

**Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H.-J. Wagner**

Abteilung Zelluläre Neurobiologie

Lehrbereich: Anatomie und Neuroanatomie

Abteilungsleiter: Professor Dr. H.-J. Wagner

**Expression von Aquaporin 4 und Aquaporin 9 in glialen
und neuronalen Zellkulturen des Mesencephalons und
des Striatums der Maus**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Jörg Walter Richard Hawes

aus

Reutlingen

2010

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-J. Wagner
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Grissmer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Gliederung der Ergebnisse und der Diskussion	V
Abkürzungen	VI
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Aquaporine	- 1 -
1.2 Aquaporin 4 und Aquaporin 9 im Zentralen Nervensystem	- 2 -
1.2.1 Aquaporin 4	- 2 -
1.2.2 Aquaporin 9	- 4 -
1.3 Die embryonale Entwicklung komplexer Hirnstrukturen.....	- 4 -
1.4 Regulation der Expression von Aquaporinen im ZNS.....	- 5 -
1.5 Ziel der Arbeit	- 6 -
2 Material und Methoden.....	- 8 -
2.1 Versuchstier.....	- 8 -
2.1.1 Makroskopische Präparation	- 9 -
2.1.2 Mikroskopische Präparation des Mesencephalons.....	- 9 -
2.1.3 Mikroskopische Präparation des Striatums.....	- 9 -
2.2 Herstellung der neuronalen Primärkulturen	- 10 -
2.2.1 Aufbereitung des Gewebes	- 10 -
2.2.2 Coaten mit Poly-DL-Ornithin.....	- 10 -
2.2.3 Vorbereitung der Neuronen zur Aussaat	- 10 -
2.3 Inkubation und Behandlung der neuronalen Zellkulturen.....	- 11 -
2.3.1 Inkubationsbedingungen.....	- 11 -
2.3.2 Medium.....	- 11 -
2.4 Herstellung der glialen Primärkulturen.....	- 12 -
2.4.1 Aufbereitung des Gewebes	- 12 -
2.4.2 Coaten mit Poly-DL-Ornithin.....	- 12 -
2.4.3 Aussaat der Gliazellen.....	- 12 -
2.5 Behandlung der Zellkulturen.....	- 13 -

2.6	Realtime-PCR.....	- 14 -
2.6.1	Gewinnung der RNA.....	- 14 -
2.6.2	Transkription in cDNA.....	- 15 -
2.6.3	Durchführung der Realtime PCR	- 15 -
2.7	Westernblot	- 18 -
2.7.1	Proteinaufbereitung	- 18 -
2.7.2	Konzentrationsbestimmung	- 18 -
2.7.3	Gelherstellung	- 20 -
2.7.4	Elektrophoretische Proteinauftrennung.....	- 20 -
2.7.5	Blotting auf Nitrozellulose	- 20 -
2.7.6	Blocken.....	- 21 -
2.7.7	Erst- und Zweitantikörper.....	- 21 -
2.7.8	Visualisierung/Entwicklung	- 22 -
2.8	Immunzytochemie.....	- 22 -
2.9	Verwendete Geräte, Materialien	- 24 -
2.10	Verwendete Chemikalien.....	- 24 -
2.11	Primer	- 26 -
2.12	Antikörper	- 26 -
2.13	Chemikalien-Sets	- 26 -
2.14	Verwendete Lösungen.....	- 27 -
2.15	Statistische Auswertung	- 28 -
3	Ergebnisse	- 30 -
3.1	AQP4-mRNA-Expression in neuronalen Zellkulturen des Mesencephalons und des Striatums.....	- 30 -
3.2	AQP4-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Mesencephalons.....	- 30 -
3.3	AQP4-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums.....	- 32 -
3.3.1	AQP4-mRNA-Expression bei Dopaminbehandlung glialer Zellkulturen des Striatums	- 32 -
3.3.2	AQP4-mRNA-Expression bei Östrogenbehandlung glialer Zellkulturen des Striatums	- 34 -

3.3.3	Quantitative Expression von AQP4 in glialen Zellkulturen des Striatums.....	- 35 -
3.3.4	Qualitative Expression von AQP4 in glialen Zellkulturen des Striatums.....	- 37 -
3.4	AQP9-mRNA- und AQP9-Expression in neuronalen Zellkulturen des Mesencephalons	- 38 -
3.5	AQP9-mRNA-Expression in neuronalen Zellkulturen des Striatums.....	- 38 -
3.5.1	AQP9-mRNA-Expression in neuronalen Zellkulturen des Striatums bei Dopaminbehandlung	- 38 -
3.5.2	AQP9-mRNA-Expression in neuronalen Zellkulturen des Striatums bei Östrogenbehandlung.....	- 40 -
3.6	AQP9-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Mesencephalons.....	- 42 -
3.7	AQP9-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums.....	- 44 -
3.7.1	AQP9-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums bei Dopaminbehandlung.....	- 44 -
3.7.2	AQP9-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums bei Östrogenbehandlung	- 46 -
3.8	Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse.....	- 47 -
4	Diskussion	- 49 -
4.1	AQP4-Expression in Neuronen des Striatums und des Mesencephalons	- 49 -
4.2	Regulation der AQP4-Expression in Gliazellen des Mesencephalons.....	- 49 -
4.3	Regulation der AQP4-Expression in Gliazellen des Striatums.....	- 50 -
4.4	Regulation der AQP9-Expression in Neuronen des Mesencephalons.....	- 54 -

4.5	Regulation der AQP9-Expression in Neuronen des Striatums.....	- 54 -
4.6	Regulation der AQP9-Expression in Gliazellen des Mesencephalons.....	- 55 -
4.7	Regulation der AQP9-Expression in Gliazellen des Striatums.....	- 56 -
4.8	Zusammenfassung AQP4 und AQP9 als Bestandteile eines komplexen Regulationssystems der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung des zentralen Nervensystems	- 58 -
5	Literaturverzeichnis.....	- 60 -

Gliederung der Ergebnisse und der Diskussion

Tabelle 1 Kapitelübersicht des Ergebnis- und Diskussionsteils, sortiert nach dem jeweils untersuchten Aquaporin, dem Zelltyp und der Hirnregion

Protein	Zelltyp	Hirnregion	Kapitel	
			Ergebnis	Diskussion
AQP4	Neuronen	Mesencephalon Striatum	3.1	4.1
	Glia	Mesencephalon	3.2	4.2
		Striatum	3.3	4.3
AQP9	Neuronen	Mesencephalon	3.4	4.4
		Striatum	3.5	4.5
	Glia	Mesencephalon	3.6	4.6
		Striatum	3.7	4.7
Zusammenfassung			3.8	4.8

Abkürzungen

al.	alii/aliae
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin(e)
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
D1R	Dopamin-1-Rezeptor
D2R	Dopamin-2-Rezeptor
Da	Dopamin
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
etc.	et cetera
FCP	Fastlane Zellyse- und RNA-Stabilisierungspuffer
FCS	Fetales Kälberserum
FCW	Fastlane Zell-Waschpuffer
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HMBS	Hydroxymethylbilanesynthase
ICI	ICI-182,780
kDa	KiloDalton
k.E.	kein Ergebnis
max.	maximal
MEM	Minimal Essential Medium (Eagle's ~)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert

NBM	Gibco Neurobasal Medium
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RT	Reverse Transkriptase
OAP	Orthogonal Arrays of Particles
PBS	Phosphate Buffered Saline
SCH	SCH23390
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SG	SYBR Green
SKF	SKF38393
s.o.	siehe oben
Sul	Sulpirid
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Aquaporine

Zellen befinden sich in kontinuierlichem Stoffaustausch mit der sie umgebenden Umwelt. Dieser für die Zelle und den Gesamtorganismus lebensnotwendige Stofftransfer über die Zellmembran dient so unterschiedlichen Zwecken wie dem Zellmetabolismus, der Signaltransduktion aber auch der Volumenregulation durch Ein- bzw. Ausstrom von Wasser und osmotisch wirksamen Molekülen und Ionen.

Die Zelle bedient sich verschiedener Mechanismen, um einen solchen transmembranalen Stoffaustausch zu gewährleisten. Neben in der Membran lokalisierten Transportmolekülen und der Möglichkeit der Diffusion ist die Zelle in der Lage, Kanalproteine zu synthetisieren, welche ebenfalls in die Zellmembran integriert werden. Diese Kanalproteine haben in unterschiedlichem Ausmaß die Fähigkeit, selektiv bestimmten Molekülen bzw. Stoffgruppen mit ähnlichen Eigenschaften, die Passage über die Zellmembran zu ermöglichen. Im Gegensatz zu energieabhängigen Transportmolekülen erfolgt der Ein- bzw. Ausstrom von Stoffen bei Kanälen gradientenabhängig.

Bei Aquaporinen handelt es sich um eine Familie von Wasserkanalproteinen mit zum Teil heterogenen Eigenschaften. Beim Säuger sind bisher 13 Subtypen dieser Aquaporine bekannt; es hat sich für diese die Bezeichnung AQP0 bis AQP12 (Itoh et al., 2005) etabliert.

Ihrer Benennung entsprechend sind alle Aquaporinsubtypen grundsätzlich von Wassermolekülen passierbar, wobei jedoch auch *in vivo* exprimierte Spleißvarianten existieren, die diese Funktion nicht besitzen (Moe et al., 2008). Darüber hinaus gibt es aber auch Subtypen (AQP3, AQP7 und AQP9), welche außer für Wasser auch für Stoffwechsel-metabolite wie Glycerol, Laktat und Monocarboxylate permeabel sind (Hub & de Groot, 2008).

Die funktionelle Bedeutung der Aquaporine reicht von der Aufrechterhaltung der Wasserhomöostase über die Volumenregulation (Agre & Kozono, 2003) weiter über den Austausch von Stoffwechselmetaboliten bis hin zur Zelladhäsion

(Engel et al., 2008). Durch AQP4 beeinflussen Gliazellen die Exzitabilität von Neuronen und könnten so auch pathophysiologisch für die Entstehung von Epilepsien relevant sein (Hsu M.S. et al., 2007). Auch unter anderen pathologischen Umständen scheinen Aquaporine eine bedeutende Rolle zu spielen. Dies konnte z.B. für AQP4 für Hirnödem, Apoplex, Entzündung und Neoplasien des Gehirns und anderer Organe (Gunnarson et al., 2004; Papadopoulos & Verkman, 2007; Verkman, 2005, 2009; Verkman et al., 2008) gezeigt werden.

Die einzelnen Säugerorgane besitzen in qualitativer Hinsicht eine typische Ausstattung an bestimmten Aquaporinsubtypen. So kommen im Zentralen Nervensystem neben AQP1 die Aquaporine AQP4 und AQP9 vor, wobei AQP4 bezüglich Vorkommen und Konzentration vorherrscht (Tait et al., 2008). Weiterhin variiert das Expressionsmuster der einzelnen Aquaporine zum einen abhängig von der spezifischen Region des Säugergehirns (Badaut et al., 2002; Yool, 2007) und zum anderen von den Anforderungen, die die Zelle erfüllen muss. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass AQP4 eine Rolle bei der Migration astroglialer Zellen bei der Gewebsreparation nach Verletzung spielt (Saadoun et al., 2005).

1.2 Aquaporin 4 und Aquaporin 9 im Zentralen Nervensystem

1.2.1 Aquaporin 4

Im ZNS der Säugetiere ist AQP4 in Neurogliazellen nachweisbar, die höchsten Konzentrationen dieses Proteins weisen hierunter die Astrozyten auf, aber auch Ependymzellen exprimieren AQP4, Plexusepithelzellen dagegen nicht (Graber 2008). Ebenso wird AQP4 in Neuronen nicht exprimiert (Tait et al., 2008; Lehmann et al., 2004, Nagelhus et al., 1998).

AQP4 ist nicht gleichmäßig in der Membran der Astrozyten verteilt, sondern befindet sich überwiegend in den Endfußmembranen der Zellen (Yool, 2007). Es können dabei die beiden Isoformen M1 und M23 dieses Proteins nachgewiesen werden. Das aus 301 Aminosäuren bestehende AQP4-M23

kommt in insgesamt dreifach höherer Konzentration vor als die 323 Aminosäuren große Isoform AQP4-M1 (Furman et al., 2003). Funktionell unterscheiden sich die beiden Isoformen hinsichtlich ihres osmotischen Wasserpermeabilitätskoeffizienten (Silberstein et al., 2004). Abhängig von der lokalen relativen Konzentration der beiden Isoformen ordnen sich diese in spezifischen Feldstrukturen, sog. *orthogonal arrays of particles* (OAPs) an (Furman et al., 2003; Silberstein et al., 2004). Während die M23-Isoform OAPs von mehr als 100 Partikeln ausbilden kann, entstehen aus M1-AQP nur gelegentlich Feldstrukturen von meist weniger als 12 Partikeln; überwiegend ist diese M1-Isoform aber in Einzelpartikeln verstreut auf der Zellmembran nachweisbar (Furman et al., 2003). Innerhalb einer OAP-Struktur tritt jeweils nur eine der beiden Isoformen auf (Crane et al., 2008). Die unterschiedliche Expression der beiden Isoformen M1 und M23 könnte bedeuten, dass durch Veränderung des Konzentrationsverhältnisses durch die Zelle die OAP-Strukturen und damit auch die osmotische Permeabilität reguliert werden könnte. Ob diese beobachtete Permeabilitätsänderung oder eine andere Funktion der OAP-Struktur deren phylogenetische Existenz und Erhaltung erklärt ist noch Gegenstand der Forschung.

Neben AQP4-M1 und AQP4-M23 wurden weitere Isoformen beschrieben, deren unterschiedliche cDNAs sich aus Spleißvarianten ergeben (Moe et al., 2008). Die Benennung dieser Isoformen erfolgt mit AQP4a, -b, -c, -d, -e und -f, wobei AQP4a synonym zu AQP4-M1 ist und AQP4c synonym zu AQP4-23. Da die Isoformen AQP4b, -d, -e und -f zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente für diese Arbeit noch nicht publiziert waren, konnten diese hier nicht berücksichtigt werden.

1.2.2 Aquaporin 9

AQP9 wird nach mehrheitlichen Beobachtungen im ZNS von Nagetieren in Astrozyten, Endothelzellen und katecholaminergen Neuronen des Hirnstamms und kortikalen Neuronen der Hippocampusregion exprimiert (Badaut et al., 2004a, Badaut & Regli, 2004b, 2008; Mylonakou et al., 2009), wogegen Rojek et al. (2007) die Existenz von AQP9 im Gehirn bestreiten. Im Gegensatz zu AQP4 ist die Lokalisation von AQP9 in Astrozyten nicht überwiegend auf die Endfußmembranen beschränkt (Badaut et al., 2004a). Untersuchungen, die zeigten, dass sich eine funktionelle Isoform von AQP9 in der inneren Mitochondrienmembran von Astrozyten befindet (Amiry-Moghaddam et al., 2005; Mylonakou et al., 2009) ließen sich nicht in allen Untersuchungen bestätigen (Yang et al., 2006).

Neben der Durchlässigkeit für Wassermoleküle ist AQP9 auch für Glycerin, Monocarboxylate (z.B. Laktat) und Harnstoff permeabel. Aufgrund der Permeabilität für die genannten Stoffwechselmetabolite könnte AQP9 eine Rolle im Energiemetabolismus der Zellen spielen (Badaut & Regli, 2004b), insbesondere konnte auch eine insulinabhängige Regulation von AQP9 im Rahmen des Glukosestoffwechsels in katecholaminergen Neuronen gezeigt werden (Badaut et al., 2008).

1.3 Die embryonale Entwicklung komplexer Hirnstrukturen

Die embryonale Heranreifeung der einzelnen Bereiche des Säugerhirns erfordert eine präzise räumliche und zeitliche Steuerung, welche aufgrund vielfältiger biochemischer Mechanismen erfolgt und auch durch umgebende Hirnareale beeinflusst wird. Grundlegendes Prinzip hierbei ist die fortwährende Interaktion zwischen extrazellulären Signalstoffen (Ionen, Proteine, anorganische Moleküle etc.), welche die Syntheseleistung und den Stoffwechsel der Zelle beeinflussen. Durch Freisetzung von Signalstoffen ist die einzelne Zelle wiederum in der Lage, andere Zellen zu beeinflussen. Die Signalstoffe entfalten ihre Wirkung entweder durch rezeptorvermittelte Signaltransduktion oder sie gelangen über Trans-

porter, Kanäle oder durch Diffusion ins Zellinnere. Dies führt dann zu Effekten wie der Aktivierung oder Hemmung der Transkription von Genen oder der Veränderung des intrazellulären Milieus. Insgesamt können solche Botenstoffe hierdurch Einfluss auf Zellwachstum, Differenzierung aber auch Apoptose nehmen. Für die physiologische Entwicklung des nigrostriatalen Systems und des Mesencephalons besitzen, neben einer Vielzahl weiterer Stoffe, die Signalmoleküle 17- β -Estradiol und Dopamin eine entscheidende Bedeutung (Beyer et al., 2002, 2003; Brito et al., 2004; Fauchey et al., 2000; Küppers & Beyer, 1999, Küppers et al., 2000, 2001a; Pawlak et al., 2005; Reuss & Unsicker, 2000, Schmidt et al., 1996; Zanassi et al., 1999).

1.4 Regulation der Expression von Aquaporinen im ZNS

Es sind bereits mehrere Signalstoffe bekannt, welche die Aquaporinexpression beeinflussen. So moduliert die für die intrazelluläre Signaltransduktion bedeutende Proteinkinase C die Expression von AQP4 und AQP9 (Yamamoto et al., 2001), auf AQP9 nimmt auch die Proteinkinase A Einfluss. Dagegen besitzt die Proteinkinase C außer auf die Expression auch Einfluss auf die Wasserpermeabilität von AQP4 (Zelenina et al., 2002). Gewebsspezifische Isoformen von Agrin als Bestandteil der extrazellulären Matrix modulieren wiederum spezifisch Isoformen von AQP4 in Astrozyten (Noell et al., 2007).

Auch durch hormonellen Einfluss wurden Veränderungen der Aquaporinkonzentrationen beobachtet, so z.B. für Steroidhormone auf AQP4 und AQP9 (Gunnarson et al., 2004) oder Insulin, welches die AQP9-Expression in katecholaminergen Neuronen verändert (Badaut et al., 2008). Durch Freisetzung von Thrombin im Rahmen hämorrhagischer Hirninsulte werden die Aquaporine 4 und 9 ebenfalls moduliert (Sun et al., 2009).

1.5 Ziel der Arbeit

Aufgrund ihrer Wasserpermeabilität und damit der Möglichkeit, das Zellvolumen zu beeinflussen, könnte die Regulation der Aquaporine 4 und 9 eine Rolle bei der Zellentwicklung und Zelldifferenzierung im ZNS spielen. Hierfür spricht auch deren vom Differenzierungsstadium abhängiges Vorkommen in neuronalen Stammzellen (Cavazzin et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Neurone und Gliazellen des nigrostriatalen Systems und des Mesencephalons der Maus in spezifischen embryonalen Entwicklungsstadien (Neurone) bzw. postnatal (Glia) gewonnen und hieraus Zellkulturen hergestellt. Die Entwicklungsstadien wurden hierbei so gewählt, dass die jeweilige Hirnregion in einem frühen und aktiven Stadium ihrer Entwicklung, zugleich aber auch in quantitativ ausreichender Zellmenge gewonnen werden konnte.

Bei der Entwicklung des Striatums findet ein Neurogenesepeak (geschlechtsabhängig) zwischen dem 13. und 15. Embryonaltag statt (Jain et al., 2001), worauf am 17. Embryonaltag die Differenzierung GABAerger Neurone beginnt; daher wurde das Striatum am Embryonaltag 17 gewonnen.

Für das Mesencephalon wurde der Embryonaltag 15 für die Zellpräparation gewählt. Zu diesem Zeitpunkt ist Aromatase nachweisbar, welche für die Konversion von Androgenen zu Östrogenen erforderlich ist (Raab et al., 1995). Östrogene wiederum nehmen Einfluss auf die Tyrosinhydroxylase-Expression in dopaminergen Zellen (Raab et al., 1995). Diese Enzymsynthese ist Voraussetzung für die Konversion von L-Tyrosin in DOPA, dem Edukt der zellulären Dopaminsynthese. Um den 15. Embryonaltag steht das Mesencephalon in vivo somit unter dem Einfluss der Expression und Interaktion von Östrogen und Dopamin.

Striatale und mesencephale Zellkulturen wurden in vitro hinsichtlich der Expression und Lokalisation von AQP4 und AQP9 untersucht.

Folgende Hypothesen sind Grundlage der Fragestellung dieser Arbeit:

1. Die Expression von AQP4 und AQP9 während der neuronalen Entwicklung wird abhängig davon verändert, ob die Zelle proliferiert oder sich differenziert, da dies mit unterschiedlichen Erfordernissen an Zellvolumen und Zellmetabolismus verbunden ist
2. Faktoren, die im nigrostriatalen System Zellteilung, Migration, sowie die Bildung von Neuriten, Wachstumskegeln und Synapsen modulieren, regulieren die Expression von AQP4 und AQP9.
3. Dopamin stellt ein Differenzierungssignal für GABAerge Neurone dar. Da dieser Differenzierungsprozess mit gesteigertem Metabolismus und erhöhtem Umsatz an Stoffwechselprodukten einhergeht, wird die Expression des für Energiemetaboliten permeable Aquaglyceroporins 9 durch Dopamin hochreguliert.

Ziel der Arbeit ist die Untersuchung, ob Dopamin und 17- β -Estradiol Einfluss auf die zelluläre Expression von AQP4 und AQP9 auf Ebene der mRNA und des Proteins selbst besitzen. Sofern sich eine Regulation durch diese Stoffe bestätigt, soll weiter untersucht werden, über welche Rezeptoren die Signaltransduktion für die Expressionsmodulation induziert werden könnte.

Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurde die Expression von AQP4 und AQP9 in primären neuronalen und glialen Zellkulturen aus dem Mittelhirn und dem Striatum der Maus in An- und Abwesenheit von Dopamin und 17- β -Estradiol untersucht.

2 Material und Methoden

Die Untersuchungen der Expression von AQP4 und AQP9 erfolgten an einem validen zellulären Modellsystem glialer und neuronaler Primärkulturen, welches in der Arbeitsgruppe von Dr. E. Küppers erfolgreich etabliert wurde (Küppers & Beyer, 1999, 2001b; Küppers et al., 2000; Küppers et al., 2001a; Beyer et al., 2002; Beyer et al., 2003; Brito et al., 2004; Pawlak et al., 2005). Die Expression der Aquaporine wurde in Kulturen untersucht, die entweder unbehandelt blieben oder mit Dopamin bzw. mit Östrogen behandelt wurden. Weiterhin wurden die Zellkulturen mit Dopamin oder Östrogen und den korrespondierenden spezifischen Rezeptorantagonisten behandelt. Für Dopaminrezeptoren war dies für den D1-Rezeptor die Substanz SCH23390 sowie für die Antagonisierung des D2-Rezeptors die Substanz Sulpirid. Zur Antagonisierung des nukleären Östrogenrezeptors kam ICI-182,780 zur Anwendung.

2.1 Versuchstier

Als Versuchsorganismus wurden ausschließlich Mäuse der Rasse Balb/c verwendet. Diese wurden vom Tierforschungszentrum der Universität Ulm und von der Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen. Dort wurden sie unter folgenden kontrollierten Bedingungen gezüchtet und gehalten: 12h/12h-Tag-Nacht-Rhythmus bei Standardpelleternahrung und Wasserzufuhr ad libitum.

Die Verpaarung erfolgte zeitlich kontrolliert, wodurch bei erfolgreicher Keimeinnistung das jeweilige Embryonalalter jederzeit bekannt war. Als Tag 0 der Zählung gilt der Tag nach Kopulation. Für die Anlage neuronaler Zellkulturen wurden Mäuseembryonen am Embryonaltag 15 für mesencephale Kulturen bzw. am Embryonaltag 17 für striatale Kulturen präpariert.

Gliale Zellkulturen wurden aus dem Mesencephalon bzw. Striatum neugeborener Mäuse hergestellt.

2.1.1 Makroskopische Präparation

Die trächtige Maus wurde am Tag der geplanten Präparation ca. eine Stunde vor Beginn der Präparation aus dem Tierforschungszentrum in den hierfür vorbereiteten Laborraum transportiert. Während dieser Stunde verblieb die Maus mit dem Ziel der Stressreduktion in ihrem mit Tierstreu ausgestreuten Käfig mit Nahrung und Flüssigkeit.

Anschließend erfolgte die Anästhesierung des Muttertieres durch eine überdosierte intraperitoneale Injektion von 1 ml pro 100 g Körpergewicht einer 25%igen Lösung Chloralhydrat in 0,9%iger NaCl-Lösung. Nach Feststellung des Ausbleibens des Vibrissen- und des Analreflexes wurde die Maus durch einen kraniokaudalen Bauchschnitt eröffnet. Nach Freilegung der Uteri wurden die Embryonen in deren intakter Fruchtblase entnommen. Hieran wurde sofort die weitere mikroskopische Präparation in gekühltem Zustand angeschlossen. Nach Entnahme der Embryonen wurde das Muttertier unter der überdosierten Narkose durch Durchtrennung der zu- und abführenden Blutgefäße zum Herzen getötet.

2.1.2 Mikroskopische Präparation des Mesencephalons

Nach Eröffnung der Fruchtblase wurde der Embryo von der Plazenta abgetrennt und anschließend dekapiert. Die Präparation erfolgte in Anlehnung an Schmidt et al. (1996). Das Gehirn wurde nach mediansagittaler Schädelöffnung entnommen. Das Mesencephalon wurde anschließend nach rostral vom Diencephalon und nach basal vom Rhombencephalon getrennt.

2.1.3 Mikroskopische Präparation des Striatums

Zur Präparation des Striatums wurde der Cortex mediansagittal durchtrennt und der hierdurch zum Vorschein tretenden subkortikale Ganglienhügel freipräpariert. Aus dem Ganglienhügel wurde anschließend die Striatumanlage abgetrennt.

Alle erfolgreich gewonnenen Mesencephali respektive Striata wurden zusammen zur Bereithaltung für die Zellkulturherstellung in eine gekühlte HBSS-Lösung überführt.

2.2 Herstellung der neuronalen Primärkulturen

2.2.1 Aufbereitung des Gewebes

Zur Loslösung der Zellen aus ihrem Zellverband wurden die Gewebestückchen zunächst kurz mit der Pipette mechanisch dissoziiert und anschließend für 15 Minuten in 10 ml Versenelösung mit 0,1% Trypsin zur weiteren enzymatischen Dissoziation überführt. Zur Inhibition der Trypsinwirkung wurden die Zellen bei Raumtemperatur in MEM mit 20% FCS überführt und zentrifugiert (max. 1400 U/min). Das Pellet wurde in 4 ml MEM und 10% FCS gelöst.

2.2.2 Coaten mit Poly-DL-Ornithin

Der Boden der 3,5 cm²-Zellkulturschalen (Neuronen) bzw. 9,6 cm²-Zellkulturschalen (Glia) wurde jeweils über Nacht bei Raumtemperatur mit einer Poly-DL-Ornithinlösung der Konzentration 0,1 mg/ml (Molekulargewicht 30-70 kDa) benetzt. Anschließend wurden die Schalen zweimal mit zweifach destilliertem Wasser ausgespült und getrocknet.

2.2.3 Vorbereitung der Neuronen zur Aussaat

2.2.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Konzentration intakter Zellen in der gewonnene Zelllösung wurde durch Auszählung mittels einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,100 mm, Einzelquadratfläche 0,0025 mm²) mit 20 µl dieser Suspension ermittelt. Zur Anfärbung strukturell defekter Zellen wurde eine trypanblauhaltige Zählösung zugegeben. Die Zellanzahl der in 4 ml Lösung befindlichen Zellen (*absolute Zellzahl*) ergibt sich aus der Multiplikation der gezählten Zellen in der Neubauer-Zählkammer mit dem Faktor 100 000 .

2.2.3.2 Verdünnung der Zellsuspension zur Aussaat

Ausgehend von der ermittelten Konzentration wurden jeweils 2,5 Millionen Zellen (*Aussaatmenge*) pro Inkubationsschale nach entsprechender Verdünnung in die ornithinbeschichteten 3,5 cm²-Schalen mit 2,4 ml Medium (*Aussaatvolumen*) ausgesät. Die erforderliche Verdünnung (*Mediumzugabe*) wurde dabei nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Mediumzugabe[ml]} = \frac{\text{absoluteZellzahl} \cdot \text{Aussaatvolumen}}{\text{Aussaatmenge}} - 4\text{ml}$$

2.3 Inkubation und Behandlung der neuronalen Zellkulturen

2.3.1 Inkubationsbedingungen

Sowohl die unbehandelten als auch die im weiteren Verlauf behandelten Zellkulturen wurden unter folgenden Standardbedingungen inkubiert:

Gerät:	CO ₂ -Inkubator BBD 6220 Heraeus
Temperatur:	37°C
Gas:	Luft mit 5% CO ₂ -Anteil
Luftfeuchtigkeit:	100% bei kontinuierlicher Entkeimung des Befeuchtungsdampfes vor Zufuhr in den Nutzraum

2.3.2 Medium

Die Primärkulturen wurden bis zum zweiten Tag nach Herstellung in MEM mit 10% FCS-Medium inkubiert. Hierauf erfolgte eine Umstellung des Mediums auf NBM mit folgenden Zusätzen:

1% L-Glutamin, 0,1% Amphotericin B, 0,1% B27, 0,05% Gentamycin und der jeweiligen nachfolgend beschriebenen Substanzbehandlung.

2.4 Herstellung der glialen Primärkulturen

2.4.1 Aufbereitung des Gewebes

Nachdem die Gewebestücke mechanisch dissoziiert wurden, erfolgte eine zwanzigminütige Inkubation bei Raumtemperatur in einer kalzium- und magnesiumfreien PBS-Lösung, der 1% Trypsin und 0,02% EDTA zugesetzt wurden. Anschließend wurden die Gewebestücke in MEM mit 20% FCS überführt. Nach Filterung durch ein Nylonnetz (Maschengröße 50 µm) wurde das Filtrat für 5 Minuten bei 1400 U/min zentrifugiert und in 20 ml MEM mit 20% FCS gelöst.

2.4.2 Coaten mit Poly-DL-Ornithin

s. 2.2.2

2.4.3 Aussaat der Gliazellen

Die in 9,6 cm²-Zellkulturschalen ausgesäten Zellen wurden mit MEM mit 20% FCS unter den in 2.4.1 beschriebenen Bedingungen inkubiert. Begannen die Astrozyten zu konfluieren (in der Regel nach drei Tagen) wurden die Kulturschalen geschüttelt und das Medium mit darin verbliebenen Oligodendrozyten und Mikroglia entfernt. Nach kurzer Einwirkung von 2 ml 0,1%iger Trypsinlösung und sofortiger Trypsininhibition durch 8 ml MEM mit 10% FCS wurden die Astrozyten von der Kulturschale gelöst und für 5 min bei 1400 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde wieder in MEM mit 20% FCS gelöst und auf drei 9,6 cm²-Zellkulturschalen verteilt (erste Passage). Nach erneuter Konfluenz wurde der beschriebene Vorgang wiederholt und die Zelllösung in 3,5 cm²-Zellkulturschalen verteilt (zweite Passage).

Zur Synchronisation wurden die Zellen der zweiten Passage für einen Tag in serumfreies NBM überführt.

2.5 Behandlung der Zellkulturen

Abhängig von der im Rahmen der Kulturherstellung gewonnenen Anzahl an Schalen wurden diese mit folgenden Substanzen alternativ behandelt. Hierbei wurden je Versuch mindestens zwei Kulturen jeweils identisch behandelt:

- Kontrollkulturen ohne Behandlung
- Dopamin in der Endkonzentration 10^{-5} M
- Dopamin in der Endkonzentration 10^{-5} M und SCH in der Endkonzentration 10^{-6} M
- Dopamin in der Endkonzentration 10^{-5} M und Sulpirid in der Endkonzentration 10^{-6} M
- Estradiol in der Endkonzentration 10^{-6} M
- Estradiol in der Endkonzentration 10^{-8} M
- ICI in der Endkonzentration 10^{-8} M

Die Behandlung erfolgte täglich, wobei sie jeden zweiten Tag mit einem Mediumswechsel kombiniert wurde. Die Behandlung fand insgesamt über 6 Tage (mesencephale Kulturen) bzw. 5 Tage (striatale Kulturen) statt.

Am Ende des Behandlungszeitraumes erfolgte eine mikroskopische Überprüfung hinsichtlich der weiteren Verwertbarkeit der einzelnen Kulturen für analytische Verfahren. Von der weiteren Verwendung ausgeschlossen wurden Kulturen, die infolge Kontamination Pilzkolonien aufwiesen und Kulturen, in welchen die neuronalen bzw. glialen Zellen in überwiegender Anzahl frei im Kulturmedium gelöst waren, anstelle am ornithinbeschichteten Boden der Schalen zu haften. Die Intensität der axonalen und dendritischen Verknüpfung der Neuronen untereinander wurde nicht direkt als Selektionskriterium herangezogen sondern indirekt berücksichtigt, indem eine mikroskopische morphologische Qualitätskontrolle erfolgte, bei der Kriterien wie Vakuolisierung, Konfluenz und abgestorbene Zellen herangezogen wurden.

2.6 Realtime-PCR

Ziel der durchgeführten PCR ist die spezifische Amplifikation derjenigen cDNA, welche für das gesuchte Protein (z.B. AQP4) kodiert. Da die Polymerase, welche bei der PCR-Reaktion eingesetzt wird, als Ausgangssubstrat DNA benötigt, wurde die mRNA zunächst mit Reverser Transkriptase in die komplementäre cDNA umgeschrieben.

2.6.1 Gewinnung der RNA

Zur Gewinnung der zellulären RNA wurde das FastLane Cell cDNA Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Hierbei wird die enzymatische reverse Transkription der RNA in cDNA durch die direkte Aufarbeitung der Zellkulturen erzielt, ohne dass in einem Zwischenschritt zunächst die Aufreinigung der RNA-Stränge notwendig wäre.

Nach Entnahme aus dem Inkubationsschrank wurde das Medium der Zellkulturen abgenommen und den Angaben des Herstellers entsprechend 500 µl FCW zur Reinigung der Kulturen von restlichem Medium, extrazellulären Produkten und abgestorbener Zellen zugeführt und wieder entfernt.

Anschließend wurden die Zellen lysiert. Hierzu wurden 200 µl FCP-Lösung für fünf Minuten zugeführt. Neben der Zellyse dient diese Behandlung der Stabilisation zellulärer RNA und der Blockierung von Reverse-Transkriptase-Inhibitoren. Die hierdurch entstandene Lösung aus FCP-Puffer und RNA wurde entweder sofort weiterverwendet oder aber zur Aufbewahrung gemäß den Herstellerangaben sofort zur Einfrierung bei -80°C verbracht.

Die anschließende Elimination genomischer DNA aus den Probenlösungen erfolgte durch Zugabe von 2 µl gDNA-Wipeout Puffer, gelöst in 8 µl H₂O, zu je 4 µl der RNA-Probenlösung. Nach Inkubation bei 42°C für 5 Minuten wurde die Lösung sofort wieder auf Eis aufbewahrt.

2.6.2 Transkription in cDNA

In diesem Schritt wurde, unabhängig von der jeweiligen RNA-Konzentration die gesamte isolierte RNA, wobei es sich überwiegend um mRNA handelte, in die komplementäre cDNA revers transkribiert. Da im Rahmen der PCR-Analyse die optische Dichte der AQP-mRNA in Relation zu der des Housekeeping-Gens HMBS gesetzt wurde, war eine vorausgehende RNA-Konzentrationsbestimmung der Proben nicht notwendig.

Zu 14 µl der RNA-Probenlösung wurden 6 µl des Mastermixes für die reverse Transkriptionsreaktion zugeführt. In diesem Mastermix wurden in 4 µl QuantiScript RT-Puffer je 1 µl RT-Primer Mix und 1 µl des Enzyms QuantiScript Reverse Transcriptase gelöst.

Hierauf erfolgte eine halbstündige Inkubation bei 42°C mit anschließender Enzyminaktivierung bei 95°C für 5 Minuten und sofortiger Kühlung auf Eis.

Die hierbei entstandene cDNA enthaltende Lösung wurde bei -20°C eingefroren. Da in diesem Schritt keine spezifischen Primer verwendet wurden, sondern Random-Primer, handelte es sich bei der gewonnenen cDNA um ein Abbild aller RNA-Moleküle, die zum Zeitpunkt der Zelllyse in den Zellen vorhanden waren und von der Reversen Transkriptase umgeschrieben wurden.

2.6.3 Durchführung der Realtime PCR

2.6.3.1 Reaktionslösung

Die Realtime PCR wurde mit dem LightCycler der Firma Roche durchgeführt. Jeweils 20 µl des Mastermixes mit der darin enthaltenen zu analysierenden cDNA wurden für die Amplifikation durch das LightCycler-System benötigt. Grundlage des Mastermixes waren neben der eingesetzten cDNA das Produkt QuantiTect SYBR Green PCR Kit der Firma Qiagen sowie die entsprechenden Primer.

Das QuantiTect SYBR Green PCR Kit beinhaltet laut Herstellerangaben folgende Komponenten:

HotStarTaq DNA Polymerase:	Modifizierte Form einer rekombinanten 94 kDa DNA-Polymerase, ursprünglich isoliert aus <i>Thermus aquaticus</i> , geklont in <i>E. coli</i> (EC 2.7.7.7)
QuantiTect SYBR Green PCR Buffer:	Enthält Tris·Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 5 mM, pH 8,7
dNTP mix including dUTP:	Enthält dATP, dCTP, dGTP und dTTP/dUTP
SYBR Green I	
ROX (passive reference dye)	
RNase-free Water	

Zu 10 µl dieser bereits gemischten Lösung wurden unter ständiger Kühlung 2 µl der cDNA-Lösung sowie 0,5 µl des Primers für die jeweils zu untersuchenden AQP-Proben zugegeben. Zur späteren quantitativen Bestimmung der AQP-Expression wurde jede Probe auch auf das Housekeeping-Gen HMBS (Hydroxymethylbilanesynthase) hin untersucht. Hierbei wurden anstelle des Primers für das jeweilige AQP 2 µl des Primers für HMBS zugegeben. Anschließend wurden die Proben mit 7,5 µl bzw. 6 µl RNase-freiem Wasser der Firma Qiagen aufgefüllt.

2.6.3.2 Verwendete Primer

Bei Primern handelt es sich um Oligonukleotide, welche komplementär zu einer bekannten Basensequenz auf der gesuchten cDNA sind (die wiederum aus der mRNA hergestellt wurde, die für das jeweilige AQP-Protein kodiert). Neben den Primern für Aquaporine wurden auch Primer eingesetzt, welche sich an cDNA binden, die ihren Ursprung in der Kodierung für so genannte Housekeeping-Gene findet. Housekeeping-Gene müssen die Anforderung erfüllen, möglichst unabhängig von Einflüssen auf die Zelle konstitutiv exprimiert zu werden. In

dieser Arbeit wurde hierfür als Housekeeping-Gen die Hydroxymethylbilanesynthase (HMBS) (Synonym: Porphobilinogen-Desaminase) eingesetzt. Hierbei kam folgender HMBS-Primer der Firma Qiagen zur Anwendung.

Produktbezeichnung:	Mm_Hmbs_1_SG QuantiTect Primer Assay
Katalognummer:	QT00494130
Spezies:	Maus (Mus musculus)
Ampliconlänge:	109 Basenpaare

Der beschriebene Primer ist laut Herstellerangaben explizit für die Anwendung mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit vorgesehen.

Die Proben wurden für die Reaktion in Glaskapillaren überführt und für die Aktivierung der Taq DNA Polymerase für 15 Min auf 95°C erhitzt. Anschließend folgten 45 Zyklen mit folgendem Ablauf:

1. Denaturierung	95°C	15 s
2. Annealing	58°C	20 s
3. Elongation	72°C	16 s

Die Auswertung der Probenmessungen erfolgte ausschließlich im linearen Abschnitt des logarithmischen Amplifikationsverlaufs. Die Zyklusnummern, die sich in diesem linearen Verlauf befinden, werden gegen den Logarithmus der zuvor bestimmten Konzentration der Matrizen-DNA aufgetragen. Die Konzentration der gesuchten mRNA wurde anhand der jeweiligen Zyklusnummer und der entsprechenden Zyklusnummer einer bereits ermittelten externen Standardkurve berechnet. Bei den in dieser Arbeit dargestellten Messergebnissen handelt es sich um die Mittelwerte der AQP-mRNA-Konzentrationen im Verhältnis zur mRNA-Konzentration des Housekeeping-Gens HMBS. Diese Ergebnisse der unterschiedlich behandelten Kulturen wurden wiederum relativ zur unbehandelten Kontrollkultur dargestellt, deren Konzentration der gesuchten mRNA willkürlich als 100% gesetzt wurde.

2.7 Westernblot

2.7.1 Proteinaufbereitung

Zur Gewinnung der Proteinproben wurde das Medium der inkubierten Zellkulturschalen abpipettiert und verworfen. Anschließend wurden die Schalen mit 1 ml PBS (10 mM, pH 7,5) gespült, wodurch nicht am Boden adhärenente Zellen sowie sonstige Substanzen entfernt wurden. Hierauf wurden in die Kulturschalen jeweils 100 µl Pufferlösung eingebracht.

Mittels eines Lysepuffers (62,5 mM TrisHCl-Lösung mit einem Anteil von 2% SDS sowie 10% Saccharose) wurden die am Schalenboden haftenden Zellen abgekratzt und in Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf überführt. Die Gewebelösungen wurden mit Ultraschall homogenisiert und anschließend für 5 Minuten bei 95°C hitzedenaturiert. Die Lösungen wurden bei -70°C eingefroren.

2.7.2 Konzentrationsbestimmung

Im Rahmen der Proteinaufbereitung wurden von den endgültigen Proteinproben jeder Kulturschale je 6 µl für die anschließende Konzentrationsbestimmung jeder Probe abgenommen.

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Katalognummer 23227) bestimmt.

Zur Erstellung der Eichreihe wurde im Kit enthaltenes Albumin der Konzentration 2 g/l verwendet und mit der für die gewünschte Konzentration erforderlichen Menge SDS-Probenpuffer zur Lösung gebracht. Hierdurch entstanden 9 Eichproben in aufsteigenden Albuminkonzentrationen von 0 bis 0,2 g/l mit einem Gesamtvolumen von je 50 µl. Ebenso wurden die hierfür abgenommenen Proteinproben der Kulturschalen mit SDS-Probenpuffer auf zunächst 60 µl SDS-Probepuffer aufgefüllt, wovon 10 µl anschließend nochmals mit 40 µl SDS-Probepuffer auf 50 µl aufgefüllt wurden. Somit erhielt man je Kulturschale eine Proteinprobe der Volumenkonzentration 0,1 µl/µl und 0,02 µl/µl. Nachdem sämtliche Proben gevortext wurden, wurden diese für 30 min

bei 60°C inkubiert. Die anschließende Extinktionsmessung fand den Herstellerangaben entsprechend bei einer Wellenlänge von 562 nm statt. Anhand der jeweils aufgestellten Eichreihen der Albuminkonzentration wurden die Proteinkonzentrationen der Proben aus den Kulturschalen bestimmt. Abb. 1 zeigt eine exemplarische Eichkurve. Durch die Bestimmung des Mittelwerts der Steigungen der Einzelmesspunkte wurde eine Eichgerade angenommen und aus der jeweiligen Geradengleichung die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet.

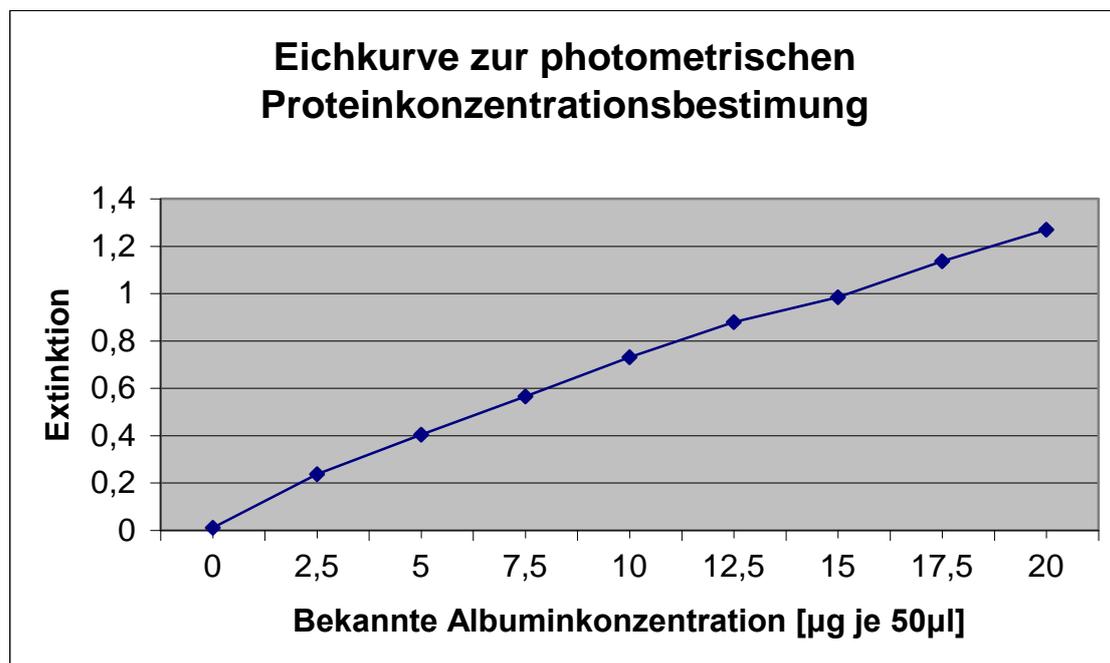


Abbildung 1 Exemplarische Eichkurve zur photometrischen Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteingehalts der gewonnenen Proben. Die Extinktionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm. Gemittelte Kurvensteigung = 0,074

2.7.3 Gelherstellung

Für die elektrophoretische Auftrennung der hergestellten Proteinproben wurden Polyacrylamidgele gegossen.

Für die Gele wurden folgende Chemikalien verwendet:

Trenngel (10%):	Sammelgel (5%):
4,9 ml H ₂ O	6 ml H ₂ O
2,5 ml Tris 1,5M	2,5 ml Tris 1M
2,5 ml Acrylamid 40%	2,5 ml Acrylamid 40%
100 µl SDS	100 µl SDS
100 µl APS 10%	100 µl APS 10%
5 µl TEMED	10 µl TEMED

2.7.4 Elektrophoretische Proteinauftrennung

Neben dem Proteinmarker (Chemiluminescent Blue MW Marker Mix; Pierce, Rockford, IL, USA) wurden die Proben in die Geltaschen eingebracht. Das einzubringende Volumen der Probenlösung errechnete sich aus deren zuvor bestimmten Konzentrationen, mit dem Ziel jeweils 20 µg je Geltasche Proteine aufzutrennen. Die Elektrophorese erfolgte in den ersten 10 Minuten bei einer Spannung von 100 V, anschließend bei 160 V mit dem Gerät PowerPack 300 der Firma Bio Rad, abhängig von der Laufgeschwindigkeit des Proteinmarkers für 1 bis 3 Stunden.

2.7.5 Blotting auf Nitrozellulose

Zur Übertragung der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Transfermembran wurden diese elektrophoretisch vom Polyacrylamidgel auf Nitrozellulosebögen (GenScript Corp., Piscataway, NJ, USA) übertragen. Dieser Schritt erfolgte mit dem Gerät Trans-Blot Semi-Dry der Firma Bio Rad sowie deren Produkt

PowerPack 200. Die konstanten Parameter dieses Verfahrens waren eine angelegte Stromstärke von 0,1 A für 30 Minuten.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Herstellung des Proteinblots wurde die Transfermembran in Ponceau S-Lösung getaucht, woraufhin die erhaltene Bandenmatrix sichtbar wurde. Die Ponceaulösung wurde anschließend zweimal mit destilliertem Wasser von der Membran abgespült.

2.7.6 Blocken

Die Membran wurde mit einer Lösung aus TBS/Tween, welche 5% Milch (frisch hergestellt aus Milchpulver) enthielt, für 40 Minuten auf einem Rüttler geblockt.

2.7.7 Erst- und Zweitantikörper

Mit dem Ziel der spezifischen Bindung an AQP4 wurde der Erstantikörper „Rabbit Anti-Aquaporin 4 affinity purified polyclonal antibody“ (Chemicon/Millipore, San Francisco, USA, Katalognummer: AB3594-200UL) verwendet, welcher für die Bindung an AQP4 der Ratte entwickelt wurde. Entsprechend der Herstellerangabe konnte erwartet werden, dass der Antikörper ebenfalls spezifisch an AQP4 der Maus binden wird, da im Bindungsbereich des Antikörpers eine Sequenzhomologie von 73 von 75 Aminosäuren zwischen Maus und Ratte besteht. In Vorversuchen bestätigten sich sowohl die hohe Bindungsaffinität als auch das hochspezifische Bindungsverhalten an AQP4 der Maus. Zur Verwendung des Erstantikörpers wurde folgende Lösung hergestellt:

5 ml TBS/TWEEN

100 µl Milch 5% in TBS/TWEEN

AQP4-Antikörper im Verhältnis 1:500

Die geblockte Membran (s.o.) wurde übernacht auf einem Rüttler in der Antikörperlösung bei 8°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran in TBS/TWEEN für 15 min und zwei weitere Male für jeweils 10 min gewaschen.

Zur Visualisierung der mit dem Erstantikörper besetzten AQP4-Bande wurde der Zweitantikörper „Polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins/

HRP“ (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark, Katalognummer: P0399) eingesetzt. Im Verhältnis 1:2000 in einer Lösung von

10 ml TBS/TWEEN

100 µl Milch 5% in TBS/TWEEN

wurde die Membran für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert.

2.7.8 Visualisierung/Entwicklung

Zur Darstellung der durch Erst- und Zweitantikörper besetzten Banden wurde „ECL Western Blotting Detection Reagents“ (Amersham Biosciences, UK, Katalognummer RPN2109) verwendet. Die Lösung wurde den Herstellerangaben entsprechend hergestellt und die Membran damit in einer Belichtungskassette benetzt. Durch die an den Zweitantikörper gebundene Meerettichperoxidase wird das in der Detektionsreagenz enthaltene Luminol oxidiert und ein Teil der hierbei freiwerdenden Energie als Licht emittiert. Durch Auflegen von Belichtungsfilm für 5 bis 120 s wurden die Licht emittierenden Banden dargestellt. Als Belichtungsfilm wurde Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, UK, Katalognummer 28-908-36) eingesetzt. Manuell wurden die Banden des Proteinmarkers in Paustechnik auf die belichteten und fixierten Filme übertragen.

2.8 Immunzytochemie

Nach Entfernung des Mediums wurden Primärkulturen striataler Astrozyten zweimal gewaschen. Als Waschlösung wurde eiskühle PBS-Lösung (10mM; pH 7,5) verwendet, welche zusätzlich 1 mM MgCl₂ sowie 0,1 mM CaCl₂ enthielt. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit 2% Paraformaldehyd in PBS gelöst. Nach 30 Minuten wurde diese Lösung wieder entfernt und die fixierten Zellen wurden nochmals zweimal mit der oben beschriebenen Waschlösung

gewaschen. Da bei AQP4, welches sich in der Zellmembran befindet sowohl der C- als auch der N-Terminus einwärtsgerichtet ist und somit nicht für einen von außen zugeführten Antikörper gegen eines dieser Proteinenden erreichbar wäre, ist eine Permeabilisierung der Zellwände erforderlich. Hierfür wurden zunächst für 15 Minuten 50 mM NH₄Cl in PBS-Lösung bei Raumtemperatur zugeführt und anschließend mit 0,1% BSA und 0,3% Triton X-100 in PBS gewaschen.

Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen durch den später zugeführten Antikörper fand eine 30 minütige Blockierung mit Ziegen Serum bei Raumtemperatur statt. Diese Ziegen Serumlösung enthielt 16% Ziegen Serum, 0,3% Triton X-100 und 0,3 M NaCl, gelöst in PBS.

Die Zellen wurden anschließend über Nacht bei 4°C mit einem polyklonalen Rabbit anti-AQP4-Antikörper der Firma Chemicon in einem Lösungsverhältnis von 1:200 in Ziegen Serumlösung inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Applikation des Zweitantikörpers, einem Alexa fluor 546-konjugierten Goat anti-Rabbit Antikörper von Invitrogen, welcher 1:1000 in Ziegen Serumlösung gelöst war. Die Inkubation fand für 45 Minuten bei Raumtemperatur statt.

Mit einer Negativkontrolle wurde in gleicher Weise verfahren, mit der Ausnahme, dass diese nicht mit dem Erstantikörper inkubiert wurde.

Die Zellen wurden anschließend mit einem Axioplan 2 imaging pol der Firma Carl Zeiss (Göttingen, Deutschland) untersucht und Lichtbilder angefertigt. Bei der Negativkontrolle wurden keine Bindungen durch den Zweitantikörper festgestellt.

2.9 *Verwendete Geräte, Materialien*

Belichtungsfilm	Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences (GE Healthcare), Little Chalfont, UK
Elektrophoresetrafo	Powerpac 300	BioRAD, München
Elektrophoresetrafo	Powerpac 200	BioRAD, München
Geltransferblotter	Trans-Blot SD	BioRAD, München
Glaskapillaren (PCR)		Roche, Mannheim
Homogenisator	Sonifier 250	Branson, Danbury, CT USA
Kühlzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Mikroskop	Axioplan 2 Imaging	Carl Zeiss, Göttingen
Nitrozellulosepapier		GenScript Corp., Piscataway, NJ, USA
Pipettenspitzen	DualFilter T.I.P.S.	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg
Real-Time PCR-System	LightCycler	Roche, Mannheim
Thermomixer	5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Vortexer	Vortexgenie 2	Scientific Industries
Wasser-Aufbereitungs- system	Milli-Q UF-Plus	Millipore, Schwalbach
Zellinkubator	BBD6220	Heraeus, Hanau

2.10 *Verwendete Chemikalien*

Produkt	Chemische Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid	2-Propenamid	Serva, Heidelberg
Amphotericin B		Carl Roth, Karlsruhe
APS	(Ammoniumperoxodisulfat)	Merck, Darmstadt
B27		Invitrogen, Karlsruhe
Chloralhydrat	2,2,2-Trichlor-1,1-ethandiol	Sigma-Aldrich, München

Dopamin	Dopaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
HBSS	(Hank's Balanced Salt Solution)	Sigma-Aldrich, München
Methanol		Sigma-Aldrich, München
Milchpulver		Carl Roth, Karlsruhe
NBM	(Neurobasal Medium)	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-DL-Ornithin		Sigma-Aldrich, München
Ponceau S	3-Hydroxy-4-((2-sulfo-4-((4-sulfophenyl)azo)phenyl)azo)-2,7-naphthalindisulfonsäure	Sigma-Aldrich, München
SCH23390	(R(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepinhydrochlorid)	Tocris, Bristol, UK
SDS		Sigma-Aldrich, München
Sulpirid		Tocris, Bristol, UK
TEMED	Tetramethylethyldiamin	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS	(Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck, Darmstadt
Triton X-100		Roche, Mannheim
Trypsin		Biochrom, Berlin
Tween 20	Polyethylenglycolsorbitanmonolaurat	Carl Roth, Karlsruhe

2.11 Primer

HMBS	Mm_Hmbs_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden
AQP4 sense	5'-GCA TCG CTA AGT CCG TCT TCT AC-3'	Thermo, Ulm
antisense	5'-CCA ATC CTC CAA CCA CAC TG-3'	Thermo, Ulm
AQP9 sense	5'-CTC TGA GTT CCT GGG CAC CTT-3'	Thermo, Ulm
anitsense	5'-GCT GAG CTC CCA CAT AAA AGG-3'	Thermo, Ulm

2.12 Antikörper

Anti-AQP4	Rabbit Anti-Aquaporin 4 affinity purified polyclonal antibody	Chemicon/ Millipore, San Francisco, CA, USA
Anti-Rabbit	Polyclonal swine anti-rabbit immunglobulins/HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-Rabbit	Alexa fluor 546 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen, Karlsruhe

2.13 Chemikalien-Sets

BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Chemoluminescent Blue MW Marker Mix	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences (GE Healthcare), Little Chalfont, UK
FastLane Cell cDNA Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden

2.14 Verwendete Lösungen

PBS (10mM; pH 7,5): 3,67% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 13,12% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 83,21% NaCl

TBS-Waschpuffer (pH 7,6): 150 mM NaCl
 50 mM TRIS

Ponceau-Lösung 0,002 % Ponceau
 0,3 % Trichloracetat
 0,3% Sulfosalicylat

2.15 Statistische Auswertung

Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte anhand des bei der PCR erhaltenen Crossing Points. Hierbei handelt es sich um den Schnittpunkt der Steigungsgeraden in der Log-Phase mit der X-Achse (Abb. 2).

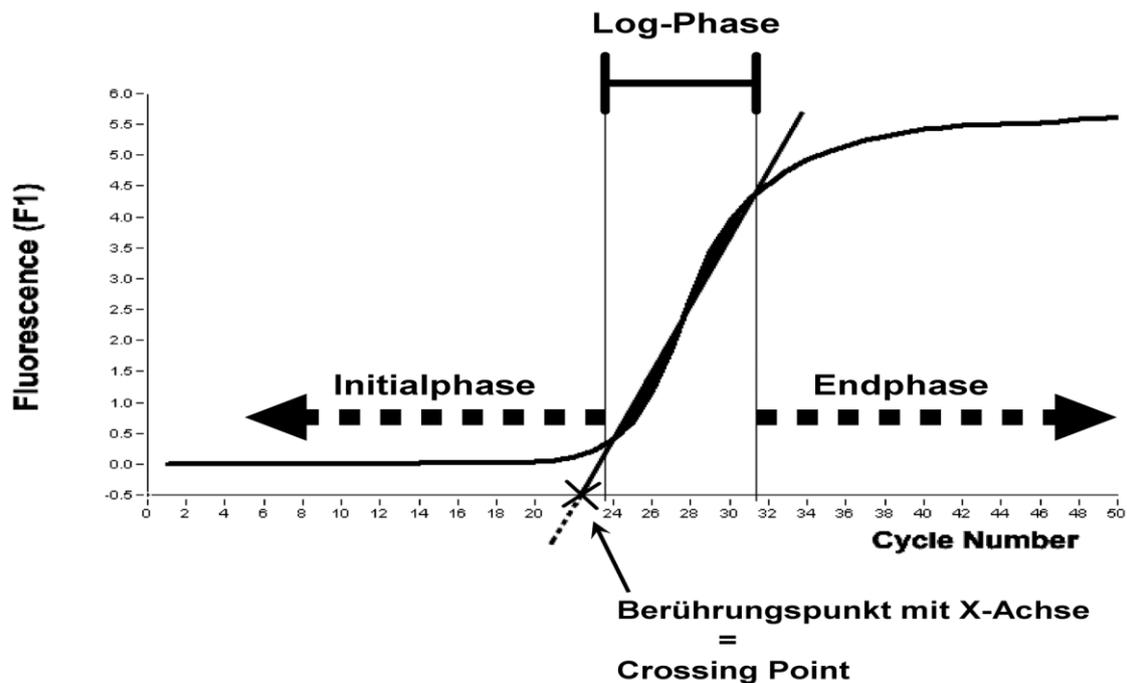


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Phasen einer LightCycler PCR-Analyse (aus: Liebau, 2004)

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten gingen nur Daten mit Crossing Points von maximal 28,0 ein.

Sowohl für die zu untersuchende mRNA als auch für das Housekeeping-Gen wurde hieraus die Konzentration berechnet. Diese beiden Konzentrationen wurden anschließend in Verhältnis zueinander gesetzt und der Gehalt an AQP4 relativ zur Expression des Housekeeping-Gens ermittelt. Die im Folgenden analysierten Daten stellen also die relative Konzentration der jeweils untersuchten AQP-mRNA in Bezug auf die Stoffwechselaktivität der jeweiligen Zellen/Kulturen dar. Hierdurch waren Vergleiche zwischen Zellkulturen unterschiedlicher Zellkonzentrationen möglich.

Im nächsten Schritt wurde jeweils die AQP-Konzentration der Kontrollkultur als 100% gesetzt. Somit wurde der Vergleich möglich, ob die AQP-Expression in den behandelten Kulturen im Vergleich zur Kontrollkultur zu oder abnahm, bzw. statistisch unverändert blieb.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SigmaStat 2.03. Unterschiede in den Konzentrationen verschieden behandelter Zellkulturen wurden mittels Mann-Whitney Rank Sum Tests im paarweisen Vergleich analysiert. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede mit $p \leq 0,05$ angenommen.

In der grafischen Darstellung der Ergebnisse wurde die Kontrollprobe als 100% angenommen und die behandelten Proben relativ zur Kontrollprobe dargestellt. Bei sämtlichen Fehlerindikatoren der Schaubilder handelt es sich um die jeweilige Standardabweichung.

3 Ergebnisse

3.1 AQP4-mRNA-Expression in neuronalen Zellkulturen des Mesencephalons und des Striatums

Die bei den PCR-Experimenten erhaltenen Messergebnisse für die Expression von AQP4-mRNA in Neuronen der beiden Hirnregionen befanden sich nahe der Messbarkeitsgrenze, zum Teil auch außerhalb des messbaren Bereichs (d.h. es wären mehr als 41 Zyklen erforderlich, um in die lineare log-Phase zu gelangen). Tab. 2 zeigt die durchschnittlichen Crossing Points der mesencephalen und striatalen Proben.

Tabelle 2 Durchschnittliche Crossing Points der LightCycler PCR-Datenanalyse für AQP4- bzw. HMBS-mRNA in neuronalen Zellkulturen des Mesencephalons und des Striatums.

Region	Mesencephalon		Striatum	
mRNA	AQP4-mRNA	HMBS-mRNA	AQP4-mRNA	HMBS-mRNA
Crossing Point	28,29	32,45	28,36	34,98

3.2 AQP4-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Mesencephalons

Die Behandlung der mesencephalen Gliazellen mit Dopamin führte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur zur Abnahme der für AQP4 kodierenden mRNA um 44,92% auf 55,08% \pm 7,67 % (Abb. 3).

Die Dopaminwirkung nach Blockade des D1-Rezeptors mit dessen Antagonist SCH23390 in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l führte zur Herunterregulation um 32,37% auf 67,63% \pm 18,21% des Kontrollkulturwertes (Abb. 3).

Ebenso führte die Antagonisierung des D2 Rezeptors mittels Sulpirid (10^{-6} M) und anschließender Dopaminapplikation zu einer Konzentrationsverringerung von AQP4-mRNA. So wurde in diesen Kulturen eine Expressionsreduktion von 50,05% auf durchschnittlich 49,95% \pm 9,13% der Kontrollprobe gemessen

(Abb. 3). Somit war die durch Dopamin induzierte Herunterregulation der AQP4-mRNA-Synthese weder über den D1- noch über den D2-Rezeptor vermittelt. Die Messergebnisse bei alleiniger Behandlung mit SCH23390 oder Sulpirid lagen mit ihren Standardabweichungen im Bereich der als 100% definierten Expression der Kontrollkulturen und hatten somit keinen Effekt (Abb. 3).

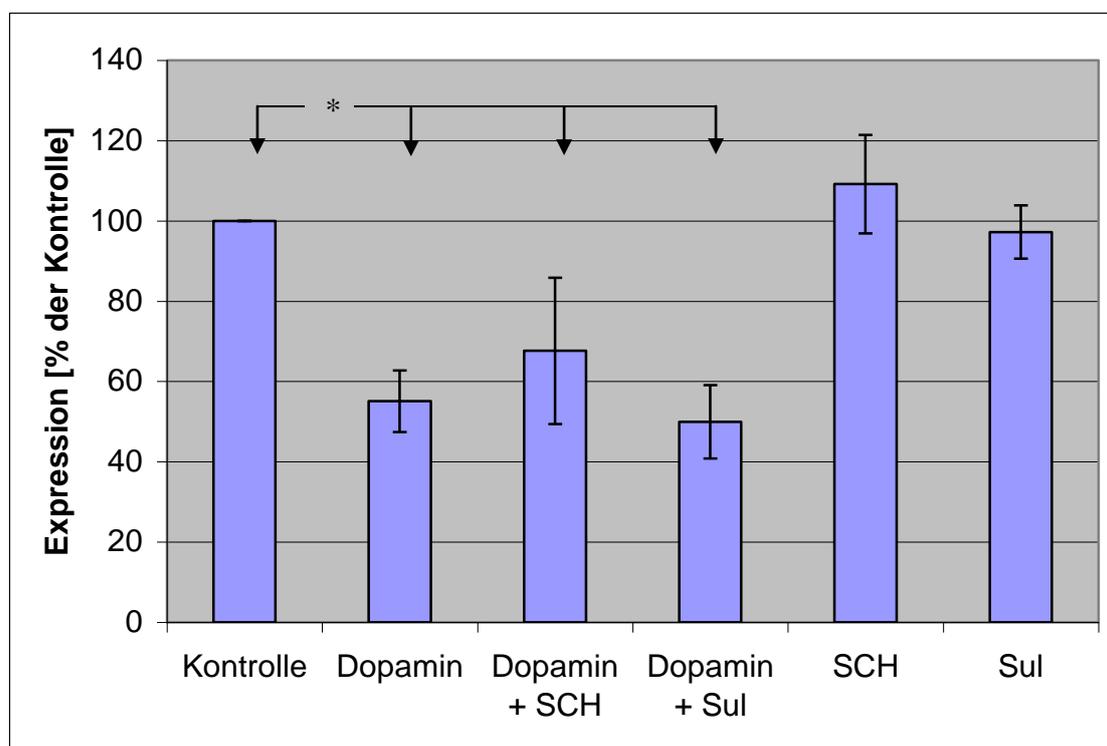


Abbildung 3 AQP4-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Mesencephalons. Konzentrationen in Prozent der unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Dopamin: Dopamin 10^{-5} M, SCH: SCH23390 10^{-6} M, Sul: Sulpirid 10^{-6} M; * $p < 0,05$

Tabelle 3 AQP4-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Mesencephalons. Rohdaten der relativen Konzentrationen von AQP4-mRNA in den behandelten Kulturen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. Dopamin: Dopamin 10^{-5} M, SCH: SCH23390 10^{-6} M, Sul: Sulpirid 10^{-6} M

Experiment	Kontrolle	Dopamin	Dopamin + SCH	Dopamin + Sul	SCH	Sul
1	100	50,83	88,27	46,13	117,22	94,66
2	100	53,50	60,42	65,64	129,42	106,38
3	100	52,24	58,92	45,45	95,23	91,12
4	100	69,57	52,56	42,82	101,33	104,68
5	100	56,55	52,51	43,30	107,03	91,66
6	100	47,79	93,10	56,35	104,74	94,77
MW	100	55,08	67,63	49,95	109,16	97,21
SD	0	7,67	18,21	9,13	12,29	6,64

3.3 AQP4-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums

3.3.1 AQP4-mRNA-Expression bei Dopaminbehandlung glialer Zellkulturen des Striatums

Bei striatalen Gliazellkulturen zeigte sich eine statistisch signifikante Herunterregulation der mRNA-Synthese für AQP4 um 26,37% auf 73,63% \pm 17,60% bei der Behandlung der Zellkulturen mit Dopamin in einer Endkonzentration von 10^{-5} mol/l im Kulturmedium (Abb. 4).

Wurden die D1-Rezeptoren selektiv mit SCH23390 in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l blockiert und anschließend 10^{-5} mol/l Dopamin zugeführt, so lag die mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollkultur signifikant um 17,98% niedriger bei 82,02% \pm 7,98% (Abb. 4). Die Dopaminwirkung konnte somit nicht durch die Blockade des D1-Rezeptors unterdrückt werden.

Das Ergebnis der AQP4-mRNA-Synthese bei selektiver Antagonisierung des D2-Rezeptors durch 10^{-6} mol/l Sulpirid, gefolgt von der Behandlung mit 10^{-5} mol/l Dopamin führte zu einer geringfügigen Zunahme um 3,76% auf 103,76% \pm 10,11% und unterschied sich somit nicht signifikant von der Kontrollkultur (Abb.4). Die Wirkung von Dopamin auf die AQP4-mRNA-Expression konnte somit durch Blockade des D2-Rezeptors supprimiert werden.

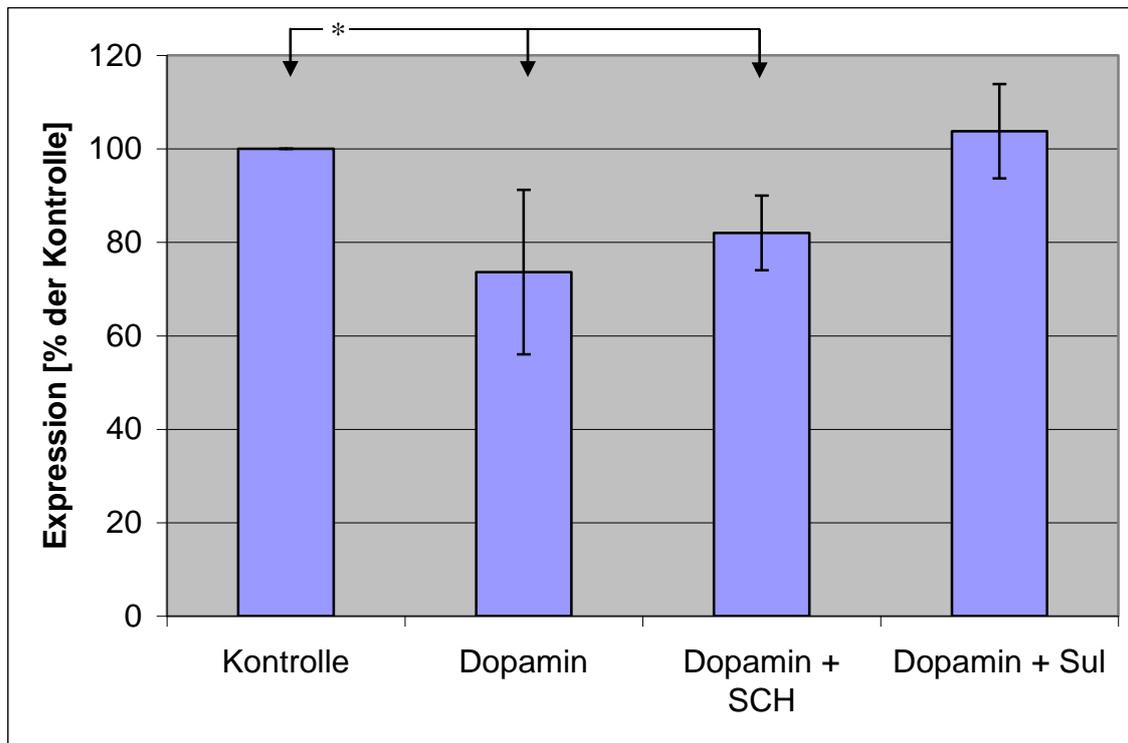


Abbildung 4 AQP4-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums. Konzentrationen in Prozent der unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Dopamin: Dopamin 10^{-5} M, SCH: SCH23390 10^{-6} M, Sul: Sulpirid 10^{-6} M, ICI: ICI-182,780 10^{-6} M; * $p < 0,05$

Tabelle 4 AQP4-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums. Rohdaten der relativen Konzentrationen von AQP4-mRNA in den behandelten Kulturen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. Dopamin: Dopamin 10^{-5} M, SCH: SCH23390 10^{-6} M, Sul: Sulpirid 10^{-6} M, k.E.: kein Messergebnis

Experiment	Kontrolle	Dopamin	Dopamin + SCH	Dopamin + Sul
1	100	56,07	k.E.	k.E.
2	100	38,27	k.E.	k.E.
3	100	79,52	86,06	85,79
4	100	87,08	87,89	110,45
5	100	84,52	91,30	108,36
6	100	85,79	74,32	108,35
7	100	84,85	81,59	97,77
8	100	72,90	70,97	111,86
MW	100	73,63	82,02	103,76
SD	0	17,60	7,98	10,11

3.3.2 AQP4-mRNA-Expression bei Östrogenbehandlung glialer Zellkulturen des Striatums

Unter Östrogenbehandlung bestand bei einem Mittelwert von $111,71\% \pm 32,34\%$ kein statistisch relevanter Unterschied zur Kontrollkultur (Abb. 5). Bei der mit ICI vorbehandelten Östrogenkultur war die AQP4-mRNA-Konzentration gegenüber der Kontrolle signifikant um 29,58% auf $129,58\% \pm 21,30\%$ erhöht (Abb. 5).

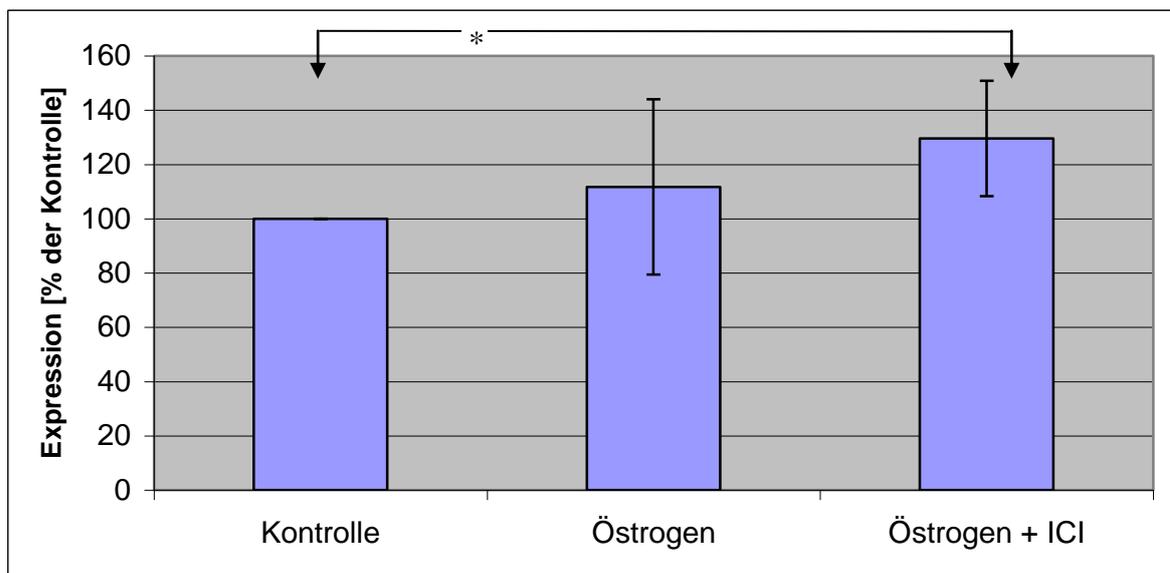


Abbildung 5 AQP4-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums. Konzentrationen in Prozent der unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. ICI: ICI-182,780 10^{-6} M; * $p < 0,05$

Tabelle 5 AQP4-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums. Rohdaten der relativen Konzentrationen von AQP4-mRNA in den behandelten Kulturen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. ICI: ICI-182,780 10^{-6} M, k.E.: kein Messergebnis

Experiment	Kontrolle	Östrogen	Östrogen + ICI
1	100	59,36	k.E.
2	100	78,78	k.E.
3	100	107,65	104,74
4	100	149,19	133,36
5	100	108,35	k.E.
6	100	131,53	123,74
7	100	106,58	123,17
8	100	152,26	162,86
MW	100	111,71	129,58
SD	0	32,34	21,30

die zunächst mit dem α_2 -Adrenozeptorantagonist Yohimbin (10^{-6}M) und anschließend mit Dopamin 10^{-4}M behandelt wurden.

Es stellten sich nach Einsatz des AQP4-Antikörpers jeweils zwei Banden dar (Abb. 7). Grund hierfür sind die beiden oben beschriebenen Isoformen des AQP4-Proteins M1 und M23. Hierbei stammt die 34 kDa-Bande von der M1-Isoform und die 32 kDa-Bande von der M23-Isoform (Furman et al., 2003).

Deutlich ist eine Abnahme beider AQP4-Isoformen in den mit Dopamin behandelten Gliazellkulturen zu erkennen (Abb. 7). Bei Gegenüberstellung der drei Behandlungen fällt auf, dass bei vorausgegangener Blockade der α_2 -Adrenozeptoren eine wesentlich abgeschwächtere Herunterregulation der AQP4-Synthese gegenüber der ausschließlichen Behandlung durch Dopamin stattfindet (Abb. 7).

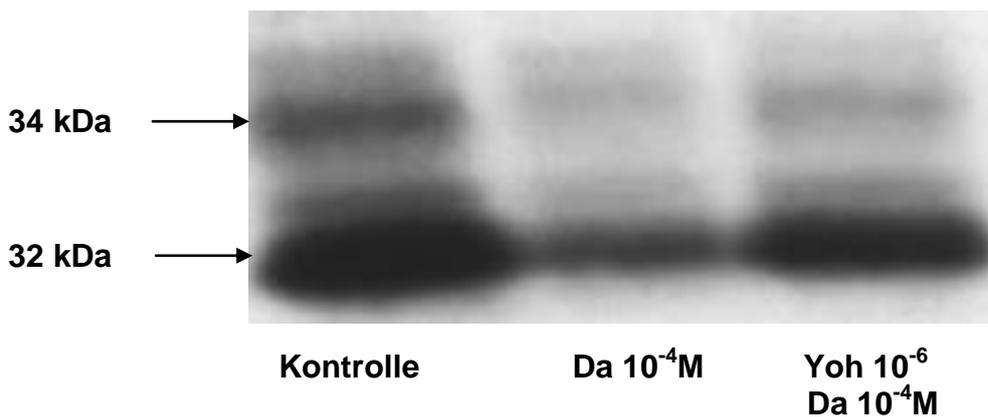


Abbildung 7 Western Blot mit einem für AQP4 spezifischen Antikörper bei Gliazellkulturen des Striatums. Da: Dopamin, Yoh: Yohimbin

3.3.4 Qualitative Expression von AQP4 in glialen Zellkulturen des Striatums

Weiterhin wurden immunzytochemische Experimente durchgeführt, in welchen unbehandelte sowie mit Dopamin behandelte Astrozyten mit fluoreszierenden AQP4-Antikörpern untersucht wurden.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass AQP4 in den unbehandelten Kontrollproben überwiegend im Bereich der auswachsenden Zellfortsätze zu finden waren. Dagegen war AQP4 in den mit Dopamin behandelten Zellen weitaus diffuser und eher perinukleär verteilt (Abb. 8).

Auffällig ist auch die morphologische Veränderung der Astrozyten, welche nach Dopaminbehandlung wesentlich abgerundeter wirkten und hier nur selten Ansätze zur Ausbildung von Fortsätzen zeigten (Abb. 8).

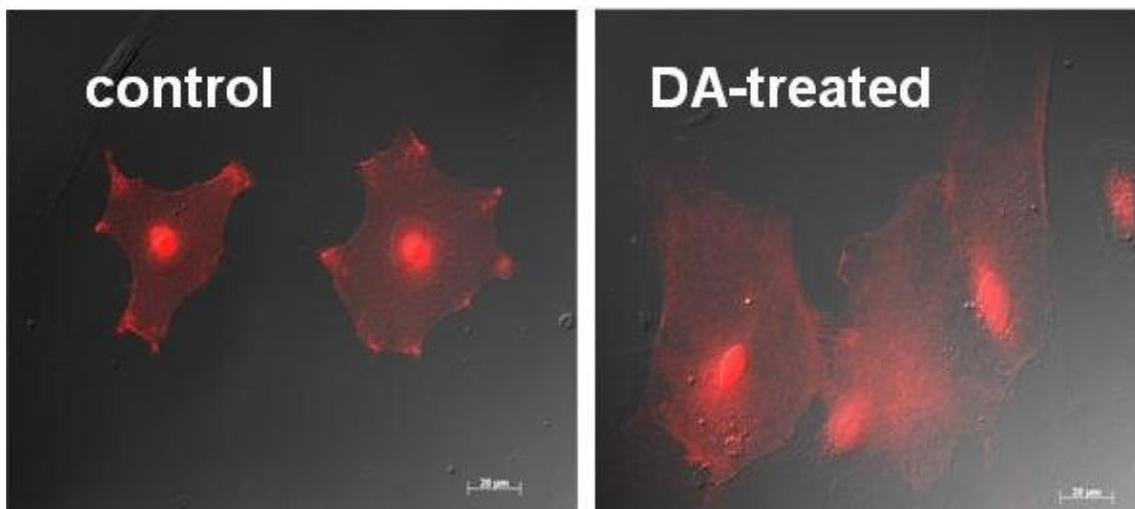


Abbildung 8 Immunzytochemie mit einem AQP4-spezifischen Antikörper. Fluoreszenzbilder von Astrozyten des Striatums. DA-treated: mit Dopamin 10^{-6} M behandelte Zellkultur

3.4 AQP9-mRNA- und AQP9-Expression in neuronalen Zellkulturen des Mesencephalons

Mit der PCR-Methode ließ sich in den durchgeführten Versuchen keine mRNA für AQP9 nachweisen. Ebenso wurde das AQP9-Protein in Western-Blot-Experimenten mit mesencephalen Nervenzellen nicht detektiert.

3.5 AQP9-mRNA-Expression in neuronalen Zellkulturen des Striatums

3.5.1 AQP9-mRNA-Expression in neuronalen Zellkulturen des Striatums bei Dopaminbehandlung

Unter Einwirkung von Dopamin kam es bei striatalen Neuronen zu einer signifikant gesteigerten AQP9-mRNA-Synthese um $79,86\% \pm 22,62\%$ auf $179,86\%$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur.

Die vorherige Blockade des D1-Rezeptors und anschließende Dopaminbehandlung ergab ebenfalls eine statistisch signifikante AQP9-mRNA-Synthesesteigerung um $67,76\% \pm 10,26\%$ auf $167,76\%$ (Abb. 9). Der Dopamineffekt ist somit nicht D1-Rezeptor-vermittelt, da die Antagonisierung des D1-Rezeptors die Dopaminwirkung nicht blockierte.

Die AQP9-mRNA-Konzentration in den zuvor mit dem D2-Rezeptorantagonist behandelten Kulturen und anschließender Dopaminapplikation war im Durchschnitt um $158,13\% \pm 105,52\%$ auf $258,13\%$ signifikant erhöht (Abb. 9) und konnte somit den Einfluss von Dopamin auf die AQP9-Expression ebenfalls nicht antagonisieren.

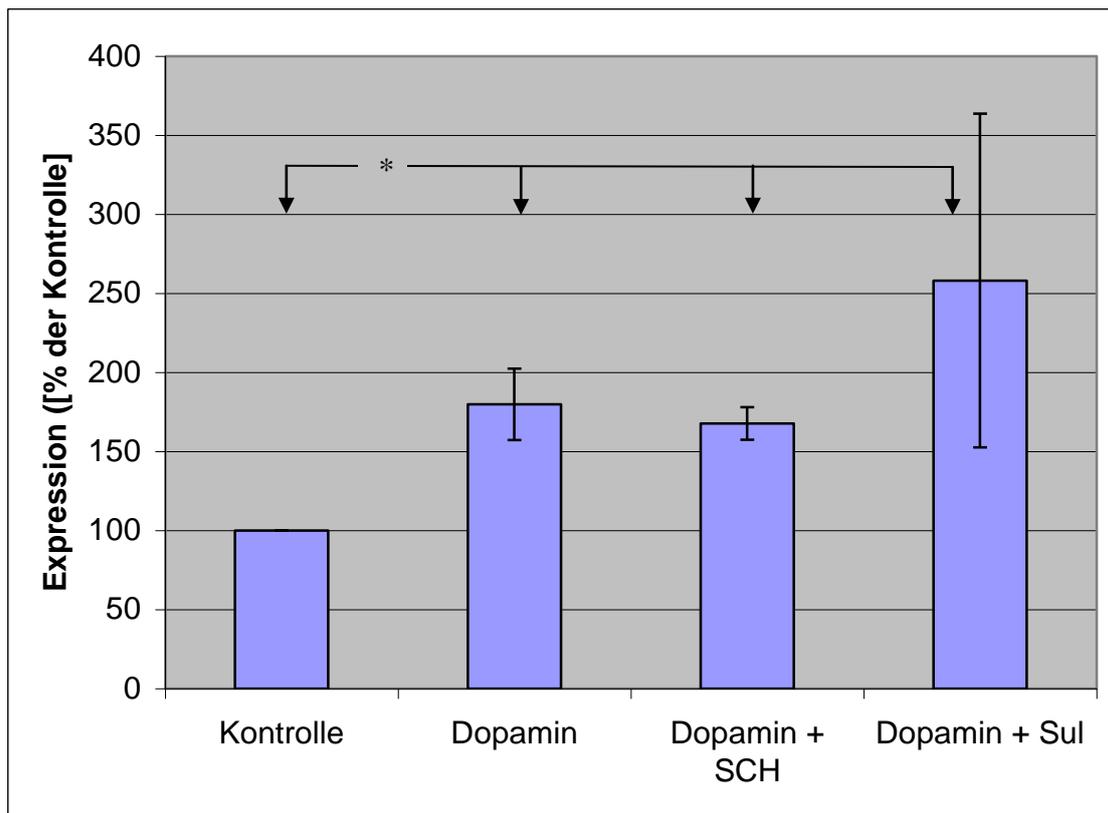


Abbildung 9 AQP9-mRNA-Expression in neuronalen Zellkulturen des Striatums. Konzentrationen in Prozent der unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Dopamin: Dopamin 10^{-5} M, SCH: SCH23390 10^{-6} M, Sul: Sulpirid 10^{-6} M; * $p < 0,05$

Tabelle 6 AQP9-mRNA-Expression in neuronalen Zellkulturen des Striatums. Rohdaten der relativen Konzentrationen von AQP9-mRNA in den behandelten Kulturen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. Dopamin: Dopamin 10^{-5} M, SCH: SCH23390 10^{-6} M, Sul: Sulpirid 10^{-6} M, ICI: ICI-182,780 10^{-6} M, k.E.: kein Messergebnis

Experiment	Kontrolle	Dopamin	Dopamin + SCH	Dopamin + Sul
1	100	169,58	k.E.	k.E.
2	100	170,66	k.E.	k.E.
3	100	172,00	k.E.	k.E.
4	100	215,25	182,48	191,14
5	100	148,79	174,04	191,60
6	100	206,34	158,49	440,25
7	100	163,90	159,62	259,11
8	100	192,40	164,18	208,56
MW	100	179,86	167,76	258,13
SD	0	22,62	10,26	105,52

3.5.2 AQP9-mRNA-Expression in neuronalen Zellkulturen des Striatums bei Östrogenbehandlung

Die mit Östrogen behandelten Neuronen wiesen im Vergleich zur Kontrollkultur eine lediglich geringe Reduktion der mRNA-Synthese um 18,39% auf $81,61\% \pm 23,15\%$ für AQP9 auf. Bei vorausgehender ICI-Behandlung lag die mRNA-Konzentration um 9,18% niedriger bei $90,82\% \pm 17,61\%$. (Abb. 10). Bei den Messungen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Zellkulturen.

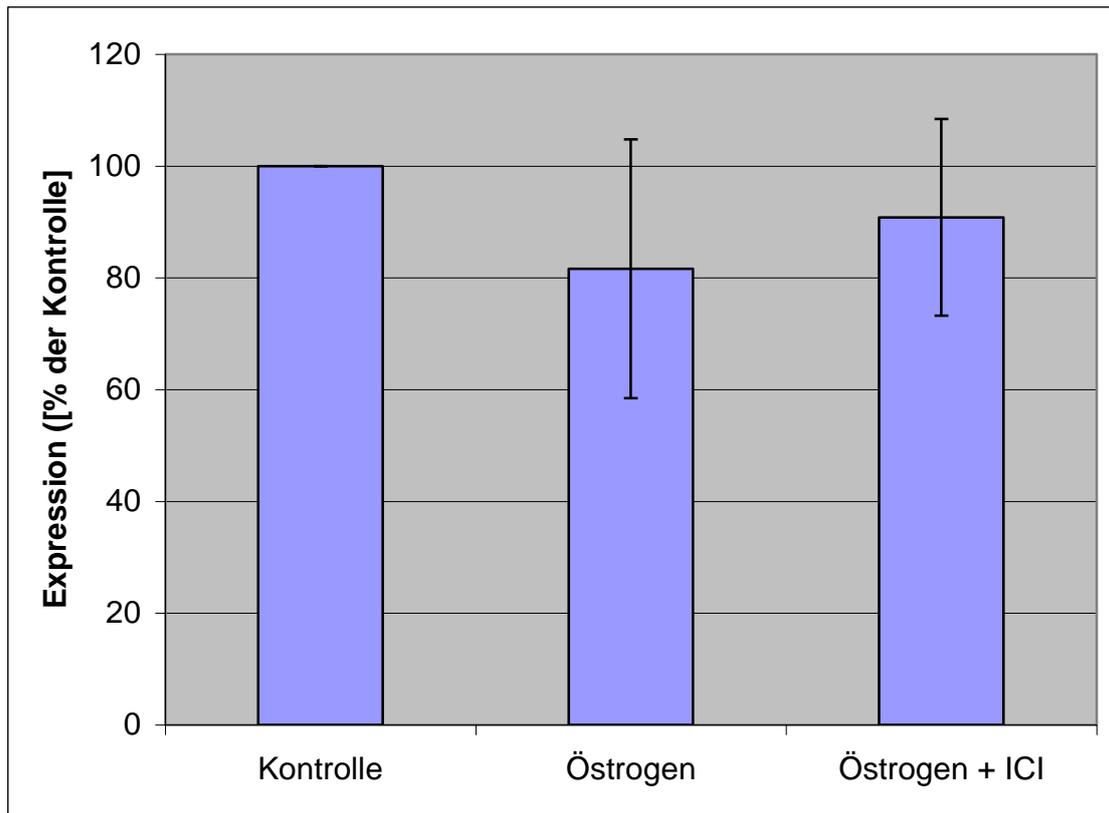


Abbildung 10 AQP9-mRNA-Expression in neuronalen Zellkulturen des Striatums. Konzentrationen in Prozent der unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. ICI: ICI-182,780 $10^{-6}M$

Tabelle 7 AQP9-mRNA-Expression in neuronalen Zellkulturen des Striatums. Rohdaten der relativen Konzentrationen von AQP9-mRNA in den behandelten Kulturen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. ICI: ICI-182,780 $10^{-6}M$, k.E.: kein Messergebnis

Experiment	Kontrolle	Östrogen	Östrogen + ICI
1	100	56,37	k.E.
2	100	39,01	k.E.
3	100	98,12	k.E.
4	100	100,05	110,68
5	100	77,73	87,56
6	100	104,13	75,29
7	100	83,16	73,04
8	100	94,27	107,53
MW	100	81,61	90,82
SD	0	23,15	17,61

3.6 AQP9-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Mesencephalons

Bei Behandlung mit Dopamin ergab sich eine statistisch signifikante Steigerung der AQP9-mRNA-Expression auf $128,99\% \pm 20,36\%$ im Vergleich zur Kontrollkultur (Abb. 11).

Bei zusätzlicher spezifischer D1-Rezeptorantagonisierung fand eine signifikant gesteigerte AQP9-mRNA-Synthese um $41,12\%$ auf $141,12\% \pm 20,56\%$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur statt (Abb. 11).

Die vorausgehende D2-Rezeptorantagonisierung und anschließende Dopaminbehandlung führte zu einem signifikanten AQP9-mRNA-Syntheseanstieg um $19,51\%$ auf $119,51\% \pm 14,14\%$. Damit war der Dopamineffekt weder durch Antagonisierung des D1- noch des D2-Rezeptors blockierbar (Abb. 11).

Ein ebenfalls statistisch signifikanter Anstieg der AQP9-mRNA auf $132,87\% \pm 31,35\%$ ergab sich bei alleiniger SCH23390-Behandlung, während die abschließliche Sulpiridbehandlung mit $98,15\% \pm 10,63\%$ auf Kontrollkulturniveau blieb (Abb. 11).

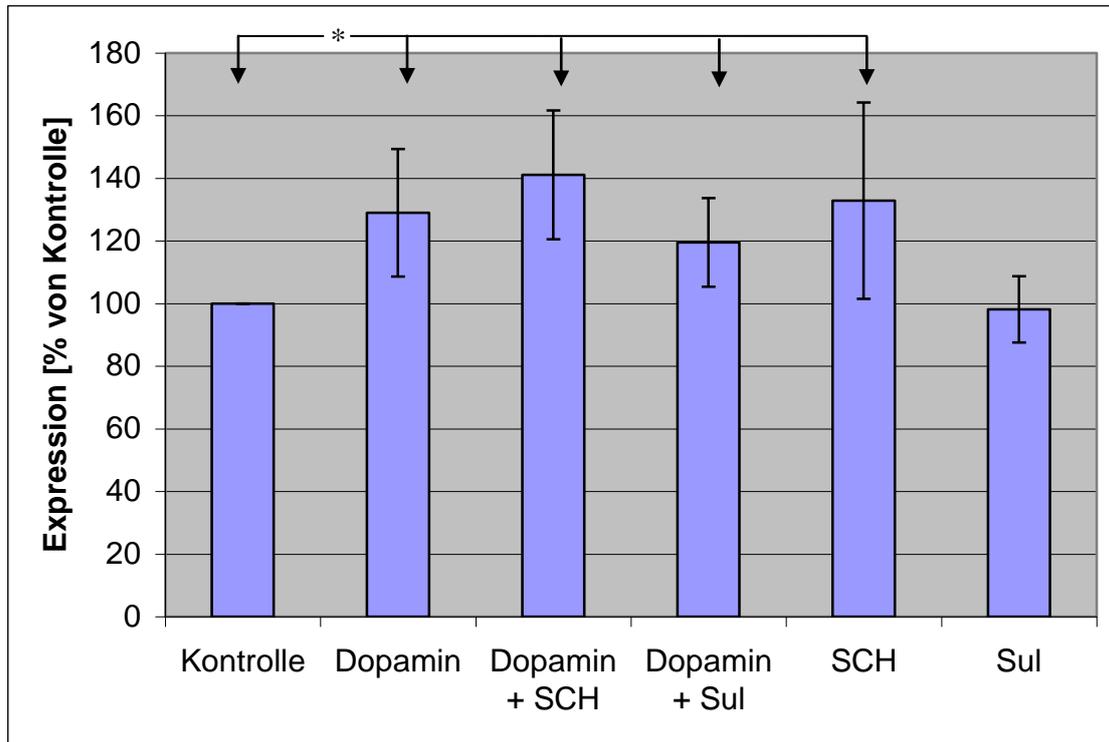


Abbildung 11 AQP9-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Mesencephalons. Konzentrationen in Prozent der unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Dopamin: Dopamin 10^{-5} M, SCH: SCH23390 10^{-6} M, Sul: Sulpirid 10^{-6} M; * $p < 0,05$

Tabelle 8 AQP9-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Mesencephalons. Rohdaten der relativen Konzentrationen von AQP9-mRNA in den behandelten Kulturen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. Dopamin: Dopamin 10^{-5} M, SCH: SCH23390 10^{-6} M, Sul: Sulpirid 10^{-6} M

Experiment	Kontrolle	Dopamin	Dopamin + SCH	Dopamin + Sul	SCH	Sul
1	100,00	135,57	115,19	116,75	101,07	113,21
2	100,00	107,81	132,32	113,79	114,37	84,75
3	100,00	108,29	135,52	102,58	115,80	102,81
4	100,00	139,04	168,22	123,58	163,41	93,57
5	100,00	154,22	154,34	140,87	169,68	96,42
MW	100	128,99	141,12	119,51	132,87	98,15
SD	0	20,36	20,56	14,14	31,35	10,63

3.7 AQP9-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums

3.7.1 AQP9-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums bei Dopaminbehandlung

Unter Dopaminbehandlung erhöhte sich die AQP9-mRNA-Expression signifikant auf $159,01\% \pm 19,06\%$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur (Abb. 12).

Bei alternativer vorausgehender Hemmung des D1- oder des D2-Rezeptors und anschließender Dopaminbehandlung erhöhte sich die AQP9-mRNA-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kultur auf $141,18\% \pm 34,44\%$ für SCH23390 bzw. $173,38\% \pm 22,61\%$ für Sulpirid (Abb. 12). Während sich die Messergebnisse zwischen der Kontrollkultur und der D2-rezeptorblockierten Zellkultur signifikant unterschieden, bestand zwischen der D1-rezeptorblockierten Kultur und der Kontrollkultur kein sicherer statistischer Unterschied (Abb. 12).

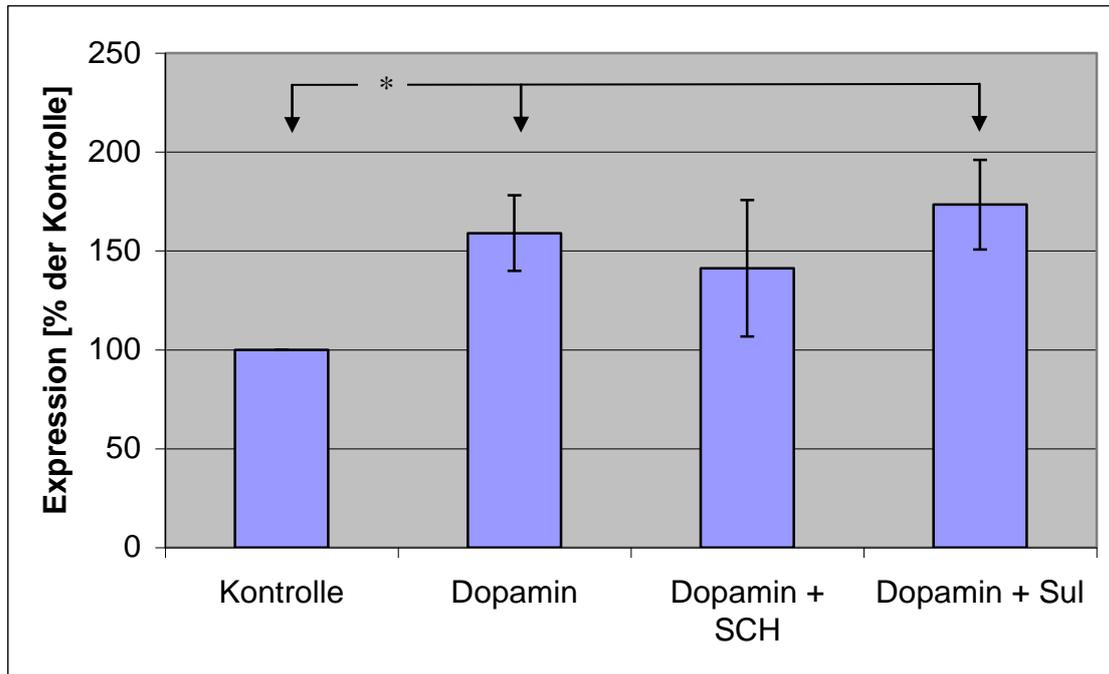


Abbildung 12 AQP9-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums. Konzentrationen in Prozent der unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Dopamin: Dopamin 10^{-5} M, SCH: SCH23390 10^{-6} M, Sul: Sulpirid 10^{-6} M; * $p < 0,05$

Tabelle 9 AQP9-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums. Rohdaten der relativen Konzentrationen von AQP9-mRNA in den behandelten Kulturen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. Dopamin: Dopamin 10^{-5} M, SCH: SCH23390 10^{-6} M, Sul: Sulpirid 10^{-6} M

Experiment	Kontrolle	Dopamin	Dopamin + SCH	Dopamin + Sul
1	100	151,44	127,11	170,92
2	100	179,19	124,99	154,85
3	100	136,00	148,17	168,45
4	100	182,59	191,15	212,58
5	100	161,85	163,66	183,45
6	100	142,96	92,00	150,05
MW	100	159,01	141,18	173,38
SD	0	19,06	34,44	22,61

3.7.2 AQP9-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums bei Östrogenbehandlung

In der mit Östrogen behandelten Zellkultur verringerte sich die AQP9-mRNA-Synthese signifikant auf $88,9\% \pm 7,25\%$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur (Abb. 13). Bei vorausgehender Blockade des nukleären Östrogenrezeptors durch ICI-182,780 und anschließender Östrogenbehandlung ergibt sich für die AQP9-mRNA-Expression ein Mittelwert von $102,82\% \pm 25,78\%$ (Abb. 13).

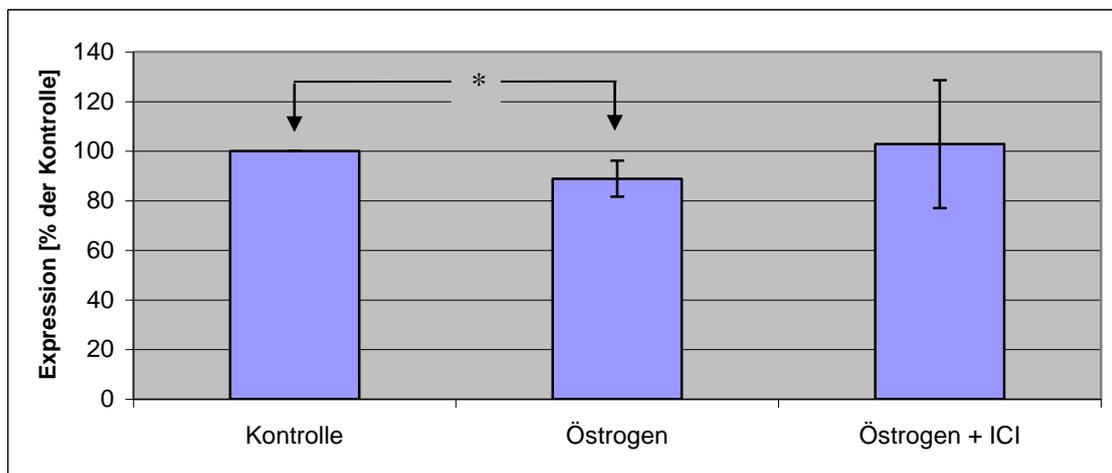


Abbildung 13 AQP9-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums. Konzentrationen in Prozent der unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. ICI: ICI-182,780 10^{-6} M; * $p < 0,05$

Tabelle 10 AQP9-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums. Rohdaten der relativen Konzentrationen von AQP9-mRNA in den behandelten Kulturen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. ICI: ICI-182,780 10^{-6} M

Experiment	Kontrolle	Östrogen	Östrogen + ICI
1	100	78,26	73,82
2	100	83,16	138,17
3	100	87,75	90,69
4	100	95,60	126,19
5	100	96,86	107,89
6	100	91,54	80,14
MW	100	88,86	102,82
SD	0	7,25	25,78

3.8 Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse

Abbildung 14 zeigt eine stark vereinfachte Übersicht der Dopamineffekte in neuronalen und glialen Kulturen des Mesencephalons und des Striatums.

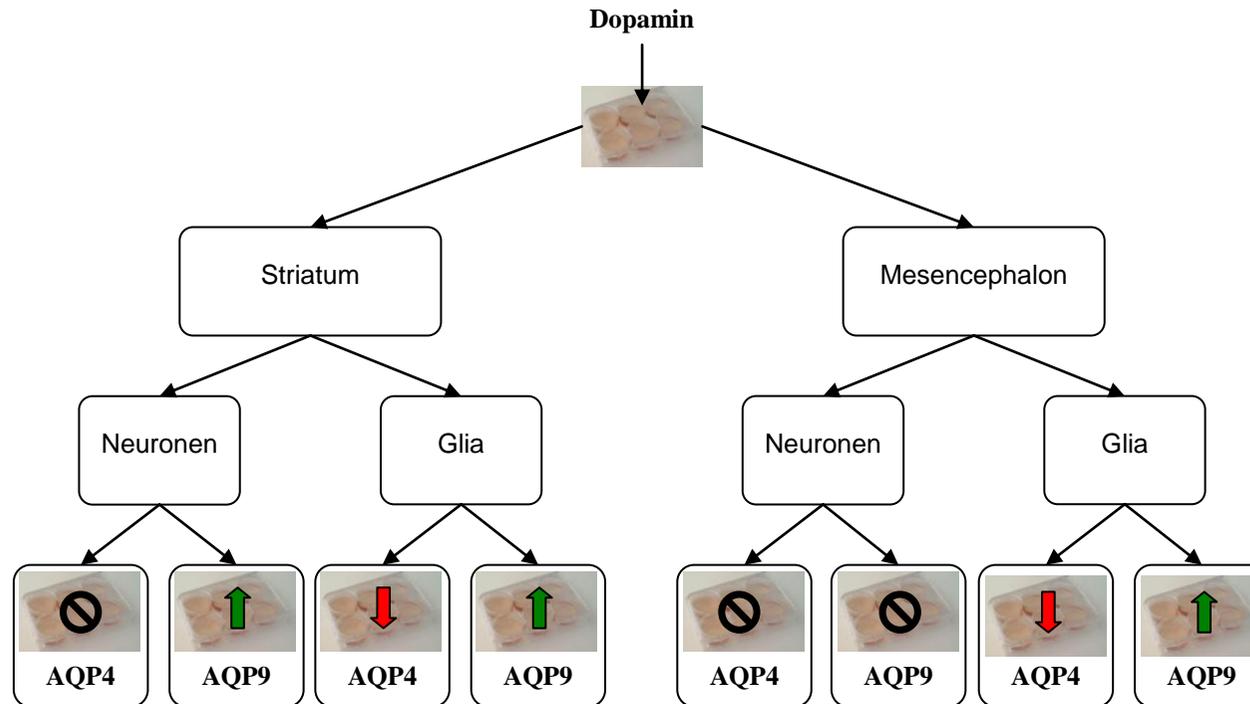


Abbildung 14 Tendenzielle Veränderung der AQP-(mRNA)-Expression nach Behandlung der Zellkulturen mit Dopamin.

↑: Hochregulation, ↓: Herunterregulation, ⊘: nicht nachweisbar

Abbildung 15 zeigt eine stark vereinfachte Übersicht der Dopamineffekte in neuronalen und glialen Kulturen des Striatums.

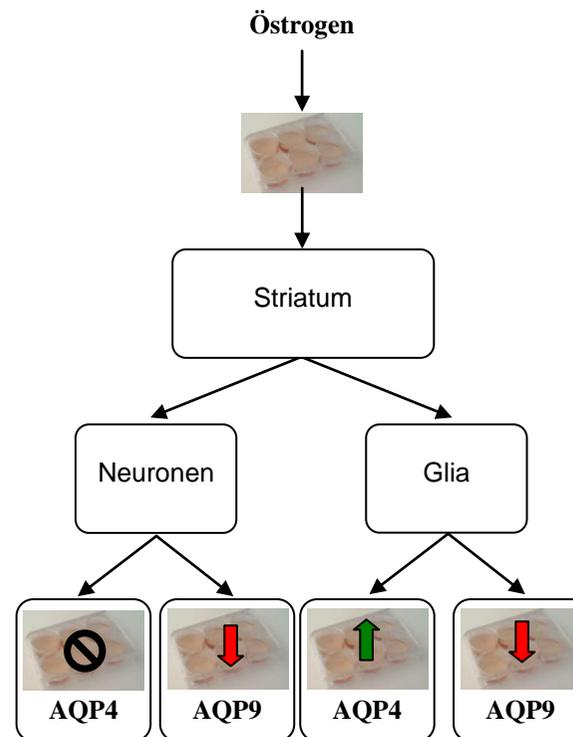


Abbildung 15 Tendenzielle Veränderung der AQP-(mRNA)-Expression nach Behandlung der Zellkulturen mit Östrogen.

↑: Hochregulation, ↓: Herunterregulation, ⊘: nicht nachweisbar

4 Diskussion

4.1 AQP4-Expression in Neuronen des Striatums und des Mesencephalons

Erwartungsgemäß war die Konzentration von AQP4-mRNA in den neuronalen Kulturen sehr gering, da Neuronen des ZNS das AQP4-Protein nicht exprimieren (Tait, 2008; Lehmann, 2004; Nagelhus, 1998). Entsprechend hoch war die erforderliche Zyklenzahl, bis die lineare log-Phase der Realtime-PCR-Analyse erreicht wurde. Zum größten Teil befanden sich die Messergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze (d.h. bei der LightCycler-Messung mehr als 41 Zyklen), zum Teil ergaben sich Werte größer Null, die als artifiziell zu werten sind und eventuell von verbliebenen Gliazellen stammten. Die Messungen im Bereich der Nachweisgrenze führten zu einer starken Zunahme an Messfehlern, wodurch sich die extremen Standardabweichungen in den Ergebnissen ergaben. Die Messungen stützen damit die Annahme, dass AQP4 von Neuronen beider untersuchter Hirnregionen nicht exprimiert wird. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Literatur (Tait, 2008; Lehmann, 2004 und Nagelhus 1998).

4.2 Regulation der AQP4-Expression in Gliazellen des Mesencephalons

In den Kulturen mesencephaler Gliazellen zeigte sich eine Herunterregulation der AQP4-mRNA-Expression unter Dopamin. Auch nach Vorbehandlung durch D1- bzw. D2-Rezeptorantagonisten führte die Dopaminbehandlung zu einer geringeren AQP4-mRNA-Synthese verglichen mit der Kontrollprobe. Somit wird der Dopamineffekt weder über D1- noch über D2-Rezeptoren vermittelt.

Eine Beeinflussung der AQP4-mRNA-Expression durch die eingesetzten Dopaminrezeptorantagonisten per se kann ausgeschlossen werden, da unter alleiniger Behandlung mit SCH23390 oder Sulpirid die AQP4-mRNA-Konzentration unverändert zu den Kontrollkulturen blieb.

Für die Vermittlung des beobachteten Dopamineffekts könnten statt der D1- oder D2-Rezeptoren auch α 2-Adrenozeptoren verantwortlich sein, welche ebenfalls durch Dopamin aktivierbar sind (Cornil & Ball, 2008). In weiterführenden Experimenten könnte dies sowohl für die mRNA-Expression als auch für die Proteinsynthese von AQP4 untersucht werden. Wie dies in dieser Arbeit bereits für striatale Gliazellkulturen erfolgte (Kap. 3.3.3), würden hierbei mesencephale Gliazellkulturen zunächst mit dem α 2-Adrenozeptor-antagonisten Yohimbin und anschließend mit Dopamin behandelt werden.

Des Weiteren könnten Untersuchungen zur intrazellulären Signaltransduktion, welche durch die Dopaminwirkung ausgelöst wird, aufschlussreich sein. Durch Blockade intrazellulärer Signalkaskaden wie z.B. durch einen PKA-Inhibitor oder einen Phospholipase-C-Inhibitor und anschließender Analyse der AQP4-Expression könnte festgestellt werden, ob einer bzw. welcher dieser Signaltransduktionswege für den Dopamineffekt Relevanz besitzt.

Die vorliegenden Ergebnisse, wonach der Dopamineffekt nicht über D1- oder D2-Rezeptoren vermittelt wird, sowie die in der Literatur beschriebene Aktivierbarkeit von α 2-Adrenozeptoren durch Dopamin (Cornil & Ball, 2008) legen die Möglichkeit nahe, dass die AQP4-Expression in mesencephalen Gliazellen über die Bindung von Dopamin an α 2-Adrenozeptoren reguliert wird. Dass die AQP4-Expression in Gliazellen potenziell über diesen Signaltransduktionsweg vermittelt werden kann, konnte für striatale Gliazellen bereits gezeigt werden (Küppers et al., 2008).

4.3 Regulation der AQP4-Expression in Gliazellen des Striatums

Das Ergebnis der Experimente zeigt zunächst, dass die Dopaminbehandlung der Zellkulturen die AQP4-mRNA-Synthese grundsätzlich beeinflusst, da im Vergleich zu den Kontrollkulturen weniger AQP4-mRNA bzw. AQP4-Protein durch die Gliazellen hergestellt wurde. Sowohl in den PCR-Experimenten wie auch in den Western Blots zeigte sich eine reduzierte AQP4-Expression. Ebenfalls übereinstimmend blieb in beiden Untersuchungen die

Synthesereduktion bei vorausgehender Antagonisierung des D1-Rezeptors statistisch unverändert im Vergleich zur alleinigen Dopaminbehandlung. Somit ist die Dopaminwirkung nicht D1-rezeptorvermittelt, da der Dopamineffekt nicht durch Antagonisierung dieses Rezeptors unterdrückt werden konnte. Im Gegensatz zu mesencephalen Gliazellkulturen führte die Blockade des D2-Rezeptors bei striatalen Gliazellen jedoch zu einer Aufhebung des Dopamineffekts auf die AQP4-mRNA-Synthese.

Auch auf Proteinebene fand unter Dopaminbehandlung eine Herunterregulation der AQP4-Expression statt. Ebenso wie bei den Experimenten zur AQP4-mRNA-Synthese war der Dopamineffekt durch Antagonisierung des D2-Rezeptors, nicht jedoch durch Antagonisierung des D1-Rezeptors blockierbar.

Aus den mit striatalen Gliazellkulturen durchgeführten Experimenten lassen sich zwei Schlussfolgerungen ziehen:

1. Unter Dopamineinfluss wird sowohl die AQP4-mRNA-Synthese als auch die AQP4-Proteinexpression herunterreguliert. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Küppers et al. (2008), die darüber hinaus zeigen konnten, dass hierbei von den beiden Isoformen nur die mRNA-Expression von AQP4-M23, nicht jedoch die von AQP4-M1 reduziert wurde.
2. Die Herunterregulation der AQP4-mRNA und -Proteinsynthese wird im Striatum durch die Aktivierung des D2-Rezeptors durch Dopamin (mit)verursacht. Hierfür spricht, dass der beobachtete Dopamineffekt nach Blockade des D2-Rezeptors sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene aufgehoben wurde. Dies steht im Widerspruch zu Küppers et al. (2008) die den Dopamineffekt nur durch Blockade des $\alpha 2$ -Rezeptors mittels Yohimbin aufheben konnten, nicht jedoch durch Blockade des D1- oder des D2-Rezeptors. Übereinstimmend mit Küppers et al. (2008) war der Dopamineffekt bezüglich der AQP4-Expression nicht durch Blockade des D1-Rezeptors modulierbar.

Als weiterer möglicher Signaltransduktionsmechanismus wäre anstelle der singulären Betrachtung des D1- und des D2-Rezeptors die Wirkung von Dopamin auf D1-D2-Heterooligomere zu bedenken, welche Phospholipase C-vermittelt zur intrazellulären Kalziumfreisetzung führen (George & O'Dowd, 2007).

Alternativ zur Signaltransduktion über D1- und D2-Rezeptoren besteht aber auch die Möglichkeit, dass der beschriebene Dopamineinfluss auf die AQP4-Synthese über andere Rezeptoren vermittelt wird. Wie beschrieben kann Dopamin auch mit α 2-Adrenozeptoren interagieren (Cornil & Ball, 2008). Hierfür spricht, dass der Effekt von Dopamin auf die AQP4-Expression durch Yohimbin blockierbar war. Dies zeigt, dass der α 2-Adrenozeptor ebenso wie der D2-Rezeptor an der Vermittlung des Dopamineffekts in Gliazellen des Striatums beteiligt ist. Die Bedeutung der Wirkung von Dopamin auf den α 2-Adrenozeptor wurde auch in weiterführenden Experimenten erfolgreich beobachtet (Küppers et al., 2008). Dagegen stehen die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich des Einflusses des D2-Rezeptors wie oben beschrieben im Gegensatz zu Küppers et al. (2008), die zeigten, dass der D2-Rezeptor keinen Einfluss auf die dopaminvermittelte AQP4-Expression besitzt.

Dass Dopamin, wie hier gezeigt wurde, zu einer Herunterregulation von AQP4 führt, steht in Einklang mit der eingangs beschriebenen Hypothese, wonach Dopamin ein Zelldifferenzierungssignal darstellt (Reuss & Unsicker, 2000) und nach Aktivierung dieses Signals die Synthese verschiedener Proteine moduliert wird.

Zelenina et al. (2002) konnten zeigen, dass Dopamin zur Reduktion der Wasserpermeabilität und damit zur Funktionseinschränkung bereits bestehender AQP4-Kanäle führt. Hier zeigt sich ein im Vergleich zu unseren Untersuchungen gleichgerichteter, negativer Effekt von Dopamin auf AQP4: Sowohl auf der von uns gezeigten Ebene der mRNA- und der Proteinsynthese wie auch bei der von Zelenina et al. (2002) beobachteten Modulation der

Funktionsfähigkeit des bereits in die Zellmembran integrierten AQP4 wird dessen funktioneller Einfluss auf die Zelle durch Dopamin reduziert.

Wurden die Gliazellen mit Östrogen behandelt, so führte dies zu keiner statistisch fassbaren AQP4-mRNA-Konzentrationsveränderung im Vergleich zu Kontrollkultur.

Wir konnten zeigen, dass Dopamin auch auf die intrazelluläre Lokalisation von AQP4 und die gesamte Zellmorphologie Einfluss zu haben scheint. Dies zeigte sich in den immunzytologischen Versuchen, in welchen die dopamin-behandelten striatalen Astrozyten weniger Zellfortsätze als die unbehandelten Kontrollzellen besaßen. Außerdem war die intrazelluläre AQP4-Verteilung in den mit Dopamin behandelten Zellkulturen mehr perinukleär verteilt, als in den unbehandelten Kulturen, bei denen sich AQP4 überwiegend in den Zellfortsätzen befindet. In weiterführenden Untersuchungen könnte analysiert werden, über welchen Rezeptor Dopamin Einfluss auf die Zellmorphologie nimmt. Gegen die Signaltransduktion über den D1-Rezeptor spricht, dass unter intrazellulärer cAMP-Zunahme bei Ratten ein positiver Einfluss sowohl auf die Ausbildung von Zellfortsätzen in Astrozyten als auch auf die AQP4-Expression beobachtet wurde (Nicchia et al., 2008). Bei Astrozyten der Maus konnte dieser Effekt jedoch nicht gezeigt werden (Nicchia et al., 2008).

4.4 Regulation der AQP9-Expression in Neuronen des Mesencephalons

Bei den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten konnte in neuronalen Zellkulturen mesencephalen Ursprungs kein Beleg für die Expression von AQP9 bzw. dessen mRNA gefunden werden. Dies steht im Widerspruch zu anderen Untersuchungen, in welchen der Nachweis für AQP9-mRNA sowie für das Protein selbst in katecholaminergen Neuronen der pars compacta der Substantia Nigra erfolgreich verlief (Badaut et al., 2008; Mylonakou et al., 2009). Andererseits bezweifeln Rojek et al. (2007) grundsätzlich die Expression von AQP9 im Gehirn und gehen von unspezifischen Antikörperbindungen aus, da auch bei AQP9-Knockoutmäusen AQP9 vermeintlich nachweisbar war.

Die Ursache für die Nichtnachweisbarkeit von AQP9 in neuronalen mesencephalen Zellkulturen in dieser Arbeit könnte darüber hinaus aber auch damit erklärbar sein, dass die Expression von AQP9 durch dopaminerge Neurone unter den artifizellen in-vitro-Bedingungen von ihrem Expressionsverhalten in vivo abweicht.

4.5 Regulation der AQP9-Expression in Neuronen des Striatums

Nach den Untersuchungen dieser Arbeit wird AQP9 in striatalen Neuronen exprimiert. Die Expression von AQP9-mRNA wird durch Dopamin erhöht. Der Dopamineffekt war weder durch Blockade des D1- noch des D2-Rezeptors antagonisierbar. Dies lässt darauf schließen, dass der agonistische Einfluss von Dopamin auf die AQP9-mRNA-Synthese über andere Rezeptoren vermittelt wird, welche durch Dopamin als Signalmolekül beeinflusst werden können. Als Zielrezeptor kommt der bereits beschriebene α 2-Adrenozeptor (Cornil & Ball, 2008) in Betracht.

Zwar mit dem beschriebenen Konzept der zellproliferativen Wirkung von Östrogen und einer damit einhergehenden geringeren AQP9-Expression stimmige Messergebnisse scheitern an der statistischen Aussagekraft. Tendenziell zeigte sich jedoch eine etwas geringere AQP9-mRNA-Konzentration unter Östrogenbehandlung.

Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen der durchgeführten Experimente mit striatalen Neuronen schließen, dass unter Einfluss des Zelldifferenzierungssignals Dopamin die Synthese von AQP9 gesteigert wird. Hierdurch wird der schnelle Ein- und Ausstrom von Energiemetaboliten, insbesondere Laktat, für das sich differenzierende Neuron ermöglicht.

4.6 Regulation der AQP9-Expression in Gliazellen des Mesencephalons

Anders als bei mesencephalen Neuronen wird in mesencephalen Gliazellen AQP9-mRNA exprimiert. Es konnte auch ein Einfluss von Dopamin auf die AQP9-mRNA-Expression gezeigt werden. Im Vergleich zu Kontrollkulturen waren in sämtlichen mit Dopamin behandelten Kulturen die AQP9-mRNA-Konzentrationen erhöht. Sowohl die vorausgegangene D2-als auch die D1-Rezeptorblockade führte zu ähnlichen Messergebnissen wie die alleinige Dopaminbehandlung. Hieraus lässt sich schließen, dass der Dopamineffekt über keinen der beiden Rezeptoren sondern über einen anderen Signaltransduktionsweg vermittelt wurde. Auch hier könnten weiterführenden Experimente hinsichtlich der Bedeutung des $\alpha 2$ -Adrenozeptors (Cornil & Ball, 2008) aufschlussreich sein.

Die Aussagekraft der Ergebnisse wird dadurch eingeschränkt, dass bereits die alleinige Applikation von SCH23390 zu einer gesteigerten Synthese von AQP9-mRNA führte. Daher könnten die beobachteten Effekte unter Applikation von SCH23390, gefolgt von Dopamin durch im Rahmen dieser Arbeit nicht nachvollziehbare Interaktionen von SCH23390 verursacht worden sein.

4.7 Regulation der AQP9-Expression in Gliazellen des Striatums

Die Dopaminbehandlung striataler Gliazellkulturen erhöhte die AQP9-mRNA-Expression signifikant. Während die vorausgegangene Applikation des D2-Rezeptorantagonisten Sulpirid statistisch keinen Einfluss auf den Dopamineffekt hatte, war die AQP9-mRNA-Expression nach Blockade des D1-Rezeptors leicht reduziert. Weiterhin ergab sich unter dieser Behandlung eine sehr viel höhere Standardabweichung im Vergleich zur ausschließlich mit Dopamin behandelten Kultur. Aus der reduzierten AQP9-mRNA-Expression und der hohen Standardabweichung resultiert auch, dass zwischen der Kontrollkultur und der D1-rezeptorantagonisierten und anschließend mit Dopamin behandelten Kultur kein signifikanter Unterschied besteht. Dies bedeutet, dass die Expressionszunahme von AQP9-mRNA durch Dopamin eventuell über den D1-Rezeptor reguliert wird. Um hierüber eine sichere Aussage treffen zu können und andere Signaltransduktionswege ausschließen zu können, sind jedoch weiterführende Untersuchungen erforderlich. Denn auch zwischen der ausschließlich mit Dopamin behandelten und der zuvor D1-rezeptorblockierten Zellkultur besteht kein signifikanter Unterschied.

Unter der Annahme des für das Differenzierungsstadium förderlichen Effekts von Dopamin, stützt dieses Ergebnis die Annahme, dass in einem Stadium der Zelldifferenzierung, welches durch die Anwesenheit von Dopamin simuliert wird, AQP9 hochreguliert wird. Diese Hochregulation des u.a. für Laktat durchlässigen AQP9 hätte für die Zelle den Vorteil, Energie- und Stoffwechselmetabolite durch das membranständige Protein passieren zu lassen. Dies gewährleistet den hohen Energiebedarf, welcher im Rahmen der Zelldifferenzierung erforderlich ist.

Dass dagegen in der Phase der Proliferation, welche unter anderem durch Östrogen unterhalten wird, AQP9 eine geringere Rolle als im Differenzierungsstadium spielen könnte, wird durch die Ergebnisse der östrogen-behandelten Kulturen gestützt. Bei diesen sank die AQP9-mRNA-Konzentration

im Vergleich zur Kontrollkultur signifikant um 11,1%. Anstelle dieser nur geringfügig niedrigeren Konzentration hätte man alternativ erwarten können, dass unter Östrogenbehandlung eine deutlichere Herunterregulation von AQP9 stattfinden würde. Gründe für das Ausbleiben der stärkeren Herunterregulation könnten in der für das Experiment zu langen biologischen Halbwertszeit der AQP9-mRNA liegen oder darin, dass die AQP9-Konzentration der Kontrollkultur bereits der einer für eine Proliferationskultur erforderlichen Konzentration entsprach. Zumindest spricht das Ergebnis dafür, dass durch Östrogen eine leichte Herunterregulation der AQP9-mRNA-Konzentration induziert wird. Aufgrund der durchgeführten Experimente bleibt jedoch unklar, ob es sich hierbei um den durch „klassische“ nukleäre Rezeptoren vermittelten Signaltransduktionsweg oder um einen alternativen Weg handelt. Aufgrund der hohen Standardabweichung bei den Experimenten mit dem nukleären Östrogenrezeptorantagonisten ICI-182,780 lässt sich hierüber keine sichere Aussage treffen, wenngleich der Mittelwert von 102,8% nahe dem der Kontrollkulturen mit 100% liegt und so eine Blockade der Östrogenwirkung möglich erscheinen lässt. In weiterführenden Experimenten könnte durch die Behandlung mit an BSA gebundenem und damit nicht membranpassierbarem Östrogen untersucht werden, ob der Östrogeneffekt durch membranständige Rezeptoren vermittelt wird.

Als weitere Möglichkeit ist in Betracht zu ziehen, dass Östrogen (innerhalb des beobachteten Zeitraums) weder einen direkten noch einen indirekten Einfluss auf die AQP9-mRNA-Synthese im Gehirn besitzt und damit der Unterschied zwischen Kontrollkulturen und behandelten Kulturen zufällig ist. Hierin würden sich sowohl neuronale als auch gliale Zellen des Striatums von Leberparenchymzellen und Zellen des Ductus deferens unterscheiden, auf deren AQP9-Expression Östrogen einen (gegensätzlichen) Einfluss besitzt (Wellejus et al., 2008).

4.8 Zusammenfassung

AQP4 und AQP9 als Bestandteile eines komplexen Regulationssystems der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung des zentralen Nervensystems

Wenngleich in dieser Arbeit nur ein sehr kleiner Ausschnitt eines bis heute nicht umfassend verstandenen Systems der Steuerung der Gehirnentwicklung betrachtet wurde, so lassen sich doch folgende Beobachtungen festhalten:

Sowohl AQP4 (Protein und mRNA) als auch AQP9-mRNA waren, wie in einer Vielzahl anderer Untersuchungen ebenfalls gezeigt werden konnte, sowohl in Gliazellen als auch zum Teil in Neuronen nachweisbar (Badaut et al., 2004a, 2008; Badaut & Regli 2004b; Amiry-Moghaddam et al., 2005).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression der mRNA beider Aquaporin-Typen durch Dopamin und Östrogen, in den in vitro-Experimenten modifiziert werden konnte. Interessanterweise zeigten sich hier gegenteilige Effekte der Dopaminwirkung auf die AQP-mRNA Expression. Während AQP4-mRNA sowohl in Gliazellen des Mesencephalons als auch des Striatums unter Dopamineinfluss herunterreguliert wurde, fand in glialen und neuronalen Zellkulturen des Striatums eine Synthesesteigerung der AQP9-mRNA statt. Ebenso konnte unter Dopamineinfluss eine gesteigerte AQP9-mRNA-Expression in glialen Zellkulturen des Mesencephalons beobachtet werden, während AQP9 in Neuronen dieser Hirnregion nicht nachweisbar war.

Die Untersuchungen bezüglich der Signaltransduktionswege, über welche Dopamin Einfluss auf die Expression von AQP4 und AQP9 nimmt, zeigten die Relevanz verschiedener Rezeptoren auf. Lediglich die AQP4-Expression in glialen Zellkulturen des Striatums wurde über den D2-Rezeptor vermittelt herunterreguliert. Daneben besitzt der D1-Rezeptor in diesen Zellkulturen eventuell eine Bedeutung bei der Hochregulation von AQP9. Im Gegensatz hierzu scheint Dopamin in mesencephalen Zellkulturen (Glia und Neurone) sowie in striatalen Neuronenkulturen über andere Wege als über die klassischen Dopaminrezeptoren D1 oder D2 regulierend auf die AQP4- und

AQP9-Expression einzuwirken. Ein für die AQP-Expression bedeutsamer Transduktionsweg könnte die Dopaminwirkung am $\alpha 2$ -Rezeptor sein (Cornil & Ball, 2008, Küppers et al. 2008)

Unter der Annahme, Dopamin sei im Rahmen der Ontogenese des zentralen Nervensystems ein Induktor zur Zelldifferenzierung (Reuss & Unsicker, 2000) und zugleich ein Inhibitor der Zellproliferation, stützen die Untersuchungen die Hypothese, wonach im Stadium der Differenzierung der beobachteten Zellen ein erhöhter Bedarf an Aquaglyceroporin AQP9 besteht, dagegen ein geringeres Vorhandensein am reinen transmembranalen Wasserkanal AQP4 erforderlich ist.

Dass die Modulationstendenzen bezüglich des jeweiligen Aquaporins von Dopamin in Gliazellen (Mesencephalon und Striatum) und Neuronen (Striatum) gleichgerichtet sind, lässt auf eine erforderliche Synchronisation der beiden unterschiedlichen Zellarten schließen, welche zumindest nicht nur auf eine spezifische Hirnregion beschränkt ist.

Hinsichtlich der Regulation von AQP9-mRNA in mesencephalen Neuronen sind weitere Untersuchungen notwendig, da die Ergebnisse der diesbezüglichen Versuche, wie oben beschrieben, nicht eindeutig waren.

5 Literaturverzeichnis

- Agre P., Kozono D.** (2003) Minireview - Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases *FEBS letters* **555**: 72-78
- Amiry-Moghaddam M., Lindland H., Zelenin S., Roberg B.A., Gundersen B.B., Petersen P., Rinvik E., Torgner I.A., Ottersen O.P.** (2005) Brain mitochondria contain aquaporin water channels: evidence for the expression of a short AQP9 isoform in the inner mitochondrial membrane *The FASEB Journal* **19**(11):1459 - 1467
- Badaut J., Lasbennes F., Magistretti P.J., Regli L.** (2002) Review Article - Aquaporins in Brain: Distribution, Physiology, and Pathophysiology *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **22**:367–378
- Badaut J., Petit J.M., Brunet J.F., Magistretti P.J., Charriaut-Marlangue C., Regli L.** (2004a) Distribution of AQP9 in the adult rat brain: preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells *Neuroscience* **128**(1):27-38
- Badaut J., Regli L.** (2004b) Distribution and possible roles of aquaporin 9 in the brain *Neuroscience* **129**(4): 971-981
- Badaut J., Brunet J.F., Petit J.M., Guérin C.F., Magistretti P.J., Regli L.** (2008) Induction of brain aquaporin 9 (AQP9) in catecholaminergic neurons in diabetic rats *Brain research* **1188**: 17-24
- Beyer C., Ivanova T., Karolczak M., Küppers E.** (2002) Cell type-specificity of nonclassical estrogen signalling in the developing midbrain *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **81** (4-5) 319 - 325
- Beyer C., Pawlak J., Brito V., Karolczak M., Ivanova T., Küppers E.** (2003) Regulation of gene expression in the developing midbrain by estrogen: implication of classical and nonclassical steroid signalling *Annals of the New York Academy of Sciences* **1007**: 17 – 28
- Brito V., Beyer C., Küppers E.** (2004) BDNF-dependent stimulation of dopamine D5 receptor expression in developing striatal astrocytes involves PI3-kinase signaling *Glia* **46**(3): 284 – 295
- Cavazzin C., Ferrari D., Facchetti F., Russignan A., Vescovi A.L., La Porta C.A., Gritti A.** (2006) Unique expression and localization of aquaporin-4 and aquaporin-9 in murine and human neural stem cells and in their glial progeny *Glia* **53**(2): 167 – 181
- Cornil C.A., Ball G.F.** (2008) Interplay among catecholamine systems: dopamine binds to alpha2-adrenergic receptors in birds and mammals *The Journal of comparative neurology* **511**(5): 610-627
- Crane J.M., Van Hoek A.N., Skach W.R., Verkman A.S.** (2008) Aquaporin-4 Dynamics in Orthogonal Arrays in Live Cells Visualized by Quantum Dot Single Particle Tracking *Molecular Biology of the Cell* **19**(8):3369-3378
- Engel A., Fujiyoshi Y., Gonen T., Walz T.** (2008) Junction-forming aquaporins *Current Opinion in Structural Biology* **18**(2): 229-235

- Fauchey Y., Jaber M., Bloch B., Le Moine C.** (2000) Dopamine control of striatal gene expression during development: relevance to knockout mice for the dopamine transporter *The European journal of neuroscience* **12**(9): 3415-3425
- Furman S., Gorelick-Feldman D.A., Davidson K.G.V., Yasumura T., Neely J.D., Agre P., Rash J.E.** (2003) Aquaporin-4 square array assembly: Opposing actions of M1 and M23 isoforms *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 13609- 13614
- George S.R., O'Dowd B.F.** (2007) A novel dopamine receptor signalling unit in brain: heterooligomers of D1 and D2 dopamine receptors *The Scientific World Journal* **7**: 58 – 63
- Graber D.J., Levy M., Kerr D., Wade W.F.** (2008) Neuromyelitis optica pathogenesis and aquaporin 4 *Journal of Neuroinflammation* **5**: 22
- Gunnarson E., Zelenina M., Aperia A.** (2004) Regulation of brain aquaporins *Neuroscience* **129**: 947 – 955
- Hsu M.S., Lee D.J., Binder D.K.** (2007) Potential role of the glial water channel aquaporin-4 in epilepsy *Neuron glia biology* **3**(4): 287– 297
- Hub J.S., de Groot B.L.** (2008) Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 1198 – 1203
- Itoh T., Rai T., Kuwahara M., Ko S.B.H., Uchida S., Sasaki S., Ishibashi K.** (2005) Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells *Biochemical and Biophysical Research Communications* **330**: 832-838
- Jain M., Armstrong R.J., Barker R.A., Rosser A.E.** (2001) Cellular and molecular aspects of striatal development *Brain research bulletin* **55** (4): 533 - 540
- Küppers E., Beyer C.** (1999) Expression of estrogen receptor-alpha and beta mRNA in the developing and adult mouse striatum *Neuroscience letters* **276** (2) 95 – 98
- Küppers E., Sabolek M., Anders U., Pilgrim C., Beyer C.** (2000) Developmental regulation of glutamic acid decarboxylase mRNA expression and splicing in the rat striatum by dopamine *Brain research. Molecular brain research* **81** (1-2) 19 – 28
- Küppers E., Ivanova T., Karolczak M., Lazarov N., Föhr K., Beyer C.** (2001a) Classical and nonclassical estrogen action in the developing midbrain *Hormones and behavior* **40** (2) 196 – 202
- Küppers E., Beyer C.** (2001b) Dopamine regulates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in cultured embryonic mouse striatal cells *Neuroreport* **12** (6) 1175 – 1179
- Küppers E., Gleiser C., Brito V., Wachter B., Pauly T., Hirt B., Grissmer S.** (2008) AQP4 expression in striatal primary cultures is regulated by dopamine – implications for proliferation of astrocytes *European Journal of Neuroscience* **28**(11): 2173 – 2182
- Lehmann G.L., Gradilone S.A., Marinelli R.A.** (2004) Aquaporin Water Channels in Central Nervous System *Current Neurovascular Research* **1**(4): 293-303

- Liebau S.** (2004) Vergleichende Analyse der Genexpressionsprofile von humanen adulten neuronalen Stammzellen *Dissertationsschrift, Medizinische Fakultät, Universität Ulm*
- Moe S.E., Sorbo J.G., Sogaard R., Zeuthen T., Petter Ottersen O., Holen T.** (2008) New isoforms of rat Aquaporin-4 *Genomics* **91**(4): 367-377
- Mylonakou M.N., Petersen P.H., Rinvik E., Rojek A., Valdimarsdottir E., Zelenin S., Zeuthen T., Nielsen S., Ottersen O.P., Amiry-Moghaddam M.** (2009) Analysis of mice with targeted deletion of AQP9 gene provides conclusive evidence for expression of AQP9 in neurons *Journal of Neuroscience Research* **87**(6): 1310-1322
- Nagelhus E.A., Mathiisen T.M., Ottersen O.P.** (2004) Aquaporin-4 in the central nervous System: cellular and subcellular distribution and coexpression with Kir4.1 *Neuroscience* **129**(4): 905-913
- Nagelhus E.A., Veruki M.L., Torp R., Haug F.M., Laake J.H., Nielsen S., Agre P., Ottersen O.P.** (1998) Aquaporin-4 Water Channel Protein in the Rat Retina and Optic Nerve: Polarized Expression in Müller Cells and Fibrous Astrocytes *The Journal of Neuroscience* **18**(7): 2506–2519
- Nicchia G.P., Rossi A., Mola M.G., Procino G., Frigeri A., Svelto M.** (2008) Actin cytoskeleton remodelling governs Aquaporin-4 localization in astrocytes *Glia* **56**(16): 1755–1766
- Noell S., Fallier-Becker P., Beyer C., Kröger S., Mack A.F., Wolburg H.** (2007) Effects of agrin on the expression and distribution of the water channel protein aquaporin-4 and volume regulation in cultured astrocytes *The European journal of neuroscience* **26**(8): 2109 – 2118
- Papadopoulos M.C., Verkman A.S.** (2007) Aquaporin-4 and brain edema *Pediatric nephrology* **22**(6): 778 - 784
- Pawlak J., Brito V., Küppers E., Beyer C.** (2005) Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen *Brain research. Molecular brain research* **138**(1): 1 – 7
- Raab H., Beyer C., Wozniak A., Hutchison J.B., Pilgrim C., Reisert I.** (1995) Ontogeny of aromatase messenger ribonucleic acid and aromatase activity in the rat midbrain *Molecular brain research* **34**(2): 333 – 336
- Reuss B., Unsicker K.** (2000) Survival and differentiation of dopaminergic mesencephalic neurons are promoted by dopamine-mediated induction of FGF-2 in striatal astroglial cells *Molecular and cellular neurosciences* **16**(6): 781-792
- Rojek A.M., Skowronski M.T., Füchtbauer E.M., Füchtbauer A.C., Fenton R.A., Agre P., Frøkiaer J., Nilsen S.** (2007) Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(9): 3609-3614
- Saadoun S., Papadopoulos M.C., Watanabe H., Yan D., Manley G.T., Verkman A.S.** (2005) Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation *Journal of Cell Science* **118**(24): 5691-5698
- Schmidt U., Beyer C., Oestreicher A.B., Reisert I., Schilling K., Pilgrim C.** (1996) Activation of dopaminergic D1 receptors promotes morphogenesis of developing striatal neurons *Neuroscience* **74**(2): 453 - 460

- Silberstein C., Bouley R., Huang Y., Fang P., Pastor-Soler N., Brown D., Van Hoek A.N.** (2004) Membrane organization and function of M1 and 23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells *American journal of physiology. Renal physiology* **287**(3): F501 - 511
- Sun Z., Zhao Z., Sheng Y., Zhao Z., Gao C., Li J., Liu X.** (2009) Recombinant hirudin treatment modulates aquaporin-4 and aquaporin-9 expression after intracerebral hemorrhage in vivo *Molecular biology reports* **36**(5): 1119 - 1127
- Tait M.J., Saadoun S., Bell B.A., Papadopoulos M.C.** (2008) Water movements in the brain: role of aquaporins *Trends in Neurosciences* **31**: 37-43
- Verkman A.S.** (2005) More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins *Journal of cell science* **118**(15): 3225- 3232
- Verkman A.S., Hara-Chikuma M., Papadopoulos M.C.** (2008) Aquaporins – new players in cancer biology *Journal of Molecular Medicine* **86**(5): 523-529
- Verkman A.S.** (2009) Knock-out models reveal new aquaporin functions *Handbook of experimental pharmacology* **190**: 359-381
- Wellejus A., Jensen H.E., Loft S., Jonassen T.E.** (2008) Expression of aquaporin 9 in rat liver and efferent ducts of the male reproductive system after neonatal diethylstilbestrol exposure *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* **56**(5): 425-432
- Yamamoto N., Sobue K., Miyachi T., Inagaki M., Miura Y., Katsuya H., Asai K.** (2001) Differential regulation of aquaporin expression in astrocytes by protein kinase C *Brain research. Molecular brain research* **95**(1-2): 110 – 116
- Yamamoto N., Sobue K., Fujita M., Katsuya H., Asai K.** (2002) Differential regulation of aquaporin-5 and -9 expression in astrocytes by protein kinase A *Brain research. Molecular brain research* **104**(1): 96 - 102
- Yang B., Zhao D., Verkman A.S.** (2006) Evidence against functionally significant aquaporin expression in mitochondria *The Journal of biological chemistry* **281**(24): 16202 - 16206
- Yool A.J.** (2007) Aquaporins: multiple roles in the central nervous system *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **13**(5): 470 – 485
- Zanassi P., Paolilli M., Montecucco A., Avvedimento E.V., Schinelli S.** (1999) Pharmacological and molecular evidence for dopamine D(1) receptor expression by striatal astrocytes in culture *Journal of neuroscience research* **58**(4): 544 - 552
- Zelenina M., Zelenin S., Bondar A.A., Brismar H., Aperia A.** (2002) Water permeability of aquaporin-4 is decreased by protein kinase C and dopamine *American journal of physiology. Renal physiology* **283**(2): F309 – 318

6 Danksagung

Ich danke Frau PD Dr. Eva Küppers für die unermüdliche Bereitschaft mich zu jedem Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit zu unterstützen und anzuleiten. Ich danke ihr für die wiederholte kritische Durchsicht und Beratung bei der Anfertigung dieser Dissertationsschrift. Ihr und Herrn Prof. Dr. Stephan Grissmer möchte ich zudem für ihre herzliche Gastfreundschaft danken.

Herrn Professor Dr. Hans-Joachim Wagner danke ich für die Annahme als Doktorand, die mir die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichte. Ihm und Herrn Professor Dr. Tobias Böckers danke ich dafür, dass ich diese Arbeit in ihren Laboren durchführen konnte.

Bei Frau Natalie Damm und Frau Anne Lehner möchte ich mich für die freundliche und kompetente Assistenz bei der Pflege der Zellkulturen und bei der Durchführung der Experimente bedanken.

Frau Verena Rozanski danke ich für die angenehme Zusammenarbeit beim gemeinsamen Erlernen der experimentellen Methoden und für die Unterstützung bei der Pflege der Zellkulturen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Marianne und Walter Hawes für die beständige Förderung und Unterstützung im Leben, im Studium und auch bei dieser Arbeit. Ebenso bedanke ich mich bei Jessica Burger, die mich auf zäher Strecke immer wieder zu motivieren vermochte.