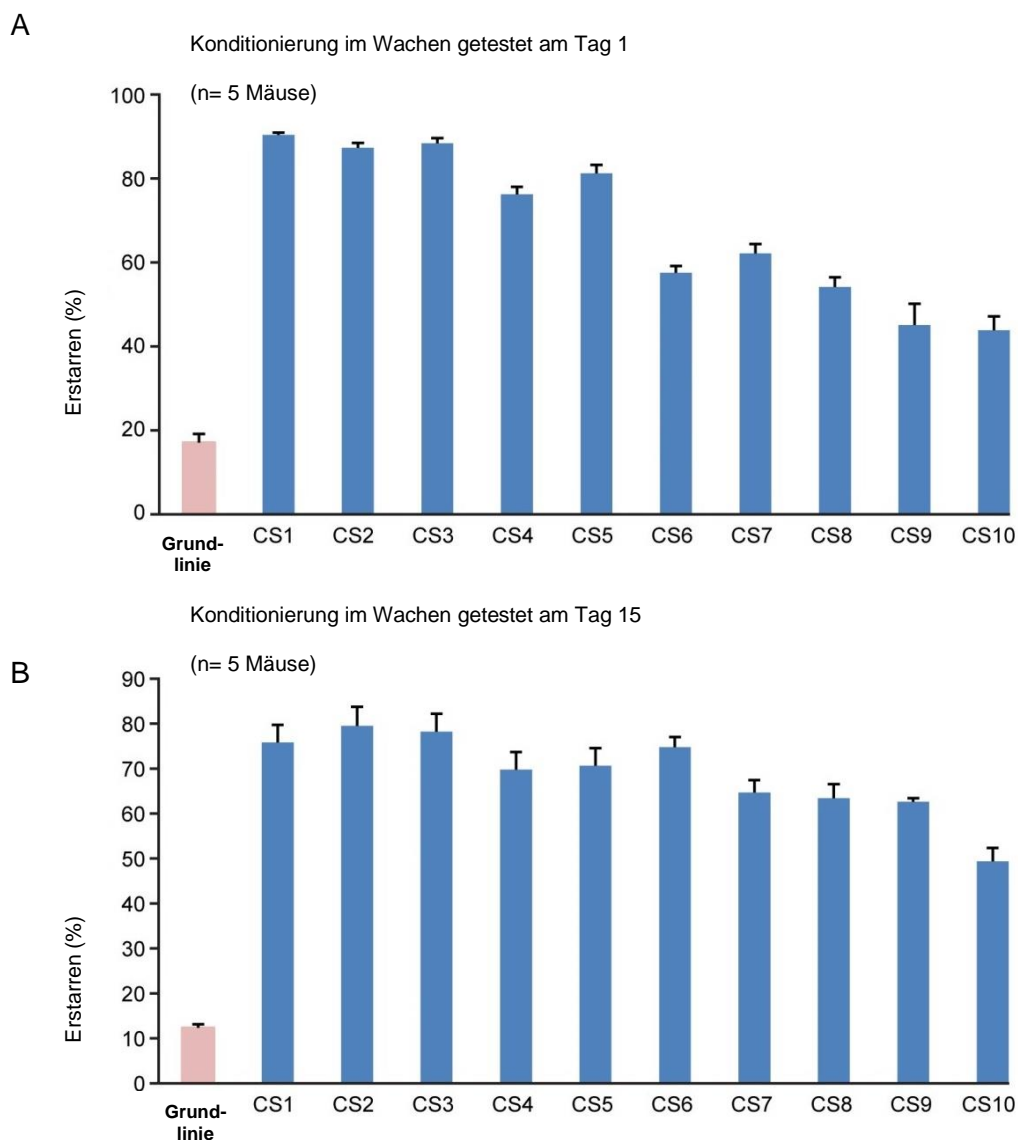


Abb. 22 Verhaltenstest mit furchtkonditionierten Mäusen

(A) Präsentation von aufeinanderfolgenden konditionierten Stimuli nach dem ersten Tag nach Erlernung des Furchtverhaltens. **(B)** Präsentation von aufeinanderfolgende konditionierte Stimuli nach den 15 Tagen nach Erlernung des Furchtverhaltens. Das Intervall zwischen den Stimulus Paarungen betrug 3 min. CS1-10= Tonstimulus, Intervall: 3min.

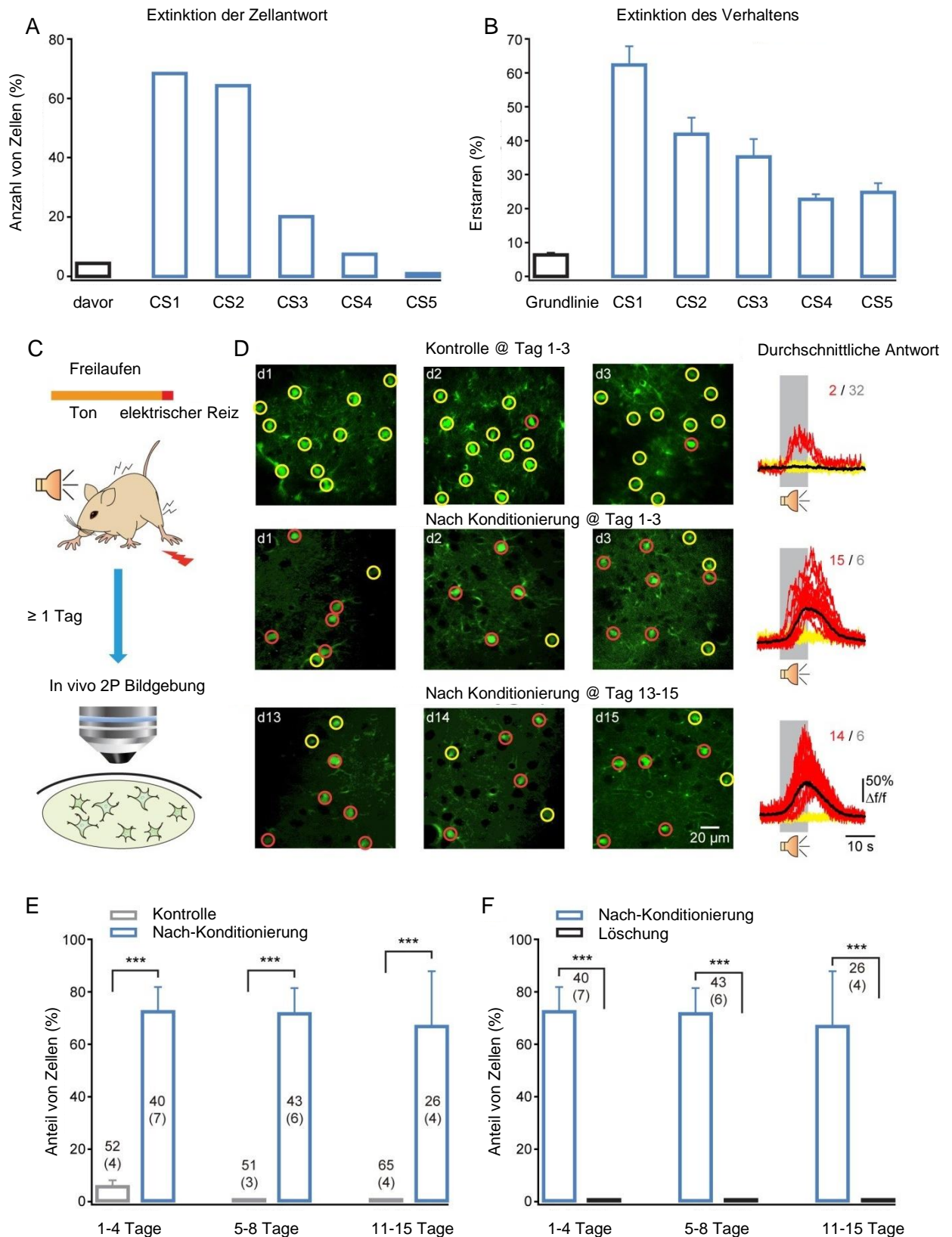


Abb. 23 Die Langzeit Wirkung und die Löschung der glialen Gedächtnisspur

(A) Das Balkendiagramm zeigt die 'Löschung' der zellulären Reaktionsfähigkeit von Ca^{2+} -Transienten, ausgelöst durch die wiederholende Präsentation des konditionierten Ton-Stimulus (als

CS angezeigt, Intervall 3 Min). Die Ergebnisse stammen von kopffixierten, anästhesierten Tieren (Zwei-Photonen-Mikroskopie: $n=30$ Zellen von 4 Tieren). **(B)** Das Balkendiagramm zeigt die Löschung des Einfrierverhaltens in freilaufenden Tieren ($n=6$ Mäuse, aufgezeichnet einen Tag nach der Konditionierung) (CS= Tonstimulus, Intervall: 3min.) **(C)** Schematische Illustration des experimentellen Protokolls zum Testen der Langzeitpersistenz der Gedächtnisspur **(D oberes Bild)** Astrozytäres Ansprechen auf Tonstimulation aufgezeichnet mit Zwei-Photon Bildgebung im *in vivo* Experiment. Oben: Zwei-Photonen-Bildgebung von Fluo-8 AM gefärbten Astrozyten aus verschiedenen Kontrollmäusen. Die Aufzeichnung wurde am Tag 1 (d1), Tag 2 (d2) und Tag 3 (d3) nach Furchtkonditionierung durchgeführt. Die antwortenden Zellen wurden durch rote Kreise angezeigt, nicht-antwortende Zelle durch gelbe Kreise markiert. Im linken Bereich werden die Spuren passend zu allen Zellen aus den Bildern links überlagert angezeigt (rot=antwortenden Zellen, gelb=nicht-antwortende Zellen, schwarz=alle gemessenen Zellen gemittelt). Die rote Zahl zeigt die antwortenden Zellen (2 Zellen) an, die schwarze Zahl (32 Zellen) gibt die nicht antwortenden Zellen wieder. Unten: ähnliche Resultate (freilaufender) konditionierter Tiere. **(D mittleres Bild)** Nach gleicher Anordnung wie in Bild D, die Ergebnisse zeigen nach 1-3 Tagen die Reaktion auf den konditionierten Stimulus, 15 Zellen antworteten auf den konditionierten Stimulus und 6 Zellen antworteten nicht auf den konditionierten Stimulus. Konditionierung erfolgte im anästhesierten Tier. **(D unteres Bild)** Nach gleicher Anordnung wie in Bild D, die Ergebnisse zeigen nach 13-15 Tagen die Reaktion auf den konditionierten Stimulus, 14 Zellen antworteten auf den konditionierten Stimulus und 6 Zellen antworteten nicht auf den konditionierten Stimulus. Konditionierung erfolgte im anästhesierten Tier. **(E)** Der Anteil von Ton-antwortenden Zellen in drei Kontrollgruppen (grau) und drei konditionierten Gruppen (blau) die an verschiedenen Tagen nach der Konditionierung stattgefunden hat. Nach 1-4 Tagen der Konditionierung in der (grauen Gruppe) waren 4 Zellen in $n=52$ Mäuse aktiv. Nach 1-4 Tagen der Konditionierung in der (blauen Gruppe) waren 7 Zellen in $n=40$ Mäuse aktiv. Nach 5-8 Tagen der Konditionierung in der (grauen Gruppe) waren 3 Zellen in $n=51$ Mäuse aktiv. Nach 5-8 Tagen der Konditionierung in der (blauen Gruppe) waren 6 Zellen in $n=43$ Mäuse aktiv. Nach 11-15 Tagen der Konditionierung in der (grauen Gruppe) waren 4 Zellen in $n=65$ Mäuse aktiv. Nach 11-15 Tagen der Konditionierung in der (blauen Gruppe) waren 4 Zellen in $n=65$ Mäuse aktiv. $***P < 0.001$, ungepaarter t Test. **(F)** Der Anteil von Ton-Antwortenden Zellen in drei konditionierten Gruppen (blau), die an verschiedenen Tagen nach der Konditionierung stattgefunden hat. (blau, die gleichen wie in der Konditionierten Gruppe in Bild F) und die gelöschte Gruppe (schwarz) die die Extinktion darstellt. Nach 1-4 Tagen der Konditionierung in der (blauen Gruppe) waren 7 Zellen in $n=40$ Mäuse aktiv. Nach 5-8 Tagen der Konditionierung in der (blauen Gruppe) waren 6 Zellen in $n=43$ Mäuse aktiv. Nach 11-15 Tagen der Konditionierung in der (blauen Gruppe) waren 4 Zellen in $n=26$ Mäuse aktiv. $*** P < 0.001$, ungepaarter t Test.

Die Ergebnisse der Messungen identifizierten einen Neuronen-Glia-Kreislauf im auditiven Kortex der Maus, bei dem cholinerge-Axone des basalen Vorderhirns die nikotinergen Rezeptoren in Astrozyten aktivierten. Das Erlernen von Furcht verursachte einen Effekt von Ton-evozierten Ca^{2+} -Transienten in einer spezifischen Subpopulation von Astrozyten. Das Antwortverhalten von Astrozyten auf viele konditionierte Stimuli kann im Verlauf des mehrmaligen Abrufes des Furchtverhaltens im Tier wieder gelöscht werden. Zusammenfassend wiesen die Ergebnisse eine persistente Gedächtnisspur in einem Neuronen-Glia-Kreislauf nach und deckten somit einen unerwarteten zellulären Mechanismus des assoziativen Furchterlernens und Gedächtnisbildung im Kortex von Säugetieren auf.

4 Diskussion

Im ersten Ergebnisteil der Dissertation wurde unter Verwendung einer CCD-Kamera zum ersten Mal eine Langstreckenausbreitung von einer großen, sensorisch-evozierten Astrozytenpopulation im Mausgehirn visualisiert und analysiert. Zuvor war es wichtig ein tieferes Verständnis für evozierte Calcium-Signale in Gliazellen zu entwickeln und dabei die Antwortreaktion auf den elektrischen Stimulus spezifischer zu charakterisieren, um danach das Ausbreitungsmuster weiter untersuchen zu können. Es stellte sich heraus, dass (1) die spontanen Oszillations-Frequenzen der Ca^{2+} -Wellen in Astrozyten mit Zunahme der Anästhesietiefe abnahmen, (2) elektrische Reizstärken mit der Amplitude, Latenzzeit und Anstiegszeit von astrozytären Ca^{2+} -Transienten korrelierten, (3) eine Langstreckenausbreitung des astrozytären Ca^{2+} -Signals auf kortikaler Oberfläche zu beobachten war, (4) elektrisch evozierte astrozytäre Ca^{2+} -Transienten im auditorischen Kortex von neuronaler Aktivität abhängig waren.

Im zweiten Ergebnisteil der Dissertation wurde zum ersten Mal eine persistierende Gedächtnisspur in einem Neuron-Glia-Kreislauf identifiziert und ein unerwarteter zellulärer Mechanismus der assoziativen Furchtkonditionierung und der Gedächtnisbildung im Säugetier-Kortex nachgewiesen. Im Einzelnen konnte gezeigt werden, dass (1) GCaMP6s gefärbte Astrozyten eine ähnliche Ca^{2+} -Aktivität aufwiesen, wie Astrozyten gefärbt mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fluo-8 AM, (2) bei elektrischer Stimulation Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten direkt über cholinerge Afferenzen aktiviert wurden, (3) Astrozyten auf einen konditionierten Stimulus reagierten, (4) die cholinergen Afferenzen einen Effekt auf die furchtkonditionierte Aktivität von Astrozyten hatten und (5) aufeinanderfolgende Konditionierungsstimuli Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten auslösten, über diese einen längeren Zeitraum erhalten bleiben konnten und bei einer Löschung des erlernten Verhaltens wieder verschwanden.

4.1 Analyse des zellulären Mechanismus der Entstehung und Weiterleitung sensorisch-evozierter astrozytärer Ca^{2+} -Transienten *in vivo*

Zur Aufnahme von astrozytären Ca^{2+} -Transienten in Astrozytenpopulationen von 1-2 Monaten alten narkotisierten Mäusen, wurde zur Ca^{2+} -Bildgebung von Zellpopulationen zum einen eine CCD-Kamera basierte Technik herangezogen und zum anderen ein Zwei-Photonen-Mikroskop für Einzelzelluntersuchungen. Die Bildgebungs-Technik der CCD-Kamera ermöglichte erstmalig die Visualisierung der räumlichen Weiterleitung und Langstreckenausbreitung von sensorisch-evozierten astrozytären Ca^{2+} -Wellen auf globaler kortikaler Ebene. Für Untersuchungen der Bedeutung der Signalweiterleitung auf zellulärer Ebene sowie des zellulären Ursprungs der sensorisch-evozierten astrozytären Ca^{2+} -Transienten wurde die Zwei-Photonen-Mikroskopie verwendet.

4.1.1 Beschreibung der Ausbreitung und Weiterleitung von Ca^{2+} -Wellen

Es ist bekannt, dass sich spontane oder sensorisch-evozierte, langsame Ca^{2+} -Oszillationen (*slow Waves*) über den Kortex ausbreiten (Ferezou et al., 2007; Massimini et al., 2004; Xu et al., 2007). In der Studie von Kuga et al. wurden zwar große und langanhaltende zytosolische Ca^{2+} -Spuren in Astrozyten im Hippocampus *in vivo* gezeigt, die sich über eine lange Distanz ausbreiteten, jedoch umfasst diese Studie nur einen quantitativen Bereich von einzelnen Zellen (Kuga 2011). Im Rahmen dieser Dissertation wurde dagegen zum ersten Mal eine Ausbreitung von astrozytären Ca^{2+} -Wellen in einer Langstrecken-Distanz dargestellt. Dies erfolgte nicht auf Einzelzellebene, sondern im Bereich von nicht mehr quantifizierbaren Zellengruppen. Studien, die sich mit der visuellen Abbildung von kortikaler Populationsaktivität befassen zeigten, dass spontane oder sensorisch-evozierte, langsame Ca^{2+} -Oszillationen (*slow waves*) als Wellen von einem Punkt des Gehirns beginnen, um dann zunehmend mehrere kortikale Regionen zu aktivieren (Busche et al., 2015; Grienberger et al., 2012; Stroh et al., 2013). Im Einklang mit diesen Beobachtungen wurden in dieser Doktorarbeit erstmalig Messungen von sensorisch-evozierten Ca^{2+} -Wellen in Astrozytenpopulationen im großen Maßstab aus den oberflächlichen kortikalen Schichten visualisiert. Diese breiteten sich

über mehrere mm über den Kortex aus (Abb. 13). Mittels CCD-Kamera-Aufnahmen wurde beobachtet, dass sensorisch-evozierte Ca^{2+} -Signale zunächst von einem Bereich zwischen dem visuellen und dem präfrontalen Kortex kreisförmig auf der kortikalen Oberfläche bilden, um sich dann weiter nach posterior und schließlich auch nach frontal auszubreiten (Abb. 13). Die höchste Aktivität von $0,1\% \Delta F/F$, wiesen die Ca^{2+} -Transienten im Bereich zwischen den beiden Hirnregionen visueller und präfrontalen Kortex auf. Unterstrichen wurde diese Beobachtung mit den daraus resultierenden Unterschieden der Latenzzeiten. So war auch im Rahmen dieser Doktorarbeit ein deutlicher Latenzzeitunterschied der besagten Spuren zu finden (Abb.12). Die größte und schnellste Amplitudenzunahme lag bei etwa 8s für den Bereich zwischen den beiden Hirnregionen präfrontaler- und visueller Kortex, dann folgte der visuelle Kortex, während der präfrontale Kortex deutlich später die höchste Amplitudenzunahme aufwies (Abb.13).

Der steilste Anstieg der Amplitude für die Ca^{2+} -Transienten war im Bereich zwischen den beiden Hirnregionen des präfrontalen und visuellen Kortex zu verzeichnen. Nach 19s war das Aktivitätsmuster komplett abgeklungen (Abb. 13). Im Gegensatz dazu gibt es eine Studie die besagt, dass sich sensorisch-evozierte neuronale Aktivität spiralförmig und in nicht-linearen Mustern im visuellen Kortex ausgebreitet (Huang et al., 2010). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz kann darin bestehen, dass die dort verwendete Voltage-sensitive Farbstoff-Bildgebung (VSDI; voltage sensitive dye imaging) in erster Linie die unterschwellige neuronale Aktivität wiedergibt, wohingegen die Ca^{2+} -Bildgebung (CCD-Kamera) die überschwellige neuronale Aktivität widerspiegelt (Grienberger et al., 2012; Stroh et al., 2013).

Auf Grund eines ähnlichen Aktivitätsverhaltens von Astrozyten gegenüber der langsamen Wellen (slow wave) in Neuronen, liegt die Hypothese nahe, dass die Aktivität von langsamen Wellen (slow wave activity) als Taktgeber fungiert oder die astrozytäre Aktivität als Träger die großen neuronalen Zellpopulationen moduliert (Szabo and Kardos, 2017).

4.1.2 Intrazellulärer Mechanismus der sensorisch-evozierten Signalweiterleitung auf zellulärer Ebene

Die leichte elektrische Stimulation an den Hinterpfoten der narkotisierten Maus vermittelte eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung in Astrozyten (Abb. 14) und evozierte eine Akti

vität in den umliegenden Neuronen, deren Aktivität mit Hilfe der LFP Technik identifiziert werden konnte (Abb. 14), wie es bereits in vorausgegangenen Studien beschrieben wurde (Metherate and Ashe, 1992). Diese intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung wurde hauptsächlich über die Aktivierung der Gq-gekoppelten Neurotransmitter Rezeptor-gesteuerten Ca^{2+} -Freisetzung des intrazellulären endoplasmatischen Retikulum (ER) ausgelöst, wie auch in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien vorausgehend gezeigt wurde (Navarrete et al., 2012; Perea and Araque, 2005; Sharma and Vijayaraghavan, 2001). Hervorgehend aus diesen Studien wurden im Rahmen dieser Dissertation pharmakologische Ca^{2+} -ATPase-(SERCA) Antagonisten wie Cyclopiazonic Säure und Thapsigargin verwendet, welche die ER Ca^{2+} -Speicher leeren. Im *in vivo* Experiment unter sensorisch-evozierten Stimulationen zeigte sich ein blockierender Effekt (Abb. 18). Die Applikation von Ryanodin unterdrückte ebenso die elektrische-evozierte Antwort von Astrozyten durch die Blockierung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER in das Zytoplasma (Abb. 18). Im Einzelnen deuten die Daten daraufhin, dass die zellulären Mechanismen der Ca^{2+} -ATPase (SERCA) im sarkoplasmatisches Retikulum (SR) sowie der ER Ca^{2+} -Speicher und das Entweichen des Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen (sarkoplasmatischen) Retikulum in das Zytoplasma an der sensorisch-evozierten Ca^{2+} -Aktivität in Astrozyten beteiligt sind (Abb. 18). Es stellte sich somit die Frage, ob neuronale Aktivität für die Aktivierung von evozierten astrozytären Ca^{2+} -Transienten nötig war.

Nach der lokalen Applikation des Na^+ -Kanal Antagonisten Tetrodotoxin (TTX) waren die astrozytären Ca^{2+} -Transienten in 5/5 Experimenten komplett blockiert (Abb. 15). Diese Ergebnisse legen nahe, dass sensorisch-evozierte Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten des auditorischen Kortex direkt durch neuronale Aktivität ausgelöst werden und nicht durch wandernde astrozytäre Ca^{2+} -Wellen.

4.1.3 Ursprung der sensorisch-evozierten astrozytären Ca^{2+} -Transienten

In der Studie von Letzkus et. all. (2011) wurde gezeigt, dass die leichten elektrischen Stimulationen der narkotisierten Maus den Kortex über cholinerge Afferenzen aus dem basalen Vorderhirn aktivieren. Daraufhin wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit pharmakologische Manipulationen mit cholinergen und pharmakologischen Antagonisten, die eine Entleerung der Ca^{2+} -Speicher des ER blockieren, unter visueller Hilfe der Zwei-

Photonen-Bildgebung durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass der Antagonist Methyllycaconitine (MLA) die sensorisch-evozierten Ca^{2+} -Transienten komplett blockierte (Abb. 19), wohingegen weder der muskarinischer-AChR (mAChR) Antagonist VU0255035 noch der metabotrope Glutamatrezeptor (mGluR) Antagonist MPEP (mGluR5 Antagonist) und LY367385 (mGluR1 Antagonist) einen Effekt zeigten (Abb. 19). Ähnlich aktivierte, nAChR vermittelte Ca^{2+} -Transienten wurden im Hippocampus *in vitro* gemessen und darüber interpretiert, dass diese Ca^{2+} -Ausschüttung des ER Speichers entstamme (Sharma and Vijayaraghavan, 2001). Die Beteiligung von nAChRs wurde weiter durch die Feststellung gestützt, dass diese Astrozyten, die auf die Stimulation des elektrischen Stimulus reagierten, die sogenannten „Antworte“, ebenfalls Ca^{2+} -Transienten als Reaktion auf direkt aufgetragenes Nikotin erzeugten (Abb. 19). Während jedoch die „Non-Antworte“ nicht auf die direkte Gabe von Nikotin reagierten (Abb. 19). Aus früheren Studien geht hervor, dass Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten im Rahmen von Schreck-Reaktionen hervorgerufen werden konnten, welche über die Aktivierung von Norepinephrin-vermittelten, α -adrenergen Rezeptoren im somatosensorischen und visuellen Kortex stattfanden (Paukert et al., 2014).

In der Arbeitsgruppe von Xiaowei Chen konnte sowohl in Messungen, die unter Anästhesie, als auch im Wachzustand des Tieres unter Gabe von dem Antagonisten Phentolamine (α -adrenerger Rezeptorantagonist) stattfanden, keine Ca^{2+} -Transienten in Astrozyten nach elektrischer Stimulation nachgewiesen werden (Chen et al., 2017), unveröffentlichtes Manuskript). Das Immunfärbeexperiment, das aus der Arbeitsgruppe von Chen stammt, identifizierte eine Übereinstimmung der Immunfärbung für die $\alpha 7$ -Untereinheit des nAChR und der GFAP gefärbten Astrozyten und belegt, dass Astrozyten direkt durch cholinerge Axone aktiviert werden (Chen et al., 2017), unveröffentlichtes Manuskript).

4.2 Analyse der langanhaltenden glialen Gedächtnisspur

In dieser Arbeit ergeben sich Hinweise darauf, dass Astrozyten auf die Gedächtnisbildung einen Einfluss nehmen, womit das Verständnis für die Funktionsweise des Gehirns und die Erforschung der Funktionsweise von Astrozyten langfristig zur Heilung neurologischer Erkrankungen einen Beitrag leisten könnten. Hierbei wurden zum ersten Mal im

Bereich Lernen und Gedächtnisbildung in einer *in vivo* Studie unter Verwendung eines Zwei-Photonen-Mikroskops, die Aktivität von Astrozyten unter der Verwendung eines assoziativen Lernparadigmas gemessen. Es sollte dabei die Frage beantwortet werden, ob Astrozyten bei einer einfachen Lernform eine zeitlich persistierende Veränderung des Aktivitätsmusters der interzellulären Ca^{2+} -Ausschüttung aufweisen. Die erzielten Ergebnisse stammen aus dem auditorischen Kortex einer anästhesierten, kopffixierten Maus. Für ein Experiment im Rahmen eines assoziativen Lernparadigmas wie Furchtkonditionierung, wurde das Prinzip der klassischen Konditionierung verwendet. Dazu wurde vor, während und nach der Präsentation des konditionierten Stimulus (konditionierter Stimulus = CS, Ton) mit der Präsentation eines unkonditionierten aversiven Stimulus (unkonditionierter Stimulus = US, elektrischer Stimulus) die Ca^{2+} -Aktivität in Astrozyten (unkonditionierter Reiz/konditionierter Reiz = UR/CR) gemessen. Es zeigte sich ein signifikant hoher Anstieg der Anzahl von Astrozyten, die auf den gepaarten Stimulus ansprachen, während die Anzahl der Astrozyten die auf den elektrischen Stimulus reagierten konstant blieb (Abb. 20E). Darüber hinaus haben nur diejenigen Astrozyten eine gute Antwortreaktion auf den Tonstimulus (~68%, n=30 Zellen, n=4 Mäusen) erworben, die auch auf den elektrischen Stimulus antworteten (Abb. 20E). Im nächsten Schritt ging es um die pharmakologische Untersuchung des Mechanismus der Ca^{2+} -Aktivität in Astrozyten nach der Konditionierung. In Abbildung 21 wird demonstriert, dass die Applikation von MLA die Ca^{2+} -Transienten sowohl der elektrischen Stimuli als auch der gelernten Ton Stimuli signifikant blockiert. Die Empfindlichkeit der neu induzierten Ton Antwort gegenüber dem nAChR Antagonist unterstreicht die wichtige Rolle, der vorgelagerten cholinergen Afferenzen des basalen Vorderhirns für die plastischen Veränderungen in den Astrozyten (Abb. 21B). Im nächsten Schritt ging es nun darum, mehr über die zeitlich persistierende Ca^{2+} -Ausschüttung in Astrozyten nach Konditionierung herauszufinden. Wie verläuft die Extinktion der Ca^{2+} -Transienten auf die konditionierten Ton Antwort?

Dabei fiel auf, dass die zelluläre Antwort von astrozytären Ca^{2+} -Transienten nach Gabe des elektrischen Stimulus eine extrem stabile Auftrittswahrscheinlichkeit zeigte (Abb.20C), während gegenüber dem reinen Tonstimulus, nach der Präsentation der Paarung der beiden Stimuli (US+CS), nur eine kurzzeitig stabile Auftrittswahrscheinlichkeit nachgewiesen werden konnte, welche schon kurz darauf nicht mehr nachweisbar war (Abb. 23A). Beim Vergleich nach der Durchführung der Konditionierung der Experimentreihen in der die Konditionierung einmal im anästhesierten Tier und ein anderes

Mal im wachen Tier durchgeführt wurde, fällt auf, dass die Extinktion des erlernten Verhaltens im leicht anästhesierten Tier deutlich schneller (4 CS) verlief als im frei beweglichen Tier (≥ 5 CS) (Abb. 23B).

Über alle Experimente hinweg war der Anteil der „Ton-Antworter“ Astrozyten über den getesteten Zeitraum von bis zu 15 Tagen nach der Konditionierung bemerkenswert stabil (Abb. 22A-B) (Abb. 23E). Dieses Verhalten konnte mehrere Tage andauern und war reversibel löschar (Abb. 22). Das Vorhandensein einer solchen lang anhaltenden Gedächtnisspur in Gliazellen war angesichts der klassischen Vorstellung über Gliazellen, die zumeist Stoffwechselprozesse steuern (Weber and Barros, 2015) und weniger zur sensorischen Integration beitragen (Iadecola and Nedergaard, 2007), unerwartet. Die Ergebnisse neuester Studien deuteten jedoch darauf hin, dass Astrozyten in verschiedenen Gehirnregionen an der sensorischen Integration beteiligt sind (Navarrete et al., 2012; Schummers et al., 2008; Wang et al., 2006b). Die in unserer Studie erzielten Erkenntnisse haben gezeigt, dass Astrozyten nicht nur an der dynamischen Regulation neuronaler Reaktionen beteiligt sind, sondern auch eine wichtige Rolle bei der längerfristigen Speicherung von Informationen im Gehirn spielen können, insbesondere in Situationen, in denen das Erlernen von Angst eine große Anzahl von Neuronen aktiviert (Herry and Johansen, 2014; Maren and Quirk, 2004). Der Beitrag von Astrozyten während der Angsterlernung in Bezug auf die beteiligten Neuronen und dessen erhöhte neuronale Aktivität, könnte in einer adaptiven Steuerung der synaptischen Prozesse sowie der metabolischen und hämodynamischen Regulation bestehen (Iadecola and Nedergaard, 2007; Schummers et al., 2008).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse eine persistente Gedächtnisspur in einem Neuronen-Glia-Kreislauf nach und decken somit einen unerwarteten zellulären Mechanismus des assoziativen Furchterlernens und Gedächtnisbildung im Kortex von Säugtieren auf.

4.3 Ausblick

Zusammen zeigen die oben vorgestellten Ergebnisse eine enge Korrelation zwischen der neu induzierten, astrozytischen Reaktion auf den konditionierten Stimulus und dem Furchtverhalten. Diese Ergebnisse klären jedoch nicht, ob die nikotinische Aktivierung

von Astrozyten direkt am Lernen und der Gedächtnisbildung beteiligt ist, oder ob dies nur auf ein Epiphänomen zurückzuführen ist. Im Labor von Chen und seinen Kollegen wurde, um den Grad der Beteiligung der aktivierten Astrozyten bei der Speicherung des Angstgedächtnisses zu untersuchen, zunächst kurz vor der Angstkonditionierung bilateral MLA in den auditorischen Kortex appliziert. Die Mäuse wurden 24h nach der Konditionierung getestet. Nach der Anwendung des nAChRs Antagonisten konnte ein stark verringertes Verharr-Verhalten in den konditionierten Mäusen nachgewiesen werden. Es könnte eine Beeinträchtigung des Angstgedächtnisses durch die Verabreichung des Antagonisten MLA vorliegen, was auf eine Blockierung entweder der $\alpha 7$ -Nikotinrezeptoren in Interneuronen (Letzkus et al., 2011) der kortikalen Schicht 1 (L1) oder in Astrozyten zurückzuführen sein könnte. Bei der Stummschaltung des auditorischen Kortex mit dem GABA-A (γ -Aminobuttersäure) Rezeptoragonisten Muscimol kommt es zu einer Verringerung des Angstniveaus. Dies deutet daraufhin, dass kortikale Neurone an diesem Prozess beteiligt sein könnten.

Um die Möglichkeit zu testen, ob ein Beitrag von $\alpha 7$ -Nikotinrezeptoren in Astrozyten in Bezug auf das Angstgedächtnis vorliegt, wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. Zunächst wurden L- α -aminoadipinsäure (L-AAA, 300mM), ein für Astrozyten spezifisches Gliotoxin (Banar and Duman, 2008), lokal im auditorischen Kortex appliziert. Das Ergebnis zeigte bei konditionierten Mäusen eine signifikante Verringerung des Verharr-Verhaltens, was auf eine Beteiligung von Astrozyten am Angstgedächtnis hindeutet. In einer zweiten Experimentreihe wurden Astrozyten-spezifische, konditionierte $\alpha 7$ -Nikotinrezeptor Knockout-Mäuse ($\alpha 7$ -cKO) generiert und analysiert. In Übereinstimmung mit dem *in vitro* Test, zeigt die *in vivo* Darstellung von Ca^{2+} -Transienten im Zwei-Photonen-Mikroskop, dass bei $\alpha 7$ -cKO-Mäusen die Reaktionen der kortikalen Astrozyten auf die Stimulation des elektrischen Reizes oder die Nikotinapplikation aufgehoben waren. Im Gegensatz dazu waren nikotinische Signalübertragung in L1-Interneurone unverändert, wie auch bei *cell-attached* Aufzeichnungen angezeigt wurde, die sowohl in $\alpha 7$ -cKO-Mäuse als auch in Wildtyp-Wurfgeschwistern ($\alpha 7$ -cWT) durchgeführt worden sind. Vor allem im Kontext der gemeinsamen Studie mit der Arbeitsgruppe von Xiaowei Chen zeigten Verhaltensexperimente, dass $\alpha 7$ -cKO-Mäuse im Vergleich zu $\alpha 7$ -cWT-Mäusen eine deutliche Verringerung des Angstgedächtnisses aufwiesen, was auf eine direkte Rolle des neu identifizierten Neuron-Glia-Kreislaufs in der Identifizierung eines Angstspeicher hindeutet.

Eine rasante Weiterentwicklung ist nicht nur in der Mikroskopie Technik zu verzeichnen, sondern auch im Bereich der verwendeten Farbstoffe. Bis vor kurzem war es nicht möglich in tiefere Schichten (μm) des Kortex bildgebende Technik zu verwenden. Jedoch ermöglicht die Verwendung des Ca^{2+} -Indikator Cal-590 nun Bildgebungsexperimente in allen Schichten des Maus-Kortex (Tischbirek et al., 2015). So wäre es nun von Interesse in tieferen Hirnschichten die Astrozyten Aktivität zu messen und unter Verwendung eines assoziativen Lernparadigmas, wie der klassischen Konditionierung, das Antwortverhalten genauer zu untersuchen. Interessant sind in dem Zusammenhang auch genetisch kodierte Fluoreszenzfarbstoffe, die auch im Rahmen dieser Arbeit zur Spezifizierung der Gewebe-Zuordnung verwendet wurden. Die genetisch kodierten Farbstoffe ermöglichen eine Darstellung von astrozytären Prozessen bestehend aus aktiven Ästen und passiven perisynaptischen Blättchen (Semyanov, 2019). Verschiedene Studien demonstrierten, dass es große Unterschiede zwischen den Ca^{2+} -Signalen in den Somata und in den Prozessen der Astrozyten gibt und insgesamt waren mindestens achtmal so viele Ca^{2+} -Transienten in den Prozessen, als in den Somata zu verzeichnen (Kanemaru and Tanaka, 2014; Srinivasan and Khakh, 2015). Diese Technik der genetisch-kodierten Ca^{2+} -Indikatoren bietet sich auch für longitudinale Studien an. In diesem Zusammenhang wäre es vorstellbar, Astrozyten wiederholt unter dem Aspekt der langanhaltenden persistente Gedächtnisspur in einem Neuronen-Glia-Kreislauf zu analysieren, um damit die zeitliche Entwicklung einer Veränderung zu charakterisieren. Häufig wurde ein astrozytäres Ca^{2+} -Muster durch 2D-konfokale oder Zwei-Photonen-Bildgebung untersucht. Diese Abbildungen liefern nur begrenzte Informationen über tatsächliche 3D- Ca^{2+} -Ereignisse. Es ist in der Tat unklar, ob Ca^{2+} -Mikrodomänen, die mit 2D-Bildgebung in Gehirnschnitten oder *in vivo* aufgenommen wurden, die volle Komplexität von Ca^{2+} -Ereignissen der anatomischen Natur widerspiegeln. Tatsächlich erfordern genauere Informationen über die räumlich-zeitlichen Eigenschaften des Ca^{2+} -Musters im Astrozyten-Netzwerk eine schnelle 3D-Bildgebung in Kombination mit neuartigen Analysemethoden, die möglicherweise eine multivariable Regressionsanalyse (auch als Big Data – Analyse bezeichnet) integrieren kann.

Es ist zu empfehlen, Astrozyten in zukünftigen Studien in ihrer Bedeutung und Beteiligung an der Krankheitsentstehung neurologischer, als auch psychiatrischer Erkrankungen weiter zu erforschen, da dies erstens weiter dazu beitragen kann, Astrozyten als aktives "Mitglied" in Gehirn- und Gedächtnisfunktionen zu etablieren und zweitens Einblicke in die Beteiligung der Astrozyten an der Gedächtnisbildung zu ermöglichen.

5 Literaturverzeichnis

Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P., Oliet, S.H., Robitaille, R., and Volterra, A. (2014). Gliotransmission travels in time and space. *Neuron*. 4, 728-739.

Araque, A., Martin, E.D., Perea, G., Arellano, J.I., and Washington, B. (2002). Synaptically released acetylcholine evokes Ca^{+2} elevations in astrocytes in hippocampal slices. *Journal of Neuroscience*. 22, 2443-2450.

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R., and Haydon, P. (1999). Tripartite synapses glia the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*. 22, 208-15.

Banasr, M., and Duman, R.S. (2008). Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biol Psychiatry*. 64, 863-870.

Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Lodi, B., Pozzan, T., and Volterra, A. (1998). Prostaglandins stimulate calcium dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*. 391, 281-5.

Bowman, C., and Kimelberg, H. (1984). Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. *Nature*. 311, 656-659.

Boyle, W., and Smith, G. (1970). Charge coupled semiconductor devices. *Bell System Technical Journal*. 49, 477-600.

Busche, M.A., Chen, X., Henning, H.A., Reichwald, J., Staufenbiel, M., Sakmann, B., and Konnerth, A. (2012). Critical role of soluble amyloid-beta for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *PNAS*. 109, 8740-8745.

Busche, M.A., Kekus, M., Adelsberger, H., Noda, T., Förstl, H., Nelken, I., and Konnerth, A. (2015). Rescue of long-range circuit dysfunction in Alzheimer disease models. *Nat. Neuroscience*. 18, 1623-30.

Bushong, E.A., Martone, M., Jones, Y., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical. *The J. Neurosci*. 1, 183-192.

Buzsaki, G., Anastassiou, C.A., and Koch, C. (2012). The origin of extracellular fields and currents EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature Reviews Neuroscience*. 13, 407-420.

Chen, N., Sugihara, H., Sharma, J., Perea, G., Petravicz, J., Le, C., and Sur, M. (2012). Nucleus basalis-enabled stimulus-specific plasticity in the visual cortex is mediated by astrocyte. *PNAS*. 109, E2832-4.

Chen, T., Wardill, T., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S., Baohan, A., Schreiter, E., Kerr, R.A., Orger, M.B., Jayaraman, V., et al. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*. 499, 295-300.

Chen, X., Förster, R., Zhang, K., He, W., Ding, R., Wang, Y., Yang, Z., Zhang, Y., Stobart, J., Weber, B., et al. (2017). Fear learning-dependent memory trace in a neuron-glia circuit (unpublished Manuscript, Technische Universität München).

Chen, X., Leischner, U., Varga, Z., Jia, H., Deca, D., Rochefort, N.L., and Konnerth, A. (2012). LOTOS-based two-photon calcium imaging of dendritic spines in vivo. *Nature Protocols*. 7, 1818-1829.

Coombs, J.S., Eccles, J.C., and Fatt, P. (1955). The electrical properties of the motoneurons membrane. *Journal of Physiology*. 130, 291-325.

Denk, W., Stricker, J.H., and Webb, W. (1990). Two-Photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. 248, 73-76.

Eroglu, C., and Barres, B.A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*. 468, 223-231.

Ferezou, I., Haiss, F., Gentet, L., Aronoff, R., Weber, B., and Petersen, C. (2007). Spatiotemporal dynamics of cortical sensorimotor integration in behaving mice. *Neuron*. 56, 1948-57.

Finkbeiner, S. (1993). Glial Calcium. *Glia*. 9, 83-104.

Flecknell, P. (2015). *Laboratory animal anaesthesia* (Boston, MA: Elsevier).

Garaschuk, O., Milos, R.I., and Konnerth, A. (2006). Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging in vivo. *Nature Protocols*. 1, 380-386.

Grienberger, C., Adelsberger, H., Stroth, A., Milos, R.I., Garaschuk, O., Schierloh, A., Nelken, I., and Konnerth, A. (2012). Sound-evoked network calcium transients in mouse auditory cortex in vivo. *The Journal of Physiology*. 590, 899-918.

Hamilton, N., Vayro, S., Kirchhoff, F., Verkhratsky, A., Robbins, J., Gorecki, D., and Butt, A. (2008). Mechanisms of ATP- and Glutamate-Mediated Calcium Signaling in White Matter Astrocytes. *Glia*. 56. 734-49.

Haydon, P. (2001). Glia listening and talking to the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*. 2, 185-193.

Haydon, P., and Nedergaard, M. (2014). How do astrocytes participate in neural plasticity? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 7.

Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H., and Rusakov, D.A. (2010). Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*. 463, 232-236.

Herculano-Houzel, S. (2014). The glia neuron ratio how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*. 62, 1377-1391.

Herry, C., and Johansen, J. (2014). Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nature Neuroscience*. 17, 1644-1654.

Hild, W., Chang, J.J., and Tasaki, I. (1958). Electrical responses of astrocytic glia from the mammalian central nervous system cultivated in vitro. *Experientia*. XIV, 220-221.

- Hirase, H., Qian, L., Bartho, P., and Buzsaki, G. (2004). Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biology*. 2, E96.
- Huang, X., Gao, X., and Wu, J. (2010). Spiral wave dynamic in neocortex. *Neuron*. 968, 978-990.
- Iadecola, C., and Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature Neuroscience*. 10, 1369-1376.
- Kanemaru, K., and Tanaka, K. (2014). In Vivo Visualization of Subtle, Transient and Local Activity of Astrocytes Using an Ultrasensitive Ca²⁺ Indicator. *Cell calcium*. 8, 311-8.
- Kastritsis, H., Salm, A., and McCarthy, K. (1992). Stimulation of the P2Y purinergic receptor on type 1 astroglia results in inositol phosphate formation and calcium mobilization. *Journal of Neurochemistry*. 58, 1277-84.
- Kettenmann, H., Backus, K., and Schachner, M. (1984). Aspartate, glutamate and gamma-aminobutyric acid depolarize cultured astrocytes. *Neuroscience Letters*. 52, 25-29.
- Kettenmann, H., and Verkhratsky, A. (2011). Neuroglia, der lebende Nervenkit. *Fortschr. Neurol. Psychiat.* 79, 588-97.
- Kirschuk, S., Kettenmann, H., and Verkhratsky, A. (2007). Membrane currents and cytoplasmic sodium transients generated by glutamate transport in Bergmann glial cells. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*. 454, 245-252.
- Koelle, G.B., and Wagner, H. (1955). The histochemical identification of acetylcholinesterase in cholinergic, adrenergic and sensory neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 144, 167-184.
- Konietzko, U., and Müller, C. (1994). Astrocytic dye coupling in rat hippocampus topography, developmental onset, and modulation by protein kinase. *Hippocampus*. 3, 297-306.
- Lee, Y., Messing, A., Su, M., and M., B. (2008). GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia*. 56, 481-493.
- Letzkus, J.J., Wolff, S.B., Meyer, E.M., Tovote, P., Courtin, J., Herry, C., and Luthi, A. (2011). A disinhibitory microcircuit for associative fear learning in the auditory cortex. *Nature*. 480, 331-335.
- Manninen, T., and Linne, M. (2018). Computational Models for Calcium-Mediated Astrocyte Functions. *Frontiers Computational Neuroscience*. 12.
- Maren, S., and Quirk, G. (2004). Neuronal signalling of fear memory. *Nature Reviews Neuroscience*. 5, 844-852.
- Massimini, M., Huber, R., Ferrarelli, F., Hill, S., and Tononi, G. (2004). The sleep slow oscillation as a travelling wave. *The J. Neurosci.* 24, 6862-70.

McCarthy, K., and Salm, A. (1991). Pharmacologically-distinct by their calcium response to neuroligand. *Neuroscience*. 41, 325-333.

Merkel, G., and Eger, E.I., 2nd (1963). A comparative study of halothane and halopropane anesthesia including method for determining equipotency. *Anesthesiology*. 24, 346-357.

Metherate, R., and Ashe, J. (1992). Cellular bases of neocortical activation: modulation of neural oscillations by the nucleus basalis and endogenous acetylcholine. *Journal of Neuroscience*. 12, 4701-11.

Navarrete, M., and Araque, A. (2008). Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*. 57, 883-893.

Navarrete, M., Perea, G., Fernandez de Sevilla, D., Gomez-Gonzal, M., Nuñez, A., Martin, E., and Araque, A. (2012). Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biology*. 10.

Nedergaard, M., and Verkhratsky, A. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*. 98,239-389.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J.N., and Helmchen, F. (2004). Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nature Methods*. 1, 31-37.

Parpura, V., Basarsky, T., Liu, F., Jęftinija, K., Jęftinija, S., and Haydon, P. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*. 369, 744-747.

Pascual, O., Casper, K.B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.Y., Takano, H., Moss, S.J., McCarthy, K., and Haydon, P.G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*. 310, 113-116.

Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (1997). Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *The J. Neurosci*. 17, 7817-7830.

Paukert, M., Agarwal, A., Cha, J., Doze, V.A., Kang, J.U., and Bergles, D.E. (2014). Norepinephrine controls astroglial responsiveness to local circuit activity. *Neuron*. 82, 1263-1270.

Paxinos, G., and Franklin, K.B.J. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (San Diego: Academic Press).

Perea, G., and Araque, A. (2005). Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *Journal of Neuroscience*. 25, 2192-2203.

Perea, G., Navarrete, M., and Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*. 32, 421-431.

Porter, J., and McCarthy, K. (1995). Adenosine receptors modulate $[Ca^{2+}]_i$ in hippocampal astrocytes in situ. *Journal of Neurochemistry*. 16, 5073-5081.

Porter, J., and McCarthy, K. (1996). Hippocampal Astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *The J. Neurosci.* 16, 5073-5081.

Poskanzer, K.E., Yuste (2016). Astrocytes regulate cortical state switching in vivo. *PNAS.* 113, E2675-E2684.

Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., and Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological Reviews.* 74, 595-636.

Schummers, J., Yu, H., and Sur, M. (2008). Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science.* 320, 1638-1643.

Semyanov, A. (2019). Spatiotemporal pattern of calcium activity in astrocytic network. *Cell calcium.* 78, 15-25.

Sharma, G., and Vijayaraghavan, S. (2001). Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular store. *PNAS.* 98, 4148-4153.

Sontheimer, H. (1994). Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia.* 11, 156-172.

Sontheimer, H., Black, J., and Waxman, S. (1996). Voltage-gated Na⁺ channels in glia properties and possible functions. *Trends in Neurosciences.* 19, 325-331.

Srinivasan, R., Huang, B., Venugopal, S., Johnston, A., Chai, H., Zeng, H., Golshani, P., and Khakh, B.S. (2015). Ca²⁺ signaling in astrocytes from IP3R2^{-/-} mice in brain slices and during startle responses in vivo. *Nature Neuroscience.* 18, 708-717.

Steinhauser, C., and Gallo, V. (1996). News on glutamate receptors in glial cells. *Trends in Neurosciences.* 19, 339-45.

Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K., and Konnerth, A. (2003). In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *PNAS.* 100, 7319-7324.

Stroh, A., Adelsberger, H., Groh, A., Ruhlmann, C., Fischer, S., Schierloh, A., Deisseroth, K., and Konnerth, A. (2013). Making waves: initiation and propagation of corticothalamic Ca²⁺ waves in vivo. *Neuron.* 77, 1136-1150.

Suzuki, A., Stern, S., Bozdagi, O., Huntley, G.W., Walker, R.H., Magistretti, P., and Alberini, C.M. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell.* 144, 810-823.

Szabo, Z., Heja, L., Szalay, G., Kekesi, O., Füredi, A., Szebenyi, K., Dobolyi, A. Orban, T., Kolacsek, O., Tompa, T., Miskolczy, Z., Biczok, L., Rozsa, B., Sarkadi, B., and Kardos, J. (2017). Extensive astrocytes synchronizaiton advances neuronal coupling in slow wave activity in vivo. *Sci Rep.* 7.

Takano, T., Tian, G.F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., and Nedergaard, M. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature Neuroscience.* 9, 260-267.

Takata, N., Mishima, T., Hisatsune, C., Nagai, T., Ebisui, E., Mikoshiba, K., and Hirase, H. (2011). Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *The Journal of Neuroscience*. 31, 18155-18165.

Thrane, A.S., Thrane, R. V., Zeppenfeld, D., Lou, N., Xu, Q., Nagelhus, E. A., and Maiken Nedergaard. (2012). General anesthesia selectively disrupts astrocyte calcium signaling in the awake mouse cortex. *PNAS*. 109, 18974-9.

Tian, G.F., Takano, T., Lin, J.H., Wang, X., Bekar, L., and Nedergaard, M. (2006). Imaging of cortical astrocytes using two-photon laser scanning microscopy in the intact mouse brain. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 58, 773-787.

Tischbirek, C., Birkner, A., Jia, H., Sakmann, B., and Konnerth, A. (2015). Deep two-photon brain imaging with a red-shifted fluorometric Ca²⁺ indicator. *PNAS*. 112, 11377-82.

Verkhratsky, A., and Butt, A. (2007). *Glial Neurobiology* (England: John Wiley&Sons).

Verkhratsky, A., and Kettenmann, H. (1998). Calcium signalling in glial cells. *Physiological Reviews*. 1, 99-141.

Virchow, R. (1846). Über das granuliertes Ansehen der Wandungen der Gehirnentrikel. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin*. 3, 242-250.

Virchow, R. (1858). *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre* (Berlin: August Hirschwald).

Volterra, A., and Meldolesi, J. (2005). Astrocytes from brain glue to communication elements the revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience*. 6, 626-640.

von Bartheld, C., Bahnay, J., and Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain. A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol*. 524, 3865-3895.

von Lenhossek, M. (1895). *Der Feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuerer Forschung* (Berlin: Fischer's Medicinische Buchhandlung).

Wang, T.F., Zhou, C., Tang, A.H., Wang, S.Q., and Chai, Z. (2006). Cellular mechanism for spontaneous calcium oscillations in astrocytes. *Acta Pharmacologica Sinica*. 27, 861-868.

Wang, X., Lou, N., Xu, Q., Tian, G.F., Peng, W.G., Han, X., Kang, J., Takano, T., and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nature Neuroscience*. 9, 816-823.

Weber, B., and Barros, L.F. (2015). *The Astrocyte: Powerhouse and RecyclingCenter*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 7.

Xu, W., Huang, X., Takagaki, K., and Wu, J. (2007). Compression and reflection of visually evoked cortical waves. *Neuron*. 55, 119-29.

Yuste, R., and Denk, W. (1995). Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature*. 375, 682-684.

6 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Arthur Konnerth für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die prägende wissenschaftliche Ausbildung und die stetige Unterstützung.

Ich danke Herrn Professor Dr. Helmuth Adelsberger für das große Engagement in der wissenschaftlichen Betreuung meines Projektes.

Herrn Dr. Xiaowei Chen danke ich für die unterstützende und geduldige Einarbeitung in die wissenschaftlichen Methoden.

Ich danke Frau Dr. Christine Grienberger für die persönliche und fachliche Unterstützung insbesondere in der Anfangsphase meines Projektes.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen für die Unterstützung sowie die schöne Zeit, die wir gemeinsam verbracht haben.

Ganz besonders danke ich meiner Familie. Jan ti amo ∞

7 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt und indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Ich weiß, dass die Arbeit in digitalisierter Form daraufhin überprüft werden kann, ob unerlaubte Hilfsmittel verwendet wurden und ob es sich – insgesamt oder in Teilen- um ein Plagiat handelt. Zum Vergleich meiner Arbeit mit existierenden Quellen darf sie in eine Datenbank eingestellt werden und nach der Überprüfung zum Vergleich mit künftig eingehenden Arbeiten dort verbleiben. Weitere Vervielfältigungen- und Verwertungsrechte werden dadurch nicht eingeräumt. Die Arbeit wurde weder einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt noch veröffentlicht.

München, den 14.01.2020

Rita Förster