

Aus dem Institut für Toxikologie
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**IN VITRO-UNTERSUCHUNG ZUR PROTEKTIVEN WIRKUNG
ENTZÜNDLICH-AKTIVIERTER MIKROGLIA
AUF ASTROZYTEN UNTER OXIDATIVEM STRESS**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

ELISABETH MARIE ARMBRUST

geboren in Rendsburg

Kiel 2013

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Claudia Röhl
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Alexa Karina Klettner

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 2014

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 29. Juli 2014

Gez.: Prof. Dr. Johann Roider

Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Publikationen von Ergebnissen dieser Doktorarbeit	IV
Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	6
2.1. Gliazellkulturen aus Rattengehirnen	6
2.1.1. Tiere (1-3 Tage alt)	6
2.1.2. Kulturmedium	6
2.1.3. Dissoziationslösung	6
2.1.4. Ablöselösung	6
2.1.5. DNase I – Lösung	7
2.1.6. Sonstiges	7
2.1.7. Präparation	7
2.1.8. Zellseparation	8
2.1.9. Aussaat von primären Gehirnzellen, Kulturdauer und Mediumwechsel	8
2.2. Astrozyten	9
2.2.1. Astrozytenkulturen	9
2.2.2. Astrozyten-konditioniertes Medium (AKM)	10
2.2.3. Immunzytochemische Färbungen	10
2.2.3.1. Antikörper	10
2.2.3.2. DAB (3,3'-Diaminobenzidin)	11
2.2.3.3. ABC-Reagenz (Avidin-Biotin-Enzymkonjugat)	11
2.2.3.4. Sonstiges	11
2.2.3.5. Durchführung	12
2.3. Mikroglia	14
2.3.1. Mikrogliakulturen	14
2.3.2. Mikroglia-konditioniertes Medium (MKM)	14
2.3.3. NO-Messung zur Bestimmung der Mikrogliaaktivierung	15
2.4. Ko-Kultur-Modell	16
2.5. Zelllinien C6 und B104	16
2.6. Versuchsaufbau	17
2.6.1. Aussaat der Zellen	17
2.6.2. Vorbehandlung mit Mikroglia-konditioniertem Medium (MKM)	17
2.6.3. Behandlung mit Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) und weiteren Substanzen (Cumolhydroperoxid [CHP], Trimethylzinn [TMT] und Natriumnitroprussid [SNP])	18
2.6.4. Endpunkte	18
2.7. Phasenkontrastmikroskopie	18
2.8. Proteinbestimmung nach Lowry	19
2.8.1. Lösung A	19

2.8.2. Lösung B	19
2.8.3. PBS-Puffer	19
2.8.4. BSA-Standardproben	20
2.8.5. Sonstiges	20
2.8.6. Durchführung	20
2.9. MTT Vitalitätstest	21
2.9.1. Substrat	22
2.9.2. Solubilisierungslösung	22
2.9.3. Geräte	22
2.9.4. Durchführung	22
2.10. Statistik	23
3. Ergebnisse	24
3.1. Charakterisierung des in vitro-Modells	24
3.2. Einfluss aktivierter Mikroglia auf die Empfindlichkeit von Astrozyten gegenüber H ₂ O ₂ -induziertem oxidativem Stress	26
3.3. Charakterisierung der protektiven Mikrogliawirkung auf Astrozyten	30
3.3.1. Einfluß der Dauer der Astrozyten-Vorbehandlung mit mikroglia- konditioniertem Medium auf die protektive Wirkung der Mikroglia ..	30
3.3.2. Dauer des protektiven Effekts gegenüber oxidativem Stress nach Beendigung der Astrozyten-Vorbehandlung mit Mikroglia- konditioniertem Medium	31
3.3.3. Abhängigkeit der protektiven Wirkung vom Grad der Mikrogliaaktivierung und des Zellkontakts zwischen Mikroglia und Astrozyten	33
3.3.3.1. Mikrogliaaktivierung <i>ohne</i> gleichzeitigen Astrozytenkontakt	33
3.3.3.2. Mikrogliaaktivierung <i>mit</i> gleichzeitigem Astrozytenkontakt	36
3.3.3.3. Einfluss des Zellkontakts auf die Stärke der Mikrogliaaktivierung	39
3.3.4. Einfluss der Mikrogliaaktivierung auf die Astrozytentoxizität anderer Substanzen (Cumolhydroperoxid (CHP), Natriumnitroprussid (SNP) und Trimethylzinnchlorid (TMT))	40
3.3.5. Einfluss der Mikrogliaaktivierung auf andere mit H ₂ O ₂ behandelte Zellarten	45
4. Diskussion	48
4.1. Charakterisierung des in vitro-Modells	48
4.1.1. Vorteile von in vitro-Systemen	48
4.1.2. Reinheitsgrad	48
4.2. Einfluss aktivierter Mikroglia auf die Empfindlichkeit von Astrozyten gegenüber oxidativem Stress	50
4.2.1. Erklärungen und Mechanismen für das beobachtete Phänomen (in vitro)	50
4.2.2. Übertragbarkeit (in vivo)	51

4.2.3. Dauer der Vorbehandlung	54
4.2.4. Dauer des protektiven Effekts	54
4.2.5. Stärke der LPS-induzierten Mikroglia-Aktivierung	55
4.2.6. Rolle des Zellkontakts	55
4.2.7. Anteil der Mikroglia im Kokulturmodell	56
4.2.8. Protektive Wirkung anderer Substanzen (TMT, CHP, SNP)	57
4.2.9. Protektive Wirkung auf andere Zellarten	58
4.3. Schlussfolgerung und Ausblick	59
5. Zusammenfassung	61
6. Literaturverzeichnis	VII
7. Danksagung	XV
8. Lebenslauf	XVI

Publikationen von Ergebnissen dieser Doktorarbeit

Artikel

Armbrust, E.; Röhl, C. (2008): *'Time- and activation-dependency of the protective effect of microglia on astrocytes exposed to peroxide-induced oxidative stress'*. Toxicology In Vitro. 22(5):1399-1404.

Röhl, C.; **Armbrust, E.**; Kolbe, K.; Lucius, R.; Maser, E.; Venz, S.; Gülden, M. (2008): *'Activated microglia modulate astroglial enzymes involved in oxidative and inflammatory stress and increase the resistance of astrocytes to oxidative stress in vitro'*. Glia. 56(10):1114–1126.

Röhl, C.; **Armbrust, E.**; Herbst, E.; Jess, A.; Gülden, M.; Maser, E.; Rimbach, G.; Bösch-Saadatmandi, C. (2009): *'Mechanisms Involved in the Modulation of Astroglial Resistance to Oxidative Stress Induced by Activated Microglia: Antioxidative Systems, Peroxide Elimination, Radical Generation, Lipid Peroxidation'*. Neurotox. Res. 17(4):317-331.

Tagungsbeitrag

Armbrust, E.; Röhl, C. (2007): *'Characterization of the astroprotective effect of activated microglia on oxidative stress-induced cell death: time- and activation dependency'*. 25th Cell Toxicology Workshop der SSCT in Salzau, Germany.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Anti-Gfap	Astrozyten-Antikörper
Anti-O4	Oligodendrozyten-Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
CHP	Cumolhydroperoxid
COX-2	Cyclooxygenase 2
d	Tage (days)
DNase	Desoxyribonuclease
FBS	Fetales bovines Serum (fetales Kälberserum)
FDU	5-Fluoro-2-Deoxyuridine
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein (saures Gliafaserprotein)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
h	Stunden (hours)
IF γ	Interferon gamma
IL-2	Interleukin 2
iNOS	NO-Synthase 2
LPS	Lipopolysaccharid
M.	Morbus
Map2	Neuronen-Antikörper
MKM	Mikroglia-konditioniertes Medium
MKM+	Mikroglia-konditioniertes Medium aktivierter Mikroglia
MKM-	Mikroglia-konditioniertes Medium ruhender Mikroglia
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	Methylthiazoltetrazolium (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid)
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
Ox-42	Mikroglia-Antikörper
PBS	Phosphat-buffered saline

PGE2	Prostaglandin E2
RECA-1	Endothelzellen-Antikörper
ROS	Reactive Oxygen Species/ Reaktive Sauerstoffspezies („Sauerstoffradikale“)
rPH	Fibroblasten-Antikörper
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase-Chain-Reaction
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
SIN-1	3-Morpholino-Syndnonimin
SNP	Sodiumnitroprussid
Sod2	Superoxiddismutase 2
TLR-4	Toll-like Rezeptor 4
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TMT	Trimethylzinnchlorid
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

Das Gewebe des Zentralen Nervensystems besteht aus vielen verschiedenen Zellen, bei denen man grundlegend zwischen den Nervenzellen (Neuronen) und den Gliazellen unterscheidet. Die Gliazellen machen den Hauptteil des menschlichen Gehirns aus, in dem sie zehnmal häufiger vorkommen als die Neurone. Zahlenmäßig stellen die Astrozyten die mit Abstand größte Fraktion der Gliazellen dar, gefolgt von den Oligodendrozyten, die durch Myelinscheidenbildung die Reizweiterleitung sicherstellen, sowie den Mikroglia-Zellen, den Immunzellen des Gehirns. Lange Zeit schrieb man den Astrozyten nur Stütz- und Ernährungsfunktionen zu („Nervenkitt“; Virchow, 1859), doch inzwischen weiß man, dass sie auch andere wichtige Rollen spielen. So kommt ihnen auch eine neuroprotektive Wirkung zuteil, bei der sie beispielsweise mit einer Glutathion-Ausschüttung einen oxidativen Schutz der Neurone bewirken. Eine weitere neuroprotektive Wirkung ist möglich, indem die Astrozyten das sich beim M. Alzheimer typischerweise in Form von Plaques ablagernde beta-Amyloid-Peptid aus dem Extrazellulärraum aufnehmen und abbauen können (Wyss-Coray et al., 2003). Möglicherweise spielt der Verlust dieser Fähigkeit eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des M. Alzheimer. Infolge von Interaktionen mit Mikrogliazellen und einer IL-6 Freisetzung konnte ebenfalls ein neuroprotektiver Effekt nachgewiesen werden (Eskes et al., 2002; Nakajima und Kohsaka, 2004; Streit, 2005). Auch an der Informationsverarbeitung sind Astrozyten beteiligt, indem sie über eine Regulierung der extrazellulären Glutamatspiegel die Aktivität benachbarter Neurone modulieren können. Des Weiteren kontrollieren sie die Homöostase des Extrazellulärraums, indem sie z. B. für die Aufrechterhaltung des K^+ -Haushaltes sorgen (Philippi et al., 1966). Darüber hinaus spielen sie eine Rolle in der Neurogenese und der Entstehung sowie der Funktionserhaltung der Blut-Hirnschranke (Dermietzel and Spray, 1998; Aschner et al., 2002). Die Astrozyten selbst sind untereinander über sogenannte Gap Junctions verbunden (Kettenmann et al., 1983), deren Astrozyten-spezifische Untereinheit als Connexin 43 identifiziert werden konnte. Die Permeabilität der Connexine wird u. a. durch Neurotransmitter, K^+ -Konzentration, Hormone sowie durch Zytokine beeinflusst. So führt z. B. TNF- α in primären Rattenastrozyten durch Phosphorylierung des Connexins 43 zu einer verringerten Kopplung der Zellen (Hinkerohe et al., 2005; Haghikia et al., 2008). Auch ein Transport zelltoxischer Substanzen durch die Gap Junctions ist möglich und kann so zur Schädigung benachbarter Zellen führen („Bystander-Effekt“; Rozental et al.,

2000). Astrozyten können also in verschiedenen Situationen und möglicherweise in Abhängigkeit unterschiedlicher Zytokine (ihren eigenen oder auch aus der Umgebung) sowohl neuroprotektive als auch neurodegenerative Wirkungen haben.

Gliazellveränderungen, die bei vielen pathologischen Zuständen auftreten und mit einer Hyperplasie und/ oder Hypertrophie mit einem Anstieg v. a. des GFAP (saures Gliafaserprotein) und Vimentins einhergehen, nennt man Astroglie (Eng und Ghirnikar, 1994). Man kann die anisomorphe (z. B. in Folge eines Traumas) von der isomorphen Astroglie (nicht-traumatisch bedingt) unterscheiden. Bei der anisomorphen Astroglie wird die Regeneration der geschädigten Neurone durch die Glianarbenbildung verhindert (Liberto et al., 2004). Hier findet man im Gegensatz zur isomorphen Astroglie auch eine viel stärkere und beständigere Hochregulierung des GFAP (Liberto et al., 2004). Die isomorphe Astroglie ist dagegen eher transient und mit einem neuroprotektiven Effekt assoziiert, z. B. durch Hochregulation antioxidativer Enzyme und Freisetzung neuronaler Wachstumsfaktoren (Desagher et al., 1996; Drukarch et al., 1998; Liberto et al., 2004). Noch weiß man wenig über die genauen molekularen und zellulären Mechanismen, die zu einer isomorphen Astroglie führen. Es wird jedoch vermutet, dass die Mikrogliaaktivierung ursächlich eine entscheidende Rolle spielt, da der Astroglie in der Regel eine Mikrogliaaktivierung vorausgeht oder sie die Astroglie begleitet (Herber et al., 2006; Iravani et al., 2005). Außerdem weiß man, dass Zytokine, wie sie von aktivierter Mikroglia zahlreich sezerniert werden (Hanisch, 2002; Nakajima und Kohsaka, 2004), die Astroglie begleiten oder einleiten (Herber et al., 2006; Iravani et al., 2005; Moynagh, 2005; Rostworowski et al., 1997) und Neurodegeneration induzieren und/ oder verschlimmern können (Liu und Hong, 2003; Block und Hong, 2005).

Mikrogliazellen sind die Hauptproduzenten proinflammatorischer Zytokine im ZNS. Diese Zellen, auch Hortega-Zellen genannt, machen 5-20 % der Gliazellen aus und sind professionelle Makrophagen des Gehirns mit antigen-präsentierenden Eigenschaften über MHC-2-Moleküle (Aloisi, 2001). In einem normalen erwachsenen Gehirn geht man davon aus, dass die Mikrogliazellen in einer funktionell inaktiven, ruhenden Form vorliegen mit typischerweise kleinen Zellkörpern und langen Fortsätzen (resting-ramified-type, „RRT“). In der aktivierten Form nehmen die Zellen eine amöboide, phagozytierende Form an (Streit et al., 1999), weswegen man sie auch als round-phagocytic-type („RPT“) bezeichnet. *In vivo* Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass auch ruhende Mikroglia ihre Umgebung fortwährend abtastet. Hierbei erfolgt eine Interaktion mit den anderen Zellen des Gehirns, was wichtig für die intakte Hirnfunktion zu sein scheint (Nimmerjahn et al., 2005).

Eine Aktivierung der Mikroglia kann man bei vielen neuropathologischen Veränderungen beobachten (z. B. Verletzungen, Ischämien, neurodegenerative Erkrankungen wie erbliche Leukodystrophien und neuroinflammatorische Erkrankungen wie Multiple Sklerose), wobei sie auf Endotoxine oder eine Schädigung neuronaler oder glialer Zellen mit der Sekretion einer Vielzahl proinflammatorischer und neurotoxischer Faktoren reagieren. Hierzu gehören u. a. IL-1- β , IL-2, IL-3, IL-6, TNF α , VEGF, IF γ , NO (Stickstoffmonoxid), O $_2^-$, PGE $_2$ und Peroxide (Beckman et al., 1996; Hanisch, 2002; Stoll, 2002), wobei die Mikrogliaaktivierung in unseren Versuchen über die NO-Produktion gemessen wurde. Bis zu einem gewissen Grad kann dem NO eine entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben werden, doch werden große Mengen produziert, kann es ebenso gewebeschädigend sein (Clancy et al., 1998). Die Aktivierung der Mikrogliazellen in dieser Arbeit erfolgte mit LPS (Lipopolysaccharide). Dies ist ein Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien. LPS ist bekannt als potenter Immunstimulator, der bei Mikroglia-Zellen eine hohe und vielfältige Ausschüttung oben genannter proinflammatorischer Substanzen bewirkt (Weinstein et al., 2008; Beckman et al., 1996; Hanisch, 2002). Des Weiteren verursacht LPS einen mikroglialen Anstieg der iNOS (induzierbare NO-Synthetase) (Fiebich B.L. et al. 1998) und COX-2 (Cyclooxygenase 2), welche wiederum in der Prostaglandinsynthese und damit der Entstehung von Schmerz, Fieber und Entzündung eine zentrale Rolle spielen (DeWitt, 1999). Hinsichtlich der Bedeutung der Mikroglia-Zellen bei Tumorerkrankungen im ZNS gibt es widersprüchliche Annahmen. Einerseits kann die Fähigkeit der Mikroglia, eine Vielzahl immunmodulatorischer Zytokine zu sezernieren, das Wachstum eines Glioms fördern. Andererseits ist beschrieben worden, dass Mikroglia ebenso gegen die Proliferation von Tumorzellen fungieren kann (Badie und Schartner, 2001). Die Astrogliazellen sezernieren jedoch auch selbst immunsuppressive Faktoren, wodurch die Mikroglia generell in ihrer Funktion als Immunzellen gehemmt wird (Badie und Schartner, 2001). Mögliche positive sowie auch negative Effekte aktivierter Mikroglia stehen also in Abhängigkeit von Art und Ausmaß der Stimulation.

Oxidativer Stress tritt bei vielen neurodegenerativen und -inflammatorischen Erkrankungen auf, ebenso bei Ischämien und Traumata. Das ZNS ist besonders anfällig für Schäden durch oxidativen Stress. Obwohl es nur 2-5 % des Körpergewichts ausmacht, beansprucht es 15 % des Herzminutenvolumens für sich. Der hohe Sauerstoffbedarf (3,5 ml O $_2$ / 100mg/ Minute) steht hierbei in Diskrepanz zur sehr kurzen Toleranzzeit neuronaler Zellen gegenüber einer Ischämie. Bereits nach 4-12 Sekunden Hypoxie können Ausfallssymptome auftreten und nach 8 bis 10 Minuten entstehen irreversible Schäden (Kuschinsky, 1991). Ebenfalls spielen das

Vorhandensein exzitotoxischer und autooxidierbarer Neurotransmitter, hohe Konzentrationen von Mangan und Eisen, ein hoher Anteil an ungesättigten Fettsäuren sowie Enzyme wie Superoxidismutasen und Monoaminoxidasen eine wichtige Rolle für die besondere Anfälligkeit des ZNS gegenüber oxidativem Stress (Ames et al., 1993).

Allgemein sind unterschiedliche Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress bekannt. Der Körper besitzt beispielsweise diverse „Radikalfänger“ in Form von Enzymen (Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Coenzym Q), Hormonen und Vitaminen (Vitamin A, Vitamin C, Vitamin E). Sie greifen in Redoxreaktionen ein und bewirken durch Abgabe eigener Elektronen, dass aus freien Radikalen stabile Moleküle werden, wobei die Oxidation und damit mögliche Schädigung anderer Substanzen verhindert wird („Scavenging“). Weiterführende Untersuchungen inklusive einer Proteomanalyse konnten zeigen, dass eine Mikrogliaaktivierung durch LPS die Expression mehrerer antioxidativer Enzyme in den Astrozyten induziert (z.B. Superoxiddismutase und Hämoxigenase) und ein Anstieg der Glutathionkonzentration in den Astrozyten stattfindet (Röhl et al., 2009). Reduktionsmittel, wie z.B. Glutathion, welche ein sehr niedriges Redoxpotential besitzen und viel leichter oxidiert werden als andere Substanzen in ihrer Umgebung, bieten eine weitere Möglichkeit antioxidativen Schutzes. Die Behandlung von Astrozyten mit dem Monoethylester des Glutathions bewirkt einen starken und langanhaltenden Anstieg des mitochondrialen Glutathiongehaltes der Zellen und verringert die Zelltoxizität von H_2O_2 oder 3-Morpholino-Syndnonimin (SIN-1) (Muyderman et al., 2007). Ein weiterer Schutzmechanismus des Körpers gegenüber oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoff-Spezies, die in der Fenton-Reaktion entstehen ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\cdot + \text{OH}^-$), ist die Ausbildung von Chelatkomplexen durch Bindung von Eisen. Wu et al. (2012) wiesen in einer Studie mit Mäusen die neuroprotektive Wirkung der Vor-/ Nachbehandlung mit dem Eisenchelatbildner 2,2'-Dipyridyl bei intrazerebralen Hämorrhagien nach. Es zeigten sich eine reduzierte Mikroglia-Aktivierung, verminderte ROS-Produktion (reaktive Sauerstoffspezies) und Reduzierung des neuronalen Zelltods.

Für die Entwicklung therapeutisch nützlicher Strategien zur Vermeidung des Auftretens und/ oder der Progredienz neuronalen Zellschadens ist es förderlich, die genauen Interaktionen zwischen Astrozyten und Mikroglia besser zu verstehen. Ziel dieser Arbeit war es daher, mithilfe eines geeigneten in vitro-Modells die Wirkung aktivierter Mikroglia auf die Resistenz von Astrozyten gegenüber oxidativem Stress zu untersuchen. Durch die Verwendung aufgereinigter Astrozyten- und Mikroglia-monokulturen als Voraussetzung für die Etablierung

definierter Kokulturmodelle wurde eine differenzierte Zuordnung von Wirkungen und Effekten dieser beiden Zellarten im Zusammenhang mit oxidativem Stress ermöglicht. Zunächst wurde die Toxizität ausgewählter Prooxidantien auf Astrozyten in der Zellkultur untersucht. Dann wurde untersucht, ob LPS-stimulierte Mikroglia die toxische Wirkung der Prooxidantien modulieren können. Schließlich wurde der hierbei nachgewiesene protektive Effekt aktivierter Mikroglia im Detail untersucht. Hierzu wurden die Parameter identifiziert, die für die protektive Mikrogliawirkung von Bedeutung sind, wie z.B. die Stärke und Länge der Aktivierung oder die Rolle des Zellkontakts mit Astrozyten. Des Weiteren wurde untersucht, wie diese Parameter moduliert werden können und welchen Effekt dies auf die schützende Wirkung der Mikrogliazellen hat.

2 Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden werden im Folgenden beschrieben.

2.1. Gliazellkulturen aus Rattengehirnen

Die Primärkulturen wurden aus den Gehirnen von 1-3 Tage alten Wistar-Ratten präpariert, basierend auf der Methode von McCarthy und DeVellis (1980).

Material

2.1.1. Tiere (1-3 Tage alt)

- Wistar-Ratten (Viktor-Hensen-Tierhaus der Universität Kiel)

2.1.2. Kulturmedium

- 85% (v/v) DMEM[®] high glucose 4,5 g/l (Dulbecco's modified Eagle's Medium, no. E15810, PAA)
- 10% (v/v) FBS (fetales bovines Serum, no. 10270, Gibco Invitrogen), für Astrozytenkulturen bei 56°C inaktiviert, für Mikroglia bei 44°-53°
- 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin [Sigma]

2.1.3. Dissoziationslösung

- 10 ml Kulturmedium *ohne* FCS
- 0,024 mg HEPES ([4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure), [Sigma]
- 0,02 mg Trypsin (Typ III) [Sigma]
- 0,002 mg Titriplex II C₁₀H₁₆N₂O₂ (EDTA= Ethylendiamintetraessigsäure) [Merck; Art. 8417]

2.1.4. Ablöselösung

- 25 ml PBS *ohne* Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺
- 0,003 g Trypsin

- 0,03 g Titriplex II

2.1.5. DNase I – Lösung

- 1 mg/ml DNase I (Desoxyribonuclease I, E.C.3.1.21.1), [Boehringer Mannheim]
- PBS Dulbecco® (Phosphat-buffered saline) *ohne* Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺, [PAA]

2.1.6. Sonstiges

- Pipettenspitzen [Sarstedt]
- Filtropur (Poren-Ø: 0,2µm) [Sarstedt]
- 10 und 50 ml Röhrchen [Sarstedt]
- Einmalspritzen [Henke/ Sass/ Wolf]
- Plastikpipetten [Sarstedt]
- Einmalreagenzgläser (15ml) [Sarstedt]
- 6-, 24-, 96-Mikrowell-Platten [Sarstedt]
- 25 und 75 cm² Flaschen [Sarstedt]
- Deckgläschen aus Glas
- PBS Dulbecco® (Phosphat-buffered saline) *ohne* Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ [PAA]
- Begasungsbrutschrank (37°C) [Heraeus]
- Zentrifuge [Heraeus]
- FDU (5-Fluoro-2-Deoxyuridine) [Sigma F-0503]
- L-Glutamin [PAA M11004]
- Schüttler Type R010 [Gerhardt Bonn]

Methode

2.1.7. Präparation

Die Präparation begann mit der Dekapitierung der neugeborenen Ratten mit einem Skalpell kaudal der Ohren. Die Schädelkalotte wurde mit einer Schere freigelegt und aufgetrennt, so dass das Gehirn entnommen werden konnte. Bis zum Beginn der folgenden Präparationsschritte wurden die Gehirne in gekühlter PBS-Lösung ohne Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ aufbewahrt. Diese Ionen sind wichtig für bestimmte Zellverbindungen (z.B. Cadherine und Integrine). Auf ihre

Verwendung wurde verzichtet, um diese Proteinstrukturen nicht zu stabilisieren und so später eine erleichterte Zellseparation mittels Trypsin erreichen zu können. Nun wurden die Gehirne unter der Sterilbank zwei weitere Male mit PBS-Lösung ohne Ca^{++} und Mg^{++} gespült. Die Hemisphären wurden vom Hirnstamm abpräpariert. Des Weiteren wurden der Hippocampus, die Plexus choroidei und die Meningen entfernt, um eine Verunreinigung der Kultur mit meningealen Zellen und Fibroblasten zu vermeiden. Auf die Verwendung des Hippocampus wurde aufgrund der großen Anzahl neuronaler Zellen verzichtet.

2.1.8. Zellseparation

Die Hemisphären wurden erneut mit PBS-Lösung ohne Ca^{++} und Mg^{++} gespült, um Serumreste und Kationen zu entfernen, welche die Wirkung des Trypsins beeinträchtigen können. Bis zu fünf Hemisphären wurden in eine kleine Plastikpetrischale gegeben und mit dem Skalpell in etwa 1 mm^3 große Stücke zerteilt. Diese wurden mit einer Pipette in ein 10 ml Röhrchen gegeben, aus dem der Überstand vorsichtig abgesaugt wird. Anschließend wurden 3 ml Dissoziationslösung sowie 35 μl DNase-Lösung hinzugegeben. Das Trypsin in der Dissoziationslösung ist eine alkalische Pankreasprotease und diente dazu, die Zell-Matrix-Verbindungen anzudauen sowie die Zellen von der Kulturunterlage abzulösen („*Detachment*“). Die DNase diente der Zerstörung externer DNA, welche das Verklumpen der Zellen fördert. Das Gemisch wurde geschüttelt und für 30 Minuten in den Brutschrank gestellt, wobei nach 15 Minuten erneut geschüttelt wurde. Nach dieser Zeit wurde die Dissoziationslösung abgesaugt und das Röhrchen mit 2 ml Medium sowie 50 μl DNase aufgefüllt. Zu lange Einwirkzeiten können irreversible Schäden der Vitalität der Zellen bewirken. Zwei silikonisierte Pasteurpipetten wurden über dem Brenner einmal nur leicht und einmal etwas stärker zugeschmolzen. Die Zellen wurden zuerst sieben bis acht Mal mit der weiteren Pipette auf- und abpipettiert und dann ca. drei Mal mit der engeren Pipette. Dadurch entsteht eine homogene Zellsuspension.

2.1.9. Aussaat von primären Gehirnzellen, Kulturdauer und Mediumwechsel

Die Zellen von zwei Hemisphären wurden in 8 ml Kulturmedium (DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium, no. 41965, Gibco Invitrogen), ergänzt mit 10 % (v/v) FBS (bei 56°C Hitze-inaktiviert) (fetal bovine serum, no. 10270 (Gibco Invitrogen), 1 % (v/v) Penicillin/

Streptomycin und 0,1 % (v/v) Amphotericin B), in drei Kulturflaschen (25 cm²) gegeben. Die Hitzeinaktivierung bei 56°C erfolgte zur Beseitigung bzw. Verringerung störender Einflüsse infolge der Zerstörung von beispielsweise Komplementfaktoren, Fibrinogen, Lactatdehydrogenase (LDH), alkalischer Phosphatase sowie der Inaktivierung von Viren und Mykoplasmen. Da mit der Hitzeinaktivierung des Serums jedoch auch eine Abnahme der wachstumsfördernden Eigenschaften einhergeht, wurde das Kulturmedium für Mikrogliazellen nur bei einer Temperatur von 44-53°C inaktiviert, da sich dieser Bereich als geeigneter für die gewünschte Mikroglia proliferation erwiesen hatte. Das Amphotericin B sollte ein eventuelles Pilzwachstum verhindern. Die Mikrogliazellen proliferierten im gemischten Monolayer im Zellverband und lösten sich dann vom Boden ab, um sich als aufschwimmende Zellen darzustellen. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel, jedoch ohne Amphotericin B über das Wochenende, da sonst eine zu starke Mikroglia proliferation die Folge ist.

2.2. Astrozyten

2.2.1. Astrozytenkulturen

Basierend auf der Methode von McCarthy und DeVellis (1980) ist es möglich, nahezu reine Astrozytenkulturen (>97%) zu erhalten. Der Anteil an Mikroglia wurde mit einer immunzytochemischen Ox-42 Färbung bestimmt und beträgt weniger als 0,5 %.

Am 9. Tag wurden die Kulturflaschendeckel mit Parafilm umwickelt, die Kulturflaschen mit Klebeband auf dem Schüttler befestigt und über Nacht bei Stärke 8 (ca. 400-500 Umdrehungen pro Minute) rotierend geschüttelt. Hierdurch sollten v. a. die Oligodendrozyten abgeschüttelt werden. Am nächsten Morgen wurde das Medium gewechselt und 5-Fluoro-2-Deoxyuridine (FDU) und Amphotericin B hinzugefügt. Das FDU wurde eingesetzt, um speziell schnellproliferierende Zellen wie Fibroblasten im Wachstum zu hemmen. Nach insgesamt 14 Tagen fand eine Subkultur statt, wobei die Zellen mit einer Dichte von 30.000 Zellen/cm² in Mikrotiterplatten ausgesät wurden.

Wenn noch viel Mikroglia in den Kulturen vorhanden war, wurde ein Preplating durchgeführt. Hierbei wurden die Astrozyten in 75 cm²- Kulturflaschen mit 12 ml Medium überführt, 10 Minuten in den Brutschrank gestellt, wobei sich die Mikroglia am schnellsten absetzte. Anschließend wurden die Astrozyten abgesaugt, was allerdings auch zu einer deutlichen Dezimierung der Astrozyten führte. Die Zellen wuchsen bei 37 °C und 7,8 % CO₂. Das

Wachstumsmedium wurde 3 x pro Woche gewechselt (310 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$). Die Experimente fanden nach 7-8 Tagen statt.

2.2.2. Astrozyten-konditioniertes Medium (AKM)

Um AKM (Astrozyten-konditioniertes Medium) für die Mikroglia Kultivierung vor den Experimenten zu gewinnen, wurden Astrozyten in 75 cm^2 Flaschen ausgesät und mit 20-40 ml Wachstumsmedium für 24 Stunden versorgt.

2.2.3. Immunzytochemische Färbungen

Um den Reinheitsgrad der primären und sekundären Zellkulturen zu bestimmen, wurden immunzytochemische Zellfärbungen durchgeführt. Die Astrozytenkulturen wurden ohne Vorbehandlung am Tag 14 in Aceton fixiert und anschließend gefärbt.

Material

2.2.3.1. Antikörper

Primäre Antikörper

- Anti-Gfap polyklonaler Gfap-Marker, Verdünnung 1:100, [DAKO; Z033401096501-1006]
- GalC anti-Maus-IgG, Oligodendrozyten-Marker, Verdünnung 1:100 [Boehringer]
- Anti-O4 monoklonaler Oligodendrozyten-Marker, Verdünnung 1:50 [Sigma;O7139-50UG/035K1434]
- Anti-OX-42 (CD11b/c) Maus-IgG gegen Mikroglia, Verdünnung 1:200, [Harlan Seralab, MAS370]
- MAP-2 monoklonaler Neuronen-Marker, Verdünnung 1:1000, [Sigma; No. M-4403]
- RECA-1 Endothelzell-Marker, [AbD Serotec; MCA97061]
- rPH monoklonaler Fibroblasten-Marker [Acris; AF5110-1]

Sekundäre Antikörper

biotinyliert

- biotinylierter Anti-Maus IgG (H+L) Verdünnung 1:300; [VECTOR; BA-9200; Lot: K0212]
- Vectastain[®] biotinylierter Antikörper IgG (H+L) Anti-Rabbit, made in goat, [VECTOR; BA-1000, Lot: R0720]

fluoreszenzmarkiert

- Cy3 Ziegen-Anti-Maus IgG (H+L) Verdünnung 1:300, [Jackson Immuno Research; Code 115-165-062; Lot: 45689]
- Cy3 Ziegen-Anti-Kaninchen IgG (H+L) Verdünnung 1:150, [Jackson Immuno Research]

2.2.3.2. DAB (3,3'-Diaminobenzidin)

[peroxidase substrate kit, Vector Lab., USA (SK-4100)]

- 1 ml Aqua dest.
- 20 µl Puffer 7,5
- 20 µl H₂O₂
- 40 µl DAB Substratreagenz

2.2.3.3. ABC-Reagenz (Avidin-Biotin-Enzymkonjugat)

[Vectastain Elite ABC kit standard, Vector Lab., USA (PK-6100)]

- 1 ml PBS
- 20 µl A (Avidin)
- 20 µl B (Biotin)

Die ABC-Reagenz wurde 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt.

2.2.3.4. Sonstiges

- Mayers Hämalaun
- bovines Serum Albumin in PBS (BSA), Harlan Sera-Lab, England [MAS 370]
- Aceton [Merck]
- PBS *ohne* Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ [PAA]

- Immu-Mount [Thermo; no. 9990402]
- Mikroskop mit DIC Optik [Zeiss Axiophot]

Methode

2.2.3.5. Durchführung

Die Methode der immunzytochemischen Färbung beruht auf einem Schlüssel-Schloss-Prinzip: der primäre Antikörper bindet an sein spezifisches Antigen. Der Sekundärantikörper stammt aus einer anderen Spezies, bindet an den primären Antikörper und ist mit Biotin markiert (=biotinyliert) bzw. fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurde ein Avidin-Biotin-Enzymkonjugat hinzugegeben, welches aufgrund der hohen Affinität von Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) und Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin an dieses bindet.

Als Substrat der Peroxidase wurde DAB (3,3'-Diaminobenzidin) angeboten, welches unter Ausbildung eines braunen Farbtons oxidiert wurde.

Das Prinzip der Fluoreszenz ist, dass Fluorochrome mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden können, weil diese Stoffe die Eigenschaft besitzen, bei Anstrahlung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge, dieses zu absorbieren, einen höheren Energiezustand ihrer Atome erreichen und daraufhin Licht unterschiedlicher Wellenlänge aussenden, das für das menschliche Auge als Farbe sichtbar wird.

Für die immunzytochemischen Färbungen wurden primäre aufgereinigte Astrozytenkulturen gefärbt. Die Zellen auf Deckgläschen wurden drei Mal mit PBS ohne Ca^{++} und Mg^{++} gespült und für 10 Minuten mit Aceton bei 4°C fixiert. Danach wurde wieder mit PBS gespült. Für die DAB-Färbung (Gfap und Map2) wurde zur Hemmung der endogenen Peroxidase 30 % H_2O_2 auf die Zellen (1:10 verdünnt) gegeben, 30 Minuten gewartet und anschließend wieder mit PBS gespült. Dieser Schritt ist wichtig, weil die endogene Peroxidase ebenfalls mit dem Chromogen DAB reagieren kann und so zu einem falsch-positiven Ergebnis mit unspezifischem Hintergrund führen kann. Nun wurde zum Blocken BSA 1 % für 30 Minuten hinzugegeben, um zu verhindern, dass der Primärantikörper an unspezifische Bindungsstellen bindet. Nach dieser Zeit wurde nicht gespült, sondern nur das BSA abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit dem entsprechenden primären Antikörper für die zu färbende Zellart (s.o.) 45 Minuten inkubiert. Nun wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gespült und dann mit einem zweiten Antikörper inkubiert (biotinylierten Ziegen Anti-Maus Antikörper IgG [H+L], für Gfap

Anti-Rabbit, für Fluoreszenz Cy3) (45 min.) (1:300, für DAB in 1% Goat Normal Serum in PBS, Vector Lab., USA (BA-9200).

Tab. 1 Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen

1. Antikörper	Zielmolekül & Funktion	Verdünnung	2. Antikörper fluoreszenzmarkiert	2. Antikörper biotinyliert	Verdünnung
Ox-42 (Mikroglia)	Integrin alpha-M/ beta-2 (Interaktionen mit Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und Faktoren des Komplementsystems)	1:200	Cy-3	Biotinylierter Anti-Maus-Ak	1:300
Anti-Map2 (Neurone)	Map2 (vermutlich Mikrotubuli-Stabilisierung)	1:1000	Cy-3	Biotinylierter Anti-Maus-Ak	1:300
Anti-Gfap (Astrozyten)	GFAP (Intermediärfilament Astrozyten/ Zellform und Beweglichkeit)	1:300	Cy-3	Vectastain® Anti-Rabbit-Ak	1:300
Anti-O4 (Oligodendrozyten)	O4 Oberflächen-Antigen (Interaktionen mit Sulfatiden, Semino-lipid und Cholesterin)	1:50	Cy-3	Biotinylierter Anti-Maus-Ak	1:300
rPH (Fibroblasten)	RAB3B-Effektor in Epithelzellen (Exozytose/ Vesikelbildung)	1:400	Cy-3	Biotinylierter Anti-Maus-Ak	1:300
RECA-1 (Endothelzellen)	MCA970R/RECA-1 Oberflächenantigen (Zellinteraktionen/ Gefäßfunktion)	1:100	Cy-3	Biotinylierter Anti-Maus-Ak	1:300

Nach 45 Minuten wurde zwei Mal mit PBS gespült. Nun wurde 100 µl der ABC-Reagenz hinzugegeben und 30 Minuten gewartet. Nach dieser Zeit wurde erneut zwei Mal mit PBS gespült. Anschließend wurde für 10 Minuten 100 µl der DAB-Lösung hinzugefügt. Nach dieser

Zeit wurden die Zellen mit Immu-Mount eingedeckt. Bei beiden Färbungen wurde auf einem Deckgläschen als Kontrolle für eine nicht-spezifische Färbung der erste Antikörper weggelassen. Die Zellkerne der DAB-Färbung wurden mit Meyer's Hämalaun gegengefärbt und stellten sich in einem violetten Farbton dar. Durch ein Mikroskop mit DIC Optik konnte die Immunreaktivität sichtbar gemacht werden. Durch den Differentialinterferenzkontrast oder auch Nomarski-Kontrast werden Unterschiede in der optischen Wellenlänge im betrachteten Objekt in Helligkeitsunterschiede des Bildes umgewandelt. Anschließend wurden die Zellen ausgezählt. Hierzu wurden in drei einzelnen Färbungen im Schnitt jeweils zehn Gesichtsfelder betrachtet und insgesamt ca. 1000 Kerne mit dem jeweiligen Anteil anderer Zellen gezählt.

2.3. Mikroglia

2.3.1. Mikroglia-kulturen

Für die Präparation von Mikroglia wurden neben den zerebralen Hemisphären rostrale mesenzephalale ein bis drei Tage alter Wistar Ratten verwendet. Die Präparation wird unter 2.1. beschrieben. Die Zellsuspension zweier Hemisphären oder eines Mesenzephalons wurden mit einer Dichte von 100.000 Zellen/ cm² (7,5 Millionen Zellen in 75 cm² bzw. 2,5 Millionen Zellen in 25 cm² Flaschen) in 15 bzw. 5 ml Astrozyten-konditioniertem Medium (AKM) ausgesät und wuchsen bei 37°C. Durch die Behandlung mit AKM konnte man bei den Mikrogliazellen morphologische Veränderungen mit Übergang in die ramifizierte, inaktive Form beobachten. Auch die Herunterregulation der Oberflächenexpression bestimmter Antigene wurde beschrieben (Eder et al., 1997; Eder et al. 1999). Nach ungefähr einer Woche konnten die aufschwimmenden Mikrogliazellen, die im Monolayerzellverband gewachsen waren und sich nach Proliferation vom Boden gelöst hatten, drei bis vier Wochen lang täglich geerntet werden. Die Zellen wurden gesammelt, zentrifugiert (700xg, 5 Min.), gezählt und für die Versuche in AKM auf Mikrotiterplatten ausgesät.

2.3.2. Mikroglia-konditioniertes Medium (MKM)

Zentraler Bestandteil dieser Arbeit war die Verwendung Mikroglia konditionierten Mediums (MKM), da es darum ging, MKM-vorbehandelte Astrozyten unter nachfolgendem oxidativem Stress zu untersuchen. Es wurde grundsätzlich zwischen konditioniertem Medium nicht-

aktivierter Mikroglia (MKM[-]) und aktivierter Mikroglia (MKM[+]) unterschieden. Um MKM[-] zu erhalten, wurden Mikroglia mit einer Zelldichte von 100.000 Zellen/ cm² in 25 cm²-Kulturflaschen ausgesät und das Medium, in dem die Mikroglia gewachsen war (10 ml 44-53° Wachstumsmedium mit Wechsel alle drei bis vier Tage), abgenommen. Zur Gewinnung von MKM[+] wurden die Zellen während der Konditionierung mit 0,02 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS, L-8274, Lot. 52K4066, Sigma) in 25 ml Wachstumsmedium pro Flasche für 24 Stunden stimuliert. Die Mikroglia wurde mit Medium behandelt, das bei 44-53°C statt der üblichen 56°C inaktiviert wurde. Bei niedrigerer Inaktivierungstemperatur bleiben mehr Wachstumsfaktoren erhalten, die für die Proliferation der Mikroglia wichtig sind. Zusätzlich wurden LPS-Konzentrationen von 0,001, 0,002, 0,01, 0,015, 0,1 und 0,2 µg/ml verwendet, um konditioniertes Medium von unterschiedlich stark aktivierter Mikroglia zu erhalten. Durch einen nicht-pyrogenen 0,2 µm Filter wurde das Mikroglia-konditionierte Medium steril filtriert und anschließend bis zur Durchführung der Experimente bei -20°C eingefroren. Für die Versuche ohne direkten Zellkontakt wurden Astrozyten für zwei Tage mit Mikroglia-konditioniertem Medium (MKM) vorinkubiert, bevor sie oxidativem Stress durch verschiedene Peroxide ausgesetzt wurden.

2.3.3. NO-Messung zur Bestimmung der Mikrogliaaktivierung

LPS ist ein potenter Immunstimulator und bindet an den Toll-like-receptor 4 (TLR-4), was eine intrazelluläre Signaltransduktion auslöst: aktivierte Kinasen phosphorylieren Inhibitoren von Transkriptionsfaktoren, was in Mikrogliazellen die Induktion der iNOS (induzierbare NO-Synthetase) bewirkt (Gebicke-Haerter, 2001). NO kann daher als Parameter für die Aktivierung der Mikroglia dienen. In dieser Arbeit wurde NO durch eine photometrische Methode basierend auf dem Griess Reagenz (Griess reagent (modified), G-4410, Sigma) bestimmt. Aus den Wells, deren NO-Gehalt bestimmt werden sollte, wurde je 90 µl Medium auf eine leere 96er Well Schale übertragen. Auf den zurückbleibenden Zellrasen wurde pro Well 200 µl PBS gegeben, um ein Austrocknen der Zellen bis zum Versuchsstart zu verhindern. Zu den abpipettierten Medien wurden pro Well 90 µl Griess-Reagenz gegeben. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurde die optische Dichte (OD) bei 550 nm bestimmt (Photometer 340 ATTC, SLT Labinstruments Germany).

2.4. Ko-Kultur-Modell

Für einige Versuche wurde ein Modell mit *direktem* Zellkontakt zwischen Mikroglia und Astrozyten verwendet. Hierfür wurden Mikroglia-Zellen in unterschiedlicher Menge von 0 bis 100.000 Zellen/ cm² auf vier Tage alte Astrozyten in 56°C Wachstumsmedium ausgesät und durch eine konstante Menge LPS (0,02 µg/ml) aktiviert.

2.5. Zelllinien C6 und B104

Um die Frage zu beantworten, ob der protektive Effekt aktivierter Mikroglia auch bei nicht-primären Zellen auftrat, wurden die Zelllinien C6 (Glioblastom-Zelllinie) und B104 (Neuroblastom-Zelllinie) eingesetzt. Die C6 Ratten-Glioblastom-Zelllinie wurde ursprünglich in Wistar-Ratten gezüchtet, die dem Zellgift N,N-Methylnitrosamid ausgesetzt worden waren (Benda et al., 1971). Sie haben eine durchschnittliche Verdopplungszeit von rund 33 Stunden (Vogelbaum et al., 1998). Morphologisch entspricht der von den C6-Zellen ausgebildete Tumor dem Glioblastoma multiforme, entsprechend einem hoch malignen Astrozytom Grad V. Das Glioblastom ist der bösartigste aller Hirntumore und die Prognose mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von < 1 Jahr nach Diagnosestellung sehr schlecht. Die C6-Zelllinie wird in der neurobiologischen Forschung häufig verwendet, da die Zellen morphologisch Astrozyten entsprechen und auch die Astrozyten-Zellmarker GFAP und S-100 besitzen (San-Galli et al., 1989). Die Glioblastom-Zellen der C6-Zelllinie wurden von der American Type Culture Collection ATCC (CCL-107) bezogen.

Die Zellen der B104-Neuroblastom-Zelllinie zeichnen sich durch viele Merkmale differenzierter Neurone aus. Morphologisch zeigen sie einen bipolaren Aufbau mit sehr langen, dünnen Zellkörpern und sind in der Lage, sowohl Neurotransmitter zu sezernieren als auch ein Aktionspotential zu generieren. Auch sie exprimieren Neuronen-spezifische Marker wie das Protein 14-3-2 (Schubert et al., 1974). Das Neuroblastom ist der dritthäufigste maligne Tumor im Kindesalter mit einer durchschnittlichen 5-Jahresüberlebensrate von 55%. Die B104 Ratten-Neuroblastom-Zelllinie war ein freundliches Geschenk von David Schubert (Dep of Neurobiology, Salk Institute, La Jolla, California) (Schubert et al., 1974).

Beide Zelllinien wurden mit dem selben Wachstumsmedium wie die Astrozytenkulturen versorgt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 10.000 Zellen/ cm² in 96 er Well Platten ausgesät. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für weitere zwei Tage mit Mikroglia konditioniertem Medium (MKM) versorgt und anschließend für 24 Stunden mit H₂O₂ versetzt.

2.6. Versuchsaufbau

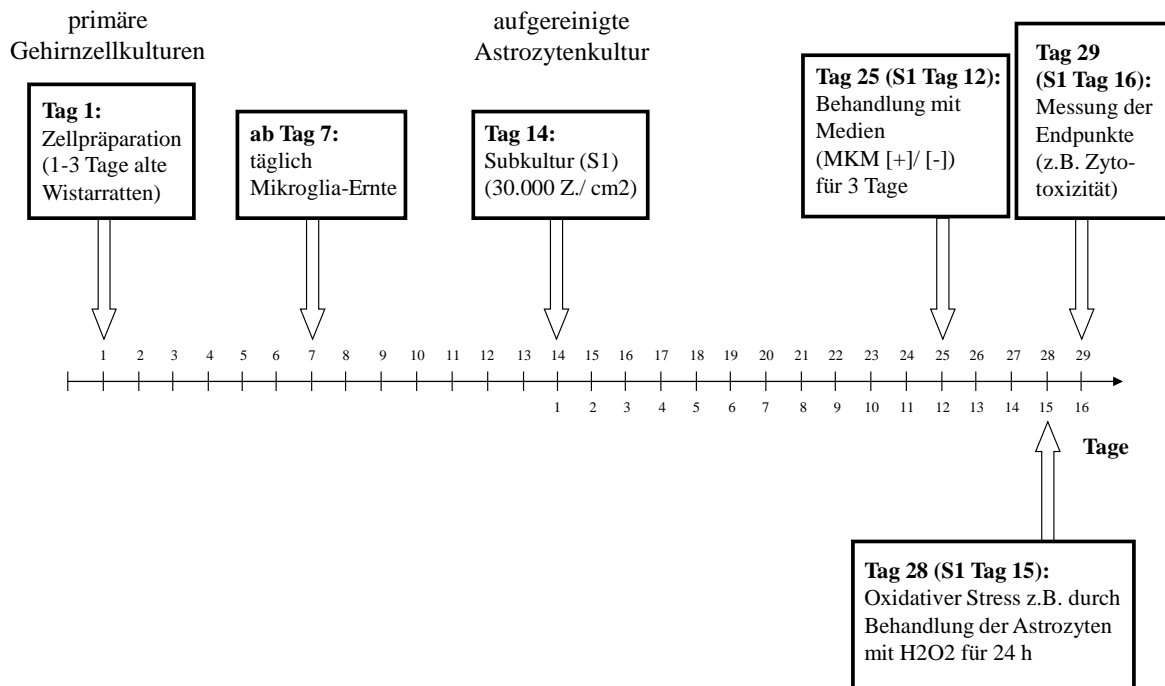


Abb. 1 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und des zeitlichen Ablaufs

2.6.1. Aussaat der Zellen

Für die Versuche wurden aufgereinigte Astrozyten mit einer Dichte von 30.000 Zellen/cm² in 96-Well-Mikrotiter Platten ausgesät.

2.6.2. Vorbehandlung mit Mikroglia-konditioniertem Medium (MKM)

Nachdem die Zellen 12 Tage gewachsen waren, erfolgte eine Behandlung mit Mikroglia-konditioniertem Medium für drei Tage. Dies geschah mit unterschiedlichen Medien:

- Konditioniertes Medium nicht-stimulierter Mikroglia (MKM [-])
- Konditioniertes Medium nicht-stimulierter Mikroglia, versetzt mit 0,02 µg/ml LPS (MKM [-] + LPS)
- Konditioniertes Medium stimulierter Mikroglia (MKM [+])

2.6.3. Behandlung mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und weiteren Substanzen (Cumolhydroperoxid [CHP], Trimethylzinn [TMT] und Sodianitroprussid [SNP])

Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden ± 1 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von H₂O₂ (0, 80, 160, 240, 320, 640 and 800 µM) im Wachstumsmedium (100 µl pro Well) behandelt. Für einige Experimente wurden die Astrozyten allein mit 320 µM H₂O₂ behandelt, da der protektive Effekt der Astrozytenvorbehandlung mit Mikroglia-konditioniertem Medium hier am deutlichsten war. In den Kontrollen der nicht vorbehandelten Astrozyten sank die Vitalität auf nahezu 0 %, wohingegen die mit MKM [+] vorbehandelten Zellen bei dieser Konzentration fast vollständig überlebten. Es wurden weitere Versuche mit anderen toxischen Substanzen durchgeführt, die sich jedoch in ihrer Wirkungsweise unterschieden. Dazu wurden Cumolhydroperoxid in den Konzentrationen 0/ 40/ 80/ 120/ 160/ 200/ 240 µM, Trimethylzinn mit 0/ 100/ 200/ 500/ 750/ 1000 µM sowie Sodianitroprussid mit 0/ 200/ 400/ 800/ 1000/ 1200 µM verwendet.

2.6.4. Endpunkte

Nach Behandlung der Astrozyten mit den Substanzen für 24 Stunden wurden die Messungen durchgeführt. Die Endpunkte waren Zytotoxizität und Mikrogliaaktivierung. Als Zytotoxizitätstest diente zum einen der MTT-Assay zur Bestimmung der Zellvitalität. Als weitere Parameter zur Erfassung der Zytotoxizität wurde der Zellproteingehalt in der Kultur mittels Lowry-Assay gemessen. Des Weiteren wurden die Morphologie der Zellen und der Zustand der Zellmonolayer durch Phasenkontrastmikroskopie beurteilt.

Zur Bestimmung des Aktivierungs-/ Inflammationsgrades der Mikrogliazellen wurde die NO-Messung, basierend auf dem Griess-Reagenz, verwendet.

2.7. Phasenkontrastmikroskopie

Mittels Phasenkontrastmikroskopie war es möglich, die Morphologie der Zellen und den Zustand der Zellkulturen nach entsprechender Vorbehandlung zu untersuchen. Hierbei stellte sich ein intakter Zellrasen als Zeichen vitaler oder allenfalls geringgradig geschädigter Kulturen dar. Zerklüftete Zellrasen oder einzelne Zelltrümmer wurden hingegen als morphologische Korrelate der Zellschädigung oder -zerstörung gewertet.

Astrozyten wurden mit einer Dichte von 30.000 Zellen/ cm² in 24-Well Platten ausgesät. Für die morphologische Analyse wurde eine Phasenkontrastmikroskopie mit einem inversen Axiovert 35 Mikroskop (OPTON, Germany) durchgeführt.

2.8. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Untersuchung des Zellproteingehalts der Kulturen erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951). Bovines Serum Albumin (BSA, A-7906, Sigma) wurde als Standard (0,025 – 0,4 mg/ml) genutzt. Der durch die Zugabe von Kupfersulfat entstehende Kupfer-Protein-Komplex wird durch Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz reduziert, wobei es zu einer konzentrationsabhängigen Blaufärbung kommt. Diese wurde bei 620 nm photometrisch quantifiziert.

Material

2.8.1. Lösung A

- 4%ige w/v Na₂CO₃-Lösung (in Aqua dest.)
- 2%ige w/v NaK-Tartrat-Lösung (in Aqua dest.)
- 1%ige w/v CuSO₄5H₂O (in Aqua dest.)

Die Lösung A wurde erst kurz vor Gebrauch angesetzt. Die benötigte Menge bestand zu 96 % (v/v) aus Na₂CO₃-Lösung, zu der 2 % (v/v) NaK-Tartrat-Lösung und als letztes 2 % (v/v) CuSO₄5H₂O hinzugegeben wurden.

2.8.2. Lösung B

- Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (1:2 mit Aqua dest. verdünnt)

2.8.3. PBS-Puffer

- 137 mM NaCl [Roth]
- 2,7 mM KCl
- 6,5 mM Na₂HPO₄ [Merck]
- 1,5 mM KH₂PO₄

- 0,5 mM MgCl₂ 6H₂O
- 0,9 mM CaCl₂ 2H₂O

MgCl₂ und CaCl₂ wurden erst mit der restlichen Lösung vermischt, nachdem sie extra gelöst worden sind.

2.8.4. BSA-Standardproben

- BSA (Bovines Serum Albumin)
- 0,5 N NaOH

Es wurde eine 0,2 %ige (w/v) BSA-Stammlösung mit der 0,5 N NaOH-Lösung angesetzt. Aus dieser wurden anschließend folgende Standards hergestellt:

St1: 0,025 mg/ml = 1,5 µg/well (Gesamtproteinmenge pro Well nach Zugabe von je 60 µl)

St2: 0,05 mg/ml = 3 µg/well

St3: 0,1 mg/ml = 6 µg/well

St4: 0,2 mg/ml = 12 µg/well

St5: 0,3 mg/ml = 18 µg/well

St6: 0,4 mg/ml = 24 µg/well

2.8.5. Sonstiges

- 0,5 N NaOH-Lösung
- Photometer (Filter: 630 nm)
- Schüttler (Zimmertemperatur)

Wärmekammer (37°C, ohne CO₂-Begasung)

Methode

2.8.6. Durchführung

Das Kulturmedium wurde gründlich abgesaugt und die Zellen anschließend drei Mal mit 200 µl PBS mit Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ gewaschen. In alle Wells, außer in die Reihen 1E-H, 2, 11 und 12 E-H, wurde 60 µl der NaOH-Lösung pipettiert. Die BSA-Stammlösungen wurden aufgetaut,

geschüttelt und anschließend nach folgendem Schema in die Wells pipettiert: St1: 1 E-F & 12 E-F, St2: 1 G-H & 12 G-H, St3: 2 A-B & 11 A-B, St4: 2 C-D & 11 C-D, St5: 2 E-F & 11 E-F, St6: 2 G-H & 11 G-H. Die Zellen wurden fünf Minuten geschüttelt, 35 Minuten in den Wärmeschrank gestellt und danach nochmals fünf Minuten geschüttelt. Nun wurden 150 µl der Lösung A in alle Wells pipettiert, anschließend wurde erneut 10 Minuten geschüttelt. 60 µl der Lösung B wurden in alle Wells gegeben und die Platte 20 Minuten geschüttelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Extinktion im Photometer, wobei der Mittelwert der Blindproben (Def.: Extinktion der Wells mit allen verwendeten Substanzen ohne behandelte Zellen) von den Messwerten abgezogen wurde.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●
B	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●
C	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●
D	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●
E	○	○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
F	○	○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
G	○	○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Abb. 2 Schema einer 96-Well-Platte. Die oberen vier Wells der Reihen 1 und 12 sind Blindwerte, die übrigen Wells beinhalten die Standards. Die Zellen sind in den Reihen 3 – 10 und in den Reihen B-G ausgesät.

2.9. MTT Vitalitätstest

Um die Zellvitalität nach der Behandlung mit H₂O₂ und CHP zu bestimmen, wurde der MTT Test nach Mosmann (1983) verwendet. Dehydrogenasen in den Mitochondrien lebender Zellen reduzieren MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromid) zu violetter Formazan. Die Produktion von Formazan durch lebende Zellen wurde durch Messung der Absorption bei 550 nm (Photometer 340 ATTC, SLT Labinstrumente Germany) quantifiziert.

Material

2.9.1. Substrat

- MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromid) [Sigma; M2128]
 - PBS Dulbecco® (Phosphat-buffered saline) *ohne* Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ [PAA]
- 5 mg MTT/ ml PBS wurden steril filtriert und lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt.

2.9.2. Solubilisierungslösung

- 50 % (v/v) DMF (N,N-Dimethylformamid) [Merck]
- 20 % (w/v) SDS (Natriumdodecylsulfat) [Merck]

Die Solubilisierungslösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt, wo sie im festen Zustand vorlag. Vor Verwendung wurde sie im Wasserbad erwärmt und dadurch verflüssigt.

2.9.3. Geräte

- Photometer (Filter: 540 nm) [Photometer 340 ATTC, SLT Labinstruments Germany]

Methoden

2.9.4. Durchführung

Das Medium wurde aus allen Wells vorsichtig abgesaugt. Die leeren Wells wurden ein Mal mit PBS gespült, anschließend erneut abgesaugt und mit 100 µl frischem Medium wieder aufgefüllt. Anschließend wurden 25 µl der MTT-Lösung in jedes Well gegeben, so dass sich eine Konzentration von 1 mg MTT/ml Medium ergab. Die Platten wurden nun für 1,5 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden in jedes Well 100 µl der Solubilisierungslösung gegeben. Durch diese lösten sich die gebildeten Farbkristalle vollständig auf. Erneut wurden die Platten für 1,5 h in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde jedes Well mit einem Rührstäbchen kurz durchgerührt, um eine gleichmäßige Färbung der entstandenen Lösung zu erzielen. Dabei war darauf zu achten, dass das Rührstäbchen zwischendurch immer wieder gesäubert wurde, um Verfälschungen innerhalb der verschiedenen Wells zu vermeiden. Nun konnte die Extinktion bei 540 nm am Photometer

bestimmt werden. Der durchschnittliche Blindwert (Def.: Extinktion der Wells mit allen verwendeten Substanzen ohne behandelte Zellen) aus den äußeren sechs Wells (Reihe 1 und 12) wurde hiervon subtrahiert.

2.10. Statistik

Drei bis neun eigenständige Experimente mit Kulturen von verschiedenen Präparationen wurden für jede Versuchsreihe durchgeführt. Die Anzahl der Experimente ist in den Legenden der Diagramme angegeben. Die Mittelwerte der n Bestimmungen aus unterschiedlichen Kulturen und der Standardfehler der Mittelwerte (SE) wurden errechnet und in den Diagrammen dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, anschließend erfolgte ein Tukey-Kramer-Test für multiple Vergleiche (p-Werte). Es wurde die Software InStat (Graph Pad Software 2012) genutzt.

Die Sternchen (* / ** / ***) in den Graphiken drücken aus, ob die Korrelation signifikant ist, d.h. ob der Zusammenhang weitgehend gesichert ist oder nicht.

- $p < 0,05$ (schwach signifikant; die Wahrscheinlichkeit einer rein zufälligen Korrelation liegt bei unter 5 % = *);
- $p < 0,01$ (signifikant; die Irrtumswahrscheinlichkeit ist kleiner als 1 % = **) oder
- $p < 0,001$ (hoch signifikant; die Irrtumswahrscheinlichkeit ist kleiner als 1 ‰ = ***).

Die EC_{50} Werte, die jene nominelle Dosis angeben, bei der 50 % einer Versuchspopulation eine definierte Wirkung zeigen, wurden graphisch aus den Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1. Charakterisierung des *in vitro*-Modells

Immunzytochemische Färbungen zeigen, dass sich in den primären Gehirnzellkulturen Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia und Neurone (Abb. 3), aber auch andere Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen befinden (Abb. 4). Die Aufreinigung der Astrozyten-Kulturen wurde nach der Methode von McCarthy und DeVellis (1980) durchgeführt, wodurch eine hohe Reinheit der Kulturen erzeugt werden konnte. Die Zellen wurden gefärbt und gezählt und es konnte festgestellt werden, dass die Anzahl der Mikroglia 0,5 %, der Oligodendrozyten 0,8 % und der Neurone 2,3 % in den Astrozytenkulturen nicht übersteigt.

In Abbildung 5 sieht man Mikrogliazellen in der Primär- und Sekundärkultur gegenübergestellt, wobei das Ausmaß der Mikroglia-reduktion deutlich zu erkennen ist.

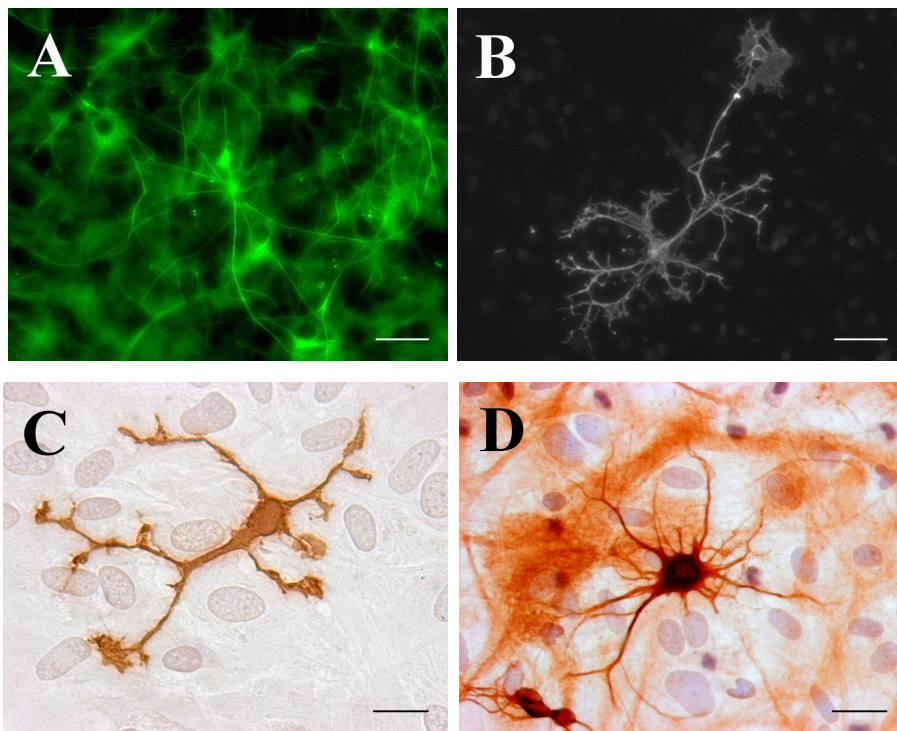


Abb. 3 Zellen in der primären Gehirnzellkultur (A) Astrozyten (*Gfap/ Cy3*), (B) Oligodendrozyten (*O4/ Cy3*), (C) Mikrogliazellen (*Ox-42/ DAB*) und (D) Neurone (*Map2/ DAB*), Balken: A= 50 μ M, B= 100 μ M, C und D = 20 μ M.

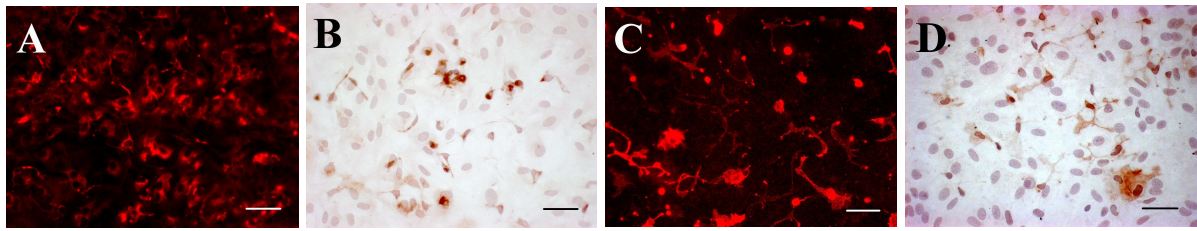


Abb. 4 Fibroblasten (rPH) (A) Cy3 sowie (B) DAB-gefärbt und Endothelzellen (RECA) (C) Cy3 sowie (D) DAB-gefärbt in der primären Gehirnzellkultur. Balken 100 μ M.

Tab. 2 Mikroskopisch ausgezählter Anteil von Mikroglia, Oligodendrozyten und Neuronen in aufgereinigten Astrozytenkulturen

Versuch	Mikroglia (<i>Ox-42</i>) (Gesamtzellzahl)	Oligodendrozyten (<i>GalC</i>) (Gesamtzellzahl)	Neurone (<i>Map2</i>) (Gesamtzellzahl)
1	5 (1055)	9 (1077)	25 (1075)
2	4 (1016)	7 (1046)	22 (1097)
3	6 (1024)	10 (1090)	31 (1089)
Gesamt-Zellzahl aller Versuche (DAPI-Kernfärbung)	3095	3213	3261
Prozent der Gesamtzellzahl (MW \pm SD)	0,5 \pm 0,1 %	0,8 \pm 0,1 %	2,3 \pm 0,4 %

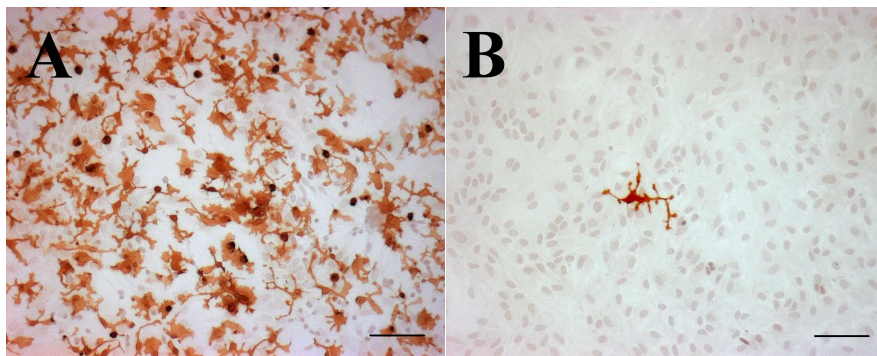


Abb. 5 Mikroglia (*Ox-42/ DAB*) in der primären Gehirnzell- (A) und aufgereinigten Astrozytenkultur (B) im Vergleich. Balken 100 μ M.

3.2. Einfluss aktivierter Mikroglia auf die Empfindlichkeit von Astrozyten gegenüber H₂O₂-induziertem oxidativem Stress

Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, war zu Beginn der Versuche - unabhängig von der Art der Vorbehandlung - die gleiche Menge Zellprotein vorhanden. Eine geringere Zellvitalität konnte somit nicht als Folge eines von vornherein geringeren Gesamtzellproteingehalts gewertet werden.

In Abbildung 7 ist die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung bezüglich der Zytotoxizität, gemessen durch Zellvitalität (Abb. 7 A) und des Zellproteins (Abb. 7 B), des anorganischen Peroxids H₂O₂ auf Astrozyten nach verschiedenen Vorbehandlungen mit mikroglia-konditioniertem Medium dargestellt.

Es ist eine deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für MKM [+]-vorbehandelte Zellen zu erkennen, was zeigt, dass konditioniertes Medium aktivierter Mikroglia die Resistenz der Astrozyten gegenüber oxidativem Stress stark erhöht. Die Rechtsverschiebung der Kurve zeigt eine erhöhte Vitalität der Astrozyten bei höheren H₂O₂-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (Zellen in Wachstumsmedium ohne Vorbehandlung). Bei einer Konzentration von 480 µM H₂O₂ waren die Zellen in den Kontrollen komplett zerstört, wohingegen 65 % der mit MKM [+] behandelten Zellen überlebten. Die mittlere H₂O₂ -Konzentration, bei der 50 % der Zellen starben (EC₅₀-Wert), lag für die Kontrollen nach 24 h ohne Vorbehandlung mit MKM bei 275 µM. Fand eine Vorbehandlung mit dem Medium ruhender Mikroglia und zusätzlicher LPS-Zugabe (MKM [-] + LPS) statt, kam es bereits zu einem leichten protektiven Effekt, zu erkennen an einer leichten Rechtsverschiebung der Kurve mit Anstieg des EC₅₀-Werts auf 300 µM. Den stärksten Schutz erhielten jedoch die Zellen, die mit konditioniertem Medium zuvor LPS-aktivierter Mikroglia (MKM [+]) vorbehandelt worden waren. Hier erhöhte sich der EC₅₀-Wert auf 540 µM (Tab. 3).

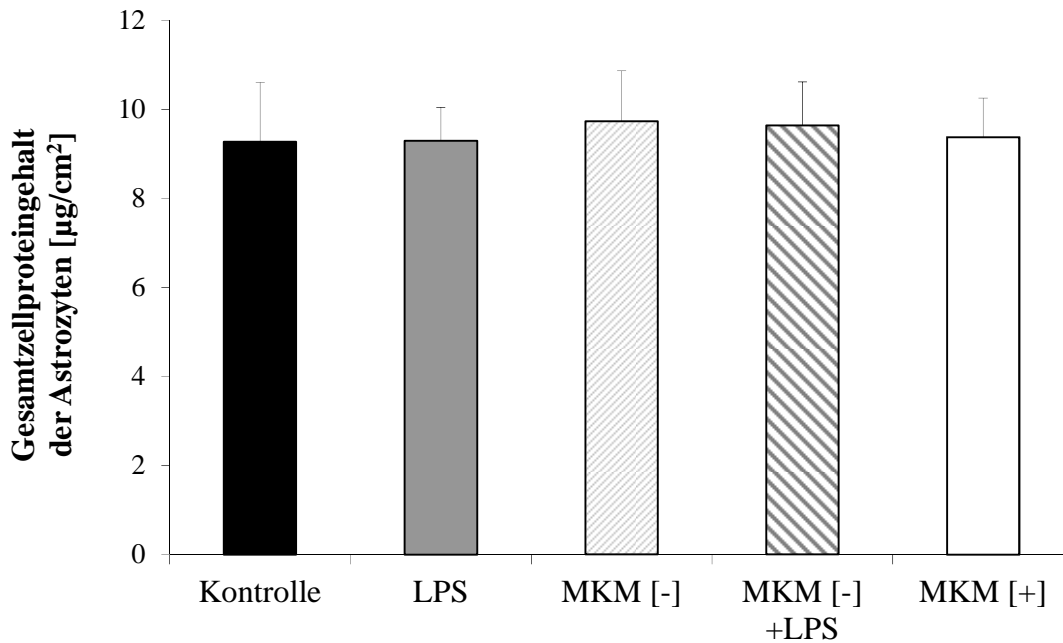


Abb. 6 Gesamtzellproteingehalt der Astrozytenkulturen nach Vorbehandlung mit normalem Wachstumsmedium (Kontrolle), konditioniertem Medium ruhender Mikroglia (MKM [-]), oder dieses mit LPS versetzt (MKM [-] + LPS), mit LPS alleine oder mit konditioniertem Medium LPS-stimulierter Mikroglia (MKM [+]) für 3 Tage. Keine der Behandlungen für sich reduziert den Gesamtzellproteingehalt der Kulturen. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert \pm SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten (außer Kontrolle $n = 9$, LPS $n = 6$, MKM[+] $n = 7$).

Tab. 3 EC_{50} -Werte für H_2O_2 von Astrozytenkulturen (graphisch ermittelt) nach unterschiedlichen Vorbehandlungen und oxidativem Stress durch H_2O_2 ($n = 3$, außer Kontrolle $n = 9$, LPS $n = 6$, MKM [+] $n = 7$)

	EC₅₀-Werte für H₂O₂ \pm Standardabweichung [in μM]
56° Wachstumsmedium (Kontrolle)	275 \pm 66
Kontrolle + LPS	295 \pm 142
MKM [-]	311 \pm 46
MKM [-] + LPS	300 \pm 10
MKM [+]	540 \pm 131

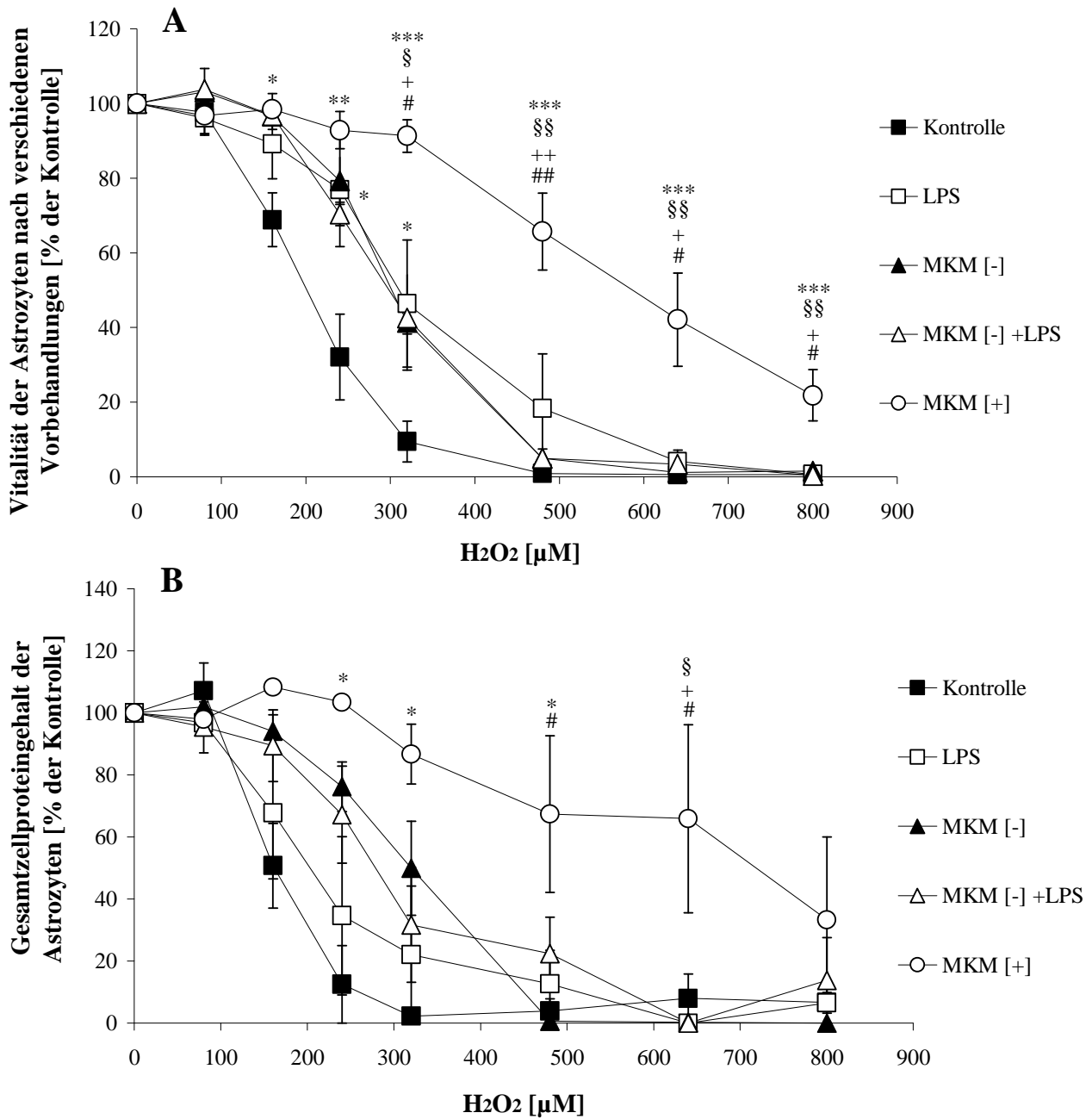


Abb. 7 Effekt von H₂O₂ auf **A** die Vitalität der Astrozyten und **B** den Gesamtzellproteingehalt der Astrozytenkulturen nach Vorbehandlung mit normalem Wachstumsmedium (Kontrolle), konditioniertem Medium ruhender Mikroglia (MKM [-]), dieses mit LPS versetzt (MKM [-] + LPS), mit LPS alleine oder mit konditioniertem Medium LPS-stimulierter Mikroglia (MKM [+]). Mit MKM [+] vorbehandelte Astrozyten weisen eine signifikant höhere Resistenz gegenüber oxidativem Stress auf als die Zellen in den Kontrollen. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert ± SEM aus *n* = drei unabhängigen Experimenten (außer Kontrolle *n* = 9, LPS *n* = 6, MKM [+] *n* = 7). ***/§§/++/### *P* < 0,001, **/§§/++/## *P* < 0,01, */§/+/# *P* < 0,05; * vs. Kontrolle, § vs. LPS, + vs. MKM [-], # vs. MKM [-] + LPS, (ANOVA, gefolgt von Tukey-Kramer-Test).

Ergebnisse

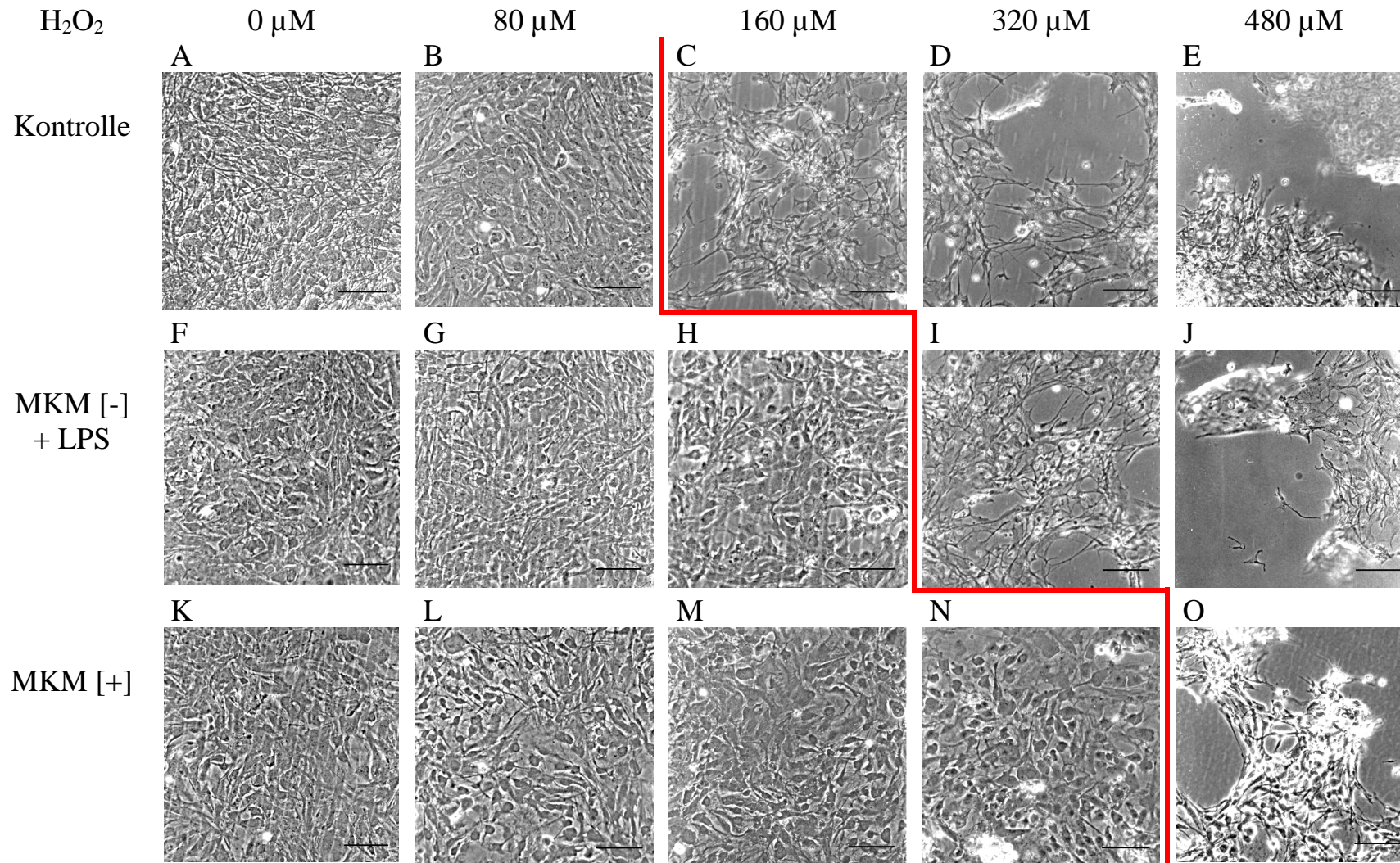


Abb. 8 Phasenkontrastmikroskopie. Astrozyten wurden über drei Tage mit normalem Wachstumsmedium (Kontrolle) [A-E], Medium ruhender Mikroglia mit LPS (MKM [-] + LPS) [F-J] oder mit konditioniertem Medium von LPS-aktivierter Mikroglia (MKM [+]) [K-O] vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von H₂O₂ (24 h) in den angegebenen Konzentrationen. *Balken* = 100 μM.

In der Phasenkontrastmikroskopie (Abb. 8) ist zu erkennen, dass Astrozyten, die mit konditioniertem Medium von LPS-aktivierter Mikroglia (MKM [+]) über drei Tage vorbehandelt wurden, gegenüber H_2O_2 -induziertem oxidativen Stress resistenter waren als Astrozyten, die mit normalem Wachstumsmedium (Kontrolle) oder Medium ruhender Mikroglia + LPS (MKM [-] + LPS) vorbehandelt worden waren. Deutlich sieht man Veränderungen des Zellrasens bei einer H_2O_2 -Konzentration von $160 \mu\text{M}$ in den Kulturen der Kontrolle. Zelltrümmer und ein zerklüfteter Zellrasen sind hierbei morphologisches Korrelat der Zellschädigung. Hingegen scheinen die Kulturen der mit MKM [-] + LPS konditionierten Astrozyten bei dieser Konzentration teilweise und die mit MKM [+] vorbehandelten Zellen vollständig geschützt zu sein.

3.3. Charakterisierung der protektiven Mikrogliawirkung auf Astrozyten

3.3.1. Einfluss der Dauer der Astrozyten-Vorbehandlung mit mikroglia-konditioniertem Medium auf die protektive Wirkung der Mikroglia

Ziel war es, herauszufinden, wie lange es dauerte, bis die Vorbehandlung durch konditioniertes Medium LPS-aktivierter Mikroglia (MKM [+]) zu einer signifikanten Erhöhung der Astrozyten-Resistenz gegenüber oxidativem Stress führte. Die Astrozytenkulturen wurden über einen unterschiedlich langen Zeitraum (0, 1, 6, 18, 24 und 72 Stunden) mit konditioniertem Medium vorbehandelt. Anschließend wurden sie oxidativem Stress in Form von $320 \mu\text{M}$ H_2O_2 ausgesetzt, da sich diese Konzentration als jene herausgestellt hatte, in der die größte Diskrepanz in der Empfindlichkeit vor- und nichtvorbehandelter Zellen bestand (Abb. 7). Der protektive Effekt gegenüber oxidativem Stress bei Astrozyten, die mit Medium LPS-stimulierter Mikroglia vorbehandelt worden waren, erreichte nach 18 Stunden sein Maximum und blieb nach dieser Zeit weitestgehend konstant (Abb. 9).

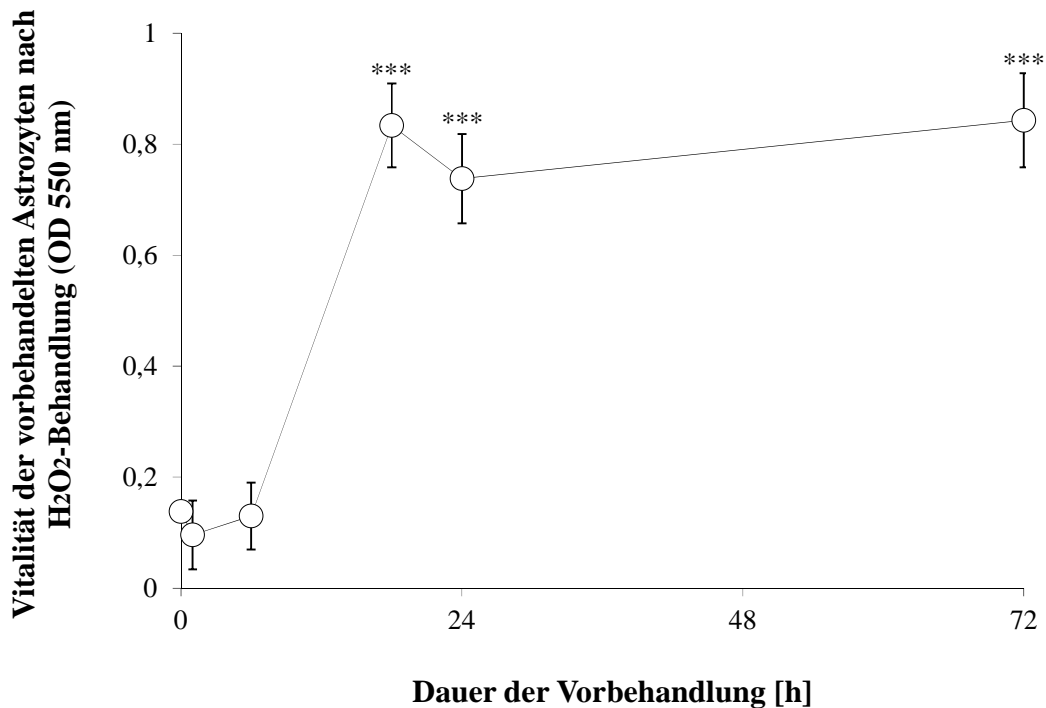


Abb. 9 Abhängigkeit des protektiven Effekts von konditioniertem Medium aktivierter Mikroglia (MKM [+]) auf H₂O₂-behandelte Astrozyten von der Dauer der Vorbehandlung. Astrozytenkulturen (30.000 Zellen/ cm²) wurden über verschiedene Zeiträume (0, 1, 6, 18, 24 und 72 h) vorbehandelt und anschließend oxidativem Stress (320 µM H₂O₂) ausgesetzt. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert ±SEM aus n = 6 unabhängigen Experimenten (außer für die Zeitdauer 18 h n = 2). *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$; * vs. Kontrolle (= 0h/ ohne H₂O₂) (ANOVA, gefolgt von Tukey-Kramer-Test).

3.3.2. Dauer des protektiven Effekts gegenüber oxidativem Stress nach Beendigung der Astrozyten-Vorbehandlung mit Mikroglia-konditioniertem Medium

Um festzustellen, wie lange der protektive Effekt anhält, wurden Astrozytenkulturen für drei Tage mit MKM [+] vorbehandelt und danach zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 0, 1, 24 und 48 h) mit zytotoxischen Konzentrationen von H₂O₂ behandelt. Vorbehandelte Astrozyten behalten den Schutz gegenüber oxidativem Stress, induziert durch 320 µM H₂O₂, mehrere Tage (Abb. 10).

Bei einer für nicht vorbehandelte Astrozyten letalen Konzentration von 320 µM H₂O₂ (Abb. 7) überlebten nach der Vorbehandlung mit MKM [+] 95 % der Zellen, nach zwei Tagen waren es

81 % und nach vier Tagen noch 40 % der Zellen. Danach sank die Überlebensrate der Zellen auf 13 %. Um zu prüfen, bis zu welcher H_2O_2 -Konzentration der protektive Effekt auslösbar war, wurden auch höhere H_2O_2 -Konzentrationen eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass bei hohen Konzentrationen (480 und 640 $\mu M H_2O_2$) eine Abnahme des protektiven Effekts durch MKM [+] eintrat.

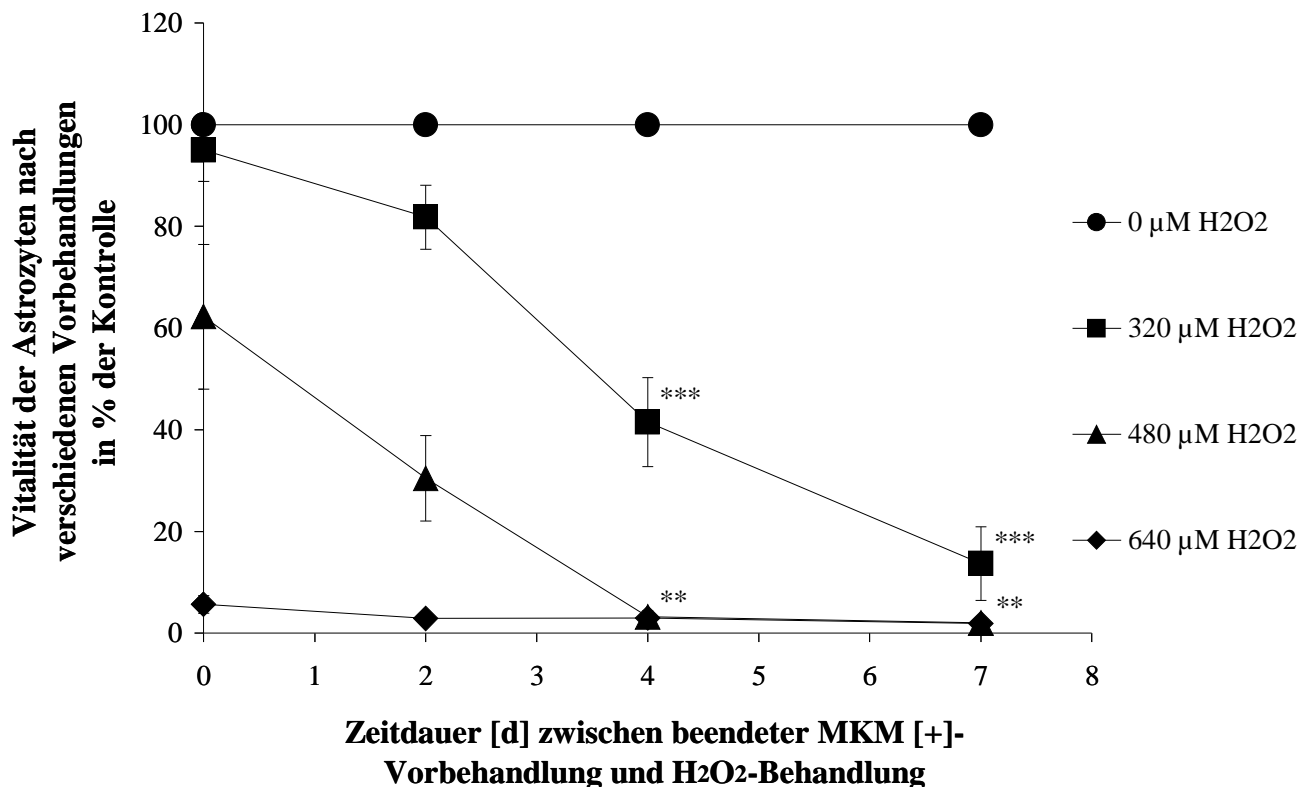


Abb. 10 Die Zeitdauer zwischen beendeter Vorbehandlung mit konditioniertem Medium LPS-aktivierter Mikroglia (MKM [+]) und H_2O_2 -induziertem oxidativem Stress. Astrozytenkulturen (30.000 Zellen/ cm^2) wurden für drei Tage mit Mikroglia-konditioniertem Medium (MKM [+]) vorbehandelt und danach zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 2, 4 und 7 d) oxidativem Stress (H_2O_2) ausgesetzt. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert \pm SEM aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten. ***/ $\$$ / $\$$ / $\$$ / $\$$ / $\$$ / $\$$ $P < 0,001$, **/ $\$$ / $\$$ / $\$$ / $\$$ $P < 0,01$, */ $\$$ / $\$$ / $\$$ $P < 0,05$; * vs. Kontrolle (= 0 d/ ohne H_2O_2) (ANOVA, gefolgt von Tukey-Kramer-Test).

3.3.3. Abhängigkeit der protektiven Wirkung vom Grad der Mikrogliaaktivierung und des Zellkontakts zwischen Mikroglia und Astrozyten

3.3.3.1. Mikrogliaaktivierung *ohne* gleichzeitigen Astrozytenkontakt

In Abbildung 11 ist zu sehen, dass mit höheren LPS-Konzentrationen auch die NO-Produktion in den Mikrogliaulturen steigt. Das Maximum der NO-Produktion wird bei einer Aktivierung mit einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS erzielt, danach nimmt die Aktivierung/ NO-Produktion trotz steigender LPS-Konzentrationen ab.

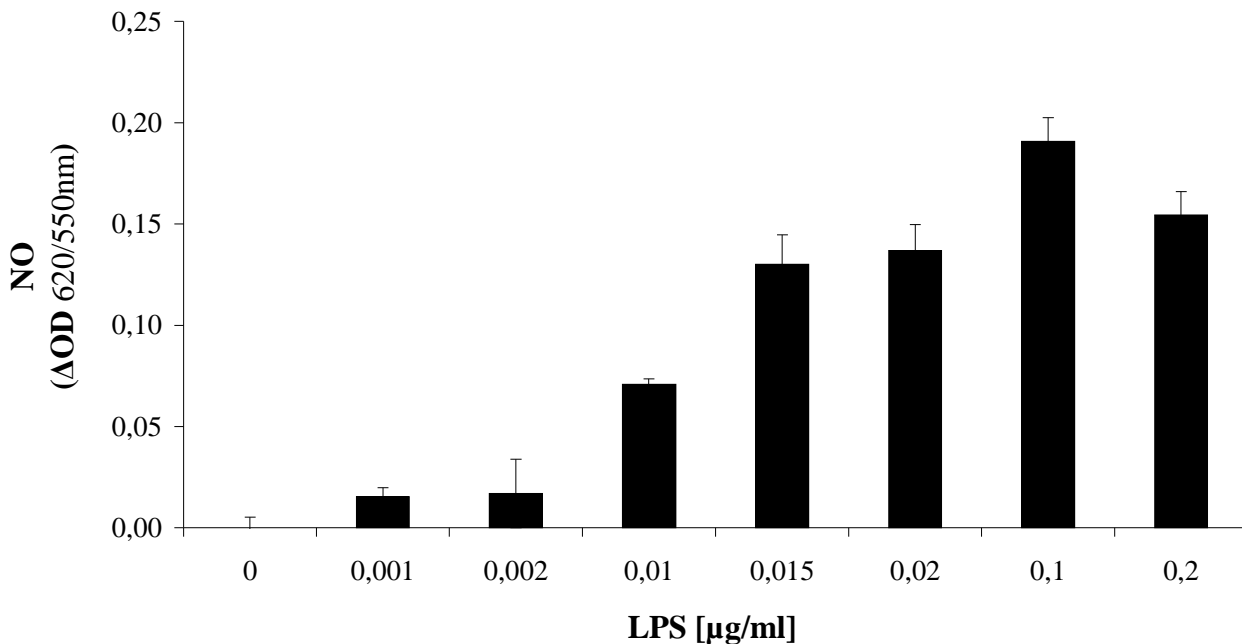


Abb. 11 Abhängigkeit der NO-Produktion in den Mikrogliaulturen von der LPS-Konzentration. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM aus $n = 3$ individuellen Experimenten.

Die protektive Wirkung der mit unterschiedlich hohen LPS-Konzentrationen stimulierten Mikroglia ist in Abbildung 12 A und B zu erkennen. Hier erfolgte eine Vorbehandlung von Astrozyten über drei Tage mit unterschiedlichen MKM [+]-Medien (0,001-0,2 $\mu\text{g/ml}$ LPS-

stimuliert) und anschließender H₂O₂-Behandlung mit 320 µM (24 h) (**A**) versus alleinige Vorbehandlung mit LPS (**B**). Abbildung 12 A und B zeigen, dass der protektive Effekt durch Mikroglia konditioniertes Medium (MKM [+]) gegenüber oxidativem Stress deutlich von der LPS-Konzentration abhängt, die bei der Konditionierung des Mediums für die Mikrogliaaktivierung verwendet wurde. Mit zunehmender Mikrogliaaktivierung nahm auch die protektive Wirkung des Mikroglia-konditionierten Mediums zu. Bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml LPS wurde die maximale Aktivierung (s. Abb. 11) und auch der maximale Schutz der Astrozyten gegenüber einer Konzentration von 320 µM H₂O₂ erreicht. Eine alleinige Applikation von LPS auf Astrozyten erbrachte keinen protektiven Effekt (Abb. 12 B). Dies weist sowohl auf den direkten Zusammenhang des protektiven Effekts mit Mikrogliazellen als auch auf die hohe Reinheit der Astrozytenkulturen hin. Im Falle einer Kontamination der Astrozytenkulturen mit Mikrogliazellen wäre infolge einer Mikrogliaaktivierung durch LPS ebenfalls ein protektiver Effekt sichtbar geworden.

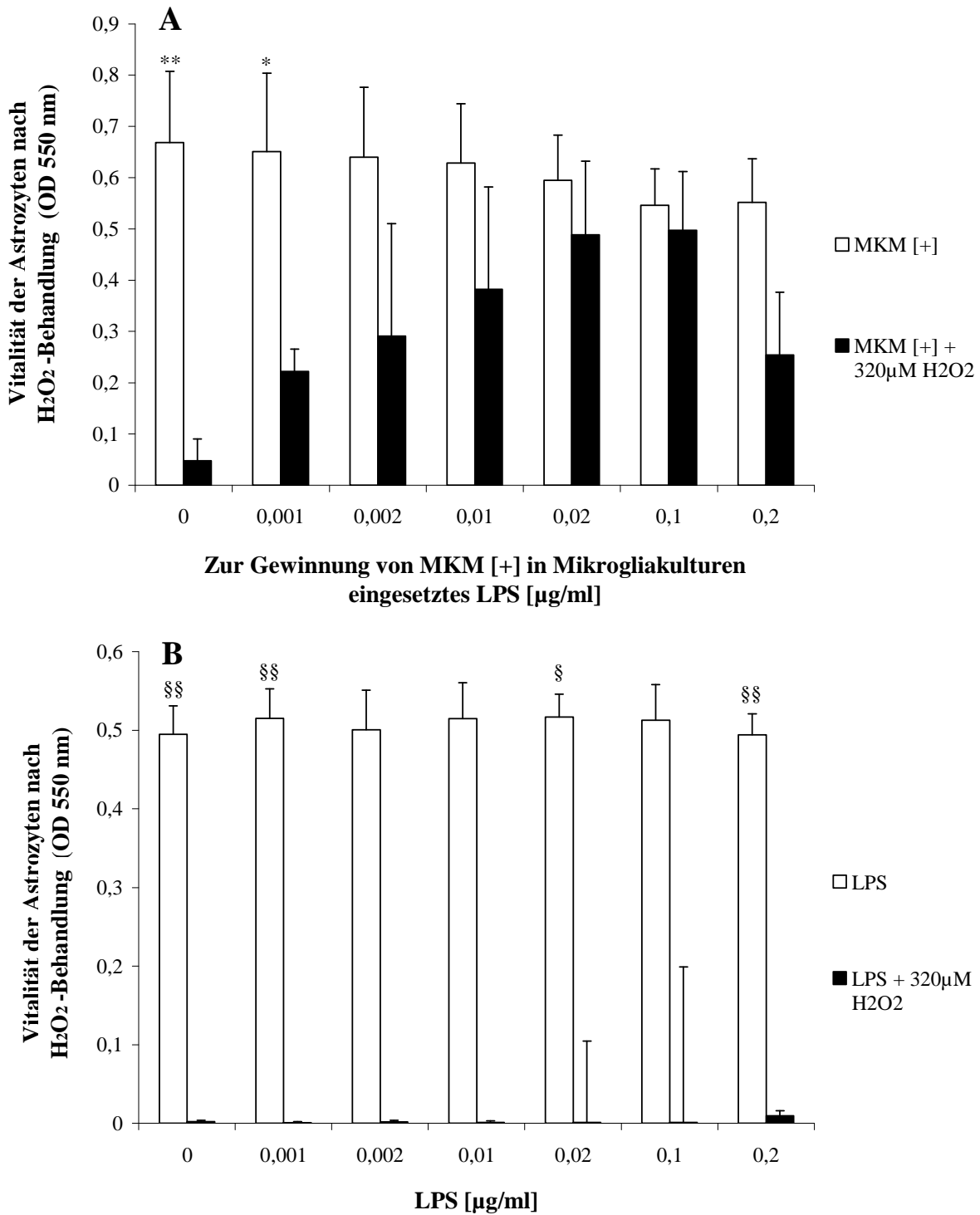


Abb. 12 Applikation steigender LPS-Konzentrationen zur Gewinnung von Mikroglia-konditioniertem Medium (MKM [+]) zur Behandlung von Astrozyten-Kulturen mit/ ohne anschließenden oxidativen Stress durch 320 μ M H₂O₂ (A) sowie alleinige Applikation von LPS auf Astrozytenkulturen mit/ ohne oxidativen Stress (B). Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert \pm SEM aus $n = 3$ individuellen Experimenten. ***/§§§ $P < 0,001$, **/§§ $P < 0,01$, */§ $P < 0,05$; * vs. MKM[+] + H₂O₂, § vs. LPS + H₂O₂, (ANOVA, gefolgt von Tukey-Kramer-Test).

3.3.3.2. Mikrogliaaktivierung *mit* gleichzeitigem Astrozytenkontakt

Um herauszufinden, ob und in welchem Ausmaß der protektive Effekt auch bei direktem Zellkontakt eintrat, und wie viel Mikroglia hierfür nötig war, wurden Mikrogliazellen vor Aktivierung mit einer Anzahl zwischen 0 und 100.000/ cm² direkt auf Astrozyten-Monolayerkulturen gesät (Abb. 13).

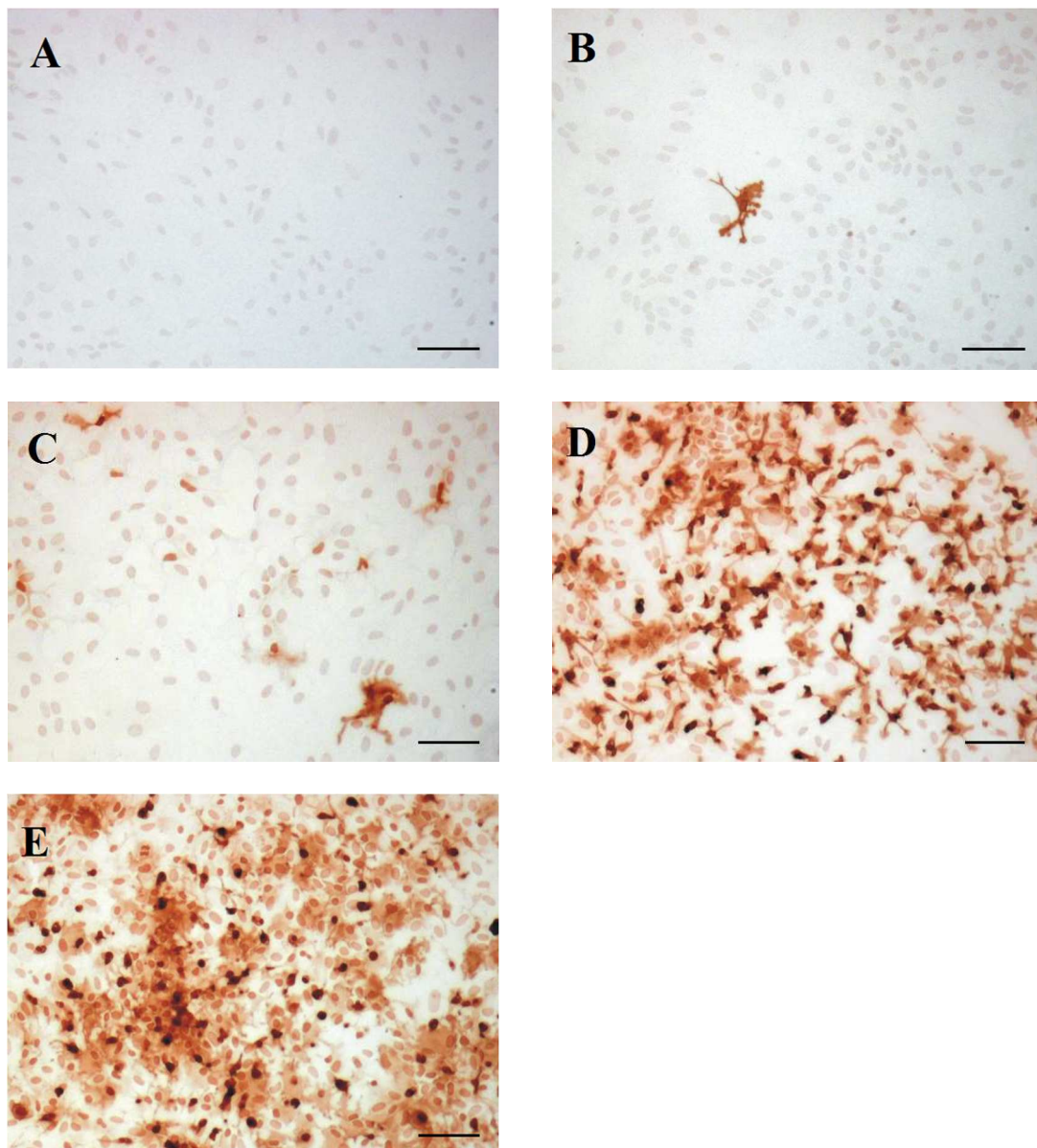


Abb. 13 Mikroglia-Aussaat auf Astrozyten: A) 0 Zellen/ cm², B) 100 Zellen/ cm², C) 1000 Zellen/ cm², D) 10.000 Zellen/ cm², E) 100.000 Zellen/ cm² (Ox-42/ DAB). Balken = 100 µm

Die Stimulation der Mikroglia erfolgte mit 0,02 µg/ml LPS für 24 Stunden. Je mehr Mikroglia in den Astrozytenkulturen vorhanden war, desto stärker war erwartungsgemäß auch die Gesamtaktivierung (Abb. 14 A). Abb. 14 B zeigt, dass sich die Gesamtzellvitalität nach oxidativem Stress durch 320 µM H₂O₂ in den Kontrollen (*ohne* LPS) auch mit steigendem Mikrogliaanteil nur unwesentlich ändert, während schon vorher in der Kokultur nach LPS-Aktivierung eine signifikant höhere Vitalität vorlag. Der protektive Effekt LPS-aktivierter Mikroglia auf Astrozyten nahm hierbei mit steigendem Mikrogliegehalt zu.

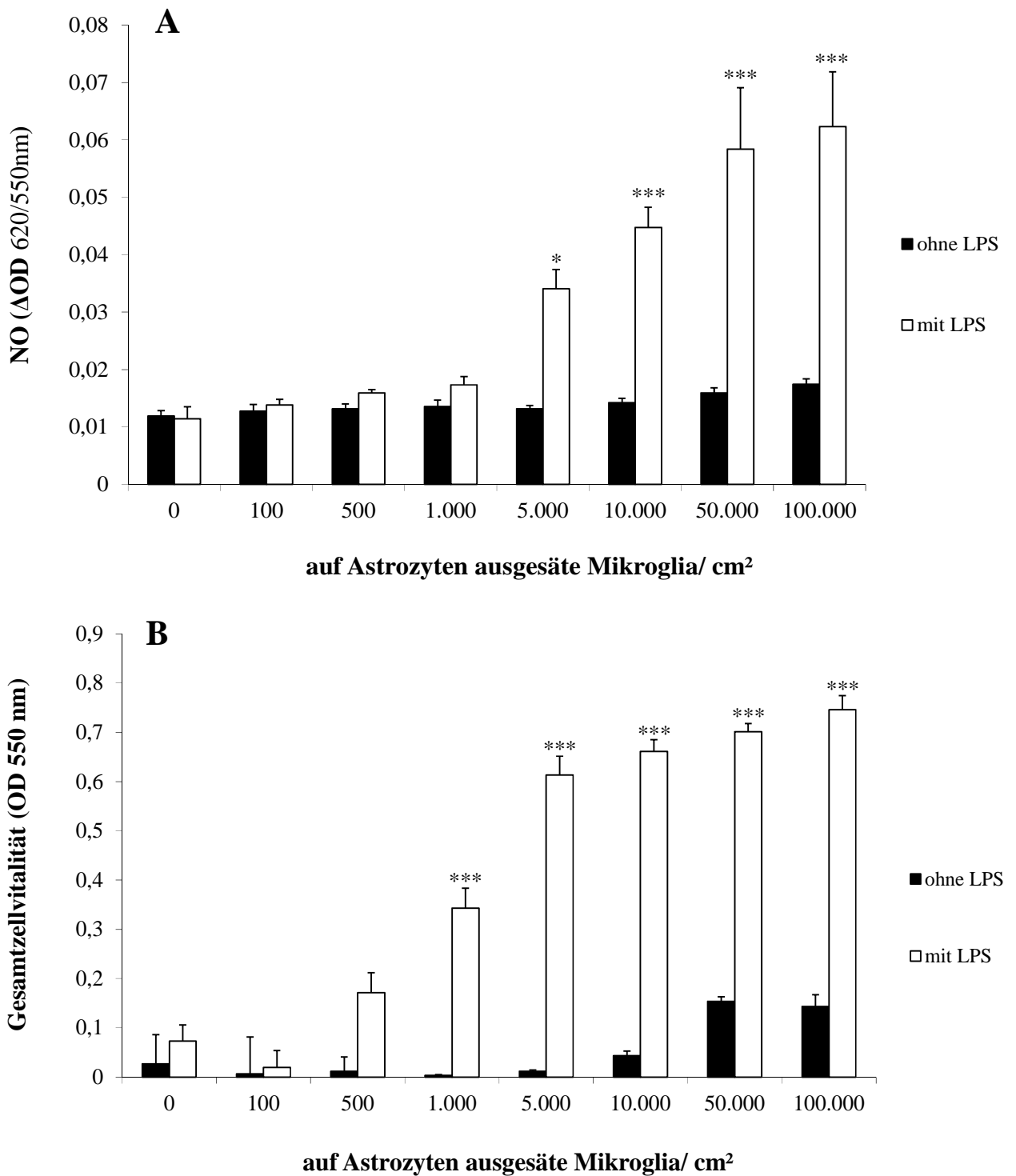


Abb. 14 NO-Bildung mit steigendem Mikrogliaanteil in der Astrozyten-Kultur nach 48-stündiger Stimulation mit LPS (0,02 μ g/ml) (A) sowie Messung der Gesamtzellvitalität nach Aussaat eines steigenden Mikrogliaanteils auf Astrozyten mit/ ohne Applikation von LPS und anschließendem oxidativen Stress durch 320 μ M H₂O₂ (B). Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von $n = 3$ unabhängigen Experimenten. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$; * vs. Kontrolle (= ohne LPS), (ANOVA, gefolgt von Tukey-Kramer-Test).

3.3.3.3. Einfluss des Zellkontakts auf die Stärke der Mikrogliaaktivierung

Um der Frage nachzugehen, ob für das Aktivierungspotential der Mikroglia der Kontakt mit umgebenden Astrozyten von Bedeutung ist, wurde die LPS-induzierte NO-Produktion der Mikroglia in Monokulturen und Astrozytenkokulturen verglichen. Hier zeigte sich in der Kokultur mit Astrozyten eine geringere Aktivierung der Mikroglia als im Vergleich zur Mikroglia-Monokultur (Abb. 15).

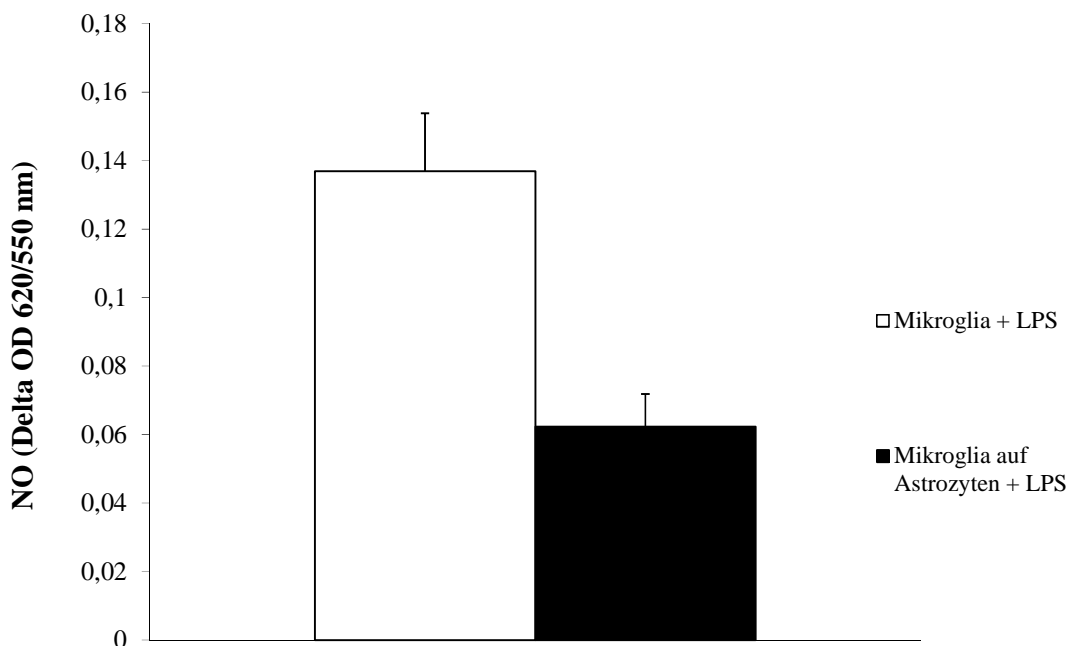


Abb. 15 Vergleich der Aktivierung von Mikrogliazellen (100.000 Zellen/ cm²) durch 0,02 µg/ml LPS mit und ohne Kokultur von Astrozyten (30.000 Zellen/ cm²). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± SEM aus *n* = 3 individuellen Experimenten.

3.3.4. Einfluss der Mikrogliaaktivierung auf die Astrozytotoxizität anderer Substanzen (Cumolhydroperoxid (CHP), Natriumnitroprussid (SNP) und Trimethylzinnchlorid (TMT))

Weitere Versuche wurden durchgeführt, um festzustellen, ob der protektive Effekt durch MKM [+] auch vorhanden war, wenn die zytotoxische Wirkung durch andere Substanzen ausgelöst wurde. Hierzu wurden Cumolhydroperoxid (CHP), Natriumnitroprussid (SNP) und Trimethylzinnchlorid (TMT) verwendet, weil sie sich in ihren Wirkmechanismen unterscheiden. CHP und SNP lösen ebenso wie H_2O_2 oxidativen Stress aus, wohingegen dies für das neurotoxische TMT nicht als zentraler Wirkmechanismus beschrieben wurde. Wie Abbildung 16 zeigt, ist der protektive Effekt von MKM [+] auch bei CHP-induziertem oxidativem Stress vorhanden. Nach 24 Stunden Inkubationszeit lag der EC_{50} -Wert für CHP auf Astrozyten ohne MKM-Vorbehandlung bei $112 \mu M$. Bei den Zellen, die mit dem normalen Wachstumsmedium versorgt wurden, dem zusätzlich noch LPS beigefügt worden war, lag der EC_{50} -Wert bei $115 \mu M$. Wie bereits bei H_2O_2 gezeigt, trat eine deutliche Rechtsverschiebung der Kurven ($EC_{50} = 171 \mu M$) nach einer Vorbehandlung mit konditioniertem Medium von ruhender Mikroglia mit und auch ohne LPS (MKM [-] und MKM [-] + LPS) auf. Astrozyten, die eine Vorbehandlung mit Medium durch LPS aktivierte Mikroglia (MKM [+]) erhielten, zeigten den besten Schutz gegenüber oxidativem Stress ($EC_{50} = 249 \mu M$).

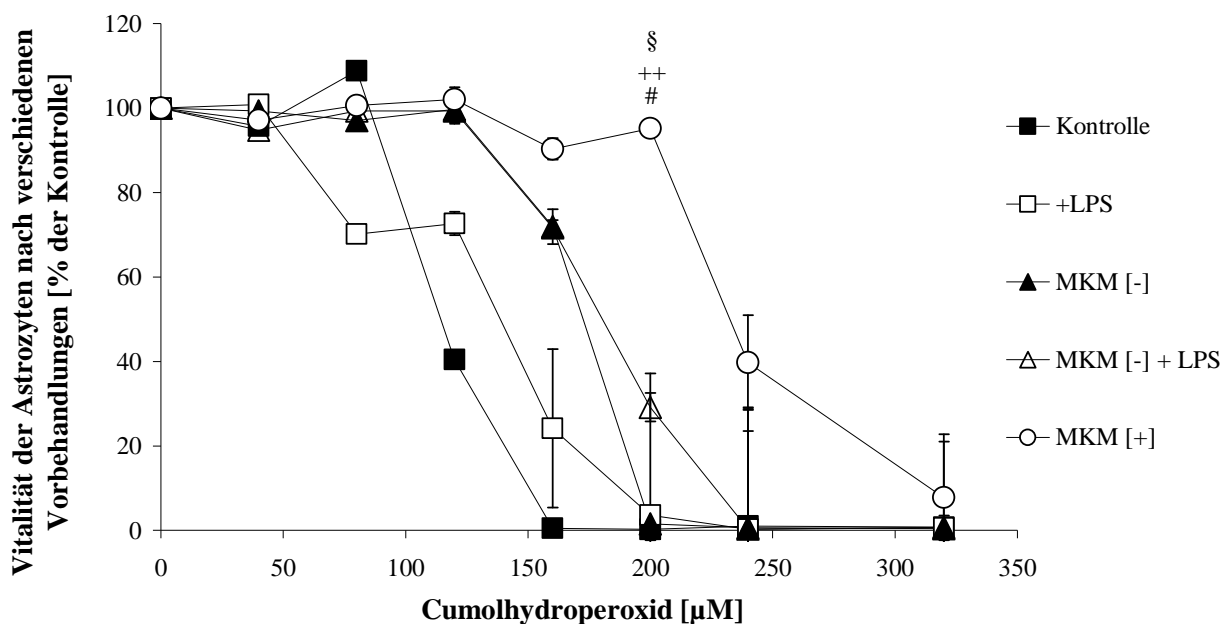


Abb. 16 Protektiver Effekt einer Astrozyten-Vorbehandlung mit MKM [+] (= konditioniertes Medium von LPS-stimulierter Mikroglia) über drei Tage auf die zytotoxische Wirkung von Cumolhydroperoxid (CHP). Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von $n = 3-4$ unabhängigen Experimenten (außer Kontrolle $n = 1$ [Medium ohne Vorbehandlung]; $n = 2$ für LPS + 120 und 200 μM CHP). §§§/+++/### $P < 0,001$, §§/++/## $P < 0,01$, §/+/# $P < 0,05$; § vs. LPS, + vs MKM[-], # vs. MKM[-]+LPS, (ANOVA, gefolgt von Tukey-Kramer-Test).

Tab. 4 EC_{50} -Werte von Astrozytenkulturen (graphisch ermittelt) nach unterschiedlichen Vorbehandlungen und oxidativem Stress durch CHP ($n = 3-4$ unabhängige Experimente, außer Kontrolle $n = 1$ [Medium ohne Vorbehandlung]; $n = 2$ für LPS + 120 und 200 μM CHP).

	EC_{50}-Werte für CHP \pm Standardabweichung [in μM]
56° Wachstumsmedium (Kontrolle)	112
Kontrolle + LPS	115 \pm 51
MKM [-]	161 \pm 35
MKM [-] + LPS	171 \pm 47
MKM [+]	249 \pm 49

Ergebnisse

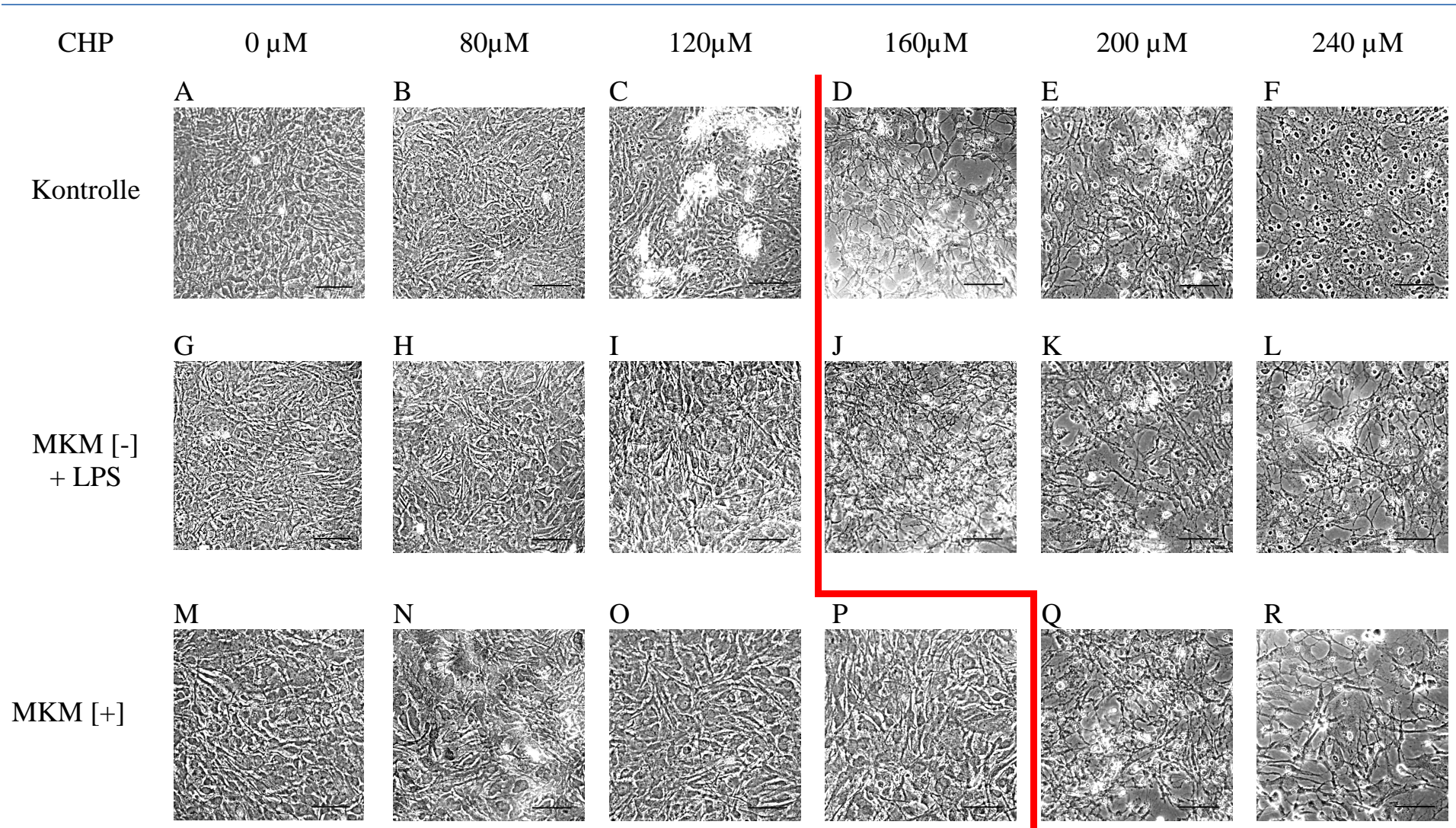


Abb. 17 Phasenkontrastmikroskopie. Astrozyten wurden über drei Tage mit normalem Wachstumsmedium (Kontrolle) [A-F], Medium ruhender Mikroglia mit LPS (MKM [-] + LPS) [G-L] oder mit konditioniertem Medium von LPS-aktivierter Mikroglia (MKM [+]) [M-R] versorgt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Cumolhydroperoxid (CHP) (24 h) in den angegebenen Konzentrationen. *Balken* 100 μM .

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Schutz für die mit MKM [+] vorbehandelten Astrozyten auch gegenüber oxidativem Stress bestand, der durch Sodianitroprussid (SNP) ausgelöst wurde (Abb. 18 A). Die Zellen in den Kontrollen waren bei einer Konzentration von 800 μ M SNP nahezu vollständig zerstört (13 %), wohingegen die Zellen, die mit MKM [+] und auch mit MKM [-]+LPS behandelt worden waren, noch relativ hohe Vitalitätsraten aufwiesen (83 %). Für die Behandlung der Zellen mit Trimethylzinn (TMT) gilt anderes. Hier hatten die mit MKM [+] vorbehandelten Astrozyten keinen erhöhten Schutz (Abb. 18 B).

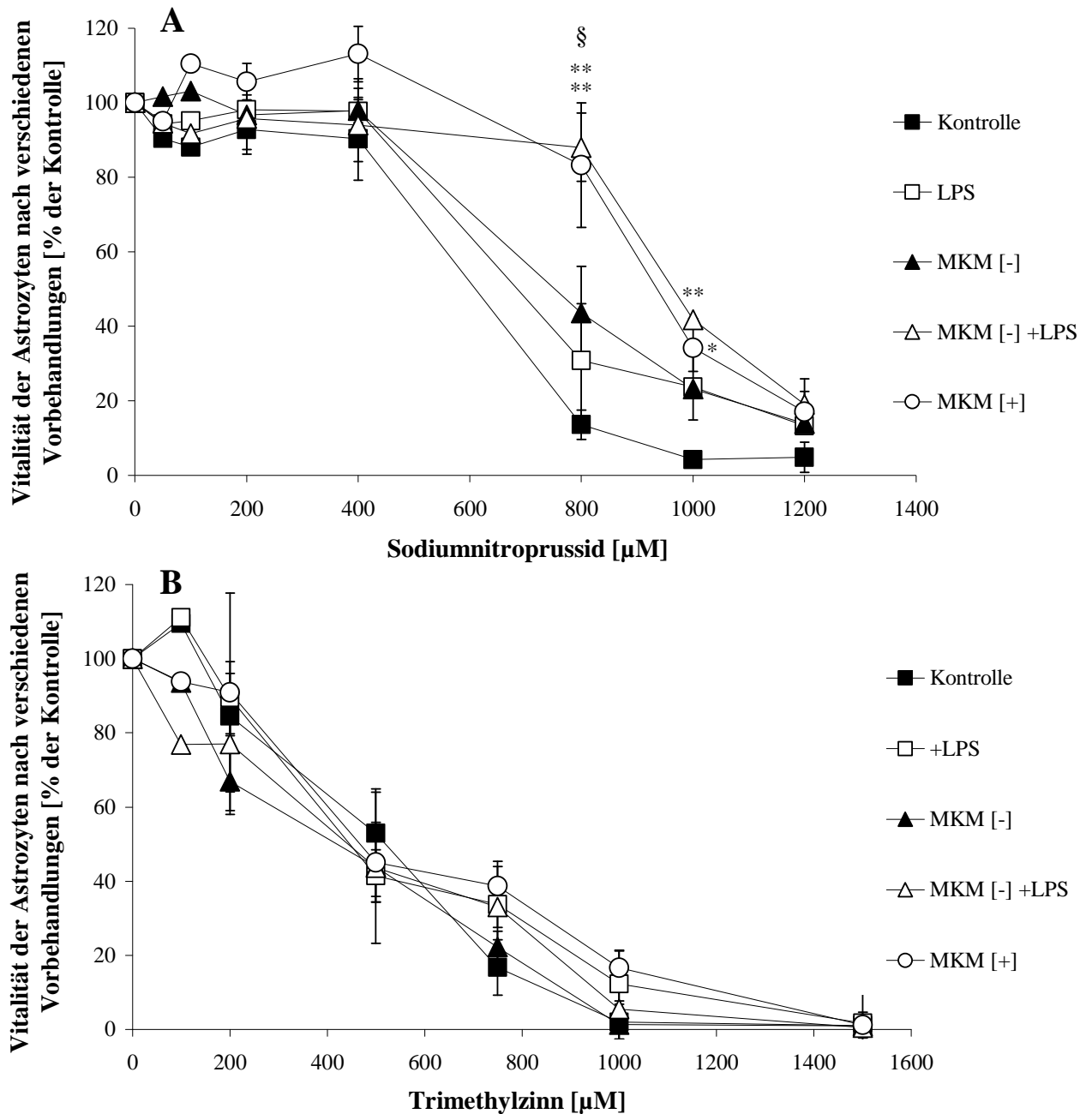


Abb. 18 Effekt von Sodiumnitroprussid (SNP) (A) und Trimethylzinn (TMT) (B) auf die Vitalität der Astrozyten nach Vorbehandlung mit normalem Wachstumsmedium (Kontrolle), konditioniertem Medium ruhender Mikroglia (MKM [-]), oder mit LPS versetzt (MKM [-] + LPS), mit LPS alleine oder mit konditioniertem Medium LPS-stimulierter Mikroglia (MKM [+]). Die mit MKM [+] vorbehandelten Astrozyten weisen gegenüber oxidativem Stress, der durch SNP verursacht wurde, eine signifikant höhere Resistenz auf als die Zellen in den Kontrollen. Bei TMT erbrachte die MKM [+] -Vorbehandlung keine erhöhte Resistenz. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert \pm SEM aus $n = 3-4$ unabhängigen Experimenten (außer $1500 \mu\text{M}$ TMT $n = 2$, $500 \mu\text{M}$ $n = 5$). ***/ $\S\S\S$ / $+++$ / $###$ $P < 0,001$, **/ $\S\S$ / $++$ / $##$ $P < 0,01$, */ \S / $+$ / $#$ $P < 0,05$; * vs. Kontrolle, \S vs. LPS, + vs MKM[-], # vs. MKM[-]+LPS, (ANOVA, gefolgt von Tukey-Kramer-Test).

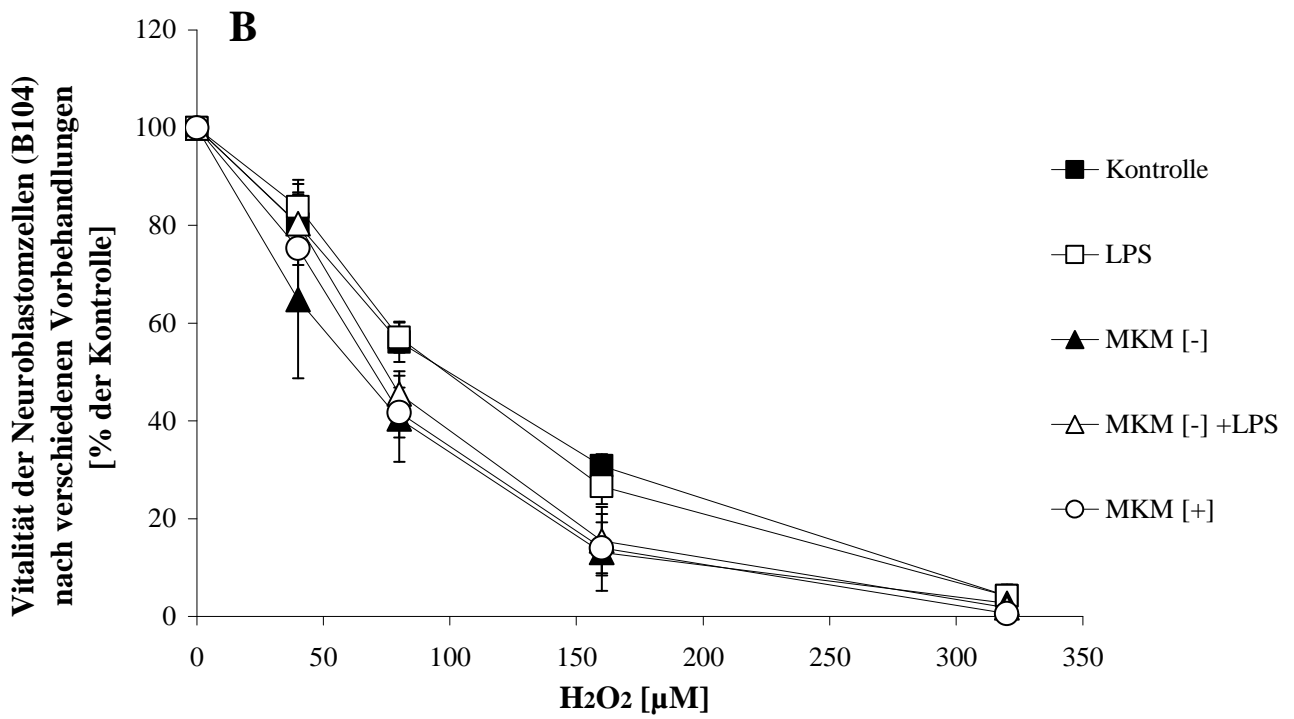
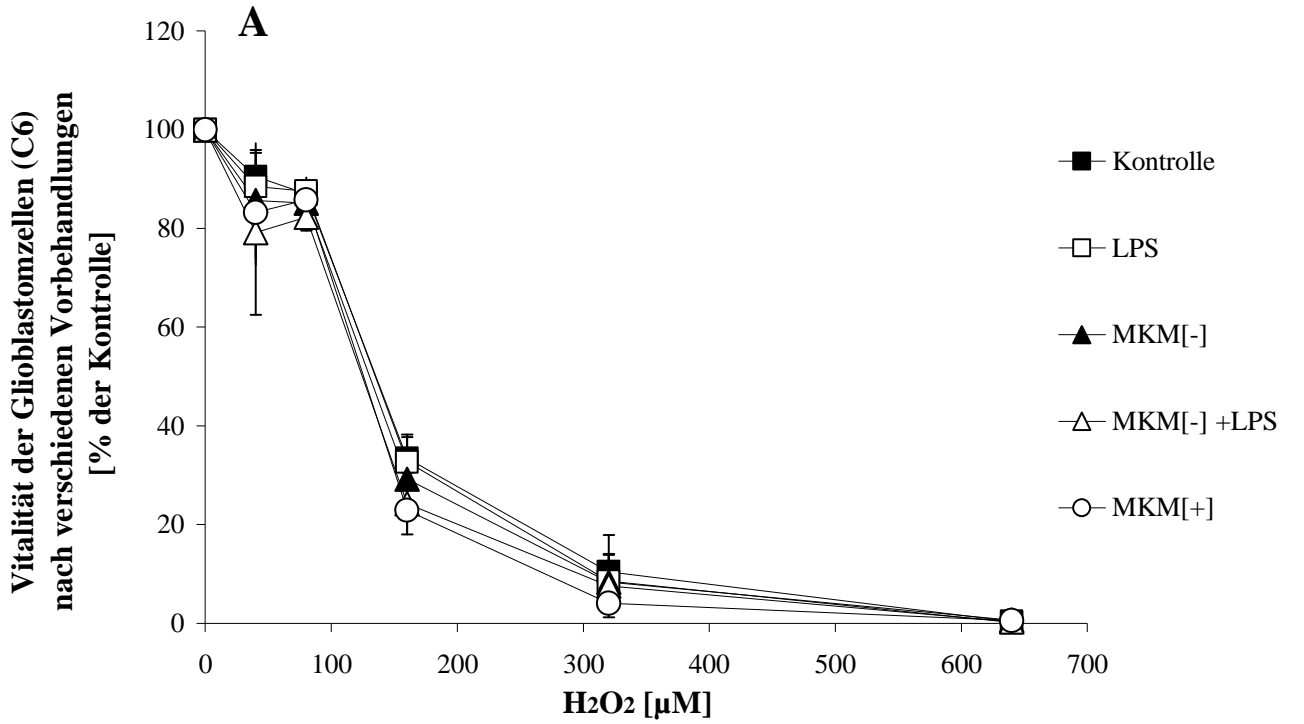
3.3.5. Einfluss der Mikrogliaaktivierung auf andere mit H₂O₂ behandelte Zellarten

Die bisher nachgewiesene protektive Wirkung von aktivierter Mikroglia bezog sich stets auf reine Astrozytenkulturen. Es stellte sich die Frage, ob der protektive Effekt auch bei anderen Zellarten auftritt. Dazu wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, die drei andere Zellarten ins Visier nahmen: Mikrogliazellen selbst, Glioblastomzellen (Zelllinie C6) und Neuroblastomzellen (Zelllinie B104).

Es stellte sich heraus, dass bei den C6-Tumorzellen kein protektiver Effekt nachgewiesen werden konnte. Die mit MKM[+] behandelten Zellen hatten im Gegenteil die geringsten Überlebenschancen. Der EC₅₀-Wert der unbehandelten Glioblastomzellen (Kontrolle) lag bei einer H₂O₂-Konzentration von etwa 135 µM, wohingegen die Zellen die mit MKM [-] +LPS und MKM [+] behandelt wurden, nur einen EC₅₀-Wert von etwa 125 µM vorweisen können (Abb. 19 A).

Ein ähnliches Ergebnis wurde für die Neuroblastomzellen (B104) festgestellt. Auch diese Tumorzellen wiesen im Gegensatz zu normalen Zellen keine erhöhten Überlebensraten nach der Behandlung mit Medium von aktivierter Mikroglia (MKM [+]) auf. Die EC₅₀-Werte lagen tendentiell sogar niedriger (59 µM) als in den Kontrollen (99 µM) (Abb. 19 B).

Mikrogliazellen profitierten von einer Aktivierung durch LPS jedoch auch selbst wie Abbildung 19 C verdeutlicht. Sie erhöhten so ihre eigene Resistenz gegenüber oxidativem Stress. Man erkennt, dass alle Wege der Vorbehandlung: direkt mit LPS, MKM [-] +LPS und MKM [+] zu einem nahezu gleich guten Schutz gegenüber oxidativem Stress führten. Im Vergleich zu den Kontrollen (EC₅₀-Wert 60 µM) wiesen die Zellen nach einer Behandlung mit LPS (EC₅₀ 240 µM), MKM [+] (EC₅₀ 200 µM) und MKM [-] +LPS (EC₅₀ 220 µM) eine deutliche Resistenzhöhung gegenüber oxidativem Stress auf.



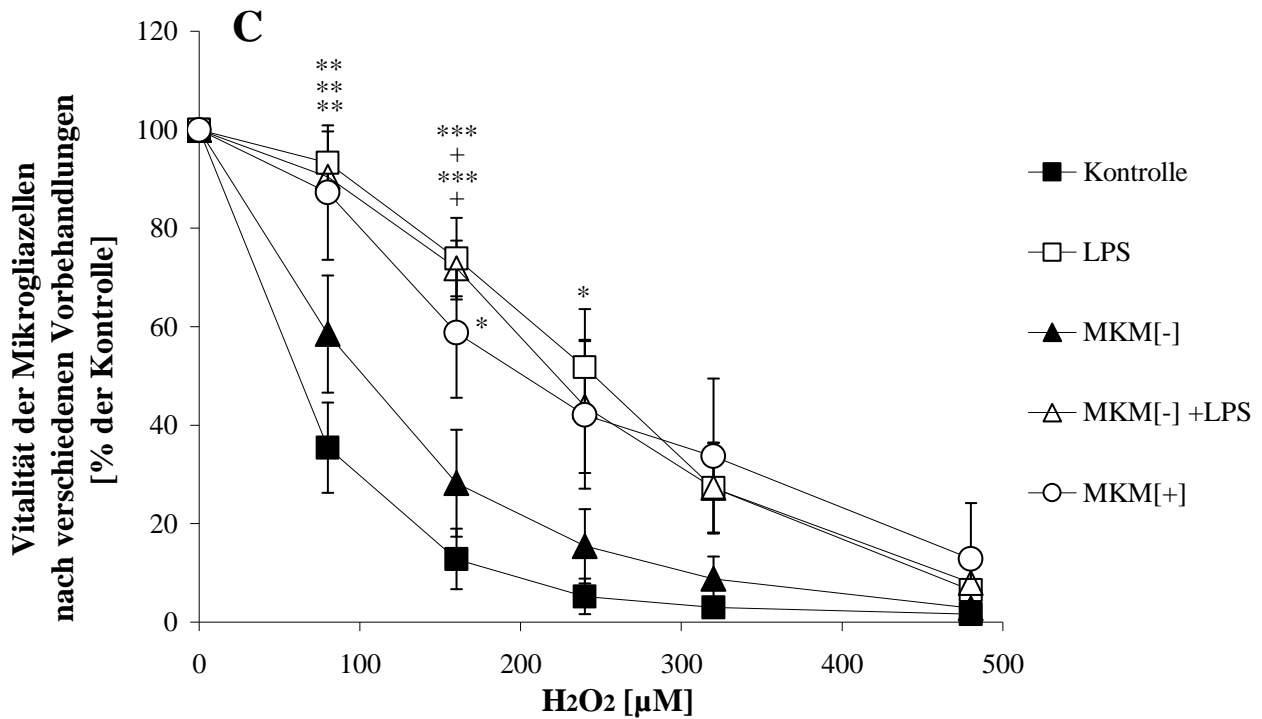


Abb. 19 Protektive Wirkung bei anderen Zellarten. Die Behandlung von Glioblastomzellen (A) und Neuroblastomzellen (B) mit MKM [+] bewirkte bei diesen Zellen keine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress durch H₂O₂. Anders bei Mikroglia (C), hier konnte der protektive Effekt deutlich nachgewiesen werden. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten (A: außer 640 und 40 μM $n = 2$; B: außer 40 μM $n = 2$; C: alle Werte $n = 7$). ***/§§§/+++/#### $P < 0,001$, **/§§/++/### $P < 0,01$, */§/+/# $P < 0,05$; * vs. Kontrolle, § vs. LPS, + vs. MKM[-], # vs. MKM[-]+LPS, (ANOVA, gefolgt von Tukey-Kramer-Test).

4 Diskussion

Viele neuropathologische Veränderungen sind Folge entzündlicher Mechanismen einschließlich oxidativem Stress auf zellulärer Ebene. Dies zeigt sich in der Regel an einer Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten. Die Bedeutung dieser Aktivierung und der Interaktionen zwischen den Zellen für das pathogenetische Geschehen sind bis heute nicht umfassend geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Bedeutung eine Mikrogliaaktivierung für den Umgang der Astrozyten mit oxidativem Stress hat.

4.1. Charakterisierung des in vitro-Modells

4.1.1. Vorteile von in vitro-Systemen

Bei der Arbeit mit einem Zellkulturmodell gibt es viele Vorteile: Die zu untersuchenden Zellen sind gut zu charakterisieren, können z.T. bei Bedarf eingefroren oder aufgetaut werden und separat voneinander behandelt werden, so dass beobachtete Effekte den Zelltypen gut zuzuordnen sind. Je nachdem welcher Zelltyp gewonnen werden soll, liegt bei Ratten der optimale Zeitpunkt zur Gewinnung von Zellen aus dem Cortex und den meisten anderen Hirnregionen zwischen 2-3 Tagen prä- und 2-3 Tagen postnatal (Lim und Bosch, 1990).

4.1.2. Reinheitsgrad

Für die Versuche wurden Primärkulturen von Mikroglia und Astrozyten aus den Gehirnen neugeborener Wistar-Ratten verwendet, wobei die Astrozyten nach Aufreinigung und Subkultur mit Mikroglia-konditioniertem Medium behandelt wurden, um herauszufinden, ob aktivierte Mikroglia das Verhalten von Astrozyten gegenüber oxidativem Stress verändert. Um auszuschließen, dass andere Zellen ursächlich oder in irgendeiner Art von Bedeutung für den protektiven Effekt waren, wurde Wert auf eine hohe Reinheit der Kulturen gelegt. Chang et al. (2000), die mit nicht aufgereinigten primären Gliazellkulturen arbeiteten, konnten mittels immunzytochemischer Färbungen 65 % der Zellen durch den astrozyten-spezifischen GFAP-Antikörper darstellen und 30 % der Zellen als Mikroglia mit dem F4/80-Antikörper identifizieren. Um einen hohen Reinheitsgrad unserer Kulturen zu erreichen, erfolgte in dieser Arbeit die Präparation der Kulturen nach der Methode von McCarthy und DeVellis (1980), wobei die Zellen verschiedenen Behandlungen unterzogen wurden: Mittels Schütteln der Zellen über Nacht konnten Oligodendrozyten entfernt werden. Um das Wachstum schnell

proliferierender Zellen wie Fibroblasten zu unterdrücken, erfolgte eine 4-tägige Behandlung der Kulturen mit der anti-mitotischen Substanz FDU. Anschließend wurden die Astrozytenkulturen durch eine zehnmünütige Präplattierung („Preplating“) von Mikroglia befreit. In den aufgereinigten Kulturen betrug der Anteil von Mikroglia ~ 0,5 %, der Oligodendrozyten ~ 1 %, der Neurone ~ 2 % und der Astrozyten ~ 96,5 %. Die im Vergleich zur Primärkultur deutlich höhere Zahl der Astrozyten deckt sich auch mit den Angaben anderer Gruppen, die mit der Methode von McCarthy und DeVellis arbeiteten. Kim und Täuber (1996) geben den Reinheitsgrad ihrer Astrozytenkulturen mit > 90 % an. Viviani et al. (1998) erreichten mit der gleichen Methode einen Reinheitsgrad der Astrozytenkulturen von 97 %. Gong et al. (2011) beschreiben eine weitere Methode, mit welcher sie einen Reinheitsgrad von 98 % in Astrozytenkulturen aus den Gehirnen neugeborener Spitzmäuse (*Tupaia belangeri*) erzielen. Das zentrale Problem all dieser Angaben besteht jedoch darin, dass allein immunzytochemische Färbungen des astrozyten-spezifischen GFAPs durchgeführt wurden und so keine Aussage über die prozentuale Verteilung der *anderen* Zellen in den Kulturen getroffen werden kann. Dies führt häufig zu einer Unterschätzung, da der Großteil der Zellen tatsächlich durch Astrozyten gestellt wird und sie einen dichten Zellrasen ausbilden. Durch die immunzytochemische Färbung mittels GFAP entsteht das irreführende Bild, es sei nicht genug Platz für andere Zellen (Saura, 2007). In vielen Studien wird der Anteil anderer Zellen in der Kultur nicht erfasst, so dass (mögliche) Mikrogliaeffekte und Wechselwirkungen mit den eigentlichen Zielzellen, den Astrozyten, nicht einzuschätzen sind. Aus diesem Grund untersuchten wir auch die prozentuale Verteilung anderer wichtiger Zellen in den Kulturen. Dies war für diese Arbeit sehr wichtig, denn insbesondere Mikrogliazellen in der Astrozytenkultur hätten zu Fehlinterpretationen führen können, da sie bereits in geringer Zahl durch Sekretion von Zytokinen das Verhalten der Astrozyten beeinflussen. Beispielsweise dachte man lange Zeit, dass prinzipiell Astrozyten für die LPS-induzierte NO-Produktion über die NO-Synthase 2 (iNOS) verantwortlich seien, da Astrozyten dieses Enzym in vitro (Akama, K.T. et al., 2000; Buskila, Y. et al., 2005) und in vivo (Murphy, S., 2000) exprimieren und NO produzieren können (Salvemini, D. et al., 1992; Lee, S.C. et al., 1993). Doch inzwischen weiß man, dass bei Stimulation mit LPS (0,025-10 µg/ml) nicht die Astrozyten, sondern hauptsächlich die Mikrogliazellen verantwortlich für eine NO-Produktion sind. Genauere Untersuchungen zeigten, dass nach LPS-Aktivierung (1 µg/ml) mehr als 98 % der iNOS-positiven Zellen positiv für den Mikroglia-Marker CD11 waren und weniger als 1 % aller iNOS-positiven Zellen positiv für GFAP (Astrozyten-Marker), (Saura, 2007; von Bernhardt et

al., 2004). Darüber hinaus hängt die iNOS-Expression in aktivierten Astrozyten und Mikroglia auch vom Aktivierungsstimulus ab. Nach LPS-Aktivierung war die iNOS-Expression in angereicherten Astrozytenkulturen sehr niedrig, stieg jedoch nach Aktivierung mit LPS + Interferon- γ (INF- γ) an und wurde noch deutlicher, nachdem die Zellen durch LPS + INF- γ + TGF β 1 (transforming growth factor β 1) aktiviert wurden (Hamby et al., 2006). Dieses Beispiel belegt die große Bedeutung einer hohen Reinheit der Kulturen. Nach Präparation und Aufreinigung unserer Astrozytenkulturen betrug der Mikrogliaanteil 0,5 %, wohingegen bei nicht-aufgereinigten Gliazellkulturen typischerweise bis zu 30 % Mikrogliazellen vorhanden sind (Chang et. al, 2000). Während in den gemischten Kulturen kaum Aussagen über die isolierten Eigenschaften von Astrozyten bei oxidativem Stress möglich sind, sind die in dieser Arbeit hoch aufgereinigten Astrozytenkulturen hierfür sehr viel besser geeignet. Trotzdem wurden Kontrollversuche durchgeführt. Beispielsweise wurde der Mikrogliaanteil in den Kulturen variiert oder auch direkt LPS auf Astrozyten appliziert, so dass sich eine Mikrogliakontamination hierbei durch eine Aktivierung der Mikrogliazellen mit folgendem protektiven Effekt auf die Astrozyten gezeigt hätte. Es ist davon auszugehen, dass auch in den aufgereinigten Kulturen noch weitere Zellarten vorhanden waren, die von uns jedoch nicht weiter quantifiziert wurden, wie z.B. Endothelzellen oder Fibroblasten. Jedoch ergibt die prozentuale Verteilung der von uns nachgewiesenen Zellen zusammengerechnet ~ 100 %, so dass der Anteil weiterer Zellarten minimal gewesen sein dürfte. Der Frage einer möglichen Modulation der Wechselwirkungen aktivierter Mikroglia und Astrozyten durch den sehr geringen Oligodendrozyten- (~ 1 %) und Neuronenanteil (~ 2 %) in den Astrozytenkulturen wurde in dieser Arbeit nicht nachgegangen.

4.2. Einfluss aktivierter Mikroglia auf die Empfindlichkeit von Astrozyten gegenüber oxidativem Stress

4.2.1. Erklärungen und Mechanismen für das beobachtete Phänomen (in vitro)

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass aktivierte Mikroglia direkt, aber auch das von ihnen konditionierte Medium (MKM [+]) allein, eine erhöhte Resistenz von Astrozyten gegenüber oxidativem Stress bewirken können, wobei sich mit MKM [+] der protektive Effekt gegenüber oxidativem Stress am deutlichsten erzielen ließ. Das Medium ruhender Mikroglia (MKM [-]) bewirkte einen wesentlich geringeren Schutz und die alleinige Applikation von

Lipopolysacchariden (0,02 µg/ml LPS) auf Astrozyten gar keinen. Durch weiterführende Untersuchungen an unserem Modell inklusive einer Proteomanalyse konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Mikroglia-konditioniertem Medium (MKM [+]) in den Astrozyten zur Hochregulierung mehrerer antioxidativer Enzyme führte, z. B. der Superoxiddismutase 2, der Glutathion-S-Transferase P, des Peroxiredoxins, des Retinol-Bindungsproteins und der Argininosuccinat-Synthase (Röhl et al., 2008). Aktivierte Mikroglia ist also in der Lage, antioxidative Schutzmechanismen in Astrozyten zu induzieren. Ähnliche Effekte konnten auch von anderen Arbeitsgruppen festgestellt werden. So wiesen Kifle et al. (1996) einen LPS-induzierten Anstieg des antioxidativen Enzyms Superoxiddismutase in Gliakulturen nach. Die Untersuchungen von Yu et. al (1999) bestätigen diese Ergebnisse.

4.2.2. Übertragbarkeit (in vivo)

Es stellte sich die Frage, ob sich die Ergebnisse unserer Arbeit auch in vivo bei pathologischen Veränderungen wiederfinden. Zahlreiche Studien weisen zunächst auf eine neurodegenerative Wirkung von LPS hin. Qin et al. (2007) zeigten, dass eine systemische Gabe von LPS (5 mg/kg) über TNF α aktivierte Mikrogliazellen zu einer chronischen Neuroinflammation und einem verzögerten sowie über Monate progredienten Verlust an dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra führen kann. Auch im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wird den aktivierten Mikrogliazellen zumeist eine negative, die Pathogenese fördernde Rolle zugesprochen. So wird z. B. die beim M. Parkinson beobachtete fortwährende Neurodegeneration mit einer persistierenden Mikrogliaaktivierung in Zusammenhang gebracht (Gerhard et al., 2006; Vila et al., 2001). Als eine der möglichen Ursachen dieser Mikrogliaaktivierung nennen Zhang et al. (2011) in ihrer Arbeit das extrazelluläre Neuromelanin, welches aus sterbenden Neuronen der Substantia nigra stammt. Es enthält hohe Konzentrationen reaktiven Eisens und wird beim M. Parkinson in großen Mengen und über lange Zeiträume im Extrazellulärraum vorgefunden (Zecca et al., 2002). Allerdings wird Neuromelanin in vitro von junger Mikroglia (10-20 Tage) innerhalb weniger Minuten phagozytiert und abgebaut, wohingegen ältere Mikrogliazellen (4 Wochen) die Fähigkeit der Phagozytose zwar behalten, jedoch das aufgenommene Neuromelanin zunehmend weniger abbauen können (Zhang et al., 2011), was zu einer verstärkten Mikrogliaaktivierung führen und ein Hinweis darauf sein könnte, warum überwiegend ältere Patienten am M. Parkinson

erkranken. Auch in den Zellkörpern der Mikroglia aus der Substantia nigra von Parkinsonpatienten findet man nicht-abgebautes Neuromelanin (Banati et al., 1998).

Obwohl diese Arbeiten der Mikrogliaaktivierung beim M. Parkinson eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression der Erkrankung zuschreiben, sind für Mikrogliazellen und LPS ebenfalls neuroprotektive Wirkungen beschrieben worden. Skaked et al. (2004) zeigten einen T-Zell-vermittelten neuroprotektiven Mechanismus, der mit einer frühen Aktivierung von Mikrogliazellen als antigen-präsentierenden Zellen verbunden ist. Vermutlich ist diese Mikrogliaaktivierung ein entscheidender Schritt, der das Überleben der umgebenden Neurone sichert. Bordet et al. (2000) wiesen in einem Versuch mit Wistar-Ratten einen neuroprotektiven Effekt durch geringe Dosen LPS (0,5 mg/kg intraperitoneale Applikation) nach. Dieses wurde 72 Stunden vor einem 60-minütigen intraluminalen Verschluss der A. cerebri media (mittels eines über die A. carotis communis eingeführten, an der Spitze abgerundeten Fadens) zugeführt und bewirkte einen zeit-verzögerten neuroprotektiven Effekt mit signifikantem Rückgang (-35 %) des Infarktolumens im Vergleich zur Kontrolle. Der Effekt trat nur bei niedrigen LPS-Dosen (0,25 bis 1 mg/kg) auf und verschwand ab einer Dosis von 2 mg/kg. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass ab dieser Dosis bereits eine Mikroglia-Überaktivierung vorliegt und die schädigende Wirkung durch Peroxide und proinflammatorische Substanzen überwiegt, wohingegen eine moderate Mikroglia-Aktivierung, möglicherweise durch erhöhte Expression antioxidativer Enzyme in benachbarten Astrozyten, hier offensichtlich positive Auswirkungen auf die umgebenden Zellen hat.

Bezüglich der Astrozyten gibt es in vivo-Beispiele, dass auch diese Zellen an der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie z. B. des M. Parkinson ursächlich beteiligt sein können. Beispielsweise konnten Vergiftungsfälle mit dem neurotoxischen MPTP (*1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin*) zeigen, dass hier die Astrozyten eine zentrale Rolle bei der Giftung von Substanzen wie MPTP spielen. Anschließend geben die Astrozyten es zurück in den Extrazellulärraum, wo es aufgrund seiner erhöhten Affinität zum Dopamin-Transporter v. a. in die dopaminergen Neurone der Substantia nigra gelangt und diese schädigt. Im Allgemeinen stehen bei den Astrozyten jedoch die positiven, neuroprotektiven Effekte im Vordergrund. Über die Sekretion von antioxidativem Gluthation, die Fähigkeit zur Regulierung des perineuronalen Neurotransmitter-, Protonen- und Ionengleichgewichts sowie die Sekretion neuronaler Wachstumsfaktoren sind sie im ZNS die protektiven und unterstützenden Zellen schlechthin. Neben den Astrozyten sind auch Neurone in der Lage, antioxidativ wirksames Glutathion zu synthetisieren. In der Substantia nigra von Parkinsonpatienten findet man typischerweise einen

reduzierten Glutathiongehalt (-40 %) (Sian et al., 1994). Gegg et al. (2003) zeigten, dass nach Exposition mit 0,5 mM NO in Astrozyten, anders als in Neuronen, welche mit einem massiven Zelltod reagieren, die GSH-Synthetase sowohl auf mRNA-Ebene als auch in ihrer Aktivität signifikant anstieg. Nach 24-stündiger NO-Behandlung verdoppelte sich die Glutathion-Abgabe in den extrazellulären Raum (Gegg et al., 2003). Neurone, die mit Astrozyten kokultiviert wurden, besaßen eine erhöhte Glutathion-Konzentration und waren resistenter gegenüber oxidativem Stress als Neurone in Monokultur (Barker et al., 1996). Somit sind Astrozyten in der Lage, das Glutathion mit ihrer Umgebung zu teilen und dadurch möglicherweise eine erhöhte Resistenz ihrer benachbarten Zellen (z. B. Neurone) gegenüber oxidativem Stress zu bewirken. Diese Fähigkeit besitzen Neurone, Mikroglia und Oligodendrozyten hingegen nicht (Hirrlinger et al. 2002).

In bestimmten Regionen des ZNS wurde eine selektive neuronale Vulnerabilität gegenüber oxidativem Stress beobachtet (Wang et al., 2010). Die unterschiedliche neuronale Vulnerabilität deckt sich mit den pathologisch betroffenen Arealen bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen wie z. B. M. Alzheimer, M. Parkinson oder der amyotrophen Lateralsklerose (ALS). Als ursächlich für die selektive neuronale Vulnerabilität werden u. a. mitochondriale Dysfunktionen, erniedrigte ATP-Produktion und mangelhafte DNA-Reparatur der Neurone diskutiert. Möglicherweise sind jedoch auch unterschiedliche Astrozytenpopulationen oder -dichten eine Erklärung für dieses Phänomen. Setzt man z. B. Neurone des Hippocampus Substanzen aus, die oxidativen Stress erzeugen, reagieren die Zellen der hippocampalen Region CA1, unabhängig von der eingesetzten Substanz, mit einem massiven Zelltod, wohingegen die benachbarten Neurone der Region CA3 größtenteils überleben (Wilde et al., 1997; Sarnowska, 2002). Auch die beiden Hauptpopulationen von dopaminergen Neuronen, z. B. in der Substantia nigra Pars compacta (A9) und der nahen ventralen tegmentalen Region (A10) weisen unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber oxidativem Stress auf. Neurone aus der A10 Region sind weitaus resistenter gegenüber oxidativem Stress als die anfälligeren A9-Neurone, welche die beim M. Parkinson betroffenen Zellen darstellen. Interessanterweise bemerkten Douhou et al. (2003) an Versuchen mit Weaver-Mäusen (Tiermodell mit einer Mutation, welche durch eine progressive Neurodegeneration der dopaminergen Neurone gekennzeichnet ist), dass in der tegmentalen Region (A10), wo die dopaminergen Neurone vollständig überlebten, eine permanente Aktivierung von Astrozyten vorlag. Diese Arbeiten weisen darauf hin, dass verschiedene Astrozytenpopulationen möglicherweise über eine unterschiedliche Ausstattung mit

antioxidativen Enzymen und damit über ein unterschiedliches Potential neuroprotektiver Wirkung verfügen. Die Beispiele zeigen, dass die in dieser Arbeit beobachteten Gliazellinteraktionen *in vitro* auch für die *in vivo*-Situation relevant sind.

4.2.3. Dauer der Vorbehandlung

In weiteren Versuchen sollten die Vorgänge, die zu einer protektiven Wirkung aktivierter Mikroglia auf Astrozyten gegenüber oxidativem Stress führen, zeitlich genauer eingegrenzt werden. Nach 18 Stunden hat der protektive Effekt sein Maximum erreichte. Dies entspricht dem typischen Zeitraum für die Proteinbiosynthese von antioxidativen Enzymen. So zeigten Röhl et al. (2009), dass der MKM [+] induzierte Anstieg von Sod2 in Astrozytenkulturen sein Plateau nach ca. 24 Stunden sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene erreicht hatte. Auch Nicolai et al. (1996) konnten nach 24 Stunden eine Verdopplung der Sod-mRNA-Expression nach vorheriger Behandlung mit cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) in C6-Ratten-Glioblastomzellen messen. Diesen Zeitraum der Proteinbiosynthese bestätigten auch die Untersuchungen von Brady et al. (1997), die nach 24 Stunden einen signifikanten Anstieg von iNOS und Sod auf mRNA- und Protein-Ebene in Ratten-Pneumozyten Typ II (Zelllinie L2) nach Instillation von IFN- γ und TNF- α feststellen konnten.

4.2.4. Dauer des protektiven Effekts

Der protektive Effekt aktivierter Mikroglia auf peroxid-behandelte Astrozyten bleibt länger als 4 Tage bestehen und nimmt in dieser Zeit um weniger als 50 % ab. Dies könnte auf eine noch verbliebene mRNA mit nachfolgender Proteinbiosynthese oder auf einen verzögerten Abbau antioxidativer Enzyme zurückzuführen sein. Die Konzentration der antioxidativen Enzyme muss unter eine bestimmte Grenze fallen, bevor die Zytotoxizität ansteigt. Bordet et al. (2000), die einen neuroprotektiven Effekt durch Vorbehandlung geringer Dosen LPS (0,5 mg/kg) nachgewiesen haben, stellten einen signifikanten Anstieg der cerebralen Superoxiddismutase nach 72 Stunden fest. Ähnlich wie in unserer Arbeit konnte noch mehrere Tage nach der Stimulation ein protektiver Effekt nachgewiesen werden. Diese Untersuchung zeigt, dass die *in vitro* festgestellte Dauer des protektiven Effekts sich mit diesen Daten *in vivo* deckt.

4.2.5. Stärke der LPS-induzierten Mikroglia-Aktivierung

Im direkten Kokulturmodell zeigt sich der protektive Effekt auf Astrozyten durch aktivierte Mikroglia bereits bei so niedrigen LPS-Konzentrationen (0,002 µg/ml), dass mittels Griess-Assay keine NO-Bildung mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 11). Dieses könnte darauf hindeuten, dass auch andere Faktoren wie Zytokine (z.B. TNF α oder IL-1 β) für den protektiven Effekt verantwortlich sind. Möglicherweise ist NO aber auch noch in einer sehr niedrigen Konzentration wirksam, die unterhalb der Nachweisgrenze der von uns verwendeten Methode liegt. Der spektrometrische Assay mittels Griess-Reagenz erlaubt eine Detektion von NO im mikromolaren Bereich ab ca. 2,5 – 3 µM Nitrit. Es gibt jedoch auch sensitivere Methoden, welche Nitrit im nanomolaren Bereich nachweisen können, z. B. die Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion (CLD) (Braman und Hendrix, 1989), die Nitrit ab ca. 50 nM nachweisen kann (Sievers, Boulder, CO, USA). Eine noch sensitivere Methode beschreiben Berkels et al. (2001), bei der Nitrit/ Nitrat in NO zurückgewandelt wird und mittels einer elektrochemischen Elektrode eine Nitrit-Konzentration bis zu 2 nmol/l gemessen werden kann. Da wir in unserer Arbeit nur mit dem weniger sensitiven Griess-Reagenz gearbeitet haben, ist nicht sicher auszuschließen, dass in den Proben mit sehr niedriger LPS-Stimulation bereits eine geringe NO-Produktion vorlag, welche man mit sensitiveren Methoden hätte nachweisen können.

4.2.6. Rolle des Zellkontakts

Um zu sichern, dass die Mikroglia-Aktivierung tatsächlich hinter dem beobachteten protektiven Effekt steckt, wurden die Parameter der Aktivierung systematisch verändert und untersucht, ob der protektiven Effekt hiervon beeinflusst wird.

Hierfür wurden ein indirektes (ohne Zellkontakt) und ein direktes (mit Zellkontakt) Kokulturmodell von Mikroglia und Astrozyten verwendet. Für das indirekte Kokulturmodell wurde bei einer konstanten Mikrogliamenge die Aktivierung durch unterschiedliche LPS-Konzentrationen verändert. Das mikroglia-konditionierte Medium wurde in der Mikroglia-monokultur gewonnen und diente anschließend zur Behandlung der aufgereinigten Astrozytenkulturen. Ein direkter Zellkontakt zwischen Mikroglia und Astrozyten bestand hierbei nicht. Beim direkten Kokulturmodell fand die Mikroglia-Aktivierung mit einer

konstanten LPS-Konzentration (0,02 µg/ml) direkt in der Kokultur statt. Die Gesamtaktivierung wurde durch unterschiedliche Mengen kokultivierter Mikroglia modifiziert.

Beide Modelle zeigten einen deutlichen protektiven Effekt aktivierter Mikroglia auf Astrozyten unter oxidativem Stress. Ein direkter Zellkontakt zwischen Astrozyten und Mikroglia ist also keine Voraussetzung für die Entwicklung einer höheren Resistenz der Astrozyten gegenüber oxidativen Substanzen, d. h. , dieser Effekt lässt sich mit löslichen Faktoren, wie z. B. NO und von aktivierter Mikroglia sezernierten Zytokinen (IL-1-β, IL-2, IL-3, IL-6, TNFα, IFγ) erklären. Ohne direkten Zellkontakt zwischen Astrozyten und Mikroglia trat der protektive Effekt sogar deutlicher hervor. Im indirekten Kokulturmodell zeigte sich infolge einer Mikrogliaaktivierung durch 0,02 µg LPS eine doppelt so starke Aktivierung, gemessen in der NO-Produktion (Δ OD 0,15), (Abb. 15), wie in der direkten Kokultur (Δ OD 0,06), obgleich dieselbe Mikrogliaadichte vorlag. Bei der direkten Kokultivierung entwickelte sich möglicherweise parallel eine antiinflammatorische Wirkung der Astrozyten auf die Mikroglia, wodurch es zu einer Abnahme der Mikroglia-Aktivierung kam. Astrozyten können unter bestimmten Bedingungen beispielsweise Schwefelwasserstoff produzieren, welches die Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch Mikroglia verringert (Lee et al., 2009 und 2010).

In den Versuchen, in denen Astrozyten mit steigendem Anteil Mikroglia kokultiviert wurden, fiel auf, dass eine geringe Zellvitalität nach H₂O₂-Behandlung ohne zuvor erfolgte LPS-Aktivierung mit ansteigendem Mikrogliaanteil bestehen blieb (Abb. 14 B, schwarze Balken). Dieser Effekt könnte durch die deutlich höhere Gesamtzelldichte erklärt werden, aus der eine bessere Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen resultieren kann. So konnte z. B. gezeigt werden, dass eine erhöhte Zelldichte mit einer besseren Entgiftungsfunktion und somit erhöhter Resistenz gegenüber akuter Toxizität durch H₂O₂ einhergehen kann (Gülden et al., 2010). Auch langfristige Effekte einer erhöhten Zelldichte von Astrozyten sind beschrieben, wie z.B. der Einfluss auf die Genexpression (Frisa und Jacobberger, 2002).

4.2.7. Anteil der Mikroglia im Kokulturmodell

Die Versuche zeigen, dass sich der Grad der Mikroglia-Aktivierung sowohl bei steigender LPS-Konzentration als auch bei steigender Mikroglia-Zellzahl erhöht. Darüber hinaus wird hier die Bedeutung der hohen Reinheit der Kulturen deutlich, denn es zeigte sich, dass bereits eine sehr

geringe Anzahl von 160 Mikrogliazellen pro 96er Well ($0,32 \text{ cm}^2$) die H_2O_2 -induzierte Zelltoxizität auf Astrozyten um ca. 30 % verringert. Diese Anzahl entspricht 500 Zellen pro cm^2 und entspricht nur knapp 2 % der Gesamtzellzahl. Auch Saura et al. (2007) wiesen bereits auf die Bedeutung von Mikrogliazellen in Astrozytenkulturen hin, da viele Arbeitsgruppen den Anteil dieser Zellen in Kultur nicht zählen/ bestimmen, Mikrogliazellen jedoch bereits in geringer Anzahl vielfältige Wirkungen (u. a. auf Astrozyten) ausüben können.

4.2.8. Protektive Wirkung anderer Substanzen (TMT, CHP, SNP)

Um zu untersuchen, ob der protektive Effekt aktivierter Mikroglia auf Astrozyten auch unter anderen oxidativen Stressbedingungen als durch H_2O_2 auftritt, setzten wir als weiteres Peroxid Cumolhydroperoxid (CHP) ein, außerdem Natriumnitroprussid (SNP) und Trimethylzinnchlorid (TMT). Diese Substanzen wurden eingesetzt, da sie sich in ihren Wirkmechanismen unterscheiden. Das anorganische Peroxid H_2O_2 kann entweder frei über die Zellmembran diffundieren oder wie das organische Peroxid CHP durch Kanäle in der Zellmembran (Aquaporine) ins Zellinnere gelangen (Bienert et al., 2007). Anders als H_2O_2 führt die Behandlung mit CHP vor allem zu einer Lipidperoxidation und damit vor allem zu einer Schädigung der Zellmembran (Linden et al., 2008, Vroegop et al., 1995). Bei Verwendung von CHP auf zuvor MKM [+] -vorbehandelte Astrozyten erhöhte sich der EC_{50} -Wert von $120 \mu\text{M}$ auf $220 \mu\text{M}$, d. h. auch hier konnte die MKM [+] -Behandlung den zytotoxischen Effekt verringern (Abb. 16). Allerdings zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Höhe der EC_{50} -Konzentrationen von CHP ($220 \mu\text{M}$) und H_2O_2 ($650 \mu\text{M}$), aus der sich eine höhere Toxizität des CHP ableiten lässt. Dieses Phänomen ist möglicherweise auf die unterschiedlichen Zielstrukturen in bzw. auf der Zelle zurückzuführen, da CHP mittels Lipidperoxidation vor allem die Zellmembran schädigt, wohingegen H_2O_2 im Zellinneren wirkt. Das Medium ruhender Mikroglia (MKM [-]) sorgte wie auch bei der Behandlung mit H_2O_2 für einen leichten protektiven Effekt gegenüber oxidativem Stress ($\text{EC}_{50} = 170 \mu\text{M}$). Dies könnte auf eine generell auch bei ruhender Mikroglia vorhandene Schutzfunktion hindeuten, welche jedoch deutlich geringer ausgeprägt ist als jene unter Aktivierungsbedingungen. Möglicherweise war während der Kontroll-Mediumkonditionierung aber auch eine leichte Aktivierung der in dieser Arbeit als ruhend betrachteten Mikroglia durch die Kulturbedingungen vorhanden.

SNP gehört in die Gruppe der Cyanide. In der Medizin ist es über NO-Freisetzung in der glatten Muskulatur als stark blutdrucksenkendes Medikament bekannt. Die Vorbehandlung von Astrozyten mit MKM [+] bewirkte auch gegenüber oxidativem Stress durch SNP eine erhöhte Resistenzentwicklung. Bei einer Konzentration von 800 μM überlebten nur 13 % der Zellen ohne Vorbehandlung, jedoch 83 % nach MKM [+] -Behandlung (Abb. 18 A).

TMT gehört zu den Organozinnverbindungen und führt vor allem im Hippocampus und anderen Regionen des limbischen Systems zum neuronalen Zelltod und begleitender Astroglieose (Latini et al., 2010). TMT bewirkt schwere Störungen des Glutamat- und GABA-Stoffwechsels (Naalsund et al., 1985; Hikal et al., 1988), was zu einer Übererregbarkeit der Neurone und damit klinischen Erscheinungen wie Tremor, Krampfanfällen und Gedächtnisverlust führen kann. Es wirkt nicht als Prooxidanz und erwartungsgemäß konnte für TMT auch kein protektiver Effekt durch MKM [+] nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen zeigen, dass der protektive Effekt durch aktivierte Mikroglia auch bei anderen, oxidativen Stress erzeugenden Substanzen auftritt, nicht jedoch bei Substanzen wie TMT, die nicht oxidativ wirken. Die Beobachtung unterstützt die Annahme eines allgemeinen Wirkmechanismus des protektiven Effekts gegenüber oxidativem Stress, z. B. über die Hochregulation antioxidativer Enzyme in den Astrozyten.

4.2.9. Protektive Wirkung auf andere Zellarten

Um festzustellen, ob der protektive Effekt gegenüber oxidativem Stress durch aktivierte Mikroglia auch bei Interaktionen mit anderen Zellarten auftritt, wurden Astrozyten durch andere Zellarten ersetzt. Es wurden Versuchsreihen mit Neuroblastomzellen (B104-Zelllinie), Glioblastomzellen (C6-Zelllinie) sowie Mikrogliazellen selbst durchgeführt. Während bei vorbehandelten Mikrogliazellen ein protektiver Effekt gegenüber H_2O_2 -induziertem oxidativem Stress nachgewiesen werden konnte, war dies bei den C6-Gliomzellen und den B104-Neuroblastomzellen nicht der Fall. Diese Zellen schienen sogar im Gegenteil anfälliger gegenüber oxidativem Stress zu sein. Möglicherweise hat der erhöhte Stoffwechsel und Zellumsatz schnellproliferierender Zelllinien durch einen höheren Nährstoffverbrauch zur Folge, dass die Zellen gegenüber oxidativem Stress durch den (relativen) Nährstoffmangel empfindlicher werden.

Dass auch Mikrogliazellen selbst resistenter gegenüber oxidativem Stress werden, könnte jedoch darauf hinweisen, dass nicht nur die Astrozyten unter den Gehirnzellen von einer

moderaten Mikrogliaaktivierung profitieren, sondern dass sich Mikroglia auch selbst vor oxidativem Stress schützen können.

4.3. Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde mithilfe eines geeigneten in vitro-Modells die Wirkung aktivierter Mikroglia auf die Resistenz von Astrozyten gegenüber oxidativem Stress, der eine wichtige Rolle in der Pathogenese neurologischer Erkrankungen spielt, untersucht. Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Arbeit, dass eine Mikroglia-Aktivierung durch LPS in vitro die Resistenz von Astrozyten und Mikroglia gegenüber oxidativem Stress, hervorgerufen durch unterschiedliche Prooxidantien, effektiv steigert.

In dem vorliegenden in vitro-Modell konnte durch die beschriebenen Präparationsschritte eine hohe Reinheit der Kulturen erzielt werden, so dass mögliche (Wechsel-)Wirkungen mit anderen Zellarten weitestgehend ausgeschlossen werden konnten. Dies ist von Bedeutung, da sich gezeigt hat, dass bereits geringe Mengen Mikroglia (ab ca. 3 % Mikrogliaanteil in den Astrozytenkulturen) die Astrozyten in ihrer Empfindlichkeit beeinflussen können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass aktivierte Mikrogliazellen Astrozyten und Mikroglia selbst resistenter gegenüber oxidativem Stress machen können. Hierfür sind bereits so niedrige LPS-Konzentrationen ausreichend, dass eine erhöhte NO-Bildung der Mikroglia mittels Griess-Assay nicht mehr nachweisbar ist. Dass der protektive Effekt aktivierter Mikroglia nicht nur nachhaltig, sondern auch sehr schnell, nämlich innerhalb weniger Stunden, induzierbar ist, könnte möglicherweise für zukünftige Therapieansätze bei akuten zerebralen Pathologien, die mit oxidativem Stress einhergehen, z. B. Ischämien und Traumata oder sogar für einen prophylaktischen Einsatz, von Interesse sein.

Hinsichtlich der widersprüchlichen Meinungen über die Rolle von Mikrogliazellen in der Pathogenese neurodegenerativer und -inflammatorischer Erkrankungen zeigt unsere Arbeit wichtige Aspekte auf, so z. B. die Bedeutung der Aktivierungsstärke. Protektive Effekte treten besonders bei einer moderaten Aktivierung auf, wohingegen dieser Effekt bei stärkerer Aktivierung durch LPS wieder abnimmt. Auch in in vivo-Modellen zu oxidativem Stress konnte gezeigt werden, dass LPS-Vorbehandlungen zwar in niedrigen, aber nicht in höheren Konzentrationen neuroprotektiv wirken, da bei höheren LPS-Konzentrationen am ehesten eine Mikroglia-Überaktivierung eintritt und die schädigende Wirkung durch Peroxide und proinflammatorische Substanzen in den Vordergrund tritt. Durch die Versuche mit zwei

verschiedenen Kokulturmodellen wurde bei gleicher Menge LPS die unterschiedlich starke Aktivierung von Mikrogliazellen mit und ohne Astrozytenkontakt sichtbar, was einen interessanten Hinweis auf die Rolle des Gliazellkontakts *in vivo* gibt. Bei direktem Zellkontakt üben die Astrozyten eine antiinflammatorische Wirkung auf die Mikrogliazellen aus und reduzieren so die Mikrogliaaktivierung. Vor dem Hintergrund des Problems der Mikroglia-Überaktivierung mit den entsprechend negativen Folgen neurologischer Erkrankungen sind weiterführende Untersuchungen zur antiinflammatorischen Wirkung von Astrozyten auf Mikrogliazellen von großem Interesse. Durch Kenntnis dieser Zusammenhänge und deren Regulationsmechanismen könnte Einfluss auf die Balance zwischen protektiver Mikrogliaaktivierung und schädigender Überaktivierung genommen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich aktivierte Mikroglia auch selbst gegen oxidativen Stress schützen. Möglicherweise sind die Mikrogliazellen über einen Feedback-Mechanismus zu einer Autoprotektion gegenüber ihrer Aktivierung in der Lage. Dass oxidativer Stress im Zusammenhang mit dem protektiven Effekt eine zentrale Bedeutung hat, wird dadurch unterstrichen, dass z. B. kein Schutzeffekt gegenüber TMT erzielt werden konnte, welches neurotoxisch, aber nicht oxidativ wirkt.

Oxidativer Stress im zentralen Nervensystem spielt bei zahlreichen neurodegenerativen und -inflammatorischen Erkrankungen, Ischämien und Traumata eine entscheidende Rolle. Die Kenntnis der Zellinteraktionen erscheint für ein besseres Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankungen essentiell. Im vorliegenden Zellkulturmodell konnte die schützende Funktion aktivierter Mikroglia auf nicht-neuronale Gliazellen gezeigt werden. Das in dieser Arbeit verwendete Zellkulturmodell eignet sich, um in zukünftigen Untersuchungen weitere Aspekte des komplexen Zusammenspiels zwischen Mikroglia und Astrozyten aufzudecken.

5 Zusammenfassung

Bei vielen neuropathologischen Prozessen kann sowohl eine Mikroglia- als auch eine Astrozytenaktivierung (Gliosis) beobachtet werden. In zahlreichen Studien ist die zentrale Rolle der Gliaaktivierung für das Überleben, den Schutz aber auch eine mögliche Schädigung neuronaler Zellen, z. B. unter oxidativem Stress, dokumentiert worden. Es ist jedoch wenig über die Rolle der Zellinteraktionen zwischen den Gliazellen während ihrer Aktivierung bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, mithilfe eines geeigneten *in vitro*-Modells die Wirkung aktivierter Mikroglia auf die Resistenz von Astrozyten gegenüber oxidativem Stress zu untersuchen. Hierfür wurden hochaufgereinigte Mikroglia- und Astrozytenkulturen aus den Gehirnen neugeborener Ratten nach der Methode von McCarthy und DeVellis verwendet. Um den Effekt aktivierter Mikroglia auf Astrozyten zu untersuchen, wurden Astrozyten mit Mikroglia-konditioniertem Medium behandelt, welches entweder von ruhender Mikroglia (MKM [-]) oder LPS-aktivierter Mikroglia (MKM [+]) stammte. Neben diesem Kokulturmodell (Zellinteraktionen nur indirekt über lösliche Faktoren im MKM) wurde mit einem zweiten Kokulturmodell gearbeitet, in dem ein direkter Zellkontakt zwischen Mikrogliazellen und Astrozyten bestand, um herauszufinden, ob der Zellkontakt, wie er *in vivo* vorhanden ist, für den protektiven Effekt notwendig ist. Der Grad der Mikroglia-Aktivierung wurde anhand der Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) bestimmt. Nach der Vorbehandlung mit mikroglia-konditioniertem Medium wurden die Astrozyten 24 Stunden lang oxidativem Stress durch Exposition gegenüber Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Cumolhydroperoxid (CHP) oder Sodianitroprussid (SNP) ausgesetzt. Anschließend wurde der Grad der Zellschädigung anhand der Zellvitalität (MTT Assay), des Gesamtzellproteingehalts (Lowry Assay) und der Integrität der Zellkulturen (Phasenkontrastmikroskopie) bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass:

1. LPS-aktivierte Mikroglia die Resistenz von Astrozyten gegenüber durch Peroxide ausgelösten oxidativen Stress erhöht. Die EC₅₀-Werte für H₂O₂ stiegen z. B. von 275 µM (Kontrolle) auf 540 µM (MKM [+]-Vorbehandlung).

2. die Zeitdauer des protektiven Effekts innerhalb weniger Stunden nach Beginn der Vorbehandlung einsetzt (Maximum nach 18 Stunden erreicht) und mindestens vier Tage nach Beendigung der Mikrogliawirkung anhält.
3. der protektive Effekt der Mikrogliazellen vom Grad ihrer Aktivierung abhängig ist. Das Maximum der nachweisbaren NO-Produktion als Parameter für die Aktivierung ist bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml LPS erreicht. Ein protektiver Effekt tritt jedoch bereits bei 0,002 µg/ml LPS auf.
4. der Zellkontakt keine Voraussetzung für den protektiven Effekt ist und somit über lösliche Faktoren im MKM vermittelt werden muss. Ein direkter Zellkontakt sorgt jedoch möglicherweise für eine Verstärkung des protektiven Effekts, da er hier bereits bei deutlich niedrigerer Mikrogliaaktivierung aufgetreten ist.
5. gegenüber oxidativem Stress, ausgelöst durch andere Substanzen (CHP und SNP), ebenfalls ein protektiver Effekt durch aktivierte Mikrogliazellen besteht, nicht jedoch bei TMT, welches zwar neurotoxisch, aber nicht oxidativ wirkt.
6. Mikroglia-Zellen sich durch eine Aktivierung auch selbst gegenüber oxidativem Stress schützen können.
7. bei den von uns verwendeten Zelllinien (Glioblastomzellen und Neuroblastomzellen) kein protektiver Effekt induziert werden kann.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass aktivierte Mikrogliazellen auf Astrozyten eine schützende Wirkung gegenüber oxidativem Stress haben. Diese wurde im Detail untersucht. Für zukünftige Therapieansätze zur Behandlung neurodegenerativer und –inflammatorischer Erkrankungen könnte besonders die schnelle Induzierbarkeit und Nachhaltigkeit des protektiven Effekts von Interesse sein. Da der protektive Effekt nur bei einer moderaten Mikrogliaaktivierung auftritt, eine starke Mikrogliaaktivierung jedoch eher schädigend wirkt, wären weiterführende Studien zur antiinflammatorischen Wirkung von Astrozyten von Interesse, um Kenntnisse darüber zu erlangen, wie eine überschießende Mikrogliaaktivierung mit den entsprechend negativen Folgen für die Zellen des zentralen Nervensystems verhindert

werden kann. Das vorliegende in vitro-Modell scheint mit der Ausnahme von Zelllinien, bei denen der protektive Effekt nicht nachweisbar war, gut geeignet zu sein, um weitere Studien zu den komplexen Interaktionen zwischen Mikroglia und Astrozyten durchzuführen.

6 Literaturverzeichnis

- Akama, K.T. und Van Eldik, L.J. 2000. Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxidesynthase in astrocytes is interleukin-1 beta- and tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha)-dependent, and involves a TNFalpha receptor-associated factor- and NfkappaB-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J Biol Chem* 275: 7918-7924
- Aloisi, F., 2001. Immune function of microglia. *Glia* 36(2): 165-179
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. und Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(17): 7915-7922
- Aschner, M., Sonnewald, U. und Tan, K.H. 2002. Astrocyte modulation of neurotoxic injury. *Brain Pathol* 12(4): 475-481
- Badie, B. und Schartner, J. 2001. Role of microglia in glioma biology. *Microsc Res Tech* 54(2): 106-113
- Banati, R.B., Daniel, S.E. und Blunt, S.B. 1998. Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. *Mov Disord* 13(2): 221-227
- Barker, J.E., Bolanos, J.P., Land, J.M., Clark, J.B. und Heales, S.J. 1996. Glutathione protects from peroxynitrite-mediated mitochondrial damage: implications for neuronal/ astrocytic trafficking and neurodegeneration. *Dev. Neurosci.* 18(5-6): 391-396
- Beckman, J.S. und Koppenol, W.H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1): C1424-1437
- Benda, P., Someda, K., Messer, J. und Sweet, W.H. 1971. Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J Neurosurg* 34(3): 310-323
- Berkels, R., Purol-Schnabel, S. und Roesen, R. 2001. A new method to measure nitrate/nitrite with a NO-sensitive electrode. *J Appl Physiol*.90(1): 317-320
- von Bernhardt, R. und Eugenin, J. 2004. Microglial reactivity to beta-amyloid is modulated by astrocytes and proinflammatory factors. *Brain Res.* 1025(1-2): 186-193
- Bienert, G.P., Møller, A.L., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Møller, I.M., Schjoerring, J.K. und Jahn, T.P. 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem.* 282(2): 1183-1192

Block, M.L. und Hong, J.S. 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology* 76(2): 77-98

Bordet, R., Deplanque, D., Maboudou, P., Puisieux, F., Pu, Q., Robin, E., Martin, A., Bastide, M., Leys, D., Lhermitte, M. und Dupuis, B. 2000. Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20(8): 1190-1196

Brady, T.C., Chang, L.Y., Day, B.J., Crapo, J.D. 1997. Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF-kappa B activation. *Am J Physiol.* 1997 Nov; 273(5 Pt 1): L1002-6

Braman, R.S. und Hendrix, S.A. 1989. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal Chem.* 61(24): 2715-2718

Buskila, Y., Farkash, S., Hershinkel, M. und Amitai, Y. 2005. Rapid and reactive nitric oxide production by astrocytes in mouse neocortical slices. *Glia* 52: 169-176

Chang, R.C.C., Hudson, P., Wilson, B., Haddon, L. und Hong, J.-S. 2000. Influence of neurons on lipopolysaccharide-stimulated production of nitric oxide and tumor necrosis factor- α by cultured glia. *Brain Research* 853(2): 236-244

Clancy, R.M., Amin, A.R. und Abramson, S.B. 1998. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum.* 41(7): 1141-1151

Dermietzel, R. und Spray, D.C. 1998. From neuro-glue („Nervenkitt“) to glia: a prologue. *Glia.* 24(1): 1-7

Desagher S., Glowinski, J. und Premont, J. 1996. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci* 16(8): 2553-2562

DeWitt, D.L. 1999. Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol Pharmacol* 55: 625-631

Douhou, A., Debeir, T., Michel, P.P., Stankovski, L., Oueghlani-Bouslama, L., Verney, C. und Raisman-Vozari, R. 2003. Differential activation of astrocytes and microglia during post-natal development of dopaminergic neuronal death in the weaver mouse. *Brain Res Dev Brain Res.* 145(1): 9-17

Drukarch, B., Schepens, E., Stoof, J.C., Langeveld, C.H. und Van Muiswinkel, F.L. 1998. Astrocyte-enhanced neuronal survival is mediated by scavenging of extracellular reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 25(2): 217-220

-
- Eder C., Klee R. und Heinemann U. 1997. Distinct soluble astrocytic factors induce expression of outward K⁺ currents and ramification of brain macrophages. *Neurosci. Lett.* 226(3): 147-150
- Eder C., Schilling T., Heinemann U., Haas D., Hailer N. und Nitsch R. 1999. Morphological, immunophenotypical and electrophysiological properties of resting microglia in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 11: 4251-4261
- Eng, L.F. und Ghirnikar, R.S. 1994. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathology* 4: 229-237
- Eskes, C., Honegger, P., Juillerat-Jeanneret, L. und Monnet-Tschudi, F. 2002. Microglial reaction induced by noncytotoxic methylmercury treatment leads to neuroprotection via interactions with astrocytes and IL-6 release. *Glia* 37(1): 43-52
- Fiebich B. L., Butcher R. D. und Gebicke-Haerter P. J. 1998. Protein kinase C-mediated regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cultured microglial cells. *J Neuroimmunol* 92: 170-178
- Frisa, P.S. und Jacobberger, J.W. 2002. Cell density related gene expression: SV40 large T antigen levels in immortalized astrocyte lines. *BMC Cell Biol* 3: 10
- Gebicke-Haerter, P.J. 2001. Microglia in neurodegeneration: molecular aspects. *Microscopy Research and Technique* 54: 47-58
- Gegg, M.E., Beltran, B., Salas-Pino, S., Bolanos, J.P., Clark, J.B., Moncada, S. und Heales, S.J. 2003. Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/neurodegeneration? *J Neurochem.* 86(1): 228-237
- Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R.B. und Brooks, D.J. 2006. In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 21(2): 404-412
- Gong, M., Li, S.Q. und Li., F. 2011. Primary culture and purification of cerebral astrocyte of tree shrew. *Sheng Li Xue Bao* 63(1): 89-92
- Gülden, M., Jess, A., Kammann, J., Maser, E. und Seibert, H. 2010. Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time. *Free Radic Biol Med.* 49(8): 1298-1305

-
- Haghikia, A., Ladage, K., Lafênetre, P., Haghikia, A., Hinkerohe, D., Smikilla, D., Haase, C.G., Dermietzel, R., Faustmann, P.M. 2008. Intracellular application of TNF-alpha impairs cell to cell communication via gap junctions in glioma cells. *J Neurooncol.* 86(2): 143-152
- Hamby, M.E., Hewett, J.A. und Hewett, S.J. 2006. TGF-beta1 potentiates astrocytic nitric oxide production by expanding the population of astrocytes that express NOS-2. *Glia* 54: 566-577
- Hanisch, U.K. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40(2): 140-155
- Herber, D.L., Maloney, J.L., Roth, L.M., Freeman, M.J., Morgan, D. und Gordon, M.N. 2006. Diverse microglial responses after intrahippocampal administration of lipopolysaccharides. *Glia* 53: 382-391
- Hinkerohe, D., Smikalla, D., Haghikia, A., Heupel, K., Haase, C.G., Dermietzel, R. und Faustmann, P.M. 2005. Effects of cytokines on microglial phenotypes and astroglial coupling in an inflammatory coculture model. *Glia* 52(2): 85-97
- Hikal, A.H., Lipe, G.W., Slikker, W. Jr, Scallet, A.C., Ali, S.F. und Newport, G.D. 1988. Determination of amino acids in different regions of the rat brain. Application to the acute effects of tetrahydrocannabinol (THC) and trimethyltin (TMT). *Life Sci.*42(20): 2029-2035
- Hirrlinger, J., Schulz, J.B. und Dringen, R. 2002. Glutathione release from cultured brain cells: multidrug resistance protein 1 mediates the release of GSH from rat astroglial cells. *J Neurosci Res* 69: 318-326
- Iravani, M., Leung, C.C., Sadeghian, M., Haddon, C.O., Rose, S. und Jenner, P. 2005. The acute and the long-term effects of nigral lipopolysaccharide administration on dopaminergic dysfunction and glial cell activation. *European Journal of Neuroscience* 22: 317-330
- Kettenmann, H., Orkand, R.K. und Schachner, M. 1983. Coupling among identified cells in mammalian nervous system cultures. *J Neurosci* 3(3): 506-516
- Kifle, Y., Monnier, J., Chesrown, S.E., Raizada, M.K. und Nick, H.S. 1996. Regulation of the manganese superoxide dismutase and inducible nitric oxide synthase gene in rat neuronal and glial cells. *J Neurochem* 66: 2128-2135
- Kim, Y.S. und Täuber, M.G. 1996. Neurotoxicity of Glia Activated by Gram-Positive Bacterial Products Depends on Nitric Oxide Production. *Infection and Immunity* 64(8): 3148-3153
- Kuschinsky, W. 1991. Physiology of cerebral blood flow and metabolism. *Arzneimittelforschung* 41: 284-288

-
- Latini, L., Geloso, M.C., Corvino, V., Giannetti, S., Florenzano, F., Viscomi, M.T., Michetti, F. und Molinari, M. 2010. Trimethyltin intoxication up-regulates nitric oxide synthase in neurons and purinergic ionotropic receptor 2 in astrocytes in the hippocampus. *J Neurosci Res.* 88(3): 500-509
- Lee, M., Schwab, C., Yu, S., McGeer, E. und McGeer, P.L. 2009. Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide. *Neurobiol Aging* (10): 1523-1534
- Lee, M., Sparatore, A., Del Soldato, P., McGeer, E. und McGeer, P.L. 2010. Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs attenuate neuroinflammation induced by microglial and astrocytic activation. *Glia* 58(1): 103-113
- Lee, S.C., Dickson, D.W., Liu, W. und Brosnan, C.F. 1993. Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 beta and interferon-gamma. *J Neuroimmunol* 46: 19-24
- Liberto, C.M., Albrecht, P.J., Herx, L.M., Yong, V.W. und Levison, S.W. 2004. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 89(5): 1092-1100
- Lim, R. und Bosch, E.P. 1990. Isolation of Astrocytes and Schwann Cells for Culture. *Methods in Neurosciences, Volume 2, Cell Culture*: 47-55
- Linden, A., Gülden, M., Martin, H.J., Maser, E. und Seibert, H. 2008. Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells. *Toxicol In Vitro* 22(5): 1371-1376
- Liu, B. und Hong, J.S. 2003. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 304(1): 1-7
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265-275
- McCarthy, K.D. und DeVellis, J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *Journal of Cell Biology* 85: 890–902
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65(1-2): 55-63
- Moynagh, P.H. 2005. The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. *J Anat.* 207(3): 265-269
- Murphy, S. 2000. Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia.* 29: 1-13

-
- Muyderman, H., Wadey, A.L., Nilsson, M. und Sims, N.R. 2007. Mitochondrial glutathione protects against cell death induced by oxidative and nitrative stress in astrocytes. *J Neurochem.* 102(4): 1369-1382
- Naalsund, L.U., Allen, C.N. und Fonnum, F. 1985. Changes in neurobiological parameters in the hippocampus after exposure to trimethyltin. *Neurotoxicology* 6(3): 145-158
- Nakajima, K. und Kohsaka, S. 2004. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 4(1): 65-84
- Nicolai, S., Willems, J., Zwijsen, A., Van Mechelen, E., Slegers, H. 1996. Cyclic AMP-induced differentiation increases the synthesis of extracellular superoxide dismutase in rat C6 glioma. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(4): 481-6
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. und Helmchen, F. 2005. Resting Microglial Cells are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in vivo. *Science* 308(5726): 1314-1318
- Philippi, M., Vyklicky, L., Orkand, R.K. 1966. Potassium currents in cultured glia of the frog optic nerve. *Glia.* 17(1): 72-82
- Qin, L., Wu, X., Block, M.L., Liu, Y., Bresse, G.R., Hong, J.S., Knapp, D.J. und Crews, F.T. 2007. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55(5): 453-462
- Rozental, R., Campos de Carvalho, A.C. und Spray, D.C. 2000. Nervous system diseases involving gap junctions. *Brain Res Brain Res Rev.* 32(1): 189-191
- Röhl, C., Armbrust, E., Kolbe, K., Lucius, R., Maser, E., Venz, S. und Gülden, M. 2008. Activated microglia modulate astroglial enzymes involved in oxidative and inflammatory stress and increase the resistance of astrocytes to oxidative stress in Vitro. *Glia* 56(10): 1114-1126
- Röhl, C., Armbrust, E., Herbst, E., Jess, A., Gülden, M., Maser, E., Rimbach, G. und Bösch-Saadatmandi, C. 2009. Mechanisms Involved in the Modulation of Astroglial Resistance to Oxidative Stress Induced by Activated Microglia: Antioxidative Systems, Peroxide Elimination, Radical Generation, Lipid Peroxidation. *Neurotox. Res.* 17(4): 317-331
- Rostworowski, M., Balasingam, V., Chabot, S., Owens, T. und Yong, V.W. 1997. Astrogliosis in the neonatal and adult murine brain post-trauma: elevation of inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon-gamma. *Journal of Neuroscience* 17(10): 3664-3674

-
- Salvemini, D., Mollace, V., Pistelli, A., Anggard, E. und Vane, J. 1992. Cultured astrocytoma cells generate a nitric oxide-like factor from endogenous L-arginine and glyceryl trinitrate: effect of E.coli lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 106: 931-936
- San-Galli, F., Vrignaud, P., Robert, J., Coindre, J.M. und Cohadon, F. 1989. Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma in Wistar rats. *J Neurooncol.*7(3): 299-304
- Sarnowska, A. 2002. Application of organotypic hippocampal culture for study of selective neuronal death. *Folia Neuropathol.* 40(2): 101-106
- Saura, J. 2007. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *Journal of Neuroinflammation* 4: 26
- Schubert, D., Heinemann, S., Carlisle, W., Tarikas, H., Kimes, B., Patrick, J., Steinbach, J.H., Culp, W. und Brandt, B.L. 1974. Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature.* 249(454): 224-227
- Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A.J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., Jenner, P. und Marsden, C.D. 1994. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol.* 36(3): 348-355
- Stoll, G., Jander, S., Schroeter, S. 2002. Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv Exp Med Biol.* 513: 87-113
- Streit, W.J., Walter, S.A., Pennell, N.A. 1999. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol.* 57(6): 563-81
- Streit, W.J. 2005. Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 48(2): 234-239
- Virchow, R. 1859. *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre.* Berlin, Verlag von August Hirschfeld
- Viviani, B., Corsini, E., Galli, C.L. und Marinovich, M. 1998. Glia Increase Degeneration of Hippocampal Neurons through Release of Tumor Necrosis Factor- α . *Toxicology And Applied Pharmacology* 150(2): 271-276
- Vila, M., Jackson-Lewis, V., Guégan, C., Wu, D.C., Teismann, P., Choi, D.K., Tieu, K. und Przedborski, S. 2001. The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 14(4): 483-489

-
- Vogelbaum, M.A., Tong, J.X., Higashikubo, R., Gutmann, D.H. und Rich, K.M. 1998. Transfection of C6 glioma cells with the bax gene and increased sensitivity to treatment with cytosine arabinoside. *J Neurosurg.* 88(1): 99-105
- Vroegop, S.M., Decker, D.E. und Buxser, S.E. 1995. Localization of damage induced by reactive oxygen species in cultured cells. *Free Radic Biol Med.* 18(2): 141-151
- Wang, X., Michaelis, M.L. und Michaelis E.K. 2010. Functional genomics of brain aging and Alzheimer's disease: focus on selective neuronal vulnerability. *Curr Genomics* 11(8): 618-633
- Weinstein, J.R., Swarts, S., Bishop, C., Hanisch, U.K. und Möller, T. 2008. Lipopolysaccharide is a frequent and significant contaminant in microglia-activating factors. *Glia* 56(1): 16-26
- Wilde, G.J., Pringle, A.K., Wright, P. und Ianotti, F. 1997. Differential vulnerability of the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus to superoxide and hydroxyl radicals in vitro. *J Neurochem.* 69(2): 883-886
- Wu, H., Wu, T., Li, M. und Wang, J. 2012. Efficacy of the lipid-soluble iron chelator 2,2'-dipyridyl against hemorrhagic brain injury. *Neurobiol Dis.* 45(1): 388-394
- Wyss-Coray, T., Loike, J.D. und Brionne, T.C. 2003. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9: 453– 457
- Yu, W.J., Liao, S.S., Chin, W.T. und Cheng, J.T. 1999. Effect of serum in medium on the expression of inducible nitric oxide synthase and superoxide dismutases in cultured C6 glioma cells. *Neurosci Lett* 261: 37-40
- Zhang, W., Phillips, K., Wielgus, A.R., Liu, J., Albertini, A., Zucca, F.A., Faust, R., Qian, S.Y., Miller, D.S., Chignell, C.F., Wilson, B., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., Joset, D., Loike, J., Hong, J.S., Sulzer, D. und Zecca, L. 2011. Neuromelanin activates microglia and induces degeneration of dopaminergic neurons: implications for progression of Parkinson's disease. *Neurotox. Res.* 19(1): 63-72
- Zecca, L., Tampellini, D., Gatti, A., Crippa, R., Eisner, M., Sulzer, D., Ito, S., Fariello, R. und Gallorini, M. 2002. The neuromelanin of human substantia nigra and its interaction with metals. *J Neural Transm* 109(5-6): 663-672

7 Danksagung

*Keine Schuld ist dringlicher, als die, Dank zu sagen.
- Cicero -*

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Ich würde gerne Professor Dr. Jobst Sievers, Professor Dr. Ralph Lucius und Professor Dr. Edmund Maser für die Bereitstellung der Laboreinrichtungen und eines Arbeitsplatzes im anatomischen Institut sowie im Institut für Toxikologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel danken. Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. habil. Claudia Röhl, die mich in der gesamten Zeit, die die Arbeit in Anspruch nahm, hervorragend betreut und unterstützt hat. Ihr danke ich für ihre Geduld, konstruktive Kritik und Offenheit, die ich stets sehr zu schätzen gewusst habe.

Ebenfalls gilt mein Dank Monika Grell aus dem Anatomischen Institut für ihre große Hilfe und wertvollen Ratschläge im Labor, wann immer diese nötig waren. Nicht zuletzt haben mir gerade ihre Ermutigungen direkt vor Ort oft geholfen. Auch Marion Kölln möchte ich für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft danken. Natürlich gilt mein Dank auch allen anderen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Sievers/ Lucius des Anatomischen Instituts sowie denen des Instituts für Toxikologie, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Großer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer ermutigt und unterstützt haben und stets ein offenes Ohr für mich hatten. Ohne sie wären ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden.

Dafür, dass sie mich auf meinem Weg begleitet, für die nötige Abwechslung gesorgt und mich gestärkt haben, wenn ich an mir gezweifelt habe, danke ich all den lieben Menschen in meinem Leben.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Elisabeth Marie Armbrust
Geburtsdatum: 05.10.1983
Geburtsort: Rendsburg
Anschrift: Holtenuer Straße 198, 24105 Kiel
Telefonnummer: 0431- 385 800 60/ 0160- 190 72 72
E-Mail: e.armbrust@gmx.de
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1990-1994 Grundschule Owschlag
1994-2000 Realschule Owschlag
2000-2003 Fachgymnasium Elly-Heuss-Knapp Neumünster
2003 Abitur

Studium der Humanmedizin:

2003-2005 Vorklinisches Medizinstudium, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2005 Physikum/ 1. Staatsexamen, CAU zu Kiel
2005-2009 Klinisches Medizinstudium CAU zu Kiel
2006 Beginn der Doktorarbeit
07/2006 Famulatur Chirurgie, Städtisches Krankenhaus Kiel
02 und 08/07 Praxisfamulatur Innere, Allgemein- und Sportmedizin, Praxis Dr. Brandecker und Dr. Dohrmann, Kiel
03/08 Famulatur Nuklearmedizin, UKSH Campus Kiel
04/08 Famulatur Kardiologie, 1. Medizinische Klinik, UKSH Campus Kiel

08/08 – 07/09	Praktisches Jahr (Chirurgie-Tertial Kreiskrankenhaus Rendsburg, Innere-Tertial UKSH Campus Kiel, Wahlfach Allgemeinmedizin Praxis Dres. Leisner/ Klinker/ Groke, Kiel
10/2009	2. Staatsexamen
11/09 – 04/10	Auslandsaufenthalt Australien, Neuseeland, Südostasien
05/10 – 03/11	Assistenzärztin für Innere Medizin, Kompass Klinik Kiel
seit 04/11	Assistenzärztin, 1. Medizinische Klinik, Städtisches Krankenhaus Kiel sowie honorarärztliche Tätigkeit in der Kompass Klinik Kiel