

Stellen murine Astrozyten Zielzellen für 6-OHDA dar?

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Etschmann, Julia

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.- J. Wagner

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Mätzler

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	VII
1 Einleitung	1
1.1 Astrozyten	1
1.1.1 Die Entwicklung von Astrozyten	3
1.2 Reaktive Astrogliose	4
1.3 GFAP	5
1.4 Vimentin	7
1.5 Nestin	7
1.6 Pax 6	9
1.7 Sox 2	9
1.8 Aquaporine	10
1.8.1 Die Molekulare Struktur von Aquaporinen	11
1.8.2 Aquaporin 4	12
1.9 Dopamin	13
1.10 6-Hydroxydopamin	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Materialien	16
2.1.1 Geräteliste	16
2.1.2 Chemikalienliste	17

2.1.3	Kits	19
2.1.4	Enzyme	19
2.1.5	Größen-Abmessungen.....	19
2.1.6	Media	19
2.1.7	Puffer und Lösungen.....	19
2.1.8	Mastermixe	23
2.1.9	Gele.....	24
2.1.10	Antikörper.....	25
2.1.11	Primer	27
2.1.12	Tiere.....	29
2.1.13	Software.....	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Zellkultur	30
2.2.1.1	Primäre Astrozytenzellkulturen	30
2.2.1.2	Coating.....	31
2.2.1.3	Medium-Wechsel.....	31
2.2.1.4	Splitten.....	31
2.2.1.5	Zellzählung	32
2.2.1.6	6-OHDA Stimulation	32
2.2.2	Immunocytochemie	33
2.2.3	RNA- Isolation	34
2.2.3.1	cDNA- Synthese	35
2.2.3.2	RT-PCR	35
2.2.4	Protein Extraktion und Membranpräparation.....	36

2.2.4.1	Proteinextraktion.....	37
2.2.4.2	Membranpräparation.....	37
2.2.4.3	Proteinbestimmung/BCA-Assay	38
2.2.4.4	SDS – Polyacrylgel Elektrophorese (SDS-Page).....	39
2.2.4.5	Semi-dry Blottransfer	39
2.2.4.6	Immunoblotting	39
3	Zielsetzung	41
4	Ergebnisse	42
4.1	6-OHDA beeinflusst die Zellzahl von Astrozyten in vitro	42
4.2	6-OHDA beeinflusst die Expression der Intermediärfilamente von Astrozyten in vitro	44
4.3	Die 24- stündige Behandlung mit 6-OHDA verändert die mRNA des Transkriptionsfaktors Sox 2 und der Intermediärfilamente GFAP und Nestin in Astrozyten in vitro	46
4.4	Proteinmengen-Bestimmung von AQP 4, GFAP und Nestin durch Westernblot	50
5	Diskussion	57
5.1	Das Kultursystem	57
5.2	Einfluss von 6-OHDA auf die Überlebensrate von Astrozyten in vitro	59
5.3	Effekte von 6-OHDA auf die Proliferationsrate von Astrozyten in vitro	62
5.4	Effekte von 6-OHDA auf die Expression der Intermediärfilamente GFAP, Nestin und Vimentin in vitro.....	64

5.5	Effekte von 6-OHDA auf die Expression des Transkriptionsfaktors Pax 6 in Astrozyten in vitro	68
5.6	Effekte von 6-OHDA auf die Expression des Transkriptionsfaktors Sox 2 in vitro.....	69
5.7	Effekte von 6-OHDA auf die Expression des Wasserkanals AQP 4 in vitro .	70
5.8	Ausblick	72
6	Zusammenfassung.....	74
7	Literaturverzeichnis.....	76
	Erklärung zum Eigenanteil	83
	Danksagung	84

Abkürzungen

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
Ala	Alanin (Aminosäure)
APS	Ammoniumpersulfat
Asn	Aspargin (Aminosäure)
AQP	Aquaporin (Wasserkanal)
BCA	Bicinchoninic acid (Bicinchoninic Säure)
Bp	Basenpaare
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Bovin Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CHIP	Channel forming integral protein (Kanalbildendes Protein)
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COOH	Carboxygruppe
Dapi	4', 6-Diamidino-2-phenylindole
Destill.	destilliert
d.h.	das heißt
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal Growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGTA	Ethylenglycol-bis (aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
FCS	fetal calf serum (fetales Rinderserum)
FGF	Fibroblast Growth Faktor (Fibroblasten Wachstumsfaktor)
FZ	Fungizone
g	Erdbeschleunigung
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GFAP	Glial fibrillary acidic protein (Saures Gliafaserprotein)
GSDB	goat serum dilution buffer (Ziegen- Serum Verdünnungspuffer)
H ₂ N	Aminogruppe
H ₂ O _{dest.}	Destilliertes Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
Iba-1	ionisiertes Calcium-bindendes Adapter Molekül 1
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumphosphat
L-Dopa	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
M	Molar
MAO B	Monoaminoxidase B
mAmpere	Milli-Ampere

MEM	minimal essential Medium
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
MM	Mastermix
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus (Mäuse Leukämie Virus)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minuten
MPTP	1- Methyl- 4- phenyl- 1, 2, 3, 6- tetrahydropyridin
mRNA	messenger RNA
mV	Millivolt
n	Stoffmenge
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumphosphat
Neurog 1 und 2	neurogenetische Differenzierungsfaktoren 1 und 2
nm	Nanometer
NSC	neural stem cells (neuronal Stammzellen)
OCT4	Oktamer bindender Transkriptionsfaktor 4
Olig2	Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor 2
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
pmol	Pikomol

PO	Polyornithin
P/S	Penicillin/Streptomycin
Pr.AK	Primär-Antikörper
Primer for.	Primer forward (vorwärts)
Primer rev.	Primer reverse (rückwärts)
Pro	Prolin
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s.	siehe
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Sek.	Sekunde
Sek.AK	Sekundär-Antikörper
SFM	serumfreies Medium
Sox	sex determining region Y-box 2 (Geschlechtsbestimmende Region Y Box 2)
Std.	Stunden
SVZ	subventrikuläre Zone
TEA	Tetra-Ethyl-Ammonium-Chlorid
TBS	Tris buffered saline (Tris gepufferte Salzlösung)
TEMED	Tetraethylmethyldiamin
Temp.	Temperatur

TNC	Tenascin-C
TGF α	Transforming growth factor alpha (transformierender Wachstumsfaktor alpha)
Tris	Hydroxymethyl-Aminomethan
u.a.	unter anderem
Vim.	Vimentin
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Astrozyten

Im späten 19. Jahrhundert identifizierten Neuroanatomen wie Virchow, Golgi und Cajal mittels zytochemischer Untersuchungen einen Zelltyp im ZNS, der durch eine charakteristische Sternform geprägt ist [Hewett 2009]. Dieser Zelltyp mit den langen radiär vom Zellkern ausspreizenden Fortsätzen ist nicht neuronaler Herkunft und wurde aufgrund seiner Morphologie mit dem Namen Astrozyt, dem griechischen Wort für „sternförmige Zelle“ bezeichnet [Trepel 2008].

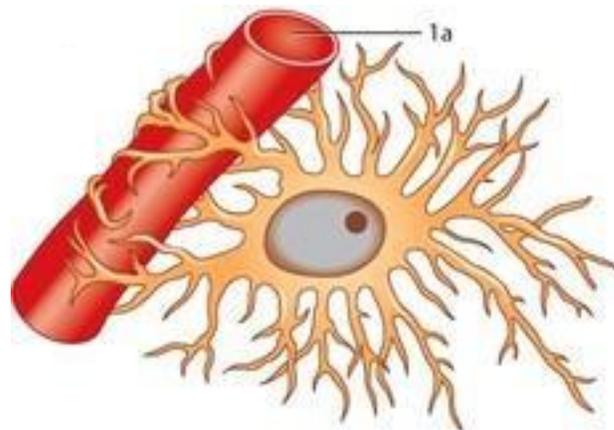


Abbildung 1: Protoplasmatischer Astrozyt umgreift mit seinen Fortsätzen eine mit 1a gekennzeichnete Hirnkapillare [Trepel 2008].

Anfänglich schrieb man den Astrozyten nur eine Art Platzhalter- Funktion zwischen den Neuronen zu und teilte sie in die Gruppe der Gliazellen ein. Der Begriff Glia entstammt dem Griechischen und bedeutet so viel wie Leim [Hewett 2009]. Zu der Gruppe der Gliazellen werden epitheliale Glia, Neuroglia und periphere Glia gezählt. Während zum epithelialen Typ ependymale Zellen und Zellen im Plexus choroideus gehören, zählen Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen zu den Neuroglia. Schwann- Zellen und Satellitenzellen hingegen gehören zu den peripheren Gliazellen. Virchow nahm da-

mals an, dass Astrozytenzellen, die zwischen dem neuronalen Hirngewebe vorliegen, die gleiche Funktion erfüllen, wie das Bindegewebe in anderen Organen [Magerkurth 2003]. Astrozyten werden in zwei Hauptformen unterteilt: Protoplasmatische Astrozyten sind durch reichlich granuliertes Zytoplasma und zahlreiche dicke Fortsätze charakterisiert, weshalb sie überwiegend in der grauen Substanz lokalisiert sind. Fibröse Astrozyten kommen hingegen in der weißen Substanz vor und besitzen lange, relativ dünne, unregelmäßig verzweigte Fortsätze, ihr Zytoplasma enthält fibrilläre Komponenten [Magerkurth 2003]. Bis heute ist die genaue Funktion der Astrozyten noch nicht vollständig erforscht. Jedoch weiß man, dass Astrozyten neben ihrer strukturegebenden Aufgabe auch eine organisatorische Funktion besitzen. Sie bilden ein Netzwerk, in dem Informationen generiert und weitergeleitet werden. Astrozyten können Neurotransmitter, wie das Glutamat, GABA oder Glycin während der synaptischen Signalübertragung ausschütten oder aufnehmen und zu einer Aktivierung der Neuronen führen [Trepel 2008]. Zudem besitzen Astrozyten die Fähigkeit mit Hilfe von Kalzium über sogenannte Kalziumwellen, d.h. vermehrter oder verminderter Freisetzung von Kalzium sowohl untereinander zu kommunizieren als auch die neuronale Transmission zu regulieren [Cornell-Bell et al. 1990]. Weiter können sie durch aktives Zurückziehen oder Vorschieben ihrer Fortsätze die Synapsenbildung zwischen Neuronen behindern oder unterstützen. Somit haben Astrozyten Einfluss auf die Signalvermittlung zwischen Neuronen und könnten auch dadurch Lernprozesse beeinflussen. Außerdem bilden Astrozyten funktionelle Kompartimente des Gehirns, regulieren den Elektrolyt- und Energiehaushalt, den pH-Spiegel und optimieren so die Umgebungsbedingungen für Neuronen. Zudem werden Abfall- und Nebenprodukte des Stoffwechsels von Neuronen eliminiert [Nedergaard et al. 2003]. Eine weitere wichtige Aufgabe der Astrozyten ist ihre Beteiligung an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke durch ihre perivaskulären Fortsätze. Außerdem sind sie an immunologischen Abwehrvorgängen im Gehirn und der Synthese von antioxidativen Substanzen zum Schutz des umliegenden Nervengewebes beteiligt [Trepel 2008]. Zuletzt wird ihnen auch noch ein modulierender Einfluss bei der Differenzierung von Neuronen aus embryonalen und adulten neuralen Stammzellen zugeschrieben [Trepel 2008]. Zusammenfassend stellen Astrozyten multifunktionelle Zellen dar, die Einfluss auf die neuronale

Transmission haben und durch deren Funktionen es den Neuronen ermöglicht wird, ihren spezialisierten Aufgaben der Informationsverarbeitung und – weitergabe nachzukommen [Nedergaard et al.2003].

1.1.1 Die Entwicklung von Astrozyten

In der Entwicklung des ZNS von Nagetieren folgt auf die Neurogenese (die Entwicklung von Neuronen) die Gliogenese (die Entwicklung von Gliazellen). Die Neurogenese dauert vom Embryonaltag E9-10 bis zum Embryonaltag E18 an, wohingegen die Gliogenese erst in der neonatalen Periode einsetzt [Miller und Gauthier 2007, Rowitch und Kriegstein 2010]. In der Entwicklung bilden sich radiale Gliazellen aus Neuroepithelialen Stammzellen. Radiale Gliazellen stellen Vorläuferzellen für Ependymale Zellen, Neurone, Astrozyten und sogenannte Intermediärzellen dar. Aus diesen Intermediärzellen können wiederum Neurone, Astrozyten oder Oligodendrozyten entstehen [Kriegstein und Alvarez-Buylla 2009]. Interessanterweise exprimieren diese radialen Gliazellen u.a. Nestin, Vimentin und GFAP. Insbesondere GFAP stellt einen wichtigen biochemischen Marker von reifen Astrozytenzellen dar [Malatesta et al. 2008]. Im adulten Säugerhirn gibt es in der subventrikulären Zone und im Gyrus dentatus des Hippocampus Stammzellnischen in denen Vorläuferzellen fortbestehen. Hier können zeitlebens neue Gliazellen und Neurone gebildet werden [Kriegstein und Alvarez-Buylla 2009]. Außerhalb dieser Zonen kommt es nur während der Embryonalentwicklung bzw. neonatalen Periode zur Bildung von Neuronen und Gliazellen. Sobald eine radiale Gliazelle – also eine Progenitorzelle- die Entwicklung zum Astrozyten begonnen hat, wandert sie zu ihrem Bestimmungsort und startet dort ihre endgültige Differenzierung [Rowitch und Kriegstein 2010].

1.2 Reaktive Astrogliose

Ein Trauma, Ischämie, Tumoren, Infektionen, Ödeme oder neurodegenerative Erkrankungen erzeugen im Gehirn eine reaktive Astrogliose. Ein Phänomen, was durch inter- und intrazelluläre Signalmoleküle gesteuert wird und aus fein aufeinander abgestimmten, reversiblen Veränderungen besteht [Anderson et al. 2013]. Bereits feinste Störeinflüsse führen zu einer Reaktivierung von Astrozyten, wobei das Ausmaß der Hirnschädigung auch die Intensität der reaktiven Astrogliose beeinflusst. Es kann somit zu einer fortschreitenden Zell-Hypertrophie der Astrozyten bis hin zu Proliferation mit Glia-Narbenbildung kommen. Im Falle einer Schädigung von Hirngewebe wandern Astrozyten zusammen mit anderen Zellen wie Mikroglia und NG2 Zellen in das geschädigte Gebiet und grenzen dieses vom umgebenden gesunden Hirngewebe ab. Diese Narbenbildung unterstützt somit die schnelle Heilung, aber kann auch die axonale Neubildung und dadurch die Neuroregeneration behindern [Sofroniew und Vinters 2010]. Zusätzlich kommt es bei der reaktiven Astrogliose zu einer Veränderung der Expressionsmuster von Intermediärfilamenten. Es kommt zu einer vermehrten Bildung von GFAP (saures Gliafaserprotein), Veränderung von Transkripten und der Zellfunktion [Anderson et al. 2013, Sofroniew und Vinters 2010]. Auch die Intermediärfilamente Nestin und Vimentin, welche normalerweise nur in unreifen Astrozyten gebildet werden, können in reaktiven Astrozyten gefunden werden. Die Veränderungen die während der reaktiven Astrogliose entstehen, haben das Potential die Aktivität der Astrozyten sowohl durch Erlangen als auch Verlust von Funktionen zu verändern, was sowohl nützlich als auch schädlich neuronale und nicht-neuronale Zellen beeinflussen kann [Sofroniew und Vinters 2010]. Untersuchungen von Sirko et al. zeigten, dass nach Stichverletzungen kortikale Astrozyten in vitro die Tendenz zur De-Differenzierung entwickeln. Dies ist hinweisend auf ein Stammzellpotential geprägt durch Multipotentialität und Selbsterneuerung der kortikalen de-differenzierten Astrozyten, eine Eigenschaft die sie als Helferzellen bei der Reparatur nach Hirnschädigungen in den Fokus treten ließ [Sirko et al. 2013]. Die reaktive Astrogliose unterstreicht somit die enorme Heterogenität der Astrozyten.

1.3 GFAP

Das saure Gliafaser-Protein GFAP wurde 1971 durch Eng und seine Mitarbeiter bei Studien an Patienten mit Multiple Sklerose entdeckt [Magerkurth 2003]. In weiteren Untersuchungen an reifem Hirngewebe von Säugetieren wurde eine GFAP-Immunoreaktivität hauptsächlich in Prozessen, an denen Astrozyten beteiligt waren enthüllt. Seitdem gilt das saure Gliafilament als ein wertvoller biochemischer Marker für die Identifikation von Astrozyten [Eng et al. 2000]. GFAP zählt zu den Klasse III Intermediärfilamenten und hat ein Molekulargewicht von 53kDa. Zur Klasse III der Intermediärfilamente werden auch Vimentin, Desmin, Peripherin und Syncoilin gezählt [Middeldrop und Hol 2011]. Diese Intermediärfilamente dienen den Zellen an ihren unterschiedlichen Bestimmungsorten der strukturellen Aufrechterhaltung. GFAP löst um den Zeitpunkt der Geburt von Wirbeltieren mehr und mehr das Intermediärfilament Vimentin in Astrozyten ab, mit welchem es sich häufig zusammen lagert [Sergent et al. 2006]. Nach weiteren Studien [Eng et al. 2000] wurde dem Intermediärfilament GFAP auch funktionelle Aufgaben zugeschrieben. Es ist am Vesikeltransport, der Proliferation im Zuge einer Astroglie zur Regeneration von Hirngewebe, der Beweglichkeit und Migrationsfähigkeit und zuletzt auch an der Neuron-Glia-Interaktion beteiligt. Insbesondere bei dem komplexen Vorgang der Astroglie kommt es zu einem Anstieg der Expression von GFAP. Somit wurde während der vergangenen Jahre immer mehr klar, dass GFAP neben seinen strukturellen Aufgaben, auch funktionell eine wichtige Rolle spielt. Die Expression von GFAP unterliegt stark äußeren Einflüssen, wie Schädigung des Gehirns oder Neurodegeneration. Aber auch physiologische Veränderungen, wie der Prozess des Alterns induziert einen Anstieg der Expressivität des sauren Gliafilaments [Middeldrop und Hol 2011]. Doch nicht nur in reifen Astrozyten stellt GFAP das am meisten exprimierte Intermediärfilament dar, auch in deren Entwicklung scheint GFAP eine entscheidende Komponente des Zytoskeletts zu spielen [Middeldrop und Hol 2011]. Interessanterweise exprimieren Zellen aus der subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels und der subgranulären Zone des Gyrus dentatus im Hippocampus GFAP und sowohl in vivo als auch in vitro Eigenschaften die Gliazellen zugeschrieben werden. Die subventrikuläre und die

subgranuläre Zone sind Hirnareale aus denen in adulten Wirbeltieren neue Neurone rekrutiert werden. Dort kommen sogenannten neuronalen Stamm-/Vorläuferzellen (NSC) vor, welche eine faszinierende Multipotenz zeigen und daher zum Fokus der Forschungen um die Vorgänge der normalen Hirnfunktion, aber auch insbesondere der Fähigkeit der Reparatur nach Schädigung, wurden. Die NSC exprimieren ähnlich wie reife Astrozyten GFAP. Somit kam die Frage auf, ob auch die GFAP-positiven Astrozyten aus der subventrikulären und der subgranulären Zone multipotente, neurogenetische Eigenschaften innehaben. Tatsächlich scheinen Astrozyten, welche in diesen zwei Hirnregionen vorkommen, den Prozess der Neurogenese zu stimulieren und ein neurogenes Potential inne zu haben. Wohingegen Astrozyten, die außerhalb dieser Zone im Gehirn vorkommen unter physiologischen Bedingungen diese Eigenschaft nicht besitzen [Zhu und Dah- lström 2007]. Zudem wurden unterschiedliche Astrozytentypen festgestellt, die wichtige Aufgaben in der Physiologie und Pathologie des Gehirns besitzen. Sie unterscheiden sich neben ihrem zeitlichen und räumlichen Auftreten, auch in der Expression unterschiedlicher Intermediärfilamente und hier insbesondere auch in der Ausbildung unterschiedlicher Isoformen ihres Hauptmarkers GFAP. Das saure Gliafilament existiert in acht Isoformvarianten die als GFAP alpha, beta, gamma, delta/epsilon, kappa, delta exon 6 und delta 164 bezeichnet werden. Während GFAP beta nur in Nagetieren vorkommt, sind alle anderen Isoformen von GFAP sowohl in Nagetieren, wie auch beim Menschen im ZNS nachgewiesen worden. GFAP alpha ist die am häufigsten vorkommende Isoform. Besondere Aufmerksamkeit wird allerdings dem GFAP delta zugestanden, seitdem bekannt wurde, dass dies die Isoform des GFAP ist, welches von neuronalen Stammzellen exprimiert wird, die in der subventrikulären bzw. subgranulären Zone der Gehirns vorkommen. Dies unterstreicht die Komplexität des Zytoskeletts von Astrozyten und lässt vermuten, dass es auch unter den Subtypen exakte Aufgabenfelder gibt [Middeldrop und Hol 2011].

1.4 Vimentin

Vimentin stellt ein Intermediärfilament der Klasse III dar. Zu dieser Klasse der Desmine, werden außerdem noch das GFAP, Peripherin und das Desmin selbst gezählt. Das Protein Vimentin hat ein Molekulargewicht von 57kDa und kommt v.a. in Gewebe mesenchymalen Ursprungs, wie dem Endothel vor

[<http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMIFilament.html>

Abfragedatum: 22.2.2014]. Vimentin zeigt in unterschiedlichen Zellen und auf unterschiedlichen Entwicklungsstufen ein variables Erscheinungsbild und zählt als Marker für Progenitorzellen. Frühere Studien von Vimentin-defizienten Mäusen schienen darauf hinzuweisen, dass der Mangel an Vimentin keine Auswirkungen auf den Phänotyp der Mäuse hat. Doch darauffolgende Studien zeigten, dass der Vimentin-Mangel verschiedenste Fehler induziert. Die Anlagerung von Zellen, deren Bewegungsfähigkeit, die Signalweitergabe, sowie die Gefäß- und Neuritaussprossung sind bei einem Vimentin-Mangel gestört. Durch posttranslationale Prozesse, wie die Phosphorylierung und die Arbeit intrazellulärer Proteasen wird die Expression von Vimentin in einem hoch komplexen Vorgang reguliert [Dave und Bayless 2014]. Doch noch bis heute sind viele Fragen zur Funktion des Proteins Vimentin ungeklärt.

1.5 Nestin

Nestin gehört zur Klasse VI der Intermediärfilamente, besteht aus über 1600 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 198 kDa. 1985 wurde Nestin als Antigen auf den Antikörper Rat- 401 gefunden und seine Gen- Sequenz fünf Jahre später charakterisiert. Die Exon- Intron Struktur des Nestin- Gens ist bei Ratten, Mäusen und Menschen identisch. Strukturell ähnelt Nestin den Proteinen anderer Intermediärfilamente, obgleich seine Morphologie sowohl funktions- als auch formbestimmend ist. Nestin kann aufgrund seiner Struktur alleine keine Intermediärfilamente formen und benötigt einen Partner zur Formierung eines Heterodimers oder - tetramers. Dieser Partner ist meist eines der Klasse III Filamente; Vimentin bzw. alpha- Internexin. Nestin dient als Zell-Struktur- Stabilisator und Koordinator von intrazellulären Bewegungen. Diese Fähigkei-

ten sind besonders bei der Zellteilung und –wanderung wichtig. Des Weiteren gilt es als Marker für neuronale Stammzellen: Nestin wurde während der Embryonalphase, in der neuronales Gewebe geformt wird, der sogenannten Ontogenese, detektiert und kann in neuronalen, wie auch glialen Zellen und deren gemeinsamen Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Transplantierte Stammzellen beginnen Nestin zu exprimieren. Außerdem zeigen Zellen von verschiedensten Tumoren (z.B. Astrozytome, Ependymome, Gliome, Neuroblastome etc.) des Gehirns Nestin und es wird diskutiert, dass diese Tumoren undifferenzierte Zellen ausbilden. Nestin wird in der intrauterinen Entwicklung von Mäusen ab Tag 7, in einigen proliferativen Geweben und in deren Embryonalphase an den oberen und unteren Enden des Neuralrohrs an Tag 10,5 ausgebildet. In adultem Gewebe tritt Nestin jedoch nur vermindert auf. Allerdings wurde es postnatal in den Stammzellnischen (subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels und Gyrus dentatus des Hippocampus) des adulten Säugetieres im Gehirn festgestellt. Neben seiner wichtigen Aufgabe als Marker für Progenitorzellen und unreife Zellen, spielt Nestin auch eine wichtige Rolle in der reaktiven Astroglie. Auf eine Hirnschädigung erfolgt ein Anstieg von Nestin-immunopositiven Zellen. Außerdem wird vermutet, dass totes Gewebe durch Nestinhaltige Zellen ersetzt wird. Insbesondere Astrozyten die immunozytochemisch positiv auf GFAP und Nestin reagierten, scheinen bei der Neuroprotektion, wobei es zu einer Art Narbenbildung um das Schädigungsgebiet durch Gliazellen kommt, beteiligt zu sein. Dabei gibt es auch eine Population an Nestin-positiven, GFAP-negativen Zellen, welche die Migration von Neuroblasten aus der subventrikulären Zone in die geschädigte Hirnregion unterstützt. Doch nicht nur in neuronalen Organen wird Nestin exprimiert, sondern auch in anderen Organen, wie der Retina, Haut, Muskel, Herzmuskel, Pankreas, Leber, Niere, Nebennieren, Zähnen und Hoden. Dies spricht dafür, dass Nestin ein pluripotentes Filament ist, welches nicht nur in neuronalen Zellen vorkommt und somit auch nicht nur als Marker für neuronale Stamm- und Vorläuferzellen interpretiert werden darf [Gilyarov 2006].

1.6 Pax 6

Pax 6 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in der Embryonalperiode und dort insbesondere in der Organogenese spielt. Er ist an der Regulation der Selbsterneuerung, der Resistenz von Zellen gegen Apoptose, an der Proliferation und Migration von Vorläuferzellen und deren Spezialisierung beteiligt. Pax 6 gehört zu einer Proteinfamilie, die aus neun unterschiedlichen Protein-Typen besteht, welche in vier Subgruppen unterteilt werden. Pax 6 wird zur Untergruppe IV gezählt und in Pankreas, Darm, Augen und im ZNS exprimiert [Lang et al. 2007]. In neuronalem Gewebe des Gehirns scheint Pax 6 überwiegend in proliferativen Zellen eine wichtige Rolle zu spielen, aber auch in der postnatalen und adulten Periode tritt Pax 6 auf. Dies betrifft v.a. Zellen aus den Stammzellnischen des adulten Säugetiergehirns (Gyrus dentatus des Hippocampus und subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels). Aber auch in nicht-proliferativen Zellen, welche mit Stammzellen Kontakt aufnehmen, wird Pax 6 exprimiert. Während der Differenzierung von Neuronen wird Pax 6 allerdings herabreguliert [Nacher et al. 2005]. Nacher et. al (2005) kamen nach ihren Studien zu der Auffassung, dass Pax 6 neben seiner Funktion als Kontrolleur der Zellproliferation und Festlegung des Bestimmungsortes der neuronalen Stammzellen auch eine ähnliche Funktion in den Stammzellnischen (Gyrus dentatus des Hippocampus und subventrikuläre Zone des lateralen Ventrikels) des adulten Säugergehirns innehaben.

1.7 Sox 2

Sox 2 ist ein Transkriptionsfaktor, der v.a. in sich selbst erneuernden Zellen und multipotenten Stammzellen des embryonalen Neuroepitheliums vorkommt [Komitova und Eriksson 2004]. Der Name Sox 2 entstand aus den Anfangsbuchstaben von „sex determining region Y (SRY) box 2“, ein geschlechtsbestimmender Abschnitt („sex determining“) auf dem Genom [Collignon et al. 1996]. Obwohl bisher nur sehr wenig über die Eigenschaften von Sox 2 bekannt ist, weiß man heute, dass er in sich teilenden Vorläuferzellen

der Stammzellnischen des adulten Säugergehirns (subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels und subgranuläre Zone des Gyrus dentatus im Hippocampus) exprimiert wird. Des Weiteren wurde Sox 2 auch in GFAP-immunopositiven Astrozyten gefunden [Komitova und Eriksson 2004]. Ein interessanter Aspekt, den ich weiter untersuchen wollte. Sox 2 sorgt für das Aufrechterhalten von Eigenschaften neuronaler Vorläuferzellen und verhindert die Differenzierung von neuronalen Zellen. Sox 2 wird außerdem als ein Marker für multipotente Progenitorzellen in neurogenetischem Gewebe exprimiert, aber im Zuge der Reifung dieser Zellen herabreguliert. Studien zeigten, dass Sox 2- positive Zellen, welche aus reifem Hirngewebe von Mäusen isoliert wurden, sich bei entsprechender Änderung der Kulturbedingungen in vitro sowohl zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrocyten differenzieren können. Neben den bereits erwähnten Stammzellnischen beherbergen auch Hirnregionen wie Kortex und Striatum Sox 2- positive Zellen. Diese Zellen scheinen, laut den Studien von Christina Ordonez und Mitarbeitern (2013) sich nicht zu teilen und zusätzlich GFAP zu exprimieren. Nach Experimenten an Primaten fand Ordonez heraus, dass die meisten Sox 2- positiven Zellen des Gehirns Astrozyten sind, denen sie eine Ähnlichkeit zu neuronalen Stammzellen zuschreibt. Astrozyten seien laut Ordonez ruhende Zellen, welche durch schädigende oder andere Reize aktiviert werden können. In reifen Hirngeweben liegen diese Stammzellen in verschiedensten Ruhestadien vor und erfüllen unterschiedlichste Aufgaben im Gewebehaushalt und in den Regenerationsvorgängen [Ordonez et al. 2013].

1.8 Aquaporine

Wasser stellt den Hauptbestandteil aller Gewebe und Zellen dar und macht etwa 67% des menschlichen Körpers aus. Die Plasmamembran, bestehend aus einer Lipid-Doppelschicht, ist für Wasser impermeabel. Schon in den 1920er Jahren haben Wissenschaftler herausgefunden, dass es trotzdem zu einer geringfügigen Diffusion von Wasser durch die Plasmamembran kommt. Weitere Studien ergaben später, dass es in bestimmten Geweben, wie den Nierentubuli, den sekretorischen Drüsen und den roten Blutzellen eine erhöhte Wasserpermeabilität gibt. Es musste somit einen Mechanismus geben, der zusätzlich zur natürlichen Diffusion in der Lage war, Wasser über die Plasmamembran

zu transportieren. Eine sich später als richtig erweisende Hypothese über die Existenz von Wasserkanälen in der Plasmamembran wurde daraufhin aufgestellt. Sowohl die Diffusion als auch der transmembranäre Transport von Wasser über Wasserkanäle existieren und unterscheiden sich dahingehend, dass Diffusion ein leistungsschwächerer Vorgang ist, der aber im Gegensatz zu den transmembranären Kanälen einen Wassertransport in beide Richtungen erlaubt. Aquaporine sind leistungsstarke transmembranäre Kanäle, welche eine hohe Selektivität für Wasser, abhängig vom osmotischen Gradienten aufweisen [Agre 2006]. Die frühen 1990er Jahre waren die Geburtsstunde der Aquaporine: Aquaporin 1, ursprünglich als CHIP (channel forming integral protein) bezeichnet, wurde hierbei als ein in roten Blutzellen vorkommender Wasserkanal als erstes von Peter Agre und Mitarbeitern Ende der 1980er Jahre identifiziert. Agre erhielt hierfür 2003 den Nobelpreis für Chemie. Im Laufe der Jahre wuchs die Gruppe der Wasserkanäle durch weitere Studien an und umschreibt nun eine Familie mit 12 unterschiedlichen Subtypen AQP 0 bis AQP 11. Der Wasserhaushalt, insbesondere im Gehirn spielt eine zentrale Rolle für die physiologischen Funktionen, aber auch bei pathologischen Vorgängen. Besonders das Gehirn, welches durch den knöchernen Schädel umgeben ist, und somit nur schlecht auf Volumenveränderungen reagieren kann, ist auf einen genau regulierten Wasserhaushalt angewiesen. Eine Hirnschwellung z.B. durch Ödeme kann fatale Folgen für das Hirngewebe haben. Wasserkanalproteine haben ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa, was aber stark vom Glykolisierungsgrad - abhängig vom jeweiligen Gewebe - variieren kann [Agre 2006].

1.8.1 Die Molekulare Struktur von Aquaporinen

Die molekulare Struktur von Aquaporinen besteht aus transmembranären alpha-Helices, welche die Plasmamembran durchdringen. Auf der zytoplasmatischen Seite zeigen Aquaporine eine Carboxy- und eine Aminogruppe. Zwei Schlaufen, bestehend aus Asn-Pro-Ala - drei Aminosäuren- formen die Wasserpore durch die Plasmamembran und bestimmen ihre Wasserselektivität. Das Aquaporinprotein stellt im vereinfachten Sinn eine Art Sanduhrform dar.

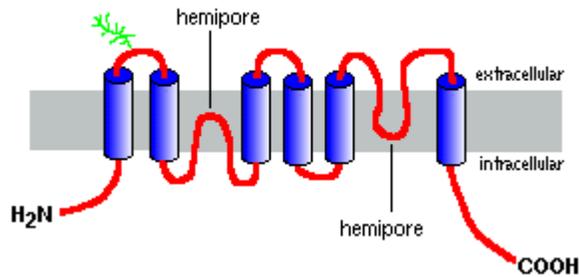


Abbildung 2: Schematisch dargestellte Struktur des Wasserkanals AQP 1 mit 6 transmembranären alpha- Helices und einer Carboxy- sowie Aminogruppe auf der intrazellulären Seite [http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/molecules/aqp1.gif 2014].

Es ist bekannt, dass die Wasserkanäle AQP 3 und AQP 7 neben Wasser auch für Glycerol und Harnstoff permeabel sind. Wohingegen AQP 0, AQP 1, AQP 2, AQP 4 und AQP 6 nur für Wasser durchlässig sind. Jüngst wurde außerdem gezeigt, dass AQP 6 sowohl für Wasser, als auch Anionen permeabel ist [Agre 2006].

1.8.2 Aquaporin 4

Neben AQP 4, welcher als erster Wasserkanal des Gehirns 1994 von Jung et al. beschrieben wurde, kommen auch noch die Subtypen AQP 1, AQP 3, AQP 5, AQP 8 und AQP 9 im Hirngewebe vor. AQP 4 kommt am häufigsten in Astrozyten des entwickelten Gehirns [Nielsen et al. 1997], aber auch in den Nieren, im Auge, im Darmgewebe, in der Lunge [Jung et al. 1994] und sogar im Skelettmuskel [Yang et al. 1996] vor. AQP 4 hat die schon beschriebene typische Struktur eines Wasserkanals und transportiert nur Wasser [Jung et al. 1994]. Im gesunden Gehirn spielt der Wasserkanal eine entscheidende Rolle in der Ausbildung und Absorption von Hirnödemen. Nach einer Schädigung des Hirngewebes kommt es im Zuge der reaktiven Astroglieose zu einer vermehrten Expression von AQP 4 an der Zellplasmamembran. Die Arbeitsgruppe um Papadopoulos (2008) fand in Studien *in vitro* heraus, dass sich beim Untergang von AQP 4 die Migrationsgeschwindigkeit von Astrozyten verlangsamt und es zu einer verspäteten Narbenbildung *in vivo* kommt. AQP 4- exprimierende Astrozyten zeigten im Vergleich zu nicht AQP 4- exprimierenden Astrozyten häufiger Vorstülpungen der Zellmembran am führenden Ende. Außerdem zeigte sich eine Polarisation von AQP 4 zu dem führenden Ende

der wandernden Zellen hin. Weitere Versuche bewiesen, dass ein Mangel an AQP 4 die Narbenbildung nach einem hirnschädigenden Ereignis verlangsamt. Nebenbei ist allerdings festzuhalten, dass das Vorhandensein von Aquaporin- Kanälen keine unabdingbare Voraussetzung in der Zellwanderung ist, da Studien über Mäuse ohne Aquaporine (AQP 1 und 4) zeigten, dass diese sich normal entwickeln [Papadopoulos et al. 2008].

1.9 Dopamin

Dopamin- im Volksmund auch als „Glückshormon“ bekanntes biogenes Amin aus der Gruppe der Katecholamine entsteht in dopaminergen Neuronen. Diese bilden das dopaminerge System was im Mittelhirn, Zwischenhirn und Endhirn lokalisiert ist. Der Neurotransmitter Dopamin wirkt über fünf verschiedene Rezeptoren, welche in 2 Gruppen (D 1 und D 2) eingeteilt werden. Zur D 1-Familie werden die erregenden Rezeptoren D 1 und D 5 gezählt, wohingegen hemmende Rezeptoren zur D 2-Familie gehören und als D 2, D 3 und D 4 bezeichnet werden. Dopamin wird neuronal von MAO-B (Monoaminoxidase B) und extraneuronal durch COMT (Catechol-O-Methyltransferase) inaktiviert. Dopamin hat als Botenstoff sowohl im ZNS als auch im peripheren Nervensystem eine zentrale Rolle: Bei dem Empfinden von Lust und Freude wird vermehrt Dopamin im mesolimbischen System des Gehirns ausgeschüttet. Auch Stoffe mit einer hohen Abhängigkeits- Potenz, wie Nikotin, Ethanol und Morphin führen in limbischen Innervationsgebieten zu einer vermehrten Freisetzung von Dopamin. Eine pathologische Erhöhung des Dopaminspiegels führt zu gehobener Stimmung, kann allerdings auch bei übermäßig hohen Spiegeln bis hin zu überaktivem Fehlverhalten und Zwangshandlungen führen [Zeiss 2005]. So können Funktionsstörungen des dopaminergen Systems zu schwerwiegenden Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Chorea Huntington aber auch psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie, Aufmerksamkeitsdefizit, manischer Depression, Hyperaktivitätssyndrom und Abhängigkeits-Syndromen führen. Im nigrostriatalen System spielt der Botenstoff eine wichtige Rolle in der Generierung willkürlicher Bewegungen. Eine Störung im Dopamin- Stoffwechsel ist somit in der Regel auch mit einem gestörten Bewegungsbild vergesellschaftet [Rassow et al. 2012]. Im ZNS kontrolliert Dopamin die Funktion der Basalkerne und deren Projektionsbahnen. Veränderungen im motorischen System der Basalganglien können u.a. die

schon zuvor genannte Erkrankung des Morbus Parkinson generieren. Klassische Symptome des Morbus Parkinson sind Hypo- bis hin zu Akinesie, Ruhetremor und ein erhöhter auch als Rigor bezeichneter Muskeltonus. Die Therapie bei dieser Erkrankung ist durch eine Zufuhr des durch pathologische Degeneration wegfallenden Dopamins gekennzeichnet. Zur Überwindung der Blut- Hirn- Schranke muss allerdings darauf geachtet werden, dass die Vorstufe des Dopamins – L-Dopa - verabreicht wird, was dann vom Körper selbst an entsprechender Ort und Stelle nach Umwandlung zu Dopamin genutzt werden kann und die Symptomatik reduziert. Neben seiner Funktion im ZNS hat Dopamin auch im peripheren Nervensystem als Botenstoff eine wichtige Rolle und wird vorwiegend im Nebennierenmark als Substrat in der Synthese von Noradrenalin und Adrenalin - Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems - genutzt [Aumüller et al. 2007].

1.10 6-Hydroxydopamin

6-Hydroxydopamin stellt ein catecholaminerges Neurotoxin dar. Studien haben gezeigt, dass es auch endogen im Körper von an Morbus Parkinson erkrankten Patienten gebildet wird [Glinka et al. 1997]. 6-OHDA stellt ein strukturelles Analogon des natürlichen Transmitters Dopamin dar, besitzt aber eine zusätzliche Hydroxy- Gruppe an seinem Benzolring an Position 6. Nachdem es erstmals von Porter et al. als biologisches Toxin, welches die noradrenergen Nervenfasern am Herzen zerstört identifiziert wurde, wird 6-OHDA heute als das meist verwendete Neurotoxin in Studien verwendet. Seine schädigende Wirkung fokussiert sich v.a. auf das catecholaminerge System, was darin begründet ist, dass 6-OHDA bevorzugt von dopaminergen und noradrenalinergen Transportermolekülen aufgenommen wird. 6-OHDA sammelt sich im Zytosol der Neuronen an und induziert den Zelltod. Die toxische Wirkung von 6-OHDA wird durch Auslösen von oxidativem Stress entfaltet: 6-OHDA hemmt die Atmungskette, hier die Komplexe I und IV und führt zur Bildung freier Radikale. Sowohl die Hemmung der Atmungskette als auch die Bildung freier Radikale führen zu Degeneration von Neuronen. 6-OHDA ist nicht nur ein Gift der Atmungskette sondern agiert auch als Mutagen und Clastrogen. Bei in vivo Studien fand man heraus, dass synthetisch hergestelltes 6-OHDA die Blut-Hirn- Schranke nicht passieren kann, weshalb 6-OHDA direkt in das Hirngewebe inji-

ziert werden muss. Der Schweregrad der 6-OHDA induzierten Schädigung hängt von der injizierten Menge, der Hirnregion und von der Art des Versuchstieres ab. Bei Ratten, Mäusen, Katzen und Primaten stellt 6-OHDA ein sehr potentes Neurotoxin dar. Zusammenfassend scheint 6-OHDA nicht die kompletten klinischen Erscheinungen der Parkinson Krankheit auszulösen. Es führt zu einem selektiven Untergang der dopaminergen Neurone und zu einem Erhalt der nicht dopaminergen (somit noradrenergen) Neurone. Sofern die Aufnahme in noradrenerge Neurone gehemmt wird hat 6-OHDA keine Effekte in außerhalb der Substantia nigra gelegen Hirnregionen, welche auch am Pathomechanismus der Parkinson Erkrankung beteiligt sind. Dies sind z.B.: der Locus coeruleus, der untere Hirnstamm und die vorderen Strukturen des Riechhirns. Das durch 6-OHDA induzierte Parkinson Modell führt nur zu einem akuten Effekt auf das Hirngewebe, was sich essentiell von dem langsam fortschreitenden Prozess der Degeneration in der Pathologie der Erkrankung beim Menschen unterscheidet. Nichts desto trotz können Studien nach diesem Modell wichtige Erkenntnisse in der Erforschung von Therapiestrategien bei Morbus Parkinson erbringen [Schober 2004].

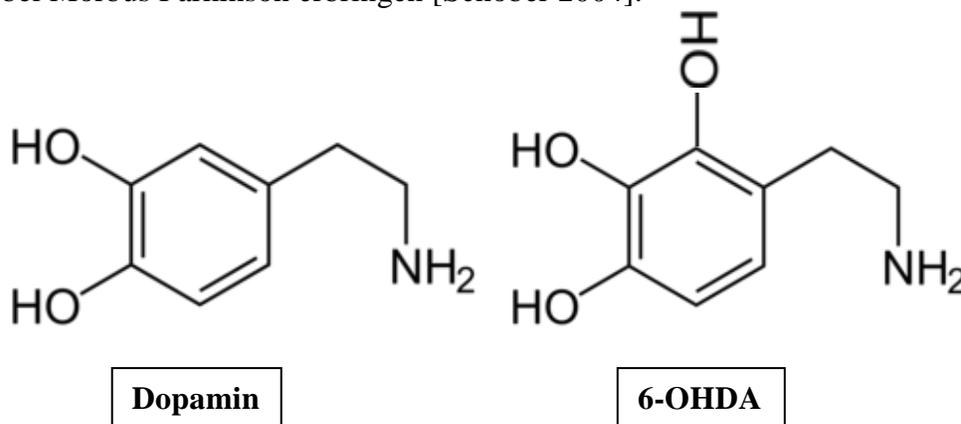


Abbildung 3: Molekulare Struktur des Transmitters Dopamin (links) und des Neurotoxins 6-OHDA (rechts)

[http://annaschimkat.de/files/gimngs/35_2000px-dopamin-dopamine-web.jpg 2014].

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräteliste

24-Loch Kulturschalen 1,9 cm ²	Corning
Brutschrank	Heraeus
Deckgläser, 24x 32 mm	R.Langenbrinck
Gelscanner	Epson
Hyperfilm ECL	Amersham
Kulturschalen 94x 16 mm, 58 cm ²	Greiner Bio-One
Neubauer Zellzählkammer	Bioanalytic GmbH
Objektträger, 76x 25 mm	R.Langenbrinck
Schüttler Vibrax VXR	IKA
Semidry Blot Kammer	Biorad
Spektrometer, Gene Quant 1300	GE Healthcare
Thermalcycler Typ DNA 480	Perkin Elmer
Thermal Cyclers, My Cycler™	Biorad
Thermomixer, 5436	Eppendorf
Ultraschallbad Transsonic 460/ H	Elma
Ultrazentrifuge, Optima™	Beckman
Zeiss Imager.M2 Apoptome	Zeiss
Zell-Filtersieb 70 µm, Nylon	BD Falcon
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf

2.1.2 Chemikalienliste

Die meisten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Buchs Schweiz) erworben, die unten aufgelisteten Substanzen wurden von anderen Vertrieben bezogen.

5x RT-PCR Reaktions Puffer	Promega
6x Orange Ladungs-Farbstoff	Fermentas
6x DNA Ladungs-Farbstoff	Fermentas
10x Coral Ladungs- PCR Puffer	Quiagen
10x Hexanukleotid Mix	Roche
10x Taq Reaktions Puffer	Invitrogen
Acrylamid 40%	Serva
Agarose	Lonza
Ampuwa	Fresenius Kabi
BSA	Roth
Chloroform	Merck
Chloralhydrat	Merck
dNTPs	Amersham
EDTA	Serva
EGTA	Serva
Entwickler	Agfa
Essigsäure	Merck
Ethanol (70%)	AppliChem
FCS	Biochrom AG
Fixierer	Agfa
FluorSave™ Reagenz	Calbiochem
FZ	Gibco
GelGreen	Biotium
Glycerol	Serva
Glycin	Roth
HCl	Merck

Isopropanol	AppliChem
KCl	AppliChem, Merck
KH_2PO_4	Fluka, Merck
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
HEPES	Serva
Methanol	VWR
MgCl_2	Invitrogen
NaCl	AppliChem, Merck
NaCl liquid (0,9%)	Fresenius Kabi
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Merck
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
Na_2HPO_4	AppliChem, Merck
NH_4Cl	Dako
Normal goat Serum(Ziegenserum)	Dako
PBS	Biochrom
Pefabloc SC-Protease Inhibitor	Roth
PFA	Merck
P/S	Gibco
RNAse Exitus-Plus™	AppliChem
RNAse freies Wasser (DEPC-behandelt)	Roth
Schweineserum	PAA
SFM	Biochrom
Sucrose	AppliChem
SDS	AppliChem
TEA	Fluka
Tris	Roth
Harnstoff	Merck
Ziegenserum	Gibco

2.1.3 Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce
ECL™ Western Blotting Detektions-Reagenz	Amersham
Peq GOLD reine RNA	Peqlab

2.1.4 Enzyme

M-MLV reverse Transkriptase	Promega
Taq DNA Polymerase	Invitrogen
Trypsin	Gibco

2.1.5 Größen-Abmessungen

Mass Ruler™ Low Range DNA Ladder	Fermentas
O`Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas

2.1.6 Media

DMEM	Gibco
MEM Earle (1x) mod.	Biochrom AG

2.1.7 Puffer und Lösungen

Tab.1 eingesetzte Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Bestandteile
Ammoniumpersulfat 10%	H ₂ O _{dest.} , 10% APS
Antikörperverdünnungs-Lösung	PBS, 5% Ziegenserum, 0,5% Triton X-100
1x Blotpuffer (für Wet blot / Tank)	20% Methanol, 25 mM Tris, 192 mM Glycin

Chloralhydrat-Lösung	NaCl liquid 0,9%, 9,5 µM Chloralhydrat
Coomassiefärbelösung	0,2% Serva Blue R (2501 g), 50% Methanol (250 ml), 10% Essigsäure (50 ml), mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen
Coomassie-Entfärbelösung	25% Methanol (250 ml), 10% Essigsäure (100 ml), mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen
Dapi-Lösung	1:1000 Dapi-Stock-lösung auf PBS
DMEM 20% FCS	DMEM, 20% FCS, 5 µl P/S, 1 µl/ml FZ
Gewebe-Homogenisierungspuffer pH= 7,0	H ₂ O _{dest.} , 7,5 mM Natrium Phosphat, 0,25 M Sucrose, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 µl Pefabloc in 5 ml
GSDB-Puffer	PBS, 16% Ziegen-Serum, 0,3% Triton-X/ Rinder-Serum, 0,3 M NaCl
Homogenisierungspuffer (Proteinextraktion) pH 6,8	62,5 mM Tris HCl, 2% SDS, 10% Sucrose
10x Laufpuffer/Elektrodenpuffer pH 8,3	50 mM NH ₄ Cl, 10 ml PBS, 0,25 M Tris, 0,192 M Glycin, 1% SDS, pH 8,3 mit Tris oder Glycin eingestellt
1x Laufpuffer/ Elektrodenpuffer	100 ml 10x Laufpuffer + 900 ml destilliertes Wasser

MEM 10% FCS/ 20% FCS	MEM Earle (1x) mod., 10% / 20% FCS, 5 $\mu\text{l/ml}$ P/S, 1 $\mu\text{l/ml}$ FZ
6-OHDA Lösung	Ampuwa, 0,1% Ascorbinsäure, 105 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ 6-OHDA Hydrochlorid
PBS, 10 mM, pH 7,4	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, 0,12 M NaCl, 20 mM Na_2HPO_4 , 3 mM KH_2PO_4 , 3 mM KH_2PO_4
5x PBS/EDTA pH 7,4	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, 13,5 mM KCl, 7,5 mM KH_2PO_4 , 0,7 M NaCl, 21 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2,7 mM EDTA
PBS-Tween, pH 7,4	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, 81 mM Na_2HPO_4 , 19 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,1 M NaCl, 0,1% Tween 20
PFA 4% pH 7,4	PBS, 4% PFA auf 60°C erhitzen
Präparationspuffer pH 7,4	NaCl liquid (0,9%), 4 mM KCl, 10 mM HEPES, 12,5 mM Glukose, 0,1% BSA
Präinkubationspuffer	PBS, 5% Ziegenserum, 0,5% Triton X-100, 1% BSA
4x Probenpuffer	125 mM Tris pH 6,8, 10% 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 4,6% SDS
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 1 M Stock (25 ml) (pH 6,8), 0,4% SDS (4 ml)entspricht dann 10% SDS, mit destilliertem Wasser auf 50 ml auffüllen

SDS 10% pH 7,2	H ₂ O _{dest.} , 10% SDS
Solubilisierungspuffer pH 8,0	H ₂ O _{dest.} , 5% SDS, 20 mM Trizma Base, 5 mM EDTA, 10 µl Pefabloc in 5 ml
Sorbo Probenpuffer	1% SDS, 10 mM Natriumphosphat (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA+ Proteaseinhibitoren (aus Publikation Sørbø et al. 2007)
Standardlösung für Proteinmengenbestimmung (aus BCA-Assay Kit 2 µg/µl) Proteinmenge in 50 µg:	BSA-Stocklösung (2 µg/µl, aus BCA-Assay Kit); Puffer (4x Proben-Puffer bzw. Solubilisierungspuffer)
1 µg	10 µl 990 µl
2,5 µg	25 µl 975 µl
5 µg	50 µl 950 µl
10 µg	100 µl 900 µl
20 µg	200 µl 800 µl
Stock von 4x Sammelgelpuffer	1 M Tris (pH 6,8, 121,14 g/mol) mit H ₂ O bidest auf 100 ml auffüllen
TAE-Puffer pH 8,5	H ₂ O _{dest.} , 0,4 M Trizma-Base, 0,2 M Essigsäure, 2% 0,5 M EDTA
1x TBS +2% Schweineserum	1x TBS+ 2% Schweineserum
4xTrenngelpuffer pH 8,8	3 M Tris-HCl, 0,4% SDS, H ₂ O _{dest.}

Tris-HCl, 1,5 M, pH 8,8	H ₂ O _{dest.} , 1,5 M Trizma Base
Tris 0,5M, pH 6,8	H ₂ O _{dest.} , 0,5 M Trizma Base
Triton X-100/ Rinder Serum Albumin	PBS, 3% Triton X-100, 0,1% Rinder Serum Albumin
0,1% Trypsin-Lösung	PBS/EDTA, 0,1% Trypsin
Waschpuffer für Membranen 10x TBS	500 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1:10 verdünnen, 0,1% TWEEN

2.1.8 Mastermixe

Tab.2 eingesetzte Mastermixe

Mastermix für cDNA Synthese	H ₂ O RNase-frei 2,5 µl, RT-PCR 5x Puffer 5 µl, dNTPs (10 pmol/µl) 1 µl, Hexanukleotide (10 pmole/µl) 1,5 µl, M- MLV reverse Transkriptase 1 µl
Mastermix für RT-PCR	H ₂ O RNase-frei 17,6 µl, 10x Coral Load PCR- Puffer 2,5 µl, MgCl ₂ (50 mM) 0,75 µl, dNTP (10 pmole/µl) 0,5 µl, Primer for. (10 pmole/µl) 0,5 µl, Primer rev. (10 pmole/µl) 0,5 µl, Taq Polymerase 0,15 µl

2.1.9 Gele

Tab.3 verwendete SDS-Page (Laemmli) Gele

Bestandteile	12% Trenngel	10% Trenngel	6% Sammelgel
Harnstoff	4,8 g	/	2,4 g
Acrylamid 40% (37,5:1)	6 ml	5 ml	1200 µl
4x Trenngelpuffer pH 8,8	5 ml	5 ml	/
4x Sammelgelpuffer pH 6,8	/	/	2 ml
Destilliertes H ₂ O	4,2 ml	10 ml	2,4 ml
Gesamtvolumen	20 ml	20 ml	8 ml
TEMED	30 µl	30 µl	12 µl
APS	80 µl	80 µl	40 µl

Tab.4 verwendete Agarose Gele

Bestandteile	Kleines Gel	Mittleres Gel	Großes Gel
Tea Puffer 1x	100 ml	200 ml	300 ml
Agarose	1,5 g	3 g	4,5 g

Gel Green	8 µl	16 µl	24 µl
-----------	------	-------	-------

2.1.10 Antikörper

Die Antikörper wurden an Kontrollgeweben bzgl. ihrer Spezifität und zu verwendenden Verdünnung getestet. Um unspezifische Färbungen der Sekundär-Antikörper ausschließen zu können, wurden Kontrollen nur mit Sekundär- Antikörpern durchgeführt.

Tab. 5 Für Immunzytochemie verwendete Primär- Antikörper

Primär- AK.	Spender		Verdünnung	Firma
Anti- GFAP	Maus	monoklonal	1:400	Millipore MAB 353
Anti- GFAP	Kaninchen	polyklonal	1:400	Dako Z0334
Anti- Nestin	Maus	monoklonal	1:100	Millipore MAB360
Anti- Vimentin	Maus	monoklonal	1:100	SantaCruz Vim.(V9)sc- 6260
Anti- Vimentin	Maus	monoklonal	1:400	Sigma
Anti- Iba 1a	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Wako

Anti- NG2	Kaninchen	polyklonal	1:500	Millipore AB5320
Anti- Map- 2	Maus	monoklonal	1:500	Sigma M4403

Tab.6 Für Immunzytochemie verwendete Sekundär- Antikörper

Sekundär- AK.	Spender		Verdünnung	Firma
Anti- Kaninchen Alexa 546nm (rot)	Ziege	polyklonal	1:1000	Molecular Probes
Anti- Maus Alexa 488nm (grün)	Ziege	polyklonal	1:1000	Molecular Probes

Tab. 7 Für Westernblot verwendete Primär- Antikörper

Primär- Ak.	Spender		Verdünnung	Firma
Anti- GFAP	Kaninchen	Polyklonal	1:400	Dako
Anti- GFAP	Maus	Monoklonal	1:1000	Chemicon/Millipore
Anti- Nestin	Maus	Monoklonal	1:100	Chemicon/Millipore
Anti- AQP4all	Ziege	Polyklonal	1:200	Santa Cruz

Anti- β - Aktin	Maus	Monoklonal	1:4000	Sigma
-----------------------	------	------------	--------	-------

Tab. 8 Für Westernblot verwendete Sekundär- Antikörper

Sekundär- AK.	Spender		Verdünnung	Firma
Anti- Maus igG HRP gelabelt ECL	Schaf	Polyklonal	1:4000	Amersham/G E Healthcare
Anti- Kaninchen HRP gelabelt	Esel	Polyklonal	1:4000	Amersham/G E Healthcare
Anti- Ziege HRP gelabelt	Esel	Polyklonal	1:4000	Amersham/G E Healthcare

2.1.11 Primer

Primer wurden von Biomers (Deutschland) erworben. Alle Primer sind in 5' -> 3' Sequenz dargestellt. Die Oligonukleotide dienen der Untersuchung von Genen in der Maus.

Tab. 9 In RT- PCR verwendete Primer

Primer	Sequenz (5`-3`)		Annealing Temp. [°C]	PCR Zyklen	Produkt [bp]
GFAP	For.	CACCAACGAGTCCCTAGAGC	60	32	234
	Rev.	ATGGTGATGCGGTTTCTTC			
Nestin	For.	CCAGAGCTGGACTGGAACTC	58	26	161
	Rev.	ACCTGCCTCTTTTGGTTCCT			
Vim.	For.	ATGCTTCTCTGGCACGTCTT	60	26	335
	Rev.	CACCTGTCTCCGTAATTCGT			
HPRT	For.	GCTGGTGAAAAGGACCTCT	60	28	249
	Rev.	GCAGGTGTTCTAGTCCTGTG			
Sox2	For.	CCGCATGTACAACATGATGG	56	32	375
	Rev.	CTTCTTCATGAGCGTCTTGG			
Pax6	For.	AACAACCTGCCTATGCAACC	55	32	206

	Rev.	ACTTGGACGGGAACTGACAC			
AQP4 all	For.	TGGTGGCTTTCAAAGGAGTC TGG	60	34	207
	Rev.	CTGATGTGGCCAAAGCACTG CAC			

2.1.12 Tiere

Trächtige Balb/C Mäuse wurden von Harlan-Winkelmann GmbH (Deutschland) bestellt und im hauseigenen Tierstall untergebracht. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen (bei 20-22 °C und 50-60% Luftfeuchtigkeit) bei standardisiertem Tag-Nacht Rhythmus gehalten. Dabei wurden die Mäuse in Käfigen der vorgeschriebenen Größe, welche mit Sägemehl ausgestreut waren und standardisiertes Nager- Futter, sowie Wasser ad libitum vorhanden hatten untergebracht. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den allgemeinen europäischen Richtlinien bezüglich der Haltung und Verwendung von Tieren für experimentelle Zwecke, bewilligt vom Regierungspräsidium Tübingen durchgeführt. Es wurde dafür gesorgt, dass Schmerz und andere Unannehmlichkeiten für die Tiere so gering wie möglich gehalten wurden.

2.1.13 Software

Folgende Programme wurden zur Datenverarbeitung, Bildverarbeitung, Datenanalyse und statistischer Analyse verwendet: Adobe Photoshop CS3, Microsoft Excel 2010, Microsoft Office 2010, Image J, Sigma Stat., Zeiss AxioVision Rel. 4.8.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Primäre Astrozytenzellkulturen

Trächtige Balb/ C Mäuse wurden von Harlan-Winkelmann GmbH (Deutschland) bestellt und im hauseigenen Tierstall untergebracht. Zur Gewinnung primärer Astrozytenkulturen aus striatalem und kortikalem Gewebe neugeborener Mäuse wurden die Jungtiere am Tag der Geburt (postnatal P 0) oder am Tag nach der Geburt (postnatal P 1) dekapitiert, das Gehirn entnommen und sofort in eiskalten Präparationspuffer überführt. Nach sorgfältiger Entfernung der Meningen (auf Eis) wurden Striatum und Kortex exzidiert und die Gewebestückchen in Präparationspuffer gesammelt. Die Muttertiere wurden nach der Geburt der Jungtiere entweder in die hauseigene Zucht aufgenommen oder durch intraperitoneale Applikation von einer Überdosis an Chloralhydratlösung euthanasiert. Nach Atemstillstand und festgestellter Areflexie wurde der Thorax und das Herz eröffnet, um den Tod sicherzustellen. Für die striatalen und kortikalen Astrozytenzellkulturen wurden Striatum und Kortex präpariert, wobei immer mindestens von 5 Jungtieren Gewebe für eine Aufarbeitung genommen wurde. Mit einer Pipette wurden die Gehirnstückchen aus dem Präparationspuffer aufgesaugt und in einer 0,1%- Trypsinlösung 15 Minuten bei Raumtemperatur enzymatisch dissoziiert. Der enzymatische Verdau wurde durch eine äquivalente Menge an vorgewärmtem serumhaltigem Medium (MEM, 20% FCS) gestoppt. Anschließend wurde das Gewebe mit einer 5- und 10 ml Plastikpipette mechanisch zerkleinert und die so entstandene Zellsuspension über einen Nylon- Filter in ein Zentrifugen-Röhrchen gefiltert. Die Proben wurden zentrifugiert (1691 g, 4 Minuten, RT) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Medium (MEM+ 20% FCS) resuspendiert und die Zellsuspension dann in 10 ml vorgewärmtes Medium (MEM, 20%FCS) überführt, in PO- beschichtete Petri-Schalen (Durchmesser 10 cm) ausplattiert und im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5% CO₂).

2.2.1.2 Coating

Die Petri-Schalen wurden vor Gebrauch mit 0,1 mg/ml Poly-DL-Ornithin in Wasser beschichtet. Dazu wurden die Schalen bodenbedeckend mit Poly- DL- Ornithin in Wasser gefüllt. Nach einer 60- minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgenommen und die Petrischalen zweimal mit pyrogenfreiem und keimfreiem Wasser bidest (Ampuwa) gewaschen und unter der Sterilbank luftgetrocknet.

2.2.1.3 Medium-Wechsel

Während der Proliferationsphase der Zellen wurde bis zum Erreichen der Konfluenz das Medium täglich gewechselt. Dazu wurde zunächst das alte Medium entfernt, die Schale mit PBS/EDTA 1x gespült und dann 10 ml vorgewärmtes neues Medium (DMEM+ 20% FCS) hinzugefügt.

2.2.1.4 Splitten

Nachdem die Astrozyten nach einer Proliferationszeit von 8 Tagen konfluent waren, wurden die Kulturen im Verhältnis 1:4 in mit Polyornithin beschichteten Petri- Schalen (Durchmesser 10 cm) gesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS/EDTA 1x gespült und die Schale kräftig hin und her geschwenkt, um dadurch nicht adhäsive Zellen, wie abgestorbene Zellen, Mikroglia und Neuronen zu entfernen. Anschließend wurde vom Rand 0,1%- Trypsinlösung hinzugegeben und die Zellen mit einer Pipette abgespült. Trypsin löst den Zellrasen von der Schale, wobei das Abspülen mechanisch diesen Vorgang unterstützt. Die somit losgelösten Zellen wurden nach Inkubation der Trypsinlösung über 10 Minuten mit der Pipette gesammelt und in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml vorgewärmtem Medium (MEM+ 10%FCS) überführt. Dieses wurde anschließend zentrifugiert (4 Min., RT, 1691 g), der Überstand abgeschüttet und das Pellet in 1 ml Medium (MEM, 20%FCS) gelöst. 250 µl der Zellsuspension wurde dann in eine mit Polyornithin beschichtete Petri-Schale (Durchmesser 10 cm) überführt. Die Petri-Schalen enthielten bereits 10 ml vorgewärmtes Medium (MEM, 10%FCS). Nach erneutem Erreichen der Konfluenz

wurden die Zellen beim zweiten Splitten in das Experiment aufgenommen. Es wurden 50 000 Zellen/Well in mit Polyornithin gecoatete 24- Well Platten mit und ohne Glasplättchen ausplattiert.

2.2.1.5 Zellzählung

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Dafür wurde das Zell-Pellet nach dem 2. Splitten in 4 ml SFM resuspendiert. Aus diesem Gemisch wurden 20 μ l in 160 μ l Medium überführt und mit 20 μ l Trypanblau vermischt. Zur Bestimmung der Zellanzahl wurde nach gutem Mischen aus der so entstandenen Trypan- Zelllösung mit der Pipettenspitze die Zellsuspension in die Neubauerkammer aufgetragen, es wurden in allen 4 Quadranten der Zählkammer gezählt und die durchschnittliche Anzahl ermittelt. Die Anzahl der Zellen/ml ergibt sich aus folgender Rechnung:

Zellzahl = Mittelwert aus den gezählten Zellen aller vier Quadranten

10 000 = Kammerfaktor

10 = Verdünnungsfaktor

Zellzahl x 10 000 x 10 = Anzahl der Zellen/ml

2.2.1.6 6-OHDA Stimulation

Es wurden 50 000 Zellen/Well auf mit Polyornithin (0,1 mg/ml) beschichtete Glasplättchen in 24- Well Platten ausplattiert und mit verschiedenen Konzentrationen an 6-OHDA für 12 und 24 Stunden behandelt.

Die Konzentrationen von 6-OHDA wurden wie folgt berechnet:

Nach dem allgemein gültigen Gesetz ist das Produkt aus Konzentration und Volumen die Stoffmenge n. Die Konzentration der Stocklösung von 6-OHDA ist bekannt und das benötigte Volumen an SFM, welches wir hinzugeben müssen, soll ermittelt werden, um eine Verdünnung der Stocklösung zu erhalten, welche die gewünschte 6-OHDA Konzentration enthält. Das Volumen pro Well betrug 500 μ l, welches aus 400 μ l Zelllösung und 100 μ l 6-OHDA-Lösung mit unterschiedlichen Konzentrationen an 6-OHDA bestand.

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

V_1 = gesuchtes Volumen an SFM was zur Stocklösung hinzugegeben werden muss, um gewünschte Verdünnung zu erhalten

$$\rightarrow V_1 = X$$

C_1 = Konzentration der 6-OHDA Stocklösung = 10 000 μM

C_2 = gewünschte Konzentration der 6-OHDA-Lösung

V_2 = gewünschtes Gesamtvolumen (400 μl)

$$V_{\text{SFM}} = V_{\text{komplett}} - V_{6\text{-OHDA}}$$

Bsp.: Für 30 μM 6-OHDA gilt:

$$X * 10\,000\ \mu\text{M} = 30\ \mu\text{M} * 0,4\ \text{ml}$$

Somit werden 1,2 μl Stocklösung zu 398,8 μl SFM gegeben um ein Lösung zu erhalten, die 30 μM 6-OHDA enthält, bei einem Endvolumen von 400 μl pro Well. In jedes Kontroll- Well wurde anstatt 100 μl 6OHDA-Lösung 100 μl SFM pipettiert. Die Inkubationszeiten mit 6-OHDA wurden auf 12- und 24 Std. festgelegt. Die in der Zelldichte 50 000 Zellen ausplattierten striatalen und kortikalen Zellen wurden nach 12- bzw. 24 Std. fixiert und fotografiert.

2.2.2 Immunozytochemie

Die Zellen wurden wie folgt behandelt, wobei alle Spülschritte mit 200 μl / Well und bei Raumtemperatur vorgenommen wurden. Zunächst wurde das Medium abgenommen und die Kulturen mit PBS-Puffer gewaschen, 20 Minuten mit 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert und erneut 2x 10 Minuten mit PBS gespült. Nach dem Spülen mit PBS erfolgte über 5 Min die Behandlung mit Triton X/BSA, um die Zellen zu permeabilisieren. Um unspezifische Bindungsreaktionen zu verhindern, wurden die Zellen 30 Minuten mit GSDB blockiert, um dann mit den Primär- Antikörpern, die ebenfalls in GSDB-Puffer gelöst wurden, über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer zu inkubieren. Pro Well wurde 150 μl Antikörper-Lösung benutzt. Die Zellen wurden

nach der Inkubation der Primärantikörper über Nacht drei Mal für je 5 Minuten mit Triton-X/BSA gewaschen und bei Raumtemperatur 90 Minuten mit dem Sekundär-Antikörper (Sekundärantikörper wurde auch in GSDB- Puffer gelöst) inkubiert. Als Zellkernfärbung wurde Dapi (0,001%) für 10 Min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Abschließend wurden die Zellen 3x 10 Min mit Ampuwa (pyrogen- und keimfreies Wasser) gewaschen, die Glasplättchen mit den gefärbten und fixierten Zellen wurden daraufhin auf die Objektträger überführt und mit Fluorsave eingedeckelt. Schließlich wurde mit einem 10er Objektiv, 10 zufällig gewählte Bildausschnitte am Apotome fotografiert, um dann die Anzahl der Zellkerne zu zählen. Bei den Fluoreszenzfärbungen der Intermediärfilamente wurden auch 10 zufällig ausgewählte Bilder bei 40- facher Vergrößerung mit Öl am Apotome fotografiert.

2.2.3 RNA- Isolation

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus striatalen und kortikalen Astrozytenzellkulturen wurde PeqGold entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurde zuerst das Medium abgenommen, dann mit PBS gewaschen und schließlich 1 ml Peq-Gold-Lösung auf die vier Löcher der Kulturschale verteilt gegeben und die Zellen sowohl chemisch als auch mechanisch mit der Pipette vom Kulturschalenboden gelöst, um sie in das darunterliegende Kulturschalenloch zu überführen. Es wurden jeweils Zellen aus vier Kulturschalenlöchern gepoolt, so dass Zellmaterial aus vier Kulturschalenlöchern in 1 ml PeqGold aufgenommen wurde und als eine Probe in ein Eppendorfgesäß überführt wurde. Anschließend wurden zu jeder Probe 200 µl Chloroform hinzugegeben, gevortext und 2-3 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der 15 minütigen Zentrifugation (4 °C, 15700 g) fand dann im Eppendorfgesäß eine Phasen-Trennung in drei Phasen statt; oben aufschwimmend eine wässrige Schicht von RNA, dann eine gelige DNA-Schicht und eine milchig erscheinende Proteinschicht. Die wässrige RNA-Phase wurde dann vorsichtig mit einer Pipette entnommen und in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Anschließend wurde die RNA in 500 µl Isopropanol für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur präzipitiert. Daraufhin wurde das Gemisch zentrifugiert (4 °C,

10 Minuten, 15.700 g) der Überstand abgekippt und das Pellet in 1 ml 70-% Ethanol (-20 °C) gewaschen, gevortext und 5 Min zentrifugiert (4 °C, 15.700 g). Nach erneutem Abkippen des Überstandes wurde das Pellet an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Das trockene Pellet wurde dann in 42 µl RNase freiem Wasser wieder gelöst (10 Min, 60 °C). Nach kurzer Zentrifugation wurden 2 µl der in RNase freiem Wasser gelösten RNA mit 98 µl RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:50 verdünnt. Diese Verdünnung wurde mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen und die RNA-Konzentration, die Absorption bei 260 bzw. 280 nm und die Ratio ermittelt.

2.2.3.1 cDNA- Synthese

Die reverse Transkription wurde mit 2 µg totaler RNA durchgeführt. Mit Hilfe der ermittelten RNA Konzentration aus den photometrischen Messungen konnte das Volumen, welches 2 µg RNA enthält, wie folgt berechnet werden: Jeder Versuchsansatz pro Probe wurde mit einem Gesamtvolumen von 25 µl festgelegt, was sich folgendermaßen zusammensetzt: Es wurde als erstes RNA freies Wasser pipettiert (Volumen wurde als Differenz aus dem Gesamtvolumen von 14 µl und dem ermittelten RNA-Volumen, was 2 µg RNA enthält ermittelt). Daraufhin wurde das Volumen an RNA, was 2 µg totale RNA enthält hinzu pipettiert und abschließend 11 µl Mastermix hinzugegeben. Die Proben wurden bei 95 °C über 5 Minuten denaturiert und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Vom Mastermix wurden 11 µl pro Probe hinzu pipettiert, so dass die Proben ein Endvolumen von 25 µl hatten, dies wurde schließlich 60 Min bei 37 °C inkubiert. Durch weitere 10 Minuten bei 95 °C wurde die reverse Transkriptase gestoppt.

2.2.3.2 RT-PCR

Für die PCR wurden 1,5 µl cDNA aus der RT-PCR eingesetzt und mit 23,5 µl Mastermix vermischt. Bei jedem PCR- Ansatz wurde als negativ Kontrolle anstelle von

cDNA, Wasser hinzugefügt um eine mögliche „Verunreinigung“ der Reagenzien mit DNA zu kontrollieren. Der Thermal Cycler (Typ DNA 480) startete die Taq-Polymerase in einem einfachen Zyklus mit 3 Min. Denaturierung bei 95 °C, 1 Min. Annealing bei 62 °C und weitere 2 Min. Elongation bei 72 °C. Die Amplifikation folgt mit 1 Min. Denaturierung bei 95 °C, 1 Min. Annealing bei unterschiedlichen Temperaturen (s.Materialteil 6.1), 2 Min. Elongation bei 72 °C (Anzahl der PCR-Zyklen siehe Materialteil 6.1) und abschließenden 7 Min. End-Elongation bei 72 °C. Die Anzahl der Zyklen und der verwendeten Temperaturen wurden mit Hilfe des Thermal Cyclers, My Cycler™ folgendermaßen über einen Gradienten bestimmt: Auf eine fünf-minütige Denaturierung bei 94 °C, folgte die Denaturierung über 30 Sek. bei 95 °C, daraufhin startete für 30 Sek. das Annealing mit den unterschiedlichen Temperaturen von 56- 66 °C (siehe Materialteil 6.1), dann lief über weitere 30 Sek. die Elongation (unterschiedliche Anzahl der PCR- Zyklen siehe Materialteil 6.1) und abschließend folgte die End-Elongation über 7 Min. bei 72 °C. Die so erhaltenen amplifizierten RT-PCR Produkte wurden anschließend auf ein 1,5% iges GelGreen angefärbtes Agarose Gel aufgetragen und bei 95 Volt, 200 mAmpere, 90 Min elektrophoriert, wobei 10 µl der PCR- Probe mit 2 µl 6x DNA loading dye in die Taschen aufgetragen wurde. Als Größenmaßstab wurde 2 µl 100 bp Gene Mass Ruler Ladder verwendet. Als Anfärbemittel wurden pro Probe 2 µl Orange loading dye hinzu pipettiert. Die Gele wurden gescannt und die optischen Dichten der Banden mit dem Image J-Programm (NIH Image J software) ermittelt. Die relative Quantifizierung wurde durchgeführt durch Ermitteln des Verhältnisses des Ziel-Gens (GFAP, Vimentin, Nestin, Pax6, Sox2, AQP4) zum Haushaltsgen HPRT (Hypoxanthin Phosphorilbosyl-Transferase). Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von t-test und One Way Analyses Variance Test (s.Materialteil) durchgeführt.

2.2.4 Protein Extraktion und Membranpräparation

Zur Bestimmung der Expression von GFAP, Nestin und AQP4 auf proteinogener Ebene wurde Westernblot durchgeführt. Analog dem bereits unter 6.2.1 beschriebenen Vorgehen wurde Hirngewebe aus den Kortices und den Striata von neonatalen Mäusen

(P 0 und P 1) isoliert und eine primäre Astrozyten- Zellkultur angelegt. Hierfür wurden die primären Astrozytenzellen aus Striatum und Kortex in 24- Well- Platten (56 cm², 25000 Zellen/cm²) ausplattiert und mit Medium (MEM mit 1 oder 10% FCS) versorgt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Astrozytenzellen für 24 bzw. 72 Std. mit 15 oder 30 µM 6-OHDA behandelt. Nach der Stimulation mit 6-OHDA wurde das Medium abgenommen und die Astrozyten mit eiskaltem PBS (4 ml pro Kulturschale) gewaschen.

2.2.4.1 Proteinextraktion

Die Protein Extraktion für die Bestimmung der Expression von GFAP und Nestin auf proteinogener Ebene durch Westernblot erfolgte nach Sørbø et al. (2007). Hierfür wurden die Zellen nachdem das Medium abgenommen und ein Waschvorgang mit eiskaltem PBS/EDTA 1x durchgeführt wurde, mechanisch durch eine Pipettenspitze und chemisch durch Homogenisierung-Puffer (100 µl pro Kulturschale) vom Schalenboden gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt und in das Ultraschallbad (Sonicate Proteins/Ultraschall 2 Min) gestellt. Dann wurden die Zellen zentrifugiert (4 °C, 10000 g, 15 Min) und der Überstand ab pipettiert. Das Pellet wurde dann in 45 µl 4x Proben-Puffer gelöst und die Protein-Konzentration mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben bestimmt.

2.2.4.2 Membranpräparation

Um die Expression von AQP 4 auf proteinogener Ebene durch Westernblot darzustellen, wurde eine Membranfraktion durch Membranpräparation nach Neely et al. (1999) hergestellt. Dafür wurde wie schon bei der Proteinextraktion nach Stimulation mit 15 und 30 µM 6-OHDA das Medium abgenommen und die Zellen in eiskaltem PBS (4 ml pro Kulturschale) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen aus der Kultur in Gewebe-Homogenisierung Puffer (2 ml pro Kulturschale) überführt. Um möglichst alle Zellen überführen zu können wurden die Zellen mit Hilfe eines Silikon- Zell- Schabers mechanisch vom Schalenboden gelöst und in ein Falconröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (4 °C, 10 Min, 1691 g), der Überstand ab

pipettiert und weitere 30 Min in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (Beckmann Ultrazentrifuge 200 000g). Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet in Solubilisierungspuffer (45 µl) gelöst und die Proben auf Eis gestellt. Die Proteinkonzentration wurde durch das BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben bestimmt.

2.2.4.3 Proteinbestimmung/BCA-Assay

Die Proteinkonzentration wurde nach der Membranpräparation (für AQP 4) bzw. Protein-Extraktion (für GFAP und Nestin) mit Hilfe des Bradford Assay durchgeführt. Hierfür wurden die in Solubilisierungspuffer (bei AQP 4) bzw. 4x Probe-Puffer (für GFAP und Nestin) aufgenommenen Proben mit 1 ml bei 60 °C unter Schütteln im Wärmeblock inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde eine Extinktionsmessung am Photometer (562 nm) vorgenommen, bei dem jeder Probenansatz (5 µl Probe auf 45 µl Solubilisierungspuffer bei AQP 4 bzw. 45 µl 4x Proben- Puffer bei GFAP und Nestin) zwei Mal gemessen wurde und der Mittelwert errechnet wurde. Dieser Mittelwert wurde schließlich mit dem Wert aus der Standardreihe, der ihm am nächsten kam ins Verhältnis gesetzt.

Beispiel: Es wurde in der Standardreihe bei den photometrischen Messungen ermittelt, dass die gemessene Extinktion von 0,255, 2,5 µg Protein enthält.

Man setzt den Quotienten aus der Proteinmenge (2,5 µg) bei gemessener Extinktion (0,255) ins Verhältnis zu dem Quotienten aus x, was die gefragte Proteinmenge der Probe ist zu dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Probe.

z.B. $2,5 \mu\text{g} / 0,255 = x / y$

x= gefragte Proteinmenge der Probe [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]

y= Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Probe.

2.2.4.4 SDS – Polyacrylgel Elektrophorese (SDS-Page)

40 µg Protein wurden für jede Probe (unbehandelt, 15 µM oder 30 µM 6-OHDA) pro Spur eingesetzt. Jede Spur enthielt 20 µl Lösung bestehend aus y [µl] der Probe, 3 µl Sorbo Proben-Puffer, das Restvolumen wurde anschließend mit der entsprechenden Menge an destilliertem Wasser aufgefüllt.

Das Volumen der Probe (y [µl]) welches 40 µg Protein enthält wurde wie folgt ermittelt:

Unter 6.2.4.3 errechnete Proteinmenge der Probe (x µg/µl) wird dem Quotienten aus

$$40 \mu\text{g} / y [\mu\text{l}] \text{ gleichgesetzt} \quad \rightarrow \quad x [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = 40 \mu\text{g} / y [\mu\text{l}]$$

Somit wird y [µl] folgendermaßen errechnet: $y [\mu\text{l}] = 40 \mu\text{g} / x [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$.

40 µg Protein von jeder Probe wurde auf einem 12% igen (für AQP 4 mit 4 M Harnstoff wegen der besseren Lösung) bzw. 10% igen (für GFAP und Nestin) SDS Polyacrylamid Gel (2 Phasengel: 12% oder 10% Trenngel + 6% Sammelgel) in Laufpuffer (1x) bei 150 V konstant und 400 mA 3 Std. bei 4 °C aufgetrennt.

2.2.4.5 Semi-dry Blottransfer

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteinproben auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Hierfür wurden Membran, Filterpapier und Schwämme zuvor in 1x Blotpuffer eingeweicht und ein Sandwich aus Schwamm / 2x Blotpapier / Membran / Gel / 2x Blotpapier / Schwamm geschichtet. Die Membran wurde am nächsten zur Anode in die Semi-dry-Blot-Kammer eingebaut und bei 4 °C für 12-16 Std. bei 6 V geblottet.

2.2.4.6 Immunoblotting

Um unspezifisches Binden der Antikörper und somit einen ungewollten Hintergrund zu vermeiden wurde die Membran nach der Elektrophorese in 1x TBS blockiert (2 Std. bei Raumtemperatur). Das Gel wurde 30 Min in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Dann wurde der Primär-Antikörper in PBS+ TWEEN über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde dann die Membran 5x mal in 1x TBS+ TWEEN gewaschen und der Sekundär- Antikörper in 1x TBS+TWEEN eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran weitere 5x in 1x TBS+ TWEEN gewaschen. Die im-

munreaktiven Proteine wurden durch eine Chemieluminescence, bei der der „Amersham ECL™ Western Blotting detection Kit“ nach Herstellerangaben verwendet wurde, sichtbar gemacht und Filme im manuellen 3 Bäder-Verfahren (Entwickler / Wasser / Fixierer) erstellt. Diese wurden eingescannt und die optische Dichte mittels Image J ermittelt. Als Nachweis, dass in allen Banden die gleiche Menge Protein eingesetzt wurde, diente ein Aktin- Nachweis, bei dem nach kurzem Waschen mit 1x TBS+ TWEEN bei Raumtemperatur mit 1x TBS + 2% Schweineserum 1 Std. blockiert wurde. Anschließend wurde über Nacht bei 4 °C der Primär- Antikörper inkubiert (in 1x TBS/TWEEN). Nach weiterem Waschen, Inkubation des Sekundär-Antikörpers (wie zuvor beschrieben) und abschließendem Waschen, wurde auch hier eine manuelle Filmentwicklung zur Dokumentation vorgenommen

3 Zielsetzung

Mit der Dissertation verfolgte ich das Ziel folgende Fragen zu klären:

In vivo Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an einem 6-OHDA-Modell in der Ratte hatten einen Anstieg der Proliferation von Astrozyten durch 6-OHDA, sowie eine erhöhte Expression von GFAP, Nestin und Pax 6 gezeigt. Die Ursache für diese beobachteten Effekte blieb allerdings unklar, da das verwendete in vivo Modell nicht ermöglichte, zwischen direkten Effekten von 6-OHDA auf Astrozyten und Effekten, die eher durch die Neurotoxin-induzierte dopaminerge Depletion erzeugt wurden, zu unterscheiden.

In dieser Arbeit wollte ich daher anhand eines in vitro Modells untersuchen, ob 6-OHDA einen direkten Effekt auf Astrozyten hat.

Ich untersuchte dafür die Expression von GFAP, Nestin und Pax 6 nach 24h-stündiger Behandlung mit 6-OHDA. Darüber hinaus wollte ich sehen, ob möglicherweise weitere Marker der reaktiven Gliose bzw. von radialen Gliazellen unter dem Einfluss von 6-OHDA in ihrer Expression verändert werden. Daher untersuchte ich auch die Expression von Vimentin, Sox 2 und AQP 4.

4 Ergebnisse

4.1 6-OHDA beeinflusst die Zellzahl von Astrozyten *in vitro*

Striatale und kortikale Astrozyten wurden *in vitro* mit unterschiedlichen Konzentrationen (10; 15; 20; 30; 37,5 und 50 μM) an 6-OHDA für die Dauer von 24 Stunden behandelt. Die Zählung der durch DAPI gefärbten Zellkerne ergab einen deutlichen Rückgang der Zellzahl nach einer Behandlung mit 30 μM 6-OHDA in Astrozytenzellkulturen in beiden untersuchten Hirnregionen (Striatum und Kortex). Die Behandlung mit niedrigeren Konzentration an 6-OHDA (10; 15 und 20 μM) hatte weder in Astrozyten- Kulturen aus der Kortex, noch aus dem Striatum der Maus einen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen (**Abb. 1**). Die Dichte der Zellen war bei Beginn aller Experimente 50 000 Zellen/ Well. Die Anzahl der Experimente war im Striatum: n= 4 außer bei 6-OHDA Konzentration 50 μM n= 3 und in der Kortex: Kontrolle n= 7; ansonsten n= 5.

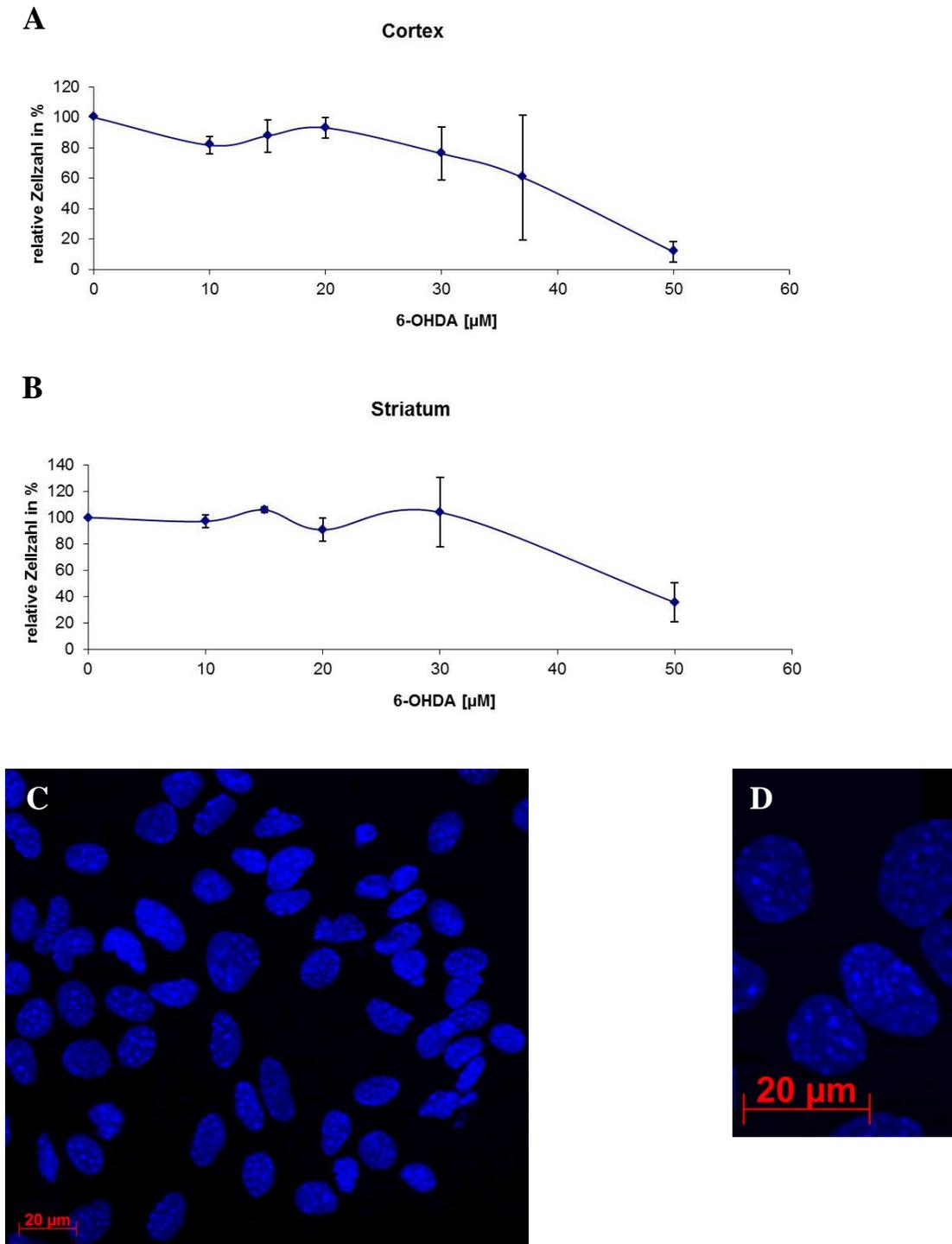


Abbildung 1: Überlebensrate von kortikalen und striatalen Astrozyten bei Behandlung mit 6-OHDA (10 μM ; 15 μM ; 20 μM ; 30 μM ; 37,5 μM ; 50 μM) über 24 Stunden in vitro. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM dar (Striatum: n= 4 außer bei 50 μM n= 3; Cortex: Kontrolle n= 7, ansonsten n= 5) (A, B). Die Zellkerne wurden mit Dapi angefärbt (C, D).

4.2 6-OHDA beeinflusst die Expression der Intermediärfilamente von Astrozyten in vitro

Die immunozytochemischen Untersuchungen der Expression von GFAP, Nestin und Vimentin in striatalen astrozytären Kulturen ergab keinen Unterschied in der Anzahl an immunoreaktiven Zellen zwischen unbehandelten Kontrollkulturen und mit 15 μM oder 30 μM 6-OHDA behandelten Kulturen (**Abb. 2**).

In den kortikalen Astrozyten-Kulturen hingegen war eine signifikante Abnahme der Anzahl an GFAP- immunoreaktiven Zellen nach Behandlung mit 30 μM 6-OHDA zu beobachten (**Abb. 2 A**). Bei den kortikalen astrozytären Zellen, die mit 15 μM 6-OHDA behandelt wurden, zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expressivität von GFAP (**Abb. 2 A**). Des Weiteren ergaben sich keine Unterschiede bei 15 μM und 30 μM 6-OHDA- Behandlung von kortikalen Kulturen in der Expression von Nestin und Vimentin (**Abb. 2 C und D**).

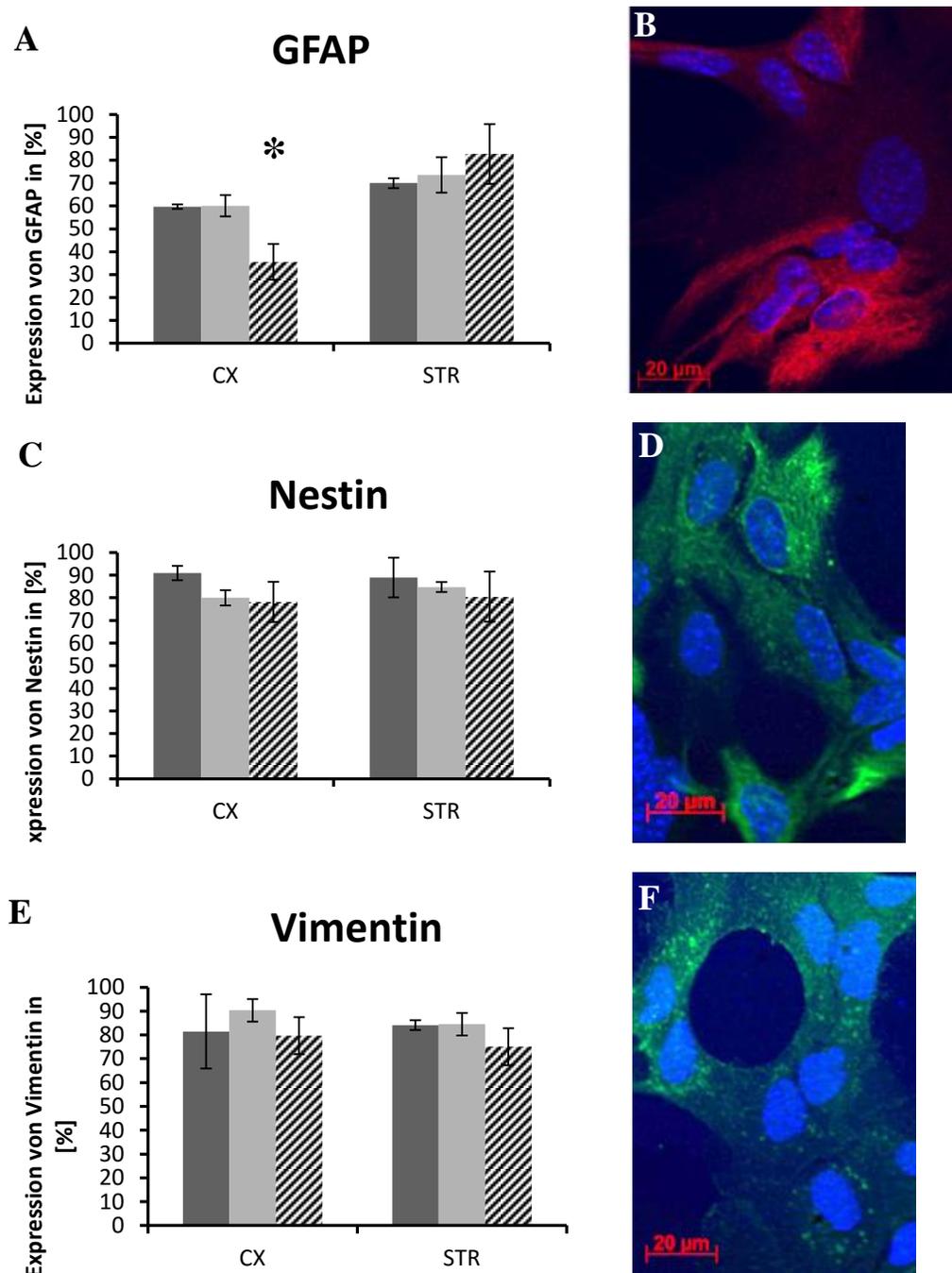
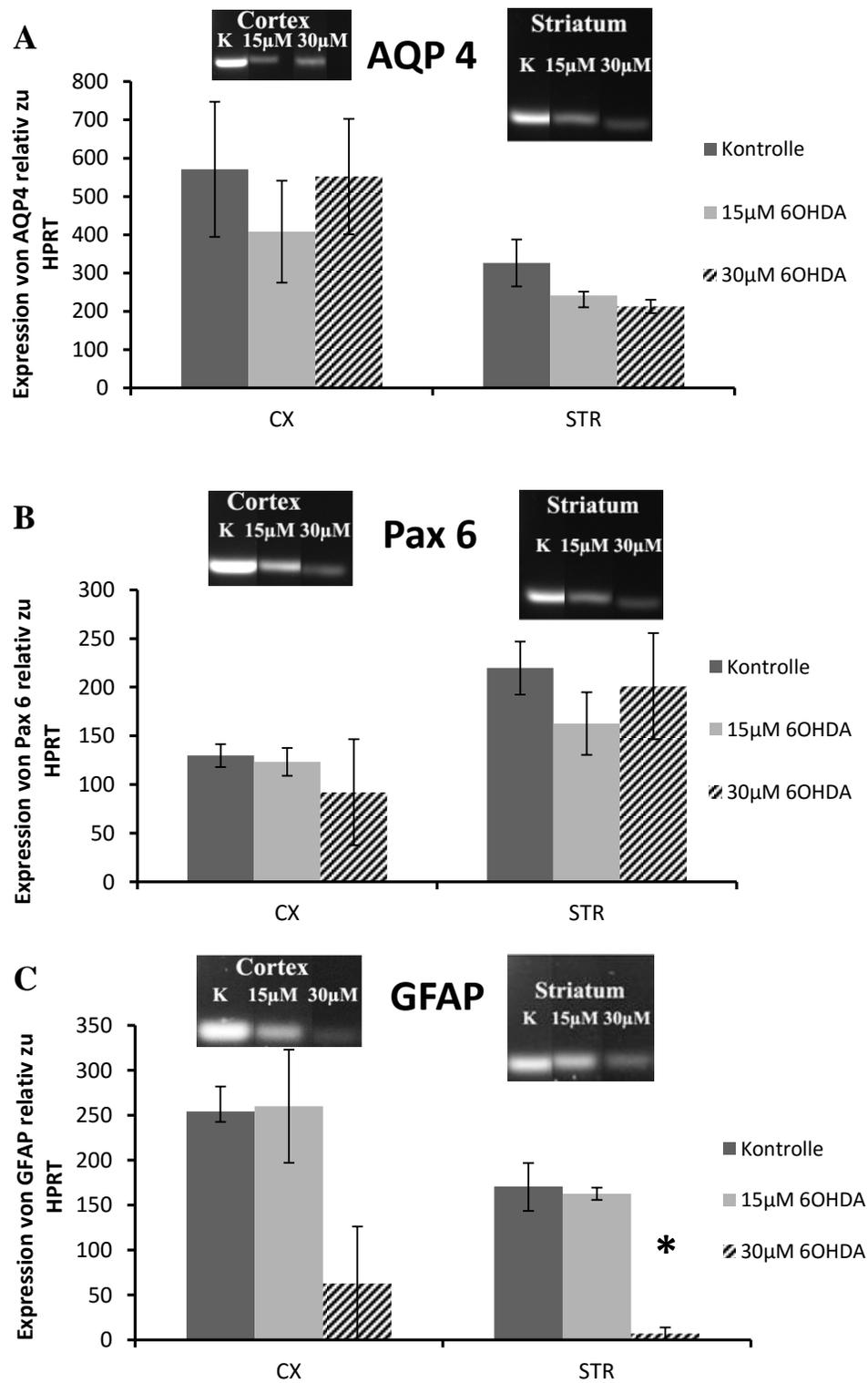
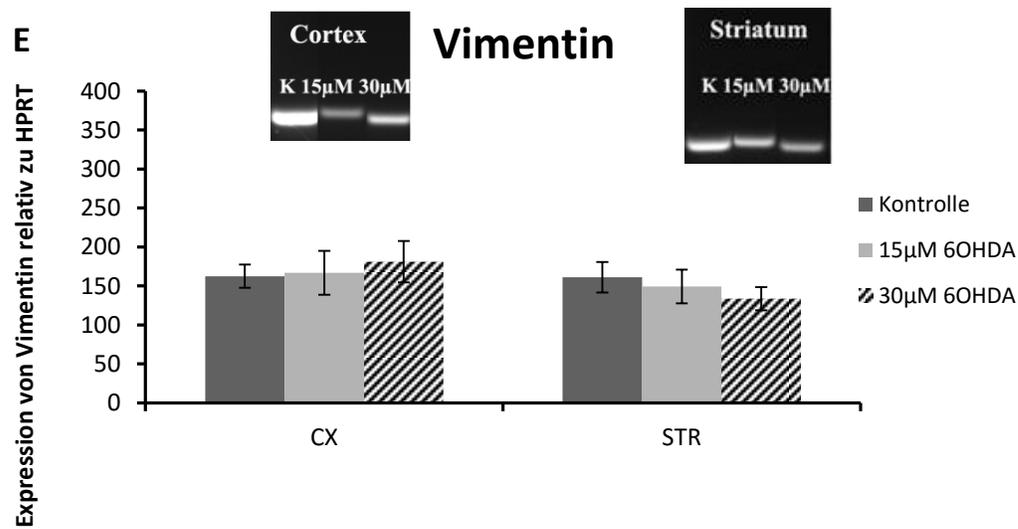
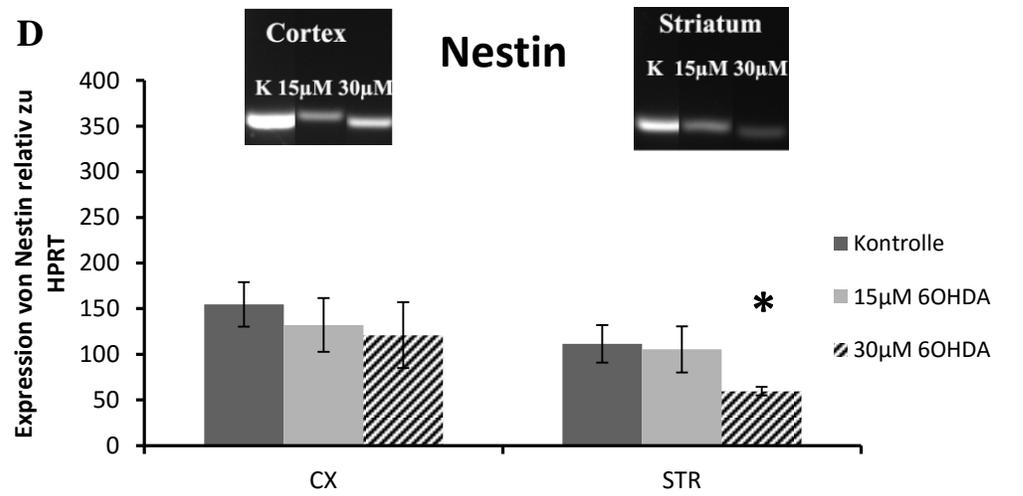


Abbildung 2: Einfluss von 6-OHDA auf die Expression der Intermediärfilamente GFAP (A, B), Nestin (C, D) und Vimentin (E, F) in Kortex und Striatum. Die Behandlung erfolgte für 24 Stunden mit 15 μ M (hellgrauer Balken) und 30 μ M (gestreifter Balken) 6-OHDA. Die dunkelgrauen Balken zeigen unbehandelte Zellen. Daten stellen den Mittelwert \pm SEM dar (n= 3 außer bei Striatum Nestin Kontrolle und 30 μ M n= 4; Vimentin Kontrolle n= 4) (A, C, E). Mit Dapi gefärbte Zellkerne (B, D, F). Die Statistik wurde mit t-test erhoben; $p \leq 0,001$ (*) bei Graph A.

4.3 Die 24-stündige Behandlung mit 6-OHDA verändert die mRNA des Transkriptionsfaktors Sox 2 und der Intermediärfilamente GFAP und Nestin in Astrozyten in vitro

Die relative Mengenbestimmung der mRNA nach der RT-PCR zeigte eine signifikante Verminderung von Sox 2 bei einer 30 μM 6-OHDA Behandlung in der Kortex. Es zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollkulturen und der mit 15 μM 6-OHDA behandelten kortikalen Astrozytenzellen. Im Striatum waren keine Unterschiede zwischen den Kontrollkulturen und den Kulturen nach Behandlung mit 15 μM bzw. 30 μM 6-OHDA nachzuweisen (**Abb. 3/F**). Die relative Mengenbestimmungen der mRNA der Intermediärfilamente GFAP, Nestin und Vimentin, welche schon immunzytochemisch untersucht wurden, ergab folgende Ergebnisse: Es wurde ein deutlicher Rückgang der GFAP und Nestin mRNA im Striatum bei einer 30 μM 6-OHDA Behandlung festgestellt (**Abb. 3/C und D**). Mit 15 μM 6-OHDA behandelte striatale Zellen zeigten keine Expressivitätsunterschiede im Vergleich zu den Kontrollkulturen. In der Kortex ergab sich sowohl nach der Behandlung mit 15 μM als auch mit 30 μM 6-OHDA bei GFAP und Nestin kein deutlicher Unterschied. Vimentin zeigte trotz Behandlung im Striatum und in der Kortex keinerlei Unterschied in seiner Expressivität. Dies deckt sich nur z.T. mit den Ergebnissen aus der Immunzytochemie; hier wurde ein signifikanter Unterschied bei gleicher Behandlung (30 μM 6-OHDA) bei GFAP in der Kortex festgestellt, was in der Untersuchung der mRNA nicht nachgewiesen werden konnte. Nestin und Vimentin zeigten in beiden Hirnregionen in der Immunzytochemie keine signifikanten Expressivitätsunterschiede. Obgleich die RT-PCR von Nestin im Striatum nach einer Behandlung mit 30 μM 6-OHDA einen signifikanten mRNA- Rückgang anzeigte. Bei den Untersuchungen der mRNA des Wasserkanals AQP 4 in der RT-PCR waren keinerlei signifikante Unterschiede der behandelten Kulturen zu den unbehandelten Kulturen sowohl im Striatum als auch in der Kortex nachzuweisen (**Abb. 3/A**). Auch die Genexpressivität des Transkriptionsfaktors Pax 6 veränderte sich durch die Behandlung mit 6-OHDA nicht (**Abb. 3/B**).





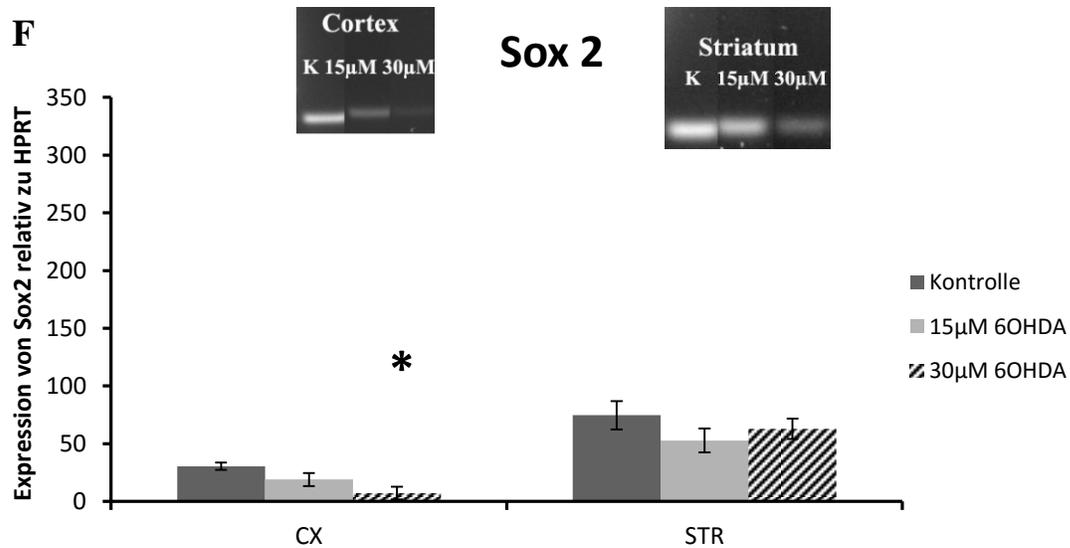
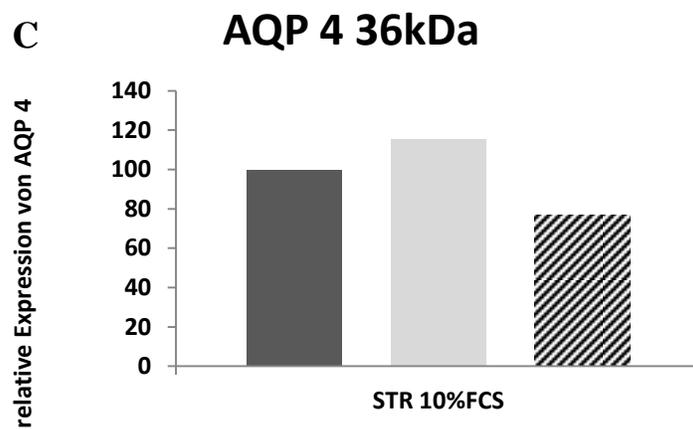
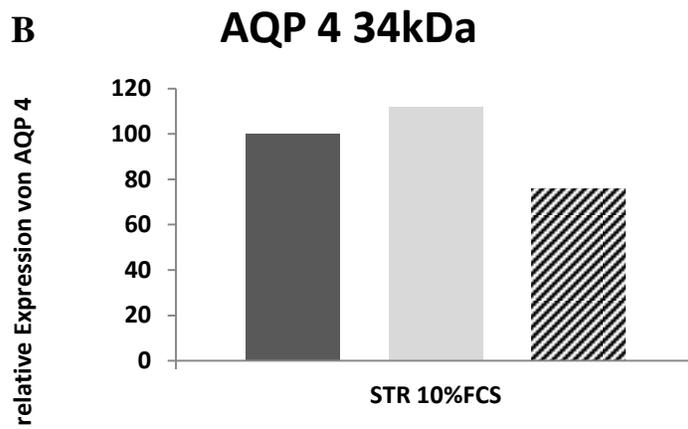
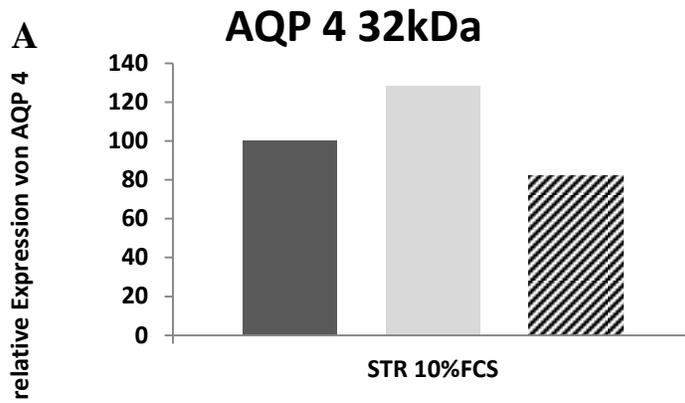


Abbildung 3: Expression von mRNA bei RT-PCR mit Primer spezifisch gegen GFAP, Nestin, Vimentin, Pax 6, Sox 2 und AQP 4. Die Behandlung der kortikalen und striatalen Astrozyten erfolgte über 24 Stunden mit 15µM und 30µM (Kortex Kontrolle n=6; 15µM n=3; 30µM n=4; Striatum Kontrolle n=5; 15µM n=4; 30µM n=3). (A-F) Daten zeigen den Mittelwert +/- SEM. Die Statistik wurde mit t-test und One Way Analysis Variance-Test gemacht; (C) p=0,007 t-test; (D) p=0,007 t-test (F) p=0,025 One Way Analysis Variance-Test. (G-R) Repräsentative Agarose Gele gefärbt mit Gel Green (Gel Green Nucleic Acid Gel Stain; Biotium).

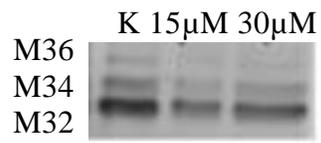
4.4 Proteinmengen-Bestimmung von AQP 4, GFAP und Nestin durch Westernblot

Die Westernblot-Analysen der einzelnen Banden M 32, 34 und 36 kDa des Wasserkanals AQP 4 lassen nur eine tendenzielle Varianz vermuten: Hierbei kommt es im Striatum bei der Behandlung mit 15 μ M bei allen drei Banden zu einem geringfügigen Anstieg der Proteinmenge, der bei der Behandlung mit 30 μ M unter das Niveau der unbehandelten Kulturen sinkt (**Abb. 4/A-C**). Die striatale Kultur wurde in 10% FCS Medium gehalten. Die kortikalen Kulturen wurden hingegen sowohl bei einer Inkubation mit 1 als auch mit 10% FCS Medium untersucht. Dabei zeigte sich bei den in 10% FCS Medium inkubierten Zellen eine ähnliche Tendenz, wie sich schon im Striatum abzeichnete. Es kommt bei der Behandlung mit 15 μ M zu einem leichten Anstieg der Proteinmenge, welche allerdings hier nur auf das Niveau etwas oberhalb der Ausgangsmenge der unbehandelten Kulturen bei einer Behandlung mit 30 μ M 6-OHDA zurückfällt (**Abb. 4/D-F**). In den Versuchen mit kortikalen Zellen, die in 1% FCS Medium behandelt wurden, zeigte die 32kDa Bande insbesondere bei der Behandlung mit 15 μ M 6-OHDA einen deutlich sichtbaren Abfall der Proteinmenge, der sich allerdings bei der 30 μ M Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen relativierte (**Abb. 4/G**). Bei den 34 und 36 kDa-Banden hingegen zeigte sich keinerlei Tendenz (**Abb. 4/H und I**). Diese Ergebnisse decken sich somit mit den RT-PCR Analysen die keine signifikanten Unterschiede der mRNA des Wasserkanals AQP 4 im Striatum und in der Kortex bei 15 und 30 μ M 6-OHDA Behandlung ergaben (**Abb. 3/A**). Da die Expression der Intermediärfilamente GFAP, Nestin und Vimentin bereits durch die Immunzytochemie (**Abb. 2**) und RT-PCR (**Abb. 3/C-E**) analysiert wurde, führte ich auch hier abschließend eine quantitative Proteinmengenbestimmung mit Westernblot durch. Die Proteinmenge von GFAP scheint sowohl im Striatum als auch in der Kortex keine deutliche Veränderung durch die Behandlung mit 6-OHDA zu erfahren (**Abb. 4/J und K**). Dieses Ergebnis deckt sich nicht ganz mit den Ergebnissen aus der Immunzytochemie und RT-PCR. In der Immunzytochemie zeigte sich ein signifikanter Rückgang der GFAP-Expressivität in der Kortex bei einer 30 μ M Behandlung (**Abb. 2/A**). In der RT-PCR wurde dagegen bei gleicher Be-

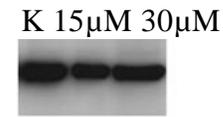
handlung ein Rückgang im Striatum festgestellt (**Abb. 3/C**). Bei der quantitativen Analyse der Proteinmenge von Nestin scheint es einen deutlichen Anstieg von Nestin in der Kortex zu geben (Behandlung mit 30 μ M 6-OHDA) (**Abb. 4/L**). Im Striatum kann man ebenfalls einen Anstieg der Proteinmenge bei 15 μ M Behandlung vermuten, die sich allerdings bei der 30 μ M 6-OHDA Behandlung wieder auf das Niveau der unbehandelten Zellen absenkt (**Abb. 4/M**). Dies würde im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Immunzytochemie und RT-PCR stehen. Hier zeigte sich nur bei der RT-PCR im Striatum nach einer Behandlung mit 30 μ M 6-OHDA eine verminderte Expression von Nestin.



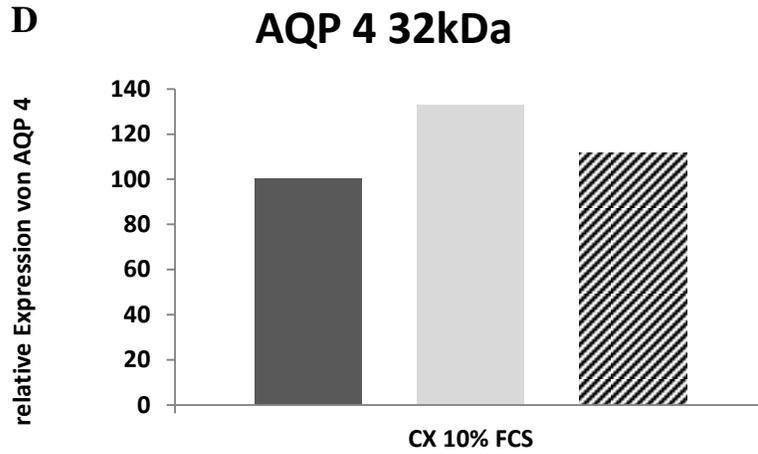
D'



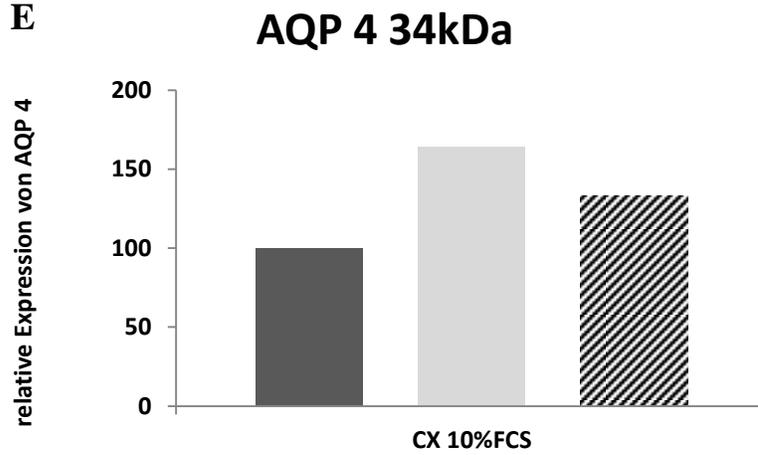
D''



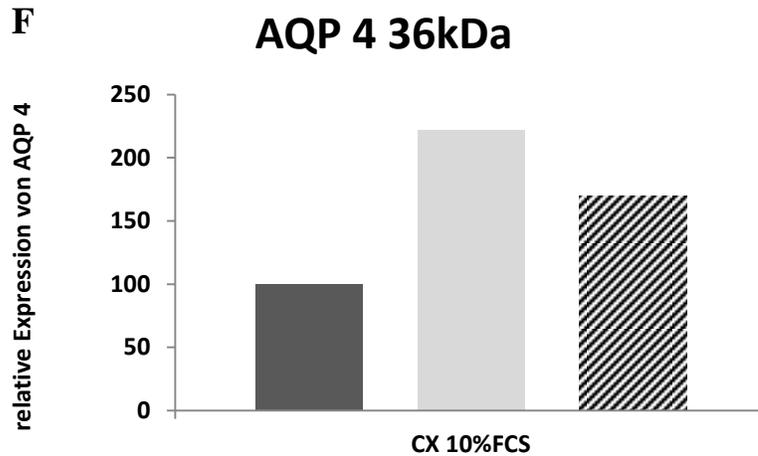
D

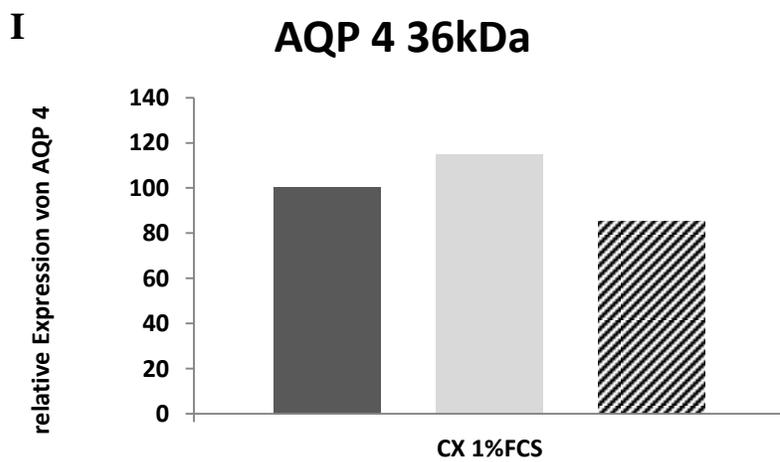
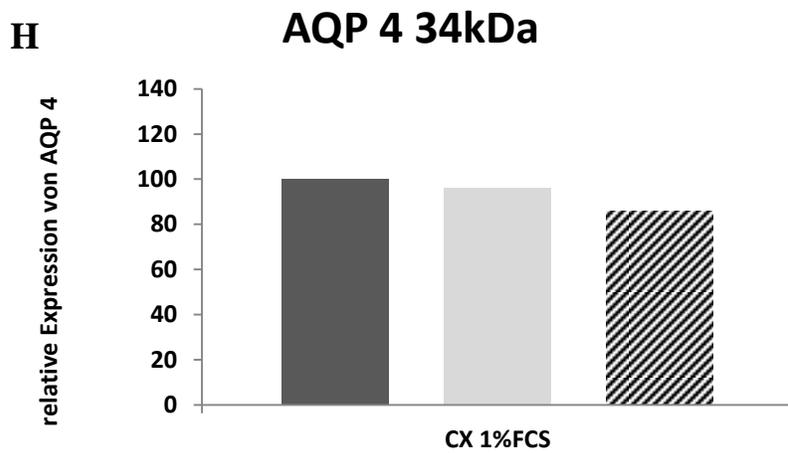
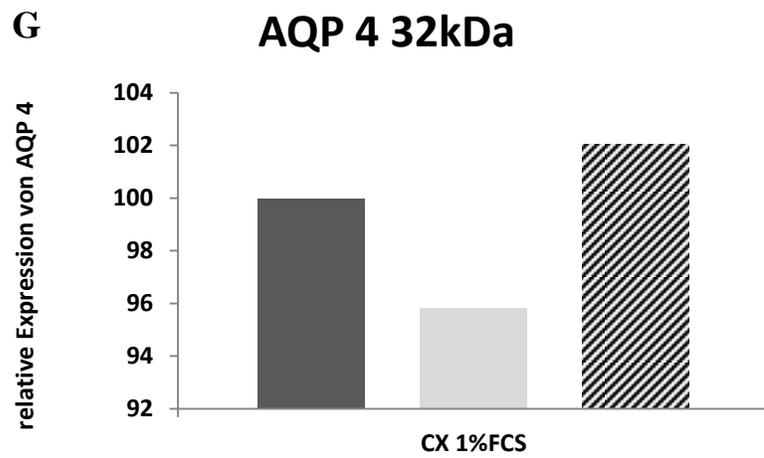
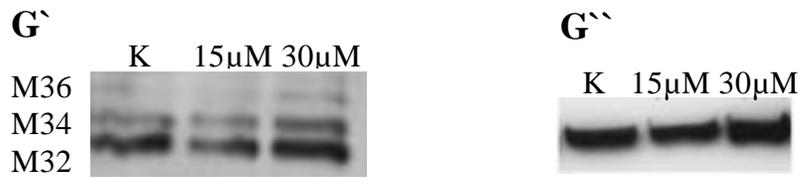


E



F





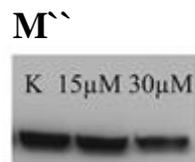
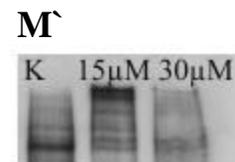
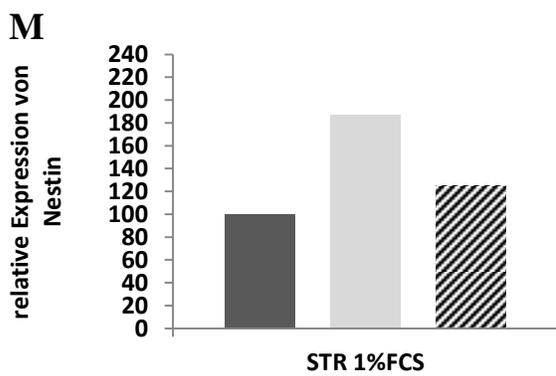
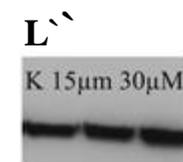
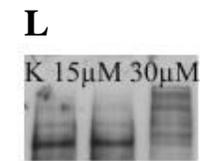
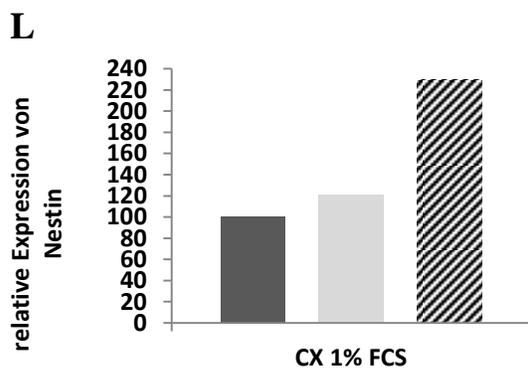
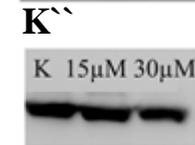
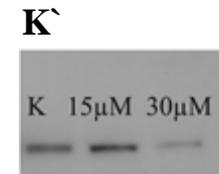
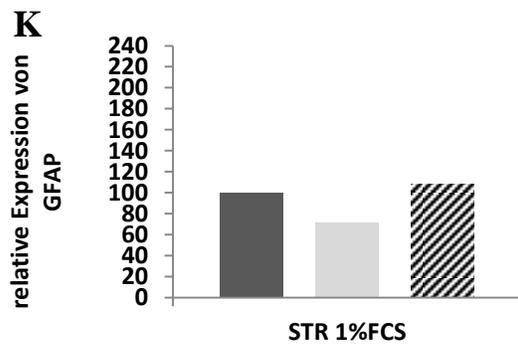
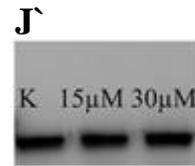
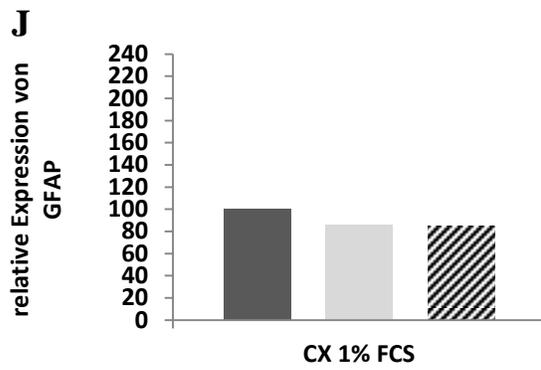


Abbildung 4: Mengenbestimmung von AQP 4 M32 (A, D, G), AQP 4 M34 (B, E, H), AQP 4 M36 (C, F, I), GFAP (J, K) (51 kDa) und Nestin (L, M) (210 kDa) nach Behandlung von kortikalen und striatalen Astrocyten ohne (dunkelgrauer Balken), mit 15 μ M (hellgrauer Balken) und 30 μ M (gestrichelter Balken) 6-OHDA über 24 Stunden in vitro (n=1). GFAP, Nestin in 1% FCS, AQP 4 STR in 10% FCS und AQP 4 CX in 1 und 10% FCS. Repräsentative AQP 4 (A', D', G'), GFAP (J', K') und Nestin (L', M') Westernblots von unbehandelten und behandelten (15 μ M und 30 μ M 6-OHDA) Zellen gefärbt mit Coomassie-Brillant-Blau. Entsprechende Aktin-Nachweise bei AQP 4 (A'', D'', G''), GFAP (J'', K'') und Nestin(L'', M'').

5 Diskussion

5.1 Das Kultursystem

Wir arbeiteten in unserer Studie mit primären Astrozytenzellkulturen. Hierfür wurde striatales und kortikales Hirngewebe neonataler (P 0 und P 1) Balb C Mäuse isoliert und eine primäre Astrozytenzellkultur erstellt. Die Astrozyten wurden in Medium (DMEM, 20% FCS) bis zum Erreichen der Konfluenz herangezüchtet, zweimal gesplittet und in das Experiment aufgenommen. In der Literatur ist ein Höhepunkt der Astrogenese in Nagetieren zwischen der späten pränatalen Periode und der frühen postnatalen Periode zwischen Tag E 18- P 7 beschrieben [Yang et al. 2013]. Wir entschlossen uns daher für die Isolation des Hirngewebes in dieser frühen postnatalen Periode (P 1-4), da das so gewonnene striatale und kortikale Hirngewebe das Anlegen sehr reiner primärer Astrozytenzellkulturen ermöglicht. Astrozytenzellkulturen zeichnen sich durch eine leichte Reproduzierbarkeit, einfache Handhabung und hohe Reinheit aus [Schildge et al. 2013]. Primäre Astrozytenzellkulturen helfen, die Funktion von Astrozyten zu erklären und Ergebnisse aus in vivo Studien zu interpretieren [Kimelberg 1983]. In vitro Studien an murinen kortikalen Astrozytenzellkulturen von neonatalen Mäusen (P 1- 4) zeigten, dass die kultivierten Astrozyten dieselbe Heterogenität wie Astrozyten in vivo aufweisen [Schildge et al. 2013]. Somit stellen primäre Astrozytenzellkulturen zwar einerseits ein artifizielles System dar, spiegeln aber andererseits auch Eigenschaften von Astrozyten im lebenden Organismus wider. Direkte Effekte von neurotoxischen Substanzen, wie MPTP (1- Methyl- 4- phenyl- 1, 2, 3, 6- tetrahydropyridin), Hexandion und das von uns verwendete 6-OHDA, können an primären Astrozytenzellkulturen getestet werden. Es zeigte sich, dass GFAP ein sehr beständiger Marker für die Toxizität der Neurotoxine auf Astrozyten darstellt. Mit Zunahme der Toxizität kam es zu einer vermehrten Expression von GFAP. Das Expressionsverhalten von GFAP hilft außerdem die Empfindlichkeit der Astrozyten auf die Toxine zu beurteilen. So kommt es z.B. nach der Stimulation mit dem neuronenspezifischen MPTP zu keinem Anstieg der Expression von GFAP.

Astrozytenzellkulturen stellen somit ein geeignetes Modell dar, um direkte Effekte unterschiedlicher Toxine auf Astrozyten testen zu können [Cookson und Pentreath 1994]. Astrozyten zeichnen sich sowohl durch eine zeitliche, als auch durch eine regionale Spezifität aus [Bayraktar et al. 2014]. In vitro zeigen postnatale Astrozyten eine höhere Plastizität und reagieren labiler auf äußere Stimuli als adulte Astrozyten. Adulte Astrozyten hingegen antworten verlässlicher, aber auch starrer auf Stimuli und bilden ein gut organisiertes Netzwerk aus [Souza et al. 2013]. Weiter weisen Astrozyten in vitro während ihrer Entwicklung ein unterschiedliches Expressionsverhalten von Intermediärfilamenten auf. So werden die Intermediärfilamente Vimentin, Nestin und GFAP in Astrozyten aus Ratten zwischen Tag P 1 und P 7 vermehrt exprimiert. In den darauffolgenden 3 Wochen nimmt dann in vitro die Expression von Nestin ab und Vimentin wird durch GFAP abgelöst [Ahlemeyer et al. 2013]. GFAP stellt insbesondere einen Marker für reife fibrilläre Astrozyten und für reaktive Astrozyten dar. Reife protoplasmatische Astrozyten hingegen weisen kaum GFAP auf [Schildge et al. 2013]. Weiter zeigen sich während der Entwicklung von Astrozyten in vivo morphologische Unterschiede. In der ersten postnatalen Woche wird in vivo eine große Anzahl an Astrozyten generiert, die aber erst ab P 14-P 26 ihre Prozesse ausbilden, mit denen die Astrozyten das für sie charakteristische Netzwerk ausbilden können. Auf molekularer Ebene kommt es während ihrer Reifung in vivo auch zu Veränderungen. Der Glutamat Transporter GLT 1, Connexin 43 und 30, sowie der Kaliumkanal Kir 4.1 werden erst in den postnatalen Wochen 3 und 4 in Astrozyten ausgebildet [Yang et al. 2013]. Astrozyten können auch durch ihre regionale Spezifität unterschieden werden [Yang et al. 2013]. Sie führen in den verschiedenen Hirnregionen unterschiedliche Funktionen aus: So unterscheiden sich Astrozyten in ihrer transmembranären elektrischen Leitfähigkeit, Expression von Intermediärfilamenten [Schitine et al. 2015], Glutamat Rezeptoren und anderen Transmitter Rezeptoren, Ausbildung von gap junctions, Signalübertragung mit Hilfe von Calcium und unterschiedlichem Volumenregulationsverhalten [Matyash und Kettenmann 2010]. Astrozyten in der grauen Hirnsubstanz bilden beispielsweise vermehrt funktionelle Zellverbände, sogenannte Syncytien in der weißen Hirnsubstanz nur sehr vereinzelt [Matyash und Kettenmann 2010]. Weiter unterscheiden sich Astrozyten aus verschiedenen Hirnregionen im Expressionsverhalten

von GFAP. Nahezu alle Astrozyten im gesunden Hippocampus exprimieren GFAP, während nur wenige Astrozyten aus dem Thalamus GFAP ausbilden. Auch im cerebralen Kortex exprimieren viele Astrozyten GFAP, wohingegen nur wenige Astrozyten GFAP in den mittleren bzw. tieferen Gehirnschichten exprimieren [Schitine et al. 2015]. Auch in unserer Studie konnten wir ein unterschiedliches Expressionsverhalten von GFAP und Nestin sowie Sox 2 in den unterschiedlichen Hirnregionen feststellen. So führt die 24-stündige Stimulation mit 30 μM 6-OHDA zu einer signifikant verminderten Expression von Sox 2 im Kortex, aber zu keinen Unterschieden im Striatum. In der RT-PCR wird die Expression von Nestin und GFAP durch die 24-stündige Stimulation mit 30 μM 6-OHDA im Striatum signifikant vermindert, wohingegen im Kortex keine signifikanten Änderungen detektiert werden konnten. In der Immunzytochemie konnte hingegen im Kortex eine signifikant verminderte GFAP Expression nach der 24-stündigen Stimulation mit 30 μM 6-OHDA festgestellt werden. Die funktionelle Divergenz der Astrozyten in den verschiedenen Hirnregionen [Matyash und Kettenmann 2010] kann als Erklärung des unterschiedlichen Expressionsverhaltens von GFAP, Nestin und Sox 2 in unserer Studie herangeführt werden.

5.2 Einfluss von 6-OHDA auf die Überlebensrate von Astrozyten in vitro

In unserer Studie führt die 24-stündige Stimulation der striatalen und kortikalen Astrozytenzellkulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 μM , 15 μM , 20 μM und 30 μM) an 6-OHDA zu keiner signifikanten Abnahme der Zellüberlebensrate. 6-OHDA scheint in diesen Konzentrationen keinen sofortigen toxischen Effekt auf die kultivierten Astrozyten auszuüben. Bei Stimulation mit höheren Konzentrationen (37,5 μM , 50 μM) an 6-OHDA konnte ein Abfall der Zellzahl sowohl im Kortex, wie auch im Striatum beobachtet werden. Wir detektierten den Abfall der Zellzahl nach Zählung der mit Dapi angefärbten Zellkerne. Kondensierte Zellkerne galten bei der Zellzählung als Zellkerne, apoptotischer Zellen aufgrund einer Chromatinkondensation und wurden nicht mit gezählt. Um jedoch lebendige Zellen exakt detektieren zu können, müsste eine Zellkernfärbung mit beispielsweise Trypanblau durchgeführt werden. Trypanblau ist ein häufig verwendeter Marker für die Zellviabilität. Apoptotische und perforierte Zellen können

Trypanblau aufnehmen und werden dadurch blau angefärbt. Dadurch ist eine Unterscheidung apoptotischer von vitalen Zellen möglich

[<https://www.appllichem.com/de/shop/produktdetail/as/trypanblau-ci-23850/>

Abfragedatum 4.10.2015]. Die von uns detektierte Abnahme der Zellzahl bei der Behandlung mit höheren Konzentration von 6-OHDA (37,5 μM und 50 μM) stimmt mit den Ergebnissen von Raicević et al. (2005) überein. Raicević et al. (2005) stimulierten über 6 Stunden primäre Astrozytenzellkulturen aus Ratten mit 30 μM , 60 μM und 120 μM 6-OHDA und konnten einen konzentrationsabhängigen Abfall der Überlebensraten durch MTT Assay, der die mitochondriale Atmung beurteilt feststellen. Die Behandlung mit 60 μM 6-OHDA führte zu einem signifikanten Abfall der Zellüberlebensrate auf etwa 60% (unbehandelte Zellen 100%) und die Behandlung mit 120 μM auf etwa 35%. Die Astrozyten zeigten nach der Behandlung morphologische Veränderungen, die im Rahmen einer Apoptose auftreten; dazu zählen Zellschrumpfung, DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensierung. Eine Behandlung mit 30 μM 6-OHDA führte hingegen zu keiner signifikanten Abnahme der Zellzahl [Raicević et al. 2005]. Diese Beobachtungen bekräftigen das Ergebnis unserer Experimente: 6-OHDA scheint erst ab einer Konzentration, die größer als 30 μM ist (in unserer Studie 37,5 μM), einen signifikant toxischen Effekt auf Astrozytenzellkulturen auszuüben und zu einer Abnahme der Zellüberlebensrate zu führen. Allerdings untersuchten Raicević et al. 2005 ihre Astrozytenzellkulturen nach einem kürzeren Behandlungszeitraum - 6 anstatt 24 Stunden- und gewannen das Hirngewebe aus Ratten. Eine weitere Studie von Yoo et al. (2005) untersuchte wie wir nach einem Behandlungszeitraum von 24 Stunden. Sie konnten in ihren in vitro Studien mit primären Astrozytenzellkulturen aus dem Kortex neonataler Ratten nach der 24-stündigen Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen (100 μM - 500 μM 6-OHDA) einen toxischen Effekt von 6-OHDA auf Astrozyten erst ab einer Konzentration von 100 μM 6-OHDA detektieren, d.h. erst die Behandlung mit der mehr als dreifachen Dosis des Neurotoxins 6-OHDA zeigte toxische Wirkungen in einem zu unserem Modell vergleichbaren Zeitrahmen. Allerdings sind diese Daten von Yoo et al. (2005) mit Astrozyten neonataler Ratten erhoben und nicht wie in unserer Studie mit Kulturen von Astrozyten aus neonatalen Mäusen. Eine weitere Studie an Astrozytenzellkulturen konnte al-

lerdings bereits ab der Stimulation mit sehr niedrigen Konzentration von 6-OHDA nach 24 Stunden toxische Effekte von 6-OHDA auf Astrozyten nachweisen [Gupta et al. 2015]. Gupta et al. (2015) behandelten Kulturen aus einer Gliazelllinie (C 6 Astrozytenzelllinie) aus Ratten (P 1- P 3) mit unterschiedlichen 6-OHDA Konzentrationen (10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M) über 24 Stunden. Sie wiesen nach, dass 6-OHDA zu eindeutigen morphologischen Veränderungen der Astrozyten führt. So kommt es bereits ab 10 μ M 6-OHDA zu einer Chromatin-Kondensation und ab einer Konzentration von 25 μ M 6-OHDA zu einer signifikant erhöhten Rate an DNA-Fragmentierung. In einem LDH Assay konnten sie nach einer Behandlung mit 25 μ M 6-OHDA eine signifikant erhöhte Aktivität von LDH nachweisen. Durch ihre Ergebnisse schlussfolgerten Gupta et al. (2015), dass 6-OHDA bereits ab Konzentrationen von 10 μ M zu einem signifikanten DNA- Schaden und schließlich zur Apoptose von C 6 Zellen führt. Da wir in unserer Studie nicht die LDH Aktivität und die Chromatin Konzentration gemessen haben, können wir zu diesen Effekten in unserem Experiment keine Stellung nehmen. Ein Zelluntergang durch Apoptose oder Nekrose zu einem späteren Zeitpunkt kann durch eine andere Studie unserer Arbeitsgruppe (unveröffentlichte Daten) jedoch ausgeschlossen werden. Dort konnte nachgewiesen werden, dass die kontinuierliche Behandlung von Astrozyten mit 30 μ M 6-OHDA über 10 Tage nicht zu einem Abfall der Zellzahl von Astrozyten führt. Astrozyten weisen neben ihrer funktionellen Heterogenität abhängig von der Hirnregion auch signifikante speziesabhängige Unterschiede auf [Oberheim et al. 2012]. Ahlemeyer et al. (2013) untersuchten kultivierte Astrozyten aus Mäusen und Ratten und konnten bei gleichen Kulturbedingungen Unterschiede im Phänotyp, in der Funktion und in ihrer Differenzierung nachweisen. So beginnen Maus- Astrozyten nach einem Kultivierungszeitraum von 42 Tagen sich vom Boden der Kulturschale zu lösen, Astrozyten aus Ratten nicht. Außerdem verlieren Astrozyten aus Mäusen in der Kultur ihre protoplasmatische Morphologie und sind anfälliger für Schäden, da sie weniger neuroprotektive Faktoren besitzen. Die von Ahlemeyer et al. (2013) beschriebenen speziesbedingten Unterschiede kultivierter Astrozyten aus Hirngewebe von Mäusen und Ratten können als Erklärung der Differenzen unserer Ergebnisse zu denen von Gupta et al. (2015), Yoo et al. (2005) und Raicević et al. (2005) herangeführt werden. In vitro Stu-

dien an murinen Astrozytenzellkulturen nach Stimulation mit 6-OHDA sind nach meiner Kenntnis noch nicht durchgeführt worden. So würden weitere in vitro Studien an murinen Astrozytenzellkulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen an 6-OHDA (beginnend z.B. mit 10 μM 6-OHDA) und unterschiedlichen Behandlungszeiträume (beispielsweise 6, 12, 24 Stunden) weiterführende Erkenntnisse liefern.

5.3 Effekte von 6-OHDA auf die Proliferationsrate von Astrozyten in vitro

Wir untersuchten das Proliferationsverhalten von kortikalen und striatalen Astrozytenzellkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit 6-OHDA in den Konzentrationen von 10 μM bis 50 μM (10 μM , 15 μM , 20 μM , 30 μM , 37.5 μM und 50 μM). Die 24-stündige Stimulation der astrozytären Zellkulturen führte bei keiner der untersuchten Konzentrationen zu einem Anstieg der Proliferation der Astrozyten in diesem Zeitraum. Wir ermittelten hierfür die Zellzahl nach der 24-stündigen Behandlung und verglichen diese mit der Anzahl an Zellen, die vor der Stimulation ausgesät wurden. Eine Zunahme der Zellzahl nach 24-stündiger Behandlung im Vergleich zu der Zellzahl zum Zeitpunkt der Aussaat würde einen Proliferationsanstieg anzeigen. Ein Ausbleiben des Proliferationsanstiegs nach kontinuierlicher Applikation von 6-OHDA über mehrere Tage konnte innerhalb unseres Labors im Rahmen einer anderen Untersuchung bestätigt werden [bisher unveröffentlichte Daten aus unserer Arbeitsgruppe]. Die Zellzahl muriner Astrozyten in vitro änderte sich nach kontinuierlicher Applikation von 6-OHDA über mehrere Tage (1-10 Tage) nicht. Ein Anstieg der Proliferation, welcher in unbehandelten kortikalen und striatalen murinen Astrozytenzellkulturen über einen Kultivierungszeitraum von 10 Tagen in Medium (DMEM + 10% FCS) nachgewiesen werden konnte [bisher unveröffentlichte Daten aus unserer Arbeitsgruppe], bleibt bei einer kontinuierlichen Behandlung mit 6-OHDA über diesen Kultivierungszeitraum aus. In vitro Studien über das Proliferationsverhalten von murinen Astrozyten nach der Stimulation mit 6-OHDA sind nach meiner Kenntnis noch nicht durchgeführt worden. Es existieren aber bereits einige Studien in vivo, in denen ein Anstieg der Proliferation von Astrozyten nach der intraventriculären

kulären Injektion von 6-OHDA beobachtet wurde [Aponso et al. 2008; Wachter et al. 2010]. Aus der Divergenz dieser in vivo Studien zu unserer in vitro Studie kann gefolgert werden, dass zum Einen der in vivo beobachtete Proliferationsanstieg von Astrozyten nach Injektion von 6-OHDA nicht durch einen direkten Effekt des Neurotoxins auf astrozytäre Zielzellen, sondern vermutlich mittelbar durch die 6-OHDA bedingte Zerstörung der dopaminergen Projektionen hervorgerufen wurde. Weiter kann durch unsere Ergebnisse in vitro gefolgert werden, dass Astrozyten direkte Zielzellen von 6-OHDA darstellen und deren Proliferation durch das Neurotoxin 6-OHDA blockiert wird. Aufgrund der strukturellen Analogie, sowie der Verwendung des gleichen dopaminergen Transporters (DAT) [Schober 2004] ist ein ähnlicher Einfluss von 6-OHDA, wie der von Dopamin auf den Zellzyklus denkbar. In einer früheren Studie aus unserer Arbeitsgruppe zur Proliferation von Astrozyten in vitro konnte nachgewiesen werden, dass Dopamin nach einer 72-stündigen Stimulation in der Konzentration von 100 μM zu einer Inhibition der Proliferation von murinen striatalen Astrozyten führt. Dabei konnte eine erhöhte Apoptose durch Dopamin ausgeschlossen werden [Küppers et al. 2008]. Ohtani et al. (2003) entdeckten einen Zellzyklus- modulierenden Effekt von Dopamin. So führt die Aktivierung von D 1- Rezeptoren durch Dopamin zu einem verminderten Übertritt von Vorläuferzellen von der G 1 in die S- Phase und somit zu einem Arrest im Zellzyklus [Ohtani et al. 2003]. Die Aktivierung von D 2 Rezeptoren hingegen führt zu dem gegensätzlichen Effekt und forciert den Übertritt der Vorläuferzellen von der G 1 in die S- Phase und unterstützt dadurch die Mitose und Proliferation. In der ventrikulären Zone überwiegen D 1 Effekte, während in der subventrikulären Zone die D 2- vermittelten Effekte überwiegen. Zusammenfassend sind die D 1- vermittelten Effekte auf den Zellzyklus vorherrschend, da im embryonalen Neostriatum vermehrt D 1 Rezeptoren vorliegen [Ohtani et al., 2003]. Ein Arrest im Zellzyklus führt schließlich zu einem Proliferationsstopp. Danach ist es möglich, dass 6-OHDA ähnlich wie Dopamin den Übertritt von der G 1 in die S Phase verhindert was schließlich zu einem Stopp der Mitose und letztendlich zu einem Stopp der Proliferation führt. Zur genaueren Untersuchung dieser Hypothese sind jedoch weitere in vitro Experimente notwendig. Eine synchrone Behandlung der Kulturen mit 6-OHDA und Sulpiride oder SCH (SCH 23390), welche spezifisch

D 2/ D 3

[<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/A2729?lang=de®ion=DE>]

bzw. D 1 Rezeptoren hemmen [Molloy und Waddington 1984] kann bei der Evaluation helfen, ob 6-OHDA seinen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von Astrozyten über Dopaminrezeptoren entfaltet. Außerdem sollte die Expression von Zellzyklusmarkern nach Behandlung mit 6-OHDA genauer untersucht werden. Bromdesoxyuridin (BrdU) stellt ein synthetisches Analogon von Thymidin dar. Thymidin wird bei der DNS-Synthese als Nukleosid in die DNS eingebaut. Das synthetisch hergestellte BrdU wird in der S-Phase des Zellzyklus an der Stelle von Thymidin in die Zell-DNS eingebaut, da es ebenso dem Thymidinstoffwechsel (Thymidinkinase) unterliegt. Bei einer Behandlung von Zellen mit BrdU, nehmen all jene Zellen BrdU auf, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Zellen, welche sich in der S-Phase befinden und somit Proliferationsaktivität zeigen, können mit Hilfe von BrdU immunzytochemisch angefärbt und markiert werden [Gratzner 1982]. So könnte durch eine Markierung mit BrdU während der Stimulation mit 6-OHDA die Zellkerne, welche sich in der S-Phase befinden und Proliferationsaktivität zeigen markiert und festgestellt werden. Ein Vergleich zu Astrozyten, die nicht mit 6-OHDA stimuliert wurden würde dann klären, ob 6-OHDA einen modulatorischen Effekt auf den Zellzyklus ähnlich dem von Dopamin hat.

5.4 Effekte von 6-OHDA auf die Expression der Intermediärfilamente GFAP, Nestin und Vimentin in vitro

In unserer Studie beobachteten wir, dass 6-OHDA zu einer verminderten Expression der Intermediärfilamente GFAP und Nestin, aber zu keinem Unterschied in der Expression von Vimentin führt. Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der in vitro Untersuchungen von Yoo et al. (2005). Yoo et al. (2005) legten aus Hirngewebe neonataler (P 1- 3) Ratten Astrozytenzellkulturen an und stimulierten diese über 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an 6-OHDA (100 µM- 500 µM). Sie wiesen nach, dass die Zellen durch die Behandlung mit 100 µM 6-OHDA einen relativen Anstieg der Expression von Nestin zeigen. Doppelfärbungen zeigten, dass 100% der

Nestin- positiven Zellen auch GFAP koexprimierten. Im Gegensatz zu unserer Studie verwendeten Yoo et al. (2005) neonatale Ratten. Die Relevanz der untersuchten Spezies in Studien zur Expression dieser astrozytären Markerproteine konnten auch Ahlemeyer et al. (2013) belegen: Sie detektierten eine vermehrte Expression der astrozytären Marker Nestin, Vimentin, GFAP und S100 β in kultivierten Astrozyten aus Ratten im Vergleich zu Mäusen und werteten das als Hinweis für ein spezies- spezifisches Expressionsverhalten der astrozytären Marker [Ahlemeyer et al. 2013]. Diese spezies-spezifische Divergenz im Expressionsverhalten von Nestin, Vimentin und GFAP kann eine Erklärung für das Abweichen unserer Ergebnisse von den oben beschriebenen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen sein. Eine weitere Erklärung für dieses Abweichen könnte in Unterschieden im methodischen Vorgehen begründet sein: Yoo et al. (2005) stimulierten ihre Astrozytenzellkulturen mit einer mehr als drei Mal so hohen Dosis an 6-OHDA. Während wir in unserer Studie maximal mit 30 μ M 6-OHDA stimulierten, verwendeten Yoo et al. (2005) 100-500 μ M 6-OHDA. Yoo et al. (2005) fügten genauso wie wir in unserer Studie das Neurotoxin 6-OHDA zu DMEM. Außerdem stimulierten sie über den gleichen Zeitraum von 24 Stunden. In einer aktuellen in vitro Studie mit Astrozyten aus Hirngewebe von Ratten konnten Gupta et al. (2015) einen Expressionsanstieg von GFAP bereits nach der 24- stündigen Behandlung mit 10 μ M 6-OHDA feststellen. Sie verwendeten im Gegensatz zu uns DMEM (10% FCS) und FK12 Medium im Verhältnis 1:1. Da die Verwendung einer anderen Spezies in der Studie von Gupta et al. (2015) den einzigen grundlegenden Unterschied im Studienaufbau darstellt, erklären wir die Divergenz unserer Ergebnisse zu denen von Gupta et al. (2015) aufgrund des spezies-spezifischen Unterschiedes im Expressionsverhalten von Nestin, Vimentin und GFAP [Ahlemeyer et al. 2013]. Zusammenfassend beobachteten wir im Gegensatz zu anderen in vitro Studien eine verminderte Expression von GFAP und Nestin. Diese Unterschiede begründen wir durch ein spezies- spezifisches Expressionsverhalten der Intermediärfilamente von Ratten im Vergleich zu Mäusen [Ahlemeyer et al. 2013]. Neben der Stimulation mit 6-OHDA konnte bereits auch durch mechanische und physikalische Reize eine Reaktivierung von Astrozyten festgestellt werden. Durch Kältereiz [Yu et al. 2006], mechanische Schädigung [Yang et al. 2009 und 2010; Mao et al. 2009; Henning et al. 2008] oder das

Zufügen eines entsprechend konditionierten Mediums [Yang et al. 2009 und 2010] können Astrozyten reaktiviert werden. Sie bilden während dem als reaktive Gliose benannten Vorgang vermehrt GFAP aus, hypertrophieren, proliferieren [Anderson et al. 2013, Sofroniew 2010] und zeigen Eigenschaften die für eine De-Differenzierung sprechen [Sofroniew und Vinters 2010]. So re-exprimieren reaktive Astrozyten Intermediärfilamente wie Nestin und Vimentin, welche ansonsten v.a. von unreifen Astrozyten und Vorläuferzellen exprimiert werden [Sofroniew und Vinters 2010]. Die in unserer Studie durchgeführte in vitro Stimulation von Astrozyten mit dem Neurotoxin 6-OHDA konnte jedoch keine reaktive Gliose der Astrozyten auslösen. Weitere in vitro Studien über das Expressionsverhalten von GFAP, Nestin oder Vimentin nach der Stimulation muriner Astrozytenzellen mit 6-OHDA liegen nach meiner Kenntnis bisher noch nicht vor. Daher sollten weitere Studien angefertigt werden, in denen Astrozytenzellkulturen aus dem Hirngewebe neonataler Mäuse angefertigt werden. Dabei sollten die Unterschiede des Expressionsverhaltens von GFAP, Nestin und Vimentin nach der Stimulation über unterschiedliche Zeitintervalle (beispielweise 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden) und mit unterschiedlichen Dosen an 6-OHDA (beispielsweise von 10 μ M- 100 μ M) untersucht werden. Dadurch wäre ein besserer Vergleich zu bereits in der Literatur bekannten Studien an Ratten möglich. Weiter kann mit Hilfe unserer Studie ein Vergleich zu den Ergebnissen von bereits durchgeführten in vivo Studien angestellt werden. In vivo konnten Wachter et al. (2010) an Tag 4 post injectionem (intraventrikuläre Applikation von 105 μ g 6-OHDA) eine vermehrte Expression von GFAP-positiven Zellen (im Striatum 86% und im lateralen Kortex 78% der Zellen) in dem Hirngewebe adulter Ratten detektieren. Alle der GFAP- exprimierenden Zellen aus Striatum und Kortex waren laut Wachter et al. (2010) auch Nestin- immunpositiv. Zudem stellten Wachter et al. (2010) einen Anstieg an Vimentin- immunpositiven Zellen sowohl im Striatum, als auch im Kortex fest. Diese Zellen wurden durch immunzytochemische Färbungen als GFAP und Nestin koexprimierende Zellen identifiziert. Die Divergenz zu unseren Ergebnissen lässt sich auch hier möglicherweise nicht nur mit den Unterschieden zwischen in vivo (Wachter et al. 2010) und in vitro Modellen erklären, sondern auch durch spezies-spezifische Expressionsunterschiede von Nestin, GFAP und Vimentin. Wachter et al. (2010) untersuch-

ten darüberhinaus an Tag 4 post läsionem, was rein rechnerisch eine 4- fache Stimulationsdauer im Vergleich zu unserer Studie darstellt. Auch in weiteren in vivo Studien an Hirngewebe von Ratten konnte nach der Injektion von 6-OHDA nach verschiedenen Zeitpunkten (4, 7, 14 Tage) reaktive Gliose von Astrozyten mit einer vermehrten Expression von GFAP, Nestin und Vimentin festgestellt werden [Aponso et al. 2008; Dutra et al. 2012; Gomide et al. 2005; Wachter et al. 2010]. Stott und Barker (2014) stellten fest, dass murine Astrozyten verzögert, nämlich an Tag 6-9 post läsionem auf die Läsion mit 6-OHDA antworten. Erst ab Tag 9 post läsionem exprimierten sie vermehrt GFAP und proliferieren. Stott und Barker (2014) stimulierten das Striatum von 10 Wochen alten Mäusen mit 5 µg/µl 6-OHDA (0,030 molar) und untersuchten das Hirngewebe nach unterschiedlichen Zeitpunkten (3 und 6 Std., 1, 3, 6, 9 und 12 Tage post-läsionem) u.a. auf Veränderungen in der Expression von TH, GFAP und des Proliferationsverhaltens. Eine verzögerte Antwort von Astrozyten aus Mäusen [Stott und Barker 2014] kann als Begründung der Unterschiede der Ergebnisse in vivo [Aponso et al. 2008; Dutra et al. 2012; Gomide et al. 2005; Wachter et al. 2010] nach längerer Stimulation (4- 14Tage) herangezogen werden. Zusammenfassend konnten wir die detektierten Ergebnisse aus diversen in vivo Studien [Aponso et al. 2008; Dutra et al. 2012; Gomide et al. 2005; Stott und Barker 2014; Wachter et al. 2010] in unserer in vitro Studie nicht reproduzieren und schlussfolgern daraus, dass Astrozyten keine direkten Zielzellen von 6-OHDA in vitro darstellen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in vivo [Aponso et al. 2008; Dutra et al. 2012; Gomide et al. 2005; Stott und Barker 2014; Wachter et al. 2010], evoziert 6-OHDA in unserer in vitro Studie keinen Anstieg der Expression von GFAP, Nestin und Vimentin. Die vermehrte Expression der Intermediärfilamente wurde als Anzeichen einer De-Differenzierung gewertet [Wachter et al. 2010]. Die detektierten Effekte in vivo können durch die Zerstörung dopaminerger Strukturen durch 6-OHDA evoziert worden sein. In unseren Astrozytenzellkulturen wurden Nestin und GFAP vermindert exprimiert, was aber vielmehr für eine Differenzierung der Zellen sprechen würde.

5.5 Effekte von 6-OHDA auf die Expression des Transkriptionsfaktors Pax 6 in Astrozyten in vitro

Die semiquantitative RT-PCR Analyse zeigte keinerlei signifikante Unterschiede in der Expression von Pax 6 von behandelten (15 μ M und 30 μ M 6-OHDA; 24 Stunden) im Vergleich zu unbehandelten astrozytären Kulturen aus Striatum und Cortex der Maus. Nach meinem Kenntnisstand sind bisher in der Literatur keine Untersuchungen über das Expressionsverhalten von Pax 6 in Astrozyten in vitro nach Stimulation mit 6-OHDA beschrieben worden. In vivo Studien jedoch wiesen nach cerebroventrikulärer Injektion von 6-OHDA vermehrt Pax 6-immunpositive Zellen im Striatum und dem lateralen Kortex nach. Diese erhöhte Expression war beschränkt auf die Proteinebene und spiegelte sich nicht auf mRNA Ebene wider [Wachter et al. 2010]. Des Weiteren konnte in vivo gezeigt werden, dass die Pax 6-immunpositiven Zellen gleichzeitig GFAP, Nestin und Vimentin koexprimieren [Wachter et al. 2010]. Pax 6 stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der vorwiegend von radialen Gliazellen gebildet wird und während der Entwicklung eine wichtige Rolle spielt [Nacher et al., 2005; Lang et al., 2007]. Der Transkriptionsfaktor kann radialen Gliazellen neurogenetisches Potential verleihen und ist unerlässlich bei der Entwicklung radialer Gliazellen zu neuronalen Zellen des Kortex [Heins et al. 2002; Warren et al. 1999]. Neben Pax 6 stellen die Intermediärfilamente GFAP, Nestin und Vimentin Marker radialer Gliazellen dar. Aufgrund der detektierten vermehrten Expression dieser Marker nach intraventrikulärer Injektion von 6-OHDA stellten Wachter et al. (2010) die Hypothese auf, dass die Behandlung mit 6-OHDA Astrozyten de-differenziert in Richtung eines radialer Glia entsprechenden Phänotyps. In unserer in vitro Studie hat 6-OHDA keinen Einfluss auf die Expression des Transkriptionsfaktors Pax 6. Folglich finden wir in unserer in vitro Studie keine Hinweise auf eine durch 6-OHDA evozierte De-Differenzierung. Wir haben allerdings nur zu einem Zeitpunkt von 24 Stunden die Expression von Pax 6 untersucht. So könnte es erst ab späteren Zeitpunkten zu einer Änderung der Expression von Pax 6 kommen. Zumal Wachter et al. (2010) ihre Expressionsveränderung in vivo auch an Tag 4 post läsionem detektieren konnte. Hier wäre die Durchführung weiterer in vitro Studien zur Expression von Pax 6 nach der Stimulation

mit 6-OHDA zu unterschiedlichen Zeitpunkten, insbesondere nach dem gleichen Zeitintervall von 96 Stunden, wie in der Studie von Wachter et al. (2010) notwendig. Aufgrund spezie- spezifischer Unterschiede [Ahlemeyer et al. 2013] sollte sowohl ein in vitro Modell mit Hirngewebe aus neonatalen Ratten, wie auch aus neonatalen Mäusen angelegt werden. Sollten sich in Astrozyten- Kulturen aus Ratten nach einer Behandlung mit 6-OHDA keine vermehrte Expression von Pax 6 in striatalen und kortikalen Kulturen nachweisen lassen, wäre dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass die von Wachter et al. (2010) beobachtete De-Differenzierung eher durch die dopaminerge Depletion durch 6-OHDA evoziert wurde, als durch die direkte Wirkung des Neurotoxins auf die Astrozyten.

5.6 Effekte von 6-OHDA auf die Expression des Transkriptionsfaktors Sox 2 in vitro

Wir beobachteten nach der 24- stündigen Stimulation mit 30 μ M 6-OHDA eine Abnahme der Expression von Sox 2 im Kortex. Sox 2 ist ein Transkriptionsfaktor, der in sich selbsterneuernden Zellen und multipotenten Stammzellen des embryonalen Neuroepitheliums vorkommt [Komitova und Eriksson 2004]. Sox 2 kommt v.a. in Vorläuferzellen der Stammzellnischen des ausgereiften Gehirns von Wirbeltieren (SVZ und SGZ) vor und wurde in GFAP- immunpositiven Astrozyten gefunden [Komitova und Eriksson 2004]. Wachter et al. (2010) stellten die Hypothese auf, dass 6-OHDA nach der intraventrikulären Injektion in vivo eine De-Differenzierung von Astrozyten induzieren kann. Eine vermehrte Expression des Stammzellmarkers Sox 2 würde die Hypothese der De-Differenzierung von Astrozyten unterstreichen. Astrozyten hatten bereits in mehreren Studien die Potenz zur De-Differenzierung gezeigt [Wachter et al 2010; Yoo et al. 2005]. Neben 6-OHDA konnten auch andere Reize wie Kälte [Yu et al. 2006], mechanische Schädigung [Yang et al. 2009 und 2010; Mao et al. 2009; Henning et al. 2008] oder das Zufügen eines entsprechend konditionierten Mediums [Yang et al. 2009 und 2010] die Fähigkeit zur De-Differenzierung hervorrufen. Die in unserer Studie detektierte Abnahme der Expression von Sox 2 spricht hingegen gegen die Induktion einer De-

Differenzierung durch Behandlung mit 6-OHDA, sondern eher für eine Differenzierung in Richtung eines reifer Astrozyten entsprechenden Phänotyps. Studien in denen die Funktion von Sox 2 nicht erhalten ist zeigen eine Reduktion der Proliferation und Regenerationsfähigkeit. Weiter konnte nachgewiesen werden, dass ein Verlust von Sox 2 zur Ausbildung von Neoplasien und Fehlprogrammierung von reifen Zellen führt. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass der Alterungsprozess mit einem irreversiblen Rückgang der Expression von Sox 2 verbunden ist [Feng und Wen 2015]. Die von uns detektierte Abnahme der Expression von Sox 2 werten wir als Hinweis für das Vorliegen differenzierter, reifer Zellen. Die Expressionsabnahme von Sox 2 nach der Stimulation mit 6-OHDA steht im Widerspruch zu den Hinweisen für eine De-Differenzierung nach Stimulation mit 6-OHDA in vivo [Wachter et al. 2010]. Die Ergebnisse von Wachter et al. (2010) in vivo sind vermutlich indirekt durch die Zerstörung von dopaminergen Strukturen und nicht durch 6-OHDA selbst evoziert worden.

5.7 Effekte von 6-OHDA auf die Expression des Wasserkanals AQP 4 in vitro

Die Stimulation von striatalen und kortikalen murinen Astrozytenzellkulturen mit 6-OHDA (24 Stunden; 15 μ M und 30 μ M) führte zu keinen signifikanten Unterschieden in der Expression des Wasserkanals AQP 4. Dies steht im Widerspruch zu in vivo Daten von Wachter et al. (2010). Sie konnten bereits zeigen, dass die intraventrikuläre Injektion von 6-OHDA im Striatum und im lateralem Kortex von Ratten an Tag 4 post Läsionem zu einem Anstieg der Expression der mRNA des Wasserkanals AQP 4, insbesondere der Isoform M23 (32 kDa) im Striatum von Ratten führt. Auf proteinoener Ebene zeigte die Isoform M1 (34 kDa) nach 4 Tagen Stimulation mit 6-OHDA eine verminderte Expression. Diese widersprüchlichen Ergebnisse der mRNA und Westernblot Untersuchungen führten Wachter et al. (2010) auf unterschiedliche Stabilität und Umsatz der mRNA und des Proteins AQP 4 zurück. Bereits im intakten Gehirn von Ratten wurde eine unterschiedliche Expression der mRNA und des Proteins von AQP4 gezeigt und auf posttranskriptionale Regulation der AQP 4 Gen-Expression zurückgeführt [Moe et al.

2008]. In Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Expression des Wasserkanals AQP 4 mit der Proliferation verknüpft ist. Eine pharmakologische Blockade der Expression von AQP 4 führte zu einer verminderten Proliferation von Astrozyten [Wachter et al. 2010]. Weiter konnte festgestellt werden, dass 6-OHDA in vivo zu reaktiver Astroglie führt. Dieser Vorgang ist gekennzeichnet durch vermehrte Proliferation von Astrozyten, vermehrte Expression von GFAP, Nestin, Vimentin Pax 6 und schließlich auch AQP 4 [Wachter et al. 2010]. Weiter ist bekannt, dass im gesunden Gehirn der Wasserkanal AQP 4 eine entscheidende Rolle in der Ausbildung und Absorption von Hirnödemen spielt so kommt es nach einer Schädigung des Hirngewebes im Zuge der reaktiven Astroglie zu einer vermehrten Expression von AQP 4 an der Zellplasmamembran [Papadopoulos et al. 2008]. In unserer Studie führt hingegen die Stimulation von Astrozytenzellkulturen mit 6-OHDA in vitro zu keinen Veränderungen in der Expression von AQP 4. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen in vivo [Wachter et al. 2010]. Daher folgern wir, dass der von Wachter et al. (2010) beobachtete Anstieg der mRNA Expression von AQP 4 nicht direkt durch das Neurotoxin 6-OHDA hervorgerufen wurde, sondern vermutlich durch die Zerstörung dopaminerger Strukturen durch 6-OHDA. In unserer Studie wurden die Astrozyten anders als bei Wachter et al. (2010) über 24 Stunden stimuliert. Dies entspricht nur etwa 25% des Untersuchungszeitraumes von Wachter et al. (2010). Weiter führten wir unsere Untersuchungen an murinen Astrozytenzellkulturen und nicht wie Wachter et al. (2010) an Ratten durch. Ahlemeyer et al. (2013) konnten spezies-spezifische Unterschiede im Expressionsverhalten von Intermediärfilamenten, sowie morphologische Unterschiede zwischen Astrozyten aus Mäusen und Ratten feststellen, weshalb auch ein spezies-spezifischer Unterschied in der Expression von AQP 4 denkbar ist. Nach meiner Kenntnis existieren in der Literatur noch keine in vitro Studien über die Effekte von 6-OHDA auf die Expression des Wasserkanals AQP 4. Weitere Studien, in denen unterschiedliche Stimulationsintervalle (beispielsweise 12, 24, 48 und 72 Stunden), sowie mit höheren Konzentrationen an 6-OHDA (30 μ M, 50 μ M, 100 μ M 6-OHDA) stimuliert wird sollten zur weiteren Evaluation der bisherigen Ergebnisse durchgeführt werden.

5.8 Ausblick

In meiner Studie komme ich zusammenfassend zu dem Ergebnis, dass striatale und kortikale murine Astrozytenzellkulturen einerseits direkte Zielzellen von 6-OHDA darstellen und nach der 24-stündigen Behandlung mit 15 μM und 30 μM 6-OHDA bereits beschriebene Kurzzeiteffekte zeigen. Andererseits können wir nach unseren Untersuchungen *in vitro*, die bereits in Ratten beobachtete Tendenz zur De-Differenzierung *in vivo* [Wachter et al. 2010] nicht nachweisen. Die von uns in murinen Astrozyten detektierte verminderte Expression von GFAP, Nestin und Sox 2 kann eher als Anzeichen für eine Differenzierung gesehen werden und unterscheidet sich von den bereits mehrfach beschriebenen Ergebnissen anderer *in vitro* und *in vivo* Studien an Ratten [Aponso et al. 2008; Dutra et al. 2012; Gomide et al. 2005; Wachter et al. 2010]. Diese Studien stellten aufgrund ihrer Ergebnisse die Hypothese einer De-Differenzierung von Astrozyten nach Stimulation mit 6-OHDA auf. Neue Studienergebnisse können nun ein Erklärungsmodell für unsere Ergebnisse und die Anzeichen einer Differenzierung liefern: Ninkovic und Götz (2013) zeigten, dass Astrozyten das Potential zu einem direkten Ligawechsel von Glia- zu Neurogenese haben. Reaktive Astrozyten haben somit zum einen die Potenz zur De-Differenzierung - sie durchlaufen dabei den linear gerichteten Abstammungsweg in umgekehrter Richtung und re-exprimieren wie in vielen Studien beobachtet [Aponso et al. 2008; Dutra et al. 2012; Gomide et al. 2005; Wachter et al. 2010] dementsprechend auch Eigenschaften (Mehrexpression von Nestin, Vimentin und Pax6) ihrer Vorläuferzellen. Sie haben des Weiteren auch die Möglichkeit sich direkt zu postmitotischen, voll funktionsfähigen Neuronen umzuwandeln. Laut Ninkovic und Götz (2013) ist ein direkter Ligawechsel durch die forcierte Expression entsprechender Umweltfaktoren wie FGF oder auch neurogenetische Transkriptionsfaktoren wie Pax 6 möglich. Studien von Berninger et al. (2007) und Heins et al. (2002) unterstützen die Hypothese von Ninkovic und Götz (2013). Berninger et al. (2007) und Heins et al. (2002) konnten nämlich zeigen, dass postnatale murine Astrozyten in Kultur zu neuronalen Zellen re-programmiert werden können, sofern der Kultur über Retroviren der Transkriptionsfaktor Pax 6 [Heins et al. 2002] oder proneuronalen Gene Neurogenin-2 bzw. Mash 1

[Berninger et al. 2007] zugefügt wurden. Laut Ninkovic und Götz (2013) besteht nun die Möglichkeit neue Neurone auf verschiedene Wege nämlich durch De-Differenzierung oder durch den direkten, forcierten Wechsel der Zell-Liga zu bilden [Ninkovic und Götz 2013]. Weiter könnten auch beide eben beschriebenen Wege – De-Differenzierung und direkter Zellligawechsel- nebeneinander vorliegen. Ob nun in unserer Studie eines der beiden Modelle – De-Differenzierung oder Differenzierung durch direkten Ligawechsel- vorliegt, kann aufgrund der kurzen Kulturdauer von 24 Stunden nicht eindeutig festgestellt werden. Hierfür wären weitere Studien mit längeren Kultivierungszeiträumen nötig. Um das Potenzial einer Umprogrammierung und Differenzierung von Astrozyten zu Neuronen durch die Stimulation von Astrozytenzellen mit 6-OHDA evaluieren zu können, sollte außerdem die Expression von neuronalen Markern nach der Behandlung mit 6-OHDA untersucht werden. Berninger et al. (2007) verwendeten hierfür TuJ1. TuJ1 stellt einen monoklonalen Antikörper, der Neuronen-spezifisches beta- Tubulin detektiert dar [Memberg et Hall 1995]. Die Expression von beta Tubulin zeigt frühe molekulare Veränderungen in der neuronalen Differenzierung an [Memberg et Hall 1995] und wäre deshalb ein geeigneter Marker, eine neuronale Differenzierung und somit eine Umprogrammierung von Astrozyten zu Neuronen zu detektieren.

6 Zusammenfassung

Astrozyten haben das Potential unter pathologischen Verhältnissen im Gehirn reaktiviert zu werden und das Stadium unreifer, somit dedifferenzierter Zellen wieder zu erlangen. Durch diese Fähigkeit erlangen sie erneut ein Stammzellpotential, was durch Selbsterneuerung und Multipotenz gekennzeichnet ist. Hinweise auf einen möglichen Wechsel von Gliagenese zu Neurogenese schüren Hoffnungen in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen, wie Morbus Parkinson. In meiner Studie untersuchte ich, ob die erzielten Effekte von Wachter et al. (2010) in vivo direkt durch 6-OHDA oder durch dessen indirekten Effekt - die Zerstörung der dopaminergen Strukturen - erzielt wurde. Ich beobachtete die direkten Effekte des Neurotoxins 6-OHDA auf striatale und kortikale primäre Astrozytenzellkulturen aus Mäusen. Dabei untersuchte ich wie sich das Expressionsverhalten der Intermediärfilamente GFAP, Nestin und Vimentin durch die Stimulation mit 6-OHDA (15 und 30 μM) über 24 Std. verändert. Hierfür führte ich immunzytochemische Untersuchungen, sowie RT-PCR und Westernblot Experimente durch. 6-OHDA bewirkt erst ab einer Konzentration von 37,5 μM einen Abfall der Zellzahl, weshalb ich meine weiteren Experimente mit 15 und 30 μM 6-OHDA durchführte. Die immunzytochemischen Untersuchungen ergaben einen signifikanten Abfall der Expression von GFAP in der Kortex durch die Stimulation mit 30 μM 6-OHDA. Auf Transkriptionsebene konnte ich im Striatum bei der Behandlung mit 30 μM 6-OHDA eine signifikante Verminderung der Expression von GFAP und Nestin nachweisen. Um weiter zu untersuchen, ob 6-OHDA selbst eine De-Differenzierung von Astrozyten in vitro induzieren kann untersuchte ich neben den Intermediärfilamenten die Transkriptionsfaktoren Pax 6 und Sox 2. Pax 6 und Sox 2 werden normalerweise von radialen Gliazellen exprimiert und können somit als Anzeichen einer De-Differenzierung gesehen werden. Ich konnte eine signifikant verminderte Expression von Sox 2 auf Transkriptionsebene durch RT-PCR und quantitative Mengenbestimmung der Expression der mRNA bei einer Behandlung mit 30 μM 6-OHDA in der Kortex feststellen. Die Untersuchungen des Wasserkanals AQP 4 ergaben sowohl auf proteinogener wie auch genetischer Ebene keine signifi-

kanten Veränderungen der Expression nach Stimulation mit 6-OHDA. Mit den Ergebnissen meiner Studie wies ich nach, dass primäre Astrozytenzellkulturen aus postnatalen Mäusen Zielzellen von 6-OHDA sind. Nach der 24-stündigen Behandlung mit 15 und 30 μM 6-OHDA scheinen murine Astrozyten eine Tendenz zur Differenzierung aus zu bilden. Ich hatte stets eine verminderte Expression von GFAP, Nestin und Sox 2 festgestellt, welche bei einer De-Differenzierung vermehrt exprimiert werden würden. Dies unterscheidet sich zu den bisher detektierten Effekten der *in vivo* Studie von Wachter et al. (2010) an Ratten. Die Ergebnisse von Wachter et al. (2010) wurden vermutlich durch den indirekten Effekt von 6-OHDA - der Zerstörung von dopaminergen Strukturen und damit induzierten Mangel an Dopamin - erzielt. Um evaluieren zu können, welche direkten Effekte 6-OHDA auf primäre Astrozytenzellkulturen aus Ratten hat, werden weitere *in vitro* Studien an Ratten in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Denn die genauen Mechanismen, wie reife Astrozyten zu einer De-Differenzierung oder zu einem Wechsel ihrer Zelllinie erweckt werden können sind bisher unbekannt.

7 Literaturverzeichnis

Agre P (2006) The Aquaporine Water Channels. Proceedings of the American Thoracic Society Vol. 3, No.1: 5-13.

Ahlemeyer B, Kehr K, Richter E, Hirz M, Baumgart-Vogt E, Herden C (2013) Phenotype, differentiation, and function differ in rat and mouse neocortical astrocytes cultured under the same conditions. *J Neurosci Methods* 212(1):156-64. doi: 10.1016/j.jneumeth.2012.09.016.

Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV (2013) Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett.* pii: S0304-3940(13)01111-7. doi: 10.1016/j.

Aponso PM, Faull RL, Connor B (2008) Increased progenitor cell proliferation and astrogenesis in the partial progressive 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 151(4):1142-53. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.11.036.

Aumüller G, Aust G, doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch HG (2007) *Duale Reihe Anatomie S.1197-1198 Thieme Verlag 1.Auflage.*

Bayraktar OA, Fuentealba LC, Alvarez-Buylla A, Rowitch DH (2014) Astrocyte development and heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7(1):a020362. doi: 10.1101/cshperspect.a020362.

Berninger B, Costa MR, Koch U, Schroeder T, Sutor B, Grothe B, Götz M (2007) Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia. *J Neurosci.*27(32):8654-64.

Brodbeck DK (2010) Die psychosoziale Anpassung an Querschnittslähmung: Eine empirische Untersuchung S.9 Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen.

Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Götz M. (2008) Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(9): 3581-6.

Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevanovic M, Goodfellow PN, Lovell-Badge R (1996) A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes Sox-1 and Sox-2. *Development* 122 (2): 509-520.

Cookson MR, Pentreath VW (1994) Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. *Toxicol In Vitro.* 8(3):351-9.

Corti S, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Donadoni C, Salani S, Rizzo F, Nardini M, Riboldi G, Magri F, Zanetta C, Faravelli I, Bresolin N, Comi GP (2012) Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons. *Exp Cell Res.* 318

(13): 1528-41.

Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*. 247(4941):470-3.

Costa MR, Götz M, Berninger B (2010) What determines neurogenic competence in glia? *Brain Res Rev*. 63 (1-2): 47-59.

Dave J.M., Bayless K.J. (2014) Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting. *Microcirculation* doi: 10.1111/micc.12111.

De Pablo Y, Nilsson M, Pekna M, Pekny M (2013) Intermediate filaments are important for astrocytes response to oxidative stress induced by oxygen-glucose deprivation and reperfusion. *Histochem Cell Biol*. 140 (1): 81-91. doi 10.1007/s 00418-013-1110-0.

Duggal N, Schmidt-Kastner R, Hakim AM (1997) Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 768 (1-2): 1-9.

Dutra MF, Jaeger M, Ilha J, Kalil-Gaspar PI, Marcuzzo S, Achaval M (2012) Exercise improves motor deficits and alters striatal GFAP expression in a 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease. *Neurol Sci*. 33(5):1137-44. doi: 10.1007/s10072-011-0925-5.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acid protein: GFAP thirty-one-years (1969-2000) *Neurochem Res* 25 (9-10): 1439-1451.

Feng R, Wen J (2015) Overview of the roles of Sox2 in stem cell and development. *Biol Chem*. 396(8):883-91. doi: 10.1515/hsz-2014-0317.

Gilyarov AV (2006) Nestin in central nervous system cells. *Neurosci Behav Physiol* 38: 165-169.

Glinka Y, Gassen M, Youdim MB (1997) Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Journal of Neural Transmission* 50: 55-66.

Glinka Y, Tripton KF, Youdim MB (1998) Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-hydroxydopamine and its prevention by desferrioxamine. *Eur J Pharmacol*. 351(1): 121-9.

Gomide V, Bibancos T, Chadi G (2005) Dopamine cell morphology and glial cell hypertrophy and process branching in the nigrostriatal system after striatal 6-OHDA analyzed by specific stereological tools. *Int J Neurosci* 115(4):557-82.

Gratzner HG (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*. 218(4571):474-5.

Gupta S, Goswami P, Biswas J, Joshi N, Sharma S, Nath C, Singh S (2015). 6-Hydroxydopamine and lipopolysaccharides induced DNA damage in astrocytes: involvement of nitric oxide and mitochondria. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.*;778:22-36. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.12.007.

Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde YA, Götz M (2002) Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci.*5(4):308-15.

Henning J, Strauss U, Wree A, Gimsa J, Rolfs A, Benecke R, Gimsa U (2008) Differential astroglial activation in 6-hydroxydopamine models of Parkinson's disease. *Neurosci Res.* 62(4):246-53. doi: 10.1016/j.neures.2008.09.001.

Hewett JA (2009) Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. *J Neurochem.* 110(6): 1717-36. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06288.x.

Holmin S, Holmin S, von Gertten C, Sandberg-Nordqvist AC, Lendahl U, Mathiesen T (2001) Induction of astrocytic Nestin expression by depolarization in rats. *Neurosci Lett.* 314(3): 151-5.

<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/molecules/aqp1.gif> (Abfragedatum:22.2.2014)

http://annaschimkat.de/files/gimsgs/35_2000px-dopamin-dopamine-web.jpg
(Abfragedatum 22.2.2014)

<https://www.applichem.com/de/shop/produktdetail/as/trypanblau-ci-23850/>
(Abfragedatum: 04.10.2015)

<http://www.encorbio.com> (Abfragedatum: 22.2.2014)

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/A2729?lang=de®ion=DE>
(Abfragedatum: 04.10.2015)

<http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMIFilament.html>
(Abfragedatum: 22.2.2014)

Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P. (1994) Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91 (26): 13052-6.

Khakh BS, Sofroniew MV (2015) Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci.*18(7):942-52. doi: 10.1038/nn.4043.

Kimelberg HK (1983) Primary astrocyte cultures--a key to astrocyte function. *Cell Mol Neurobiol.* (1):1-16.

Komitova M, Eriksson PS (2004) Sox 2 is expressed by neuronal progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neurosci Lett.* 369(1): 24-7.

Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.*; 32:149-84. doi: 10.1146.

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 prolifer-

eration of astrocytes. *Eur J Neurosci.* 28(11):2173-82. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06531.x.

Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA (2007) Pax genes: Roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol.* 73(1): 1-14.

Magerkurth O (2003) Nachweis von saurem glialen Faserprotein (GFAP) in humanem Serum und erste klinische Ergebnisse. Medizinische Dissertationsschrift, Universität München.

Malatesta P, Appolloni I, Calzolari F (2008) Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res.*; 331(1):165-78.

Mao XG, Xue XY, Zhang X (2009) The potential of the brain: plasticity implications for de-differentiation of mature astrocytes. *Cell Mol Neurobiol.*29(8):1105-8. doi: 10.1007/s10571-009-9416-0.

Matyash V, Kettenmann H (2010) Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev.* 63(1-2): 2-10. doi: 10.1016/j.brainresrev.

McMillian MK, Thai L, Hong JS, O'Callaghan JP, Pennypacker KR (1994) Brain injury in a dish: A model for reactive gliosis. *Trends Neurosci.* 17 (4): 138-42.

Memberg SP, Hall AK (1995) Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin. *J Neurobiol.*27(1):26-43.

Middeldrop J, Hol EM (2011) GFAP in health and disease *Prog Neurobiol* 93: 421-443 doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.005.

Miller FD, Gauthier AS (2007) Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron.*; 54(3):357-69.

Moe SE, Sorbo JG, Sogaard R, Zeuthen T, Petter Ottersen O, et al. (2008) New isoforms of rat Aquaporin-4. *Genomics.*

Molloy AG, Waddington JL (1984) Dopaminergic behaviour stereospecific promoted by the D1 agonist R-SK & F 38393 and selectively blocked by the D1 antagonist SCH 23390. *Psychopharmacology (Berl)*; 82(4):409-10.

Nacher J, Varea E, Blasco-Ibañez JM, Castillo-Gomez E, Crespo C, Martinez-Guijarro FJ, McEwen BS (2005) Expression of the transcription factor Pax 6 in adult rat dentate gyrus. *J Neurosci Res.* 81(6): 753-61.

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 26 (10): 523-30.

Neely JD, Christensen BM, Nielsen S, Agre P (1999) Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry*; 38 (34): 11156-63.

- Nielson S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP (1997) Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci.* 17 (1): 171-80.
- Ninkovic J, Götz M (2013) Fate specification in the adult brain-lessons for eliciting neurogenesis from glial cells. *Bioessays* 35(3): 242-52.
- Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M (2012) Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol.* 814:23-45. doi: 10.1007/978-1-61779-452-0_3.
- Ohtani N, Goto T, Waeber C, Bhide PG (2003) Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence. *J Neurosci* 23(7):2840-50.
- Ordoñez C, Moreno-Murciano P, Hernandez M, Di Caudo C, Mundiñano IC, Vazquez N, Garcia-Verdugo JM, Sanchez-Pernaute R, Luquin MR (2013) Sox-2 positive neural progenitors in the primate striatum undergo dynamic changes after dopamine denervation. *PLoS One.* 8 (9). doi: 10.1371/annotation/e844adbf-7acf-4b7a-8eaa-46e356c5d9f5.
- Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS (2008) Aquaporins and cell migration. *Pflugers Arch* 456: 693-700.
- Puschmann TB, Dixon KJ, Turnley AM (2010) Species differences in reactivity of mouse and rat astrocytes in vitro. *Neurosignals.* 18 (3): 152-63. doi: 10.1159/000321494.
- Raicević N, Mladenović A, Perović M, Miljković D, Trajković V (2005) The mechanisms of 6-hydroxydopamine-induced astrocyte death. *Ann N Y Acad Sci.* 1048:400-5.
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2012) *Duale Reihe Biochemie S.796 Thieme Verlag 3.Auflage.*
- Robel S, Berninger B, Götz M (2011) The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev. Neurosci* 12: 88-104.
- Rowitch DH, Kriegstein AR (2010) Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature.*; 468(7321):214-22. doi: 10.1038/nature09611
- Saura J (2007) Microglial cells in strogial culturs: a cautionary note. *J Neuroinflammation.* 4: 26.
- Schober A. (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson`s disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 318(1): 215-24.
- Schildge S, Bohrer C, Beck K, Schachtrup C (2013) Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. *J Vis Exp.* (71). pii: 50079. doi: 10.3791/50079.
- Schitine C, Nogaroli L, Costa MR, Hedin-Pereira C (2015) Astrocyte heterogeneity in the brain: from development to disease. *Front Cell Neurosci.*9:76. doi: 10.3389/fncel.2015.00076.

Sergent-Tanguy S, Michel DC, Neveu I, Naveilhan P (2006) Long-lasting coexpression of nestin and glial fibrillary acid protein in primary cultures of astroglial cells with a major participation of nestin (+)/ GFAP (-) cells in cell proliferation. *J Neurosci Res.* 83(8): 1515-24.

Sirko S, Behrendt G, Johansson PA, Tripathi P, Costa M, Bek S, Heinrich C, Tiedt S, Colak D, Dichgans M, Fischer IR, Plesnila N, Staufenbiel M, Haass C, Snayyan M, Saghatelyan A, Tsai LH, Fischer A, Grobe K, Dimou L, Götz M (2013) Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. *Cell Stem Cell.* 12 (4): 426-39. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.019.

Stott SR, Barker RA (2014) Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 39(6):1042-56. doi: 10.1111/ejn.12459.

Sofroniew MC, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119: 7-35.

Sørnbø JG, Moe SE, Holen T (2007) Early upregulation in nasal epithelium and strong expression in olfactory bulb glomeruli suggest a role for Aquaporin-4 in olfaction. *FEBS Lett.*;581(25):4884-90.

Souza DG, Bellaver B, Souza DO, Quincozes-Santos A (2013) Characterization of adult rat astrocyte cultures. *PLoS One.* 8(3):e60282. doi: 10.1371/journal.pone.0060282.

Trepel M (2008) *Neuroanatomie Struktur und Funktion.* S.8-9 4.Auflage Urban&Fischer Verlag.

Wachter B, Schürger S, Rolinger J, von Ameln-Mayerhofer A, Berg D, Wagner HJ, Kueppers E. Effect of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on proliferation of glial cells in the rat cortex and striatum: evidence for de-differentiation of resident astrocytes. *Cell Tissue Res.* 342(2):147-60. doi: 10.1007/s00441-010-1061-x.

Wachter B (2011) The proliferation of rodent astrocytes –implications for a modulatory role of dopamine and aquaporin 4. *Naturwissenschaftliche Dissertationsschrift, Universität Tübingen.*

Warren N, Caric D, Pratt T, Clausen JA, Asavaritikrai P, Mason JO, Hill RE, Price DJ (1999) The transcription factor, Pax6, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex. *Cereb Cortex* 9(6):627-35.

Yang B, Brown D, Verkman AS (1996) The mercurial insensitive water channel (AQP-4) forms orthogonal arrays in stably transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 271(9): 4577-80.

Yang H, Cheng XP, Li JW, Yao Q, Ju G (2009) De-differentiation response of cultured astrocytes to injury induced by scratch or conditioned culture medium of scratch-insulted astrocytes. *Cell Mol Neurobiol.* 29 (4): 455-73. doi: 10.1007/s10571-008-9337-3.

Yang H, Qian XH, Cong R, Li JW, Yao Q, Jiao XY, Ju G, You SW (2010) Evidence for heterogeneity of astrocyte de-differentiation in vitro: astrocytes transform into intermediate precursor cells following induction of ACM from scratch-insulted astrocytes. *Cell Mol Neurobiol.* 30(3):483-91. doi: 10.1007/s10571-009-9474-3.

Yang Y, Higashimori H, Morel L (2013) Developmental maturation of astrocytes and pathogenesis of neurodevelopmental disorders. *J Neurodev Disord* 5(1): 22. doi: 10.1186/1866-1955-5-22.

Yoo YM, Lee U, Kim YJ (2005) Apoptosis and nestin expression in the cortex and cultured astrocytes following 6-OHDA administration. *Neurosci Lett.* 1-8;382(1-2):88-92.

Yu T, Cao G, Feng L (2006) Low temperature induced de-differentiation of astrocytes. *J Cell Biochem.* 99 (4): 1096-107.

Zeiss CJ (2005) Neuroanatomical phenotyping in the mouse: The dopaminergic system. *Vet Pathol.* 42 (6): 753-73.

Zhu H, Dahlström A (2007) Glial Fibrillary Acid Protein-Expressing Cells in the Neurogenic Regions in Normal and Injured Adult Brains. *J Neurosci Res.* 85 (12): 2783-92.

Zigmond MJ, Stricker EM (1972) Deficits in feeding behavior after intraventricular injection of 6-hydroxydopamine in rats. *Science* 177(4055): 1211-4

Erklärung zum Eigenanteil

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau PD. Dr. biol. hum. Eva Küppers, wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie Abteilung Neuroanatomie und Zelluläre Neurobiologie der Universität Tübingen.

Der überwiegende Teil der Versuche wurde von mir eigenständig durchgeführt. Vereinzelte Versuche wurden von Frau Sabine Conrad, medizinisch-technische Assistentin des Instituts für Anatomie Abteilung Neuroanatomie und Zelluläre Neurobiologie der Universität Tübingen durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau PD. Dr. biol. hum. Eva Küppers und Frau Dr. rer. nat. Britta Wachter.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Halblech, den 16.10.2015

Danksagung

Ich danke Frau PD. Dr. biol. hum. Eva Küppers für die hervorragende Betreuung und Hilfsbereitschaft. Ihre motivierende und fordernde Art, sowie die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens hat diese Arbeit zu dem gemacht was sie jetzt ist.

Weiter bedanke ich mich bei Frau Sabine Conrad für die grenzenlose Hilfsbereitschaft bei jeglichen Fragen im Labor und die freundliche Übernahme von Versuchen.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Britta Wachter, die mich als Küken in der Wissenschaft aufgenommen hat und mit mir die ersten Schritte gegangen ist.

Ein herzlicher Dank geht an meine Freunde, die mir immerzu unterstützend und liebevoll zur Seite standen. Hier möchte ich insbesondere Isabel Faude danken, die mir bei jeglichen Computerproblemen hilfsbereit zur Seite stand.

Zuletzt möchte ich noch meinen Eltern danken, die mich mit einer unglaublichen Geduld in den Belastungsspitzen gestützt haben und mich zu dem Menschen gemacht haben der ich jetzt bin.