

Aus dem Bereich Anatomie und Zellbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Hyperosmolare Sucrose-Lösung induziert ultrastrukturelle Veränderungen in astrozytären Gap Junctions

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2020

vorgelegt von: Johanna Christina Recktenwald
geb. am: 16.05.1993 in Saarbrücken

Tag der Promotion: 04.12.2020

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. C. Meier

Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Kirchhoff

-meinen Eltern gewidmet-

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Homburg, den 04.03.2020

Beiträge:

Das Projekt wurde gemeinsam mit Frau Univ.-Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier und Frau Dr. rer. nat. Anja Beckmann entwickelt. Beide halfen bei der Ausarbeitung, Analyse und Interpretation der Daten.

Alle Zellexperimente und Immunoblots sowie deren Analyse, Interpretation und statistische Auswertung wurden mit Unterstützung von Frau Dr. rer. nat. Anja Beckmann durchgeführt.

Zellkultur, immunhistochemische Färbungen, sämtliche Arbeitsschritte der FRIL-Versuche sowie die transmissionselektronenmikroskopische Erfassung der FRIL-Proben und Fotoaufnahmen wurden mit Hilfe von Herrn Alexander Grißmer durchgeführt.

Die Anfertigung des SL/DT-Assays wurde von Frau Dr. rer. nat. Anja Beckmann und Herrn Alexander Grißmer durchgeführt. Die Auswertung erfolgte auf der Grundlage der Auswertungsmethode von Herrn Alexander Grißmer.

Frau Andrea Rabung unterstützte die RNA-Isolation und führte die qRT-PCR durch.

Ein Teil der Abbildungen wurde auf Grundlagen der Ideen und Vorlagen von Frau Franziska Müller angefertigt. Ein Teil der immunhistochemischen Färbungen wurde ebenfalls mit ihrer Hilfe angefertigt.

Herr Martin Messer führte die DAB-Färbung der Astrozyten durch.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
Zusammenfassung	1
Summary: Hyperosmolar sucrose solution induces ultrastructural changes of gap junctions in astrocytes	2
1 Einleitung.....	3
1.1 Astrozyten	4
1.1.1 Connexine bilden Gap Junction-Kanäle	6
1.1.2 Gap Junction-Trafficking	8
1.1.3 Intermediärfilamente und Membranproteine von Astrozyten	12
1.1.4 Osmotisch wirksame Substanzen und Sucrose	13
1.2 Darstellung von biologischen Membranen durch die Gefrierbruchtechnik	15
1.2.1 Nomenklatur	16
1.3 Ziel der Arbeit: Osmotischer Stress führt zu ultrastrukturellen Veränderungen in der GJIC von Astrozyten	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Geräte, Werkzeuge, Verbrauchsmaterial, Software	20
2.1.1 Geräte und Werkzeuge	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.3 Kits	23
2.2 Chemikalien und Lösungen.....	23
2.2.1 Chemikalien.....	23
2.2.2 Antikörper	25
2.2.3 Primer für die qRT-PCR.....	26
2.2.4 Software.....	26
2.3 Isolation und Kultivierung von primären Astrozyten.....	27
2.3.1 Isolation der primären Astrozyten	27
2.3.2 Kultivierung und Passagieren.....	27
2.4 Immunzytochemische Reinheitsbestimmung der Astrozytenkultur.....	28
2.5 Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin	28

2.6	Aussaat und Stimulation der Astrozyten	29
2.6.1	Zählen und Aussaat der Zellen	29
2.6.2	Serumreduktion	29
2.6.3	Stimulation der Astrozyten.....	29
2.7	RNA/Protein-Isolation.....	30
2.8	Analyse der mRNA Expression mittels qRT-PCR.....	30
2.8.1	RNA-Isolierung mit RNeasy Plus Mini Kit von Qiagen.....	30
2.8.2	Ethanol-Präzipitation.....	31
2.8.3	Umschreiben der RNA in cDNA.....	31
2.8.4	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	31
2.8.5	Auswertung der qRT-PCR	32
2.9	Immunoblot	33
2.9.1	Proteinextraktion und Bestimmung der Proteinkonzentration	33
2.9.2	Anfertigung bzw. Gießen der Gele.....	33
2.9.3	Start der Elektrophorese	34
2.9.4	Blotting.....	34
2.9.5	Ponceau-S-Färbung	34
2.9.6	Inkubation mit Antikörpern.....	34
2.9.7	Ladekontrolle und quantitative Auswertung der optischen Dichte	35
2.10	FRIL	36
2.10.1	Vorbereitung und Vitrifizierung der Zellproben	36
2.10.2	Gefrierbruch und Membran-Bedampfung	37
2.10.3	<i>Immunolabeling</i> für Lexan-stabilisierte Gold-Grids	38
2.10.4	Entfernung des Lexans (<i>DeLex</i>)	38
2.10.5	Auswertung der FRIL-Proben	39
2.10.6	Unterscheidung spezifisches/unspezifisches Labeling.....	40
2.11	<i>Scrape Loading/Dye Transfer Assay</i>	41
2.11.1	Auswertung des SL/DT-Assays.....	41
2.12	Statistische Auswertung	43
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Reinheitsbestimmung der Astrozytenkulturen	44
3.2	Analysen zur mRNA-Expression nach Sucrose-Behandlung.....	44

3.2.1	Die Expression der Astrozyten-Proteine GFAP und AQP4 verändert sich nach 5-minütiger Sucrose-Stimulation nicht.....	44
3.2.2	Auswirkungen der 5-minütigen Stimulation mit hyperosmolarer Sucrose-Lösung auf die Membranproteine Cx43 und ZO-1	45
3.3	Proteinanalysen von Cx43 nach Sucrose-Behandlung	46
3.3.1	Hyperosmolare Sucrose-Lösung hat keine Auswirkung auf die Proteinmenge von panCx43.....	46
3.3.2	5-minütige Stimulation mit Sucrose-Lösung bewirkt eine Zunahme der Phosphorylierung von Cx43 an S368	47
3.4	Die Visualisierung der Gap Junctions mittels FRIL zeigte morphologische Veränderungen nach Sucrose-Stimulation	48
3.4.1	<i>Signal-to-Noise Ratio</i> und <i>Labeling-Effizienz</i>	48
3.4.2	Stimulation von Astrozyten mit hyperosmolarer Sucrose-Lösung führt zu morphologischen Veränderungen der Gap Junctions	48
3.4.3	5-minütige Sucrose-Stimulation führt zu einer Zunahme von Fläche und Umfang der Gap Junctions	53
3.4.4	5-minütige Sucrose-Stimulation beeinflusst die Flächendichte der IMPs.....	54
3.4.5	5-minütige Sucrose-Stimulation bewirkt eine Zunahme des NND	55
3.5	Die Stimulation mit hyperosmolarer Sucrose-Lösung vermindert GJIC	57
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	59
4	Diskussion	61
4.1	Reaktionssysteme als Antwort auf osmotischen Stress in Säugetieren	61
4.2	Wirkung von Hyperosmolarität auf primäre Astrozyten und die Morphologie von Cx43-Gap Junctions.....	62
4.2.1	Etablierung der Auswertungs-Methode der FRIL-Bilder.....	62
4.2.2	Gap Junctions und Osmose – Ein Rückblick auf erste Erklärungsmodelle.....	62
4.2.3	5-minütige Sucrose-Behandlung führt zu ultrastrukturellen und funktionellen Veränderungen der Cx43-Gap Junctions.....	63
4.2.4	5-minütige Stimulation von Astrozyten führt zu keinen signifikanten Veränderungen der AQP4-, Cx43- und GFAP-Expression.....	66
4.2.5	Hyperosmolare Sucrose-Lösung bewirkt eine signifikante Zunahme der Expression von ZO-1	68
4.2.6	Hyperosmolare Sucrose-Lösung beeinflusst die Phosphorylierung von Cx43	69
4.3	Gap Junctions in Gesundheit und Krankheit	71

4.3.1	Auswirkungen der hyperosmolaren Stimulation auf Stoffwechselebene	71
4.3.2	Bedeutung der hyperosmolaren Stimulation für die Zellintegrität	74
4.3.3	Veränderungen von Cx43 nach hyperosmolarer Stimulation im Kontext des Hirnödems und der Hirnschwellung.....	75
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	78
5	Literaturverzeichnis	80
6	Veröffentlichungen	86
6.1	Publikationen.....	86
6.2	Kongressbeiträge	86
7	Danksagung	87
8	Lebenslauf	88

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
A	Astrozyt
Abb.	Abbildung
AGJ	Anular Gap Junction
AQP	Aquaporin
AP2	Alternative Clathrin Adaptor Protein Complex
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderalbumin)
bzw.	Beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium-Ion
C _t -Wert	Threshold Cycle-Wert
CBX	Carbenoxolon
CD68	Cluster of Differentiation 68
CLASP	Clathrin Associated Sorting Protein
COP	Coat Protein Complex
COX ₂	Cyclooxygenase 2
CPC	Cryo Preparation Chamber
Cx	Connexin
Dab2	Alternative Adaptor Protein, Disabled 2
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	Diamidinphenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	Reinstwasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNase	Desoxyribonuklease (DNase)
Eb Protein	End Binding-Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eps15	Epidermal Growth Factor Receptor Substrate 15
EtOH	Ethanol
f.	für
FRIL	Freeze Fracture Replica Immunogold Labeling
FCS	Fetal Calf Serum (Kälberserum)
Gap26	Gap Junction Blocker 26

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial Fibrillary Acid Protein
GJIC	Gap Junction Intercellular Communication
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O _d	Aqua destillate
H ₂ O _{dd}	Reinstwasser
HCl	Salzsäure
HeLa-Zelle	<i>Henrietta Lacks</i> -Zelle
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	Horseradish Peroxidase
ICC	Immunzytochemie
IMP	Intramembranpartikel
K ⁺	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LBB	Labeling Blocking Buffer
LN ₂	Liquid Nitrogen
NGS	Normal Goat Serum
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
M.	Morbus
M	Molarität
mbar	Millibar
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger-RNA
MW	Molecular Weight
nm	Nanometer
NFAT5	Nuclear factor of activated T-cells 5

NO-Synthase	Stickstoffmonoxid-Synthase
O	Oligodendrozyt
O ₂	Sauerstoff
OGD-R	Oxygen/Glucose-Deprivation With Subsequent Reoxygenation
PBN	Probenecid
PBS	Phosphate-buffered saline
pCx	Phosphoryliertes Connexin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PG ₂	Prostaglandin ₂
pp60	Proto-Oncogene Protein 60 (Tyrosinkinase)
pS	Pico-Siemens
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaktion
rel.	relativ
RNA	Ribonucleic Acid
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RLT-Puffer	RNeasy Lysis Tissue Buffer
RNase	Ribonuklease
Rpm	Revolution per Minute
RT	Raumtempereatur
RW	Reinstwasser
S	Serin-Rest
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEM	Standard Error of Mean (Standardfehler)
siRNA	Small interfering RNA
SPB	Sörensen Phosphat-Puffer
Src-c	Genprodukt der Tyrosinkinase-Src (Rous Sarcoma/ Cellular)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline with Tween20
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	Tetramethylethylendiamin

TonEBP	Tonicity-responsive Enhancer Binding Protein
TPA	Tetradecanoyl-Phorbolacetat
TRIS	Tris/Hydroxymethylaminomethan
u. a.	unter anderem
VCT	Vacuum Cryo Transfer System
WB	Western Blot
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	Zona Occludens Protein-1

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Astrozyten.	4
Abb. 2: Aufbau, Morphologie und Zusammensetzung eines Gap Junction-Kanals.....	7
Abb. 3: Gap Junctions-Trafficking.....	9
Abb. 4: FRIL-Nomenklatur.	17
Abb. 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer astrozytären Cx43 Gap Junction.	18
Abb. 6: Zubehör für die FRIL-Technik.	36
Abb. 7: Schematischer Ablauf der FRIL-Technik.....	37
Abb. 8: Vorgehen bei der Auswertung des SL-/DT-Assays.	43
Abb. 9: Relative Expression von GFAP und AQP4 unter Kontrollbedingungen und Sucrose-Behandlung.....	44
Abb. 10: Darstellung der Expression von Cx43 und ZO-1 unter PBS- und Sucrose-Behandlung.....	45
Abb. 11: Hyperosmolare Sucroslösung bewirkte keine Veränderungen in der Signalintensität von panCx43.	46
Abb. 12: 5-minütige Stimulation mit Sucrose-Lösung bewirkt eine signifikante Zunahme von pCx43 S368.....	47
Abb. 13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gap Junctions nach PBS- und Sucrose-Stimulation.	49
Abb. 14: Riesen-Gap Junctions nach Sucrose-Stimulation.	50
Abb. 15: Partikelfreie Korridore und Grüppchenbildung in Gap Junctions der Sucrosegruppe.	51
Abb. 16: Darstellung der semiquantitativen Auswertung der FRIL-Bilder.	52
Abb. 17: Sucrose bewirkt eine Zunahme von Fläche und Umfang.	54
Abb. 18: Anzahl IMP/0,01µm ² nimmt unter Sucrose-Behandlung ab.	55
Abb. 19: Bestimmung der NND.	55
Abb. 20: Aufnahme der SL/DT Assays unter verschiedenen Versuchsbedingungen.	57
Abb. 21: Statistische Auswertung des SL/DTAssays.....	59

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.....	25
Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper	25
Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Primer	26
Tab. 4: Übersicht über die Zyklen und Temperaturprofile der PCR.....	32

Zusammenfassung

Astrozyten bilden im zentralen Nervensystem ein Stützgewebe, welches Schutz, Nährstoffversorgung sowie Aufrechterhaltung der biochemischen Gleichgewichte gewährleistet. In ihrer Gesamtheit bilden die Astrozyten einen komplexen, interagierenden Zellverband. Um diese herausragende Stellung wahrzunehmen, sind Astrozyten u. a. sowohl untereinander als auch mit anderen Zelltypen über Connexin 43-Gap Junctions verbunden, welche durch äußere Faktoren, wie osmotische Ungleichgewichte, beeinflusst werden können. Gleichzeitig ist bekannt, dass Connexin 43 auch in zahlreichen anderen pathologischen Prozessen, wie beispielsweise die Entstehung von Ödemen nach Schädelhirntraumata oder Schlaganfällen, involviert ist. Ultrastrukturell können Konfiguration und Morphologie der Gap Junctions mit Hilfe der *Freeze fracture-immunogold labeling*-Technik visualisiert werden, wodurch ihre Connexone elektronenmikroskopisch als Intramembranpartikel sichtbar werden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss hyperosmolarer Sucrose-Lösung auf Ultrastruktur und Funktion astrozytärer Connexin 43-Gap Junctions näher beleuchtet. Weiterhin wurden auch mögliche Folgen für die Expression der Proteine Aquaporin 4, saures Glia-Faser Protein und Zona Occludens-Protein-1 erarbeitet. Darüber hinaus wurde überprüft, ob die hyperosmolare Stimulation Veränderungen in der Phosphorylierung von Connexin 43 induziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden: Hyperosmolare Sucrose-Lösung führt zu einer Vergrößerung der Gap Junctions und innerhalb dieser zu einer Auflockerung der Partikelstruktur. Während die mRNA-Synthese von Aquaporin 4, saurem Glia-Faser Protein und Connexin 43 weitestgehend unverändert bleibt, konnte herausgearbeitet werden, dass die mRNA-Synthese von Zona Occludens-Protein-1 zunimmt. Gleichzeitig zeigten Immunoblots eine Zunahme der Phosphorylierung von Connexin 43 am Serin-Rest 368. Im *Scrape Loading/Dye Transfer Assay* führte eine kurzfristige Sucrose-Inkubation zu einer verminderten Farbstoffweitergabe, welche für eine Einschränkung der Gap Junction-Permeabilität und daher für eine Abnahme der Zellkommunikation über Gap Junctions spricht.

Connexin 43 scheint folglich bei der Reaktion von Astrozyten auf osmotische Stimuli, wie beispielsweise hyperosmolare Sucrose-Lösung, eine wesentliche Rolle zu spielen. Dabei scheint der Umverteilung der Connexone innerhalb der Gap Junctions eine besondere Rolle in der unmittelbaren Regulation zuzukommen.

Summary: Hyperosmolar sucrose solution induces ultrastructural changes of gap junctions in astrocytes

In the central nervous system, astrocytes form a specialized supporting tissue, which guarantees protection, nutrition and maintenance of the biochemical balance. Together, astrocytes are seen as a complex, interacting cell structure. In view of this outstanding position, astrocytes are coupled both among themselves and to other cell types by, among others, connexin 43-gap junctions, which can be changed subsequently to external influences like osmotic imbalance. Also, it's well known that connexin 43 plays a leading role in a large number of pathologic processes, for instance formation of brain edema after stroke or traumatic brain injury. Ultrastructure and morphology of gap junctions can be revealed by performing freeze fracture immunogold labeling, in which their connexons appear as intramembrane-particles.

This present dissertation examined effects of hyperosmolar Sucrose on ultrastructure and function of connexin 43-gap junctions in astrocytes. Furthermore, possible consequences for aquaporin 4, glial fibrillary acid protein and zonula occludens protein-1 expression were worked out. In addition, possible changes in phosphorylation-state of connexin 43 as a response on hyperosmolar Sucrose were investigated.

The results of this study can be summarized as follows: Hyperosmolar Sucrose-solution leads to an enlargement of the gap junctions and within these to a dispersal of the intramembrane-particles. There were no changes of mRNA-expression of glial fibrillary acid protein, connexin 43 and aquaporin 4, whereas a significant increase in zonula occludens protein-1 expression was detected. Additionally, immunoblots revealed an increase of phosphorylation of connexin 43 at the aminoacid site of Serin-rest 368. The scrape loading/dye transfer assay showed as a consequence of the incubation with hyperosmolar sucrose-solution a decrease of gap junction intercellular communication.

It seems that connexin 43 plays a crucial role in the reaction of astrocytes to osmotic changes and stimuli, as for example in case of incubation with hyperosmolar sucrose-solution. Here, it's possible, that the rearrangement of the connexons within the gap junction is a serious part of these regulation mechanisms.

1 Einleitung

Das Stützgewebe des zentralen Nervensystems (ZNS) wird von Gliazellen gebildet, welche eine anatomische und funktionelle Einheit bilden. Wesentlicher Bestandteil dieser Einheit sind Astrozyten, welche die Nervenzellen und ihre Myelinscheiden umgeben und stützen (Chung et al. 2015). Astrozyten dienen zum Schutz vor Verletzungen, Ischämien und ödematösen Schwellungen (Barres 2008). Des Weiteren regulieren sie den extrazellulären Volumengehalt und gewährleisten eine ausgeglichene Ionenhomöostase (Vasile et al. 2017). Astrozyten ist daher nicht nur unter physiologischen Bedingungen, sondern insbesondere bei pathologischen Veränderungen und krankhaften Zuständen des ZNS eine besondere Bedeutung zuzuschreiben (Sofroniew and Vinters (2010).

Um die Entstehung von neurologischen Krankheiten zu verstehen und Fortschritte in deren Prävention und Therapie zu erreichen, müssen zelluläre Funktionen, Prozesse und Signalwege untersucht werden (Barres 2008). Aus diesem Grund richtet sich in der neurobiologischen Forschung die Aufmerksamkeit auf Astrozyten sowie auf die mit diesen vergesellschafteten Zellen, Proteine und Signalwege. Interessant sind hierbei Zell-Zell-Kontakte, welche dem Austausch von Informationen mit dem umliegenden Extrazellulärraum bzw. anderen Zellen dienen. In Astrozyten bewerkstelligen diesen Austausch u. a. sogenannte Gap Junctions (Giaume and McCarthy 1996, Naus et al. 1999, Theis and Giaume 2012). Gap Junctions ermöglichen den Austausch von Wasser, Metaboliten und Ionen (Beyer and Berthoud 2018, Mathias et al. 2010, Theis and Giaume 2012) und tragen u. a. zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase bei (Muto et al. 2014). Über das Ausmaß der Beteiligung von astrozytären Gap Junction-Proteinen an der Wahrung und Regulation der osmotischen Gleichgewichte im ZNS ist zurzeit wenig bekannt. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von hyperosmolarer Sucrose-Lösung auf astrozytäre Gap Junctions untersucht. Im Mittelpunkt dieser Fragestellung standen die ultrastrukturellen Veränderungen, welche mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik erfasst werden konnten. Außerdem sollten der quantitative Nachweis von mRNA, Protein-Analysen mittels Immunoblot sowie die Analyse der interzellulären Kommunikation mittels Farbstoffweitergabe Aufschluss über die Auswirkungen von Sucrose-Lösung auf die Ultrastruktur der Gap Junctions geben.

1.1 Astrozyten

Astrozyten sind zahlenmäßig allen anderen Zellen im Nervensystem überlegen (Sofroniew and Vinters 2010, Wolf and Kirchhoff 2008). Namensgebend sind ihre in alle Richtungen zeigenden Ausläufer, welche Astrozyten das typische sternförmige Aussehen verleihen und für deren Funktionsweise unentbehrlich sind. Charakteristisch sind ihre spezifischen Intermediärfilamente, welche von dem sauren Glia-Faser Protein (GFAP) gebildet werden (Vasile et al. 2017). Astrozyten lassen sich in verschiedene Populationen unterteilen, welche dementsprechend auch über unterschiedlichen GFAP-Gehalt verfügen (Oberheim et al. 2009). Abb. 1 zeigt mittels GFAP-DAB-Färbung immunhistochemisch dargestellte Astrozyten.

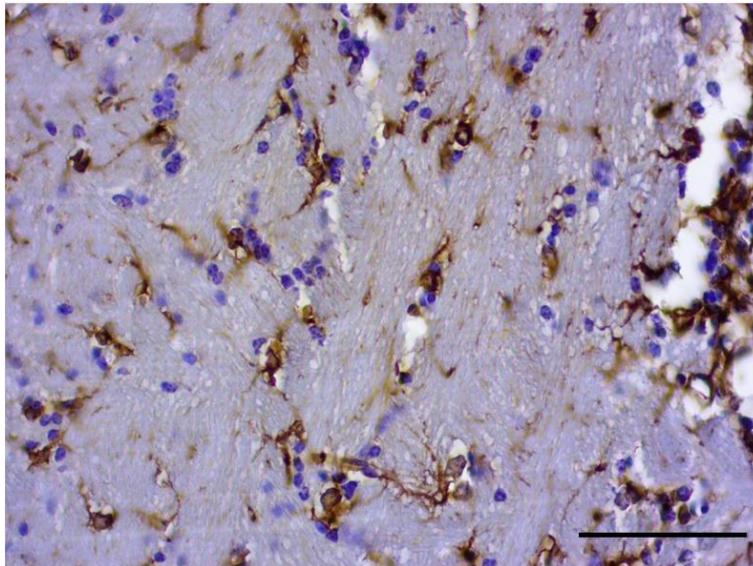


Abb. 1: Astrozyten. Mittels GFAP-DAB-Färbung dargestellte Astrozyten der Maus. Die Strecke des Maßstabes entspricht 60 μm .

Die Ausläufer der Astrozyten befinden sich um die Nervenzellen sowie deren Synapsen (Reichenbach et al. 2010), Axone und Blutgefäße herum und tragen dadurch zum Schutz sowie zum Aufbau der Blut-Hirn-Schranke (Giaume et al. 2007, Michinaga and Koyama 2019) bei. Astrozyten (A) sind sowohl untereinander als auch mit Oligodendrozyten (O) durch Zell-Kontakte, insbesondere durch Gap Junctions, verbunden (A/A-Gap Junctions, A/O-Gap Junctions). Dadurch entsteht eine anatomische und funktionelle Einheit, das gliale Synzytium. Innerhalb dieses Synzytiums ermöglichen Gap Junctions den Austausch von Nährstoffen, Ionen, *Second Messengers* und Neurotransmittern, aber auch von Toxinen und anderen Stoffen (Abrams Charles and Rash 2009, Lapato and Tiwari-Woodruff 2018, Vasile et al. 2017, Wolf and Kirchhoff 2008). Astrozyten sorgen für die Aufrechterhaltung der metabolischen Gleichgewichte im ZNS (Liddelow and Barres 2015, Verkhratsky and Nedergaard 2018), indem sie beispielsweise die durch Aktionspotentiale ansteigende K^+ -Konzentration der Extrazellulärflüssigkeit stetig ausgleichen (Abrams Charles and Rash 2009, Barres 2008, Giaume et al. 2007). Zusätzlich sind sie für die Reifung, Ausbildung und Elimination von Synapsen erforderlich

(Vasile et al. 2017). Demzufolge haben Astrozyten einen großen Stellenwert bei der synaptischen Regulation, Verknüpfung von neuronalen Signalen und Entwicklung kognitiver Funktionen (Barres 2008). Astrozyten sind folglich für ein gesundes ZNS und seine intakten Funktionen essenziell, verdeutlicht am Beispiel zahlreicher Erkrankungen (Nagy and Rash 2003, Sofroniew and Vinters 2010, Xing et al. 2019): Dysfunktionale Astrozyten sind an der Entstehung und Aufrechterhaltung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Hirntumoren aber auch an der Entstehung von Epilepsien verschiedener Genesen beteiligt (Vasile et al. 2017). Die meisten Studien zur Untersuchung und Beteiligung von Astrozyten im pathologischen Kontext wurden an Nagetieren durchgeführt. In einigen Punkten konnten spezifische Unterschiede zwischen den Astrozyten von Nagetieren und humanen Astrozyten hinsichtlich Morphologie, Genexpression, funktionellen Eigenschaften und Astrozyten-Nervenzellen-Verhältnis nachgewiesen werden (Vasile et al. 2017). Menschliche Astrozyten sind größer und strukturell komplexer als die von Nagetieren (Oberheim et al. 2009, Sofroniew and Vinters 2010). Trotzdem ähneln menschliche Astrozyten ihrem murinen Korrelat und teilen mit ihnen viele Gemeinsamkeiten. In der Neurobiologie sind daher Nagetier- bzw. Mausmodelle als geeignete Modelle für Pathologien und deren Erforschung anerkannt (Oberheim et al. 2009). Wie eingangs angesprochen, werden Astrozyten in verschiedene Populationen eingeteilt. Murine Astrozyten umfassen hierbei zwei verschiedene Astrozytenarten, menschliche Astrozyten weisen zusätzlich zwei weitere primatenspezifische Klassen auf (Oberheim et al. 2012). Die Astrozytenarten können jeweils spezifisch den kortikalen Schichten zugeordnet werden (Oberheim et al. 2009, Sofroniew and Vinters 2010). Sowohl Mäuse als auch Menschen besitzen protoplasmatische und fibröse Astrozyten. In höheren Primaten und Menschen gibt es außerdem interlaminäre sowie varikös projizierende Astrozyten. Interlaminäre, protoplasmatische und variköse Astrozyten stehen mit Synapsen oder Blutgefäßen in Kontakt (Oberheim et al. 2009, Sofroniew and Vinters 2010). Fibröse Astrozyten sind vorwiegend in der weißen Substanz zu finden und dienen zur Unterstützung der Axone der Nervenzellen (Vasile et al. 2017). Protoplasmatische Astrozyten, ihre Fortsätze und der sie umgebende Extrazellulärraum bilden anatomisch eigene Bezirke, sogenannte Domänen. Alle Perikaryen, Blutgefäße und Synapsen innerhalb einer Domäne stehen folglich mit den Fortsätzen dieses Astrozyten in Kontakt (Oberheim et al. 2009). Lediglich durch die Ausbildung von Gap Junctions und die Verknüpfung der Astrozyten untereinander überlappen sich diese Bereiche. Es wird daher vermutet, dass Astrozyten ihre regulatorische Funktion sehr organisiert wahrnehmen (Nagy and Rash 2003). Eine weitere Fähigkeit der Astrozyten im Rahmen der Antwort auf ZNS-Verletzungen und -Erkrankungen sind die Astrogliose und die damit einhergehende Narbenbildung. Hierbei handelt es sich um eine vermehrte Proliferation der Astrozyten. Bei schweren Verletzungen und Erkrankungen wie im Rahmen von Ischämien (Liddelow and Barres 2015, Sofroniew and Vinters 2010, Verkhratsky and Nedergaard 2018) reagieren Astrozyten mit starker Hypertrophie von Zellkörpern und Fortsätzen sowie vermehrter Expression von GFAP. Dadurch entstehen narbenartige Abgrenzungen, welche Entzündungszellen abwehren und somit eine Abgrenzung zu dem erkrankten Gewebe schaffen. Des Weiteren sezernieren

sie dichte Kollagenfasern in die extrazelluläre Matrix, wodurch axonale und zelluläre Migration verhindert wird. Diesen Mechanismen können zum einen neuroprotektive Funktionen zugeschrieben werden, zum anderen können sie zu einer Verschlechterung des Behandlungsergebnisses nach Verletzungen und Erkrankungen führen (Sofroniew and Vinters 2010). Demnach sind Astrozyten für die Aufrechterhaltung physiologischer Gleichgewichte und Zustände im ZNS unverzichtbar.

1.1.1 Connexine bilden Gap Junction-Kanäle

Gap Junction-Proteine sind porenbildende Transmembranproteine, die zwischen zwei benachbarten Zellen unmittelbar einen Zell-Zell-Kontakt ausbilden. Sie ermöglichen in verschiedensten Zellen den direkten Austausch von Wasser und kleinen Molekülen (Größe bis 1,2 kDa) mittels passiver Diffusion sowie die Weitergabe von Ionen, welche die Weiterleitung von elektrischen Impulsen in erregbare Zellen ermöglicht (Giaume et al. 2007, Schulz et al. 2015, Sohl and Willecke 2004, Valiunas et al. 2018). Abb. 2 zeigt schematisch die einzelnen Komponenten einer Gap Junction. Die ultrastrukturelle Einheit bilden zwei aneinander koppelnde Hemikanäle, die sogenannten Connexone. Ein Connexon wiederum besteht aus sechs Untereinheiten, den Connexinen. Diese Connexine reihen sich zirkulär aneinander, sodass in ihrem Zentrum eine Pore entsteht. Connexone zeigen sich im Gefrierbruch als 10 nm große Intramembranpartikel (IMP). Treffen Connexone von benachbarten Zellen aufeinander, entsteht ein langer Kanal, welcher beide Intrazellularräume miteinander verbindet und als Gap Junction bezeichnet wird (Sohl and Willecke 2004). Der daraus resultierende Stoffaustausch wird in der Literatur als *Gap junctional intercellular communication* (GJIC) beschrieben (Epifantseva and Shaw 2018).

Ein Connexin-Molekül enthält vier Transmembrandomänen; die dazwischenliegenden Proteinanteile formen zwei extrazellulär und eine intrazellulär gelegene Schleife. Sowohl N- als auch C-Terminus befinden sich innerhalb der Zelle. Die extrazellulären Schleifen werden jeweils durch drei Cystein-Reste stabilisiert. Diese Cystein-Reste spielen eine Rolle bei der Ausbildung des Gap Junction-Kanals, wobei zwischen den Cystein-Resten der aneinander dockenden Connexone Disulfid-Brücken ausgebildet werden (Sohl and Willecke 2004). Darüber hinaus sind für die Ausbildung funktionsfähiger Gap Junctions Wasserstoffbrückenbindungen notwendig, die jeweils zwischen den extrazellulären Schleifen ausgebildet werden (Gong et al. 2013). Der Abstand zwischen den über Gap Junctions verbundenen Zellmembranen beträgt ca. 3 nm (Beckmann et al. 2019b, Perkins et al. 1998). Damit die Zelle von dem Stoffaustausch möglichst profitieren kann, werden an der Stelle des Zell-Zell-Kontaktes bis zu 1000 Gap Junction-Kanäle zusammengelagert (Orthmann-Murphy et al. 2008). Es ergibt sich ein nahezu hexagonales Muster aus zahlreichen ausgebildeten Kanälen, welches als Gap Junction-Plaque beziehungsweise, im Allgemeinen, als Gap Junction bezeichnet wird (Kumar and Gilula 1996).

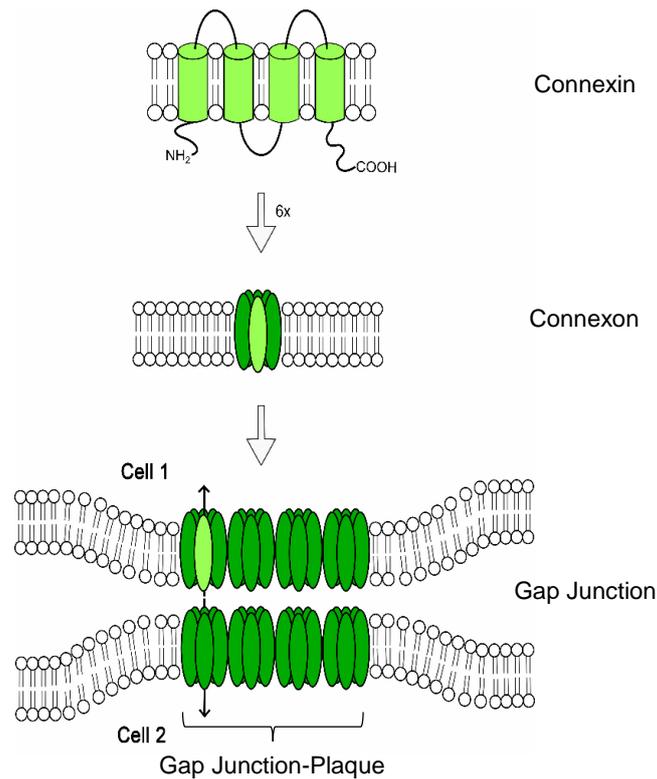


Abb. 2: Aufbau, Morphologie und Zusammensetzung eines Gap Junction-Kanals. Sechs Connexin-Moleküle lagern sich zu einem Hemikanal (Connexon) zusammen. Treffen zwei Connexone benachbarter Zellen aufeinander, bildet sich ein Gap Junction-Kanal. Eine Gap Junction(-Plaques) entsteht dort, wo mehrere Gap Junction-Kanäle zu einer großen Fläche aggregieren (Beckmann et al. 2019a).

In einem Astrozyten können bis zu 30.000 Gap Junctions gefunden werden, welche primär in der Zellmembran der astrozytären Fortsätze lokalisiert sind (Nagy and Rash 2003). Die mit Gap Junctions versehenen Fortsätze befinden sich an astrozytären Lamellen der synaptischen Neuronen-Endfüße, bilden Kontaktstellen mit Blutgefäßen und sind im Bereich Ranvier'scher Schnürringe myelinisierter Axone lokalisiert. Eine weitere Möglichkeit ist die Ausbildung von autologen Gap Junctions, welche die Fortsätze eines Astrozyten untereinander verbinden. Es wird angenommen, dass wahrscheinlich 75% der astrozytären Gap Junctions autologe Gap Junctions sind (Nagy and Rash 2003).

Das Molekulargewicht von Connexinen reicht von 25 kDa bis 62 kDa und wird in die Nomenklatur einbezogen. So hat Cx43 ein Molekulargewicht von ca. 43 kDa (Beyer et al. 1990, Kamasawa et al. 2006, Sohl and Willecke 2003). Alternativ können Connexine wie folgt benannt werden: Zunächst wird die Abkürzung „Gj“ für Gap Junction verwendet. An zweiter Stelle folgt, abhängig von Sequenzlänge bzw. Länge der zytoplasmatischen Domänen, der griechische Buchstabe für die drei Untergruppen α , β und γ . Zuletzt wird dem Connexin entsprechend der Reihenfolge der Entdeckung eine Nummer zugeordnet. Cx43 ist beispielsweise das erste Connexin aus der α -Gruppe und erhält folglich den Namen „Gja1“ (Sohl and Willecke 2003). In Wirbeltieren werden die verschiedenen Arten von Connexinen zell- und gewebsspezifisch exprimiert. Im Menschen sind bisher 21 Mitglieder der Connexin-Familie bekannt (Sohl and Willecke 2003, 2004).

Bei der Ausbildung eines Gap Junction-Kanals ist die Kombination verschiedener Connexin-Arten innerhalb eines Connexons möglich. Dadurch entstehen homomere und heteromere Hemikanäle. Ferner kann ein funktionsfähiger Gap Junction-Kanal von zwei gleichen oder unterschiedlichen Hemikanälen gebildet werden und wird dann als homotypisch oder heterotypisch bezeichnet (Mese et al. 2007). Dennoch können nicht alle Connexine miteinander interagieren. Cx26 kann beispielsweise lediglich mit Cx30 und Cx32 kombiniert werden, während dies mit Cx40 nicht möglich ist. Die Verknüpfung verschiedener Connexin-Isoformen und die daraus resultierende Vielfalt an verschiedenen Gap Junctions ermöglicht der Zelle auf unterschiedliche Art und Weise mit der Umwelt und anderen Zellen in Kontakt zu stehen (Mese et al. 2007).

Der am häufigsten exprimierte Vertreter der Connexin-Familie ist Cx43, welches vorwiegend im Herzen und im menschlichen Gehirn eine Rolle spielt (Epifantseva and Shaw 2018, Falk et al. 2016). Im ZNS ist Cx43 in der grauen Substanz stärker verbreitet als in der weißen Substanz (Abrams Charles and Rash 2009, Oberheim et al. 2012). Astrozyten exprimieren Cx43, Cx30 sowie Cx26 und sind untereinander mittels Cx30- und Cx26-Gap Junctions, sowie durch Cx30- und Cx43-Gap Junctions verbunden (Nagy and Rash 2003). Kultivierte Astrozyten nutzen vorwiegend Cx43, während die Expression von Cx30 und Cx26 herunterreguliert wird, sodass deren Bedeutung *in vitro* vernachlässigt werden kann. Die Expression von Cx43 wird sowohl von Alter und Geschlecht aber auch von pathologischen Zuständen wie Hypertension, Hypertrophie, Diabetes mellitus und ischämischen Zuständen beeinflusst. In diesem Zusammenhang wird Cx43 bei zerebralen Ischämien, Reperfusion und deren Abschwächung besondere Bedeutung beigemessen (Giaume et al. 2007, Schulz et al. 2015). In den vergangenen Jahren konnten darüber hinaus vermehrt Mutationen in Connexin-Genen und ihre Verknüpfung mit verschiedenen Krankheiten identifiziert werden. Gendefekte im Cx43-Gen führen zu der Erkrankung Oculodentodigitale Dysplasie (ODDD) und können auch mit dem Hallermann-Streiff-Syndrom assoziiert sein (Kelly et al. 2016). Das Krankheitsbild der ODDD ist sehr variabel und u. a. von oculofazialen Dysmorphien, Hypoplasie des Zahnschmelzes und neurologischen Auffälligkeiten geprägt (Abrams C. K. and Scherer 2012, Kelly et al. 2016).

Connexine und die daraus entstehenden Gap Junctions bilden folglich hochspezifische Membranstrukturen, welche Zellen innerhalb eines Gewebeverbandes elektrisch und biochemisch miteinander koppeln. Dadurch sichern sie die Aufrechterhaltung der Gewebe-Integrität und Organ-Homöostase (Mese et al. 2007).

1.1.2 Gap Junction-Trafficking

Gap Junctions sind keine konstanten Strukturen, sondern unterliegen einem stetigen Prozess von Auf- und Abbau, welcher als *Gap Junction-Trafficking* bezeichnet wird (Epifantseva and Shaw 2018, Nielsen et al. 2012). Dieser Lebenszyklus reguliert die Anzahl der Gap Junction-Kanäle, wodurch der Zelle eine Anpassung an äußere Einflüsse möglich ist. Auf die dazugehörigen Schritte und zellulären Abläufe wird im Folgenden näher eingegangen. Diese erklären auch die geringe Halbwertszeit der Gap Junctions von ca. ein bis fünf Stunden (Beardslee et al. 1998, Epifantseva and Shaw 2018, Nielsen et al. 2012).

Gap Junction-Trafficking ist unentbehrlich für die Aufrechterhaltung der Zellstruktur und interzellulären Kommunikation (Falk et al. 2016, Johnson et al. 2012). Abb. 3: Gap Junctions-Trafficking. zeigt schematisch den Aufbau von Connexin-Molekülen bis zur Entstehung einer Gap Junction-Plaue sowie deren Abbau.

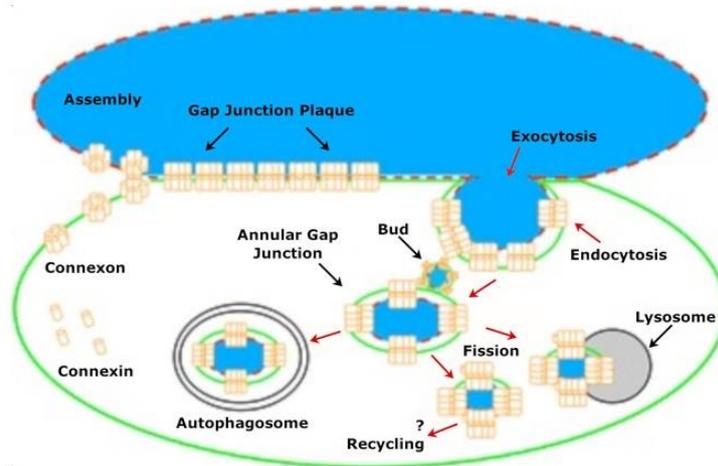


Abb. 3: Gap Junctions-Trafficking. Gap Junction-Trafficking beschreibt den Aufbau einer Gap Junction aus einzelnen Connexin-Molekülen bis zur Gap Junction-Plaue. Zum Abbau werden einzelne Gap Junction-Kanäle internalisiert und endolysosomal oder phagosomal abgebaut. Im Rahmen des Abbaus können diese auch möglicherweise „recyclt“ und wiederverwendet werden (Falk, et al., 2016).

Neu synthetisierte Connexin-Moleküle werden co-translational, umhüllt vom Coat Protein Complex II (COPII), zum endoplasmatischen Retikulum transportiert, wo Disulfid-Brücken ausgebildet werden (Epifantseva and Shaw 2018). Zum Schutz vor verfrühtem Abbau oder verfrühter ZO-1-Bindung werden die Connexine der sich aufbauenden Gap Junctions am Serin-Rest 372 des C-Terminus phosphoryliert (S372). Die daraus gebildeten Connexone fungieren im Verlauf vermutlich nur als Hemikanäle (Falk et al. 2016). Beim Verlassen des rauen endoplasmatischen Retikulums Richtung Trans-Netzwerk des Golgi-Apparates kommt es zur bereits beschriebenen Oligomerisierung der Connexin-Proteine zum Connexon (Hemikanal) (Epifantseva and Shaw 2018). Als Vesikel verpackt werden sie mit Hilfe von Mikrotubuli und Aktin zur Plasma-Membran transportiert. Dieser Transport zur Zellmembran wird durch Ca^{2+} -abhängige Adhäsions-Moleküle, wie beispielsweise E-Cadherin, unterstützt und wird als *Targeted Delivery* bezeichnet (Epifantseva and Shaw 2018). Kommen die Zellmembranen zweier Zellen aneinander zu liegen, bilden sich Gap Junction-Kanäle. Bei der Verbindung zweier Hemikanäle zu einer Gap Junction spielen nichtkovalente Kräfte eine Rolle (Laird 1996). Wie genau sich die Hemikanäle finden, konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Die Aggregation zahlreicher Gap Junction-Kanäle (von einigen wenigen Kanälen bis hin zu 1000 Gap Junction-Kanälen) (Aasen et al. 2018, Schulz et al. 2015) führt zur Formierung einer Gap Junction-Plaue, wodurch die gekoppelten Zellen ihren Austausch und Kommunikationsgrad optimieren können. Die Ausdehnung der Plaues ist unterschiedlich; in Leberzellen konnten Gap Junctions mit einer Fläche von über $1 \mu m$ beschrieben werden (Kojima et al. 1996). Hemikanäle,

die teils als Vorläufer der Gap Junction-Kanäle angesehen werden, weisen auch im nicht gekoppelten Zustand Fähigkeiten zum Molekülaustausch mit dem Extrazellulärraum auf. Verschiedene äußere Reize wie Depolarisation, niedrige extrazelluläre und hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen sowie Veränderungen von Phosphorylierungsmustern und Redoxpotentialen können die Hemikanäle öffnen und ermöglichen somit eine unmittelbare Reaktion der Zelle auf veränderte Umweltbedingungen. Diese Eigenschaften lassen darauf zurückschließen, dass Hemikanäle vor allem bei pathologischen Prozessen durch Na^+ - und Ca^{2+} -Einstrom, K^+ -Ausstrom sowie Verschiebungen von ATP und anderen Metaboliten zu Zellschwellung und Zelltod führen (Schulz et al. 2015).

Wenn Gap Junctions altern, schließen sich ihre Kanäle permanent. Zur Degradation der Gap Junction werden die einzelnen Gap Junction-Kanäle mitsamt den dazugehörigen Zellmembranen internalisiert, in eine der beiden Zellen aufgenommen und möglicherweise unter Ausbildung einer ringförmigen Struktur, der *Annular Gap Junction* (AGJ), in Fragmente gespalten und endolysosomal oder phagosomal abgebaut (Falk et al. 2016). Hemikanäle werden ebenfalls endozytotisch aufgenommen, bevor diese mittels lysosomaler, proteasomaler oder autophagosomaler Degradation abgebaut werden (Epifantseva and Shaw 2018). Als Auslöser für die Bildung von *Annular Gap Junctions* ließen sich Zellwachstum und -migration aber auch Toxine, Tumore, ischämische Zustände und Wundheilungsprozesse identifizieren (Defranco et al. 2008, Falk et al. 2016). Daraus lässt sich folgern, dass *Gap Junction Trafficking* auch Auswirkungen auf die Morphologie der Gap Junction-Plaques hat. Neu synthetisierte Gap Junction-Kanäle finden in der äußeren Peripherie Anschluss an die Plaque, während im Zentrum der Plaque alte Gap Junction-Kanäle abgebaut werden (Gaietta et al. 2002).

Die Internalisierung wird von zahlreichen biochemischen Prozessen reguliert, von denen bereits einige identifiziert werden konnten. Eine zentrale Stellung nimmt hierbei der C-Terminus der Connexin-Moleküle ein (Epifantseva and Shaw 2018, Falk et al. 2016, Johnson et al. 2012). Hierbei stehen vor allem das Protein Clathrin und mit ihm assoziierte Proteine, sogenannte *Clathrin associated sorting proteins* (CLASPs), als Auslöser im Vordergrund. Damit CLASPs und Connexine interagieren können, sind Modifikationen der Connexin-Proteine notwendig. Dazu zählen die Phosphorylierung, Ubiquitinierung und ZO-1-Bindung (Falk et al. 2016, Kells-Andrews et al. 2018, Thevenin et al. 2017). Bisher konnten 22 Serin-Reste, vier Threonin-Reste und fünf Tyrosin-Reste am C-terminalen Ende von Cx43-Molekülen als mögliche Zielstrukturen von Phosphorylierungen identifiziert werden (Epifantseva and Shaw 2018): Protein-Kinase C (PKC), Mitogen-aktive-Protein-Kinase (MAPK) und Cell-Cycle-dependent Kinase (CDC2) phosphorylieren Serin-Reste von Connexinen. Tyrosin-Reste können dagegen durch die Tyrosinkinase Src-c phosphoryliert werden (Falk et al. 2016). Darüber hinaus konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass MAPK- und Protein-Kinase C- assoziierte Phosphorylierungen zur Rekrutierung von Clathrin und folglich zur Endozytose der Gap Junctions führen. Neben den Serin-Resten S255, S262, S279 und S282 konnte auch der Serin-Rest S368 als Zielstruktur der Phosphorylierungen in Cx43 identifiziert werden (Nimlamool et al. 2015).

Wesentliche Voraussetzungen für Internalisierung von Gap Junctions und Unterdrückung von GJIC sind somit verschiedene Phosphorylierungsmuster von Cx43. ZO-1 hingegen reguliert sowohl den Einbau bzw. die Ausbildung neuer Gap Junction-Kanäle als auch Abbau und Internalisierung. Die letzten vier Aminosäure-Reste von Cx43 koppeln über die PDZ-2- (*post synaptic density protein* (PSD)95, *Drosophila disc large tumor suppressor* (Dlg1), and *zonula occludens-1 protein* (ZO-1)) Domäne von ZO-1 an das Protein (Falk et al. 2016, Kennedy 1995). Bei dieser PDZ-Domäne handelt es sich um einen ca. 80 bis 90 Aminosäuren-langen Abschnitt von ZO-1, welcher an den C-terminalen Rest von bestimmten Zielproteinen bindet (Thevenin et al. 2013). Darüber hinaus zeigten Rhett et al., dass Cx43-Hemikanäle an ZO-1 binden, bevor sie an Connexone benachbarter Zellen Anschluss finden. Außerdem bindet ZO-1 nur in der Peripherie (Perinexus) der Plaque an Hemikanäle (Rhett et al. 2011). Falk und Murray postulierten daraus folgende Hypothese: Verfrühte Bindung von ZO-1 kann durch die zuvor erfolgte Phosphorylierung von S272 im Perinexus bzw. von S273 während der Sekretion verhindert werden; jene Kanäle agieren dann als Hemikanäle. Die Dephosphorylierung hingegen erlaubt ZO-1-Bindung, sodass die Connexone sich im Perinexus der Gap Junction sammeln und Kanäle ausbilden. Geht im Rahmen des Alterungsprozesses die Funktionalität der Gap Junctions verloren, kommt es zur Dephosphorylierung von S365, welche eine Phosphorylierung von S368 initiiert und ZO-1 verlässt den Plaque-Verband. Die Konformationsveränderung, die durch diese Dephosphorylierung hervorgerufen wird, erlaubt die Bindung von Ubiquitin und folglich die Bindung von Clathrin, CLASPs und die Einleitung der Degradation (Falk et al. 2016). Die Modifikationen, welche beim Auf- und Abbau einer Gap Junction notwendig sind, bestehen folglich vor allem aus einem Zusammenspiel von Phospho-Kinasen und ZO-1.

Als bisher wichtigster Regulationsmechanismus der Expression von Cx43 steht daher die Phosphorylierung im Vordergrund. Im physiologischen Zustand kann Cx43 durch Wachstumsfaktoren und andere Stimuli an C-terminalen Aminosäureresten phosphoryliert werden (Solan and Lampe 2009). Sowohl die Lokalisation als auch Phosphorylierungsstatus werden gravierend durch Ischämien und Verletzung beeinflusst, was auf Veränderungen im ATP-Gehalt der Zelle zurückzuführen ist (Axelsen et al. 2006). Dunn und Lampe zeigten in murinen Herzen, dass eine Unterbrechung der Blutzufuhr zu Phosphorylierungen führt, welche eine ausgeprägte Größenzunahme der Gap Junctions und im Anschluss deren Internalisierung bewirken (Dunn and Lampe 2014).

Zusammenfassend können Gap Junctions verschiedene Funktionen zugeordnet werden. Unter pathologischen Bedingungen könnten sie auf der einen Seite zur Ausbreitung von Zellschäden und Zelltod beitragen. Andererseits werden ihnen protektive Eigenschaften zugeschrieben, indem sie beispielsweise weitere Zellschäden in ihrer Nachbarschaft verhindern. Zerebrale Ischämien führen zu einer Abnahme der GJIC (Schulz et al. 2015). Ob diese Veränderungen auch unter osmotischem Stress auftreten, soll im Rahmen dieser Arbeit näher beleuchtet werden.

1.1.3 Intermediärfilamente und Membranproteine von Astrozyten

Zonula Occludens Protein-1

Zonula Occludens Protein-1 (ZO-1) stellt einen wichtigen Bestandteil der Zonulae occludentes, sogenannter Tight Junctions, dar. Hierbei handelt es sich um einen sehr engen, mittels verschiedener Proteine gebildeten verschließenden Zell-Zell-Kontakt, der verhindert, dass extrazelluläre Komponenten zwischen benachbarte Zellen gelangen. Neben ZO-1 sind verschiedene Isoformen der Membranproteine Claudin, Occludin und weitere assoziierte Proteine an deren Aufbau beteiligt (Van Itallie and Anderson 2014, Zihni et al. 2016). Sehr häufig befinden sich Tight Junctions an der zytoplasmatischen Oberfläche epithelialer und endothelialer Zellen, wo sie die Diffusionsbarriere verstärken. Über Adapterproteine sind die Membranproteine mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbunden, wodurch eine strukturelle und funktionelle Einheit entsteht (Zihni et al. 2016).

ZO-1 ist hierbei als hochmolekulares Phosphoprotein bekannt, welches im ZNS u. a. an der Ausbildung von Tight Junctions in den endothelialen Zellen der Blut-Hirn-Schranke beteiligt ist. Zudem ist es in Oligodendrozyten, neuroepithelialen Zellen sowie in Astrozyten als zytoskelettales Protein zu finden. Somit ist ZO-1 sowohl an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt als auch im Zytoplasma zu finden (Howarth et al. 1992, Penes et al. 2005). ZO-1 ist des Weiteren in der Lage, mit dem C-Terminus von Cx43 zu interagieren (Giepmans 2004), wodurch im Rahmen des Gap Junction-Trafficking die Größe der Gap Junction reguliert werden kann (Rhett et al. 2011).

Glial fibrillary acid protein (saures Glia-Faser Protein)

Intermediärfilamente sind wichtige Bestandteile des Zytoskeletts einer Zelle, denn sie stabilisieren mechanisch die Plasmamembran und geben der Zelle Form (Middeldorp and Hol 2011). Das saure Glia-Faser Protein (GFAP) ist der wichtigste und häufigste Vertreter von Intermediärfilamenten in Astrozyten, weshalb es sich als spezifischer immunhistochemischer Astrozytenmarker eignet (Li et al. 2019, Liedtke et al. 1996, Sofroniew and Vinters 2010). Neben GFAP werden auch Vimentin und Synemin als Intermediärfilamente in Astrozyten beschrieben. Die Funktionen von GFAP umfassen Wahrung der Zellintegrität, Regeneration und synaptische Plastizität. Außerdem ist es funktionell bedeutsam für die Ausbildung einer reaktiven Gliose. Darüber hinaus ist GFAP an der Zell-Migration und -Motilität, an der Verankerung verschiedener Transport-Proteine in der Zellmembran sowie an der Mitose beteiligt (Middeldorp and Hol 2011). Astrozyten exprimieren im Menschen zehn Isoformen von GFAP (Hol and Pekny 2015), wobei diese teilweise spezifisch für die einzelnen Astrozyten-Subtypen sind (Bignami et al. 1972, Hol and Pekny 2015, Middeldorp and Hol 2011).

Aquaporine

Aquaporine (AQP) sind wasserdurchlässige, porenförmige Transmembranproteine, welche in zahlreichen Lebewesen vorkommen und in die Regulation des Wasserhaushaltes involviert sind. Wasser passiert die semipermeable Zellmembran von Zellen durch Aquaporin-Kanäle schneller als durch

einfache Diffusion (Arima et al. 2003). Die Transmembranproteine bestehen aus sechs Transmembrandomänen, welche durch fünf Schleifen miteinander verknüpft sind. Sowohl C- als auch N-Terminus befinden sich innerhalb der Zelle. Vier AQP-Monomere lagern sich zu einem Tetramer mit jeweils vier Wasserporen zusammen. Die Expression der Aquaporine wird durch Faktoren wie Vasopressin, Hypoxie, Wachstumsfaktoren, Vitamin A oder auch durch hyperosmolaren Stress beeinflusst (Arima et al. 2003). Gegenwärtig sind 13 AQP-Isoformen bekannt, AQP0 bis 12, welche anhand ihrer Eigenschaften in drei Gruppen unterteilt werden (Clement et al. 2020). AQP4 und AQP9 werden im ZNS ausschließlich in Astrozyten exprimiert, jedoch nicht in Nervenzellen, Oligodendrozyten oder Mikroglia (Arima et al. 2003). AQP4 und AQP9 sind vor allem in den Astrozyten-Fortsätzen weit verbreitet. AQP4 ist unter den Aquaporinen im ZNS das am häufigsten exprimierte Aquaporin (Manley et al. 2004). Insbesondere an Fortsätzen, die Blutgefäße umgeben und mit diesen in Kontakt stehen, sowie unter der pialen Oberfläche ist die Expression von AQP4 sehr ausgeprägt (Manley et al. 2004, Papadopoulos et al. 2002). Daneben gibt es im ZNS noch AQP1, welches in den Epithelien der Plexus choroideus exprimiert wird (Manley et al. 2004). Somit spielen Aquaporine eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Wasser- und Ionenhomöostase im Gehirn. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass es bei einer Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke, Verletzungen des Gehirns oder Hirnschwellung zu einer Zunahme der Expression von AQP1, AQP4 und AQP9 kommt (Arima et al. 2003, Papadopoulos et al. 2002). AQP4 wird dabei im verletzten Gehirn in der akuten Phase in den ersten 48 Stunden weniger stark exprimiert. In der späten Phase, ab dem dritten Tag, folgt dann eine starke Zunahme der Expression. Die Abnahme in den ersten Tagen wird dabei als endogen protektiver Mechanismus angesehen, welcher dazu dient, gliale Wasseransammlungen sowie Zellschwellungen zu verhindern (Ke et al. 2001). Der späte Anstieg von AQP4 wiederum wird als maladaptiver Mechanismus gedeutet (Papadopoulos et al. 2002). Im Bezug auf das Gap Junction-Protein Cx43 gibt es darüber hinaus Hinweise, dass AQP4 mit diesem funktionell interagiert. Vermutlich kommt es im Rahmen dieser Regulationsmechanismen auch zu Veränderungen des Zytoskeletts (Nicchia et al. 2005). Aquaporine können als Transmembranproteine ebenfalls mit Hilfe der FRIL-Technik elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden und zeigen sich dann als sogenannte *Square arrays* oder *Orthogonal arrays of intramembranous particles* (OAP). Die Bezeichnung beruht darauf, dass sich eine Vielzahl von Aquaporin-Proteinen in einem Muster anordnen, welches elektronenmikroskopisch als quadratisches Gitter erscheint (Rash et al. 2004, Wolburg et al. 2011).

1.1.4 Osmotisch wirksame Substanzen und Sucrose

Im menschlichen Körper bilden Zellen eigene Kompartimente, welche von ihrer Umgebung durch die Zellmembranen abgegrenzt sind. Grundlage der biochemischen Gleichgewichte ist hierbei ein ausgeglichener stetiger Stofftransport, die zelluläre Homöostase. Dieser Steady-State wird durch Diffusion, Osmose und verschiedene Stofftransporte aufrechterhalten (Dubyak 2004). Diffusion ist die gleichmäßige Verteilung von Atomen, Ionen und Molekülen und folglich auch Stoffgemischen, welche auf der thermischen Bewegung von Teilchen beruht. Als hyperosmotische oder hyperosmolare

Substanzen werden Stoffe bezeichnet, welche in einem Medium eine höhere Konzentration aufweisen, als innerhalb eines Kompartimentes oder einer lebenden Zelle (Olins et al. 2020). Konzentrationsunterschiede von löslichen Partikeln bzw. von osmotisch wirksamen Substanzen, welche durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt sind, haben ein Nachströmen von Wasser zur Folge. Hierbei strömt Wasser vom Ort niedriger Konzentration entlang des Konzentrationsgradienten zum Ort der höheren Konzentration. Dieser Prozess wird als Osmose bezeichnet. Der Austausch von Wasser ist in Organismen, deren Intrazellularraum von semipermeablen Membranen abgegrenzt wird, fundamentale Grundlage für alle biologischen Prozesse. Wasser passiert die Lipiddoppelmembranen mittels einfacher Diffusion oder mit Hilfe von bestimmten Kanälen (MacAulay and Zeuthen 2010). Letzteres gewährleisten im ZNS die spezifisch für Wasser permeablen Aquaporine zwischen den einzelnen Nervenzellen, Astrozyten und anderen Zellen bzw. den verschiedenen ZNS-Kompartimenten (Kimmelberg 2004). Zusätzlich werden Co-Transporter als passiver Transport-Mechanismus beschrieben, wobei Wasser entlang oder entgegen eines osmotischen Gradienten parallel zu anderen Substanzen transportiert wird (MacAulay and Zeuthen 2010).

Beim Transport von Molekülen über die Zellmembran unterscheidet man passiven und aktiven Transport. Bei der passiven Diffusion überwinden Moleküle die Zellmembran mit Hilfe spezifischer Carrier entlang eines Konzentrationsgradienten. Aktiver Transport hingegen bezeichnet den Transport von Molekülen entgegen eines Konzentrationsgradienten, welcher aufgrunddessen nur unter Energieverbrauch stattfinden kann (Chen and Lui 2020).

Ist eine Zelle einem hypertonem Umgebungsmilieu ausgesetzt, so reagiert diese mit osmotischem Wasserausstrom, welcher wiederum zu einer Abnahme des intrazellulären Volumens führt und eine Zunahme der Konzentration intrazellulärer Substanzen bewirkt. Die Zelle muss diesem Ungleichgewicht entgegenwirken, damit biologische Funktionen aufrechterhalten werden können. Gleichzeitig kann dies auch den Funktionsstatus einer Zelle beeinflussen. Diese unphysiologischen Bedingungen können auf der Ebene von Zellen als osmotischer Stress bezeichnet werden. Osmotischer Stress kann im Verlauf pleiotrope Effekte auslösen, wie beispielsweise Unterbrechung in Zellwachstum und -proliferation, Induktion von oxidativem Stress, Polysom-Disaggregation sowie Einleitung der Apoptose (Alfieri and Petronini 2007, Ho 2006). Im physiologischen Zustand kann es ebenso zu hyperosmotischen Verhältnissen kommen. Im ZNS entstehen diese beispielsweise im Rahmen von neuronalen Aktionspotentialen, welche einen Anstieg der extrazellulären K^+ -Konzentration zur Folge haben. Würde diesem Ungleichgewicht nicht entgegengewirkt werden, so hätte die erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration eine Inaktivierung der neuronalen Aktivität zur Folge, da keine neuen Aktionspotentiale gebildet werden können. Diesen K^+ -Bewegungen wirken Astrozyten entgegen, indem sie mittels verschiedener Kanäle die K^+ -Konzentration wieder ausgleichen und dadurch die physiologische Ionenverteilung wiederherstellen (Dietzel et al. 1989).

Phosphate buffered saline (PBS), eine in den Naturwissenschaften etablierte Pufferlösung, ist isoosmotisch und führt zu keinen Konzentrationsveränderungen. Werden Zellen hingegen

Sucrose-Lösung ausgesetzt, so herrscht extrazellulär ein höherer osmotischer Druck und die Zelle ist letztendlich osmotischem Stress ausgesetzt (Olins et al. 2020).

1.2 Darstellung von biologischen Membranen durch die Gefrierbruchtechnik

Die Gefrierbruchtechnik und ihre Weiterentwicklungen sind seit über 60 Jahren in der Zellbiologie etabliert und ermöglichen genaue elektronenmikroskopische Untersuchungen durch ultrastrukturelle Erfassung der Zellmembranen. Gap Junctions können beispielsweise bis auf die Ebene der Connexone dargestellt werden; mit einem gewöhnlichen Lichtmikroskop ist dies nicht möglich (Meier and Beckmann 2018). Alternativ ermöglichen die Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy*) sowie die interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (*Total internal reflection microscopy*) bzw. deren Kombination das direkte Verfolgen von Molekülströmen durch die Kanäle (Ramachandran et al. 2014). Allerdings verfügen diese über ein geringeres Auflösungsvermögen. Zudem können sie die dreidimensionale Darstellung der Membran und assoziierte Strukturen nicht so präzise darstellen, wie die Gefrierbruchtechnik.

Grundlage der Gefrierbruchtechnik ist, dass biologische Membranen im gefrorenen Zustand an den hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der inneren Membran eine Schwachstelle haben. So werden die Lipid-Doppelmembranen an dieser Stelle in ihrer Mitte zwischen den Enden der Kohlenwasserstoffketten beim Gefrierbruch aufgebrochen. Folglich bleiben die Membranen als große Flächen zurück. Zur Visualisierung im Elektronenmikroskop werden die Membranen mit einem Kohle-Platin-Film beschichtet (Severs 2007). In einer Weiterentwicklung der Gefrierbruchtechnik, dem *Freeze-fracture Replica Immunogold Labeling* (FRIL), werden Membranproteine nach einem Gewebe-Verdau mit Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) in dem Platin/Kohle-Abdruck bzw. der Replika durch die Markierung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (*Immunolabeling*) (Fujimoto 1995).

1961 wurde die Idee der Gefrierbruchtechnik erstmals von Hans Moor et al. eingeführt, um die Zugänglichkeit von biologischen Proben für elektronenmikroskopische Untersuchungen zu vereinfachen und zu verbessern. Dies erreichte er mit Hilfe der Entwicklung der Balzer's *Freeze Fracture Machine* auf Grundlage des Vorwissens von Steere et al. (1957) über die Gefrierätztechnik. Seine Apparatur vereinte ein Ultramikrotom mit einer Gefrietrocknungs- und Beschattungsanlage in einem Vakuum-Behälter (Heuser 2011, Moor et al. 1961). Im Laufe der Zeit wurde die Technik weiterentwickelt, Protokolle ergänzt und in Bezug auf verschiedene Aspekte (u. a. Vakuum, Objektischkühlung) verbessert (Severs 2007). Jahre später zeigten Pinto da Silva et al., dass Bestandteile von mittels Gefrierbruch aufbereiteten Zellmembranen zytochemisch markiert und dargestellt werden können (da Silva et al. 1981). Diese Errungenschaft erleichterte die elektronenmikroskopische Suche nach verschiedenen Membranbestandteilen und deren Identifikation. 1995 gelang K. Fujimoto ein weiterer Durchbruch bei der spezifischen Markierung von

Membranproteinen in Gefrierbrüchen. Er etablierte den Verdau der Replika mit SDS, wodurch überschüssiges Gewebe unter der Replika entfernt wurde, sodass die an den Kohle-Film gebundenen Membranbestandteile für spezifisches Labeling mit Primär- und Sekundäntikörpern verfügbar wurden. Durch Koppelung der Sekundäntikörper an kolloidale Gold-Partikel können diese aufgrund ihrer hohen Dichte elektronenmikroskopisch leicht erfasst werden (Fujimoto 1995). Die Möglichkeit, größere Gewebeflächen zu untersuchen, erreichten Rash et al., als sie die replizierten Membranen mit gelöstem Polykarbonat-Plastik (Lexan in Dichlorethan (DCE) gelöst) an einem Gold-Finder-Netz (Gold-Grid) fixierten. Grundlage hierfür lieferten die Erkenntnisse von Steere und Erbe, welche bereits 1983 versuchten, die Membranen mittels Lexan zu stabilisieren (Steere and Erbe 1983). Dadurch konnten von diesem Zeitpunkt an Membranen und Gewebe mit einer Größe von ca. 3 mm, was dem Durchmesser eines Gold-Netzes für die Elektronenmikroskopie entspricht, repliziert werden. Gleichzeitig erlaubt dies, die zugehörigen Replikas an einem Stück zu labeln. Nach dem Abdampfen des DCE bleiben verfestigte Replikas zurück. Diese sind um einiges widerstandsfähiger als die dünnen Kohle/Platin-Replikas allein, die bei weiterer Handhabung leicht auseinanderbrachen (Rash et al. 1997). Die FRIL-Technik visualisiert die Membranflächen mit ihren Komponenten und Proteinen, wie es mit keiner anderen Technik möglich ist. Intramembranproteine werden als sogenannte Intramembran-Partikel (IMP) dargestellt (Robenek and Severs 2008). Die FRIL-Technik kann außerdem für die elektronenmikroskopische Darstellung von Gewebeschnitten und Zellkulturen angewendet werden und bietet großes Potential in der Analyse von genetisch modifizierten Zellen (Meier and Beckmann 2018). Auf diese Weise konnten bereits Tight Junctions, Gap Junctions, Aquaporine und Calveolae näher untersucht werden (Meier and Beckmann 2018). Mit Hinblick auf die Analyse von Zellkontakten und Gap Junctions lassen sich hochauflösende Bilder und Ergebnisse mit Hilfe der FRIL-Technik reproduzieren. Aus diesem Grund fokussiert sich der Hauptteil dieser Arbeit, bei der Suche nach ultrastrukturellen Veränderungen, auf die Analyse von mittels FRIL-Technik visualisierten astrozytären Gap Junctions.

1.2.1 Nomenklatur

Abb. 4 veranschaulicht exemplarisch die Nomenklatur für mittels FRIL-Technik visualisierte Membranen. Die Zellmembranen zweier Zellen, welche durch Gap Junctions verbunden sind, wurden durch den Gefrierbruch aufgetrennt (hier nicht dargestellt). Die Bruchlinie verläuft stets innerhalb der Doppelmembranen an den Enden der Kohlenwasserstoffketten bzw. im Fall der Gap Junctions zwischen den beiden gegenüberliegenden Connexonen. Zellmaterial jenseits der Bruchfläche wird nicht abgebildet. Der Anteil der Doppelmembran, welcher dem Zytoplasma (Protoplasma) anliegt, wird als P-Hälfte bezeichnet. Das Gegenstück, welches an den Extrazellulärraum angrenzt, ist als E-Hälfte definiert. Wird in Folge des Bruchverlaufs durch die Zellmembran die P-Hälfte der Membran repliziert, bleiben Connexone dementsprechend als kleine Hügel zurück, welche als Partikel bezeichnet werden und immer auf der P-Seite (*P-face*) der Membran zu finden sind (vgl. Abb. 4). Verläuft der Bruch derart durch die Membran, dass die E-Hälfte repliziert wird, bleiben kleine Einsenkungen zurück, die

sogenannten Pits. Analog befinden sich diese auf der E-Seite (*E-face*). Der Bruchverlauf kann folglich von der Membran einer Zelle in die Membran einer anderen springen. Durch die Beschattung mit Platin und Kohle resultiert ein Abdruck dieses Membranreliefs, die Replika.

Sind zwei Zellen durch eine Gap Junction verbunden, zeigt sich diese folglich je nach Verlauf des Bruchs als Ansammlung von Partikeln, Pits oder einer Kombination aus beiden. Die ungekoppelten Hemikanäle werden dabei stets als Partikel dargestellt. Der detaillierte Ablauf des Gefrierbruch-Vorgangs ist in Kapitel 2.10.2 (Seite 37) beschrieben.

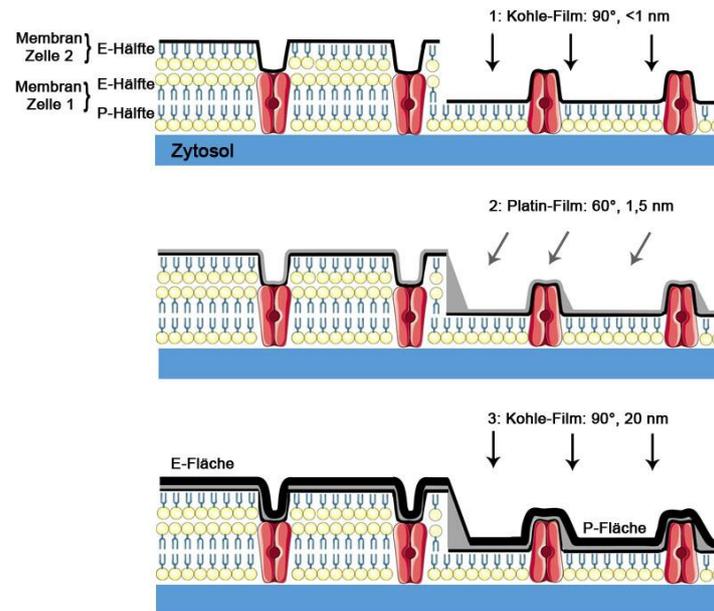


Abb. 4: FRIL-Nomenklatur. Gap Junctions lassen sich als Intramembranpartikel mittels FRIL-Technik visualisieren. Der Membranbruch teilt die Doppelmembran in eine P- und E-Hälfte. In Abhängigkeit davon, wo die Bruchfläche verläuft, bleiben dann die Connexone als Partikel auf der P-Fläche oder als Pits auf der E-Fläche der fertigen Replika zurück. Darüber hinaus zeigt die Abbildung, welche Beschattungswinkel für die Herstellung der Replika notwendig sind (vgl. auch Kapitel 2.10).

Die elektronenmikroskopische Aufnahme einer Gap Junction, welche mittels FRIL visualisiert wurde, ist in Abb. 5 dargestellt. Die Gap Junction grenzt sich deutlich zur umgebenden Membranfläche ab. Der Anteil der Partikel ist grün hinterlegt, während die Pits nicht markiert wurden. Des Weiteren ist die Gap Junction mit 12 nm großen Goldpartikeln markiert, welches die enthaltenen IMP als Cx43-Moleküle identifiziert.

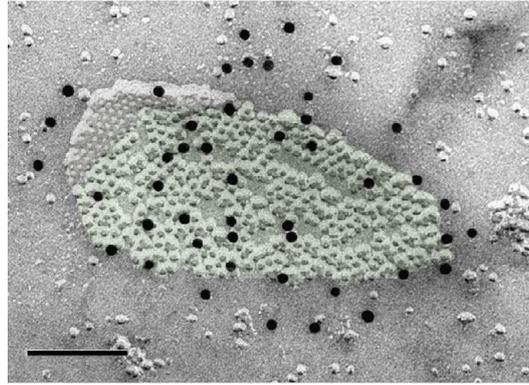


Abb. 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer astrozytären Cx43 Gap Junction. Der Großteil der Gap Junction wird von den grün hervorgehobenen Partikeln, welche sich auf der P-Seite der Membran befinden, gebildet. Im oberen Teil der Gap Junction zeigen sich die IMPs als Pits, welche auf der E-Seite lokalisiert sind. Zusätzlich erkennt man als schwarze Punkte 12 nm-große Gold-Partikel, welche über die Koppelung an entsprechende Primär- und Sekundärantikörper Cx43-Gap Junctions markieren. Der Maßstab entspricht einer Distanz von 0,1 μm (Beckmann et al. 2019b) (Lizenznummer:4776471135117).

1.3 Ziel der Arbeit: Osmotischer Stress führt zu ultrastrukturellen Veränderungen in der GJIC von Astrozyten

Für Nervenzellen im ZNS ist die Wahrung des osmotischen Gleichgewichts von besonderer Bedeutung, da sie sehr empfindlich auf Schwankungen in dem sie umgebenden Milieu reagieren. Mögliche Wassereinlagerungen und darauffolgender Anstieg des intrazerebralen Drucks schädigen Nervenzellen mechanisch und führen so zum Untergang von Nervengewebe (Papadopoulos et al. 2002). Daher ist die regulatorische Funktion von Astrozyten unverzichtbar, welche Ionen- und Wasserschwankungen des Interzellularraums puffern und abfangen. Veränderungen im osmotischen Gleichgewicht werden durch Ionen und Moleküle, wie beispielsweise Glukose und Sucrose, hervorgerufen. Als Konsequenz kann es durch Wasser-Verschiebungen zu Veränderungen des Wassergehalts kommen.

Wie bereits beschrieben, können zahlreiche Prozesse Veränderungen im Expressionsmuster von Connexin-Molekülen bewirken und die Ausbildung von Gap Junctions beeinflussen. In der Vergangenheit zeigten bereits einige Studien in verschiedenen Geweben, dass hyperosmolare Sucroslösung zu Veränderungen der Gap Junction-Konformation führt (Fujimoto 1995, Goodenough and Gilula 1972, Peracchia 1977). Auch hypoxische Zustände können auf Struktur und Funktionalität von Gap Junctions einwirken. Arbeiten wie z. B. von Beardslee et al. zeigen, dass ischämische Bedingungen im Herzen die Ausbildung von Gap Junctions verändern können (Beardslee et al. 1998). Ähnliche Beobachtungen gibt es auch für Schlaganfälle und zerebrale Ischämien. Es konnte sogar ein enger Zusammenhang zwischen Cx43 und der Entwicklung von mit Schlaganfall assoziierten Hirnödemen festgestellt werden, da eine Hemmung von Cx43 zu einer verminderten Ödembildung führt (Chu H. et al. 2017, Wu et al. 2013). Diese Erkenntnisse werden von Studien bestätigt, in denen eine

Hemmung der GJIC von Cx43-Gap Junctions neuroprotektiv wirkte und eine verminderte Apoptose von Nervenzellen zur Folge hatte (Ichkova et al. 2019, Xie et al. 2011).

Osmotisch wirksamen Substanzen wird ebenfalls eine abschwellende Wirkung und verminderte Ödembildung zugeschrieben. Auf diese Weise wird hyperosmolares Mannitol zur Behandlung des Hirnödems eingesetzt (Manley et al. 2004, Weed and Mc Kibben 1919). Arima et al. konnten beispielsweise nachweisen, dass Mannitol den intrazerebralen Druck sowie den Wassergehalt des Gehirns reduziert und zu einer Induktion von AQP4 und AQP9 führt (Arima et al. 2003).

Inwiefern Mannitol bzw. hypertone Substanzen zu einer Senkung des Wassergehalts im Gehirn und folglich zur Senkung des intrazerebralen Drucks beitragen, ist zu diesem Zeitpunkt im Einzelnen jedoch nicht geklärt. Auch die mögliche Beteiligung von astrozytären Gap Junctions in diesem Zusammenhang ist weitestgehend offen. Hierfür muss zunächst im Einzelnen untersucht werden, welche Folgen die Einwirkung von hypertonen bzw. hyperosmolaren Substanzen auf Gap Junctions hat.

Der Einfluss von hyperosmolaren Substanzen auf Gap Junction-Kanäle in Astrozyten soll in dieser Dissertation *in vitro* beleuchtet werden. Hierbei soll der Frage nachgegangen werden, ob und in welchem Ausmaß, hyperosmolare Sucroslösung in primären Astrozyten zu morphologischen und ultrastrukturellen Veränderungen der Gap Junction-Konformation führt. PCRs sowie ein *Scrape Loading/Dye Transfer Assay* ergänzten die Versuche und sollten weiteren Aufschluss über Zellkommunikation geben. Zusätzlich wird die Hypothese geprüft, dass die Behandlung mit hyperosmolaren Substanzen das Phosphorylierungsmuster von Cx43, welches für das *Gap Junction-Trafficking* eine Rolle spielt, verändert. Die Phosphorylierung an den verschiedenen Aminosäure-Resten von Cx43 resultiert in einer Änderung des Molekulargewichtes, was folglich verschiedene Isoformen im Immunoblot ergibt. Diese bestehen aus der P0- (oder *nonphosphorylated*, NP) Isoform bzw. -Bande, welche auf dem Gelelektrophoresegel schneller wandert, als die zwei langsameren phosphorylierten Isoformen. Letztere sind die im Allgemeinen als P1 sowie P2 bezeichneten Isoformen (Lampe and Lau 2004).

Das hieraus erworbene Wissen könnte beispielsweise einen möglichen Wirkungsmechanismus von hyperosmolarer Mannitol-Lösung bei der Behandlung des Hirnödems erklären. Dadurch könnten bisherige Therapien untermauert und weiter optimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Werkzeuge, Verbrauchsmaterial, Software

2.1.1 Geräte und Werkzeuge

Gerät/Werkzeug	Firma, Land
3D-Schüttler/Taumelschüttler PS M3D	Grant-Bio, Cambridge, UK
Analysenwaage, M-Power	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Backofen: HERA-Therm	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Bench: Hera Safe KS	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Blotting-Apparatur	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Brutschrank: HERA-cell 150 i	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Cellcounter LUNA-II™	Logos Biosystems, Anyang-si, Südkorea
Cryo Preparation Chamber (CPC)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
EM-BAF 060 (Gefrierbruchanlage)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Observer Z.1	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Folienschweißgerät: Folio	Severin Elektrogeräte, Sundern, Deutschland
Gelelektrophoresapparatur mit Zubehör: Glasplatte, Kamm, Keramikplatte und Spacer für SDS-PAGE	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glasschneider	Tchibo GmbH, Hamburg, Deutschland
Heizplatte C-MAP HP7	IKA, Staufen, Deutschland
i Mark Microplate Absorbance Reader 1	Bio-Rad, München, Deutschland
Kamera: Elektronenmikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
Kamera: Vilber Lourmat Fusion SL 35000 WL	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Keramikpinzette	Baltic Präparation e.K., Niesgrau, Deutschland
Keramik-Well-Platte	Baltic Präparation e.K., Niesgrau, Deutschland
Kupfer-Trägerplättchen	Baltic Präparation e.K., Niesgrau, Deutschland
Mikrovolumen-Spektralphotometer und -Fluorometer Nano Drop	Thermo Fisher Scientific (am UKS in der AG Hannig, Zahnerhaltung), Karlsruhe, Deutschland
Millipore-Anlage für Bidest.-Wasser	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wipp-Schüttler: Mini Minirocker MR1	BioSan, Riga, Lettland
Mini-Zentrifuge: Sprout®	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
Nano Drop: Mikrovolumen Spektralphotometer und Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland

Niedrigraum-Tischabzug Secuflow (Scala)	Waldner Laboreinrichtungen, Wangen, Deutschland
Vacuum Cryo Transfer System (VCT-) Shuttle	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop: Primo Vert	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
pH-Meter + Sonde	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
Pinzette 2ASASL, gerade, Edelstahl	Weller Erem, Besigheim, Deutschland
Präzisions-Pinzette Dumxoeel N7, gekrümmt,	Dumont, Montignez, Schweiz
Präzisionswaage: KERN PLE-N	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Pipetten: 0,5 µl bis 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipet Boy 2	Integra Biosciences, Biebertal Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Präparier-Set	FSTE, Heidelberg, Deutschland
PTFE-Schale	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stereomikroskop M3B	Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz
Wärmebank	Medax Nagel KG, Kiel, Deutschland
Transmissions-Elektronenmikroskop Technai G ²	FEI, Hillsboro, OR, USA
Reagenzglasschüttler: Lab Dancer	IKA, Staufen, Deutschland
Reagenzglasschüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Schüttler: Heidolph Incubator 1000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Netz-Gerät: PEQ-POWER 300	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Thermocycler Life Touch	Biozym, Hessisch Oldenburg, Deutschland
Thermocycler Applied Biosystems™-StepOne Plus™	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Teflon-Schale	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop FEI, Technai G2	Technai (inzwischen Thermo Fisher Scientific), Karlsruhe, Deutschland
Wärmebad TW 20	JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland
Wärmebad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zellzähler: Cellcounter LUNA-II™	Logos Biosystems, Villeneuve d'Ascq, Frankreich
Zentrifuge: Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge: himac CT6EL	Hitachi-Koki Co.,Ltd., Tokio, Japan
Zentrifuge: himac CT15RE	Hitachi-Koki Co.,Ltd., Tokio, Japan

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
24-Well-Mikrotiter-Platte Cellstar	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
96-Well-Mikrotiter-Platte Biolite	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
96-Well-Mikrotiter-Platte	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Deckgläschen Ø: 12 mm	Glaswarenfabrik Karl Hcht, Sondheim, Deutschland
Filterpapier Whatman, Ø: 90 mm	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA
Filterpapier Whatman	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA
Filter Easy Strainer, 70 µm, Nylon	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Finder Gold Netzchen mit Orientierungshilfe: (Grids) G200F1-G3, Ø: 3,05 mm	Gildergrids, Grantham, UK
Glas-Pipette 5, 10 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Glas-Petrischalen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Laborglas-Flaschen, 0,25 – 1 l	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kanüle: 0,4x40 mm	Braun, Melsungen, Deutschland
Kryo-Konservierungsgefäße, 2 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Kohlestab	Baltic Präparation e.K., Niesgrau, Deutschland
Parafilm M	Bemis, Oshkosh, WI, USA
Pasteur-Pipette, Plastik, 3 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran 0,2 µm	Advansta Inc., San Jose, CA, USA
Platinstab	Baltic Präparation e.K., Niesgrau, Deutschland
Reaktionsgefäße, 0,2 – 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsröhrchen, 15 – 20 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Reaktionsröhrchen, 50 ml	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Schraubgläschen mit chemikalienresistentem Deckel X100, 27,5x57 mm, hydrolyt. Klasse I	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Serva-Fertig Elektrophorese-Gel TGPRIME, 12%	Serva, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflasche T 75, Cellstar	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschale, Plastik, Ø: 35 mm	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zellschaber, 16 cm	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

2.1.3 Kits

Kit	Firma
RNeasyPlus Minikit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pierce™ 660nm Protein Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe; Deutschland
Takyon qPCR Kit (Rox SYBR)	Eurogentec, Seraing, Belgien
QIAshredder	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.2 Chemikalien und Lösungen

2.2.1 Chemikalien

Chemikalie	Firma
2-Propanol	Fisher Chemicals, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
1,2 Dichlorethan 99,8%	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Gibco (jetzt Thermo Fisher Scientific), Karlsruhe, Deutschland
Aceton	Zentrales Chemikalien Lager (ZCHL) der Universität des Saarlandes (UdS), Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau (-Natrium-Salz)	AlfaAesa, Ward Hill, USA
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
Carbenoxolon	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
Collagenase D	Roche, Mannheim, Deutschland
Complete	Roche, Mannheim, Deutschland
DAPI-Fluoromount-G	Southern Biotech, Birmingham, USA
DEPC	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Desosyribonuklease (DNase)	Serva, Heidelberg, Deutschland
dNTP Mix 10 mM	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium, niedriger Glukose-Gehalt (DMEM)	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland,
Ethanol 96%	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland

Ethanol 100%	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
FCS	Gibco (jetzt Thermo Fisher Scientific), Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ SO ₄	Zentrales Chemikalien-Lager, Universität des Saarlandes, Deutschland
Lucifer Yellow	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
Methanol	Zentrales Chemikalien-Lager, Universität des Saarlandes, Deutschland
Milchpulver, fettarm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MULV-Reverse Transkriptase + Puffer	NEB, Frankfurt am Main, Deutschland
Natrium-Acetat	Zentrales Chemikalien-Lager, Universität des Saarlandes, Deutschland
Normal Goat Serum (NGS)	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 100x	Thermo Fisher Scientific (ehemals Lifetechnologies), Karlsruhe, Deutschland
PFA-Pulver Biochemica	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PonceauS-Pulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
PhosphoSTOP	Roche, Mannheim, Deutschland
Propan-1,2,3-triol (Glycerin)	Zentrales Chemikalien-Lager, Universität des Saarlandes, Deutschland
Dextran	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
RNase Inhibitor (40 U/μl)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel30	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose D(+)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure, 70%	Zentrales Chemikalien-Lager, Universität des Saarlandes, Deutschland
SDS-Pellets >99%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tetradecanoyl-phorbolacetat (TPA)	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland
TRIS-base (Trizmabase)	Sigma-Aldrich (jetzt Merck), Darmstadt, Deutschland,
Triton X 100 (in PBS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	PAA Laboratories, Etobicoke, Kanada
Trypanblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tween20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Western Bright Quantum HRP Substrat	Advansta, San Jose, USA

2.2.2 Antikörper

Primärantikörper

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper

Primär-antikörper	Hersteller	Spezies/Wirt	Verdünnung/Anwendung			Bestellnummer
			ICC	WB	FRIL	
Cx43	Abcam	Kaninchen			1:75	ab11370
GAPDH	Milipore	Maus		1:2.000		MAB374
GFAP	Merck	Maus	1:100			MAB360
panCx43	Sigma Aldrich	Kaninchen		1:8.000		C6219
pCx43, S368	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Kaninchen		1:500		48-3000

Sekundärantikörper

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

Sekundär-antikörper	Hersteller	Quelle	Verdünnung/Anwendung			Bestellnummer
			ICC	WB	FRIL	
Anti-Maus IgG Alexa 488	Thermo Fisher Scientific	Ziege	1:3000			A21144
Anti-Kaninchen HRP	Invitrogen	Ziege		1:7000		A10547
Anti-Maus HRP	Santa Cruz	Ziege		1:7000		sc-2005
Anti-Maus 12 nm Gold	J/R	Ziege			1:20	115.205-166

2.2.3 Primer für die qRT-PCR

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Primer

Name	Spezies	Sequenz 5'-3'	Produktgröße [bp]	Referenz
18S fwd	Maus	AAACGGCTACCACATCCAAG	155	(Raslan et al. 2016)
18S rev	Maus	CCTCCAATGGATCCTCGTTA		
Cx43 fwd	Maus	TGGAGTAGGCTTGGACCTTG	123	(Chu M. et al. 2018)
Cx43 rev	Maus	CTCCAAGGAGTTCACCACT		
ZO-1 fwd	Maus	GAGATGTTTATGCGGACGGT	146	(Ye et al. 2012)
ZO-1 rev	Maus	AGCTGTTTCCTCCATTGCTG		
AQP4 fwd	Maus	GAGTCACCACGGTTCATGGA	183	(Ye et al. 2012)
AQP4 rev	Maus	CGTTTGGGAATCACAGCTGGC		
GFAP fwd	Maus	TGGAGGAGGAGATCCAGTTC	67	(Bai et al. 2013)
GFAP rev	Maus	AGCTGCTCCCGGAGTTCT		

2.2.4 Software

Software	Firma
Axio Vision SE64 Rel. 4.8	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Excel	Microsoft, Redmond, WA, USA
Fusion-Capt nAdvanced	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
Image J	National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA
MPM6	Bio-Rad
Licor/Image Studio Lite 5.2	LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA
Adobe Photoshop	Adobe inc., San José, CA, USA
TECHNAI	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Step One Plus	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Servier Medical Art	Servier Laboratoires, Suresnes, Frankreich
Inkscape	1991 Free Software Foundation, Bosten, MA, USA

2.3 Isolation und Kultivierung von primären Astrozyten

2.3.1 Isolation der primären Astrozyten

Astrozyten wurden aus ein bis fünf Tage alten Mäusen (postnatal Tag (P) 1-5; Stamm: C57BL/6) isoliert und davon primäre Astrozytenkulturen angelegt. Für die Präparation des benötigten Zellmaterials wurden dabei 6-8 Tiere eines Wurfs verwendet. Hierfür wurden die Tiere dekapitiert und nach Eröffnen des Schädels die Meningen unter einer Stereolupe mit einer spitzen Pinzette entfernt. In eiskaltem PBS wurden die Großhirne gesammelt und im Anschluss in eine Trypsin-/PBS-Lösung überführt (in 50 ml Röhrchen, 10 ml PBS (170 mM NaCl, 3,35 mM KCl, 4 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,84 mM KH₂PO₄, pH 7,2) und 450 µl Trypsin (10x)) und im Wasserbad inkubiert (37°C, 30 Minuten). Nach Auffüllen der Suspension mit PBS auf 20 ml wurde ein Zentrifugationsschritt (7 Minuten, RT, 500 x g) durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet durch Zugabe von 1 ml DNase verdaut (4 Minuten, RT). In den darauffolgenden drei Resuspensionsschritten wurden die Reaktionsröhrchen bei jedem Schritt mit Kulturmedium (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), komplementiert mit 1 g/l Glukose, 1% Pen/Strep und 10% FCS bzw. zur Serumreduktion 0,5% FCS (s.u.)) auf 20 ml aufgefüllt, bei Raumtemperatur zentrifugiert (5 Minuten, 250 x g) und der Überstand abgenommen. Zum Schluss wurde der Überstand entfernt und das Pellet erneut in 1 ml Wachstumsmedium (1 ml pro Gehirn) resuspendiert. Nach Passieren eines Filters (70 µm Porengröße, Nylon), platziert auf einem 50 ml-Röhrchen, wurde die gefilterte Zellsuspension mit einer Pipette in eine Zellkulturflasche überführt (Zellsuspension aus vier Gehirnen pro 200 ml Flasche (T75); 9 ml Wachstumsmedium vorlegen + Hirnsuspension) und im Brutschrank (Temperatur: 37°C, Atmosphäre: 5% CO₂) gelagert. Für die Kultivierung wurde 24 Stunden später zwei Mal hintereinander das alte Medium abgesaugt, durch 8 ml neues Medium ersetzt und die Mischung mit einer Pipette (Fassungsvermögen 10 ml) am Boden der Flasche mehrmals gespült und verteilt. Im Rahmen dieses Vorgangs wurde nach Zugabe des Mediums mit der flachen Hand an die Seitenwände der Zellkulturflaschen geklopft, um Mikroglia und anderes nicht benötigtes Zellmaterial abzulösen, und das Medium verworfen. Abschließend wurde 12 ml neues Wachstumsmedium auf die Zellen gegeben.

2.3.2 Kultivierung und Passagieren

Für die drei Wochen andauernde Kultivierung (im Brutschrank: Temperatur: 37°C, Atmosphäre: 5% CO₂) wurden die Zellkulturflaschen zwei Mal in der Woche entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise durch Passagieren verdünnt und das Medium gewechselt. Nach Absaugen des Mediums wurden hierzu die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das PBS entfernt und 1,5 ml einer auf 37°C vorgewärmten Trypsinlösung (1x Trypsin/EDTA: 10x Stocklösung: 0,5% Trypsin/EDTA verdünnt in PBS), zum Ablösen der Zellen von ihrer Unterlage, für 5 Minuten auf die Zellen gegeben. Zur Inhibierung des Trypsins wurde danach die Zellsuspension mit 4,5 ml Wachstumsmedium verdünnt. Im Rahmen der weiteren Kultivierung wurde ein Drittel der Zellen in der Flasche belassen oder alternativ in einer neuen Kulturflasche mit einem Drittel der Zellen expandiert.

2.4 Immunzytochemische Reinheitsbestimmung der Astrozytenkultur

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades der primären Astrozytenkulturen wurde eine immunzytochemische Färbung (ICC) angefertigt. Zu diesem Zweck wurden nach den drei Wochen Kultivierungsdauer analog zur Vorbereitung der FRIL- und Immunoblot-Proben 50.000 Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät (vgl. Kapitel 2.5).

Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 100%igen EtOH für 15 Minuten bei -20°C fixiert, im Anschluss auf Filterpapier getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zu Beginn der immunzytochemischen Färbung wurden die Deckgläschen durch 3-maliges Eintauchen in PBS gewaschen, gefolgt von einem Blockierungsschritt mit 10%igem NGS (v/v) und 0,1% TritonX-100 (v/v) in PBS. Anschließend wurden die Zellen für 120 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (GFAP, vgl. Tab. 1, gelöst in NGS-Blockierlösung) behandelt. Danach erfolgte ein erneuter Waschvorgang mit PBS (3x pro Deckgläschen). Im nächsten Schritt wurden die Proben für 30 Minuten mit 0,2% BSA (w/v) in PBS behandelt und daraufhin mit dem Sekundärantikörper (vgl. Tab. 2), gelöst in NGS-Blockierlösung, 60 Minuten lang inkubiert. Zum Schluss wurden die Proben erneut gewaschen (3x in PBS, 1x in dH_2O), um sie abschließend auf einem mit 5 μl DAPI-Fluoromount-G benetzten Objektträger einzudecken.

Die fertigen Objektträger konnten mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes Observer Z.1 (Carl Zeiss) mit entsprechenden Filtersets (für rotes Licht: 43 HE, für grünes Licht: 38 HE, blaues Licht: DAPI-Signal, 49 HE) in 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung untersucht werden. Die Belichtungszeit für das DAPI-Signal (blau) betrug 15-35 ms und für GFAP 1500-4000 ms (grün), wobei von jedem Deckgläschen fünf Bilder von verschiedenen Deckgläschen-Abschnitten erfasst wurden. Die Auszählung der Zellen pro Ausschnitt wurde mit Hilfe der Programme ImageJ und Axio Vision umgesetzt. Die ImageJ-Funktion Multi-Counter erfasste durch Anwählen der gewünschten Zellen bzw. Fluoreszenz-Signale und Zuordnung verschiedener Farbcodes die Gesamtzahl von GFAP-positiven Zellen sowie Zellkernen (DAPI-Signal). Dadurch konnte mit Microsoft Excel das Verhältnis von GFAP-positiven Zellen zu der Gesamtzahl der Zellen berechnet und aus den fünf Werten ein Mittelwert für ein Deckgläschen gebildet werden, woraus auf den Reinheitsgrad in Prozent geschlossen werden konnte.

2.5 Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin

Die kultivierten Astrozyten wurden im Verlauf der Versuchsreihe auf Deckgläschen ausgesät. Die Deckgläschen (Durchmesser: 12 mm) wurden zunächst im Ofen zur Verbesserung der Haftung (2 Stunden, 140°C) gebacken. Es folgte die Inkubation der Deckgläschen in verdünnter Poly-L-Lysin-Lösung (0,01% (w/v) in dH_2O) für 5 Minuten auf dem Schüttler. Anschließend wurden die Deckgläschen zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die Deckgläschen in 24-Well-Platten gelegt und für ca. 20 Minuten unter UV-Licht sterilisiert.

2.6 Aussaat und Stimulation der Astrozyten

Zu Beginn wurde aus der Zellkulturflasche das Medium abgesaugt und anschließend die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS erfolgte eine 5-minütige Inkubation der Zellen im Brutschrank mit 1x Trypsin/EDTA (2,5% in PBS). Danach wurde die Trypsin-Zellsuspension mit Medium abgewaschen. Zum Schluss wurde die gesamte Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen aufgenommen.

2.6.1 Zählen und Aussaat der Zellen

Die Zellzahl pro Milliliter in der Suspension wurde mittels eines automatischen Zellzählers (Cellcounter LUNA-II™, Logos Biosystems) bestimmt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (0,4% in NaCl (w/v)) versetzt und 10 µl der Zell-Trypanblau-Lösung in die Zählkammer gegeben. Für FRIL-Proben wurden anschließend auf jedes Deckgläschen 50.000 Zellen ausgesät. Für die Isolation von RNA bzw. Protein wurden 400.000 Zellen auf 35 mm-Zellkulturschalen ausgesät. Die ausgesäten Zellen wurden für zwei Tage im Inkubator (Temperatur: 37°C, Atmosphäre: 5% CO₂) kultiviert.

2.6.2 Serumreduktion

Nach einem Tag wurde das Wachstumsmedium durch Medium mit reduziertem FCS-Gehalt (0,5% (v/v)) ersetzt. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen in serumreduziertem Medium für weitere 24 Stunden im Brutschrank kultiviert.

2.6.3 Stimulation der Astrozyten

Ansetzen der Lösungen bzw. der Inhibitoren:

- 0,5 M Sucrose (Saccharose): 8,56 g Sucrose wurden in 50 ml PBS gelöst und sterilfiltriert. Die Lösung wurde bei RT gelagert.
- Carbenoxolon (CBX): Eine 50 mM Stocklösung wurde in dH₂O hergestellt und bei -20°C gelagert. Eingesetzt wurden 50 µM.
- Probenecid (PBN): Um eine 10 mM Stocklösung herzustellen, wurden 88 mg PBN unter Zugabe von 0,37 ml (1 M) NaOH und 30,4 ml PBS gelöst. Der pH-Wert wurde mit 0,5%igem HCl (in 1M NaOH) auf 7,2 eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Eingesetzt wurden 1 µM.

Stimulation:

Zur Induktion des osmotischen Stresses wurden Astrozyten für 5 Minuten mit 0,5 M Sucrose-Lösung stimuliert. Als Kontrolle wurden parallel Zellen für 5 Minuten in PBS inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

Die Proben, die im Versuchverlauf für eine Stimulation mit CBX bzw. PBN vorgesehen waren, wurden mit 50 µM CBX-Stocklösung bzw. mit 1 µM PBN-Stocklösung in DMEM jeweils für 30 Minuten vorinkubiert. Zur Stimulation wurden die Zellen ebenso für 5 Minuten mit Sucrose-CBX/-PBN bzw. PBS-CBX/-PBN behandelt.

2.7 RNA/Protein-Isolation

Für die RNA- und Protein-Analysen wurde lediglich Material von mit PBS- und Sucrose-Lösung-behandelten Proben verwendet. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben, stimuliert. Nach Absaugen der entsprechenden Medien wurden die Schalen mit 0,5 ml eiskaltem PBS aufgefüllt und mit einem Schaber die Zellen vom Boden der Schalen abgekratzt. Die Zell-Suspension wurde in vorgekühlte Eppendorfgefäße gegeben und für 5 Minuten zentrifugiert (13.000 rpm, 4°C). Nach Entfernen des Überstandes wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt, der Überstand abgenommen und abschließend die Zellpellets bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren.

2.8 Analyse der mRNA-Expression mittels qRT-PCR

Um nachzuweisen, ob Sucrose, im Vergleich zu PBS, die Menge von GFAP-, AQP4-, Cx43- und ZO-1-mRNA in Astrozyten verändert, wurde mit dem Probenmaterial von drei verschiedenen Astrozyten-Würfen (n=3) eine quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) durchgeführt.

2.8.1 RNA-Isolierung mit RNeasy Plus Mini Kit von Qiagen

Zunächst wurde aus den eingefrorenen Zellpellets die RNA mit Hilfe des „RNeasy Plus Mini Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Zu Beginn wurde pro Probe der RLT-Plus-Lysepuffer (gebrauchsfertig im Qiagen-Kit enthalten) mit β -Mercaptoethanol (14,3 M) versetzt (10 μ l β -Merkaptoethanol/ml RLT-Puffer). Es wurden 350 μ l RLT- β -Mercaptoethanol zu jeder Probe hinzugegeben und nach kurzem Vortexen das Lysat auf die QIA-Shredder-Säule gegeben. Der Durchfluss wurde 2 Minuten bei höchster Geschwindigkeit (13.000 rpm) zentrifugiert. Der darauffolgende genomische DNA-Verdau wurde mit dem Auftragen des Durchflusses auf den „gDNA-Eliminator“ begonnen. Nach einer 30-sekündigen Zentrifugation bei 8.000 x g folgte die Zugabe von 350 μ l 70%-igem Ethanol. Das durch Auf- und Abpipettieren vermischte Lysat wurde danach auf die RNeasy Säule gegeben, woraufhin sich die RNA im Filter sammelte. Die Gefäße wurden 15 Sekunden lang bei 8.000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurden 700 μ l Puffer RW1 hinzugefügt und insgesamt drei Zentrifugationsschritte bei 8000 x g (zweimal für 15 Sekunden, letzter Schritt für 2 Minuten) durchgeführt, wobei vor der 2. und 3. Zentrifugation (s.o., 8000 x g) jeweils 500 μ l RPE-Puffer hinzugegeben wurde. Der Durchfluss wurde stets entfernt. Danach wurde die RNeasy Säule auf ein frisches 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben, 1 Minute lang zum Trocknen der Membran bei 13.000 rpm zentrifugiert und schließlich das Reaktionsgefäß gegen ein frisches Reaktionsgefäß mit einem Auffangvolumen von 1,5 ml ausgetauscht. Für die Elution wurden 30-60 μ l RNase-freies Wasser auf jede Säule gegeben und nach einer 10-minütigen Inkubation die Säulen 1 Minute lang bei 8.000 x g zentrifugiert. Dies bewirkt ein Herauslösen der RNA aus dem Filter, sodass ab diesem Schritt der Durchfluss verwahrt bzw. zum Schluss, bis zur weiteren Verarbeitung, bei -80°C eingefroren wurde.

2.8.2 Ethanol-Präzipitation

Zur Ethanol-Präzipitation zwecks Konzentrierung und Entsalzung der RNA-Proben wurden jeweils 15 µl Natrium-Acetat (3 M, angesetzt in Diethylpyrocarbonat versetztem Wasser (0,1% (v/v) DEPC-H₂O)) zusammen mit 420 µl 100%igem Ethanol zu den zuvor isolierten RNA-Aliquots gegeben und nach kurzem Vortexen 2 Stunden lang bei -80°C gelagert. Im Anschluss erfolgte ein 20 Minuten langer Zentrifugationsschritt bei 13.000 x g, in dessen Folge der Überstand entfernt wurde. Danach wurde das Pellet mit 70%igem, eiskaltem Ethanol gewaschen, die Suspension erneut zentrifugiert (10 Minuten, 13.000 x g) und der Überstand verworfen. Das Pellet trocknete 30 Minuten lang und löste sich nach Zugabe von RNase-freiem Wasser (12 µl RNase-freies H₂O, 55°C, 10 Minuten).

Anschließend konnte die RNA-Konzentration am Mikrovolumen-Spektralphotometer und -Fluorometer (Nano Drop, Thermo Fisher Scientific) gemessen werden.

2.8.3 Umschreiben der RNA in cDNA

Um von den RNA-Proben gleiche Ausgangsmengen anzunehmen, wurden die isolierten und präzipitierten RNA-Proben mit Hilfe des Nano Drop auf die Konzentration 500 ng/µl umgerechnet. Anschließend musste so viel Wasser hinzugefügt werden, bis 13 µl Endvolumen erreicht wurden.

Für das weitere Prozedere war die Herstellung zwei verschiedener sogenannter Mastermix-Ansätze erforderlich. Der erste Ansatz enthielt Oligo(dt)Primer und einen dNTP Mix, welcher nach der Zugabe zu den RNA-Proben für 5 Minuten bei 65°C im Thermocycler inkubiert wurde. Der zweite Mastermix bestand aus Nuclease-freiem Wasser, RT-Puffer (10x), RNase Inhibitor (40 U/µl) sowie MuLV-Reverse-Transkriptase. Das hierzu notwendige Pipettierschema wurde der Vorlage „*First Strand cDNA-Synthesis (Standard Protocol NEB # MEB M0253)*“ entnommen.

Nachdem der Reaktionsansatz in die Eppendorfgefäße pipettiert wurde, wurden diese erneut in den Thermocycler (Biozym) gestellt, der die notwendigen Temperaturen von 42°C für 1 Stunde und 65°C für 20 Minuten reguliert.

2.8.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR erfolgte für die ribosomale Untereinheit 18S als *Housekeeping-Gen* sowie für GFAP, AQP4, Cx43 und ZO-1.

In jedes *Well* wurden in DEPC-Wasser im Verhältnis von 1:6 verdünnte cDNA gegeben. Der notwendige Reaktionsansatz bestand aus 2,5 µl cDNA, jeweils 1 µl *forward* (fwd) und *reverse* (rev) Primern (Tab. 3), 5,5 µl DEPC-H₂O und 10 µl Reaktions-Mastermix (gebrauchsfertig von Takyon, Eurogentec). Für jedes Primerpaar wurden auf diese Weise in dieser Zusammensetzung jeweils drei Reaktionsansätze („Triplets“) angelegt.

Alle Komponenten wurden in die Wells einer 96er Mikrotiterplatte pipettiert und kurz abzentrifugiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte in das Kassettenfach des Step One Plus Thermocyclers (Thermo Fisher Scientific) eingelegt und die PCR mit dem Modus *Regular Cycling-Regular Ramping Rates* gestartet. Zyklen und Temperaturprofile der PCR sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Übersicht über die Zyklen und Temperaturprofile der PCR

	Temperatur	Modus: Regular Cycling
Takyon Aktivierung	95°C	3 min
40 Zyklen		
Denaturierung	95°C	10 s
Annealing/Extension	60°C	60 s

2.8.5 Auswertung der qRT-PCR

Die qRT-PCR-Ergebnisse wurden mittels der Step One Software ausgewertet. Die ermittelten Graphen stellten die detektierten Fluoreszenzsignale in Abhängigkeit der abgelaufenen PCR-Zyklen dar. Die Fluoreszenzsignale bilden die Menge der gebildeten RNA-Moleküle ab.

Zur relativen Quantifizierung und zum Vergleich der Werte wurde der sogenannte C_t -Wert (*threshold cycle*) herangezogen. Dies ermöglicht den direkten Vergleich von Veränderungen in der Genexpression der Sucrose-Proben mit denen der PBS-Kontrolle. Als Referenzgen diente das konstitutiv und von äußeren Faktoren unabhängig exprimierte Gen der ribosomalen Untereinheit 18S. Zur Quantifizierung und Auswertung der PCR wurde am Anfangspunkt der exponentiellen Amplifikation ein Schwellenwert, der sogenannte *Threshold*, auf dem Graphen festgelegt. Der Schnittpunkt zwischen Amplifikationskurve und der Schwellenwertlinie ergibt den C_t -Wert. Der C_t -Wert wurde von der Software nach Festlegen des *Thresholds* für alle Proben und PCR-Produkte ermittelt. Da für die PCR der verschiedenen Gene jeweils drei Reaktionsansätze aufgetragen wurden, wurde aus den einzelnen C_t -Werten der Triplets der Mittelwert gebildet. Der relative Expressionsunterschied wurde mittels der Berechnung von $\Delta\Delta C_t$ und mit Hilfe der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (nach Pfaffl) berechnet (Pfaffl 2001):

$$\begin{aligned} \Delta C_t &= C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen} \\ \Delta\Delta C_t &= \Delta C_t \text{ Behandlung} - \Delta C_t \text{ Kontrolle} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta C_t} \end{aligned}$$

Die Berechnungen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt und die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten anschließend mit GraphPad Prism statistisch ausgewertet.

Die statistische Darstellung erfolgte in Form von Säulen-Diagrammen. Sowohl die Expression der Gene in PBS als auch in Sucrose behandelten Proben wurde dabei auf die relative Expression des *Housekeeping*-Gens 18S bezogen. Um eine Aussage über die Veränderungen der relativen Expression unter der Sucrose-Behandlung zu treffen, wurde die relative Expression von GFAP, AQP4, Cx43 und ZO-1 nach Sucrose-Behandlung auf die Expression unter PBS-Behandlung bezogen.

2.9 Immunoblot

Von n=6 Astrozyten-Kulturen wurden Immunoblots angefertigt, um Aussagen über quantitative Veränderungen in der Proteinexpression von Cx43 in all seinen Isoformen (=panCx43) zu treffen. Zusätzlich wurde von n=4 Astrozytenkulturen ein Immunoblot mit spezifischen Antikörpern, die die Phosphorylierung von Cx43 am Serin-Rest 368 erkennen, durchgeführt.

2.9.1 Proteinextraktion und Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteine der pelletierten Zellen zugänglich zu machen, wurden zunächst die Membranen der pelletierten Zellen mittels Zugabe von 50 µl *Radio-Immunoprecipitation-Assay* (RIPA)-Lysepuffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA und 0,5 mM Natrium-Desoylecholol-SDS, 0,1 M Triton X-100 und 1x Phosphostop und Complete) und gelegentlichem Vermischen aufgelöst. RIPA extrahiert Proteine aus der ganzen Zelle (Membran und Zytosol), während Phosphostop und Complete zur Inhibition von Proteinasen und Phosphatasen eingesetzt werden. Nach 30 Minuten auf Eis wurde das Lysat 10 Minuten lang bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in neue Eppendorfgeläße überführt und eine Proteinbestimmung mit dem „Pierce™ 660 nm Protein Assay Reagent“ (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Als Vergleich dienten BSA-Standardlösungen mit bekannter Proteinkonzentration (2000/ 1500/ 1000/ 750/ 500/ 250/ 125/ 0 µg/ml).

Die Proteinkonzentration ermittelte der „iMark™ Microplate Absorbance Reader“ (168-1135, Bio-Rad), die Auswertung erfolgte durch die Software MPM6 Bio-Rad.

Die von dem Programm berechneten Proteinkonzentrationen wurden anschließend auf die Einheit µg/µl umgerechnet und anhand dessen die notwendigen Volumina von RIPA (+Complete+Phosphostop) und 5x Laemmli-Probenpuffer (312,5 mM TRIS-HCl, 10% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerol, 25% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,005% (w/v) Bromphenolblau) berechnet, um die Proben einheitlich auf eine Konzentration von 0,25-1 µg/µl Protein einzustellen. Für die weitere Analyse im Immunoblot wurden für den Nachweis von panCx43 jeweils 5 µg Protein der Zellextrakte und für den Nachweis von pCx43 S368 jeweils 15 µg Protein aufgetragen.

2.9.2 Anfertigung bzw. Gießen der Gele

Zur Anfertigung der Natrium-Dodecyl-Sulfat-(SDS)-Gele (12,5% für 0,8 mm Dicke) wurden zunächst für das Trenngel 2,5 ml 1,5 M TRIS-Base in 0,4%igem SDS (pH 8,9) und 4,1 ml Rotiphorese-Gel 30 (Carl Roth) zusammen mit 3,4 ml dH₂O, 100 µl APS (10%ig, Ammoniumperoxidsulfat, Carl Roth) und 10 µl TEMED (Tetramethylethylendiamin, Carl Roth) in gegebener Reihenfolge vermischt und zwischen die Keramik- und Glasplatten der Kammer pipettiert. Zwecks Konturierung des Gels und Vermeidung von Luftblasen wurde mit 100%igem 2-Isopropanol aufgefüllt. Das Gel polymerisierte 30-40 Minuten aus.

Anschließend wurden für die Herstellung des Sammelgels 1,25 ml 0,5 M TRIS Base in 0,4% SDS (und 0,025% Bromphenolbau, pH 6,8) zusammen mit 583 µl Rotiphorese-Gel 30, 3,2 ml

dH₂O, 100 µl APS (10%) und 10 µl TEMED vermischt und nach Abschütten des Alkohols zwischen die Glasscheiben pipettiert. Zur Ausbildung der Taschen wurde ein passender Gel-Elektrophorese-Kamm eingesteckt und das Gel 10-15 Minuten lang auspolymerisiert.

Die Elektrophorese-Wanne wurde mit 1x Laemmli-Lauf-Puffer (25 mM TRIS-Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS in dH₂O, pH 8,3) aufgefüllt und der Taschen-Kamm entfernt. Die SDS-Gele wurden für die Immunoblots zur Darstellung von panCx43 verwendet.

Die Immunoblots zum Nachweis von pCx43 S368 wurden mit Hilfe von 12%igen Fertig-Gelen (TG PRIME, Serva) angefertigt.

2.9.3 Start der Elektrophorese

Zur Denaturierung der Proteine wurde der Reaktionsansatz aus Lysat, 5x-Laemmli-Puffer und RIPA (+Complete+Phosphostop) bei 95°C inkubiert (5 Minuten, 300 rpm). Die Proteinlösung wurde kurz im Vortex gemischt, in der Mini-Zentrifuge abzentrifugiert (2000 x g) und bis zum Start des Immunoblots auf Eis gestellt bzw. für spätere Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Nach Befüllen der Geltaschen mit 5 µg (panCx43) bzw. 15 µg (pCx43 S368) Probenmenge und dem geeigneten Proteinmarker (*Broad range P 7712*, New-England Biolabs, Frankfurt) wurde die Gelelektrophorese bei 25 mA gestartet. Sobald die Lauffront ca. 1 cm vom Rand des Gels entfernt war, wurde der Strom abgestellt.

2.9.4 Blotting

Beim Blotting wurden die auf dem Gel aufgetrennten Proteine auf eine zuvor in Methanol aktivierte und in Wasser/1x Transferpuffer (Towbin-Puffer; für 1x Transferpuffer: 25 mM TRIS, 192 mM Glycin, in 20%igem Methanol (v/v) gelöst und mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt, pH 8,3) equilibrierte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Hierzu wurde das Gel luftblasenfrei auf die PVDF-Membran gelegt, Unterlage und Abschluss bildeten je drei Lagen Puffer-befeuchtetes Whatman-Filterpapier. Die Stromquellen wurden angeschlossen und die Stromstärke in mA mit Hilfe der Membranfläche (Fläche in cm² x 1,5) berechnet sowie die Blottingdauer von 50 Minuten eingestellt.

2.9.5 Ponceau-S-Färbung

Zur Überprüfung, ob die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgreich war, wurde eine Ponceau-S-Färbung durchgeführt. Nach dem Blotting erfolgte hierzu jeweils ein Waschvorgang der PVDF-Membran mit dH₂O bzw. Methanol. Anschließend wurde die Membran für 5 Minuten in Ponceau-S-Lösung (0,1% (w/v) Ponceau-S in 1%iger (v/v) Essigsäure in dH₂O) gelegt. Die Kamera (Wilber Lourmat Fusion-SL 35000 WL) lieferte entsprechende Fotoaufnahmen der rötlich angefärbten, proteinhaltigen Spuren. Zum Schluss wurde die Membran durch Schwenken in dH₂O wieder entfärbt.

2.9.6 Inkubation mit Antikörpern

Zunächst mussten unspezifische Bindungsstellen mittels 30-minütiger Inkubation mit Milchpulverlösung (1%ig (w/v) in *Tris-buffered-saline tween* (TBST): 10,6 M TRIS HCl mit 150 mM

NaCl, 0,005% (v/v) Tween, pH 8 in ddH₂O) blockiert werden. Alle verwendeten Antikörper wurden entsprechend in dieser Milchpulverlösung angesetzt.

Der Primärantikörper wurde bei 4°C auf einem 3D-Schüttler/Taumelschüttler über Nacht inkubiert. Eine Übersicht der verwendeten Antikörper ist in Tab. 1 und Tab. 2 dargestellt. Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper waren drei Waschschrte (je 5 Minuten, auf der Wippe) mit TBST-Tween erforderlich. Die Membran wurde dann für 1,5 Stunden mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nachfolgend erfolgten wieder die drei Waschschrte und das Trocken zwischen zwei Lagen Whatman-Filterpapier. Anschließend wurde die Membran kopfüber und luftblasenfrei für 2 Minuten auf einen Tropfen Entwicklerlösung gelegt. Die hierzu notwendige Entwicklerlösung (Western Bright Quantum HRP Substrat, Advansta) bestand aus im Verhältnis 1:1 vermischter Western Bright Quantum Peroxidase-Lösung und Western Bright Quantum Luminol/Verstärker-Lösung. Im Anschluss konnte die Chemilumineszenz von der Membran unter Zuhilfenahme der Kamerastation Vilber Lourmat Fusion SL 3500 WL detektiert und die Fotoaufnahmen mit dem entsprechenden Computerprogramm Fusion (beides Vilber Lourmat) verarbeitet bzw. Image Studio (Licor) optodensitometrisch ausgewertet werden.

2.9.7 Ladekontrolle und quantitative Auswertung der optischen Dichte

Zur Anfertigung der Ladekontrollen mittels GAPDH-Nachweis erfolgte eine Primärantikörper-Inkubation mit GAPDH bei 4°C über Nacht und am nächsten Tag die Inkubation mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern für 1,5 Stunden. Die Waschschrte und Entwicklung der Fotos erfolgten analog zu dem zuvor beschriebenen Prozedere.

Mit Hilfe der Licor-Software wurden die aufgenommenen Chemilumineszenz-Signale optodensitometrisch vermessen. Im Falle des panCx43-Immunoblots wurden hierbei alle drei Banden gemeinsam ausgemessen. Für die statistische Auswertung wurden die zu GAPDH-relativierten Signale von n=6 (panCx43) und n=4 (pCx43 S368) Astrozyten-Präparationen in Excel berechnet. Die statistische Auswertung der ermittelten Signalintensitäten erfolgte mit GraphPad Prism6.

2.10 FRIL

2.10.1 Vorbereitung und Vitrifizierung der Zellproben

Das Vorgehen bei der Vorbereitung und Herstellung der FRIL-Proben orientierte sich an dem Protokoll nach Severs et al. (Severs 2007). Die Kupfer-Trägerplättchen wurden zuvor mit 70%iger (v/v in H₂O) H₂SO₄, destilliertem Wasser und Aceton gereinigt. Um Gefrierschäden an den Proben vorzubeugen, wurden die Deckgläschen mit den ausgesäten Astrozyten nach Fixation mit 2%igem PFA (in 0,15 M Sörensen-Phosphat-Puffer (SPB)) mit 50%iger Glycerin-Lösung (v/v) behandelt. Nachfolgend wurden von den Deckgläschen auf einer vorbereiteten Arbeitsplatte mit dem Glasschneider kleine Stücke abgeschnitten, diese als nächstes mit der Zellseite nach unten auf ein Kupfer-Trägerplättchen gelegt (Abb. 6 B) und mit einer feinen Pinzette mit Kunststoffschieber fixiert.

Die Zellproben wurden anschließend mittels *Plunge freezing* in der auf -168°C vorgekühlten Vitrifizierungskammer *Cryo preparation chamber* (CPC, Leica Microsystems) auf die Kupfer-Trägerplättchen aufgefroren und schließlich bei -196°C gelagert.

Zum kontaminationsfreien Transfer (gekühlt und mit Stickstoff geflutet) der Proben in die Gefrierbruchanlage wurde das *Vacuum Cryo Transfer System*-(VCT-) Shuttle sowie das *Vacuum Cryo Manipulation*- (VCM-) System (beides Leica Microsystems) eingesetzt. Letzteres ermöglichte das Einlegen der mit den tiefgefrorenen Proben versehenen Kupfer-Trägerplättchen unter Stickstoff-Atmosphäre auf den Probenstisch (Abb. 6 A).

Der Probenstisch wiederum wurde über das Shuttlesystem kontaminationsfrei in die Vakuum-Kammer der BAF060 (Leico Microsystems) transferiert und eingespannt.

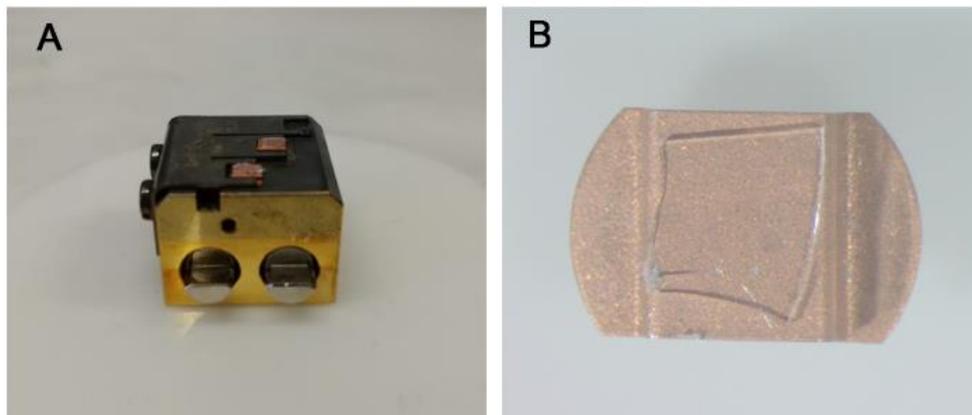


Abb. 6: Zubehör für die FRIL-Technik. A) zeigt den Probenstisch, auf den die Kupfer-Trägerplättchen eingespannt werden. Hier sind die beiden vorderen Plätze mit Trägerplättchen beladen. Der Probenstisch hat in etwa eine Größe von ca. 2x2 cm². B) Auf die Kupfer-Trägerplättchen werden die mit Astrozyten bedeckten Deckgläschen mit der Zellseite nach unten aufgefroren. Die Größe der Kupfer-Trägerplättchen beträgt 3 x 3,5 mm².

2.10.2 Gefrierbruch und Membran-Bedampfung

Der Ablauf der einzelnen Arbeitsschritte und die damit verbundenen Mechanismen sind in Abb. 7 dargestellt.

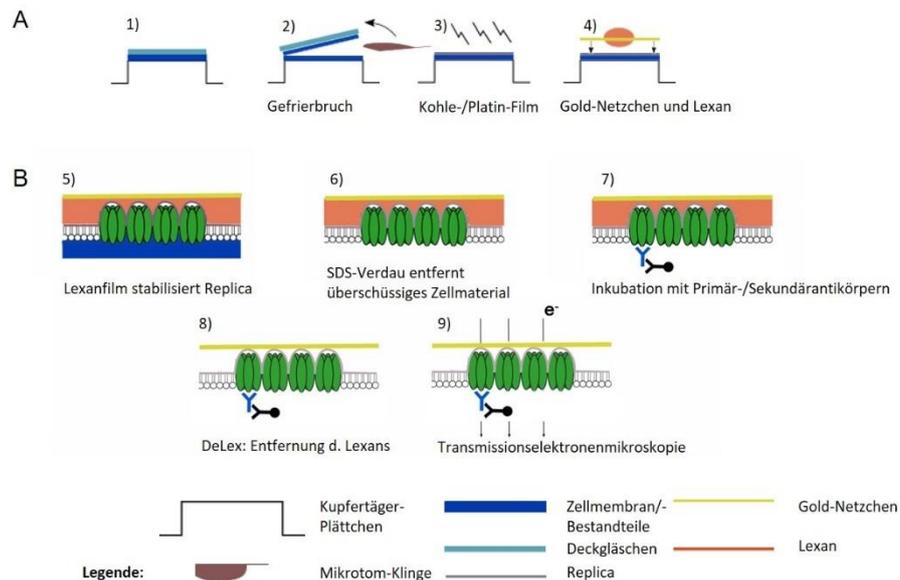


Abb. 7: Schematischer Ablauf der FRIL-Technik. A) zeigt die ersten vier Schritte der FRIL-Technik. Zu Beginn wurden die Deckgläschen (türkis), auf denen die Astrozyten (blau) kultiviert wurden, mittels *Plunge Freezing* auf die Kupfer-Trägerplättchen aufgefroren (Schritt 1). Nach Transfer der Proben mit Hilfe des VCT-Shuttles in die BAF060 wurde durch Hinwegführen einer Mikrotom-Klinge über das Deckgläschen dieses abgelöst und der Bruchvorgang induziert (Schritt 2). Die freiliegende Membranfläche wird anschließend mittels eines Kohle-Platin-Filmes beschattet (Schritt 3), wodurch die Replika entsteht (grau). Um diese zu stabilisieren und im Verlauf elektronenmikroskopisch zu untersuchen, wird diese mittels eines Tropfens Lexan (orange) auf ein Gold-Finder-Netzchen (gelb) aufgebracht und bei -20°C verfestigt (Schritte 4 und 5).

In B) sind die darauffolgenden Schritte im Detail dargestellt. Der SDS-Verdau (Schritt 6) führt zur Entfernung nicht gebrochener Membrananteile und Zellreste. Ab diesem Schritt liegen die Membran und deren Bestandteile, wie z.B. Proteine, Zellkanäle und in diesem Fall Gap Junctions, frei, sodass diese mittels Primär- und Sekundärantikörpern markiert werden können (*Immunolabeling*, Schritt 7). Die Sekundärantikörper sind mit kolloidalem Gold (12 nm) (schwarze Punkte) gekoppelt, wodurch die elektronenmikroskopische Identifikation der Gap Junctions ermöglicht wird. Nach Entfernen des Lexans (Schritt 8) können die auf den Gold-Netzchen stabilisierten und antikörpermarkierten Replikas mittels TEM untersucht werden (Schritt 9).

Der eigentliche Gefrierbruch wurde bei einer Temperatur von -164°C sowie einem Vakuum von 2×10^{-7} bis 10^{-8} durch Heranführen einer ebenfalls mit Stickstoff gekühlten Mikrotom-Klinge an den Probenstisch erreicht, sodass das Deckgläschen abgeschlagen wurde. Zur anschließenden Visualisierung der Membranen wurde die Bruchfläche, wie in Abb. 4 schematisch dargestellt, mit Hilfe der Elektronenverdampfungsanlage und dem Schichtdickenmessgerät der BAF060 mit einem Kohle- und Platin-Film beschichtet (*Coating*). Auf die erste Kohle-Schicht (<1 nm Schichtdicke, aufgetragen im Winkel von 90°) folgten ein 1,5 nm dünner Platin-Kohle-Film (60°) und ein 20 nm-dicker Kohle-Film (90°). Die Topographie der Bruchfläche mit ihrem Relief wird durch den Beschattungsvorgang auf den aufgetragenen Kohle-Film übertragen und ermöglicht dabei die Konturierung von Membranproteinen und anderen Strukturen der Zelle. Es entsteht die Replika.

Zum Schluss werden die Kupfer-Trägerplättchen wieder mit Hilfe des Shuttles ausgeschleust und in der gekühlten VCM-Ladestation aus dem Tisch gehoben. Nachfolgend wurden Finder-Netzchen (Gold-Grid) aus Gold, versehen mit in DCE gelöstem Lexan, vorbereitet. Die mit den Proben beladenen Kupfer-Trägerplättchen wurde anschließend mit Keramikpinzetten innerhalb der Stickstoff-Atmosphäre der VCM auf die Finder-Netzchen aufgetragen (Rash et al. 1997). Das Makrolon fixiert die Replika auf dem Finder-Netzchen, welches wiederum den Zellverdau und die weitere Verarbeitung erleichtert. Die fertiggestellten Grids wurden danach bei -20°C eingefroren. Zurück bleibt auf dem Finder-Netzchen die durch das ausgehärtete Lexan stabilisierte Replika.

2.10.3 Immunolabeling für Lexan-stabilisierte Gold-Grids

Die Finder-Netzchen wurden in einem Tropfen PBS vorsichtig von den Kupfer-Trägerplättchen gelöst. Für den SDS-Verdau wurden die Gold-Grids in Schraubgefäßen auf einem Schüttler bei 48°C und 300 rpm über Nacht mit je 2 ml SDS-Lösung (2,5% (w/v) in 10 mM TRIS-HCl, pH 8,9) behandelt. Am darauffolgenden Tag wurde die SDS-Lösung gegen 100 µl Collagenase D (2% (w/v) in 0,15 M SPB) für eine 90-minütige Behandlung (37°C, 100 rpm) ausgetauscht. Anschließend erfolgten zwei 5-minütige Waschschrte bei 300 rpm mit SPB, gefolgt von der Inkubation in *labeling blocking buffer* (LBB: 10%iges NGS mit 1,5%iger Teleost-Gelatine in 0,15 M SPB) für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden je 50 µl entsprechende Primärantikörper-Lösung (in LBB, Inkubation über Nacht) auf die Replikas aufgetragen. Eine Übersicht der verwendeten Antikörper geben Tab. 1 und Tab. 2 wieder. Es folgten drei aufeinanderfolgende LBB-Waschschrte (bei 300 rpm, für 7 Minuten). Nachfolgend wurden 50 µl Sekundärantikörper-Lösung auf die Finder-Netzchen aufgetragen und die Behandlung durch leichtes Schütteln (<100 rpm) über Nacht in feuchter Atmosphäre bei Raumtemperatur komplettiert. Die an die Sekundärantikörper gebundenen Gold-Partikel mit ihrer hohen elektronenmikroskopischen Dichte und kleinen Größe eignen sich als sehr gute Marker auf den Replikaflächen (Robenek and Severs 2008). Das *Labeling* wurde am letzten Tag durch abschließende Waschschrte mit LBB (3 x 10 Minuten), SPB (1 x 10 Minuten) und dH₂O (2 x 2 Minuten) vervollständigt und die Grids auf Filterpapier getrocknet. Als Nächstes wurde erneut eine abschließende 20 nm dicke Kohleschicht, der *Carbon backcoat*, mit Hilfe der BAF060 aufgetragen. Der Kohle-Film stabilisiert den Halt der Goldpartikel auf der Replika (Rash et al. 1997).

2.10.4 Entfernung des Lexans (*DeLex*)

Abschließend wurde das Lexan entfernt (Rash et al. 1997). Hierzu wurde jedes Finder-Netzchen zehn Mal in auf 80°C erhitztes DCE (in einer PFTE-Schale) getaucht und nach jedem Herausnehmen auf Filterpapier trocken getupft. Der gesamte Prozess wiederholte sich dreimal in heißem DCE. Danach wurden die Finder-Netzchen einer weiteren Behandlung in mit 10 ml DCE gefüllten Schraubgläschen über Nacht und unter leichtem Schütteln (<100 rpm) unterzogen.

Der zweite Teil des *DeLex* umfasste das zehnminütige Erhitzen bei 80°C, erneutes Eintauchen der Finder-Netzchen in siedendes DCE und anschließendes Abtupfen auf Filterpapier. Dies wurde

insgesamt drei Mal mit jeweils frischem DCE wiederholt. Analog dazu wiederholte sich der Vorgang mit DCE bei Raumtemperatur, wobei jedes Grid zehn Mal in frisches DCE eingetaucht und schließlich getrocknet wurde.

2.10.5 Auswertung der FRIL-Proben

Die fertigen Replikas wurden unter Zuhilfenahme des FEI Technai G² Transmissions-Elektronenmikroskops bei 100 kV nach gelabelten IMP und Gap Junction-Plaques abgesucht. Der Elektronenstrahl des Elektronenmikroskops kann die Fläche der Replika leicht passieren, die im nachfolgenden *Immunolabeling* gebundenen Goldpartikel sind hingegen so elektronendicht, dass sie leicht gegen den Hintergrund abgegrenzt werden können (Robenek and Severs 2008). Auch nicht gelabelte Gap Junctions, welche die charakteristische Ultrastruktur aufweisen, wurden berücksichtigt. Die Fotoaufnahmen stammen von einer 8-bit Kamera (Olympus) und wurden in der 98.000-fachen oder 150.000-fachen Vergrößerung aufgenommen. Gelabelte Plaques wurden stets in zwei um 8° versetzten Winkeln aufgenommen und mit einer Stereobrille betrachtet, um sie später von „unspezifischem Labeling“ abzugrenzen (vgl. Kapitel 2.10.6). Die semiquantitativen und quantitativen Analysen, Auswertung und Bearbeitung der Bilder erfolgten mit den Bildbearbeitungsprogrammen ImageJ (Schneider et al. 2012) und Adobe Photo-Shop.

Über eine semiquantitative/qualitative Analyse der Bilder wurde das Ausmaß von partikelfreien Stellen und „Straßen“ genauer untersucht. Bei partikelfreien Lücken handelt es sich beispielsweise um einzelne Stellen oder Bereiche, an denen einzelne Partikel (1-2) zu fehlen scheinen bzw. die Gap Junction sehr aufgelockert ist. Des Weiteren wurden Gap Junctions mit partikelfreien Korridoren bzw. Straßen gezählt. Als partikelfreie Straßen wurden Bereiche definiert, in denen über eine Länge oder Breite, welche vier Partikel oder mehr entspricht, keine Partikel zu finden waren. Um festzustellen, ob sich mehrere Gap Junctions nebeneinander auf der Zellmembran befinden, wurde zusätzlich die Anzahl der Bilder gezählt, auf denen im Abstand von $>0,1 \mu\text{m}$ zwei oder mehrere Gap Junctions abgebildet waren. Zuletzt wurde außerdem nach Gap Junctions gesucht, welche innerhalb ihrer Fläche mehrere kleinere Grüppchen bilden. Hier waren nicht nur einzelne Partikel durch partikelfreie Straßen abgegrenzt, sondern die Ausbildung dieser Straßen führte gleichzeitig zu Grüppchenbildung innerhalb einer Gap Junction. Für jedes Kriterium wurde die Anzahl der darauf zutreffenden Gap Junctions bestimmt und der prozentuale Anteil der Gesamtzahl gebildet.

Außerdem erfolge noch eine quantitative Auswertung anhand der Untersuchungskriterien Fläche, Umfang, Anzahl der IMP insgesamt, $\text{IMP}/0,01 \mu\text{m}^2$ sowie die *Nearest Neighbour Distance* (NND). Die *Nearest Neighbour Distance* ist der Mittelwert, welcher aus den kürzesten Abständen aller in einem Raum verteilten Punkte zu ihrem nächsten Nachbarn gebildet wird. Hierdurch wurde ermöglicht, eine quantitative Aussage über die Verteilung IMP innerhalb einer Gap Junction zu treffen. Fläche und Umfang wurden mit den Ausmessungsfunktionen von ImageJ vermessen. Das Beziffern der IMP oder Goldpartikel leistete die Funktion *Cell Counter*, mit welcher durch Anwählen der Zielstrukturen (in verschiedenen Farbcodes) die genaue Anzahl bestimmt werden konnte.

Das Auszählen der IMP und der Goldpartikel ermöglicht aber auch die Multi-Point-Auswahl Funktion. Diese ist gleichzeitig die Voraussetzung dafür, damit das Plugin bzw. dessen Algorithmus zur Berechnung der *Nearest Neighbour Distance* (NND) angewandt werden kann (Mao 2016). Die Bilddatei muss hierfür in ein 8-bit-Format umgewandelt werden. Wichtig ist, dass beim Setzen der *Multi-Points* die Marker genau in die Mitte der IMP gesetzt werden. Dies kann durch schräge Aufnahmewinkel oder aufgrund der Beschaffenheit der Replika erschwert werden. Außerdem sollten für ein Bild die Marker bei jedem Partikel an die gleiche Stelle gesetzt werden. Diese Maßnahme muss stets beachtet werden, damit die Abstände zwischen den einzelnen Partikeln aussagekräftig sind. Das *Multi-Point-Tool* zeigt bei jedem Markieren eines IMP die Nummer und somit die Anzahl der gezählten Partikel an. Die Anzahl der IMP konnte im Folgenden auf die Fläche von $0,01 \mu\text{m}^2$ hochgerechnet werden. Die Ergebnisse wurden in einer Microsoft Excel-Tabelle zusammengetragen und mit dem Statistikprogramm Prism (Graph-Pad) ausgewertet.

2.10.6 Unterscheidung spezifisches/unspezifisches Labeling

Zur Differenzierung, ob die Antikörper-gekoppelten Goldpartikel korrekterweise spezifisch an die Replika gekoppelt waren oder unspezifisch an Geweberesten bzw. am Lexan im Verlauf der Bearbeitung hängen geblieben waren, wurden die Bilder stets in 8° versetzten Winkeln aufgenommen. Hintergrund hiervon ist, dass Gold-Partikel optisch innerhalb des Bereichs einer Gap Junctions-Fläche liegen können. Bei unspezifischem Labeling sind diese jedoch an der Oberseite der Replika im Lexan hängengeblieben, und nicht durch die Antikörper-spezifische Bindung an Cx43 entstanden. Die winkelvesetzten Bilder ermöglichten im Nachhinein, die Bilder stereotypisch zu betrachten und die Position des Goldes in Bezug zur Replika zu bewerten (Rash and Yasumura 1999).

2.11 Scrape Loading/Dye Transfer Assay

Das *Scrape Loading/Dye Transfer Assay* (SL/DT) -Verfahren ist ein Verfahren zur Überprüfung der interzellulären Kommunikation durch Gap Junctions. Grundlage dieser Analyse bildet die Aufnahme von zwei verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen, eines hoch- und eines niedermolekularen, in mit einem Skalpell verletzten Zellen. Der hochmolekulare Farbstoff verbleibt dabei in den verletzten Zellen, während der niedermolekulare Farbstoff in über Gap Junctions kommunizierende Zellen weitergegeben wird. Es handelt sich hierbei um eine häufig verwendete Technik, welche einfache und schnelle Untersuchungen großer Zellpopulationen ermöglicht. Entwickelt wurde die Technik von El-Fouly et al. (1987), weiterentwickelt von Babica et al. (Babica et al. 2016). Bei dem niedermolekularen Farbstoff handelt es sich um das Dilithium Salz von Lucifer Yellow-Hydrazin (LY, MW 457 Da). Rhodamin-Dextran (Rh-D, MW 10.000 Da) verbleibt in den angekratzten Zellen, da es aufgrund seiner Größe Gap Junctions nicht passieren kann. Die Menge des von den Zellen weitergegebenen LY ist folglich von der Anzahl funktionierender Gap Junctions abhängig. Demzufolge ermöglicht der *Scrape Loading/Dye Transfer Assay* eine qualitative und quantitative Aussage über die Gap Junction-vermittelte interzelluläre Kommunikation (*gap junctional intercellular communication*; GJIC).

Die Astrozyten von jeweils drei verschiedenen Würfeln waren auf 35 mm-Zellkulturschalen ausgesät worden. Die Zellen wurden entweder mit PBS (als Kontrolle) oder mit 0,5 M Sucrose-Lösung inkubiert. Darüber hinaus waren Zellkulturschalen mit PBN- sowie mit CBX-versetzten PBS- und Sucrose-Lösungen verwendet worden, analog zur Vorbereitung in Kapitel 2.6. Die PBN-stimulierten Astrozyten dienten als Negativkontrolle, da PBN andere, farbstoffdurchlässige Kanäle, die Pannexin1-Kanäle, inhibiert. Zusätzlich gab es noch Astrozytenproben, welche mit Sucrose und CBX bzw. Sucrose und PBN stimuliert worden waren. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden Lucifer-Yellow (LY) (1 mg/ml in Ca^{2+} - Mg^{+} -PBS) und Rhodamin-Dextran (Rh-D) (10 mg/ml in Ca^{2+} - Mg^{+} -PBS) auf die Zellschicht gegeben. Die zusätzlich enthaltenen Ca^{2+} - Mg^{+} -Ionen halten die Zell-Adhäsion aufrecht und schützen die Zellschicht davor, sich von der Zellkulturschale abzulösen. Damit die Zellen den Farbstoff aufnehmen, mussten diese mit einer 0,4x40 mm-starken Kanüle zwei- bis dreimal parallel zueinander angeritzt werden. Es folgte ein weiterer 8-minütiger Inkubationsschritt im Dunkeln mit Ca^{2+} - Mg^{+} -PBS-Lösung bevor die Proben mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert wurden. Zur fotografischen Dokumentation wurden Belichtungszeiten für die LY-Bilder von 1034 ms und für die Rh-D-Bilder von 150 ms angewandt. Die verwendeten Filter waren für Rh-D 43 HE und für LY 38 HE. Jede Kulturschale wurde in 10-facher Vergrößerung entlang des Kratzers fotografiert, sodass pro Schale mindestens 5 Bilder entstanden.

2.11.1 Auswertung des SL/DT-Assays

Die Bilder wurden anschließend mit Hilfe der ImageJ-Software und Microsoft Excel ausgewertet. Dies erfolgte mit Hinblick auf die Distanz, die der Farbstoff in den Zellen unter den verschiedenen Bedingungen zurückgelegt hatte. Hierbei spiegelt sich die zurückgelegte Distanz in Veränderungen der

Graustufen in Abhängigkeit der damit verbundenen Pixel wider. Das Auswertungsverfahren erfolgte in Anlehnung an eine Methode, die von Begandt et al. entwickelt wurde (Begandt et al. 2010), und wurde mit der Hilfe von ImageJ abgeschlossen.

Die Bilder wurden zunächst in 8-bit Dateien umgewandelt, der Maßstab auf die Einheit Pixel zurückgesetzt sowie der Kontrast angepasst. Danach wurden die Bilder ausgerichtet, sodass der für die Farbstoffaufnahme erzeugte Kratzer senkrecht verläuft. Die zurückgelegte Distanz des Farbstoffes wurde an verschiedenen Stellen in den Bildern ermittelt (vgl. Abb. 8). Mit der Funktion *Rectangular selection* wurden Rechtecke mit einer Höhe von 200 Pixeln über verschiedene Stellen mit gefärbten Zellen gelegt. Zunächst wurde zum Festlegen des Hintergrundwertes das Rechteck in den Hintergrund bewegt und mit dem entsprechenden Plugin der gemittelte Grauwert des Hintergrundes festgestellt. Zur Darstellung des Ausbreitungsweges des Farbstoffes wurde das Rechteck danach in der Länge vergrößert. Das Rechteck begann an den durch das Skalpell verletzten Zellen und endete im Hintergrund. Mittels der Funktion *Plot Profile* konnte für diesen Bereich das Profil mit den gemittelten Graustufen erzeugt werden. Dies zeigt die Veränderungen der Grauwerte in Abhängigkeit der Strecke, welche in Pixel angezeigt wird. Die zurückgelegte Wegstrecke des Farbstoffes bildete schlussendlich der Pixelwert ab, an welchem der Grauwert den gemittelten Grauwert des Hintergrundes unterschreitet. Es resultierte als zurückgelegte Wegstrecke des Farbstoffes die Distanz in Pixel. Für jedes Bild wurden aus mind. zwei gebildeten Distanzen die Mittelwerte mit SEM berechnet. Für jede Versuchsgruppe wurden mind. drei Fotos ausgewertet. Das verwendete Zellmaterial stammte von drei unabhängig voneinander präparierten Würfeln (PBS- bzw. Sucrose-stimuliert, bzw. jeweils +CBX/+PBN). Die zugehörige Statistik wurde mit Graph Pad Prism berechnet und statistisch ausgewertet.

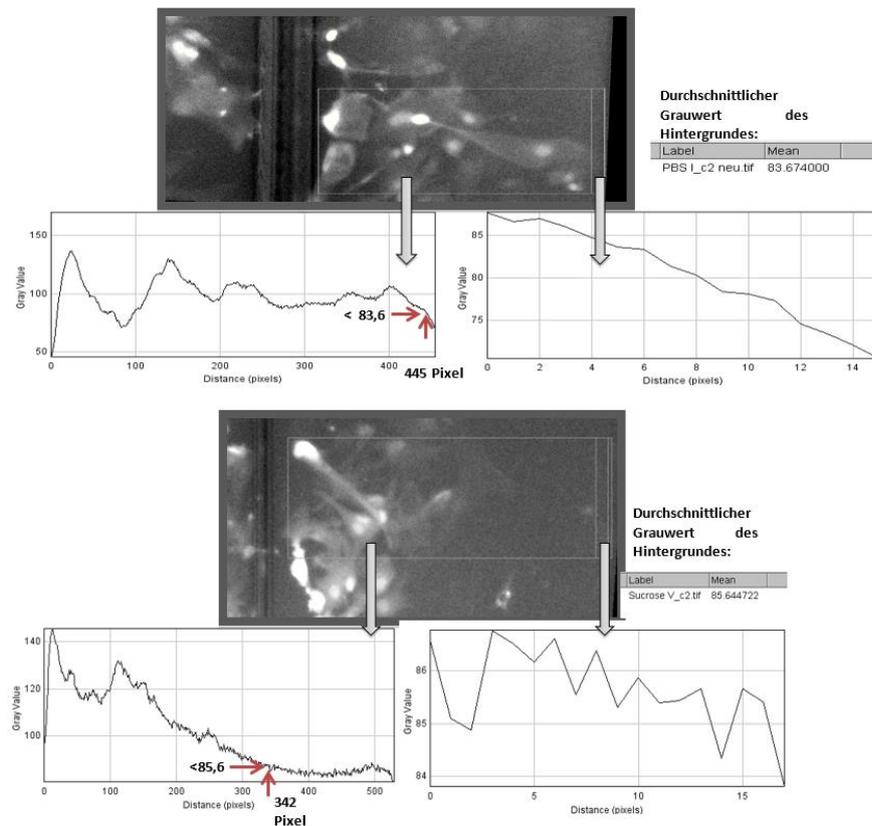


Abb. 8: Vorgehen bei der Auswertung des SL-/DT-Assays. Die Abbildung zeigt exemplarisch das Vorgehen bei der Auswertung der SL-/DT-Assays mit Hilfe von ImageJ am Beispiel eines Bildes aus der PBS-Gruppe (oberer Teil) und aus der Sucrose-Gruppe (unterer Teil). Zunächst wurde ein Orientierungskästchen mit einer Höhe von 200 Pixeln gezeichnet. Durch Bewegen des Kästchens mit dem Mauszeiger konnte mittels der ImageJ-Software der mittlere Grauwert des Hintergrundes bestimmt werden. Anschließend wurde das Kästchen so vergrößert, dass alle Zellen abgebildet werden konnten. Das Kästchen sollte an den angekratzten Zellen beginnen und im Hintergrund enden. Mit Hilfe der Funktion Plot-Profil konnten die Grauwerte für jeden Pixel dargestellt werden. Zur Festlegung der Distanz in Pixel, die der Farbstoff zurückgelegt hatte, wurde im Plot-Profil der erste Wert gesucht, welcher niedriger als der Grauwert des Hintergrundes war.

2.12 Statistische Auswertung

Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism, welche zunächst die Daten mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests auf Normalverteilung überprüfte. Im Falle einer Normalverteilung erfolgte die weitere Auswertung unter Zuhilfenahme des parametrischen zwei-geteilten t-Tests. Konnte für die Daten eine Normalverteilung ausgeschlossen werden, wurden der Mann-Whitney-Test bzw. Kruskal-Wallis-Test angewandt.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Reinheitsbestimmung der Astrozytenkulturen

Der Anteil der GFAP-positiven Zellen betrug in den verwendeten Würfeln für die Astrozytenkulturen im Mittel 82,3% ($\pm 2,4$ SEM).

3.2 Analysen zur mRNA-Expression nach Sucrose-Behandlung

3.2.1 Die Expression der Astrozyten-Proteine GFAP und AQP4 verändert sich nach 5-minütiger Sucrose-Stimulation nicht

Abb. 9 zeigt die graphische Darstellung der relativen Expression von GFAP (A) sowie von AQP4 (B) als typische Astrozytenproteine unter den Versuchsbedingungen. Sowohl für die GFAP mRNA-Expression ($p = 0,6667$) als auch für AQP4 mRNA-Expression ($p = 0,5407$) können keine signifikanten Unterschiede zwischen Sucrose-Gruppe und Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden. Die relative Expression von GFAP unter Sucrose-Behandlung beträgt im Mittel 1,185 ($\pm 0,285$) und von AQP4 1,231 ($\pm 0,345$) (normiert auf PBS=1). Die entsprechenden Berechnungen erfolgten im Fall von GFAP mit dem Mann-Whitney-Test sowie im Fall von AQP4 aufgrund von Normalverteilung mit dem 2-seitigen t-Test.

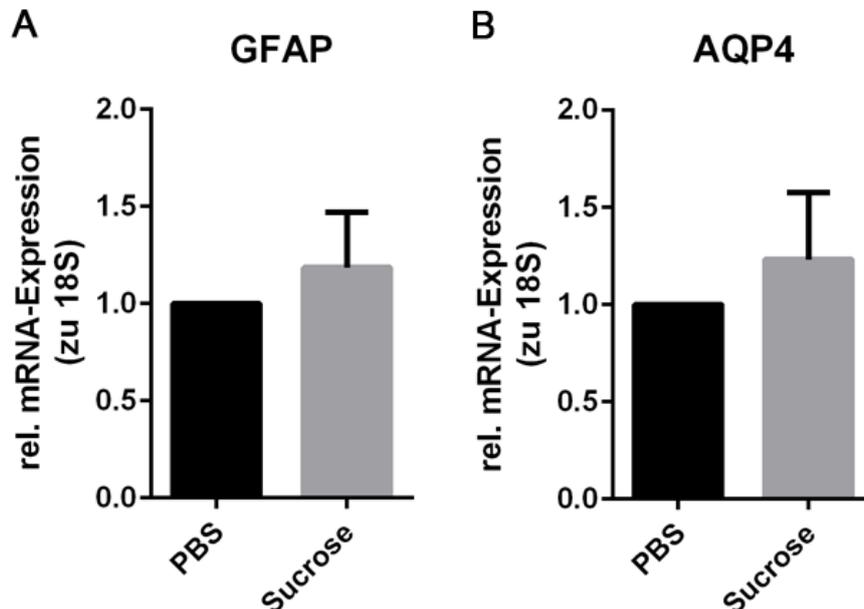


Abb. 9: Relative Expression von GFAP und AQP4 unter Kontrollbedingungen und Sucrose-Behandlung. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte sowie deren Standardfehler. (A) Die nicht normalverteilten Ct-Werte ($2^{-\Delta\Delta}$) von GFAP wurden mittels Mann-Whitney-Test statistisch ausgewertet und ergaben keine signifikante Zunahme der Expression von GFAP ($p > 0,05$). (B) Für die statistische Berechnung der Expression von AQP4 wurde aufgrund der Normalverteilung ein 2-seitiger t-Test durchgeführt ($p > 0,05$). Auch hier konnte keine signifikante Veränderung der relativen mRNA-Expression in Sucrose im Vergleich zu PBS festgestellt werden.

3.2.2 Auswirkungen der 5-minütigen Stimulation mit hyperosmolarer Sucrose-Lösung auf die Membranproteine Cx43 und ZO-1

Da ZO-1 mit Cx43 vergesellschaftet ist, wurde die Expression dieser beiden Proteine näher beleuchtet. Wie Abb. 10 A) zeigt, konnte keine signifikante Zunahme von Cx43-codierender mRNA nach 5-minütiger Sucrose-Behandlung nachgewiesen werden ($p = 0,6667$). Die im Mittel errechnete relative Expression von Cx43 beträgt $1,097 (\pm 0,274)$. Die statistische Auswertung erfolgte aufgrund fehlender Normalverteilung mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests.

Die relative Expression des Membranproteins ZO-1 nahm unter Sucrose-Behandlung signifikant zu ($p = 0,0390$). Der Mittelwert der relativen Expression von ZO-1 unter Sucrose-Behandlung betrug $1,538 (\pm 0,178)$. Abb. 10 B) zeigt eine starke Zunahme des mRNA-Gehaltes im Vergleich zur Kontrollgruppe, was mittels ungepaarten t-Tests analysiert wurde. In diesem Versuch ließ Sucrose die relative Expression von ZO-1 im Vergleich zu PBS um $0,538$ ansteigen.

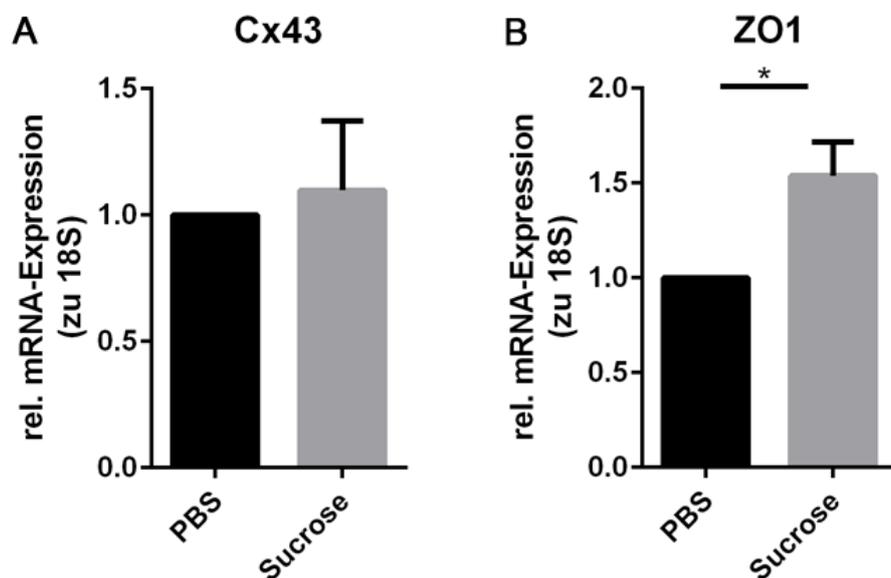


Abb. 10: Darstellung der Expression von Cx43 und ZO-1 unter PBS- und Sucrose-Behandlung. A) Zwischen PBS- und Sucrose-Behandlung ergibt sich hinsichtlich der Expression von Cx43 kein signifikanter Unterschied. Zur statistischen Erfassung wurde ein Mann-Whitney-Test durchgeführt ($p > 0,05$). Die normalverteilten Ct-Werte ($2^{-\Delta\Delta}$) der Expression von ZO-1 wurden mittels zweigeteiltem t-Test- statistisch ausgewertet. B) Hier konnte mittels ungepaartem t-Test eine signifikante Zunahme der ZO-1-Expression nach 5-minütiger Sucrose-Behandlung nachgewiesen werden (* $p < 0,05$).

3.3 Proteinanalysen von Cx43 nach Sucrose-Behandlung

Um Veränderungen in Astrozyten auf Protein-Ebene zu untersuchen, wurden Immunoblots angefertigt. Ziel war es, Veränderungen im Cx43-Protein-Gehalt der Astrozyten sowie deren Phosphorylierungsstatus unter Kontroll- und Versuchsbedingungen näher zu beleuchten. Hierbei wurde u. a. der panCx43-Antikörper verwendet (Tab. 1). Dieser zeigt das native, unphosphorylierte Cx43-Protein auf einer Höhe von 43 kDa an (P0, *Non-phosphorylated* (NP)). Zusätzlich können die zwei phosphorylierten Isoformen von Cx43 detektiert werden, die aufgrund der zusätzlichen Molekülmasse etwas langsamer wandern, sodass sich die entsprechenden Banden ggf. über der nativen Bande präsentieren (P1 und P2) (Lampe and Lau 2004).

3.3.1 Hyperosmolare Sucrose-Lösung hat keine Auswirkung auf die Proteinmenge von panCx43

Die Immunoblots mit panCx43-Antikörpern zeigten, dass die hyperosmolare Stimulation nahezu keine Veränderungen in der Signalintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkte. Das Säulendiagramm zeigte zwar eine Abnahme der Signalintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS), die Veränderungen waren jedoch nicht signifikant ($p = 0,3188$). Der Kolmogorow-Smirnow-Test ergab, dass die Daten normalverteilt waren. Die Signalintensitäten wurden mittels ungepaartem t-Test ausgewertet, wobei die Signalintensitäten der Kontrollgruppe auf den Referenzwert 1 gesetzt wurden. Die Signalintensitäten der mit Sucrose-Lösung behandelten Astrozyten betragen im Mittel 0,8102 ($\pm 0,1809$ SEM).

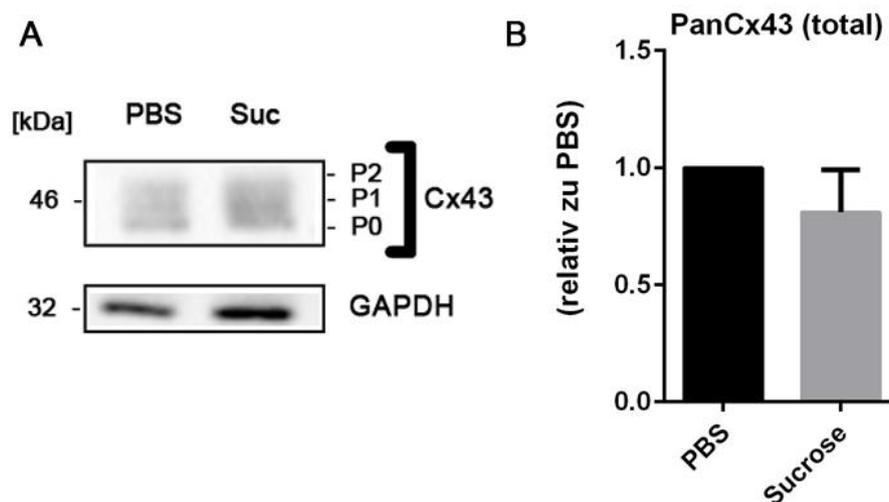


Abb. 11: Hyperosmolare Sucroselösung bewirkte keine Veränderungen in der Signalintensität von panCx43. In A) sind die fotografierten Membranen des Immunoblots dargestellt. Der obere Teil der Abbildung zeigt die verschiedenen Isoformen von phosphoryliertem Cx43, wobei es optisch zu einer Zunahme der Signalintensitäten von phosphoryliertem Cx43 zu kommen scheint. B). Die Quantifizierung der Signalintensitäten von panCx43 relativ zur Kontrolle ($0,8101 \pm 0,1801$ SEM) zeigte keine signifikante Veränderung im panCx43-Proteingehalt nach Sucrose-Behandlung ($p > 0,05$).

3.3.2 5-minütige Stimulation mit Sucrose-Lösung bewirkt eine Zunahme der Phosphorylierung von Cx43 an S368

Der Immunoblot für die Darstellung von pCx43 S368 enthüllte, dass die 5-minütige Stimulation mit hyperosmolarer Sucrose-Lösung eine signifikante Zunahme der Signalintensität von pCx43 bewirkte ($p = 0,0286$). Mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft. Zur statistischen Auswertung wurden die Veränderungen analog zu dem panCx43-Immunoblot in Relation zur PBS-Gruppe (Signalintensität = 1) verglichen und mittels Mann-Whitney-Test ausgewertet. Die 5-minütige Sucrose-Behandlung hatte zur Folge, dass die relative Signalintensität von pCx43 im Mittel auf eine Signalintensität von $8,792 (\pm 5,77 \text{ SEM})$ zunahm.

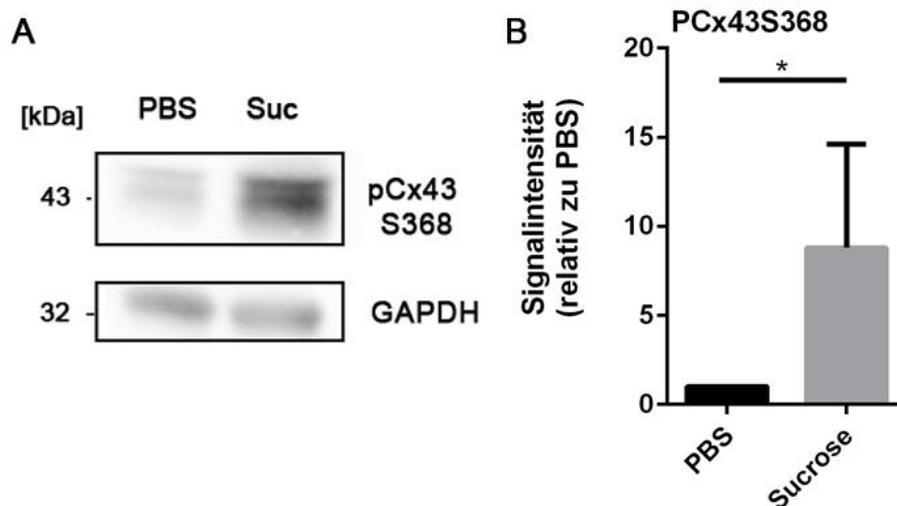


Abb. 12: 5-minütige Stimulation mit Sucrose-Lösung bewirkt eine signifikante Zunahme von pCx43 S368. Das dargestellte Histogramm zeigt eindrücklich, dass eine 5-minütige Stimulation mit Sucrose-Lösung eine signifikante Zunahme der Signalintensität von pCx43 S368 im Mittel auf einen Wert von $8,792 (\pm 5,77 \text{ SEM})$ ($p = 0,0286$, $*p < 0,05$) zur Folge hat. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test.

3.4 Die Visualisierung der Gap Junctions mittels FRIL zeigte morphologische Veränderungen nach Sucrose-Stimulation

Die Cx43-Gap Junctions wurden auf ultrastruktureller Ebene analysiert. Hierzu wurden Gefrierbruch-Replikas angefertigt, eine Cx43-Immunmarkierung durchgeführt (vgl. Kapitel 2.10) und die Ultrastruktur der Gap Junctions elektronenmikroskopisch untersucht. Über diese Methode sind spontane Veränderungen der Gap Junction-Morphologie - unabhängig von Transkription und Translation der Connexine - darstellbar.

3.4.1 Signal-to-Noise Ratio und Labeling-Effizienz

Um die Spezifität des *Immunolabelings* zu bestimmen, wurden die sogenannte *Signal-to-Noise Ratio* sowie die *Labeling*-Effizienz berechnet. Berechnungen von Fujimoto et al. und Rash et al. ergaben, dass 12 nm-Gold Partikel erfolgreiches Labeling anzeigen, wenn sie sich maximal im Umkreis von 30 nm einer Gap Junction befinden (Rash and Yasumura 1999, Rash et al. 2004, Rash et al. 1997). Die *Signal-to-Noise Ratio* spiegelt das Verhältnis von 12 nm-Gold auf Gap Junction-Flächen zu Membranflächen außerhalb von Gap Junctions wider (Rash and Yasumura 1999). Sie betrug jeweils für die drei Replikas, die von den Astrozyten der Kontrollgruppe hergestellt wurden, im Durchschnitt 1:1315, 1:1843 und 1:3036. Die Replikas der Astrozyten, welche mit Sucrose-Lösung stimuliert wurden, wiesen eine *Signal-to-Noise Ratio* von 1: 1879, 1:1997 und 1:77 auf.

Die Labeling-Effizienz errechnet sich aus dem Verhältnis der gezählten Intramembranpartikel der Gap Junctions und der Anzahl von 12 nm-Immuno-Gold (Rash and Yasumura 1999, Rash et al. 1997). Hier ergaben sich für die Replikas der Kontrollgruppe eine *Labeling*-Effizienz von 1:158, 1:118 und 1:29, während sie für die Replikas der Sucrosegruppe 1:115, 1:36 und 1:226 betrug.

3.4.2 Stimulation von Astrozyten mit hyperosmolarer Sucrose-Lösung führt zu morphologischen Veränderungen der Gap Junctions

Die Nomenklatur und allgemeine Vorgehensweise zur Beschreibung elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Gap Junctions ist in Kapitel 1.2.1 dargestellt. Abb. 13 und Abb. 14 zeigen exemplarisch elektronenmikroskopische Aufnahmen der Gap Junctions jeweils aus der PBS-Kontrollgruppe (blau hinterlegt) und Sucrose-Gruppe (rot hinterlegt). Insgesamt waren 84 Bilder aus der PBS-Gruppe und 102 Bilder von Sucrose stimulierten Astrozyten ausgewertet worden. Bereits beim ersten Überblick scheinen die Partikel der Kontrollgruppe regelmäßiger angeordnet sowie enger gepackt zu sein als die Partikel in Proben nach Sucrose-Behandlung. Wie in der Literatur charakteristisch beschrieben, konnte unter Kontrollbedingungen eine Gap Junction (Abb. 13 A) mit nahezu hexagonaler Anordnung der Partikel gefunden werden (Kamasawa et al. 2006). Abb. 13 zeigt exemplarisch zwei Gap Junctions, die jeweils eine Fläche von $0,006 \mu\text{m}^2$ (A) bzw. $0,025 \mu\text{m}^2$ (B) erreichten. Die Partikel der in Abb. 13 A abgebildeten Gap Junction, welche aus der Kontrollgruppe stammte, weisen einen NND von $0,0082 \mu\text{m}$ auf. Auf einer Fläche von $0,01 \mu\text{m}^2$ befanden sich dabei 102 Partikel. Ähnliche Werte fanden sich für

die Gap Junction in Abb. 13 B, welche ebenfalls unter Kontrollbedingungen gefunden wurde. 101 Partikel befinden sich auf einer Fläche von $0,01 \mu\text{m}^2$. Im Kontrast hierzu führte die Sucrose-Behandlung (Abb. 13 C und D) zu Gap Junctions mit unregelmäßig angeordneten Partikeln sowie einem größeren Abstand zwischen den Partikeln. Abb. 13 C zeigt einzelne partikelfreie Areale zwischen den Partikeln. Diese Besonderheit wurde mehrfach in Gap Junctions von Sucrose-behandelten Astrozyten gefunden und hatte auch zur Folge, dass die Anzahl der Partikel pro Fläche ($0,01 \mu\text{m}^2$) abnahm. Im Fall der Gap Junction in C betrug die Anzahl der Partikel pro $0,01 \mu\text{m}^2$ 87,2, während die Anzahl der Partikel in Abb. D 80,8 betrug.

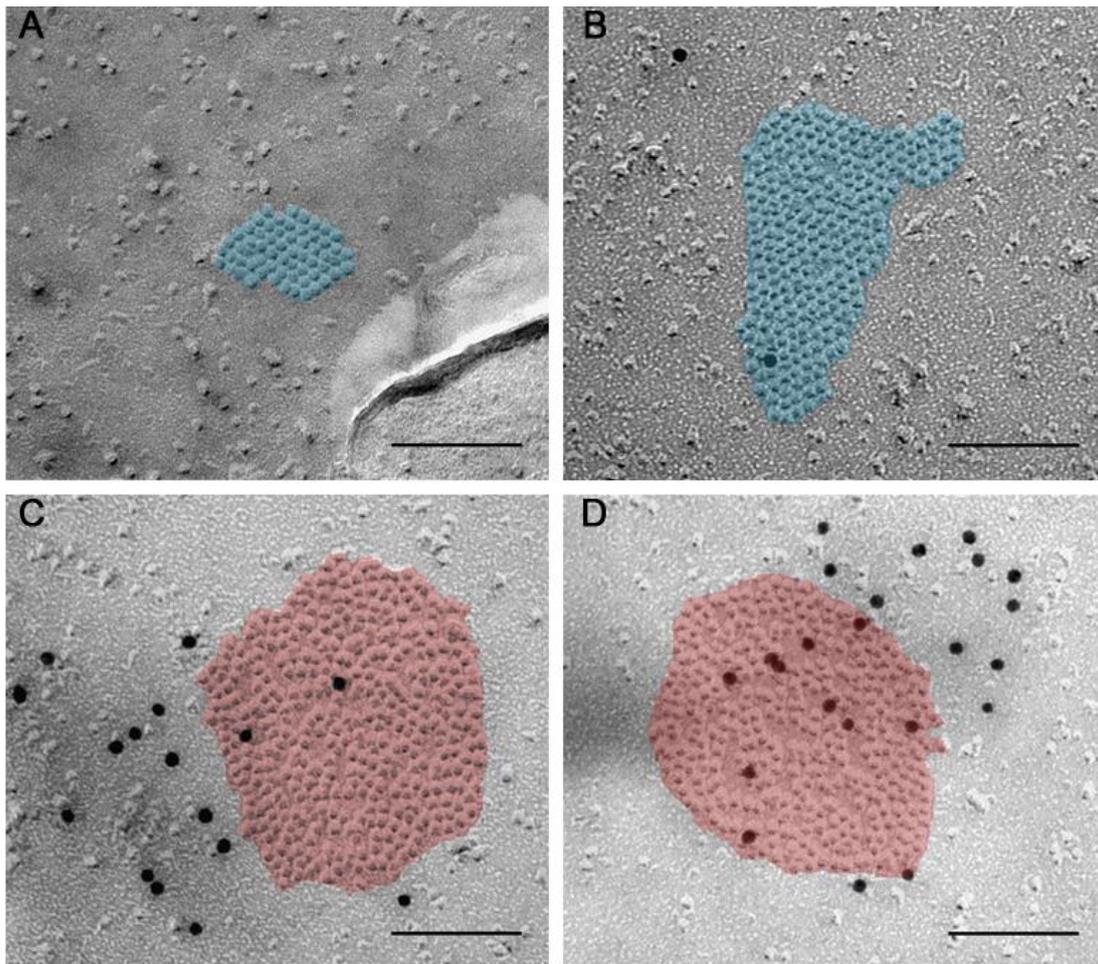


Abb. 13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gap Junctions nach PBS- und Sucrose-Stimulation. Alle abgebildeten Gap Junctions wurden nach der Replikation im Immunogoldlabeling mit 12 nm Gold markierten sekundären Antikörpern gegen Cx43 (*schwarze Punkte*) visualisiert. Der Maßstab entspricht einer Strecke von $0,1 \mu\text{m}$. Dies spricht folglich für das Vorhandensein von Cx43-haltigen Gap Junctions (in Abb. A fehlt Gold-Markierung, Erscheinungsbild spricht aber für Gap Junction). A) und B) zeigen exemplarisch Gap Junctions von Astrozyten, welche als Kontrollgruppe mit PBS-Lösung behandelt wurden. A) Replizierte Membran einer Gap Junction mit der bekannten hexagonalen und regelmäßigen Anordnung der Partikel. Bei einer Fläche von $0,006 \mu\text{m}^2$ beträgt der NND zwischen den Partikeln $0,0082 \mu\text{m}$. Auf einer Fläche von $0,01 \mu\text{m}^2$ befinden sich dabei 102 Partikel. B) Gap Junction mit einer Fläche von $0,025 \mu\text{m}^2$, die nahezu der im Mittel festgestellten Fläche in der Kontrollgruppe entspricht ($0,024 \mu\text{m}^2 \pm 0,006$). Auch diese Gap Junction zeigt die typische regelmäßige Anordnung der Partikel. Die Partikel sind eng gepackt, welches zu einem geringen NND-Wert von $0,0083 \mu\text{m}$ führt. Auf einer Fläche von $0,01 \mu\text{m}^2$ finden sich 101 Partikel. C) und D) zeigen beispielhaft das Aussehen der Gap Junctions, wie sie in mit Sucrose-Lösung stimulierten Astrozyten beobachtet wurde. Die Gap Junction in C) hat eine Fläche von $0,042 \mu\text{m}^2$, die Gap Junction in D) weist eine Fläche von $0,039 \mu\text{m}^2$ auf. Beide repräsentieren die durchschnittlich gemessene Fläche der Gap Junctions in der Sucrose-Gruppe ($0,047 \mu\text{m}^2 \pm 0,011$). Beide Bilder zeigen einen aufgelockerten Zustand der Gap Junctions. Auf einer Fläche von $0,01 \mu\text{m}^2$ befinden sich 87,2 (C)

und 80,8 (D) Partikel. Der NND-Wert beträgt für beide Gap Junctions 0,0081 μm . Das Erscheinungsbild beider Gap Junctions wird lediglich durch Partikel gebildet.

Eine weitere Beobachtung, die in der Sucrose-Gruppe gemacht werden konnte, war das Vorkommen von regelrechten Riesen-Gap Junctions (Abb. 14): Auch hier hatte sich die Partikelstruktur stark aufgelockert, die Anzahl der Partikel nahm insgesamt zu, der Abstand zwischen den Partikeln wurde größer und die Kontur wirkte unregelmäßig. Abb. 14 A) und B) zeigen exemplarisch zwei Gap Junctions, die jeweils eine Fläche von 0,35 μm^2 (A) und 0,46 μm^2 (B) erreichten. Hier befinden sich auf einer Fläche von 0,01 μm^2 71,2 (A) und 68 (B) Partikel. Der NND-Wert beträgt für die Partikel der Gap Junction in A 0,0087 μm und für die Partikel der Gap Junction von B 0,0085 μm . Die statistische Auswertung der quantitativen Erfassung folgt in Kapitel 3.4.3.

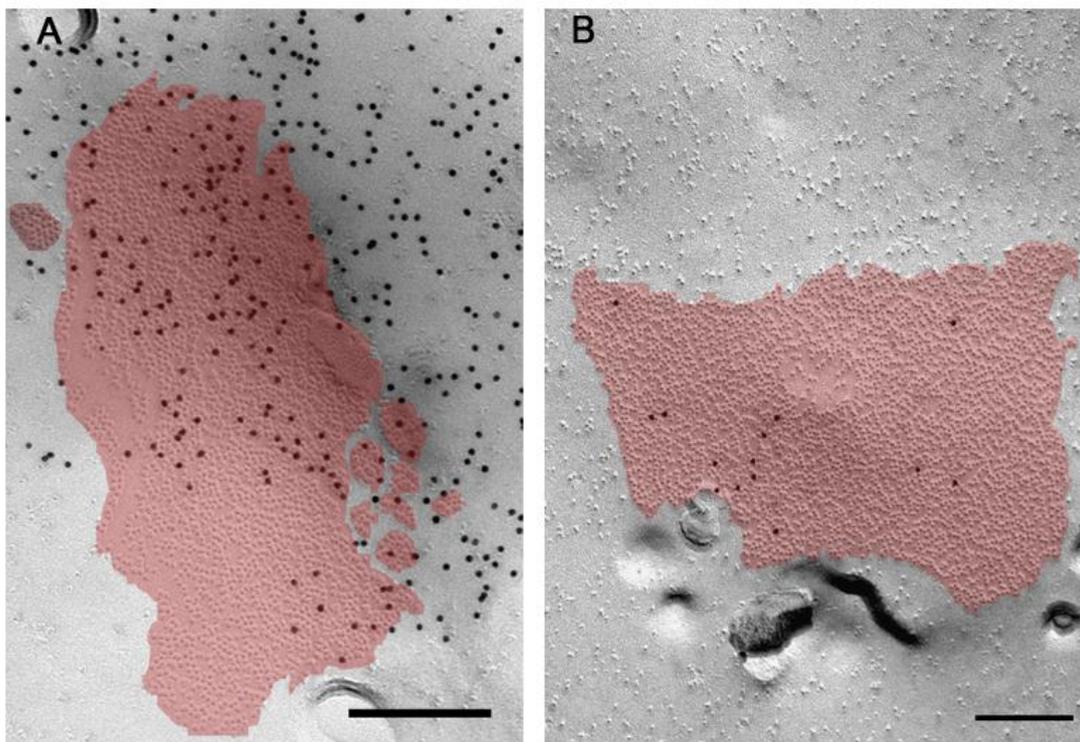


Abb. 14: Riesen-Gap Junctions nach Sucrose-Stimulation. Riesen-Gap Junctions sind in A) und B) dargestellt. Die partikelfreien Bereiche haben sich ausgeweitet und bilden flurartige Straßen zwischen den Partikeln. Auch generell hat sich der Abstand zwischen Partikeln vergrößert, welches sich in einer Zunahme des NND und einer Abnahme der Partikel pro Fläche widerspiegelt. Der Maßstab entspricht jeweils einer Strecke von 0,2 μm .

Außerdem konnte die Veränderung weiterer Parameter festgestellt werden: Astrozyten, welche mit hyperosmolarer Sucroselösung behandelt worden waren, zeigten, wie bereits oben beschrieben, vermehrt partikelfreie Bereiche (orange hinterlegt) innerhalb der Gap Junctions (Abb. 15). Sind diese partikelfreien Flure besonders ausgeprägt, so entstand der Eindruck, als würde die Gap Junction am Rand von mehreren akzessorischen Partikel-Gruppierungen ergänzt, nachfolgend bezeichnet als assoziierte Mini-Gap Junction, wie Abb. 15, A), B) und E) (grüne Pfeile) zeigt. In diesem Fall erscheinen die partikelfreien Bereiche wie Straßen oder Korridore (grün hinterlegt).

In einigen Bildern wurden zudem IMP-Ansammlungen bzw. kleinere Gap Junctions beobachtet, welche sich in der Umgebung größerer Gap Junctions befanden. Dieses Erscheinungsbild zeigen Abb. 15 C und D.

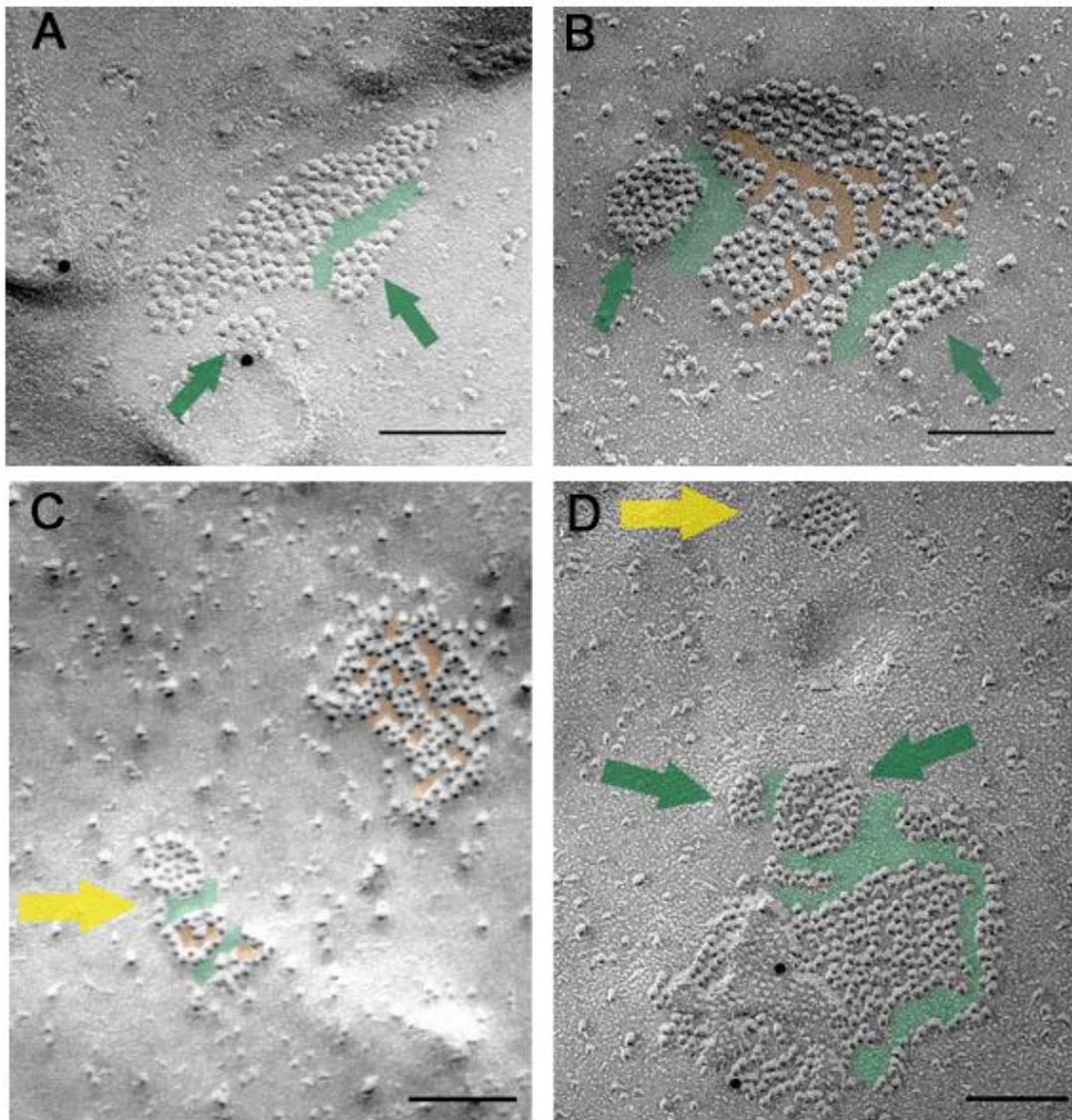


Abb. 15: Partikelfreie Korridore und Grüppchenbildung in Gap Junctions der Sucrosegruppe. Innerhalb einiger Gap Junctions wurden partikelfreie Areale gefunden (orange hinterlegt), welche sich in manchen Gap Junctions durch die gesamte Gap Junction-Plaques wie partikelfreie Straßen/Korridore hindurchzogen (grün hinterlegt). Diese Beobachtung wurde vor allem in Gap Junctions von mit hyperosmolarer Sucrose-Lösung stimulierten Astrozyten gemacht. Abb. C) und D) zeigen ebenso Gap Junctions von Astrozyten, welche mit hyperosmolarer Sucroselösung behandelt wurden. In der unmittelbaren Umgebung einer Gap Junction trifft man häufig auf weitere kleine Gap Junctions (gelber Pfeil). Ein weiteres beobachtetes Phänomen ist die Grüppchenbildung innerhalb einer Gap Junction (A-D, grüne Pfeile). Die Gap Junctions in A) und D) sind nach *Immunolabeling* mit Cx43 und 12 nm-Gold-Partikeln markiert. Der Maßstab entspricht einer Strecke von 0,1 μm .

Der prozentuale Anteil der partikelfreien Lücken sowie der assoziierten Mini-Gap Junctions wurde semiquantitativ erfasst: 27,4% der Gap Junctions der PBS-Gruppe wiesen partikelfreie Lücken auf, während dies in der Sucrose-Gruppe in 46,1% der untersuchten Gap Junctions zutraf (Abb. 16 A). Partikelfreie Straßen wurden in der PBS-Gruppe in 6% der untersuchten Gap Junctions gefunden, während 23,5% der Gap Junctions in der Sucrose-Gruppe diese Morphologie aufwiesen (Abb. 16 B).

Des Weiteren zeigten einige Bilder mehrere benachbarte Gap Junctions, die mehr als $0,1\ \mu\text{m}$ voneinander entfernt waren. Ein größerer Abstand als $0,1\ \mu\text{m}$ spricht dafür, dass es sich um zwei unterschiedliche Gap Junctions handelt. Dieser Befund fand sich bei 2,4% der Bilder der PBS-Gruppe, während 11,8% der Bilder der Sucrosegruppe mehrere Gap Junctions zeigten. Auch Abb. 15 D und E veranschaulichen jeweils eine Gap Junction, in deren Nähe sich eine zweite, kleinere (gelber Pfeil) befindet. Wie Abb. 15 A, B und C zeigen, konnte auch eine Grüppchenbildung innerhalb einer Gap Junction (grüne Pfeile) festgestellt werden. Jene Gruppenbildung konnte bei 1,2% der Gap Junctions der PBS-Gruppe und bei 8,8% der Gap Junctions der Sucrose-Gruppe gefunden werden, grafisch dargestellt in Abb. 16 D.

Diese Ergebnisse lassen sich abschließend folgendermaßen zusammenfassen: Hypertone Sucrose-Behandlung führte zu vermehrter Ausbildung von partikelfreien Arealen innerhalb von Gap Junctions, welche das Ausmaß partikelfreier Straßen und Korridore erreichen können. Gleichzeitig ließen sich unter Sucrose-Behandlung vermehrt akzessorische Mini-Gap Junctions sowie eine vermehrte Anzahl von Gap Junctions an einer Stelle der Membran beschreiben.

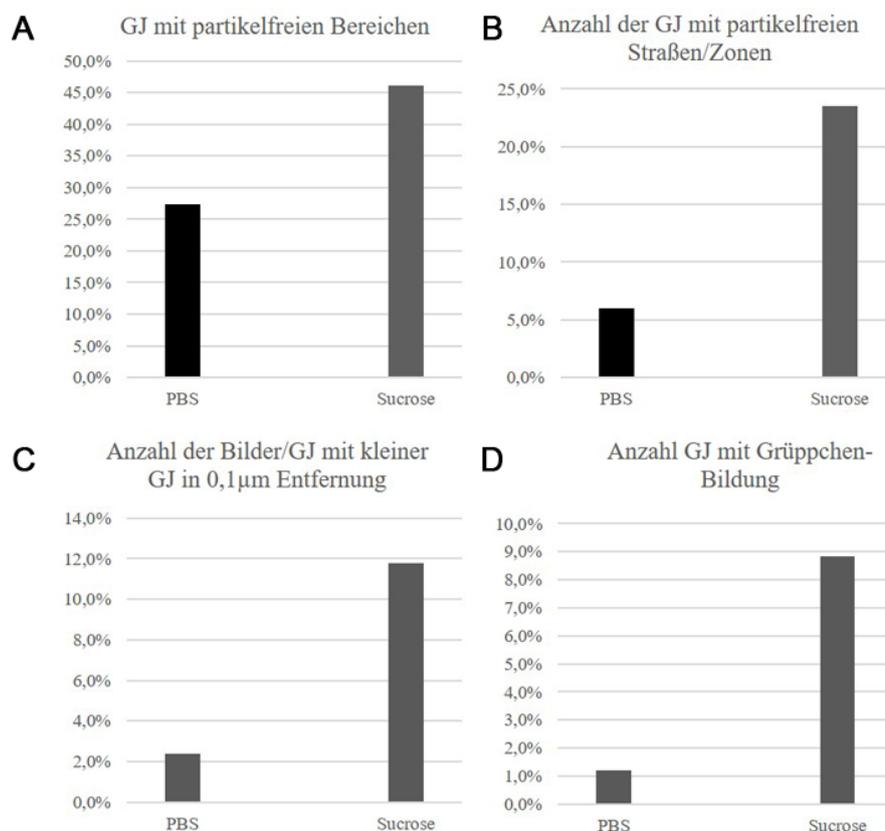


Abb. 16: Darstellung der semiquantitativen Auswertung der FRIL-Bilder. A) zeigt das vermehrte Auftreten von Gap Junctions mit partikelfreien Bereichen unter Sucrose-Behandlung (46,1%) im Vergleich zur PBS-Gruppe (27,4%). Die partikelfreien Bereiche konnten so groß werden, sodass sich Straßen zwischen einzelnen Partikeln bilden. B) Dies konnte in 6,0% der Gap Junctions aus der Kontrollgruppe gefunden werden und in 23,5% der Sucrose-stimulierten Gap Junctions. C) Zusätzlich stellten sich in 2,4% der Bilder von Astrozyten der PBS-Gruppe und in 11,8% der Bilder der Sucrose-Gruppe Gap Junctions dar, in deren unmittelbaren Nachbarschaft sich mind. eine weitere Gap Junction befand. D) Darüber hinaus konnten in 1,2% der Fälle in der PBS-Gruppe Grüppchenbildung innerhalb einer Gap Junction gefunden werden, wobei dieses Erscheinungsbild zu 8,8% in der Sucrose-Gruppe auftrat.

3.4.3 5-minütige Sucrose-Stimulation führt zu einer Zunahme von Fläche und Umfang der Gap Junctions

Eine 5-minütige Inkubation mit Sucrose-Lösung resultierte in einer signifikanten Zunahme ($p = 0,0107$) der Fläche der Gap Junction. Aufgrund einer fehlenden Normalverteilung wurde ein Mann-Whitney-Test (2-seitig) durchgeführt. Es wurden dabei aus den Replikas der Kontrollgruppe 84 Gap Junctions und aus denen der Versuchsgruppe 102 Gap Junctions ausgemessen. Ausgemessen wurden nur Gap Junctions, an deren Stelle die Replika intakt war und keine Bruchstellen aufwies. Durchschnittlich betrug der Mittelwert der Gap Junction-Fläche in der Kontrollgruppe $0,025 \mu\text{m}^2 (\pm 0,006)$, während unter Sucrose-Stimulation im Durchschnitt Flächen von $0,045 \mu\text{m}^2 (\pm 0,011)$ erreicht wurden. In der PBS-Gruppe betrug der Median $0,008 \mu\text{m}^2$, während er in der Sucrose-Gruppe $0,013 \mu\text{m}^2$ beträgt. Die maximale Größe einer Gap Junction, die in der Kontrollgruppe gefunden wurde, hatte eine Fläche von $0,3733 \mu\text{m}^2$. Demgegenüber führte die Stimulation mit Sucrose zu Gap Junctions mit einer Größe von $0,7522 \mu\text{m}^2$. Die kleinste Gap Junction in der Kontrollgruppe wies eine Größe von $0,001 \mu\text{m}^2$ auf. Die kleinste Gap Junction unter Sucrose-Stimulation hatte eine Größe von $0,000861 \mu\text{m}^2$. Die statistische Auswertung zeigen Abb. 17 A und B.

Entsprechend der Zunahme der Flächen konnten auch für den Umfang signifikante Unterschiede erfasst werden (Abb. 17 C und D). Die Auswertung der gleichen Gap Junctions unter PBS- und Sucrose-Stimulation zeigte die signifikante Zunahme des Umfangs ($p = 0,005$), dargestellt in C. Die nicht-normalverteilten Daten wurden mit der Hilfe eines 2-seitigen Mann-Whitney-Testes geprüft. Im Mittel hatten die Gap Junctions aus der Kontrollgruppe einen Umfang von $0,52 \mu\text{m} (\pm 0,048)$, während die Sucrose-Behandlung durchschnittlich zu einem Umfang von $0,78 \mu\text{m} (\pm 0,082)$ führte. Der Median in der Kontrollgruppe war $0,36 \mu\text{m}$, in der Sucrose-Gruppe hingegen $0,57 \mu\text{m}$. Der größte Umfang fand sich in der Sucrose-Gruppe mit $4,6 \mu\text{m}$, während in der PBS-Gruppe Gap Junctions mit einem Umfang von maximal $2,58 \mu\text{m}$ gefunden wurden. Dementprechend zeigte sich auch die Verteilung auf den abgebildeten Histogrammen.

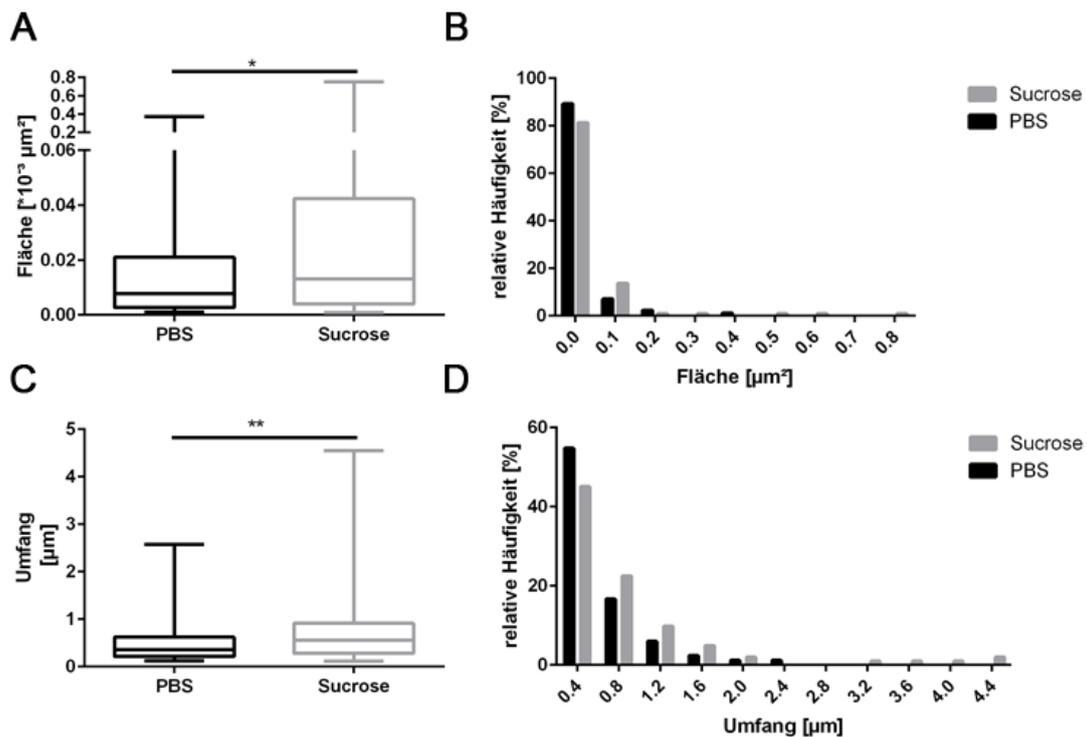


Abb. 17: Sucrose bewirkt eine Zunahme von Fläche und Umfang. A) zeigt das Box-Plot-Diagramm der statistischen Auswertung der Flächenmessung. Hyperosmolare Sucrose-Lösung führte zu einer signifikanten Zunahme der Fläche (* $p < 0,05$). B) zeigt das zu A) passende Histogramm mit Verteilung der Flächen. Dargestellt sind der Median sowie Minimum und Maximum. C) zeigt das Box-Plot-Diagramm der statistischen Auswertung vom Umfang mit Median, Maximum und Minimum. Hier konnte ebenfalls eine signifikante Zunahme des Umfangs gezeigt werden (** $p < 0,01$). D) zeigt das zu C) passende Histogramm mit der Verteilung der gemessenen Umfänge.

3.4.4 5-minütige Sucrose-Stimulation beeinflusst die Flächendichte der IMPs

Um die Anordnung der Connexone in einer Gap Junction zu analysieren, wurde die Anzahl der IMPs in Bezug auf eine Fläche von $0,01 \mu\text{m}^2$ ermittelt und die Werte zwischen den beiden Gruppen verglichen. Hierfür wurden in der Kontrollgruppe 58 Gap Junctions und in der Sucrose-Gruppe 88 Gap Junctions ausgewertet. Die nicht-normalverteilten Daten wurden mittels Mann-Whitney-Test (2-seitig) statistisch ausgewertet und hierfür wurden signifikante Unterschiede nachgewiesen ($p < 0,0001$). In mit PBS-Lösung inkubierten Astrozyten wurden Plaques mit einer Anzahl von im Mittel $101,9$ ($\text{SEM} \pm 2,7$) Partikeln pro $0,01 \mu\text{m}^2$ Fläche ausgebildet. Hingegen führte die Sucrose-Stimulation im Mittel zu $76,5$ IMP pro $0,01 \mu\text{m}^2$ ($\text{SEM} \pm 2,27$). Wie in Abb. 18 dargestellt, zeigte sich nach der Sucrose-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme der Anzahl von IMPs pro Fläche. Der Median betrug in der PBS-Gruppe $102,4 \text{ IMP}/0,01 \mu\text{m}^2$, während in der Sucrose-Gruppe ein Median von $77,2/0,01 \mu\text{m}^2$ festgestellt wurde. Die Mehrheit der Gap Junction-Plaques unter Kontrollbedingungen hatte mind. 90 bis 100 Partikel auf einer Fläche von $0,01 \mu\text{m}^2$. Im Vergleich hierzu zeigten Gap Junctions unter Sucrose-Stimulation weniger Partikel auf dieser Fläche; im Histogramm (Abb. 18) war eine deutliche Linksverschiebung erkennbar.

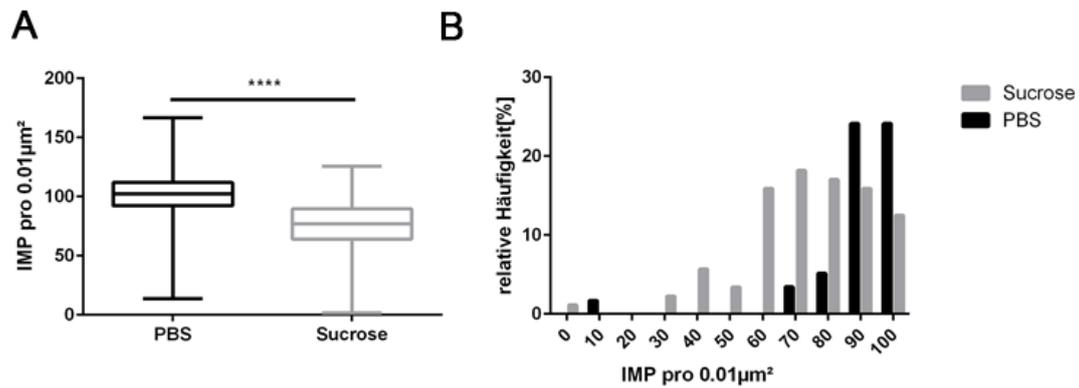


Abb. 18: Anzahl IMP/0,01µm² nimmt unter Sucrose-Behandlung ab. A) Die statistische Auswertung ergab, dass Sucrose-Behandlung zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl der IMP in Bezug auf die Fläche führte (****p < 0,0001). Das Box-Plot-Diagramm zeigt Median, Minimum und Maximum. B) Das Histogramm zeigt die relative Häufigkeit, wie viele IMP pro µm² vorkommen. Hierbei ist zu erkennen, dass in der PBS-Gruppe die Anzahl der Partikel/0,01 µm² höher ist als in der Sucrose-Gruppe.

3.4.5 5-minütige Sucrose-Stimulation bewirkt eine Zunahme des NND

Die Bestimmung des NND zeigte, dass die Sucrose-Behandlung die Distanz zwischen den einzelnen Partikeln signifikant ($p < 0,0001$) vergrößerte. Es wurden 58 Gap Junctions unter PBS-Behandlung und 88 Gap Junctions unter Sucrose-Stimulation ausgewertet; die entsprechende statistische Auswertung ist in Abb. 19 dargestellt. Auch hier wurde der zweiseitige Mann-Whitney-Test durchgeführt. Im Durchschnitt betrug die kürzeste Distanz zwischen den Partikeln in der Kontrollgruppe 0,0077 µm ($\pm 0,0001$). Die Gap Junctions in den Astrozytenkulturen, die mit Sucrose-Lösung behandelt wurden, wiesen durchschnittlich einen NND von 0,0087 µm ($\pm 0,0001$) auf. Die Kontrollgruppe wies als kleinste Distanz 0,0058 µm und als größte Distanz 0,011 µm auf. In Kontrast hierzu führte die Sucrose-Stimulation zu einer kürzesten Distanz von 0,0074 µm, während die größte Distanz 0,0131 µm lang war. Die meisten Partikel in der Kontrollgruppe wiesen einen Abstand von 0,0078 µm auf, während in der Sucrose-Gruppe ein Median von 0,0085 µm gemessen wurde. Die Darstellung der relativen Häufigkeiten zeigt eine klare Rechtsverschiebung des NND nach Sucrose-Behandlung (B).

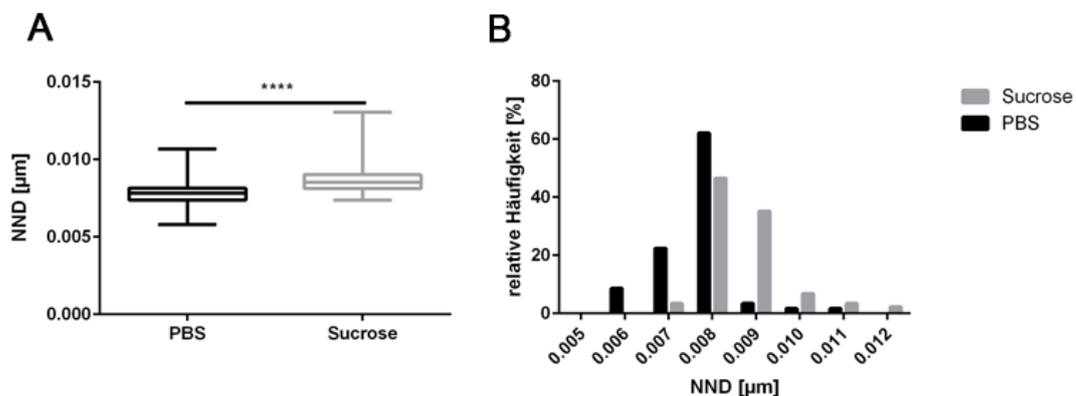


Abb. 19: Bestimmung der NND. A) Das Box-Plot-Diagramm zeigt die signifikante Zunahme der NND in der mit Sucroslösung stimulierten Versuchsgruppe (Sucrose) im Vergleich zur Kontrolle (PBS) (****p < 0,0001). Dargestellt sind Median, Minimum und Maximum. B) Das Histogramm zeigt die Häufigkeitsverteilung der NND-Werte.

Zusammenfassend ließen sich signifikante Änderungen der Connexon-Anordnung innerhalb der Gap Junction nach Sucrose-Stimulation nachweisen.

3.5 Die Stimulation mit hyperosmolarer Sucrose-Lösung vermindert GJIC

Zur Überprüfung, ob die unter verschiedenen osmotischen Bedingungen beobachteten morphologischen Veränderungen der Gap Junctions auch in funktionellen Änderungen resultieren, wurde ein *Scrape Loading/Dye Transfer Assay* durchgeführt (n=3). Zur Auswertung der Assays einer Kulturbedingung wurden mind. drei Bilder ausgewertet, wobei für jedes Bild mind. zwei Distanzen bestimmt wurden. Die nicht normalverteilten Daten wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests analysiert.

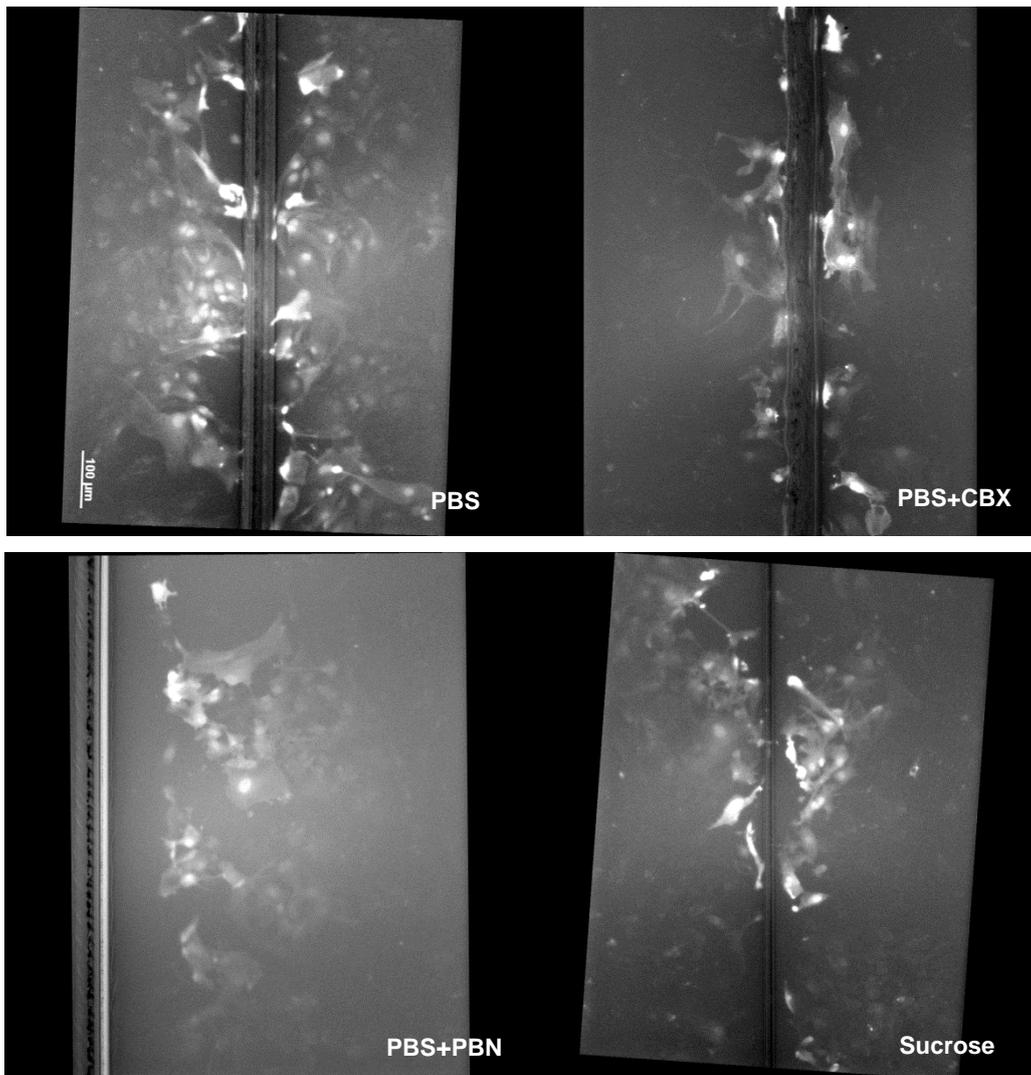


Abb. 20: Aufnahme der SL/DT Assays unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Auf der Abbildung sind die Aufnahmen der Farbstoffweiterleitung unter den Versuchsbedingungen abgebildet. A) Unter Kontrollbedingungen wanderte der Farbstoff LY über Gap Junctions mehrere Zellreihen entlang. B) Wurden die Gap Junctions mittels CBX blockiert, verblieb der Farbstoff in den ersten, angekratzten Zellen. C) Wurden Pannexine mittels PBN blockiert, wanderte der Farbstoff ebenfalls weiter. Aus praktischen Gründen wurden hier die Zellen auf einer Seite des Kratzers fotografiert. D) Hyperosmolare Sucroselösung führte dazu, dass der Farbstoff nicht mehr weitergeleitet wurde und lediglich in den angekratzten Zellen verblieb.

Abb. 20 zeigt exemplarisch Auszüge der Fotoaufnahmen des Assays, während Abb. 21 die statistische Auswertung darstellt. In Zellen, welche in PBS inkubiert wurden, breitete sich der niedrig-molekulare Farbstoff LY über mehrere Zellreihen aus und spiegelt den Farbstofftransfer *in vitro* ohne verändernde

Einflüsse wider. Die Zellen stehen folglich über offene und funktionell intakte Gap Junctions in Verbindung. Im Mittel breitet sich der Farbstoff um 345 Pixel (± 10) aus. Hierfür flossen in die statistische Auswertung insgesamt 62 ermittelte Distanzen von sieben verschiedenen Bildern ein.

Kombinierte man die PBS-Lösung mit dem Gap Junction- und Hemikanal-Inhibitor Carbenoxolon (CBX), so verblieb der Farbstoff in den ersten Zellreihen und wurde nicht mehr an die Nachbarzellen weitergegeben (Abb. 20 B). CBX, ein Glycyrrhetinsäure-Derivat, hemmt Gap Junction-Kanäle, indem es sich in die Doppelmembran einschleust und dadurch die Membraneigenschaften sowie Struktur und Funktion der Gap Junctions blockiert (Jiang et al. 2011). 68 Werte flossen hier in die statistische Auswertung ein. In diesem Fall zeigte sich, wie Abb. 21 darstellt, ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur PBS-Gruppe; der Farbstoff wanderte 155 ($\pm 9,2$) Pixel weit. Um nachzuweisen, dass LY wirklich nur Gap Junctions passiert, wurde eine weitere Klasse von Kanälen in Astrozyten, die Pannexine, mittels Probenecid (PBN) blockiert. Für diese Bedingungen wurden 53 Werte statistisch ausgewertet. In diesem Fall kam es zu einer Verbreitung von LY um 310 ($\pm 16,6$) Pixel (Abb. 20 C), wobei sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) im Vergleich zur PBS-Gruppe nachweisen ließ. Astrozyten, die mit einer PBS-PBN-Lösung behandelt wurden, können daher als Vergleichsgruppe angesehen werden und zeigen, dass der Farbstoff nicht über Pannexin-Kanäle transportiert wird. In der PBS-Gruppe betrug der Median 345 Pixel, während dieser in der PBS-CBX-Gruppe 150 Pixel und in der PBS-PBN-Gruppe 310 Pixel war.

In Kontrast hierzu hatte sich die zurückgelegte Distanz des Farbstoffes nach Sucrose-Behandlung stark verkürzt. Das Signal zeigte sich nur in den ersten Zellreihen. Die statistische Auswertung von 52 Werten erbrachte, dass Sucrose lediglich eine Weiterleitung des Farbstoffes um 189 Pixel ($\pm 12,1$) bewirkte. Dieses Ergebnis unterschied sich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,0001$). Der Median betrug hier 190,5 Pixel. Zusätzliche Inhibition von Gap Junctions durch Sucrose-CBX bzw. der Pannexine durch Sucrose-PBN veränderte dieses Ergebnis nicht. Nach der Sucrose-CBX-Behandlung wanderte der Farbstoff im Mittel 180 Pixel ($\pm 11,8$) (insgesamt 59 Werte) und auch nach der Stimulation mit Sucrose-PBN-Lösung kam es lediglich zu einer Ausbreitung um 185 Pixel ($\pm 12,9$) (insgesamt 63 Werte) (Abb. nicht gezeigt). In der Sucrose-CBX-Gruppe betrug der Median 170 Pixel und in der Sucrose-PBN-Gruppe 174 Pixel.

Die Ergebnisse des SL/DT-Assays zeigen, dass Sucrose anscheinend im Gegensatz zu PBS bzw. PBS+PBN die GJIC signifikant unterbindet. Ähnliche Effekte wurden durch den Gap Junction- und Hemikanal-Blocker CBX hervorgerufen. Hieraus lässt sich ableiten, dass die durch Sucrose verursachten Veränderungen der Connexine und Gap Junctions auch funktionelle Auswirkungen haben, was eine Unterdrückung der Zellkommunikation und der GJIC zur Folge hat.

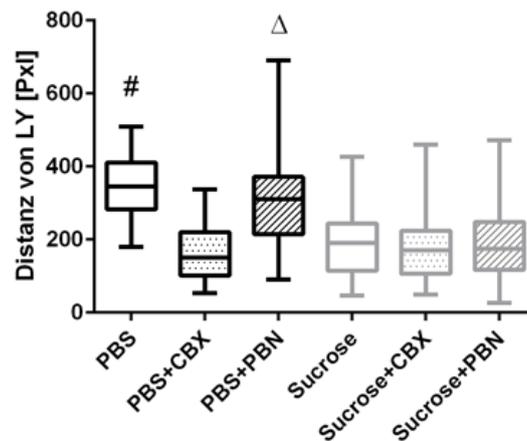


Abb. 21: Statistische Auswertung des SL/DT-Assays. Darstellung der statistischen Auswertung des Scrape Loading/Dye Transfer Assays in Form eines Box-Blot-Diagrammes. Dargestellt sind Median, Minimum und Maximum. Es konnten signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll-Gruppe (PBS) und allen Sucrose-Gruppen sowie zur PBS-CBX-Gruppe nachgewiesen werden (#: **** $p < 0,0001$). Auch beim Vergleich der Kontrolle PBS-PBN mit allen Sucrose-Gruppen sowie mit der Gruppe PBS-CBX finden sich signifikante Unterschiede (Δ : **** $p < 0,0001$); im Vergleich mit PBS konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend zeigten die Resultate der mRNA-Expressions-Analysen, dass die Sucrose-Behandlung zu keinen signifikanten Veränderungen der Expression von GFAP, AQP4 und Cx43 führt, während hingegen für die Expression von ZO-1 eine signifikante Zunahme beobachtet werden konnte. Daraus lässt sich folgern, dass hyperosmolare Sucroslösung die Expression von ZO-1 kurzfristig induziert. Auf Proteinebene konnte mittels Immunoblots nachgewiesen werden, dass die hyperosmolare Stimulation zu einer signifikanten Zunahme von pCx43 S368 führte, während sich der Proteingehalt von panCx43 nicht änderte.

Auf morphologischer Ebene zeigte die FRIL-Analyse eindeutig, dass Sucrose zu starken ultrastrukturellen Veränderungen führte: Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass die 5-minütige Sucrose-Stimulation zu einer signifikanten Zunahme von Größe und Umfang der Gap Junction-Fläche führte. Zum anderen zeigte sich, dass Sucrose eine signifikante Abnahme der Partikel-Dichte pro $0,01 \mu\text{m}^2$ Gap Junction-Fläche bewirkt, einhergehend mit einer Zunahme des Abstandes zwischen den einzelnen Partikeln. Ferner erschloss sich aus der semiquantitativen Auswertung, dass unter Sucrose-Behandlung die Anzahl von Gap Junctions mit partikelfreien Bereichen wie auch mit partikelfreien Straßen zunahm. Ebenso konnte nach Sucrose-Behandlung eine Zunahme von assoziierten Mini-Gap Junctions und eine Vermehrung von kleineren Gap Junctions in unmittelbarer Nachbarschaft der Gap Junctions durchschnittlicher Größe beobachtet werden.

Gleichzeitig zeigte der *Scrape Loading/Dye Transfer Assay*, dass die hyperosmolare Sucrose-Lösung zu einer verminderten Farbstoff-Weitergabe führte. Dies weist auf eine Drosselung der GJIC hin.

Daraus lässt sich schließen, dass hyperosmolare Sucrose-Lösung zu einer Veränderung in der Gap Junction-Konfiguration führt, und zum anderen mit einer Drosselung des Stoffaustauschs zwischen den Gap Junctions und folglich der GJIC einhergeht.

4 Diskussion

4.1 Reaktionssysteme als Antwort auf osmotischen Stress in Säugetieren

Die Wahrung der Konzentration von Wasser, Ionen und verschiedenen Makromolekülen muss in Zellen stets ausgeglichen sein, damit biologische Funktionen und Prozesse aufrechterhalten werden können. Kommt es zu Konzentrationsveränderungen von osmotisch wirksamen Substanzen, wie beispielsweise von Ionen, so hat dies auch Veränderungen im Wassergehalt einer Zelle bzw. des umliegenden Extrazellulärtraumes zur Folge. Für die Zelle bringt dies eine Ausnahmesituation mit sich. Sie wurde aus ihrem physiologischen Gleichgewicht gebracht, es herrscht regelrecht osmotischer Stress (Zhou et al. 2016). Für diesen Fall sind Zellen mit Mechanismen ausgestattet, welche eine Anpassung an osmotische Veränderungen ermöglichen, da ein Ausbleiben einer Reaktion schädliche Auswirkungen auf Zellfunktion und Lebensfähigkeit der Zelle hätte (Dmitrieva et al. 2001, Ho 2006). Alle Zellen reagieren auf extrazelluläre osmotische Veränderungen, indem sie die Konzentrationen von Osmolyten innerhalb der Zelle durch Wasserverschiebung nach außen oder innen verändern und dadurch den Konzentrationsgradienten verringern. Auch wenn osmotische Verschiebungen von Wasser die erste physiologische Reaktion auf osmotischen Stress darstellen, muss die Zelle der Veränderung des Wassergehaltes mittelfristig entgegenwirken und eine regulatorische Volumen-Zunahme in Gang setzen bzw. Wasserausstrom verhindern. Würde die Zelle intrazellulär gelegene Ionen als kompensatorische Osmolyte nutzen, so würden diese die osmotische Kraft innerhalb der Zelle weiter erhöhen. Gleichzeitig würden diese auch Signalwege, Membranpotentiale und andere Funktionen beeinträchtigen. Daher nutzt die Zelle als verspätete bzw. adaptive Antwort die Regulation auf der transkriptionellen Ebene von Genen, die für Proteine kodieren, welche durch Transport oder Synthese die Akkumulation von kleinen organischen Osmolyten gewährleisten. Hierbei handelt es sich um kleine, nicht geladene, organische Moleküle wie beispielsweise Sorbitol, Myoinositol, neutrale Aminosäuren, Taurin und Alanin, welche auch in hohen Konzentrationen Zellfunktionen nicht beeinflussen (Alfieri and Petronini 2007, Handler and Kwon 2001, Ho 2006, Zhou et al. 2016).

In einigen Studien konnten bereits erste Schlüsselkomponenten der osmotischen Stressantwort, insbesondere in den Zellen der Niere und in Lymphozyten, identifiziert werden (Aramburu et al. 2006). Hierzu zählen die Transkriptionsfaktoren NFAT5 sowie TonEBP, welche die Expression von osmotisch-kompensatorisch wirksamen Genprodukten regulieren. Diese Zielgene führen zum Anstieg von osmotisch wirksamen Substanzen innerhalb der Zelle und bewirken Veränderungen in der Protein-Stabilität, in post-translationalen Modifikationen und beeinflussen die RNA-Akkumulation (Alfieri and Petronini 2007, Ho 2006). Inwieweit diese Komponenten in Astrozyten reguliert werden, ist zum momentanen Zeitpunkt noch endgültig zu klären und bedarf weiterer Untersuchungen.

Astrozytäre Membranproteine wie beispielsweise AQP4-Kanäle, Gap Junction-Proteine, GFAP oder ZO-1 könnten als Effektoren in Folge von osmotischem Stress ebenfalls vermehrt oder vermindert exprimiert werden. Die Veränderungen in Regulation und Expression beeinflussen auch den

funktionellen Status dieser Proteine. Die Beteiligung von AQP4 und seiner Funktion als Wassertransporter in Astrozyten ist in diesem Zusammenhang bislang nicht endgültig geklärt. Das Membranprotein ZO-1 und Intermediärfilament GFAP könnten sich in Folge von hohem osmotischem Druck bzw. der darauffolgenden Umgestaltung der Zellmembran ebenfalls verändern. Cx43-Gap Junctions als Membranproteine könnten ebenso an Anpassungsmechanismen beteiligt sein. Dies kann sowohl ihre Durchlässigkeit als auch die Konfiguration und Morphologie der Gap Junction-Plaques in der Zellmembran betreffen. Die hier präsentierten Ergebnisse erlauben einen Einblick in mögliche Reaktionen von Astrozyten auf hyperosmolare Sucrose-Lösung.

4.2 Wirkung von Hyperosmolarität auf primäre Astrozyten und die Morphologie von Cx43-Gap Junctions

4.2.1 Etablierung der Auswertungs-Methode der FRIL-Bilder

Die Analyse des Abstandes zwischen den einzelnen IMP der untersuchten Gap Junctions erwies sich komplexer, als zuvor angenommen. Ursprünglich war beabsichtigt, den Abstand von 20 IMP zum nächsten Nachbarn von jeder gefundenen Gap Junction-Plaque zu untersuchen (Center to Center Messung, CTC). Diese Messmethode ergab jedoch mehrere Schwachstellen: Zum einen gab es häufig kleine Plaques, welche weniger als 20 Partikel aufwiesen. Hier war es unmöglich, auf statistisch aussagekräftige 20 Messungen zu kommen. Dem gegenüber standen die sehr großen Plaques mit über Tausend IMP, die bei einer Auswertung von lediglich 20 Abständen folglich nicht in einer repräsentativen Gesamtheit erfasst hätten werden können. Des Weiteren kristallisierten in diesem Zusammenhang bereits E. Page et al. heraus, dass bei Pits die CTC-Messungen nicht reproduzierbar durchgeführt werden können (Page et al. 1983). Hinzu kommt, dass die willkürliche Auswahl von zwei offensichtlich nah beieinanderliegenden IMP sehr subjektiv sein kann und dadurch die Ergebnisse, insbesondere bei mittelgroßen bis kleinen Plaques, verzerrt werden können.

Um dieser Schwierigkeit zu entgehen, wurde die Bestimmung des nächsten Abstandes der einzelnen IMP mit dem sogenannten *Multi-Point-Tool*-Plugin der Image-J-Software wiederholt. Hierbei wurde die Gesamtheit der IMP einer Plaque, wie bereits in Kapitel 2.10.5 beschrieben, erfasst und nach Anwendung des NND-Algorithmus (der Abstand jedes Partikel zum nächsten Nachbarn) bestimmt (Mao 2016). Durch Bildung des Mittelwertes aller Abstände konnte somit ein Maß der durchschnittlichen Distanz zwischen den Partikeln einer Plaque geschaffen werden.

4.2.2 Gap Junctions und Osmose – Ein Rückblick auf erste Erklärungsmodelle

Mit dem Ziel, Veränderungen von Gap Junctions nach Stimulation mit hyperosmolaren Substanzen greifbar zu machen, wurden in der Vergangenheit von verschiedenen Arbeitsgruppen zahlreiche experimentelle Studien durchgeführt. Bereits 1977 machte die Arbeitsgruppe um Peracchia die Entdeckung, dass sich der Abstand zwischen Gap Junction-Partikeln untereinander in mit hypertoner Sucrose-Ca²⁺-Lösung perfundiertem Lebergewebe verändert. Damit orientierte er sich an der bereits

zuvor postulierten Hypothese, dass Erscheinung und Morphologie von Gap Junctions durch hypertone Stimulationen verändert werden können, und folglich auch Permeabilität und Stoffaustausch (Peracchia 1977). Um diese strukturellen Veränderungen nachzuweisen, wurden Ratten-Mägen und -Lebern *ex vivo* mit hyperosmolarer Sucrose-Lösung stimuliert, anschließend mittels der Gefrierbruchtechnik aufgearbeitet und elektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass sich die IMP, nachdem die Zellen hypertoner Sucrose-Lösung ausgesetzt worden waren, regelmäßiger anordneten und auch der Abstand zwischen den Partikeln kleiner wurde.

Ähnliche Beobachtungen veröffentlichten Goodenough und Gilula (Goodenough and Gilula 1972). Nachdem Lebergewebe mit hypertoner Sucrose-Lösung (0,5 M in 0,05% NaCl, pH 7,4, 10 Minuten) perfundiert worden war, konnten tiefgreifende Veränderungen in der Ultrastruktur der Gap Junctions mittels der „Freeze-Clamp“-Technik beobachtet werden: Die Gap Junctions schienen, im Vergleich zu den Gap Junctions der Kontrollgruppen, durch eintretende Extrazellulärsubstanz getrennt zu werden, wodurch die einzelnen Gap Junction-Kanäle diskonnektiert wurden. Auch schien die Gap Junction-Anordnung regelmäßiger zu werden. Ob und inwiefern diese Veränderungen in einer Abnahme der GJIC bzw. in einem Schluss der Kanäle resultieren, ließen die Autoren offen.

Derartige Veränderungen wurden einige Jahre später in mittels Gefrier-Ätz-Methode präpariertem Lebergewebe beobachtet, welches mit einer Sucroselösung behandelt worden war. Hierbei wurden die Auswirkungen der Sucrose auf Cx26- und Cx32-Gap Junctions untersucht (Fujimoto 1995). Zwar konnten hier keine Diskonnektionen nachgewiesen werden, jedoch strukturelle Veränderungen der Gap Junctions. In einigen Regionen innerhalb der Gap Junctions schienen hier die IMPs aufgelockert und verstreut zu sein. Zusätzlich konnten sehr große Gap Junctions neben kleineren Plaques gefunden werden.

4.2.3 5-minütige Sucrose-Behandlung führt zu ultrastrukturellen und funktionellen Veränderungen der Cx43-Gap Junctions

Die Auswertung und Analyse der mittels FRIL-Technik aufgearbeiteten Proben zeigte eindrücklich, dass bereits eine 5-minütige Behandlung mit hyperosmolarer Sucroselösung ultrastrukturelle Veränderungen der Gap Junctions zur Folge hatte. Diese Beobachtungen konnten beim ersten Anblick der TEM-Bilder und Vergleich beider Versuchsgruppen visuell festgestellt werden und wurden von den genannten Messungen sowie von den Ergebnissen der statistischen Auswertung untermauert. Zum einen schien die hyperosmolare Umgebung eine Zunahme von Größe und Umfang der Gap Junction-Kontur zu bewirken. Gleichzeitig konnte eine Auflockerung der IMP-Anordnung innerhalb der Plaque beobachtet werden; erwartungsgemäß nahm die Anzahl von IMPs in Bezug auf eine Fläche von $0,01 \mu\text{m}^2$ ab. Damit ging wiederum einher, dass die Abstände zwischen den einzelnen Partikeln größer wurden (Zunahme des NND). Die Anordnung der IMP auf der Membran veränderte sich entsprechend: Die Partikel wirkten verstreut und ungeordnet. Darüber hinaus konnten in den mit Sucrose-Lösung behandelten Astrozyten vermehrt regelrechte Riesen-Gap Junctions gefunden werden. Diese zeigten ebenfalls im Vergleich zur Kontrolle eine stark aufgelockerte und ungeordnete Partikel-Konformation.

Diese Ergebnisse von in der Vergangenheit durchgeführten Studien, wie beispielsweise von Peracchia et al. (vgl. Kapitel 4.2.2), können mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht immer in Einklang gebracht werden. So zeigte die Endauswertung von Peracchia et al., dass sich die Abstände der IMP nach Sucrose-Behandlung verringern, dass die einzelnen IMP regelmäßiger in einem hexagonalen Muster angeordnet werden und dass die Plaque-Größe abnahm. Zusätzlich wurde eine Reduktion des Partikel-Durchmessers vermutet. Währenddessen waren die Partikelabstände in den Kontrollgruppen größer und die Partikel insgesamt unregelmäßiger verpackt. Diese Ergebnisse stehen auf den ersten Blick in Kontrast zu den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunden. Allerdings hat die Arbeitsgruppe um Peracchia mit EDTA-Sucrose-Lösung perfundiertes Leber- und Magengewebe verwendet, während in dieser Dissertation vorwiegend die Morphologie der Membranen kultivierter Astrozyten analysiert wurde. Möglicherweise sind die Reaktionen der Zellen auf hyperosmolare Stimuli daher zelltypspezifisch. Da Astrozyten in der Ionen- und Flüssigkeitshomöostase eine bedeutsame Rolle innehaben, ist eine spezifische Reaktion der entsprechenden Kanäle denkbar. Astrozytäre Gap Junctions sind primär aus Cx43 aufgebaut, während die Gap Junctions der Hepatozyten aus Cx32 und Cx26 bestehen. Allerdings wurde eine Auflockerung von Gap Junctions, wie in dieser Arbeit beobachtet, auch in Cx26- und Cx32-Gap Junctions von mit Sucroselösung behandeltem Lebergewebe detektiert (Fujimoto 1995). Damit könnten die oben genannten Befunde von Peracchia durchaus auch mit der Verwendung von EDTA, und nicht primär mit dem untersuchten Gewebematerial, zusammenhängen. Zusätzlich ähneln die gewonnenen Erkenntnisse über die Veränderungen von Cx43-Gap Junctions den Ergebnissen einer vorherigen Studie, in welcher der Einfluss des Versuchmodells OGD-R (*Oxygen-Glucose-deprivation with subsequent reoxygenation*) auf astrozytäre Cx43-Gap Junctions untersucht wurde (Beckmann et al. 2019b). Hierbei wurde die OGD-R-Behandlung als Modell zur Nachahmung des unterdrückten Stoffwechsels bei ischämischen Zuständen im Gehirn genutzt und eine mögliche Beteiligung von Cx43 daran untersucht. Mittels FRIL-Technik aufgearbeitete Proben enthüllten, im Vergleich zur Kontrollgruppe, nach OGD-R eine Auflockerung der Cx43-IMP innerhalb der Gap Junction sowie eine signifikante Zunahme des NND. Hyperosmolare Umgebung scheint folglich auf die Gap Junctions in ähnlicher Art und Weise zu wirken wie ischämische Zustände im ZNS.

Die beobachteten Veränderungen dieser Parameter können auch in Hinblick auf den Lebenszyklus der Gap Junction-Plaques erklärt werden. Wie einleitend in Kapitel 1.1.2 erörtert, sind Gap Junctions keine konstanten Strukturen in der Membran. Durch Anbau neuer Gap Junction-Kanäle in die Peripherie einer Gap Junction-Plaque und die parallele Entfernung gealterter Kanäle aus dem Zentrum unterliegen Gap Junctions stetigen Veränderungen (Gaietta et al. 2002). Diese assoziierenden oder dissoziierenden Partikel könnten von den beobachteten Partikel-Grüppchen oder kleineren Ansammlungen von Partikeln in der Nähe von größeren Gap Junctions repräsentiert werden. Diese Beobachtungen konnten auch vermehrt in den mit Sucrose-Lösung stimulierten Astrozyten festgestellt werden.

Ein weiterer möglicher Mechanismus, welcher in Frage kommen könnte, wäre das Auseinanderweichen der Hemikanäle. Ein Schluss bzw. eine Inaktivierung der Kanäle könnte aus diesem Grund mit einer

Größenzunahme der gesamten Gap Junction-Plaques einhergehen, in dessen Folge die Kanäle im Zuge des Gap Junction-Trafficking internalisiert und abgebaut werden könnten. Eine alternative Erklärung für die Größenzunahme der Gap Junction-Plaques wäre eine mögliche Fusion von mehreren kleinen Gap Junctions. Um diesen Ansatz zu verfolgen, müssten die Veränderungen der Gap Junctions in Echtzeit untersucht werden, beispielsweise mittels *Live Cell Imaging* und kombinierten immunzytochemischen Färbungen bzw. transgenen Tieren (Cx43-GFAP).

Die partikelfreien Korridore und Grüppchen, die infolge der osmotischen Stimulation beobachtet werden konnten, werfen ebenfalls weitere Fragen auf. Sind partikelfreie Areale eher im Zentrum der Plaques zu finden, so könnten diese auch leere Membranteile, aus denen die Connexone entfernt wurden, repräsentieren. Die bereits beschriebenen Partikelansammlungen könnten alte Hemikanäle darstellen, welche im Verlauf internalisiert und abgebaut werden. Da dies vermehrt in der Sucrose-Gruppe festzustellen war, könnte dies auf einen möglichen Schluss der Kanäle hinweisen.

Um nachzuweisen, dass diese morphologischen Veränderungen auch auf funktioneller Ebene Konsequenzen haben, wurde ein *Scrape Loading/Dye Transfer Assay* durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass Zellen nach hyperosmolarer Sucrose-Stimulation ihren interzellulären Stoffaustausch via Gap Junctions einstellen. Der Farbstoff Lucifer Yellow, welcher Gap Junctions passieren kann, aber nicht membrangängig ist, wurde nach der Sucrose-Behandlung nicht mehr an benachbarte Zellen weitergegeben. Vergleichbare Ergebnisse erhielten Muto et al., die Cx43-vermittelte GJIC in retinalen Müller-Zellen untersuchten (Muto et al. 2014). Die retinalen Müller-Zellen, welche zu Glia-Zellen zählen, waren entweder in einem norm-glykämischen Wachstumsmedium oder einer hochkonzentrierten Glukose-Lösung kultiviert worden. Im Verlauf zeigte sich im durchgeführten *Scrape Loading/Dye Transfer Assay*, dass die Anzahl der Farbstoff-aufnehmenden Zellen in mit hochkonzentrierter Glukose versetztem Wachstumsmedium stark vermindert war. Daneben konnten durchgeführte immunzytochemische Färbungen und Western Blot-Analysen eine verminderte Anzahl von Gap Junctions sowie eine verminderte Expression von Cx43 unter der hohen Glukose-Konzentration nachweisen. Diese Ansatzpunkte legen nahe, dass die Stimulation mit hyperosmolaren Substanzen GJIC bremst und herabsetzt.

Werden die in dieser Dissertation nachgewiesenen Beobachtungen des *Scrape Loading/Dye Transfer Assays* zusammen mit den FRIL-Ergebnissen betrachtet, so kann daraus gefolgert werden, dass die morphologischen Veränderungen der Gap Junctions mit einem Schließen bzw. einer Inaktivierung der Kanäle in Zusammenhang stehen könnten. Die Auswirkungen dieser strukturellen Veränderungen auf die interzelluläre Kommunikation und zelluläre Signalwege bedürfen weiterer Untersuchungen. Im Kontext mit dem bisherigen Wissen über den Lebenszyklus der Gap Junctions könnten sich diese Beobachtungen jedoch über die Einleitung des Gap Junction-Traffickings erklären lassen. Wie bereits in Kapitel 1.1.2 beschrieben, ermöglicht dieser Mechanismus der Zelle, durch den Einbau neuer Gap Junction-Kanäle bzw. deren Abbau und Internalisierung, auf Veränderungen im umgebenden Milieu zu reagieren. Wird ein Astrozyt hyperosmolaren Substanzen, wie beispielsweise Sucrose-

Lösung, ausgesetzt, wird dies auch Auswirkungen auf Zell-Zell-Kontakte und Gap Junctions haben. Hier zeigte der *Scrape Loading/Dye Transfer Assay*, dass es zu einem Verschluss der Kanäle kommt. Infolgedessen scheint es primär aufgrund unbekannter Mechanismen zu einer Größenzunahme der Gap Junction-Plaques zu kommen, welche im Verlauf wahrscheinlich aus der Zellmembran entfernt wird. Da die Halbwertszeit der Gap Junctions mit einer Zeitspanne von ein bis fünf Stunden (Epifantseva and Shaw 2018) im Vergleich zur Dauer der Stimulation vergleichsweise lang ist, könnte davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse primär mit der hyperosmolaren Stimulation zusammenhängen.

4.2.4 5-minütige Stimulation von Astrozyten führt zu keinen signifikanten Veränderungen der AQP4-, Cx43- und GFAP-Expression

Die Analyse der qRT-PCR zeigte, dass eine 5-minütige Stimulation der Astrozyten zwar einen leichten Anstieg der Expression von AQP4-mRNA bewirkte, allerdings unterschied sich dieser Wert nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Es gibt hingegen Hinweise, dass eine längerfristige hyperosmolare Stimulation von Astrozyten die AQP4-Expression induziert (Arima et al. 2003, Yang et al. 2013). Arima et al. führten eine Versuchsreihe durch, in der Astrozytenkulturen in einer Zeitreihe mit 3%iger hyperosmolarer Mannitollösung inkubiert wurden, gefolgt von quantitativen mRNA- und Protein-Analysen. Sie konnten nachweisen, dass es nach einer ein-, drei-, sechs- und zwölf-stundenlangen Inkubation zu einem signifikanten Anstieg der AQP4-mRNA kam. Der AQP4-Proteingehalt stieg nach 6 Stunden signifikant an. In Anlehnung an den in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Versuch von Fujimoto et al. (Fujimoto 1995), wurden in der hier beschriebenen Arbeit als Zeitspanne für die hyperosmolare Stimulation 5 Minuten angesetzt. Mit dieser Arbeit könnten folglich kurzfristige Effekte des osmotischen Stresses auf Astrozyten gezeigt werden. 5 Minuten reichten auch in dem von Fujimoto et al. beschriebenen Experiment aus, um Veränderungen der Gap Junctions zu induzieren, wobei hier mögliche Veränderungen von AQP4 nicht untersucht worden waren. Daher kann postuliert werden, dass eine längere Inkubation möglicherweise zu einer Veränderung der AQP4-mRNA führen könnte. Neben einem direkten Effekt wäre in diesem Szenario auch denkbar, dass eine längere Stimulation über indirekte Mechanismen eine Veränderung der AQP4 Expression induzieren könnte.

Die Folgen von osmotischem Stress wurden in den letzten Jahren auch in Bezug auf die Wechselwirkungen von AQP4 und Cx43 weiter untersucht. Nicchia et al. nutzten hierfür die Methode des *Gene Silencing*, welche auf der Blockade bestimmter Zielproteine mit spezifischen siRNAs beruht. Sie konnten nachweisen, dass die siRNA-vermittelte Unterdrückung bzw. verminderte AQP4-Expression in Astrozyten, welche in hochkonzentriertem Glukose-Wachstumsmedium kultiviert worden waren, mit einer verminderten Cx43-Expression sowie Veränderungen des Zytoskeletts einherging. AQP4 und Cx43 scheinen folglich funktionell miteinander gekoppelt zu sein (Nicchia et al. 2005). Die Arbeitsgruppe um Nicchia stellte infolgedessen die Hypothese auf, dass bei Verstärkung oder Hemmung der AQP4-vermittelten Wasserströme, die Durchlässigkeit von Cx43-Gap Junctions entsprechend moduliert werde, um eine Akkumulation von Metaboliten im perivaskulären Bereich zu

verhindern. Weiterhin verwiesen sie auf eine ähnliche Reaktion bei hohen extrazellulären Kalium-Konzentrationen, welche beispielsweise bei Ischämien oder hoher neuronaler Aktivität vorkommen können. Die zeitgleiche Induktion von AQP4- und Cx43-Expression sowie die vermehrte Ausbildung von Cx43-Gap Junction-Kanälen könnte laut Autoren die erhöhten Kalium-Konzentrationen abfangen (Nicchia et al. 2005). Diese Korrelation lässt sich auch in dieser Arbeit an dem ähnlichen Verhalten der mRNA-Synthese-Raten erkennen, welche mittels qRT-PCR ermittelt worden waren: Die hyperosmolare Sucrose-Behandlung führte kurzfristig weder zu Veränderungen der Syntheseraten von AQP4-mRNA noch von Cx43-mRNA.

Es stellt sich die Frage, welche Rolle AQP4 konkret zugeordnet werden könnte. In Anlehnung daran, dass AQP4 im Gehirn am häufigsten exprimiert wird, kann diesem als Wassertransport-Protein eine besondere Bedeutung in der osmotischen Stressantwort zugeschrieben werden. Im klinischen Kontext wird beispielsweise das Ausmaß der Beteiligung von AQP4 an der Entstehung bzw. Reduktion von Hirnödemen vielseitig diskutiert (Chu H. et al. 2017). Adaptieren sich Zellen an hyperosmolare Umgebung, führt dies zu Veränderungen in der AQP-Expression. Beteiligte Signalwege auf zellulärer Ebene konnten bereits genauer untersucht werden. MAPK (mitogen activated protein kinase), ERK (extracellular-signal-regulated kinase) sowie JNK (c-Jun- N-terminal protein kinase) und p38MAPK konnten eine entscheidende Rolle bei der Antwort auf osmotischen Stress beigemessen werden. Diese Signalwege beeinflussen wiederum auch die Synthese von Aquaporinen, insbesondere von AQP4 und AQP9. Beide Aquaporine werden vorwiegend durch den p38 MAPK-Signalweg reguliert (Arima et al. 2003). Hier wird die Hypothese vertreten, dass die Expression von AQP4 und AQP9 dabei das Hirnödem reduziert, weshalb sie als entscheidende Komponente und Angriffspunkte in der Therapie des Hirnödems angesehen werden. Darüber hinaus zeigten Arima et al., dass die Proteinbiosynthese von sowohl AQP4 als auch AQP9 keine de-novo-Protein-Synthese benötigt und dass die Induktion der Proteinbiosynthese auf der direkten Aktivierung von p38 MAPK-Signalwegen durch hypertone Bedingungen beruht (Arima et al. 2003).

Die hier präsentierten Versuche zeigten darüber hinaus, dass hyperosmolare Sucroselösung keine signifikanten Veränderungen der Expression von Cx43 und GFAP bewirkt. Zwar scheint es unter Sucrose-Behandlung zu einem Schluss bzw. einer Inaktivierung der Kanäle zu kommen, allerdings kommt es zu einer leicht, jedoch nicht signifikant verstärkten Expression von Cx43. Hier verbleibt die Überlegung, dass eine vermehrte Expression nicht unbedingt mit einem vermehrten Einbau funktionierender Gap Junctions in die Zellmembran einhergeht. Mit immunhistochemischen Methoden könnte analysiert werden, ob sich Connexin-Proteine in hyperosmolarer Umgebung möglicherweise vermehrt innerhalb der Zelle befinden.

Auf die unveränderte GFAP-Expression sollte an dieser Stelle ebenfalls näher eingegangen werden. Die in diesem Versuch verwendete hyperosmolare Sucroselösung hätte eigentlich, solange keine Kompensationsmechanismen greifen, ein Ausströmen von Wasser zur Folge. Dies würde eine Zellschrumpfung und folglich auch eine Veränderung von Zellform und -Integrität sowie des

zytoskelettalen GFAP-Arrangements auslösen. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Veränderung in der GFAP-Expression könnte wie folgt unter Vorbehalt formuliert werden: Der beobachtete Schluss der Gap Junctions und möglicherweise Hemikanäle könnte diesen Wasserausstrom verhindern. Dieser Kompensationsmechanismus könnte Astrozyten vor Schrumpfung und Verlust der ursprünglichen Zellgestalt bewahren und sollte dementsprechend auch keine Veränderung der GFAP-Expression hervorrufen. An dieser Stelle ist jedoch nicht auszuschließen, dass an Aufrechterhaltung der Zellform und des intrazellulären Wassergehaltes weitere zytoskelettale Proteine oder Membranproteine in bisher unbekannter Weise beteiligt sind.

4.2.5 Hyperosmolare Sucrose-Lösung bewirkt eine signifikante Zunahme der Expression von ZO-1

Während die 5-minütige Stimulation mit hyperosmolarer Sucrose-Lösung keine Veränderungen in der Expression von Cx43, GFAP und AQP4 bewirkte, konnte eine signifikante Zunahme der Expression von ZO-1 nachgewiesen werden. Da ZO-1, wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, eine Rolle in der Regulation des Gap Junction-Trafficking spielt, könnte dieses Ergebnis auf eine mögliche Beteiligung von ZO-1 bei der Reaktion auf osmotischen Stress hinweisen. Gap Junction-Trafficking umfasst den stetigen Umbau der Gap Junction-Formation durch Einbau und Kopplung neuer Kanäle bzw. Internalisierung geschlossener Gap Junctions (Epifantseva and Shaw 2018). Da in den hier durchgeführten Versuchen Sucrose eine Veränderung der Gap Junction-Größe sowie eine Hemmung von GJIC auslöst, erscheint eine Veränderung der ZO-1-Expression nicht ungewöhnlich, insbesondere die beobachtete Zunahme der Expression.

ZO-1 interagiert sowohl mit gekoppelten als auch mit ungekoppelten Hemikanälen in der Peripherie der Plaque, dem Perinexus, wo neue Hemikanäle in den Gap Junction-Verband eingebaut und schlussendlich Gap Junction-Kanäle ausgebildet werden. Dabei reguliert ZO-1 auch die Größe der Gap Junction. Entsprechende Untersuchungen von Rhett et al. und Hunter et al. in HeLa-Zellen führten zu der Annahme, dass zusätzlich die ZO-1/Cx43-Bindung den Einbau weiterer Hemikanäle hemmen könnte. Außerdem zeigten sie, dass eine Hemmung der ZO-1/Cx43-Interaktion zu einer Zunahme der Gap Junction-Größe, einer Zunahme der GJIC und einer Abnahme der Permeabilität der Hemikanäle führt (Hunter et al. 2005, Rhett et al. 2011). Es stellte sich folglich die Frage, ob die in dieser Dissertation beobachtete Größenzunahme ebenfalls auf einer labilen ZO-1/Cx43-Bindung beruhen könnte. Nicht zu den hier gezeigten Ergebnissen passt, dass in den von Rhett et al. publizierten Ergebnissen eine ZO-1-Überexpression wiederum eine Abnahme der Gap Junction-Größe zur Folge hatte. In welchem Zusammenhang die Cx43/ZO-1-Bindung und die Sucrose-Behandlung stehen, kann daher nicht beantwortet werden. Ob es in der hier präsentierten Dissertation auch zu einer Zunahme von ZO-1 auf Proteinebene kommt, bleibt ebenfalls offen. Um die ZO-1/Cx43-Interaktion in Astrozyten unter den verschiedenen Bedingungen genauer zu erfassen, müssten weitere Untersuchungen eingeleitet werden, beispielsweise mittels immunhistochemischer Methoden.

4.2.6 Hyperosmolare Sucrose-Lösung beeinflusst die Phosphorylierung von Cx43

Die durchgeführten Immunoblots zeigten, dass die 5-minütige Sucrose-Behandlung zu keinen signifikanten Veränderungen der Signalintensitäten von panCx43 führt. Es kann daher angenommen werden, dass das Gesamt-Phosphorylierungsmuster bzw. der Proteingehalt der elektrophoretischen Cx43-Isoformen auch unter hyperosmolarer Stimulation gleich bleibt. Bei den Isoformen von Cx43 handelt es sich um die nicht phosphorylierte P0-Isoform sowie die phosphorylierten Isoformen P1 und P2. In dieser Dissertation wurde die Gesamt-Signalintensität von panCx43 ausgewertet. Eine gesonderte Auswertung für die jeweiligen Isoformen, welche zwischen den phosphorylierten und unphosphorylierten Isoformen unterscheidet, könnte möglicherweise größere Unterschiede nachweisen. Eine derartige Auswertung war allerdings aus praktischen Gründen nicht möglich. Trotz mehrfacher Verwendung verschiedener SDS-Gele unterschiedlicher Gelstärke gelang es nicht, die Isoformen in detaillierter Form getrennt voneinander darzustellen. Für die panCx43-Isoformen ist beschrieben, dass sie auch fließend unter bestimmten Bedingungen wechseln können. Mittels Pulsmarkierung konnte in Herzgewebe gezeigt werden, dass unter physiologischen Bedingungen primär phosphorylierte Isoformen nachweisbar sind. Unter ischämischen Bedingungen im Herzen sind dann eher die dephosphorylierten Proteine nachweisbar, nämlich P0 (Solan and Lampe 2007). Es ist gut möglich, dass die Phosphorylierungsprozesse im Gehirn unter pathologischen Prozessen gegensätzlich oder anders ablaufen. Ob ähnliche Veränderungen infolge von osmotischem Stress bzw. hyperosmolarer Stimulation auftreten, kann daher zu diesem Zeitpunkt nicht belegt werden. Da hyperosmolare Umgebungsbedingungen in dieser Dissertation zu einer Einschränkung von GJIC und zu strukturellen Modifikationen führten, wären schlussendlich trotz allem Veränderungen im panCx43-Proteingehalt zu erwarten gewesen.

Gleichzeitig konnte mittels Immunoblot gezeigt werden, dass die 5-minütige Sucrose-Behandlung zu einer signifikanten Zunahme von pCx43 S368 führte. Dieses Ergebnis erscheint mit Hinblick auf die Regulationsmechanismen von GJIC nicht ungewöhnlich und wird von zahlreichen ähnlichen Studien bestätigt. Wie bereits in Kapitel 1.1.2 erläutert, spielen Phosphorylierungen von Connexinen, insbesondere an Serin-Resten, eine große Rolle bei Einbau, Internalisierung und Abbau von Gap Junctions und folglich in deren Lebenszyklus. Die Phosphorylierungen werden im Fall von Cx43 durch PKC, MAPK oder die c-src-Kinasen (pp60) induziert (Lampe and Lau 2000). Die Phosphorylierung am Serin-Rest 368 ist hierbei sehr häufig (Lampe and Lau 2000) und resultiert wahrscheinlich in der Internalisierung der Gap Junction-Kanäle (Falk et al. 2016).

Lampe et al. beschrieben zudem, dass Studien mit TPA-stimulierten Zellen zeigten, dass dieses zu einer vermehrten Phosphorylierung und infolgedessen zu einem verminderten Einbau und einer verkürzten Lebenszeit von Gap Junctions führte. Außerdem konnten sie nachweisen, dass die Phosphorylierung von Cx43 in chinesischen Hamster-Ovarienzellen an S368 PKC-vermittelt (*in vitro*) abläuft und dadurch die GJIC vermindert wird (Lampe et al. 2000). Darüber hinaus konnte in einer weiteren Studie nachgewiesen werden, dass eine Cx43-Phosphorylierung an S368 in einer reduzierten Gap Junction-

Permeabilität resultiert. Auf elektrochemischer Ebene konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von S368 zu einer Reduktion der Leitfähigkeit der Kanäle von 100 pS zu 50 pS führt (Lampe and Lau 2000). Makroskopisch führten diese Veränderungen zu einer Beeinträchtigung der Gap Junctions-vermittelten Weitergabe von LY (Lampe et al. 2000, Marquez-Rosado et al. 2012). Die Veränderungen der Leitfähigkeiten wurden in diesem Zusammenhang mit einer verminderten Offenheitswahrscheinlichkeit sowie einer Konversion von Cx43 in Zustände mit geringerer Leitfähigkeit erklärt (Lampe et al. 2000). Dass die Phosphorylierung von Cx43 an Serin-Rest 368 in einer GJIC-Inhibierung sowie Cx43-Internalisierung endet, konnte ebenso von der Arbeitsgruppe um Nimlamool et al. in Pulmonalarterien-Endothelzellen gezeigt werden. In deren Versuchen wurde die Phosphorylierung *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF-A-), MAPK- bzw. PKC-vermittelt ausgelöst (Nimlamool et al. 2015).

Die im Rahmen dieser Dissertation erhaltenen Immunoblot-Ergebnisse lassen sich schlussendlich folgendermaßen einordnen: Die im *Scrape Loading/Dye Transfer Assay* nachgewiesene Einschränkung und Abnahme von GJIC könnte auf der Internalisierung der Gap Junctions in Folge vermehrter Phosphorylierung an S368 beruhen. Diese Modifikationen wurden hier durch hyperosmolare Sucrose-Lösung induziert. Gleichzeitig scheint die Phosphorylierung an S368 mit morphologischen Veränderungen der Gap Junction-Konfiguration einherzugehen. Der fehlende Nachweis von signifikanten Veränderungen von panCx43 könnte in diesem Fall auf praktische oder versuchsbedingte Ursachen zurückgeführt werden. An dieser Stelle sei außerdem anzumerken, dass Phosphorylierungen von Cx43, insbesondere durch PKC, in verschiedenen Zelltypen sowohl eine vermehrte als auch verminderte GJIC induzieren können (Lampe et al. 2000). Ob die hier festgestellten Veränderungen der Phosphorylierungsmuster von astrozytärem Cx43 auf die Gesamtheit übertragen werden können, muss in Studien und Versuchen weiter nachverfolgt werden.

4.3 Gap Junctions in Gesundheit und Krankheit

In dieser Arbeit wurde der Einfluss hyperosmolarer Sucrose-Lösung auf Ultrastruktur und Funktion astrozytärer Cx43-Gap Junctions untersucht. Mögliche Auswirkungen auf die Expression der Proteine AQP4, GFAP und ZO-1 wurden ebenfalls erarbeitet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können zusammenfassend wie folgt formuliert werden: Hyperosmolare Sucrose-Lösung führte kurzfristig zu einer Vergrößerung der Gap Junctions und innerhalb dieser zu einer Auflockerung der Partikelstruktur. Während für die mRNA-Synthese von GFAP, Cx43 und AQP4 weitestgehend keine Veränderungen festgestellt werden konnten, zeigte sich, dass die mRNA-Synthese von ZO-1 zunahm. Die zusätzlich angefertigten Immunoblots zeigten eine Zunahme der Phosphorylierung von Cx43 an S368. Im Scrape Loading/Dye Transfer Assay kam es zu einer verminderten Farbstoffweitergabe, was für eine Einschränkung der GJIC spricht. Es stellt sich die Frage, welche Rolle Cx43 bei der Reaktion auf osmotische Stimuli, wie beispielsweise hyperosmolare Sucrose-Lösung, einnimmt. Der Einfluss von hyperosmolarer Sucrose-Lösung auf Astrozyten, bzw. Cx43-Gap Junctions, und deren klinische Bedeutung wurde bisher wenig untersucht. Diese Arbeit könnte weitere Hinweise auf das Ausmaß der Beteiligung von Cx43-Gap Junctions an der Regulation der osmotischen Homöostase im ZNS liefern.

4.3.1 Auswirkungen der hyperosmolaren Stimulation auf Stoffwechselebene

Nachdem in dieser Arbeit der Fokus vor allem auf strukturelle und funktionelle Folgen von hyperosmolarer Stimulation in Astrozyten gelegt wurde, bleibt die Frage offen, welche Stoffwechselwege infolgedessen in Gang gesetzt werden könnten. Bereits durchgeführte Studien zu dieser Thematik wurden entweder mit anderem Zellmaterial durchgeführt oder es wurde hochkonzentrierte Glukose-Lösung als Stimulanz verwendet. Erste Hinweise auf mögliche Effekte finden sich in einer Arbeit von Saez et al. Hier wurden die Veränderungen von Cx43-Hemikanal-Aktivitäten in Folge von Stimulation mit hochkonzentrierter Glukose-Lösung in Endothelzellen näher untersucht (Saez et al. 2018). Auch wenn Saez et al. Endothel-Zelllinien verwendeten, könnten derartige Arbeiten zumindest neue Herangehensweisen und Ideen für die Erforschung der Signalwege des hier verwendeten Astrozyten-Sucrose-Modells aufzeigen. Wichtig ist ebenso anzumerken, dass die Arbeit von Saez et al. sich vor allem mit Cx43-Hemikanälen beschäftigte. Hier zeigte sich in einem Farbstoff-Aufnahme-Versuch mit Ethidium-Bromid, dass die hochkonzentrierte Glukose-Lösung, vor allem zusammen mit den proinflammatorischen Signalmolekülen IL-1 β und TNF α , zu einer vermehrten Aufnahme des Farbstoffs über Cx43-Hemikanäle führte. Insbesondere IL-1 β und TNF α wurde hierbei zugeschrieben, die Hemikanäle zu beeinflussen. Hyperosmolare Glukose- oder gar Sucrose-Lösungen könnten entsprechend zu einem vermehrten Öffnen von Cx43-Hemikanälen und folglich auch zur vermehrten Aufnahme von Substanzen aus dem Extrazellulärraum führen. Die in dieser Dissertation durchgeführten Versuche erlauben jedoch nur bedingt eine Differenzierung zwischen Hemikanälen und Gap Junctions. In welcher Weise proinflammatorische Signalmoleküle auch auf Gap Junctions

einwirken, kann nicht sicher beurteilt werden. Saez et al. zeigten darüber hinaus, welche Folgen die hypertone Stimulation für Endothel-Zellen hat: Die Cx43-Hemikanal-Aktivität wurde u.a. durch vermehrte ATP-Freisetzung, Aktivierung der p38MAPK, NO-Synthase, COX₂ sowie PGE₂-Rezeptoren in Folge der Sucrose-Stimulation induziert (Saez et al. 2018). Diese genannten Signalmoleküle stehen mit der Entstehung zellulärer Dysfunktion im Rahmen von chronischen Entzündungsprozessen in Zusammenhang. Saez et al. unterstreichen, dass Cx43-Moleküle auch bei pathologischen Prozessen eine Rolle spielen können. Sie stellten folglich die Hypothese auf, dass eine Hemmung der Cx43-Hemikanäle den Stoffausstausch beeinträchtigt und dadurch die Glukose-induzierte endotheliale Dysfunktion verhindert werden könnte. Der Zusammenhang von osmotischem Stress und der Aktivierung von MAPKs wurde in der Vergangenheit auch von der Arbeitsgruppe von Zhou et al. nachgewiesen (Zhou et al. 2016). Diese betonen jedoch, dass die MAPK-Aktivierung oder -Inaktivierung in Folge von osmotischem Stress im Allgemeinen Zelltyp-spezifisch ist.

Neben der in dieser Arbeit verwendeten Sucrose-Lösung könnte eine Glukose-Lösung in Astrozyten als verwandte Stoffsubstanz ähnliche Effekte erzeugen. Beispielsweise analysierten Orellana et al. in kortikalen Astrozyten die Permeabilität von Cx43-Hemikanälen, welche zunächst einer hypertonen Stimulation mit hochkonzentrierter Glukose-Lösung und anschließend einer Reoxygenierung unterzogen wurden (Orellana et al. 2010). Hierbei wurde zum einen gezeigt, dass eine Hypoxie das Öffnen der Hemikanäle induziert, insbesondere in einem Medium, welches mit höherkonzentrierter Glukose versetzt ist. Auf der anderen Seite zeigte diese Studie jedoch auch, dass osmotisch wirksame Substanzen, wie beispielsweise Sucrose und Glukose, die Permeabilität von Cx43-Hemikanälen und sogar Cx43-Gap Junctions beeinflusst. Gleichzeitig hatten die in der Arbeit von Saéz et al. induzierte Hypoxie und die hochkonzentrierte Glukose-Lösung wiederum zur Folge, dass die Lebensfähigkeit der Astrozyten abnahm, was diese in einem *Life-Dead-Assay* nachwies. Die Arbeitsgruppe um Orellana et al. ging sogar so weit, Cx43-Hemikanäle als mögliche therapeutische Zielscheibe zur Reduktion von Zelltod im Rahmen der Schlaganfalltherapie zu postulieren.

Das Zusammenspiel von Cx43 und akuten hyperosmotischen Stimuli konnte in einer Arbeit von Cao et al. ebenfalls näher analysiert werden (Cao et al. 2008). In dieser Studie konnten sogar auf molekularer Ebene Effekte der hypertonen Stimulation nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass insbesondere nach 5-, 10- und 15-minütiger Stimulation mit dem hypertonen Agens FBS/DMEM ein signifikanter Anstieg der Glutamat-Konzentration im Medium zu verzeichnen war. Glutamat selbst wiederum ist im ZNS ein exzitatorischer Transmitter, welcher für viele wichtige Funktionen im ZNS verantwortlich ist. Auch mittels verschiedener Färbungen konnte demonstriert werden, dass die hypertone Stimulation die Synthese von Glutamat-Molekülen in Astrozyten sowie anschließend ihre Freisetzung ins umgebende Medium bewirkt. Inwieweit die Cx43-Hemikanäle in dem Stimulations-Modell dieser Dissertation beeinflusst werden, bleibt bis dahin offen.

Jiang et al. arbeiten ebenfalls daran, den Zusammenhang zwischen hyperosmolaren Stimuli, Cx43-Gap Junctions und den zellulären Signalwegen zu entschlüsseln (Jiang et al. 2011). Diese fokussierten

sich ebenfalls auf den Neurotransmitter Glutamat, dessen Freisetzung durch Cx43-Hemikanäle mittels hyperosmolarer Stimulation induziert wird. Diese Glutamat-Freisetzung konnte mittels HPLC bzw. der Messung der Glutamat-Konzentration im Medium nachgewiesen werden. Außerdem zeigten sie mittels Immunfluoreszenz-Analysen, dass es im Rahmen der hypertonen Stimulation zu einer vermehrten Cx43-Expression kam. Dies deuteten sie als vorbereitenden Schritt der Glutamat-Freisetzung.

Ob die in dieser Dissertation verwendete hyperosmolare Sucrose-Lösung zu einer Zunahme der Cx43-Hemikanäle führt, bleibt bis hierhin unbeantwortet. Mittels des Peptids Gap26 können beispielsweise Cx43-Hemikanäle spezifisch blockiert werden, sodass in weiterführenden Studien beispielsweise die Unterscheidung von Cx43-Gap Junctions oder -Hemikanälen erleichtert werden könnte. Zu neuen Erkenntnissen könnte auch die FRIL-Technik in weiterführenden Versuchen beitragen. Elektronenmikroskopisch können Hemikanäle und Gap Junctions jedoch nicht immer einfach voneinander abgegrenzt werden. Sind sowohl Partikel als auch Pits innerhalb einer Gap Junction erkennbar, so liegt sicher ein vollständig ausgebildeter Kanal vor. Aus technischen Gründen (vgl. hierzu Kapitel 1.2.1) zeigt auch eine nur von Pits dargestellte Plaque, einen kompletten Gap Junction-Kanal an. Sind auf der Zellmembran elektronenmikroskopisch jedoch lediglich Partikel dargestellt, können beide Möglichkeiten der Fall sein. Um auf der P-Seite Gap Junctions und Hemikanäle weiterhin zu differenzieren, bedarf es der Entwicklung weiterer Methoden. Bis dahin können die mittels FRIL-Versuchen visualisierten Gap Junctions lediglich morphologisch, jedoch nicht funktionell beurteilt werden.

Die Beteiligung von Cx43 an verschiedenen Stoffwechselprozessen in Lebewesen konnte in der Vergangenheit ebenfalls aufgearbeitet werden. Jiang et al. beschäftigten sich mit der Frage, inwiefern Cx43 bei der Synthese und Freisetzung von Vasopressin (VP) im Nucleus supraopticus von Ratten-Hirnen nach hyperosmolarer Stimulation eine Rolle spielt (Jiang et al. 2014). Diese gingen dem Kenntnisstand nach, dass Cx43 möglicherweise in Astrozyten des im Thalamus lokalisierten Nucleus supraopticus zur Regulation von Durst und Aufrechterhaltung des osmotischen Druckes im menschlichen Körper eine wesentliche Rolle spielt. Sie konnten beweisen, dass die Expression von Cx43 für die Synthese und Freisetzung von VP notwendig ist, was wiederum durch akute hyperosmotische Zustände eingeleitet wird. Wurde mittels Cx43-spezifischen Anti-Sense-Oligodeoxynucleotiden die Synthese von Cx43 verhindert, konnte kein VP-Anstieg verzeichnet werden. Die Aktivierung von Signalkaskaden, wie beispielsweise des MAPK-Signalweges oder anderer Enzymwege, lässt die Zelle folglich auf osmotische Veränderungen in ihrer Umgebung reagieren (Saez et al. 2018). Infolgedessen können proinflammatorische Moleküle oder Neurotransmitter, wie beispielsweise Glutamat, freigesetzt werden. Diese Signalwege beeinflussen wahrscheinlich auch sekundär die Offenwahrscheinlichkeit der membranständigen Gap Junctions bzw. können durch diese oder Hemikanäle modifiziert werden.

4.3.2 Bedeutung der hyperosmolaren Stimulation für die Zellintegrität

Außerdem ist die Frage zu klären, ob die nachgewiesenen strukturellen Veränderungen als unmittelbare Reaktion der Zelle auf eine hyperosmolare Umgebung eingeleitet werden. Alternativ könnten die Veränderungen auch auf Schutzmechanismen beruhen, über die Kanäle und Zellkontakte in ihrer Funktionalität gebremst werden. Ist eine Zelle hyperosmolarer Umgebung ausgesetzt und wirkt sie diesem Umstand nicht entgegen, kann dies zu Zellschäden und Induktion von Apoptose führen (Ho 2006). Beispielsweise konnte in Nierenzellen nachgewiesen werden, dass hyperosmolarer Stress verschiedene Stoffwechselwege induziert, welche zu Apoptose und Zelltod führen (Dmitrieva et al. 2001, Moeckel 2013). Würde durch Inaktivierung der Gap Junctions der Kontakt zu anderen Zellen eingedämmt, so könnte auf diese Weise eine weitere Verbreitung von zellschädigenden bzw. Apoptose-induzierenden Signalen in den gesamten Zellverband verhindert werden. Hieraus lässt sich die Hypothese formulieren, dass Astrozyten auf diese Weise eine sogenannte *Bystander*-Position einnehmen. Dieses Verhalten von Zellen konnte für Apoptose und Zelltod schon in mehreren Studien näher untersucht werden. Lu et al. induzierten beispielsweise mittels steigender Mangan-Konzentrationen (von 0 bis 1000 μM) die Apoptose in kultivierten, primären Astrozyten, um anschließend die Funktionalität der GJIC zu bewerten (Lu et al. 2018). Alle Mangan-Konzentrationen führten zu einem signifikant erhöhten Ausmaß der Apoptose und zu einem signifikant erhöhten Anstieg des neurotoxischen Transmitters Glutamat. Der durchgeführte *Dye Transfer-Assay* mittels LY resultierte in einer verminderten Farbstoff-Laufstrecke, was die Unterbrechung der Cx43-GJIC indizierte. Um schädliche Einflüsse einzudämmen, kappen Astrozyten folglich ihre Gap Junction-vermittelten Kommunikationswege bzw. stoppen die GJIC. Ähnlich, jedoch in die entgegengesetzte Richtung, verhalten sich Astrozyten bei der chronischen HIV-Infektion. Neben dem vorwiegenden Befall der CD4^+ T-Zellen werden im ZNS auch Mikro-Gliazellen, Makrophagen sowie ein kleiner Anteil von Astrozyten befallen (Malik et al. 2017). Unter den Astrozyten lässt sich eine sogenannte *Bystander*-Apoptose beobachten, bei der Astrozyten sowie benachbarte uninfizierte Zellen zu Grunde gehen. Dieses „systematische Absterben“ kann erhebliche kognitive Defizite, demenzielle Symptome und weitere neurologische Ausfallerscheinungen zur Folge haben (He et al. 2020). Malik et al. beriefen sich darauf, dass infizierte Astrozyten proapoptotische Signale, Chemokine und Virus-Partikel über Cx43-Hemikanäle freisetzen und zu deren Verbreitung über Cx43-Gap Junctions in benachbarte Zellen beitragen, wodurch die Neuroinflammation weiter begünstigt wird. Eine Blockade der Cx43-Kanäle mittels 18 α -Glycyrrhetinsäure konnte die Apoptose verhindern und die HIV-induzierte *Bystander*-Toxizität abschwächen (Malik et al. 2017). Studien wie diese verdeutlichen eindrücklich, dass Astrozyten einen eigenen organisierten Verband darstellen. In Gegenüberstellung zu den in dieser Dissertation vorgestellten Ergebnissen und dem bekannten Wissensstand über den *Bystander* Effekt kann folgende Bilanz gezogen werden. Cx43-vermittelte GJIC ermöglicht Astrozyten in unterschiedlichen Situationen eine synchronisierte, gleichgerichtete Reaktion. Hierbei können entweder *Bystander*-Schutzmechanismen greifen und eine Inhibition der GJIC dazu führen, dass der Schaden auf

wenige direkt betroffene Zellen begrenzt und die Ausbreitung verhindert wird. Dem entgegengesetzt kann ein Zusammenbruch der Zellintegrität auch direkt zu einem *Bystander*-Zelluntergang führen, welcher neuroinflammatorische und degenerative Prozesse begünstigen kann.

Die in dieser Dissertation präsentierten Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die unter hyperosmolaren Bedingungen beobachtete Einschränkung der GJIC möglicherweise eine Schutzfunktion der Astrozyten darstellt.

4.3.3 Veränderungen von Cx43 nach hyperosmolarer Stimulation im Kontext des Hirnödems und der Hirnschwellung

Die gerade beschriebenen Mechanismen könnten auch auf das pathophysiologische Szenario bei einem Hirnödem übertragen werden. Pathologische Zustände unterschiedlicher Ätiologie wie beispielsweise Krampfanfälle, Schlaganfälle oder Schädel-Hirn-Traumata können durch Wasserströme zu einem Anstieg des intrazerebralen Drucks führen. Gleichzeitig kommt es hierbei zu einem Zusammenbruch der protektiven Blut-Hirn-Schranke (Michinaga and Koyama 2019). Kimelberg et al. gehen bei der Entstehung des Hirnödems von zwei verschiedenen Mechanismen aus: Als regelrechtes Hirnödem bezeichnet man die extrazelluläre Wasseransammlung. Hiervon zu unterscheiden ist die Hirnschwellung, welche durch intrazellulären Wassereinstrom hervorgerufen wird. Das Hirnödem ist hierbei die Folge von traumatischen Einwirkungen, welche beispielsweise zu Verletzungen der Blutgefäße führen. Währenddessen ist die Hirnschwellung in der Regel toxischen oder metabolischen Ursprungs. Letzteres wird auch als zelluläres Hirnödem bezeichnet, da dieses in Folge der Produktion von verschiedenen Zell-Toxinen entsteht (Kimelberg 2004). Je nach Hergang können beide Mechanismen auch gleichzeitig wirken, zumal im Allgemeinen der Begriff des Hirnödems für beide Prozesse etabliert ist. Generell spielen, wie eingangs erläutert, Astrozyten eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung und Stabilität der Blut-Hirnschranke, sowohl anatomisch als auch funktionell. Astrozyten sind in der Lage, die Funktion der Blut-Hirnschranke mittels der Freisetzung verschiedener spezifischer Moleküle zu gewährleisten (Michinaga and Koyama 2019).

Die pathologischen biochemischen Prozesse, welche zu der Entstehung eines Hirnödems nach Schädelhirntrauma beitragen, scheinen u. a. von Cx43 auszugehen. Entsprechende Hinweise dafür liefert beispielsweise eine Arbeit von Ren et al. Die Arbeitsgruppe untersuchte zur Erfassung, inwiefern Cx43 zur Entstehung von Hirnödemen beiträgt, 80 Mäuse, bei denen mittels der *Feeney's free falling method* eine traumatische Hirnverletzung induziert wurde. Mittels immunhistochemischer Methoden sowie Western Blot-Analysen konnten sie zeigen, dass es 6 Stunden postinterventionell zu einem Anstieg der Cx43-Expression in Astrozyten kam. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass Cx43 bei der Ausbildung eines Hirnödems und dem damit verbundenen sekundären Hirnschaden eine Rolle spielt. In diesem Zusammenhang wurde Cx43 als therapeutisches Ziel bei der Behandlung von Hirnödemen vorgeschlagen (Ren et al. 2013).

Ähnliche Erkenntnisse liefert die Arbeit von Ichkova et al., welche mittels der Methode *Controlled Cortical Impact* ebenfalls an einem Ratten-Modell ein Schädel-Hirn-Trauma induzierten. Mittels

immunhistochemischer Färbungen konnten sie nachweisen, dass die nach dem Schädel-Hirn-Trauma auftretende Astrogliose mit einer erhöhten Cx43-Expression einhergeht. Die gegen Cx43 gerichtete siRNA konnte die Cx43-Expression akut nach der Verletzung reduzieren. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass diese positive Effekte auf sensomotorische Koordination und Propriozeption hatten (Ichkova et al. 2019).

Auch Ischämien zählen zu den Auslösern eines zytotoxischen Hirnödems. Der mit dem Sauerstoffmangel einhergehende Funktionsverlust der Na⁺-ATP-ase bewirkt durch die intrazelluläre Akkumulation von Natrium Flüssigkeitsverschiebungen in die Zellen (Sekerdag et al. 2018). In diesem Fall könnte der Wassertransport in die Zellen Cx43- oder AQP4-vermittelt stattfinden.

Zu gleichwertigen Schlüssen kamen auch Chu et al., welche ebenfalls davon ausgehen, dass sowohl Cx43 als auch AQP4 an der Entstehung des zytotoxischen Hirnödems beteiligt sind (Chu H. et al. 2017). Chu et al. untersuchten hierbei die in der traditionellen chinesischen Medizin etablierten pflanzlichen Wirkstoffe *Paeoniflorin* und *AstragalosidIV*. Sie konnten in ihrer Versuchsreihe nachweisen, dass diese das Hirnödem nach zerebraler Ischämie deutlich verringerten. Außerdem zeigten sie, dass diese Effekte auf einer Hemmung der Cx43-Expression, und konsekutiv auch auf einer Abnahme der AQP4-Expression beruhten (Chu H. et al. 2017).

Wird Cx43 als einer der Hauptfaktoren für die Entstehung eines Hirnödems angesehen, so kann daraus geschlossen werden, dass eine Hemmung der Cx43-Gap Junctions die Entstehung des Ödems möglicherweise verhindern könnte. Setzt man die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen in diesen Kontext, so könnte hyperosmolare Sucrose-Lösung durch die Hemmung der Gap Junctions einen protektiven Effekt auf ischämisches Hirngewebe haben. Dies lässt sich auch mit einer aktuell möglichen Therapie des Hirnödems in Einklang bringen: Die Therapie des Hirnödems im Rahmen von Schlaganfällen oder traumatischen Verletzungen wird beispielsweise mit hyperosmolarer Mannitollösung durchgeführt (Manley et al. 2004, 1919). Dadurch wird in den zirkulierenden Blutgefäßen temporär ein osmotischer Gradient erreicht, welcher den Wasserausstrom aus dem geschädigten Hirngewebe unterstützt. Gleichzeitig könnte die in dieser Dissertation nachgewiesene Hemmung der GJIC und die daraus resultierende Dämpfung der Verbreitung von inflammatorischen und neurotoxischen Substanzen die Abschwellung unterstützen.

Bislang gibt es allerdings wenig ähnliche wissenschaftliche Arbeiten, welche auf zellulärer Ebene bzw. in Bezug auf Gap Junctions oder weitere Membranproteine neue Erkenntnisse liefern.

An dieser Stelle ist jedoch auch zu erwähnen, dass das akute Aussetzen des Gehirns in hypertone (und auch hypotone) Umgebung schädliche Auswirkungen auf die Zellen des Gehirns hat. Wird beispielsweise ein chronischer Natrium-Mangel zu schnell mit hyperosmolaren Substanzen oder Natrium-Substitution therapiert, so führt dies im zeitlichen Verlauf zu einer symmetrischen Demyelinisierung (Zentrale Pontine Myelinolyse), nachdem die Werte wieder normalisiert sind. Dies wird durch ein weitläufiges Absterben von Astrozyten, welche durch den zu schnellen Ausgleich geschädigt werden, hervorgerufen (Gankam-Kengne et al. 2017). Besonders betroffen sind Patienten

mit einer chronischen Hyponatriämie, welche länger als 48 Stunden dauert. In diesem Fall greifen adaptive Mechanismen, beispielsweise das Ausschleusen von organischen Osmolyten und Wasser, um die Zellschwellung in Folge des extrazellulären Natrium-Mangels zu verhindern. Mit der zu schnellen Einleitung einer Natrium-Substitution ist das Gehirn jedoch nicht in der Lage, die verlorenen Osmolyte wieder zurückzunehmen, sodass eine Dehydratation des Gehirns mit konsekutiver Demyelinisierung der weißen Substanz resultiert (Danyalian and Heller 2020).

Anhand dieser Beispiele wird deutlich, dass hyperosmolare Substanzen zum einen protektive Effekte haben und zu Genesung und Verringerung von zerebralen Schäden beitragen. Zum anderen muss jedoch stets das empfindliche Gleichgewicht gewahrt und der therapeutische Umgang mit hyperosmolaren Substanzen mit Vorsicht bedacht werden.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Dissertation zeigte, in welchem Ausmaß Astrozyten durch hyperosmolare Substanzen beeinflusst werden. Die ultrastrukturelle Betrachtung zeigte eine Umorganisation der Kanäle in Gap Junctions, welche wahrscheinlich in einer Verminderung der GJIC resultiert.

In weiteren Arbeiten könnte nun differenziert herausgearbeitet werden, inwieweit sich die Reaktionen von Cx43-Hemikanälen und Gap Junctions auf die Stimulation unterscheiden. Diese Unterschiede sind für die Interpretation der Ergebnisse durchaus relevant. Es könnte geklärt werden, ob durch die Stimulation die Kommunikation zwischen den Zellen durch die Gap Junction-Kanäle, durch die nach extrazellulär weisenden Hemikanäle oder sogar durch beide beeinflusst wird. Es kann gegenwärtig nicht nachvollzogen werden, inwiefern die Stimulation in dieser Versuchsreihe Cx43-Hemikanäle beeinflusst. Zur zukünftigen Überprüfung, in welcher Form nun spezifisch die Cx43-Hemikanäle durch Sucrose-Lösung beeinflusst werden, könnte ein *Dye-Uptake-Assay* mittels Ethidium-Bromid durchgeführt werden. Für Ethidium-Bromid ist bekannt, dass es die Plasma-Membran passieren kann, in dem es diese mittels kleiner Kanäle, wie beispielsweise Hemikanälen, passiert (Johnson et al. 2016). Außerdem müsste in weiteren Versuchen geklärt werden, ob die nachgewiesenen Veränderungen durch Sucroslösung selbst hervorgerufen werden oder ob hypertone Effekte im Allgemeinen die beschriebenen strukturellen Umgestaltungen zur Folge haben. Auch bleibt die Frage offen, welche Bedeutung der hier beobachtete Verlust der GJIC für Astrozyten hat. Es gibt die Möglichkeit, dass lediglich zelluläre Signalwege supprimiert werden. Hier wäre darüber hinaus interessant zu wissen, ob infolge der Suppression, Gap Junctions an protektiven Mechanismen beteiligt sind, in dem diese z. B. bei Zunahme des osmotischen Drucks die Weiterleitung von Zell-Tod-Signalen verhindern. Auch eine weitere Frage in Bezug auf astrozytäre Regulationsmechanismen bleibt bisher unbeantwortet: Eigentlich sollte eine hypertone Umgebung zu einer Schrumpfung von Astrozyten führen. Der nachgewiesenen Einschränkung der GJIC könnte mit dem Schluss der Kanäle womöglich ebenfalls ein protektiver Effekt zugeordnet werden, welcher die Schrumpfung verhindert. Zur Klärung könnten immunhistochemische Färbungen und anschließende Zeitraffer-Fotografie sowie die Bestimmung des Ausmaßes möglichen Zelltodes mittels *Life-Dead-Assays* beitragen. Um die hier präsentierten Ergebnisse außerdem in Zukunft weiter zu bekräftigen, könnte das gleiche Versuchsmodell mittels hochkonzentrierter Glukose-Lösung, Natriumchloridlösung, Mannitol oder anderen hyperosmolaren Substanzen durchgeführt werden. Ein Vergleich dieser Ergebnisse würde eine Zuordnung bzw. ein Muster in Reaktion auf bestimmte Stoffgruppen erleichtern. Ein zusätzlicher modulierbarer Faktor wäre die Zeit. Die Stimulation und die entsprechenden Untersuchungen könnten nach längeren Stimulationszeiten bzw. in bestimmten Zeitabständen durchgeführt werden.

Zudem könnte die Signalkaskade zur Phosphorylierung der Gap Junction-Proteine analysiert werden, um nachzuweisen, ob die gezeigten Phosphorylierungen von S368 auf einer Induktion von PKC oder MAPK beruhen.

Zusammenfassend konnten in dieser Doktorarbeit die Auswirkungen hyperosmolarer Sucrose-Lösung auf Cx43-Gap Junctions hinsichtlich deren Morphologie sowie Offenwahrscheinlichkeit erfasst werden. Während die 5-minütige hyperosmolare Stimulation zu einer Zunahme von Größe und Fläche, vergrößerten Abständen der IMP sowie zu einer Abnahme der Partikeldichte führte, konnte indes im *Scrape Loading/Dye Transfer Assay* ein verminderter Farbaustausch in den Sucrose-Gruppen beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die hyperosmolare Stimulation ein Schließen der Gap Junction-Kanäle bewirken könnte. Die zeitgleich zur Größenzunahme beobachtete Abnahme der Partikeldichte könnte als Indiz dafür gesehen werden, dass die geschlossenen Gap Junction-Kanäle abgebaut und internalisiert werden. Parallel hierzu scheint die kurzfristige hyperosmolare Stimulation eine vermehrte Expression von ZO-1 zu begünstigen, während die Expressionsmuster von Cx43 selbst, GFAP und AQP4 nicht maßgeblich beeinflusst wurden. Die Proteinanalysen im Immunoblot zeigten, dass die 5-minütige Stimulation mit Sucrose-Lösung keine signifikante Veränderung von panCx43 induzierte, während eine signifikante Zunahme von pCx43 S368-Protein festgestellt werden konnte.

In Anbetracht der Beteiligung von Cx43 an Entstehung und Verlauf von Krankheiten erscheint die Charakterisierung und Analyse der Reaktionen von Cx43-Gap Junctions auf verschiedene äußere Einflüsse sinnvoll und unverzichtbar. Konkrete Beispiele sowie eine mögliche Einordnung der hier herausgearbeiteten Ergebnisse wurden bereits in Kapitel 4.3. erläutert. Hier wurde insbesondere auf die Rolle von Cx43 bei der Entstehung von Hirnödemen nach Schlaganfall bzw. Schädelhintrauma eingegangen. Ebenso wurde der mögliche Beitrag von Cx43 bei der Entstehung von zellulärer Dysfunktion vorgestellt. Die Beeinflussung bzw. Hemmung von Cx43-GJIC durch hyperosmolare Substanzen könnte folglich Grundlagen sowie mögliche Funktionsweisen zukünftiger Therapiestrategien bei diesen Pathologien aufzeigen. Zudem könnte die Aufklärung über das Zusammenwirken mit anderen astrozytären Proteinen wie AQP4, ZO-1 oder GFAP weitere Erkenntnisse über die Funktion von Astrozyten im ZNS liefern. Auch die Assoziation von Cx43 und ZO-1, welche im Rahmen des Abbaus und Internalisierung von Gap Junctions eine Rolle spielt, könnte als mögliche Zielstruktur in Therapien genutzt werden. Vielversprechend wäre auch die schrittweise Aufarbeitung beteiligter zellulärer Enzym- und Signalwege, wie beispielsweise der MAPK-Phosphorylierungskaskade. Auf der anderen Seite scheint das Zusammenwirken von hyperosmolaren Substanzen und Cx43-Gap Junctions in physiologischen, lebensnotwendigen Stoffwechselwegen, wie beispielsweise in der Regulation von Durst im Nucleus subthalamicus, unverzichtbar zu sein.

Letztendlich sind Cx43-Gap Junctions unentbehrlich für zelluläre Funktionen, unabhängig davon, in welchem Gewebe sie exprimiert werden. Ihre zweiseitige Beteiligung bei Wahrung der physiologischen Homöostase sowie bei der Entstehung von zahlreichen Krankheiten rückt diese immer weiter in das Zentrum aktueller Forschung und lässt Raum für neue Erklärungsmodelle oder Therapieansätze.

5 Literaturverzeichnis

- Aasen T, Johnstone S, Vidal-Brime L, Lynn KS, Koval M. 2018. Connexins: Synthesis, Post-Translational Modifications, and Trafficking in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 19.
- Abrams C, Rash J. 2009. Connexins in the Nervous System. Pages 323-357.
- Abrams CK, Scherer SS. 2012. Gap junctions in inherited human disorders of the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1818: 2030-2047.
- Alfieri R, Petronini PG. 2007. Hyperosmotic stress response: Comparison with other cellular stresses. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 454: 173-185.
- Aramburu J, Drews-Elger K, Estrada-Gelonch A, Minguillon J, Morancho B, Santiago V, Lopez-Rodriguez C. 2006. Regulation of the hypertonic stress response and other cellular functions by the Rel-like transcription factor NFAT5. *Biochem Pharmacol* 72: 1597-1604.
- Arima H, Yamamoto N, Sobue K, Umenishi F, Tada T, Katsuya H, Asai K. 2003. Hyperosmolar mannitol simulates expression of aquaporins 4 and 9 through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in rat astrocytes. *J Biol Chem* 278: 44525-44534.
- Axelsen LN, Stahlhut M, Mohammed S, Larsen BD, Nielsen MS, Holstein-Rathlou NH, Andersen S, Jensen ON, Hennan JK, Kjolbye AL. 2006. Identification of ischemia-regulated phosphorylation sites in connexin43: A possible target for the antiarrhythmic peptide analogue rotigaptide (ZP123). *J Mol Cell Cardiol* 40: 790-798.
- Babica P, Sovadinova I, Upham BL. 2016. Scrape Loading/Dye Transfer Assay. *Methods Mol Biol* 1437: 133-144.
- Bai X, Saab AS, Huang W, Hoberg IK, Kirchhoff F, Scheller A. 2013. Genetic background affects human glial fibrillary acidic protein promoter activity. *PLoS One* 8: e66873.
- Barres BA. 2008. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60: 430-440.
- Beardslee MA, Laing JG, Beyer EC, Saffitz JE. 1998. Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res* 83: 629-635.
- Beckmann A, Hainz N, Tschernig T, Meier C. 2019a. Facets of Communication: Gap Junction Ultrastructure and Function in Cancer Stem Cells and Tumor Cells. *Cancers (Basel)* 11.
- Beckmann A, Grissmer A, Wolf S, Recktenwald J, Meier C. 2019b. Oxygen-Glucose Deprivation in Mouse Astrocytes is Associated with Ultrastructural Changes in Connexin 43 Gap Junctions. *Neuroscience* 397: 67-79.
- Begandt D, Bintig W, Oberheide K, Schlie S, Ngezahayo A. 2010. Dipyridamole increases gap junction coupling in bovine GM-7373 aortic endothelial cells by a cAMP-protein kinase A dependent pathway. *J Bioenerg Biomembr* 42: 79-84.
- Beyer EC, Berthoud VM. 2018. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860: 5-8.
- Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. 1990. Connexin family of gap junction proteins. *J Membr Biol* 116: 187-194.
- Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT. 1972. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43: 429-435.
- Cao R, Jiang S, Duan L, Xiong YF, Gao B, Rao ZR. 2008. Hypertonic stimulation induces synthesis and release of glutamate in cultured rat hypothalamic astrocytes and C6 cells. *Neurosci Bull* 24: 359-366.
- Chen I, Lui F. 2020. Physiology, Active Transport. StatPearls. Treasure Island FL: StatPearls Publishing LLC.
- Chu H, Huang C, Gao Z, Dong J, Tang Y, Dong Q. 2017. Reduction of Ischemic Brain Edema by Combined use of Paeoniflorin and Astragaloside IV via Down-Regulating Connexin 43. *Phytother Res* 31: 1410-1418.
- Chu M, Novak SM, Cover C, Wang AA, Chinyere IR, Juneman EB, Zarnescu DC, Wong PK, Gregorio CC. 2018. Increased Cardiac Arrhythmogenesis Associated With Gap Junction Remodeling With Upregulation of RNA-Binding Protein FXR1. *Circulation* 137: 605-618.
- Chung WS, Allen NJ, Eroglu C. 2015. Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a020370.
- Clement T, Rodriguez-Grande B, Badaut J. 2020. Aquaporins in brain edema. *J Neurosci Res* 98: 9-18.

- da Silva PP, Parkison C, Dwyer N. 1981. Freeze-fracture cytochemistry: thin sections of cells and tissues after labeling of fractures faces. *J Histochem Cytochem* 29: 917-928.
- Danyalian A, Heller D. 2020. Central Pontine Myelinolysis. StatPearls. Treasure Island FL: StatPearls Publishing LLC.
- Defranco BH, Nickel BM, Baty CJ, Martinez JS, Gay VL, Sandulache VC, Hackam DJ, Murray SA. 2008. Migrating cells retain gap junction plaque structure and function. *Cell Commun Adhes* 15: 273-288.
- Dietzel I, Heinemann U, Lux HD. 1989. Relations between slow extracellular potential changes, glial potassium buffering, and electrolyte and cellular volume changes during neuronal hyperactivity in cat brain. *Glia* 2: 25-44.
- Dmitrieva NI, Michea LF, Rocha GM, Burg MB. 2001. Cell cycle delay and apoptosis in response to osmotic stress. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130: 411-420.
- Dubyak GR. 2004. Ion homeostasis, channels, and transporters: an update on cellular mechanisms. *Adv Physiol Educ* 28: 143-154.
- Dunn CA, Lampe PD. 2014. Injury-triggered Akt phosphorylation of Cx43: a ZO-1-driven molecular switch that regulates gap junction size. *J Cell Sci* 127: 455-464.
- Epifantseva I, Shaw RM. 2018. Intracellular trafficking pathways of Cx43 gap junction channels. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860: 40-47.
- Falk MM, Bell CL, Kells Andrews RM, Murray SA. 2016. Molecular mechanisms regulating formation, trafficking and processing of annular gap junctions. *BMC Cell Biol* 17 Suppl 1: 22.
- Fujimoto K. 1995. Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J Cell Sci* 108 (Pt 11): 3443-3449.
- Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Bouwer J, Tour O, Laird DW, Sosinsky GE, Tsien RY, Ellisman MH. 2002. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296: 503-507.
- Gankam-Kengne F, Couturier BS, Soupart A, Brion JP, Decaux G. 2017. Osmotic Stress-Induced Defective Glial Proteostasis Contributes to Brain Demyelination after Hyponatremia Treatment. *J Am Soc Nephrol* 28: 1802-1813.
- Giaume C, McCarthy KD. 1996. Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci* 19: 319-325.
- Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A. 2007. Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ* 14: 1324-1335.
- Giepmans BN. 2004. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res* 62: 233-245.
- Gong XQ, Nakagawa S, Tsukihara T, Bai D. 2013. A mechanism of gap junction docking revealed by functional rescue of a human-disease-linked connexin mutant. *J Cell Sci* 126: 3113-3120.
- Goodenough D, Gilula N. 1972. CELL JUNCTIONS AND INTERCELLULAR COMMUNICATION. Pages 155-168.
- Handler JS, Kwon HM. 2001. Cell and molecular biology of organic osmolyte accumulation in hypertonic renal cells. *Nephron* 87: 106-110.
- He JT, Li XY, Yang L, Zhao X. 2020. Astroglial connexins and cognition: memory formation or deterioration? *Biosci Rep* 40.
- Heuser JE. 2011. The origins and evolution of freeze-etch electron microscopy. *J Electron Microscop* (Tokyo) 60 Suppl 1: S3-29.
- Ho SN. 2006. Intracellular water homeostasis and the mammalian cellular osmotic stress response. *J Cell Physiol* 206: 9-15.
- Hol EM, Pekny M. 2015. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* 32: 121-130.
- Howarth AG, Hughes MR, Stevenson BR. 1992. Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. *Am J Physiol* 262: C461-469.
- Hunter AW, Barker RJ, Zhu C, Gourdie RG. 2005. Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion. *Mol Biol Cell* 16: 5686-5698.
- Ichkova A, Fukuda AM, Nishiyama N, Paris G, Obenaus A, Badaut J. 2019. Small Interference RNA Targeting Connexin-43 Improves Motor Function and Limits Astrogliosis After Juvenile Traumatic Brain Injury. *ASN Neuro* 11: 1759091419847090.

- Jiang S, Wang YQ, Xu CF, Li YN, Guo R, Li L. 2014. Involvement of connexin43 in the acute hyperosmotic stimulus-induced synthesis and release of vasopressin in the supraoptic nucleus of rats. *Mol Med Rep* 10: 2165-2171.
- Jiang S, Yuan H, Duan L, Cao R, Gao B, Xiong YF, Rao ZR. 2011. Glutamate release through connexin 43 by cultured astrocytes in a stimulated hypertonicity model. *Brain Res* 1392: 8-15.
- Johnson RG, Reynhout JK, TenBroek EM, Quade BJ, Yasumura T, Davidson KG, Sheridan JD, Rash JE. 2012. Gap junction assembly: roles for the formation plaque and regulation by the C-terminus of connexin43. *Mol Biol Cell* 23: 71-86.
- Johnson RG, et al. 2016. Connexin Hemichannels: Methods for Dye Uptake and Leakage. *J Membr Biol* 249: 713-741.
- Kamasawa N, et al. 2006. Abundance and ultrastructural diversity of neuronal gap junctions in the OFF and ON sublaminae of the inner plexiform layer of rat and mouse retina. *Neuroscience* 142: 1093-1117.
- Ke C, Poon WS, Ng HK, Pang JC, Chan Y. 2001. Heterogeneous responses of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats. *Neurosci Lett* 301: 21-24.
- Kells-Andrews RM, Margraf RA, Fisher CG, Falk MM. 2018. Connexin-43 K63-polyubiquitylation on lysines 264 and 303 regulates gap junction internalization. *J Cell Sci* 131.
- Kelly JJ, Esseltine JL, Shao Q, Jabs EW, Sampson J, Auranen M, Bai D, Laird DW. 2016. Specific functional pathologies of Cx43 mutations associated with oculodentodigital dysplasia. *Mol Biol Cell* 27: 2172-2185.
- Kennedy MB. 1995. Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends Biochem Sci* 20: 350.
- Kimelberg HK. 2004. Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience* 129: 851-860.
- Kojima T, Yamamoto M, Tobioka H, Mizuguchi T, Mitaka T, Mochizuki Y. 1996. Changes in cellular distribution of connexins 32 and 26 during formation of gap junctions in primary cultures of rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 223: 314-326.
- Kumar NM, Gilula NB. 1996. The gap junction communication channel. *Cell* 84: 381-388.
- Laird DW. 1996. The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *J Bioenerg Biomembr* 28: 311-318.
- Lampe PD, Lau AF. 2000. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384: 205-215.
- Lampe PD; Lau AF. 2004. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1171-1186.
- Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF. 2000. Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol* 149: 1503-1512.
- Lapato AS, Tiwari-Woodruff SK. 2018. Connexins and pannexins: At the junction of neuro-glial homeostasis & disease. *J Neurosci Res* 96: 31-44.
- Li D, Liu X, Liu T, Liu H, Tong L, Jia S, Wang YF. 2019. Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. *Glia*.
- Liddel S, Barres B. 2015. SnapShot: Astrocytes in Health and Disease. *Cell* 162: 1170-1170.e1171.
- Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS. 1996. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17: 607-615.
- Lu C, et al. 2018. Involvement of gap junctions in astrocyte impairment induced by manganese exposure. *Brain Res Bull* 140: 107-113.
- MacAulay N, Zeuthen T. 2010. Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. *Neuroscience* 168: 941-956.
- Malik S, Theis M, Eugenin EA. 2017. Connexin43 Containing Gap Junction Channels Facilitate HIV Bystander Toxicity: Implications in NeuroHIV. *Front Mol Neurosci* 10: 404.
- Manley GT, Binder DK, Papadopoulos MC, Verkman AS. 2004. New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice. *Neuroscience* 129: 983-991.
- Mao Y. 2016. Nearest neighbor distances calculation with Image J.
- Marquez-Rosado L, Solan JL, Dunn CA, Norris RP, Lampe PD. 2012. Connexin43 phosphorylation in brain, cardiac, endothelial and epithelial tissues. *Biochim Biophys Acta* 1818: 1985-1992.
- Mathias RT, White TW, Gong X. 2010. Lens gap junctions in growth, differentiation, and homeostasis. *Physiol Rev* 90: 179-206.

- Meier C, Beckmann A. 2018. Freeze fracture: new avenues for the ultrastructural analysis of cells in vitro. *Histochem Cell Biol* 149: 3-13.
- Mese G, Richard G, White TW. 2007. Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127: 2516-2524.
- Michinaga S, Koyama Y. 2019. Dual Roles of Astrocyte-Derived Factors in Regulation of Blood-Brain Barrier Function after Brain Damage. *Int J Mol Sci* 20.
- Middeldorp J, Hol EM. 2011. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93: 421-443.
- Moeckel GW. 2013. Hypertonic stress and cell death. Focus on "Multiple cell death pathways are independently activated by lethal hypertonicity in renal epithelial cells". *Am J Physiol Cell Physiol* 305: C1009-1010.
- Moor H, Muhlethaler K, Waldner H, Frey-Wyssling A. 1961. A new freezing-ultramicrotome. *J Biophys Biochem Cytol* 10: 1-13.
- Muto T, Tien T, Kim D, Sarthy VP, Roy S. 2014. High glucose alters Cx43 expression and gap junction intercellular communication in retinal Muller cells: promotes Muller cell and pericyte apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55: 4327-4337.
- Nagy JI, Rash JE. 2003. Astrocyte and oligodendrocyte connexins of the glial syncytium in relation to astrocyte anatomical domains and spatial buffering. *Cell Commun Adhes* 10: 401-406.
- Naus CC, Bani-Yaghoob M, Rushlow W, Bechberger JF. 1999. Consequences of impaired gap junctional communication in glial cells. *Adv Exp Med Biol* 468: 373-381.
- Nicchia GP, Srinivas M, Li W, Brosnan CF, Frigeri A, Spray DC. 2005. New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: cell cytoskeleton and functional relationship with connexin43. *Faseb j* 19: 1674-1676.
- Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou NH. 2012. Gap junctions. *Compr Physiol* 2: 1981-2035.
- Nimlamool W, Andrews RM, Falk MM. 2015. Connexin43 phosphorylation by PKC and MAPK signals VEGF-mediated gap junction internalization. *Mol Biol Cell* 26: 2755-2768.
- Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. 2012. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol* 814: 23-45.
- Oberheim NA, et al. 2009. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* 29: 3276-3287.
- Olins AL, Gould TJ, Boyd L, Sarg B, Olins DE. 2020. Hyperosmotic stress: in situ chromatin phase separation. *Nucleus* 11: 1-18.
- Orellana JA, Hernandez DE, Ezan P, Velarde V, Bennett MV, Giaume C, Saez JC. 2010. Hypoxia in high glucose followed by reoxygenation in normal glucose reduces the viability of cortical astrocytes through increased permeability of connexin 43 hemichannels. *Glia* 58: 329-343.
- Orthmann-Murphy JL, Abrams CK, Scherer SS. 2008. Gap junctions couple astrocytes and oligodendrocytes. *J Mol Neurosci* 35: 101-116.
- Page E, Karrison T, Upshaw-Earley J. 1983. Freeze-fractured cardiac gap junctions: structural analysis by three methods. *Am J Physiol* 244: H525-539.
- Papadopoulos MC, Krishna S, Verkman AS. 2002. Aquaporin water channels and brain edema. *Mt Sinai J Med* 69: 242-248.
- Penes MC, Li X, Nagy JI. 2005. Expression of zonula occludens-1 (ZO-1) and the transcription factor ZO-1-associated nucleic acid-binding protein (ZONAB)-MsY3 in glial cells and colocalization at oligodendrocyte and astrocyte gap junctions in mouse brain. *Eur J Neurosci* 22: 404-418.
- Peracchia C. 1977. Gap junctions. Structural changes after uncoupling procedures. *J Cell Biol* 72: 628-641.
- Perkins GA, Goodenough DA, Sosinsky GE. 1998. Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons. *J Mol Biol* 277: 171-177.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- Ramachandran S, Arce FT, Patel NR, Quist AP, Cohen DA, Lal R. 2014. Structure and permeability of ion-channels by integrated AFM and waveguide TIRF microscopy. *Sci Rep* 4: 4424.
- Rash JE, Yasumura T. 1999. Direct immunogold labeling of connexins and aquaporin-4 in freeze-fracture replicas of liver, brain, and spinal cord: factors limiting quantitative analysis. *Cell Tissue Res* 296: 307-321.

- Rash JE, Davidson KG, Yasumura T, Furman CS. 2004. Freeze-fracture and immunogold analysis of aquaporin-4 (AQP4) square arrays, with models of AQP4 lattice assembly. *Neuroscience* 129: 915-934.
- Rash JE, Duffy HS, Dudek FE, Bilhartz BL, Whalen LR, Yasumura T. 1997. Grid-mapped freeze-fracture analysis of gap junctions in gray and white matter of adult rat central nervous system, with evidence for a "panglial syncytium" that is not coupled to neurons. *J Comp Neurol* 388: 265-292.
- Raslan A, Hainz N, Beckmann A, Tschernig T, Meier C. 2016. Pannexin-1 expression in developing mouse nervous system: new evidence for expression in sensory ganglia. *Cell Tissue Res* 364: 29-41.
- Reichenbach A, Derouiche A, Kirchhoff F. 2010. Morphology and dynamics of perisynaptic glia. *Brain Res Rev* 63: 11-25.
- Ren W, Jing G, Shen Q, Yao X, Jing Y, Lin F, Pan W. 2013. Occludin and connexin 43 expression contribute to the pathogenesis of traumatic brain edema. *Neural Regen Res* 8: 2703-2712.
- Rhett JM, Jourdan J, Gourdie RG. 2011. Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1. *Mol Biol Cell* 22: 1516-1528.
- Robenek H, Severs NJ. 2008. Recent advances in freeze-fracture electron microscopy: the replica immunolabeling technique. *Biol Proced Online* 10: 9-19.
- Saez JC, et al. 2018. Connexin 43 Hemichannel Activity Promoted by Pro-Inflammatory Cytokines and High Glucose Alters Endothelial Cell Function. *Front Immunol* 9: 1899.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671-675.
- Schulz R, Gorge PM, Gorbe A, Ferdinandy P, Lampe PD, Leybaert L. 2015. Connexin 43 is an emerging therapeutic target in ischemia/reperfusion injury, cardioprotection and neuroprotection. *Pharmacol Ther* 153: 90-106.
- Sekerdag E, Solaroglu I, Gursoy-Ozdemir Y. 2018. Cell Death Mechanisms in Stroke and Novel Molecular and Cellular Treatment Options. *Curr Neuropharmacol* 16: 1396-1415.
- Severs NJ. 2007. Freeze-fracture electron microscopy. *Nat Protoc* 2: 547-576.
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 7-35.
- Sohl G, Willecke K. 2003. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes* 10: 173-180.
- Söhl G., Willecke K. 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62: 228-232.
- Solan JL, Lampe PD. 2007. Key connexin 43 phosphorylation events regulate the gap junction life cycle. *J Membr Biol* 217: 35-41.
- Solan JL, Lampe PD. 2009. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J* 419: 261-272.
- Steere RL, Erbe EF. 1983. Supporting freeze-etch specimens with 'Lexan' while dissolving biological remains in acids. *Microsc Soc Am Proc* 41: 618-619.
- Theis M, Giaume C. 2012. Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res* 1487: 88-98.
- Thevenin AF, Margraf RA, Fisher CG, Kells-Andrews RM, Falk MM. 2017. Phosphorylation regulates connexin43/ZO-1 binding and release, an important step in gap junction turnover. *Mol Biol Cell* 28: 3595-3608.
- Thevenin AF, Kowal TJ, Fong JT, Kells RM, Fisher CG, Falk MM. 2013. Proteins and mechanisms regulating gap-junction assembly, internalization, and degradation. *Physiology (Bethesda)* 28: 93-116.
- Valiunas V, Cohen IS, Brink PR. 2018. Defining the factors that affect solute permeation of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860: 96-101.
- Van Itallie CM, Anderson JM. 2014. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol* 36: 157-165.
- Vasile F, Dossi E, Rouach N. 2017. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct* 222: 2017-2029.
- Verkhatsky A, Nedergaard M. 2018. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev* 98: 239-389.
- Weed LH, Mc Kibben PS. 1919. EXPERIMENTAL ALTERATIONS OF BRAIN BULK. *Journal of the American Medical Association* 73: 194-195.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, Mack AF. 2011. Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol* 287: 1-41.
- Wolf F, Kirchhoff F. 2008. Neuroscience. Imaging astrocyte activity. *Science* 320: 1597-1599.

- Wu Z, Xu H, He Y, Yang G, Liao C, Gao W, Liang M, He X. 2013. Antisense oligodeoxynucleotides targeting connexin43 reduce cerebral astrocytosis and edema in a rat model of traumatic brain injury. *Neurol Res* 35: 255-262.
- Xie M, et al. 2011. Glial gap junctional communication involvement in hippocampal damage after middle cerebral artery occlusion. *Ann Neurol* 70: 121-132.
- Xing L, Yang T, Cui S, Chen G. 2019. Connexin Hemichannels in Astrocytes: Role in CNS Disorders. *Front Mol Neurosci* 12: 23.
- Yang M, Gao F, Liu H, Yu WH, Zhuo F, Qiu GP, Ran JH, Sun SQ. 2013. Hyperosmotic induction of aquaporin expression in rat astrocytes through a different MAPK pathway. *J Cell Biochem* 114: 111-119.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134.
- Zhou X, Naguro I, Ichijo H, Watanabe K. 2016. Mitogen-activated protein kinases as key players in osmotic stress signaling. *Biochim Biophys Acta* 1860: 2037-2052.
- Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS. 2016. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17: 564-580.

6 Veröffentlichungen

6.1 Publikationen

Anja Beckmann, Alexander Grißmer, Sandra Wolf, **Johanna Recktenwald**, Carola Meier (2019)
Oxygen-Glucose Deprivation in Mouse Astrocytes is Associated with Ultrastructural Changes in
Connexin 43 Gap Junctions
Neuroscience 397: S. 67-79, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.11.043>

Anja Beckmann, **Johanna Recktenwald**, Alexander Grißmer, and Carola Meier
Connexin 43 gap junctions as frontline challengers in astrocytic response to hyperosmotic stress:
Modification of ultrastructural connexon assembly
Manuskript in Vorbereitung

6.2 Kongressbeiträge

Anja Beckmann, **Johanna Recktenwald**, Alexander Grißmer, Sandra Wolf, Carola Meier
Ultrastructural changes in Connexin 43 gap junctions in primary astrocytes after oxygen-glucose
deprivation or upon stimulation with hyperosmolar sucrose
XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Porto, Portugal, 10.-13. Juli 2019
GLIA 67: E125-E766 (2019)

Anja Beckmann, **Johanna Recktenwald**, Sandra Wolf, Alexander Grißmer, Carola Meier
Pathologic alteration of astrocytic homeostasis induces changes of Connexin 43 gap junctions
encompassing ultrastructure, phosphorylation status and function
114. Jahrestagung der anatomischen Gesellschaft

7 Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich meinen Dank all jenen Personen aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. C. Meier bedanken, für die Möglichkeit, diese Dissertation in Ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen. Des Weiteren bedanke ich mich für ihre fachliche Betreuung und Unterstützung sowie ihr offenes Ohr für all die Dissertation betreffenden Themen und Fragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Anja Beckmann. Ihre hervorragende Betreuung hat maßgeblich dazu beigetragen, diese Dissertation in dieser Form fertigzustellen. Ich danke ihr für ihre fachliche Unterstützung, Hilfsbereitschaft, Geduld, und auch für ihre motivierenden Gespräche. Frau Dr. rer. nat. Anja Beckmann war stets eine zuverlässige Ansprechpartnerin bei allen die Dissertation betreffenden Problemen oder Fragen.

Herrn Alexander Grißmer danke ich ebenso, insbesondere für seine Unterstützung bei den FRIL-Versuchen, sowie seine Hilfestellung bei den zahlreichen Labor-Versuchen.

Frau Dr. rer. nat. Nadine Hainz danke ich für ihren Einsatz bei der Auswertung der qRT-PCR sowie für ihre Unterstützung und ihren Rat, insbesondere bei Formatierungsfragen.

Ich bedanke mich bei Frau Andrea Rabung für ihre Mithilfe bei der Durchführung der qRT-PCR.

Auch an Frau Helga Meyer, Frau Franziska Müller und Herrn Martin Messer geht ein herzliches Dankeschön für ihre Mithilfe und Unterstützung. Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern der TEM-Abteilung des Forschungsgebäudes 61.4 bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich noch einmal bei allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppe von Frau Prof. C. Meier bedanken, welche mich nicht nur fachlich auf diesem Weg begleitet haben, sondern mich auch in diese Arbeitsgruppe integriert haben. Die Arbeit im Labor hat mir in dieser Zeit sehr viel Freude bereitet.

Ein großes Dankeschön geht an meinen Freund Vitalij. Danke für die Rückendeckung, den Beistand und Zuversichtlichkeit und für das unzählige Korrekturlesen.

Und schließlich geht mein Dank an meine Eltern, die mir dieses Studium und damit diese Dissertation überhaupt ermöglicht haben – und an meine Schwester Katharina. Vielen Dank dafür, dass ihr immer an mich glaubt.

8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.